(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2012-187113
(P2012-187113A)
(43)公開日　平成24年10月4日(2012.10.4)

| (51)Int.Cl. | | F I | | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|---|---|
| C12N 15/09 | (2006.01) | C12N | 15/00 | ZNAA | 2B030 |
| C12N 9/10 | (2006.01) | C12N | 9/10 | | 4B024 |
| C12N 15/113 | (2010.01) | C12N | 15/00 | G | 4B050 |
| C12N 7/00 | (2006.01) | C12N | 7/00 | | 4B065 |
| A01H 1/00 | (2006.01) | A01H | 1/00 | A | |

審査請求 有　請求項の数 20　ＯＬ　（全 47 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2012-127234 (P2012-127234)
(22)出願日　平成24年6月4日 (2012.6.4)
(62)分割の表示　特願2010-137640 (P2010-137640)の分割
原出願日　平成12年7月6日 (2000.7.6)
(31)優先権主張番号　09/348,675
(32)優先日　平成11年7月6日 (1999.7.6)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　09/597,771
(32)優先日　平成12年6月19日 (2000.6.19)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　502458132
セネスコ　テクノロジーズ，インコーポレイティド
アメリカ合衆国，ニュージャージー　０８９０１，ニュー　ブルンズウィック，スイート　４２０，ジョージ　ストリート　３０３
(74)代理人　100107456
弁理士　池田　成人
(74)代理人　100148596
弁理士　山口　和弘
(74)代理人　100123995
弁理士　野田　雅一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】植物のデオキシハイプシンシンターゼをコードするＤＮＡ、植物の真核開始因子５Ａ、トランスジェニック植物、および植物におけるセネッセンスおよびプログラムされた細胞死をコントロー

(57)【要約】
【課題】植物のデオキシハイプシンシンターゼをコードするＤＮＡ、トランスジェニック植物、および植物におけるセネッセンスおよびプログラムされた細胞死をコントロールする方法を提供することを目的とする。
【解決手段】セネッセンス誘導デオキシハイプシンシンターゼをコードする遺伝子または遺伝子フラグメントを植物ゲノムの中にアンチセンスの向きに組込むことによって、植物における、セネッセンスを含むプログラムされた細胞死の発現の調節は達成される。セネッセンス誘導デオキシハイプシンシンターゼをコードする植物遺伝子を同定し、そして単独のヌクレオチド配列を使用して、トランスジェニック植物におけるセネッセンスを変更する。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
配列番号１または配列番号９のヌクレオチド配列を含む、センネッセンス誘導デオキシハイプシンシンターゼをコードする単離されたＤＮＡ分子。
【請求項２】
前記ＤＮＡ分子が配列番号１または配列番号９のヌクレオチド配列からなる、請求項１に記載の単離されたＤＮＡ分子。
【請求項３】
配列番号２または配列番号１０を含むセネッセンス誘導デオキシハイプシンシンターゼをコードする単離されたＤＮＡ分子。
【請求項４】
配列番号１または配列番号９を含むヌクレオチド配列によってコードされたセネッセンス誘導デオキシハイプシンシンターゼ。
【請求項５】
配列番号２または配列番号１０のアミノ酸配列を含む、請求項４に記載のセネッセンス誘導デオキシハイプシンシンターゼ。
【請求項６】
（ａ）配列番号１、配列番号５、または配列番号９を含むヌクレオチド配列によってコードされたセネッセンス誘導デオキシハイプシンシンターゼ；そして
（ｂ）その中に形質転換されている植物細胞において前記デオキシハイプシンシンターゼが発現されるように、ＤＮＡ分子に作用可能に連鎖された調節配列
をコードするＤＮＡ分子を含むベクター。
【請求項７】
下記の配列を含んでなる植物細胞の形質転換用ベクター：
（ａ）（１）配列番号１、配列番号５および／または配列番号９のヌクレオチド配列を含む、センネッセンス誘導デオキシハイプシンシンターゼをコードするＤＮＡ分子の１つの鎖、または（２）センネッセンス誘導デオキシハイプシンシンターゼをコードするＤＮＡ分子によりコードされるＲＮＡ配列の全部または部分に対して実質的に相補的であるアンチセンスヌクレオチド配列；および
（ｂ）それがその中に形質転換されている植物細胞においてアンチセンスヌクレオチド配列が発現されるように、アンチセンスヌクレオチド配列に作用可能に連鎖された調節配列。
【請求項８】
調節配列がプロモーターおよび転写終結領域を含んでなる、請求項６または７に記載のベクター。
【請求項９】
調節配列が構成的プロモーターを含んでなる、請求項６または７に記載のベクター。
【請求項１０】
調節配列が植物組織特異的プロモーターを含んでなる、請求項６または７に記載のベクター。
【請求項１１】
調節配列がセネッセンス誘導植物プロモーターを含んでなる、請求項６または７に記載のベクター。
【請求項１２】
調節配列がウイルスのプロモーターを含んでなる、請求項６または７に記載のベクター。
【請求項１３】
調節配列が構成的プロモーターをさらに含んでなる、請求項１１に記載のウイルス。
【請求項１４】
（ｉ）配列番号１、配列番号５または配列番号９のヌクレオチド配列を含む植物センネッ

センス誘導デオキシハイプシンシンターゼ遺伝子のＲＮＡ転写物の全部または部分に対して相補的であるＲＮＡ分子をコードするアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド。
【請求項１５】
オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドが約６～約１００ヌクレオチドを含んでなる、請求項１４に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド。
【請求項１６】
アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドがＲＮＡ転写物の５’非コーディング領域の対応する部分に対して相補的である、請求項１４に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド。
【請求項１７】
アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドがＲＮＡ転写物の３’末端の対応する部分に対して実質的に相補的である、請求項１４に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド。
【請求項１８】
アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドがアラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）セネッセンス誘導ＤＨＳ遺伝子の３’末端に対して実質的に相補的である、請求項１４に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド。
【請求項１９】
アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドが配列番号２３に対して相補的である、請求項１８に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド。
【請求項２０】
アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドが配列番号３０に対して相補的である、請求項１８に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド。
【請求項２１】
工程：
（１）植物のゲノムの中にベクターを組込み、前記ベクターは、
（Ａ）（ｉ）配列番号１、配列番号５、または配列番号９を含むヌクレオチド配列によってコードされた内因的セネッセンス誘導デオキシハイプシンシンターゼをコードするＤＮＡ分子、または（ｉｉ）内因的セネッセンス誘導デオキシハイプシンシンターゼ遺伝子によりコードされるＲＮＡ配列、の全部または部分に対して相補的なアンチセンスヌクレオチド配列、あるいは
（Ｂ）アンチセンスヌクレオチド配列が発現されるように、アンチセンスヌクレオチド配列に作用可能に連鎖された調節配列、
を含んでなり；そして
（２）前記植物を成長させる、それにより前記アンチセンスヌクレオチド配列は転写され、前記ＲＮＡ配列に結合し、それによりセネッセンス誘導デオキシハイプシンシンターゼ遺伝子の発現は阻害される；
を含んでなる、植物における内因的セネッセンス誘導デオキシハイプシンシンターゼの発現を阻害する方法。
【請求項２２】
アンチセンスヌクレオチド配列がそれに対して相補的であるＤＮＡの部分またはＲＮＡの部分が５’非コーディング配列または３’コーディング配列および／または非コーディング配列を含んでなる、請求項２１に記載の方法。
【請求項２３】
アンチセンスヌクレオチド配列が配列番号２３に対して実質的に相補的である、請求項２１に記載の方法。
【請求項２４】

アンチセンスヌクレオチド配列が配列番号３０に対して実質的に相補的である、請求項２１に記載の方法。
【請求項２５】
前記阻害が植物の変更されたセネッセンスを生ずる、請求項２１に記載の方法。
【請求項２６】
前記阻害が環境ストレス誘導および／または病原体誘導セネッセンスに対する前記植物の耐性を増加させる、請求項２１に記載の方法。
【請求項２７】
前記阻害が前記植物のバイオマスを増加させる、請求項２１に記載の方法。
【請求項２８】
前記阻害が前記植物における果実の軟化および腐敗を遅延させる、請求項２１に記載の方法。
【請求項２９】
前記阻害が前記植物の種子収量を増加させる、請求項２１に記載の方法。
【請求項３０】
調節配列が植物において活性である構成的プロモーターを含んでなる、請求項２１に記載の方法。
【請求項３１】
調節配列が植物において活性である組織特異的プロモーターを含んでなる、請求項２１に記載の方法。
【請求項３２】
調節配列が植物において活性であるセネッセンス誘導プロモーターを含んでなる、請求項２１に記載の方法。
【請求項３３】
前記植物が結実植物、顕花植物、野菜、栽培作物の植物および森林種から成る群より選択される、請求項２１に記載の方法。
【請求項３４】
植物がトマトである、請求項２１に記載の方法。
【請求項３５】
植物が顕花植物である、請求項２１に記載の方法。
【請求項３６】
工程：
（１）植物の少なくとも１つの細胞のゲノムび中にベクターを組込み、前記ベクターは、
（Ａ）外因的セネッセンス誘導デオキシハイプシンシンターゼをコードする単離されたＤＮＡ分子、ここで前記ＤＮＡ分子は配列番号１、配列番号５、または配列番号９のヌクレオチド配列を含む；および
（Ｂ）それによりコードされる外因的セネッセンス誘導デオキシハイプシンシンターゼが発現されるように、ＤＮＡ分子に作用可能に連鎖された調節配列；を含んでなる；そして
（２）前記植物を成長させる、それにより前記ＤＮＡ分子は過剰発現され、そして内因的セネッセンス誘導デオキシハイプシンシンターゼ遺伝子は外因的セネッセンス誘導デオキシハイプシンシンターゼにより阻害される；
を含んでなる、植物細胞における内因的セネッセンス誘導デオキシハイプシンシンターゼ遺伝子の発現を阻害する方法。
【請求項３７】
調節配列が構成的プロモーターを含んでなる、請求項３６に記載の方法。
【請求項３８】
工程：
（１）植物のゲノムの中にベクターを組込み、前記ベクターは、

（Ａ）（ｉ）内因的セネッセンス誘導デオキシハイプシンシンターゼをコードするＤＮＡ分子、ここで前記内因的セネッセンス誘導デオキシハイプシンシンターゼをコードするＤＮＡは配列番号１、配列番号５、または配列番号９のヌクレオチド配列を含む、または（ｉｉ）内因的セネッセンス誘導デオキシハイプシンシンターゼ遺伝子をコードするＲＮＡ配列、の全部または部分に対して相補的であるアンチセンスヌクレオチド配列、
（Ｂ）アンチセンスヌクレオチド配列が発現されるように、アンチセンスヌクレオチド配列に作用可能に連鎖された調節配列、を含んでなり；そして
（２）前記植物を成長させる、それにより前記アンチセンスヌクレオチド配列は転写され、前記ＲＮＡ配列に結合し、そして前記デオキシハイプシンシンターゼの発現は阻害される；
を含んでなる、植物における年齢に関係するセネッセンスおよび／または環境的ストレスに関係するセネッセンスを変更する方法。

【請求項３９】
請求項６もしくは７に記載のベクター、または前記ベクターの組合わせを含んでなるトランスジェニック植物細胞。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
発明の分野
本発明は、セネッセンス誘導発現を示す植物ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに関する。本発明は、また、アンチセンスの向きでポリヌクレオチドを含有するトランスジェニック植物、および植物における、セネッセンスを包含する、プログラムされた細胞死をコントロールする方法に関する。さらに詳しくは、本発明は、その発現がセネッセンスを包含するプログラムされた細胞死の開始により誘導される、セネッセンス誘導植物デオキシハイプシンシンターゼ遺伝子およびセネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａ遺伝子、および植物におけるプログラムされた細胞死およびセネッセンスをコントロールするために、デオキシハイプシンシンターゼ遺伝子およびｅｌＦ－５Ａ遺伝子を、単独または組合わせで、使用することに関する。

【背景技術】
【０００２】
先行技術の説明
セネッセンスは植物の寿命における生物学的発生の末期である。セネッセンスは死の前兆であり、全植物、器官、花および果実、組織および個々の細胞を包含する生物学的体制化の種々のレベルにおいて起こる。
【０００３】
セネッセンスの開始は、内部および外部の両方の異なる因子により誘導されることがある。セネッセンスは、植物または植物組織、例えば、果実、花および葉の寿命において、複雑な、高度に調節された発生段階である。セネッセンスは、細胞膜および高分子の同調的破壊、および代謝物質の植物の他の部分への引き続く移動化を生ずる。
【０００４】
正常の植物発生の間に起こるプログラムされたセネッセンスに加えて、細胞および組織の死および続いて起こる代謝物質の再移動化は、外部の、環境的因子に対する同調的応答として起こる。また壊死またはアポトーシスと呼ばれる、セネッセンスの早期の開始を誘導する外部の因子は、環境的ストレス、例えば、温度、乾燥、劣った光または栄養の供給、ならびに病原体の攻撃を包含する。環境的ストレスに暴露された植物組織は、また、ストレスエチレンとして普通に知られているエチレンを産生する（Ｂｕｃｈａｎａｎ－Ｗｏｌｌａｓｔｏｎ、Ｖ．、１９９７、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｂｏｔａｎｙ、４８：１８１－１９９；Ｗｒｉｇｈｔ、Ｍ．、１９７４、Ｐｌａｎｔ、１２０：６３－６９）。エチレンはある植物においてセネッセンスを引き起こすことが知られている。
【０００５】

セネッセンスは受動的プロセスではなく、むしろ、特異的遺伝子の共役発現を包含する、活性的に調節されたプロセスである。セネッセンスの間に、全ＲＮＡのレベルは減少し、多数の遺伝子の発現はスイッチが切られる（Ｂａｔｅ他、１９９１、Ｊ．Ｅｘｐｅｒ．Ｂｏｔａｎｙ、４２：８０１－１１；Ｈｅｎｓｅｌ他、１９９３、Ｔｈｅ　Ｐｌａｎｔ　Ｃｅｌｌ、５：５５３－６４）。しかしながら、セネッセンスプロセスが核遺伝子の新規な転写に依存するという証拠が増加している。例えば、セネッセンスはｍＲＮＡおよびタンパク質合成および除核のインヒビターによりブロックされる。ｉｎ　ｖｉｔｒｏ翻訳実験のためにセネッシング葉および緑色の葉からのｍＲＮＡを使用する分子の研究において、セネッシング葉において葉タンパク質産物の変化したパターンが示された（Ｔｈｏｍａｓ他、１９９２、Ｊ．Ｐｌａｎｔ　Ｐｈｙｓｉｏｌ．、１３９：４０３－１２）。

【０００６】

ディファレンシャルスクリーニングおよび差引きハイブリダイゼーション技術を使用して、単子葉植物および双子葉植物、例えば、アラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）、トウモロコシ、キュウリ、アスパラガス、トマト、イネおよびジャガイモを包含する、ある範囲の異なる植物から、セネッセンス誘導遺伝子を表す、多数のｃＤＮＡクローンが同定されてきている。セネッセンスの間に特異的に発現される遺伝子の同定は、セネッセンスの新たな転写を進行させるための要件の客観的な証拠である。

【０００７】

セネッセンスの間に起こる事象は高度に同調して、壊死および死が起こる前の細胞成分の最大の使用を可能とする。特異的シグナルの感知および遺伝子発現のカスケードの誘導を包含する複雑な相互作用が起こって、このプロセスを調節するに違いない。セネッセンス関係タンパク質をコードする遺伝子の発現は、多分、普通のアクチベータータンパク質を介して調節され、引き続いて、アクチベータータンパク質はホルモンのシグナルにより直接的または間接的に活性化される。このプロセスの初期のシグナリングまたは引き続く同調に関係するメカニズムについてほとんど知られていない。

【０００８】

同調的遺伝子発現は、開始因子を包含する、転写および翻訳に関係する因子を必要とする。翻訳開始因子の遺伝子は、植物を包含する、種々の生物において単離され、特性決定されてきている。真核生物の翻訳開始因子５Ａ（ｅｌＦ－５Ａ）はほぼ１７ｋＤａのサイズの必須タンパク質因子であり、これは真核細胞のタンパク質系合成の開始に関係する。それはｅｌＦ－５Ａの中にのみ存在することが知られているハイプシン［Ｎ－（４－アミノ－２－ヒドロキシブチル）リシン］、すなわち、ユニークな修飾されたアミノ酸、の存在により特徴づけられる。ポリアミン、スペリミジン、からｅｌＦ－５Ａ中の特定のリシン残基の側鎖アミノ基へのブチルアミノ基の転移およびヒドロキシル化を介して翻訳後にハイプシンは形成される。

【０００９】

ｅｌＦ－５Ａの活性化は、スペリミジンのブチルアミン残基のｅｌＦ－５Ａのリシンへの転移、ハイプシンの形成およびｅｌＦ－５Ａの活性化を包含する。真核生物において、デオキソハイプシンシンターゼ（ＤＨＳ）はｅｌＦ－５Ａにおけるハイプシンの翻訳後の合成を仲介する。対応するＤＨＳ遺伝子は植物において同定されてきていないが、植物のｅｌＦ－５Ａはハイプシンを含有することが知られている。ハイプシンの修飾は、メチオニル－プロマイシンアッセイを使用するｉｎ　ｖｉｔｒｏ　ｅｌＦ－５Ａ活性のために必須であることが示された。

【００１０】

ハイプシンはｅｌＦ－５Ａの中にユニークに存在し、すべての真核生物、いくつかの始原細菌（これらは真核生物に関係するように思われる）の中に見出されるが、真性細菌の中に見出されない。そのうえ、ｅｌＦ－５Ａのアミノ酸配列は、特にハイプシン残基を取り囲む領域において、高度に保存され、ｅｌＦ－５Ａおよびその活性化タンパク質、デオキシハイプシンシンターゼは真核細胞の生理学において基本的に重要な工程を実行することを示唆する（Ｊｏｅ他、ＪＢＣ、２７０：２２３８６－２２３９２）。

【００１１】
ｅｌＦ－５Ａは、ヒト、アルファルファ、スライムのカビ、ニューロスポラ・クラッサ（Ｎｅｕｒｏｓｐｏｒａ　ｃｒａｓｓａ）、タバコおよび酵母からクローニングされた。ウサギ網状赤血球ライゼイトのリボソームからの単離、およびメチオニン－プロマイシン合成を刺激するｉｎ　ｖｉｔｒｏ活性に基づいて、ｅｌＦ－５Ａは本来一般的翻訳開始因子として同定された。しかしながら、ｅｌＦ－５Ａは包括的タンパク質合成の翻訳開始因子ではなく、むしろｍＲＮＡ集団の特定のサブセットの翻訳を促進する働きをすることが、より最近のデータにより示された。
【００１２】
例えば、ｅｌＦ－５Ａの１または２以上のイソ型は細胞増殖に関係するｍＲＮＡのサブセットの翻訳の仲介において必須の役割を演ずるということを示す強い証拠が、動物細胞および酵母を使用する実験から得られた。酵母において２つのイソ型が存在し、そして両方の遺伝子がサイレントである場合、細胞は分裂することができない（Ｐａｒｋ他、Ｂｉｏｌ．　Ｓｉｇｎａｌｓ、６：１１５－１２３、１９９７）。同様に、ｅｌＦ－５Ａを活性化する酵母デオキシハイプシンシンターゼの発現をサイレンスすると、細胞分裂はブロックされる。事実、過増殖状態の治療において重要性を有すると思われるデオキシハイプシンシンターゼのインヒビターが開発された（Ｗｏｌｆｆ他、ＪＢＣ、２７２：１５８６５－１５８７１、１９９７）。
【００１３】
他の研究において、ｅｌＦ－５Ａの他のイソ型がＨＩＶ－１の複製におけるＲｅｖ機能またはＨＴＬＶ　Ｖ複製におけるＲｅｘ機能のために必須であるということが示された（Ｐａｒｋ他、Ｂｉｏｌ．Ｓｉｇｎａｌｓ、６：１１５－１２３、１９９７）。また、タバコの中に少なくとも２つの発現されたｅｌＦ－５Ａ遺伝子が存在する。それらの両方は検査したすべての組織において発現されるが、各遺伝子は明確な発現パターンを有し、多分特定の転写物の翻訳を調節することを、遺伝子特異的プローブは示す（Ｃｈａｍｏｔ他、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．、２０：６２５－６６９、１９９２）。
【００１４】
デオキシハイプシンシンターゼは、ラット精巣、ＨｅＬａ細胞、ニューロスポラ・クラッサ（Ｎｅｕｒｏｓｐｏｒａ　ｃｒａｓｓａ）および酵母から精製された。デオキシハイプシンシンターゼのアミノ酸配列は高度に保存され、そして異なる種からの酵素は同様な、触媒的性質を共有し、異種ｅｌＦ－５Ａ前駆体と交差種反応性を示す（Ｐａｒｋ他、Ｂｉｏｌ．Ｓｉｇｎａｌｓ、６：１１５－１２３、１９９７）。
【００１５】
植物ポリアミンは、花の誘導、胚形成、病原体耐性、細胞の成長、分化および分裂を包含する、広範な種類の生理学的作用に関係づけられた（Ｅｖａｎｓ他、１９８９、Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｐｌａｎｔ　Ｐｈｙｓｉｏｌ．Ｐｌａｎｔ　Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、４０：２３５－２６９；およびＧａｌｓｔｏｎ他、１９９０、Ｐｌａｎｔ　Ｐｈｙｓｉｏｌ．、９４：４０６－１０）。ｅｌＦ－５Ａはポリアミンがその作用を発揮するとき通過する中間物であることが示唆された（Ｃｈａｍｏｔ他、１９９２、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．、２０（４）：６６５－６９）。
【００１６】
タバコ（Ｎｉｃｏｔｉａｎａ）からのｅｌＦ－５Ａのイソ型をコードする２つの遺伝子が同定された（ＮｅｌＦ－５Ａ１およびＮｅｌＦ－５Ａ２）（Ｃｈａｍｏｔ他、１９９２、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．、２０（４）：６６５－６９）。これらの遺伝子は非常に類似することが示された。一方の遺伝子はｍＲＮＡレベルで構成的に発現されるが、他方の発現パターンは光合成活性の存在または非存在と相関する。遺伝子構造およびゲノムサザンマッピングに基づいて、タバコの中にＮｅｌＦ－５Ａの多重遺伝子ファミリーが存在することが示唆された。セネッセンス／壊死特異的ｍＲＮＡ転写物のサブセットの翻訳を調節するｅｌＦ－５Ａのイソ型が存在すると思われる。
【００１７】

現在、内部または外部の、例えば、環境的ストレスの、因子により引き起こされるプログラムされた細胞死（セネッセンスを包含する）の開始をコントロールする、広く適用可能な方法は存在しない。したがって、すべてのタイプの植物に適用可能でありかつセネッセンスに導く事象のカスケードにおいて最も早い段階において有効である、セネッセンスをモジュレートする技術を開発することが重要である。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【００１８】

発明の要約

本発明は、トマトのセネッセンス誘導デオキシハイプシンシンターゼ（ＤＨＳ）をコードする全長のｃＤＮＡクローン、ならびにアラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）の葉およびカーネーションの花弁からの全長のセネッセンス誘導ＤＨＳ　ｃＤＮＡクローンの発見およびクローニングに基づく。ヌクレオチド配列および対応するアミノ酸配列が本明細書において開示される。

【００１９】

本発明は、また、一部分、トマト、アラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）およびカーネーションからのセネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａ遺伝子をコードする全長のｃＤＮＡクローンの発見およびクローニングに基づく。ｅｌＦ－５Ａ　ｃＤＮＡの各々のヌクレオチド配列および対応するアミノ酸配列が本明細書において開示される。

【００２０】

本発明は、年齢に関係するセネッセンスまたは環境的ストレス誘導セネッセンスである、セネッセンスの開始をコントロールするために、植物を遺伝的に修飾する方法を提供する。本発明のセネッセンス誘導ＤＨＳヌクレオチド配列、それらのフラグメント、またはこのようなフラグメントの組合わせを植物細胞の中に逆向きに導入して、内因的セネッセンス誘導ＤＨＳ遺伝子の発現を阻害し、これにより内因的セネッセンス誘導ＤＨＳタンパク質のレベルを減少し、かつｅｌＦ－５Ａの活性化および引き続くセネッセンスを仲介する遺伝子の発現を減少および／または防止する。

【００２１】

本発明の他の面において、本発明のセネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａヌクレオチド配列、それらのフラグメント、またはこのようなフラグメントの組合わせを植物細胞の中に逆向きに導入して、内因的セネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａ遺伝子の発現を阻害し、これにより内因的セネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａタンパク質のレベルを減少し、かつｅｌＦ－５Ａの活性化および引き続くセネッセンスを仲介する遺伝子の発現を減少および／または防止する。あるいは、ＤＨＳ配列およびｅｌＦ－５Ａ配列の両方を一緒に使用して、内因的ＤＨＳおよびｅｌＦ－５Ａタンパク質のレベルを減少させる。

【００２２】

なお他の面において、本発明は、本発明のセネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａヌクレオチド配列と本発明のセネッセンス誘導ＤＨＳヌクレオチド配列との組合わせを植物細胞の中に逆向きに導入して、内因的セネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａ遺伝子およびセネッセンス誘導ＤＨＳ遺伝子の発現を阻害し、これにより内因的セネッセンス誘導ＤＨＳタンパク質のレベルを減少し、かつｅｌＦ－５Ａの活性化および引き続くセネッセンスを仲介する遺伝子の発現を減少および／または防止することによって、年齢に関係するセネッセンスまたは環境的ストレス誘導セネッセンスである、セネッセンスの開始をコントロールするために、植物を遺伝的に修飾する方法に関する。

【００２３】

本発明の方法を使用して、トランスジェニック植物を発生させ、成長、発生、および自然のセネッセンスまたは早期に誘導されたセネッセンスについてモニターする。セネッセンス誘導ＤＨＳ、セネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａまたは両方のレベルが減少するために延長した寿命または棚持ち（例えば、花の寿命の延長、果実または野菜の腐敗の減少、バイオマスの増強、種子収量の増加、種子老化の減少および／または葉の黄色化の減少）を示

す植物または植物の分離した部分（例えば、挿木、花、野菜、果実、種子または葉）が、葉の黄色化の減少、花弁の離層の減少、輸送および貯蔵中の果実および野菜の腐敗の減少を包含する改良された性質を有する、所望の産物として選択される。これらのよりすぐれた植物を増殖させる。同様に、環境的ストレスに対する抵抗性が増加した、例えば、低温（冷却）、乾燥、感染、およびその他に対する感受性が減少した、および／または病原体に対する抵抗性が増加した植物がよりすぐれた産物として選択される。

【００２４】

１つの面において、本発明は、セネッセンス誘導ＤＨＳをコードする単離されたＤＮＡ分子に関し、ここでＤＮＡ分子は配列番号１とハイブリダイゼーションするか、あるいは配列番号１とハイブリダイゼーションする単離されたＤＮＡ分子の機能的誘導体とハイブリダイゼーションする。本発明のこの面の１つの態様において、単離されたＤＮＡ分子は配列番号１のヌクレオチド配列、すなわち、配列番号１に対して１００％の相補性（配列同一性）を有する。

【００２５】

本発明は、また、セネッセンス誘導ＤＨＳをコードする単離されたＤＮＡ分子に関し、ここでＤＮＡ分子は配列番号９とハイブリダイゼーションするか、あるいは配列番号９とハイブリダイゼーションする単離されたＤＮＡ分子の機能的誘導体とハイブリダイゼーションする。本発明のこの面の１つの態様において、単離されたＤＮＡ分子は配列番号９のヌクレオチド配列、すなわち、配列番号９に対して１００％の相補性（配列同一性）を有する。

【００２６】

本発明は、また、セネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａをコードする単離されたＤＮＡ分子に関し、ここでＤＮＡ分子は配列番号１１、配列番号１３または配列番号１５とハイブリダイゼーションするか、あるいは配列番号１１、配列番号１３または配列番号１５とハイブリダイゼーションする単離されたＤＮＡ分子の機能的誘導体とハイブリダイゼーションする。本発明のこの面の１つの態様において、単離されたＤＮＡ分子は配列番号１１、配列番号１３または配列番号１５のヌクレオチド配列、すなわち、配列番号１１、配列番号１３または配列番号１５に対して１００％の相補性（配列同一性）を有する。

【００２７】

本発明の他の態様において、本明細書において記載するＤＮＡ分子によりコードされる単離されたタンパク質、またはその機能的誘導体が提供される。好ましいタンパク質は配列番号２のアミノ酸配列を有するか、あるいはその機能的誘導体である。他の好ましいタンパク質は配列番号１０のアミノ酸配列を有するか、あるいはその機能的誘導体である。本発明の他の好ましいタンパク質は、配列番号１２、配列番号１４または配列番号１６のアミノ酸配列を有する。

【００２８】

また、前述のＤＮＡ分子のＲＮＡ転写物の対応する部分に対して相補的であるＲＮＡ分子をコードするアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドが提供され、ここで内因的セネッセンス誘導ＤＨＳの発現が変更されるように、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドはＲＮＡ転写物とハイブリダイゼーションする。本発明のこの面の他の態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドは、内因的セネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａの発現が変更されるように、前述のＤＮＡ分子のＲＮＡ転写物の対応する部分に対してハイブリダイゼーションするＲＮＡ分子である。アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドは全長であるか、あるいは好ましくは約６～約１００ヌクレオチドを有する。

【００２９】

アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドはセネッセンス誘導ＤＨＳをコードするＤＮＡ分子の１つ鎖の対応する部分に対して実質的に相補的であることができ、ここでセネッセンス誘導ＤＨＳをコードするＤＮＡ分子は配列番号１、配列番号５、配列番号９、またはそれらの組合わせとハイブリダイゼーションするか、あるいはセネッセ

ンス誘導ＤＨＳをコードするＤＮＡ分子によりコードされるＲＮＡ配列の少なくとも対応する部分に対して実質的に相補的である。

【００３０】

本発明の１つの態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドはヌクレオチド配列番号１、配列番号５、配列番号９の１つ鎖の対応する部分またはそれらの組合わせに対して実質的に相補的であるか、または配列番号１、配列番号５、配列番号９から転写されたＲＮＡ転写物またはそれらの組合わせに対して実質的に相補的である。他の態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドはセネッセンス誘導ＤＨＳをコードするＤＮＡ分子の１つ鎖の５’非コーディング部分または３’部分の対応する部分に対して実質的に相補的であり、ここでＤＮＡ分子は配列番号１、配列番号５、配列番号９またはそれらの組合わせとハイブリダイゼーションする。

【００３１】

あるいは、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドはセネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａをコードするｄｎａ分子の１つ鎖の対応する部分に対して実質的に相補的であることができ、ここでセネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａをコードするｄｎａ分子は配列番号１１、配列番号１３、配列番号１５、またはそれらの任意の組合わせとハイブリダイゼーションするか、あるいは配列番号１１、配列番号１３または配列番号１５から転写されたＲＮＡ配列の少なくとも対応する部分に対して実質的に相補的である。

【００３２】

本発明の１つの態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドはヌクレオチド配列の配列番号１１、配列番号１３、配列番号１５またはそれらの組合わせの１つ鎖の対応する部分に対して実質的に相補的であるか、あるいはコードされるＲＮＡ転写物はセネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａをコードするｄｎａ分子によりコードされる調節配列の対応する部分に対して実質的に相補的である。他の態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドはセネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａをコードするｄｎａ分子の１つ鎖の５’非コーディング領域または３’領域の対応する部分に対して実質的に相補的であり、ここでＤＮＡ分子は配列番号１１、配列番号１３、配列番号１５またはそれらの組合わせとハイブリダイゼーションする。

【００３３】

さらに、本発明は、下記の配列を含んでなる植物細胞の形質転換用ベクターに関する：

（ａ）（１）セネッセンス誘導ＤＨＳをコードするＤＮＡ分子の１つの鎖の対応する部分、ここでセネッセンス誘導ＤＨＳをコードするＤＮＡ分子は配列番号１、配列番号５または配列番号９とハイブリダイゼーションする、または（２）セネッセンス誘導ＤＨＳをコードするＤＮＡ分子によりコードされるＲＮＡ配列の対応する部分、に対して実質的に相補的であるアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド；および

（ｂ）それがその中に形質転換されている植物細胞においてアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドが発現されるように、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドに作用可能に連鎖された調節配列。

【００３４】

さらに、本発明は、下記の配列を含んでなる植物細胞の形質転換用ベクターに関する：

（ａ）（１）セネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａをコードするｄｎａ分子の１つの鎖の対応する部分、ここでセネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａをコードするｄｎａ分子は配列番号１１、配列番号１３、配列番号１５とハイブリダイゼーションする、または（２）セネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａをコードするｄｎａ分子によりコードされるＲＮＡ配列の対応する部分、に対して実質的に相補的であるアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド；および

（ｂ）それがその中に形質転換されている植物細胞においてアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドが発現されるように、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドに作用可能に連鎖された調節配列。

【００３５】

調節配列は形質転換された細胞中で機能的であるプロモーターを含み、このプロモーターは誘導可能または構成的であることができる。必要に応じて、調節配列はポリアデニル化シグナルを含む。

【００３６】

本発明は、また、前述のベクターまたはベクターの組合わせで形質転換された植物細胞、このような細胞から発生した小植物または成熟植物、またはこのような小植物または成熟植物の植物部分を提供する。

【００３７】

本発明は、下記の工程を含んでなる、非修飾植物に比較して、セネッセンス誘導ＤＨＳ、セネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａまたは両方のレベルが減少した植物を産生する方法に関する：

（１）植物を前述のベクターまたはベクターの組合わせで形質転換し；

（２）植物を少なくとも小植物段階に成長させ；

（３）形質転換された植物または小植物をセネッセンス誘導ＤＨＳ活性および／またはｅｌＦ－５Ａ活性の変更および／またはセネッセンスの変更および／または環境的ストレス誘導セネッセンスおよび／または病原体誘導セネッセンスおよび／またはエチレン誘導セネッセンスの変更についてアッセイし；そして

（４）非形質転換植物に比較して、セネッセンス誘導ＤＨＳ活性が変更されたおよび／またはｅｌＦ－５Ａ活性が減少したおよび／またはセネッセンスが変更したおよび／または環境的ストレス誘導セネッセンスが変更されたおよび／または病原体誘導セネッセンスおよび／またはエチレン誘導セネッセンスが変更した植物を選択し、そして成長させる。

【００３８】

前述したように産生された植物、または子孫、ハイブリッド、クローンまたは植物部分は、好ましくは、セネッセンス誘導ＤＨＳの発現の減少、セネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａ活性の減少、または両方およびセネッセンスの遅延および／または環境的ストレス誘導セネッセンスおよび／または病原体誘導セネッセンスおよび／またはエチレン誘導セネッセンスの遅延を示す。

【００３９】

さらに、本発明は、下記の工程を含んでなる植物における内因的セネッセンス誘導ＤＨＳの発現を阻害する方法に関する：

（１）植物のゲノムの中にベクターを組込み、前記ベクターは、

（Ａ）（ｉ）内因的セネッセンス誘導ＤＨＳをコードするＤＮＡ分子の１つの鎖の対応する部分、ここで内因的セネッセンス誘導ＤＨＳをコードするＤＮＡ分子は配列番号１、配列番号５および／または配列番号９とハイブリダイゼーションする、または（ｉｉ）内因的セネッセンス誘導ＤＨＳ遺伝子によりコードされるＲＮＡ配列の少なくとも一部分、に対して相補的であるアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド、および

（Ｂ）アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドが発現されるように、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドに作用可能に連鎖された調節配列、

を含んでなり；そして

（２）前記植物を成長させる、それにより前記アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドは転写され、前記内因的ＲＮＡ配列に結合し、それにより前記セネッセンス誘導ＤＨＳ遺伝子の発現は阻害される。

【００４０】

本発明は、さらに、下記の工程を含んでなる植物における内因的セネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａの発現を阻害する方法に関する：

（１）植物のゲノムの中にベクターを組込み、前記ベクターは、

（Ａ）（ｉ）内因的セネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａをコードするｄｎａ分子の１つの鎖の対応する部分、ここで内因的セネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａをコードするｄｎａ分子は配列番号１１、配列番号１５、配列番号１７またはそれらの組合わせとハイブリダイゼー

ションする、または（ｉｉ）内因的セネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａ遺伝子によりコードされるＲＮＡ配列の少なくとも一部分、に対して相補的であるアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド、および

【００４１】

（Ｂ）アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドが発現されるように、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドに作用可能に連鎖された調節配列、

を含んでなり；そして

（２）前記植物を成長させる、それにより前記アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドは転写され、前記内因的ＲＮＡ配列に結合し、それにより前記セネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａ遺伝子の発現は阻害される。

【図面の簡単な説明】

【００４２】

【図１】第１図は、セネッセンス誘導トマト葉ＤＨＳ　ｃＤＮＡ配列（配列番号１）およびトマト葉ｃＤＮＡライブラリーから得られた誘導アミノ酸配列（配列番号２）のヌクレオチド配列を描写する。

【図２Ａ】第２Ａ図は、アラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）遺伝子バンクにおいてトマトＤＨＳ配列を非同定ゲノム配列と整列させることによって得られたアラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）ＤＨＳ遺伝子のヌクレオチド配列を描写する（ｈｔｔｐ：／／ｇｅｎｏｍｅ－ｗｗｗ．ｓｔａｎｆｏｒｄ．ｅｄｕ／Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ／）（配列番号５）。アミノ酸配列間のギャップは予測されたイントロンである。

【図２Ｂ】第２Ｂ図は、誘導アラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）ＤＨＳアミノ酸配列（配列番号６）を描写する。

【図２Ｃ】第２Ｃ図は、ＰＣＲにより得られた６００塩基対のセネッセンス誘導アラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）ＤＨＳ　ｃＤＮＡのヌクレオチド配列を描写する。

【図２Ｄ】第２Ｄ図は、セネッセンス誘導アラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）ＤＨＳ　ｃＤＮＡフラグメントの誘導アミノ酸配列を描写する。

【図３】第３図は、誘導全長トマト葉セネッセンス誘導ＤＨＳアミノ酸配列（配列番号２）および誘導全長アラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）セネッセンス誘導ＤＨＳアミノ酸配列と、ヒト、酵母、菌類、および始原細菌（Ａｒｃｈａｅｏｂａｃｔｅｒｉａ）のＤＨＳタンパク質の配列との整列である。配列の３つまたは４つの間で同一のアミノ酸はボックスで囲まれている。

【図４】第４図は、トマトＤＨＳ　ｃＤＮＡの制限地図である。

【図５】第５図は、トマト葉から単離され、$^{32}$Ｐ－ｄＣＴＰ標識化全長トマトセネッセンス誘導ＤＨＳ　ｃＤＮＡでプロービングしたゲノムＤＮＡのサザンブロットである。

【００４３】

【図６】第６図は、発生の異なる段階においてトマト花から単離されたＲＮＡのノザンブロットである。第６Ａ図は、全ＲＮＡの臭化エチジウム染色ゲルである。各レーンは１０μｇのＲＮＡを含有する。第６Ｂ図は、$^{32}$Ｐ－ｄＣＴＰ標識化全長トマトセネッセンス誘導ＤＨＳ　ｃＤＮＡでプロービングしたノザンブロットのオートラジオグラフである。

【図７】第７図は、$^{32}$Ｐ－ｄＣＴＰ標識化全長トマトセネッセンス誘導ＤＨＳ　ｃＤＮＡでプロービングした成熟の種々の段階においてトマト果実から単離されたＲＮＡのノザンブロットである。各レーンは１０μｇのＲＮＡを含有する。

【図８】第８図は、２Ｍのソルビトールで６時間処理して乾燥ストレスさせたトマト葉から単離されたＲＮＡのノザンブロットである。このブロットを$^{32}$Ｐ－ｄＣＴＰ標識化全長トマトセネッセンス誘導ＤＨＳ　ｃＤＮＡでプロービングした。

【図９】第９図は、冷却温度に暴露したトマト葉から単離されたＲＮＡのノザンブロットである。第９Ａ図は、全ＲＮＡの臭化エチジウム染色ゲルである。第９Ｂ図は、$^{32}$Ｐ－ｄＣＴＰ標識化全長トマトセネッセンス誘導ＤＨＳ　ｃＤＮＡでプロービングしたノザンブロットのオートラジオグラフである。第９Ｃ図は、葉透析質の導電率として測定した、対

応する漏出データを示す。
【図１０】第１０図は、ポリＡテイルおよび５’末端非コーディング領域を含まない、カーネーション全長（１３８４塩基対）ｃＤＮＡクローンのヌクレオチド配列（配列番号９）である。誘導アミノ酸配列はヌクレオチド配列の下に示されている（３７３アミノ酸）（配列番号１０）。
【００４４】
【図１１】第１１図は、$^{32}$Ｐ－ｄＣＴＰ標識化全長アラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）センネッセンス誘導ＤＨＳ　ｃＤＮＡでプロービングしたセネッセンシングアラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）葉からの全ＲＮＡのノザンブロットである。オートラジオグラフは上部に存在し、エチジウム染色ゲルは下に存在する。
【図１２】第１２図は、種々の段階におけるカーネーション花から単離された全ＲＮＡのノザンブロットである。このブロットを$^{32}$Ｐ－ｄＣＴＰ標識化全長カーネーションセネッセンス誘導ＤＨＳ　ｃＤＮＡでプロービングした。オートラジオグラフは上部に存在し、エチジウム染色ゲルは下に存在する。
【図１３】第１３図は、トマト果実セネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａ遺伝子のヌクレオチド（上部）（配列番号１１）および誘導アミノ酸（下部）（配列番号１２）配列である。
【図１４】第１４図は、カーネーションセネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａ遺伝子のヌクレオチド（上部）（配列番号１３）および誘導アミノ酸（下部）（配列番号１４）配列である。
【図１５】第１５図は、アラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）セネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａ遺伝子のヌクレオチド（上部）（配列番号１５）および誘導アミノ酸（下部）（配列番号１６）配列である。
【００４５】
【図１６】第１６図は、種々の発生段階におけるアラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）植物から単離された全ＲＮＡのノザンブロットである。このブロットを$^{32}$Ｐ－ｄＣＴＰ標識化全長アラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）センネッセンス誘導ＤＨＳ　ｃＤＮＡおよび全長センネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａでプロービングした。オートラジオグラフは上部に存在し、エチジウム染色ゲルは下に存在する。
【図１７】第１７図は、発生のブレーカー（ｂｒａｋｅｒ）（ＢＫ）、レッド－ファーム（ｒｅｄ－ｆｉｒｍ）（ＲＦ）およびレッド－ソフト（ｒｅｄ－ｓｏｆｔ）（ＲＳ）段階におけるトマト果実から単離された全ＲＮＡのノザンブロットである。このブロットを$^{32}$Ｐ－ｄＣＴＰ標識化全長センネッセンス誘導ＤＨＳ　ｃＤＮＡおよび全長センネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａでプロービングした。ＤＨＳおよびｅｌＦ－５Ａは果実成熟と一致してレッド－ソフト果実において平行にアップレギュレートされる。オートラジオグラフは上部に存在し、エチジウム染色ゲルは下に存在する。
【図１８】第１８図は、ソルビトールで処理して乾燥ストレスを誘導したトマトの葉から単離された全ＲＮＡのノザンブロットである。Ｃは対照であり；Ｓはソルビトール処理である。このブロットを$^{32}$Ｐ－ｄＣＴＰ標識化全長センネッセンス誘導ＤＨＳ　ｃＤＮＡおよび全長センネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａでプロービングした。ｅｌＦ－５ＡおよびＤＨＳの両方は乾燥ストレスに応答してアップレギュレートされる。オートラジオグラフは上部に存在し、エチジウム染色ゲルは下に存在する。
【図１９】第１９図は、トマト植物の花芽および開いたセネッセンシング花から単離された全ＲＮＡのノザンブロットである。このブロットを$^{32}$Ｐ－ｄＣＴＰ標識化全長センネッセンス誘導ＤＨＳ　ｃＤＮＡおよび全長センネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａでプロービングした。ｅｌＦ－５ＡおよびＤＨＳの両方は開いた／センネッセンシング花においてアップレギュレートされる。オートラジオグラフは上部に存在し、エチジウム染色ゲルは下に存在する。
【図２０】第２０図は、冷却損傷したトマト葉から単離された全ＲＮＡのノザンブロットである。このブロットを$^{32}$Ｐ－ｄＣＴＰ標識化全長センネッセンス誘導ＤＨＳ　ｃＤＮＡおよび全長センネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａでプロービングした。ｅｌＦ－５ＡおよびＤＨＳ

の両方は再加温の間における冷却損傷植物の発生とともにアップレギュレートされる。オートラジオグラフは上部に存在し、エチジウム染色ゲルは下に存在する。

【００４６】

【図２１】第２１図は、３．１週齢のアラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）野生型（左）およびアンチセンスの向きでセネッセンスＤＨＳ遺伝子（第３６図に示す配列）の３’末端を発現し、トランスジェニック植物において葉サイズの増加を示すトランスジェニック植物の写真である。

【図２２】第２２図は、４．６週齢のアラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）野生型（左）およびアンチセンスの向きでセネッセンスＤＨＳ遺伝子（第３６図に示す配列）の３’末端を発現し、トランスジェニック植物において葉サイズの増加を示すトランスジェニック植物の写真である。

【図２３】第２３図は、５．６週齢のアラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）野生型（左）およびアンチセンスの向きでセネッセンスＤＨＳ遺伝子（第３６図に示す配列）の３’末端を発現し、トランスジェニック植物において葉サイズの増加を示すトランスジェニック植物の写真である。

【図２４】第２４図は、６．１週齢のアラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）野生型（左）およびアンチセンスの向きでセネッセンスＤＨＳ遺伝子（第３６図に示す配列）の３’末端を発現し、トランスジェニック植物において葉サイズの増加を示すトランスジェニック植物の写真である。

【図２５】第２５図は、アンチセンスの向きでセネッセンス誘導ＤＨＳ遺伝子を発現する３つの$T_1$トランスジェニックアラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）植物系統からの種子収量の増加を示すグラフである。種子収量は種子の体積として表されている。ｎ＝３０についてのＳＥを野生型植物について示す。

【００４７】

【図２６】第２６図は、アンチセンスの向きでセネッセンスＤＨＳ遺伝子（第３６図に示す配列）の３’末端を発現するトランスジェニックトマト植物（左）およびトランスジェニック植物において葉サイズの増加および植物サイズの増加を示す野生型植物（右）の写真である。写真は小植物を土壌に移した後１８日に撮った。

【図２７】第２７図は、アンチセンスの向きでセネッセンスＤＨＳ遺伝子（第３６図に示す配列）の３’末端を発現するトランスジェニックトマト植物（左）およびトランスジェニック植物において葉サイズの増加および植物サイズの増加を示す野生型植物（右）の写真である。写真は小植物を土壌に移した後３２日に撮った。

【図２８】第２８図は、野生型からのトマト果実（上部パネル）およびアンチセンスの向きで全長セネッセンスＤＨＳ遺伝子を発現するトランスジェニック植物（下部パネル）の写真である。果実を発生のブレーカー段階において収穫し、成長チャンバー内で成熟させた。収集後の日数を各パネルの上左コーナーに示す。

【図２９】第２９図は、野生型からのトマト果実（上部パネル）およびアンチセンスの向きで全長セネッセンスＤＨＳ遺伝子を発現するトランスジェニック植物（下部パネル）の写真である。果実を発生のブレーカー段階において収穫し、成長チャンバー内で成熟させた。収集後の日数を各パネルの上左コーナーに示す。

【図３０】第３０図は、野生型からのトマト果実（上部パネル）およびアンチセンスの向きで全長セネッセンスＤＨＳ遺伝子を発現するトランスジェニック植物（下部パネル）の写真である。果実を発生のブレーカー段階において収穫し、成長チャンバー内で成熟させた。収集後の日数を各パネルの上左コーナーに示す。

【００４８】

【図３１】第３１図は、野生型からのトマト果実（上部パネル）およびアンチセンスの向きで全長セネッセンスＤＨＳ遺伝子を発現するトランスジェニック植物（下部パネル）の写真である。果実を発生のブレーカー段階において収穫し、成長チャンバー内で成熟させた。収集後の日数を各パネルの上左コーナーに示す。

【図３２】第３２図は、野生型からのトマト果実（上部パネル）およびアンチセンスの向

きで全長セネッセンスＤＨＳ遺伝子を発現するトランスジェニック植物（下部パネル）の写真である。果実を発生のブレーカー段階において収穫し、成長チャンバー内で成熟させた。収集後の日数を各パネルの上左コーナーに示す。
【図３３】第３３図は、野生型からのトマト果実（上部パネル）およびアンチセンスの向きで全長セネッセンスＤＨＳ遺伝子を発現するトランスジェニック植物（下部パネル）の写真である。果実を発生のブレーカー段階において収穫し、成長チャンバー内で成熟させた。収集後の日数を各パネルの上左コーナーに示す。
【図３４】第３４図は、野生型からのトマト果実（上部パネル）およびアンチセンスの向きで全長セネッセンスＤＨＳ遺伝子を発現するトランスジェニック植物（下部パネル）の写真である。果実を発生のブレーカー段階において収穫し、成長チャンバー内で成熟させた。収集後の日数を各パネルの上左コーナーに示す。
【図３５】第３５図は、野生型からのトマト果実（上部パネル）およびアンチセンスの向きで全長セネッセンスＤＨＳ遺伝子を発現するトランスジェニック植物（下部パネル）の写真である。果実を発生のブレーカー段階において収穫し、成長チャンバー内で成熟させた。収集後の日数を各パネルの上左コーナーに示す。
【００４９】
【図３６】第３６図は、植物を形質転換するためにアンチセンスの向きで使用したアラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）セネッセンス誘導ＤＨＳ遺伝子の３’末端のヌクレオチド（上部）（配列番号３０）および誘導アミノ酸（下部）配列である。
【図３７】第３７図は、植物を形質転換するためにアンチセンスの向きで使用したトマトセネッセンス誘導ＤＨＳ遺伝子の３’末端のヌクレオチド（上部）（配列番号３１）および誘導アミノ酸（下部）配列である。
【図３８】第３８図は、全長アラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）遺伝子を単離するために使用した６００塩基対のアラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）セネッセンス誘導ＤＨＳプローブのヌクレオチド（上部）（配列番号２６）および誘導アミノ酸（下部）配列である。
【図３９】第３９図は、全長カーネーション遺伝子を単離するために使用した４８３塩基対のカーネーションセネッセンス誘導ＤＨＳプローブのヌクレオチド（上部）（配列番号２７）および誘導アミノ酸（下部）配列である。
【発明を実施するための形態】
【００５０】
発明の詳細な説明
植物細胞における１または２以上のセネッセンス誘導ＤＨＳ遺伝子、１または２以上のセネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａまたは両方の発現を変更する方法および組成物が提供される。植物におけるセネッセンス誘導ＤＨＳおよびセネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａの、単独または組合わせにおける、発現の変更はセネッセンスの開始を遅延し、環境的ストレスおよび病原体に対する抵抗性を改良し、こうして植物の棚持ちおよび／または成長期間を延長する。
【００５１】
セネッセンス誘導発現を示すトマトＤＨＳ遺伝子をコードする全長ｃＤＮＡ配列は、鋳型として冷却損傷したトマト葉から単離されたＲＮＡを使用する逆転写酵素仲介ポリメラーゼ連鎖反応（ＲＴ－ＰＣＲ）により単離し、ＲＴ－ＰＣＲ生成物を使用して冷却損傷した、ソルビトール処理トマト葉ｃＤＮＡライブラリーをスクリーニングする。単離されたトマト葉ｃＤＮＡ配列ならびに全長トマト葉ｃＤＮＡの選択された領域に対応するポリヌクレオチドプローブを使用して、環境的ストレスに暴露された（冷却された）トマト葉、（脱水された）ソルビトール処理されたトマト葉、成熟するトマト果実およびセネッセンシングトマト花の中のＤＨＳ遺伝子をコードするｍＲＮＡの存在を決定する。
【００５２】
アラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）ＤＨＳゲノムクローンから設計したプライマーを使用することによって、鋳型としてセネッセンシングアラアビドプシス（Ａｒａ

ｂｉｄｏｐｓｉｓ）葉ｃＤＮＡライブラリーを使用してポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）生成物を発生させる。アラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）ヌクレオチド配列は、セネッセンス誘導トマトＤＨＳの対応する配列と７３％のヌクレオチド配列同一性および８１％のアミノ酸配列同一性を有する。

【００５３】

ＲＴ－ＰＣＲを使用することによって、本発明のセネッセンス誘導トマトＤＨＳ遺伝子を単離した。トマトＤＨＳ遺伝子を単離するために使用する上流のプライマーは２４ヌクレオチドのプライマーである：５’ＡＧ ＴＣＴ ＡＧＡ ＡＧＧ ＴＧＣ ＴＣＧ ＴＣＣ ＴＧＡ Ｔ３’（配列番号３）；下流のプライマーは３４ヌクレオチドを含有する：５’Ｇ ＡＣＴ ＧＣＡ ＧＴＣ ＧＡＣ ＡＴＣ ＧＡＴ（Ｔ）$_{15}$３’（配列番号４）。１００ｐｍｏｌの下流のプライマーを使用して、標準ＲＴ－ＰＣＲを使用してｃＤＮＡの第１鎖を単離した。次いで、上流のプライマーおよび下流のプライマーの両方を使用するＲＴ－ＰＣＲにおいて、鋳型としてとして第１鎖を使用した。

【００５４】

アガロースゲル上でＲＴ－ＰＣＲ生成物を分離すると、１．５ｋｂ～６００ｂｐのサイズ範囲の３つの明確なバンドの存在が明らかにされた。それぞれ、上流のプライマーおよび下流のプライマーの中に存在するＸｂａＩおよびＳａｌＩクローニング部位を使用して、３つのフラグメントをプラスミドベクター、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ｓｙｓｔｅｍｓ、カリフォルニア州ラジョラ）の中にサブクローニングし、配列決定した。フラグメントの配列を遺伝子バンクのデータベースの中に存在する配列と比較し、整列させた。結果は１．５ｋｂおよび１ｋｂのフラグメントがトマトＤＨＳ配列であることを示した。また、６００ｂｐのフラグメントはヒト、酵母およびニューロスポラ（Ｎｅｕｒｏｓｐｏｒａ）ＤＨＳ配列と整列した。

【００５５】

２Ｍのソルビトールで６時間処理して脱水を誘導したトマト葉から得られたＲＮＡから作ったトマト（ｃｖ．Ｍａｔｃｈ Ｆ１ハイブリッド）ｃＤＮＡライブラリーをスクリーニングするために、６００ｂｐのＲＴ－ＰＣＲフラグメントを使用した。λＺａｐ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ｓｙｓｔｅｍｓ、カリフォルニア州ラジョラ）ｃＤＮＡライブラリーキットを使用して、ｃＤＮＡライブラリーを構築した。セネッセンス誘導ＤＨＳ遺伝子に対応する３つの同一の陽性全長ｃＤＮＡクローンが得られ、これらを配列決定した。セネッセンス誘導ＤＨＳ ｃＤＮＡクローンのヌクレオチド配列を配列番号１に示す。このｃＤＮＡクローンは、４２．１ｋＤａの計算した分子量を有する３８１アミノ酸のポリペプチド（配列番号２）をコードする。

【００５６】

発生するおよびストレスに暴露されたトマト花、果実および葉の中の遺伝子の発現パターンに基づいて、それはセネッセンスに関係づけられる。

【００５７】

トマトＤＨＳ ｃＤＮＡ配列をアラビドプシス・タリアナ（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ ｔｈａｌｉａｎａ）ゲノムバンクの中の未同定ゲノム配列と整列させた（ｈｔｔｐ：／／ｇｅｎｏｍｅ－ｗｗｗ．ｓｔａｎｆｏｒｄ．ｅｄｕ／Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）。結果は未同定アラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）ゲノム配列（ＡＢ１０７０６０）との整列を示した。この整列の情報を使用して、アラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）配列中のオープンリーディングフレームを同定し、それから予測されたアミノ酸配列を発生させた。整列したアラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）ＤＨＳ遺伝子の生ずるヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号５（第２Ａ図）および配列番号６と表示する。

【００５８】

同定されたアラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）ＤＨＳ配列の短い領域に基づく２つのプライマーを発生させた：プライマー１、５’ＧＧＴＧＧＴＧＴＴＧＡＧＧＡＡＧＡＴＣ３’（配列番号７）；およびプライマー２、５’ＧＧＴＧＣＡＣＧＣＣＣＴＧＡ

ＴＧＡＡＧＣ３’（配列番号８）。標準ＰＣＲにおける２つのプライマーのための鋳型として、アラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）セネッシング葉ｃＤＮＡライブラリーを使用した。６００ｂｐのＰＣＲ生成物を単離し、配列決定し、これらの生成物はゲノムＤＨＳ配列の対応するフラグメントのそれと同一の配列を有することが示された。

【００５９】

また、全長セネッセンス誘導トマトＤＨＳ ｃＤＮＡを使用して、全長セネッセンス誘導アラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）およびカーネーションＤＨＳ ｃＤＮＡクローンを単離した。プローブとして全長トマトＤＨＳ ｃＤＮＡクローンを使用して、それぞれ、セネッシングアラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）葉ｃＤＮＡライブラリーおよびセネッセンシングカーネーション花弁ｃＤＮＡライブラリーをスクリーニングすることによって、アラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）およびカーネーションＤＨＳ ｃＤＮＡクローンを単離した。次いでｃＤＮＡライブラリーから得られたｃＤＮＡクローンを配列決定した。

【００６０】

この方法において単離されたアラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）全長ｃＤＮＡクローンのヌクレオチド配列は、トマトｃＤＮＡ配列との整列によりエンコーディングアラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）ＤＨＳとして同定されたアラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）ゲノム配列のコーディング領域と同一の配列を有する（第２Ａ図、配列番号５）。全長カーネーション花弁セネッセンス誘導ＤＨＳクローンのヌクレオチド配列および誘導アミノ酸配列を第１０図に示す（それぞれ、配列番号９および配列番号１０）。

【００６１】

トマト、カーネーションおよびアラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）からのＤＨＳをコードする、本発明のｃＤＮＡ配列を同様な方法においてプローブとして使用して、他の植物からＤＨＳ遺伝子を単離し、次いでこれらはトランスジェニック植物における配列を変更するために使用することができる。

【００６２】

セネッセンス誘導ＤＨＳ遺伝子は、ＤＨＳ遺伝子ファミリーのメンバーであるように思われる。ハイブリッド植物から抽出したゲノムＤＮＡを使用して、トマト葉ＤＮＡのゲノムサザンブロット分析を実施した。ＤＨＳ遺伝子のコーディング領域内の単一部位を認識するか、あるいはＤＨＳ遺伝子のオープンリーディングフレーム内のいずれの部位をも認識しない、種々の制限酵素を使用してＤＮＡを切断した。トマトＤＨＳの制限地図を第４図に示す。

【００６３】

制限酵素消化したトマト葉ゲノムＤＮＡを$^{32}$Ｐ－ｄＣＴＰ標識化全長トマトＤＨＳ ｃＤＮＡでプロービングした。高いストリンジェンシイの条件下のハイブリダイゼーションは、全長ｃＤＮＡプローブが各制限酵素消化ＤＮＡ試料についての３つの制限フラグメントに対してハイブリダイゼーションすることを示した。ＤＨＳのオープンリーディングフレーム（第４図）内に制限部位を有する、ＸｂａＩおよびＥｃｏＲＩでトマト葉ゲノムＤＮＡを消化したとき、２より多い制限フラグメントがサザンブロットにおいて検出可能であった（第５図）ことは特に注目すべきである。ｃｖ． Ｍａｔｃｈ Ｆ１、ハイブリッド変種、およびホモ接合性系統、ＵＣＴ５、からのゲノムＤＮＡは、制限消化の同一パターンを生じた。これらの結果が示唆するように、トマト植物の中に２またはそれ以上のイソ型が存在する。第３図に示すように、ＤＨＳ遺伝子は種を通じて高度に保存されるので、任意の種内のイソ型の間で有意な量の保存が存在する。

【００６４】

全長トマトｃＤＮＡでプロービングしたトマト花全ＲＮＡのノザンブロットは、セネッセンス誘導ＤＨＳ遺伝子の発現がトマト花において有意に誘導されるが、発現は芽においてわずかに検出可能であることを示す（第６図）。トマト果実の種々の発生段階の間におけるＤＨＳ発現のノザンブロット分析は、ＤＨＳ遺伝子がブレーカーおよびピンク色果実

において低いレベルで発現され、これに対して赤色（成熟）トマト果実におけるＤＨＳ発現が有意に増強されることを証明する（第７図）。

【００６５】

ノザンブロット分析は、また、セネッセンス誘導ＤＨＳ遺伝子が環境的ストレス条件、例えば、脱水（第８図）および冷却（第９図）により誘導されることを証明する。脱水を誘導するように２Ｍのソルビトールで処理したトマト葉は、非処理葉に比較して脱水された葉におけるＤＨＳ発現の誘導を証明する（第８図）。冷却温度に暴露し、周囲温度に戻した植物は、冷却損傷症状（例えば、漏出）の発生と一致するセネッセンス誘導ＤＨＳ遺伝子の発現の誘導を示す（第９図）。トマト植物および種々の植物組織、例えば、葉、果実および花における遺伝子発現の全体のパターンは、本発明のＤＨＳ遺伝子がこれらの植物および植物組織におけるセネッセンスの開始に関係することを証明する。

【００６６】

ＤＨＳ遺伝子発現の誘導による同様な結果は、アラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）における葉セネッセンスおよびカーネーションの花弁セネッセンスの開始とともに観測される。種々の年齢の植物から単離されたアラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）葉の全ＲＮＡのノザンブロット分析は、セネッセンス誘導ＤＨＳ遺伝子の発現が若い（５週齢の）植物において明らかでないが、約６週において出現し始めることを示す。ＤＨＳ遺伝子の発現は７週までに有意に誘導される。ノザンブロット分析は、植物が加齢するにつれてアラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）ＤＨＳ遺伝子が有意に増強されることを示す（第１１図）。

【００６７】

ノザンブロット分析は、また、ＤＨＳ遺伝子が顕花植物、例えば、カーネーションにおいて同様に調節されることを示す（第１２図）。種々の年齢のカーネーションの花弁から単離された全ＲＮＡのノザンブロット分析において、年齢誘導セネッセンスの症状、例えば、セネッセンスの最初の形態学的発現である、花弁のインローリング（ｉｎｒｏｌｌｉｎｇ）を有する花からの花弁において、カーネーションＤＨＳの発現は有意に誘導されるが、堅い芽の花において発現は非常に低いことが示された。ちょうど開花し始めているカーネーションの花からの花弁は、堅い芽の段階における花よりも有意に多いＤＨＳ発現を有し、そして完全に開いた花からの花弁もまたＤＨＳ発現の増強を示す。

【００６８】

こうして、植物組織におけるセネッセンス誘導ＤＨＳ遺伝子の発現を実質的に表すか、あるいは変更することによって、劣化および腐敗を遅延し、腐敗しやすい果実、花、および野菜の棚持ちを増加することができ、そして植物およびそれらの組織をよりストレス抵抗性としかつ病原体抵抗性とすることができることが期待される。これは次のようにして達成することができる。好ましくは構成的プロモーター、例えば、ＣａＭＶ　３５Ｓプロモーターを使用するか、あるいは組織特異的またはセネッセンス／ストレス誘導プロモーターを使用して、ＤＨＳ　ｃＤＮＡまたはそのオリゴヌクレオチドフラグメントが果実、花、葉および野菜においてアンチセンス立体配置において発現されるトランスジェニック植物を産生する。

【００６９】

また、植物におけるセネッセンス関係形態学的変化の誘導に関係する、他の遺伝子、ｅｌＦ－５Ａ、が単離され、ここにおいて配列決定され、そしてＤＨＳと同様に、好ましくは、植物の中にアンチセンスの向きで導入することによって、植物におけるセネッセンスおよびセネッセンス関係プロセスを変更するためにそれを使用することができる。成熟するトマト果実、セネッシングアラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）葉およびセネッシングカーネーション花ｃＤＮＡライブラリーの各々から、全長セネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａ　ｃＤＮＡを単離した。

【００７０】

全長クローンの各々のヌクレオチド配列および誘導アミノ酸配列を第１３図（トマトセネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａ）、第１４図（カーネーションセネッセンス誘導ｅｌＦ－５

Ａ）および第１５図（アラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）セネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａ）に示す。また、これらのｃＤＮＡの各々のヌクレオチド配列を配列番号１１（トマト）（第１３図）、配列番号１３（カーネーション）（第１４図）および配列番号１５（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）（第１５図）として示す。遺伝子の各々の誘導アミノ酸配列を、それぞれ、配列番号１２（第１３図）、配列番号１４（第１４図）および配列番号１６（第１５図）として示す。

【００７１】

本明細書に記載するＤＨＳ遺伝子配列を使用して場合におけるように、本発明のｅｌＦ－５Ａ配列を使用して他の植物からｅｌＦ－５Ａ遺伝子を単離することができる。単離されたｅｌＦ－５Ａ配列を使用して、植物におけるセネッセンスおよびセネッセンス関係プロセスを変更することができる。少なくとも約７０％の交差種の配列類似性に基づいて、既知の方法を使用して、植物からのｅｌＦ－５Ａ配列の単離を達成することができる。

【００７２】

ｅｌＦ－５ＡおよびＤＨＳの平行誘導は植物においてセネッセンスの間に起こる。自然およびストレス誘導セネッセンスの両方の開始において、ｅｌＦ－５ＡはＤＨＳと平行にアップレギュレートされることをノザンブロット分析は証明する（第１６図～第２０図）。例えば、種々の段階におけるアラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）植物の葉から単離された全ＲＮＡのノザンブロット分析において、葉セネッセンスが植物において明らかであるとき、ｅｌＦ－５Ａの発現は誘導され、セネッセンスが進行するにつれて、発現は有意に増強されたことが証明される。結実植物、例えばトマトにおいて、ｅｌＦ－５ＡおよびＤＨＳは果実の軟化および腐敗の開始と一致して赤色柔軟果実においてアップレギュレートされる（第１７図）。

【００７３】

また、ノザンブロット分析において、ｅｌＦ－５ＡおよびＤＨＳは、環境的ストレス、例えば、乾燥（第１８図）および冷却損傷（第２０図）に応答して植物中で平行にアップレギュレートすることが証明される。同様に、顕花植物において、ｅｌＦ－５ＡおよびＤＨＳは開いた花において平行にアップレギュレートされ、そして両方の遺伝子の発現は顕花の後の段階を通して増強され続ける。

【００７４】

クローニングしたセネッセンス誘導ＤＨＳ遺伝子、それらの１または２以上のフラグメント、あるいはクローニングしたセネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａ遺伝子、それらの１または２以上のフラグメント、あるいはｅｌＦ－５ＡとＤＨＳ配列との組合わせは、構成的プロモーター、例えば、イチジクイボモザイクウイルス３５Ｓプロモーター、カリフラワーモザイクウイルスプロモーターＣａＭＶ３５Ｓ、二重３５ＳプロモーターまたはＭＡＳプロモーターの制御下に逆向き（アンチセンス）に導入されるとき、植物を遺伝的に修飾し、修飾された植物におけるセネッセンスを変更することができる。

【００７５】

トマト、アラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）またはカーネーションのセネッセンス誘導ＤＨＳ遺伝子またはセネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａ遺伝子と十分な配列同一性を共有する他の植物から選択されたアンチセンス配列を使用して、同様に遺伝的修飾を達成することができる。遺伝的修飾の１つの結果は、ｍＲＮＡをコードする内因的翻訳可能セネッセンス誘導ＤＨＳ、ｍＲＮＡをコードするｅｌＦ－５Ａまたは両方の量の減少である。結局、植物細胞において産生されたセネッセンス誘導ＤＨＳおよび／またはセネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａの量は減少され、これにより活性化されたｅｌＦ－５Ａの量は減少し、これは引き続いてセネッセンス誘導タンパク質、例えば、セネッセンス誘導リパーゼ、セネッセンス誘導プロテアーゼおよびセネッセンス誘導ヌクレアーゼの翻訳を減少させる。セネッセンスの開始のために新たなタンパク質合成が必要であるので、こうしてセネッセンスは阻害または遅延される。

【００７６】

例えば、二重３５Ｓプロモーターの調節下にアラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉ

ｓ）センネッセンス誘導ＤＨＳ遺伝子（配列番号２６）（第３８図）の全長または３’領域をアンチセンスの向きに発現するベクターで形質転換されたアラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）植物は、第２１図～第２４図に示すように対照植物に比較して、成長のすべての段階を通じてバイオマスの増加、例えば、より大きい葉サイズおよび全体のより大きい植物成長、および葉センネッセンスの遅延を示す。

【００７７】

トランスジェニックアラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）植物においてアラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）センネッセンス誘導ＤＨＳ遺伝子の完全なまたは３’コーディング領域をアンチセンスの向きで発現することによって発生したセネッセンス誘導ＤＨＳ遺伝子の発現の減少の効果は、また、トランスジェニック植物において種子収量の増加として見られる。アラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）センネッセンス誘導ＤＨＳ遺伝子のアンチセンス３’非コーディング領域を発現するアラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）植物系統は、野生型植物よりも６倍までの種子を生産する（第２５図）。

【００７８】

アンチセンスの向きでかつ二重３５Ｓプロモーターの調節下にトマトセネッセンス誘導ＤＨＳ遺伝子（配列番号２７）の３’末端で形質転換されたトマト植物を使用して、同様な結果が得られる。アンチセンスの向きで遺伝子の３’末端で形質転換された植物は、対照（非形質転換）植物に比較して葉サイズの増加および植物サイズの増加を示す（第２６図および第２７図）。

【００７９】

全長トマトセネッセンス誘導ＤＨＳでアンチセンスの向きに形質転換されたトマト植物は、野生型植物に比較して遅延した軟化および腐敗を示す果実を産生する（第２８図～第３５図）。こうして、本発明の方法および配列を使用して、果実の軟化および腐敗を遅延し、ならびに植物バイオマスおよび種子収量を増加し、一般に、植物においてセネッセンスを遅延することができる。

【００８０】

本発明の単離されたヌクレオチド配列を使用して、他の植物または生物から実質的に相補的なＤＨＳおよび／またはｅｌＦ－５Ａヌクレオチド配列を単離することができる。引き続いて、ここに示す単離されたヌクレオチド配列の使用とともに示した方法と同一の方法において、これらの配列を使用して、植物を形質転換し、これにより形質転換された植物のセネッセンスを変更することができる。

【００８１】

ＤＨＳ、ｅｌＦ－５Ａ、それらのフラグメントまたはそれらの組合わせで植物を形質転換して得られる遺伝的修飾は、植物におけるセネッセンス誘導ＤＨＳ、ｅｌＦ－５Ａまたは両方のレベルを永久的に変化させることができ、そして自殖または他の生殖スキームにより子孫植物において増殖させることができる。遺伝的に変更された植物を使用して、変更が世代から世代に安定に伝達される植物の新しい変種または系統を産生する。本発明は、広い範囲の異なる植物においてセネッセンスの安定な遺伝的修飾を達成するために使用できる、適当なＤＮＡ配列を最初に提供する。

【００８２】

センネッセンス誘導ＤＨＳ遺伝子およびｅｌＦ－５Ａ遺伝子を同定し、単離するために、一般に、この分野においてよく知られている慣用法を使用して、プラスミドＤＮＡの調製、制限酵素消化、ＤＮＡのアガロースゲル電気泳動、タンパク質のポリアクリルアミドゲル電気泳動、ＰＣＲ、ＲＴ－ＰＣＲ、サザンブロット、ノザンブロット、ＤＮＡ結合および細菌の形質転換を実施した。例えば、下記の文献を参照のこと：Ｓａｍｂｒｏｏｋ　Ｊ．　他、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ、第２版、Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｐｒｅｓｓ、Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ、ＮＹ、１９８９。核酸のハイブリダイゼーション技術はＳａｍｂｒｏｏｋ（前掲）に開示されている。

【００８３】
本明細書において使用するとき、用語「植物」は全植物、植物部分、植物細胞または植物細胞のグループを意味する。本発明の方法において使用できる植物の型は、例えば、下記のものを包含するが、これらに限定されない：エチレン感受性およびエチレン不感受性植物；結実植物、例えば、アプリコット、リンゴ、オレンジ、バナナ、グレープフルーツ、セイヨウナシ、トマト、イチゴ、アボカド、およびその他；野菜、例えば、ニンジン、エンドウ、レタス、キャベツ、カブ、ジャガイモ、ブロッコリ、アスパラガス、およびその他；花、例えば、カーネーション、バラ、キク、およびその他；耕種学的作物植物および森林種、例えば、トウモロコシ、イネ、大豆、アルファルファおよびその他；および一般に、本発明のＤＮＡ分子を吸収しかつ発現する任意の植物。それは種々の倍数レベル、例えば、一倍体、二倍体、四倍体および多倍数体の植物を包含することができる。植物は単子葉植物または双子葉植物であることができる。
【００８４】
トランスジェニック植物は、ここにおいてある方法において遺伝的に修飾された植物として定義され、下記の植物を包含するが、これらに限定されない：異種または同種セネッセンス誘導ＤＨＳ　ＤＮＡまたは修飾されたＤＮＡ、あるいは異種セネッセンス誘導ＤＨＳ　ＤＮＡまたは同種セネッセンス誘導ＤＨＳ　ＤＮＡのある部分をそのゲノムの中に組込んで有する植物。あるいは、本発明のトランスジェニック植物は、異種または同種セネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａ　ＤＮＡまたは修飾されたＤＮＡ、あるいは異種セネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａ　ＤＮＡまたは同種セネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａ　ＤＮＡのある部分をそのゲノムの中に組込んで有することができる。
【００８５】
本発明のトランスジェニック植物は、異種または同種セネッセンス誘導ＤＨＳおよびｅｌＦ－５Ａ　ＤＮＡまたは修飾されたＤＮＡ、あるいは異種セネッセンス誘導ＤＨＳおよびｅｌＦ－５Ａ　ＤＮＡまたは同種セネッセンス誘導ＤＨＳおよびｅｌＦ－５Ａ　ＤＮＡのある部分、あるいは異種および同種のＤＨＳおよびｅｌＦ－５Ａ配列の組合わせをそのゲノムの中に組込んで有することができる。変更された遺伝物質は、タンパク質をコードすることができ、調節配列または対照配列を含んでなることができるか、あるいはアンチセンス配列であるかまたはそれを含むか、あるいは内因的セネッセンス誘導ＤＨＳまたはｅｌＦ－５ＡまたはｍＲＮＡ配列またはその一部分に対してアンチセンスであるか、あるいはアンチセンスｍＲＮＡ配列をコードすることができる。「トランスジーン」または「トランスジェニック配列」は、トランスジェニック植物の中に組込まれた外来遺伝子または部分的配列として定義される。
【００８６】
用語「ハイブリダイゼーション」は、本明細書において使用するとき、一般に、プローブ配列およびターゲット配列の特質に依存して当業者にとって容易に明らかなように、適当なストリンジェンシイの条件における核酸のハイブリダイゼーションを意味するために使用される。ハイブリダイゼーションおよび洗浄の条件はこの分野においてよく知られており、そしてインキュベーション時間、温度および／または溶液のイオン強度を変化させることによって所望のストリンジェンシイに依存して条件を調節することは容易に達成される。例えば、下記の文献を参照のこと：Ｓａｍｂｒｏｏｋ　Ｊ．　他、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ、第２版、Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｐｒｅｓｓ、Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ、Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ、１９８９。
【００８７】
ハイブリダイゼーションする配列の長さ、特にプローブ配列の長さ、核酸の相対的Ｇ－Ｃ含量および許容すべき不一致の量により、条件を選択する。より低い程度の相補性を有する鎖間の部分的ハイブリダイゼーションを望むとき、低いストリンジェンシイの条件が好ましい。完全なまたはほぼ完全な相補性を望むとき、高いストリンジェンシイの条件が好ましい。典型的な高いストリンジェンシイの条件について、ハイブリダイゼーション溶

液は６×ＳＳＣ、０．０１ＭのＥＤＴＡ、１×デンハルト溶液および０．５％のＳＤＳを含有する。ハイブリダイゼーションは約６８℃においてクローニングされたＤＮＡについて約３～４時間実施し、そして全真核ＤＮＡについて約１２～約１６時間実施する。より低いストリンジェンシイのために、ハイブリダイゼーション温度を二本鎖の溶融温度（$T_M$）より約４２℃低く低下させる。$T_M$はＧ－Ｃ含量および二本鎖長さならびに溶液のイオン強度の関数であることが知られている。

【００８８】

本明細書において使用するとき、用語「実質的配列同一性」または「実質的相同性」は、ヌクレオチド配列またはアミノ酸配列が他のヌクレオチド配列またはアミノ酸配列と実質的な構造的または機能的同等性を表すことを示すために使用される。実質的配列同一性または実質的相同性を有する配列間の構造的または機能的差は最小であろう；すなわち、それらは所望の用途において示すように配列が機能する能力に影響を与えないであろう。差は、例えば、異なる種間のコドン使用頻度における固有変動のためであることがある。

【００８９】

２またはそれ以上の異なる配列間に有意な量の配列のオーバーラップまたは類似性が存在する場合、あるいは配列の長さまたは構造が異なる場合でさえ異なる配列が同様な物理的特性を示す場合、構造的差は最小であると考えられる。このような特性は、例えば、定められた条件下にハイブリダイゼーションする能力、またはタンパク質の場合において、免疫学的交差反応性、同様な酵素活性、およびその他を包含する。熟練した実施者は、既知の方法により、これらの特性の各々を容易に決定することができる。

【００９０】

さらに、２つのヌクレオチド配列がそれらの間で少なくとも約７０％、より好ましくは８０％、最も好ましくは約９０％の配列類似性を有する場合、それらの配列は「実質的に相補性」である。２つのアミノ酸配列がポリペプチドの活性部分間の少なくとも５０％、好ましくは７０％の類似性を有する場合、それらは実質的に相同性である。

【００９１】

本明細書において使用するとき、ＤＮＡまたはＲＮＡ分子の「対応する部分に対してハイブリダイゼーションする」という句は、ハイブリダイゼーションする分子、例えば、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、または任意のヌクレオチド配列が（センスまたはアンチセンスの向きで）ほぼ同一サイズの他の核酸分子中の配列を認識し、それに対してハイブリダイゼーションし、そして適当な条件下にハイブリダイゼーションを実行するために十分な類似性をその配列に対して有することを意味する。

【００９２】

例えば、トマトＤＨＳの３’コーディングまたは非コーディング領域からの１００ヌクレオチド長さのアンチセンス分子は、２つの配列間に約７０％またはそれより高い配列類似性が存在するかぎり、カーネーションＤＨＳ遺伝子または任意の他の植物ＤＨＳ遺伝子のそれぞれ３’コーディングまたは非コーディング領域内のヌクレオチド配列のほぼ１００ヌクレオチド部分を認識し、それに対してハイブリダイゼーションする。「対応する部分」がそれに対してハイブリダイゼーションする分子よりも小さいか、あるいは大きくあるように、例えば、２０～３０％小さいか、あるいは大きく、好ましくは約１２～１５％小さいか、あるいは大きくあるように、「対応する部分」のサイズがハイブリダイゼーションにおいて多少の不一致を可能とすることを理解すべきである。

【００９３】

核酸（またはポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド）の「機能的誘導体」という用語は、ここにおいて、セネッセンス誘導ＤＨＳまたはセネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａをコードする遺伝子またはヌクレオチド配列のフラグメント、変異型、相同体またはアナローグを意味するために使用する。機能的誘導体は、本発明による実用性を可能とするセネッセンス誘導ＤＨＳまたはｅｌＦ－５Ａをコードするの少なくとも一部分を保持することができる。

【００９４】

このような機能は、低いストリンジェンシイの条件下に、天然のトマト、アラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）またはカーネーションのセネッセンス誘導ＤＨＳまたはｅｌＦ－５Ａ、あるいはセネッセンス誘導ＤＨＳまたはｅｌＦ－５Ａをコードする他の植物からの実質的に相同性のＤＮＡと、あるいはそれらのｍＲＮＡ転写物と、または、アンチセンスの向きで、ハイブリダイゼーションして、植物セネッセンス誘導ＤＨＳまたはｅｌＦ－５Ａ　ｍＲＮＡの転写および／または翻訳、およびその他を阻害する能力を包含することができる。

【００９５】

遺伝子またはＤＮＡ配列の「フラグメント」は、分子のサブセット、例えば、より短いポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを意味する。「変異型」は、全遺伝子またはそのフラグメントに実質的に類似する分子、例えば、１または２以上の置換したヌクレオチドを有するが、特定の遺伝子とハイブリダイゼーションする能力または自然ＤＮＡとハイブリダイゼーションするｍＲＮＡ転写物をコードする能力を維持するヌクレオチド置換変異型を意味する。「相同体」は、異なる植物の属または種からのフラグメントまたは変異型配列を意味する。「アナローグ」は、全分子、その変異型またはフラグメントに実質的に類似するか、あるいは機能的にそれらに関係する、非天然分子を意味する。

【００９６】

遺伝子、例えば、セネッセンス誘導ＤＨＳ遺伝子またはセネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａ遺伝子の「変更された発現」または「修飾された発現」とは、遺伝子の正常の発現、例えば、非修飾結実植物、顕花植物または他の植物における起こる発現がある方法において変化される、任意のプロセスまたは結果を意味する。本明細書において意図するとき、遺伝子発現の変更は、セネッセンス誘導ＤＨＳ遺伝子またはセネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａ遺伝子または両方の発現の完全なまたは部分的減少であるが、また、発現のタイミングの変化、あるいはセネッセンス誘導ＤＨＳ遺伝子またはセネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａ遺伝子または両方の発現が非修飾植物または栽培品種において最も自然に起こりやすい発現と異なる他の状態を包含することができる。好ましい変更は、非修飾植物における産生に比較して植物によるセネッセンス誘導ＤＨＳ産生またはセネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａ産生または両方を減少させる変更である。

【００９７】

本発明に従い遺伝的に変更された植物を生産するとき、所望の特性、一般にセネッセンス誘導ＤＨＳの発現または産生の減少またはセネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａの発現の減少または両方により個々の小植物または植物を選択することが好ましい。セネッセンス誘導ＤＨＳおよびセネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａの発現は、例えば、トランスジェニック植物におけるセネッセンスの遅延または減少の観測により決定することができる。また、既知の方法を使用して対照（正常、非トランスジェニック）植物に比較してトランスジェニック植物におけるＤＨＳおよび／またはｅｌＦ－５Ａの活性を定量することが可能である。

【００９８】

新しく挿入された遺伝子またはＤＮＡ配列を発現させ、それがコードするタンパク質を産生するか、あるいは転写すべきアンチセンスＤＮＡの場合において、アンチセンスＲＮＡ分子を産生するために、適切な調節因子を遺伝子またはＤＮＡ配列に関して適切な位置にかつ向きで存在させるべきである。調節領域はプロモーター、５’非翻訳リーダー配列および３’ポリアデニル化配列ならびにエンハンサーおよび他の調節配列を包含することができる。

【００９９】

遺伝子のセンスまたはアンチセンス転写物を発生させるためにセネッセンス誘導ＤＨＳ遺伝子と組み合わせて有効であるプロモーター調節因子は、一般に任意のプロモーター、特に構成的プロモーター、例えば、イチジクイボモザイクウイルス３５Ｓプロモーター、カリフラワーモザイクウイルスプロモーター、ＣａＭＶ３５Ｓプロモーター、またはＭＡＳプロモーター、または組織特異的またはセネッセンス誘導プロモーター、例えば、カーネーション花弁ＧＳＴ１プロモーターまたはアラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ

）ＳＡＧ１２プロモーターを包含する。
【０１００】
（例えば、下記の文献を参照のこと：Ｊ．Ｃ．Ｐａｌａｑｕｉ他、Ｐｌａｎｔ Ｐｈｙｓｉｏｌ．１１２：１４４７－１４５６（１９９６）；Ｍｏｒｔｏｎ他、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｒｅｅｄｉｎｇ、１：１２３－１３２（１９９５）；Ｆｏｂｅｒｔ他、Ｐｌａｎｔ Ｊｏｕｒｎａｌ、６：５６７－５７７（１９９４）；およびＧａｎ他、Ｐｌａｎｔ Ｐｈｙｓｉｏｌ．、１１３：３１３（１９９７）、引用することによって本明細書の一部とされる）。好ましくは、本発明において使用するプロモーターは構成的プロモーター、最も好ましくは二重３５Ｓプロモーターを使用する。
【０１０１】
本発明のために有効であるプロモーターからの発現レベルは、慣用の発現系を使用して、例えば、プロモーター／リポーター遺伝子が導入されたトランスジェニック植物の葉、花、果実または他の組織の抽出物中のリポーター遺伝子産物、例えば、タンパク質またはｍＲＮＡのレベルを測定することによって試験することができる。
【０１０２】
本発明は、トマトセネッセンス誘導ＤＨＳ、カーネーションセネッセンス誘導ＤＨＳ、アラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）セネッセンス誘導ＤＨＳをコードする遺伝子に対して相補的であるか、あるいは低い～高いストリンジェンシイの条件下にトマト、カーネーションまたはアラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）のセネッセンス誘導ＤＨＳ遺伝子とハイブリダイゼーションする、他の植物からの遺伝子または遺伝子フラグメントに対して相補的である、アンチセンスオリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドを提供する。
【０１０３】
本発明は、また、トマトセネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａ、カーネーションセネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａ、アラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）セネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａをコードする遺伝子に対して相補的であるか、あるいは低い～高いストリンジェンシイの条件下にトマト、カーネーションまたはアラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）のセネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａ遺伝子とハイブリダイゼーションする、他の植物からの遺伝子または遺伝子フラグメントに対して相補的である、アンチセンスオリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドを提供する。
【０１０４】
このようなアンチセンスオリゴヌクレオチドは少なくとも約６ヌクレオチド長さであってハイブリダイゼーションの最小の特異性を提供し、そしてセネッセンス誘導遺伝子またはその一部分をコードするＤＮＡまたはｍＲＮＡの１つの鎖に対して、あるいはセネッセンス誘導ＤＨＳまたはｅｌＦ－５Ａ遺伝子の発現の調節に関係するゲノムＤＮＡ中のフランキング配列に対して相補的であることができる。アンチセンスオリゴヌクレオチドは１００ヌクレオチドまたはそれより大きい程度に大きく、そしてそれに対してアンチセンスである完全なコーディング配列までかつそれを越える長さに伸長することができる。アンチセンスオリゴヌクレオチドはＤＮＡまたはＲＮＡまたはそれらのキメラ混合物または誘導体または修飾されたバージョン、一本鎖または二本鎖であることができる。
【０１０５】
アンチセンスオリゴヌクレオチドの作用は、細胞におけるセネッセンス誘導ＤＨＳの発現、セネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａの発現または両方の変更、主として阻害を生ずることがある。アンチセンスの一般的開示については、下記の文献を参照のこと：Ａｌｂｅｒｔ他、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ ｏｆ ｔｈｅ Ｃｅｌｌ、第２版、Ｇａｒｌａｎｄ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ，Ｉｎｃ．、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、１９８９（特にｐｐ．１９５－１９６、引用することによって本明細書の一部とされる）。
【０１０６】
アンチセンスオリゴヌクレオチドは、セネッセンス誘導ＤＨＳまたはｅｌＦ－５Ａ遺伝子の任意の対応する部分に対して相補的であることができる。他の態様において、アンチ

センスオリゴヌクレオチドは６～１００ヌクレオチド長さであり、例えば、セネッセンス誘導ＤＨＳまたはｅｌＦ－５Ａ配列の３’末端内の５’非コーディングまたは配列に対して相補的であることができる。主として５’非コーディング配列に対して相補的であるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、転写因子をコードする遺伝子の発現の有効なインヒビターであることが知られている。Ｂｒａｎｃｈ、Ｍ．Ａ．、Ｍｏｌｅｃ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．，１３：４２８４－４２９０（１９９３）。

【０１０７】

好ましいアンチセンスオリゴヌクレオチドはセネッセンス誘導ＤＨＳまたはセネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａをコードするｍ ＲＮＡの一部分に対して実質的に相補的であり、ｍＲＮＡの一部分はアンチセンスオリゴヌクレオチドとほぼ同一のサイズである。例えば、セネッセンス誘導ＤＨＳまたはｅｌＦ－５Ａをコードする全長ｃＤＮＡクローンを植物の中にアンチセンスの向きで導入すると、セネッセンス誘導ＤＨＳおよび／またはｅｌＦ－５Ａ遺伝子の発現を首尾よく変更することが期待される。そのうえ、第２１図～第３５図において証明されるように、セネッセンス誘導ＤＨＳ遺伝子またはセネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａ遺伝子または両方の特定の部分をターゲットとした、部分的配列の導入は等しく有効であることがある。

【０１０８】

本発明が必要とする相同性の最小量は、特定のターゲットＲＮＡまたはＤＮＡを認識しかつその翻訳または機能を阻害または減少するために十分な相補性を生ずると同時に他のＲＮＡまたはＤＮＡ分子の機能および他の遺伝子の発現に影響を与えないために十分である量である。本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドはセネッセンス誘導ＤＨＳ遺伝子またはセネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａ遺伝子のＲＮＡ転写物の対応する部分に対して相補的である配列を含んでなるが、絶対的相補性は、好ましいが、不必要である。

【０１０９】

ハイブリダイゼーションする能力は、アンチセンスオリゴヌクレオチドの長さおよび相補性の程度に依存することがある。一般に、ハイブリダイゼーションする核酸が長いほど、それが含有し、なお安定な二本鎖を形成することができる、セネッセンス誘導ＤＨＳターゲット配列に対してより多くの塩基が一致しなくなる。当業者は標準手順を使用して、例えば、ハイブリッドの複合体の溶融温度を測定することによって、許容可能な不一致の程度を確認することができる。

【０１１０】

外因的に導入された核酸配列からの転写により、アンチセンスＲＮＡオリゴヌクレオチドを細胞内で発生させることができる。適当な調節因子、例えば、プロモーターに作用可能に連鎖されたアンチセンスセネッセンス誘導ＤＨＳ配列をコードするＤＮＡが組込まれたベクター、例えば、プラスミドまたはウイルスを使用する形質転換、トランスフェクションまたは感染により、アンチセンス分子を細胞の中に送達することができる。細胞内で外因的ＤＮＡ配列が発現され、セネッセンス誘導ＤＨＳ遺伝子のアンチセンスＲＮＡが産生される。

【０１１１】

ベクターは好ましくはプラスミドであることができるか、あるいは植物細胞または細菌細胞中で複製し、コードされる遺伝子を発現することがこの分野において知られているウイルスまたは他のベクターであることができる。ベクターは所望のアンチセンスセネッセンス誘導ＤＨＳ　ＲＮＡを産生するように転写されることができるように、染色体的に統合されるようになる。このようなプラスミドまたはウイルスベクターは、この分野において標準的である組換えＤＮＡ技術的方法により構築することができる。例えば、ベクターは原核宿主中で機能的である複製系および本発明によるアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドを含有するプラスミドベクターであることができる。

【０１１２】

あるいは、ベクターはアグロバクテリウム（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）において機能的である複製系および本発明によるアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレ

オチドを含有するプラスミドであることができる。アグロバクテリウム（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）中で複製することができるプラスミドはこの分野においてよく知られている。下記の文献を参照のこと：Ｍｉｋｉ他、Ｐｒｏｃｅｄｕｒｅｓ ｏｆ Ｉｎｔｒｏｄｕｃｉｎｇ Ｆｏｒｅｉｇｎ ＤＮＡ Ｉｎｔｏ Ｐｌａｎｔｓ、Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｐｌａｎｔ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、Ｂ．．Ｇｌｉｃｋおよび Ｊ．Ｅ．Ｔｈｏｍｐｓｏｎ編、ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ（１９９３）、ｐｐ． ６７－８３。

【０１１３】

トマトＤＨＳ遺伝子を下記の方法においてプラスミドベクターの中にアンチセンスの向きでクローニングした。ｐＵＣ１８バックボーンから構築され、カリフラワーモザイクウイルス（ＣａＭＶ）および引き続いて多重クローニング部位およびオクタパインシンターゼ終結配列を含有するｐＣＤプラスミドを使用して、トマトＤＨＳ遺伝子をクローニングした。ＸｈｏＩおよびＳａｃＩ制限部位を使用してｐＣＤプラスミドの中に全長トマトＤＨＳ遺伝子をサブクローニングすることによって、ｐＣｄ－ＤＨＳ（アンチセンス）プラスミドを構築した。

【０１１４】

好ましくは約６～約１００ヌクレオチド長さでありかつセネッセンス誘導ＤＨＳまたはセネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａのターゲット配列に対して相補的である、オリゴヌクレオチドは組換えヌクレオチド技術により調製することができるか、あるいは、例えば、モノヌクレオチドまたはより短いオリゴヌクレオチドから合成することができる。自動化合成装置を本発明のオリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドの化学的合成に適用可能である。

【０１１５】

本発明に従い組換えヌクレオチド分子を構築する手順は下記の文献に開示されている：Ｓａｍｂｒｏｏｋ他、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ、第２版、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｒｅｓｓ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ、Ｎ．Ｙ．（１９８９）、これは引用することによって本明細書の一部とされる。セネッセンス誘導デオキシハイプシンシンターゼ配列に対して相補的であるアンチセンスＲＮＡをコードするオリゴヌクレオチドは、この分野においてよく知られている手順を使用して調製することができる。このような手順は下記の文献に詳述されている：Ｍａｎｉａｔｉｓ、Ｔ．他、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｍｅｃｈａｎｉｓｍｓ ｉｎ ｔｈｅ Ｃｏｎｔｒｏｌ ｏｆ Ｇｅｎｅ ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ、Ｎｉｅｒｉｌｉｃｈ他、編、Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ、Ｎ．Ｙ．（１９７６）。

【０１１６】

本発明の別の態様において、内因的植物セネッセンス誘導ＤＨＳ、セネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａまたは両方の発現の阻害は、植物細胞の中に導入された外因的セネッセンス誘導ＤＨＳまたはｅｌＦ－５Ａ遺伝子または遺伝子フラグメントまたは両方の過剰発現による共抑制の結果である。本発明のこの態様において、アンチセンス分子について本明細書において記載した方法と同一の方法により、センスの向きでセネッセンス誘導ＤＨＳ、セネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａまたは両方をコードするベクターを細胞の中に導入する。好ましくは、セネッセンス誘導ＤＨＳまたはセネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａを強い構成的プロモーター、例えば、イチジクイボモザイクウイルスプロモーターまたはＣａＭＶ３５Ｓまたは二重３５Ｓプロモーターに作用可能に連鎖させる。

【０１１７】

本発明の他の態様において、内因的植物セネッセンス誘導ＤＨＳ、セネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａまたは両方の発現の阻害はリボザイムを使用して実施される。リボザイムは配列特異的エンドリボヌクレアーゼ活性を示すＲＮＡ分子である。１例はハンマーヘッドリボザイムであり、これはターゲットＲＮＡ中のＵＨ（ここでＨはＡ、ＣまたはＵ残基である）認識部位において切断し、かつリボザイムの触媒ドメインを基質ＲＮＡのターゲット部位に向ける塩基対合領域を含有する。リボザイムは高度にターゲット特異的であり、そ

して多重遺伝子ファミリーの１メンバーを不活性化するように設計するか、あるいは関係するｍＲＮＡの保存された領域にターゲットすることができる（下記の文献を参照のこと：Ｍｅｒｌｏ他、Ｔｈｅ　Ｐｌａｎｔ　Ｃｅｌｌ、１０：１６０３－１６２１、１９９８）。

【０１１８】

リボザイム分子は、適当な調節因子、例えば、プラスミドに作用可能に連鎖されたリボザイムが組込まれたベクター、例えば、プラスミドまたはウイルスを使用する形質転換、トランスフェクションまたは感染により、細胞に送達すことができる。このようなリボザイム構築物は塩基対合アームを含有し、これらのアームはリボザイム構築物をセネッセンス誘導ＤＨＳ　ｍＲＮＡ、またはセネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａ　ｍＲＮＡ内の切断部位に向け、ＤＨＳまたはｅｌＦ－５Ａ　ｍＲＮＡの切断およびセネッセンス誘導ＤＨＳおよび／またはｅｌＦ－５Ａ発現の阻害を生ずる。

【０１１９】

本発明に従い作られるトランスジェニック植物は、この分野において知られている植物形質転換の任意の方法を使用するＤＮＡ形質転換により調製することができる。植物形質転換法は下記の方法を包含する：植物、組織または細胞とアグロバクテリウム・ツメファシエンス（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｔｕｍｅｆａｃｉｅｎｓ）との同時培養または直接的感染（Ｍｉｋｉ他、Ｍｅｔｈ．ｉｎ　Ｐｌａｎｔ　Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．ａｎｄ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、（１９９３）、ｐ．６７－８８）；プロトプラストの中への直接的遺伝子転移またはプロトプラスト吸収（Ｐａｓｚｋｏｗｓｋ他、ＥＭＢＯ　Ｊ．、１２：２７１７（１９８４）；エレクトロポレーション（Ｆｒｏｍｍ他、Ｎａｔｕｒｅ、３１９：７１９（１９８６）；粒子衝撃（Ｋｌｅｉｎ他、Ｂｉｏ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、６：５５９－５６３（１９８８）；実生および植物の分裂組織の中への注入（Ｄｅ　ＬａＰｅｎａ他、Ｎａｔｕｒｅ、３２５：２７４－２７６（１９８７）；培養した細胞および組織のプロトプラストの中への注入（Ｒｅｉｃｈ他、Ｂｉｏ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、４：１００１－１００４（１９８６））。

【０１２０】

一般に、完全な植物は形質転換プロセスから得られる。プロトプラスト、カルス、組織の部分または外植体、およびその他から植物を再生する。セネッセンス誘導ＤＨＳ、セネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａまたは両方の発現が変更された再生した植物から得られた植物部分、例えば、葉、花、果実、種子およびその他は、本明細書において使用する「植物」の定義の中に含まれる。再生植物の子孫、変異型および突然変異もまた「植物」の定義の中に含まれる。

【０１２１】

トマト、カーネーションまたはアラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）セネッセンス誘導ＤＨＳタンパク質またはそれらの機能的誘導体、およびトマト、カーネーションまたはアラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）セネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａタンパク質またはそれらの機能的誘導体は、必要に応じて化学的合成法と組み合わせて、組換え技術により産生されることが好ましい。本発明の１つの態様において、セネッセンス誘導ＤＨＳは融合タンパク質として発現され、この融合タンパク質はマルトース結合性植物と融合されたセネッセンス誘導ＤＨＳから成ることが好ましい。

【０１２２】

本明細書において記載するセネッセンス誘導ＤＨＳまたはセネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａタンパク質の「機能的誘導体」は、それぞれ、セネッセンス誘導ＤＨＳまたはセネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａのフラグメント、変異型、アナローグ、または化学的誘導体であり、これらはセネッセンス誘導ＤＨＳまたはｅｌＦ－５Ａ活性またはそれぞれセネッセンス誘導ＤＨＳまたはセネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａに対して特異的な抗体との交差反応性の少なくとも一部分を保持する。セネッセンス誘導ＤＨＳまたはセネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａタンパク質のフラグメントは、この分子の任意のサブセットを意味する。変異型ペプチドは直接的化学的合成により、例えば、この分野においてよく知られている方法を使用

して作ることができる。

【０１２３】

セネッセンス誘導ＤＨＳまたはセネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａのアナローグは、全タンパク質またはそのフラグメントに実質的に類似する非天然タンパク質を意味する。セネッセンス誘導ＤＨＳまたはセネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａの化学的誘導体は、通常ペプチドまたはペプチドフラグメントの一部分でない追加の化学的部分を含有する。選択した側鎖または末端の残基と反応することができる有機誘導体化因子とペプチドのターゲッテッドアミノ酸残基を反応させることによって、修飾をペプチドまたはそのフラグメントの中に導入することができる。

【０１２４】

本発明のヌクレオチド配列で形質転換された細胞（センス向きで）を培養し、細胞がタンパク質を合成するようにさせ、次いで、使用するクローニングプロトコルに依存して、遊離タンパク質または融合タンパク質として、培地または細胞抽出物からタンパク質を単離することによって、本発明によるセネッセンス誘導ＤＨＳまたはセネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａタンパク質またはペプチドを産生することができる。あるいは、タンパク質は無細胞系において産生することができる。Ｒａｎｕ他、Ｍｅｔｈ．　Ｅｎｚｙｍｏｌ．、６０：４５９－４８４、（１９７９）。

【０１２５】

本発明を一般に記載したが、下記の実施例を参照することによって本発明はいっそう容易に理解されるであろう。これらの実施例は例示であり、本発明を限定することを意図しない。

【実施例】

【０１２６】

実施例１．メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）の単離

種々の発生段階におけるトマトの花およびトマトの果実から、そして葉（未処理または冷却またはソルビトール処理後の）から全ＲＮＡを単離した。簡単に述べると、組織（５ｇ）を液体窒素中で粉砕した。粉砕した粉末を３０ｍｌのグアニジニウム緩衝液（４Ｍのグアニジニウムイソチオシアネート、２．５ｍＭのＮａＯＡｃ　ｐＨ８．５、０．８％のβ－メルカプトエタノール）と混合した。この混合物を４層のチーズクロスを通して濾過し、１０，０００×ｇ、４℃において３０分間遠心した。次いで上清を塩化セシウム密度勾配で２６，０００×ｇにおいて２０時間遠心した。

【０１２７】

ペレット化したＲＮＡを７５％のエタノールですすぎ、６００μｌのＤＥＰＣ処理水の中に再懸濁させ、－７０℃において０．７５ｍｌの９５％のエタノールおよび３０μｌの３ＭのＮａＯＡｃでＲＮＡを沈降させた。１０μｇのＲＮＡを１．２％の変性ホルムアルデヒドアガロースゲル上で分画し、ナイロン膜に移した。ランダムにプライムした$^{32}$Ｐ－ｄＣＴＰ標識化全長ＤＨＳ　ｃＤＮＡ（配列番号１）を使用して、膜を４２℃において一夜プロービングした。次いで０．１％のＳＤＳを含有する１×ＳＳＣで室温において膜を１５分間１回洗浄し、０．１％のＳＤＳを含有する０．２×ＳＳＣで６５℃において各１５分間３回洗浄した。膜を－７０℃においてＸ線フィルムに一夜露出した。

【０１２８】

プロメガ（Ｐｒｏｍｅｇａ）から入手可能なポリＡ$^{+}$トラクトｍＲＮＡ単離システムを使用して、ｔＲＮＡからポリＡ$^{+}$ｍＲＮＡを単離した。ストラタジーン（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）（カリフォルニア州ラジョラ）から入手可能なＺＡＰ　Ｅｘｐｒｅｓｓ$^{R}$　ｃＤＮＡ合成システムを使用するｃＤＮＡ合成の鋳型として、ポリＡ$^{+}$ｍＲＮＡを使用した。

【０１２９】

トマト葉ｃＤＮＡライブラリーのスクリーニング

２Ｍのソルビトールに６時間暴露したＭａｔｃｈ　Ｆ１ハイブリッドトマト葉から単離したｍＲＮＡを使用して作ったｃＤＮＡライブラリーを、ほぼ５×１０$^{6}$ＰＦＵ／ｍｌに希釈した。$^{32}$Ｐ標識化６００ｂｐのＲＴ－ＰＣＲフラグメントを使用して、ｃＤＮＡライ

ブラリーをスクリーニングした。３つの陽性ｃＤＮＡクローンを切除し、製造業者のインストラクション中の方法を使用してｐＢＫ－ＣＭＶ$^{R}$（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）ファージミドの中に再循環させた。全長ｃＤＮＡをｐＢＫ－ＣＭＶベクターの中に挿入した。

【０１３０】

プラスミドＤＮＡの単離、ＤＮＡのスクリーニング

Ｓａｍｂｒｏｏｋ他（前掲）が記載するアルカリ溶解法を使用してプラスミドＤＮＡを単離した。デオキシ配列決定法を使用して、全長の陽性ｃＤＮＡクローンを配列決定した。Ｓａｎｇｅｒ他、Ｐｒｏｃ．　Ｎａｔｌ．　Ａｃａｄ．　Ｓｃｉ．　ＵＳＡ、７４：５４６３－５４６７。オープンリーディングフレームを収集し、ＢＬＡＳＴ検索（ＧｅｎＢａｎｋ、マリイランド州ベセスダ）を使用して分析し、下記の方法を使用して５つの最も相同性のタンパク質とコード化遺伝子の誘導アミノ酸配列との整列を達成した：ＢＣＭ　Ｓｅａｒｃｈ　Ｌａｕｎｃｈｅｒ：Ｍｕｌｔｉｐｌｅ　Ｓｅｑｕｅｎｃｅ　Ａｌｉｇｎｍｅｎｔｓ　Ｐａｔｔｅｒｎ－Ｉｎｄｕｃｅｄ　Ｍｕｌｔｉｐｌｅ　Ａｌｉｇｎｍｅｎｔｓ　Ｍｅｔｈｏｄｓ（参照：Ｆ．Ｃｏｒｐｅｔ、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．、１６：１０８８１－１０８９０（１９８７））。誘導アミノ酸配列の中に存在する機能的モチーフをＭｕｌｔｉＦｉｎｄｅｒにより同定した。

【０１３１】

トマトＲＮＡのノザンブロットハイブリダイゼーション

種々の段階におけるトマトの花（広く開いたまたは乾燥している芽および花およびセネッシング花弁）、トマトの葉、およびトマトの果実種々の成熟段階における（ブレーカー、すなわち、１０％より少ない赤色の緑色果実、ピンク色、すなわち、全果実はオレンジ色またはピンク色である、柔らかいか、あるいは堅い）から単離された全ＲＮＡの１０μｇを１％の変性ホルムアルデヒドアガロースゲル上で分離し、ナイロン膜上に固定化した。

【０１３２】

ランダムプライマーキット（Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ　Ｍａｎｎｈｅｉｍ）を使用して$^{32}$Ｐ－ｄＣＴＰで標識化した全長トマトｃＤＮＡを使用して、フィルター（７×１０$^{7}$ｃｐｍ）をプロービングした。フィルターを１×ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳで室温において１回洗浄し、０．２×ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳで６５℃において３回洗浄した。フィルターを乾燥し、－７０℃においてＸ線フィルムに一夜露出した。結果を第６図、第７図、第８図および第９図に示す。

【０１３３】

アラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）ＲＮＡのノザンブロットハイブリダイゼーション

５週齢（レーン１）、６週齢（レーン２）および７週齢（レーン３）のアラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）植物の葉からの全ＲＮＡを前述したように単離し、１％の変性ホルムアルデヒドアガロースゲル上で分離し、ナイロン膜上に固定化した。ランダムプライマーキット（Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ　Ｍａｎｎｈｅｉｍ）を使用して$^{32}$Ｐ－ｄＣＴＰで標識化した全長アラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）セネッセンス誘導ＤＨＳ　ｃＤＮＡを使用して、フィルター（７×１０$^{7}$ｃｐｍ）をプロービングした。フィルターを１×ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳで室温において１回洗浄し、０．２×ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳで６５℃において３回洗浄した。フィルターを乾燥し、－７０℃においてＸ線フィルムに一夜露出した。結果を第１１図に示す。

【０１３４】

カーネーションＲＮＡのノザンブロットハイブリダイゼーション

種々の花発生段階、すなわち、堅い芽の花（レーン１）、開花し始めた花（レーン２）、完全に開いた花（レーン３）、インローリング（ｉｎｒｏｌｌｉｎｇ）花弁（レーン４）のカーネーション植物の花弁からの全ＲＮＡを前述したように単離し、１％の変性ホルムアルデヒドアガロースゲル上で分離し、ナイロン膜上に固定化した。ランダムプライマーキット（Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ　Ｍａｎｎｈｅｉｍ）を使用して$^{32}$Ｐ－ｄＣＴＰで標識

化した全長カーネーションセネッセンス誘導ＤＨＳ　ｃＤＮＡを使用して、フィルター（７×１０$^{7}$ｃｐｍ）をプロービングした。フィルターを１×ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳで室温において１回洗浄し、０．２×ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳで６５℃において３回洗浄した。フィルターを乾燥し、－７０℃においてＸ線フィルムに一夜露出した。結果を第１２図に示す。

【０１３５】

実施例２．トマトセネッセンス誘導ＤＨＳ遺伝子のソルビトール誘導

トマトの葉を密閉したチャンバー内において２Ｍのソルビトールで６時間処理した。次のようにしてＲＮＡをソルビトール処理した葉から抽出した。

【０１３６】

葉（５ｇ）を液体窒素中で粉砕した。粉砕した粉末を３０ｍｌのグアニジニウム緩衝液（４Ｍのグアニジニウムイソチオシアネート、２．５ｍＭのＮａＯＡｃ　ｐＨ８．５、０．８％のβ－メルカプトエタノール）と混合した。この混合物を４層のチーズクロスを通して濾過し、１０，０００×ｇ、４℃において３０分間遠心した。次いで上清を塩化セシウム密度勾配で２６，０００×ｇにおいて２０時間遠心した。

【０１３７】

ペレット化したＲＮＡを７５％のエタノールですすぎ、６００μｌのＤＥＰＣ処理水の中に再懸濁させ、－７０℃において０．７５ｍｌの９５％のエタノールおよび３０μｌの３ＭのＮａＯＡｃでＲＮＡを沈降させた。１０μｇのＲＮＡを１．２％の変性ホルムアルデヒドアガロースゲル上で分画し、ナイロン膜に移した。ランダムにプライムした$^{32}$Ｐ－ｄＣＴＰ標識化全長ＤＨＳ　ｃＤＮＡ（配列番号１）を使用して、膜を４２℃において一夜プロービングした。次いで０．１％のＳＤＳを含有する１×ＳＳＣで室温において膜を１５分間１回洗浄し、０．１％のＳＤＳを含有する０．２×ＳＳＣで６５℃において各１５分間３回洗浄した。膜を－７０℃においてＸ線フィルムに一夜露出した。

結果を第８図に示す。見ることができるように、ＤＨＳの転写は葉においてソルビトールにより誘導される。

【０１３８】

実施例３．セネッシング花中のトマトＤＨＳ遺伝子の誘導

トマト植物の堅い花の芽および開いた、セネッシング花を収穫し、実施例２におけるようにＲＮＡを単離した。１０μｇのＲＮＡを１．２％の変性ホルムアルデヒドアガロースゲル上で分画し、ナイロン膜に移した。ランダムにプライムした$^{32}$Ｐ－ｄＣＴＰ標識化全長ＤＨＳ　ｃＤＮＡ（配列番号１）を使用して、膜を４２℃において一夜プロービングした。次いで０．１％のＳＤＳを含有する１×ＳＳＣで室温において膜を１５分間１回洗浄し、０．１％のＳＤＳを含有する０．２×ＳＳＣで６５℃において各１５分間３回洗浄した。膜を－７０℃においてＸ線フィルムに一夜露出した。

【０１３９】

結果を第６図に示す。見ることができるように、ＤＨＳの転写はセネッシング花において誘導される。

【０１４０】

実施例４．成熟する果実におけるトマトＤＨＳ遺伝子の誘導

実施例２におけるように、ブレーカー、ピンク色および成熟した果実からＲＮＡを単離した。１０μｇのＲＮＡを１．２％の変性ホルムアルデヒドアガロースゲル上で分画し、ナイロン膜に移した。ランダムにプライムした$^{32}$Ｐ－ｄＣＴＰ標識化全長ＤＨＳ　ｃＤＮＡ（配列番号１）を使用して、膜を４２℃において一夜プロービングした。次いで０．１％のＳＤＳを含有する１×ＳＳＣで室温において膜を１５分間１回洗浄し、０．１％のＳＤＳを含有する０．２×ＳＳＣで６５℃において各１５分間３回洗浄した。膜を－７０℃においてＸ線フィルムに一夜露出した。

【０１４１】

結果を第７図に示す。見ることができるように、ＤＨＳの転写はセネッセンスの開始直前の成熟した、赤色の果実において最強であり、腐敗に導く。

【０１４２】
実施例５．冷却によるトマトセネッセンス誘導ＤＨＳ遺伝子の誘導
鉢中のトマト植物（７～８週齢）を６℃に成長チャンバー内で２日間、３日間または６日間暴露した。光サイクルを８時間の暗闇および１６時間の光に設定した。植物を温室に戻すことによって、再加温した。再加温しない植物を成長チャンバーから取出した直後に収穫した。次のようにしてＲＮＡを葉から抽出した。
【０１４３】
葉（５ｇ）を液体窒素中で粉砕した。粉砕した粉末を３０ｍｌのグアニジニウム緩衝液（４Ｍのグアニジニウムイソチオシアネート、２．５ｍＭのＮａＯＡｃ　ｐＨ８．５、０．８％のβ－メルカプトエタノール）と混合した。この混合物を４層のチーズクロスを通して濾過し、１０，０００×ｇ、４℃において３０分間遠心した。次いで上清を塩化セシウム密度勾配で２６，０００×ｇにおいて２０時間遠心した。ペレット化したＲＮＡを７５％のエタノールですすぎ、６００μｌのＤＥＰＣ処理水の中に再懸濁させ、－７０℃において０．７５ｍｌの９５％のエタノールおよび３０μｌの３ＭのＮａＯＡｃでＲＮＡを沈降させた。
【０１４４】
１０μｇのＲＮＡを１．２％の変性ホルムアルデヒドアガロースゲル上で分画し、ナイロン膜に移した。ランダムにプライムした$^{32}$Ｐ－ｄＣＴＰ標識化全長ＤＨＳ　ｃＤＮＡ（配列番号１）を使用して、膜を４２℃において一夜プロービングした。次いで０．１％のＳＤＳを含有する１×ＳＳＣで室温において膜を１５分間１回洗浄し、０．１％のＳＤＳを含有する０．２×ＳＳＣで６５℃において各１５分間３回洗浄した。膜を－７０℃においてＸ線フィルムに一夜露出した。
【０１４５】
結果を第９図に示す。見ることができるように、冷却温度に暴露し、引き続いて再加温することによって、ＤＨＳの転写は葉において誘導され、そして増強された転写は膜漏出として測定した冷却損傷と相関する。
【０１４６】
実施例６．未同定アラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）ゲノム配列に基づくプライマーを使用するアラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）ＰＣＲ生成物の発生
アラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）ゲノム配列から設計した１対のオリゴヌクレオチドプライマーを使用するＰＣＲにより、アラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）ｃＤＮＡ鋳型から部分的長さのセネッセンス誘導ＤＨＳ配列を発生させた。５’プライマーは配列、５’－ＧＧＴＧＧＴＧＴＴＧＡＧＧＡＡＧＡＴＣ（配列番号７）を有する１９マーである；３’プライマーは配列、ＧＧＴＧＣＡＣＧＣＣＣＴＧＡＴＧＡＡＧＣ－３’（配列番号８）を有する２０マーである。Ｅｘｐａｎｄ　Ｈｉｇｈ　Ｆｉｄｅｌｉｔｙ　ＰＣＲ　Ｓｙｓｔｅｍ（Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ　Ｍａｎｎｈｅｉｍ）および鋳型としてアラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）セネッシング葉ｃＤＮＡライブラリーを使用するポリメラーゼ連鎖反応を次のようにして実施した。
【０１４７】
反応成分：
ｃＥＮＡ　１μｌ（５×１０$^{7}$ｐｆｕ）
ｄＮＴＰ（各々１０ｍＭ）　１μｌ
ＭｇＣｌ$_{2}$（５ｍＭ）＋１０×緩衝液　１μｌ
プライマー１および２（各々１００μＭ）　２μｌ
Ｅｘｐａｎｄ　Ｈｉｇｈ　Ｆｉｄｅｌｉｔｙ　ＤＮＡプライマー　１．７５Ｕ
反応体積　５０μｌ
【０１４８】
反応パラメーター：
９４℃、３分間
９４℃／１分、５８℃／１分、７２℃／２分、４５サイクル

７２℃、１５分間。

【０１４９】

実施例７．ゲノムＤＮＡの単離およびサザン分析

１０ｇのトマト葉組織を液体窒素中で微細粉末に粉砕することによって、ゲノムＤＮＡをトマト葉から抽出した。２５ｍｌの均質化緩衝液を含有する３７．５ｍｌの混合物［１００ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ８．０、１００ｍＭのＥＤＴＡ、２５０ｍＭのＮａＣｌ、１％のサルコシル、１％の２－メルカプトエタノール、１０μｇ／ｍｌのＲＮアーゼおよび１２．５ｍｌのフェノール］を６０℃に前もって加温し、粉砕した組織に添加した。

【０１５０】

この混合物を１５分間震盪した。追加の１２．５ｍｌのクロロホルム／イソアミルアルコール（２４：１）を混合物に添加し、さらに１５分間震盪した。この混合物を遠心し、水性相を２５ｍｌのフェノール／クロロホルム／イソアミルアルコール（２５：２４：１）およびクロロホルム／イソアミルアルコール（２４：１）で再抽出した。室温において１５ｍｌのイソプロパノールを使用する沈澱により、核酸を回収した。沈澱を１ｍｌの水の中に再懸濁させた。

【０１５１】

ゲノムＤＮＡを次のようにして制限酵素消化した：１０μｇのゲノムＤＮＡ、４０μｌの１０×反応緩衝液および１００Ｕの制限酵素（ＸｂａＩ、ＥｃｏＲＩ、ＥｃｏＲＶまたはＨｉｎｄＩＩＩ）を、４００μｌの全反応体積で５～６時間反応させた。次いでこの混合物をフェノール抽出し、エタノール沈降させた。消化したＤＮＡを０．８％のアガロースゲル上で１５ボルトにおいてほぼ１５時間アガロースゲル電気泳動に付した。ゲルを変性緩衝液［８７．６６ｇのＮａＣｌおよび２０ｇのＮａＯＨ／リットル］の中におだやかに撹拌しながら３０分間沈め、蒸留水ですすぎ、中性緩衝液［８７．６６ｇのＮａＣｌおよび６０．５５ｇのＴｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ７．５／リットル］の中におだやかに撹拌しながら３０分間沈めた。ＤＮＡを毛管ブロッティングによりＨｙｂｏｎｄ－$H^+$ナイロン膜に移した。

【０１５２】

１×１０$^6$ｃｐｍ／ｍｌの$^{32}$Ｐ－ｄＣＴＰ標識化ＤＨＳ　ｃＤＮＡまたはＤＨＳ　ｃＤＮＡクローンの３’非コーディング領域を使用して４２℃において、ハイブリダイゼーションを一夜実施した。５０％のホルムアミド、６×ＳＳＣ、５×デンハルト溶液、０．１％ＳＤＳおよび１００ｍｇ／ｍｌの変性サケ精子ＤＮＡを含有する緩衝液中でプレハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーションを実施した。膜を２～４時間プレハイブリダイゼーションした；ハイブリダイゼーションを一夜実施した。

【０１５３】

ハイブリダイゼーションが完結した後、膜を２×ＳＳＣおよび０．１％のＳＤＳ中ですすぎ、次いで２×ＳＳＣおよび０．１％のＳＤＳ中で１５分間洗浄し、０．２×ＳＳＣおよび０．１％のＳＤＳ中で１５分間洗浄した。次いで膜を－８０℃においてＸ線フィルムに一夜露出した。結果を第５図に示す。

【０１５４】

実施例８．アラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）からのセネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａ遺伝子の単離

鋳型としてアラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）セネッシング葉ｃＤＮＡライブラリーを使用するＰＣＲにより、アラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）葉中で発現されたセネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａ遺伝子の全長ｃＤＮＡクローンを得た。最初に、ベクターＴ７プライマー＜ＡＡＴＡＣＧＡＣＴＣＡＣＴＡＴＡＧ＞（配列番号１８）と対合したデジェネレイト上流のプライマー＜ＡＡＡＲＲＹＣＧＭＣＣＹＴＧＣＡＡＧＧＴ＞（配列番号１７）、およびベクターＴ３プライマー＜ＡＴＴＡＡＣＣＣＴＣＡＣＴＡＡＡＧ＞（配列番号２０）と対合したデジェネレイト下流のプライマー＜ＴＣＹＴＴＮＣＣＹＴＣＭＫＣＴＡＡＨＣＣ＞（配列番号１９）を使用して、遺伝子の５’および３’末端

に対応するＰＣＲ生成物を作った。

【０１５５】

ＰＣＲ生成物を配列決定のためにｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔの中にサブクローニングした。次いで、３’特異的プライマー＜ＡＧＡＡＧＡＡＧＴＡＴＡＡＡＡＡＣＣＡＴＣ＞（配列番号２２）と対合した５’特異的プライマー＜ＣＴＧＴＴＡＣＣＡＡＡＡＡＡＴＣＴＧＴＡＣＣ＞（配列番号２１）を使用して全長ｃＤＮＡを作り、配列決定のためにｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔの中にサブクローニングした。

【０１５６】

実施例９．トマト果実からのセネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａ遺伝子の単離

鋳型としてトマト果実ｃＤＮＡライブラリーを使用するＰＣＲにより、トマト果実中で発現されたセネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａ遺伝子の全長ｃＤＮＡクローンを得た。最初に、ベクターＴ７プライマー（配列番号１８）と対合したデジェネレイト上流のプライマー（配列番号１７）、およびベクターＴ３プライマー（配列番号２０）と対合したデジェネレイト下流のプライマー（配列番号１９）を使用して、遺伝子の５’および３’末端に対応するＰＣＲ生成物を作った。ＰＣＲ生成物を配列決定のためにｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔの中にサブクローニングした。次いで、ベクターＴ７プライマー（配列番号１８）と対合した５’特異的プライマー＜ＡＡＡＧＡＡＴＣＣＴＡＧＡＧＡＧＡＧＡＡＡＧＧ＞（配列番号２３）を使用して全長ｃＤＮＡを作り、配列決定のためにｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔの中にサブクローニングした。

【０１５７】

実施例１０．カーネーションからのセネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａ遺伝子の単離

鋳型としてカーネーション花ｃＤＮＡライブラリーを使用するＰＣＲにより、カーネーション花中で発現されたセネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａ遺伝子の全長ｃＤＮＡクローンを得た。最初に、ベクターＴ７プライマー（配列番号１８）と対合したデジェネレイト上流のプライマー（配列番号１７）、およびベクターＴ３プライマー（配列番号２０）と対合したデジェネレイト下流のプライマー（配列番号１９）を使用して、遺伝子の５’および３’末端に対応するＰＣＲ生成物を作った。

【０１５８】

ＰＣＲ生成物を配列決定のためにｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔの中にサブクローニングした。次いで、３’特異的プライマー＜ＡＣＣＡＡＡＡＣＣＴＧＴＧＴＴＡＴＡＡＣＴＣＣ＞（配列番号２５）と対合した５’特異的プライマー＜ＴＴＴＴＡＣＡＴＣＡＡＴＣＧＡＡＡＡＴＡＣＣ＞（配列番号２４）を使用して全長ｃＤＮＡを作り、配列決定のためにｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔの中にサブクローニングした。

【０１５９】

実施例１１．アラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）からのセネッセンス誘導ＤＨＳ遺伝子の単離

アラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）セネッシング葉ｃＤＮＡライブラリーをスクリーニングすることによって、アラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）葉中で発現されたセネッセンス誘導ＤＨＳ遺伝子の全長ｃＤＮＡクローンを得た。スクリーニングに使用したプローブ（配列番号２６）の配列を第３８図に示す。鋳型としてセネッセンス葉ｃＤＮＡライブラリーを使用しかつＧｅｎＢａｎｋにおける未同定ゲノム配列（ＡＢ０１７０６０）から設計したプライマー（第３８図に下線が引かれている領域として示す）を使用するＰＣＲにより、このプローブを得た。ＰＣＲ生成物を配列決定のためにｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔの中にサブクローニングした。

【０１６０】

実施例１２．カーネーションからのセネッセンス誘導ＤＨＳ遺伝子の単離

カーネーションセネッシング花弁ｃＤＮＡライブラリーをスクリーニングすることによって、カーネーション花弁中で発現されたセネッセンス誘導ＤＨＳ遺伝子の全長ｃＤＮＡクローンを得た。スクリーニングに使用したプローブ（配列番号２７）の配列を第３９図に示す。鋳型としてセネッセンス花弁ｃＤＮＡライブラリーおよびデジェネレイトプライ

マー（上流：５’ＴＴＧ ＡＲＧ ＡＡＧ ＡＴＹ ＣＡＴ ＭＡＡ ＲＴＧ ＣＣＴ３’）（配列番号２８）；下流：５’ＣＣＡ ＴＣＡ ＡＡＹ ＴＣＹ ＴＧＫ ＧＣＲ ＧＴＧ ＴＴ３’）（配列番号２９））を使用するＰＣＲにより、このプローブを得た。ＰＣＲ生成物を配列決定のためにｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔの中にサブクローニングした。

【０１６１】

実施例１３．アンチセンスの向きにアラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）ＤＨＳの全長または３’領域を使用するアラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）の形質転換

二重３５Ｓプロモーターの調節下に、全長センセンス誘導アラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）ＤＨＳ ｃＤＮＡ配列またはＤＨＳ遺伝子の３’末端（配列番号３０）（第３６図）（両方はアンチセンス立体配置で発現された）を含有するバイナリーベクター、ｐＫＹＬＸ７１、で、アグロバクテリア（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉａ）を形質転換した。アラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）植物を形質転換されたアグロバクテリア（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉａ）で真空浸潤により形質転換し、生ずる$T_0$植物からの形質転換された種子をアンピシリン上で選択した。

【０１６２】

第２１図～第２４図は形質転換されたアラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）植物の写真であり、形質転換された植物におけるアンチセンスの向きのＤＨＳ遺伝子またはその３’末端の発現がバイオマスを増加させ、例えば、葉を大きくしかつ植物のサイズを大きくすることを示す。第２５図は、トランスジェニックアラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）植物が種子収量を増加したことを図解する。

【０１６３】

実施例１４．アンチセンスの向きにトマトＤＨＳの全長または３’領域を使用するトマト植物の形質転換

二重３５Ｓプロモーターの調節下に、全長センセンス誘導トマトＤＨＳ ｃＤＮＡ配列またはＤＨＳ遺伝子の３’末端（配列番号３１）（第３７図）（両方はアンチセンス立体配置で発現された）を含有するバイナリーベクター、ｐＫＹＬＸ７１、で、アグロバクテリア（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉａ）を形質転換した。これらのアグロバクテリア（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉａ）を使用してトマト葉の外植体を形成し、標準組織培養法によりカルスおよび小植物を発生させ、選択した。形質転換された植物を温室の条件下に成熟果実産生$T_1$植物に成長させた。

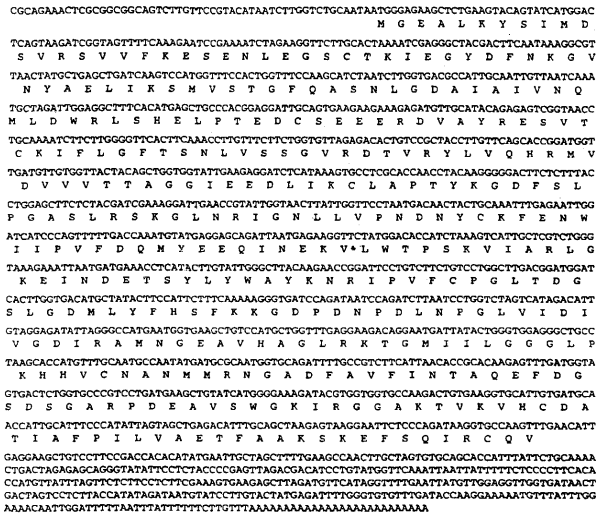
【０１６４】

第２６図～第３５図は、形質転換されたアラアビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）植物において見られるように、形質転換された植物中のセネッセンス誘導トマトＤＨＳ遺伝子の発現の減少がバイオマスを増加させ、例えば、葉のサイズを大きくしかつ植物を大きくすること、ならびにトマト果実の軟化および腐敗を遅延することを示す写真である。

【図１】

図1

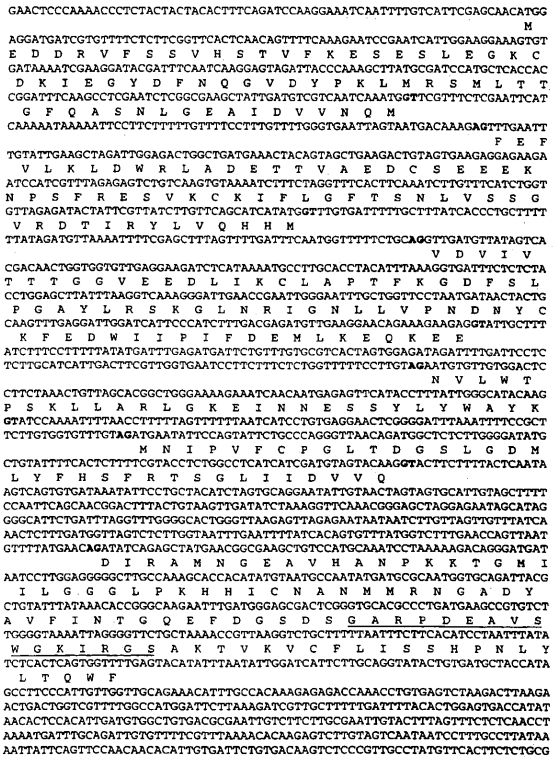
トマトの葉ＤＨＳ ｃＤＮＡ配列



【図２Ａ】

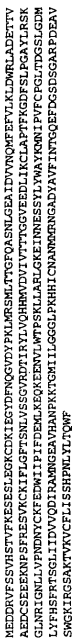
図2A

（ＤＨＳ）予想配列



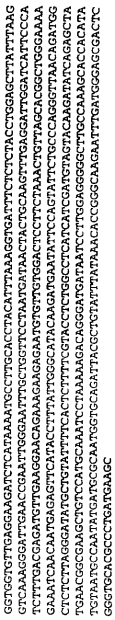
【図２Ｂ】

図2B



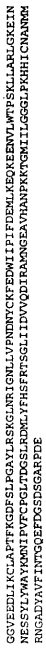
【図２Ｃ】

図2C



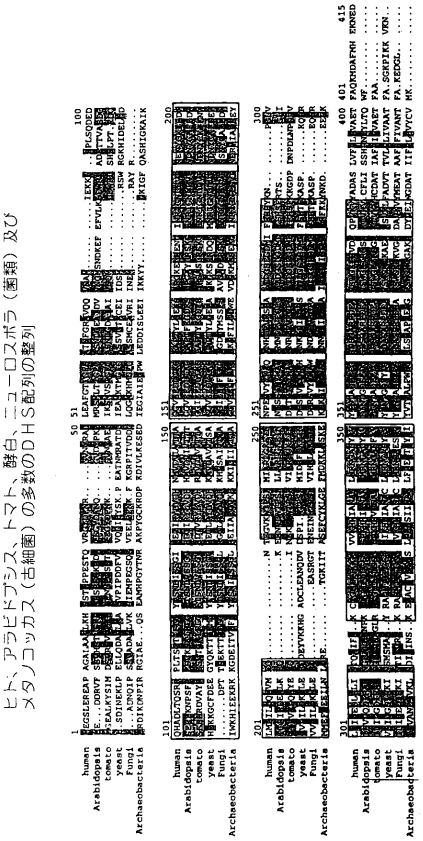
【図２Ｄ】

図2D




【図３】

図3




【図４】

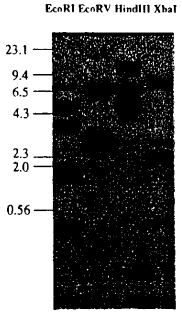
図4




【図５】

図5

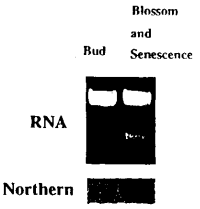
ＤＨＳのサザン分析




【図６】

図6

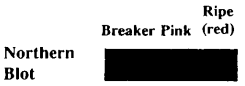
トマトの花に対するＤＨＳのノーサン分析




【図７】

図7

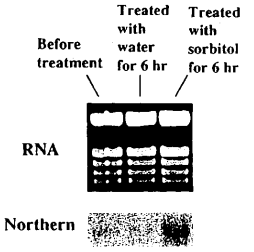
トマト果の発達段階のＤＨＳの
ノーサン分析



【図８】

図8

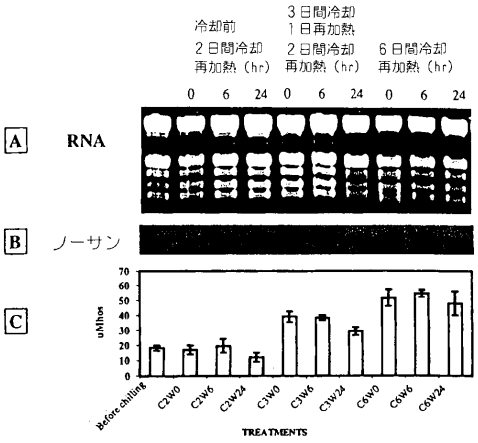
サルビトール処理トマト葉の
ＤＨＳ－２Ｍのノーサン分析




【図９】

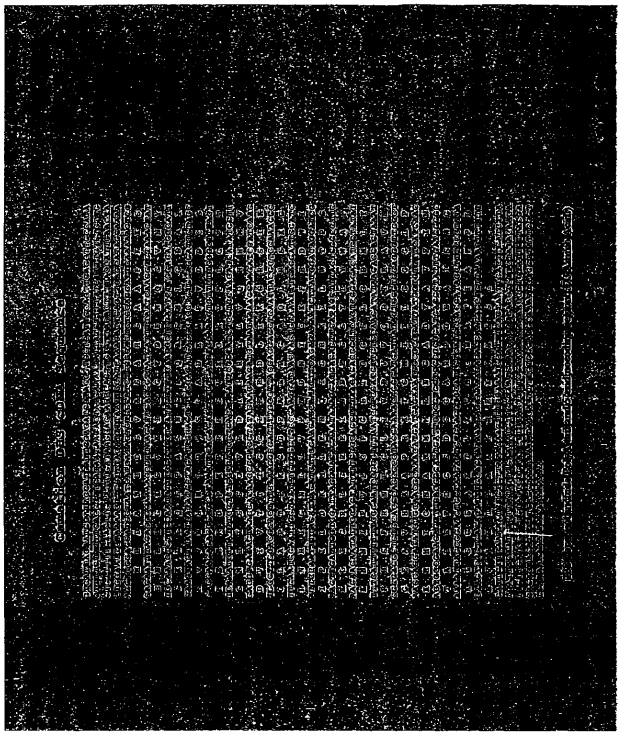
図9

トマト葉冷効果ＤＨＳのノーサン分析




【図１０】

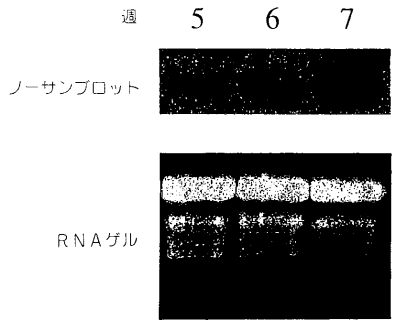
図10



【図１１】

図11

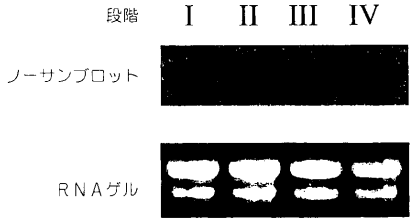
ＷＴ ＡＴエージング葉のノーサン分析




【図１２】

図12

カーネーション花ベン（in situ）ＤＨＳのノーサン分析




【図１３】

図13

トマト **eif5A**

```
AAAGAATCCTAGAGAGAGAAAGGGAATCCTAGAGAGAGAAGCATGTCGGACGAAGAACAC
                                          M  S  D  E  E  H
CATTTTGAGTCAAAGGCAGATGCTGGTGCCTCAAAAACTTTCCCACAGCAAGCTGGAACC
H  F  E  S  K  A  D  A  G  A  S  K  T  F  P  Q  Q  A  G  T
ATCCGTAAGAATGGTTACATCGTTATCAAAGGCCGTCCCTGCAAGGTTGTTGAGGTCTCC
I  R  K  N  G  Y  I  V  I  K  G  R  P  C  K  V  V  E  V  S
ACTTCAAAAACTGGAAAACACGGACATGCTAAATGTCACTTTGTGGCAATTGACATTTTC
T  S  K  T  G  K  H  G  H  A  K  C  H  F  V  A  I  D  I  F
AATGGAAAGAAACTGGAAGATATCGTTCCGTCCTCCCACAATTGTGATGTGCCACATGTT
N  G  K  K  L  E  D  I  V  P  S  S  H  N  C  D  V  P  H  V
AACCGTACCGACTATCAGCTGATTGATATCTCTGAAGATGGTTTTGTCTCACTTCTTACT
N  R  T  D  Y  Q  L  I  D  I  S  E  D  G  F  V  S  L  L  T
GAAAGTGGAAACACCAAGGATGACCTCAGGCTTCCCACCGATGAAAATCTGCTGAAGCAG
E  S  G  N  T  K  D  D  L  R  L  P  T  D  E  N  L  L  K  Q
GTTAAAGATGGGTTCCAGGAAGGAAAGGATCTTGTGGTGTCTGTTATGTCTGCGATGGGC
V  K  D  G  F  Q  E  G  K  D  L  V  V  S  V  M  S  A  M  G
GAAGAGCAGATTAACGCCGTTAAGGATGTTGGTACCAAGAATTAGTTATGTCATGGCAGC
E  E  Q  I  N  A  V  K  D  V  G  T  K  N
ATAATCACTGCCAAAGCTTTAAGACATTATCATATCCTAATGTGGTACTTTGATATCACT
AGATTATAAACTGTGTTATTTGCACTGTTCAAAACAAAAGAAAGAAAACTGCTGTTATGG
CTAGAGAAAGTATTGGCTTTGAGCTTTTGACAGCACAGTTGAACTATGTGAAAATTCTAC
TTTTTTTTTTTTGGGTAAAATACTGCTCGTTTAATGTTTTGCAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

764 bps，ポリ（Ａ）テイルを含まず；160 アミノ酸

【図１４】

図14

続き－Ｆ５Ａ

CTCTTTTACATCAATCGAAAAAAAATTAGGGTTCTTATTTTAGAGTGAGA

GGCGAAAAATCGAACG**ATG**TCGGACGACGATCACCATTTCGAGTCATCGG
**M S D D D D H H F E S S A**
CCGACGCCGGAGCATCCAAGACTTACCCTCAACAAGCTGGTACAATCCGC
**D A G A S K T Y P Q Q A G T I R**
AAGAGCGGTCACATCGTCATCAAAAATCGcCCtTGCAAGGtGGTTGAGGT
**K S G H I V I K N R P C K V V E V**
TTCTACCTCCAAGACTGGCAAGCACGGTCATGCCAAATGTCACTTTGTTG
**S T S K T G K H G H A K C H F V A**
CCATTGACATTTTCAACGGCAAGAAGCTGGAAGATATTGTCCCCTCATCC
**I D I F N G K K L E D I V P S S**
CACAATTGTGATGTTCCACATGTCAACCGTGTCGACTACCAGCTGCTTGA
**H N C D V P H V N R V D Y Q L L D**
TATCACTGAAGATGGCTTTGTTAGTCTGCTGACTGACAGTGGTGACACCA
**I T E D G F V S L L T D S G D T K**
AGGATGATCTGAAGCTTCCTGCTGATGAGGCCCTTGTGAAGCAGATGAAG
**D D L K L P A D E A L V K Q M K**
GAGGGATTTGAGGCGGGGAAAGACTTGATTCTGTCAGTCATGTGTGCAAT
**E G F E A G K D L I L S V M C A M**
GGGAGAAGAGCAGATCTGCGCCGTCAAGGACGTTAGTGGTGGCAAG**TAG**A
**G E E Q I C A V K D V S G G K**
AGCTTTTGATGAATCCAATACTACGCGGTGCAGTTGAAGCAATAGTAATC
TCGAGAACATTCTGAACCTTATATGTTGAATTGATGGTGCTTAGTTTGTT
TTGGAAATCTCTTTGCAATTAAGTTGTACCAAATCAATGGATGTAATGTC
TTGAATTTGTTTTATTTTGTTTTGATGTTTGCTGtGATTGCATTATGCA
TTGTTATGAGTTATGACCTGTTATAACACAAGGTTTTGGTAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAA

*790 bps, 160 アミノ酸*

【図１５】

図15

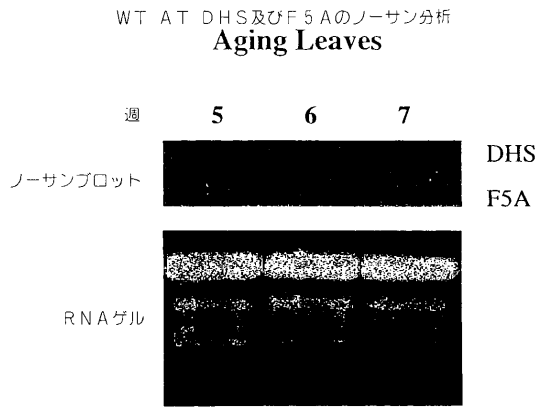
アラビドプシスＦ５Ａ

CTGTTACCAAAAAATCTGTACCGCAAAATCCTCGTCGAAGCTCGCTGCTGCAACC**ATG**TC
**M S**
CGACGAGGAGCATCACTTTGAGTCCAGTGACGCCGGAGCGTCCAAAACCTACCCTCAACA
**D E E H H F E S S D A G A S K T Y P Q Q**
AGCTGGAACCATCCGTAAGAATGGTTACATCGTCATC**AAAAATCGTCCCTGCAAGGT**TGT
**A G T I R K N G Y I V I K N R P C K V V**
TGAGGTTTCAACCTCGAAGACTGGCAAGCATGGTCATGCTAAATGTCATTTTGTAGCTAT
**E V S T S K T G K H G H A K C H F V A I**
TGATATCTTCACCAGCAAGAAACTCGAAGATATTGTTCCTTCTTCCCACAATTGTGATGT
**D I F T S K K L E D I V P S S H N C D V**
TCCTCATGTCAACCGTACTGATTATCAGCTGATTGACATTTCTGAAGATGGATATGTCAG
**P H V N R T D Y Q L I D I S E D G Y V S**
TTTGTTGACTGATAACGGTAGTACCAAGGATGACCTTAAGCTCCCTAATGATGACACTCT
**L L T D N G S T K D D L K L P N D D T L**
GCTCCAACAGATCAAGAGT**GGGTTTGATGATGGAAAAGA**TCTAGTGGTGAGTGTAATGTC
**L Q Q I K S G F D D G K D L V V S V M S**
AGCTATGGGAGAGGAACAGATCAATGCTCTTAAGGACATCGGTCCCAAG**TGA**GACTAACA
**A M G E E Q I N A L K D I G P K**
AAGCCTCCCCTTTGTTATGAGATTCTTCTTCTTCTGTAGGCTTCCATTACTCGTCGGAGA
TTATCTTGTTTTTGGGTTACTCCTATTTTGGATATTTAAACTTTTGTTAATAATGCCATC
TTCTTCAACCTTTTCCTTCTAGATGGTTTTTATACTTCTTCT

754 bps, ポリ（Ａ）テイルを含まず：158 アミノ酸

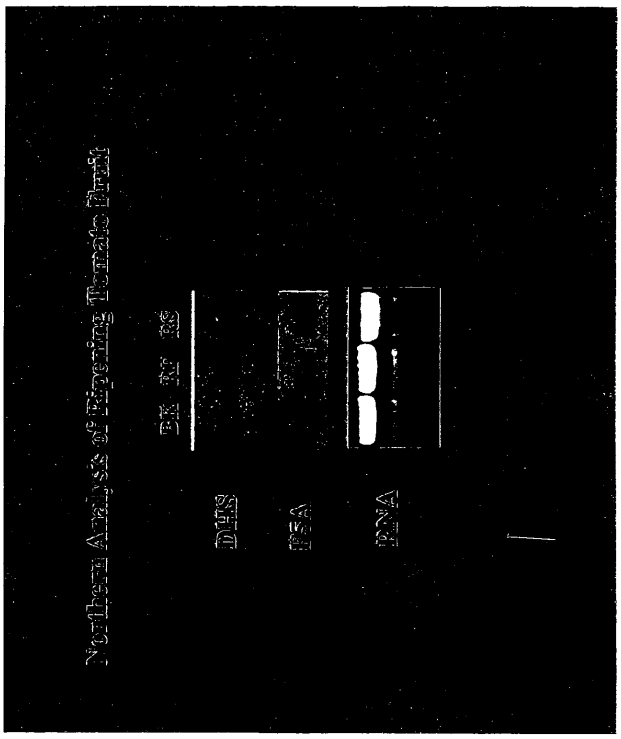
【図１６】

図16



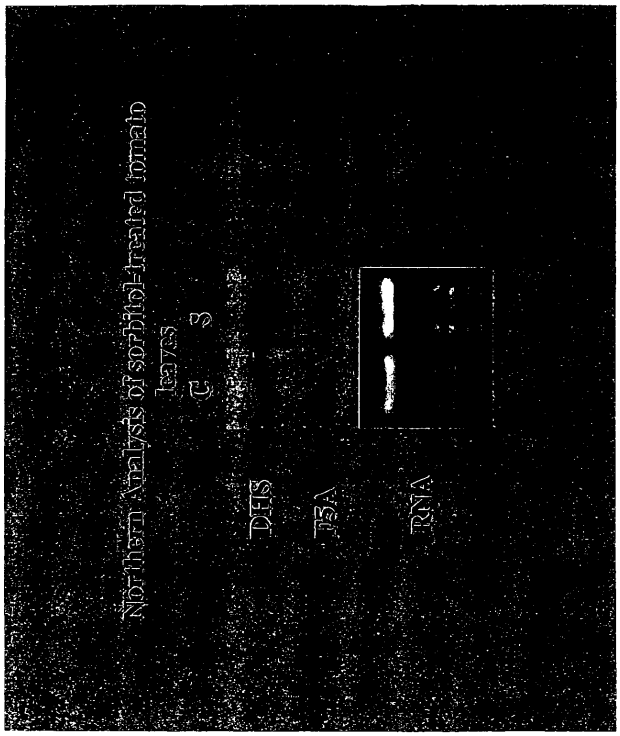

【図１７】

図17



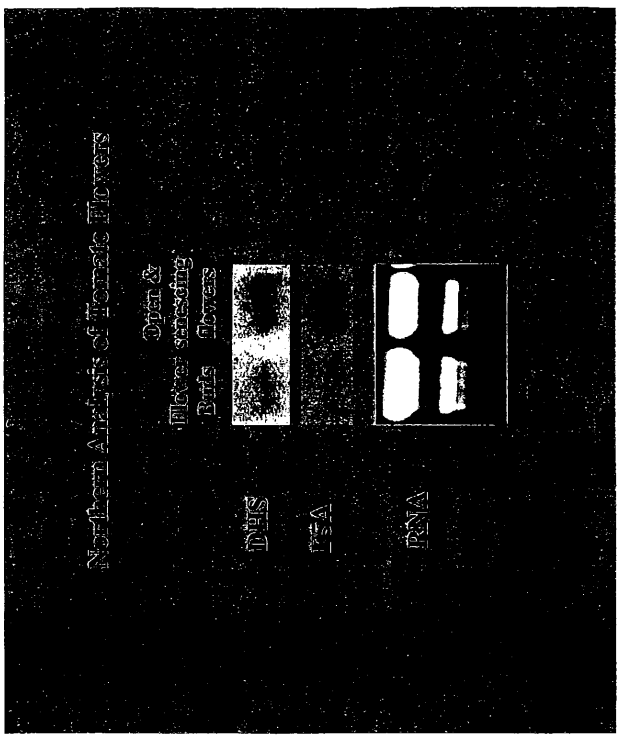
【図１８】

図18



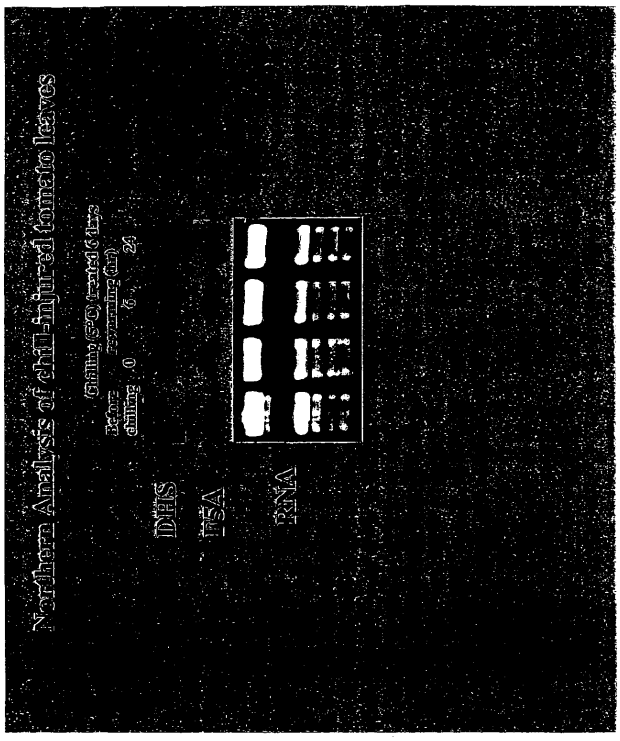

【図１９】

図19



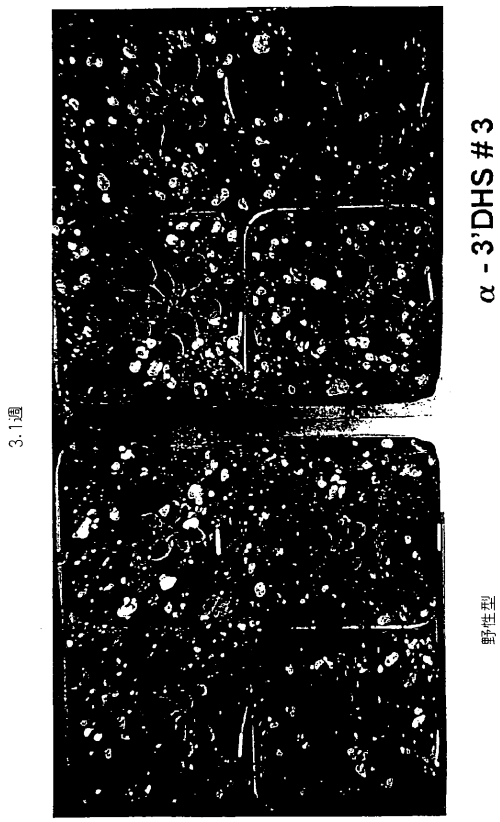

【図２０】

図20



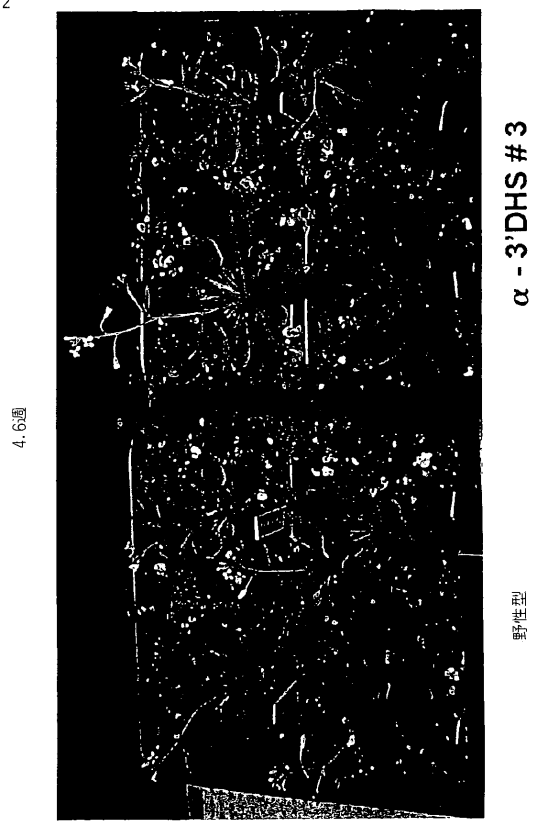

【図２１】

図21



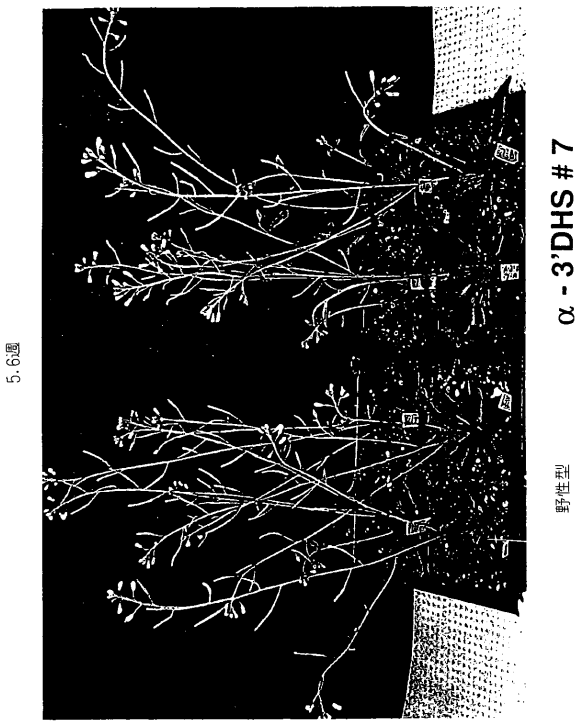
【図２２】

図22




【図２３】

図23



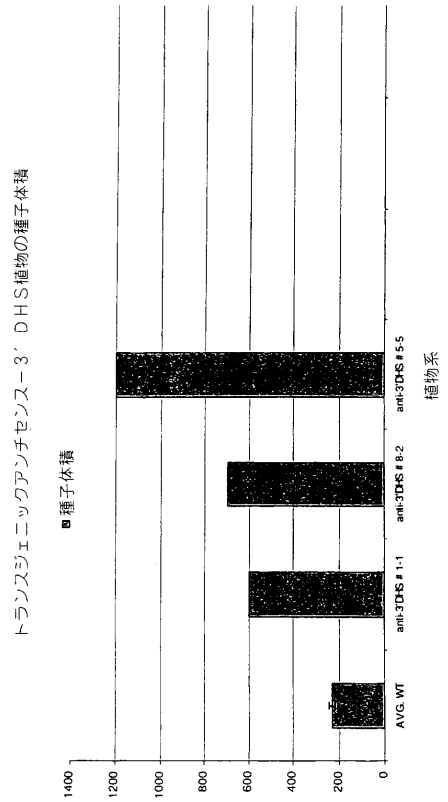

【図２４】

図24



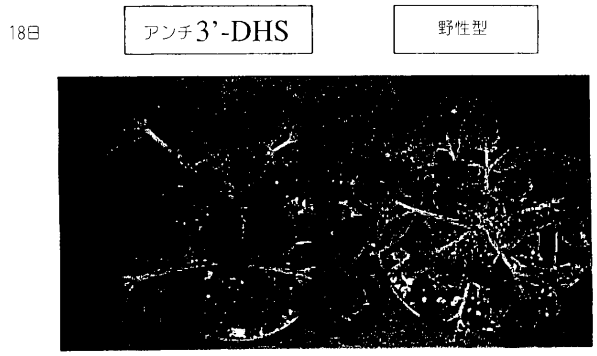

【図２５】

図25



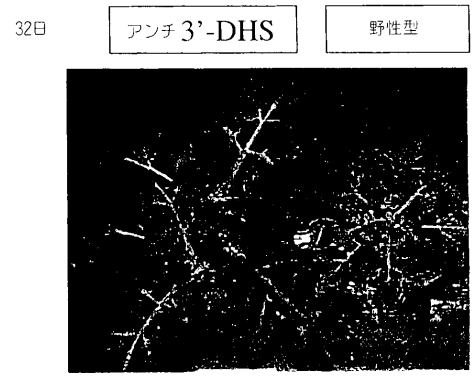
【図２６】

図26



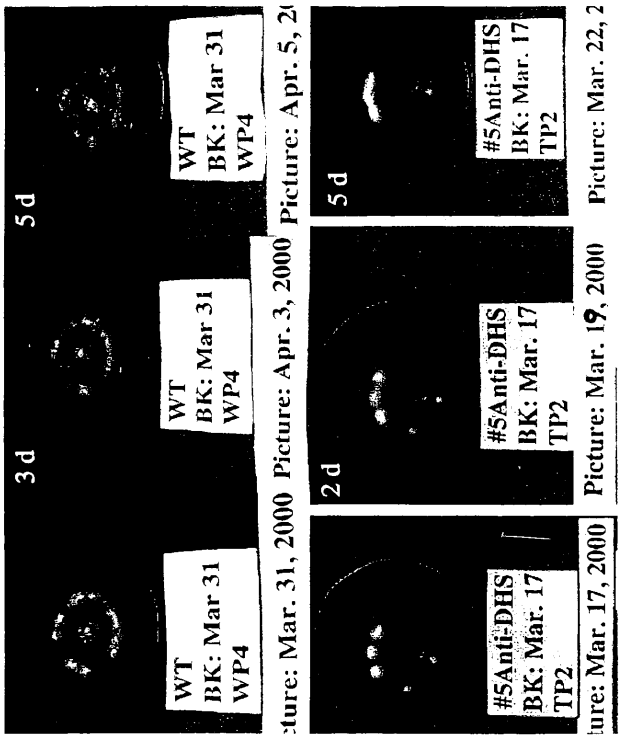

【図２７】

図27



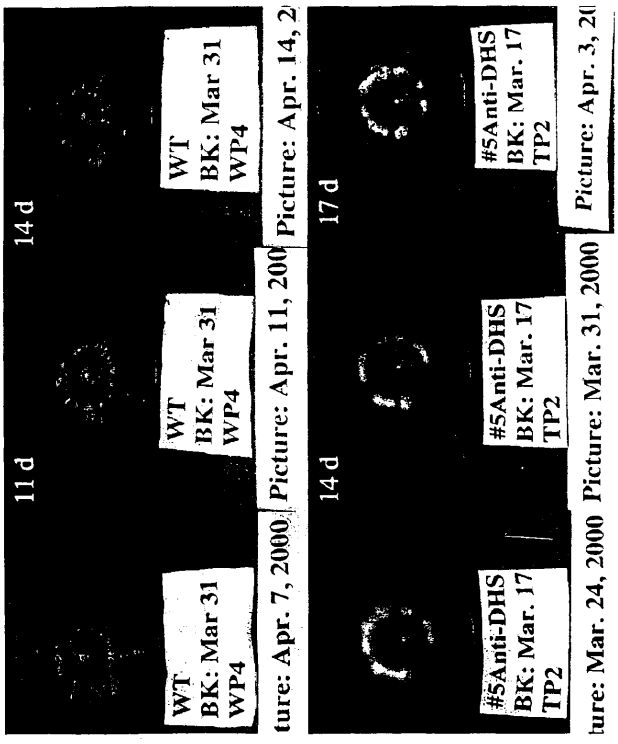

【図２８】

図28



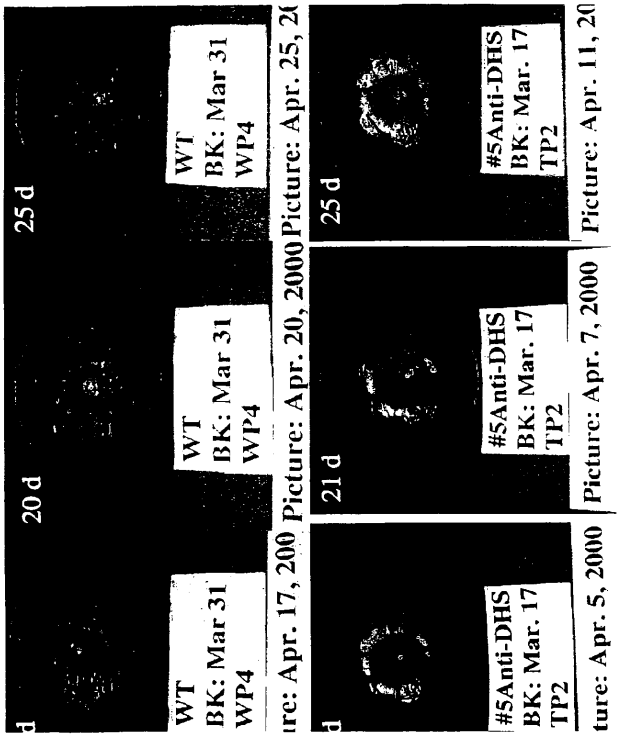

【図２９】

図29



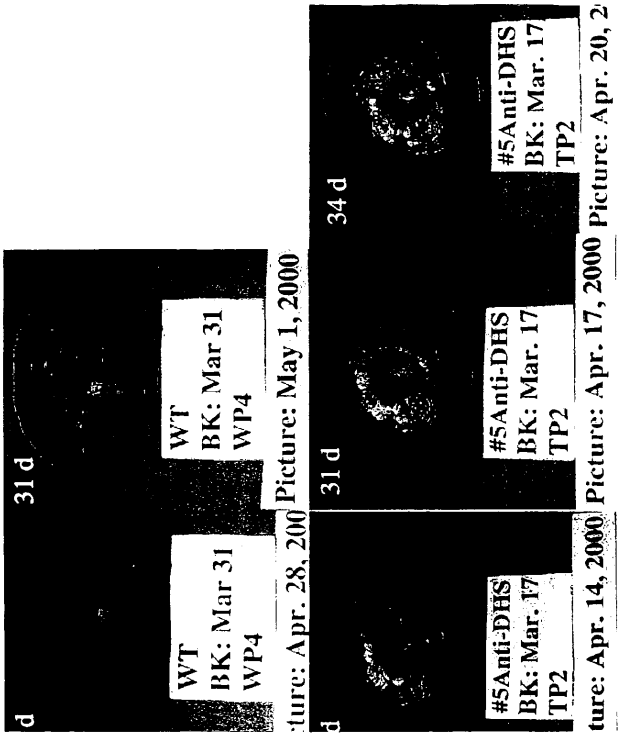

【図３０】

図30



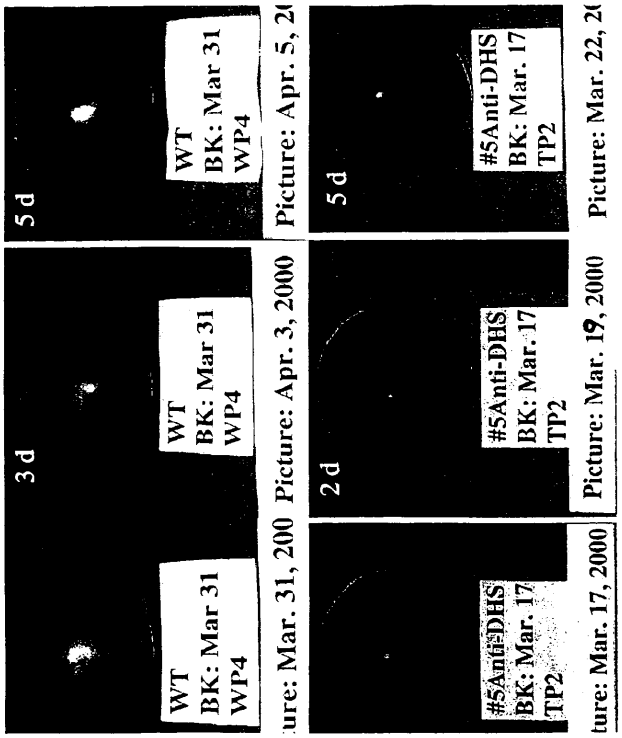
【図３１】

図31



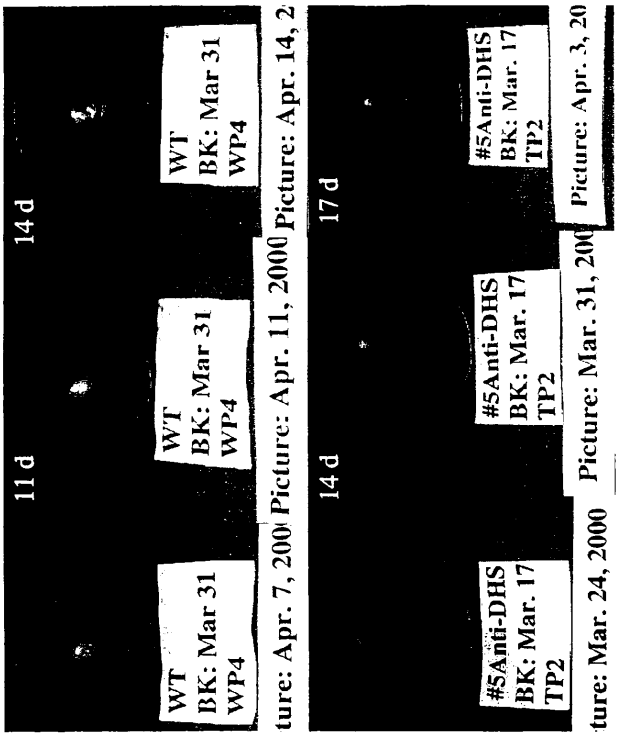

【図３２】

図32



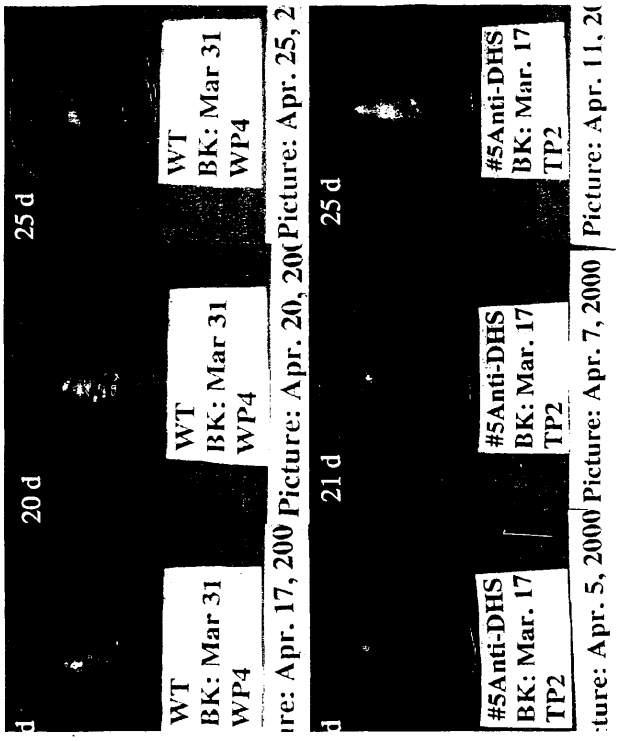

【図３３】

図33



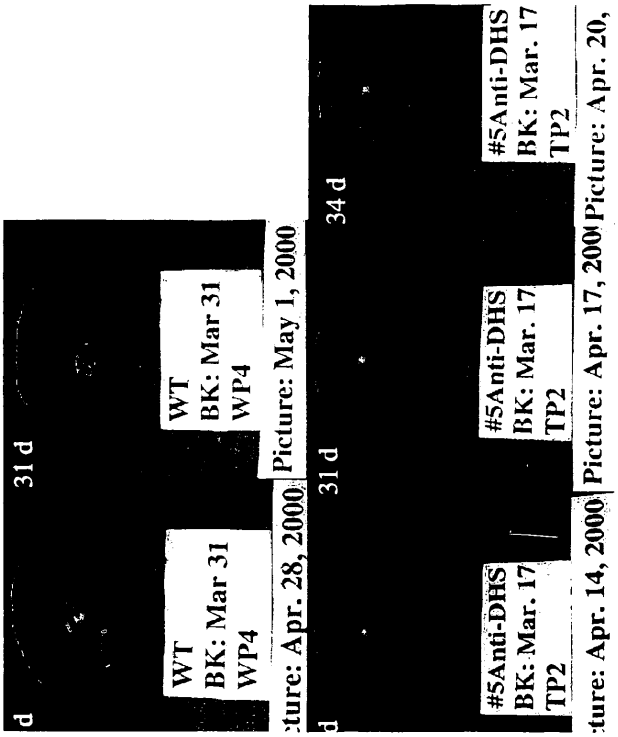

【図３４】

図34



【図３５】

図35




【図３６】

図36

アラビドプシスアンチセンスのための３′－末端ＤＨＳ

ヌクレオチド配列及び推定されるアミノ酸配列

```
TGCACGCCCTGATGAAGCTGTGTCTTGGGGTAAAATTAGGGGTTCTGCTAAAACCGTTAAGGTCTGCTTTT
  A  R  P  D  E  A  V  S  W  G  K  I  R  G  S  A  K  T  V  K  V  C  F

TAATTTCTTCACATCCTAATTTATATCTCACTCAGTGGTTTTGAGTACATATTTAATATTGGATCATTCTT
L  I  S  S  H  P  N  L  Y  L  T  Q  W  F

GCAGGTATACTGTGATGCTACCATAGCCTTCCCATTGTTGGTTGCAGAAACATTTGCCACAAAGAGAGACC
AAACCTGTGAGTCTAAGACTTAAGAACTGACTGGTCGTTTTGGCCATGGATTCTTAAAGATCGTTGCTTTT
TGATTTTACACTGGAGTGACCATATAACACTCCACATTGATGTGGCTGTGACGCGAATTGTCTTCTTGCGA
ATTGTACTTTAGTTTCTCTCAACCTAAAATGATTTGCAGATTGTGTTTTCGTTTAAAACACAAGAGTCTTG
TAGTCAATAATCCTTTGCCTTATAAAATTATTCAGTTCCAACAAAAAAAAAAAAAAAA

------------------------------------------------------------

ヌクレオチド配列
TGCACGCCCTGATGAAGCTGTGTCTTGGGGTAAAATTAGGGGTTCTGCTAAAACCGTTAAGGTCTGCTTTT
TAATTTCTTCACATCCTAATTTATATCTCACTCAGTGGTTTTGAGTACATATTTAATATTGGATCATTCTT
GCAGGTATACTGTGATGCTACCATAGCCTTCCCATTGTTGGTTGCAGAAACATTTGCCACAAAGAGAGACC
AAACCTGTGAGTCTAAGACTTAAGAACTGACTGGTCGTTTTGGCCATGGATTCTTAAAGATCGTTGCTTTT
TGATTTTACACTGGAGTGACCATATAACACTCCACATTGATGTGGCTGTGACGCGAATTGTCTTCTTGCGA
ATTGTACTTTAGTTTCTCTCAACCTAAAATGATTTGCAGATTGTGTTTTCGTTTAAAACACAAGAGTCTTG
TAGTCAATAATCCTTTGCCTTATAAAATTATTCAGTTCCAACAAAAAAAAAAAAAAAA

ARPDEAVSWGKIRGSAKTVKVCFLISSHPNLYLTQWF
```

【図３７】

図37

トマトアンチセンスのために使用される３′－
末端デオキシプシンシンサーゼ
ヌクレオチド配列及び推定されるアミノ酸配列

```
GGTGCTCGTCCTGATGAAGCTGTATCATGGGGAAAGATACGTGGTGTGCCAAGACTGTGAAGGTGCATTGTGATGCAAC
G  A  R  P  D  E  A  V  S  W  G  K  I  R  G  G  A  K  T  V  K  V  H  C  D  A  T

CATTGCATTTCCCATATTAGTAGCTGAGACATTTGCAGCTAAGAGTAAGGAATTCTCCAGATAAGGTGCCAAGTTTGAA
  I  A  F  P  I  L  V  A  E  T  F  A  A  K  S  K  E  F  S  Q  I  R  C  Q  V

CATTGAGGAAGCTGTCCTTCCGACCACACATATGAATTGCTAGCTTTGAAGCCAACTTGCTAGTGTGCGAGCACCATTTA
TTCTGCAAAACTGACTAGAGAGCAGGGTATATTCTCTACCCGAGTTAGACGACATCTGTATGTTCAAATTAATTAT
TTTTCTCCCCTTCACCATGTTATTTAGTTCTCTTCTCGAAAGTGAAGAGCTTAGATGTTCATAGGTTTTGAATT
ATGTTGGAGGTTGGTGATAACTGACTAGTCCTCTTACCATATAGATAATGTATCCTTGTACTATGAGATTTTGGGTGTGT
TTGATACCAAGGAAAAATGTTTATTTGGAAAACAATTGGATTTTTAATTTAAAAAAAAAAAAAAA

------------------------------
ヌクレオチド配列
GGTGCTCGTCCTGATGAAGCTGTATCATGGGGAAAGATACGTGGTGTGCCAAGACTGTGAAGGTGCATTGTGATGCAAC
CATTGCATTTCCCATATTAGTAGCTGAGACATTTGCAGCTAAGAGTAAGGAATTC

TCCCAGATAAGGTGCCAAGTTTGAACATTGAGGAAGCTGTCCTTCCGACCACACATATGAATTGCTAGCTTTGAAGCCA
ACTTCTATTCTCCCCTTCACCATGTTATTTAGTTCTCTTCTCGAAAGTGAAGAGCTTAGATGTTCATAGGTTTTGAATT
ATCCCTGTATGGTTCAAATTAATTATTTTCTCCCCTTCACCATGTTATTTAGTTCTCTTCTCGAAAGTGAAGAG
CTTAGATGTTCATAGGTTTTGAATTAATTCTGGAGGTTGGTGATAACTGACTAGTCCTCTTACCATATAGATAATGTATCC
TTGTACTATGAGATTTTGGGTGTGTTGATACCAAGGAAAAATGTTTATTTGGAAAACAATTGGATTTTTAATTTAAAAA
AAATTGNTTAAAAAAAAAAAAAA
```

【図３８】

図38

600bp アラビドプシスデオキシプシンシンサーゼプローブ

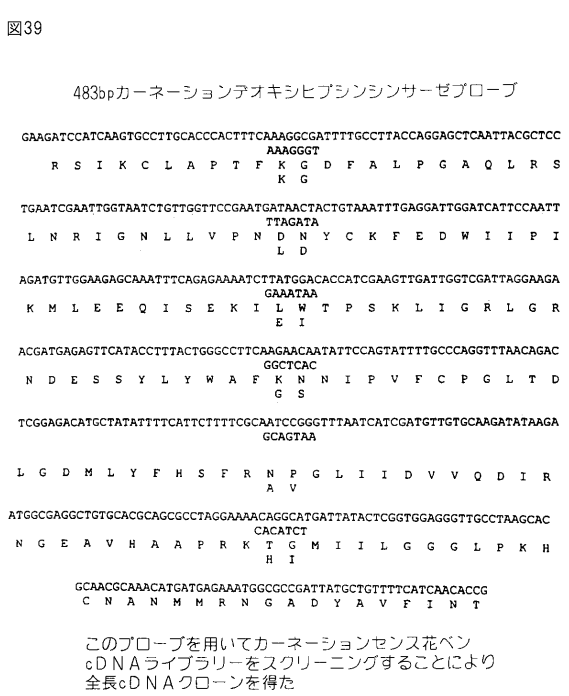
プライマー１（下線部分）

```
GGTGGTGTTGAGGAAGATCTCATAAAATGCCTTGCACCTACATTTAAAGGTGATTTCTCTCTACCTGGAGC
                                TTATTTAAG
 G  G  V  E  E  D  L  I  K  C  L  A  P  T  F  K  G  D  F  S  L  P  G  A
                                   Y  L  R
GTCAAAGGGATTGAACCGAATTGGGAATTTGCTGGTTCCTAATGATAACTACTGCAAGTTTGAGGATTGGA
                             TCATTCCCA
 S  K  G  L  N  R  I  G  N  L  L  V  P  N  D  N  Y  C  K  F  E  D  W  I
                                   I  P
TCTTTGACGAGATGTTGAAGGAACAGAAAGAAGAGAATGTGTTGTGGACTCCTTCTAAACTGTTAGCACGG
                          CTGGGAAAA
 I  F  D  E  M  L  K  E  Q  K  E  E  N  V  L  W  T  P  S  K  L  L  A  R
                                L  G  K
GAAATCAACAATGAGAGTTCATACCTTTATTGGGCATACAAGATGAATATTCCAGTATTCTGCCCAGGGTT
                             AACAGATGG
 E  I  N  N  E  S  S  Y  L  Y  W  A  Y  K  M  N  I  P  V  F  C  P  G  L
                                T  D  G
CTCTCTTAGGGATATGCTGTATTTTCACTCTTTTCGTACCTCTGGCCTCATCATCGATGTAGTACAAGATA
                          TCAGAGCTA


 S  L  R  D  M  L  Y  F  H  S  F  R  T  S  G  L  I  I  D  V  V  Q  D  I
                                   R  A
TGAACGGCGAAGCTGTCCATGCAAATCCTAAAAAGACAGGGATGATAATCCTTGGAGGGGGCTTGCCAAAG
                             CACCACATA
 M  N  G  E  A  V  H  A  N  P  K  K  T  G  M  I  I  L  G  G  G  L  P  K
                                H  H  I
TGTAATGCCAATATGATGCGCAATGGTGCAGATTACGCTGTATTTATAAACACCGGGCAAGAATTTGATGG
                          GAGCGACTC
 C  N  A  N  M  M  R  N  G  A  D  Y  A  V  F  I  N  T  G  Q  E  F  D  G
                                S  D  S
                   GGGTGCACGCCCTGATGAAGC
                      G  A  R  P  D  E
```

プライマー２（下線部分）

【図３９】




このプローブを用いてカーネーションセンス花ベン
ｃＤＮＡライブラリーをスクリーニングすることにより
全長ｃＤＮＡクローンを得た

【配列表】
2012187113000001.app
【手続補正書】
【提出日】平成24年7月4日(2012.7.4)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
配列番号１２または配列番号１４のアミノ酸配列に対して少なくとも９５％の配列同一性を有する、単離されたセネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａ（翻訳開始因子５Ａ）ポリペプチド。
【請求項２】
配列番号１２または配列番号１４のアミノ酸配列を含む、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項３】
配列番号１２または配列番号１４のアミノ酸配列からなる、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項４】
トマトまたはカーネーションから単離された、請求項１～３のいずれか一項に記載のポリペプチド。
【請求項５】
請求項１～４のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含

む、単離されたポリヌクレオチド。
【請求項６】
配列番号１１または配列番号１３のヌクレオチド配列を含む、請求項５記載のポリヌクレオチド。
【請求項７】
配列番号１１または配列番号１３のヌクレオチド配列からなる、請求項５記載のポリヌクレオチド。
【請求項８】
請求項５～７のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドと、植物において前記ポリヌクレオチドが転写されるように、前記ポリヌクレオチドに作用可能に連鎖された調節配列と、を含むベクター。
【請求項９】
請求項５～７のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドとハイブリダイゼーションする、アンチセンスポリヌクレオチド。
【請求項１０】
請求項９に記載のアンチセンスポリヌクレオチドと、植物において前記アンチセンスポリヌクレオチドが転写されるように、前記アンチセンスポリヌクレオチドに作用可能に連鎖された調節配列と、を含むベクター。
【請求項１１】
植物における内因的セネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａ遺伝子の発現を阻害する方法であって、
請求項１０に記載のベクターを少なくとも１つの植物細胞のゲノムの中に組込む工程を含み、
前記アンチセンスポリヌクレオチドが転写されることによって、前記植物における内因的セネッセンス誘導ｅｌＦ－５Ａ遺伝子の発現が阻害される、前記方法。
【請求項１２】
環境ストレス誘導および／または病原体誘導セネッセンスに対する植物の耐性を増加させる方法であって、
請求項１０に記載のベクターを少なくとも１つの植物細胞のゲノムの中に組込む工程を含み、
前記アンチセンスポリヌクレオチドが転写されることによって、環境ストレス誘導および／または病原体誘導セネッセンスに対する前記植物の耐性が、野生型植物と比較して増加する、前記方法。
【請求項１３】
植物のバイオマスを増加させる方法であって、
請求項１０に記載のベクターを少なくとも１つの植物細胞のゲノムの中に組込む工程を含み、
前記アンチセンスポリヌクレオチドが転写されることによって、前記植物のバイオマスが野生型植物と比較して増加する、前記方法。
【請求項１４】
植物の種子収量を増加させる方法であって、
請求項１０に記載のベクターを少なくとも１つの植物細胞のゲノムの中に組込む工程を含み、
前記アンチセンスポリヌクレオチドが転写されることによって、前記植物の種子収量が野生型植物と比較して増加する、前記方法。
【請求項１５】
植物における果実の軟化および腐敗を遅延させる方法であって、
請求項１０に記載のベクターを少なくとも１つの植物細胞のゲノムの中に組込む工程を含み、
前記アンチセンスポリヌクレオチドが転写されることによって、前記植物における果実

の軟化および腐敗が野生型植物と比較して遅延する、前記方法。
【請求項１６】
植物における年齢に関係するセネッセンスおよび／または環境的ストレスに関係するセネッセンスを変更する方法であって、
請求項１０に記載のベクターを少なくとも１つの植物細胞のゲノムの中に組込む工程を含み、
前記アンチセンスポリヌクレオチドが転写されることによって、前記植物における年齢に関係するセネッセンスおよび／または環境的ストレスに関係するセネッセンスが野生型植物に対して変更される、前記方法。
【請求項１７】
植物における種子老化を増加させる方法であって、
請求項１０に記載のベクターを少なくとも１つの植物細胞のゲノムの中に組込む工程を含み、
前記アンチセンスポリヌクレオチドが転写されることによって、前記植物における種子老化が野生型植物と比較して増加する、前記方法。
【請求項１８】
前記植物がトマトまたはカーネーションである、請求項１１～１７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１９】
請求項１１～１８のいずれか一項に記載の方法により産生される植物。
【請求項２０】
請求項１９に記載の植物の子孫、植物部分または種子。

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. | | FI | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|---|
| ***A01H 5/00*** | ***(2006.01)*** | Ａ０１Ｈ 5/00 | Ａ | |

(72)発明者 トンプソン，ジョン イー.
カナダ国，オンタリオ エヌ２ジェイ ４ジー８，ウォータールー，ウールウィッチ ストリート ６４０
(72)発明者 ワン，トザン－ウェイ
カナダ国，オンタリオ エヌ２ジェイ ３ビー８，ウォータールー，リジャイナ，ストリート ノース ３００，アパートメント １－１１０９
(72)発明者 ル，ドンジェン リリー
カナダ国，オンタリオ エヌ２エル ３ビー８，ウォータールー，シーグラム ドライブ １００

Ｆターム(参考) 2B030 AA02 AB03 AD04 AD05 AD07 AD20 CA17 CB02 CD17
4B024 AA08 BA10 BA79 CA02 CA20 DA01 EA04 EA10 FA02 GA11 GA17
4B050 CC03 DD09 LL10
4B065 AA87Y AA95X AB01 BA02 CA29 CA53

(54)【発明の名称】植物のデオキシハイプシンシンターゼをコードするＤＮＡ、植物の真核開始因子５Ａ、トランスジェニック植物、および植物におけるセネッセンスおよびプログラムされた細胞死をコントロールする方法