



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0616416-1 A2**

(22) Data de Depósito: 25/09/2006
(43) Data da Publicação: 21/06/2011
(RPI 2111)



(51) *Int.Cl.:*
C12N 15/09 2006.01
C12N 1/15 2006.01
C12N 1/19 2006.01
C12N 1/21 2006.01
C12N 5/10 2006.01

(54) Título: **PROTOPORFIRINOGÊNIO OXIDASE
TENDO ATIVIDADE DE CONFERIR RESISTÊNCIA
CONTRA ACIFLUORFEN E GENE DA MESMA**

(30) Prioridade Unionista: 26/09/2005 JP 2005-278942

(73) Titular(es): NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION
HOKKAIDO UNIVERSITY, NIPPON SODA CO., LTD.

(72) Inventor(es): FUKAGAWA TAKAKO, KATO KAZUSHIGE,
TANAKA AYUMI, TANAKA RYOUICHI

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler &
Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT JP2006319001 de 25/09/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/034953 de 29/03/2007

(57) Resumo: PROTOPORFIRINOGÊNIO OXIDASE TENDO ATIVIDADE DE CONFERIR RESISTÊNCIA CONTRA ACIFLUORFEN E GENE DA MESMA. A presente invenção refere-se a protoporfirinogênio oxidase tendo uma atividade de conferir resistência ao acifluorfen e gene do mesmo são proporcionados. O gene de protoporfirinogênio oxidase de cianobactéria é identificado através de introdução de um gene de protoporfirinogênio oxidase de Arabidopsis em cianobactéria, ruptura de um gene de cianobactéria com um transposon, seleção de uma cepa mutante na qual o gene de protoporfirinogênio oxidase está rompido, identificação do gene de protoporfirinogênio oxidase rompido e isolamento do gene de protoporfirinogênio oxidase rompido. Esse procedimento é eficaz como uma técnica de isolamento de gene quando uma proteína derivada de outra espécie de organismo que é homóloga a uma proteína conhecida (por exemplo, protoporfirinogênio oxidase de cianobactéria) pode não ser encontrada em um banco de dados de gene de outra espécie.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**PROTOPORFIRINOGÊNIO OXIDASE TENDO ATIVIDADE DE CONFERIR RESISTÊNCIA CONTRA ACIFLUORFEN E GENE DA MESMA**".

Campo Técnico

5 A presente invenção refere-se a protoporfirinogênio oxidases tendo uma atividade de conferir resistência contra acifluorfen e se refere, particularmente, a protoporfirinogênio oxidases de cianobactérias, genes das mesmas, transformantes nos quais o gene é incorporado, etc.

Técnica Antecedente

10 A protoporfirinogênio oxidase é uma enzima que catalisa a reação em estágio final de síntese de heme e síntese de clorofila, isto é, catalisa a reação que remove seis elétrons de protoporfirinogênio IX para sintetizar protoporfirina IX. Heme é um co-fator de heme proteínas, tais como hemoglobina e citocroma, e é uma molécula essencial para respiração, metabolismo de energia e defesa contra estresse por oxigênio. A via sintética de heme comumente existe em microorganismos, plantas e animais e sintetiza heme a partir de um ácido δ -aminolevulínico precursor. Ainda, em plantas, vias sintéticas de heme e clorofila compartilham etapas comuns do ácido δ -aminolevulínico precursor em protoporfirina IX. Protoporfirinogênio oxidase é considerada como exercendo um papel regulatório nessa via sintética. Em plantas terrestres, a enzima protoporfirinogênio oxidase, a qual é responsável pelo sistema metabólico de clorofila, pode ser uma enzima-alvo para herbicidas de difenil éter (aqui depois referido como DPE em alguns casos). Quando herbicidas de DPE inibem a atividade de protoporfirinogênio oxidase, protoporfirinogênio IX, um substrato da enzima, se acumulará no cloroplasto e eventualmente o protoporfirinogênio IX vazará para o citosol, onde ele é oxidado em protoporfirina IX pela peroxidase. Quando exposta à luz e oxigênio, a protoporfirina IX pode produzir oxigênio simples e mesmo outras espécies de oxigênio reativas. Peroxidação de lipídio e dano conferido à membrana resultam em rápida morte de células vegetais (Lee et al., 1993, *Plant Physiol.*, 102, 881). Por outro lado, cianobactérias são bem-conhecidas por serem capazes de sobreviver na presença de herbicida de DPE, embora

15

20

25

30

a razão ou mecanismo para tal não seja conhecido em geral.

Genes de protoporfirinogênio oxidase já foram isolados de vários organismos. Por exemplo, o gene PPX1 (Acesso ao Genbank Y13465) e o gene PPX2 (Acesso ao Genbank Y13466) de tabaco, o gene PPOX de *Arabidopsis thaliana* (Acesso ao Genbank D83139), o gene HemY de *Bacillus subtilis* (Acesso ao Genbank M97208), o gene PPX de camundongo (Acesso ao Genbank D45185), o gene PPX humano (Acesso ao Genbank D38537), o gene PPX de *Saccharomyces cerevisiae* (Acesso ao Genbank Z71381), o gene hemG de *Escherichia coli* (Acesso ao Genbank X68660) são conhecidos.

Como uma aplicação de protoporfirinogênio oxidases, por exemplo, o Documento de Patente 1 descreve um método para expressar uma protoporfirinogênio oxidase de *Bacillus subtilis*, a qual confere resistência contra herbicidas de DPE em uma planta e descreve uma planta transgênica expressando a referida protoporfirinogênio oxidase. Ainda, por exemplo, no Documento de Patente 2, um gene de protoporfirinogênio oxidase de 1,7 kbp de comprimento obtível de *Arabidopsis* é descrito como um gene de uma proteína enzimática em sistema de biossíntese de porfirina, em que o gene é adequado para cultura de planta e contém a seqüência de nucleotídeo de reconhecimento de enzima de restrição EcoR1 (5'-GAATTC-3') no sitio 1,3 kbp de sua extremidade 5'. Além disso, por exemplo, o Documento de Patente 3 descreve um método simples para avaliação da atividade inibitória contra protoporfirinogênio oxidase derivada de rato ou *Chlamydomonas*, o referido método compreendendo as etapas de (1) cultura de transformantes, os quais são gerados através de introdução de um fragmento de DNA composto de promotor operavelmente ligado sendo operável em uma célula hospedeira e um gene de protoporfirinogênio oxidase em uma célula hospedeira que é deficiente em crescimento baseado em atividade de protoporfirinogênio oxidase e expressam o gene de protoporfirinogênio oxidase presente no fragmento de DNA, no meio na presença ou ausência de um composto de teste e medição da taxa de crescimento dos transformantes sob cada condição, em que o meio não contém substancialmente um composto que

complementa a deficiência no crescimento baseado em protoporfirinogênio oxidase; e (2) determinação da atividade inibitória do composto de teste contra atividade de protoporfirinogênio oxidase através de determinação do grau de inibição sobre o crescimento de transformantes via contato do composto de teste baseado na diferença no crescimento.

Por outro lado, em cianobactérias, um gene análogo ao hemK de *E. coli* foi especulado como sendo protoporfirinogênio oxidase a partir de análise de seu banco de dados de gene. Depois, contudo, foi provado que o referido gene hemK análogo de cianobactérias não era protoporfirinogênio oxidase na verdade. Contudo, proteínas homólogas a protoporfirinogênio oxidases de outras espécies já identificados não foram encontradas em bancos de dados de genes de cianobactérias e protoporfirinogênio oxidase de cianobactérias não foi isolada (vide, por exemplo, Documento Não Patenteável 1).

Documento de Patente 1 Pedido de Patente Japonesa Nº 09-107833

Documento de Patente 2 Pedido de Patente Japonesa Depositado Aberto à Inspeção Pública Nº 09-140381

Documento de Patente 3 Pedido de Patente Japonesa Nº 11-346787

Documento Não Patenteável 1 Dmitrii V.Vavilin, Wim F. J. Vermaas, Regulation of the tetrapyrrole biosynthetic pathway leading to heme and chlorophyll in plants and cyanobacteria, *Physiologia Plantarum*, Vol. 115, página 9, 2002.

Descrição da Invenção

Objetivo a ser resolvido pela Invenção

Conforme descrito acima, proteínas homólogas a protoporfirinogênio oxidases conhecidas de outras espécies não foram encontradas nos bancos de dados de gene de cianobactérias e protoporfirinogênio oxidase de cianobactérias não foi isolada até agora. Um objetivo da presente invenção é proporcionar uma protoporfirinogênio oxidase tendo uma atividade de conferir resistência ao acifluorfen e um gene da mesma e um transformante no qual o referido gene é incorporado etc.

Meios para resolver o objetivo

Os presentes inventores tentaram seleção por complementação

usando *E. coli* deficiente de protoporfirinogênio oxidase com o objetivo de isolamento de protoporfirinogênio oxidase de cianobactéria. Nesse método, fragmento genômico de cianobactérias é introduzido em *E. coli* deficiente de protoporfirinogênio oxidase e um gene que complementa a deficiência é buscado para identificar o gene relacionado à oxidação de protoporfirinogênio IX em cianobactérias. Genes de protoporfirinogênio oxidase derivados de *Arabidopsis* e Tabaco foram isolados através do mesmo método usando um vetor diferente. Um esboço da seleção por complementação será descrito abaixo.

Primeiro, DNA foi obtido de uma cianobactéria (*Synechocystis* PCC6803). Um vetor de fago λ ZaPII (STRATEGENE) foi empregado para construção da biblioteca de DNA. Uma vez que a seqüência de nucleotídeo completa da referida cianobactéria já foi reportada (aproximadamente 3.500 kb), a seqüência do genoma de cianobactéria foi investigada cerca de seis seqüências de enzima de restrição contidas no sítio de multiclonagem do vetor. Três enzimas, XbaI, SpeI e EcoRI, foram consideradas apropriadas para construção da biblioteca. Conseqüentemente, uma biblioteca de fago foi construída baseada em tratamento com essas três enzimas de restrição. Experimento de complementação foi realizado através de introdução da biblioteca resultante em um *E. coli* deficiente de protoporfirinogênio oxidase e testagem da atividade de protoporfirinogênio oxidase dos transformantes. Complementação clara, contudo, não foi observada. Várias possibilidades foram concebidas a partir desse resultado: por exemplo, o gene de protoporfirinogênio oxidase de cianobactéria infelizmente traz seqüências dessas três enzimas de restrição ou um promotor da referida cianobactéria não funciona bem, etc.

Portanto, outra biblioteca foi construída usando digestão limitada com a enzima de restrição Tsp5091 e foi reexaminada. Tsp5091 é uma enzima de restrição de reconhecimento com quatro bases. Uma vez que as enzimas de restrição usadas na tentativa anterior de construir a biblioteca (EcoRI, SpeI e XbaI) reconhecem seqüências de seis bases, não se pode evitar gerar fragmentos de tamanho muito grande. Além disso, se o sítio de

reconhecimento dessas enzimas de restrição existe dentro da seqüência do gene de protoporfirinogênio oxidase de cianobactéria, um gene de protoporfirinogênio oxidase de comprimento total não precisa ser clonado. Por outro lado, digestão completa de DNA com uma enzima de restrição de reconhecimento com quatro bases produz um número grande de fragmentos curtos de várias centenas de bp. Para resolver esse problema, DNA foi digerido incompletamente (digestão limitada) com a enzima de restrição de reconhecimento com quatro bases para construir uma biblioteca. Mesmo com essa biblioteca, deficiência de protoporfirinogênio oxidase em *E. coli* não foi complementada.

Em seguida, os presentes inventores acreditaram que a forma de plasmídeo poderia restaurar o crescimento e excisar uma grande quantidade de plasmídeos da biblioteca de fago genômico de cianobactéria Tsp5091 para construir a biblioteca de plasmídeo genômico de cianobactéria Tsp5091 para investigação. Contudo, restauração de crescimento acentuada não foi observada em qualquer clone. A partir desse resultado, acredita-se que a protoporfirinogênio oxidase de cianobactéria não complementa a deficiência de protoporfirinogênio oxidase de *E. coli* ou a complementação é, se houver, muito leve.

Então, os presentes inventores conduziram estudo intensivo para resolver o objetivo acima. Baseados no conhecimento de que cianobactérias têm resistência ao acifluorfen, os presentes inventores empregaram uma seleção de mutante de cianobactéria usando um transposon, levando ao isolamento de protoporfirinogênio oxidase de uma cianobactéria (*Synechocystis* PCC6803) pela primeira vez, descobrindo que a protoporfirinogênio oxidase tinha uma atividade de conferir resistência ao acifluorfen e identificaram o gene da mesma, obtendo a presente invenção. Ainda, a presente invenção foi completada com a descoberta de que o procedimento de seleção de gene usando o transposon é um método útil para isolamento de um gene quando uma proteína de outra espécie homóloga a uma proteína conhecida não pode ser encontrada em um banco de dados de gene de outras espécies.

Em outras palavras, a presente invenção se refere a (1) uma protoporfirinogênio oxidase tendo uma atividade de conferir resistência ao acifluorfen a um organismo e sendo derivado de cianobactéria; (2) a protoporfirinogênio oxidase de acordo com (1) acima, em que a cianobactéria é uma cianobactéria pertencendo ao gênero *Synechocystis*; e (3) a protoporfirinogênio oxidase de acordo com (1) ou (2) acima, em que o organismo é uma planta.

A presente invenção também se refere a (4) uma proteína mostrada em qualquer um de (a) a (c) a seguir: (a) a proteína compreendendo a seqüência de aminoácido mostrada em SEQ ID NO: 2; (b) uma proteína tendo atividade de protoporfirinogênio oxidase, a qual compreende uma seqüência de aminoácido em que um ou vários aminoácidos são deletados, substituídos ou adicionados na seqüência de aminoácido mostrada em SEQ ID NO: 2 e a qual tem uma atividade de conferir resistência ao acifluorfen a um organismo; e (c) uma proteína tendo atividade de protoporfirinogênio oxidase, a qual tem 20% ou mais de homologia à seqüência de aminoácido mostrada em SEQ ID NO: 2 e tem uma atividade de conferir resistência ao acifluorfen a um organismo; e (5) a proteína de acordo com (4) acima, em que a proteína é derivada de cianobactéria.

A presente invenção também se refere a (6) um DNA de gene de protoporfirinogênio oxidase que codifica a protoporfirinogênio oxidase de acordo com qualquer um de (1) a (3) acima ou que codifica a proteína de acordo com (4) ou (5) acima; (7) um DNA de gene de protoporfirinogênio oxidase mostrado em (d) ou (e) a seguir: (d) o DNA de gene de protoporfirinogênio oxidase compreendendo a seqüência de nucleotídeo mostrada em SEQ ID NO: 1; ou (e) um DNA de gene de protoporfirinogênio oxidase que compreende uma seqüência de nucleotídeo em que um ou vários nucleotídeos são deletados, substituídos ou adicionados na SEQ ID NO: 1 e codifica uma proteína tendo atividade de protoporfirinogênio oxidase e tendo uma atividade de conferir resistência ao acifluorfen a um organismo; (8) um DNA de gene de protoporfirinogênio oxidase que se hibridiza com um DNA compreendendo uma seqüência complementar à seqüência de nucleotídeo mos-

trada em SEQ ID NO: 1 sob condições estridentes e codifica uma proteína tendo atividade de protoporfirinogênio oxidase e tendo uma atividade de conferir resistência ao acifluorfen a um organismo; e (9) o DNA do gene de protoporfirinogênio oxidase de acordo com (7) ou (8) acima, em que a proteína tendo atividade de protoporfirinogênio oxidase é derivada de uma cianobactéria.

A presente invenção também se refere a (10) um vetor recombinante no qual o DNA do gene de protoporfirinogênio oxidase de acordo com qualquer um de (6) a (9) acima é incorporado.

A presente invenção também se refere a (11) um transformante no qual o vetor recombinante de acordo com (10) acima é introduzido; (12) o transformante de acordo com (11) acima em que o transformante tem uma resistência ao acifluorfen; (13) o transformante de acordo com (11) ou (12) acima, em que o transformante é um microorganismo; e (14) o transformante de acordo com (11) ou (12) acima, em que o transformante é uma planta; e (15) o transformante de acordo com (14) acima, em que a capacidade fotosintética é aumentada.

A presente invenção também se refere a (16) um método para avaliação de uma atividade inibitória contra protoporfirinogênio oxidase usando o transformante de acordo com qualquer um de (11) a (15) acima; e (17) um método de seleção para um inibidor de protoporfirinogênio oxidase usando o transformante de acordo com qualquer um de (11) a (16) acima.

A presente invenção também se refere a (18) um método para isolamento de um gene de protoporfirinogênio oxidase de cianobactéria, compreendendo as etapas (f) a (j) a seguir: (f) introdução de um gene de protoporfirinogênio oxidase de *Arabidopsis* em uma cianobactéria; (g) ruptura do gene de cianobactéria usando um transposon; (h) seleção de uma cepa mutante gene de protoporfirinogênio oxidase-rompido; (i) identificação do gene de protoporfirinogênio oxidase rompido; e (j) isolamento do gene de protoporfirinogênio oxidase rompido.

A presente invenção também se refere a (19) um método para uso da proteína de acordo com (4) ou (5) acima como protoporfirinogênio

oxidase; (20) um método para conversão de protoporfirinogênio IX em protoporfirina IX através de contato artificial do protoporfirinogênio IX com a proteína de acordo com (4) ou (5) acima; (21) um método para uso do DNA de acordo com qualquer um de (6) a (9) acima como um gene de protoporfirinogênio oxidase; e (22) um método para conversão de protoporfirinogênio IX em protoporfirina IX através de contato do protoporfirinogênio IX com um produto de expressão artificialmente expresso a partir do DNA de acordo com qualquer um de (6) a (9) acima.

A presente invenção também se refere a (23) um método para isolamento de um gene que codifica uma proteína tendo uma função exata a partir de um organismo específico, compreendendo as etapas (1) a (5) a seguir:

(1) geração de um transformante através de introdução, no organismo específico, de um gene que codifica uma proteína que complementa a determinada função, em que o gene é derivado de um outro organismo que não o organismo específico;

(2) geração de uma cepa mutante do transformante através de ruptura aleatória de um gene do transformante;

(3) seleção de uma cepa mutante rompida no gene que codifica a proteína tendo a determinada função através de uso de um agente que atua sobre a proteína que complementa a determinada função, mas não atua sobre a proteína tendo a determinada função ou através de alteração das condições de cultura;

(4) identificação do gene rompido que codifica a proteína tendo a determinada função; e

(5) isolamento do gene rompido que codifica a proteína tendo a determinada função.

A presente invenção também se refere ao (24) método para isolamento de um gene de acordo com (23) acima, em que a mutagênese é uma mutagênese usando um transposon; (25) o método para isolamento de um gene de acordo com (23) ou (24) acima, em que a proteína que complementa a determinada função derivada de um outro organismo que não um

organismo específico é protoporfirinogênio oxidase de Arabidopsis; (26) o método para isolamento de um gene de acordo com (25) acima, em que o agente que atua sobre a proteína que complementa a determinada função, mas não atua sobre a proteína tendo a determinada função, é acifluorfen; e (27) o método para isolamento de um gene de acordo com (25) ou (26) acima, em que a proteína tendo uma determinada função no organismo específico é protoporfirinogênio oxidase de cianobactéria.

Breve Descrição dos Desenhos

Figura 1: alinhamento da seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 2 e seqüências de aminoácido codificadas por genes com função desconhecida derivados de cianobactérias.

Figura 2: alinhamento da seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 2 e seqüências de aminoácido codificadas por genes com função desconhecidas derivados de outros organismos.

Figura 3: é uma figura mostrando uma estrutura para ruptura do gene slr1790 de Synechocystis (pslr1790SKM, 6,4 kb).

Figura 4: é uma figura mostrando cromatogramas de: amostra de protoporfirina IX (A), extrato da cepa de gene slr1790 rompido (B) e extrato do tipo silvestre (C).

Figura 5: é uma figura mostrando uma vista esquemática de pBI121.

Figura 6: é uma figura mostrando uma vista esquemática de pBIslr1790.

Melhor Modo para Realização da Invenção

Protoporfirinogênio oxidase da presente invenção tem uma atividade de conferir resistência ao acifluorfen a um organismo. A "protoporfirinogênio oxidase tendo uma atividade de conferir resistência ao acifluorfen a um organismo" aqui significa uma protoporfirinogênio oxidase que aumenta a resistência ao acifluorfen do organismo quando a protoporfirinogênio oxidase é introduzida em um organismo apropriado e apropriadamente expressa no organismo. O aumento na resistência ao acifluorfen do organismo pode ser avaliado, por exemplo, através de investigação se o valor de LC 50 do aci-

fluorfen no organismo é aumentado a 48 horas após a introdução da enzima comparado com o valor antes de introdução da enzima. Particularmente, quando o organismo é uma planta, o aumento na resistência ao acifluorfen da planta pode ser investigado, por exemplo, confirmando a diminuição no grau de etiolação, amarelamento ou dessecação na planta expressando apropriadamente a enzima, comparado com a planta antes da expressão apropriada da enzima quando uma quantidade particular de acifluorfen é aplicada ao solo de cultura ou pode ser investigado confirmando o aumento na quantidade de aplicação de acifluorfen por unidade de área requerida para causar o mesmo grau de etiolação, amarelamento ou dessecação na planta expressando apropriadamente a enzima, comparado com a planta antes da expressão apropriada da enzima. Ainda, o grau de aperfeiçoamento na resistência ao acifluorfen não está particularmente limitado, mas é preferido que seja um aumento, de preferência, de 1,1 vez ou mais, mais preferivelmente 1,5 vez ou mais, ainda mais preferivelmente 2 vezes ou mais, mais preferivelmente 3 vezes ou mais, no valor de LC 50 do acifluorfen contra o organismo a 48 horas depois ou na quantidade de aplicação de acifluorfen por área unitária requerida para causar o mesmo nível de etiolação, amarelamento ou dessecação do que antes da introdução da enzima.

Ainda, a “protoporfirinogênio oxidase tendo uma atividade de conferir resistência ao acifluorfen a um organismo” da presente invenção inclui o caso onde a protoporfirinogênio oxidase em si tem resistência ao acifluorfen. Aqui, o termo “a protoporfirinogênio oxidase em si tem resistência ao acifluorfen” significa que a atividade específica de protoporfirinogênio oxidase em um solvente apropriado contendo 1 μM de acifluorfen permanece um quinquagésimo ou maior, de preferência um vigésimo ou mais ou, mais preferivelmente, um décimo ou mais do que aquela na ausência de acifluorfen. O termo “atividade de protoporfirinogênio oxidase” aqui significa uma atividade enzimática para oxidar protoporfirinogênio IX em protoporfirina IX. A atividade específica de protoporfirinogênio oxidase de uma proteína pode ser facilmente verificada, por exemplo, através de contato da proteína com protoporfirinogênio IX em um tampão apropriado ou solução salina e

exame do rendimento de protoporfirina IX. Ainda, o “organismo” na expressão “tendo uma atividade de conferir resistência ao acifluorfen a um organismo” não é particularmente limitado e pode ser uma planta ou um microorganismo. Contudo, uma planta é preferida. Dentre plantas, *Arabidopsis*, tabaco, milho, arroz, a família do trigo (tal como trigo e cevada) e batatas (tais como batatas brancas) são preferidos.

A protoporfirinogênio oxidase da presente invenção pode ser ou pode não ser de cianobactérias na medida em que tenha uma atividade de conferir resistência ao acifluorfen a um organismo. Exemplos de cianobactérias incluem, mas não estão limitados a, cianobactérias pertencendo aos gêneros *Synechocystis*, *Anabaena*, *Gloeobacter*, *Prochlorococcus*, *Synechococcus*, *Rhodospseudomonas* e, mais especificamente, *Synechocystis* PCC6803, *Anabaena* PCC7120, *Gloeobacter violaceus* PCC7421, *Prochlorococcus marinus* SS120, *Prochlorococcus marinus* MIT9313, *Prochlorococcus marinus* MED4, *Synechococcus* WH8102 e *Rhodospseudomonas palustris*. Dentre esses, cianobactérias pertencendo ao gênero *Synechocystis* são preferidas e *Synechocystis* PCC6803 é mais preferido.

O termo “protoporfirinogênio oxidase derivada de cianobactéria” aqui inclui, além de protoporfirinogênio oxidase que realmente existe em cianobactéria, protoporfirinogênio oxidase expressa em um outro microorganismo, etc., que não cianobactéria usando técnicas recombinantes, etc., na medida em que ela seja a mesma que a protoporfirinogênio oxidase que realmente existe em cianobactéria.

Uma proteína da presente invenção é qualquer uma das seguintes proteínas: (1) uma proteína compreendendo a seqüência de aminoácido mostrada em SEQ ID NO: 2; (2) uma proteína tendo uma atividade de conferir resistência ao acifluorfen a um organismo, tendo atividade de protoporfirinogênio oxidase e compreendendo uma seqüência de aminoácido na qual ou vários aminoácidos são deletados, substituídos ou adicionados em qualquer uma de (i) a seqüência de aminoácido mostrada em SEQ ID NO: 2, (ii) as seqüências de aminoácido das posições de aminoácido 1 a 34 e 48 a 176 de SEQ ID NO: 2 ou (iii) as seqüências de aminoácido de posições de ami-

noácido 1 a 34 e 48 a 193 de SEQ ID NO: 2; e (3) uma proteína tendo uma atividade de conferir resistência ao acifluorfen a um organismo, tendo atividade de protoporfirinogênio oxidase e tendo uma homologia de 20% ou mais a qualquer uma de (i) a seqüência de aminoácido mostrada em SEQ ID NO: 2, (ii) as seqüências de aminoácido das posições de aminoácido 1 a 34 e 48 a 176 de SEQ ID NO: 2 ou (iii) as seqüências de aminoácido de posições de aminoácido 1 a 34 e 48 a 193 de SEQ ID NO: 2. Aqui depois, essas proteínas da presente invenção podem ser coletivamente referidas como "a(s) presente(s) proteína(s)".

A proteína de (2) acima da presente invenção não está particularmente limitada, na medida em que ela seja uma proteína tendo uma atividade de conferir resistência ao acifluorfen a um organismo, tendo atividade de protoporfirinogênio oxidase e compreendendo uma seqüência de aminoácido na qual um ou vários aminoácidos são deletados, substituídos ou adicionados em qualquer uma de (i) a seqüência de aminoácido mostrada em SEQ ID NO: 2, (ii) as seqüências de aminoácido de posições de aminoácido 1 a 34 e 48 a 176 de SEQ ID NO: 2 ou (iii) as seqüências de aminoácido de posições de aminoácido 1 a 34 e 48 a 193 de SEQ ID NO: 2. Contudo, exemplos preferidos incluem uma proteína tendo uma atividade de conferir resistência ao acifluorfen a um organismo, tendo atividade de protoporfirinogênio oxidase e compreendendo uma seqüência de aminoácido na qual um ou vários aminoácidos são deletados, substituídos ou adicionados na seqüência de aminoácido mostrada em SEQ ID NO: 2; uma proteína tendo uma atividade de conferir resistência ao acifluorfen a um organismo, tendo atividade de protoporfirinogênio oxidase, compreendendo uma seqüência de aminoácido na qual um ou vários aminoácidos são deletados, substituídos ou adicionados nas seqüências de aminoácido de posições de aminoácido 1 a 34 e 48 a 176 e compreendendo uma seqüência de aminoácido consistindo em quaisquer um de 10 a 16, de preferência quaisquer um de 12 a 14, mais preferivelmente quaisquer 13 aminoácidos entre uma seqüência de aminoácido correspondendo à referida seqüência de aminoácido de posições de aminoácido 1 a 34 e uma seqüência de aminoácido correspondendo

à referida seqüência de aminoácido de posições de aminoácido 48 a 176; uma proteína tendo uma atividade de conferir resistência ao acifluorfen a um organismo, tendo atividade de protoporfirinogênio oxidase, compreendendo uma seqüência de aminoácido na qual um ou vários aminoácidos são deletados, substituídos ou adicionados na seqüência de aminoácido de posições de aminoácido 1 a 34 e 48 a 193 e compreendendo uma seqüência de aminoácido consistindo em quaisquer 10 a 16, de preferência quaisquer 12 a 14, mais preferivelmente quaisquer 13 aminoácidos entre uma seqüência de aminoácido correspondendo à referida seqüência de aminoácido das posições de aminoácido 1 a 34 e uma seqüência de aminoácido correspondendo à referida seqüência de aminoácido das posições 48 a 193 de aminoácido. Aqui, uma seqüência de aminoácido correspondendo à seqüência de aminoácido das posições de aminoácido m a n significa uma seqüência de aminoácido na qual um ou vários aminoácidos são deletados, substituídos ou adicionados na seqüência de aminoácido das posições de aminoácido m a n.

A “seqüência de aminoácido na qual um ou vários aminoácidos são deletados, substituídos ou adicionados” acima significa uma seqüência de aminoácido na qual qualquer número de aminoácidos, por exemplo, 1 a 20, de preferência 1 a 15, mais preferivelmente 1 a 10, ainda mais preferivelmente 1 a 5, mais preferivelmente 1 a 3 aminoácidos são deletados, substituídos ou adicionados.

O termo “tendo atividade de protoporfirinogênio oxidase” aqui significa tendo uma atividade enzimática para oxidar protoporfirinogênio IX em protoporfirina IX. A presença da atividade de protoporfirinogênio oxidase em uma proteína pode ser facilmente confirmada através de avaliação da produção de protoporfirinogênio IX após contato da proteína com protoporfirinogênio IX em um tampão ou solução salina apropriada.

Ainda, a “proteína tendo uma atividade de conferir resistência ao acifluorfen a um organismo” aqui significa uma proteína a qual aumenta a resistência ao acifluorfen do organismo quando a proteína é introduzida em um organismo apropriado e apropriadamente expressa no organismo. Aumento na resistência ao acifluorfen do organismo pode ser avaliado, por e-

xemplo, investigando se o valor de LC 50 de acifluorfen para o organismo é aumentado em 48 horas após a introdução de proteína, comparado com o valor antes de introdução da proteína. Ainda, particularmente quando o organismo é uma planta, aumento na resistência ao acifluorfen da planta pode ser investigado, por exemplo, confirmando uma diminuição no grau de etiolação, amarelamento ou dessecação na planta expressando apropriadamente a proteína na planta, comparado com a planta antes da expressão apropriada da proteína quando uma quantidade particular de acifluorfen é aplicada ao solo de cultura ou pode ser investigado confirmando o aumento na quantidade de aplicação de acifluorfen por unidade de área requerida para causar o mesmo grau de etiolação, amarelamento ou dessecação na planta expressando apropriadamente a proteína, comparado com a planta antes da expressão apropriada da proteína. Ainda, o grau de aperfeiçoamento na resistência ao acifluorfen não está particularmente limitado mas, é preferido que seja um aumento, de preferência, de 1,1 vez ou mais, mais preferivelmente 1,5 vez ou mais, ainda mais preferivelmente 2 vezes ou mais, mais preferivelmente 3 vezes ou mais no valor de LC 50 do acifluorfen para o organismo 48 horas depois ou na quantidade de aplicação de acifluorfen por área unitária requerida para causar o mesmo nível de etiolação, amarelamento ou dessecação que aquele antes de introdução da proteína.

Ainda, a “proteína tendo uma atividade de conferir resistência ao acifluorfen a um organismo” da presente invenção inclui o caso onde a proteína em si tem uma resistência ao acifluorfen. Aqui, a “proteína em si tem resistência ao acifluorfen” significa que uma atividade específica (com relação à atividade de protoporfirinogênio oxidase) da proteína em um solvente apropriado contendo 1 μ M de acifluorfen é, de preferência, um quinquagésimo ou maior, mais preferivelmente um vigésimo ou mais ou, mais preferivelmente, um décimo ou mais do que uma atividade específica (referente à atividade de protoporfirinogênio oxidase) da proteína na ausência de acifluorfen. O termo “atividade de protoporfirinogênio oxidase” aqui significa uma atividade enzimática para oxidar protoporfirinogênio IX em protoporfirina IX. Atividade específica (referente à protoporfirinogênio oxidase) de uma proteína pode

ser facilmente confirmada, por exemplo, através de contato da proteína com protoporfirinogênio IX em um tampão ou solução salina apropriada e examinando o rendimento de protoporfirina IX. Ainda, o “organismo” na expressão “tendo uma atividade de conferir resistência ao acifluorfen a um organismo” não está particularmente limitado, mas plantas e microorganismos são preferidos. Particularmente preferidas são plantas.

A proteína (3) acima da presente invenção não está particularmente limitada, na medida em que ela seja uma proteína tendo uma atividade de conferir resistência ao acifluorfen a um organismo, tendo atividade de protoporfirinogênio oxidase e tendo uma homologia de 20% ou mais a qualquer uma de (i) a seqüência de aminoácido mostrada em in SEQ ID NO: 2 (slr1790), (ii) as seqüências de aminoácido das posições de aminoácido 1 a 34 e 48 a 176 de SEQ ID NO: 2 ou (iii) as seqüências de aminoácido das posições de aminoácido 1 a 34 e 48 a 193 de SEQ ID NO: 2. Contudo, a homologia de qualquer uma de (i) a seqüência de aminoácido mostrada em SEQ ID NO: 2, (ii) as seqüências de aminoácido das posições de aminoácido 1 a 34 e 48 a 176 de SEQ ID NO: 2 ou (iii) as seqüências de aminoácido das posições de aminoácido 1 a 34 e 48 a 193 de SEQ ID NO: 2 deverá ser, de preferência, 45% ou mais, mais preferivelmente 54% ou mais, ainda mais preferivelmente 65% ou mais, mais preferivelmente 80% ou mais, ainda mais preferivelmente 90% ou mais, mais preferivelmente 95% ou mais. O termo “homologia às seqüências de aminoácido das posições de aminoácido o a p e q a r é X% ou mais” aqui significa que a homologia é X% ou mais a uma seqüência de aminoácido compreendendo seqüências de aminoácido das posições de aminoácido o a p e posições de aminoácido q a r nessa ordem, entre as quais uma seqüência de aminoácido consistindo em quaisquer 10 a 16, de preferência 12 a 14 ou, mais preferivelmente, 13 aminoácidos está contida. A “proteína tendo atividade de conferir resistência ao acifluorfen a um organismo” e “proteína tendo atividade de conferir resistência ao acifluorfen a um organismo” na proteína de (3) acima e suas modalidades preferíveis têm o mesmo significado que aquela da proteína de (2) acima.

Além disso, busca baseada no BLAST por proteínas com alta

homologia à seqüência de aminoácido mostrada em SEQ ID NO: 2 revelou vários genes de função desconhecida que codificam seqüências de aminoácido tendo alta homologia à seqüência de aminoácido mostrada em SEQ ID NO: 2. Dentre essas, genes derivados de cianobactéria de função desconhecida são mostrados na Tabela 1 abaixo. Também mostrada na Tabela 1 é a homologia (%) das seqüências de aminoácido codificadas por esses genes à seqüência de aminoácido mostrada em SEQ ID NO: 2. Essas são também abrangidas pelas presentes proteínas. Enquanto isso, a seqüência de aminoácido da presente invenção mostrada em SEQ ID NO: 2 é a seqüência de aminoácido codificada pelo gene slr1790 derivado de *Synechocystis* PCC6803, a qual foi revelada pelos presentes inventores conforme descrito nos Exemplos abaixo.

Tabela 1

Gênero de cianobactérias	Genes	Homologia à seqüência de aminoácido do slr1790
<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	slr1790	-
<i>Anabaena</i> sp. PCC7120	alr5217	68
<i>Gloeobacter violaceus</i> PCC7421	gll3040	65
<i>Prochlorococcus marinus</i> SS120	Pro0955	55
<i>Prochlorococcus marinus</i> MIT9313	PMT0725	54
<i>Synechococcus</i> sp. WH8102	SYNW1243	56
<i>Prochlorococcus marinus</i> MED4	PMM0881	46
<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	RPA0297	27

Ainda, alinhamento das seqüências de aminoácido codificadas pelos genes apresentados na Tabela 1 é mostrado abaixo na Figura 1.

No alinhamento da Figura 1, um asterisco é adicionado sob os aminoácidos idênticos em todos os 7 genes, enquanto que um traço é adicionado sob os aminoácidos idênticos em 4 a 6 genes. Conforme conhecido da Tabela 1 e Figura 1, essas seqüências de aminoácido de 7 cianobactérias (exclusivas de *Synechocystis* PCC6803) têm alta homologia com a seqüência de aminoácido codificada pelo gene slr1790 de *Synechocystis*

PCC6803 e determinadas regiões são altamente conservadas. Portanto, as proteínas codificadas por esses genes, além do gene *slr1790* de *Synechocystis* PCC6803, são estimadas como sendo protoporfirinogênio oxidases tendo uma atividade de conferir resistência ao acifluorfen a organismos, conforme com a proteína codificada pelo gene *slr1790* de *Synechocystis* PCC6803 (a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 2). Além disso, o alinhamento da Figura 1 mostra alta conservação da protoporfirinogênio oxidase da presente invenção nas seqüências de aminoácido das posições de aminoácido 1 a 34 e 48 a 193 da seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 2 (correspondendo às seqüências de nucleotídeo das posições de nucleotídeo 1 a 102 e 142 a 582) e, especialmente, as seqüências de aminoácido das posições de aminoácido 1 a 34 e 48 a 176 da seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 2 (correspondendo às seqüências de nucleotídeo das posições de nucleotídeo 1 a 102 e 142 a 528), dentre a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 2 ou a seqüência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1. Assim, é provável que essas regiões exerçam um papel importante na propriedade das referidas enzimas.

Ainda, dentre os genes mostrados, através de busca pelo BLAST, codificar uma seqüência de aminoácido tendo uma alta homologia à seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 2, genes de outros organismos que não cianobactérias são mostrados na Tabela 2 abaixo. As presentes proteínas também incluem produtos da expressão desses genes.

Tabela 2

Espécie de organismo	Gene	Homologia à seqüência de aminoácido do <i>slr1790</i> (%)
<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	<i>slr1790</i>	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PA0661	35
<i>Helicobacter pylori</i>	O26018	33
<i>Brucella melitensis</i>	Q8YJTO	29
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (cepa C58 / ATCC33970)	Q8UBL7	25

Ainda, alinhamento das seqüências de aminoácido codificadas

pelos genes mostrados na Tabela 2 é mostrado na Figura 2.

No alinhamento da Figura 2, um asterisco é adicionado sob os aminoácidos idênticos em todos os 5 genes, enquanto que um traço é adicionado sob os aminoácidos idênticos em 3 genes. Conforme conhecido da Tabela 2 e Figura 2, essas seqüências de aminoácido de 4 espécies (exclusivas de *Synechocystis* PCC6803) têm alta homologia com a seqüência de aminoácido codificada pelo gene *slr1790* de *Synechocystis* PCC6803 e determinadas regiões são altamente conservadas. Portanto, as proteínas codificadas por esses genes, além do gene de *Synechocystis* PCC6803, também são estimadas como sendo protoporfirinogênio oxidases tendo uma atividade de conferir resistência ao acifluorfen a um organismo, conforme com a proteína codificada pelo gene *slr1790* de *Synechocystis* PCC6803.

A presente invenção também se refere a um método para uso das presentes proteínas acima como protoporfirinogênio oxidase. O “uso como protoporfirinogênio oxidase” aqui significa, por exemplo, uso da presente proteína em uma reação na qual o produto da reação, protoporfirina IX, é produzido através de contato artificial da presente proteína com o substrato, protoporfirinogênio IX, *in vitro* ou *in vivo*. A descoberta de que as presentes proteínas têm atividade de protoporfirinogênio oxidase é uma descoberta totalmente nova primeiro mostrada na presente invenção. Ainda, o termo “contato artificial”, no método para conversão de protoporfirinogênio IX em protoporfirina IX através de contato artificial de protoporfirinogênio IX com a presente proteína, significa um contato artificial *in vitro* ou *in vivo* e não inclui, por exemplo, um contato não-artificial em uma célula cianobacteriana.

O DNA do gene de protoporfirinogênio oxidase da presente invenção é qualquer um dos seguintes DNAs de gene de protoporfirinogênio oxidase: (1) um DNA de gene de protoporfirinogênio oxidase que codifica a protoporfirinogênio oxidase da presente invenção ou as presentes proteínas; (2) um DNA de gene de protoporfirinogênio oxidase compreendendo a seqüência de nucleotídeo mostrada em SEQ ID NO: 1; (3) um DNA de gene de protoporfirinogênio oxidase que codifica uma proteína tendo atividade de

protoporfirinogênio oxidase e tendo uma atividade de conferir resistência ao acifluorfen a um organismo e compreende uma seqüência de nucleotídeo na qual um ou vários nucleotídeos são deletados, substituídos ou adicionados em qualquer uma de (i) a seqüência de nucleotídeo mostrada em SEQ ID NO: 1; (ii) as seqüências de nucleotídeo das posições de nucleotídeo 1 a 102 e 142 a 528 de SEQ ID NO: 1 ou (iii) as seqüências de nucleotídeo das posições de nucleotídeo de 1 a 102 e 142 a 528 de SEQ ID NO: 1; e (4) um DNA de gene de protoporfirinogênio oxidase que codifica uma proteína tendo uma atividade de conferir resistência ao acifluorfen a um organismo e tendo atividade de protoporfirinogênio oxidase e se hibridiza com um DNA complementar a qualquer uma de (i) a seqüência de nucleotídeo mostrada em SEQ ID NO: 1, (ii) as seqüências de nucleotídeo das posições de nucleotídeo 1 a 102 e 142 a 528 de SEQ ID NO: 1 ou (iii) as seqüências de nucleotídeo das posições de nucleotídeo de 1 a 102 e 142 a 528 de SEQ ID NO: 1 sob condições estridentes. Esses DNAs de gene de protoporfirinogênio oxidase da presente invenção podem ser coletivamente referidos como "o presente DNA de gene".

O DNA (2) acima da presente invenção não está particularmente limitado, na medida em que ele seja um DNA de gene de protoporfirinogênio oxidase que codifica uma proteína tendo uma atividade de conferir resistência ao acifluorfen a um organismo e tendo atividade de protoporfirinogênio oxidase e compreende uma seqüência de nucleotídeo na qual um ou vários nucleotídeos são deletados, substituídos ou adicionados a uma de (i) a seqüência de nucleotídeo mostrada em SEQ ID NO: 1; (ii) as seqüências de nucleotídeo das posições de nucleotídeo 1 a 102 e 142 a 528 de SEQ ID NO: 1 ou (iii) as seqüências de nucleotídeo das posições de nucleotídeo de 1 a 102 e 142 a 528 de SEQ ID NO: 1. Contudo, o seguinte pode ser, de preferência, exemplificado: um DNA de gene de protoporfirinogênio oxidase que codifica uma proteína tendo uma atividade de conferir resistência ao acifluorfen a um organismo e tendo atividade de protoporfirinogênio oxidase e compreendendo uma seqüência de nucleotídeo na qual um ou vários nucleotídeos são deletados, substituídos ou adicionados na seqüência de nucleotí-

deo mostrada em SEQ ID NO: 1; um DNA de gene de protoporfirinogênio oxidase que codifica uma proteína tendo uma atividade de conferir resistência ao acifluorfen a um organismo e tendo atividade de protoporfirinogênio oxidase, compreende uma seqüência de nucleotídeo na qual um ou vários nucleotídeos são deletados, substituídos ou adicionados nas seqüências de nucleotídeo das posições de nucleotídeo 1 a 102 e 142 a 528 de SEQ ID NO: 1 e compreende uma seqüência de nucleotídeo consistindo em quaisquer 30 a 48 (múltiplos de três apenas), de preferência 36 a 42 (múltiplos de três apenas), mais preferivelmente 39 nucleotídeos entre a seqüência de nucleotídeo correspondendo à referida seqüência de nucleotídeo das posições de nucleotídeo 1 a 102 e a seqüência de nucleotídeo correspondendo à referida seqüência de nucleotídeo das posições de nucleotídeo 142 a 528; um DNA de gene de protoporfirinogênio oxidase que codifica uma proteína tendo uma atividade de conferir resistência ao acifluorfen a um organismo e tendo atividade de protoporfirinogênio oxidase, compreende uma seqüência de nucleotídeo na qual um ou vários nucleotídeos são deletados, substituídos ou adicionados nas seqüências de nucleotídeo das posições de nucleotídeo 1 a 102 e 142 a 582 da SEQ ID NO: 1 e compreende uma seqüência de nucleotídeo consistindo em quaisquer 30 a 48 (múltiplos de três apenas), de preferência 36 a 42 (múltiplos de três apenas), mais preferivelmente 39 nucleotídeos entre a seqüência de nucleotídeo correspondendo à seqüência de nucleotídeo das posições de nucleotídeo 1 a 102 e a seqüência de nucleotídeo correspondendo à seqüência de nucleotídeo das posições de nucleotídeo 142 a 582. Aqui, a seqüência de nucleotídeo correspondendo às seqüências de nucleotídeo das posições de nucleotídeo m a n significa uma seqüência de nucleotídeo na qual um ou vários nucleotídeos são deletados, substituídos ou adicionados na seqüência de nucleotídeo das posições de nucleotídeo m a n.

A "seqüência de nucleotídeo, na qual um ou vários nucleotídeos são deletados, substituídos ou adicionados" acima significa uma seqüência de nucleotídeo na qual qualquer número de nucleotídeos, por exemplo, 1 a 20, de preferência 1 a 15, mais preferivelmente 1 a 10, ainda mais preferi-

velmente 1 a 5, mais preferivelmente 1 a 3 nucleotídeos são deletados, substituídos ou adicionados.

Por exemplo, DNA compreendendo uma seqüência de nucleotídeo na qual vários nucleotídeos são deletados, substituídos ou adicionados (DNA mutante) pode ser preparado usando quaisquer métodos conhecidos por aqueles habilitados na técnica (por exemplo, síntese química, procedimento de engenharia genética, mutagênese, etc.). Especificamente, DNAs mutantes podem ser obtidos através de introdução de uma mutação no DNA compreendendo a seqüência de nucleotídeo mostrada em SEQ ID NO: 1 através de métodos tais como contato com um agente mutagênico, radiação de raios ultravioleta ou procedimento de engenharia genética. Mutagênese de sítio específico, a qual é uma técnica de engenharia genética, é útil porque ela permite a introdução de uma mutação específica em um sítio específico e pode ser realizada de acordo com um método descrito, por exemplo, em *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989 (aqui depois referido como *Molecular Cloning* 2ª ed.) Expressão desse DNA mutante usando um sistema de expressão apropriado permite a aquisição de proteínas compreendendo uma seqüência de aminoácido na qual um ou vários aminoácidos são deletados, substituídos ou adicionados.

O "DNA que se hibridiza sob condições estringentes" significa um DNA obtido através de realização do método de hibridização em colônia, método de hibridização em placa ou método de hibridização de southern blot usando um ácido nucléico, tal como DNA ou RNA, como uma sonda. Especificamente exemplificado é um DNA identificado realizando uma hibridização usando um filtro, ao qual DNAs derivados de placa ou colônia ou fragmentos dos referidos DNAs são fixados, na presença de NaCl a 0,7 a 1,0 M a 65°C e subsequente lavagem do filtro a 65°C usando cerca de 0,1 a 2 x solução de SSC (composição de 1 x solução de SSC é cloreto de sódio a 150 mM e citrato de sódio a 15 mM). Hibridizações podem ser realizadas de acordo com o método descrito em *Molecular Cloning* 2ª ed., etc.

Exemplos do DNA que se hibridiza sob condições estringentes

incluem um DNA tendo homologia, acima de um determinado nível, a uma seqüência de nucleotídeo do DNA sonda. Exemplos do DNA preferido incluem, por exemplo, um DNA tendo homologia de 60% ou mais, de preferência 70% ou mais, mais preferivelmente 80% ou mais, ainda mais preferivelmente 90% ou mais, particularmente de preferência 95% ou mais e, ainda mais preferivelmente, 98% ou mais a qualquer uma das seguintes seqüências de nucleotídeo: a seqüência de nucleotídeo mostrada em SEQ ID NO: 1; as seqüências de nucleotídeo das posições de nucleotídeo 1 a 102 e 142 a 528 da SEQ ID NO: 1; ou as seqüências de nucleotídeo das posições de nucleotídeo 1 a 102 e 142 a 528 da SEQ ID NO: 1. Aqui, na presente invenção, "homologia de X% ou mais às seqüências de nucleotídeo das posições de nucleotídeo s a t e u a v" significa que a homologia é X% ou mais a uma seqüência de nucleotídeo compreendendo as seqüências de nucleotídeo das posições de nucleotídeo s a t e das posições de nucleotídeo u a v nessa ordem e uma seqüência de nucleotídeo consistindo em quaisquer 30 a 48 (múltiplos de 3 apenas), de preferência 36 a 42 (múltiplos de três apenas), mais preferivelmente 39 nucleotídeos entre as seqüências de nucleotídeo das posições de nucleotídeo s a t e das posições de nucleotídeo u a v. Ainda, exemplos preferidos do DNA que se hibridiza sob condições estridentes incluem um DNA que codifica uma seqüência de aminoácido tendo uma homologia de 20% ou mais, de preferência 45% ou mais, mais preferivelmente 54% ou mais, ainda mais preferivelmente 65% ou mais, ainda mais preferivelmente 80% ou mais, mais preferivelmente 90% ou mais, ainda mais preferivelmente 95% ou mais a qualquer uma das seguintes seqüências de aminoácido: a seqüência de aminoácido mostrada em SEQ ID NO: 2; as seqüências de aminoácido das posições 1 a 34 e 48 a 176 de SEQ ID NO: 2; ou as seqüências de aminoácido das posições de aminoácido 1 a 34 e 48 a 193 de SEQ ID NO: 2.

A presente invenção é também dirigida a um método para uso do presente DNA como um gene de protoporfirinogênio oxidase. O termo "uso como um gene de protoporfirinogênio oxidase" se refere, por exemplo, ao uso em uma reação na qual o presente DNA é artificialmente expresso *in*

vitro ou *in vivo* e o produto da expressão de protoporfirinogênio oxidase é colocado em contato com seu substrato, protoporfirinogênio IX, para produzir um produto da reação, protoporfirina IX. A descoberta de que os produtos da expressão dos presentes DNAs têm atividade de protoporfirinogênio oxidase é uma descoberta totalmente nova primeiro mostrada na presente invenção. Com o uso do presente DNA como um gene de protoporfirinogênio oxidase, por exemplo, resistência ao acifluorfen pode ser conferida a um organismo não tendo resistência ao acifluorfen. Ainda, o termo "artificialmente expresso", no método da presente invenção para conversão de protoporfirinogênio IX em protoporfirina IX através de contato do protoporfirinogênio IX com um produto da expressão artificialmente expresso a partir do presente DNA", se refere a uma expressão artificial *in vitro* ou *in vivo* e não inclui, por exemplo, expressão não-artificial em uma célula cianobacteriana.

Um método para isolamento da presente proteína ou presente DNA de gene não está particularmente limitado e as presentes proteínas ou os presentes DNAs de gene podem ser obtidos usando um método comumente conhecido, tais como métodos de genética molecular ou métodos enzimáticos. Contudo, para isolar um DNA de gene que codifica uma protoporfirinogênio oxidase tendo baixa homologia a protoporfirinogênio oxidases conhecidas, é preferido usar um método para isolamento de um gene de protoporfirinogênio oxidase compreendendo as etapas de: (f) introdução de um gene de protoporfirinogênio oxidase de *Arabidopsis* em cianobactéria; (g) ruptura de um gene de cianobactéria usando um transposon; (h) seleção de uma cepa mutante de gene rompido de protoporfirinogênio oxidase; (i) identificação do gene de protoporfirinogênio oxidase rompido; e (j) isolamento do gene de protoporfirinogênio oxidase rompido.

Um organismo fonte pode ser um organismo não resistente ao acifluorfen, mas preferido é um organismo resistente ao acifluorfen. Aqui abaixo, um método usando um organismo resistente ao acifluorfen como uma fonte será descrito.

Antes de mutagênese, o gene de protoporfirinogênio oxidase de um organismo relacionado a um organismo fonte é introduzido no organismo

fonte e o gene de protoporfirinogênio oxidase do organismo relacionado é expresso no organismo fonte, de modo que o organismo fonte pode crescer mesmo quando a protoporfirinogênio oxidase do organismo fonte se torna rompida. Ainda, uma protoporfirinogênio oxidase derivada do organismo relacionado que é confirmado não mostrando resistência ao acifluorfen é usada. Em seguida, mutagênese usando um transposon é realizada no organismo fonte. Os mutantes obtidos são selecionados com relação ao acifluorfen (herbicida de difenil éter). O organismo fonte mostra resistência ao acifluorfen, mas a protoporfirinogênio oxidase do organismo relacionado não (isto é, sensível). Portanto, a fonte (cepa deficiente de protoporfirinogênio oxidase) na qual o gene de protoporfirinogênio oxidase do organismo relacionado é introduzido mostra sensibilidade ao acifluorfen. Assim, cepas mutantes mostrando crescimento normal na ausência do tratamento com acifluorfen, ao mesmo tempo em que mostram sensibilidade ao acifluorfen quando tratadas com acifluorfen, são selecionadas. Por exemplo, o gene pode ser identificado através de análise da cepa mostrando sensibilidade ao acifluorfen para o sítio de inserção de transposon com um método descrito no Exemplo 3, etc. Dessa forma, o gene fonte derivado que codifica protoporfirinogênio oxidase que mostra resistência ao acifluorfen pode ser isolado.

Na presente invenção, um organismo usado como uma fonte de gene de protoporfirinogênio oxidase é, de preferência, um organismo tendo uma enzima mostrando baixa homologia à protoporfirinogênio oxidases conhecidas. Na presente invenção, o gene mostrando baixa homologia à protoporfirinogênio oxidase conhecida significa, especificamente, por exemplo, um gene tendo uma homologia de menos de 20% ao gene PPX1 de tabaco (Acesso ao Genbank Y13465) a nível de aminoácido. Na presente invenção, um organismo usado como uma fonte do gene de protoporfirinogênio oxidase é, de preferência, um procaríota, mais preferivelmente cianobactéria, ainda mais preferivelmente uma cepa resistente à glicose de *Synechocystis* (*Synechocystis* sp. PCC6803) porque essa cepa é fácil de obter e lidar. Essas cepas bacterianas podem ser facilmente obtidas, por exemplo, do Instituto Pasteur. Cultura dessa cepa pode ser realizada de acordo com um mé-

todo comumente conhecido. É preferível, contudo, cultivar sob luz contínua a 30°C com meio de cultura BG11 (Hihara Y, et al. *Plant Physiol*(1998) 117: página 1205) ajustado para uma concentração final de 5 mM.

Um método para obtenção ou preparo de um presente DNA de gene não está particularmente limitado. O presente DNA de gene pode ser isolado, por exemplo, de uma biblioteca de DNA genômico de um organismo tal como *Synechocystis* PCC6803 ou outra cianobactéria usando iniciadores ou sondas apropriadas projetadas baseado na informação de seqüência de nucleotídeo mostrada em SEQ ID NO: 1 ou na informação de seqüência de aminoácido mostrada em SEQ ID NO: 1 descrita aqui. Alternativamente, eles podem ser preparados através de síntese química de acordo com métodos convencionais. Além disso, aquisição e clonagem, etc. de DNA genômico podem ser realizadas de acordo com métodos convencionais. Métodos para selecionar a biblioteca de DNA genômico para o presente DNA de gene incluem, por exemplo, métodos convencionais comumente usados por aqueles versados na técnica (por exemplo, um método descrito em *Molecular Cloning* 2ª ed.). Ainda, genes mutantes ou genes homólogos podem ser isolados através de seleção de outros organismos, etc., sob condições apropriadas usando um fragmento de DNA tendo a seqüência de nucleotídeo mostrada em SEQ ID NO: 1 ou uma parte da mesma para um DNA compreendendo uma seqüência de nucleotídeo tendo alta homologia ao referido DNA. Alternativamente, ele também pode ser preparado através do método antes mencionado para geração de um DNA mutante.

O vetor recombinante da presente invenção não está particularmente limitado, na medida em que ele seja um vetor no qual um presente DNA de gene é incorporado. O vetor recombinante da presente invenção pode ser construído através de introdução apropriada do presente DNA de gene em um vetor de expressão. Por exemplo, uma estrutura trazendo o presente DNA de gene ligado a jusante de um promotor apropriado pode ser, de preferência, exemplificado. Como um vetor de expressão, aqueles capazes de se replicar independentemente em sua célula hospedeira ou capazes de ser incorporados em um cromossoma de sua célula hospedeira

são preferidos. Ainda, um vetor de expressão compreendendo genes de uma seqüência regulatória ou um fator de transcrição, tal como um promotor ou um terminador, relevante para a expressão de um gene da presente invenção pode, de preferência, ser usado.

Exemplos de um vetor de expressão para bactérias incluem vetores conhecidos ou comercialmente disponíveis, tais como as linhagens pUC (por exemplo, pUC118 (TaKaRa) e pUC19 [Gene 33, 103(1985)]), linhagens pGEM (por exemplo, pGEMEX-1 (Promega)), pKK223-2 (Pharmacia), pBluescriptII SK(+), pBluescriptII SK(-) (Stratagene).

Exemplos de um promotor para bactérias incluem, por exemplo, o promotor de fago T7, promotor *trp* (P *trp*), promotor *lac* (P *lac*), promotor *recA*, promotor λ PL, promotor λ PR, promotor *lpp*, promotor PSE, promotor SP01, promotor SP02 e promotor *penP*.

Exemplos de um vetor de expressão para células de planta incluem pIG121-Hm [Plant Cell Report, 15, 809-814 (1995)], pBI121 [EMBO J. 6, 3901-3907 (1987)], pLAN411 e pLAN421 (Plant Cell Reports 10(1991) 286-290). Ainda, exemplos de um promotor para plantas incluem o promotor 35S de vírus mosaico da couve-flor (Mol. Gen. Genet (1990) 220, 389-392), um promotor de desidrogenase de álcool derivado de milho (Maydica 35 (1990) 353-357) e um promotor do gene IRE derivado de Arabidopsis (Pedido de Patente Japonesa Depositado Aberto à Inspeção Pública No. 2000-270873).

O transformante da presente invenção não está limitado, na medida em que ele seja um transformante no qual o vetor acima da presente invenção é incorporado. Exemplos de hospedeiros incluem microorganismos (tais como bactérias), plantas e animais. Dentre os mesmos, microorganismos e plantas são preferidos. Exemplos específicos de bactérias incluem bactérias pertencendo aos gêneros *Escherichia*, *Pseudonocardia*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Streptococcus* e *Staphylococcus*. Ainda, exemplos específicos de plantas incluem *Arabidopsis*, tabaco, milho, arroz, a família do trigo (tal como trigo e cevada), batatas (tais como batatas brancas).

Exemplos de um método para introdução do vetor recombinante

acima da presente invenção em um microorganismo hospedeiro incluem métodos descritos em muitos manuais de laboratório padrão, tal como Molecular Cloning 2^a ed. (por exemplo, eletroporação, transdução ou transformação). Ainda, exemplos de um método para introdução do referido vetor recombinante da presente invenção incluem o método com pistola de partículas, o método de eletroporação e o método com *Agrobacterium*.

Acredita-se que um transformante, de preferência uma planta transformada, no qual o vetor recombinante da presente invenção é introduzido, tenha resistência ao acifluorfen. Aqui, o "transformante tendo resistência ao acifluorfen" significa um transformante cuja resistência ao acifluorfen é aumentada comparado com a resistência antes de introdução do vetor recombinante da presente invenção. O aumento na resistência ao acifluorfen do transformante pode ser avaliado, por exemplo, investigando se o valor de LC50 do acifluorfen para o transformante está aumentado em 48 horas após a introdução do vetor recombinante comparado com o valor antes da introdução do vetor recombinante. Particularmente, quando o organismo é uma planta, o aumento na resistência ao acifluorfen da planta pode ser investigado, por exemplo, confirmando uma diminuição no grau de etiolação, amarelamento ou dessecação na planta expressando apropriadamente o vetor recombinante na planta, comparado com a planta antes da expressão apropriada do vetor recombinante quando uma quantidade particular de acifluorfen é aplicada ao solo de cultura ou pode ser investigado confirmando o aumento na quantidade de aplicação de acifluorfen por unidade de área requerida para causar o mesmo grau de etiolação, amarelamento ou dessecação na planta expressando apropriadamente o vetor recombinante na planta, comparado com a planta antes da expressão apropriada do vetor recombinante. Ainda, o grau de aperfeiçoamento na resistência ao acifluorfen não está particularmente limitado, mas é preferido que seja um aumento, de preferência, de 1,1 vez ou mais, mais preferivelmente 1,5 vez ou mais, ainda mais preferivelmente 2 vezes ou mais, mais preferivelmente 3 vezes ou mais no valor de LC50 do acifluorfen para o organismo a 48 horas depois ou na quantidade de aplicação de acifluorfen por área unitária requerida para causar o

mesmo nível de etiolação, amarelamento ou dessecação que aquele antes da introdução do vetor recombinante.

A presente proteína pode ser preparada em grande quantidade, por exemplo, através de cultura de um transformante da presente invenção em um meio de cultura apropriado para produzir e acumular a presente proteína na cultura e, então, coleta da presente particularmente da referida cultura. Ainda, no caso de uma planta transformada, quando o acifluorfen é pulverizado como um agroquímico/herbicida, a planta transformada cujo crescimento é objetivado pode crescer, mas ervas daninhas sensíveis ao acifluorfen são mortas, de modo que a planta transformada cujo crescimento é objetivado pode crescer seletivamente.

Para uma planta transgênica da presente invenção, aperfeiçoamento na capacidade fotossintética é preferida, embora não seja requerido, e aperfeiçoamento na capacidade fotossintética na presença de acifluorfen é mais preferido. Espera-se que a planta transformada da presente invenção seja aperfeiçoada quanto à sua capacidade fotossintética porque ela expressa muita protoporfirinogênio oxidase. O aperfeiçoamento na capacidade fotossintética pode ser confirmado comparando-se a capacidade fotossintética da planta hospedeira antes da introdução do vetor recombinante da presente invenção e a capacidade fotossintética da planta transformada após a introdução. O aperfeiçoamento na capacidade fotossintética pode ser confirmado, por exemplo, comparando as taxas fotossintéticas calculadas a partir de medições obtidas usando um sistema de medição de transpiração e fotossíntese ou comparando o peso seco de plantas cultivadas sob as mesmas condições durante um determinado período.

Um transformante de acordo com a presente invenção pode ser usado para um método para avaliação da atividade inibitória contra protoporfirinogênio oxidase. Exemplos do referido método incluem, mas não estão limitados a, um método de avaliação compreendendo as etapas de: (1) cultura do hospedeiro do referido transformante na presença de uma substância de teste e registro de sua curva de crescimento; (2) cultura do referido transformante na presença da mesma substância de teste conforme na etapa (1)

e registro de sua curva de crescimento; e (3) comparação das curvas de crescimento obtidas nas etapas (1) e (2).

Além disso, um transformante da presente invenção também pode ser usado para um método de seleção para um inibidor de protoporfirinogênio oxidase. Exemplos do referido método de seleção incluem o mesmo método conforme o método de avaliação acima.

Acifluorfen é um dos herbicidas de difenil éter. Uma vez que as presentes proteínas têm atividade de conferir resistência ao acifluorfen a um organismo, elas também teriam uma atividade de conferir a um organismo uma resistência contra outros herbicidas de difenil éter similar quanto ao mecanismo de ação. O mesmo também se aplicaria para a presente protoporfirinogênio oxidase e os transformantes da presente invenção.

Em seguida, um método para isolamento de um gene que codifica uma proteína tendo uma determinada função (por exemplo, protoporfirinogênio oxidase) de um organismo específico (por exemplo, cianobactéria) será explicado.

Esse método para isolamento de um gene compreende as etapas (1) a (5) a seguir:

(1) geração de um transformante através de introdução, no organismo específico, de um gene que codifica uma proteína que complementa a determinada função, em que o gene é derivado de um outro organismo que não o organismo específico;

(2) geração de uma cepa mutante do transformante através de ruptura aleatória dos genes do transformante;

(3) seleção de uma cepa mutante rompida no gene que codifica a proteína tendo a determinada função usando um agente que atua sobre a proteína que complementa a determinada função, mas não atua sobre a proteína tendo a determinada função ou através de troca das condições de cultura;

(4) identificação do gene rompido que codifica a proteína tendo a determinada função; e

(5) isolamento do gene rompido que codifica a proteína tendo a

determinada função. Esse método é especialmente eficaz com uma técnica de isolamento de gene quando uma proteína de outra espécie que é homóloga a uma proteína conhecida (por exemplo, protoporfirinogênio oxidase derivada de *Arabidopsis*) não pode ser encontrada no banco de dados de gene da outra espécie (por exemplo, protoporfirinogênio oxidase derivada de cianobactéria).

Exemplos da mutagênese acima incluem um tratamento por mutagênese de uma célula com um agente, tal como metanossulfonato de etila (EMS), N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG), 2,6-diaminopurina (DAP) ou semelhante, e um tratamento por mutagênese de uma célula com raios ultravioleta. Contudo, uma mutagênese usando um transposoma, o qual permite a introdução de uma mutação a nível de gene, pode, de preferência, ser exemplificado. Transposomas são complexos de transposon e transposase e proporcionam fácil introdução de uma mutação a nível de gene em uma variedade de microorganismos (Hoffman, L.M., Jendrisak, J.J., Meis, R.J., Coryshin, I.Y. e Rezhikof, S.W. *Genetica*, 108, 19-24 (2000)). Por exemplo, como um método usando um transposoma, um método usando transposoma EZ::TN[®] <KAN-2> Tnp (EPICENTRE) etc., é conhecido.

Métodos de mutagênese usando um transposon são conhecidos na técnica como uma ferramenta poderosa para análise de gene. Mutantes gene rompido podem ser selecionados, por exemplo, usando um marcador de resistência a antibiótico conhecido introduzido por um transposon.

Seleção adicional dos mutantes gene rompido obtidos usando um agente que atua sobre uma proteína que complementa a determinada função, mas não atua sobre uma proteína tendo a determinada função ou através de troca das condições de cultura permite seleção de um mutante no qual um gene que codifica uma proteína tendo a determinada função é rompido. As seqüências de nucleotídeo adjacentes ao transposon podem ser determinadas usando, por exemplo, o método de término de cadeia (Sanger F.S. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 75: 5463-5467(1977)). Essa análise de sítio de inserção de tag de transposon permite a identificação do gene rompido que codifica a proteína tendo a determinada função.

Exemplos preferidos do “agente que atua sobre uma proteína que complementa a determinada função, mas não atua sobre uma proteína tendo a determinada função” acima incluem acifluorfen (tipo difenil-éter), pirflufen-etila (tipo fenilpirazola), flumioxazina (tipo dicarboxiimido), o qual atua sobre protoporfirinogênio oxidase de *Arabidopsis*, mas não atua sobre uma protoporfirinogênio oxidase derivada de cianobactéria.

Incidentalmente, heme e clorofila são sintetizadas a partir de um precursor em comum, ácido δ -aminolevulínico (ALA). Em plantas, *E. coli*, etc., o ALA é sintetizado via a reação com três etapas denominada “via C5” compreendendo as etapas de: (1) produção de glutamyl-tRNA a partir de ácido glutâmico através da ação de sintase de glutamyl-tRNA; (2) produção de 1-semialdeído de glutamato a partir do glutamyl-tRNA produzido através da ação de reductase de glutamyl-tRNA; e (3) produção de ALA a partir do 1-semialdeído de glutamato produzido através da ação de aminomutase de 1-semialdeído de glutamato. Em animais ou bactérias pertencendo ao gênero *Agrobacterium*, em contraste, o ALA é sintetizado via uma reação em uma etapa denominada “via C4” a partir de succinil CoA e glicina através da ação de sintase de ALA. Conforme descrito acima, bactérias pertencendo ao gênero *Agrobacterium* sintetizam ALA através da “via C4” e se sabe que a enzima sintase de ALA existe, embora o gene da mesma não seja identificado. Em tal caso, o gene de sintase de ALA de bactérias pertencendo ao gênero *Agrobacterium* pode ser identificado através de co-infecção das bactérias pertencendo ao gênero *Agrobacterium* com genes que codificam sintase de glutamyl-tRNA, reductase de glutamyl-tRNA e aminomutase de 1-semialdeído de glutamato derivadas de planta rompendo aleatoriamente um gene nas bactérias transformadas pertencendo ao gênero *Agrobacterium* usando um transposon ou semelhante para gerar cepas mutantes, selecionando as cepas mutantes com relação a uma cepa mutante que cresce na ausência de gabaculina, a qual é um inibidor de aminomutase de 1-semialdeído de glutamato e é morta na presença de gabaculina e analisando o sítio de inserção de tag de transposon na cepa mutante selecionada. Portanto, exemplos de “agente que atua sobre uma proteína que complementa

a determinada função, mas não atua sobre uma proteína tendo a determinada função” acima incluem gabaculina, a qual atua sobre aminomutase de 1-semialdeído de glutamato de uma planta ou *E. coli* e não atua sobre a sintase de ácido δ -aminolevulínico (ALA) de um animal ou bactéria pertencendo ao gênero *Agrobacterium*.

Além disso, exemplos de um método de seleção via troca de condições de cultura para uma cepa mutante na qual um gene que codifica uma proteína tendo uma determinada função é rompido incluem: como um método de seleção baseado em condições de temperatura, por exemplo, um método compreendendo cultura de mutantes gene rompido em temperatura de cultura normal e em alta (ou baixa) temperatura para selecionar mutantes mostrando diferença no crescimento; como um método de seleção baseado em condições de luz, por exemplo, um método compreendendo cultura de mutantes gene rompido sob condições normais de iluminação e sob condições de alta (ou baixa) iluminação para selecionar mutantes mostrando diferença no crescimento; e como um método de seleção baseado em condições de pH, por exemplo, um método compreendendo cultura de mutantes gene rompido em condições de pH normal e em condições de alto (ou baixo) pH para selecionar mutantes mostrando diferença no crescimento.

A presente invenção será ainda descrita em detalhes com referência aos Exemplos a seguir. Contudo, o escopo técnico da presente invenção não estará limitado por esses Exemplos.

[Exemplo 1]

(Introdução de gene de protoporfirinogênio oxidase derivado de Arabidopsis em cianobactéria)

RNA total foi extraído de folhas de roseta de Arabidopsis usando o kit de extração de RNA RNeasy (Qiagen). mRNA de Poli(A)+ foi purificado do RNA total usando um método convencional. O mRNA de Poli(A)+ foi usado como um template para a síntese de cDNA usando o kit ReverTra-Plus (TOYOBO). Um gene de protoporfirinogênio oxidase de Arabidopsis (1,6 kbp) foi amplificado através de PCR usando o cDNA sintetizado como um template, um iniciador ATHPPOX.Ase1f (SEQ ID NO: 3) contendo um sítio

de enzima de restrição AseI, um iniciador ATHPPOX.r (SEQ ID NO: 4) e Taq Polimerase TaKaRa LA (TAKARA). Então, o produto de PCR foi digerido com AseI. A PCR foi realizada com 28 ciclos de desnaturação (94°C, 30 s), anelamento (52°C, 45 s) e extensão (72°C, 120 s).

pFS10, o qual pode ser usado para transformação de cianobactérias e tem o gene de resistência à canamicina, foi usado como um vetor (Jansson et al. *Methods Enzymol* (1998) 297: página 166). O vetor pFS10 foi digerido com as enzimas de restrição NdeI e HindIII e ligado ao produto de PCR antes mencionado do gene de protoporfirinogênio oxidase para gerar um vetor recombinante. Esse vetor recombinante foi transformado em *E. coli* (JM109) através do método de choque térmico, os transformantes foram, então, selecionados sobre lâmina de ágar LB contendo canamicina. A colônia que emergiu foi cultivada em meio líquido LB contendo canamicina e o plasmídeo foi purificado da cultura. Em uma etapa posterior de mutagênese usando transposon, a resistência à canamicina será usada como um marcador selecionável. Portanto, remoção do gene de resistência à canamicina e introdução de outro gene de resistência a antibiótico (gene de resistência ao cloranfenicol) são requeridas.

PCR primária foi realizada com os iniciadores Chloram.r (SEQ ID NO: 5) e SPE2Xba1.r (SEQ ID NO: 6) tendo um sítio XbaI, Taq Polimerase Pyrobest (TAKARA) e vetor pFS10 como um template. A PCR foi realizada com 25 ciclos de desnaturação (98°C, 10 s), anelamento (55°C, 45 s) e extensão (72°C, 30 s) e um produto de PCR de aproximadamente 500 bp foi proporcionado. Em seguida, PCR secundária foi realizada usando o gene de resistência ao cloranfenicol como um template, com o produto de PCR obtido, um iniciador Chloram.Xba1.f (SEQ ID NO: 7) e Taq Polimerase Pyrobest (TAKARA). A PCR foi realizada com 25 ciclos de desnaturação (98°C, 10 s), anelamento (50°C, 45 s) e extensão (72°C, 90 s). O produto de PCR, o qual continha um gene de resistência ao cloranfenicol, foi digerido com a enzima de restrição XbaI.

Enquanto isso, o vetor recombinante antes mencionado construído através de ligação do gene de protoporfirinogênio oxidase de Arabidop-

sis com vetor pFS10 também foi digerido com XbaI para remover o gene de resistência à canamicina e, então, ligado com o fragmento de gene de resistência ao cloranfenicol digerido com XbaI descrito acima para obter um novo vetor recombinante. Esse vetor recombinante foi transformado em *E. coli* (JM109) e os transformantes foram, então, selecionados sobre meio de ágar LB contendo cloranfenicol. A colônia que emergiu foi cultivada em meio líquido LB contendo cloranfenicol e o plasmídeo foi purificado da cultura. *Synechocystis* PCC6803 foi transformado com esse plasmídeo para gerar uma cepa de *Synechocystis* transgênica expressando protoporfirinogênio oxidase derivada de *Arabidopsis* (aqui depois referida como "cepa AT" em alguns casos). O método de transformação de *Synechocystis* PCC6803 foi realizado de acordo com Williams JG. *Methods Enzymol* (1998) 167: página 766.

[Exemplo 2]

(Geração de mutante de cianobactéria usando um transposon)

Genoma extraído de *Synechocystis* PCC6803 foi parcialmente digerido com Tsp5091 e uma biblioteca de plasmídeo genômico foi construída usando o kit lambda ZAP II vector (Stratagene). Um transposon foi inserido na biblioteca de plasmídeo genômico usando o kit de Inserção EZ::TNTM<KAN-2> (Epicentre) de acordo com um manual descrito pela Epicentre. Com essa biblioteca de plasmídeo genômico tag de transposon inserida de *Synechocystis*, a cepa AT foi transformada através de recombinação homóloga para gerar mutantes de *Synechocystis* expressando protoporfirinogênio oxidase derivada de *Arabidopsis*.

[Exemplo 3]

(Seleção de mutantes deficientes em protoporfirinogênio oxidase de cianobactéria)

Os mutantes de *Synechocystis* gerados no Exemplo 2 foram selecionados com relação a mutantes deficientes de protoporfirinogênio oxidase de cianobactéria usando sensibilidade ao acifluorfen como um marcador selecionável. Procedimentos específicos são descritos abaixo.

Os mutantes de *Synechocystis* gerados no Exemplo 2 foram colocados sobre meio de ágar BG11 contendo acifluorfen em uma concentra-

ção final de 500 μM e cultivados estaticamente sob radiação contínua com uma luz fluorescente branca (intensidade da luz: $30 \mu\text{mols s}^{-1} \text{ m}^{-2}$) a 30°C durante duas semanas. Cultura sobre meio de ágar BG11 isento de acifluorfen foi também realizada da mesma forma. Baseado nos resultados dessas culturas, nove mutantes que cresceram na ausência de acifluorfen, mas ainda morriam na presença de acifluorfen, foram selecionados. Dentre esses nove mutantes, um mutante, o crescimento do qual foi mais inibido, foi denominado mutante 3216 e o sítio de inserção de tag de transposon foi analisado conforme descrito abaixo. Descobriu-se que a tag de transposon tinha sido inserida dentro de um domínio regulatório transcricional putativo da proteína slr1790.

(Análise genética de mutante de cianobactéria)

Dois métodos foram considerados como uma forma de determinar o sítio de inserção da tag de transposon.

(1) Uma vez que um gene de resistência à canamicina é introduzido como uma tag no transposon usado, essa resistência a antibiótico é usada para seleção.

Especificamente, DNA é obtido de um mutante e fragmentado usando uma seqüência de enzima de restrição não incluída no gene de resistência à canamicina. Um vetor não contendo um gene de resistência à canamicina é digerido com a mesma enzima de restrição conforme usado para clivagem de DNA. Esses são ligados e transformados em *E. coli*. Plasmídeo foi purificado de um clone o qual tinha crescido sobre um meio contendo canamicina e, então, a seqüência é analisada.

(2) Uso do método de PCR invertida.

DNA é obtido de um mutante conforme em (1) e fragmentado usando uma seqüência de enzima de restrição não incluída na tag de transposon. Esse é autoligado (circularizado) e submetido à reação de PCR com iniciadores projetados ao exterior da tag de transposon. O produto de PCR amplificado é seqüenciado.

Primeiro, o método de (1) usando uma resistência a antibiótico foi empregado para investigação.

(1) Investigação usando resistência à canamicina

Extração de DNA de mutante de cianobactéria

Um mutante de cianobactéria (mutante 3216) foi cultivado em meio líquido BG11 a 30°C sob luz durante 12 dias. Após a cultura, as células foram coletadas e DNA foi extraído através do método com SDS. Como um resultado, aproximadamente 800 µg de DNA de mutante de cianobactéria foram obtidos.

Digestão com enzimas de restrição

Enzimas de restrição EcoRI e SacI foram usadas para digerir o DNA de mutante de cianobactéria e um vetor (pUC118), respectivamente. Após o tratamento com enzima de restrição, DNA de mutante de cianobactéria fragmentado foi purificado usando uma coluna giratória. O vetor foi tratado com fosfatase alcalina de forma a evitar auto-ligação.

Ligação

O comprimento médio dos fragmentos proporcionados através de digestão com as três enzimas de restrição acima é calculado, a partir de um banco de dados, como sendo de 6 kb e 10 kb para EcoRI e SacI, respectivamente. Em vista do comprimento médio dos fragmentos, a proporção molar de inserto/vetor foi ajustada para 3/1 ou 9/1 e ligada a 12°C durante 16 horas.

Transformação em *E. coli*

Uma alíquota de mistura de ligação foi transformada em *E. coli* (JM109) através do método de choque térmico a qual foi, então, submetida a uma seleção sobre meio de ágar LB contendo canamicina. Como um resultado, nenhuma formação de colônia foi observada sobre o meio de ágar LB contendo canamicina.

Ligação usando uma quantidade muito excessiva do inserto na proporção de inserto/vetor também resultou no mesmo. O método de seleção utilizando uma resistência a antibiótico seria teoricamente possível, nesse caso, contudo, haveria alguns problemas, tais como condições inapropriadas de proporção de inserto/vetor. Embora haja espaço para estudo das condições, é determinado investigar usando o método de PCR invertida,

conforme mostrado em (2).

(2) Investigação usando o método de PCR invertida

O mutante 3216, o qual mostra um forte fenótipo, foi investigado. DNA foi obtido conforme descrito acima e as enzimas de restrição EcoRI e KpnI foram usadas. Após tratamento com as enzimas de restrição, fragmento de DNA foi purificado com uma coluna giratória.

Auto-ligação

O fragmento de DNA purificado usando uma coluna giratória foi autoligado a 12°C durante 16 horas.

1ª e 2ª PCR

Uma vez que há uma preocupação a respeito da amplificação de bandas não-específicas para o método de PCR invertida, a reação de PCR foi realizada em duas etapas.

Dois conjuntos de iniciadores dirigidos ao exterior da tag de transposon foram projetados. Para a 2ª PCR, iniciadores de seqüência incluídos no kit foram usados.

(iniciadores para 1ª PCR)

KAN-2-fr (SEQ ID NO: 17)

KAN-2-rev (SEQ ID NO: 18)

(iniciadores para 2ª PCR)

KAN-2FP1 (SEQ ID NO: 19)

KAN-2RP1 (SEQ ID NO: 20)

A 1ª PCR foi realizada usando um fragmento genômico autoligado como um template. A 1ª PCR foi realizada com 30 ciclos de 98°C durante 10 s (desnaturação), 55°C durante 30 s (anelamento) e 72°C durante 7 min (extensão) usando iniciadores com uma concentração final de 0,5 µM cada e taq polimerase EX (Takara).

As concentrações finais do template usando a mistura de reação de ligação foram investigadas para três diluições (1:50, 1:250 e 1:1250). Uma quantidade de 5 µl dos produtos de PCR foi examinada através de eletroforese em gel de agarose.

A eletroforese mostrou amplificação de uma banda específica

em torno de 7 kb apenas quando o fragmento digerido com EcoRI foi usado como um template. O produto da 1ª PCR foi purificado com uma coluna giratória para remover os iniciadores e, então, usado como um template para a 2ª PCR.

A 2ª PCR foi realizada com 3 ciclos de 98°C durante 10 s (desnaturação), 60°C durante 30 s (anelamento) e 72°C durante 5 min (extensão), seguido por 20 ciclos de 98°C durante 10 s (desnaturação), 58°C durante 30 s (anelamento) e 72°C durante 5 min (extensão) usando iniciadores com uma concentração final de 0,5 µM cada e taq polimerase EX (Takara).

Uma quantidade de 5 µl do produto de PCR foi examinada através de eletroforese em gel de agarose.

Como um resultado, de acordo com o design de iniciador, amplificação de uma banda foi observada em uma posição inferior àquela do produto de 1ª PCR em várias centenas de bp. Ao mesmo tempo, contudo, amplificação de bandas não-específicas também foi observada.

Clonagem de TA e purificação de plasmídeo

A condição da 2ª PCR foi investigada. Contudo, a amplificação de bandas não-específicas não pôde ser removida. Portanto, a banda em torno de 7 kb especificamente amplificada na 1ª PCR foi recuperada do gel e usada como um inserto para clonagem de TA (vetor pGEM-T Easy, Promega), a qual foi, então, transformada em *E. coli* (JM109) através do método de choque térmico e os transformantes foram selecionados sobre meio de ágar LB contendo ampicilina. Quatro colônias foram selecionadas a partir das colônias que emergiram sobre a lâmina e foram cultivadas em meio líquido LB contendo ampicilina e, então, purificação de plasmídeo foi realizada usando o procedimento "miniprep." Uma vez que o inserto pode ser excisado do vetor pGEM-T Easy através de tratamento com EcoRI, os plasmídeos purificados foram tratados com EcoRI e examinados através de eletroforese em gel de agarose.

A eletroforese do plasmídeo 1 e do plasmídeo 2 mostrou bandas em torno de 5 kb, 3 kb (vetor) e 1,8 kb. Uma vez que o tamanho total das bandas derivadas do inserto era aproximadamente 7 kb, esses clones foram

determinados como sendo clones de interesse. A possível causa de proporcionar três bandas clivadas, incluindo a banda derivada de vetor, através de tratamento com EcoRI dos plasmídeos 1 e 2 é a formação de um concatâmero ao invés da forma circular na etapa inicial de ligação. Isso não pode afetar a análise de seqüência. Portanto, o plasmídeo 1 foi submetido a uma reação de seqüência.

Seqüenciamento

A seqüência de nucleotídeo do plasmídeo 1 foi analisada através de seqüenciamento de ciclo de acordo com o método com dideoxi. Como iniciadores de seqüência, KAN-2FP1 e KAN-2RP1 usados na 2ª PCR foram empregados. Uma vez que os iniciadores de seqüência se anelam ao DNA da região de tag de transposon, a parte inicial dos dados de seqüência obtidos é para o DNA da região de tag de transposon. Uma seqüência repetida invertida é uma seqüência de reconhecimento de Transposase Terminal em Mosaico de Transposon de 19 bp encontrada na junção do DNA alvo e da tag de transposon dentro do clone transposon-inserido. Essa seqüência pode ser usada para distinguir o alvo da tag de transposon. Inserção de transposon transposase-catalisada gera uma duplicação de seqüência do sítio alvo de 9 bp para proteger os lados do transposon inserido.

Em vista do acima, a seqüência obtida foi analisada e descobriu-se que a tag de transposon estava inserida entre 256677th T e 256685th G (seqüência terminal em mosaico e seqüência de sobreposição de 9 bp). Essa posição não está incluída na região de ORF, mas considerada como sendo um domínio regulatório transcricional da proteína putativa a jusante slr1790 (256698-257279, 193 aa).

Dos nove mutantes os quais cresceram na ausência de acifluorfen, mas são mortas na presença de acifluorfen, os oito mutantes que não o mutante 3216, foram analisados da mesma forma. A tag de transposon estava inserida no mesmo gene em todos os mutantes conforme o mutante 3216 (slr1790).

Exemplo 4

(Geração de mutante gene de proteína slr1790-rompido)

Para determinar se o gene de slr1790 (600 bp a partir de 256698 a 257279 do genoma de *Synechocystis*) codifica protoporfirinogênio oxidase ou não, ruptura do gene de slr1790 em *Synechocystis* PCC6803 foi realizada usando um vetor recombinante o qual codifica um gene de resistência à canamicina inserido dentro da região de codificação do slr1790. Uma vez que a cianobactéria pode ser transformada através de recombinação homóloga, iniciadores foram projetados baseado na seqüência entre 700 bp a montante e 600 bp a jusante do gene de slr1790 (1,9 kbp a partir de 255999 a 257920 do genoma de *Synechocystis*). A seqüência incluindo 700 bp a montante e 600 bp a jusante do gene de slr1790 foi amplificada através de PCR usando DNA extraído de *Synechocystis* PCC6803 como um template, iniciadores Slr1790 km EcoRI f (SEQ ID NO: 8) e Slr1790 km HindIII r (SEQ ID NO: 9) e Taq Polimerase TaKaRa EX (Takara) para obter um produto de PCR. A PCR foi realizada com 28 ciclos de desnaturação (98°C, 10 s), anelamento (55°C, 30 s) e extensão (72°C, 120 s). O produto de PCR resultante foi ligado ao vetor pGEM-T Easy (Promega).

O vetor incluindo a seqüência contendo o gene de slr1790 foi transformado em *E. coli* (cepa JM109) através do método de choque térmico e os transformantes foram selecionados sobre meio de ágar LB contendo ampicilina. A colônia que emergiu foi cultivada em meio líquido LB contendo ampicilina e um plasmídeo (pslr1790S) foi purificado da cultura. Em seguida, PCR foi realizada usando o gene de resistência à canamicina (1,3 kbp) incluído na tag de transposon como um template, iniciadores os quais continham um sítio NheI, Km NheI f (SEQ ID NO: 10) e Km NheI r (SEQ ID NO: 11) e Taq Polimerase TaKaRa EX (Takara) para amplificar um produto de PCR compreendendo o gene de resistência à canamicina. A PCR foi realizada com 28 ciclos de desnaturação (98°C, 10 s), anelamento (58°C, 30 s) e extensão (72°C, 80 s). O produto de PCR obtido foi digerido com NheI e ligado ao sítio NheI no meio do gene de slr1790 do vetor. Esse plasmídeo foi transformado em *E. coli* (JM109) através do método de choque térmico e os

transformantes foram selecionados sobre meio de ágar LB contendo canamicina. A colônia que emergiu foi cultivada em meio líquido LB contendo canamicina e um plasmídeo (pslr1790SKM) foi purificado da cultura. Essa estrutura para ruptura do gene slr1790 é mostrada na Figura 3. *Synechocystis* PCC6803 foi transformado com esse plasmídeo pslr1790SKM e mutantes gene de slr1790-rompido foram selecionados através de cultura do transformante resultante sobre meio de ágar BG11 contendo canamicina. A transformação de *Synechocystis* PCC6803 foi realizada de acordo com um método descrito anteriormente (Williams JG. *Methods Enzymol* (1998) 167: página 766).

Exemplo 5

(Análise de mutante gene de proteína slr1790-rompido)

Quando protoporfirinogênio oxidase é rompida, acúmulo de protoporfirinogênio IX, o qual é um substrato, é esperado. Contudo, protoporfirinogênio IX é tão instável que ele reage facilmente com o oxigênio no ar e oxida facilmente em protoporfirina IX durante o processo de extração. Portanto, ruptura de protoporfirinogênio oxidase pode ser determinada através de medição da quantidade de protoporfirina IX após operação de extração em ar. Medição da quantidade de protoporfirina IX para o mutante gene de slr1790-rompido foi realizada como segue.

O mutante gene de slr1790-rompido obtido no Exemplo 4 foi cultivado em 50 ml de meio líquido BG11 aerado usando um tubo de ensaio sob iluminação contínua com uma luz fluorescente branca (intensidade de iluminação: $30 \mu\text{mols s}^{-1} \text{m}^{-2}$), a 30°C durante 1 semana para obter uma solução de cultura. Pigmentos contendo protoporfirina IX foram extraídos da solução de cultura obtida usando acetona a 90% para obter uma solução de extrato de pigmento. Essa solução de extrato de pigmento foi submetida à HPLC e análise por HPLC foi realizada usando uma coluna de octilsílica (Waters Symmetry C8 (150 × 4,6 mm)) e metanol (eluente) sob as condições de uma taxa de fluxo de 1,2 ml/min e forno da coluna ajustado a 40°C (bomba LC-10ATVP e AutoSampler SIL-10ADVP são da Shimadzu Corp.). Protoporfirina IX foi monitorada usando o comprimento de onda de excitação de 405 nm e comprimento de onda de fluorescência de 633 nm (detector de fluorescência

RF-10AXL é da Shimadzu Corp.). O resultado é mostrado na Figura 4C. Ainda, ao invés do mutante gene de slr1790-rompido, análise de *Synechocystis* PCC6803, no qual o gene não é rompido, foi realizada da mesma forma e o resultado é mostrado na Figura 4B. Ainda, cromatograma de uma amostra de protoporfirina IX é mostrado na Figura 4A.

Conforme mostrado na Figura 4, 20 vezes ou mais protoporfirina IX foi acumulada no mutante gene de slr1790-rompido do que uma cepa na qual o gene não é rompido. A partir disso e do fato de que a enzima não identificada entre as enzimas relacionadas ao metabolismo de cianobactéria de protoporfirinogênio IX ou protoporfirina IX é apenas protoporfirinogênio oxidase, foi revelado que o slr1790 codifica protoporfirinogênio oxidase. Também, o slr1790 tem homologia extremamente baixa à protoporfirinogênio oxidases conhecidas. Homologias de protoporfirinogênio oxidases conhecidas ao slr1790 a nível de aminoácido são mostradas na Tabela 3.

Tabela 3

Protoporfirinogênio oxidases conhecidas	Homologia ao slr1790 (%)
PPX1 de tabaco (Acesso ao Genbank Y13465)	12,2
PPX2 de tabaco (Acesso ao Genbank Y13466)	12,5
PPOX de <i>Arabidopsis thaliana</i> (Acesso ao Genbank D83139)	12,5
HemY de <i>Bacillus subtilis</i> (Acesso ao Genbank M97208)	13,4
PPX de camundongo (Acesso ao Genbank D45185)	13,6
PPX humana (Acesso ao Genbank D38537)	13,6
PPX de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Acesso ao Genbank Z71381)	11,9
hemG de <i>E. coli</i> (Acesso ao Genbank X68660)	14,9

Exemplo 6

(Introdução de slr1790 de protoporfirinogênio oxidase de cianobactéria em Arabidopsis)

Como um vetor de expressão para plantas, pBI121 foi usado. A Figura 5 mostra uma vista esquemática do pBI121.

Protoporfirinogênio oxidase de planta é uma enzima que existe em cloroplastas e mitocôndrias. Dessa vez, contudo, o sinal de localização no cloroplasta derivado de clorofila Arabidopsis, uma oxigênio (CAO, Acesso ao Genbank BT002075) foi ligada ao gene de slr1790 e introduzida de forma a expressar slr1790 em cloroplasta. Para previsão do sinal de localização, TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) foi usado. O procedimento detalhado é como segue.

O vetor pBI121 (14,8 kbp) foi tratado com as enzimas de restrição BamHI e SacI para remover um gene GUS (1,9 kbp) e a parte do vetor (12,9 kbp) foi purificada do gel. Ainda, usando o cDNA de Arabidopsis obtido no Exemplo 1 como um template, o sinal de localização em cloroplasta CAO-derivado (0,2 kbp) foi amplificado através de PCR usando iniciadores BamSma CAO fr. (SEQ ID NO: 12) e Sac CAO rev. (SEQ ID NO: 13) tendo os sítios de reconhecimento de enzimas de restrição BamBI e SacI, respectivamente, e KOD-Plus-polimerase (TOYOBO). A PCR foi realizada com 30 ciclos de desnaturação (94°C, 15 s), anelamento (55°C, 30 s) e extensão (68°C, 15 s).

O produto de PCR obtido foi ligado no vetor pTA2 tendo resistência à ampicilina (TOYOBO, vetor de clonagem de TA para KOD-Plus, 2,9 kbp), então, transformado em *E. coli* (JM109) através do método de choque térmico e os transformantes foram selecionados sobre meio de ágar LB contendo ampicilina. A colônia que emergiu foi cultivada em meio líquido LB contendo ampicilina e, então, um plasmídeo (pTACAO) foi purificado. O plasmídeo pTACAO foi digerido com as enzimas de restrição BamHI e SacI para excisar o sinal de localização em cloroplasta o qual foi, então, purificado do gel. O sinal de localização em cloroplasta purificado derivado de CAO foi ligado como um inserto no vetor pBI121, do qual um gene GUS tinha sido

removido antecipadamente. Esse foi transformado em *E. coli* (JM109) e os transformantes foram selecionados sobre meio de ágar LB contendo canamicina. A colônia que emergiu foi cultivada em meio líquido LB contendo canamicina e, então, um plasmídeo (pBICAO, 13,1 kbp) foi purificado. O pBICAO foi digerido com a enzima de restrição *SacI* e tratado com CIP para evitar a auto-ligação e, então, o fragmento de vetor foi purificado do gel.

Em seguida, o gene de *slr1790* (0,6 kbp) foi amplificado através de PCR usando genoma extraído de *Synechocystis* como um template, os iniciadores *SacI* *slr1790*fr. (SEQ ID NO: 14) e *SacI* *slr1790* rev. (SEQ ID NO: 15), nos quais um sítio de reconhecimento de enzima de restrição *SacI* é incluído e KOD-Plus-polimerase (TOYOBO). A PCR foi realizada com 30 ciclos de desnaturação (94°C, 15 s), anelamento (55°C, 30 s) e extensão (68°C, 35 s). O produto de PCR obtido foi ligado ao vetor pTA2 tendo resistência à ampicilina, então, transformado em *E. coli* (JM109) através do método de choque térmico e os transformantes foram selecionados sobre meio de ágar LB contendo ampicilina. A colônia que emergiu foi cultivada em meio líquido LB contendo ampicilina e, então, um plasmídeo (pTAslr1790Sac) foi purificado. O plasmídeo pTAslr1790Sac, foi digerido com a enzima de restrição *SacI* para excisar o gene de *slr1790*, o qual foi, então, purificado do gel. O gene de *slr1790* purificado foi ligado como um inserto no pBICAO que tinha sido digerido com a enzima de restrição *SacI* antecipadamente, o qual foi, então, transformado em *E. coli* (JM109) através do método de choque térmico e os transformantes foram selecionados sobre meio líquido LB contendo canamicina e um plasmídeo (pBIslr1790, 13,6 kbp) foi purificado. Uma vista esquemática do pBIslr1790 é mostrada na Figura 6.

Em seguida, *Arabidopsis* foi transformado através do método *in planta* usando a cepa C58 de *Agrobacterium tumefaciens*, no qual pBIslr1790 foi introduzido através do método de congelamento.

A cepa C58 de *Agrobacterium tumefaciens* abrigando o pBIslr1790 foi suspensa em 300 mL de tampão de transformação (5% de sacarose, 0,02% de silwetL-77) em uma densidade bacteriana em torno de OD600 = 0,8 – 1,0. Em seguida, a parte acima do solo de *Arabidopsis* plantada em vaso tendo

brotos foi embebida na suspensão acima mencionada durante 30 segundos e, então, cada vaso foi coberto com um saco plástico durante dois dias. Após descobrir, a cultura foi continuada para obter sementes. A cultura foi realizada em uma câmara de crescimento (24 h de luz, temperatura: 22°C, intensidade da luz: 70 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$). As sementes obtidas foram esterilizadas e inoculadas sobre 1/2 meio de Murashige-Skoog contendo 35 ppm de canamicina e 0,6% de ágar [T. Murashige e F. Skoog *Physiol. Plant* (1962) 15: página 473] para obter transformantes (linhagem slr). Os transformantes foram transplantados para a terra e cultivados em uma câmara de crescimento para obter sementes de segunda geração.

Exemplo 7

(Efeito resistência de transformantes contra acifluorfen)

Para a segunda geração de transformantes nos quais a introdução do gene foi confirmada, resistência ao acifluorfen foi investigada.

Introdução do gene foi confirmada com o método a seguir.

Uma região de aproximadamente 2 mm de diâmetro foi coletada de uma folha de cada linhagem slr de *Arabidopsis* transformada crescida 1 a 2 cm de altura em uma câmara de crescimento e DNA genômico foi extraído. Amplificação por PCR foi realizada usando esse DNA genômico como um template, iniciadores AtCAO-tra-up (SEQ ID NO: 16) e Sac slr1790 rev. (SEQ ID NO: 15), os quais se anelam ao N término e C término do gene introduzido, respectivamente, e Taq DNA polimerase (SIGMA). A presença de bandas foi examinada através de eletroforese em gel de agarose. A PCR foi realizada com 40 ciclos de desnaturação (95°C, 30 s), anelamento (55°C, 45 s) e extensão (72°C, 60 s).

Para transformantes nos quais introdução do gene foi confirmada, o efeito de resistência ao acifluorfen foi testada. Acifluorfen foi preparado como emulsão para conter 4% de componente eficaz através de mistura e solubilização de dimetilformamida e tensoativo polioxietileno sorbitano. Essa foi diluída com água para compor a concentração final de acifluorfen de 10 μM , 5 μl do qual foram gotejados usando uma micropipeta sobre folhas de *Arabidopsis* do tipo silvestre e a linhagem slr de *Arabidopsis* transformada,

na qual introdução do gene foi confirmada, ambos cresceram para 1 a 2 cm de altura em uma câmara de crescimento.

O estudo foi continuado até 7 dias após o tratamento com os produtos químicos e o grau de necrose foi avaliado pelos olhos (em uma escala de 0 a 5, 0 significa sem efeito). Os resultados em 7 dias após tratamento são mostrados na Tabela 4. O resultado mostra a resistência ao acifluorfen em *Arabidopsis* slr1790-introduzido em comparação com *Arabidopsis* do tipo silvestre.

Tabela 4

Resistência de *Arabidopsis* slr1790-introduzido contra acifluorfen (7 dias após tratamento)

	Tratamento com acifluorfen (10 μ M)
<i>Arabidopsis</i> do tipo silvestre	4
slr 52	1
slr 146	1

Avaliação foi feita pelo olho em uma escala de 0 a 5, com 5 significando morte completa e 0 significando nenhum efeito.

Exemplo 8

(Teste da potência inibitória de inibidor de protoporfirinogênio oxidase)

A cepa AT obtida no Exemplo 1 e a cepa AT Δ slr1790, na qual o gene de slr1790 foi rompido através do método descrito no Exemplo 4, foram usadas. Meio líquido BG11 antes descrito foi empregado. Com vista à prevenção de mutação invertida ou perda do gene, cloranfenicol ou canamicina foi adicionado ao meio em uma concentração final de 25 μ M para a cepa AT e a cepa AT Δ slr1790, respectivamente, porque o gene de resistência ao cloranfenicol é introduzido com protoporfirinogênio oxidase na cepa AT e um gene de resistência à canamicina é introduzido na cepa AT Δ slr1790 quando de rompimento do gene. A cepa AT e a cepa AT Δ slr1790 foram pré-cultivadas com agitação em meio líquido BG11, coletada durante a fase de crescimento e suspensa em meio líquido BG11 fresco suplementado com um antibiótico, de modo que A720 se tornasse 0,1, o qual foi usado para investigação.

Um ingrediente farmacêutico ativo de um produto químico de teste foi dissolvido em DMSO e adicionado às cavidades, de modo que a concentração final de agente se tornasse de $1,0 \times 10^{-4}$ M a $1,0 \times 10^{-9.5}$ M para cada cavidade (a concentração final de DMSO é de 0,5%). O teste compreende agitação da cultura usando uma lâmina com 96 cavidades em uma escala de 100 µl em cada cavidade a 30°C de temperatura de incubação sob 1000 lux de intensidade de luz. A turvação foi medida 6 dias após o início do teste e comparado com uma amostra de solvente para calcular o valor de pI50.

Valor de pI50 = $-\log$ (concentração para inibir 50% de atividade (M))

(Atividade de tratamento com herbicida)

Sementes de *Amaranthus lividus* foram plantadas sobre a superfície do solo cheio em um vaso (200 cm²), seguido por cobertura com um pouco de solo e, então, crescidas para 5 a 10 cm de altura da planta em uma estufa. Cada uma das soluções químicas de teste diluída em água foi pulverizada na parte da folhagem de *Amaranthus lividus* com uma pequena pulverização em uma quantidade correspondendo à quantidade pulverizada de 1000 litros/ha para obter uma quantidade predeterminada de agente. Cultura foi realizada em uma estufa. Então, o efeito herbicida sobre *Amaranthus lividus* foi examinado duas semanas após o tratamento de acordo com um critério de exame abaixo. Os resultados são mostrados no índice de herbicida na tabela abaixo.

Tabela 5

Critério de Exame

Taxa de herbicida	Índice de herbicida
0%	0
20–29%	2
40–49%	4
60–69%	6
80–89%	8
100%	10

Valores de 1, 3, 5, 7 e 9 indicam o valor intermediário de 0 e 2, 2 e 4, 4 e 6, 6 e 8 e 8 e 10, respectivamente.

Tabela 6

Produtos químicos de teste	Valor de pI50		Atividade herbicida (tratamento na folhagem) (índice de herbicida para <i>Amaranthus lividus</i> , 16g ai/ha)
	Cepa AT	Cepa AT Δ slr1790	
acifluorfen	4>	4,5	7
pirafufen-etila	4>	6,6	10
flumioxazina	4>	6,7	10
diquat	5,2	5	-

Tabela 7

Produtos químicos de teste

Inibidor de protoporfirinogênio oxidase acifluorfen (tipo difenil-éter) pirafufen-etila (tipo fenilpirazol) flumioxazina (tipo dicarboxiimido)
Não-inibidor de protoporfirinogênio oxidase diquat

A cepa AT Δ slr1790 mostrou sensibilidade a outros agentes que não acifluorfen, o qual é um inibidor do tipo difenil-éter de protoporfirinogênio oxidase. Isso significa que inibidores de protoporfirinogênio oxidase geralmente mostram um efeito inibitório contra a cepa AT Δ slr1790. Ainda, a tendência do valor de pI50 de cada produto químico de teste para a cepa AT Δ slr1790 reflete as atividades de cada tratamento na folhagem e pode ser usado para avaliar o efeito de atividade inibitória contra protoporfirinogênio oxidase.

Exemplo 9

(Método de seleção por um composto inibidor de protoporfirinogênio oxidase-específico)

A partir do Exemplo acima, a cepa AT não mostra sensibilidade

ao inibidor de protoporfirinogênio oxidase, enquanto que a AT Δ slr1790 sim. Por outro lado, inibidor de não-protoporfirinogênio mostrou atividade inibitória contra a cepa AT e a cepa AT Δ slr1790 em graus similares. Dessa forma, comparando o efeito inibitório de um produto químico contra a cepa AT e a cepa AT Δ slr1790, o efeito inibitório de cada composto químico de teste contra protoporfirinogênio oxidase é determinado.

Aplicabilidade Industrial

Uma vez que a protoporfirinogênio oxidase da presente invenção tem uma estrutura significativamente diferente daquelas conhecidas, espera-se que ela seja aplicada à seleção de novos herbicidas inibidores de protoporfirinogênio oxidase. Ainda, espera-se que a protoporfirinogênio oxidase da presente invenção seja aplicada à produção de plantas fotossintéticas tendo resistência a um herbicida inibidor de protoporfirinogênio oxidase ou plantas tendo resistência a um ambiente estressante. Além disso, mesmo em um caso onde uma proteína homóloga a uma proteína conhecida não pode ser encontrada em um banco de dados de gene de outra espécie, o método da presente invenção para isolamento de um gene pode proporcionar um método eficaz para isolar o gene de outra espécie.

LISTAGEM DE SEQÜÊNCIA

<110> Nippon Soda Co., Ltd.
National University Corporation Hokkaido University

<120> **PROTOPORFIRINOGÊNIO OXIDASE TENDO ATIVIDADE DE CONFERIR RESISTÊNCIA CONTRA ACIFLUORFEN E GENE DA MESMA**

<130> 00F00753

<150> JP2005-278942

<151> 2005-09-26

<160> 20

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 582

<212> DNA

<213> Synechocystis sp. PCC6803

<400> 1

```
atggcctact actggtttaa agccttccac ttgattggca ttgttgttg gtttgctgga      60
ttattttatt tagtgcgtct tttgtctat cacgccgagg cagaccagga gccggaacca      120
gctaaaacta tctcaaaaa acagtatgag ttgatgaaa agcggcttta caacatcatc      180
actacccccg gcatggtagt tacggtggct atggcgatcg gtctcatttt cacagaacct      240
gaaattctca aatccggctg gctccacatc aaactcacct ttgtggcggt actggtgctt      300
taccatttct attgtggctg ggtgatgaaa aagctagccc agggggaatc ccaatggagt      360
gggcaacagt tccgggcttt aatgaggca ccgactattt tgctcgtggt gattgtccta      420
ctggcggtgt ttaagaataa tttgccctg gatgcgacca cttggttaat tgtagctttg      480
gttattgcca tggtgcttc gattcaactc tacgctaaaa aacgtcgccg ggaccaagca      540
ctattaacgg aacagcaaaa agcggcttct gctcagaatt ag                          582
```

<210> 2

<211> 193

<212> PRT

<213> Synechocystis sp. PCC6803

<400> 2

```
Met Ala Tyr Tyr Trp Phe Lys Ala Phe His Leu Ile Gly Ile Val Val
1           5           10          15
```

```
Trp Phe Ala Gly Leu Phe Tyr Leu Val Arg Leu Phe Val Tyr His Ala
          20          25          30
```

```
Glu Ala Asp Gln Glu Pro Glu Pro Ala Lys Thr Ile Leu Lys Lys Gln
          35          40          45
```

Tyr Glu Leu Met Glu Lys Arg Leu Tyr Asn Ile Ile Thr Thr Pro Gly
 50 55 60

Met Val Val Thr Val Ala Met Ala Ile Gly Leu Ile Phe Thr Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Ile Leu Lys Ser Gly Trp Leu His Ile Lys Leu Thr Phe Val Ala
 85 90 95

Leu Leu Leu Leu Tyr His Phe Tyr Cys Gly Arg Val Met Lys Lys Leu
 100 105 110

Ala Gln Gly Glu Ser Gln Trp Ser Gly Gln Gln Phe Arg Ala Leu Asn
 115 120 125

Glu Ala Pro Thr Ile Leu Leu Val Val Ile Val Leu Leu Ala Val Phe
 130 135 140

Lys Asn Asn Leu Pro Leu Asp Ala Thr Thr Trp Leu Ile Val Ala Leu
 145 150 155 160

Val Ile Ala Met Ala Ala Ser Ile Gln Leu Tyr Ala Lys Lys Arg Arg
 165 170 175

Arg Asp Gln Ala Leu Leu Thr Glu Gln Gln Lys Ala Ala Ser Ala Gln
 180 185 190

Asn

<210> 3
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Iniciador ATHPPOX. Aself

<400> 3
 ggggattaat ggagttatct cttctccgt

29

<210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Iniciador ATHPPOX.r

<400> 4
 ttacttgtaa gcgtaccgtg

20

<210> 5
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Iniciador Chloram.r

 <400> 5
 gctaaccggt tttatcacct ggggggcacc ttatttt 37

<210> 6
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Iniciador SPE2Xba1.r

 <400> 6
 tgtttctaga taatcctggt c 21

<210> 7
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Chloram.Xba1.f

 <400> 7
 ggtctagatg atgtccggcg gtgctttt 28

<210> 8
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Iniciador Slr1790km EcoR1 f

 <400> 8
 ggggaattct gcttgcacatca atatggtggc 30

<210> 9
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Iniciador Slr1790km Hind3 r

 <400> 9
 ggggaagctta ccttgagat ccactggtt 29

<210> 10
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Iniciador Km Nhe1 f

 <400> 10
 ggggctagcg cgaagaactc cagcatgaga 30

<210> 11
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Iniciador Km Nhe1 r

 <400> 11
 ggggctagca gtttcacgct gccgcaagca ct 32

<210> 12
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Iniciador BamSma CAO fr.

 <400> 12
 gaggatcccc gggtggtcag tccttatga acgccgccgt gtttagtc 48

<210> 13
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Iniciador Sac CAO rev.

 <400> 13
 ttacttgtaa gcgtaccgtg 20

<210> 14
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Iniciador Sac slr1790fr.

 <400> 14

ccgagctcgc ctactactgg tttaaagcct tc 32

<210> 15
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Iniciador Sac slr1790 rev

<400> 15
 ccgagctcct aattctgagc agaagccgc 29

<210> 16
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Iniciador AtCAO-tra-up

<400> 16
 aacgccgccc tgtttagtc 20

<210> 17
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> KAN-2-fr

<400> 17
 ggcctgttga acaagtctgg aa 22

<210> 18
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> KAN-2-rev

<400> 18
 ggcgtttccc gttgaatatg gctc 24

<210> 19
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> KAN-2 F P 1

<400> 19
acctacaaca aagctctcat caacc 25

<210> 20
<211> 25
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> KAN-2R P 1

<400> 20
gcaatgtaac atcagagatt ttgag 25

REIVINDICAÇÕES

1. Protoporfirinogênio oxidase tendo atividade de conferir resistência ao acifluorfen a um organismo e sendo derivado de cianobactéria.

5 2. Protoporfirinogênio oxidase de acordo com a reivindicação 1, em que a cianobactéria é uma cianobactéria pertencendo ao gênero *Synechocystis*.

3. Protoporfirinogênio oxidase de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que o organismo é uma planta.

4. Proteína mostrando qualquer um de (a) a (c) a seguir:

10 (a) a proteína compreendendo a seqüência de aminoácido mostrada em SEQ ID NO: 2;

(b) uma proteína tendo atividade de protoporfirinogênio oxidase, a qual compreende uma seqüência de aminoácido em que um ou vários aminoácidos são deletados, substituídos ou adicionados na seqüência de aminoácido mostrada em SEQ ID NO: 2; e a qual tem uma atividade de conferir resistência ao acifluorfen a um organismo; e

15

(c) uma proteína tendo atividade de protoporfirinogênio oxidase, a qual tem 20% ou mais de homologia à seqüência de aminoácido mostrada em SEQ ID NO: 2 e tem uma atividade de conferir resistência ao acifluorfen a um organismo.

20

5. Proteína de acordo com a reivindicação 4, em que a proteína é derivada de uma cianobactéria.

6. DNA de gene de protoporfirinogênio oxidase que codifica a protoporfirinogênio oxidase como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 3 ou codifica a proteína como definida na reivindicação 4 ou 5.

25

7. DNA de gene de protoporfirinogênio oxidase mostrando (d) ou (e) a seguir:

(d) o DNA de gene de protoporfirinogênio oxidase compreendendo a seqüência de nucleotídeo mostrada em SEQ ID NO: 1; ou

30 (e) um DNA de gene de protoporfirinogênio oxidase que compreende uma seqüência de nucleotídeo em que um ou vários nucleotídeos são deletados, substituídos ou adicionados na SEQ ID NO: 1 e codifica uma

proteína tendo atividade de protoporfirinogênio oxidase e tendo uma atividade de conferir resistência ao acifluorfen a um organismo.

8. DNA de gene de protoporfirinogênio oxidase que se hibridiza com um DNA compreendendo uma seqüência complementar à seqüência de nucleotídeo mostrada em SEQ ID NO: 1 sob condições estringentes e codifica uma proteína tendo atividade de protoporfirinogênio oxidase e tendo uma atividade de conferir resistência ao acifluorfen a um organismo.

9. DNA de gene de protoporfirinogênio oxidase de acordo com a reivindicação 7 ou 8 em que a proteína tendo atividade de protoporfirinogênio oxidase é derivada de cianobactéria.

10. Vetor recombinante no qual o DNA de gene de protoporfirinogênio oxidase como definida em qualquer uma das reivindicações 6 a 9 é incorporado.

11. Transformante no qual o vetor recombinante como definido na reivindicação 10 é introduzido.

12. Transformante de acordo com a reivindicação 11, em que o transformante tem resistência ao acifluorfen.

13. Transformante de acordo com a reivindicação 11 ou 12, em que o transformante é um microorganismo.

14. Transformante de acordo com a reivindicação 11 ou 12, em que o transformante é uma planta.

15. Transformante de acordo com a reivindicação 14, em que a capacidade fotossintética é aumentada.

16. Método para avaliação de uma atividade inibitória contra protoporfirinogênio oxidase usando o transformante como definido em qualquer uma das reivindicações 11 a 15.

17. Método de seleção por um inibidor de protoporfirinogênio oxidase usando o transformante de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 16.

18. Método para isolamento de um gene de protoporfirinogênio oxidase de cianobactéria compreendendo as etapas (f) a (j) a seguir:

(f) introdução de um gene de protoporfirinogênio oxidase de A-

rabidopsis em cianobactéria;

(g) ruptura de um gene de cianobactéria usando um transposon;

(h) seleção de uma cepa mutante com gene de protoporfirinogênio oxidase rompido;

5 (i) identificação do gene de protoporfirinogênio oxidase rompido; e

(j) isolamento do gene de protoporfirinogênio oxidase rompido.

19. Método para uso da proteína como definido na reivindicação 4 ou 5 como uma protoporfirinogênio oxidase.

20. Método para converter protoporfirinogênio IX em protoporfirina IX através de contato artificial do protoporfirinogênio IX com a proteína como definida na reivindicação 4 ou 5.

21. Método para uso do DNA como definido em qualquer uma das reivindicações 6 a 9 como um gene de protoporfirinogênio oxidase.

22. Método para conversão de protoporfirinogênio IX em protoporfirina IX através de contato do protoporfirinogênio IX com um produto de expressão artificialmente expresso a partir do DNA como definido em qualquer uma das reivindicações 6 a 9.

23. Método para isolamento de um gene que codifica uma proteína tendo uma determinada função de um organismo específico compreendendo as etapas (1) a (5) a seguir:

(1) geração de um transformante através de introdução, no organismo específico, de um gene que codifica uma proteína que complementa a determinada função, em que o gene é derivado de um outro organismo que não o organismo específico;

25 (2) geração de uma cepa mutante do transformante através de ruptura aleatória de um gene do transformante;

(3) seleção de uma cepa mutante que é rompida no gene que codifica a proteína tendo a determinada função usando um agente que atua sobre a proteína que complementa a determinada função, mas não atua sobre a proteína tendo a determinada função ou através de troca das condições de cultura;

(4) identificação do gene rompido que codifica a proteína tendo a

determinada função; e

(5) isolamento do gene rompido que codifica a proteína tendo a determinada função.

5 24. Método para isolamento de um gene de acordo com a reivindicação 23, em que a mutagênese é uma mutagênese usando um transposon.

10 25. Método para isolamento de um gene de acordo com a reivindicação 23 ou 24, em que a proteína que complementa a determinada função derivada de um outro organismo que não o organismo específico é protoporfirinogênio oxidase de Arabidopsis.

26. Método para isolamento de um gene de acordo com a reivindicação 25, em que o agente que atua sobre a proteína que complementa a determinada função, mas não atua sobre a proteína tendo a determinada função é acifluorfen.

15 27. Método para isolamento de um gene de acordo com a reivindicação 25 ou 26, em que a proteína tendo uma determinada função no organismo específico é protoporfirinogênio oxidase de cianobactéria.

FIG 1

```

Synecocystis_sp._PCC_6803      1:-----MAYWFKAFHLIGIVVWFAGLFYLVRLFYVHAEADQEPEPAKTILK 46
Anabaena_sp._PCC_7120        1:-----MVFAGLFYLVRLFIYHVEANQEPEPARTILK 32
Gloeobacter_violaceus_PCC_7421 1:-----MAYLWFKAFHIVGFVWFAGLFYLVRLFIYHVEANEQPEAARAILK 46
Prochlorococcus_marinus_SS120  1:-----MSLPAESYLWKTLLHIGVVVWFAGLFYLVRLFIYHVEADELESDIKFAFV 51
Prochlorococcus_marinus_MIT9313 1:-----MTFPPEAYLWFKTLHIVGVVWFAGLFYLVRLFIYHVEAADLEPTVKKAFE 51
Synecococcus_sp._WH8102      1:-----MTLPPEAYLWFKTLHIVGVVWFAGLFYLVRLFIYHVETAELAEDLQQPFR 51
Prochlorococcus_marinus_MED4   1:NVIVYELYFINLSSEAYLWFKSLHIGVIVWFSGLFYLVRLFIYHEESRTMQDDLKIAFN 60
                                ..... **.*.....**.*

Synecocystis_sp._PCC_6803      47:KQYELMEKRLYNIITTPGMVVTVAMAIGLIFTEPEILKSGWLHIKLTFAVLLLYHFYCG 106
Anabaena_sp._PCC_7120        33:NQYQIMEKRLYNIITTPGMLVTVAMAIGLVSTEPEVLKQGNLHFKLLCVALLLGYHYCYG 92
Gloeobacter_violaceus_PCC_7421 47:KQYEIMEKRLNIIITTPGMVLTVAMAVGNLVVQPDWLKAGWLHIKLTLVLLMGYHFYCM 106
Prochlorococcus_marinus_SS120  52:NQYSLMERRLANIITTPGMILAVSMAIGLLIYNPSWLEQYVWQVKKLFFVLLLIIYHIFCY 111
Prochlorococcus_marinus_MIT9313 52:EQYTLMERRLANIITTPGMILAVSMAVGLLIITQPSWLNQAVWQAKLALVAGLIYHIFCY 111
Synecococcus_sp._WH8102      52:DQYSLMEKRLANIITTPGMVVAVSMAIGLLVAQPSWLNQGNWMAKLGFAVGLLAYHVACY 111
Prochlorococcus_marinus_MED4   61:DQYSLMEKRLANIITTPGMILALSMAICLVINQPGWLNSEKWLQIKISFVLGLVIYHVICY 120
                                **.*.*.*.....**.*.....**.*.....**.*.....**.*.....**.*

Synecocystis_sp._PCC_6803      107:RVMKLAQGESQWSGQFRALNEAPTILLVIVLLAVFKNNLPLDATTWLIIVALVIAMAA 166
Anabaena_sp._PCC_7120        93:RLMKLADECRWSSQQLRALNEAPTVMVVIVMLAVFKNNLPTDLTAWLIFALIFMAV 152
Gloeobacter_violaceus_PCC_7421 107:RLRTQLAAGTCRWGPKQLRALNEAPTILLVTIVLLAVFKNDLPTDATAWIVFGLVISFAV 166
Prochlorococcus_marinus_SS120  112:RLMSSLAKGECKWSGQQLRIINELPTLFLVIVVMLVVFKNFPPTSAATWLVFLVIFMAL 171
Prochlorococcus_marinus_MIT9313 112:RLMQQLNRGECWSGRQLRALNELPTLFLVIVVMLVVFKNFPPTGAATWLVGLVLFMAA 171
Synecococcus_sp._WH8102      112:RLMGQLAAGTCRLSGKQLRALNELPTLLVIVVMLVVFKSQPPTGAATWLVIVLVFMAA 171
Prochlorococcus_marinus_MED4   121:KIMNSLQNGTSKISAKNRLNELPTLLLFVIVLLVIFKNFPPTSIAWVFGLIIFMLL 180
                                .....*.....**.*.....**.*.....**.*.....**.*.....**.*

Synecocystis_sp._PCC_6803      167:SIQLYAKRRRDQALLTEQKAASAQN- 193
Anabaena_sp._PCC_7120        153:TIQLYAKRRLDKEKLTAGIQGIPQEQS 180
Gloeobacter_violaceus_PCC_7421 167:TIQLYARKRRLDKEKQLASQGGQ---- 190
Prochlorococcus_marinus_SS120  172:SIQLYARFRRIKKEQI----- 188
Prochlorococcus_marinus_MIT9313 172:SIQFYARRRRLRSRQLESPLNNG---- 195
Synecococcus_sp._WH8102      172:SIQFYARRRRLRAEAQAVTGS----- 192
Prochlorococcus_marinus_MED4   181:SIQLYAKIRKKNESLKN----- 199
                                **.*.*.....

```


FIG 3

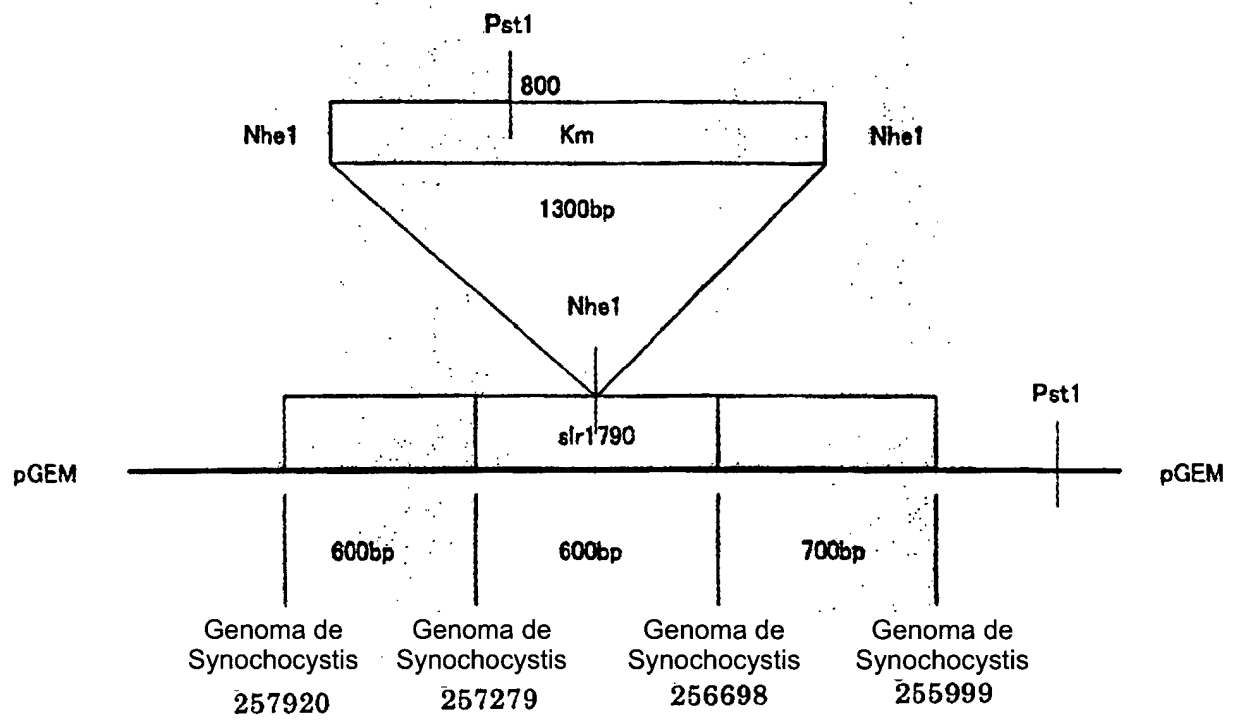


FIG 4

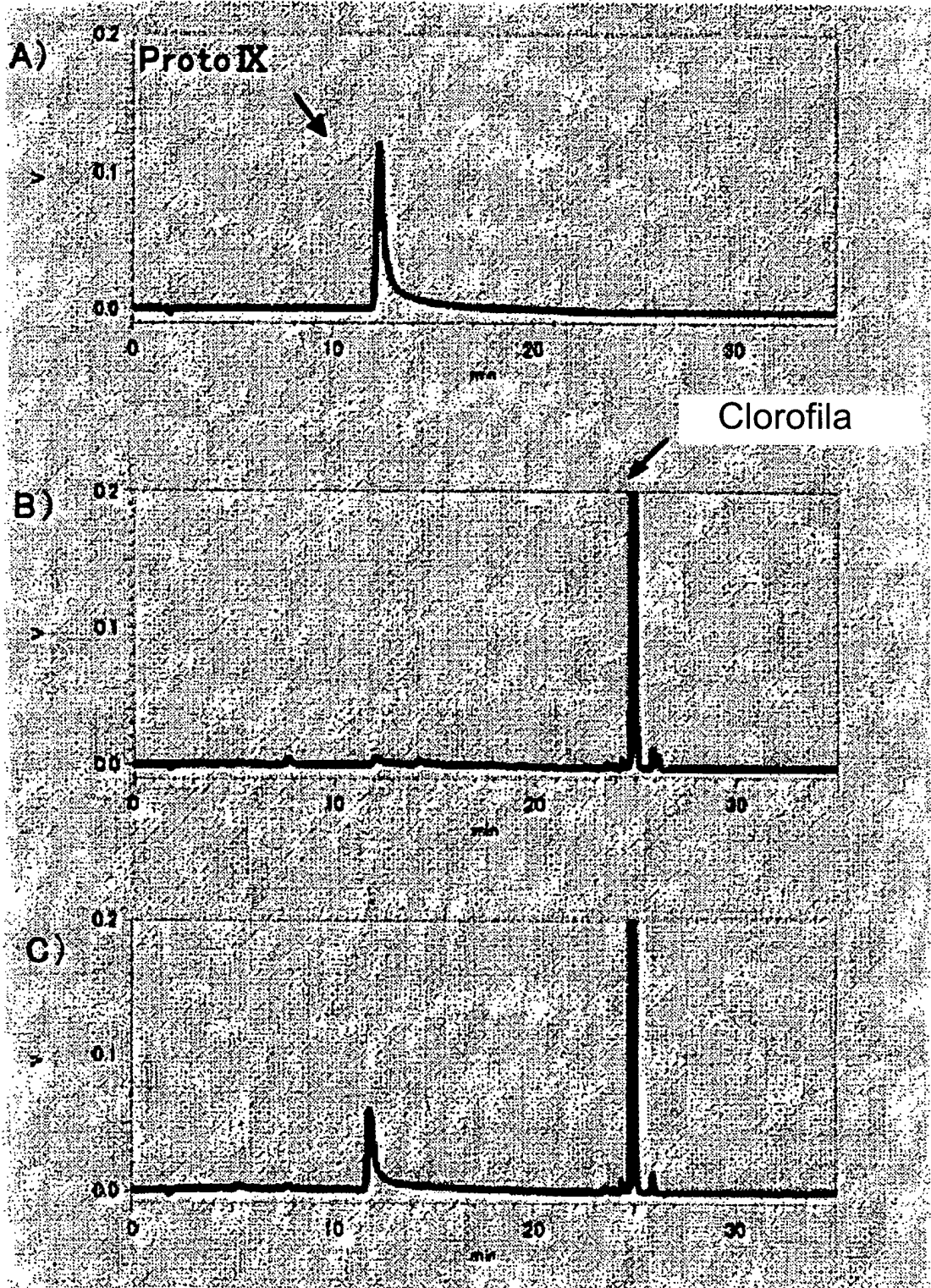


FIG 5

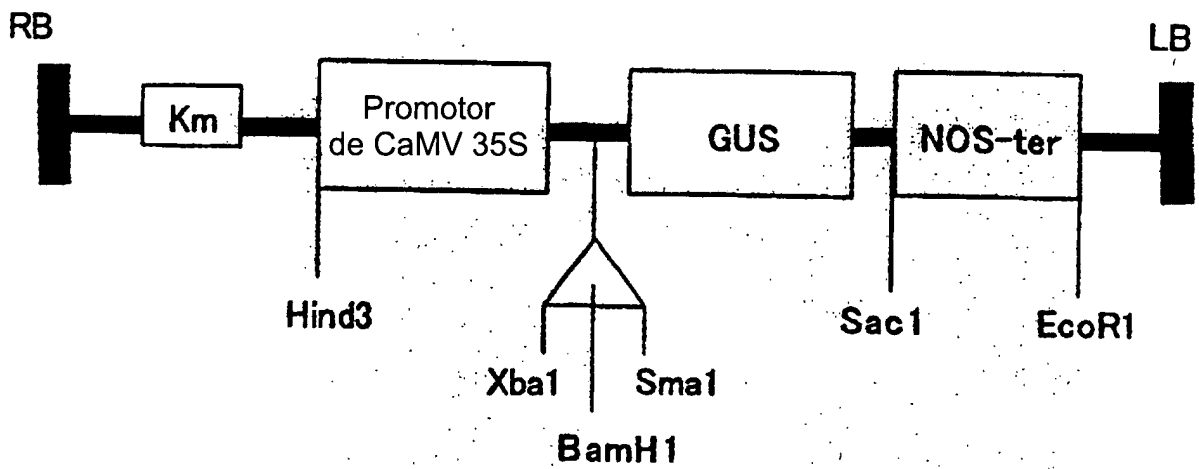
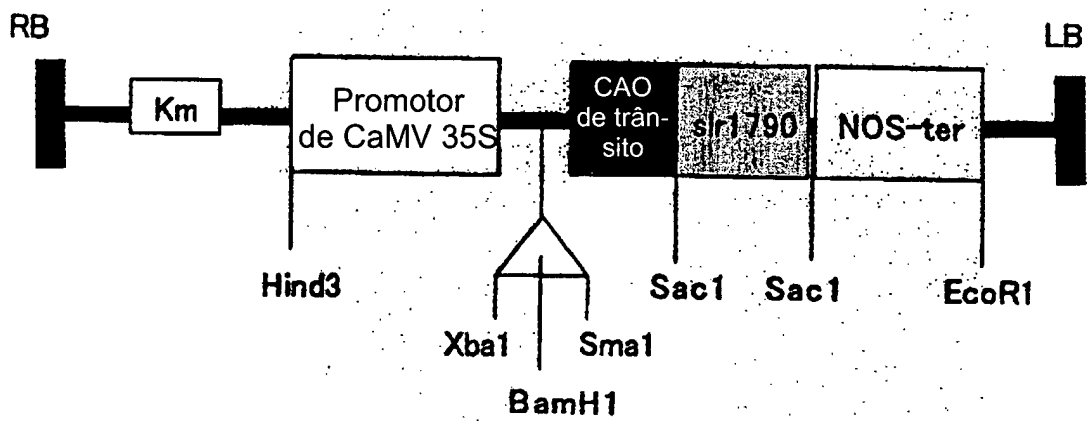


FIG 6



RESUMO

Patente de Invenção: "PROTOPORFIRINOGÊNIO OXIDASE TENDO ATIVIDADE DE CONFERIR RESISTÊNCIA CONTRA ACIFLUORFEN E GENE DA MESMA".

- 5 A presente invenção refere-se a protoporfirinogênio oxidase tendo uma atividade de conferir resistência ao acifluorfen e gene do mesmo são proporcionados. O gene de protoporfirinogênio oxidase de cianobactéria é identificado através de introdução de um gene de protoporfirinogênio oxidase de Arabidopsis em cianobactéria, ruptura de um gene de cianobactéria com
- 10 um transposon, seleção de uma cepa mutante na qual o gene de protoporfirinogênio oxidase está rompido, identificação do gene de protoporfirinogênio oxidase rompido e isolamento do gene de protoporfirinogênio oxidase rompido. Esse procedimento é eficaz como uma técnica de isolamento de gene quando uma proteína derivada de outra espécie de organismo que é homóloga a uma proteína conhecida (por exemplo, protoporfirinogênio oxidase de
- 15 cianobactéria) pode não ser encontrada em um banco de dados de gene de outra espécie.