(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2018-523480
(P2018-523480A)
(43)公表日　平成30年8月23日(2018.8.23)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/62	(2006.01)	C12N	15/62		2B030
C12N 15/82	(2006.01)	C12N	15/82	Z	4B050
C12N 9/00	(2006.01)	C12N	9/00		4B065
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/10		
A01H 5/00	(2018.01)	A01H	5/00	A	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 60 頁）　最終頁に続く

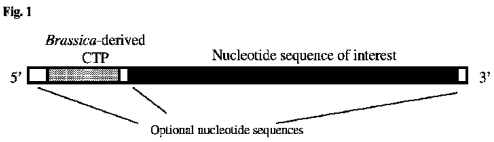
(21)出願番号　特願2018-508708 (P2018-508708)
(86)(22)出願日　平成28年8月17日 (2016.8.17)
(85)翻訳文提出日　平成30年4月16日 (2018.4.16)
(86)国際出願番号　PCT/US2016/047355
(87)国際公開番号　WO2017/031211
(87)国際公開日　平成29年2月23日 (2017.2.23)
(31)優先権主張番号　62/207,685
(32)優先日　平成27年8月20日 (2015.8.20)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　501035309
ダウ　アグロサイエンシィズ　エルエルシー
アメリカ合衆国　インディアナ州　４６２６８，　インディアナポリス，　ジオンスヴィレ　ロード，　９３３０
(74)代理人　100092783
弁理士　小林　浩
(74)代理人　100095360
弁理士　片山　英二
(74)代理人　100120134
弁理士　大森　規雄
(74)代理人　100104282
弁理士　鈴木　康仁

最終頁に続く

(54)【発明の名称】葉緑体輸送ペプチド

(57)【要約】
本開示は、ペプチド、ポリペプチド及びタンパク質を、色素体含有細胞の色素体に対して標的化する組成物及び方法に関する。一部の実施形態では、本開示は、ポリペプチドを色素体へと向けさせることができる葉緑体輸送ペプチドと、それをコードする核酸分子とに関する。一部の実施形態では、本開示は、葉緑体輸送ペプチドだけではなく、前記方法により生成された植物材料を含むトランスジェニック植物材料（例えば、トランスジェニック植物）を生成する方法と、それから製造される植物商品生産物に関する。
【選択図】　図１



【特許請求の範囲】
【請求項１】
長さ７３アミノ酸未満のペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、配列番号１、配列番号２及び配列番号６のうちの１つと少なくとも８０％同一である前記ペプチドをコードするヌクレオチド配列を含み、対象とするヌクレオチドコード配列に対してインフレームで操作可能に連結されている、キメラ核酸分子。
【請求項２】
前記ペプチドが配列番号１と少なくとも９５％同一である、請求項１記載のキメラ核酸分子。
【請求項３】
前記ペプチドが配列番号２と少なくとも９５％同一である、請求項１記載のキメラ核酸分子。
【請求項４】
前記ペプチドが、配列番号６と少なくとも９５％同一である、請求項１記載のキメラ核酸分子。
【請求項５】
前記ペプチドが、配列番号１である、請求項１記載のキメラ核酸分子。
【請求項６】
前記ペプチドが、配列番号２である、請求項１記載のキメラ核酸分子。
【請求項７】
前記ペプチドが、配列番号６である、請求項１記載のキメラ核酸分子。
【請求項８】
前記対象とするヌクレオチドコード配列は、ｄｓｍ－２コード配列、ｄｇｔ－２８コード配列、Ｂｔトキシン遺伝子コード配列、ｙｆｐコード配列又はｇｆｐコード配列である、請求項１記載のキメラ核酸分子。
【請求項９】
前記ペプチドをコードする前記ヌクレオチド配列が、配列番号９、配列番号１０及び配列番号１４のうちの１つに、特異的にハイブリダイズ可能である、請求項１記載のキメラ核酸分子。
【請求項１０】
前記ヌクレオチド配列が、１つ又は複数の調節配列と作動可能に連結されている、請求項１記載のキメラ核酸分子。
【請求項１１】
請求項１記載の核酸分子によってコードされたポリペプチド。
【請求項１２】
色素体含有細胞中の色素体に対して標的化された、請求項１１記載のポリペプチド。
【請求項１３】
前記色素体に対して標的化されたときに除去される葉緑体輸送ペプチドを含む、請求項１２記載のポリペプチド。
【請求項１４】
前記葉緑体輸送ペプチドが除去されたときに残る葉緑体標的化ペプチドを含むものであって、前記葉緑体標的化ペプチドは、前記対象とするヌクレオチドコード配列によってコードされる、請求項１３記載のポリペプチド。
【請求項１５】
前記対象とするヌクレオチドコード配列が生物活性ペプチドをコードする、請求項１１記載のポリペプチド。
【請求項１６】
前記対象とするヌクレオチドコード配列が蛍光ペプチドをコードする、請求項１１記載のポリペプチド。
【請求項１７】

前記生物活性ペプチドが酵素である、請求項１５記載のポリペプチド。
【請求項１８】
前記生物活性ペプチドは、該ペプチドが天然で発現されている細胞の色素体中で正常に発現されている、請求項１５記載のポリペプチド。
【請求項１９】
前記生物活性ペプチドは、除草剤抵抗性、ウイルス抵抗性、病原性微生物抵抗性、昆虫抵抗性、線虫抵抗性、カビ抵抗性、草勢、植物収穫量、温度耐性、土壌状態耐性、低光量耐性、低水量耐性、高水量耐性、化学的環境耐性、種子色、デンプン変性、アミノ酸合成、光合成、脂肪酸合成、油脂合成、カロテノイド合成、テルペノイド合成、デンプン合成、除草剤抵抗性からなる群から選択されるプロセスに関与する、請求項１５記載のポリペプチド。
【請求項２０】
前記生物活性ペプチドは、ゼアキサンチンエポキシダーゼ、コリンモノオキシゲナーゼ、フェロケラターゼ、ω３脂肪酸デサチュラーゼ、グルタミンシンセターゼ、プロビタミンＡ、ホルモン、Ｂｔトキシンタンパク質、及び対象とする形質を含む植物を特定するのに有用なマーカーからなる群から選択される、請求項１５記載のポリペプチド。
【請求項２１】
前記生物活性ペプチドが除草剤抵抗性に関与している、請求項１９記載のポリペプチド。
【請求項２２】
前記生物活性ペプチドは、アセトラクターゼシンターゼ（ＡＬＳ）、変異型ＡＬＳ、ＡＬＳ前駆体、３－エノールピルビルシキミ酸－５－リン酸シンターゼ（ＥＰＳＰＳ）、ＤＧＴ－２８　ＥＰＳＰＳ、ＣＰ４　ＥＰＳＰＳ、クラスＩＶ　ＥＰＳＰＳ及びクラスＩＩＩ　ＥＰＳＰＳからなる群から選択される、請求項２１記載のポリペプチド。
【請求項２３】
前記生物活性ペプチドが昆虫抵抗性に関与している、請求項１９記載のポリペプチド。
【請求項２４】
請求項１０に記載の核酸分子を含有する植物発現ベクター。
【請求項２５】
請求項１に記載のキメラ核酸分子を含有する植物材料。
【請求項２６】
前記植物材料が、植物細胞、植物組織、植物組織培養物、カルス培養物、植物の一部及び植物全体からなる群から選択される、請求項２５記載の植物材料。
【請求項２７】
前記ペプチドを含むポリペプチドをさらに含む、請求項２６記載の植物材料。
【請求項２８】
前記対象とするヌクレオチドコード配列は、前記植物材料の細胞中の色素体に対して標的化された前記ポリペプチドの一部をコードしている、請求項２７記載の植物材料。
【請求項２９】
前記核酸分子が前記植物材料からの細胞のゲノムに安定的に組み込まれている、請求項２５記載の植物材料。
【請求項３０】
前記植物材料が植物全体である、請求項２５記載の植物材料。
【請求項３１】
前記植物材料は、アラビドプシス(Arabidopsis)、アルファルファ、アブラナ属(Brassica)、豆類、ブロッコリー、キャベツ、ニンジン、カリフラワー、セロリ、ハクサイ、綿花、キュウリ、ナス、レタス、メロン、エンドウ、コショウ、ピーナッツ、ジャガイモ、カボチャ(pumpkin)、ダイコン、ナタネ、ホウレンソウ、ダイズ、カボチャ(squash)、テンサイ、ヒマワリ、タバコ、トマト、スイカ、コーン、タマネギ、イネ、ソルガム、小麦、ライ麦、キビ、サトウキビ、燕麦、ライ小麦、スイッチグラス及び芝草からなる群から

選択される植物由来のものである、請求項２５記載の植物材料。
【請求項３２】
トランスジェニック植物材料を作製する方法であって、
請求項１のキメラ核酸分子を得ることと、
該核酸分子で植物材料を形質転換することとを含む、方法。
【請求項３３】
前記植物材料が、植物細胞、植物組織、植物組織培養物、カルス培養物、植物の一部および植物全体からなる群から選択される、請求項３２記載の方法。
【請求項３４】
前記植物材料が植物全体でない、請求項３３記載の方法。
【請求項３５】
請求項３２記載の方法により作製される、トランスジェニック植物材料。
【請求項３６】
請求項３４記載の方法により作製される、トランスジェニック植物材料。
【請求項３７】
請求項３６記載の植物材料より再生される、トランスジェニック植物。
【請求項３８】
請求項３５記載の植物材料より作製される、トランスジェニック植物商品生産物。
【請求項３９】
前記対象とするヌクレオチドコード配列が生物活性ペプチドをコードする、請求項３５記載のトランスジェニック植物材料。
【請求項４０】
前記生物活性ペプチドは、除草剤抵抗性、ウイルス抵抗性、病原性微生物抵抗性、昆虫抵抗性、線虫抵抗性、カビ抵抗性、草勢、植物収穫量、温度耐性、土壌状態耐性、低光量耐性、低水量耐性、高水量耐性、化学的環境耐性、種子色、デンプン変性、アミノ酸合成、光合成、脂肪酸合成、油脂合成、カロテノイド合成、テルペノイド合成、デンプン合成、除草剤抵抗性からなる群から選択されるプロセスに関与する、請求項３９記載のトランスジェニック植物材料。
【請求項４１】
前記生物活性ペプチドは、ゼアキサンチンエポキシダーゼ、コリンモノオキシゲナーゼ、フェロケラターゼ、ω３脂肪酸デサチュラーゼ、グルタミンシンセターゼ、プロビタミンＡ、ホルモン、Ｂｔトキシンタンパク質及び対象とする形質を含む植物を特定するのに有用なマーカーからなる群から選択される、請求項３９記載のトランスジェニック植物材料。
【請求項４２】
前記生物活性ペプチドが除草剤抵抗性に関与する、請求項４０記載のトランスジェニック植物材料。
【請求項４３】
前記生物活性ペプチドは、アセトラクターゼシンターゼ（ＡＬＳ）、変異型ＡＬＳ、ＡＬＳ前駆体、３－エノールピルビルシキミ酸－５－リン酸シンターゼ（ＥＰＳＰＳ）、ＣＰ４　ＥＰＳＰＳ及びクラスＩＩＩ　ＥＰＳＰＳからなる群から選択される、請求項４２記載のトランスジェニック植物材料。
【請求項４４】
前記植物材料は、同じ種の野生型植物材料と比較した場合に、高い除草剤抵抗性又は除草剤耐性を示す、請求項４２記載のトランスジェニック植物材料。
【請求項４５】
前記生物活性ペプチドが除草剤抵抗性に関与する、請求項４０記載のトランスジェニック植物材料。
【請求項４６】
前記植物材料が、再生して植物を生成できない植物細胞である、請求項２６記載の植物

材料。
【請求項４７】
前記植物材料が、再生して植物を生成できない植物細胞である、請求項３２記載の植物材料。
【請求項４８】
対象とするヌクレオチドコード配列に対してインフレームで操作可能に連結された配列番号９を含むトランスジェニック植物種子の使用であって、昆虫抵抗性植物の圃場を配置することを特徴とする、使用。
【請求項４９】
対象とするヌクレオチドコード配列に対してインフレームで操作可能に連結された配列番号９を含むトランスジェニック植物種子の使用であって、昆虫抵抗性植物の圃場を配置することを特徴とする、使用。
【請求項５０】
前記トランスジェニック植物種子は、トウモロコシ、大豆及び綿花からなる群から選択される植物由来であることを特徴とする、請求項４８又は４９に記載の使用。
【請求項５１】
対象とするヌクレオチドコード配列に対してインフレームで操作可能に連結された配列番号１０を含むトランスジェニック植物種子の使用であって、昆虫抵抗性植物の圃場を配置することを特徴とする、使用。
【請求項５２】
対象とするヌクレオチドコード配列に対してインフレームで操作可能に連結された配列番号１０を含むトランスジェニック植物種子の使用であって、除草剤抵抗性植物の圃場を配置することを特徴とする、使用。
【請求項５３】
前記トランスジェニック植物種子が、トウモロコシ、大豆及び綿花からなる群から選択される植物由来であることを特徴とする、請求項５１又は５２に記載の使用。
【請求項５４】
対象とするヌクレオチドコード配列に対してインフレームで操作可能に連結された配列番号１４を含むトランスジェニック植物種子の使用であって、昆虫抵抗性植物の圃場を配置することを特徴とする、使用。
【請求項５５】
対象とするヌクレオチドコード配列に対してインフレームで操作可能に連結された配列番号１４を含むトランスジェニック植物種子の使用であって、除草剤抵抗性植物の圃場を配置することを特徴とする、使用。
【請求項５６】
前記トランスジェニック植物種子が、トウモロコシ、大豆及び綿花からなる群から選択される植物からのものであることを特徴とする、請求項５４又は５５に記載の使用。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
米国特許法施行規則１．８２１（ｃ）又は（ｅ）に従う明細書
ＡＳＣＩＩ文字コードファイルとして提出した配列表
米国特許法施行規則１．８２１（ｃ）又は（ｅ）に従い、ＡＳＣＩＩ文字コードバージョンの配列表を含むファイルを、本出願と共に提出し、その内容は参照することにより本明細書中に組み込まれたものとする。
【０００２】
本開示は、高等植物の葉緑体に対して標的化されるポリペプチドを遺伝的にコードして発現するための組成物及び方法に関する。ある実施形態において、この開示は、葉緑体に対してキメラポリペプチドを標的化するアミノ酸配列及び／又はそれをコードする核酸分子に関する。ある実施形態においては、この開示は、葉緑体へのキメラポリペプチドの輸

送を制御するアミノ酸配列を含むキメラポリペプチド及び／又はそれをコードする核酸分子に関する。

【背景技術】

【０００３】

植物細胞は、概して「色素体」と称される別個の細胞小器官を含有し、それは特有の膜系で区切られており、細胞内で固有の機能を果たす。個々の色素体は、光合成だけでなく、特定の化学物質の合成と貯蔵を担う。色素体は全て、植物の分裂組織部位に存在する原色素体に由来する。原色素体は、例えば葉緑体、エチオプラスト、有色体、ゲロントプラスト、白色体、アミロプラスト、エライオプラスト及びプロテイノプラストに成長することができる。色素体は、半自律的に細胞内に存在しており、独自の遺伝子系及びタンパク質合成機構を含むが、その成長及び生合成的な動きにおいては核・細胞質系との密接な協力関係に依存する。

【０００４】

高等植物における葉細胞の光合成では、葉緑体が色素体の最たるものである。光合成の光駆動反応を行うことが、葉緑体の最も不可欠な機能である。ただし、葉緑体はまた、植物細胞にとって重要な多くの他の生合成過程を行う。例えば、細胞の脂肪酸の全ては、葉緑体ストロマ中にある酵素によって、そこで直ぐに利用できるATP、NAOPH及び炭水化物を用いて生成される。さらに、光で活性化した電子の還元力が、葉緑体内で亜硝酸塩（NO_2^-）をアンモニア（NH_3）に還元し、このアンモニアにより、アミノ酸とヌクレオチドとの合成に必要な窒素が植物にもたらされる。

【０００５】

葉緑体はまた、農薬産業において、特に重要なプロセスに用いられる。例えば、多くの除草剤は、葉緑体中で行われる機能を阻害することによって作用することが知られている。近年の研究において、いくつかの除草剤の特異的な標的が特定されてきている。例えば、トリアジン由来の除草剤は、プラストキノン分子を、光化学系ＩＩの３２ｋＤポリペプチド中のその結合部位から移動させることによって光合成を阻害する。この３２ｋＤポリペプチドは、葉緑体ゲノムにおいてコードされ、細胞小器官の機構によって合成される。トリアジン除草剤に対して抵抗性である変異植物が得られている。これら植物は、トリアジン除草剤によってもはやプラストキノンを移動させることができないものである、３２ｋＤ変異ポリペプチドを含有する。スルホニルウレアは、葉緑体中のアセト乳酸シンターゼを阻害する。アセト乳酸シンターゼは、イソロイシン及びバリンの合成に関与している。グリフォセートは、芳香族アミノ酸の合成に関与する酵素である、５－エノールピルビル－３－ホスホシキミ酸シンターゼ（ＥＰＳＰＳ）の機能を阻害する。これら酵素の全ては、核ゲノムによりコードされるが、実際にアミノ酸合成が行われる葉緑体に移動される。

【０００６】

ほとんどの葉緑体タンパク質は、植物細胞の核においてコードされ、サイトゾルにおいてより大きい前駆体タンパク質として合成され、翻訳後に葉緑体に移送される。外包膜及び内包膜の全域にわたってストロマに移送することは、ストロマ、チラコイド膜及びチラコイド内腔に向けられるタンパク質の導入のための主要な手段である。移送される前駆体タンパク質のチラコイド膜及びチラコイド内腔への局在化は、４つの別個の機構によって達成され、細菌タンパク質の輸送系と相同である機構を２つ含む。このように、葉緑体におけるタンパク質の局在化機構は、一部、原核の内部共生体から生じるものである。Cline及びHenry（1996）、Annu.Rev. Cell. Dev. Biol.12:1-26。

【０００７】

葉緑体発現のための前駆体タンパク質は、葉緑体輸送ペプチド（ＣＴＰ（ｃｈｌｏｒｏｐｌａｓｔ　ｔｒａｎｓｉｔ　ｐｅｐｔｉｄｅ））として知られる、Ｎ末端伸長部を含有する。この輸送ペプチドは、葉緑体表面の特異的認識と、葉緑体包膜を通過させそこから葉緑体内の様々なサブコンパートメント（例えば、ストロマ、チラコイド膜及びチラコイド内腔）まで、翻訳後にタンパク質前駆体を移動させることの仲介とに役立つ。これらＮ

末端の輸送ペプチド配列は、色素体への葉緑体タンパク質の移送に必要な情報を全て含有するものであり、色素体の移送には、該輸送ペプチド配列が必要十分なものである。

【０００８】

天然にコードされる輸送ペプチド配列をそのＮ末端に有すると報告されている植物遺伝子としては、リブロース－１，５－二リン酸カルボキシラーゼ（ＲｕＢｉｓＣｏ）の葉緑体小サブユニット（de Castro Silva-Filhoら（1996）、Plant Mol. Biol. 30:769-80; Schnellら（1991）、J. Biol. Chem. 266:3335-42）；EPSPS（例えば、Archerら（1990）、J. Bioenerg.及びBiomemb. 22:789-810ならびに米国特許第6,867,293号、第7,045,684号及び米国再発行特許第Re. 36,449号を参照のこと）；トリプトファンシンターゼ（Zhaoら（1995）、J. Biol. Chem. 270:6081-7）；プラストシアニン（Lawrenceら（1997）、J. Biol. Chem. 272:20357-63）；コリスミ酸シンターゼ（Schmidtら（1993）、J. Biol. Chem. 268:27447-57）；集光性クロロフィルａ／ｂ結合タンパク質（LHBP）（Lamppaら（1988）、J. Biol. Chem. 263:14996-14999）；及びシロイヌナズナ（Arabidopsis thaliana）の葉緑体タンパク質（Leeら（2008）、Plant Cell 20:1603-22）が挙げられる。米国特許出願公開第US2010/0071090号は、クラミドモナス属（Chlamydomonas）の種よりのペプチドを標的化する特定の葉緑体を提供する。

【０００９】

しかしながら、ペプチドを標的化する葉緑体によってコードされる情報の構造的要件は、配列が高度に多様であることと、共通又は一致する配列モチーフが欠如していることとにより不明のままであるが、独立の構造モチーフを有する、葉緑体標的化ペプチドの別個のサブグループが存在する可能性がある。Leeら（2008）、上記参照。また、高等植物における葉緑体標的化タンパク質の異種発現において、これら配列の一部が有用であった。

【発明の概要】

【００１０】

本明細書には、植物におけるポリペプチドの葉緑体標的化のための組成物及び方法を記載している。一部の実施形態では、組成物は、対象とするヌクレオチド配列と作動可能に連結された葉緑体輸送ペプチド（例えば、ＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８のペプチド）をコードする少なくとも１つのヌクレオチド配列を含む核酸分子を含む。特定の実施形態では、かかる核酸分子は、単子葉植物又は双子葉植物における対象とするヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチドの発現及び標的化のために有用であり得る。また、対象とするヌクレオチド配列と作動可能に連結された、ＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８の葉緑体輸送ペプチドをコードする少なくとも１つのヌクレオチド配列を含む核酸分子を含むベクターが記載される。

【００１１】

一部の実施形態では、ＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８の葉緑体輸送ペプチドをコードするヌクレオチド配列は、原核生物のヌクレオチド配列であるか、又はその機能性変異体であり得る。一部の実施形態では、ＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８の葉緑体輸送ペプチドをコードするヌクレオチド配列は、低光合成真核生物から単離したヌクレオチド配列（例えば、クラミドモナス属（Chlamydomonas）及びドナリエラ（Dunaliella）などである緑色植物から単離した配列）であるか、又はその機能性変異体であり得る。一部の実施形態では、ＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８の葉緑体輸送ペプチドをコードするヌクレオチド配列は、高光合成真核生物から単離したヌクレオチド配列（例えば、セイヨウアブラナ（Brassica napus）、アマランサス（Amaranthus）、ヒルガオ（Calystegia）及びダイズ（Glycine max）などである双子葉植物か、例えばイネ（Oryza sativa）などである単子葉植物から単利した配列）か、又はその機能性変異体であり得る。或る実施形態で

は、ＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８の葉緑体輸送ペプチドをコードするヌクレオチド配列は、セイヨウアブラナ（Brassica napus）、ダイズ、イネ、アマランサス、ヒルガオ及びドナリエラ（Dunaliella salina）及びコナミドリムシ（Chlamydamonas reinhardtii）から単離したヌクレオチド配列であり得る。さらなる実施形態では、ＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８の葉緑体輸送ペプチドをコードするヌクレオチド配列は、部分的原核生物のＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８の葉緑体輸送ペプチドのヌクレオチド配列か、又はその機能性変異体を含むキメラヌクレオチド配列であり得る。またさらなる実施形態では、ＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８の葉緑体輸送ペプチドをコードするヌクレオチド配列は、例えば異なる植物種からの複数（例えば、２つ）の葉緑体輸送ペプチドのヌクレオチド配列である、複数の真核生物葉緑体輸送ペプチドか、又はその機能性変異体を含むキメラヌクレオチド配列であり得る。またさらなる実施形態では、ＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８の葉緑体輸送ペプチドをコードするヌクレオチド配列は、原核生物のＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８の葉緑体輸送ペプチドのヌクレオチド配列を少なくとも一部参照することによって設計したものであり得る、合成ヌクレオチド配列であり得る。またさらなる実施形態では、ＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８の葉緑体輸送ペプチドをコードするヌクレオチド配列は、真核生物のＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８の葉緑体輸送ペプチドのヌクレオチド配列を少なくとも一部参照することによって設計したものであり得る、合成ヌクレオチド配列であり得る。またさらなる実施形態では、ＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８の葉緑体輸送ペプチドをコードするヌクレオチド配列は、ＥＰＳＰＳ遺伝子配列又はその他の葉緑体輸送ペプチドを含有する遺伝子配列からの真核生物葉緑体輸送ペプチドのヌクレオチド配列を少なくとも一部参照することによって設計したものであり得る、合成ヌクレオチド配列であり得る。

【００１２】

一部の実施形態では、組成物は、対象とするヌクレオチド配列と作動可能に連結された、葉緑体に対してポリペプチドを標的化する少なくとも１つの手段を含む、核酸分子を含む。特定の実施形態では、かかる核酸分子は、単子葉植物又は双子葉植物において対象とするヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチドの発現及び標的化のために有用であり得る。また、対象とするヌクレオチド配列と作動可能に連結された、葉緑体に対してポリペプチドを標的化する少なくとも１つの手段を含む、核酸分子を含むベクターについて記載している。他の実施形態には、ＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８のヌクレオチド配列及びその機能性均等物を介して、葉緑体に対してポリペプチドを標的化するための手段を記載している。

【００１３】

また、本明細書には、対象とするヌクレオチド配列と作動可能に連結された、ＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８の葉緑体輸送ペプチドをコードする少なくとも１つのヌクレオチド配列を含む核酸分子を含む、植物、植物組織及び植物細胞についても記載している。一部の実施形態では、植物、植物組織又は植物細胞は、そのゲノムに安定的に組み込まれる、かかる核酸分子を有し得る。一部の実施形態では、植物、植物組織又は植物細胞は、かかる核酸分子を一時的に発現し得る。

【００１４】
植物又は植物細胞の葉緑体においてヌクレオチド配列を発現する方法についても記載している。一部の実施形態では、対象とするヌクレオチド配列と作動可能に連結された、ＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８の葉緑体輸送ペプチドをコードする少なくとも１つのヌクレオチド配列を含む核酸分子を用いて、植物細胞を形質転換し得るため、対象とするヌクレオチド配列の発現産物と融合されたＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８の葉緑体輸送ペプチドを含む前駆体融合ポリペプチドが、植物細胞の細胞質中で生成され、次いで、当該融合ポリペプチドが植物細胞の葉緑体にインビボで輸送される。

【００１５】
また、対象とするヌクレオチド配列と作動可能に連結された、ＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８の葉緑体輸送ペプチドをコードする少なくとも１つのヌクレオチド配列を含む核酸分子を含む、トランスジェニック植物の作成方法が記載されている。また、かかるトランスジェニック植物から生産される植物製品（例えば、種子）も記載されている。

【００１６】
前記及び他の特徴は、幾つかの実施形態の以下の詳述からより明らかになるし、添付図面を参照することで進展するであろう。

【図面の簡単な説明】

【００１７】
【図１】図１は、対象とするヌクレオチド配列と作動可能に連結した、合成ＣＴＰをコードするヌクレオチド配列（例えば、ＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８の葉緑体輸送ペプチド）の特定の例を代表するｍＲＮＡ分子を示す。一部の実施形態では、ｍＲＮＡ分子（例えば図示したもの）は、対象とするヌクレオチド配列と作動可能に連結した合成ＣＴＰコード配列を含む、オープンリーディングフレームを備えたＤＮＡ分子から転写され得る。対象とするヌクレオチド配列は、一部の実施形態では、対象とするペプチドをコードする配列であり得、例えば、限定するものではなく、色素体に対して標的化されるマーカー遺伝子産物又はペプチドであり得る。
【図２】図２は、セイヨウアブラナ（Brassica napus）、ドナリエラ（Dunaliella salina）、イネ、アマランサス、コナミドリムシ、ヒルガオ（Calystegia）及びダイズ（Glycine max）からの、予測される葉緑体輸送ペプチドのアラインメントを示す。アスタリスクは、配列が切断して再結合し、様々なキメラＴｒａＰ配列を形成する場所を示す。アマランサス（Amaranthus）を、２つの異なるキメラ葉緑体輸送ペプチド（ＴｒａＰ１８及びＴｒａＰ１９）に用いて、２つの異なるアスタリスクで示すように配列内の異なる２箇所でスプライシングされたことに留意されたい。
【図３】図３は、プラスミドマップｐＤＡＢ１０１９７９を示す。
【図４】図４は、プラスミドマップｐＤＡＢ１０１９８０を示す。
【図５】図５は、プラスミドマップｐＤＡＢ１０７６３４を示す。
【図６】図６は、プラスミドマップｐＤＡＢ１０７６３５を示す。
【図７】図７は、プラスミドマップｐＤＡＢ１０７６３６を示す。
【図８】図８は、プラスミドマップｐＤＡＢ１０９８４７を示す。
【図９】図９は、プラスミドマップｐＤＡＢ１０９８４８を示す。
【図１０】図１０は、プラスミドマップｐＤＡＢ１０９８４９を示す。
【図１１】図１１は、プラスミドマップｐＤＡＢ１０１９０８を示す。
【図１２】図１２は、タバコ葉組織に浸潤し、タバコ葉組織の葉緑体に移動したＴｒａＰ１０－ＹＦＰの顕微鏡画像を示す。
【図１３】図１３は、タバコ葉組織に浸潤し、タバコ葉組織の葉緑体に移動したＴｒａＰ１１－ＹＦＰの顕微鏡画像を示す。

【図１４】図１４は、タバコ葉組織の葉緑体に移動しなかった、タバコ葉組織に浸潤したＴｒａＰ１７－ＧＦＰの顕微鏡画像を示す。
【図１５】図１５は、タバコ葉組織の葉緑体に移動した、タバコ葉組織に浸潤したＴｒａＰ１８－ＧＦＰの顕微鏡画像を示す。
【図１６】図１６は、タバコ葉組織に浸潤し、タバコ葉組織の葉緑体に移動したＴｒａＰ１９－ＧＦＰの顕微鏡画像を示す。
【図１７】図１７は、タバコ葉組織の葉緑体に移動した、タバコ葉組織に浸潤したＴｒａＰ２６－ＧＦＰの顕微鏡画像を示す。
【図１８】図１８は、タバコ葉組織に浸潤し、タバコ葉組織の葉緑体に移動したＴｒａＰ２７－ＧＦＰの顕微鏡画像を示す。
【図１９】図１９は、タバコ葉組織に浸潤し、タバコ葉組織の葉緑体に移動したＴｒａＰ２８－ＧＦＰの顕微鏡画像を示す。
【図２０】図２０は、タバコ葉組織に浸潤し、かつ、タバコ葉組織の葉緑体に組み込まれなかった標的化なしのＹＦＰ対照の顕微鏡画像である。
【図２１】図２１は、トウモロコシプロトプラストに形質転換して、トウモロコシプロトプラストの葉緑体に移動したＴｒａＰ１７－ＧＦＰの顕微鏡画像を示す。
【図２２】図２２は、トウモロコシプロトプラストに形質転換して、トウモロコシプロトプラストの葉緑体に移動したＴｒａＰ１８－ＧＦＰの顕微鏡画像を示す。
【図２３】図２３は、トウモロコシプロトプラストに形質転換して、トウモロコシプロトプラストの葉緑体に移動したＴｒａＰ１９－ＧＦＰの顕微鏡画像を示す。
【図２４】図２４は、プラスミドマップｐＤＡＢ１０７５３８を示す。
【図２５】図２５は、プラスミドマップｐＤＡＢ１０７６１７を示す。
【図２６】図２６は、プラスミドマップｐＤＡＢ１１４２８６を示す。
【図２７】図２７は、プラスミドマップｐＤＡＢ１１４２８７を示す。
【発明を実施するための形態】
【００１８】
発明の詳細な説明
Ｉ．いくつかの実施形態の概要
葉緑体輸送ペプチド（ＣＴＰ）（すなわち色素体輸送ペプチド）は、翻訳と同時に又は翻訳後に、ＣＴＰを含むポリペプチドを、例えば葉緑体である色素体に向かわせる働きをする。この発明の一部の実施形態では、内在性葉緑体タンパク質又は異種タンパク質のいずれかが、かかるタンパク質の発現によって、ＣＴＰを含むより大きい前駆体ポリペプチドとして、葉緑体に向かわせ得る。
【００１９】
例示的な実施形態では、ＣＴＰをコードする核酸配列は、セイヨウアブラナ（Brassica napus）から得たＥＰＳＰＳ遺伝子配列（ＮＣＢＩデータベース目録Ｎｏ．Ｐ１７６８８）、ダイズ（Glycine max）から得たＥＰＳＰＳ遺伝子配列（ＮＣＢＩデータベース目録Ｎｏ．ＸＰ＿００３５１７０３９）、ヒルガオ（Calystegia）から得たＥＰＳＰＳ遺伝子配列（ＮＣＢＩデータベース目録Ｎｏ．ＡＣＢ３７３８０）、コナミドリムシ（Chlamydamonas reinhardtii）から得たＥＰＳＰＳ遺伝子配列（ＮＣＢＩデータベース目録Ｎｏ．ＸＰ＿００１７０２９４２）、イネ（Oryza sativa）から得たＥＰＳＰＳ遺伝子配列（ＮＣＢＩデータベース目録Ｎｏ．ＡＦ４１３０８２＿１）、アマランサス（Amaranthus）から得たＥＰＳＰＳ遺伝子配列（ＮＣＢＩデータベース目録Ｎｏ．ＡＣＶ５３０２２）、及びドナリエラ（Dunaliella salina）から得たＥＰＳＰＳ遺伝子配列（ＮＣＢＩ目録Ｎｏ．：ＡＭＢＭ６８６３２）から単離した。ＣＴＰは、ＣｈｌｏｒｏＰ予測サーバにより、遺伝子配列を解析することによって、全長タンパク質から特定して単離した。Emanuelssonら（1999）、Protein Science 8:978-84（cbs.dtu.dk/services/ChloroPで利用可能）。単離したＣＴＰコード配列のうち予測したタンパク質産物を用いて、主題の開示であるキメラＣＴＰコード核酸配列、ＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８を生成した。

【００２０】
さらなる例示的な実施形態では、ＴｒａＰ１０ペプチドを単独で合成し、黄色蛍光タンパク質（ＹＦＰ）と融合させて、キメラＴｒａＰ１０－ＹＦＰポリペプチドを生成した。キメラＴｒａＰ１０－ＹＦＰポリペプチドをコードする核酸分子をバイナリーベクターに導入して、ＴｒａＰ１０－ＹＦＰコード核酸配列がＡｔＵｂｉ　１０のプロモーターと作動可能に連結された。
【００２１】
またさらなる例示的な実施形態では、ＡｔＵｂｉ　１０のプロモーターと作動可能に連結したＴｒａＰ１０－ＹＦＰコード核酸配列を含むバイナリーベクターが、アグロバクテリウム（Agrobacterium）を介してタバコ（Nicotiana tabacum）を一過性に形質転換した。共焦点顕微鏡観察及びウエスタンブロット分析により、ＴｒａＰ１０がタバコの葉緑体に対してＹＦＰを標的化させることに成功したことを確認した。
【００２２】
さらなる例示的な実施形態では、ＴｒａＰ１１ペプチドを単独で合成し、黄色蛍光タンパク質（ＹＦＰ）と融合させてキメラＴｒａＰ１１－ＹＦＰポリペプチドを生成した。キメラＴｒａＰ１１－ＹＦＰポリペプチドをコードする核酸分子を、バイナリーベクターに導入して、ＴｒａＰ１１－ＹＦＰコード核酸配列がＡｔＵｂｉ　１０のプロモーターと作動可能に連結された。
【００２３】
またさらなる例示的な実施形態では、ＡｔＵｂｉ　１０のプロモーターと作動可能に連結されたＴｒａＰ１１－ＹＦＰコード核酸配列を含むバイナリーベクターが、アグロバクテリウム（Agrobacterium）を介してタバコ（Nicotiana tabacum）を一過性に形質転換した。共焦点顕微鏡観察及びウエスタンブロット分析により、ＴｒａＰ１１がＹＦＰをタバコの葉緑体に標的化することに成功したことを確認した。
【００２４】
さらなる例示的な実施形態では、ＴＲＡＰ１７ペプチドを単独で合成し、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）と融合させてキメラＴＲＡＰ１７－ＧＦＰポリペプチドを生成した。キメラＴｒａＰ１７－ＧＦＰポリペプチドをコードする核酸分子を、バイナリーベクターに導入して、ＴｒａＰ１７－ＧＦＰコード核酸配列がＡｔＵｂｉ　１０のプロモーターと作動可能に連結された。
【００２５】
またさらなる例示的な実施形態では、ＡｔＵｂｉ　１０のプロモーターと作動可能に連結されたＴｒａＰ１７－ＧＦＰコード核酸配列を含むバイナリーベクターが、アグロバクテリウム（Agrobacterium）を介してトウモロコシ（Zea mays）を一過性に形質転換した。共焦点顕微鏡観察及びウエスタンブロット分析により、ＴｒａＰ１７がＧＦＰをトウモロコシの葉緑体に標的化することに成功したことを確認した。
【００２６】
さらなる例示的な実施形態では、ＴｒａＰ１８ペプチドを単独で合成し、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）と融合させてキメラＴｒａＰ１８－ＧＦＰポリペプチドを生成した。キメラＴｒａＰ１８－ＧＦＰポリペプチドをコードする核酸分子をバイナリーベクターに導入して、ＴｒａＰ１８－ＧＦＰコード核酸配列がＡｔＵｂｉ　１０のプロモーターと作動可能に連結された。
【００２７】
またさらなる例示的な実施形態では、ＡｔＵｂｉ　１０のプロモーターと作動可能に連結しされたＴｒａＰ１８－ＧＦＰコード核酸配列を含むバイナリーベクターが、アグロバクテリウム（Agrobacterium）を介してトウモロコシ（Zea mays）及びタバコ（Nicotiana tabacum）を一過性に形質転換した。共焦点顕微鏡観察及びウエスタンブロット分析により、ＴｒａＰ１８がＧＦＰをトウモロコシ及びタバコの葉緑体に標的化することに成功したことを確認した。
【００２８】

さらなる例示的な実施形態では、ＴｒａＰ１９ペプチドを単独で合成し、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）と融合させてキメラＴｒａＰ１９－ＧＦＰポリペプチドを生成した。キメラＴｒａＰ１９－ＧＦＰポリペプチドをコードする核酸分子を、バイナリーベクターに導入し、ＴｒａＰ１９－ＧＦＰコード核酸配列がＡｔＵｂｉ　１０のプロモーターと作動可能に連結された。

【００２９】

またさらなる例示的な実施形態では、ＡｔＵｂｉ　１０のプロモーターと作動可能に連結されたＴｒａＰ１９－ＧＦＰコード核酸配列を含むバイナリーベクターが、アグロバクテリウム（Agrobacterium）を介して一時的にトウモロコシ（Zea mays）及びタバコ（Nicotiana tabacum）を形質転換した。共焦点顕微鏡観察及びウエスタンブロット分析により、ＴｒａＰ１９がＧＦＰをトウモロコシ及びタバコの葉緑体に標的化することに成功したことを確認した。

【００３０】

さらなる例示的な実施形態では、ＴｒａＰ２６ペプチドを単独で合成し、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）と融合させてキメラＴｒａＰ２６－ＧＦＰポリペプチドを生成した。キメラＴｒａＰ２６－ＧＦＰポリペプチドをコードする核酸分子をバイナリーベクターに導入し、ＴｒａＰ２６－ＧＦＰコード核酸配列がＡｔＵｂｉ　１０のプロモーターと作動可能に連結された。

【００３１】

またさらなる例示的な実施形態では、ＡｔＵｂｉ　１０のプロモーターと作動可能に連結したＴｒａＰ２６－ＧＦＰコード核酸配列を含むバイナリーベクターが、アグロバクテリウム（Agrobacterium）を介して一時的にタバコ（Nicotiana tabacum）に形質転換された。共焦点顕微鏡観察及びウエスタンブロット分析により、ＴｒａＰ２６がタバコの葉緑体に対してＧＦＰを標的化することに成功したことを確認した。

【００３２】

さらなる例示的な実施形態では、ＴｒａＰ２７ペプチドを単独で合成し、黄色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）と融合させてキメラＴｒａＰ２７－ＧＦＰポリペプチドを生成した。キメラＴｒａＰ２７－ＧＦＰポリペプチドをコードする核酸分子をバイナリーベクターに導入し、ＴｒａＰ２７－ＧＦＰコード核酸配列がＡｔＵｂｉ　１０のプロモーターと作動可能に連結された。

【００３３】

またさらなる例示的な実施形態では、ＡｔＵｂｉ　１０のプロモーターと作動可能に連結したＴｒａＰ２７－ＧＦＰコード核酸配列を含むバイナリーベクターが、アグロバクテリウム（Agrobacterium）を介してタバコ（Nicotiana tabacum）を一過性に形質転換した。共焦点顕微鏡観察及びウエスタンブロット分析により、ＴｒａＰ２７がＧＦＰをタバコの葉緑体に標的化することに成功したことを確認した。

【００３４】

さらなる例示的な実施形態では、ＴｒａＰ２８ペプチドを単独で合成し、黄色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）と融合させてキメラＴｒａＰ２８－ＧＦＰポリペプチドを生成した。キメラＴｒａＰ２８－ＧＦＰポリペプチドをコードする核酸分子を、バイナリーベクターに導入し、ＴｒａＰ２８－ＧＦＰコード核酸配列がＡｔＵｂｉ　１０のプロモーターと作動可能に連結された。

【００３５】

またさらなる例示的な実施形態では、ＡｔＵｂｉ　１０のプロモーターと作動可能に連結したＴｒａＰ２８－ＧＦＰコード核酸配列を含むバイナリーベクターが、アグロバクテリウム（Agrobacterium）を介してタバコ（Nicotiana tabacum）を一過性に形質転換した。共焦点顕微鏡観察及びウエスタンブロット分析により、ＴｒａＰ２８がＧＦＰをタバコの葉緑体に標的化することに成功したことを確認した。

【００３６】

さらなる例示的な実施形態では、この発明の合成ＴｒａＰペプチドをそれぞれコードす

る核酸配列が、単独で合成されて、農学上重要な遺伝子配列をコードする核酸配列と作動可能に連結された。ＴｒａＰ配列は、耐除草剤の形質（例えばｄｇｔ－２８、ｄｇｔ－１４、ｄｇｔ－３２及びｄｇｔ－３３）と融合されて、キメラのＴｒａＰ１０：ＤＧＴ－２８、ＴｒａＰ１１：ＤＧＴ－２８、ＴｒａＰ１７：ＤＧＴ－２８、ＴｒａＰ１８：ＤＧＴ－２８、ＴｒａＰ１９：ＤＧＴ－２８、ＴｒａＰ２６：ＤＧＴ－２８、ＴｒａＰ２７：ＤＧＴ－２８又はＴｒａＰ２８：ＤＧＴ－２８の融合ポリペプチドをそれぞれコードする合成核酸分子を生成できる。キメラのＴｒａＰ１０：ＤＧＴ－２８、ＴｒａＰ１１：ＤＧＴ－２８、ＴｒａＰ１７：ＤＧＴ－２８、ＴｒａＰ１８：ＤＧＴ－２８、ＴｒａＰ１９：ＤＧＴ－２８、ＴｒａＰ２６：ＤＧＴ－２８、ＴｒａＰ２７：ＤＧＴ－２８又はＴｒａＰ２８：ＤＧＴ－２８のポリペプチドをそれぞれコードできる核酸配列がそれぞれバイナリーベクターに導入されて、ＴｒａＰ１０：ＤＧＴ－２８、ＴｒａＰ１１：ＤＧＴ－２８、ＴｒａＰ１７：ＤＧＴ－２８、ＴｒａＰ１８：ＤＧＴ－２８、ＴｒａＰ１９：ＤＧＴ－２８、ＴｒａＰ２６：ＤＧＴ－２８、ＴｒａＰ２７：ＤＧＴ－２８又はＴｒａＰ２８：ＤＧＴ－２８をそれぞれコードする核酸配列が、プロモーター及び他の遺伝子制御エレメントと作動可能に連結された。ＴｒａＰ１０：ＤＧＴ－２８、ＴｒａＰ１１：ＤＧＴ－２８、ＴｒａＰ１７：ＤＧＴ－２８、ＴｒａＰ１８：ＤＧＴ－２８、ＴｒａＰ１９：ＤＧＴ－２８、ＴｒａＰ２６：ＤＧＴ－２８、ＴｒａＰ２７：ＤＧＴ－２８又はＴｒａＰ２８：ＤＧＴ－２８をコードする核酸配列を含有するバイナリーベクターを用いて、様々な植物種を形質転換した。トランスジェニック植物について、葉緑体に対するＤＧＴ－２８酵素の発現及び移動の結果としての、グリホサート耐性を測定することができる。

【００３７】

上記した詳細な実施例を鑑みて、本発明のＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８の配列を用いて、広範囲にわたる植物種内の色素体に、任意のポリペプチドを向かわせるようにしてもよい。例えば、本開示により当業者に対して利用可能になされた方法によって、任意の第２のペプチド配列のＮ末端に融合された、ＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８のペプチド配列を含むキメラポリペプチドを、第２のペプチド配列を標的化する色素体の宿主細胞に導入してもよい。それにより、特定の実施形態では、ＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８のペプチドにより、色素体発現が望まれるペプチドの移送及びプロセッシングの効率の向上をもたらすことができる。

【００３８】

ＩＩ．略語

ＣＴＰ　　葉緑体輸送ペプチド
ＥＰＳＰＳ　３－エノールピルビルシキミ酸－５－リン酸シンターゼ
ＹＦＰ　　黄色蛍光タンパク質
T_i　　腫瘍誘発（Ａ．ｔｕｍｅｆａｃｉｅｎｓ由来のプラスミド）
Ｔ－ＤＮＡ　トランスファーＤＮＡ

【００３９】

ＩＩＩ．用語

本開示の様々な実施形態の検討を円滑にするため、以下に特定の用語の説明を提供する。

【００４０】

葉緑体輸送ペプチド：本明細書で用いる場合、「葉緑体輸送ペプチド（ＣＴＰ）」（すなわち「色素体輸送ペプチド」）という用語は、ポリペプチドのＮ末端に存在する場合に、植物細胞の色素体、例えば葉緑体内へのポリペプチドの移送をさせるアミノ酸配列を指し得る。ＣＴＰは概して、宿主細胞の色素体（例えば、葉緑体などである、一次色素体、二次色素体又は三次色素体）へのタンパク質を移送させるのに必要十分である。推定葉緑体輸送ペプチドは、いくつかの利用可能なアルゴリズム（例えば、ＰＳＯＲＴ及びＣｈｌ

ｏｒｏＰ（www.cbs.dtu.dk/services/ChloroPで利用可能））のうちのひとつによって同定することができる。特にＣｈｌｏｒｏＰにより、葉緑体輸送ペプチドの良好な予測がなされ得る。Emanuelssonら（1999）、Protein Science 8:978-84。ただし、機能性な葉緑体輸送ペプチドの予測は、いずれの既存のアルゴリズムによっても１００％の効率では達成されない。したがって、同定した推定葉緑体輸送ペプチドが、意図したとおりに、例えば、インビトロ又はインビボの方法論で本当に機能するかを検証することが重要である。

【００４１】

葉緑体輸送ペプチドは、色素体に移送されるポリペプチドのＮ末端に位置付けられてもよいし、いくつかの例では、ポリペプチドのＣ末端に位置付けられてもよい。輸送ペプチドにより、色素体への、ＣＴＰを含むポリペプチドの翻訳と同時又は翻訳後の輸送を容易にすることができる。葉緑体輸送ペプチドは典型的に、約４０から約１００のアミノ酸を含み、かかるＣＴＰは、特定の共通した特徴、例えばＣＴＰはたとえ存在していたとしても極めて少量の負電荷のアミノ酸（例えばアスパラギン酸、グルタミン酸、アルパラギン又はグルタミン）を含有すること、ＣＴＰのＮ末端領域は荷電アミノ酸、グリシン及びプロリンが欠如していること、ＣＴＰの中央領域はまた塩基性アミノ酸又は水酸化アミノ酸（例えばセリン及びトレオニン）を非常に高い割合で含有する可能性があること、ＣＴＰのＣ末端領域はアルギニンが豊富であり、かつ、両親媒性のβシート構造を含む性能を有する可能性があることが観察された。色素体プロテアーゼは、ＣＴＰを含むポリペプチドの残りの部分から、色素体へのポリペプチド移送後にＣＴＰを切断することができる。

【００４２】

接触：本明細書において使用される場合、細胞、組織又は生物体（例えば、植物細胞、植物組織及び植物）「との接触」又は「による取り込み」という用語は、核酸分子に関しては、当該生物体への核酸分子の内在化を含み、例えば限定されないが：当該生物体と、核酸分子を含む組成物との接触；及び核酸分子を含有する溶液に生物体が浸ることを含む。

【００４３】

内在性：本明細書において使用される場合、「内在性」という用語は、特定の生物体、組織又は細胞内から生じる物質（例えば、核酸分子及びポリペプチド）を指す。例えば植物細胞内で発現した「内在性」ポリペプチドは、同じ種の非遺伝子組み換え植物と同じ型の細胞内で通常発現されるポリペプチドを指し得る。

【００４４】

発現：本明細書において使用される場合、コード配列（例えば、遺伝子又は導入遺伝子）の「発現」とは、核酸転写ユニット（例えば、ゲノムＤＮＡ又はｃＤＮＡを含む）のコード化情報が、細胞の作動性部分、非作動性部分、又は構造的部分へと転換されるプロセスを指し、多くの場合、タンパク質の合成を含んでいる。遺伝子発現は、遺伝子発現を増加又は低下させる剤への、例えば細胞、組織、又は生物体の曝露などの外部シグナルにより影響され得る。遺伝子の発現はまた、ＤＮＡからＲＮＡ、蛋白質への経路のいずれかで制御され得る。遺伝子発現の制御は、例えば転写、翻訳、ＲＮＡの輸送及びプロセッシング、例えばｍＲＮＡなどの中間分子の分解に対する作用を制御することにより発生するか、又はそれらが生成された後の特定の蛋白質分子の活性化、不活化、区画化、又は分解を介して発生するか、又はそれらの組み合わせにより発生する。遺伝子発現は、これらに限定はされないが、ノーザンブロット、ＲＴ－ＰＣＲ、ウエスタンブロット、又はインビトロ、インサイチューもしくはインビボでの蛋白質活性アッセイ（複数）が含まれる、当該技術分野で公知の任意の方法によってＲＮＡレベル又は蛋白質レベルで測定することができる。

【００４５】

遺伝物質：本明細書において使用される場合、「遺伝物質」という用語は、全ての遺伝子、ならびに例えばＤＮＡ及びＲＮＡなどの核酸分子を含む。

【００４６】

異種：本明細書において使用される場合、「異種」という用語は、特定の生物体、組織

又は細胞内から生じるものではない物質（例えば、核酸分子及びポリペプチド）を指す。例えば、植物細胞内で発現した「異種」ポリペプチドは、同じ種の非遺伝子組み換え植物と同じ型の細胞においては通常では発現しないポリペプチド（例えば、同じ生物体の異なる細胞において、又は異なる生物体の細胞において発現するポリペプチド）を指し得る。

【００４７】

単離した：本明細書において使用される場合、「単離（した）」という用語は、分子（例えば、核酸分子及びポリペプチド）であって、該分子が天然に存在する生物体の細胞内において、該分子が通常伴っている同じ型の他の分子（例えば、核酸分子及び他のポリペプチド）から実質的に分離又は精製した分子を指す。例えば、単離核酸分子は、該核酸分子が天然に存在する生物体の細胞内の染色体ＤＮＡ又は染色体外ＤＮＡから、実質的に分離又は精製されたものであり得る。そのため、該用語には、生化学的に精製されて他の核酸分子、ポリペプチド及び細胞成分が除去された、組み換え核酸分子及びポリペプチドが含まれる。該用語にはまた、組み換え核酸分子、化学的に合成した核酸分子及び組み換えにより生成したポリペプチドが含まれる。

【００４８】

本明細書において使用される場合、「実質的に精製（した）」という用語は、分子がその天然の状態において通常伴っていた他の分子から分離された分子を指す。実質的に精製した分子は、組成物中に存在する優勢種であり得る。実質的に精製した分子は例えば、天然の混合物中に存在する溶媒の他に、他の分子が少なくとも６０％存在しない、少なくとも７５％存在しない、又は少なくとも９０％存在しないものであり得る。「実質的に精製（した）」という用語は、それらの天然の状態で存在している分子を指すものではない。

【００４９】

核酸分子：本明細書において使用される場合、「核酸分子」という用語は、重合形態のヌクレオチドを指し、ＲＮＡ、ｃＤＮＡ、ゲノムＤＮＡのセンス鎖とアンチセンス鎖の両方を含んでもよいし、それらの合成型及び混合型ポリマーを含んでもよい。ヌクレオチドは、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、又はいずれかのタイプのヌクレオチドの修飾型を指す場合がある。本明細書で使用されるとき、「核酸分子」は、「核酸」及び「ポリヌクレオチド」と同義である。別段の言及がない限り、核酸分子は通常、少なくとも１０塩基の長さである。前記用語はＤＮＡの一本鎖及び二本鎖の形態を含む。核酸分子は、二量体（いわゆる、タンデム）の形態及び核酸分子の転写産物を含む。核酸分子は、天然型、及び／又は非天然型のヌクレオチド結合によって、共に連結された天然型ヌクレオチド及び修飾ヌクレオチドのいずれか、又は両方を含んでもよい。

【００５０】

核酸分子は、当業者によって容易に理解される化学的又は生化学的に修飾されてもよく、あるいは非自然又は誘導体化ヌクレオチド塩基を含んでもよい。かかる修飾としては、例えば、標識、メチル化、１つ以上の天然型ヌクレオチドのアナログでの置換、ヌクレオチド間修飾（例えば、非荷電結合：例えばホスホン酸メチル、リン酸トリエステル、アミド亜リン酸エステル、カルバマートなど；荷電結合：例えばチオリン酸エステル、ジチオリン酸エステルなど；ペンダント(pendent)部分：例えば、ペプチド；挿入剤：例えば、アクリジン、ソラレンなど；キレーター；アルキレーター；及び改変された結合：例えば、αアノマー核酸など）が挙げられる。また、「核酸分子」という用語は、一本鎖、二本鎖、部分的に二重、三重、ヘアピン型、環状及び錠型の立体配座を含む位相幾何学立体配座も含む。

【００５１】

本明細書においてＤＮＡに関して使用される場合、「コード配列」、「構造的ヌクレオチド配列」、又は「構造的核酸分子」という用語は、適切な調節配列の制御下に置かれたときに、転写及びｍＲＮＡを介してポリペプチドへと最終的に翻訳されるヌクレオチド配列を指す。ＲＮＡに関しては、「コード配列」という用語は、ペプチド、ポリペプチド、又はタンパク質へと翻訳されるヌクレオチド配列を指す。コード配列の境界は、５’末端の翻訳開始コドンと、３’末端の翻訳停止コドンにより決定される。コード配列としては

、限定されないが、ゲノムＤＮＡ、ｃＤＮＡ、ＥＳＴ、及び組み換えヌクレオチド配列が含まれる。

【００５２】

一部の実施形態では、この発明には、例えばイオン交換クロマトグラフィー等の分離法、分子サイズもしくはアフィニティーに基づく除去、様々な溶媒への溶解度に基づく分取技術、又は増幅、クローニング及びサブクローニングなどの遺伝子工学による方法を用いて、単離、精製又は部分的に精製され得るヌクレオチド配列が含まれる。

【００５３】

配列の同一性：２つの核酸配列又はポリペプチド配列の文脈において本明細書で使用される場合、「配列同一性」又は「同一性」という用語は、特定した比較ウィンドウにわたって最大一致で並べられたとき、２つの配列中の同一である残基を指す場合がある。

【００５４】

本明細書において使用される場合、「配列同一性の割合」という用語は、最適に並べられた配列（例えば、核酸配列及びアミノ酸配列）を、比較ウィンドウにわたって比較することにより決定される値を指す場合があり、この場合において比較ウィンドウ中の配列部分は、２つの配列の最適なアライメントのために、基準配列（付加又は欠失を含んでいない）と比較し、付加又は欠失（すなわち、ギャップ）を含有する場合がある。割合は、同一のヌクレオチド又はアミノ酸残基が両配列に存在する位置の数を決定し、合致した位置の数を出し、合致した位置の数を比較ウィンドウ中の位置の総数で割り、１００を掛けて配列同一性の割合を出すことにより算出される。

【００５５】

比較のための配列アライメントの方法は当分野において公知である。様々なプログラム及びアライメントアルゴリズムが記載されており、例えば以下がある：Smith及びWaterman (1981)、Adv. Appl. Math. 2:482; Needleman及びWunsch（1970）、J. Mol. Biol. 48:443; Pearson及びLipman (1988)、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:2444; Higgins及びSharp (1988)、}Gene 73:237-44; Higgins及びSharp (1989)、CABIOS 5:151-3; Corpetら（1988）、Nucleic Acids Res. 16:10881-90; Huangら（1992）、Comp. Appl. Biosci. 8:155-65; Pearsonら（1994）、Methods Mol. Biol. 24:307-31; Tatianaら（1999)、FEMS Microbiol. Lett. 174:247-50. 配列アライメント法及び相同性算出に関する詳細な検討については、例えば、下記に見出される：Altschulら（1990）、J. Mol. Biol. 215:403-10。

【００５６】

The National Center for Biotechnology Information (NCBI) Basic Local Alignment Search Tool(ＢＬＡＳＴ（商標）;Altschulら（1990）)は、いくつかの配列解析プログラムと関連した用途に対し、National Center for Biotechnology Information(Bethesda,MD)、及びインターネットをはじめとするいくつかの供給源から利用可能である。このプログラムを使用して配列同一性を決定する方法の記載は、ＢＬＡＳＴ（商標）の「ヘルプ」セクション下のインターネットで入手することができる。核酸配列の比較では、ＢＬＡＳＴ（商標）（Ｂｌａｓｔｎ）プログラムの機能「Blast 2 sequences」を利用して、デフォルトパラメータを設定してもよい。この方法で評価する場合、参照配列に対してより高い配列類似性を有する核酸配列は、より高い率の同一性を示す。

【００５７】

特異的ハイブリダイズ可能／特異的相補性：本明細書において使用される場合、「特異的にハイブリダイズ可能」及び「特異的相補性」という用語は、核酸分子と標的核酸分子との間で、充分な程度の相補性を示して安定かつ特異的な結合が発生する用語である。２つの核酸分子の間のハイブリダイゼーションは、当該２つの核酸分子の核酸配列の間の逆平行のアライメントの形成を含む。その後この２つの分子は対向鎖上の対応する塩基と水素結合を形成し、そしてもしこれが充分に安定であった場合には、当分野に公知の方法を使用して検出可能な二重鎖分子を形成することができる。核酸分子は、特異的にハイブリダイズ可能であるために、その標的配列に対して１００％相補的であることは必ずしも必

要ではない。しかしながら、ハイブリダイゼーションが特異的であるために存在しなければならない配列相補性の量は、使用されるハイブリダイゼーション条件の関数である。

【００５８】

特定の程度のストリンジェンシーを生じさせるハイブリダイゼーション条件は、選択したハイブリダイゼーション方法の性質、及びハイブリダイズする核酸配列の組成と長さに応じて変化する。概して、ハイブリダイゼーションの温度、及びハイブリダイゼーション緩衝液のイオン強度（特にＮａ$^{+}$及び／又はＭｇ$^{++}$の濃度）が、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーを決定するが、洗浄時間もストリンジェンシーに影響を与える。特定のストリンジェンシーの程度を得るために必要とされるハイブリダイゼーション条件に関する算定は当分野の当業者に公知であり、例えば、Sambrook ら編 Molecular Cloning: A Laboratory Manual、 2nd 編、 vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, chapters 9及び11；ならびにHames 及びHiggins 編 Nucleic Acid Hybridization, IRL Press, Oxford, 1985.に検討されている。また、核酸のハイブリダイゼーションに関する詳細な説明及びガイダンスは、例えば、Tijssen、 "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays" in Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology- Hybridization with Nucleic Acid Probes, Part I, Chapter 2, Elsevier, NY, 1993；及びAusubel ら編、 Current Protocols in Molecular Biology, Chapter 2, Greene Publishing and Wiley-Interscience, NY, 1995.に見出され得る。

【００５９】

本明細書において使用される場合、「ストリンジェントな条件」とは、ハイブリダイゼーション分子と、標的核酸分子内の相同配列の間のミスマッチが２０％未満である場合にのみハイブリダイゼーションが発生する条件を包含する。「ストリンジェントな条件」は、特定のレベルのストリンジェンシーをさらに含む。したがって本明細書において使用される場合、「中程度のストリンジェンシー」条件とは、２０％を超える配列ミスマッチを伴う分子がハイブリダイズしない条件であり、「高ストリンジェンシー」の条件は、１０％を超えるミスマッチを伴う配列がハイブリダイズしない条件であり、及び「非常に高ストリンジェンシー」の条件は、５％を超えるミスマッチを伴う配列がハイブリダイズしない条件である。

【００６０】

以下は代表的な非限定的ハイブリダイゼーション条件である。

【００６１】

高いストリンジェンシー条件（少なくとも９０％の配列同一性を共有する配列を検出する）：５ｘＳＳＣ、０．１％ＳＤＳの緩衝液中で、６５℃、１６時間のハイブリダイゼーション；２ｘＳＳＣ、０．１％ＳＤＳの緩衝液中で、室温で各々１５分間の洗浄を２回；及び０．５ｘＳＳＣ、０．１％ＳＤＳの緩衝液中で、６５℃で各々２０分の洗浄を２回。

【００６２】

中程度のストリンジェンシー条件（少なくとも８０％の配列同一性を共有する配列を検出する）：５ｘ～６ｘＳＳＣ、０．１％ＳＤＳの緩衝液中で、６５℃～７０℃、１６～２０時間のハイブリダイゼーション；２ｘＳＳＣ、０．１％ＳＤＳの緩衝液中で、室温で各々５～２０分間の洗浄を２回；及び１ｘＳＳＣ、０．１％ＳＤＳの緩衝液中で、５５℃～７０℃で各々３０分の洗浄を２回。

【００６３】

非ストリンジェントな対照条件（少なくとも５０％の配列同一性を共有する配列がハイブリダイズする）：６ｘＳＳＣ、０．１％ＳＤＳの緩衝液中で、室温～５５℃、１６～２０時間のハイブリダイゼーション；２ｘ～３ｘＳＳＣ、０．１％ＳＤＳの緩衝液中で、室温～５５℃で各々２０～３０分間の洗浄を少なくとも２回。

【００６４】

本明細書において使用される場合、「実質的に相同」又は「実質的な相同性」という用語は、連続した核酸配列に関する場合、ストリンジェントな条件下で、参照核酸配列にハ

イブリダイズする連続したヌクレオチド配列を指す。例えば、配列番号９、配列番号１０、配列番号１１、配列番号１２、配列番号１３、配列番号１４、配列番号１５及び配列番号１６の参照核酸配列と実質的に相同である核酸配列は、ストリンジェントな条件下（例えば、上記で述べた中程度のストリンジェンシー条件）で、配列番号９、配列番号１０、配列番号１１、配列番号１２、配列番号１３、配列番号１４、配列番号１５及び配列番号１６の参照核酸配列にハイブリダイズするそれら核酸配列である。実質的に相同な配列は、少なくとも８０％の配列同一性を有していてもよい。例えば、実質的に相同な配列は、約８０％～１００％の配列同一性を有していてもよく、例えば約８１％、約８２％、約８３％、約８４％、約８５％、約８６％、約８７％、約８８％、約８９％、約９０％、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、約９８．５％、約９９％、約９９．５％、及び約１００％の配列同一性を有していてもよい。実質的な相同性の特性は、特異的ハイブリダイゼーションに密接に関係している。例えば、特異的結合が望ましい条件下、例えばストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、核酸の非標的配列への非特異的結合を回避するのに充分な程度の相補性がある場合、核酸分子は特異的にはハイブリダイズ可能である。

【００６５】

本明細書において使用される場合、「オルソログ」という用語は、共通の先祖ヌクレオチド配列から進化した、２個以上の種の遺伝子を指し、当該２個以上の種において同じ機能を保持している場合がある。

【００６６】

本明細書において使用される場合、５’から３’の方向で読まれた配列の各ヌクレオチドが、３’から５’の方向で読まれたときに、他の配列の各ヌクレオチドに対し相補的である場合、２つの核酸配列分子は、「完全な相補性」を示すと言われる。参照ヌクレオチド配列に対し完全に相補的なヌクレオチド配列は、参照ヌクレオチド配列の逆相補配列に対し、配列同一性を示すこととなる。これらの用語及び記載は当分野においてよく定義されており、当分野の当業者には容易に理解される。

【００６７】

アミノ酸配列間の配列同一性の割合を決定する際、アラインメントにより与えられる所与の位置におけるアミノ酸の同一性は、並べられた配列を含むポリペプチドの所望の特性に影響することなく変化し得る、ということが、当業者には周知である。これらの例において、配列同一性の割合は、保存的置換アミノ酸の間での類似性を考慮して調節することができる。これら調節は、周知であり、当業者に通常用いられるものである。例えば、Myers及びMiller (1988)、Computer Applications in Biosciences 4:11-7を参照のこと。

【００６８】

このように、この発明の実施形態には、例示的な色素体輸送ペプチドのアミノ酸配列の機能性変異体及びそれをコードする核酸配列が含まれる。例示的な輸送ペプチド配列の機能性変異体は、例えば、例示的な輸送ペプチドのアミノ酸配列の断片（例えばＮ末端又はＣ末端の断片）又は例示的な輸送ペプチドのアミノ酸配列の全長の又は例示的な輸送ペプチドのアミノ酸配列の断片の改変配列であり得る。例示的な輸送ペプチドのアミノ酸配列は、一部の実施形態において、１つ又は複数の保存的アミノ酸置換を導入することによって改変することができる。「保存的」アミノ酸置換は、アミノ酸残基を、類似の機能性側鎖、類似の大きさ及び／又は類似の疎水性を有するあるアミノ酸残基と置換するというものである。保存的置換を導入するために、同一群の別のアミノ酸の置換に用いることができるアミノ酸の群が、当該分野において公知である。例えば、これらアミノ酸の群には、以下が含まれる：塩基性アミノ酸（例えば、リジン、アルギニン及びヒスチジン）；酸性アミノ酸（例えば、アスパラギン酸及びグルタミン酸）；無電荷（生理学的なｐＨで）の極性アミノ酸（例えば、グリシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、セリン、トレオニン、チロシン及びシトシン）；非極性アミノ酸（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン及びトリプトファン）；β分岐アミノ酸（例えば、トレオニン、バリン及びイソロイシン）；及び芳香族アミノ酸（例えば

、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン及びヒスチジン）。例えば、Sambrookら（編）、上記参照；及びInnisら、PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, 1990, Academic Press, NY, USA.を参照のこと。

【００６９】

操作可能に連結された：第一のヌクレオチド配列が、第二のヌクレオチド配列と機能的関係性にあるとき、第一のヌクレオチド配列は第二のヌクレオチド配列と「操作可能に連結」されている。例えば、プロモーターが、コード配列の転写又は発現に影響を与える場合、プロモーターは、コード配列と作動可能に連結されている。遺伝子組換的に作製されるとき、操作可能であるように連結されたヌクレオチド配列は概して隣接し、同じ読み枠（オープンリーディングフレーム）の中で２つの蛋白質コード領域を結合する必要性がある。しかしながら、ヌクレオチド配列は、操作可能に連結されるために必ずしも連続ではない。

【００７０】

「操作可能に連結される」という用語は、調節配列及びコード配列に関し使用される場合、当該調節配列が、連結されたコード配列の発現に作用することを意味する。「調節配列」又は「制御性エレメント」とは、関連するコード配列の転写、ＲＮＡのプロセッシングもしくは安定性、又は翻訳のタイミング、及びレベル／量に影響を与えるヌクレオチド配列を指す。調節配列としては、プロモーター、翻訳リーダー配列、イントロン、エンハンサー、ステムループ構造、リプレッサー結合配列、終結配列、ポリアデニル化認識配列などが挙げられる。特定の調節性配列は、自身と作動可能に連結されたコード配列の上流及び／又は下流に位置している場合がある。また、コード配列と作動可能に連結された特定の調節性配列は、二本鎖核酸分子の関連する相補鎖上に位置する場合もある。

【００７１】

プロモーター：本明細書において使用される場合、「プロモーター」という用語は、転写の開始部分から上流にある場合があるＤＮＡの領域、ならびにＲＮＡポリメラーゼ及び転写を開始させる他のタンパク質の認識及び結合に関与する場合があるＤＮＡの領域を指す。プロモーターは、細胞における発現のためにコード配列と作動可能に連結されてもよく、又はプロモーターは、細胞における発現のためにコード配列と作動可能に連結され得るシグナル配列をコードするヌクレオチド配列と作動可能に連結されてもよい。「植物プロモーター」は、植物細胞において転写を開始させることができるプロモーターであってもよい。発生制御下のプロモーターの例としては、例えば葉、根、種、繊維、導管、仮道管、又は厚膜組織などの特定の組織において転写を優先的に開始させるプロモーターが挙げられる。かかるプロモーターは、「組織優先的」と呼称される。特定の組織においてのみ転写を開始させるプロモーターは、「組織特異的」と呼称される。「細胞型特異的」プロモーターは主に、例えば根又は葉の管細胞などの１つ以上の器官の特定の細胞型における発現を誘導する。「誘導性」プロモーターは、環境制御下にあり得るプロモーターである場合がある。誘導性プロモーターによる転写を開始させることができる環境条件の例としては、嫌気的条件、及び光の存在が挙げられる。組織特異的、組織優先的、細胞型特異的、及び誘導性のプロモーターは、「非構造性」プロモーターに分類を構成する。「構造性」プロモーターは、ほとんどの環境条件下で活性であり得るプロモーターである。

【００７２】

任意の誘導性プロモーターを本発明の一部の実施形態に使用することができる。誘導性プロモーターに関しては、Wardら（1993）、Plant Mol. Biol. 22:361-366を参照のこと。誘導性プロモーターにより、転写率は、誘導剤に応じて増加する。例示的な誘導性プロモーターとしては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：銅に反応するＡＣＥＩ系由来のプロモーター；ベンゼンスルホンアミド除草剤緩和剤に反応する、トウモロコシ由来のＩｎ２遺伝子；Ｔｎ１０由来のＴｅｔリプレッサー；及びステロイドホルモン遺伝子由来の誘導性プロモーター。その転写活性は、グルココルチコステロイドホルモンにより誘導され得る（Schenaら（1991）、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:0421）。

【００７３】

例示的な構造性プロモーターとしては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：例えば、ＣａＭＶ由来の３５Ｓプロモーターなどの植物ウイルス由来のプロモーター；イネのアクチン遺伝子由来のプロモーター；ユビキチンプロモーター；ｐＥＭＵ；ＭＡＳ；トウモロコシＨ３ヒストンプロモーター；及びＡＬＳプロモーター、セイヨウアブラナ（Brassica napus）ＡＬＳ３構造遺伝子に対して５’側のＸｂａ１／ＮｃｏＩ断片（又は前記Ｘｂａ１／ＮｃｏＩ断片に類似のヌクレオチド配列）（ＰＣＴ国際公開第ＷＯ９６／３０５３０号）。

【００７４】

さらに、任意の組織特異的プロモーター、又は組織優先的プロモーターを、本発明の一部の実施形態に使用することができる。組織特異的プロモーターと作動可能に連結されたコード配列を含有する核酸分子で形質転換された植物は、特定の組織において限局的に、又は優先的にコード配列の産物を生成することができる。例示的な組織特異的プロモーター又は組織優先的プロモーターとしては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：例えばファセオリン（phaseolin）遺伝子由来のプロモーターなどの根優先的プロモーター；例えばｃａｂ又はｒｕｂｉｓｃｏ由来のプロモーターなどの、葉特異的かつ光誘導性プロモーター；例えばＬＡＴ５２由来のプロモーターなどの葯特異的プロモーター；例えばＺｍ１３由来のプロモーターなどの花粉特異的プロモーター；及び例えばａｐｇ由来のプロモーターなどの小胞子優先的プロモーター。

【００７５】

形質転換：本明細書において使用される場合、「形質転換（transformation）」又は「形質導入（transduction）」という用語は、１つ以上の核酸分子を細胞内へと移送させることを指す。細胞ゲノムへの核酸分子の組み込み、又はエピソーム複製のいずれかによって、核酸分子が細胞により安定的に複製されるようになったとき、細胞内に導入された核酸分子により細胞は「形質転換」されている。本明細書において使用される場合、「形質転換」という用語は、かかる細胞内に核酸分子を導入することができる全ての技術を包含している。例としては限定されないが、以下が挙げられる：ウイルスベクターを用いたトランスフェクション法；プラスミドベクターを用いた形質転換；エレクトロポレーション法（Fromm ら (1986)、Nature 319:791-3）；リポフェクション法（Felgner ら (1987)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7）；マイクロインジェクション法（Mueller ら (1978)、 Cell 15:579-85）；アグロバクテリウム（Agrobacterium）媒介移送（Fraley ら (1983)、 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:4803-7）；直接的なＤＮＡ取り込み；及び微粒子銃（Klein ら (1987)、 Nature 327:70）。

【００７６】

導入遺伝子：外因性核酸配列。いくつかの実施例では、導入遺伝子は、少なくとも１つのＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８の葉緑体輸送ペプチドを含むポリペプチドをコードする配列であり得る。特定の実施例では、導入遺伝子は、少なくとも１つのＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８の葉緑体輸送ペプチドと、色素体発現のために望ましい少なくとも１つの追加のペプチド配列（例えば、除草剤抵抗性を与えるペプチド配列）とを含むポリペプチドをコードすることができる。これら、及び他の例において、導入遺伝子は、当該導入遺伝子のコード配列と作動可能に連結されている制御配列を含有してもよい（例えば、プロモーター）。本開示のため、「トランスジェニック（transgenic）」という用語を用いる。生物体（例えば、植物）に関して用いる場合、外因性核酸配列を含む生物体を指す。一部の実施例では、外因性核酸配列を含む生物体は、分子形質転換技術を介して核酸配列が導入される生物体であり得る。他の実施例では、外因性核酸配列を含む生物体は、例えば植物において遺伝子交雑（introgression）又は異花受粉（cross-pollination）を行うことによって核酸配列が導入された生物体であり得る。

【００７７】

輸送：本明細書で用いる場合、「輸送」、「標的化」及び「移送」という用語は、アミ

ノ酸配列を含むポリペプチドが、宿主細胞の核から該宿主細胞の色素体中に移動することを容易にする、本発明の特定のアミノ酸配列の特性を指す。特定の実施形態では、かかるアミノ酸配列（すなわち、ＣＴＰ）は、このアミノ酸配列を含むポリペプチドの約１００％、少なくとも約９５％、少なくとも約９０％、少なくとも約８５％、少なくとも約８０％、少なくとも約７０％、少なくとも約６０％及び／又は少なくとも約５０％を宿主細胞の色素体中へと輸送することができるものであり得る。

【００７８】

ベクター：核酸分子が細胞に導入されると、例えば形質転換細胞が生成される。ベクターは、例えば複製起源などの、宿主細胞で自身を複製することができるようになる核酸配列を含有してもよい。ベクターの例としては、細胞内に外因性ＤＮＡを運ぶプラスミド、コスミド、バクテリオファージ、又はウイルスが挙げられるがこれらに限定されない。ベクターは、１つ以上の遺伝子、アンチセンス分子、及び／又は選択マーカー遺伝子、ならびに当分野に公知の他の遺伝エレメントを含有してもよい。ベクターが、細胞に形質導入し、形質転換し、又は感染することにより、当該細胞が、ベクターにコードされた核酸分子及び／又は蛋白質を発現してもよい。ベクターは任意で、細胞内への核酸の侵入の実現を補助するための物質を含む（例えば、リポソーム、タンパク質コーティングなど）。

【００７９】

具体的に指示、又は暗示されたことを除き、「ａ」、「ａｎ」、及び「ｔｈｅ」は、本明細書において使用される場合、「少なくとも１つ」を示す。

【００８０】

具体的に別段の説明がなされない限り、本明細書において使用されるすべての技術的用語及び科学的用語は、本開示が属する分野の当業者により通常理解される意味と同じ意味を有する。分子生物学における共通の用語の定義は、例えば、Lewin B.、Genes V、Oxford University Press、1994 (ISBN 0-19-854287-9)；Kendrewら（編）The Encyclopedia of Molecular Biology、Blackwell Science Ltd.、1994 (ISBN 0-632-02182-9)；及びMeyers R.A.（編）、Molecular Biology and Biotechnology：A Comprehensive Desk Reference、VCH Publishers, Inc.、1995（ISBN 1-56081-569-8）で見出すことができる。全ての割合は重量によるものであり、すべての溶媒混合物の比率は、別段の記載がない限り体積によるものである。全ての温度は摂氏である。

【００８１】

ＩＶ．ＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８をコードする配列を含む核酸分子

一部の実施形態で、本開示は、対象とするヌクレオチド配列と作動可能に連結されたＴｒａＰ１０の葉緑体輸送ペプチドをコードする少なくとも１つのヌクレオチド配列を含む核酸分子を提供する。他の実施形態で、本開示は、対象とするヌクレオチド配列と作動可能に連結されたＴｒａＰ１１の葉緑体輸送ペプチドをコードする少なくとも１つのヌクレオチド配列を含む核酸分子を提供する。他の実施形態で、本開示は、対象とするヌクレオチド配列と作動可能に連結されたＴｒａＰ１７の葉緑体輸送ペプチドをコードする少なくとも１つのヌクレオチド配列を含む核酸分子を提供する。他の実施形態で、本開示は、対象とするヌクレオチド配列と作動可能に連結されたＴｒａＰ１８の葉緑体輸送ペプチドをコードする少なくとも１つのヌクレオチド配列を含む核酸分子を提供する。他の実施形態で、本開示は、対象とするヌクレオチド配列と作動可能に連結されたＴｒａＰ１９の葉緑体輸送ペプチドをコードする少なくとも１つのヌクレオチド配列を含む核酸分子を提供する。他の実施形態で、本開示は、対象とするヌクレオチド配列と作動可能に連結されたＴｒａＰ２６の葉緑体輸送ペプチドをコードする少なくとも１つのヌクレオチド配列を含む核酸分子を提供する。他の実施形態で、本開示は、対象とするヌクレオチド配列と作動可能に連結されたＴｒａＰ２７の葉緑体輸送ペプチドをコードする少なくとも１つのヌクレオチド配列を含む核酸分子を提供する。他の実施形態で、本開示は、対象とするヌクレオチド配列と作動可能に連結されたＴｒａＰ２８の葉緑体輸送ペプチドをコードする少なくとも１つのヌクレオチド配列を含む核酸分子を提供する。

【００８２】
特定の実施形態では、対象とするヌクレオチド配列は、対象とするポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であり得る。特定の実施形態では、対象とするポリペプチドのＮ末端にＴｒａＰ１０ペプチド配列が融合しているポリペプチドをコードする、単一の核酸分子を提供する。特定の実施形態では、対象とするポリペプチドのＮ末端にＴｒａＰ１１ペプチド配列が融合しているポリペプチドをコードする、単一の核酸分子を提供する。特定の実施形態では、対象とするポリペプチドのＮ末端にＴｒａＰ１７ペプチド配列が融合しているポリペプチドをコードする、単一の核酸分子を提供する。特定の実施形態では、対象とするポリペプチドのＮ末端にＴｒａＰ１８ペプチド配列が融合しているポリペプチドをコードする、単一の核酸分子を提供する。特定の実施形態では、対象とするポリペプチドのＮ末端にＴｒａＰ１９ペプチド配列が融合しているポリペプチドをコードする、単一の核酸分子を提供する。特定の実施形態では、対象とするポリペプチドのＮ末端にＴｒａＰ２６ペプチド配列が融合しているポリペプチドをコードする、単一の核酸分子を提供する。特定の実施形態では、対象とするポリペプチドのＮ末端にＴｒａＰ２７ペプチド配列が融合しているポリペプチドをコードする、単一の核酸分子を提供する。特定の実施形態では、対象とするポリペプチドのＮ末端にＴｒａＰ２８ペプチド配列が融合しているポリペプチドをコードする、単一の核酸分子を提供する。

【００８３】
この発明の一部の実施形態で提供される核酸分子においては、ＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８の葉緑体輸送ペプチドをコードするヌクレオチド配列の最後のコドンと、対象とするヌクレオチド配列の最初のコドンとを、例えば、「終止」コドンをコードすることなく、任意の数のヌクレオチドのトリプレットによって離間させることができる。いくつかの実施例では、天然の前駆体ポリペプチドにおいて、輸送ペプチドを通常伴う成熟タンパク質の第１のアミノ酸をコードする配列が、ＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８の葉緑体輸送ペプチドをコードするヌクレオチド配列の最後のコドンと、対象とするヌクレオチド配列の最初のコドンとの間に存在し得る。ＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８の葉緑体輸送ペプチドをコードするヌクレオチド配列と、対象とするヌクレオチド配列の第１のコドンとを離間させる配列は、例えば、コードされたアミノ酸配列がキメラポリペプチドの翻訳及びその色素体への移動を大幅に変化させる可能性が低くなるように、任意の配列で構成することができる。これら実施形態及びさらなる実施形態では、ＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８の葉緑体輸送ペプチドをコードするヌクレオチド配列の最後のコドンを、直接隣接させるか、又は例えば合成ヌクレオチドリンカー（例えば、融合を達成するために用いられ得るヌクレオチドリンカー）によってコードされる短いペプチド配列で離間するようにして、対象とするヌクレオチド配列の最初のコドンと同位相の配列（in phase-register）で融合させ得る。

【００８４】
一部の実施形態では、例えば特定の宿主でのコード配列の発現を高めるために、単一のコード配列において、対象とするヌクレオチド配列のヌクレオチド及び／又はそれに融合されるＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８をコードする配列を修飾することが望ましい場合もある。遺伝暗号は、可能性のある６４のコドンで重複するが、大半の生物体は、これらコドンのサブセットを優先的に用いる。ある種において最も多くの場合に用いられるコドンは、最適コドンと呼ばれ、それほど頻繁に使用されないコドンは、レアコドン又は低頻度コドンとして分類される。Zhangら（1991）、Gene 105:61-72。コドンは、「コドン最適化」と称されることもあるプロセスにおいて、特定の宿主の好ましいコドンの使用頻度を反映するために置換され得る。原核細胞又は真核細胞の特定の宿主に好ましいコドン

を含有する、最適化されたコード配列は、例えば翻訳の速度を上げるか、又は所望の特性（例えば、非最適化配列から生じた転写と比べて半減期が長い）を有する組換えＲＮＡ転写を生じさせるように、調整することができる。

【００８５】

一部の実施形態には、ＴｒａＰ１０の機能性変異体が含まれる。ＴｒａＰ１０の機能性変異体には、例えば、限定するものではないが、配列番号１として表されるＴｒａＰ１０の相同体及びオルソログ；配列番号１内に隣接アミノ酸配列を含むものである葉緑体輸送ペプチド；切断ＴｒａＰ１０ペプチド；配列番号１内に隣接アミノ酸配列を含むものであるより長い葉緑体輸送ペプチド；１つ又は複数の保存的アミノ酸置換を有するものである、配列番号１内に隣接アミノ酸配列を含む葉緑体輸送ペプチド；及び操作可能に連結したペプチドを色素体含有細胞における色素体に向かわせることが実証されている１つ又は複数の非保存的アミノ酸置換を有するものである、配列番号１内に隣接アミノ酸配列を含む葉緑体輸送ペプチドが挙げられる。

【００８６】

一部の実施形態には、ＴｒａＰ１１の機能性変異体が含まれる。ＴｒａＰ１１の機能性変異体には、例えば、限定するものではなく、配列番号２として表されるＴｒａＰ１１の相同体及びオルソログ；配列番号２内に隣接アミノ酸配列を含むものである葉緑体輸送ペプチド；切断ＴｒａＰ１１ペプチド；配列番号２内に隣接アミノ酸配列を含むものであるより長い葉緑体輸送ペプチド；１つ又は複数の保存的アミノ酸置換を有するものである、配列番号２内に隣接アミノ酸配列を含む葉緑体輸送ペプチド；及び操作可能に連結したペプチドを色素体含有細胞における色素体に向かわせることが実証されている１つ又は複数の非保存的アミノ酸置換を有するものである、配列番号２内に隣接アミノ酸配列を含む葉緑体輸送ペプチドが含まれる。

【００８７】

一部の実施形態には、ＴｒａＰ１７の機能性変異体が含まれる。ＴｒａＰ１７の機能性変異体には、例えば、限定するものではなく、配列番号３として表されるＴｒａＰ１７の相同体及びオルソログ；配列番号３内に隣接アミノ酸配列を含むものである葉緑体輸送ペプチド；切断ＴｒａＰ１７ペプチド；配列番号３内に隣接アミノ酸配列を含むものであるより長い葉緑体輸送ペプチド；１つ又は複数の保存的アミノ酸置換を有するものである、配列番号３内に隣接アミノ酸配列を含む葉緑体輸送ペプチド；及び操作可能に連結したペプチドを色素体含有細胞における色素体に向かわせることが実証されている１つ又は複数の非保存的アミノ酸置換を有するものである、配列番号３内に隣接アミノ酸配列を含む葉緑体輸送ペプチドが含まれる。

【００８８】

一部の実施形態には、ＴｒａＰ１８の機能性変異体が含まれる。ＴｒａＰ１８の機能性変異体には、例えば、限定するものではなく、配列番号４として表されるＴｒａＰ１８の相同体及びオルソログ；配列番号４内に隣接アミノ酸配列を含むものである葉緑体輸送ペプチド；切断ＴｒａＰ１８ペプチド；配列番号４内に隣接アミノ酸配列を含むものであるより長い葉緑体輸送ペプチド；１つ又は複数の保存的アミノ酸置換を有するものである、配列番号４内に隣接アミノ酸配列を含む葉緑体輸送ペプチド；及び操作可能に連結したペプチドを色素体含有細胞における色素体に向かわせることが実証されている１つ又は複数の非保存的アミノ酸置換を有するものである、配列番号４内に隣接アミノ酸配列を含む葉緑体輸送ペプチドが含まれる。

【００８９】

一部の実施形態には、ＴｒａＰ１９の機能性変異体が含まれる。ＴｒａＰ１９の機能性変異体には、例えば、限定するものではなく、配列番号５として表されるＴｒａＰ１９の相同体及びオルソログ；配列番号５内に隣接アミノ酸配列を含むものである葉緑体輸送ペプチド；切断ＴｒａＰ１９ペプチド；配列番号５内に隣接アミノ酸配列を含むものであるより長い葉緑体輸送ペプチド；１つ又は複数の保存的アミノ酸置換を有するものである、配列番号５内に隣接アミノ酸配列を含む葉緑体輸送ペプチド；及び操作可能に連結したペ

プチドを色素体含有細胞における色素体に向かわせることが実証されている１つ又は複数の非保存的アミノ酸置換を有するものである、配列番号５内に隣接アミノ酸配列を含む葉緑体輸送ペプチドが含まれる。

【００９０】

一部の実施形態には、ＴｒａＰ２６の機能性変異体が含まれる。ＴｒａＰ２６の機能性変異体には、例えば、限定するものではなく、配列番号６として表されるＴｒａＰ２６の相同体及びオルソログ；配列番号６内に隣接アミノ酸配列を含むものである葉緑体輸送ペプチド；切断ＴｒａＰ２６ペプチド；配列番号６内に隣接アミノ酸配列を含むものであるより長い葉緑体輸送ペプチド；１つ又は複数の保存的アミノ酸置換を有するものである、配列番号６内に隣接アミノ酸配列を含む葉緑体輸送ペプチド；及び操作可能に連結したペプチドを色素体含有細胞における色素体に向かわせることが実証されている１つ又は複数の非保存的アミノ酸置換を有するものである、配列番号６内に隣接アミノ酸配列を含む葉緑体輸送ペプチドが含まれる。

【００９１】

一部の実施形態には、ＴｒａＰ２７の機能性変異体が含まれる。ＴｒａＰ２７の機能性変異体には、例えば、限定するものではなく、配列番号７として表されるＴｒａＰ２７の相同体及びオルソログ；配列番号７内に隣接アミノ酸配列を含むものである葉緑体輸送ペプチド；切断ＴｒａＰ２７ペプチド；配列番号７内に隣接アミノ酸配列を含むものであるより長い葉緑体輸送ペプチド；１つ又は複数の保存的アミノ酸置換を有するものである、配列番号７内に隣接アミノ酸配列を含む葉緑体輸送ペプチド；及び操作可能に連結したペプチドを色素体含有細胞における色素体に向かわせることが実証されている１つ又は複数の非保存的アミノ酸置換を有するものである、配列番号７内に隣接アミノ酸配列を含む葉緑体輸送ペプチドが含まれる。

【００９２】

一部の実施形態には、ＴｒａＰ２８の機能性変異体が含まれる。ＴｒａＰ２８の機能性変異体には、例えば、限定するものではなく、配列番号８として表されるＴｒａＰ２８の相同体及びオルソログ；配列番号８内に隣接アミノ酸配列を含むものである葉緑体輸送ペプチド；切断ＴｒａＰ２８ペプチド；配列番号８内に隣接アミノ酸配列を含むものであるより長い葉緑体輸送ペプチド；１つ又は複数の保存的アミノ酸置換を有するものである、配列番号８内に隣接アミノ酸配列を含む葉緑体輸送ペプチド；及び操作可能に連結したペプチドを色素体含有細胞における色素体に向かわせることが実証されている１つ又は複数の非保存的アミノ酸置換を有するものである、配列番号８内に隣接アミノ酸配列を含む葉緑体輸送ペプチドが含まれる。

【００９３】

この発明の一部の実施形態にはまた、ＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８のペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子が含まれる。かかる核酸分子は、例えば、ＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８をコードする配列の分子生物学技術上の操作を容易にするのに有用であり得る。例えば、一部の実施形態では、ＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８をコードする配列は、発現ベクターへの該配列のサブクローニングに好適なベクターに導入され得るか、又はＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８をコードする配列は、対象とするヌクレオチド配列と作動可能に連結されたＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８をコードする配列を含むさらなる核酸分子の生成を容易にする核酸分子に導入され得る。

【００９４】

特定の実施例では、ＴｒａＰ１０ペプチドは、７２アミノ酸長以下である。例えば、ＴｒａＰ１０ペプチドは、７２、７１、７０、６９、６８、６７、６６、６５、６４、６３

、６２以下のアミノ酸長であってよい。或る実施例では、ＴｒａＰ１０ペプチドは、配列番号１で表されるアミノ酸配列又はその機能性変異体を含む。したがって、ＴｒａＰ１０ペプチドは、配列番号１を含むアミノ酸配列又はその機能性変異体を含むものであり得、ＴｒａＰ１０ペプチド又はその機能性変異体の長さは、７２アミノ酸長以下である。或る実施例では、ＴｒａＰ１０ペプチド又はその機能性変異体は、例えば、配列番号１に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９２％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含み得る。

【００９５】

当業者によれば、例えば、配列番号１のＴｒａＰ１０ペプチド又は配列番号１の配列全体未満であるその機能性変異体をコードするヌクレオチド配列の全てを、直ちに認識できるであろう。遺伝暗号の縮重により、特定のアミノ酸配列に有限数のコード配列がもたらされる。ＴｒａＰ１０ペプチドをコードする特定の配列は、実行者の裁量の範囲で選択される。異なる用途には、異なるコード配列が望ましいものであり得る。例えば、特定の宿主においてＴｒａＰ１０ペプチドの発現を増加させるために、宿主のコドン使用頻度のバイアスを反映するコード配列を選択することができる。例として、ＴｒａＰ１０ペプチドは、配列番号９で表されるヌクレオチド配列によってコードすることができる。

【００９６】

特定の実施例では、ＴｒａＰ１１ペプチドは、６８アミノ酸長以下である。例えば、ＴｒａＰ１１ペプチドは、６８、６７、６６、６５、６４、６３、６２、６１、６０、５９以下のアミノ酸長であってよい。或る実施例では、ＴｒａＰ１１ペプチドは、配列番号２で表されるアミノ酸配列又はその機能性変異体を含む。したがって、ＴｒａＰ１１ペプチドは、配列番号２を含むアミノ酸配列又はその機能性変異体を含むものであり得、ＴｒａＰ１１ペプチド又はその機能性変異体の長さは、６８アミノ酸長以下である。或る実施例では、ＴｒａＰ１１ペプチド又はその機能性変異体は、例えば、配列番号２に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９２％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含み得る。

【００９７】

当業者によれば、例えば、配列番号２のＴｒａＰ１１ペプチド又は配列番号２の配列全体未満であるその機能性変異体をコードするヌクレオチド配列の全てを、直ちに認識できるであろう。遺伝暗号の縮重により、特定のアミノ酸配列の有限数のコード配列がもたらされる。ＴｒａＰ１１ペプチドをコードする特定の配列は、実行者の裁量の範囲で選択される。異なる用途には、異なるコード配列が望ましいものであり得る。例えば、特定の宿主においてＴｒａＰ１１ペプチドの発現を増加させるために、宿主のコドン使用頻度のバイアスを反映するコード配列を選択することができる。例として、ＴｒａＰ１１ペプチドは、配列番号１０で表されるヌクレオチド配列によってコードすることができる。

【００９８】

特定の実施例では、ＴｒａＰ１７ペプチドは、６６アミノ酸長以下である。例えば、ＴｒａＰ１７ペプチドは、６６、６５、６４、６３、６２、６１、６０、５９、５８以下のアミノ酸長であってよい。或る実施例では、ＴｒａＰ１７ペプチドは、配列番号３で表されるアミノ酸配列又はその機能性変異体を含む。したがって、ＴｒａＰ１７ペプチドは、配列番号３を含むアミノ酸配列又はその機能性変異体を含むものであり得、ＴｒａＰ１７ペプチド又はその機能性変異体の長さは、６６アミノ酸長以下である。或る実施例では、ＴｒａＰ１７ペプチド又はその機能性変異体は、例えば、配列番号３に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９２％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含み得る。

【００９９】

当業者によれば、例えば、配列番号３のＴｒａＰ１７ペプチド又は配列番号３の配列全

体未満であるその機能性変異体をコードするヌクレオチド配列の全てを、直ちに認識できるであろう。遺伝暗号の縮重により、特定のアミノ酸配列の有限数のコード配列がもたらされる。ＴｒａＰ１７ペプチドをコードする特定の配列は、実行者の裁量の範囲で選択される。異なる用途には、異なるコード配列が望ましいものであり得る。例えば、特定の宿主においてＴｒａＰ１７ペプチドの発現を増加させるために、宿主のコドン使用頻度のバイアスを反映するコード配列を選択することができる。例として、ＴｒａＰ１７ペプチドは、配列番号１１で表されるヌクレオチド配列によってコードすることができる。

【０１００】

特定の実施例では、ＴｒａＰ１８ペプチドは、６７アミノ酸長以下である。例えば、ＴｒａＰ１８ペプチドは、６７、６６、６５、６４、６３、６２、６１、６０、５９以下のアミノ酸長であってよい。或る実施例では、ＴｒａＰ１８ペプチドは、配列番号４で表されるアミノ酸配列又はその機能性変異体を含む。したがって、ＴｒａＰ１８ペプチドは、配列番号４を含むアミノ酸配列又はその機能性変異体を含むものであり得、ＴｒａＰ１８ペプチド又はその機能性変異体の長さは、６７アミノ酸長以下である。或る実施例では、ＴｒａＰ１８ペプチド又はその機能性変異体は、例えば、配列番号４に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９２％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含み得る。

【０１０１】

当業者によれば、例えば、配列番号４のＴｒａＰ１８ペプチド、又は配列番号４の配列全体未満であるその機能性変異体をコードするヌクレオチド配列の全てを、直ちに認識できるであろう。遺伝暗号の縮重により、特定のアミノ酸配列の有限数のコード配列がもたらされる。ＴｒａＰ１８ペプチドをコードする特定の配列は、実行者の裁量の範囲で選択される。異なる用途には、異なるコード配列が望ましいものであり得る。例えば、特定の宿主においてＴｒａＰ１８ペプチドの発現を増加させるために、宿主のコドン使用頻度のバイアスを反映するコード配列を選択することができる。例として、ＴｒａＰ１８ペプチドは、配列番号１２で表されるヌクレオチド配列によってコードすることができる。

【０１０２】

特定の実施例では、ＴｒａＰ１９ペプチドは、６７アミノ酸長以下である。例えば、ＴｒａＰ１９ペプチドは、６７、６６、６５、６４、６３、６２、６１、６０、５９以下のアミノ酸長であってよい。或る実施例では、ＴｒａＰ１９ペプチドは、配列番号５で表されるアミノ酸配列又はその機能性変異体を含む。したがって、ＴｒａＰ１９ペプチドは、配列番号５を含むアミノ酸配列又はその機能性変異体を含むものであり得、ＴｒａＰ１９ペプチド又はその機能性変異体の長さは、６７アミノ酸長以下である。或る実施例では、ＴｒａＰ１９ペプチド又はその機能性変異体は、例えば、配列番号５に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９２％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含み得る。

【０１０３】

当業者によれば、例えば、配列番号５のＴｒａＰ１９ペプチド又は配列番号５の配列全体未満であるその機能性変異体をコードするヌクレオチド配列の全てを、直ちに認識できるであろう。遺伝暗号の縮重により、特定のアミノ酸配列の有限数のコード配列がもたらされる。ＴｒａＰ１９ペプチドをコードする特定の配列は、実行者の裁量の範囲で選択される。異なる用途には、異なるコード配列が望ましいものであり得る。例えば、特定の宿主においてＴｒａＰ１９ペプチドの発現を増加させるために、宿主のコドン使用頻度のバイアスを反映するコード配列を選択することができる。例として、ＴｒａＰ１９ペプチドは、配列番号１３で表されるヌクレオチド配列によってコードすることができる。

【０１０４】

特定の実施例では、ＴｒａＰ２６ペプチドは、６０アミノ酸長以下である。例えば、ＴｒａＰ２６ペプチドは、６０、５９、５８、５７、５６、５５、５４、５３、５２、５１

以下のアミノ酸長であってよい。或る実施例では、ＴｒａＰ２６ペプチドは、配列番号６で表されるアミノ酸配列又はその機能性変異体を含む。したがって、ＴｒａＰ２６ペプチドは、配列番号６を含むアミノ酸配列又はその機能性変異体を含むものであり得、ＴｒａＰ２６ペプチド又はその機能性変異体の長さは、６０アミノ酸長以下である。或る実施例では、ＴｒａＰ２６ペプチド又はその機能性変異体は、例えば、配列番号６に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９２％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含み得る。

【０１０５】

当業者によれば、例えば、配列番号６のＴｒａＰ２６ペプチド又は配列番号６の配列全体未満であるその機能性変異体をコードするヌクレオチド配列の全てを、直ちに認識できるであろう。遺伝暗号の縮重により、特定のアミノ酸配列の有限数のコード配列がもたらされる。ＴｒａＰ２６ペプチドをコードする特定の配列は、実行者の裁量の範囲で選択される。異なる用途には、異なるコード配列が望ましいものであり得る。例えば、特定の宿主においてＴｒａＰ２６ペプチドの発現を増加させるために、宿主のコドン使用頻度のバイアスを反映するコード配列を選択することができる。例として、ＴｒａＰ２６ペプチドは、配列番号１４で表されるヌクレオチド配列によってコードすることができる。

【０１０６】

特定の実施例では、ＴｒａＰ２７ペプチドは、６１アミノ酸長以下である。例えば、ＴｒａＰ２７ペプチドは、６１、６０、５９、５８、５７、５６、５５、５４以下のアミノ酸長であってよい。或る実施例では、ＴｒａＰ２７ペプチドは、配列番号７で表されるアミノ酸配列又はその機能性変異体を含む。したがって、ＴｒａＰ２７ペプチドは、配列番号７を含むアミノ酸配列又はその機能性変異体を含むものであり得、ＴｒａＰ２７ペプチド又はその機能性変異体の長さは、６１アミノ酸長以下である。或る実施例では、ＴｒａＰ２７ペプチド又はその機能性変異体は、例えば、配列番号７に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９２％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含み得る。

【０１０７】

当業者によれば、例えば、配列番号７のＴｒａＰ２７ペプチド又は配列番号７の配列全体未満であるその機能性変異体をコードするヌクレオチド配列の全てを、直ちに認識できるであろう。遺伝暗号の縮重により、特定のアミノ酸配列の有限数のコード配列がもたらされる。ＴｒａＰ２７ペプチドをコードする特定の配列は、実行者の裁量の範囲で選択される。異なる用途には、異なるコード配列が望ましいものであり得る。例えば、特定の宿主においてＴｒａＰ２７ペプチドの発現を増加させるために、宿主のコドン使用頻度のバイアスを反映するコード配列を選択することができる。例として、ＴｒａＰ２７ペプチドは、配列番号１５で表されるヌクレオチド配列によってコードすることができる。

【０１０８】

特定の実施例では、ＴｒａＰ２８ペプチドは、６０アミノ酸長以下である。例えば、ＴｒａＰ２８ペプチドは、６０、５９、５８、５７、５６、５５、５４、５３、５２、５１以下のアミノ酸長であってよい。或る実施例では、ＴｒａＰ２８ペプチドは、配列番号８で表されるアミノ酸配列又はその機能性変異体を含む。したがって、ＴｒａＰ２８ペプチドは、配列番号８を含むアミノ酸配列又はその機能性変異体を含むものであり得、ＴｒａＰ２８ペプチド又はその機能性変異体の長さは、６０アミノ酸長以下である。或る実施例では、ＴｒａＰ２８ペプチド又はその機能性変異体は、例えば、配列番号８に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９２％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含み得る。

【０１０９】

当業者によれば、例えば、配列番号８のＴｒａＰ２８ペプチド又は配列番号８の配列全

体未満であるその機能性変異体をコードするヌクレオチド配列の全てを、直ちに認識できるであろう。遺伝暗号の縮重により、特定のアミノ酸配列の有限数のコード配列がもたらされる。ＴｒａＰ２８ペプチドをコードする特定の配列は、実行者の裁量の範囲で選択される。異なる用途には、異なるコード配列が望ましいものであり得る。例えば、特定の宿主においてＴｒａＰ２８ペプチドの発現を増加させるために、宿主のコドン使用頻度のバイアスを反映するコード配列を選択することができる。例として、ＴｒａＰ２８ペプチドは、配列番号１６で表されるヌクレオチド配列によってコードすることができる。

【０１１０】

ＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８のペプチド配列の組み込みによって、色素体含有細胞の色素体に対して任意のポリペプチドを標的化することができる。例えば、一部の実施形態では、ポリペプチドをＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８のペプチド配列に連結してよいものであるが、連結されるポリペプチドとＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８との分子が発現される細胞内の色素体に対して、該ポリペプチドを向かわせるようにする。特定の実施形態では、ＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８の配列の組み込みによって色素体に標的化されたポリペプチドは、例えば、該ポリペプチドが自然に発現される細胞の色素体内で通常発現するポリペプチドであり得る。例えば、限定するものではなく、ＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８の配列の組み込みによって色素体に標的化されたポリペプチドは、除草剤抵抗性、ウイルス抵抗性、病原性微生物抵抗性、昆虫抵抗性、線虫抵抗性又はカビ抵抗性に関与するポリペプチドとすることができる。例えば、米国特許第５，５６９，８２３号、第５，３０４，７３０号、第５，４９５，０７１号、第６，３２９，５０４号及び第６，３３７，４３１号を参照されたい。あるいは、ＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８の配列の組み込みによって色素体に標的化されたポリペプチドは、例えば、限定するものではなく、草勢又は収穫量に関与するポリペプチド（極端な温度、土壌状態、光量、水量、窒素量及び化学的環境に対する耐性に関与するポリペプチドを含む）であるか、又は対象とする形質を含む植物を特定するマーカーとして用いることができるポリペプチド（例えば、選択マーカー遺伝子産物、種子色に関与するポリペプチド等）であってよい。

【０１１１】

この発明の一部の実施形態における、ＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８のペプチド配列に連結できる除草剤抵抗性に関与するポリペプチドの非限定的な例としては、アセトラクターゼシンターゼ（ＡＬＳ）、変異型ＡＬＳ及びＡＬＳ前駆体（例えば米国特許第５，０１３，６５９号参照）；ＥＰＳＰＳ（例えば米国特許第４，９７１，９０８号及び第６，２２５，１１４号参照）であって、例えば一部の実施形態においてはＤＧＴ－２８又はクラスＩＶのＥＰＳＰＳ、又は他の実施形態においてはＣＰ４　ＥＰＳＰＳ又はクラスＩＩのＥＰＳＰＳ；色素体において生じる、光合成及び脂肪酸、アミノ酸、油脂、アロテノイド（ａｒｏｔｅｎｏｉｄ）、テルペノイド、デンプン等の合成を含む生理学的なプロセスを改変する酵素が挙げられる。特定の実施形態における、ＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８のペプチドに連結できるポリペプチドの他の非限定的な例としては、ゼアキサンチンエポキシダーゼ；コリンモノオキシゲナーゼ；フェロケラターゼ；オメガ３脂肪酸デサチュラーゼ；グルタミンシンセターゼ；デンプンを修飾する酵素；必須アミノ酸、プロビタミンＡ、ホルモン、Ｂｔトキシンタンパク質等の合成に関与するポリペプチドが挙げられる。先述したペプチドをコードするヌクレオチド配列は、この分野で利用可能であり、かかるヌクレオチド配列は、ＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１

８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８のペプチドをコードするヌクレオチド配列と作動可能に連結され得、ＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８のペプチドに連結された対象とするポリペプチドを含んだポリペプチドに対して発現される。また、当業者によれば、先述したポリペプチドのいずれかをコードする追加のヌクレオチド配列を、特定することができる（例えば、特定のポリペプチドをコードする他の遺伝子に対して高い相同性をもつ遺伝子のクローニングによって）。かかるヌクレオチド配列が特定されれば、特定したヌクレオチド配列と作動可能に連結されるＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７もしくはＴｒａＰ２８をコードする配列を含んだ第２のヌクレオチド配列又は同等のポリペプチドをコードする配列を設計することができる。

【０１１２】

Ｖ．　ＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８の葉緑体輸送ペプチドを含むポリペプチドの発現

一部の実施形態では、少なくとも１つのＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８の葉緑体輸送ペプチドを含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む少なくとも１つの核酸分子が、細胞、組織又は生物体に対して、その内部でポリペプチドを発現させるために導入され得る。特定の実施形態では、核酸分子が、ＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８の葉緑体輸送ペプチドをコードするヌクレオチド配列と作動可能に連結される、対象とするヌクレオチド配列を含み得る。例えば、核酸分子は、少なくとも１つのＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８の葉緑体輸送ペプチドと、対象とするヌクレオチド配列によってコードされる少なくとも１つの追加のペプチド配列とを含むポリペプチドをコードするコード配列を含み得る。一部の実施形態では、この発明の核酸分子を、色素体含有の宿主細胞、組織又は生物体（例えば、植物細胞、植物組織及び植物）に導入することができるため、ポリペプチドを、色素体含有の宿主細胞、組織又は生物体内で核酸分子から発現することができるものであって、該発現したポリペプチドは、ＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８の葉緑体輸送ペプチドと、対象とするヌクレオチド配列によってコードされる少なくとも１つの追加のペプチド配列とを含む。或る実施例では、かかる発現ポリペプチドのＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８の葉緑体輸送ペプチドが、宿主細胞、組織又は生物体の色素体に対する少なくとも１つの追加のペプチド配列を含むポリペプチドの一部の標的化を容易にし得る。

【０１１３】

一部の実施形態では、当業者に公知の方法論のいずれかひとつによって、この発明の核酸分子を色素体含有細胞に導入することができる。特定の実施形態では、核酸分子を細胞、組織又は生物体に導入するために、宿主細胞、組織又は生物体を、この発明の核酸分子と接触させることができる。特定の実施形態では、核酸分子を細胞に導入して、該核酸分子が該細胞のゲノムに安定的に組み込まれるように、細胞を、この発明の核酸分子により形質転換することができる。一部の実施形態では、対象とするヌクレオチド配列と作動可能に連結されたＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８の葉緑体輸送ペプチドをコードする少なくとも１つのヌクレオチド配列を含む核酸分子を、例えば色素体含有細胞（例えば、植物細胞）である細胞の形質転換に用いることができる。発現を開始させる又は高めるために、核酸分子は、１つ又は複数の調節配列を含むことができ、該調節配列は、少なくとも１つのＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、Ｔｒ

ａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８の葉緑体輸送ペプチドを含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と作動可能に連結され得る。

【０１１４】

例えば核酸分子は、例えば線形又は閉環状プラスミドを含むベクター系であり得る。特定の実施形態では、ベクターは、発現ベクターであり得る。この発明の核酸配列は、該核酸配列が１つ又は複数の調節配列と作動可能に連結されるように、例えばベクターに対して挿入され得る。この目的に対して多くのベクターが利用可能であり、特定のベクターの選択は、例えば、ベクターへと挿入される核酸のサイズ、及びベクターで形質転換される特定の宿主細胞に依存し得る。ベクターは典型的に様々な成分を含有しており、その同一性は、そのベクターの機能（例えば、ＤＮＡ増幅又はＤＮＡ発現）、及び該ベクターと適合性のある特定の宿主細胞に依存する。

【０１１５】

一部の実施形態には、少なくとも１つのＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８の葉緑体輸送ペプチドを含むポリペプチドをコードする１つ又は複数のヌクレオチド配列と作動可能に連結された、上記に記載した調節配列のうちの少なくとも１つを含むヌクレオチド配列を含むものである、植物形質転換ベクターが含まれ得る。該１つ又は複数のヌクレオチド配列は、調節配列の制御下で、植物細胞、組織又は生物体内で発現されて、植物細胞、組織又は生物体の色素体に対して、ポリペプチドの少なくとも一部を標的化するＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８の葉緑体輸送ペプチドを含むポリペプチドを生成し得る。

【０１１６】

一部の実施形態では、少なくとも１つのＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８の葉緑体輸送ペプチドを含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と作動可能に連結される調節配列は、例えば核酸分子が増幅されるものであるバクテリア細胞や核酸分子が発現されるものである植物細胞などである宿主細胞内で機能するプロモーター配列であり得る。本発明の核酸分子における使用に適したプロモーターとしては、誘導性、ウイルス性、合成、又は構造性のプロモーターが挙げられ、それらはすべて当分野に公知である。本発明の実施形態で有用であり得るプロモーターの非限定的な例を、以下で与える：米国特許第６，４３７，２１７号（トウモロコシＲＳ８１プロモーター）；米国特許第５，６４１，８７６号（イネアクチンプロモーター）；米国特許第６，４２６，４４６号（トウモロコシＲＳ３２４プロモーター）；米国特許第６，４２９，３６２号（トウモロコシＰＲ－１プロモーター）；米国特許第６，２３２，５２６号（トウモロコシＡ３プロモーター）；米国特許第６，１７７，６１１号（構造性トウモロコシプロモーター）；米国特許第５，３２２，９３８号、第５，３５２，６０５号、第５，３５９，１４２号、及び第５，５３０，１９６号（３５Ｓプロモーター）；米国特許第６，４３３，２５２号（トウモロコシＬ３オレオシンプロモーター）；米国特許第６，４２９，３５７号（イネアクチン２プロモーター、及びイネアクチン２イントロン）；米国特許第６，２９４，７１４号（光誘導性プロモーター）；米国特許第６，１４０，０７８号（塩誘導性プロモーター）；米国特許第６，２５２，１３８号（病原体誘導性プロモーター）；米国特許第６，１７５，０６０号（リン欠乏誘導性プロモーター）；米国特許第６，３８８，１７０号（二方向性プロモーター）；米国特許第６，６３５，８０６号（ガンマ－コイキシン（ｃｏｉｘｉｎ）プロモーター）；及び米国特許出願第０９／７５７，０８９号（トウモロコシ葉緑体アルドラーゼプロモーター）。

【０１１７】

追加の例示的なプロモーターとしては、ノパリンシンターゼ（ＮＯＳ）プロモーター（Ebertら(1987), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84(16):5745-9）；オクトピンシンターゼ（OCS）プロモーター（アグロバクテリウム・ツメファシエンス（Agrobacterium tumefaciens）の腫瘍誘導性プラスミド上に担持されている）；カリモウイルスのプロモーター、

例えばカリフラワーモザイクウイルス（ＣａＭＶ）１９Ｓプロモーター（Lawtonら(1987), Plant Mol. Biol. 9:315-24）；ＣａＭＶ　３５Ｓプロモーター（Odellら (1985), Nature 313:810-2；ゴマノハモザイクウイルス３５Ｓプロモーター（Walkerら(1987), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84(19):6624-8）；スクロースシンターゼプロモーター（Yang 及び Russell (1990), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:4144-8）；Ｒ遺伝子複合体プロモーター（Chandlerら(1989) Plant Cell 1:1175-83）；クロロフィルａ／ｂ結合タンパク質遺伝子プロモーター；ＣａＭＶ　３５Ｓ（米国特許第５，３２２，９３８号、第５，３５２，６０５号、第５，３５９，１４２号、及び第５，５３０，１９６号）；ＦＭＶ　３５Ｓ（米国特許第６，０５１，７５３号及び第５，３７８，６１９号）；ＰＣ１ＳＶプロモーター（米国特許第５，８５０，０１９号）；ＳＣＰ１プロモーター（米国特許第６，６７７，５０３号）；及びＡＧＲｔｕ．ｎｏｓプロモーター（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号Ｖ０００８７；Depickerら(1982), J. Mol. Appl. Genet. 1:561-73；Bevanら(1983), Nature 304:184-7）が挙げられる。

【０１１８】

特定の実施形態において、本発明の核酸分子は、組織特異的プロモーターを含有し得る。組織特異的プロモーターは、生物体の他の組織と比較して、プロモーターが特異的となるような組織において、操作可能に連結したヌクレオチド配列の高度な転写を行わせるヌクレオチド配列である。組織特異的プロモーターの例としては、限定するものではなく、タペータム特異的プロモーター；葯特異的プロモーター；花粉特異的プロモーター（例えば、米国特許第７，１４１，４２４号及びＰＣＴ国際公開公報第ＷＯ９９／０４２５８７号を参照）；胚珠特異的プロモーター；（例えば、米国特許出願公開第２００１／０４７５２５Ａ１号を参照）；果実特異的プロモーター（例えば、米国特許第４，９４３，６７４号及び第５，７５３，４７５号を参照）；及び種子特異的プロモーター（例えば、米国特許第５，４２０，０３４号及び第５，６０８，１５２号を参照）が挙げられる。一部の実施形態では、この発明の組成物又は方法において、発達段階特異的プロモーター（例えば、後期発育段階で活性なプロモーター）を用いることができる。

【０１１９】

一部の実施形態において、核酸分子と作動可能に連結され得る追加の調節配列としては、プロモーター配列とコード配列の間に位置づけられ、翻訳リーダー配列として機能する５’ＵＴＲが挙げられる。翻訳リーダー配列は、完全にプロセッシングされたｍＲＮＡ中に存在し、一次転写物のプロセッシング、及び／又はＲＮＡの安定性に影響を与えうる。翻訳リーダー配列の例としては、トウモロコシ及びペチュニアのヒートショックプロテインリーダー（米国特許第５，３６２，８６５号）、植物ウイルスコートタンパク質リーダー、植物ルビスコリーダー、及びその他が挙げられる。例えば、Turner及びFoster （1995）、Molecular Biotech. 3(3):225-36を参照のこと。5'UTRの非限定的な例としては、ＧｍＨｓｐ（米国特許第５，６５９，１２２号）、ＰｈＤｎａＫ（米国特許第５，３６２，８６５号）、ＡｔＡｎｔ１、ＴＥＶ（Carrington及びFreed (1990), J. Virol. 64:1590-7）、及びＡＧＲｔｕｎｏｓ（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号Ｖ０００８７、及びBevanら（1983）、Nature 304:184-7）が挙げられる。

【０１２０】

一部の実施形態において、核酸分子と作動可能に連結され得る追加の調節配列としては、３’非翻訳配列、３’転写終結領域、又はポリアデニル化領域も挙げられる。これらはヌクレオチド配列の下流に位置する遺伝的エレメントであり、ポリアデニル化シグナル、及び／又は転写もしくはｍＲＮＡのプロセッシングに影響を与え得る他の制御シグナルをもたらすポリヌクレオチドを含む。ポリアデニル化シグナルは植物において機能し、ｍＲＮＡ前駆体の３’末端にポリアデニル酸ヌクレオチドの付加をもたらす。ポリアデニル化配列は、様々な植物遺伝子から誘導することができ、又はＴ－ＤＮＡ遺伝子から誘導することができる。３’転写終結領域の非限定的な例は、ノパリンシンターゼ３’領域（nos 3'；Fraley ら(1983), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:4803-7）である。異なる３’非翻訳領域の使用の例は、Ingelbrechtら（1989）、Plant Cell 1：671-80に提示されてい

る。ポリアデニル化シグナルの非限定的な例としては、エンドウマメ（Ｐｉｓｕｍ　ｓａｔｉｖｕｍ）ＲｂｃＳ２遺伝子（Ps.RbcS2-E9；Coruzzi ら (1984), EMBO J. 3:1671-9）及びAGRtu.nos（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号Ｅ０１３１２）からのものが挙げられる。

【０１２１】

本発明の組み換え核酸又はベクターは、例えば植物細胞などの形質転換細胞に選択可能な表現型を寄与する選択マーカーを含んでもよい。選択マーカーを使用し、本発明の組み換え核酸分子を含有する植物又は植物細胞を選択してもよい。マーカーは、殺生物剤抵抗性、抗生物質抵抗性（例えば、カナマイシン、ジェネティシン（Ｇ４１８）、ブレオマイシン、ハイグロマイシン、など）又は除草剤抵抗性（例えばグリホサートなど）をコードしてもよい。選択マーカーの例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：カナマイシン抵抗性をコードし、カナマイシン、Ｇ４１８などを使用し選択されることができるｎｅｏ遺伝子；ビアラホス抵抗性をコードするｂａｒ遺伝子；グリホサート耐性をコードする変異ＥＰＳＰシンターゼ遺伝子；ブロモキシニルに対する抵抗性を付与するニトリラーゼ遺伝子；イミダゾリノン又はスルホニルウレア抵抗性を付与する変異アセト乳酸シンターゼ（ＡＬＳ）遺伝子；及びメトトレキサート抵抗性ＤＨＦＲ遺伝子。アンピシリン、ブレオマイシン、クロラムフェニコール、ゲンタマイシン、ハイグロマイシン、カナマイシン、リンコマイシン、メトトレキサート、ホスフィノトリシン、ピューロマイシン、スペクチノマイシン、リファンピシン、ストレプトマイシン、及びテトラサイクリンなどに対する抵抗性を寄与する選択マーカーが複数、利用可能である。かかる選択マーカーの例は、例えば、米国特許第５，５５０，３１８号、第５，６３３，４３５号、第５，７８０，７０８号、及び第６，１１８，０４７号に解説されている。

【０１２２】

本発明の組み換え核酸分子又はベクターは、スクリーンマーカーも含有するか、又は代わりに含有してもよい。スクリーンマーカーを使用し、発現を監視してもよい。例示的なスクリーンマーカーとしては、様々な発色性基質が公知である酵素をコードするβ－グルクロニダーゼ又はｕｉｄＡ遺伝子（ＧＵＳ）（Jefferson ら (1987), Plant Mol. Biol. Rep. 5:387-405）；植物組織においてアントシアニン色素（赤色）の生成を制御する産物をコードするＲ－ｌｏｃｕｓ遺伝子（Dellaporta ら (1988) "Molecular cloning of the maize R-nj allele by transposon tagging with Ac."In 18th Stadler Genetics Symposium, P. Gustafson 及び R. Appels, eds. (New York: Plenum), pp. 263-82）；β－ラクタマーゼ遺伝子（Sutcliffe ら (1978), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:3737-41）；様々な発色性基質が公知である酵素をコードする遺伝子（例えば、PADAC、発色性セファロスポリン）；ルシフェラーゼ遺伝子（Owら (1986), Science 234:856-9）；発色性カテコール類を転換することができるカテコールジオキシゲナーゼをコードするｘｙｌＥ遺伝子（Zukowski ら (1983), Gene 46(2-3):247-55）；アミラーゼ遺伝子（Ikatu ら (1990), Bio/Technol.8:241-2）；チロシンをＤＯＰＡ及びドーパキノン（次にメラニンへと濃縮される）へと酸化することができる酵素をコードするチロシナーゼ遺伝子（Katz ら (1983), J. Gen. Microbiol. 129:2703-14）；及びα-ガラクトシダーゼ、が挙げられる。

【０１２３】

宿主細胞の適切な形質転換方法としては、細胞へＤＮＡを導入することができる任意の方法が挙げられるが、例えば、限定するものではなく、プロトプラストの形質転換による方法（例えば米国特許第５，５０８，１８４号を参照のこと）、乾燥／阻害介在性ＤＮＡ取り込みによる方法（例えば、Potrykus ら (1985), Mol. Gen. Genet. 199:183-8を参照のこと）、エレクトロポレーションによる方法（例えば、米国特許第５，３８４，２５３号を参照のこと）、炭化ケイ素繊維を用いた攪拌による方法（例えば、米国特許第５，３０２，５２３号及び第５，４６４，７６５号を参照のこと）、アグロバクテリウム（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）媒介性形質転換による方法（例えば、米国特許第５，５６３，０５５号、第５，５９１，６１６号、第５，６９３，５１２号、第５，８２４，８７７号

、第５，９８１，８４０号、及び第６，３８４，３０１号を参照のこと）、及びＤＮＡコート化粒子の加速による方法（例えば、米国特許第５，０１５，５８０号、第５，５５０，３１８号、第５，５３８，８８０号、第６，１６０，２０８号、第６，３９９，８６１号、及び第６，４０３，８６５号を参照のこと）などが挙げられる。例えばこれらの技術を適用することにより、事実上すべての種の細胞を安定的に形質転換することができる。一部の実施形態において、形質転換ＤＮＡは、宿主細胞のゲノムに組み込まれる。多細胞の種の場合には、トランスジェニック細胞を、トランスジェニック生物体へと再生することができる。これらの技術のいずれかを使用して、例えばトランスジェニック植物のゲノム中に、この発明の核酸配列を１つ以上含有するトランスジェニック植物を作製してもよい。

【０１２４】

植物への発現ベクターの導入に最も広く利用されている方法は、アグロバクテリウム（Agrobacterium）の天然形質転換系に基づく方法である。Ａ．ツメファシエンス（A.tumefaciens）及びＡ．リゾゲネス（A.rhizogenes）は、植物細胞を遺伝的に形質転換する植物病原性土壌細菌である。Ａ．ツメファシエンス（A.tumefaciens）及びＡ．リゾゲネス（A.rhizogenes）のそれぞれＴｉプラスミドとＲｉプラスミドは、植物の遺伝的形質転換の原因となる遺伝子を担持している。Ｔｉ（腫瘍誘導性）プラスミドは、Ｔ－ＤＮＡとして知られる大きなセグメントを含有しており、形質転換植物へと移送される。Ｔｉプラスミドの他のセグメントであるＶｉｒ領域は、Ｔ－ＤＮＡの移送に寄与している。Ｔ－ＤＮＡ領域は、末端リピートに隣接している。一部の改変バイナリーベクターにおいて、腫瘍誘導性遺伝子は削除され、Ｖｉｒ領域の機能が利用され、Ｔ－ＤＮＡ境界配列に隣接する外来性ＤＮＡが移送される。Ｔ－領域はまた、例えばトランスジェニック細胞及び植物の効率的な回収のための選択マーカーを含有してもよく、及び例えばＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８コード核酸などの移送のための配列挿入用マルチプルクローニングサイトを含有してもよい。

【０１２５】

従って一部の実施形態において、植物形質転換ベクターは、Ａ．ツメファシエンス（A.tumefaciens）のＴｉプラスミドから誘導され（例えば、米国特許第４，５３６，４７５号、第４，６９３，９７７号、第４，８８６，９３７号、及び第５，５０１，９６７号、ならびに欧州特許第ＥＰ０１２２７９１号を参照のこと）、又はＡ．リゾゲネス（A.rhizogenes）のＲｉプラスミドから誘導される。追加の植物形質転換ベクターとしては、例えば限定されないが、Herrera-Estrellaら（1983）、Nature 303:209-13；Bevanら（1983）、Nature 304:184-7；Kleeら（1985）、Bio/Technol. 3:637-42、及び欧州特許第ＥＰ０１２０５１６号に記載されるもの、ならびに前述のいずれかから誘導されるものが挙げられる。例えばシノリゾビウム（Sinorhizobium）、リゾビウム（Rhizobium）、及びメソリゾビウム（Mesorhizobium）などの植物と自然に相互作用する他の細菌を改変し、多くの多様な植物への遺伝子移送を介在してもよい。これらの植物関連共生細菌は、不活性化Ｔｉプラスミド及び適切なバイナリーベクターの両方を獲得することにより、遺伝子移送の能力を有することができる。

【０１２６】

レシピエント細胞に外因性ＤＮＡをもたらした後、形質転換細胞は多くの場合、さらなる培養及び植物再生に関して特定される。形質転換細胞を特定する能力を改善するために、形質転換体を作製するために使用されたベクターと共に、前述の選択マーカー又はスクリーンマーカーの遺伝子を利用することを所望してもよい。選択マーカーが使用された場合、形質転換細胞は、当該細胞を選択剤へと曝露させることにより、形質転換された可能性のある細胞群内で特定される。スクリーンマーカーが使用された場合、細胞は、所望のマーカー遺伝子の形質に対しスクリーニングされてもよい。

【０１２７】

選択剤への曝露を生き残った細胞、又はスクリーニングアッセイにおいて陽性を記録し

た細胞を、植物再生を支持する培地中で培養してもよい。一部の実施形態において、任意の適切な植物組織培養培地（例えば、ＭＳ及びＮ６培地）を、例えば成長調節因子などのさらなる物質を含ませることにより改変してもよい。組織は、植物再生の試みを開始するのに充分な組織が利用可能となるまで、成長調節因子を有する基礎培地上で維持されてもよく、又は組織の形態が再生に適するまで（例えば、少なくとも２週間）、手動選択ラウンドを反復した後、発芽形成に寄与する培地へ組織を移送してもよい。培養物は、充分な発芽形成が発生するまで、定期的に移送される。発芽が形成されたら、それらを、根形成に寄与する培地へと移送する。充分な根が形成されたら、さらなる成長と成熟のために植物を土壌へと移してもよい。

【０１２８】

再生植物において、対象とする核酸分子（例えば、少なくとも１つのＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８の葉緑体輸送ペプチドを含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列）の存在を確認するために、種々のアッセイを実行してもよい。かかるアッセイとしては、例えば、サザンブロッティング及びノーザンブロッティング、ＰＣＲならびに核酸配列解析などの分子生物学的アッセイ；例えばタンパク質産物の存在を検出するための、例えば免疫学的手法（ＥＬＩＳＡ及び／又はウェスタンブロット）による、又は酵素機能による生化学的アッセイ；例えば葉又は根のアッセイなどの植物部分のアッセイ；及び再生植物全体の表現型の解析などが挙げられる。

【０１２９】

例えば、対象のヌクレオチド配列に特異的なオリゴヌクレオチドプライマーを使用したＰＣＲ増幅により、組み込みイベントを解析してもよい。ＰＣＲ遺伝子型決定は、限定されないが、ゲノム内に組み込まれた対象核酸分子を含有することが予測されている単離宿主植物組織由来のゲノムＤＮＡのポリメラーゼ鎖反応（ＰＣＲ）増幅を行った後、ＰＣＲ増幅産物の標準的なクローニングと配列解析を含むものと理解されている。ＰＣＲ遺伝子型決定法は詳細に記載されており（例えば、Rios, G.ら（2002）、Plant J. 32:243-53参照）、任意の植物種（例えば、トウモロコシ（Z.mays）、又はダイズ（G.max））由来のゲノムＤＮＡ、又は細胞培養物を含む組織型由来のゲノムＤＮＡへと適用することができる。

【０１３０】

アグロバクテリウム（Agrobacterium）依存性形質転換法を使用して形成されたトランスジェニック植物は通常、１つの染色体に挿入された単一組み換えＤＮＡ配列を含有する。単一組み換えＤＮＡ配列は、「トランスジェニックイベント」又は「組み込みイベント」と呼称される。かかるトランスジェニック植物は、挿入ＤＮＡ配列に対してヘテロ接合である可能性が高い。一部の実施形態において、導入遺伝子に関してホモ接合体のトランスジェニック植物は、単一外因性遺伝子配列を含有する、独立分離トランスジェニック植物、例えばT_0植物を、自身と性的交配（自殖）させ、T_1種子を生成させることにより取得することができる。生成されたT_1種子のうちの４分の１が、導入遺伝子に関しホモ接合体である。T_1種子を発芽させることにより、ヘテロ接合体とホモ接合体の区別を可能とするＳＮＰアッセイ又はＰＣＲベースの増幅アッセイを通常は使用して、ヘテロ接合性に関し検証することができる植物が生じる（すなわち、接合性アッセイ）。

【０１３１】

特定の実施形態では、少なくとも１つのＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８の葉緑体輸送ペプチドを含む少なくとも１つのポリペプチドの複製が、少なくとも１つのＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８の葉緑体輸送ペプチドを含む少なくとも１つのポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む少なくとも１つの核酸分子が導入されるものである色素体含有細胞中で生成される。少なくとも１つのＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８の葉緑

体輸送ペプチドを含む各ポリペプチドは、異なる形質転換イベントに導入される複数の核酸配列から、又は単一の形質転換イベントに導入される単一の核酸配列から発現され得る。一部の実施形態において、かかる複数のポリペプチドは、単一のプロモーターの制御下で発現される。他の実施形態において、かかる複数のポリペプチドは、複数のプロモーターの制御下で発現される。そのそれぞれのペプチド配列が色素体に標的化されるものである、複数のペプチド配列を含む単一のポリペプチドを、発現させることができる。

【０１３２】

組み換え核酸分子を用いた植物の直接的な形質転換に加え、トランスジェニック植物は、少なくとも１つのトランスジェニックイベントを有する第一の植物と、かかるイベントを欠く第二の植物を交配させることにより作製することもできる。例えば、少なくとも１つのＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８の葉緑体輸送ペプチドを含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む組み換え核酸分子を、形質転換を受け入れ可能である第１の植物系統に導入し、トランスジェニック植物を生成することができるものであり、該トランスジェニック植物を、第２の植物系統と交配させて、第２の植物系統に、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を移入させることができる。

【０１３３】

ＶＩ．ＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８の葉緑体輸送ペプチドが誘導するポリペプチドを含む植物材料

一部の実施形態では、植物を提供するものであって、該植物は、少なくとも１つのＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８の葉緑体輸送ペプチドを含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む植物細胞を含む。特定の実施形態では、かかる植物は、植物組織又は植物細胞の形質転換と植物全体の再生とによって生成することができる。さらなる実施形態では、かかる植物は、市販原料から得られるか、又は少なくとも１つのＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８の葉緑体輸送ペプチドを含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸を生殖質へ遺伝子交雑することで得ることができる。少なくとも１つのＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８の葉緑体輸送ペプチドを含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む植物細胞を含む植物材料もまた、提供する。かかる植物材料は、植物細胞を含む植物から得ることができる。さらなる実施形態では、該植物材料は、植物を生成するように再生することができない植物細胞である。

【０１３４】

一部の実施形態では、少なくとも１つのＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８の葉緑体輸送ペプチドを含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むトランスジェニック植物又はトランスジェニック植物材料が、以下の特徴：植物細胞内でのポリペプチドの発現；植物細胞の色素体内でのポリペプチドの一部の発現；植物細胞のサイトゾルよりのポリペプチドを細胞の色素体へ移送すること；植物細胞内でのポリペプチドの色素体特異的発現；及び／又は植物細胞内でのポリペプチドの局在性、のうちの１つ又は複数を示すことができる。かかる植物は、コードされたポリペプチドの発現以外の所望の１つ又は複数の形質を、追加的に有してもよい。かかる形質としては、例えば、以下が挙げられる：昆虫、他の害虫、及び病原体に対する抵抗性；除草剤耐性；安定性、収穫量又は保存可能期間の増強；環境耐性；医薬生産；工業製品生産；及び栄養学的増強。

【０１３５】

この発明によるトランスジェニック植物は、本発明の核酸分子で形質転換されることができる任意の植物であってもよい。したがって、植物は、双子葉植物であっても、単子葉植物であってもよい。本方法で使用可能な双子葉植物の非限定的な例としては、アラビド

プシス（Arabidopsis）、アルファルファ、豆類、ブロッコリー、キャベツ、ニンジン、カリフラワー、セロリ、ハクサイ、綿花、キュウリ、ナス、レタス、メロン、エンドウ、コショウ、ピーナッツ、ジャガイモ、カボチャ（pumpkin）、ダイコン、ナタネ、ホウレンソウ、ダイズ、カボチャ（squash）、テンサイ、ヒマワリ、タバコ、トマト、及びスイカが挙げられる。本方法で使用可能な単子葉植物の非限定的な例としては、コーン、アブラナ属（Brassica）、タマネギ、イネ、ソルガム、小麦、ライ麦、キビ、サトウキビ、燕麦、ライ小麦及び芝草が挙げられる。この発明によるトランスジェニック植物は、任意の方法で使用又は栽培することができる。

【０１３６】

一部の実施形態により、少なくとも１つのＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８の葉緑体輸送ペプチドを含むポリペプチドをコードする１つ又は複数のヌクレオチド配列を含有する商品生産物、例えばかかるヌクレオチド配列を１つ又は複数含有する組み換え植物又は種子から生成される商品生産物もまた提供される。少なくとも１つのＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８の葉緑体輸送ペプチドを含むポリペプチドをコードする１つ又は複数のヌクレオチド配列を含有する商品生産物としては、例えば、限定するものではなく、以下が含まれる：少なくとも１つのＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８の葉緑体輸送ペプチドを含むポリペプチドをコードする１つ又は複数のヌクレオチド配列を含む植物による、食品、食事、油脂、又は粉砕したもしくは全体の穀粒や種子。１つ又は複数の商品又は商品生産物中で、少なくとも１つのＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８の葉緑体輸送ペプチドを含むポリペプチドをコードする１つ又は複数のヌクレオチド配列が検出されるということが、少なくとも１つのＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８の葉緑体輸送ペプチドを含むポリペプチドをコードする１つ又は複数のヌクレオチド配列を含む植物から、該商品又は商品生産物の少なくとも一部が生成されたという事実上の証拠となる。特定の実施形態では、この発明の商品生産物には、少なくとも１つのＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８の葉緑体輸送ペプチドを含むポリペプチドをコードする核酸配列が検出可能な量で含まれている。一部の実施形態において、かかる商品生産物は、トランスジェニック植物を取得し、それらから食物又は餌を作製することにより製造されてもよい。

【０１３７】

一部の実施形態では、少なくとも１つのＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８の葉緑体輸送ペプチドを含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む導入遺伝子を含むトランスジェニック植物又は種子もまた、そのゲノムにおける少なくとも１つの他のトランスジェニックイベントを含むことができ、限定するものではなく、以下が含まれる：それよりＲＮＡｉ分子が転写されるトランスジェニックイベント；殺虫タンパク質をコードする遺伝子（例えば、バチルスチューリンゲンシス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｔｈｕｒｉｎｇｉｅｎｓｉｓ）殺虫タンパク質）；除草剤耐性遺伝子（例えば、グリホサートに対する耐性をもたらす遺伝子）；及びトランスジェニック植物において所望の表現型に寄与する遺伝子（例えば、収穫量増加、脂肪酸代謝変化又は細胞質雄性不稔の回復）。

【０１３８】

ＶＩＩ．色素体に対する、遺伝子産物のＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８媒介性局在

本発明の一部の実施形態により、色素体（例えば、葉緑体）に対する、遺伝子産物の発現及び／又は局在に関する方法が提供される。特定の実施形態では、遺伝子産物は、例えば蛍光分子である、マーカー遺伝子産物であり得る。ＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、Ｔｒ

ａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８のペプチドもまた含むポリペプチドの一部としての遺伝子産物の発現により、特定のＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８のペプチド配列の色素体局在能を評価する系が提供される。一部の実施形態では、ＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８含有ポリペプチドの一部としてのマーカー遺伝子産物の発現を、ポリペプチドが発現するものである細胞の色素体に対してマーカー遺伝子産物の発現を標的化するために利用する。或る実施形態では、かかるマーカー遺伝子産物が、宿主細胞の色素体内に局在する。例えば、マーカー遺伝子産物は、宿主細胞のサイトゾル又は他の細胞小器官においてよりも、色素体においてより高度に発現され得るか；マーカー遺伝子産物は、色素体において最も高度に発現され得うるか；マーカー遺伝子産物は、本質的に色素体においてのみ発現され得うるか、又はマーカー遺伝子産物は、色素体において完全に発現し得るため、サイトゾル又は非色素体の細胞小器官における発現は検出できない。

【０１３９】

一部の実施形態では、マーカー遺伝子産物に連結した機能性ＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８の変異体ペプチドを含むポリペプチドを用いて、該機能性ＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８の変異体ペプチドの特徴を評価する。例えば、ＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８のペプチドの配列は、例えば、少なくとも１つの保存的変異をＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８のペプチドに導入することによって変更することができ、得られたＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８の変異体ペプチドを、マーカー遺伝子産物に連結することができる。好適な宿主細胞（例えば、発現コンストラクト中の１つ又は複数の制御エレメントが操作可能である細胞）における発現の後で、マーカー遺伝子産物の発現を判断することができる。参照ＴｒａＰペプチド－マーカーのコンストラクトと変異体ＴｒａＰペプチド－マーカーのコンストラクトとでマーカー遺伝子産物の細胞内局在性を比較することで、変異体ＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８のペプチドがもたらす色素体局在性が、例えば、より優れた色素体局在性か、実質的に同一な色素体局在性か、又はより劣った色素体局在性かを判断することができる。より優れた色素体局在性をもたらすＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８の変異体を特定することによって、かかるＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８の変異体における変異を、さらなるＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８の変異体に組み込むことができる。この評価プロセスの全てを実行して、特定された好ましい変異を、次いでＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８の配列に組み込むことが、ＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８の配列の最適化のための反復プロセスとなり得る。こうして最適化したＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８のペプチド配列及びそれをコードしたヌクレオチド配列は、本発明の一部として、こうして最適化したＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７又はＴｒａＰ２８のペプチド配列が、追加の変異によりさらに最適化することができるか否かが検討される。

【０１４０】

本明細に引用される、公表文献、特許、及び特許出願を含むすべての参照文献は、本開示の明白な詳細と一致する範囲で参照により本明細書に援用され、各参照文献が個々に、及び具体的に、参照により援用されると示され、本明細書にその全体が明記された場合と同程度に援用される。本明細書において検討された参照文献は、本出願の出願日の前のその開示内容に対してのみ提供される。本明細書はいずれも、先行発明を理由としたかかる開示の先行のために本発明者らが権利付与されないことの同意とはみなされない。

【０１４１】

以下の実施例は、ある特定の特性及び／又は態様の解説のために提供される。これらの実施例によって、記載される特定の特性又は態様に本開示が限定されるとみなされるべきではない。

【実施例】

【０１４２】

実施例１：キメラ葉緑体輸送ペプチド（ＴｒａＰ）配列の設計及び生成

色素体は、高等植物種において見られ、かつ、全ての植物組織に存在する細胞小器官である。葉緑体は、不可欠な生理的機能を担う、緑色光合成組織中で見られる特殊な型の色素体である。例えば、こうした最も重要な生理的機能のひとつに、植物が必要とする芳香族アミノ酸の合成がある。この生合成経路には、核にコードされた酵素を必要とし、該核コードの酵素は、細胞質から葉緑体内部に輸送される。これら核コードの酵素は通常、葉緑体膜と相互作用して葉緑体のストロマへのペプチドの輸送を容易にするＮ末端輸送ペプチドを保有する。Bruce B, (2000) Chloroplast transit peptides: structure, function, and evolution.Trends Cell Bio., 10:440-447。移送されると、ストロマのペプチダーゼが輸送ペプチドを切断し、葉緑体内に移送された成熟機能性タンパク質が残る。Richter S, Lamppa GK, (1999) Stromal processing peptidase binds transit peptides and initiates their ATP-dependent turnover in chloroplasts. Journ.Cell Bio., 147:33-43。葉緑体輸送ペプチドは、可変の配列であり、長さ、組成及び構成が非常に多岐にわたる（Bruce, 2000）。葉緑体輸送ペプチドの配列類似性は、異なる植物種の相同タンパク質の間で有意に異なる。異なる植物種より得られた相同タンパク質は通常、プロセッシングされた成熟機能性タンパク質と比較した場合に、相対的に高い配列類似性を共有するということを考慮すれば、葉緑体輸送ペプチド間の相違量は、予測しがたいものである。

【０１４３】

新規のキメラ葉緑体輸送ペプチド配列を設計し、生成し、植物内で試験した。新規のキメラ葉緑体輸送ペプチドは、葉緑体内で農学上重要なタンパク質の移送に関して、有効な移動特性及びプロセッシング特性をもつことを示した。はじめに、異なる植物種及び細菌種よりのタンパク質配列をＣｈｌｏｒｏＰ（商標）コンピュータプログラムにより分析し、推定葉緑体輸送ペプチド配列を同定した（Emanuelsson O, Nielsen H, von Heijne G, (1999) ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. Protein Science, 8: 978-984、http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/で利用可能である）。天然の葉緑体輸送ペプチドを同定した後、葉緑体輸送ペプチド配列を互いに整列させた（図２）。

【０１４４】

葉緑体輸送ペプチド配列のアラインメントを利用して、第１の生物体よりの葉緑体輸送ペプチド配列の第１の半分を第２の生物体よりの葉緑体輸送ペプチド配列の第２の半分と、約１：１の割合で結合させて、新規キメラ葉緑体輸送ペプチドを設計した。新規に設計したキメラ葉緑体輸送ペプチドの例示的なタンパク質配列は、ＴｒａＰ１０（配列番号１）、ＴｒａＰ１１（配列番号２）、ＴｒａＰ１７（配列番号３）、ＴｒａＰ１８（配列番号４）及びＴｒａＰ１９（配列番号５）である。これら新規のキメラ葉緑体輸送ペプチド配列は、セイヨウアブラナ（Brassica napus）、ダイズ（Glycine max）、イネ、アマランサス、ヒルガオ（Calystegia）ならびにドナリエラ（Dunaliella salina）及びコナミドリムシ（Chlamydamonas reinhardtii）のＥＰＳＰＳタンパク質に由来する。ＴｒａＰ１０（配列番号１）のキメラ葉緑体輸送ペプチド配列は、セイヨウアブラナ（Brassica n

apus）由来のＮ末端を含み、この葉緑体輸送ペプチドのＣ末端は、ダイズ（Glycine max）由来である。ＴｒａＰ１１（配列番号２）の葉緑体輸送ペプチド配列は、ダイズ（Glycine max）由来のＮ末端を含み、この葉緑体輸送ペプチドのＣ末端は、セイヨウアブラナ（Brassica napus）に由来する。ＴｒａＰ１７（配列番号３）の葉緑体輸送ペプチド配列は、ヒルガオ（Calystegia）由来のＮ末端を含み、この葉緑体輸送ペプチドのＣ末端は、コナミドリムシ（Chlamydamonas reinhardtii）に由来する。ＴｒａＰ１８（配列番号４）の葉緑体輸送ペプチド配列は、イネ（Oryza sativa）由来のＮ末端を含み、この葉緑体輸送ペプチドのＣ末端は、アマランサス（Amaranthus）に由来する。ＴｒａＰ１９（配列番号５）の葉緑体輸送ペプチド配列は、アマランサス（Amaranthus）由来のＮ末端を含み、この葉緑体輸送ペプチドのＣ末端は、ドナリエラ（Dunaliella salina）に由来する。

【０１４５】

同様に、異なる植物種よりの複数のタンパク質配列を、ＣｈｌｏｒｏＰ（商標）（Emanuelsson, 1999）コンピュータプログラムにより分析し、推定葉緑体輸送ペプチド配列で同定したが、該プログラムはhttp://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/で利用可能である。葉緑体輸送ペプチド配列アラインメントを利用して、ランダムに選択したアミノ酸で、新規の合成葉緑体輸送ペプチドを設計して、新規の合成推定葉緑体輸送ペプチド配列を生成した。新規に設計した合成葉緑体輸送ペプチドの例示的な配列は、ＴｒａＰ２６（配列番号６）、ＴｒａＰ２７（配列番号７）及びＴｒａＰ２８（配列番号８）である。

【０１４６】

キメラ葉緑体輸送ペプチドについて、植物内での一時的発現系を含む複数のアッセイにより、農学上重要な導入遺伝子配列と融合した遺伝子制御発現エレメントを含有する安定な形質転換イベントとして遺伝子導入的に試験された。

【０１４７】

実施例２：　　キメラ葉緑体輸送ペプチド（ＴｒａＰ）配列の植物内一過性試験

タバコのトランジェントアッセイ

上記に記載したキメラ葉緑体輸送ペプチド配列を、まず植物内トランジェントアッセイにより試験した。ＴｒａＰ１０（配列番号９）、ＴｒａＰ１１（配列番号１０）、ＴｒａＰ１７（配列番号１１）、ＴｒａＰ１８（配列番号１２）、ＴｒａＰ１９（配列番号１３）、ＴｒａＰ２６（配列番号１４）、ＴｒａＰ２７（配列番号１５）及びＴｒａＰ２８（配列番号１６）のキメラ葉緑体輸送ペプチド配列をコードするポリヌクレオチド配列を合成した。リンカー配列（配列番号１７）を、ＴｒａＰ配列と、ＴｒａＰ１０及びＴｒａＰ１１のｙｆｐコード配列との間に組み込んだ。得られたコンストラクトは、２つの植物転写単位（ＰＴＵ（plant transcription unit））を含んだ。第１のＰＴＵは、シロイヌナズナ（Arabidopsis thaliana）のＵｂｉｑｕｉｔｉｎ　１０プロモーター（ＡｔＵｂｉ１０プロモーター；Callisら（1990） J. Biol. Chem.、265: 12486-12493）、ＴｒａＰ－黄色蛍光タンパク質融合遺伝子（ＴｒａＰ－ＹＦＰ；米国特許出願第２００７／０２９８４１２号）又はＴｒａＰ－緑色蛍光タンパク質融合遺伝子（ＴｒａＰ－ＧＦＰ；Sheenら（1995）Plant J., 8 (5): 777-84）及びアグロバクテリウム・ツメファシエンス（Agrobacterium tumefaciens）のＯＲＦ　２３　３’非翻訳領域（ＡｔｕＯＲＦ２３　３’ＵＴＲ；米国特許第５，４２８，１４７号）により構成された。第２のＰＴＵは、キャッサバ葉脈モザイクウィルスプロモーター（ＣｓＶＭＶプロモーター；Verdaguerら（1996）Plant Molecular Biology、31: 1129-1139）、ホスフィノトリシンアセチル基転移酵素（phosphinothricin acetyl transferase）（ＰＡＴ；　Wohllebenら（1988） Gene、 70: 25-37）又はＤＳＭ－ＩＩ（国際特許出願第２００８０７０８４５号）及び、アグロバクテリウム・ツメファシエンス（Agrobacterium tumefaciens）のＯＲＦ　１　３’非翻訳領域（ＡｔｕＯＲＦ１　３’ＵＴＲ；Huangら（1990）J. Bacteriol.、172: 1814-1822）により構成された。コンストラクトｐＤＡＢ１０１９７９は、ＴｒａＰ１０キメラ葉緑体輸送ペプチドを含有する（図３）。コンストラクトｐＤＡＢ１０１９８０は、ＴｒａＰ１１キメラ葉緑体輸送ペプチドを含有する（図４）。コンストラクトｐＤＡＢ１０７６３４は、ＴｒａＰ１７キメラ葉緑体輸送ペプチドを含有する（図５）。コンストラクトｐＤＡ

Ｂ１０７６３５は、ＴｒａＰ１８キメラ葉緑体輸送ペプチドを含有する（図６）。コンストラクトｐＤＡＢ１０７６３６は、ＴｒａＰ１９キメラ葉緑体輸送ペプチドを含有する（図７）。コンストラクトｐＤＡＢ１０９８４７は、ＴｒａＰ２６キメラ葉緑体輸送ペプチドを含有する（図８）。コンストラクトｐＤＡＢ１０９８４８は、ＴｒａＰ２７キメラ葉緑体輸送ペプチドを含有する（図９）。コンストラクトｐＤＡＢ１０９８４９は、ＴｒａＰ２８キメラ葉緑体輸送ペプチドを含有する（図１０）。ｙｆｐ遺伝子の上流に葉緑体輸送ペプチド配列を含まない対照プラスミドｐＤＡＢ１０１９０８を、構築し、この実施例に含んだ（図１１）。上記コンストラクトは、制限酵素消化及び配列解析により確認した。最後に、コンストラクトを、アグロバクテリウム・ツメファシエンス（Agrobacterium tumefaciens）に形質転換して、グリセロールストックとして保存した。

【０１４８】

アグロバクテリウム（Agrobacterium）のグリセロールストックから、１ループ量（loop full)の凍結培養物を、14mlの滅菌管中で、2mlのYPD(Yeast-extract Peptone Dextrose）（１００μｇ／ｍｌスペクチノマイシン）に播種した。播種した培地を、２００ｒｐｍで振とうしながら２８℃で一晩インキュベートした。翌日、約１００μｌの培養物を用いて、滅菌の１２５ｍｌフラスコ（３箇所のバッフル付）中で、２５ｍｌのＹＰＤ（１００μｇ／ｍｌスペクチノマイシン）を播種し、２００ｒｐｍで振とうしながら２８℃で一晩インキュベートした。翌日、この培養物を、滅菌のｄｄＨ$_2$０（ｐＨ８．０）中でＯＤ$_{600}$が０．５となるように希釈した。希釈したアグロバクテリウム（Agrobacterium）株を、Ｐ１９補助タンパク質を含有する第２のアグロバクテリウム（Agrobacterium）株と、１：１の割合で混合した。この培養物を、Ｖｏｉｎｎｅｔ法によるタバコ葉の浸潤に用いた。Voinnet O、Rivas S、Mestre P及び、Baulcombe D, (2003) An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus.The Plant Journal, 33:949-956。浸潤したタバコ植物を、アッセイがなされるまで少なくとも３日間、２４℃で、明条件で１６時間、Ｃｏｎｖｉｒｏｎ（商標）セット内に配置した。

【０１４９】

顕微鏡観察結果：

アグロバクテリウム浸潤タバコ葉を植物から切り離し、乾燥防止のために水を入れたペトリ皿に移した。該浸潤タバコ葉を、ダークリーダーハンドランプ（Dark Reader Hand Lamp（商標））（Clare Chemical Research社；コロラド州ドロレス）を用いて、適当である位置に保持したロングパスフィルターガラスによる青色光励起の下で観察し、ＹＦＰ又はＧＦＰのレポータータンパク質を良好に発現している葉の無傷な領域を特定した。具体的には、共焦点顕微鏡（ライカTCS-SP5 AOBS（商標）；イリノイ州バッファローグローブ）によるイメージングのために、特定した葉の領域を葉から切り離し、水中に載置した。ＹＦＰは、マルチラインのアルゴンイオンレーザにより、５１４ｎｍのレーザ光で励起させた。ＧＦＰは、マルチラインのアルゴンイオンレーザにより、４８８ｎｍのレーザ光で励起させた。検出スリットの幅を、非発現（暗条件）対照葉のサンプルを用いて調節し、バックグラウンドの葉の自家蛍光を除外した。葉緑体の局在性を判断するために、蛍光のレポータータンパク質シグナルとの直接比較用に、クロロフィルの自家蛍光を第２チャネルに同時に収集した。

【０１５０】

顕微鏡イメージングにより、ＴｒａＰ葉緑体輸送ペプチド（ＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７及びＴｒａＰ２８）を含むＹＦＰ又はＧＦＰの蛍光タンパク質は、タバコ細胞の細胞質の葉緑体中に移動しなかった対照のＹＦＰ蛍光タンパク質と比べて、タバコ細胞の細胞質中に位置する葉緑体内に蓄積したという結果が示された（図１２から図１９）。ＴｒａＰ１７輸送ペプチドは、ＹＦＰ蛍光タンパク質をタバコの葉緑体に移動させなかったが、ＴｒａＰ１７輸送ペプチドは、ＹＦＰ蛍光タンパク質をトウモロコシの葉緑体に移動させたということに留意されたい。これら顕微鏡イメージングの結果は、ＹＦＰタンパク質の葉緑体への移動が、ＴｒａＰ

葉緑体輸送ペプチドの結果であったことを示唆する。顕微鏡画像の図に示すように、ＹＦＰ蛍光シグナルは、顕微鏡イメージング条件下で自家蛍光により赤色光も発光するものである葉緑体中に局在化している。比較として、図２０に、葉緑体輸送ペプチドを含有しない、対照であるコンストラクトｐＤＡＢ１０１９０８で浸潤したタバコ葉組織の顕微鏡画像を示している。この画像中の葉緑体は、顕微鏡イメージング条件下で自家蛍光により赤色光のみを発光し、タバコ細胞に浸潤したＴｒａＰ中で現れるＹＦＰ蛍光シグナルを何も示さない。むしろ、対照であるタバコ植物細胞中のＹＦＰ蛍光シグナルが、該タバコ植物細胞の細胞質の全体にわたって広く現われている。

【０１５１】

トウモロコシプロトプラストトランジェントアッセイ

トウモロコシ（Zea mays）ｃ．ｖ．Ｂ１０４の種子を、Ｔｗｅｅｎ（登録商標）２０を２～３滴加えた５０％Ｃｌｏｒｏｘ（商標）（３％次亜塩素酸ナトリウム）中で、約２０分間激しく振とうすることによって、表面滅菌した。種子を、滅菌蒸留水で完全にすすいだ。滅菌種子を、Ｐｈｙｔａｔｒａｙ又は同様の型の箱内の１／２ＭＳ培地上に移し、１２日から２０日間、暗条件（２８℃）で成長させた。トウモロコシプロトプラストトランジェントアッセイにより、トウモロコシ（Zea mays）ｃ．ｖ．Ｂ１０４の葉からトウモロコシプロトプラストを得て形質移入した。このトウモロコシプロトプラストアッセイは、Yoo、S.-D.、Cho、Y.-H.、 及び Sheen, J. (2007)、Arabidopsis Mesophyll Protoplasts:A Versitile Cell System for Transient Gene Expression Analysis, Nature Protocols, 2:1565-1572に記載の系を変形したものである。以下の実験で用いるマンニトールの濃度を０．６Ｍに変更したことを除いて、Yooら（2007）に記載の通りに溶液を調整した。

【０１５２】

１００から５００ｌのプロトプラスト（１～５×１０^{5}細胞）のトランスフェクションは、室温で、約４０ｍｇのプラスミドＤＮＡを含んだ２ｍｌマイクロチューブに、プロトプラストを添加することによって完了した。好ましくは、ＤＮＡの量を、プロトプラストの量の約１０％に保った。プロトプラスト及びＤＮＡを、時々攪拌しながら５分間インキュベートした。プロトプラスト及びＤＮＡに、同量のＰＥＧ溶液を、ＰＥＧ溶液の液滴を添加している間攪拌しながら、１回に２滴でゆっくりと加えた。該チューブを、時々穏やかに攪拌しながら、約１０分間インキュベートさせた。次に、１ｍｌのＷ５＋溶液を添加し、チューブを数回反転させることにより攪拌した。チューブを、４℃の温度で、７５×ｇで５分間遠心分離した。最後に、上澄みを除き、ペレットを１ｍｌのＷＩ溶液中に再懸濁し、プロトプラストを小さいペトリ皿（３５×１０ｍｍ）又は６ウェルのマルチウェルプレートに移し、室温で、暗条件で一晩インキュベートした。１２時間のインキュベート後、顕微鏡でＧＦＰの蛍光が見られた。イメージングには、先に記載した顕微鏡条件と類似の顕微鏡条件を用いた。

【０１５３】

顕微鏡イメージングにより、ＴｒａＰ１７、ＴｒａＰ１８又はＴｒａｐ１９のキメラ葉緑体輸送ペプチドを含むＧＦＰ蛍光タンパク質は、トウモロコシ細胞の細胞質の葉緑体に移動しなかった対照ＧＦＰ蛍光タンパク質と比べて、トウモロコシ細胞の細胞質に位置する葉緑体内に蓄積していたという結果が示された（図２１から図２３）。これら顕微鏡イメージングの結果は、ＧＦＰタンパク質の葉緑体への移動が、ＴｒａＰキメラ葉緑体輸送ペプチドの結果であったことを示唆する。

【０１５４】

ウエスタンブロットの結果

浸潤させたタバコ植物のサンプルに対して、ウエスタンブロットによりアッセイを行った。葉の打抜きを収集して、ビーズミルにかけた。約１００から２００ｍｇの葉材料を、２ＢＢ（Ｄａｉｓｙ社；アーカンソー州ロジャース）及び５００ｍｌのＰＢＳＴと、Ｋｌｅｃｏ（商標）ビーズミル中で３分間混合した。その後サンプルを、４℃で、１４，０００×ｇの遠心分離で遠心沈殿させた。上澄みを除去し、直接ウエスタンブロットで分析す

るか、又は免疫沈降するかのいずれかを行った。免疫沈降は、Ｐｉｅｒｃｅ　Ｄｉｒｅｃｔ　ＩＰ　ｋｉｔ（商標）（サーモサイエンティフィック社；イリノイ州ロックフォード）を用いて、製造元のマニュアルに沿って行った。約５０μｇの抗ＹＦＰ抗体又は抗ＧＦＰ抗体を樹脂に結合させた。サンプルは、樹脂と共に４℃で一晩インキュベートした。次に、翌朝、サンプルを洗浄及び溶出させ、同量の２×８M尿素サンプルバッファーと合わせた後、サンプルを５分間煮沸して、分析の準備をした。煮沸したサンプルは、ＭＯＰＳバッファー中の４～１２％のＳＤＳ－Ｂｉｓ　Ｔｒｉｓゲル上で４０分間電気泳動を行った。その後該ゲルは、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　ｉＢｌｏｔ（商標）（ライフテクノロジーズ社；カリフォルニア州カールスバッド）を用いて、製造元のマニュアルに沿って転写した。転写したメンブレンを、５％脱脂粉乳を含むＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎ（登録商標）溶液を用いて、１０分間ブロックさせた。メンブレンは、５％脱脂粉乳を含むＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎ（登録商標）溶液中に１：１０００希釈で用いた一次抗体（ウサギにおける抗ＧＦＰ又は抗ＹＦＰモノクローナル抗体）により、１時間プローブした。次に、メンブレンをＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎ（登録商標）で５分間に３回すすぎ、結合しなかった一次抗体を除去した。メンブレンは、１：１０００希釈で用いたヤギ抗ウサギ抗体のモノクローナル二次抗体（ライフテクノロジー社）で、６０分間プローブした。メンブレンを、先に記載したように洗浄し、Ｔｈｅｍｏ　ＢＣＩＰ／ＮＢＴ（商標）基質を加えることによって成長させた。発色気質を、５分から１０分間成長させて、その後転写物は乾燥する前に水ですすいだ。

【０１５５】

ウエスタンブロットにより、試験した全てのコンストラクトに関して、浸潤タバコ細胞中でＹＦＰ又はＧＦＰタンパク質が発現したという結果を示した。ＹＦＰ又はＧＦＰ抗体に反応したタンパク質バンドの存在が示唆しているように、浸潤タバコ植物の葉の組織の全てが、ＹＦＰ又はＧＦＰタンパク質を発現させ、かつ、ＹＦＰ又はＧＦＰ対照コンストラクトで浸潤させたタバコ植物の葉の組織から得られたＹＦＰ又はＧＦＰタンパク質バンドと同等の大きさであった。さらに、これら結果は、ＴｒａＰキメラ葉緑体輸送ペプチド（ＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７及びＴｒａＰ２８）がプロセッシングされ、かつ、ＹＦＰ又はＧＦＰタンパク質から切断されたことを示唆した。ＴｒａＰ－ＹＦＰ又はＧＦＰのコンストラクトは、対照であるＹＦＰ又はＧＦＰタンパク質よりも分子量が大きいものである予めプロセッシングされたタンパク質のバンドを表す。ウエスタンブロットにおいて対照であるＹＦＰ又はＧＦＰと同等の大きさであるバンドが存在するということは、ＴｒａＰ葉緑体輸送ペプチド配列（ＴｒａＰ１０、ＴｒａＰ１１、ＴｒａＰ１８、ＴｒａＰ１９、ＴｒａＰ２６、ＴｒａＰ２７及びＴｒａＰ２８）がプロセッシングされて、それによりＹＦＰ又はＧＦＰの対照と同等である分子量サイズまでＹＦＰ又はＧＦＰの大きさが低下したことを示唆する。

【０１５６】

実施例３：アラビドプシスにおける、昆虫耐性導入遺伝子発現のためのキメラ葉緑体輸送ペプチド（ＴｒａＰ）配列

Ｃｒｙ２Ａａ：

シロイヌナズナ（Arabidopsis thaliana）のＣｒｙ２Ａａタンパク質発現におけるＴｒａＰ１１キメラ葉緑体輸送ペプチドの効果を評価した。Ｃｒｙ２Ａａタンパク質と融合したＴｒａＰ１１キメラ葉緑体輸送ペプチドを含むトランスジェニックアラビドプシス（Arabidopsis）植物に、ソイビーンルーパー（soybean looper(SBL)）及びオオタバコガ（TBW）に対する昆虫耐性のアッセイを行った。

【０１５７】

ＴｒａＰ１１キメラ葉緑体輸送ペプチド配列を、植物発現コンストラクトｐＤＡＢ１０７５３８（図２４）にクローニングし、アラビドプシス（Arabidopsis）において試験した。Ｔｒａｐ１１（配列番号１８）キメラ葉緑体輸送ペプチド配列をコードする新しいポリヌクレオチド配列を合成して、プラスミドコンストラクトに組み込んだ。得られたコンストラクトは、２つの植物転写単位（ＰＴＵ）を含んだ。第１のＰＴＵは、シロイヌナズ

ナ（Arabidopsis thaliana）のＵｂｉｑｕｉｔｉｎ　１０プロモーター（ＡｔＵｂｉ１０プロモーター；Callisら（1990）J. Biol. Chem.、 265: 12486-12493）、ＴｒａＰ１１－ｃｒｙ２Ａａ融合遺伝子（Ｃｒｙ２Ａａ；配列番号１９）及びアグロバクテリウム・ツメファシエンス（Agrobacterium tumefaciens）のＯＲＦ　２３　３'非翻訳領域（ＡｔｕＯＲＦ２３　３’ＵＴＲ；米国特許第５，４２８，１４７号）により構成された。第２のＰＴＵは、キャッサバ葉脈モザイクウィルスプロモーター（ＣｓＶＭＶプロモーター；Verdaguerら（1996）Plant Molecular Biology、31: 1129-1139）、ｄｓｍ－２遺伝子（ＤＳＭ２；米国特許出願公開第２０１１／０１０７４５５号明細書）及びアグロバクテリウム・ツメファシエンス（Agrobacterium tumefaciens）のＯＲＦ　１　３'非翻訳領域（ＡｔｕＯＲＦ１　３’ＵＴＲ；Huangら（1990）J. Bacteriol.、172: 1814-1822）により構成された。コンストラクトｐＤＡＢ１０７５３８は、ＴｒａＰ１１キメラ葉緑体輸送ペプチドを含有する。ｃｒｙ２Ａａ遺伝子の上流に葉緑体輸送ペプチド配列を含まない対照プラスミド１０７６１７を構築し、この実施例に含めた（図２５）。上記コンストラクトは、制限酵素消化及び配列解析により確認した。最後に、コンストラクトを、アグロバクテリウム・ツメファシエンス（Agrobacterium tumefaciens）に形質転換して、グリセロールストックとして保存した。

【０１５８】

ｐＤＡＢ１０７５３８コンストラクトは、アグロバクテリウム・ツメファシエンス（Agrobacterium tumefaciens）媒介での植物形質転換を介して、シロイヌナズナ（Arabidopsis thaliana）に形質転換された。簡潔に、１２～１５のシロイヌナズナ（Arabidopsis thaliana）植物（コロンビア生態型、Ｃｏｌ－０）を、２５０μｍｏｌ／ｍ^{2}の光強度、２５℃で、明条件／暗条件を１８時間／６時間として、温室内の４インチ植木鉢中で成長させた。最初の花の茎を、形質転換の１週間前に切り取った。アグロバクテリウム接種物は、１００ｍｌのＬＢブロス（１００ｍｇ／Ｌスペクチノマイシン、５０ｍｇ／Ｌカナマイシン）中で、組み換えアグロバクテリウム（Agrobacterium）グリセロールストック１０μｌを２８℃でインキュベートし、７２時間、２２５ｒｐｍで振とうすることにより調製された。アグロバクテリウム（Agrobacterium）の培養物の量は分光計で測定し、細胞が、ＯＤ　６００が０．８に達したときに、遠心分離により細胞を収穫した。次に、該細胞は、５％のショ糖及び０．０４％のＳｉｌｗｅｔ－Ｌ７７（商標）及び１０μｇ／Ｌのベンズアミノプリン（ＢＡ（benzamino purine））よりなる浸潤培地（ｉｎｆｉｌｔｒａｔｉｏｎ　ｍｅｄｉｕｍ）３～４の量中に再懸濁した。植物の地上部分を、アグロバクテリウム（Agrobacterium）溶液に穏やかに攪拌しながら５～１０分間浸漬した。次いで、正常に成長させるために植物を温室に移し、定期的な水やりと施肥を行いながら、結実させた。

【０１５９】

約２００ｍｇのまとめたT_1種子を、セレクショントレイ（１０．５インチ×２１インチ×１インチの発芽トレイ（Ｔ．Ｏ．　Ｐｌａｓｔｉｃｓ　Ｉｎｃ社、ミネソタ州クリアウォーター））に均等に播種した。苗には、播種後５日、播種後１０日に再度、ＤｅＶｉｌｂｉｓｓ圧送式スプレーノズルを用いてグルホシネート除草剤（Liberty（商標））の０．２０％溶液（２０μｌ／１０ｍＬのｄH_2O）を散布量１０ｍｌ／トレイ（７０３Ｌ／ｈａ）で散布した。グルホシネートの二度目の散布後の４～７日の間に、耐除草剤植物を特定し、T_2種子生成のために移植した。得られたT_2種子を、以下に記載する実験に用いた。

【０１６０】

イベント毎にT_2種子の小分注（およそ１００～２００種子）を、４０ｍｌの０．１％アガロース溶液中に懸濁し、４℃で２４時間、低温湿層処理を行った。湿層処理した種子はその後、繁殖床中の４床の表面上に、１０ｍｌの種子をピペットで滴下することによって播種した。該床は、Ｓｕｎｓｈｉｎｅ　＃５土壌培地（Sunshine #5 soil media（商標））（Sun Gro社；ワシントン州ベルビュー）を敷きつめ、バーミキュライトの細粒で軽く覆った。播種前に、また必要であればその後に、ホーグランド肥料で飽和させた。播種後、湿度ドーム（humidity dome）を用いてトレイを覆い、その後２４℃、光照射期間１

６時間に設定したＣｏｎｖｉｒｏｎ（商標）育成チャンバー内にそれらを移した。電球及び蛍光灯により、光量２００ＰＡＲで光照射した。５日後、種子が発芽したため、ドームを除去した。形質転換体の第１の除草剤による淘汰（selection）は６日目であり、第２の除草剤に対しては、１０日目であった。ＤｅＶｉｌｂｉｓｓ噴霧器ハンドスプレーを用いて、２００ｇ　ａｉ／ｈａで除草剤Ｌｉｂｅｒｔｙ（商標）（すなわち、グルホシネートアンモニウム）を噴霧し、ヌル植物を除去した。予測のとおり、概ね２５％の植物がヌル植物であった。淘汰には野生型確認用の列も含まれており、それらは２回の除草剤散布後には死滅率が１００％であった。植物は、１４日で移植可能となった。バイオアッセイのため、イベント毎に１２の植物を採取し、Ｓｕｎｓｈｉｎｅ　＃５土壌を敷き詰めてバーミキュライトで軽く覆った３インチの植木鉢に移植した。そうした床には、移植前に、また必要であればその後に、ホーグランド肥料を予浸させた。移植した植物は、１４時間の補光で、２５℃に設定した空調を効かせていない温室中で成長させた。長角果の成長を、ハサミでの刈り取りで阻害したことにより、試験用の植物組織がより多く生成された。植物は１６～１８日でＤＮＡサンプリング可能となり、約２３日でバイオアッセイ可能となった。分子確認アッセイにより、推定トランスジェニック植物を選別し、特定されたイベントに対しては、タンパク質分析及びバイオアッセイ結果まで進めた。

【０１６１】

移植した植物は、視覚的に比較したところその一部の植物は野生型植物より小さかったが、概して健全な表現型を示した。アラビドプシス（Arabidopsis）コンストラクト毎の遺伝子複製数分析では、全てのコンストラクトに関して、対象とするｃｒｙ２Ａａ遺伝子の≧３コピーを有する植物が約５０％であり、該遺伝子の１～２コピーを有する植物が約５０％であるという類似した挿入結果を示した。

【０１６２】

T_1アラビドプシス（Arabidopsis）イベントのＣｒｙ２Ａａ発現レベルは、広範囲にわたった。タンパク質の検出は、Ｃｒｙ２Ａａタンパク質の発現を定量化するＥＬＩＳＡアッセイを用いて完了した。概して、タンパク質発現レベルは、イベント毎のＴ鎖挿入の複製数に相当する。Ｔ鎖複製数が多いイベント（例えば、＞３である挿入イベント）では、概してアラビドプシス（Arabidopsis）の形質転換イベントの両セット（例えば、ＴｒａＰを伴わないＣｒｙ２Ａａを発現するｐＤＡＢ１０７６１７イベントと、ＴｒａＰ１１キメラ葉緑体輸送ペプチドを伴うＣｒｙ２Ａａを発現するｐＤＡＢ１０７５３８イベント）に関して、Ｔ鎖複製数が少ないイベントよりも、タンパク質の平均発現レベルが高かった。

【０１６３】

T_2世代のアラビドプシス（Arabidopsis）植物では、T_1のアラビドプシス（Arabidopsis）植物の発現量の値と比べて減少した値でＣｒｙ２Ａａタンパク質を発現した。これら結果は、タンパク質発現量がイベントセットごとに可変であることを示唆した。試験した全ての植物イベントに関して、ホモ接合イベントより得たタンパク質の平均発現量レベルは、ヘミ接合イベントより得たタンパク質の平均発現量レベルよりも上回った（例えば、ＴｒａＰ［ｐＤＡＢ１０７６１７］を伴わないイベントとＴｒａＰ１１［ｐＤＡＢ１０７５３８］を伴うイベント）。Ｔ鎖挿入のコピーを２コピーよりも多く含むアラビドプシス（Arabidopsis）イベントは、１コピーのみを含むアラビドプシス（Arabidopsis）イベントよりも発現レベルが高かった。T_1からT_2世代でタンパク質発現レベルが低下するにもかかわらず、コンストラクト内のＴｒａＰ１１キメラ葉緑体輸送ペプチドの挿入は、結果としてＣｒｙ２Ａａタンパク質を発現するトランスジェニックアラビドプシスイベントとなった。

【０１６４】

T_1のアラビドプシス（Arabidopsis）イベントの両セットに、昆虫バイオアッセイ実験を行った。概して、より多量のＣｒｙ２Ａａタンパク質を発現する複製数の多いイベントは、複製数の少ないイベントと比べて、葉の損傷数が少ない結果となった。ＴｒａＰを伴わないＣｒｙ２Ａａを発現するアラビドプシス（Arabidopsis）イベントのＳＢＬ及び

ＴＢＷ（r^2＝０．４９［ＳＢＬ］、０．２３［ＴＢＷ］）と、ＴｒａＰ１１を伴うＣｒｙ２Ａａを発現するアラビドプシス（Arabidopsis）イベントのＳＢＬ及びＴＢＷ（r^2＝０．７５［ＳＢＬ］、０．１７［ＴＢＷ］）との両方に対する葉の保護と、タンパク質の発現との間に相関があった。結果としてのタンパク質発現量の増加が、葉の損傷に対する有意な保護を引き起こした（Ｐｒ＜０．０５）。

【０１６５】

アラビドプシス（Arabidopsis）植物は、ＴｒａＰ１１の及びＴｒａＰなしの両アラビドプシス（Arabidopsis）イベントにおいてＳＢＬによる損傷から保護された。ＴｒａＰ１１を伴うＣｒｙ２Ａａの発現及びＴｒａＰ１１を伴わないＣｒｙ２Ａａの発現では、最小のタンパク質発現量が、ＴｒａＰ１１：Ｃｒｙ２Ａａイベントに関しては約１．０ｎｇ／ｃｍ^2、ＴｒａＰなしのＣｒｙ２Ａａイベントに関しては約１．５ｎｇ／ｃｍ^{2}で、葉の損傷が３０％を下回る結果となった。アラビドプシス（Arabidopsis）イベントのＴｒａＰ１１を伴うＣｒｙ２Ａａの発現量及びＴｒａＰ１１を伴わないＣｒｙ２Ａａの発現量の評価では、最小のタンパク質発現量が、ＴｒａＰ１１アラビドプシス（Arabidopsis）イベントでは約１．１ｎｇ／ｃｍ^2、ＴｒａＰなしのアラビドプシス（Arabidopsis）イベントでは約２．０～２．５ｎｇ／ｃｍ^{2}で、葉の損傷が２０％を下回る結果となった。

【０１６６】

アラビドプシス（Arabidopsis）植物は、ＴｒａＰ１１の及びＴｒａＰなしの両アラビドプシス（Arabidopsis）イベントによって、ＴＢＷによる損傷から保護されていた。アラビドプシス（Arabidopsis）イベントより得られた植物材料を与えるとき、ＴＢＷ昆虫が、ＳＢＬ昆虫よりも、Ｃｒｙ２Ａａタンパク質に敏感に反応した。Ｃｒｙ２Ａａを約１．０及び１．５ｎｇ／ｃｍ^{2}とした低濃度のタンパク質濃度では、Ｃｒｙ２Ａａタンパク質が、ＴｒａＰ１１と組み合わせた場合と、ＴｒａＰなしの場合とでそれぞれ発現されたときに、葉の損傷が３０％未満であるという結果となった。２０％の葉の損傷であるカットオフポイントでは、ＴｒａＰ１１アラビドプシス（Arabidopsis）イベントによる葉の保護は、Ｃｒｙ２Ａａタンパク質約１．１ｎｇ／ｃｍ^{2}のレベルで得られ、一方で、ＴｒａＰを保有しなかったアラビドプシス（Arabidopsis）イベントでは、発現したＣｒｙ２Ａａタンパク質２．０～２．５ｎｇ／ｃｍ^{2}のレベルで得られた。

【０１６７】

ＴｒａＰ１１キメラ葉緑体輸送ペプチドは、シロイヌナズナ（Arabidopsis thaliana）におけるＣｒｙ２Ａａタンパク質の発現の効果を低下させなかった。Ｃｒｙ２Ａａタンパク質に融合したＴｒａＰ１１キメラ葉緑体輸送ペプチドを含有するトランスジェニックアラビドプシス（Arabidopsis）植物は、ソイビーンルーパー（ＳＢＬ）及びオオタバコガ（ＴＢＷ）に対する昆虫耐性をもたらすＣｒｙ２Ａａタンパク質を高いレベルで発現した。

【０１６８】

実施例４：アラビドプシスにおける除草剤耐性導入遺伝子の発現のためのキメラ葉緑体輸送ペプチド（ＴｒａＰ）配列

ＤＧＴ２８：

シロイヌナズナ（Arabidopsis thaliana）での、ＤＧＴ２８（国際特許出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１３／０２４４８８号明細書）タンパク質発現におけるＴｒａＰ２６及びＴｒａＰ２７のキメラ葉緑体輸送ペプチドの効果を評価した。ＤＧＴ２８タンパク質に融合したＴｒａＰ２６キメラ葉緑体輸送ペプチド又はＴｒａＰ２７キメラ葉緑体輸送ペプチドのいずれかを含有するトランスジェニックアラビドプシス（Arabidopsis）植物について、グリホサートの噴霧に対する除草剤耐性に関するアッセイを行った。

【０１６９】

ＴｒａＰ２６キメラ葉緑体輸送ペプチド配列を、植物発現コンストラクトｐＤＡＢ１１４２８６（図２６）に対してクローニングし、アラビドプシス（Arabidopsis）において試験した。得られたコンストラクトは、２つの植物転写単位（ＰＴＵ）を含んだ。第１のＰＴＵは、シロイヌナズナ（Arabidopsis thaliana）のＵｂｉｑｕｉｔｉｎ　１０プロモ

ーター（ＡｔＵｂｉ１０プロモーター；Callisら（1990）J. Biol. Chem.、265: 12486-12493）、ＴｒａＰ２６－ｄｇｔ２８融合遺伝子（ＴｒａＰ２６－ＤＧＴ２８；配列番号２７）及びアグロバクテリウム・ツメファシエンス（Agrobacterium tumefaciens）のＯＲＦ　２３　３’非翻訳領域（ＡｔｕＯＲＦ２３　３’ＵＴＲ；米国特許第５，４２８，１４７号）により構成された。第２のＰＴＵは、キャッサバ葉脈モザイクウィルスプロモーター（ＣｓＶＭＶプロモーター；Verdaguerら（1996）Plant Molecular Biology、31: 1129-1139）、ｄｓｍ－２　遺伝子（ＤＳＭ２；米国特許出願公開第２０１１／０１０７４５５号明細書）及びアグロバクテリウム・ツメファシエンス（Agrobacterium tumefaciens）のＯＲＦ　１　３’非翻訳領域（ＡｔｕＯＲＦ１　３’ＵＴＲ；Huangら（1990）J. Bacteriol.、 172: 1814-1822）により構成された。コンストラクトｐＤＡＢ１１４２８６は、ＴｒａＰ２６キメラ葉緑体輸送ペプチドを含有する。

【０１７０】

ＴｒａＰ２７キメラ葉緑体輸送ペプチド配列を植物発現コンストラクトｐＤＡＢ１１４２８７（図２７）にクローニングし、アラビドプシス（Arabidopsis）において試験した。得られたコンストラクトは、２つの植物転写単位（ＰＴＵ）を含んだ。第１のＰＴＵは、シロイヌナズナ（Arabidopsis thaliana）のＵｂｉｑｕｉｔｉｎ　１０プロモーター（ＡｔＵｂｉ１０プロモーター；Callisら（1990）J. Biol. Chem.、 265: 12486-12493）、ＴｒａＰ２７－ｄｇｔ２８融合遺伝子（ＴｒａＰ２７－ＤＧＴ２８；配列番号２８）及びアグロバクテリウム・ツメファシエンス（Agrobacterium tumefaciens）のＯＲＦ　２３　３’非翻訳領域（ＡｔｕＯＲＦ２３　３’ＵＴＲ；米国特許第５，４２８，１４７号）により構成された。第２のＰＴＵは、キャッサバ葉脈モザイクウィルスプロモーター（ＣｓＶＭＶプロモーター；Verdaguerら（1996）Plant Molecular Biology、31: 1129-1139）、ｄｓｍ－２遺伝子（ＤＳＭ２；米国特許出願公開第２０１１／０１０７４５５号明細書）及びアグロバクテリウム・ツメファシエンス（Agrobacterium tumefaciens）のＯＲＦ　１　３’非翻訳領域（ＡｔｕＯＲＦ１　３’ＵＴＲ；Huangら（1990）J. Bacteriol.、172: 1814-1822）により構成された。コンストラクトｐＤＡＢ１１４２８７は、ＴｒａＰ２７キメラ葉緑体輸送ペプチドを含有する。

【０１７１】

両コンストラクトは、制限酵素消化及び配列解析により確認した。コンストラクトを、アグロバクテリウム・ツメファシエンス（Agrobacterium tumefaciens）に形質転換して、グリセロールストックとして保存した。最後に、コンストラクトを、上記に記載したアグロバクテリウム（Agrobacterium）の形質転換法により、シロイヌナズナ（Arabidopsis thaliana）に形質転換した。

【０１７２】

植物形質転換：

新たに収穫したｄｇｔ－２８及びＤＳＭ－２の発現カセットを含有するトランスジェニックＴ$_1$種子を、室温で７日間乾燥させた。Ｔ$_1$種子を、２６．５×５１ｃｍの発芽トレイのそれぞれに、予め４０ｍｌの０．１％アガロース溶液中に懸濁した、湿層処理済みのＴ$_1$種子（～１０，０００種子）を２００ｍｇで分注して播種し、４℃で２日間保存し、休眠のための要件を完全にして種子の同時発芽を確実にした。

【０１７３】

Ｓｕｎｓｈｉｎｅ　Ｍｉｘ　ＬＰ５土壌（Sunshine Mix LP5 soil（商標））をバーミキュライトの細粒で覆い、湿るまでホーグランド溶液で地下灌漑し、その後重力排水した。バーミキュライト上に、湿層処理済みの種子を各４０ｍｌの分注で、ピペットを用いて均等に播種し、４日から５日間湿度ドームで覆った。グルホシネート出芽後散布スプレーを用いての最初の形質転換体の淘汰（同時形質転換したｄｓｍ－２遺伝子に関する選択）の１日前に、ドームを除去した

【０１７４】

播種７日後（７ＤＡＰ(days after planting)）と、播種１１日後（１１ＤＡＰ）に再度、Ｔ$_1$植物（それぞれ子葉期、２～４葉期）に、Ｌｉｂｅｒｔｙ（商標）除草剤（２０

０ｇ　ａｉ／Ｌのグルホシネート（Ｂａｙｅｒ　Ｃｒｏｐ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ社、ミズーリ州カンザスシティ）の０．２％溶液を１０ｍｌ／トレイ（７０３Ｌ／ｈａ）の散布量で、ＤｅＶｉｌｂｉｓｓ圧送式スプレーノズルを用いて散布し、１散布につき２８０ｇ　ａｉ／ｈａのグルホシネートの有効量を行き渡らせた。最終散布の４～７日後に、生存植物（活発に成長中の植物）を特定し、培養土（Ｍｅｔｒｏ　Ｍｉｘ　３６０（商標））で準備した３インチ植木鉢に独立に移植した。移植した植物は、３日から４日間湿度ドームで覆い、温室に移す前に２２℃の成長チャンバー内に配置させるか、又は直接温室に移動させた。その後ドームを除去し、温室内で植物を栽培した（２２±５℃、５０±３０％ＲＨ、明条件１４時間：暗条件１０時間、最小値５００μＥ／m^2 s^1の自然光＋補光）。生存しているT_1植物に対して分子確認分析を完了させ、グリホサート耐性遺伝子が、植物のゲノムに安定的に組み込まれていることを確認した。

【０１７５】

分子確認

ｐＤＡＢ１１４２８６及びｐＤＡＢ１１４２８７で形質転換されたアラビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）植物のゲノム内に、ｄｇｔ－２８及びｄｓｍ－２導入遺伝子が存在していることを確認した。これらポリヌクレオチド配列の存在は、加水分解プローブ、遺伝子発現カセットＰＣＲ（植物転写単位ＰＣＲ、ＰＴＵ　ＰＣＲとも説明される）、ウエスタンブロット及びＥＬＩＳＡ分析を介して確認した。

【０１７６】

はじめに、T_1のアラビドプシス（Arabidopsis）植物を選別し、ｄｇｔ－２８及びｄｓｍ－２導入遺伝子ならびに及びＡｔＵｂｉ１０プロモーターの存在を確認した。遺伝子発現カセットＰＣＲを介してイベントを選別して、ｄｇｔ発現カセットが、再配列することなく、完全に植物ゲノムに組み込まれているかどうかを判断する。次に、ＴＡＱＭＡＮ（商標）に類似の加水分解プローブアッセイを介して、T_1のアラビドプシス（Arabidopsis）植物を選別した。これら実験より生じたデータを用いて、導入遺伝子の複製数を判定し、自己施肥及びT_2世代への成長の点で、選択されるアラビドプシス（Arabidopsis）イベントを特定する。以下に記載する加水分解プローブアッセイを用いて、T_1のアラビドプシス（Arabidopsis）植物において、複製数を判定した。導入遺伝子数が変化する植物を特定し、その後のグリホサート耐性実験に進めた。

【０１７７】

組織サンプルを、９６ウェルプレートに収集し、２日間凍結乾燥させた。ＫＬＥＣＯ（商標）組織破砕機及びタングステンビーズ（Ｅｎｖｉｒｏｎ　Ｍｅｔａｌ　ＩＮＣ社、オレゴン州スウィートホーム）を用いて、新しい組織を軟化（maceration）させた。組織を軟化後、Ｂｉｏｓｐｒｉｎｔ　９６　Ｐｌａｎｔ　ｋｉｔ（商標）（Ｑｉａｇｅｎ社、メリーランド州ジャーマンタウン）を用いて、製造元が推奨するプロトコルに従って、ゲノムＤＮＡをハイスループット形式で単離した。単離後、ｇＤＮＡはスタンダード希釈１：３で希釈した。加水分解プローブアッセイによる導入遺伝子複製数の判定は、ＬＩＧＨＴＣＹＣＬＥＲ（登録商標）４８０システム（Ｒｏｃｈｅ　Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｓｃｉｅｎｃｅ社、インディアナ州インディアナポリス）を用いてリアルタイムＰＣＲで行った。アッセイは、ｄｓｍ－２、ＡｔＵｂｉ１０及び内部標準遺伝子ＴＡＦＩＩ１５（Ｇｅｎｂａｎｋ　ＩＤ：　ＮＣ　００３０７５；Duarteら、BMC Evol. Biol.、10:61）に関して設計した。

【０１７８】

増幅のために、ＬｉｇｈｔＣｙｃｌｅｒ（登録商標）４８０　Ｐｒｏｂｅｓ　Ｍａｓｔｅｒミックス（Ｒｏｃｈｅ　Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｓｃｉｅｎｃｅ社、インディアナ州インディアナポリス）を、ｄｓｍ－２及びＡｔＵｂｉ１０の各プライマーを０．１μＭ、ＴＡＦＩＩ１５の各プライマーを０．４μＭならびに各プローブを０．２μＭ含有する、１０μＬ量のマルチプレックス反応液中、１ｘの最終濃度で調製した（表１）。６０℃で４０秒間伸長して、蛍光取得しながら、二段階増幅反応を行った。全てのサンプルに対して行い、各サンプルを分析するために、平均サイクル数（cycle threshold）（Ｃｔ）の値を用

いた。リアルタイムＰＣＲデータの分析は、相対定量モジュール（relative quant module）を用いる、ΔΔＣｔ法に基づくＬｉｇｈｔＣｙｃｌｅｒ ｓｏｆｔｗａｒｅ ｒｅｌｅａｓｅ １．５（商標）を用いて行った。このため、１コピーの標準物質及び既知の２コピーの確認用物質よりのゲノムＤＮＡのサンプルを、各走査に含ませた。T_1トランスジェニックアラビドプシス（Arabidopsis）植物に関して、加水分解プローブスクリーニングの複製数結果が決定された。

【０１７９】

表１．ｄｓｍ－２、ＡｔＵｂｉ１０及び内部標準遺伝子（ＴＡＦＩＩ１５）の加水分解プローブアッセイに関するプライマー及びプローブ情報

【表１】

プライマー名	配列
DSM2A(配列番号29)	5’AGCCACATCCCAGTAACGA 3’
DSM2S(配列番号30)	5’CCTCCCTCTTTGACGCC 3’
DSM2 Cy5プローブ（配列番号31）	5’CAGCCCAATGAGGCATCAGC 3’
AtUbi10v2Set5-F（配列番号32）	5’CTTCACCGCCTTAGCTTTCT 3’
AtUbi10v2Set5-R（配列番号33）	5’GTGAAGAAGAAGCTTTGGGTATTG 3’
AtUbi10v2Set5-FAM（配列番号34）	5’CGTGACCTAGTCGTCCTCGTCTTT 3’
TAFFY-HEX プローブ（配列番号35）	5’AGAGAAGTTTCGACGGATTTCGGGC 3’
TAFII15-F（配列番号36）	5’GAGGATTAGGGTTTCAACGGAG 3’
TAFII15-R（配列番号37）	5’GAGAATTGAGCTGAGACGAGG 3’

【０１８０】

ウエスタンブロットを完了して、トランスジェニックシロイヌナズナ（Arabidopsis thaliana）植物から得た葉サンプル中の発現したＤＧＴ－２８タンパク質を検出した。Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ（商標）装置及び基本試薬と共に、従来の電気泳動法及びブロッティング法を用いた。Gallagher S、Winston S、Fuller S、Hurrell J、“Immunoblotting and Immunodetection” Current Protocols in Immunology 8.10.1 - 8.10.28, November 2008。抗ウサギ抗体蛍光（Ｃｙ３）検出システムにより、一次抗体としてウサギの抗ＤＧＴ－２８抗体を用いて、ＤＧＴ－２８タンパク質を発現したトランスジェニック陽性イベントを検出した。インタクトなＤＧＴ－２８タンパク質の生成により、ウエスタンブロットを介して、アッセイを行ったトランスジェニック植物が、適切な分子量でＤＧＴ－２８タンパク質を発現したということが示唆された。ウエスタンブロットにより、異なる分子量である２つのタンパク質バンドを含むことが観察された。この２つのバンドは、葉緑体輸送ペプチドのｄｇｔ－２８導入遺伝子からの切断で得られた、低分子量のプロセッシングされた第１のＤＧＴ－２８タンパク質と、プロセッシングされておらず、かつ、葉緑体輸送ペプチド配列の切断で得られたのではない、大きい完全長の第２のＴｒａＰ：：ＤＧＴ－２８タンパク質とにより構成されているという仮説を立てた。

【０１８１】

ＥＬＩＳＡアッセイを用いて、ウエスタンブロットによりトランスジェニックイベントを特定し、かつ、ｑＰＣＲアッセイが導入遺伝子を表したということを確認した。直径６ｍｍの２つの葉サンプルを収集し、９６ウェルクラスターチューブラックに移した。次に２つのＤａｉｓｙ（商標）スチールＢＢ及び２００μｌの抽出バッファー（１％Ｂｒｉｊ

（商標）０．５ｇ／５００ｍｌ、プロテアーゼ阻害剤５μｌ／ｍｌを含んだ、５０ｍＭ ＨＥＰＥＳ５．９７ｇ／５００ｍｌのバッファー（ｐＨ７．５））を各チューブに加えた。サンプルは、最大設定値で、ＫＬＥＣＯ（商標）組織破砕機で３分間粉砕した。サンプルを３，０００×ｇで５分間遠心分離し、１００μｌの上澄みを空の試験管に移した。１００μｌの別の抽出バッファーを植物サンプルに加えて、さらに３分間ビーズミルにかけて、遠心分離し、この抽出物１００μｌを、第１の溶液１００μｌと合わせた。合わせた上澄みを攪拌し、集めて同日に分析した。

【０１８２】

ＥＬＩＳＡアッセイのために、モノクローナル抗体を成長させた。キャプチャー抗体クローンＳＷ４－８Ｆ１１を、マキシソーププレート上に、ＰＢＳ中２μｇ／ｍｌで被覆し、４℃で一晩インキュベートした。その後、プレートをＰＢＳ（１０Ｘストック）、Ｔｗｅｅｎ（登録商標）－２０を用いて、４ウェル量の該バッファーで洗浄した。ＥＬＩＳＡプレートは、ＰＢＳ（１０Ｘストック）、Ｔｗｅｅｎ（登録商標）－２０及び２％魚肉ゼラチンを、ウェル毎に２００μｌ用いて、室温で２時間ブロッキングした。プレートをＰＢＳ（１０Ｘストック）及びＴｗｅｅｎ（登録商標）－２０を用いて、４ウェル量の該バッファーで洗浄した。サンプルは、上記に記載したように、かつ、以下のバッファー中で、２倍希釈で６０ｎｇ／ｍｌから０．９４ｎｇ／ｍｌで標準曲線を与えるように調整した。１％Ｂｒｉｊ（商標）０．５ｇ／５００ｍｌ、プロテアーゼ阻害剤５μｌ／ｍｌを含んだ、５０ｍＭ ＨＥＰＥＳ５．９７ｇ／５００ｍｌのバッファー（ｐＨ７．５）。サンプル及び標準物質を、ウェル毎に１００μｌ加え、室温で２時間振とうした。その後プレートをＰＢＳ（１０Ｘストック）及びＴｗｅｅｎ（登録商標）－２０を用いて、４ウェル量の該バッファーで洗浄した。ペルオキシダーゼと結合した検出抗体クローンＳＷ４－１８Ｆ５を、濃度１μｇ／ｍｌでウェル毎に１００μｌそれぞれ加え、室温で１時間インキュベートした。プレートをＰＢＳ（１０Ｘストック）及びＴｗｅｅｎ（登録商標）－２０を用いて、４ウェル量の該バッファーで洗浄した。ＴＭＢ（商標）（Ｐｉｅｒｃｅ社）基質をウェル毎に１００μｌ加え、およそ１０分間インキュベートするか、又は適切な呈色になるまでインキュベートした。呈色は、ウェル毎に１００μｌの０．４ＭのH_2SO_4を加えて停止させた。Ｓｏｆｔｍａｘ（商標）ソフトウェアを用いて、プレートを４５０ｎｍで読み込んだ。１コピーのT_1イベントより得られたＥＬＩＳＡデータは、標準偏差＋／－３３ｎｇ／ｃｍ^{2}で、ＤＧＴ－２８タンパク質の発現が平均７７ｎｇ／ｃｍ^{2}を示した。

【０１８３】

グリホサート耐性

はじめに、グルホシネートの選択スキームを用いて、非形質転換種子のバックグラウンドから、アラビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）のT_1形質転換体（ｐＤＡＢ１１４２８６又はｐＤＡＢ１１４２８７による形質転換より）を選択した。各T_1コンストラクトに関して、３床又は５０，０００種子を分析した。選択されたT_1植物の分子を同定（上記に記載したように）し、ある範囲の複製数をもつイベントに対して、様々な量の市販のグリホサートを散布した。

【０１８４】

ｄｇｔ－２８の導入遺伝子を含有するトランスジェニックT_1アラビドプシス（Arabidopsis）植物に、異なる量のグリホサートを散布した。この実験において、散布量を増加させて、抵抗性の相対レベルを決定した（４２０、８４０、１，６８０又は３，３６０ｇ ａｅ／ｈａ）。通常の１Ｘフィールドのグリホサート使用量は、１１２０ｇ ａｅ／ｈａである。これらの植物の反応を、散布後２週間（２ＷＡＴ（2 weeks after treatment））の、視認される損傷のパーセンテージ（％）で提示している。この実験に用いたT_1アラビドプシス（Arabidopsis）植物は、ｄｇｔ－２８導入遺伝子に関して可変の複製数をもつものである。低複製数のｄｇｔ－２８のT_1アラビドプシス（Arabidopsis）植物は、自己受粉して、T_2植物の生成に用いた。表２は、ｄｇｔ－２８導入遺伝子植物間と、それに次ぐ野生型（非トランスジェニック）対照との比較を示す。

【０１８５】
提示したデータは、個々の損傷がない又は損傷がほぼない植物（＜２０％）、中程度の損傷の植物（２０～４０％）又は過度の損傷の植物（＞４０％）をそれぞれ示している。アラビドプシス（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）の形質転換に用いたコンストラクト毎に、単純平均及び標準偏差を提示している。量及び形質転換毎に、最後の列に個々の応答の範囲もまた提示している。野生型、非形質転換シロイヌナズナ（Arabidopsis thaliana）ｃ．ｖ．Ｃｏｌｕｍｂｉａは、グリホサートに対して敏感に反応する対照としての機能を果たした。

【０１８６】
グリホサート散布に対する植物応答レベルは、様々であった。この差異は、各植物が、独立の形質転換イベントを表しており、それにより対象とする遺伝子の複製数が植物間で様々であるという事実に起因するものであり得る。しかしながら、データは、ＴｒａＰ２６及びＴｒａＰ２７の葉緑体輸送ペプチド配列と連結したｄｇｔ－２８がグリホサートに対する保護をもたらすということを示している。

【０１８７】
表２　ある範囲の出芽後散布グリホサート量に応答する、ｄｇｔ－２８で形質転換したT_1アラビドプシス（Arabidopsis）の非形質転換対照との比較。視認できる損傷のパーセンテージ（％）を、グリホサート散布後１４日間記録した。

【表２】

TraP26:: dgt-28 (pDAB114286)	損傷範囲%(複製数)			損傷分析%		
散布量	<20%	20-40%	>40%	平均	標準偏差:	範囲(%)
グリホサート 0 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
グリホサート 420 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
グリホサート 840 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
グリホサート 1680 g ae/ha	4	0	0	10.0	0.0	10
グリホサート 3360 g ae/ha	3	1	0	16.3	2.5	15-20
TraP27:: dgt-28 (pDAB114287)	損傷範囲%(複製数)			損傷分析%		
散布量	<20%	20-40%	>40%	平均	標準偏差:	範囲(%)
グリホサート 0 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
グリホサート 420 g ae/ha	3	1	0	19.0	8.2	10-30
グリホサート 840 g ae/ha	3	1	0	15.8	4.3	10-20
グリホサート 1680 g ae/ha	1	3	0	18.8	2.5	15-20
グリホサート 3360 g ae/ha	0	4	0	25.0	0.0	25
WT(非形質転換対照)	損傷範囲%(複製数)			損傷分析%		
散布量	<20%	20-40%	>40%	平均	標準偏差:	範囲(%)
グリホサート 0 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
グリホサート 420 g ae/ha	0	0	4	100.0	0.0	100
グリホサート 840 g ae/ha	0	0	4	100.0	0.0	100
グリホサート 1680 g ae/ha	0	0	4	100.0	0.0	100
グリホサート 3360 g ae/ha	0	0	4	100.0	0.0	100

【配列表フリーテキスト】

【０１８８】

添付の配列表に列記される核酸配列は、３７ Ｃ．Ｆ．Ｒ． §１．８２２に規定されるヌクレオチド塩基に対する標準的な略号を使用して示されている。添付の配列表には、各核酸配列の一方の鎖のみが示されているが、表示されている鎖を任意に参照することにより相補鎖も含まれるものと理解される。添付の配列表において：

配列番号１は、ＴｒａＰ１０のアミノ酸配列を示している。

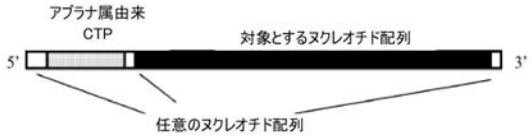
配列番号２は、ＴｒａＰ１１のアミノ酸配列を示している。

配列番号３は、ＴｒａＰ１７のアミノ酸配列を示している。

配列番号４は、ＴｒａＰ１８のアミノ酸配列を示している。

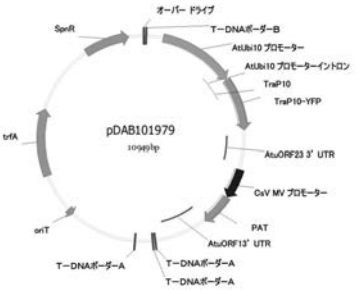
配列番号５は、ＴｒａＰ１９のアミノ酸配列を示している。
配列番号６は、ＴｒａＰ２６のアミノ酸配列を示している。
配列番号７は、ＴｒａＰ２７のアミノ酸配列を示している。
配列番号８は、ＴｒａＰ２８のアミノ酸配列を示している。
配列番号９は、ＴｒａＰ１０のポリヌクレオチド配列を示している。
配列番号１０は、ＴｒａＰ１１のポリヌクレオチド配列を示している。
配列番号１１は、ＴｒａＰ１７のポリヌクレオチド配列を示している。
配列番号１２は、ＴｒａＰ１８のポリヌクレオチド配列を示している。
配列番号１３は、ＴｒａＰ１９のポリヌクレオチド配列を示している。
配列番号１４は、ＴｒａＰ２６のポリヌクレオチド配列を示している。
配列番号１５は、ＴｒａＰ２７のポリヌクレオチド配列を示している。
配列番号１６は、ＴｒａＰ２８のポリヌクレオチド配列を示している。

【図１】

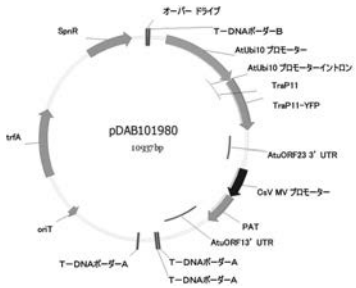


【図２】

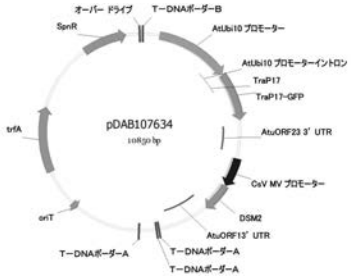
【図３】



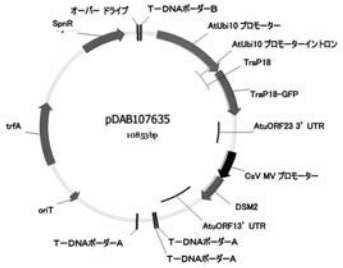
【図４】



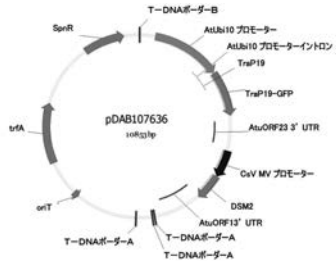
【図５】



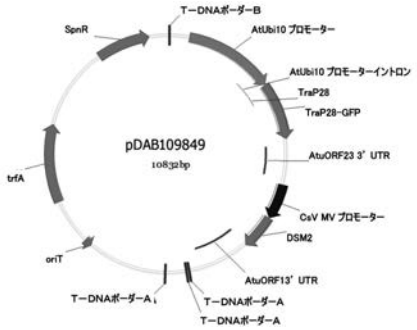
【図６】



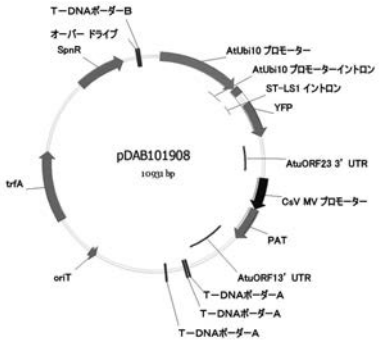
【図７】



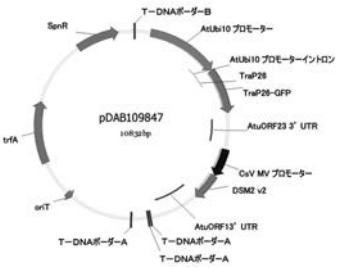
【図１０】



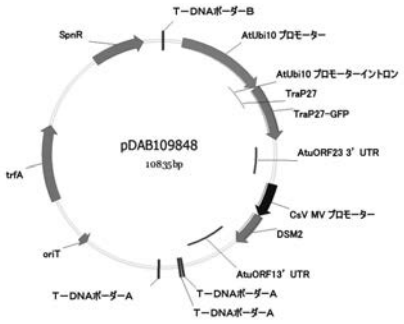
【図１１】



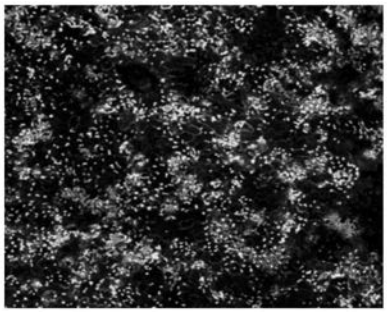
【図８】



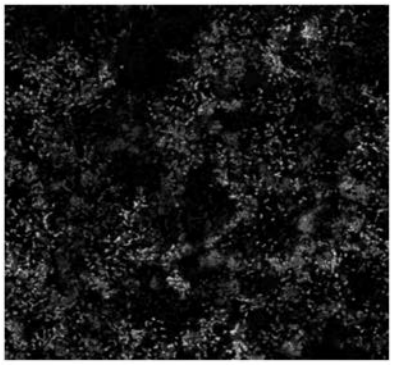
【図９】



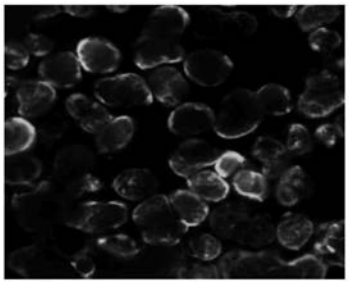
【図１２】



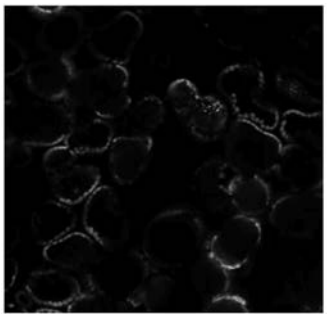
【図１３】



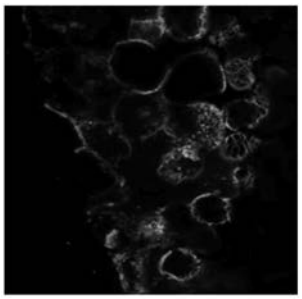
【図１４】



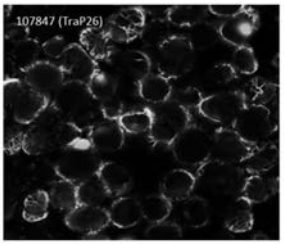
【図１５】



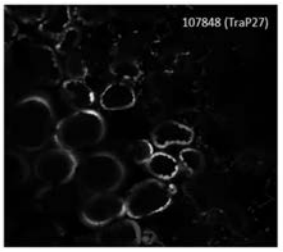
【図１６】



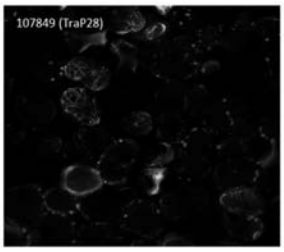
【図１７】



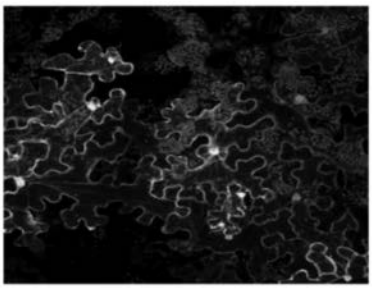
【図１８】



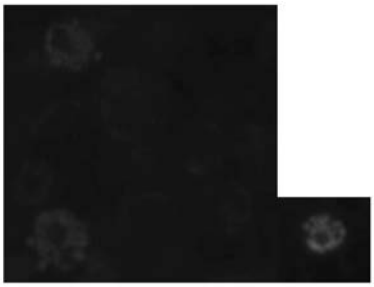
【図１９】



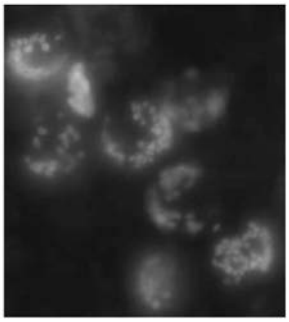
【図２０】



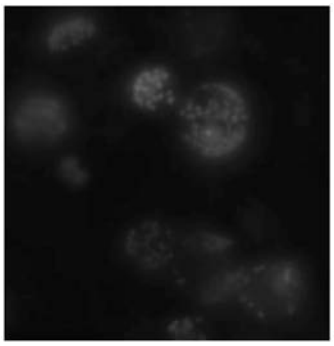
【図２１】



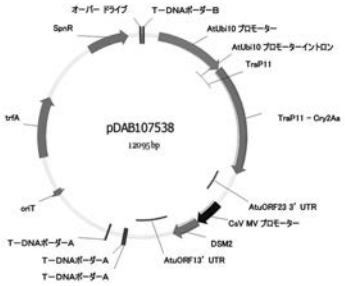
【図２２】



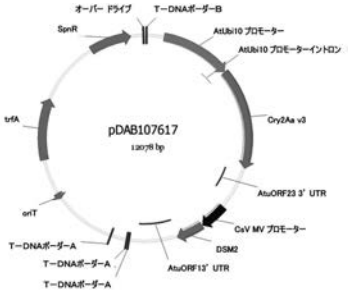
【図２３】



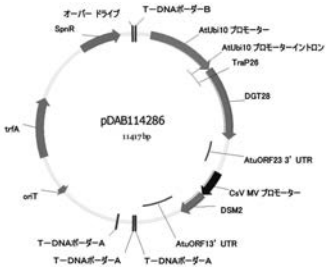
【図２４】



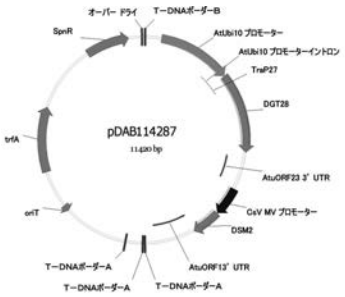
【図２５】



【図２６】



【図２７】



【配列表】
2018523480000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US16/47355

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - A01H 1/00, 3/00, 5/00, 5/10; C12N 1/21, 5/10, 15/29, 15/63; C07K 14/415 (2016.1)
CPC - C07K 14/415; C12N 5/00, 5/10, 15/00, 15/63; A01H 1/00, 3/00, 5/00, 5/10
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC: A01H 1/00, 3/00, 5/00, 5/10; C12N 1/21, 5/10, 15/29, 15/63; C07K 14/415 (2016.1)
CPC:C07K 14/415; C12N 5/00, 5/10, 15/00, 15/63; A01H 1/00, 3/00, 5/00, 5/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
PatSeer (US, EP, WO, JP, DE, GB, CN, FR, KR, ES, AU, IN, CA, INPADOC Data); Google Scholar; EBSCO; PubMed; Lens.org; NCBI BLAST; EMBL; Terms: chloroplast, plant, transgenic, vector, EPSPS, resistance, insect, herbicide

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2013/158766 A1 (DOW AGROSCIENCES LLC) 24 October 2013; page 3, line 33; page 8, line 17; page 12, line 28; page 28, 9-12; page 44, line 10; page 53, line 9	1-2, 5, 8-49, 50/48-49
A	(GASSER, C et al.) A Brassica napus Gene Encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate Synthase. Nucleic Acids Research. 5 March 1990, Vol. 18, No. 9; page 2821; page 2821, 1st column, 1st paragraph; Genbank supplement page 1	1-2, 5, 8-47
A	US 2013/0210114 A1(DOW AGROSCIENCES LLC) 15 August 2013; Figure 2	1-2, 5, 8-47 48-49, 50/48-49
A	US 2013/0295638 A1 (DOW AGROSCIENCES LLC) 7 November 2013; paragraphs [0011], [0135]-[0136], [0193]	48-49, 50/48-49
A	US 2013/0205440 A1 (DOW AGROSCIENCES LLC) 8 August 2013; paragraph [0011]], [0017], [0043], [0101], and [0160]	48-49, 50/48-49
A	(UMEZAWA, T et al.) Sequencing and Analysis of Approximately 40 000 Soybean cDNA Clones from a Full-Length-Enriched cDNA Library. DNA Research. 16 October 2008, Vol. 15, No. 6; pages 333-346; Genbank Supplement pages 1-2; DOI: 10.1093/dnares/dsn024	

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
14 December 2016 (14.12.2016)	13 JAN 2017
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US16/47355

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
-***-Please See Supplemental Page-***-

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Groups I+, Claims 1-56(in-part); and SEQ ID NOs: 1 and 9

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/US16/47355

-***-Continued from Box No. III: Observations where unity of invention is lacking-***-

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

Groups I+, Claims 1-56; and SEQ ID NOs: 1 and 9 are directed toward a chimeric nucleic acid molecule encoding peptides that are targeted to chloroplasts of higher plants; a method of producing transgenic plant material and use of said transgenic material.

The peptides will be searched to the extent that they encompasses SEQ ID NO: 1 (first exemplary TraP amino acid sequence) and SEQ ID NO: 9 (first exemplary TraP polynucleotide sequence). Applicant is invited to elect additional TraP amino acid and corresponding polynucleotide sequence(s), each with specified SEQ ID NO, to be searched. Additional TraP sequence(s) will be searched upon the payment of additional fees. It is believed that claims 1 (in-part), 2 (in-part), 5 (in-part), 8 (in-part), 9 (in-part), 10 (in-part), 11 (in-part), 12 (in-part), 13 (in-part), 14 (in-part), 15 (in-part), 16 (in-part), 17 (in-part), 18 (in-part), 19 (in-part), 20 (in-part), 21 (in-part), 22 (in-part), 23 (in-part), 24 (in-part), 25 (in-part), 26 (in-part), 27 (in-part), 28 (in-part), 29 (in-part), 30 (in-part), 31 (in-part), 32 (in-part), 33 (in-part), 34 (in-part), 35 (in-part), 36 (in-part), 37 (in-part), 38 (in-part), 39 (in-part), 40 (in-part), 41 (in-part), 42 (in-part), 43 (in-part), 44 (in-part), 45 (in-part), 46 (in-part), 47 (in-part), 48 (in-part), and 49 (in-part), 50 (in-part) encompass this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass SEQ ID NO: 1 (TraP amino acid sequence) and SEQ ID NO: 9 (TraP polynucleotide sequence). Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be SEQ ID NO: 2 (first exemplary elected TraP amino acid sequence) and SEQ ID NO: 10 (first elected exemplary TraP polynucleotide sequence).

No technical features are shared between the peptide sequences of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Groups I+ share the technical features including: a chimeric nucleic acid molecule comprising: a nucleotide sequence that encodes a peptide of less than 73 amino acids in length, wherein the peptide is operably linked in frame to a nucleotide coding sequence of interest; a polypeptide encoded by said nucleic acid molecule; a plant expression vector comprising said nucleic acid molecule; a plant material comprising said chimeric nucleic acid molecule; a method for producing a transgenic plant material, the method comprising: obtaining said chimeric nucleic acid molecule; and transforming a plant material with the nucleic acid molecule; a transgenic plant material produced by said method; a transgenic plant regenerated from said plant material; a transgenic plant commodity product produced from said plant material; use of a transgenic plant seed, operably linked in frame to a nucleotide coding sequence of interest, characterized in that it is to plant a field of insect resistant plants; use of a transgenic plant seed, operably linked in frame to a nucleotide coding sequence of interest, characterized in that it is to plant a field of herbicide resistant plants.

However, these shared technical features are previously disclosed by WO 2013/158766 A1 (DOW AGROSCIENCES LLC.) (hereinafter 'Dow'766') in view of WO 2011/075588 A1 (DOW AGROSCIENCES LLC.) (hereinafter 'Dow'588').

Dow'766 discloses a chimeric nucleic acid molecule (page 4, lines 10-22; claim 18) comprising: a nucleotide sequence that encodes a peptide of less than 73 amino acids in length (a nucleotide sequence that encodes a peptide of less than 73 amino acids in length; page 4, lines 10-22; page 26, lines 19-25; Figure 18), wherein the peptide is operably linked in frame to a nucleotide coding sequence of interest (wherein the peptide is operably linked in frame to a nucleotide coding sequence of interest; page 21, lines 17-19); a polypeptide encoded by said nucleic acid molecule (a polypeptide encoded by said nucleic acid molecule; page 4, lines 2-22; claim 19); a plant expression vector comprising said nucleic acid molecule (a plant expression vector comprising said nucleic acid molecule; claim 30); a plant material comprising said chimeric nucleic acid molecule (a plant material comprising said chimeric nucleic acid molecule; claim 31); a method for producing a transgenic plant material (a method for producing a transgenic plant material; claim 39), the method comprising: obtaining said chimeric nucleic acid molecule (the method comprising: obtaining said chimeric nucleic acid molecule; claim 39); and transforming a plant material with the nucleic acid molecule (and transforming a plant material with the nucleic acid molecule; claim 39); a transgenic plant material produced by said method (a transgenic plant material produced by said method; claim 42); a transgenic plant regenerated from said plant material (a transgenic plant regenerated from said plant material; claim 44); a transgenic plant commodity product produced from said plant material (a transgenic plant commodity product produced from said plant material; claim 45); and use of a transgenic plant seed (use of de-husked ears from Zea mays comprising Cry2a (transgenic plant seed); page 121, lines 1-4), operably linked in frame to a nucleotide coding sequence of interest (wherein the peptide is operably linked in frame to a nucleotide coding sequence of interest; page 21, lines 17-19); use of a transgenic plant seed (page 97, lines 4-12), operably linked in frame to a nucleotide coding sequence of interest (wherein the peptide is operably linked in frame to a nucleotide coding sequence of interest; page 21, lines 17-19), characterized in that it is to plant a field of herbicide resistant plants (characterized in that it is to plant a field of glyphosate (herbicide) resistant plants; page 97, lines 4-12; Table 22).

Dow'766 does not disclose a transgenic plant seed characterized in that it is to plant a field of insect resistant plants.

Dow'588 discloses use of a transgenic plant seed characterized in that it is to plant a field of insect resistant plants (claim 16).

It would have been obvious to one of ordinary skill in the art at the time of the invention to modify the disclosure of Dow'766, to include a transgenic plant seed characterized in that it is to plant a field of insect resistant plants, as disclosed by Dow'588, for producing plant materials that produce plants comprising chloroplast transit peptides that are resistant to insects in order to improve plant yields.

Since none of the special technical features of the Groups I+ inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by a combination of the Dow'766 and Dow'588 references, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		テーマコード（参考）
A01H	*5/10*	*(2018.01)*	A01H	5/10	
A01H	*6/46*	*(2018.01)*	A01H	6/46	
A01H	*6/54*	*(2018.01)*	A01H	6/54	
A01H	*6/60*	*(2018.01)*	A01H	6/60	
A01H	*6/20*	*(2018.01)*	A01H	6/20	
A01H	*6/34*	*(2018.01)*	A01H	6/34	
A01H	*6/82*	*(2018.01)*	A01H	6/82	
C12N	*15/52*	*(2006.01)*	C12N	15/52	ZNA
C12N	*5/04*	*(2006.01)*	C12N	5/04	

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

(72)発明者 リラ，ジャスティン エム.
アメリカ合衆国 インディアナ州 ４６２６８，インディアナポリス，ジオンスヴィレ ロード ９３３０
(72)発明者 シッチロ，ロバート
アメリカ合衆国 インディアナ州 ４６２６８，インディアナポリス，ジオンスヴィレ ロード ９３３０
(72)発明者 ヤーキーズ，カーラ エヌ.
アメリカ合衆国 インディアナ州 ４６２６８，インディアナポリス，ジオンスヴィレ ロード ９３３０
(72)発明者 ロビンソン，アンドリュー イー.
アメリカ合衆国 インディアナ州 ４６２６８，インディアナポリス，ジオンスヴィレ ロード ９３３０

Ｆターム(参考) 2B030 AA02 AB03 AD05 CA17 CB02
4B050 CC03 DD13 LL10
4B065 AA88X AA88Y AA89X AA89Y AB01 BA02 CA27 CA47