

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6262217号
(P6262217)

(45) 発行日 平成30年1月17日 (2018. 1. 17)

(24) 登録日 平成29年12月22日 (2017. 12. 22)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
A O 1 H 5/00 (2018. 01)	A O 1 H 5/00 A
C 1 2 N 5/04 (2006. 01)	C 1 2 N 5/04
A O 1 H 1/00 (2006. 01)	A O 1 H 1/00 A

請求項の数 27 (全 36 頁)

(21) 出願番号	特願2015-516162 (P2015-516162)	(73) 特許権者	501035309
(86) (22) 出願日	平成25年6月5日 (2013. 6. 5)		ダウ アグロサイエンシズ エルエルシ
(65) 公表番号	特表2015-518733 (P2015-518733A)		ー
(43) 公表日	平成27年7月6日 (2015. 7. 6)		アメリカ合衆国 インディアナ州 4 6 2
(86) 国際出願番号	PCT/US2013/044262		6 8, インディアナポリス, ジオンス
(87) 国際公開番号	W02013/184764		ヴィレ ロード, 9 3 3 0
(87) 国際公開日	平成25年12月12日 (2013. 12. 12)	(74) 代理人	100092783
審査請求日	平成28年5月23日 (2016. 5. 23)		弁理士 小林 浩
(31) 優先権主張番号	61/656, 634	(74) 代理人	100120134
(32) 優先日	平成24年6月7日 (2012. 6. 7)		弁理士 大森 規雄
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100126354
			弁理士 藤田 尚
		(74) 代理人	100190779
			弁理士 神谷 昌男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アブラナ属 (Brassica) 二方向構成的プロモーターを使用してトランス遺伝子を発現するための構築物および方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 配列番号 1 に少なくとも 90% 同一性を有するヌクレオチド配列を含み、GFP 及び GUS レポーター遺伝子を発現させることができる二方向プロモーター、および

(b) 二方向プロモーターの両端に 2 つの遺伝子発現カセットを含む、植物細胞および／または組織において複数の遺伝子を発現するための核酸構築物。

【請求項 2】

二方向プロモーターが少なくとも 1 つのエンハンサーを含む、請求項 1 に記載の核酸構築物。

【請求項 3】

核酸構築物がアグロバクテリウム (Agrobacterium) 媒介形質転換のためのバイナリーベクターを含む、請求項 1 に記載の核酸構築物。

【請求項 4】

二方向プロモーターが少なくとも 1 つのイントロンを含む、請求項 1 に記載の核酸構築物。

【請求項 5】

二方向プロモーターが少なくとも 1 つの 5' 非翻訳領域を含む、請求項 1 に記載の核酸構築物。

【請求項 6】

二方向プロモーターが配列番号 2 または 3 から選択されるヌクレオチド配列を含む、請

求項 1 に記載の核酸構築物。

【請求項 7】

二方向プロモーターが配列番号 1、22～25 から選択されるヌクレオチド配列、またはその相補体を含む、請求項 1 に記載の核酸構築物。

【請求項 8】

遺伝子発現カセットのうちの少なくとも 1 つが翻訳スイッチを介して連結された 2 つ以上の遺伝子を含む、請求項 1 に記載の核酸構築物。

【請求項 9】

両方の遺伝子発現カセットが翻訳スイッチを介して連結された 2 つ以上の遺伝子を含む、請求項 1 に記載の核酸構築物。

10

【請求項 10】

翻訳スイッチが、配列内リボソーム進入部位 (IRES)、選択的スプライシング部位、2A ペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、2A 様ペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、インテインをコードするポリヌクレオチド配列、プロテアーゼ切断部位をコードするポリヌクレオチド配列、およびそれらの組合せからなる群から選択される、請求項 8 に記載の核酸構築物。

【請求項 11】

翻訳スイッチの上流の遺伝子が翻訳停止コドンを含まない、請求項 8 に記載の核酸構築物。

【請求項 12】

少なくとも 4 つの遺伝子の発現を可能にする、請求項 1 に記載の核酸構築物。

20

【請求項 13】

3 つから 20 までの遺伝子の発現を可能にする、請求項 1 に記載の核酸構築物。

【請求項 14】

4 つから 8 つまでの遺伝子の発現を可能にする、請求項 13 に記載の核酸構築物。

【請求項 15】

両方の遺伝子発現カセットが EPSPS 遺伝子またはパラログを含むわけではない、請求項 1 に記載の核酸構築物。

【請求項 16】

請求項 1 に記載の核酸構築物で植物細胞を形質転換することを含む、トランスジェニック植物を作製するための方法。

30

【請求項 17】

請求項 1 に記載の核酸構築物で細胞を形質転換することを含む、トランスジェニック細胞を作製するための方法。

【請求項 18】

請求項 1 に記載の核酸構築物を含む植物細胞。

【請求項 19】

核酸構築物が植物細胞に安定的に形質転換されている、請求項 18 に記載の植物細胞。

【請求項 20】

請求項 1 に記載の核酸構築物を含むトランスジェニック植物または種子。

40

【請求項 21】

核酸構築物がトランスジェニック植物または種子の細胞に安定的に形質転換されている、請求項 20 に記載のトランスジェニック植物または種子。

【請求項 22】

双子葉植物である、請求項 20 に記載のトランスジェニック植物。

【請求項 23】

单子葉植物である、請求項 20 に記載のトランスジェニック植物。

【請求項 24】

請求項 1 に記載の核酸構築物を植物細胞および／または組織中に導入することを含む、植物細胞および／または組織において複数の遺伝子を発現させるための方法。

50

【請求項 25】

植物細胞および／または組織が請求項 1 に記載の核酸構築物で安定的に形質転換されている、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

請求項 1 に記載の核酸構築物を含む、アグロバクテリウム (Agrobacterium) 媒介形質転換のためのバイナリーベクター。

【請求項 27】

二方向プロモーターが配列番号 1 に少なくとも 90 % 同一性を有するヌクレオチド配列を含み、GFP 及び GUS レポーター遺伝子を発現させることができる、トランスジェニック植物または種子の生産における二方向プロモーターの使用。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は 2012 年 6 月 7 日提出の米国特許仮出願第 61 / 656, 634 号明細書の優先権を主張するものであり、前記特許文献の開示は参照によりその全体を明確に本明細書に組み込まれる。

【0002】

電子的に提供される資料を参照することによる組込み

添付して同時に提供され以下の：2013 年 5 月 13 日作成の「70136 __ST25 .txt」と名付けられた 1 つの 78, 835 バイト ASCII (テキスト) ファイルの通りに同定されるコンピュータ可読配列表は参照によりその全体を組み込まれる。

20

【0003】

本発明は一般的には植物分子生物学の分野、さらに具体的にはトランスジェニック植物における複数の遺伝子の安定な発現の分野に関する。

【背景技術】

【0004】

多くの植物種は他の種由来のトランス遺伝子で形質転換して、農学的に望ましい形質または特徴を導入する、例えば、栄養価品質を改良する、収率を増加する、病害虫もしくは疾患抵抗性を与える、乾燥およびストレス耐性を増加する、園芸性質 (例えば、色素沈着および成長) を改良する、除草剤抵抗性を分け与える、植物からの産業的に有用な化合物および／もしくは原料の生産を可能にする、ならびに／または医薬品の製造を可能にすることができる。植物細胞へのトランス遺伝子の導入およびトランス遺伝子の安定的に組み込まれたコピーを含有する繁殖性トランスジェニック植物のその後の回収を使用すれば、望ましい形質を有するトランスジェニック植物を産生することができる。

30

【0005】

遺伝子発現の制御および調節は多数の機構を通じて起こることがある。遺伝子の転写開始は遺伝子発現の支配的な制御機構である。転写の開始は一般には転写される遺伝子の 5' 隣接または上流領域に位置するポリヌクレオチド配列により制御される。これらの配列は集合的にプロモーターと呼ばれ、遺伝子調節エレメントとして分類される。基礎研究と生物工学的応用の両方のためにクローニングされ広く使用されてきた植物中のプロモーターは、一般に一方方向性であり、その 3' 末端 (すなわち、下流に) に融合された 1 つの遺伝子のみを方向付ける。例えば、Xie ら、(2001) Nat. Biotechnol. 19(7):677~9: 米国特許第 6, 388, 170 号を参照されたい。

40

【0006】

追加の遺伝子調節エレメントには、特定の DNA 結合因子と相互作用する配列が含まれる。これらの配列モチーフはシスエレメントと呼ばれることがあり、通常は位置および配向非依存性であるが、遺伝子コード配列の 5' 側もしくは 3' 側に、またはイントロン中に見出されることもある。そのようなシスエレメントは、組織特異的または発生特異的転写因子が個別にまたは組み合わせて結合するが、転写レベルでのプロモーターの時空間的

50

発現パターンを決定しうる。これらのシスエレメントは、作動可能に連結された遺伝子に対して行使する制御の種類が広く異なる。一部のエレメントは環境応答（例えば、温度、湿度、および創傷）へ応答して作動可能に連結された遺伝子の転写を増加させるように作用する。他のシスエレメントは発生上の合図（例えば、発芽、種子成熟、および開花）または空間情報（例えば、組織特異性）に応答しうる。例えば、Langridgeら、(1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:3219~23を参照されたい。

【0007】

その遺伝子が同一のまたは相同なプロモーターにより制御されることが多い、代謝操作および形質スタッキングのためには植物に複数の遺伝子を導入する必要がある場合が多い。しかし、複数の導入されたトランス遺伝子とその遺伝子を駆動させる相同なプロモーターを有する場合には、相同性ベースの遺伝子サイレンシング（HBGS）が生じる可能性が高い。例えば、Molら、(1989) *Plant Mol. Biol.* 13:287~94を参照されたい。HBGSはトランスジェニック植物においては広範囲に起こることが報告されている。例えば、Vaucheret and Fagard (2001) *Trends Genet.* 17:29~35を参照されたい。いくつかの機構がHBGSの現象を説明するために提唱されてきたが、その全てが、プロモーター中の配列相同性が反復遺伝子のサイレンシングをもたらす細胞認識機構を始動させるという特長を含む。例えば、Matzke and Matzke (1995) *Plant Physiol.* 107:679~85; Meyer and Saedler (1996) *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47:23~48; Fire (1999) *Trends Genet.* 15:358~63; Hamilton and Baulcombe (1999) *Science* 286:950~2; および Steimerら、(2000) *Plant Cell* 12:1165~78を参照されたい。

【0008】

トランスジェニック植物においてHBGSを回避する戦略は、機能的に等価であるが最小配列相同性を有する様々なプロモーターの開発を伴う場合が多い。したがって、トランスジェニック植物における育種または複数の世代を通じてトランス遺伝子の組換えまたは消失のリスクを効果的に最小限に抑えて、複数のトランス遺伝子を安定的に発現させるための構築物および方法の必要性が依然として存在する。

【発明の概要】

【0009】

セイヨウアブラナ (*brassica napus*) 由来の開示された二方向プロモーターまたはアブラナ属 (*Brassica*) 二方向構成的プロモーター (BBCP) を使用して植物細胞および／または植物組織において複数の遺伝子を発現するための構築物および方法が提供される。提供される構築物は、遺伝子発現カセットのそれぞれが少なくとも1つのトランス遺伝子を含む、複数の遺伝子発現カセットに連結された少なくとも1つのそのような二方向プロモーターを含む。いくつかの実施形態では、提供される構築物および方法は2から20の遺伝子の発現を可能にする。

【0010】

一態様では、植物細胞および／または組織において複数の遺伝子を発現するための核酸構築物が提供される。核酸構築物は、(a) 配列番号1に少なくとも80%同一性を有するヌクレオチド配列を含む二方向プロモーター、および(b) 前記二方向プロモーターの両端に2つの遺伝子発現カセットを含む。

【0011】

一実施形態では、二方向プロモーターは少なくとも1つのエンハンサーを含む。別の実施形態では、二方向プロモーターはエンハンサーを含まない。別の実施形態では、核酸構築物は植物形質転換のためのバイナリーベクターを含む。別の実施形態では、核酸構築物は、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 媒介形質転換のためのバイナリーベクターを含む。別の実施形態では、二方向プロモーターは少なくとも1つのイントロンを含む。別の実施形態では、二方向プロモーターは少なくとも1つの5'非翻訳領域を含む。一実施形態では、二方向プロモーターは配列番号2または3から選択されるヌクレオチド配列を含む。別の実施形態では、配列番号1に少なくとも85%、90%、95%、または100%同一性を有するヌクレオチド配列を含んでいる二方向プロモーター。別の実施形態で

は、二方向プロモーターは配列番号 1、22～25 から選択されるヌクレオチド配列、またはその相補体を含む。追加のまたは代わりの実施形態では、二方向プロモーターは配列番号 1、22～24 から選択されるヌクレオチド配列、またはその相補体を含む。追加のまたは代わりの実施形態では、二方向プロモーターは配列番号 1、22～23 から選択されるヌクレオチド配列、またはその相補体を含む。追加のまたは代わりの実施形態では、二方向プロモーターは配列番号 1、22 から選択されるヌクレオチド配列、またはその相補体を含む。

【0012】

一実施形態では、遺伝子発現カセットのうちの少なくとも 1 つは、翻訳スイッチを介して連結された 2 つまたはそれよりも多い遺伝子を含む。別の実施形態では、両方の遺伝子発現カセットは翻訳スイッチを介して連結される 2 つ以上の遺伝子を含む。追加のまたは代わりの一実施形態では、翻訳スイッチは、配列内リボソーム進入部位 (IRES)、選択的スプライシング部位、リボザイム切断部位、2A ペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、2A 様ペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、インテインをコードするポリヌクレオチド配列、プロテアーゼ切断部位をコードするポリヌクレオチド配列、およびそれらの組合せからなる群から選択される。追加のまたは代わりの一実施形態では、翻訳スイッチはシス作用性ヒドロラーゼエレメント (CHYSEL) を含む。追加の実施形態では、CHYSEL は 2A または 2A 様ペプチド配列である。別の実施形態では、翻訳スイッチの上流の遺伝子は翻訳停止コドンを含まない。

【0013】

一実施形態では、核酸構築物は少なくとも 1 つのトランス遺伝子を含む。別の実施形態では、核酸構築物は少なくとも 4 つの遺伝子の発現を可能にするまたは許容する。追加の実施形態では、4 つの遺伝子全てがトランス遺伝子である。別の実施形態では、核酸構築物は 3 つから 20 までの遺伝子の発現を可能にする。別の実施形態では、核酸構築物は 4 つから 8 つまでの遺伝子の発現を可能にする。追加のまたは代わりの一実施形態では、遺伝子はトランス遺伝子である。別の実施形態では、少なくとも 1 つの遺伝子発現カセットは融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を含む。追加の実施形態では、融合タンパク質は 3 つから 5 つの遺伝子を含む。別の実施形態では、両方の遺伝子発現カセットが EPSPS 遺伝子またはパラログを含むわけではない。

【0014】

別の態様では、植物細胞および／または組織において単一のまたは複数の遺伝子の発現を終結させるのに有用な調節エレメントを含む核酸構築物が提供される。調節エレメントは、パラログ A3' 非翻訳領域 (UTR) またはトランス遺伝子の 3' 末端に融合させることができるポリ A 領域を含む。一実施形態では、パラログ A3' UTR は、転写および翻訳の終結および調節に有用である機能的ポリアデニル化配列を含む。追加のまたは代わりの実施形態では、調節エレメントは配列番号 26 に少なくとも 80%、85%、90%、95% または 100% 同一性を有するポリヌクレオチド配列、またはその相補体を含む。追加の実施形態では、調節エレメントは配列番号 26 またはその相補体のポリヌクレオチド配列を含む。

【0015】

別の態様では、植物細胞を本明細書に提供される核酸構築物で形質転換することを含む、トランスジェニック植物を作製するための方法が提供される。別の態様では、細胞を本明細書に提供される核酸構築物で形質転換することを含む、トランスジェニック細胞を作製するための方法が提供される。別の態様では、本明細書に提供される核酸構築物を含む植物細胞が提供される。追加のまたは代わりの一実施形態では、核酸構築物は植物細胞に安定的に形質転換される。別の態様では、本明細書に提供される核酸構築物を含むトランスジェニック植物または種子が提供される。追加のまたは代わりの一実施形態では、核酸構築物はトランスジェニック植物または種子の細胞に安定的に形質転換される。追加の実施形態では、トランスジェニック植物は双子葉植物である。別の追加の実施形態では、トランスジェニック植物は単子葉植物である。別の態様では、植物細胞および／または組織

10

20

30

40

50

に本明細書に提供される核酸構築物を導入することを含む、植物細胞および／または組織において複数の遺伝子を発現するための方法が提供される。追加のまたは代わりの一実施形態では、植物細胞および／または組織は本明細書に提供される核酸構築物で安定的に形質転換される。別の態様では、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 媒介形質転換のためのバイナリーベクターが提供される。バイナリーベクターは本明細書に提供される核酸構築物を含む。別の態様では、植物における複数のトランス遺伝子発現のための本明細書に提供される二方向プロモーターの使用が提供される。一実施形態では、二方向プロモーターは配列番号 1 に少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 % または 100 % 同一性を有するヌクレオチド配列を含む。別の態様では、トランスジェニック植物または種子の生産における本明細書に提供される二方向プロモーターの使用が提供される。一実施形態では、二方向プロモーターは配列番号 1 に少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 % または 100 % 同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

10

【0016】

別の態様では、トランスジェニック植物細胞および／または組織において少なくとも 1 つのアブラナ属 (*Brassica*) イントロン配列を含む核酸構築物が提供される。一実施形態では、アブラナ属 (*Brassica*) イントロン配列は配列番号 27～33 から選択される。別の態様では、トランスジェニック植物または種子の生産において少なくとも 1 つのアブラナ属 (*Brassica*) イントロン配列の使用が提供される。一実施形態では、アブラナ属 (*Brassica*) イントロン配列は配列番号 27～33 から選択される。

20

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図 1】図 1 A はアブラナ属 (*Brassica*) 二方向構成的プロモーター (BBCP) の 739 nt コア二方向プロモーターの配列 (配列番号 1) を示す図である。図 1 B は BBCP の改変 1226 nt 配列 (配列番号 2) を示す図であり、制限酵素切断部位を導入するためにヌクレオチド配列「gg」が付加されている。図 1 C は配列番号 2 の逆相補体である配列番号 3 を示す図であり、配列番号 2 の付加された「gg」配列は配列番号 3 では「cc」配列として示されている。

【図 2】図 2 A はセイヨウアブラナ (*brassica napus*) のゲノム由来の BBCP の同定を示す図であり、EPSPS パラログ A 遺伝子の発現は BBCP により推進される。EPSPS パラログ A 遺伝子の反対の BBCP 末端では、提唱されている未知の遺伝子も同定されている。図 2 B は (1) 提唱されている未知の遺伝子、(2) BBCP、および (3) EPSPS パラログ A 遺伝子を含む天然のゲノム配列ポリヌクレオチド配列 (配列番号 4) を示す図である。

30

【図 3】図 3 A はこの提唱されている未知の遺伝子の予想されるタンパク質配列 (配列番号 5) をさらに示す図であり、図 3 B は対応するコード配列 (配列番号 6) を示す図である。

【図 4】図 4 A は EPSPS パラログ A 遺伝子の部分的配列 (配列番号 7) を示す図であり、US2009/0205083 の配列番号 10 と同じである。図 4 B は EPSPS パラログ A 遺伝子の全配列を示す図である。図 4 C は EPSPS パラログ A のタンパク質配列 (配列番号 9) をさらに示す図であり、図 4 D は EPSPS パラログ A の対応するコード配列 (配列番号 10) を示す図である。

40

【図 5】図 5 A は EPSPS パラログ B 遺伝子の配列 (配列番号 11) を示す図であり、US2009/0205083 の配列番号 11 と同じである。図 5 B は EPSPS パラログ B のタンパク質配列 (配列番号 12) をさらに示す図であり、図 5 C は EPSPS パラログ B の対応するコード配列 (配列番号 13) を示す図である。

【図 6】図 6 A は EPSPS パラログ C 遺伝子の配列 (配列番号 14) を示す図であり、US2009/0205083 の配列番号 12 と同じである。図 6 B は EPSPS パラログ C のタンパク質配列 (配列番号 15) をさらに示す図であり、図 6 C は EPSPS パラログ C の対応するコード配列 (配列番号 16) を示す図である。

【図 7】図 7 A は EPSPS パラログ E 遺伝子の配列 (配列番号 17) を示す図であり、

50

US 2009/0205083の配列番号14と同じである。図7BはE P S P SパラログEのタンパク質配列(配列番号18)をさらに示す図であり、図7CはE P S P SパラログCの対応するコード配列(配列番号19)を示す図である。

【図8】図8はE P S P SパラログA(配列番号9)、E P S P SパラログB(配列番号12)、E P S P SパラログC(配列番号15)、およびE P S P SパラログE(配列番号18)のタンパク質配列間の例となる配列アライメントを示す図である。

【図9】図9はB B C Pの反対の末端にG U SおよびG F Pの遺伝子発現カセットを含むp D A B 1 0 0 3 3 1由来の例となる配列(配列番号20)を示す図である。G U SとG F Pの両方の発現はB B C Pにより推進される。

【図10】図10はB B C Pの反対の末端にG U SおよびG F Pの遺伝子発現カセットを含むp D A B 1 0 0 3 3 3由来の例となる配列(配列番号21)を示す図である。G U SとG F Pの両方の発現はB B C Pにより推進される。

【図11】図11は、配列番号22~25を含む、代替りのB B C P配列を示す図である。

【図12】図15はプラスミドp D A B 1 0 0 3 3 1およびp D A B 1 0 0 3 3 3の代表的マップを示している。

【図13】図16はプラスミドp D A B 1 0 8 7 1 0およびp D A B 1 0 8 7 1 1の代表的マップを示している。

【図14】図14は例となるE P S P SパラログA 3' U T R遺伝子配列(配列番号26)および7つのパラログAイントロン配列(配列番号27~33)を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0018】

トランスジェニック産物の開発はますます複雑になっており、単一遺伝子座に複数のトランス遺伝子をスタッキングする必要がある。伝統的に、それぞれのトランス遺伝子は通常、発現のための独自のプロモーターが必要であり、したがって、1つの遺伝子スタック内で異なるトランス遺伝子を発現するには複数のプロモーターが必要である。このせいで、遺伝子スタックのサイズが増えることに加えて、同じプロモーターを繰り返し使用して、単一の多遺伝子形質の発現のための異なるトランス遺伝子の類似するレベルの発現パターンを得る場合が多くなる。同じプロモーターにより駆動される多重遺伝子構築物は、遺伝子サイレンシングを引き起こし、したがってトランスジェニック産物のフィールドでの効果が低くなることが知られている。プロモーター繰り返しに起因する過剰な転写因子(TF)結合部位は内在性TFを枯渇させ、転写不活性化をもたらすことがある。トランス遺伝子のサイレンシングは、トランス遺伝子を発現するために作製されたトランスジェニック植物の性能におそらく望ましくない影響を与えることになる。トランス遺伝子内の反復配列は、遺伝子座内相同組換えをもたらし、ポリヌクレオチド再配置を生じることがある。

【0019】

植物においてトランス遺伝子を発現させるアブラナ属(Brassica)二方向構成的プロモーター(B B C P)を使用する方法および構築物が提供される。また、二方向プロモーター系を、プロモーターのどちらか1つのまたは両方の末端で遺伝子のバイシストロン性組織と、例えば、トーセア・アシグナ(Thorea asigna)ウイルス由来の2A配列の使用と組み合わせる方法および構築物も提供される。2Aタンパク質は、わずか16~20アミノ酸長であるが、ポリタンパク質をそれ自体のカルボキシ末端で切断する。2Aまたは2A様ペプチドの「自己切断」または「リボソームスキップ」特性を使用して、トランスジェニック植物において産生される人工的ポリタンパク質を加工することができる。一実施形態では、C r y 3 4とC r y 3 5遺伝子は1つの遺伝子発現カセットに融合され、ここではG F P(またはY F P、またはP h i Y F P)とA A D 1遺伝子はもう1つの遺伝子発現カセットに融合されている(2Aタンパク質遺伝子のコピーがそれぞれの組合せの2つの遺伝子間に置かれている単一オープンリーディングフレーム(O R F)を有する)。例えば、これらの遺伝子発現カセット(または遺伝子対)のそれぞれは二方向プロモータ

一のどちらかの末端に置かれ、単一のプロモーターを使用して4つのトランス遺伝子を駆動させることができる。したがって、本明細書に提供される構築物および方法は、同じプロモーターを繰り返して使用することを回避し商業的構築物のサイズを著しく減少させるのに有用である。さらに、4つ以上の遺伝子を1つのプロモーターで駆動させれば、単一が多遺伝子形質を制御する遺伝子を同時発現させる能力も与えられる。

【0020】

開示されているある特定の略字は表1に収載されている。

【0021】

【表1】

表1. 本開示において使用される略字	
語句	略字
ビシンコニン酸	BCA
カリフラワーモザイクウイルス	CaMV
葉緑体輸送ペプチド	CTP
相同性ベースの遺伝子サイレンシング	HBGS
ZmUbi1最少コアプロモーター	minUbi1P
オリゴライゲーション増幅	OLA
リン酸緩衝食塩水	PBS
0.05%Tween20を含むリン酸緩衝食塩水	PBST
ポリメラーゼ連鎖反応	PCR
ローリングサークル増幅	RCA
逆転写酵素PCR	RT-PCR
一本鎖ヌクレオチドプライマー伸長	SNuPE
上流調節配列	URS

【0022】

基礎研究または生物工学的応用のために使用される植物プロモーターは、一般に一方方向性であり、その3'末端（下流）に融合されている1つの遺伝子のみに指令を与える。代謝工学および形質スタッキングのために植物に複数の遺伝子を導入することが必要であることが多く、したがって、複数の遺伝子の発現を駆動させるためには複数のプロモーターが典型的には将来のトランスジェニック作物に必要となる。配置されるプロモーターの数を節約し遺伝子スタッキングのための同時共調節発現を可能にすることができる戦略を設計するのが望ましい。ある実施形態では、提供される二方向プロモーターは、RNAi、人工miRNA、またはヘアピンループRNA配列を含む、複数の転写単位の転写を駆動させることができる。

【0023】

本明細書で使用されるように、冠詞「1つ(a)」、「1つ(an)」、および「その(the)」は、文脈がはっきりと明確に他の方法で指示していなければ、複数の参照を含む。

【0024】

本明細書で使用されるように、語句「戻し交配」とは、育種家が雑種子孫を親のうちの一方、例えば、F1雑種の親遺伝子型のうちの1つを有する第1世代雑種F1と再び交雑させる工程のことである。

【0025】

本明細書で使用されるように、語句「イントロン」とは、転写されるが翻訳はされない遺伝子（または対象の発現されたヌクレオチド配列）に含まれる任意の核酸配列のことである。イントロンには、DNAの発現された配列内の非翻訳核酸配列、ならびにそこから転写されるRNA分子中の対応する配列が含まれる。

【0026】

提供される構築物は翻訳および／またはmRNA安定性を増強するイントロンなどの配列も含有することが可能である。1つのそのようなイントロンの例は、シロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）のヒストンH3.1 I I Iバリエーションの遺伝子I Iの第一イントロンまたは他の任意の一般に知られているイントロン配列である。Chaubetら、*Journal of Molecular Biology*, 225:569～574 (1992)。イントロンはプロモーター配列と組み合わせて使用して翻訳および／またはmRNA安定性を増強することができることは当技術分野では公知である。

10

【0027】

本明細書で使用されるように、語句「5'非翻訳領域」または「5'UTR」とはプレmRNAまたは成熟mRNAの5'末端における非翻訳セグメントのことである。例えば、成熟mRNA上では、5'UTRは典型的にはその5'末端で7-メチルグアノシンキャップを抱えており、スプライシング、ポリアデニル化、細胞質へのmRNA核外輸送、翻訳機械によるmRNAの5'末端の識別および分解からのmRNAの保護などの多くのプロセスに関与している。

【0028】

本明細書で使用されるように、語句「3'非翻訳領域」または「3'UTR」とはプレmRNAまたは成熟mRNAの3'末端における非翻訳セグメントのことである。例えば、成熟mRNA上では、この領域はポリ(A)テイルを抱えており、mRNA安定性、翻訳開始、mRNA核外輸送に多くの役割を有することが知られている。

20

【0029】

本明細書で使用されるように、語句「ポリアデニル化シグナル」とは、転写物が、ポリ(A)ポリメラーゼの存在下にある場合、例えば、ポリ(A)シグナルの10から30塩基下流に位置するポリアデニル化部位上でポリアデニル化されるのを可能にするmRNA転写物に存在する核酸配列のことである。多くのポリアデニル化シグナルが当技術分野では知られており、本発明に有用である。例には、ヒトバリエーション成長ホルモンポリアデニル化シグナル、SV40後期ポリアデニル化シグナルおよびウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルが含まれる。

30

【0030】

本明細書で使用されるように、語句「単離された」とは、構成成分内に化学的または機能的変化をもたらしつつ（例えば、核酸は、染色体内でこの核酸を残りのDNAに連結している化学結合を切断することにより染色体から単離されることもある）、構成成分が天然に存在している生物の細胞内の他の生物学的構成成分（すなわち、他の染色体および染色体外DNAおよびRNA、ならびにタンパク質）から実質的に分離されている、これとは別に産生された、またはこれから精製分離されている生物学的構成成分（核酸またはタンパク質を含む）のことである。「単離」された核酸分子およびタンパク質には、標準精製法により精製された核酸分子およびタンパク質が含まれる。語句「単離された」は、宿主細胞において組換え発現により調製された核酸およびタンパク質、ならびに化学的に合成された核酸分子、タンパク質、およびペプチドも包含する。

40

【0031】

本明細書で使用されるように、語句「遺伝子発現」とは、核酸転写単位のコードされた情報（例えば、ゲノムDNAを含む）が、タンパク質の合成を含むことが多い、細胞の操作的、非操作的、または構造的部分に変換される過程のことである。遺伝子発現は、外部シグナル、例えば、遺伝子発現を増加させるまたは減少させる作用因子への細胞、組織、または生物の曝露により影響を受けることがある。遺伝子の発現は、DNAからRNAそしてタンパク質への経路における任意の場所でも調節されることがある。遺伝子発現の調

50

節は、例えば、転写、翻訳、RNA輸送およびプロセッシング、mRNAなどの中間分子の分解に作用する制御を通して、または産生された後の特定のタンパク質分子の活性化、不活性化、区分化、もしくは分解を通して、またはそれらの組合せにより起こる。遺伝子発現は、限定せずに、ノーザンブロット、RT-PCR、ウェスタンブロット、または *in vitro*、*in situ* もしくは *in vivo* タンパク質活性アッセイ（複数可）を含む、当技術分野で公知のどんな方法によってもRNAレベル、またはタンパク質レベルで測定することが可能である。

【0032】

本明細書で使用されるように、語句「相同性ベースの遺伝子サイレンシング」（HBGS）とは、転写遺伝子サイレンシングと転写後遺伝子サイレンシングの両方を含む総称のことである。非連結サイレンシング遺伝子座による標的遺伝子座のサイレンシングは、プロモーターまたは転写された配列に対応する二本鎖RNA（dsRNA）の産生のせいでそれぞれ転写阻害（転写遺伝子サイレンシング；TGS）またはmRNA分解（転写後遺伝子サイレンシング；PTGS）に起因することがある。それぞれの過程への異なる細胞構成成分の関与は、dsRNA誘導TGSおよびPTGSがおそらく古代の共通な機構の多様化に起因することを示唆している。しかし、TGSとPTGSを厳密に比較するのは、その比較が一般に異なるサイレンシング遺伝子座の解析に依拠しているために困難であった。単一トランス遺伝子座は、異なる標的遺伝子のプロモーターと転写された配列に対応するdsRNAの産生のせいで、TGSとPTGSの両方を始動させると説明することができる。例えば、Mourrainら、(2007) *Planta* 225:365～79を参照されたい。siRNAは相同な配列上でTGSとPTGSを始動させる実際の分子である可能性が高く、siRNAはこのモデルでは、トランス遺伝子配列のメチル化を内在性プロモーター内に広げることを通じて相同な配列のサイレンシングおよびメチル化をシスでおよびトランスで始動させると考えられる。

【0033】

本明細書で使用されるように、語句「核酸分子」（または「核酸」または「ポリヌクレオチド」）とは、ヌクレオチドのポリマー形態のことであり、これにはRNA、cDNA、ゲノムDNA、および合形成態のセンス鎖とアンチセンス鎖の両方ならびに上記の混合ポリマーを含みうる。ヌクレオチドとは、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、またはどちらかの種類のヌクレオチドの改変された形態のことでもよい。本明細書で使

【0034】

核酸分子は、当業者により容易に認識されるように、化学的に改変されても生化学的に改変されてもよく、または非天然もしくは誘導体化されたヌクレオチド塩基を含有していてもよい。そのような改変には、例えば、標識、メチル化、天然に存在するヌクレオチドのうちの1つまたは複数の類似体との置換、ヌクレオチド間改変（例えば、無電荷連鎖、例えば、メチルホスホン酸、リン酸トリエステル、ホスホロアミド酸、カルバミン酸、等；電荷連鎖、例えば、ホスホロチオエート、ジチオリン酸、等；ペンダント部分、例えば、ペプチド；介入物、例えば、アクリジン、ソラレン、等；キレート剤；アルキル化剤；および改変連鎖、例えば、アルファアノマー核酸、等）が含まれる。用語「核酸分子」には、一本鎖、二本鎖、部分的二重鎖、三重鎖、ヘアピン、環状、および錠かけ型の立体構造を含む、任意のトポロジー立体構造も含まれる。

【0035】

転写はDNA鎖に沿って5'から3'への様式で進む。これにより、RNAは伸長している鎖の3'末端へのリボヌクレオチドー5'ー三リン酸の連続付加（ピロリン酸の不可

欠な除去と共に)により作られる。線形または環状核酸分子どちらでも、別々のエレメント(例えば、特定のヌクレオチド配列)は、そのエレメントから5'方向の同じ核酸に結合しているまたは結合することになるのであれば、追加のエレメントに対して「上流」にあると呼んでもよい。同様に、別々のエレメントは、そのエレメントから3'方向の同じ核酸に結合しているまたは結合することになるのであれば、追加のエレメントに対して「下流」にあることになりうる。

【0036】

本明細書で使用されるように、語句「塩基位置」とは、指定された核酸内の所与の塩基またはヌクレオチド残基の位置のことである。指定された核酸は、基準核酸とのアライメント(下参照)により定義してもよい。

10

【0037】

本明細書で使用されるように、語句「ハイブリダイゼーション」とは、オリゴヌクレオチドとその類似体が水素結合によりハイブリダイズする過程のことであり、水素結合には相補的塩基間のワトソン-クリック、フーグスティーンまたは逆フーグスティーン水素結合が含まれる。一般に、核酸分子は、ピリミジン(シトシン(C)、ウラシル(U)、およびチミン(T))またはプリン(アデニン(A)およびグアニン(G))のどちらかである窒素塩基からなる。これらの窒素塩基はピリミジンとプリン間で水素結合を形成し、プリンへのピリミジンの結合は「塩基対合」と呼ばれる。さらに具体的には、AはTまたはUと水素結合し、GはCと結合する。「相補的」とは、2つの異なる核酸配列または同じ核酸配列の2つの異なる領域間で起こる塩基対合のことである。

20

【0038】

本明細書で使用されるように、語句「特異的にハイブリダイズ可能な」および「特異的に相補的な」とは、オリゴヌクレオチドとDNAまたはRNA標的の間で安定で特異的な結合が生じるのに十分な程度の相補性のことである。特異的にハイブリダイズ可能であるためにはオリゴヌクレオチドはその標的配列と100%相補的である必要はない。標的DNAまたはRNA分子へのオリゴヌクレオチドの結合が標的DNAまたはRNAの正常な機能を妨害し、特異的な結合が望ましい条件下で、例えば、*in vivo*アッセイまたは系の場合の生理的条件下で非標的配列へのオリゴヌクレオチドの非特異的な結合を避けるのに十分な程度の相補性が存在するとき、オリゴヌクレオチドは特異的にハイブリダイズ可能である。そのような結合は特異的なハイブリダイゼーションと呼ばれる。

30

【0039】

特定の程度の厳密性を生じるハイブリダイゼーション条件は、選択されたハイブリダイゼーション法の性質ならびにハイブリダイズする核酸配列の組成および長さに応じて変化することになる。一般に、ハイブリダイゼーションの温度およびハイブリダイゼーションバッファのイオン強度(特に、Na⁺および/またはMg²⁺濃度)はハイブリダイゼーションの厳密性に寄与するが、洗浄時間も厳密性に影響を与える。特定の程度の厳密性を達成するのに必要なハイブリダイゼーション条件に関する計算は、Sambrookら、(ed.)、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、2nd ed.、vol. 1~3、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、New York、1989、chs. 9 and 11で考察されている。

40

【0040】

本明細書で使用されるように、語句「厳密な条件」は、ハイブリダイゼーション分子とDNA標的の間のミスマッチが50%未満である場合にのみハイブリダイゼーションが起こる条件を包含する。「厳密な条件」には、さらに特定のレベルの厳密性が含まれる。したがって、本明細書で使用されるように、「中程度の厳密性」条件とは、50%を超える配列ミスマッチを有する分子ではハイブリダイズしない条件であり、「高厳密性」の条件とは、20%を超えるミスマッチを有する配列ではハイブリダイズしない条件であり、「超高厳密性」の条件とは、10%を超えるミスマッチを有する配列ではハイブリダイズしない条件である。

【0041】

50

特定の実施形態では、厳密な条件は、65℃でのハイブリダイゼーション、続いて0.1×SSC/0.1%SDSを用いた65℃での40分間の洗浄を含むことができる。

【0042】

以下は代表的、非限定的ハイブリダイゼーション条件である。

超高厳密性：5×SSCバッファー中65℃で16時間のハイブリダイゼーション；2×SSCバッファー中室温でそれぞれ15分間の洗浄2回；および0.5×SSCバッファー中65℃でそれぞれ20分間の洗浄を2回。

高厳密性：5～6×SSCバッファー中65～70℃で16～20時間のハイブリダイゼーション；2×SSCバッファー中室温でそれぞれ5～20分間の洗浄2回；および1×SSCバッファー中55～70℃でそれぞれ30分間の洗浄を2回。

中程度厳密性：6×SSCバッファー中室温から55℃で16～20時間のハイブリダイゼーション；2×～3×SSCバッファー中室温から55℃でそれぞれ20～30分間の洗浄を少なくとも2回。

【0043】

特定の実施形態では、特異的にハイブリダイズ可能な核酸分子は、超高厳密性ハイブリダイゼーション条件下で結合したままでいることができる。これらのおよび追加の実施形態では、特異的にハイブリダイズ可能な核酸分子は、高厳密性ハイブリダイゼーション条件下で結合したままでいることができる。これらのおよび追加の実施形態では、特異的にハイブリダイズ可能な核酸分子は、中程度厳密性ハイブリダイゼーション条件下で結合したままでいることができる。

【0044】

本明細書で使用されるように、語句「オリゴヌクレオチド」とは、短い核酸ポリマーのことである。オリゴヌクレオチドは、さらに長い核酸セグメントを切断することによりまたは個々のヌクレオチド前駆体を重合することにより形成しうる。自動合成装置を使用すれば、最大数百塩基対長のオリゴヌクレオチドの合成が可能になる。オリゴヌクレオチドは相補的ヌクレオチド配列に結合することができるので、DNAまたはRNAを検出するためのプローブとして使用しうる。DNAで構成されているオリゴヌクレオチド（オリゴデオキシリボヌクレオチド）は、小DNA配列の増幅のための技法であるPCRにおいて使用しうる。PCRでは、オリゴヌクレオチドは典型的には「プライマー」と呼ばれ、これによりDNAポリメラーゼはオリゴヌクレオチドを伸長して相補鎖を複製することができる。

【0045】

本明細書で使用されるように、語句「配列同一性」または「同一性」とは、2つの核酸またはポリペプチド配列が、特定された比較窓にわたって最大一致に整列された場合と同じである2つの配列中の残基を指しうるコンテキストのことである。

【0046】

本明細書で使用されるように、語句「配列同一性の百分率」とは、比較窓にわたって2つの最適に整列された配列（例えば、核酸配列およびアミノ酸配列）を比較することにより決定される値のことであり、比較窓内の配列の一部は、2つの配列の最適アライメントの基準配列（付加も欠失も含まない）と比べた場合、付加または欠失（例えば、ギャップ）を含んでいてもよい。百分率は、同一ヌクレオチドまたはアミノ酸残基が両方の配列中に存在する位置の数を決定して適合した位置の数を得て、適合した位置の数を比較窓内の位置の総数で割り、この結果に100を掛けることにより計算されて配列同一性の百分率が得られる。

【0047】

比較のために配列を整列させる方法は当技術分野では周知である。様々なプログラムおよびアライメントアルゴリズムが、例えば、Smith and Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482; Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443; Pearson and Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:2444; Higgins and Sharp (1988) Gene 73:237~44; Higgins and Sharp (1989) CABIOS 5:151~3; Corpetら、(1988) Nucleic Acids

10

20

30

40

50

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に記載されている。配列アライメント法および相同性計算の詳細な検討は、例えば、Altschulら、(1990) J. Mol. Biol. 215:403~10に見ることができる。

【0048】

国立バイオテクノロジー情報センター (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に関連して使用するための、国立バイオテクノロジー情報センター (Bethesda, MD)、およびインターネット上を含むいくつかの供給源から入手可能である。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、インターネット上のBLAST (商標) についての「ヘルプ」セクションで入手可能である。核酸配列の比較では、BLAST (商標) (Blastn) プログラムの「Blast2配列」機能はデフォルトパラメータを使用して用いてもよい。基準配列にはるかに大きな類似性を有する核酸配列であれば、この方法により評価される場合、百分率同一性の増加を示すことになる。

【0049】

本明細書で使用されるように、語句「作動可能に連結された」とは、第一の核酸配列が第二の核酸配列と機能的な関係にある場合、第一の核酸配列は第二の核酸配列に作動可能に連結しているコンテキストのことである。例えば、プロモーターがコード配列の転写または発現に影響を与える場合、プロモーターはコード配列に作動可能に連結している。組織学的に産生される場合、作動可能に連結された核酸配列は一般に連続しており、2つのタンパク質コード領域を結合させる必要がある場合は、同じリーディングフレーム内にある。しかし、エレメントは作動可能に連結されるのに近接している必要はない。

【0050】

本明細書で使用されるように、語句「プロモーター」とは、一般に上流に（遺伝子の5'領域の方に）位置しているDNAの領域であって、転写に必要な領域のことである。プロモーターは、それが制御している遺伝子の適切な活性化または抑圧を可能にしてもよい。プロモーターは転写因子により認識される特定の配列を含有しうる。これらの因子はプロモーターDNA配列に結合して、遺伝子のコード領域からRNAを合成する酵素である、RNAポリメラーゼを動員することができる。

【0051】

本明細書で使用されるように、語句「形質転換する」または「形質導入する」とは、ウイルスまたはベクターが核酸分子を細胞内に移す過程のことである。核酸分子を細胞ゲノムに取り込むことによりまたはエピソーム複製によりのいずれかで、細胞により核酸分子が安定的に複製される場合、細胞は、細胞内に「形質導入された」核酸分子により「形質転換」される。本明細書で使用されるように、用語「形質転換」は、核酸分子をそのような細胞内に導入することができる全ての技法を包含する。例には、ウイルスベクターを用いたトランスフェクション；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 (Frommら、(1986) Nature 319:791~3)；リポフェクション (Felgnerら、(1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413~7)；マイクロインジェクション (Muellerら、(1978) Cell 15:579~85)；アグロバクテリウム (Agrobacterium) 媒介移入 (Fraleyら、(1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:4803~7)；直接DNA取り込み；ウィスカー媒介形質転換；および微粒子銃 (Kleinら、(1987) Nature 327:70) が含まれるが、これらに限定されない。

【0052】

本明細書で使用されるように、語句「トランス遺伝子」とは、外来性核酸配列のことである。一例では、トランス遺伝子は遺伝子配列（例えば、除草剤耐性遺伝子）、産業的にまたは薬剂的に有用な化合物をコードする遺伝子、または望ましい農業上の形質をコードする遺伝子である。さらに別の例では、トランス遺伝子は、その発現により標的核酸配列の発現が阻害されるアンチセンス核酸配列である。トランス遺伝子は、それに作動可能に連結している調節配列（例えば、プロモーター）を含有していてもよい。いくつかの実施

形態では、対象の核酸配列はトランス遺伝子である。しかし、他の実施形態では、対象の核酸配列は、その追加のゲノムコピーが望ましい内在性核酸配列、または宿主生物における標的核酸分子の配列に関してアンチセンス配向である核酸配列である。

【0053】

本明細書で使用されるように、語句「ベクター」とは、細胞に導入され、それにより形質転換細胞を作製する核酸分子のことである。ベクターは、複製起点などの、ベクターが宿主細胞内で複製することを可能にする核酸配列を含みうる。例には、プラスミド、コスミド、バクテリオファージ、または外来性DNAを細胞内に運ぶウイルスが含まれるが、これらに限定されない。ベクターは、1つもしくは複数の遺伝子、アンチセンス分子、および／または選択可能マーカー遺伝子ならびに当技術分野で公知の他の遺伝要素も含むことができる。ベクターは、細胞を形質導入する、形質転換する、または感染させ、それにより細胞に核酸分子および／またはベクターにコードされたタンパク質を発現させる。ベクターは、場合によって、核酸分子の細胞内への進入を達成するのに役立つ物質（例えば、リポソーム）を含みうる。

10

【0054】

本明細書で使用されるように、語句「植物」には、植物細胞ならびに葉、茎、根、花、花粉、および種子などの植物組織を含むがこれらに限定されない植物および植物部分が含まれる。本発明で使用する植物の種類は一般に、被子植物（単子葉および双子葉植物）、裸子植物、シダ類および多細胞藻類を含む、変異誘発を受け入れられる高等および下等植物の種類と同じくらい幅広い。したがって、「植物」には双子葉植物および単子葉植物が含まれる。双子葉植物の例には、タバコ、シロイヌナズナ (*Arabidopsis*)、ダイズ、トマト、パパイア、キャノーラ、ヒマワリ、ワタ、アルファルファ、ジャガイモ、ブドウ、キマメ、エンドウマメ、アブラナ属 (*Brassica*)、ヒヨコマメ、サトウダイコン、ナタネ、スイカ、メロン、コショウ、ピーナッツ、カボチャ (pumpkin)、ダイコン、ホウレンソウ、カボチャ (squash)、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、キュウリ、ナスおよびレタスが含まれる。単子葉植物の例には、トウモロコシ、イネ、コムギ、サトウキビ、オオムギ、ライムギ、モロコシ、ラン、タケ、バナナ、ガマ、ユリ、カラスムギ、タマネギ、アワ、およびライコムギが含まれる。

20

【0055】

本明細書で使用されるように、語句「植物物質」とは、葉、茎、根、花もしくは花部、果実、花粉、卵細胞、接合体、種子、挿し木、細胞もしくは組織培養物、または植物の他の任意の部分もしくは産物のことである。ある実施形態では、植物物質には子葉および葉が含まれる。

30

【0056】

本明細書で使用されるように、語句「翻訳スイッチ」とは、すぐ下流の遺伝子の翻訳を可能にする遺伝子末端の機構のことである。翻訳スイッチの機構は、核酸レベルで（例えば、ウイルスもしくは真核生物配列内リポソーム進入部位 (IRES)、選択的スプライシング部位、またはリボザイム切断部位）またはペプチド／タンパク質レベルで（例えば、2Aペプチド、2A様ペプチド、インテインペプチド、またはプロテアーゼ切断部位）機能することができる。

40

【0057】

核酸レベルでのまたはペプチド／タンパク質レベルでの翻訳スイッチのこれらの機構は当技術分野では周知である。例えば、li, Z., H. M. Schumacherら、(2010) *J Biotechnol* 145(1): 9~16; Chen, Y., K. Perumalら、(2000) *Gene Expr* 9(3): 133~143; Dinkova, T. D., H. Zepedaら、(2005) *Plant J* 41(5): 722~731; Dorokhov, Y. L., M. V. Skulachevら、(2002) *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(8): 5301~5306; Fernandez-Miragall, O. and C. Hernandez (2011) *PLoS One* 6(7): e22617; Groppe, E., G. J. Belshamら、(2007) *J Gen Virol* 88(Pt 5): 1583~1588; Ha, S. H., Y. S. Liangら、(2010) *Plant Biotechnol J* 8(8): 928~938; Karetnikov, A. and K. Lehto (2007) *J Gen Virol* 88(Pt 1): 286~297; Karetnikov, A. and K. Lehto (2008) *Virology* 371(2): 292~308

50

; Khan, M. A., H. Yumakら、(2009) J Biol Chem 284(51): 35461~35470; and Koh, D. C., S. M. Wongら、(2003) J Biol Chem 278(23): 20565~20573を参照されたい。前記文献の内容は本明細書によりその全体を参照によって組込まれている。改変されたインテインを含有する多重遺伝子発現構築物は、米国特許第7, 026, 526号および米国特許第7, 741, 530号ならびに米国特許出願公開第2008/0115243号に開示されている。前記文献の内容は本明細書によりその全体を参照によって組込まれている。

【0058】

本明細書で使用されるように、語句「選択可能マーカー」または「選択可能マーカー遺伝子」とは、例えば、植物細胞を選択剤から保護するまたは選択剤に対する抵抗性／耐性を与えるために、場合によって植物形質転換において使用される遺伝子のことである。機能的選択可能マーカーを受け入れる細胞または植物のみが、選択剤を有する条件下で分裂または増殖することができる。選択剤の例は、例えば、スペクチノマイシン、ネオマイシン、カナマイシン、パロモマイシン、ゲンタマイシン、およびハイグロマイシンを含む抗生物質を含むことができる。これらの選択可能マーカーには、抗生物質カナマイシンに対する抵抗性を与える酵素を発現するネオマイシンホスホトランスフェラーゼ (nptII) の遺伝子、ならびに関連抗生物質ネオマイシン、パロモマイシン、ゲンタマイシン、およびG418の遺伝子、またはハイグロマイシンに対する抵抗性を与える酵素を発現するハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ (hpt) の遺伝子が含まれる。他の選択可能マーカー遺伝子は、Bar (BASTA (登録商標) (グルホシネートアンモニウム)、またはホスフィノトリシン (PPT) に対する抵抗性)、アセト乳酸シンターゼ (ALS、分岐鎖アミノ酸の合成の第1ステップを妨げるスルホニル尿素 (SU)、イミダゾリノン (IMI)、トリアゾロピリミジン (TP)、ピリミジニルオキシベンゾエート (POB)、およびスルホニルアミノカルボニルトリアゾリノンなどの阻害剤に対する抵抗性)、グリホサート、2, 4-Dを含む除草剤抵抗性、および金属抵抗性または感受性をコードする遺伝子を含むことができる。語句「マーカー陽性」とは、選択可能マーカー遺伝子を含むように形質転換された植物のことである。

【0059】

様々な選択可能なまたは検出可能なマーカーを選ばれた発現ベクター中に取り込ませて、形質転換された植物、または形質転換体の同定および選択を可能にすることができる。例えば、DNA塩基配列決定およびPCR (ポリメラーゼ連鎖反応)、サザンブロッティング、RNAブロッティング、ベクターから発現されたタンパク質、例えば、ホスフィノトリシン抵抗性を媒介する沈降タンパク質、またはレポーター遺伝子β-グルクロニダーゼ (GUS)、ルシフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質 (GFP)、DsRed、β-ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT)、アルカリホスファターゼ、および同類の物などの他のタンパク質を検出するための免疫学的方法を含む、形質転換植物における選択マーカーの発現を確認するための多くの方法が利用可能である (Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Third Edition、Cold Spring Harbor Press、N.Y.、2001参照、前記文献の内容は本明細書によりその全体を参照によって組込まれている)。

【0060】

選択可能マーカー遺伝子は形質転換細胞または組織の選択のために利用される。選択可能マーカー遺伝子には、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ II (NEO) およびハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ (HPT) をコードする遺伝子などの抗生物質抵抗性をコードする遺伝子、ならびに除草剤化合物に対する抵抗性を与える遺伝子が含まれる。除草剤抵抗性遺伝子は一般に、除草剤に非感受性の改変された標的タンパク質または除草剤が機能することができる前に植物中で除草剤を分解するもしくは解毒する酵素をコードしている。例えば、グリホサートに対する抵抗性は、変異体標的酵素、5-エノールピルビルシキミ酸-3-ホスフェートシンターゼ (EPSPS) をコードする遺伝子を使用することにより獲得されてきた。EPSPSの遺伝子および変異体は、米国特許第4

10

20

30

40

50

、 940、835号、米国特許第5、188、642号、米国特許第5、310、667号、米国特許第5、633、435号、米国特許第5、633、448号、および米国特許第6、566、587号に開示されている。前記文献の内容は本明細書によりその全体を参照によって組込まれている。グルホシネートアンモニウム、プロモキシニル、および2、4-ジクロロフェノキシアセテート（2、4-D）に対する抵抗性は、それぞれの除草剤を解毒するホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ、ニトリラーゼ、または2、4-ジクロロフェノキシアセテートモノオキシゲナーゼをコードする細菌遺伝子を使用することにより獲得されてきた。グルホシネート抵抗性／耐性のための酵素／遺伝子は、米国特許第5、273、894号、米国特許第5、276、268号、米国特許第5、550、318号、および米国特許第5、561、236号に開示されている。前記文献の内容は本明細書によりその全体を参照によって組込まれている。2、4-D抵抗性のための酵素／遺伝子は、米国特許第6、100、446号および米国特許第6、153、401号、ならびに米国特許出願公開第2009/0093366号およびWO2007/053482に既に開示されている。前記文献の内容は本明細書によりその全体を参照によって組込まれている。ニトリラーゼに対する酵素／遺伝子は米国特許第4、810、648号に既に開示されている。前記文献の内容は本明細書によりその全体を参照によって組込まれている。

10

【0061】

イミダゾリノンまたはスルホニル尿素を含む、他の除草剤は成長点または分裂組織を阻害することができ、これらの除草剤に対するアセトヒドロキシ酸シンターゼ（A H A S）およびアセト乳酸シンターゼ（A L S）の抵抗性／耐性の遺伝子は記載されている。A H A Sおよび変異体の遺伝子および変異体は、米国特許第4、761、373号、米国特許第5、304、732号、米国特許第5、331、107号、米国特許第5、853、973号、および米国特許第5、928、937号に開示されている。前記文献の内容は本明細書によりその全体を参照によって組込まれている。A L Sの遺伝子および変異体は米国特許第5、013、659号および米国特許第5、141、870号に開示されている。前記文献の内容は本明細書によりその全体を参照によって組込まれている。

20

【0062】

グリホサート抵抗性遺伝子には、それぞれ変異体5-エノールピルビルシキミ酸-3-ホスフェートシンターゼ（E P S P）遺伝子（組み換え核酸の導入および／または天然のE P S P遺伝子の様々な形態の *i n v i v o* 変異誘発を介して）、*a r o A* 遺伝子およびグリホサートアセチルトランスフェラーゼ（G A T）遺伝子が含まれる。他のホスホ化合物に対する抵抗性遺伝子には、グルホシネート（ストレプトミセス・ハイグロスコピクス（*Streptomyces hygroscopicus*）およびストレプトミセス・ビリジクロモジェネス（*Streptomyces viridichromogenes*）を含むストレプトミセス（*Streptomyces*）種由来のホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ（P A T）遺伝子）、およびピリジノキシまたはフェノキシプロピオン酸およびシクロヘキソン（cyclohexone）（A C Cアーゼ阻害因子コード遺伝子）が含まれる。アセチル補酵素Aカルボキシラーゼ（A C C a s）の除草剤抵抗性／耐性遺伝子は、米国特許第5、162、602号および米国特許第5、498、544号に記載されている。前記文献の内容は本明細書によりその全体を参照によって組込まれている。

30

40

【0063】

変異体 *a r o A* 遺伝子をコードするDNA分子はA T C C受託番号39256の下で入手可能であり、この変異体遺伝子のヌクレオチド配列は、C o m a i への米国特許第4、769、061号、K u m a d a への欧州特許出願第0333033号、およびG o o d m a n への米国特許第4、975、374号で開示されており、L-ホスフィノトリシンなどの除草剤に対する抵抗性を与えるグルタミンシンターゼ遺伝子のヌクレオチド配列を開示している。P A T 遺伝子のヌクレオチド配列は、L e e m a n s への欧州特許出願第0242246号に提供されている。DeGreefら、Bio/Technology 7:61(1989)も、P A T 活性をコードするキメラバー遺伝子を発現するトランスジェニック植物の作製を

50

記載している。セトキシジムおよびハロキシホップを含む、フェノキシプロピオン酸およびシクロヘキソンに対する抵抗性を与える遺伝子の例は、Marshallら、Theor. Appl. Genet. 83:435 (1992)により記載されているA c c 1 - S 1、A c c 1 - S 2およびA c c 1 - S 3遺伝子である。グリホサート抵抗性を与えることができるG A T遺伝子は、C a s t l eらへのW O 2 0 0 5 0 1 2 5 1 5に記載されている。2, 4-D、f o pおよびピリジルオキシオーキシン除草剤に対する抵抗性を与える遺伝子はW O 2 0 0 5 1 0 7 4 3 7および米国特許出願第1 1 / 5 8 7, 8 9 3号に記載されている。

【0064】

トリアジン (p s b Aおよび1 s +遺伝子) またはベンゾニトリル (ニトリラーゼ遺伝子) を含む、他の除草剤は光合成を阻害することができる。Przibilaら、Plant Cell 3:169 (1991)は、変異体p s b A遺伝子をコードするプラスミドを有するクラミドモナス (Chlamydomonas) の形質転換を記載している。ニトリラーゼ遺伝子のヌクレオチド配列は、S t a l k e rへの米国特許第4, 8 1 0, 6 4 8号に開示されており、これらの遺伝子を含むDNA分子はA T C C受託番号5 3 4 3 5、A T C C受託番号6 7 4 4 1、およびA T C C受託番号6 7 4 4 2の下で入手可能である。グルタチオンS-トランスフェラーゼをコードするDNAのクローニングおよび発現はHayesら、Biochem. J. 285:173 (1992)により記載されている。

【0065】

本発明の目的のために、選択可能マーカー遺伝子には、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼI I (Fraleyら、(1986) CRC Critical Reviews in Plant Science、4:1~25)、シアナミドヒドラーゼ (Maier-Greinerら、(1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA、88:4250~4264)、アスパラギン酸キナーゼ、ジヒドロジピコリン酸シンターゼ (Perlら、(1993) Bio/Technology、11:715~718)、トリプトファンデカルボキシラーゼ (Goddijnら、(1993) Plant Mol. Bio.、22:907~912)、ジヒドロジピコリン酸シンターゼおよび脱感作アスパルテート (aspartate) キナーゼ (Perlら、(1993) Bio/Technology、11:715~718)、バー遺伝子 (Tokiら、(1992) Plant Physiol.、100:1503~1507 および Meagherら、(1996) and Crop Sci.、36:1367)、トリプトファンデカルボキシラーゼ (Goddijnら、(1993) Plant Mol. Biol.、22:907~912)、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ (N E O) (Southernら、(1982) J. Mol. Appl. Gen.、1:327、ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ (H P TまたはH Y G) (Shimizuら、(1986) Mol. Cell Biol.、6:1074)、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (D H F R) (Kwokら、(1986) PNAS USA 4552)、ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ (DeBlockら、(1987) EMBO J.、6:2513)、2, 2-ジクロロプロピオン酸デハロゲナーゼ (Buchanan-Wollastonら、(1989) J. Cell Biochem. 13D:330)、アセトヒドロキシ酸シンターゼ (Andersonら、米国特許第4, 7 6 1, 3 7 3号; Haughnら、(1988) Mol. Gen. Genet. 221:266)、5-エノールピルビル-シキミ酸-リン酸シンターゼ (a r o A) (Comaiら、(1985) Nature 317:741)、ハロアリアルニトリラーゼ (Stalkerら、公開されたP C T出願W O 8 7 / 0 4 1 8 1)、アセチル補酵素Aカルボキシラーゼ (Parkerら、(1990) Plant Physiol. 92:1220)、ジヒドロプテロイン酸シンターゼ (s u l I) (Guerineauら、(1990) Plant Mol. Biol. 15:127)、および3 2 k D光化学系I Iポリペプチド (p s b A) (Hirschbergら、(1983) Science、222:1346) をコードする遺伝子が含まれるが、これらに限定されない。

【0066】

クロラムフェニコール (Herrera-Estrellaら、(1983) EMBO J.、2:987~992)、メトトレキサート (Herrera-Estrellaら、(1983) Nature、303:209~213; Meijerら、(1991) Plant Mol Bio.、16:807~820 (1991))、ハイグロマイシン (Waldronら、(1985) Plant Mol. Biol.、5:103~108; Zhijianら、(1995) Plant Science、108:219~227 および Meijerら、(1991) Plant Mol. Bio. 16:807~820)、ストレプトマイシン (Jonesら、(1987) Mol. Gen. Genet.、210:86~91)、スペクチノマイシン (Bretagne-Sagnardら、(1996) Transgenic Res.、5:131~137)、ブレオマイシン (Hilleら、(1986) Plant Mol. Biol.、7:171~176)、スルホンアミド (Guerineauら、(1990) Plant Mol. Bio.、15:127~136)

、プロモキシニル (Stalkerら、(1988) Science, 242:419~423)、2, 4-D (Streberら、(1989) Bio/Technology, 7:811~816)、グルホサート (Shawら、(1986) Science, 233:478~481)、およびホスフィノトリシン (DeBlockら、(1987) EMBO J., 6:2513~2518) に対する抵抗性をコードする遺伝子も含まれる。本開示に列挙される参考文献はすべて、別段に記述されなければ参照によりその全体を本明細書に組み込まれる。

【0067】

選択可能マーカーおよびレポーター遺伝子の上記一覧は限定することを意図していない。いかなるレポーターまたは選択可能マーカー遺伝子も本発明に包含される。必要な場合には、そのような遺伝子は当技術分野で公知である方法により塩基配列決定することができる。

10

【0068】

レポーターおよび選択可能マーカー遺伝子は、植物における最適発現のために合成される。すなわち、遺伝子のコード配列は植物における発現を増強するように改変されている。合成マーカー遺伝子は植物においてより高いレベルで発現されてより高い形質転換効率を生じるように設計されている。遺伝子の合成最適化のための方法は当技術分野で入手可能である。実際、いくつかの遺伝子は、植物における遺伝子産物の発現を増加するように最適化されている。

【0069】

マーカー遺伝子配列は特定の植物種における発現のために最適化することが可能であり、またはあるいは植物科における最適発現のために改変することが可能である。植物の好ましいコドンは、対象の特定の植物種において最大量で発現されるタンパク質において最も使用頻度の高いコドンから決定しうる。例えば、EPA0359472; EPA0385962; WO91/16432; Perlakら、(1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:3324~3328; およびMurrayら、(1989) Nucleic Acids Research, 17: 477~498; 米国特許第5, 380, 831号; および米国特許第5, 436, 391号を参照されたい。参照によって本明細書に組込まれている。このように、ヌクレオチド配列は任意の植物における発現に最適化することが可能である。遺伝子配列の全てまたは任意の部分は最適化するまたは合成であってもよいことが認識される。すなわち、完全に最適化されたまたは部分的に最適化された配列も使用しうる。

20

【0070】

除草剤に対する抵抗性を与える遺伝子:

A. 除草剤イミダゾリノンまたはスルホニル尿素に対するアセトヒドロキシ酸シンターゼ (AHAS) およびアセト乳酸シンターゼ (ALS) の抵抗性/耐性。AHASおよび変異体の遺伝子および変異体は、米国特許第4, 761, 373号、米国特許第5, 304, 732号、米国特許第5, 331, 107号、米国特許第5, 853, 973号、および米国特許第5, 928, 937号に開示されている。ALSの遺伝子および変異体は米国特許第5, 013, 659号および米国特許第5, 141, 870号に開示されている。

30

【0071】

B. 除草剤シクロヘキサジオンおよび/またはアリールオキシフェノキシプロパン酸 (Haloxyp, Diclofop, Fenoxyp, Fluazifop, Quizalofopを含む) に対するアセチル補酵素Aカルボキシラーゼ (ACCase) の抵抗性/耐性遺伝子は米国特許第5, 162, 602号および米国特許第5, 498, 544号に記載されている。

40

【0072】

C. グルホサート抵抗性/耐性の遺伝子。5-エノールピルビル-3-ホスホシキミ酸シンターゼ (ES3Pシンターゼ) の遺伝子は米国特許第4, 769, 601号に記載されている。5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸シンターゼ (EPSPS) および変異体の遺伝子は米国特許第4, 940, 835号、米国特許第5, 188, 642号、米国特許第5, 310, 667号、米国特許第5, 633, 435号、米国特許第5, 63

50

3, 448号、および米国特許第6, 566, 587号に記載されている。

【0073】

D. グルホシネート（ピアラホス、ホスフィノトリシン（PPT））抵抗性／耐性の遺伝子。ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ（Pat）の遺伝子は米国特許第5, 273, 894号、米国特許第5, 276, 268号、および米国特許第5, 550, 318号に記載されており、ピアラホス抵抗性の遺伝子（Bar）は米国特許第5, 561, 236号、および米国特許第5, 646, 024号、米国特許第5, 648, 477号、および米国特許第7, 112, 665号に記載されている。グルタミンシンテターゼ（GS）の遺伝子は米国特許第4, 975, 372号および欧州特許出願EP 0333033 A1に記載されている。

10

【0074】

E. 除草剤イソオキサゾール、ジケトニトリル、および／またはスルコトリオンおよびメソトリオンを含むトリケトンに対するヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ（HPPD）の抵抗性／耐性遺伝子は、米国特許第6, 268, 549号および米国特許第6, 069, 115号に記載されている。

【0075】

F. 2, 4-D抵抗性／耐性の遺伝子。2, 4-Dモノオキシゲナーゼの遺伝子は米国特許第6, 100, 446号および米国特許第6, 153, 401号に記載されている。2, 4-D抵抗性／耐性の追加の遺伝子はUS 2009/0093366およびWO 2007/053482に開示されている。

20

【0076】

G. 除草剤イミダゾールおよび／またはトリアゾールに対するイミダゾールグリセロールリン酸デヒドラターゼ（IGPD）の遺伝子は米国特許第5, 541, 310号に記載されている。除草剤Dicambaに対するDicamba分解酵素（オキシゲナーゼ、フェレドキシン、およびレダクターゼ）の遺伝子は米国特許第7, 022, 896号および米国特許第7, 105, 724号に開示されている。

【0077】

H. トリアジン（psbAおよび1s+遺伝子）またはベンゾニトリル（ニトリラーゼ遺伝子）を含む、光合成を阻害する除草剤の遺伝子。例えば、変異psbA遺伝子をコードするプラスミドでのクラミドモナス（Chlamydomonas）の形質転換を開示しているPrzibilaら、Plant Cell 3:169 (1991)を参照されたい。ニトリラーゼ遺伝子のヌクレオチド配列は米国特許第4, 810, 648号に開示されており、これらの遺伝子を含有するDNA分子はATCC受託番号53435、ATCC受託番号67441、およびATCC受託番号67442下で入手可能である。グルタチオンS-トランスフェラーゼをコードするDNAのクローニングおよび発現はHayesら、Biochem. J. 285:173 (1992)により記載されている。

30

【0078】

他の方法で具体的に説明されなければ、本明細書で使用される全ての専門用語および科学用語は、本開示が属する分野の当業者が一般的に理解しているのと同じ意味を有する。分子生物学の一般用語の定義は、例えば、Lewin, Genes V, Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrewら、(eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); およびMeyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference, VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8)に見ることができる。

40

【0079】

3つのEPSPS遺伝子パラログ（A、BおよびC）ならびにセイヨウアブラナ（*brassica napus*）中の5' UTRなどのその遺伝子成分、プロモーターおよび輸送ペプチドに関係する構築物および方法が提供される。遺伝子およびその遺伝子エレメントのトランスジェニックおよび非トランスジェニック（その天然環境において）使用も開示される。いくつかの実施形態では、これらの遺伝子またはエレメントのトランスジェニック使用は植

50

物における除草剤（例えば、グリホサートまたは2，4-D）耐性という形質を与えることができる。パラログAとBは高度な相同性または同一性（約92%）を共有しており、パラログCとDも同様である（約95%）。パラログAは複数の組織型において異なる植物成長段階において最も高度な発現パラログである。EPSPSパラログA遺伝子は、すべての試験された植物組織、例えば、葉、根、茎、頂端分裂組織、花、花蕾、等において4～8葉期で構成的に発現される。さらに、パラログAはその他の4種のパラログと比べて独特の輸送ペプチド配列を有する。いくつかの実施形態では、EPSPSパラログAの輸送ペプチドを使用して細胞質から色素体までのタンパク質前駆体の効果的移行を提供する。さらに、EPSPSパラログB、CおよびEの輸送ペプチドは細胞質から色素体までのタンパク質前駆体の移行を提供するのに有用になりうる。EPSPS酵素は、植物、菌類および微生物における芳香族アミノ酸および芳香族代謝物の合成のためのシキミ酸経路の6番目の重要な酵素を表す。したがって、EPSPS遺伝子は、植物中のアミノ酸含有量を操作するように適用される既存のまたは将来のどんな技術によっても植物中で上方調節するまたは下方調節することが可能である。例えば、WO2009/042164を参照されたい。前記特許文献の内容は参照によりその全体を組み込まれる。これらの特長はすべて、単独でまたは組み合わせれば、EPSPSパラログは、シキミ酸および関連経路の操作の結果として除草剤耐性などの形質ならびに／またはアミノ酸、炭素および窒素含有量の変化を与えるトランスジェニックもしくは非トランスジェニック（天然の遺伝子環境）適用における使用に重要になる。本発明に従ったトランスジェニックキャノーラは特に興味深い。

10

20

【0080】

セイヨウアブラナ (*B. napus*) 変種 Nex 710 由来の EPSPS パラログ A のプロモーター配列が提供される。EPSPS パラログ A のこのプロモーターは、トランスジェニックセイヨウアブラナ (*B. napus*) カルス組織および苗木において示される結果に基づけば二方向であり、したがってアブラナ属 (*Brassica*) 二方向構成的プロモーター (BBCP) と呼ばれる。トランスジェニック植物において BBCP を使用すれば、以下の利点、(a) 植物ゲノムへの1回の形質転換でより多くの遺伝子を積み重ねることができる、(b) トランス遺伝子をすべての植物組織および部分において構成的に発現させることができる、および (c) 亜鉛フィンガー媒介精密遺伝子スタッキングを用いて標的遺伝子座において新しい遺伝子をさらに付加するまたは交換することができる、のうちの少なくとも1つを提供することができる。例えば、BBCP を使用すれば、一方向に選択可能マーカー／除草剤耐性形質の、別の方向に対象の遺伝子（例えば、作物保護または産出高増強という形質）の発現を可能にできる。パラログ A 遺伝子配列に含有され、色素体、例えば、葉緑体へのタンパク質ターゲティングを可能にする独特の輸送ペプチドがさらに提供される。

30

【0081】

セイヨウアブラナ (*B. napus*) は複二倍体種であり、2つの染色体セット、ブラッシカ・ラパ (*B. rapa*) ($2n = 20$ 、AA) とブラッシカ・オレラセア (*B. oleracea*) ($2n = 18$ 、CC) の組合せから生じる。したがって、提供される複数の EPSPS 遺伝子パラログは、その起源が A ゲノム由来もしくは C ゲノム由来に応じて（相同な (homeologous)）または種分化に続くゲノム内でのその重複の結果として（パラログスな (paralogous)）相同遺伝子またはパラログス遺伝子であることもある。

40

【0082】

提供される方法および構築物を使用すれば、インプット形質（例えば、虫害抵抗性および除草剤耐性形質）、農業形質（例えば、産出高増強）、アウトプット形質（例えば、ヘルシー油）、等などの任意の形質をキャノーラまたは双子葉／单子葉植物において発現させることができる。BBCP を使用する特異的ベクターの構築およびキャノーラまたは他の植物へのその形質転換に関連するすべての方法も提供される。

【0083】

送達および／または形質転換。植物の形質転換に適した方法には、DNA を細胞内に導

50

入することができるいかなる方法でも、例えば、限定せずに、エレクトロポレーション（例えば、米国特許第5, 384, 253号参照）、微粒子銃（例えば、米国特許第5, 015, 580号、米国特許第5, 550, 318号、米国特許第5, 538, 880号、米国特許第6, 160, 208号、米国特許第6, 399, 861号、および米国特許第6, 403, 865号参照）、アグロバクテリウム（*Agrobacterium*）媒介形質転換（例えば、米国特許第5, 635, 055号、米国特許第5, 824, 877号、米国特許第5, 591, 616号、米国特許第5, 981, 840号、および米国特許第6, 384, 301号参照）、プロトプラスト形質転換（例えば、米国特許第5, 508, 184号参照）が含まれる。前述の技法などの技法の適用を通じて、事実上どんな植物種の細胞も安定的に形質転換され、これらの細胞は当業者には公知の技法によりトランスジェニック植物に成長せうる。例えば、ワタ形質転換のコンテキストで特に有用でありうる技法は、米国特許第5, 846, 797号、米国特許第5, 159, 135号、米国特許第5, 004, 863号、および米国特許第6, 624, 344号に記載されており、特にアブラナ属（*Brassica*）植物を形質転換するための技法は、例えば、米国特許第5, 750, 871号に記載されており、ダイズを形質転換するための技法は、例えば、米国特許第6, 384, 301号に記載されており、トウモロコシを形質転換するための技法は、例えば、米国特許第7, 060, 876号および米国特許第5, 591, 616号、ならびに国際PCT出願WO95/06722に記載されている。

10

【0084】

受容細胞への外来性核酸の送達を達成後、形質転換細胞は一般にさらなる培養および植物再生のために同定される。形質転換体を同定する能力を改善するために、形質転換体を生み出すのに使用される形質転換ベクターと一緒に選択可能またはスクリーニング可能マーカー遺伝子を用いることを望む場合がある。この場合、潜在的形質転換細胞集団は、細胞を選択剤（複数可）に曝露することによりアッセイすることができる、または望ましいマーカー遺伝子形質を求めて細胞をスクリーニングすることが可能である。

20

【0085】

選択剤への曝露を乗り切る細胞、またはスクリーニングアッセイにおいて陽性とスコア化された細胞は、植物の再生を支持する培地で培養してもよい。いくつかの実施形態では、どんな適切な植物組織培養培地（例えば、MSおよびN6培地）でも、成長調節物質などのさらなる物質を含むことにより改変しうる。組織は、植物再生取組みを始めるのに十分な組織が入手可能になるまで、または手動選択のラウンドの繰り返しの続いて、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）成長調節物質を有する基礎培地で維持され、次に苗条形成の助けになる培地へ移されうる。培養物は十分な苗条形成が生じるまで定期的に移される。苗条が形成されると、根形成の助けになる培地へ移される。十分な根が形成されると、植物はさらなる成長と成熟のために土壌に移すことができる。

30

【0086】

再生中の植物における提供される構築物を含む望ましい核酸分子の存在を確認するため、種々のアッセイを実施しうる。そのようなアッセイは、サザンおよびノーザンブロットイングならびにPCRなどの分子生物学的アッセイ；例えば、免疫学的手段（ELISA、ウェスタンブロットおよび／または液体クロマトグラフィー質量分析法（LC-MS/MS spectrophotometry））によりまたは酵素機能によりタンパク質産物の存在を検出するなどの生化学的アッセイ；葉または根アッセイなどの植物部分アッセイ；ならびに／または全再生植物の表現型の解析を含みうる。

40

【0087】

標的にされる組込み事象は、例えば、対象の核酸分子に特異的なオリゴヌクレオチドプライマーを使用して、例えば、PCR増幅によりスクリーニングしうる。PCR遺伝子型判定には、ゲノムに組み込まれた対象の核酸分子を含有すると予測される単離された宿主植物カラス組織由来のゲノムDNAのポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅、続いてPCR増幅産物の標準クローニングおよび配列解析が含まれるがこれらに限定されないと理解されている。PCR遺伝子型判定の方法はよく記載されており（例えば、Riosら、(2002)

50

Plant J. 32:243～53参照)、細胞培養物を含む、任意の植物種または組織型由来のゲノムDNAに適用しうる。標的配列と導入された配列の両方に結合するオリゴヌクレオチドプライマーの組合せは、PCR増幅反応において順次使用されてもまたは多重化されてもよい。標的部位、導入された核酸配列、および／または前記2つの組合せにアニールするように設計されたオリゴヌクレオチドプライマーを作製しうる。したがって、PCR遺伝子型判定戦略には、例えば、限定せずに、植物ゲノムにおける特定の配列の増幅、植物ゲノムにおける複数の特定の配列の増幅、植物ゲノムにおける非特異的配列の増幅、および前述のいずれかの組合せが含まれうる。当業者であれば、プライマーと増幅反応の追加の組合せを考案してゲノムを調べることができる。例えば、フォワードとリバースオリゴヌクレオチドプライマーのセットを、導入された核酸配列の境界の外側で標的に特異的な核酸配列(複数可)にアニールするように設計しうる。

10

【0088】

フォワードおよびリバースオリゴヌクレオチドプライマーは、導入された核酸分子に、例えば、そこに含まれる対象のヌクレオチド配列内のコード領域に対応する配列で、またはこの核酸分子の他の部分に特異的にアニールするように設計しうる。これらのプライマーは上記のプライマーと併せて使用しうる。オリゴヌクレオチドプライマーは所望の配列に従って合成することができ、市販されている(例えば、Integrated DNA Technologies, Inc.、Coralville、IAから)。増幅に続いてクローニングおよび塩基配列決定を、または増幅産物の直接配列解析を実施してもよい。当業者であれば、PCR遺伝子型判定中に生み出される増幅産物の解析のための代替方法を想定してもよい。一実施形態では、遺伝子標的に特異的なオリゴヌクレオチドプライマーはPCR増幅において用いられる。

20

【0089】

本発明は特定の方法及び実施形態を参照して説明されてきたが、本発明から逸脱することなく様々な改変および変化を加えられることは認識されるであろう。本明細書で引用される出版物はすべて、本発明に関連して使用されることがある組成物および方法を説明し開示する目的で、参照により本明細書に明確に組み込まれる。引用されている特許、特許出願、ならびに参照ウェブサイトおよび公表データベース中の配列情報もすべて参照により組み込まれる。

(実施例)

30

【実施例1】

【0090】

EPSPSパラログAプロモーター(BBCP)配列の同定

セイヨウアブラナ(*Brassica napus*)中の5つの5'-エノールピルビルシキミ酸-3'-リン酸シンターゼ(EPSPS)遺伝子配列(パラログまたは相同体)はUS2009/0205083A1に記載されている。これら5つの遺伝子間では、EPSPSパラログAのプロモーターが種々の植物組織において最も強力な発現を推進する。1571nt EPSPSパラログAの配列(配列番号7)を伸長するためには、EPSPSパラログA遺伝子の追加の配列はGenomeWalker(商標)ユニバーサルキット(Clone tech Laboratories、Palo Alto、CA)を使用してゲノムを介して得られ、そのプロモーター領域および3'非翻訳領域(例えば、配列番号26)を含むEPSPSパラログAの完全な配列(配列番号8)が得られる。

40

【0091】

EPSPSパラログA遺伝子のプロモーター配列を同定するために、様々な植物およびアブラナ属(*Brassica*)データベースに対してBasic Local Alignment Search Tool(BLAST)を使用して完全配列を探索する。EPSPSパラログA遺伝子発現の方向に整列したセイヨウアブラナ(*Brassica napus*)およびブラシカ・ラパ(*Brassica rapa*)の6つのcDNAおよび／またはmRNA配列が同定される。これらの配列のジェンバンク識別番号(ID)はES937178、ES904055、CD825798、CD835768、CD837464およびEV12191

50

5である。これらのcDNAおよび／またはmRNA配列は、標的種の葉、根または胚ライブラリーから検出することができるが、これらのcDNAまたはmRNAの特定の役割についてはジェンバンクには注釈はない。興味深いことに、EPSPSパラログA遺伝子の発現の反対方向にEPSPSパラログA遺伝子の5'配列に適合する3つのcDNAおよび／またはmRNAが同定される。これらの配列のジェンバンクIDはCD836095、EV100366およびEE568337である。セイヨウアブラナ (*Brassica napus*) cDNAおよび／またはmRNA配列はこれらの配列の供給源であり、やはりジェンバンクではこれらの配列に特定の機能は割り当てられていない。

【0092】

この実施例の配列分析により、EPSPSパラログA遺伝子のプロモーター配列は二方向プロモーターであることが明らかにされ、このプロモーターはアブラナ属 (*Brassica*) 二方向構成的プロモーター (BBCP) と呼ばれる。

【実施例2】

【0093】

BBCP構築物の設計および構築

pDAB100333と名付けられる単一バイナリーベクター (図12) は、当技術分野において認知されている手順を使用して構築する。バイナリーpDAB100333は遺伝子発現カセットまたは植物転写ユニット (PTU) の2つのセットを含有している。第一のPTUセットは、2つのレポーター遺伝子を推進する二方向セイヨウアブラナ (*Brassica napus*) パラログAプロモーター (BBCP) からなる。BBCPの一方の末端はβ-グルクロニダーゼレポーター遺伝子 (GUS) の発現を推進するように構築され、アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) オープンリーディングフレーム-243'非翻訳領域 (AtuORF243'UTR) が終端をなす。BBCPの反対の末端は緑色蛍光タンパク質レポーター遺伝子 (GFP) を推進するように構築され、アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) ノパリンシンターゼ3'非翻訳領域 (AtuNos3'UTR) が終端をなす。

【0094】

pDAB100333の第二のPTUセットは、イソペンテニルトランスフェラーゼコード配列 (ipt CDS; ジェンバンク受託番号X00639.1) 内にクローニングされ、それによりjptコード配列を中断する選択可能マーカーを含み、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) ユビキチン10プロモーター (AtUb110プロモーター) を使用してホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼコード配列 (PAT) を推進し、PTUはアグロバクテリウム・ツメファシエンス (*A. tumefaciens*) オープンリーディングフレーム-13'非翻訳領域 (AtuORF13'UTR) が終端をなす。得られたバイナリーベクターは、二方向プロモーターにより推進される2つの視覚的レポーター遺伝子 (GUSおよびGFP) および選択可能マーカー遺伝子 (PAT) を含有する。

【0095】

バイナリーベクターpDAB100333は、エレクトロポレーションを使用してアグロバクテリウム・ツメファシエンス (*A. tumefaciens*) 内に動員する。個々のコロニーは、抗生物質スペクチノマイシンを含有するYEP培地上で同定する。単一コロニーは単離し、pDAB100333バイナリーベクターの存在は制限酵素消化により確かめることができる。

【0096】

もう1つのバイナリーベクターpDAB100331 (図12) も、当技術分野において認知されている手順を使用して構築する。バイナリーpDAB100331は、pDAB100333の場合とは逆配向にBBCPを含有するように構築するが、特長はpDAB100333と同じである。したがって、バイナリーベクターpDAB100331は遺伝子発現カセットまたは植物転写ユニット (PTU) の2つのセットからなる。第一のPTUセットは、2つのレポーター遺伝子を推進する二方向セイヨウアブラナ (*Brassica*

10

20

30

40

50

napus) パラログAプロモーター (pDAB100333と比べた場合逆配向のBBCP) からなる。BBCPの一方の末端は緑色蛍光タンパク質レポーター遺伝子 (GFP) を推進するように構築され、アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) ノパリンシンターゼ3' 非翻訳領域 (AtuNos 3' UTR) が末端をなす。BBCPの反対の末端はβ-グルクロニダーゼレポーター遺伝子 (GUS) の発現を推進するように構築され、アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) オープンリーディングフレーム-24 3' 非翻訳領域 (AtuORF24 3' UTR) が末端をなす。

【0097】

pDAB100331の第二のPTUセットも、イソペンテニルトランスフェラーゼコード配列 (ipt CDS; ジェンバンク受託番号X00639.1) 内にクローニングされ、それによりjptコード配列を中断する選択可能マーカールを含み、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) ユビキチン10プロモーター (AtUbi10プロモーター) を使用してホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼコード配列 (PAT) を推進し、PTUはアグロバクテリウム・ツメファシエンス (*A. tumefaciens*) オープンリーディングフレーム-1 3' 非翻訳領域 (AtuORF1 3' UTR) が末端をなす。得られたバイナリーベクターは、二方向プロモーターにより推進される2つの視覚的レポーター遺伝子 (GUSおよびGFP) および選択可能マーカール遺伝子 (PAT) を含有する。

【0098】

同様に、バイナリーベクターpDAB100331は、エレクトロポレーションを使用してアグロバクテリウム・ツメファシエンス (*A. tumefaciens*) 内に動員する。個々のコロニーは、抗生物質スペクチノマイシンを含有するYEP培地上で同定する。単一コロニーは単離し、pDAB100331バイナリーベクターの存在は制限酵素消化により確かめることができる。

【0099】

高コピー数pUCベースのプラスミドにクローニングする直接DNA送達ベクターは、上に記載されているBBCPプロモーターを含有する第一PTUのみを使用して構築する。プラスミドpDAB108710およびpDAB108711 (図14) は当技術分野において認知されている手順を使用して構築する。この2つのベクターは、BBCPを異なる配向で含有するように構築されて同じ特長を推進するので、異なっている。単一PTUは2つのレポーター遺伝子を推進する二方向セイヨウアブラナ (*Brassica napus*) パラログAプロモーターからなる。BBCPの1つの末端は緑色蛍光タンパク質レポーター遺伝子 (GFP) を推進するように構築され、アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) ノパリンシンターゼ3' 非翻訳領域 (AtuNos 3' UTR) が末端をなす。BBCPの反対の末端はβ-グルクロニダーゼレポーター遺伝子 (GUS) の発現を推進するように構築され、アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) オープンリーディングフレーム-24 3' 非翻訳領域 (AtuORF24 3' UTR) が末端をなす。直接DNA送達ベクターは、トウモロコシ組織のパーティクルボンバードメントのために使用する。

【実施例3】

【0100】

セイヨウアブラナ (*Brassica napus*) 中でのBBCP構築物の発現

キャノーラ形質転換-胚軸セグメントの調製および前処理: エリートキャノーラ遺伝子型、Nex710の種子を10%市販の漂白剤で10分間表面殺菌し無菌蒸留水で3回すすぐ。種子は無菌ペーパータオルで乾燥させ、次に2分の1濃度のMS基本培地 [Phytotech Cat#M519 (PhytoTechnology Laboratories, Shawnee Mission, KS)]、20g/Lショ糖、および8g/L TC寒天からなる「発芽培地」を含有するPhytaトレイに置き、16時間明/8時間暗の光周期で23℃に設定された成長レジーム下に維持する。

【0101】

5日目に、実生は不稔性について検査され、Phytatレイは不稔性を維持するためラミナーフローフード(The Baker Company EdgeGARD)の内部に置く。無菌鉗子と剥離鉗を使用して、苗木はPhytatレイから取り除き、気生(分裂組織および子葉)領域と根は剥離し捨てる。胚軸は、乾燥を防ぐために必要な無菌蒸留水を含有する100×25mmペトリ皿に置く。胚軸は2mmセグメントに横方向に切断し、MS培地(Phytotech M519)、30g/Lショ糖、1mg/Lキネチン、および7g/L TC寒天で凝固させた1mg/L 2, 4-Dからなる「カルス誘導培地MSK1D1」上に重ね置きされた無菌フィルターペーパー上に水平に置く。プレートは透明なSterilite(登録商標)タブに置き、前処理として3日間同じ成長レジーム下に維持する。

10

【0102】

アグロバクテリウム(Agrobacterium)の調製：アグロバクテリウム(Agrobacterium)感染の四日前に、アグロバクテリウム(Agrobacterium)株DA2552(例えば、WO2012/016222参照)中のpDAB10333およびpDAB10331をグリセロールストックから、YEP培地(10g/Lペプトン、10g/L酵母エキス、5g/L NaCl、10g/Lショ糖プラス100mg/Lスペクチノマイシンおよび150mg/Lエリスロマイシンおよび15g/L Bacto Agarで凝固されている)上にストリークアウト(streak out)して、28℃で培養器(Fisher Scientific Isotemp Incubator)中2日間生育させる。2日後、アグロバクテリウム(Agrobacterium)の小ループを、150mLの「液体細菌増殖培地」(上記と同じ培地であるが凝固剤がない)を含有する500mLの無菌整流装置付きフラスコに置く。培養物は囲い込み振盪機(New Brunswick Scientific Innova 4330冷蔵培養器振盪機)上200rpmで、暗所において28℃で16時間増殖させる。16時間後、アグロバクテリウム(Agrobacterium)培養物は振盪機から取り除き、50mL遠心管にアリコートする。遠心管は遠心分離機(Beckman Model J2-21遠心分離機)に置き、6,000rpmで15分間遠心分離し、続いてLS塩(Phytotech L689)、3%グルコース、改変Gamborg B5ビタミン(Phytotech G249)、215mg/Lキネチン、および221mg/Lの2, 4-Dからなる「液体培養培地M」にpH5で再懸濁する。

20

30

【0103】

感染およびカルス誘導：感染の1日目、アグロバクテリウム(Agrobacterium)の準備ができるのを待っている間、キャノール胚軸セグメントを20mLの「液体培養培地」を含有する100×25無菌ペトリ皿に移す。次に「液体培養培地」は胚軸セグメントから取り除き、40mLのアグロバクテリウム(Agrobacterium)懸濁液を短時間ボルテックスし、胚軸セグメントを含有する100×25mmペトリ皿に注ぎ入れ30分間処置する。30分間の処置後、アグロバクテリウム(Agrobacterium)懸濁液はすべて二重ピペットを使用して取り除く。処理された胚軸は「カルス誘導培地MSK1D1」上に重ね置きされたフィルターペーパー上に再び置く。培養物はSterilite(登録商標)タブに戻し、色の濃い蓋で覆い、3日間の同時栽培期間、上記と同じ成長レジーム下の培養室に戻す。3日間の同時栽培期間の後、胚軸は「選択1培地MSK1D1H1」(「カルス誘導培地」プラス1mg/L Herbiceからなる)上に直に置き、透明な蓋付きの元のタブに戻し、培養室に戻して、上記と同じ成長レジームを維持する。1週間後、次に胚軸は「選択2培地MSK1D1H3」(「カルス誘導培地」プラス3mg/L Herbiceからなる)に直に移す。2週間後、胚軸は「選択3培地MSK1D1H5」(「カルス誘導培地」プラス5mg/L Herbiceからなる)に直に移す。胚軸セグメントは、胚軸の両末端に十分なカルスが形成されるまで2週間ごとに新しい選択3培地に移し続ける。次に、カルスはGUSについてアッセイする。

40

【0104】

キャノール胚軸セグメントのGUS染色：GUS染色手順は当技術分野では公知であり

50

、以下の、pH 8で0.1Mの NaPO_4 バッファー、0.5mMの $\text{K}_3(\text{Fe}(\text{CN})_6)$ 、10mMの Na_2EDTA 、1mg/mlのX-Gluc、および0.06%のTrition X-100の通りにGUS染色液をわずかに変更する。染色された組織由来の葉緑素は70%エタノールにより取り除く。GUSアッセイは、少なくとも2週間選択3培地上に置かれた後に胚軸セグメントにおいて行う。カルスをGUS染色液中に浸し、37℃、暗所で一晩インキュベートする。非感染組織およびGUS陽性対照は、陰性および陽性対照についてのアッセイでは常に含まれる。

【0105】

結果によれば、pDAB100331とpDAB100333形質転換の両方から得られるトランスジェニックカルス試料における著しいGUS発現が示されている。非トランスジェニック対照試料では青色は目に見えない。したがって、トランスジェニック実験結果により、BBCPが二方向プロモーターであることが確かめられる。

10

【実施例4】

【0106】

ダイズにおけるBBCP構築物の発現

アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) 株EHA105にバイナリーベクターpDAB9381 (BBCP二方向プロモーターを含有しない対照バイナリーベクター)、pDAB100331およびpDAB100333を別々に電気穿孔する。単離されたコロニーは抗生物質スペクチノマイシンを含有するYEP培地上で同定する。単一のコロニーは単離し、pDAB9381、pDAB100331およびpDAB100333バイナリーベクターの存在は制限酵素消化により確かめることができる。ダイズ (ダイズ (*Glycine max*) c. v. *Maverick*) のアグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 媒介形質転換は当技術分野で周知の方法に従って実施することができる。

20

【0107】

形質転換後、根が発生すると、根付いた小植物はGFP発現について励起/発光をカバーする482nm/502nm GFPフィルター付きで撮影する。葉は、Jefferson, R., (1987) "Histochemical localization of β -glucuronidase (GUS) reporter activity in plant tissues" *Plant Mol. Biol. Reporter*, 5: 387~405から適応させたプロトコールに従ってGUS染色のために小植物から試料採取する。次に、葉は、2×リン酸バッファーpH 7.0 (1×の0.1Mの NaH_2PO_4 および0.1Mの Na_2HPO_4 で作製)、0.5mMの $\text{K}_3(\text{Fe}(\text{CN})_6)$ 、10mMの Na_2EDTA 、1mg/mlのX-Gluc、および0.06%のTrition X-100からなる染色液に浸し、37℃で一晩インキュベートする。インキュベーション後、染色液は取り除き、組織は70%エタノールを数回交換して洗浄し、撮影する前にエタノール中に一晩放置しておく。

30

【0108】

試験した外植片およびトランスジェニック小植物についての4ラウンドの実験結果は表2に示している。表2は、BBCPにより推進されるGFPおよびGUSレポーター遺伝子の発現されたタンパク質産物を含有することを確認しているトランスジェニック苗条の数を示している。構築物pDAB100331およびpDAB100333で安定的に形質転換されているダイズトランスジェニック苗木は3~14%の頻度で再生される。再生された苗条 (小植物) のほぼ81~99%がGFPを発現し、その41%がGFPとGUSの両方を発現する。pDAB100333で再生された苗木では、GUS発現は葉全体でより均一であり、中肋組織および葉脈では第一に発現されることはない。複数の葉について終了している研究において観察されたように、pDAB100331から再生される苗木において比較して、GUS発現は葉の中肋および葉脈においてより局在化していると思われる。対照構築物pDAB9381で形質転換されているトランスジェニック苗木は、GFPまたはGUS発現を全く示さない。結果により、BBCPはトランス遺伝子発現を両方向に妥当なレベルで推進するが、葉組織内では発現パターンにいくつかのマイナーな方向の違いがある可能性があることが確かめられる。

40

50

【0109】

【表2】

表2. 試験された外植片およびトランスジェニック小植物におけるBBCPによるGFPおよびGUSレポーター遺伝子発現				
構築物	感染した外植片の数	再生された苗条の数	GFPを示す苗条の数	GUSを示す苗条の数
pDAB9381	1096	246 (22.4%)	236 (96%)	0
pDAB100331	1158	139 (12.0%)	138 (99%)	57 (41%)
pDAB100333	1153	160 (14.0%)	154 (96%)	63 (41%)

10

【実施例5】

【0110】

トウモロコシ葉組織の一過性形質転換

組織調製：濃褐色葉組織は照射の3～4時間前に収穫し、表3に記載される照射調製培地上に置く。プレートはラップをし、照射の準備ができるまで28℃、暗所で保存する。

【0111】

マイクロ粒子（金）調製：30mg金（1μmの大きさをBioRad、Hercules、CAより購入）を500μlの冷エタノール中で洗浄し15秒間超音波処理し、次に15秒間ボルテックスする。粒子は10分間沈殿させた後3000rpmで60秒間遠心分離させる。次に上清は捨て、ペレットは冷水で洗浄し（ペレットはピペット先端および／または指ボルテックスで壊す）、続いて3000rpmで60秒間遠心分離する。この洗浄および遠心分離ステップはさらに2回繰り返すことができる。最終すすぎ後、250μlの50%グリセロール（最終濃度約120mg/ml）を添加する。試料は15秒間超音波処理し、15秒間ボルテックスし、エペンドルフ管内にアリコートする。

20

【0112】

マイクロキャリアを調製する：照射する組織のプレートごとに、金/DNA反応物を、以下の通りに、5～15μg DNA（プラスミドpDAB108710、pDAB108711、または対照プラスミドDNA）、6mgの金、最終濃度1MのCaCl₂および16mMのスペルミジンを総反応容積125μlで調製する。超音波処理およびボルテックスの直後、50μlの金懸濁液アリコートそれぞれの反応管に入れる。反応管は50μlの予め冷却していたCaCl₂の添加前にボルテックスし、次に20μlの0.1Mスペルミジンの添加前に再度ボルテックスする。次に、反応管は最長10分までボルテックスし、5000rpmで15秒間遠心分離する前に実験台上で10分間そのままにしておく。上清は捨て、ペレットは150μlの70%エタノールに再懸濁する。次に、ペレットは、5000rpmで15秒間遠心分離する前にピペットおよび／または指ボルテックスで壊す。上清は捨て、ペレットは150μlのエタノールに再懸濁する。次に、ペレットは、5000rpmで15秒間遠心分離する前にピペットおよび／または指ボルテックスで再度壊す。最後に、ペレットは照射実験の前に36μlのエタノール（6mg金あたり36μl）に再懸濁する。マイクロキャリア上へのアリコート前に、ペレットは15秒間超音波処理し、金が十分懸濁しているように見えるまでボルテックスする。ペレットをそれぞれ10μlで3つのマイクロキャリア上にアリコートする。アリコート間の超音波処理およびボルテックスが推奨される。

30

40

【0113】

【表 3】

表 3. 照射調製培地の成分		
成分	量	単位
MS 塩	4.330	g/L
1,2,3,5/4,6-ヘキサヒドロキシシクロヘキサン	100.000	mg/L
MES	0.500	g/L
EPS0000063-L-プロリン	700.000	mg/L
カゼイン酵素加水分解物	100.000	mg/L
ショ糖	30.000	g/L
Gelzan (Gelrite) 714246	2.300	g/L
EPS0000200-isu 改変 MS ビタミン(1000x)	1.000	mL/L
EPS0000205-ジカンバ-KOH - 6.6 mg/ml	3.300	mg/L
EPS0000206-硝酸銀- 8.5 mg/ml	15.000	mg/L
マンニトール	45.50	g/L

10

【0114】

照射条件：ヘリウムベースのマイクロキャリアディスクおよびマイクロキャリアホルダーを使用し先立って準備しオートクレーブする。DNA被覆金粒子（10 μlで十分懸濁されている）を乾燥するまで5分間マイクロキャリアの上に置く。発射のためのマイクロキャリア発射台を組み立てるために、停止スクリーンを先ず組み立て装置に設置する。次に、マイクロキャリアを組み立て装置上に逆さまに置き、次に組み立てマイクロキャリア蓋を閉じて、その後新たに手短にすすいだ（70%エタノール中で）1350 psi 破裂板をストッパーに設置し、ガス加速管に取り付ける。次に、マイクロキャリア組み立て装置を直ちに最上層のスロットに入れて、その後チャンバーの扉を閉める。照射前に真空排気室において真空を起動させる。1350 psi 破裂板が破裂しヘリウム圧力計がゼロに下がるまで発射ボタンを押し続けることにより試料に照射する。それぞれのプレートは同じプラスミドで3回まで照射することができ、プレートは照射がプレート上の異なる部位／方向で起こることができるように向きを変えることができる。照射後、プレートはGFP観察および／またはSigma-Aldrich染色キットを使用するGUS染色前に少なくとも24時間28℃で暗所に保存する。

20

30

【0115】

結果：GUS発現は、BBCPにより推進されるGUS遺伝子を含有するプラスミドを照射した葉組織において観察される。対照プラスミドを照射したトウモロコシ葉組織はGUS発現を全く示していない。GFP発現は、BBCPにより推進されるGFP遺伝子を有するプラスミドで形質転換されたトウモロコシ葉試料において観察される。対照構築物を照射されたトウモロコシ葉組織はGFP発現を全く示していない。この結果により、BBCPはレポーター遺伝子、GUSおよびGFPの発現を両方向に推進する二方向プロモーターであることが確かめられる。結論として、BBCPからの二方向発現は、双子葉（ダイズおよびセイヨウアブラナ（*B. napus*））植物組織でも単子葉（トウモロコシ）植物組織でも観察することができる。

40

【0116】

多くの例となる態様および実施形態を上で考察してきたが、当業者であればある種の改変、置換、追加およびそれらの部分的組合せを認識するであろう。したがって、以下の添付の特許請求の範囲および今後導入される特許請求の範囲は、その真の精神および範囲内であるような改変、置換、追加および部分的組合せを全て含むと解釈されることが意図されている。

MLPSGLKETQLNNNNNNQKVHPQPMQEQINQNPEAMEALISNLFNGNISSLKSA
YIQLQSAHTPYDPDKQEADKAVISELKNLSEKHVYRENNPKPVCSVPKSDR
LA AEIQEQQSLLKTYEVMFKWKFQSEIQLKSDITHIEKIEAENQKRKLKLEKN
LKLKRMSSNSTSGDLPQPDLTALFTESTEYAAKSAVHDFSKPLINMMKAAG
WDLDSAESIEPGVAKYAKRPHKKYAFESYICQRMFSGQEQFTSLSDNDTET
FYTFQLALKDMDPLDALNDPSNDFGFKRSCYKYLILHMKPMAESFFGNLDQRE
VVTGGGHPRTAFYAQFLKAKLSIWLLHRLAYSF DPAAKNPGPS

【図 5 B】

配列番号12 セイヨウアブラナ(B. napus) EPSPSバロログBのタンパク質配列 506アミノ酸

MAQASRICQNPCVISNLSKSNQRKSPLSVSMKTHQISSWGLKKSNNGSVIRPV
RVTASVSTAEEKSSEIVLQPIREISGLIKLPGKSLSNRILLAAALSEGTTVVVNDLL
NSDDINMYMLDALKKLGLNVERDSENNRAVVEGCGIFFASLDSKSDIELYLGNG
AGTAMRPLTAAVTAAGGNASYILGGVPRMRERPIGDLVVLKQLGADVECT
LGTNCPVVRVNAVNGGLPGGKVKLSGXISSQYLTAALLMAAPLALGDVEIEIVDK
LISVPYVEMTLKLMERFVSAEHSDSWDRFFVYKGGQKYKSPGNAYVEGDASS
ASYFLAGAAITGETVTVVEGCGTTSLQGDVKFAEVLEKMGCKVSWTENSVTVT
GPSRDAFGMRHLRAVDVNMNMKMPDVAMTLAVVALFADGPTTTRDVASWRV
KETERMIAICTELRKLGAATVEGSDYCVITPPAKLKPAEIDTYDDHRMAMAFS
LAACADVPTIKDPGCTRKTRFPDYFQVLESITKH*TD

【図 5 C】

配列番号13 セイヨウアブラナ(B. napus) EPSPSバロログBのコード配列 1670nt

atggcgcaagctagcagaatctgccagaacccatgtgtatctccaatctctccaaatcaaaccaacgcaaatcgccctgtc
tgtctcgtagaagacgcaccagatactctcgtgggggttgaagaagagtaaacacggctctgtgattcgcggctgggta
acggcgctctgttccaggctgagaatctcggagattgtcttcagcccatatagagaatctcgggtctgatacagctacc
cggaccacaatctctgccaatggaatctcttcttagccgctctatcccgagggaaccactgattgtaacaactgttgaacag
tgaagacataactacattcattgtgagcttgaagaatggggcttaattggaacgtgacagtgaagaataacgtgcggtgtg
tgaaggattggcggggattccagctctcttagattccaagagtgatatactgagttgaccttgggaatgctggaacgccat
gcgtccacttaccgctgcagttaactgctgcagggtgcaacgcaagtataattcttgggtgggtgcctagaatgagggaagg
cctattggagatttggtttggctttaaagcagcttggtgctgagtgtgaatgtactcttggaaactaactgcctctctgttcgctc
aatgcataatgggtgcccctccgggtggaaggagtgaaagctatcttgaatacagttagtaacttgaactgctctgctcatggca
gctcctttagctctggagacgttggagattgagatctgttgaacaactgactctctgtccgtatgttgaatgacattgaagttagt
gaacgttttgtgttagtgccgagcatagtgacagttggcgatcgttcttcttcaaggcggttcagaaatacaagctgccttgt
aatgtcttagctagaaggatgctctttagtgcctagtatttcttggcgtgggtgcgccttactctgtagactgacttcttgaagg
ttgtggaacacacgctcgaggagatgtgaagtctcgtgagcttctgagaaatgggatgaagtgtcatgtagacagaga
gaacagttgtagctgtagctggacatctagagattgttttgaatgagacacttgcgcgtgttgaatgtaacatgaacaaa
tgctcttagttagccatgactcttgcgtgtgtgtctcttctgcagatggttccaaccaccattagagatgggcttagctgagagt
aaaggagacagagaaggatgattgccattgacagacagcttaggaagcttgtagctacagttggaagggtcttagattattgt
gtgataactccaccagctgaagctgaaacctggagagttgacacatagatgatcatagaatggcaatggcattctccctgt
cagctgtgtcgtatgttcagataacatcaagatctcgtgttcaccaggaanaacttccctgactacttccagctcctgaaa
gtatcacaaagcactaaacagac

【図 6 B】

配列番号15 セイヨウアブラナ(B. napus) EPSPSバロログCのタンパク質配列 516アミノ酸

MAQASRICHGVQNPCVIHNSLSKSNQKSPFSVSLKTQQSRASSWGLKKSGMT
LNGSVIRPVKVTASVSTAEEKASEIVLQPIREISGLIKLPGKSLSNRILLAAALSE
GTTVVVNDLLNSDDINMYMLDALKKLGLNVERDVNNRAVVEGCGIFFASLDS
KSDIELYLGNAAGTAMRPLTAAVTAAGGNASYVLDGVPRMRERPIGDLVVVL
KQLGADVECTLGTNCPVVRVNAVNGGLPGGKVKLSGXISSQYLTAALLMAAPLA
LGDVEIEIDKLSVPYVEMTLKLMERFVSAEHSDSWDRFFVYKGGQKYKSPG
NAYVEGDASSASYFLAGAAITGETVTVVEGCGTTSLQGDVKFAEVLEKMGCK
VSWTENSVTVTGPSRDAFGMRHLRAVDVNMNMKMPDVAMTLAVVALFADGP
TTTRDVASWRVKETERMIAICTELRKLGAATVEGSDYCVITPPAKLKPAEIDTY
DDHRMAMAFSLAACADVPTIKDPGCTRKTRFPDYFQVLESITKH*

【図 6 C】

配列番号16 セイヨウアブラナ(B. napus) EPSPSバロログCのコード配列 1554nt

atggcgcaagctagcagaatctgccatggcggtgcagaaacccatgtgtatctccaatctctccaaatcaacaaaaa
aatcacctttctcgtctcgtcgtgaagacgcagcagctctcaggctcttctcgtggggactaaagaaggttgaacgatgctaa
cgggttctgaattcgcggcggttaaggtaaacagcttcggttccnccggcgagaaagcttcagagattgtcttcaaccaattag
agaatctcgggtctcattaaagctaccgggtccaaatctctctccaatcggatctctcttctgtctctatctgagggaact
actgttagtggacaactgttgaacaagtatgacatacaactacatctgttgaatgcttgaagaagctggcggttaacgtggaacg
tgacagggttaaacacccgtgctgttagttgaaggatgtgtgtgaataatccagcttctttagattccaagagtataattgagtt
gtaccttgggaatgcaggaaacgccatgcgttccactaccgctgccttactgctgcagggtgccaacgcaagtataattgctt
gatggggctgcctagaatgaggggagagaccattagagatttggtttgtggtcttaagcagcttgggtgctgattgaatgtact
ctgggcactaactgtcctctgttctgttcaatgctaatgttggcccttccgggtggaagggtgaagctttctgcatcaatcagt
agtcataactgactgccttgcctatgagcagctctctttagctcttggagacgttggagattgagatcattgataaactgatttct
tccatattgtgaatgacattgaagttgatggaacgttttgggttttagtgcgagcatagtgatagctggagatcgtttcttgc
agggcggtgcagaagtacaagtgccctgttaattgctttagtagaaggatgactcttagtgcctgactcttctgtcgtcgtgctg
ctattaccgggtgaacgtctactgttgaagggttgggaacacactagcttccaggagatgtgaattcgcagagacttagca
gaaatgtgaatgataatgattcgtggaagagacagagctgtgactgtgactggacatctagagattgttggaaatgagac
ttcgtgctgttgtgatgtcaacatgataaaatgcccgcatgttagccatgacttcttccgtttgtgtctcttcttccgagtgtccaac
caccatcagagatgtgctgactggagattgaaggatgaagaaggatgataccatctgacacagagcttgcgaagctgt
gagctacagttggaagaggttcaagattattgtgtgataactcaccacgcgaaggttgaacccggcggaagttagatacgtatg
atgatacagaattggcgatggcgttctcgttcgacatgtgctgatttccagtcacatcaagatcttggctgcaccaga
aagacttctcctgactacttccaagcttgaagatgcacaaagcactaaaaa

【図 6 A】

配列番号14 セイヨウアブラナ(B. napus) EPSPSバロログC遺伝子の配列 2834nt
(US2009/0205083の配列番号12と同じ)

atggcgcaag ctacagaat ctgccatggc gtgcagaac catgtgttat catctccaat ctctccaaat
caacacaaa caatcacct ttctcgtct cgtggaagc gcagcagct cgagcttct cgtgggaact
aaaganagat ggaacgatgc taaacggttc tgaattcgc ccggttaagg taacagcttc cgtttccacg
gcggagaag ctfcagagat tgtgtctcaa ccaattagag aaatctcggg tctcaitaag ctacccegat
ccaatctct cccaatcgg atctccttc ttgtcgtct atctgaggta catatactg attagtgtta ggccttgc
gtgagattt gggaaacta gacaatttag taagaattta tatattatt ttaaaaaatt aaagccctat atatatat
ataaaaaatt tcaaaaaat tatggaggtt tgagactgaa gaaagttttt tttaattat tattataggg aactcatga
ttgcacaact tgttgaacag tgaatgacat aactacatgc ttgattcggt gaagaagctt gggcttaaga
tggaaactga cagggttaac aaccgtgcgt tagttgaagg atrggttga atattccag ctctctaga
ttcaagagt gatattgagt tgtaccttgg gaatgcaga acagccaatgc gtccaactac cgtcgcggt
actgtgcag gtggcaacgc aaggtaaagg ttaaggagct ttgttatt gtcaagaat ttgatttgg ttgatgct
ttagtgtgt ttgtttcta gttatgtct tgaatgggtg cctagaatga gggagagac tataggagat ttggtgttg
tcttaagca gcttgcgtct gatgtgaat gtactctgg cactaactgt cctctcgttc gtgcaatgc taatgttgc
cttcccggtg gaaagggtat ctgtttgca gcagttcttg ttcatcacag cettgtcttc acattattac actttttag
ttgtttgtg gacttgatgc atcttaaaa aaggaattgg gaactggtgt gaaagtgaat agcaatctt ctgactct
tgcagggcgg tgggcattac taagtgaac attagcctat taaccccata attattgaa aaaaatttag tatatggccc
caaaatagt tttaagaat tagaaaaact tttaataat cgtctacgt cccatttgt taagccaccc tggttgtatg
gtttcttag tgaatattt tacaattgtt gcaattttag gtgaagcttt ctggataat catgtatcaa tacttgact
cctgtctat ggcagctct ctatgcttg gagactgga gatggagatc attgataaac tgaattctgt tccatattgt
gaaatgacat tgaagttagt ggaacgtttt ggtgttagtg ccgagcatag tgaatagctg gatctgttct ttgcaaggg
cgttcagag tacaagtaag aattctttaa attaaagat tagattgaag aaatgactg attaaccaaa tggcaaaact
gattcagctt gcctgttaat gcttatgtag aaggtgatgc ttctatgct agctactct tggcgtgtgc tgcattacc
gggtgaaccc tcactgtga aggttggga acaactagcc tccaggtagt ttctccact tgaatcalca aattattac
tcccctcgt ttgtattag ttgacttta gctttaaat ttgtctcat taaaagtgc atttacct ttcaattat
attataata aatttccag ttittactaa ttactatat taataatat aaaaacagaa attaacat tatcgtatt
cgtgcacaa gtgtattagt tcaaaagtgt ggttaacatg ttitgaagaa tctctcttt attttttg
tgaatggcc caaagggaga tgtgaattc gcagaggtac ttgagaana gggatgtaaa gtgctatgga
cagaacaag tctgactgt actggacct ctagagatgc ttitggaatg agacacttgc gtgctgtga
tgtcaaatg aataaaatgc ccgatgtag catgactct gcctgtgtg ctctcttgc cgtatgtcca accaccata
gagatgttaa agcaaaaccc tctcttga tcaagctct taaagatt catgtgtct ttaactat ttgctaatg
tagtgcctg ctggagagt aaggagacag aaagatgat agccatgc ctacagctgt gaaaggtaag
ttctcttgc tctactgc tcaattcaag ttaactgttg cataacttt tgggttttt ttittgcgt cagctttag
ctacatgga agaaagttca gattattgt tgaataccc accagcgaag gtgaacccc gcgagattga
tacgatgat gatcataga tggcgatggc gttctcgt ctgacatgt ctgatgtcc agtccaccat aaggtatcgt
gtgcacacag aaagacttgc cctgactact tcaagctct tgaagatgc acaagcaat aaaaagatca ttcttga
atccaaagt gagaatgtgt ttctctct ctctgttgc actgtacat ttattagaag acaaaagtgt gtgtgttaa
gagtgttt gtgttaatg aactgagta gatcaatg tgaatcagt ttgggccaa gggc

【図 7 A】

配列番号17 セイヨウアブラナ(B. napus) EPSPSバロログE遺伝子の配列 2958nt
(US2009/0205083の配列番号14と同じ)

atggcgcaag ctacagaat ctgccatggc gtgcagaac catgtgttat catctccaat ctctccaaat
ccaacaaaa caatcacct ttctcgtct cctggaagc gcatcagct cgagcttct cgtgggaact
gaagaagat ggaacgatgc taaacggttc tgaattcgc ccggttaagg taacagcttc tgtttccag
tcggagaag ctfcagagat tgtgtctcaa ccaatcagag aaatctcggg tctcaitaag ctacccegat
ccaatctct cccaatcgg atctccttc ttgcgtct atctgaggta catatactg cttaggtta ggccttgc
gtgagattt gggaaacta gacaatttag taagaattta tatataatt tttaaaaa attcaagaac ctatatat
ataaatttt ccaaaatttt tggagattat aggtctatgt tacaccattc tagtctcat ctttccgttt gagactgaag
aattttatt tttaaaaaa tattataggg aactactga gtggacaact tgrtgaacag tgaatgacat aactacatgc
ttgatcggtt gaagaagctg gggcttaacg tggaaactga catgtataac aaccgtgcgg ttgttgaagg
atcggttggga atattccag ctctctaga ttcaagagt gatattgagt tgcacttgg gaatgcaga
acagccaatgc gtccactac cgtctcagtt acagctgcag gtggcaacgc gaggtaagtt taacgattt
ttgttattg tcaagaatt gatcttgtt ttgattctt tagtttgtt tttttctag tgaatgact gatgggtgc
ctagaatgag gaaagacat atagagatt ttgttttgg tcttaagcag ctgtgtcgt agttgagtg tacttggc
actaactgtc ctctgttgc tgaactgtc aatgttggcc ttcccgttgg gaaggatga ttcaattca ctctaatg
tttttgcgc agtcttgtt catcacagcc ttcttccac attattcat cttttatt ttgtttat tactttagt
attcttaaaa aggaattggg tctgtgtga aagtattag caattcttt cpatcttgc caggggcgtg ggcattacta
agtgaacat tagctatta acccccataa ttittgaaa aaattttaga tatggccca aaatagttt taaaaatta
gaaaaacttt taataaatgc tctacgtcc caaaaacttt agagccggcc cgtctgtat gttttctga ttgatatt
agactatgt ttgaatttc aggtgaagct tctgtgatgc atcagtagtc agtactgac tgcctcttc atggcagct
ctttagctt tggagactgc gagattgaga tcaattgata actgatatc ttccattag ttgaatgac attgaagt
atgaagcgtt ttgtgttag tggcgagcat agtgaatag cttgcagctt ctttgcagag ggcgttcaga
ataacaagta atgattct ttgaattgag agttagatg aagaatgaat gactgattaa ccaattgcca aaactgac
aggtgcctg tgaatgctta tgaagaagt gatgtctta gtgctageta ctttggct ggtgtgcga ttactgtga
aactgttat gtccaaggtt gtggaaacat tagctccag gtagttatc cacttgaat calcaaatat tatactct
ccgttttag ttaagtga ttagcttta aattttgtt cattaaagt gcaatttacc atttcaatg catataaa
ataaatttc cagttttac taacttatta attagcaaa tcaacaaaa attataaa ataatgaaa attcgtaat
ttgtgtcaaa tactttaaac cttatgaac ggaacacta tgaacagag ggagactaaa tttaataa aaattttag
agtccaagt tgrtataac atgttctga agaatcag cttacttct ttattttt tgrtgaat cccaaagga
gatgtgaat tgcagaggt tcttgaaaa atggatgata aggttcatg gacagagac agtgtgact
tacttgcag atcaagat gcttttga tgaagcact gcgtgtgt gactgtgt gactgtgt gactgtgt
gcgtgtga gccatgact tagcctgtt tgcctctt gccagatgc caaccacat cagagatgt
aaagcaaac cctctcttg atcagcgtg tttaaaaa ttactgttg cttaaactt atttggtaa tgaatgtct
agcttgaag

【図 7 A - 1】

ttaaggagc agagaggatg attgcattt gcacagact tagaaagga agtttcttt tctctatgc tctctatc
gaagttaac gtgcataac ttittgcgt ttittttt gcttcagct tggactca gtggaaga gttagata
ttgttgtata actccaccag caaagggtga accggggag attgatact atgatgata tagaatggg
atgcgttct cgtctcagc ttgtgtgat ttccagta ccatcaaga tctgtgtgc accagaaaga
cttccctga ctacttcaa gtcttgaaa gtatcaaaa gcaataaag acccttct ctgatcaaa tgrtgaatc
tgttcttct tctttgtc caccgtaa ttattaga gaacaaagt ttgtgttaa gagtgtgtt gctttaatg
aactgagta gatcaatg tgaatcagt ttggccc

【図 7 B】

配列番号18 セイヨウアブラナ(B. napus) EPSPS バラログEのタンパク質配列
515アミノ酸

MAQSSRICHVQNPVCIISNLKSNQNKSPFVSVLKTHQPRASSWGLLKSGTMM
LNGSVIRPVKVTASVSTSEKASEIVLQPIREISGLIKLPGSKSLNRIILAALE
GTTVVDNLLNSDDINYLMDALKKGLNVERDSVNNRAVVEGCGGIFPASLDS
KSDIELYLGNAGTAMRPLTAAVTAAGGNASYVLDGVPRMRERPIGDLVVLG
KQLGADVCTLTGNTCPVRVYANAGGLPGGKVKLSGSISSQYLTALLMAAPLA
LGDVEIEIDKLSVPYVEMTLKLMERFVGVS AEHSDSWDRFFVKGQKQYKSPG
NAYVEGDASSASYFLAGAAITGETVTVVEGCGTTLQGDVKAFAVLEKMGCK
VSWTENSVTVTGPSRDAFGMRHLRAVDVNMNKMPPDVAMTLAVVAFADGP
TTIRDVASWRVKETERMIAICTELRLKLGATVEEGSDYCVITPPAKVKPAEIDTY
DDHRMAMAFSLAACADVPVTIKDPGCTRKTFPPDYFQVLESITK

【図 7 C】

配列番号19 セイヨウアブラナ(B. napus) EPSPS バラログEのコード配列 1547nt

atgcegaatctcagacaatcgccatggcgtgcagaacccatgtgttatcatctcaactctccaaatcaacaaacaa
atcaccttctccgtctctgaagacgaicagcctcgagctctctgtgggattgaagaagagtggaacgatgtaaacg
gttctgtaattcccccgtgaaggaacatgctgttctcacgtccgagaagctcagagattgtcttcaacaaatcagag
aaatctcggtctcatgaagcaccggatccaaatctctccaatcggtatctcttgcgcctatctgagggaaactac
tgtatggacaactgttgaaacgatgatcatcaactacatctgtgatcggtgaagaagctggcgcttaacgtgaacgtg
acaggtgaaacacccgtcggtgttggaagctgggtggaatctccagctctctgatctcaagagtgatattgattgtg
acctgggaatcaggaacacgcatcgctcaactaccgctgcagttacagctgcaggtggcaacgagtgatgatgtg
atggggctcagaatgaggggaagacatcagaagattgtgtgtgtcttaagcagctgtggtgctgattgtgattgactc
ttggcaataactctctctgtgctgaatgctgaatgggtgctcccggtggaaggtgaagcttctgactgacatcaga
tgactgattgactgcccctcctcagtcgagctccttgatctgtggagacgtggagattgagatcattgaataactgatactgtt
ccatattgtaaatgacattgaattggaagctgtttgtgtgtgctggagcatatgtatgattggatctgttctttgttcaa
ggcggtgcagaaatacaagtcgcttggaatgcttatgataaggtgatgctcttagtctagctactcttggcgtgctgc
ctattactggaactgttactgtcgaaggtgtggaacaaactagcctcaggagagatggaattcgcagagacttctgaga
aaatggagatgaaggtgaggaacagagaacagctgtgactgacgaccaagagatgcttttggatagagcactt
gcgtgctgttgatgtaacatacaaaaactgcttgatgtagcatgactctagcctgtttgtctctttgcgagtgctccaac
accatcagagatgctgctagctggagagtggaagacagagagagattgctcattgcacagagctgataagaagcttga
gctacagtggaagaaggttcagattattgtgtgataactccaccagaaggtgaacccggcgagattgatacgtatgatg
atcataagaatggcgatggcgttctgctgctgacgtgtgctgactgcagtcacatcaaggaatcctgcgtccaccaggaag
acttccctgactactccaagctcttgaagatcatcaagaag

【図 8 - 1】

バラログ E (	配列番号 18)	(266)	GEVEIEIDKLSVVPYVEMTLKLMERFVGS	300
バラログ C (	配列番号 15)	(266)	GEVEIEIDKLSVVPYVEMTLKLMERFVGS	
バラログ B (	配列番号 12)	(267)	GEVEIEIDKLSVVPYVEMTLKLMERFVGS	
バラログ A (	配列番号 9)	(271)	GEVEIEIDKLSVVPYVEMTLKLMERFVGS	
バラログ E (	配列番号 18)	(266)	AEHSDSWDRFFVKGQKQYKSPGNAYVEGDA	330
バラログ C (	配列番号 15)	(266)	AEHSDSWDRFFVKGQKQYKSPGNAYVEGDA	
バラログ B (	配列番号 12)	(267)	AEHSDSWDRFFVKGQKQYKSPGNAYVEGDA	
バラログ A (	配列番号 9)	(301)	AEHSDSWDRFFVKGQKQYKSPGNAYVEGDA	
バラログ E (	配列番号 18)	(326)	SSASYFLAGAAITGETVTVVEGCGTTLQGD	360
バラログ C (	配列番号 15)	(326)	SSASYFLAGAAITGETVTVVEGCGTTLQGD	
バラログ B (	配列番号 12)	(317)	SSASYFLAGAAITGETVTVVEGCGTTLQGD	
バラログ A (	配列番号 9)	(331)	SSASYFLAGAAITGETVTVVEGCGTTLQGD	
バラログ E (	配列番号 18)	(356)	VKFAEVLKMGCKVSWTENSIVTVGPSRDA	380
バラログ C (	配列番号 15)	(356)	VKFAEVLKMGCKVSWTENSIVTVGPSRDA	
バラログ B (	配列番号 12)	(347)	VKFAEVLKMGCKVSWTENSIVTVGPSRDA	
バラログ A (	配列番号 9)	(361)	VKFAEVLKMGCKVSWTENSIVTVGPSRDA	
バラログ E (	配列番号 18)	(386)	FQMRHLRAVDVNMNKMPPDVAMTLAVVAFADGP	420
バラログ C (	配列番号 15)	(386)	FQMRHLRAVDVNMNKMPPDVAMTLAVVAFADGP	
バラログ B (	配列番号 12)	(377)	FQMRHLRAVDVNMNKMPPDVAMTLAVVAFADGP	
バラログ A (	配列番号 9)	(391)	FQMRHLRAVDVNMNKMPPDVAMTLAVVAFADGP	
バラログ E (	配列番号 18)	(416)	DGPFTTIRDVASWRVKETERMIAICTELRLK	450
バラログ C (	配列番号 15)	(416)	DGPFTTIRDVASWRVKETERMIAICTELRLK	
バラログ B (	配列番号 12)	(407)	DGPFTTIRDVASWRVKETERMIAICTELRLK	
バラログ A (	配列番号 9)	(421)	DGPFTTIRDVASWRVKETERMIAICTELRLK	
バラログ E (	配列番号 18)	(446)	GATVEEGSDYCVITPPAKVKPAEIDTYDDH	480
バラログ C (	配列番号 15)	(446)	GATVEEGSDYCVITPPAKVKPAEIDTYDDH	
バラログ B (	配列番号 12)	(437)	GATVEEGSDYCVITPPAKVKPAEIDTYDDH	
バラログ A (	配列番号 9)	(451)	GATVEEGSDYCVITPPAKVKPAEIDTYDDH	
バラログ E (	配列番号 18)	(476)	RMAMAFSLAACADVPVTIKDPGCTRKTFPPD	510
バラログ C (	配列番号 15)	(476)	RMAMAFSLAACADVPVTIKDPGCTRKTFPPD	
バラログ B (	配列番号 12)	(467)	RMAMAFSLAACADVPVTIKDPGCTRKTFPPD	
バラログ A (	配列番号 9)	(481)	RMAMAFSLAACADVPVTIKDPGCTRKTFPPD	
バラログ E (	配列番号 18)	(506)	YFQVLESITKH	521
バラログ C (	配列番号 15)	(506)	YFQVLESITKH	
バラログ B (	配列番号 12)	(497)	YFQVLESITKH	
バラログ A (	配列番号 9)	(511)	YFQVLESITKH	

【図 8】

バラログ E (	配列番号 18)	(1)	MAQSSRICHVQNPVCIISNLKSNQNKSP	1	30
バラログ C (	配列番号 15)	(1)	MAQSSRICHVQNPVCIISNLKSNQNKSP		
バラログ B (	配列番号 12)	(1)	MAQSSRICHVQNPVCIISNLKSNQNKSP		
バラログ A (	配列番号 9)	(1)	MAQSSRICHVQNPVCIISNLKSNQNKSP		
バラログ E (	配列番号 18)	(31)	FVSVLKTHQPR-----ASSWGLKSGTMMN	31	60
バラログ C (	配列番号 15)	(31)	FVSVLKTHQPR-----ASSWGLKSGTMMN		
バラログ B (	配列番号 12)	(27)	LVSVMKTHQIS-----SWGLKKS--M-N		
バラログ A (	配列番号 9)	(31)	FVSVLKTHQPRGAYQISERGLKKSMMN	61	80
バラログ E (	配列番号 18)	(56)	GSVTRPVVVTASVSTSEKASEIVLQPIREI	91	120
バラログ C (	配列番号 15)	(56)	GSVTRPVVVTASVSTSEKASEIVLQPIREI		
バラログ B (	配列番号 12)	(47)	GSVTRPVVVTASVSTSEKASEIVLQPIREI		
バラログ A (	配列番号 9)	(61)	GSVTRPVVVTASVSTSEKASEIVLQPIREI	91	120
バラログ E (	配列番号 18)	(86)	SGLIKLPGSKSLNRIILAAALSEGTTVVD	121	150
バラログ C (	配列番号 15)	(86)	SGLIKLPGSKSLNRIILAAALSEGTTVVD		
バラログ B (	配列番号 12)	(77)	SGLIKLPGSKSLNRIILAAALSEGTTVVD		
バラログ A (	配列番号 9)	(91)	SGLIKLPGSKSLNRIILAAALSEGTTVVD	121	150
バラログ E (	配列番号 18)	(116)	NLINSDDINYLMDALKKGLNVERDSVNNR	151	180
バラログ C (	配列番号 15)	(116)	NLINSDDINYLMDALKKGLNVERDSVNNR		
バラログ B (	配列番号 12)	(107)	NLINSDDINYLMDALKKGLNVERDSVNNR		
バラログ A (	配列番号 9)	(121)	NLINSDDINYLMDALKKGLNVERDSVNNR	151	180
バラログ E (	配列番号 18)	(146)	AVVEGCGGIFPASLDSKSDIELYLGNAGTA	181	210
バラログ C (	配列番号 15)	(146)	AVVEGCGGIFPASLDSKSDIELYLGNAGTA		
バラログ B (	配列番号 12)	(137)	AVVEGCGGIFPASLDSKSDIELYLGNAGTA		
バラログ A (	配列番号 9)	(151)	AVVEGCGGIFPASLDSKSDIELYLGNAGTA	181	210
バラログ E (	配列番号 18)	(176)	MRELTAAVTAAGGNASYVLDGVPMRERPI	211	240
バラログ C (	配列番号 15)	(176)	MRELTAAVTAAGGNASYVLDGVPMRERPI		
バラログ B (	配列番号 12)	(167)	MRELTAAVTAAGGNASYVLDGVPMRERPI		
バラログ A (	配列番号 9)	(181)	MRELTAAVTAAGGNASYVLDGVPMRERPI	211	240
バラログ E (	配列番号 18)	(206)	GLDVVLKQLGADVCTLTGNTCPVVRVNN	241	270
バラログ C (	配列番号 15)	(206)	GLDVVLKQLGADVCTLTGNTCPVVRVNN		
バラログ B (	配列番号 12)	(197)	GLDVVLKQLGADVCTLTGNTCPVVRVNN		
バラログ A (	配列番号 9)	(211)	GLDVVLKQLGADVCTLTGNTCPVVRVNN	241	270
バラログ E (	配列番号 18)	(236)	GLDPGKVKVLSGSISSQYLTALLMAAPLAL	281	310
バラログ C (	配列番号 15)	(236)	GLDPGKVKVLSGSISSQYLTALLMAAPLAL		
バラログ B (	配列番号 12)	(227)	GLDPGKVKVLSGSISSQYLTALLMAAPLAL		
バラログ A (	配列番号 9)	(241)	GLDPGKVKVLSGSISSQYLTALLMAAPLAL	281	310

【図 9】

配列番号20 Atu ORF24 3'UTR (下線部)+Nt OSM3'UTR (二重下線部)+
GUSコード配列(斜字体)+BBCPプロモーター(太字;逆相向)+GFPコード配列(斜字体)+
Nos 3'UTR (点線下線部)を含むpDAB100331由来の488nt配列

gagcataatttttattatgataaattactgtttgttaaatgcaattttgttctcggatttttaatatcaaaatctatttgaagaata
cacaatattttgttcaggctgttcgagaatcgatcgtctatcataaaaaatacaaaaaattttatttgcctcaatttttagga
tttattgaagacagcttaattttgttcggctcactacgcatcatcttgatgagaagatcagcgatcagaatttctgata
ctatccgataatttttgaanaattcatatgaaaagcaaacgtttacatgaattgatgaacaatacaaaagacagataaagcca
cgacattttagataattgcccagattactgaatttgaattgaatgacgcgaatttctgcagagagcatgtcttcaattcagcc
caaatgcgaattgaanaattactcaaacgccccatatacagagcgagatcatcattttgtttgttgcctttcccaactgag
gaactcaagatttggtaacctcgagccttaagactttacaaacttcaaaacaaaaaataaaaaacataaactcaaatgc
attattgatctatataacatcaagacaaaaatacatatgtacttcttcaagcttcttatttattacagaagaatcatagctt
atcaactcaaaagaattacttaactataaaaaaacgactcaaatagatttcttactactagctgtcatagaataatttgaacaaa
aggtatcttattacagaataaacgcaactgagctcgtagcaattcccgagcgttagccgagcagatgtgcgcagagagagt
tttgattcatgtttgttccttcgtcgtgtttttaccgaattcactcagcgtgtttttgcagcagaadaagccgcgc
acttcggttgcggtcgagtggaatctcttctgttaccgaacgcgaattatgccttgcaggtgcgaataatcg
cguaattcataactcgttccagcagcagcgcgttcagcagcatcaagagcgggtgatacatatcagccatgcacuat
gatacttctactccacatgtcgggtatcattgagtgacgcgcgcctaacgtctacacgcggttctcggtgatgataatcg
gcgtgatgcatttctcgtccagcgcagagatttttttcagtagcttcttgcgtttccaattgcgcgtttggaccatacc
atcgataaacggttcagcagcagacatcaagagatgcgtggtatcgtgtgagcgtgcagagacatcatt
gagcgaagtgatgcgcgcgttcggctgagttacgctgttcgcgcaggtgcgcgaatattccggtgcacattgc
gaggggtatcggttggcaataactccacatcaccagcgttgggtgttttttttttttttttttttttttttttttttttttt
tgtaagtgcgtgtggtgttccccgttgatgcctcttctgttaccgttcttgcgtgttggcgttgcgcgttgcgaacaaatgc
ctaaagagaggtttaaagccgacagcagcaggttcatcaatcaccagatgcgcatctcatctgccagtcgcatctct
tgatcgtaagggttaatgcgaggtacggttaggaggttggcccaatccagctcattaatgctgtgtgtgcacacatcaga
cggttatgcatttcccaacgaactcgcattctcatgacgacaaagccagatgaagtagacagcgtttgtgttataca
ggaactgttgccttccactgcacatgacccgagtcgcagcgaagcgggttagatatacaactctgttgcgttttgcgtg
tgacgcagatctcatagatataactcaccggttgcgcagaggttgcggattaccactgtcaaatgtccgctagtgcct
tgacaggttgataacacacttngatcgcatacgcagttcaacgtcgcataccattggccacacacgtgcagtcac
agcgcgttggtttagacttgcgcagatgcgcacacggttcagatgcctacacacacggttgcgtgtgtgagc
attacgtctgcatgattccgcatgataaagaataatcagaagtaagactgttttcttgcgttcttgcgttgcgttgcgttgc
acttccggcgagtagtctgcaggttcaggttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc

acagagagaagaagcgtatctctgtagaagatgaacgaaaagacagcttggttaagctcaataatcctcgggttatatacca
aatgagagagagcttcgaattgcggtttatagcaacggacccgaatcggttgatgtttggggatgtgcaaaatt
aactggaaaaagacatcccgggtttggtttccaaactcggcctgagctgaggtatatttccgataaagctaatcct
cgcgggtttgttggaattatgctttggatataatcgcctgcacggctgcgaacgcttaataagaagaataccaactc
ggatttgcacatcatatagtcctctgacgaacgattttggatcgctgacgaagaagatgataacacctctcttgtaa
aaataatcgcacggcttaactcgcattatcttcttcgaaattatcttgaacgaacgcgactgattatgagtgattgat
gtttcatctgtttttttaaagaagccgaatctatcttgatggcccaattaaacaaacaaatcttaacattcaatgta
acaagaagcacaattccttcctcaactctgtttgaacagctgcagctgagctggatgaataagaagtctcataacca
tcgtttggagggtgtgtgaacgatttgatgcactcttctgcacaaaccc

【図 1 1 B】

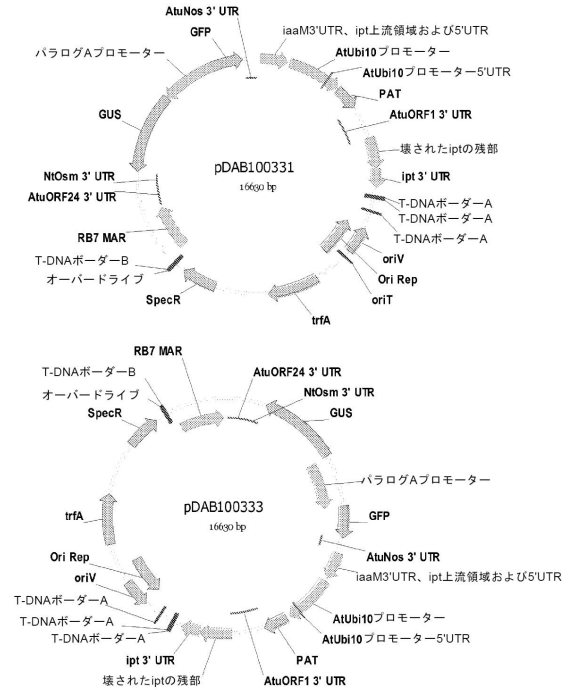
配列番号24 別のBBCP配列 739nt

acaggaaggaaggaatattctctgaaagagcagcgaacgaagaatggttgaactctatattgtctgcgcttaataacca
aatgaatgaagtgctgcgtttccggtttgaatctaaacgaacctgaattggtttgtttgggtttgcaatcaattac
ctggaaaaagacatcccccgtttatggtcttaaccttaaccttaacggatgattttctgcgaatctataatccttcc
gagttttctggattttgaattgaatctctgaataatcgcagtcgaacccgcgcgaataataaagatgcttccacccatcgc
atacttcaatcctatagatctcccccagaacccctttgtcttgcctgcggacacgaatggaatgaatcctctgataat
tgaatcttgcctgtctctcattgatttctcttccatacttaactctgaacacgaacgaatgattatgattgaattggtt
ctgggtttttttttaaataagcccgacgaatactctggaggcccgatcttaaacacacaaataaaccttctccttccact
taacacaaacactcttccataacggtctctctgaaacagcggacgctttctgcagcaatgggaataatcataacacagct
tgaagctgggtttgctgaaggttttgatgcctctactcctctctcaataccccc

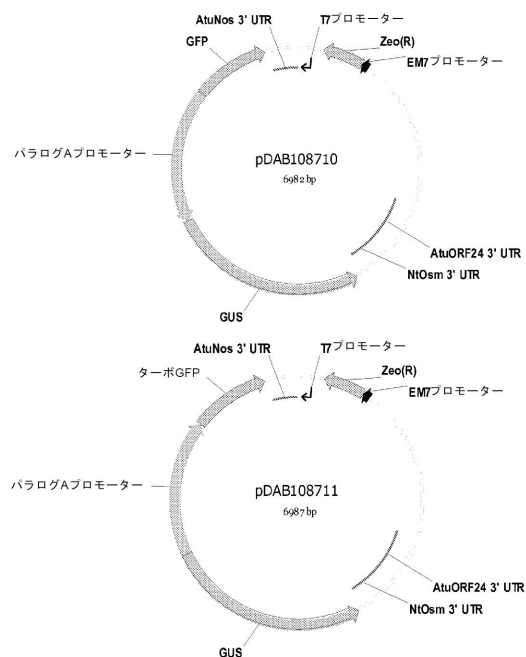
配列番号25 別のBBCP配列 739nt

acaggaaggaaggaaggaatggtgttcgcgggaaggaacgaacaaaagaaggggttaagctacatctgttcgttttcaatacca
aatggaagaagaagctgcgaattgcgggtgttccttcgcgaacgaagctacatctgcgtgttcgttttgggtttgacatatat
atctgaaaaaagagatcccccgggtgattgtgtccaaactctaaacagattggaatttttcggaagctacataactct
gtgtgtgtatgtcggatattggaatggtgtgtgataataatcgcgcgaacccgttcgcgaacataataaagacatcccaatc
ggatcttcacacatcagtcgagacgcgcctgaacacggcgttttgatgcagtcacagatcagtgattttccatccatcccaatc
aagtgaatctgcgcggcttactctgattgatttgcctctcctacatctagctgaacacccgcgaggtgttgatgattgattg
gtgttcgggtttgttttaaacccgcgcgaataactcttgaggcccgatctgtaaacaccaactatlaacccaatcgaatct
tccctcaacaaacactctgcgcacactctgcagcgtlaaacgcggcagctgtgttcgtaataatgatctcacaaccc
actttgaggtgttcgggttcgaagagctctgatcgctactctcttcctgcacaaacccc

【図 1 2】



【図 1 3】



【図 14】

配列番号26 パラログA3'非翻訳領域(UTR)

aaaaaccctttttttaccactgactaaaaagaccttaagcccatgtcttctttttgatcaatfgagatcagtttctctgt
 tgtcactgttaagattacgaaaaacaaagagtattaaagatgctgtctgtaccttaaacgtttgatgcaatcgtgaatcagttt
 gg

配列番号27 パラログAイントロン1 (5'-3')

ag/gtttgcctcttctttgtttgcttagtggttgcgttttaacggcgtaggatgaagaaaggcttctgactttgttgggtttatag/
gg

配列番号28 パラログAイントロン2 (5'-3')

ag/gtaaggtaaggacttattctgttagttagtttgattattttaagaatcggctctgtactgatgcttttagttgggtttgttacc
ag/tt

配列番号29 パラログAイントロン3 (5'-3')

ga/gtttgaatttcagcatttgcattgtaaaagtgcagcaatctttgttcacacactgcgttagcttgacatgattttagctttt
gtatggtttcttgattgacacattagacatgttttgcattttcagggtga/ag

配列番号30 パラログAイントロン4 (5'-3')

aa/gtaagagttgtttctaaaatcactgaacttataattagattgacagaagagtgactaaccaaatggtaaaatttgattcag/g
t

配列番号31 パラログAイントロン5 (5'-3')

ag/gtaacactaagttataataaaatttgcttagttcaattttttgtctttctaaggcttggctagttgtgtcacttgtgtgaaca
tatgaagaatctaagtttagtttttttggatgaatctaaag/gg

配列番号32 パラログAイントロン6 (5'-3')

tg/gtaagcacacccctcaattgttttttaaagattcatagtcacttagttctctctcatccattctttttatcatatag/tg

配列番号33 パラログAイントロン7 (5'-3')

aggtaaaacattttcttctgtctcgtctcactctcactctcttggtttatgtgtctcagtcctaagttaagttctgcataacttttgcg
tacagct

【配列表】

0006262217000001.app

フロントページの続き

- (74)代理人 100104282
弁理士 鈴木 康仁
- (72)発明者 グブタ, マンジュ
アメリカ合衆国 46032 インディアナ州, カーメル, ウィンマック コート 13463
- (72)発明者 ラッセル, シーン マイケル
アメリカ合衆国 46032 インディアナ州, カーメル, ラークスパー レーン 11574
- (72)発明者 シェン, リウ イン
アメリカ合衆国 46074 インディアナ州, ウェストフィールド, ニコラス ドライブ 14207
- (72)発明者 ケナレディー, シヴァラマ レディ
アメリカ合衆国 47906 インディアナ州, ウェスト ラファイエット, セクレタリアト ドライブ 3529
- (72)発明者 ラウト, ジョーティー アール
アメリカ合衆国 97229 オレゴン州, ポートランド, エヌダブリュー 172エヌディー プレイス 5071
- (72)発明者 ノバク, ステファン
アメリカ合衆国 46074 インディアナ州, ウェストフィールド, ジョナサン ドライブ 14853

審査官 千葉 直紀

- (56)参考文献 米国特許第06388170 (US, B1)
米国特許出願公開第2011/0252504 (US, A1)
Plant Molecular Biology, 1994, Vol. 24, pp. 327-340

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
Caplus/WPIDS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)