

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】平成22年4月30日(2010.4.30)

【公表番号】特表2008-523821(P2008-523821A)

【公表日】平成20年7月10日(2008.7.10)

【年通号数】公開・登録公報2008-027

【出願番号】特願2007-547015(P2007-547015)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 9/02 (2006.01)

A 0 1 H 5/00 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 9/02

A 0 1 H 5/00 A

【手続補正書】

【提出日】平成22年3月12日(2010.3.12)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

野生型と比較して目的遺伝子の発現が抑制されているトランスジェニック植物を作製する方法であって、

RNA前駆体構築物を用いて植物細胞を形質転換する工程、および

該植物細胞からトランスジェニック植物を生成させる工程、

を含み、

ここで該構築物は、目的遺伝子を標的とするマイクロRNA配列を含む前駆体マイクロRNA配列に機能し得るように連結された、植物細胞中での発現を駆動するプロモーターを含む、前記方法。

【請求項 2】

前記マイクロRNA配列が、異なる目的遺伝子を標的とするマイクロRNA配列で置換される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記マイクロRNA配列が、

(a) 目的遺伝子のmRNA配列に相補的なマイクロRNA配列、

(b) 目的遺伝子のmRNA配列の3'領域に相補的なマイクロRNA配列、

(c) 目的遺伝子のmRNA配列中のコード領域もしくは5'UTRおよび3'UTRに相補的なマイクロRNA配列、または

(d) 前記(a)、(b)もしくは(c)の核酸の相補配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド配列

を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

置換される前記マイクロRNA配列がmiR166を含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

前記前駆体マイクロRNA配列が配列番号 47 に記載の配列またはその断片を含む、請求

項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法により作製されたトランスジェニック植物。

【請求項 7】

前記植物が、シロイヌナズナ (*Arabidopsis*)、ナタネ、カノーラ、亜麻仁、ダイズ、ヒマワリ、トウモロコシ、オートムギ、ライムギ、オオムギ、コムギ、コショウ、マンジュギク、ワタ、アブラヤシ、ココヤシ、アマ、トウゴマ、テンサイ、イネおよびラッカセイからなる群より選択される、請求項 6 に記載のトランスジェニック植物。

【請求項 8】

請求項 6 または 7 に記載のトランスジェニック植物により生産された種子であって、該トランスジェニック植物はマイクロRNAを発現し、これにより該植物の野生型品種と比較して目的遺伝子の発現が抑制されており、該トランスジェニック植物が形質固定されている、前記種子。

【請求項 9】

植物において目的遺伝子の発現を調節する方法であって、
RNA前駆体構築物を用いて植物細胞を形質転換する工程、および
該植物細胞からトランスジェニック植物を生成させる工程、
を含み、
ここで該構築物は、目的遺伝子を標的とするマイクロRNA配列を含む前駆体マイクロRNA配列に機能し得るように連結された、植物細胞中での発現を駆動するプロモーターを含む、前記方法。

【請求項 10】

前記マイクロRNA配列が、異なる目的遺伝子を標的とするマイクロRNA配列で置換される、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

目的遺伝子の発現が、該植物の野生型品種と比較して抑制されている、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 12】

目的遺伝子を標的とするマイクロRNA配列を含む前駆体マイクロRNA配列に機能し得るように連結された、植物細胞中での発現を駆動するプロモーターを含むRNA前駆体構築物。

【請求項 13】

前記マイクロRNA配列が異なる目的遺伝子を標的とするマイクロRNA配列で置換される、請求項 12 に記載の構築物。

【請求項 14】

請求項 12 または 13 に記載の構築物を含む、トランスジェニック植物細胞、植物またはその一部。

【請求項 15】

前記植物が、シロイヌナズナ (*Arabidopsis*)、ナタネ、カノーラ、亜麻仁、ダイズ、ヒマワリ、トウモロコシ、オートムギ、ライムギ、オオムギ、コムギ、コショウ、マンジュギク、ワタ、アブラヤシ、ココヤシ、アマ、トウゴマ、テンサイ、イネおよびラッカセイからなる群より選択される、請求項 14 に記載のトランスジェニック植物。

【請求項 16】

請求項 14 または 15 に記載のトランスジェニック植物により生産された種子であって、該トランスジェニック植物はマイクロRNAを発現し、これにより該植物の野生型品種と比較して目的遺伝子の発現が抑制されており、該トランスジェニック植物が形質固定されている、前記種子。

【請求項 17】

野生型と比較してオレイン酸の重量%のレベルが増加したトランスジェニック植物を作製する方法であって、

植物細胞を、RNA前駆体構築物を用いて形質転換する第1工程、および

該植物細胞からトランスジェニック植物を作製する第2工程、
を含み、

ここで、該構築物は、前駆体マイクロRNA配列をコードするヌクレオチド配列に機能し得るように連結された植物細胞中での発現を駆動するプロモーターを含み、該マイクロRNA前駆体配列をコードするヌクレオチド配列が、

- a) 配列番号47に示されるヌクレオチド配列、
- b) 上記a)の核酸と少なくとも70%の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列、
- c) 上記a)の核酸と相補的であるポリヌクレオチド配列、および
- d) 上記a)の核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド配列、

からなる群より選択される、前記方法。

【請求項 18】

前駆体マイクロRNA配列をコードするヌクレオチド配列が、配列番号37に示されるマイクロRNAをコードするヌクレオチド配列が配列番号40に示されるマイクロRNAをコードするヌクレオチド配列により置換されるように遺伝子操作されている、請求項17に記載の方法。

【請求項 19】

- a) 配列番号47に示されるヌクレオチド配列、
- b) 上記a)の核酸と少なくとも70%の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列、
- c) 上記a)の核酸と相補的であるポリヌクレオチド配列、
- d) 上記a)の核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド配列、

からなる群より選択されるポリヌクレオチド配列を含む単離された核酸。

【請求項 20】

請求項17または18に記載の方法により作製されたトランスジェニック植物。

【請求項 21】

オレイン酸重量%のレベルが、該植物の野生型品種と比較してトランスジェニック植物において増加している、請求項20に記載のトランスジェニック植物。

【請求項 22】

前記植物が、ナタネ、カノーラ、亜麻仁、ダイズ、ヒマワリ、トウモロコシ、オートムギ、ライムギ、オオムギ、コムギ、コショウ、マンジュギク、ワタ、アブラヤシ、ココヤシ、アマ、トウゴマ、テンサイ、イネおよびラッカセイからなる群より選択される、請求項20または21に記載のトランスジェニック植物。

【請求項 23】

請求項20～22のいずれか1項に記載のトランスジェニック植物により生産された種子であって、該植物は、種子貯蔵化合物のモジュレーターとして機能するポリペプチドを発現するものであり、かつ該植物は、該植物の野生型品種と比較して種子貯蔵化合物の改変された重量%レベルについて形質固定されている、前記種子。

【請求項 24】

野生型と比較して種子貯蔵化合物の重量%レベルが改変されたトランスジェニック植物を作製する方法であって、

核酸を含む発現ベクターを植物細胞に導入する第1工程、および

該植物細胞からトランスジェニック植物を生成させる第2工程、
を含み、

ここで、該核酸は該植物中で種子貯蔵化合物のモジュレーターとして機能し、かつ該核酸は、

- a) 配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33または配列番号35に示されるポリヌクレオチド配列と、
- b) 配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号

号18、配列番号20、配列番号22、配列番号24、配列番号26、配列番号28、配列番号30、配列番号32、配列番号34または配列番号36に示されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列と、

c) 上記a)またはb)の核酸と少なくとも70%の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列と、

d) 上記a)またはb)の核酸と相補的であるポリヌクレオチド配列と、

e) 上記a)またはb)の核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド配列と、

からなる群より選択されるポリヌクレオチド配列を含む、前記方法。

【請求項 2 5】

前記核酸が、請求項 2 4 のa)またはb)のポリヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

オレイン酸のレベルが、該植物の野生型品種と比較して、トランスジェニック植物において増加する、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 7】

請求項 2 4 ~ 2 6 のいずれか 1 項に記載の方法により作製されたトランスジェニック植物。

【請求項 2 8】

オレイン酸重量%のレベルが、該植物の野生型品種と比較してトランスジェニック植物において増加している、請求項 2 7 に記載のトランスジェニック植物。

【請求項 2 9】

前記植物が、ナタネ、カノーラ、亜麻仁、ダイズ、ヒマワリ、トウモロコシ、オートムギ、ライムギ、オオムギ、コムギ、コショウ、マンジュギク、ワタ、アブラヤシ、ココヤシ、アマ、トウゴマ、テンサイ、イネおよびラッカセイからなる群より選択される、請求項 2 7 または 2 8 に記載のトランスジェニック植物。

【請求項 3 0】

請求項 2 7 ~ 2 9 のいずれか 1 項に記載のトランスジェニック植物により生産された種子であって、該植物は、種子貯蔵化合物のモジュレーターとして機能するポリペプチドを発現するものであり、かつ該植物は、該植物の野生型品種と比較して種子貯蔵化合物の改変された重量%レベルについて形質固定されている、前記種子。

【請求項 3 1】

種子貯蔵化合物の重量%レベルの改変が、核酸の下方調節によるものである、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 3 2】

下方調節が、アンチセンス核酸またはマイクロRNAによって行われる、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

植物における種子貯蔵化合物の重量%のレベルを改変する方法であって、

a. 核酸を含む発現ベクターを植物細胞に導入する第1工程、および

b. 該植物細胞からトランスジェニック植物を作製する第2工程、
を含み、

ここで、該核酸は該植物中で種子貯蔵化合物のモジュレーターとして機能し、該核酸は、

i) 配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33、または配列番号35に示されるポリヌクレオチド配列と、

ii) 配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、配列番号24、配列番号26、配列番号28、配列番号30、配列番号32、配列番号34または配列番号36に示されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列と、

iii) 上記i)またはii)の核酸と少なくとも70%の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列と、

iv) 上記i)またはii)の核酸と相補的であるポリヌクレオチド配列と、

v) 上記i)またはii)の核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド配列と、

からなる群より選択されるポリヌクレオチド配列を含む、
前記方法。

【請求項 3 4】

オレイン酸の重量%のレベルを改変する、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

請求項 3 3 または 3 4 に記載の方法により作製されたトランスジェニック植物。

【請求項 3 6】

モジュレートが下方調節である、請求項 3 3 ~ 3 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 7】

下方調節が、アンチセンス核酸またはマイクロRNAにより行われる、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 8】

$X^1X^2X^3X^4X^5X^6X^7LX^8X^9PX^{10}YL$ (式中、 X^1 はMではなく、 X^3 はTではなく、 X^6 はFではなく、 X^7 はVではない) (配列番号 4 8)、

$GX^{11}X^{12}X^{13}X^{14}X^{15}X^{16}X^{17}X^{18}HX^{19}X^{20}PX^{21}X^{22}X^{23}X^{24}X^{25}X^{26}X^{27}X^{28}ER$ (式中、 X^{15} はGではなく、 X^{20} はFではなく、 X^{21} はNではなく、 X^{22} はAではない) (配列番号 4 9)、

$HX^{29}X^{30}PX^{31}X^{32}X^{33}X^{34}X^{35}X^{36}X^{37}X^{38}ER$ (式中、 X^{30} はFではなく、 X^{31} はNではなく、 X^{32} はAではない) (配列番号 5 0)、

$LX^{39}X^{40}X^{41}X^{42}X^{43}X^{44}X^{45}GX^{46}X^{47}X^{48}X^{49}X^{50}X^{51}X^{52}YX^{53}X^{54}P$ (式中、 X^{41} はYではなく、 X^{45} はQではなく、 X^{48} はSではなく、 X^{49} はMではなく、 X^{50} はIではない) (配列番号 5 1)、

$TX^{55}X^{56}X^{57}X^{58}HX^{59}X^{60}X^{61}X^{62}X^{63}X^{64}X^{65}X^{66}X^{67}X^{68}X^{69}X^{70}X^{71}T$ (式中、 X^{67} はNではない) (配列番号 5 2)、および

$PX^{72}X^{73}X^{74}X^{75}X^{76}X^{77}X^{78}X^{79}X^{80}X^{81}X^{82}X^{83}X^{84}X^{85}X^{86}$ (式中、 X^{84} はWではなく、 X^{85} はYではなく、 X^{86} はVではない) (配列番号 5 3)、

からなる群より選択されるアミノ酸配列 (式中、Xは、上記の他の場所で定義されていない場合、任意のアミノ酸を意味する) を含む、単離されたポリペプチド。

【請求項 3 9】

$AWYTPYX^{87}YX^{88}NPX^{89}GRLVHIX^{90}VQLTLGWPLYLAX^{91}NX^{92}SGRPYPRFACHFDPYGPITYNDRER$ (配列番号 5 4)、

$FISDVGV$ (配列番号 5 5)、

$ALX^{93}KLX^{94}SX^{95}FGFWVVVRVYGV$ (配列番号 5 6)、

$ILGEYYQFDX^{96}TPVAKAT$ (配列番号 5 7)

からなる群より選択されるアミノ酸配列 (式中、Xは任意のアミノ酸を意味する) を含む、単離されたポリペプチド。

【請求項 4 0】

請求項 3 8 に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする単離された核酸。

【請求項 4 1】

請求項 4 0 に記載の核酸によりコードされる単離されたポリペプチド。

【請求項 4 2】

a) 配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33、または配列番号35に示されるポリヌクレオチド配列と、

b) 配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、配列番号24、配列番号26、配列番号28、配列番号30、配列番号32、配列番号34または配列番号36に示されるポリペプチドをコードするポリヌクレ

オチド配列と、

c) 上記a)またはb)の核酸と少なくとも70%の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列と、

d) 上記a)またはb)の核酸と相補的であるポリヌクレオチド配列と、

e) 上記a)またはb)の核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド配列と、

からなる群より選択されるポリヌクレオチド配列を含む単離された核酸。

【請求項 4 3】

請求項 4 2 に記載の ポリヌクレオチド配列 によりコードされる単離されたポリペプチド。

【請求項 4 4】

単離された核酸が、微生物または植物中で種子貯蔵化合物のモジュレーターとして機能するポリペプチドをコードする、請求項 4 2 に記載の単離された核酸。

【請求項 4 5】

単離された脂質代謝タンパク質 (LMP) ポリペプチド配列が、微生物または植物中で種子貯蔵化合物のモジュレーターとして機能する、請求項 4 3 に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 4 6】

請求項 4 0 に記載の核酸が、種子特異的プロモーター、根特異的プロモーター、および組織非特異的プロモーターからなる群より選択されるプロモーターに機能し得る形で連結されている、該核酸を含む発現ベクター。

【請求項 4 7】

請求項 3 9 に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする単離された核酸。

【請求項 4 8】

請求項 4 2 に記載の核酸が、種子特異的プロモーター、根特異的プロモーター、および組織非特異的プロモーターからなる群より選択されるプロモーターに機能し得る形で連結されている、該核酸を含む発現ベクター。

【請求項 4 9】

a) 配列番号 6 の位置204～位置226のアミノ酸配列を含むアミノ酸配列、および

b) 配列番号 6 の位置342～位置357のアミノ酸配列を含むアミノ酸配列

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。