

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6186463号
(P6186463)

(45) 発行日 平成29年8月23日 (2017. 8. 23)

(24) 登録日 平成29年8月4日 (2017. 8. 4)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

A O 1 H 1/00 (2006. 01)

A O 1 H 5/00 (2006. 01)

A O 1 H 5/10 (2006. 01)

A O 1 H 5/02 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

A O 1 H 1/00 A

A O 1 H 5/00 A

A O 1 H 5/10

A O 1 H 5/02

請求項の数 20 外国語出願 (全 63 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-28727 (P2016-28727)
 (22) 出願日 平成28年2月18日 (2016. 2. 18)
 (62) 分割の表示 特願2013-516837 (P2013-516837)
 の分割
 原出願日 平成23年6月24日 (2011. 6. 24)
 (65) 公開番号 特開2016-136957 (P2016-136957A)
 (43) 公開日 平成28年8月4日 (2016. 8. 4)
 審査請求日 平成28年2月23日 (2016. 2. 23)
 (31) 優先権主張番号 61/358, 314
 (32) 優先日 平成22年6月24日 (2010. 6. 24)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 501035309
 ダウ アグロサイエンシズ エルエルシ
 ー
 アメリカ合衆国 インディアナ州 462
 68, 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 100120134
 弁理士 大森 規雄
 (74) 代理人 100126354
 弁理士 藤田 尚
 (74) 代理人 100104282
 弁理士 鈴木 康仁

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 植物種子の飽和脂肪酸含量の低減

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

植物細胞において作動可能なプロモーターに作動可能に連結したポリヌクレオチドを含む単離された核酸分子であって、前記ポリヌクレオチドが配列番号：14の配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含むデルタ-9デサチュラーゼ酵素をコードする単離された核酸分子。

【請求項 2】

前記プロモーターが、ole1遺伝子プロモーター、ファゼオリンプロモーター、キャッサバ葉脈モザイクウイルス (Cassava vein Mosaic Virus) プロモーター、LfKCS3プロモーター、およびFAE1プロモーターからなる群から選択される、請求項1に記載の核酸分子。

【請求項 3】

前記前記ポリヌクレオチドが、配列番号：8、配列番号：11、配列番号：17、及び配列番号：44から成る群から選択されるヌクレオチド配列に対して少なくとも60%同一である、請求項1に記載の核酸分子。

【請求項 4】

前記ポリヌクレオチドが、配列番号8、配列番号11、配列番号17、および配列番号44からなる群から選択されるヌクレオチド配列に対して少なくとも80%同一である、請求項3に記載の核酸分子。

【請求項 5】

前記ポリヌクレオチドが、配列番号8、配列番号11、配列番号17、および配列番号44か

10

20

らなる群から選択されるヌクレオチド配列に対して少なくとも90%同一である、請求項3に記載の核酸分子。

【請求項6】

前記ポリヌクレオチドが、配列番号8、配列番号11、配列番号17、および配列番号44からなる群から選択される、請求項3に記載の核酸分子。

【請求項7】

前記ポリヌクレオチドに作動可能に連結したさらなる遺伝子調節エレメントを含む、請求項1に記載の核酸分子。

【請求項8】

前記さらなる遺伝子調節エレメントは、デルタ-9デサチュラーゼ3'UTR /ターミネーター、インゲンマメ (Phaseolus vulgaris) ファゼオリン5'非翻訳領域、インゲンマメファゼオリン3'非翻訳領域、インゲンマメファゼオリンマトリックス結合領域、アグロバクテリウムツメファシエンス (Agrobacterium tumefaciens) ORF23 3'非翻訳領域、アグロバクテリウムツメファシエンスORF1 3'非翻訳領域、タバコ (Nicotiana tabacum) RB7マトリックス結合領域、オーバードライブ、Tスタンドボーダー配列、配列番号：40、配列番号：41、配列番号：42、および配列番号：43から成る群から選択される、請求項7に記載の核酸分子。

【請求項9】

野生型植物に比べて減少量の飽和脂肪酸をその植物において含む遺伝子操作された植物材料を作製するための方法であって：

請求項1に記載の核酸分子で植物材料を形質転換する工程；および

前記ポリヌクレオチドを含む植物材料を選択する工程
を含む、方法。

【請求項10】

前記植物材料が、植物細胞、植物の部分、植物組織培養物、植物細胞培養物、または植物体である、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

前記ポリヌクレオチドを含む前記植物材料を培養して植物体を得る工程をさらに含む、請求項9に記載の方法。

【請求項12】

前記植物材料が、シロイヌナズナ、ボラゴ (Borago)、キャノーラ、ヒマ、テオブロマ、トウモロコシ、ワタ、ハマナ、クフェア、アマ、レスケレーラ (Lesquerella)、リムナンテス (Limnanthes)、リノラ (Linola)、キンレンカ、マツヨイグサ、オレア、アブラヤシ、落花生、菜種、ペニバナ、大豆 (Glycine)、ソヤ (Soja)、ヒマワリ、ニコチアナ、ベルノニア、コムギ、オオムギ、イネ、エンバク、ソルガム、ライムギ、及びイネ科の他のメンバーからなる群から選ばれる属から選択される植物である、請求項9に記載の方法。

【請求項13】

請求項1に記載の核酸分子を含む植物材料。

【請求項14】

前記植物材料が、前記植物材料のゲノムに安定的に組み込まれた前記ポリヌクレオチドの複数のコピーを含む、請求項13に記載の植物材料。

【請求項15】

前記植物材料が、植物細胞、植物の部分、植物組織培養物、植物細胞培養物、または植物体である、請求項13に記載の植物材料。

【請求項16】

前記植物材料が種子である、請求項13に記載の植物材料。

【請求項17】

前記種子が、トランスジェニックセイヨウアブラナ (Brassica napus) 系統の植物に由来し、同質遺伝子系統バージョンのトランスジェニックセイヨウアブラナ系統に対して減

10

20

30

40

50

少しした16:0レベルを有する、請求項16に記載の植物材料。

【請求項18】

植物体である、請求項13に記載の植物材料。

【請求項19】

請求項13に記載の植物材料であって、前記ポリヌクレオチドによってコードされるデルタ-9デサチュラーゼ酵素以外の植物材料において、16:0-ACPのレベルを減少させるための植物細胞小器官外(extraplastidial)デサチュラーゼを含む、植物材料。

【請求項20】

前記植物細胞小器官外デサチュラーゼが、LnD9DSデサチュラーゼ、AnD9DSデサチュラーゼ、およびMgD9DSデサチュラーゼからなる群から選択される、請求項19に記載の植物材料

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

優先権の主張

この出願は、2006年4月20日にPCT国際公開番号WO 2006/042049 A2として英語で公開され、アメリカ合衆国を指定する、2005年10月7日に出願されたPCT国際特許出願番号PCT/US 05/36052の国内段階の移行である同時係属中の米国特許出願11/576,750の一部継続出願である。PCT国際特許出願番号PCT/US05/36052は、2004年10月8日に出願された米国仮特許出願番号60/617,532の継続出願である。この出願はまた、2010年6月24日に出願された米国仮特許出願番号61/358,314の継続出願である。

20

【0002】

技術分野

いくつかの実施形態は、一般的に特定のデルタ-9デサチュラーゼ酵素、これらの酵素をコードする核酸、植物細胞内で該核酸を発現する方法に関連している。いくつかの実施形態では、植物材料(plant material)(例えば、種子)中の飽和脂肪酸の%組成を減少させるために特定のデルタ-9デサチュラーゼ酵素の活性を利用して、 ω -7脂肪酸の%組成を増加させることに関連している。また、特定の実施形態での方法によって製造された植物および植物材料が本明細書に開示されている。

【背景技術】

30

【0003】

背景

植物由来の油が、徐々に食物脂肪摂取量の主要な供給源として、動物由来の油脂類を代替してきている。しかし、ほとんどの先進国では飽和脂肪の摂取量が総カロリー消費量の約15%から20%で推移している。健康的なライフスタイルを促進するための努力において、米国農務省(USDA)は最近、飽和脂肪が、毎日のカロリー摂取量の10%未満を構成することを推奨している。消費者の意識を促進するために、米国農務省が発行した現在の表示ガイドラインは現在、総飽和脂肪酸レベルは、「低飽和脂肪酸(low-sat)」のラベルを受けるためには、14グラム分量当たり1.0グラム未満であることを要求し、「無飽和脂肪酸(no-sat)」のラベルを受けるためには、14グラム分量当たり0.5グラム未満であることを要求する。これは、植物油の飽和脂肪酸含量は、「低飽和脂肪酸」または「無飽和脂肪酸」のラベルを受けるためには、それぞれ7%未満および3.5%未満である必要があることを意味する。これらのガイドラインの発行以来、「低飽和脂肪酸」油および「無飽和脂肪酸」油に対する消費者の需要の急増があった。現在までに、この需要はキャノーラ油で主に満たされ、ヒマワリおよびペニバナ油ではるかに低い程度で満たされている。

40

【0004】

不飽和脂肪(一価不飽和と多価不飽和)は(適度に消費される場合は特に)は有益であるが、飽和およびトランス脂肪は有益ではない。飽和脂肪とトランス脂肪は、血液中の望ましくないLDLコレステロール値を上げる。食事性コレステロールもLDLコレステロールを上昇させ、LDLを上げなくても、心臓病に貢献するかもしれない。したがって、それは健

50

康的な食事の一部として、飽和脂肪、トランス脂肪、コレステロールの低い食品を選択することを推奨する。

【0005】

油の特性は、植物または動物起源かどうかに関わらず、油分子中の炭素と水素原子の数だけでなく、脂肪酸鎖に含まれる二重結合の数と位置によって主に決定される。植物由来のほとんどの油はパルミチン酸(16:0)、ステアリン酸(18:0)、オレイン酸(18:1)、リノール酸(18:2)及びリノレン酸(18:3)の脂肪酸の量を変えることで構成されている。その炭素鎖が水素原子で飽和し、従って二重結合を有していないため、従来は、パルミチン酸及びステアリン酸は、「飽和」として指定され、それらには可能な水素原子の最大数を含む。しかし、オレイン酸、リノール酸、およびリノレン酸は、それぞれ、1、2、およ

10

【0006】

び3つの二重結合を有する18炭素脂肪酸鎖である。リノール酸とリノレン酸は多価不飽和脂肪酸であると考えられているのに対し、オレイン酸は、典型的には、一価不飽和脂肪酸とみなされる。脂肪酸含有量3.5%未満を有するものとしての「無飽和脂肪酸」油製品のU.S.D.A.の定義は、組み合わせ飽和脂肪酸重量含量(脂肪酸の総量に比べて)として計算される。

20

【0007】

キャノーラ油はすべて植物油の飽和脂肪酸の最も低いレベルを有する。「キャノーラ」は、種の総脂肪酸含量に基づいて、エルカ酸(C22:1)を最大2重量%の含有量で有している菜種(アブラナ)を指し(好ましくは0.5重量%、最も好ましくは、本質的に0重量%)、を有し、かつ、粉碎した後、脱脂(オイルフリー)の食事中30 mmol/g未満を含む空気乾燥ミールを生成する。菜種のこれらのタイプは、種のより伝統的な品種に比較してそれらの食用であることによって区別される。

30

【0008】

油糧種子において、脂肪酸合成は色素体で主に発生することが仮定される。脂肪酸合成の主な生成物はパルミチン酸塩(16:0)であり、効率的にステアリン酸塩(18:0)に伸長しているように見える。まだ色素体にあるうちに、飽和脂肪酸は、1つ以上の炭素-炭素二重結合を導入するアシル-ACPデルタ-9デサチュラーゼ、として知られている酵素によって不飽和化することができる。具体的には、ステアリン酸塩は、オレイン酸塩(18:1)を生ずる色素体(plastidial)デルタ-9デサチュラーゼ酵素により急速に不飽和化することができる。実際には、パルミチン酸塩も色素体デルタ-9デサチュラーゼによってパルミトイル酸塩(palmitoleate)(16:1)に不飽和化されてもよいが、この脂肪酸は、ほとんどの植物油でわずかに微量(0-0.2%)に出現するにすぎない。したがって、色素体における脂肪酸合成の主要な生成物は、パルミチン酸塩、ステアリン酸塩、及びオレイン酸塩である。飽和脂肪酸がはるかに低い割合で存在しているので、ほとんどの油で、オレイン酸塩は、合成される主要な脂肪酸である。

40

【0009】

新たに合成された脂肪酸は、色素体から細胞質に輸出されている。細胞質内の植物脂肪酸のその後の不飽和化は、ホスファチジルコリン(PC)にエステル化されるオレオイルまたはリノレオイル(lineoleoyl)基質に作用するミクロソームデサチュラーゼによりリノール酸塩(18:2)及びリノレン酸塩(18:3)に不飽和化することができる、オレイン酸塩に限定されるようである。また、植物に応じて、オレイン酸塩は伸長(20:1、22:1、および/または24:1)によって、または官能基の付加によりさらに改変(modified)することができる。これらの脂肪酸は、飽和脂肪酸、パルミチン酸塩、およびステアリン酸塩と一緒に、その後細胞内(endoreticular)膜中でトリグリセリドに組み立てられる。

50

る。米国特許5,723,595および米国特許6,706,950は植物デサチュラーゼに関連している。

【0010】

酵母デルタ-9デサチュラーゼ遺伝子は、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) から単離され、クローン化され、そして配列決定されている。Stukey et al. (1989) J. BIOL. CHEM. 264:16537-44; Stukey et al. (1990) J. BIOL. CHEM. 265:20144-9。この酵母遺伝子は、タバコ葉組織に導入されており (Polashcok et al. (1991) FASEB J. 5: A1157; Polashok et al. (1992) Plant Physiol. 100:894-901)、明らかにこの組織で発現された。さらに、この酵母遺伝子は、トマトで発現された。Wang et al. (1996)、J. Agric. Food Chem. 44:3399-402、およびWang et al. (2001) Phytochemistry 58:227-32を参照のこと。特定の不飽和脂肪酸が一部上昇し、特定の飽和脂肪酸が一部減少したことは、この酵母デルタ-9デサチュラーゼ遺伝子を用いてタバコとトマトの両方で報告されたが、タバコ、トマトは明らかに油料作物ではない。この酵母遺伝子はまた、セイヨウアブラナに導入された。米国特許5,777,201。

【0011】

アスペルギルスニデュランス (*Aspergillus nidulans*) 由来の異なる真菌アシルCoAデルタ-9デサチュラーゼがキャノーラに導入され、それによって種子油で飽和脂肪酸レベルの減少を達成した。米国特許出願公開2008/0260933 A1。A. ニデュランスアシルCoAデルタ-9デサチュラーゼは、種子油中のより豊富なパルミチン酸脂肪酸 (36 - 49%) よりも大きいステアリン酸の枯渇 (61 - 90%) を生じた。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0012】

【特許文献1】米国特許5,723,595

【特許文献2】米国特許6,706,950

【特許文献3】米国特許出願公開2008/0260933 A1

【非特許文献】

【0013】

【非特許文献1】Stukey et al. (1989) J. BIOL. CHEM. 264:16537-44

【非特許文献2】Stukey et al. (1990) J. BIOL. CHEM. 265:20144-9

【非特許文献3】Polashcok et al. (1991) FASEB J. 5: A1157

【非特許文献4】Polashok et al. (1992) Plant Physiol. 100:894-901

【非特許文献5】Wang et al. (1996)、J. Agric. Food Chem. 44:3399-402

【非特許文献6】Wang et al. (2001) Phytochemistry 58:227-32

【発明の概要】

【0014】

本発明は以下を提供する。

[1] 配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：50、配列番号：51、配列番号：52、配列番号：72、および配列番号：73から成る群から選択される配列と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含むデルタ-9デサチュラーゼ酵素をコードする単離された核酸分子。

[2] 上記核酸分子が、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：44、及び配列番号：45から成る群から選択される配列に対して少なくとも60%同一であるヌクレオチド配列を含む、上記[1]に記載の核酸分子。

[3] さらに遺伝子調節エレメントを含む、上記[1]に記載の核酸分子。

[4] 上記遺伝子調節エレメントは、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) デルタ-9デサチュラーゼプロモーター、デルタ-9デサチュラーゼ3'UTR /ターミネーター、OLE1遺伝子プロモーター、ファゼオリンプロモーター、インゲンマメ (*Phaseolus vulgaris*) ファゼオリン5'非翻訳領域、インゲンマメファゼオリン3'非翻訳領域、インゲンマメファゼオリンマトリックス結合領域、アグロバクテリウムツメファシエン

ス (*Agrobacterium tumefaciens*) ORF23 3'非翻訳領域、キャッサバ葉脈モザイクウイルスプロモーター、アグロバクテリウムツメファシエンスORF1 3'非翻訳領域、タバコ (*Nicotiana tabacum*) RB7マトリックス結合領域、オーバードライブ、Tスタンドボーダー配列、LfKCS3プロモーター、FAE 1プロモーター、配列番号：40、配列番号：41、配列番号：42、配列番号：43、Mycタグ、およびヘマグルチン (hemagglutinin) タグから成る群から選択される、上記 [3] に記載の核酸分子。

[5] 配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：50、配列番号：51、配列番号：52、配列番号：72、および配列番号：73から成る群から選択される配列に対して少なくとも80%同一のアミノ酸配列を含む単離されたデルタ-9デサチュラーゼ酵素。

[6] 配列番号：72および/または配列番号：73を含むキメラデルタ-9デサチュラーゼポリペプチドであって、配列番号：77および配列番号：78から成る群から選択されるアミノ酸配列をさらに含むことを特徴とする、ポリペプチド。

[7] 細胞内の飽和脂肪酸の量を減少させるための方法であって、細胞内の飽和脂肪酸の量が減少するように、上記 [1] に記載の核酸分子で細胞を形質転換する工程を含む、方法。

[8] 上記細胞は酵母細胞である、上記 [7] に記載の方法。

[9] 上記細胞は植物細胞である、上記 [7] に記載の方法。

[10] 上記 [1] に記載の複数の核酸分子で植物細胞を形質転換する工程を含む、上記 [9] に記載の方法。

[11] 上記植物細胞を形質転換することによって、上記植物細胞に、上記植物細胞内で16:0-ACPのレベルを減少させるための手段が導入される、上記 [9] に記載の方法。

[12] 上記植物細胞において16:0-ACPのレベルを減少させるための手段が、植物細胞小器官外 (extraplastidial) デサチュラーゼである、上記 [11] に記載の方法。

[13] 上記植物細胞小器官外デサチュラーゼが、LnD9DSデサチュラーゼ、AnD9DSデサチュラーゼ、HzD9DSデサチュラーゼ、およびMgD9DSデサチュラーゼからなる群から選ばれるデサチュラーゼである、上記 [12] に記載の方法。

[14] 上記植物細胞が、シロイヌナズナ、ボラゴ (*Borago*)、キャノーラ、ヒマ、テオブロマ、トウモロコシ、ワタ、ハマナ、クフェア、アマ、レスケレーラ (*Lesquerella*)、リムナンテス (*Limnanthes*)、リノラ (*Linola*)、キンレンカ、マツヨイグサ、オレア、アブラヤシ、落花生、菜種、ベニバナ、大豆 (*Glycine*)、ソヤ (*Soja*)、ヒマワリ、ニコチアナ、ベルノニア、コムギ、オオムギ、イネ、エンバク、ソルガム、ライムギ、及びイネ科の他のメンバーからなる群から選ばれる属から選択された植物から得られる、上記 [9] に記載の方法。

[15] 上記 [1] に記載の核酸配列を含む油種子植物。

[16] 配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：50、配列番号：51、および配列番号：52から成る群から選択される植物細胞小器官外デサチュラーゼを発現する植物種子。

[17] トランスジェニックセイヨウアブラナ (*Brassica napus*) 系統の種子であって、同質遺伝子系統バージョンのトランスジェニックセイヨウアブラナ系統に対して減少した16:0レベルを有する種子。

[18] 野生型植物に比べて減少量の飽和脂肪酸をその植物において含むトランスジェニック植物を作製するための方法であって：

上記 [1] に記載の核酸分子で植物材料を形質転換する工程；および形質転換された植物素材を培養して、植物を得る工程を含む、方法。

[19] 上記植物が、シロイヌナズナ、ボラゴ (*Borago*)、キャノーラ、ヒマ、テオブロマ、トウモロコシ、ワタ、ハマナ、クフェア、アマ、レスケレーラ (*Lesquerella*)、リムナンテス (*Limnanthes*)、リノラ (*Linola*)、キンレンカ、マツヨイグサ、オレア、アブラヤシ、落花生、菜種、ベニバナ、大豆 (*Glycine*)、ソヤ (*Soja*)、ヒマワリ、ニコチアナ、ベルノニア、コムギ、オオムギ、イネ、エンバク、ソルガム、ライムギ、及びイ

10

20

30

40

50

ネ科の他のメンバーからなる群から選ばれる属から選択される、上記 [18] に記載の方法。

【 2 0 】 上記 [18] に記載の方法により得られる植物。

【 2 1 】 上記 [20] に記載の植物から得られる植物材料。

【 2 2 】 上記植物材料が種子である、上記 [21] に記載の植物材料。

新規な真菌デルタ-9デサチュラーゼ酵素、そのようなデサチュラーゼ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、植物、植物材料（例えば、種子）、植物の部分、および上記のいずれかを含む植物コモディティ製品類が本明細書に開示される。いくつかの実施形態の側面は、イネいもち病菌（*Magnaporthe grisea*）、レプトスファエリアノドルム（*Leptosphaeria nodorum*）、およびオオタバコガトウモロコシ（*Helicoverpa zea*）から単離された真菌のデルタ-9デサチュラーゼ酵素によって例示される。いくつかの例は、パルミチン酸又はステアリン酸の基質選好（substrate preference）を有する天然のおよび合成デルタ-9デサチュラーゼを含む。

【 0 0 1 5 】

いくつかの実施形態では、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：50、配列番号：51、配列番号：52、配列番号：72、および配列番号：73からなる群から選択される配列に対して少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含むデルタ-9デサチュラーゼ酵素をコードする単離された核酸分子を含む。特定の例において、核酸分子は、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：44、配列番号：45、配列番号：番号：48、および配列番号：49からなる群から選択される配列に対して少なくとも60%同一である配列を含む。これらおよびさらなる実施形態は、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：50、配列番号：51、配列番号：52、配列番号：72、および配列番号：73から成る群から選択される配列と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含む単離されたデルタ-9デサチュラーゼポリペプチドを含んでいてもよい。

【 0 0 1 6 】

また、植物細胞における上記の核酸および/またはポリペプチドの少なくとも1つを発現させる方法が開示される。特定の実施形態では、飽和脂肪酸の割合（%）組成が、植物、植物材料（例えば、種子）および/または植物細胞を含む植物部分、および/または前述のいずれかから産生された植物コモディティ製品において減少されているように、デルタ-9デサチュラーゼ酵素の活性を活用する。特定の実施形態では、 ω -7脂肪酸は、植物、植物材料、植物の部分、および/または植物コモディティ製品において同時に増加させることができる。

【 0 0 1 7 】

いくつかの実施形態では、植物、植物材料、植物の部分、および/または植物コモディティ製品中の飽和脂肪酸の量を減少させるための方法を含み、その方法は、細胞内の飽和脂肪酸の量が減少するように本発明のデルタ-9デサチュラーゼポリペプチドをコードする核酸分子を用いて植物細胞を形質転換することを含む。いくつかの実施形態は、同じ種の野生型植物と比較して、植物内の飽和脂肪酸の減少量を含み、トランスジェニック植物を作製するための方法を含む。このような方法は、本発明のポリペプチドデルタ-9デサチュラーゼコードする核酸分子を用いて植物材料（または植物細胞）を形質転換し、その形質転換された植物材料（または植物細胞）を培養して植物体を得ることを含んでいてもよい。特定の例では、シロイヌナズナ属の植物細胞及び/又は植物材料を、本発明のポリペプチドデルタ-9デサチュラーゼをコードする核酸分子で形質転換することができる。

【 0 0 1 8 】

上記及び他の特徴は、添付の図面を参照して進めるいくつかの実施形態の以下の詳細な説明から一層明らかとなるであろう。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 9 】

10

20

30

40

50

【図 1】様々な真菌デサチュラーゼタンパク質配列の概略系統解析を含む。描かれたデサチュラーゼの完全なタンパク質配列は、ClustalXを使用してアラインメントし、MEGAを使って表示した。

【図 2 a】真菌のデルタ-9デサチュラーゼ遺伝子配列のアラインメントを含む。大文字のフォントはこのアラインメントで保存されたヌクレオチドを表している。影付きフォントは、このアラインメントの同一ヌクレオチドを表している。

【図 2 b】真菌のデルタ-9デサチュラーゼ遺伝子配列のアラインメントを含む。大文字のフォントはこのアラインメントで保存されたヌクレオチドを表している。影付きフォントは、このアラインメントの同一ヌクレオチドを表している。

【図 2 c】真菌のデルタ-9デサチュラーゼ遺伝子配列のアラインメントを含む。大文字のフォントはこのアラインメントで保存されたヌクレオチドを表している。影付きフォントは、このアラインメントの同一ヌクレオチドを表している。

10

【図 2 d】真菌のデルタ-9デサチュラーゼ遺伝子配列のアラインメントを含む。大文字のフォントはこのアラインメントで保存されたヌクレオチドを表している。影付きフォントは、このアラインメントの同一ヌクレオチドを表している。

【図 3 a】真菌のアラインメントデルタ-9デサチュラーゼのポリペプチドを含む。

【図 3 b】真菌のアラインメントデルタ-9デサチュラーゼのポリペプチドを含む。

【図 4 a】いくつかの実施形態において有用であり得る真菌デルタ-9デサチュラーゼポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む典型的なプラスミドのプラスミドマップを含む。図4は、具体的には、LnD9DS-2をコードし（pDAB110110図4a）およびHzD9DSをコードし（図4b; pDAB110112）、さらにPvPhas 5'UTRおよびPvPhas 3'UTRを含むヌクレオチド配列を含む典型的なプラスミドのプラスミドマップを含む。

20

【図 4 b】いくつかの実施形態において有用であり得る真菌デルタ-9デサチュラーゼポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む典型的なプラスミドのプラスミドマップを含む。図4は、具体的には、LnD9DS-2をコードし（pDAB110110図4a）およびHzD9DSをコードし（図4b; pDAB110112）、さらにPvPhas 5'UTRおよびPvPhas 3'UTRを含むヌクレオチド配列を含む典型的なプラスミドのプラスミドマップを含む。

【図 5】いくつかの実施形態において有用であり得る真菌デルタ-9デサチュラーゼポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む典型的なプラスミドのプラスミドマップを含む。図4は、具体的には、LnD9DS-2をコードし（pDAB110110図4a）およびHzD9DSをコードし（図4b; pDAB110112）、さらにPvPhas 5'UTRおよびPvPhas 3'UTRを含むヌクレオチド配列を含む典型的なプラスミドのプラスミドマップを含む。

30

【図 6】いくつかの実施形態において有用であり得る真菌デルタ-9デサチュラーゼポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む典型的なプラスミドのプラスミドマップを含む。図4は、具体的には、LnD9DS-2をコードし（pDAB110110図4a）およびHzD9DSをコードし（図4b; pDAB110112）、さらにPvPhas 5'UTRおよびPvPhas 3'UTRを含むヌクレオチド配列を含む典型的なプラスミドのプラスミドマップを含む。

【図 7】いくつかの実施形態において有用であり得る真菌デルタ-9デサチュラーゼポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む典型的なプラスミドのプラスミドマップを含む。図4は、具体的には、LnD9DS-2をコードし（pDAB110110図4a）およびHzD9DSをコードし（図4b; pDAB110112）、さらにPvPhas 5'UTRおよびPvPhas 3'UTRを含むヌクレオチド配列を含む典型的なプラスミドのプラスミドマップを含む。

40

【図 8】いくつかの実施形態において有用であり得る真菌デルタ-9デサチュラーゼポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む典型的なプラスミドのプラスミドマップを含む。図4は、具体的には、LnD9DS-2をコードし（pDAB110110図4a）およびHzD9DSをコードし（図4b; pDAB110112）、さらにPvPhas 5'UTRおよびPvPhas 3'UTRを含むヌクレオチド配列を含む典型的なプラスミドのプラスミドマップを含む。

【図 9】いくつかの実施形態において有用であり得る真菌デルタ-9デサチュラーゼポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む典型的なプラスミドのプラスミドマップを含む。図4は、具体的には、LnD9DS-2をコードし（pDAB110110図4a）およびHzD9DSをコード

50

し（図4b; pDAB110112）、さらにPvPhas 5'UTRおよびPvPhas 3'UTRを含むヌクレオチド配列を含む典型的なプラスミドのプラスミドマップを含む。

【図10】いくつかの実施形態において有用であり得る真菌デルタ-9デサチュラーゼポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む典型的なプラスミドのプラスミドマップを含む。図4は、具体的には、LnD9DS-2をコードし（pDAB110110図4a）およびHzD9DSをコードし（図4b; pDAB110112）、さらにPvPhas 5'UTRおよびPvPhas 3'UTRを含むヌクレオチド配列を含む典型的なプラスミドのプラスミドマップを含む。

【図11】いくつかの実施形態において有用であり得る真菌デルタ-9デサチュラーゼポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む典型的なプラスミドのプラスミドマップを含む。図4は、具体的には、LnD9DS-2をコードし（pDAB110110図4a）およびHzD9DSをコードし（図4b; pDAB110112）、さらにPvPhas 5'UTRおよびPvPhas 3'UTRを含むヌクレオチド配列を含む典型的なプラスミドのプラスミドマップを含む。

【図12】いくつかの実施形態において有用であり得る真菌デルタ-9デサチュラーゼポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む典型的なプラスミドのプラスミドマップを含む。図4は、具体的には、LnD9DS-2をコードし（pDAB110110図4a）およびHzD9DSをコードし（図4b; pDAB110112）、さらにPvPhas 5'UTRおよびPvPhas 3'UTRを含むヌクレオチド配列を含む典型的なプラスミドのプラスミドマップを含む。

【図13】いくつかの実施形態において有用であり得る真菌デルタ-9デサチュラーゼポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む典型的なプラスミドのプラスミドマップを含む。図4は、具体的には、LnD9DS-2をコードし（pDAB110110図4a）およびHzD9DSをコードし（図4b; pDAB110112）、さらにPvPhas 5'UTRおよびPvPhas 3'UTRを含むヌクレオチド配列を含む典型的なプラスミドのプラスミドマップを含む。

【図14】いくつかの実施形態において有用であり得る真菌デルタ-9デサチュラーゼポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む典型的なプラスミドのプラスミドマップを含む。図4は、具体的には、LnD9DS-2をコードし（pDAB110110図4a）およびHzD9DSをコードし（図4b; pDAB110112）、さらにPvPhas 5'UTRおよびPvPhas 3'UTRを含むヌクレオチド配列を含む典型的なプラスミドのプラスミドマップを含む。

【図15】いくつかの実施形態において有用であり得る真菌デルタ-9デサチュラーゼポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む典型的なプラスミドのプラスミドマップを含む。図4は、具体的には、LnD9DS-2をコードし（pDAB110110図4a）およびHzD9DSをコードし（図4b; pDAB110112）、さらにPvPhas 5'UTRおよびPvPhas 3'UTRを含むヌクレオチド配列を含む典型的なプラスミドのプラスミドマップを含む。

【図16】いくつかの実施形態において有用であり得る真菌デルタ-9デサチュラーゼポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む典型的なプラスミドのプラスミドマップを含む。図4は、具体的には、LnD9DS-2をコードし（pDAB110110図4a）およびHzD9DSをコードし（図4b; pDAB110112）、さらにPvPhas 5'UTRおよびPvPhas 3'UTRを含むヌクレオチド配列を含む典型的なプラスミドのプラスミドマップを含む。

【図17】いくつかの実施形態において有用であり得る真菌デルタ-9デサチュラーゼポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む典型的なプラスミドのプラスミドマップを含む。図4は、具体的には、LnD9DS-2をコードし（pDAB110110図4a）およびHzD9DSをコードし（図4b; pDAB110112）、さらにPvPhas 5'UTRおよびPvPhas 3'UTRを含むヌクレオチド配列を含む典型的なプラスミドのプラスミドマップを含む。

【図18】いくつかの実施形態において有用であり得る真菌デルタ-9デサチュラーゼポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む典型的なプラスミドのプラスミドマップを含む。図4は、具体的には、LnD9DS-2をコードし（pDAB110110図4a）およびHzD9DSをコードし（図4b; pDAB110112）、さらにPvPhas 5'UTRおよびPvPhas 3'UTRを含むヌクレオチド配列を含む典型的なプラスミドのプラスミドマップを含む。

【図19】特定の典型的な真菌デルタ-9デサチュラーゼ遺伝子配列で形質転換された植物からの典型的なT2のシロイヌナズナ種子の総飽和脂肪酸含量（%FAME）を示すデータを含む。

10

20

30

40

50

【図20】特定の典型的な真菌デルタ-9デサチュラーゼ遺伝子配列で形質転換された植物からの典型的なT2のシロイヌナズナ種子のパルミチン酸 (C16:0) の含有率 (%FAME) を示すデータを含む。

【図21】特定の典型的な真菌デルタ-9デサチュラーゼ遺伝子配列で形質転換された植物からの典型的なT2のシロイヌナズナ種子のステアリン酸 (C18:0) の含有率 (%FAME) を示すデータを含む。

【図22】特定の典型的な真菌デルタ-9デサチュラーゼ遺伝子配列で形質転換された植物からの典型的なT2のシロイヌナズナ種子のパルミトレイン酸 (C16:1) の含有率 (%FAME) を示すデータを含む。

【図23】pDAB7319 (AnD9DS v3およびLnD9DS-2 V2) またはpDAB7324 (AnD9DS v3およびHzD9DS V2) で形質転換されたキャノーラ植物から種子を開発する上でHzD9DSとLnD9DS-2のmRNA転写物の蓄積 (AnD9DS転写物に対する) を図表示を含む。各遺伝子の定量RT-PCRの $\Delta\Delta CT$ はアクチン転写レベルと比較して決定し、HzD9DSとLnD9DS-2の転写物の量は、各試料におけるAnD9DS転写物のレベルに対して標準化した。

10

【0020】

配列表

37 C.F.R. § 1.822に定義されているように、添付の配列表に記載されている核酸配列は、ヌクレオチド塩基のための標準文字の略語を使用して示されている。各核酸配列の片方の鎖だけが示されているが、相補鎖が表示された鎖に対する参照によって含まれることが理解される。添付の配列表では：

20

【0021】

配列番号：1は、イネいもち病菌 (*Magnaporthe grisea*) アシルCoAデルタ-9デサチュラーゼ遺伝子 (MgD9DSとして、呼ばれることがある) の断片をPCR増幅するために使用されるフォワードプライマーを示す。

【0022】

配列番号：2は、*M. grisea* (M. grisea) アシルCoAデルタ-9デサチュラーゼ遺伝子 (MgD9DSとして呼ばれることがある) の断片をPCR増幅するために使用されるリバースプライマーを示す。

【0023】

配列番号：3は、PCRにより増幅したM. griseaアシルCoAデルタ-9デサチュラーゼ遺伝子 (MgD9DSとして呼ばれることがある) の典型的な断片を示す。

30

【0024】

配列番号：4は、典型的なイントロン無しのMgD9DSクローンを示す。

【0025】

配列番号：5は、LnD9DS-1として呼ばれることがある第1のレプトスファエリア ノドルム (*Leptosphaeria nodorum*) アシルCoAデルタ-9デサチュラーゼをコードする典型的な核酸配列を示す。

【0026】

配列番号：6および7は、いくつかの実施形態において有用であり得るプライマー配列を示す。

40

【0027】

配列番号：8は、LnD9DS-2として呼ばれることがある第2の典型的なL. nodorumアシルCoAデルタ-9デサチュラーゼをコードする典型的な核酸配列を示す。

【0028】

配列番号：9は、M. griseaに由来する典型的な天然のデルタ-9デサチュラーゼ遺伝子 (MgD9DS V1と表記) からのコーディング領域を示す。

【0029】

配列番号：10は、オオタバコガトウモロコシ (*Helicoverpa zea*) 由来の典型的な天然のデルタ-9デサチュラーゼ遺伝子 (HzD9DS V1と表記) からのコーディング領域を示す。

【0030】

50

配列番号：11は、*L. nodorum*由来の典型的な天然のデルタ-9デサチュラーゼ（LnD9DS-2 V1）から遺伝子からのコード領域を示す。

【 0 0 3 1 】

配列番号：12は、*M. グリセア*由来の典型的な天然のデルタ-9デサチュラーゼ（MgD9DS）のアミノ酸配列を示す。

【 0 0 3 2 】

配列番号：13は、*H. ゼア*由来の典型的な天然のデルタ-9デサチュラーゼ（HzD9DS）のアミノ酸配列を示す。

【 0 0 3 3 】

配列番号：14は、*L. nodorum*由来の典型的な天然のデルタ-9デサチュラーゼ（LnD9DS-2 V2）のアミノ酸配列を示す。 10

【 0 0 3 4 】

配列番号：15は、*M. グリセア*由来の典型的なキャノーラに最適化されたデルタ-9デサチュラーゼ遺伝子（MgD9DS V2）の配列を示す。

【 0 0 3 5 】

配列番号：16は、*H. ゼア*由来の典型的なキャノーラに最適化されたデルタ-9デサチュラーゼ遺伝子（HzD9DS V2）の配列を示す。

【 0 0 3 6 】

配列番号：17は、*L. nodorum*由来の典型的なキャノーラに最適化されたデルタ-9デサチュラーゼ遺伝子（LnD9DS-2 V2）の配列を示す。 20

【 0 0 3 7 】

配列番号：18-39は、いくつかの実施形態において有用であり得るプライマーおよびプロンプの配列を示す。

【 0 0 3 8 】

配列番号：40-43は、いくつかの実施形態での発現を増加させるために使用され得る典型的な代替Kozak配列を示す。

【 0 0 3 9 】

配列番号：44は、*L. nodorum*由来のさらなる例示的なキャノーラに最適化されたデルタ-9デサチュラーゼ遺伝子（LnD9DS-2 V3）の配列を示す。

【 0 0 4 0 】

配列番号：45は、*H. ゼア*からさらなる例示的なキャノーラに最適化されたデルタ-9デサチュラーゼ遺伝子（HzD9DS V3）の配列を示す。 30

【 0 0 4 1 】

配列番号：46は、Mycタグのアミノ酸配列を示す。

【 0 0 4 2 】

配列番号：47は、HAタグのアミノ酸配列を示す。

【 0 0 4 3 】

配列番号：48は、AnD9DS v2と呼ばれることがあるアスペルギルス・デルタ-9デサチュラーゼをコードする典型的な核酸配列を示す。

【 0 0 4 4 】

配列番号：49は、AnD9DS v3と呼ばれることがあるA. ニデュランスデルタ-9デサチュラーゼをコードする第二の典型的な核酸配列を示す。 40

【 0 0 4 5 】

配列番号：50は、配列番号：48-49（AnD9DS）によって例示されるような核酸によってコードされるアミノ酸配列を示す。

【 0 0 4 6 】

配列番号：51は、別の例示的なAnD9DSデサチュラーゼのアミノ酸配列を示す。

【 0 0 4 7 】

配列番号：52は、*Saccharomyces cerevisiae*由来の典型的な天然のデルタ-9デサチュラーゼ（ScOLE1）のアミノ酸配列を示す。 50

【 0 0 4 8 】

配列番号：53-66は、いくつかの実施形態において有用であり得るプラスミドを示す。

【 0 0 4 9 】

配列番号：67-71は、いくつかの実施形態において有用であり得るいくつかの核酸調節制御エレメントを含む。

【 0 0 5 0 】

配列番号：72は、典型的なAnD9DSデサチュラーゼのN末端68残基（1 - 68）を示す。

【 0 0 5 1 】

配列番号：73は、典型的なAnD9DSデサチュラーゼのC末端175残基（281 - 455）を示す。

【 0 0 5 2 】

配列番号：74は、プラスミドpDAB110110のマップを示す。

【 0 0 5 3 】

配列番号：75は、プラスミドpDAB110112のマップを示す。

【 0 0 5 4 】

配列番号：76は、MgD9DSとして呼ばれることがある典型的なM・グリセアアシルCoAデルタ-9デサチュラーゼをコードする典型的な核酸配列を示す。

【 0 0 5 5 】

配列番号：77は、配列番号：14のL. nodorum由来の典型的な天然のデルタ-9デサチュラーゼ内に含まれるアミノ酸配列を示す。

【 0 0 5 6 】

配列番号：78は、配列番号：13のH. ゼア由来の典型的な天然のデルタ-9デサチュラーゼ内に含まれるアミノ酸配列を示す。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 5 7 】

I. いくつかの実施形態の概要

本発明者らは以前に、アスペルギルスニデュランス由来の真菌アシルCoAデルタ-9デサチュラーゼをキャノーラに導入したことにより、種子油で飽和脂肪酸レベルの減少を達成した。米国特許出願公開US2008/0260933 A1。A. ニデュランスデルタ-9デサチュラーゼは、種子油中で、より豊富なパルミチン酸脂肪酸（36 - 49%）よりもステアリン酸の枯渇（61 - 90%）の方が大きかった。したがって、パルミチン酸が飽和する上で優先的に作用するデルタ-9デサチュラーゼの同時導入は、A. nidulansのデルタ-9デサチュラーゼのステアリン酸塩-優先的（stearate-preferring）活性を補完することで総飽和のさらなる削減を実現する。本発明のいくつかの実施形態では、様々な基質特異性を有する真菌デルタ-9デサチュラーゼポリペプチドが開示されている。特定の実施形態では、パルミチン酸塩優先的（palmiate-preferring）デルタ-9デサチュラーゼ（例えば本明細書で開示される天然の真菌酵素、またはその機能的等価物；およびパルミチン酸基質に対して優先性を有するように設計された合成ポリペプチド）を含む。

【 0 0 5 8 】

本明細書中、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：44、番号：45、配列番号：48、および配列番号：49からなる群から選択される配列に対して少なくとも60%同一であるヌクレオチド配列を含むデルタ-9デサチュラーゼポリペプチドをコードする核酸分子が開示される。いくつかの態様において、核酸分子は、デルタ-9デサチュラーゼポリペプチドコード配列に作動可能に連結された遺伝子調節エレメントを含むことがある。特定の実施形態では、遺伝子調節エレメントは、ゼオリンプロモーター、ファゼオリン5'非翻訳領域、ファゼオリン3'非翻訳領域、アグロバクテリアツメファシエンス（Agrobacterium tumefaciens）ORF1 3'非翻訳領域、キャッサバ葉脈モザイクウイルス（Cassava vein Mosaic Virus）プロモーター、タバコ（Nicotiana tabacum）RB7マトリックス結合地域、T鎖境界配列、LfKCS3プロモーター、およびFAE 1プロモーターであり得る。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 9 】

配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：50、配列番号：52、配列番号：72、および配列番号：73から成る群から選択される配列と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含むデルタ-9デサチュラーゼポリペプチド、ならびにデルタ-9デサチュラーゼのポリペプチドをコードする核酸分子もまた開示される。

【 0 0 6 0 】

いくつかの実施形態では、核酸分子およびデルタ-9デサチュラーゼポリペプチドの本発明の実施形態は、植物材料、細胞、組織、または植物全体の飽和脂肪酸の量を減少させるための方法を含む。このような方法は、植物材料、細胞、組織、または植物全体の飽和脂肪酸の量が減少するように、前述の核酸分子の少なくとも1つを有する植物材料、細胞、組織、または植物全体を形質転換することを含んでもよい。特定の実施形態では、植物材料、細胞、組織、または植物全体におけるパルミチン酸および/またはステアリン脂肪酸を優先的に減少させるための方法を含む。

10

【 0 0 6 1 】

本明細書に開示される方法は、例えば、植物または植物に由来する植物材料（例えば、シロイヌナズナ属の植物、またはキャノーラ）に対して実施してもよい。特定の実施形態では、同じ種の野生型植物に比べて、植物における飽和脂肪酸の減少量を含むトランスジェニック植物を作製または再生するための方法が記載され、この方法は、少なくとも1つの前述の核酸分子で植物細胞または材料を形質転換する工程、およびその形質転換された植物材料を培養して植物体を得る工程を含む。前述のいずれかの方法によって得られた植物、植物材料、植物細胞、および種子も開示される。

20

【 0 0 6 2 】

II. 略語

$x:y\Delta^z$ x 個の炭素およびカルボキシル末端から数えて z 位置において y 個の二重結合を含む脂肪酸

ACP	アシルキャリアタンパク質
CoA	補酵素A
FA	脂肪酸
FAM	フルオレセイン
FAS	脂肪酸合成酵素
FAME	脂肪酸メチルエステル
KASII	b-ケトアシル-ACPシンターゼII
MUFA	一価不飽和脂肪酸
WT	野生型

30

【 0 0 6 3 】

III. 用語

脂肪酸：本明細書で使用する場合、用語「脂肪酸」は、長い鎖長および短い鎖長の両方の脂肪酸が知られているが、種々の鎖長、例えば、約C12 - C22、の長鎖脂肪酸（アルカン酸）を指す。脂肪酸の構造は、表記、 $x:y\Delta^z$ で表される：ここで「 x 」は、特定の脂肪酸中の炭素（C）原子の総数であり、「 y 」はその酸のカルボキシル末端から数えて「 z 」の位置にある炭素鎖中の二重結合の数である。

40

【 0 0 6 4 】

代謝経路：用語「代謝経路」は、代謝産物の形成、または別の代謝経路の開始のいずれかを達成するための、酵素によって触媒されて、細胞内で発生する一連の化学反応を指す。代謝経路は、複数または多数の工程を含むことがあり、特定の反応基質に対して異なる代謝経路と競合する可能性がある。同様に、1つの代謝経路の生成物はまた別の代謝経路の基質となることがある。

【 0 0 6 5 】

代謝工学：本発明の目的のために、「代謝工学」は、細胞内で作動可能な総代謝経路の全体的な体系の中で所望の正確な化学構造を有する生成物への初期の物質のステップ・バ

50

イ・ステップの変更が達成されるように、細胞内の1つまたは複数の代謝経路を改変するための戦略の合理的な設計を指す。

【0066】

デサチュラーゼ：本明細書で用いる用語「デサチュラーゼ」は、目的の脂肪酸または前駆体を生成するために、1つ以上の脂肪酸を不飽和する（すなわち、二重結合を導入する）ことができるポリペプチドを指す。植物可溶性脂肪酸デサチュラーゼ酵素が、飽和アシル-ACP基質に位置特異的に二重結合を導入するかもしれない。アシル-CoAデサチュラーゼは、飽和脂肪酸アシル-CoA基質に位置特異的に二重結合を導入する。反応は不飽和化アーキテクチャの中核をなす4ヘリックスバンドルによって協調された二電子減少二鉄中心（two-electron reduced diiron center）による酸素分子の活性化を伴う。いくつかの実施形態で特に興味深いのは、アシルCoAデルタ-9デサチュラーゼである。

10

【0067】

デルタ-9-18:0¹-ACPデサチュラーゼは、膜の流動性を維持するためにすべての植物によって必要とされる。この酵素は、主にステアロイル-ACPを不飽和化するが、それはまた、パルミトイル-ACPに対して少しの程度に（to a minor extent）アクティブになっている。

【0068】

バリエーションデサチュラーゼ：本明細書で用いる用語「バリエーションデサチュラーゼ」は、異常な（unusual）脂肪酸を生成する際の役割と一致する特定の活性プロファイルを示すデサチュラーゼを包含している。バリエーションデサチュラーゼは、生物から単離され得るか、指向化進化プログラムを介して操作され得るか、または1つ以上の特徴付けされたデサチュラーゼからの保存されたアミノ酸を組み込んだ合成デサチュラーゼとして操作され得る。

20

【0069】

子孫植物：本発明の目的のために、「子孫植物」は、植物の育種方法によって得ることができる任意の植物や、そこから得られた植物材料をいう。植物育種方法は、当技術分野において周知であり、自然交配、人工繁殖、DNAの分子マーカー分析を伴う選抜育種、遺伝子組換え、および商業繁殖を含んでいる。

【0070】

植物材料：本明細書で用いる用語「植物材料」は、植物から得られる任意の細胞または組織を指す。

30

【0071】

核酸分子：RNAのセンスおよびアンチセンス鎖の両方、cDNA、ゲノムDNA、および上記のものの合形成態や混合ポリマーを含むことができるヌクレオチドのポリマー形態。ヌクレオチドは、リボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、またはヌクレオチドのいずれかのタイプの改変された形態を指す。本明細書で使用される「核酸分子」は、「核酸」および「ポリヌクレオチド」と同義である。この用語は、DNAの一本鎖および二本鎖形態を含む。核酸分子は、天然に存在するヌクレオチド、ならびに天然および/または非天然のヌクレオチド結合によって一緒に連結された改変されたヌクレオチドのいずれかまたは両方を含むことができる。

40

【0072】

核酸分子は、当業者によって容易に理解されるように、化学的もしくは生化学的に改変することができ、または非天然または誘導体化されたヌクレオチド塩基を含むことができる。このような改変としては、例えば、ラベル、メチル化、天然に存在するヌクレオチドの1以上のヌクレオチドのアナログでの置換、ヌクレオチド間改変、例えば、非常電結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど）、荷電結合（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）、ペンダント部分（例えば、ペプチド）、インターカレーター（例えば、アクリジン、ソラレンなど）、キレート剤、アルキル化剤、および改変された結合（例えば、αアノマー核酸など）が含まれる。用語「核酸分子」はまた、一本鎖、二本鎖、部分的に二重鎖、三重鎖、

50

ヘアピン、円形および南京錠型コンフォメーションをなどの任意の位相幾何学的コンフォメーションを含む。

【0073】

作動可能に連結された：第1の核酸配列が第2の核酸配列と機能的な関係にあるとき、第1の核酸配列は第2の核酸配列と作動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または発現に影響を及ぼすならば、プロモーターはコード配列に作動可能に連結されている。組換えにより産生された場合、作動可能に連結された核酸配列は一般的に連続しており、2つのタンパク質コード領域を結合する必要がある場合、同じリーディングフレーム内にある。しかし、核酸は、作動可能に連結されるためには連続している必要はない。

10

【0074】

調節エレメント：本明細書で用いる用語「調節エレメント」は、遺伝子調節活性を有する核酸分子を指す。すなわち、作動可能に連結された転写可能な核酸分子の転写または翻訳に影響を与える能力を有するものである。例えば、プロモーター、リーダー、イントロン、および転写終結領域などの調節エレメントは、生きた細胞内の遺伝子の全体的発現において不可欠な役割を果たす遺伝子調節活性を有する非コーディング核酸分子である。植物内で機能する単離された調節エレメントは、それ故、分子工学の技術により植物の表現型を改変するために有用である。「調節エレメント」によって、特定の遺伝子がいつそしてどのようなレベルで発現したか否かを決定する一連のヌクレオチドを意図している。調節DNA配列は、特に調節タンパク質または他のタンパク質と相互作用する。

20

【0075】

本明細書で使用する用語「遺伝子調節活性」は、作動可能に連結された核酸分子の転写または翻訳に影響を及ぼすことができる核酸分子を指す。遺伝子調節活性を有する単離された核酸分子は、作動可能に連結された核酸分子の、時間的または空間的な発現を提供したり、発現レベルおよび発現率を調節したりすることができる。遺伝子調節活性を有する単離された核酸分子は、プロモーター、イントロン、リーダー、または3'転写終結領域を含んでもよい。

【0076】

プロモーター：本明細書で用いられる用語「プロモーター」は、RNAポリメラーゼIIまたは作動可能に連結された遺伝子の転写を開始する転写因子（転写を制御するトランス作用タンパク質因子）などの他のタンパク質との結合および認識に関与している核酸分子を指す。プロモーターは、自身が作動可能に連結された遺伝子の転写に影響を及ぼすシスエレメントまたはエンハンサードメインなどのサブエレメントを含む場合がある。「植物プロモーター」は、植物細胞中で機能している天然または非天然プロモーターである。植物プロモーターは、作動可能に連結された遺伝子または遺伝子の発現を調節するための5'調節エレメントとして使用することができる。植物プロモーターは、その時間的、空間的、または発現パターンによって定義され得る。本明細書に記載の核酸分子は、プロモーターを含む核酸配列を含んでもよい。

30

【0077】

配列同一性：2つの核酸またはポリペプチド配列の文脈で本明細書において使用される用語「配列同一性」または「同一性」は、指定された比較ウィンドウに対して最大の一致のために整列させた場合、同じである2つの配列における残基を指すことができる。

40

【0078】

配列同一性の割合がタンパク質に関連して使用される場合、同一でない残基位置は、多くの場合、アミノ酸残基が、類似の化学特性（例えば、電荷、疎水性、または立体効果）を有する他のアミノ酸残基に置換され、したがって、分子の機能的特性を変更しない、保存的アミノ酸置換によって異なることが認識されている。

【0079】

したがって、配列が保存的置換によって異なる場合、%配列同一性は、非同一の残基の部位での置換の保存的性質を修正するために上向きに調整することができる。このような

50

保存的置換によって異なる配列は「配列類似性 (sequence similarity)」または「類似性 (similarity)」を有すると言われている。この調整を行うための技術は、当業者に周知である。典型的には、このような技術は、保存的置換を完全なミスマッチではなく、部分的ミスマッチとしてスコア付けすることを含み、それによってパーセント配列同一性を増加させる。たとえば、同一のアミノ酸は、0と1の間のスコアが与えられ、非保存的置換が0のスコアを与えた場合には、保存的置換は、0と1の間のスコアが付与される。保存的置換のスコアリングは、例えば、プログラムのPC/GENE (Intelligenetics、カリフォルニア州マウンテンビュー) に実装されているように計算することができる。

【 0 0 8 0 】

本明細書で用いられる用語「配列同一性の割合」は、比較ウィンドウを介して2つの最適に整列された配列を比較することによって決定された値を意味することができる。但し、比較ウィンドウにおける配列の一部は、2つの配列の最適なアラインメントについて参照配列 (付加または欠失を含まないもの) と比較して、付加または欠失 (すなわち、ギャップ) を含むことができる。パーセンテージは、マッチした位置の数を得るために両方の配列中に同一のヌクレオチドまたはアミノ酸残基が発生した位置の数を決定し、比較ウィンドウ内の位置の総数でマッチした位置の数を分割し、結果を100で乗算して配列同一性のパーセンテージを得ることによって算出される。

【 0 0 8 1 】

アミノ酸配列の類似の位置：核酸およびアミノ酸配列は、以下の段落に記載される方法によって整列 (align) させることができる。整列させた場合、1つの配列中の位置は、その位置がコンセンサス配列内で同一である場合に、整列させた配列の位置と「類似の位置」である。

【 0 0 8 2 】

比較のために配列を整列させるための方法は、当技術分野で周知である。様々なプログラムや整列アルゴリズムが以下の文献に記載されている。Smith and Waterman, Adv. APP L.Math. 2:482, 1981; Needleman and Wunsch, J. Mol. BIOL. 48:443,1970; Pearson and Lipman, Proc. NATL. ACAD. Sci. USA 85:2444, 1988;Higgins and Sharp, Gene 73:237-44, 1988;Higgins and Sharp, CABIOS 5:151-3, 1989;Corpet et al., Nucleic Acids Research 16:10881-10890, 1988;huang, et al., Computer Applications in the Biosciences 8:155-65,1992; Pearson et al., Methods in Molucular Biology 24:307-31, 1994; Tatiana et al., FEMS Microbiol. Lett., 174:247-50, 1990. Altschulet al., J. Mol. BIOL. 215:403-10, 1990 (配列アライメント手法および相同性の計算の詳細な検討)。

【 0 0 8 3 】

国立バイオテクノロジー情報センター (NCBI) の基本的なローカル配列検索ツール (Basic Local Alignment Search Tool) (BLAST) は、配列解析プログラムとの接続で使用するために、インターネット (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) で提供されている。例えば、BLASTPおよびBLASTN。このプログラムを用いて配列同一性を決定する方法の説明は、blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE= BlastDocsでNCBIを介してインターネット上で利用可能である。

【 0 0 8 4 】

アミノ酸配列の比較には、BLASTプログラム (bl2seq) の「Blast 2配列」機能がデフォルトのパラメータを使用して採用されている。特定のパラメータは、例えば、マッチのためのミスマッチや報酬のためにペナルティを提供するために、当業者の裁量の範囲内で調整することができる。

【 0 0 8 5 】

形質転換された：本明細書で使用する用語「形質転換された」とは、構築物 (construct) のような外来核酸分子を導入された細胞、組織、器官、または生物を指す。導入された核酸分子は、レシピエントの細胞、組織、器官、または生物に、導入されたポリヌクレオチド分子がその後の子孫に継承されるように、ゲノムDNAに組み込まれてもよい。「ト

10

20

30

40

50

ランスジェニック」または「形質転換された」細胞または生物はまた、その細胞または生物の子孫、および例えば、異種交配における親としてそのようなトランスジェニック植物を用いた繁殖プログラムから生成され、外来核酸分子の存在に起因する変化した表現型を示す子孫もまた含む。

【0086】

IV. 宿主細胞、組織、または生物において飽和脂肪酸を減少させることへの代謝工学的アプローチ

A. 概要

本発明の一実施形態は、植物の種子の中の特定のアシル-CoA優先性（例えば、パルミチン酸又はステアリン酸）を有するデルタ-9デサチュラーゼを導入することを含む。デルタ-9デサチュラーゼの特定のアシル-CoA優先性は、ある特定の飽和脂肪酸プール（例えば、一価不飽和の生成物への変換のためのパルミチン酸）のターゲティングを可能にする。アシルCoAデルタ-9デサチュラーゼは、それらが正常に感知できる程度にまで植物系で生産されていないことから、植物の飽和脂肪酸含量を低下させるために選択した。

【0087】

B. ポリペプチド

本発明のいくつかの実施形態に係るポリペプチドは、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：50、配列番号：52、配列番号：72、および配列番号：73からなる群から選択される配列と整列したときに増加する割合の同一性を示すアミノ酸配列を含む。これらおよび他の実施形態内の特定のアミノ酸配列は、例えば、上記配列と少なくとも約70%、約75%、約80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一性を有する配列を含んでもよい。多くの実施形態では、上記の配列と整列された場合、上記の配列同一性を有するアミノ酸配列は、酵素 δ -9-18 :0-ACPデサチュラーゼ活性を有するペプチドまたはそのようなペプチドの一部をコードする。

【0088】

C. 核酸

いくつかの実施形態は、上記のポリペプチドをコードする核酸分子を含む。例えば、いくつかの実施形態では、核酸配列は、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：44、配列番号：45、配列番号：48、および配列番号：49からなる群から選択される配列と整列するときのパーセント同一性の増加を示す。これらおよび他の実施形態における特定の核酸配列は、例えば、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列11、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：44、配列番号：45、配列番号：48、および配列番号：49から成る群から選択される配列と、少なくとも約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有する配列を含むことができる。これは、核酸分子は、例えば、コドンの縮重に応じて許容される塩基置換を導入することによって、実質的にコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を変えずに変更できることは、当業者によって理解される。

【0089】

いくつかの実施形態において、本発明の核酸分子は、遺伝子調節エレメント（例えば、プロモーター）を含む。プロモーターは、ベクター構築物が挿入される細胞の種類に基づいて選択することができる。細菌、酵母、植物で機能するプロモーターは、当技術分野で周知である。プロモーターはまた、それぞれの制御の特徴に基づいて選択することができる。そのような特徴の例としては、転写活性の増強、誘導性、組織特異性、および発達段階特異性を含む。植物では、誘導可能であり、ウイルスまたは合成起源の、時間的に恒常的に活性調節や空間的規制であるプロモーターが記載されている。例えば、Poszkowski et al. (1989) EMBO J. 3:2719; Odell et al. (1985) Nature 313:810; およびChau et al.

10

20

30

40

50

l. (1989) Science 244:174-81を参照。

【0090】

有用な誘導性プロモーターとしては、例えば、プロモーターは、薬害軽減剤（置換ベンゼンスルホンアミド系除草剤）の適用によって誘導されるサリチル酸又はポリアクリル酸によって誘導されるプロモーター、熱ショックプロモーター、ハウレンソウ硝酸レダクターゼ転写可能な核酸分子配列に由来する硝酸塩誘導性プロモーター、ホルモン誘導性プロモーター、およびRuBPカルボキシラーゼとLHCPファミリーの小サブユニットに関連付けられた光誘導性プロモーターが含まれる。

【0091】

組織特異的、発生学的に調節されているプロモーターの例としては、b-コングリシニン7Saプロモーターおよび種子特異的プロモーターを含む。種子色素体における優先性発現に有用な植物機能プロモーターとしては、油糧種子における脂肪酸生合成に関与するタンパク質に由来するもの、および植物貯蔵タンパク質に由来するものを含む。このようなプロモーターの例としては、ファゼオリン、ナピン、ゼイン、大豆トリブシンインヒビター、ACP、ステアロイル-ACPデサチュラーゼ、およびオレオなど転写可能な核酸分子配列からの5'調節領域を含む。別の例示的な組織特異的プロモーターは、種子組織に特異的なレクチンプロモーターである。

【0092】

その他の有用なプロモーターには、Agrobacterium tumefaciensの腫瘍誘発プラスミドに運ばれるノパリンシンターゼ、マンノピンシンターゼ、及びオクトピンシンターゼプロモーター；カリフラワーモザイクウイルス（CaMV）の19Sおよび35Sプロモーター；強化CaMV 35Sプロモーター；ゴマノハグサモザイクウイルス（Figwort Mosaic Virus）35Sプロモーター；リブ羅斯-1,5 - ビスリン酸カルボキシラーゼ（ssRUBISCO）の小サブユニット由来の光誘導性プロモーター；タバコ由来のEIF-4Aプロモーター（Mandel et al. (1995) Plant Mol. Biol. 29:995-1004）；トウモロコシスクロース合成酵素；トウモロコシアルコールデヒドロゲナーゼI；トウモロコシライト収穫複合体（complex）；トウモロコシ熱ショックタンパク質；シロイヌナズナ由来のキチナーゼプロモーター；LTP（脂質転送蛋白）プロモーター；ペチュニアカルコンイソメラーゼ；豆グリシンリッチタンパク質1；ポテトパタチン；ユビキチンプロモーター；およびアクチンプロモーターが含まれる。有用なプロモーターは、好ましくは、種子選択的、組織選択的、または誘導可能である。種子特異的調節は、例えば、EP 0 255 378に記載されている。

【0093】

異種遺伝子の高い発現を得るために、例えば、それがより効率的に発現宿主細胞（例えば、植物細胞、例えば、キャノーラ、米、タバコ、トウモロコシ、ワタ、ダイズ）内で発現されるように、遺伝子（複数可）を再設計することが好ましい場合がある。したがって、植物発現用のデルタ-9デサチュラーゼをコードする遺伝子の設計における任意の付加的なステップ（すなわち、1つ以上の遺伝子調節エレメントの提供に加えて）は、最適な発現のための異種遺伝子のタンパク質コード領域の再構築である。特定の実施形態では、天然に存在する異種遺伝子配列で形質転換したキャノーラ植物細胞またはシロイヌナズナ植物細胞よりも遺伝子組換えキャノーラ植物細胞またはシロイヌナズナ植物細胞で発現レベルを大きくする（すなわち、より多くのタンパク質を産生する）ために最適化されて再設計された遺伝子が含まれる。

【0094】

遺伝子コードの冗長性/縮退（すなわち、いくつかのアミノ酸が複数のコドンによって指定される）によって与えられる可塑性のために、様々な生物や生物のクラス内のゲノムの進化は、同義のコドン異なる使用法をもたらしている。この「コドンバイアス」がタンパク質コード領域の平均塩基組成に反映される。例えば、比較的低いG+Cの含有量を有するゲノムを有する生物は、同義コドンの3番目の位置にAまたはTを有するより多くのコドンを利用しているのに対し、より高いG+Cの含有量を有するものは、第3の位置にGまたはCを有するより多くのコドンを利用している。さらに、mRNA内の「マイナー」コドンの存在

が、特にマイナーコドンに対応する荷電したtRNAの相対的な存在量が低い場合は、そのmRNAの絶対的な翻訳率を下げる可能性があると考えられる。この推論の延長は、個々のマイナーコドンによる翻訳率の減少が、複数のマイナーコドンに対して、少なくとも相加的であるだろうということである。したがって、特定の発現宿主においてマイナーコドンの高い相対含量を有するmRNAは、相応に低い翻訳率を有するであろう。この率は、それに対応した低レベルのコード化タンパク質に反映され得る。

【0095】

キャノーラやシロイヌナズナ（または米、タバコ、トウモロコシ、綿、または大豆などの植物）での発現のためにデルタ-9デサチュラーゼをコードする最適化された遺伝子を操作するにおいて、将来の宿主植物のコードバイアスが決定されている場合、それは助けになる。複数の一般的に利用可能なDNA配列データベースが存在し、当業者は植物ゲノムのコドンの分布または様々な植物遺伝子のタンパク質コード領域に関する情報を見つけることができる。

10

【0096】

コードバイアスは、発現宿主（例えば、キャノーラやシロイヌナズナなどの植物）が、そのタンパク質のアミノ酸をコードするために使用するコドンの統計的な分布である。コードバイアスは、単一のコドンが全てのアミノ酸のコドンに対して相対的に使用される頻度として計算することができる。あるいは、コードバイアスは、単一コドンがそのアミノ酸（同義コドン）についての他のすべてのコドンに対して、特定のアミノ酸をコードするために使用される頻度として算出することができる。

20

【0097】

デルタ-9デサチュラーゼ遺伝子の植物発現のための最適化コード領域を設計するには、植物によって好まれるプライマリ（「第一の選択」）コドンが決定されるべきであり、複数の選択枝が存在する場合は、第二、第三、第四などの優先コドンの選択枝も決定されるべきである。次いで、デルタ-9デサチュラーゼ遺伝子をコードする新たなDNA配列が設計され得、この新しいDNA配列は、アミノ酸配列内の各位置のアミノ酸を指定する宿主に好ましい（第一の好ましい、第二優先、第三優先、または第四優先など）コドンの発現を置換することによって天然のDNA配列（デサチュラーゼをコードする）とは異なる。次いで、その新しい配列は、その変更によって作製された可能性のある制限酵素部位について分析される。同定された推定の制限部位は、制限部位を除去するための次に優先されるコドンでこれらのコドンを置換することによりさらに改変されている。異種配列の転写または翻訳に影響を及ぼす可能性のある配列内の他の部位は、エクソン：イントロン接合（5'または3'）、ポリA付加シグナル、および/またはRNAポリメラーゼ終結シグナルである。配列をさらに分析し、TAやCGダブレットの頻度を減らすように変更することができる。これらのダブレットに加えて、同じである約6個以上のGまたはCヌクレオチドを有する配列ブロックはまた、配列の転写または翻訳に悪影響を及ぼす可能性がある。したがって、これらのブロックは、第一または第二の選択枝等のコドンを次に優先される選択のコドンと置換することにより有利に改変される。

30

【0098】

上記の方法は、当業者が、遺伝子が最適に植物中で発現されるように、特定の植物に異質な遺伝子（群）を変更することを可能にする。この方法は、更に、PCT出願WO 97/13402に示されている。したがって、いくつかの実施形態の不飽和化酵素/遺伝子と機能的に同等の最適化された合成遺伝子は、植物を含む宿主を形質転換するために用いることができる。合成遺伝子の生産に関するその他のガイダンスについては、例えば、米国特許5380831に記載されている。

40

【0099】

一旦、植物に最適化されたDNA配列が紙上でまたはin silicoで設計されたら、実際のDNA分子が設計された配列に正確に順番に対応して実験室で合成することができる。そのような合成DNA分子は、クローニングされ、そうでなければ、天然または天然の供給源から得られたかのように正確に操作されることができる。

50

【 0 1 0 0 】

D. 植物材料の遺伝子形質転換のための方法

いくつかの実施形態は、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：44、配列番号：45、配列番号：48、および配列番号：49からなる群から選択される配列に対して少なくとも60%同一である核酸配列を含む1つまたは複数の核酸分子を含む形質転換細胞を製造する方法に関する。このような核酸分子はまた、例えば、プロモーターなどの非コーディング調節エレメントを含むことができる。他の配列もまた、非コーディング調節エレメントおよび転写可能な核酸分子の配列と共に細胞に導入することができる。これらの他の配列は、3'転写ターミネーター、3'ポリアデニル化シグナル、他の非翻訳配列、トランジット、または標的配列、選択マーカー、エンハンサー、およびオペレーターを含むことができる。

10

【 0 1 0 1 】

形質転換の方法は一般的には、適当な宿主細胞を選択する工程、組換えベクターで宿主細胞を形質転換する工程、および形質転換された宿主細胞を得る工程を含む。細胞へDNAの導入のための技術は、当業者に周知である。これらの方法は、一般的に5つのカテゴリに分類することができる：(1) 化学的方法 (Graham and Van der Eb (1973) *Virology* 54(2):536-9; Zatloukal et al. (1992) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 660:136-53)；(2) 物理的方法、例えば、マイクロインジェクション (Capechi (1980) *Cell* 22(2):479-88)、エレクトロポレーション (Wong and Neumann (1982) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 107(2):584-7; Fromm et al. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82(17):5824-8; U.S. Patent 5,384,253)、および粒子加速 (Johnston and Tang (1994) *Methods Cell Biol.* 43(A):353-65; Fynan et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90(24):11478-82)；(3) ウィルスベクター (Clapp (1993) *Clin. Perinatol.* 20(1):155-68; Lu et al. (1993) *J. Exp. Med.* 178(6):2089-96; Eglitis and Anderson (1988) *Biotechniques* 6(7):608-14)；(4) 受容体媒介のメカニズム (Curiel et al. (1992) *Hum. Gen. Ther.* 3(2):147-54; Wagner et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89(13):6099-103)；(5)、アグロバクテリウムのような細菌の媒介メカニズム。あるいは、核酸は、直接植物の生殖器官を注入することにより、花粉の中に導入することができる。Zhou et al. (1983) *Methods in Enzymology* 101:433; Hess (1987) *Intern. Rev. Cytol.* 107:367; Luo et al. (1988) *Plant Mol. Biol. Reporter* 6:165; Pena et al. (1987) *Nature* 325:274。その他の形質転換方法としては、例えば、米国特許5508184に示されるプロトプラスト形質転換が含まれる。核酸分子はまた、未熟胚に注入してもよい。Neuhaus et al. (1987) *Theor. Appl. Genet.* 75:30。

20

30

【 0 1 0 2 】

植物細胞の形質転換のための最も一般的に使用される方法は、次のとおりである：アグロバクテリウム媒介DNA転移プロセス (Fraley et al. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:4803) (米国特許5824877、米国特許5591616、米国特許5981840、及び米国特許6384301に示される) およびバイオリスティックまたは微粒子銃媒介プロセス (すなわち、遺伝子銃) (例えば、米国特許5550318、米国特許5538880、米国特許6160208、米国特許6399861、および米国特許6403865)。典型的には、核の形質転換が望ましいが、葉緑体またはアミロプラストなどの色素体を特異的に形質転換することが望ましい場合には、植物の色素体は、例えば、シロイヌナズナ、タバコ、ジャガイモ、そしてアブラナの種などの特定の植物種において所望の核酸分子のマイクロプロジェクト媒介送達を利用して形質転換することができる。

40

【 0 1 0 3 】

アグロバクテリウム媒介形質転換は、アグロバクテリウム属に属する遺伝子操作された土壌細菌の使用によって達成される。いくつかのアグロバクテリウム属は、遺伝子操作して多くの植物種へのDNAの任意の部分の運ぶようにすることができる「T-DNA」と呼ばれる特定のDNAの転移を仲介する。T-DNAを媒介発病 (pathogenesis) のプロセスをマーキング

50

する主要なイベントは、次のとおりである。病原性遺伝子の誘導、およびT-DNAのプロセッシングと転移。このプロセスは、多くのレビューの対象となっている。例えば、Ream (1989) *Ann. Rev. Phytopathol.* 27:583-618; Howard and Citovsky (1990) *Bioassays* 12:103-8; Kado (1991) *Crit. Rev. Plant Sci.* 10:1-32; Zambryski (1992) *Annual Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43:465-90; Gelvin (1993) in *Transgenic Plants*, Kung and Wu eds., Academic Press, San Diego, CA, pp. 49-87; Binns and Howitz (1994) In *Bacterial Pathogenesis of Plants and Animals*, Dang, ed., Berlin: Springer Verlag., pp. 119-38; Hooykaas and Beijersbergen (1994) *Ann. Rev. Phytopathol.* 32:157-79; Lessl and Lanka (1994) *Cell* 77:321-4; および Zupan and Zambryski (1995) *Annual Rev. Phytopathol.* 27:583-618を参照。

10

【0104】

形質転換の手法にかかわらず、形質転換された植物細胞について選択するかまたはスコア化するために、細胞内に導入されたDNAは、再生可能な植物組織内で機能して、植物組織に、もし抵抗性を与えなければ毒性化合物であるものに対する抵抗性を与える化合物を産生する遺伝子が含まれる場合がある。選択マーカー、スクリーニングマーカー、またはスコアマーカーとして使用するための目的の遺伝子は、 β -グルクロニダーゼ (GUS)、緑色蛍光タンパク質 (GFP)、ルシフェラーゼ、および抗生物質または除草剤耐性遺伝子を含むがこれらに限定されない。抗生物質耐性遺伝子の例としては、ペニシリン、カナマイシン (およびネオマイシン、G418、ブレオマイシン)、メトトレキサート (およびトリメトプリム)、クロラムフェニコール、およびテトラサイクリンに対する耐性を付与する遺伝子を含む。例えば、グリホセート耐性を除草剤耐性遺伝子により付与することができる。Della-Cioppa et al. (1987) *Bio/Technology* 5:579-84。他の選択デバイス、例えば、限定はしないが、ホスフィノトリシン、ピアラホス、正の選択メカニズム (Joersbroら (1998) *Mol. Breed.* 4:111-7) に対する耐性、などもまた実装することができ、本発明の実施形態の範囲内にあると考えられる。

20

【0105】

選択またはスクリーニングによって同定され、再生をサポートする適切な培地で培養された、形質転換された細胞は、その後、植物にまで成熟させ得る。

【0106】

本明細書中に開示された方法は、任意の形質転換可能な植物の細胞や組織で使用される。形質転換可能な細胞及び組織は、本明細書で使用する場合、更に増殖して植物を生じさせることが可能である細胞または組織を含むが、これらに限定されない。当業者は、多数の植物細胞または組織が外来DNAを挿入した後と適切な培養条件で、植物細胞または組織が分化した植物体を形成することができるような形質転換可能であることを認識している。これらの目的のための適切な組織としては、未熟胚、タツナミソウ属 (scutellar) 組織、懸濁培養細胞、未熟花序、茎頂分裂組織、リンパ節の外植片、カルス組織、胚軸組織、子葉、根や葉を含めることができるが、これらに限定されない。

30

【0107】

形質転換植物プロトプラストまたは外植片からの植物の再生、発育、栽培は、当該技術分野で公知である。Weissbach and Weissbach (1988) *Methods for Plant Molecular Biology*, (Eds.) Academic Press, Inc., San Diego, CA; Horsch et al. (1985) *Science* 227:1229-31。この再生と成長のプロセスは、形質転換された細胞を選択する工程、それらの細胞を胚発生から根ざした (rooted) 幼植物の段階を通じての通常の段階を経て培養する工程を典型的に含む。トランスジェニック胚および種子も同様に再生される。この方法では、形質転換体は、首尾良く形質転換細胞を選択し、植物のシュート (shoot) の再生を誘導する選択培地の存在下で一般的に培養される。Fraley et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:4803。これらのシュートは、通常、2 ~ 4 ヶ月以内に得られる。得られたトランスジェニック根ざしたシュートは、その後土壌などの適切な植物成長培地に植えられる。選択剤への暴露を生き残る細胞、またはスクリーニングアッセイで陽性獲得された細胞は、植物の再生を支持する培地で培養することができる。シュートは次に選

40

50

拮抗剤と細菌の増殖を防ぐために抗生物質を含有する適切な根誘導培地に移すことができる。シュートの多くは根を発達させる。そして、これらは根の継続的な発達を可能にする土壌または他の培地に移植される。方法は、上記のように、一般的に使用される特定の植物株によって異なり、そのため方法論の子細は、当業者の裁量の範囲内にある。

【0108】

再生されたトランスジェニック植物は、ホモ接合性トランスジェニック植物を提供するために、自家受粉され得る。あるいは、再生されたトランスジェニック植物から得られた花粉は、非トランスジェニック植物、好ましくは、農学的に重要な種の近交系と交配することができる。逆に、非トランスジェニック植物からの花粉を、再生するトランスジェニック植物を受粉するために用いることができる。

10

【0109】

トランスジェニック植物は、その子孫に変換された核酸配列を一緒に渡すことができる。トランスジェニック植物は、形質転換された核酸配列に対して、好ましくはホモ接合体であり、その子孫の際のすべてに、有性生殖の結果としてその配列を伝達する。子孫は、トランスジェニック植物によって生成された種子から成長させることができる。これらの付加的な植物は、その後、植物の真の繁殖ラインを生成するために、自家受粉してもよい。

【0110】

これらの植物からの子孫が、とりわけ、遺伝子発現のために評価されることができる。遺伝子発現は、ウェスタンブロットティング、ノーザンブロットティング、免疫沈降、及びELISA（酵素結合免疫吸着アッセイ）などのいくつかの一般的な方法によって検出することができる。形質転換植物はまた、導入したDNAの存在、および発現レベル、および/または本発明の核酸分子およびアミノ酸分子によって付与された脂肪酸プロファイルのために分析することができる。当業者は、形質転換植物の分析のために利用できる多くの方法を認識している。例えば、植物の分析のための方法としては、サザンブロットまたはノーザンブロット、PCRベースのアプローチ、生化学分析、表現型のスクリーニング方法、フィールド評価、及び免疫アッセイが含まれるが、これらに限定されない。

20

【0111】

特に双子葉植物を形質転換するための方法は、当業者に周知である。これらの方法を用いた形質転換および植物体再生が、以下を含む多数の作物：シロイヌナズナ属のメンバー、綿花（チョウ目害虫抵抗性ワタ）、ダイズ（*Glycine max*）、落花生（ラッカセイ（*Arachis hypogaea*））、アブラナ属のメンバーについて記載されているが、これらに限定されない。主にアグロバクテリウムツメファシエンス（*Agrobacterium tumefaciens*）の使用による双子葉植物の形質転換の方法およびトランスジェニック植物を得るための方法が、綿（米国特許第5004863、米国特許5159135、米国特許5518908）、大豆（米国特許5569834、米国特許5416011；McCabe et al. (1988) *Biotechnology* 6:923；Christou et al. (1988) *Plant Physiol.* 87:671-4）。アブラナ（米国特許5463174）、ピーナッツ（Cheng et al. (1996) *Plant Cell Rep.* 15:653-7；McKently et al. (1995) *Plant Cell Rep.* 14:699-703）、パパイヤ、およびエンドウ（Grant et al. (1995) *Plant Cell Rep.* 15:254-8）について公表されている。

30

40

【0112】

単子葉植物を形質転換するための方法もまた、当該分野で周知である。これらの方法を用いた形質転換および植物体再生は、以下を含む多数の作物について記載されているが、これらに限定されない：大麦（オオムギ *vulgarae*）；トウモロコシ（*Zea mays*）；オート麦（エンバク）；カモガヤ（オーチャード）；イネ（*Oryza* インディカとジャポニカ品種を含むイネ）；ソルガム（モロコシ）；サトウキビ（サトウキビ種）；トールフェスク（オニウシノケグサ）；芝草の種（例えば、*Agrostis* 根生目（*Agrostis stolonifera*））、ケンタッキーブルーグラス（*Poa pratensis*）、*Stenotaphrum secundatum*）、小麦（コムギ）；およびアルファルファ（アルファルファ）。多数の形質転換の方法論が、任意の数の関心の対象作物のために、安定したトランスジェニック植物の生産のために使用され、変更

50

され得ることが、当業者には明らかである。

【0113】

任意の植物が本明細書中に開示された方法で使用するために選択され得る。本発明に係る改変のための好ましい植物としては、例えば、限定されないが、油糧種子植物、シロイヌナズナ、ルリヂサ (*Borago* spp)、キャノーラ (アブラナ属)、ヒマシ (トウゴマ)、カカオ豆 (テオブロマカカオ)、トウモロコシ (*Zea mays*)、ワタ (ワタ属)、ハマナ属、クフェア属、亜麻 (アマ属)、*Lesquerella* および *Limnanthes* 属、*Linola*、キンレンカ (ノウゼンハレン属)、マツヨイグサ属、オリーブ (*Olea* の属)、パーム (アブラヤシ属)、落花生 (ラッカセイ属)、菜種、紅花 (ペニバナ属)、ダイズ (*Glycine* および総社属)、ヒマワリ (ヒマワリ属)、タバコ (ニコチアナ属)、ハグマ属、コムギ (*Triticum* 属)、オオムギ (オオムギ属)、イネ (*Oryza* 属)、燕麦 (カラスムギ属)、ソルガム (モロコシ属)、およびライムギ (ライムギ属) やイネ科の他のメンバーが含まれる。

10

【0114】

多数の形質転換の方法論が、関心の対象作物は、任意の数から安定したトランスジェニック植物の生産のために使用され、変更され得ることは、当業者には明らかである。

【0115】

E. トランスジェニック種子

いくつかの実施形態では、トランスジェニック種子は、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：50、配列番号：51、配列番号：52、配列番号：72、および配列番号：73からなる群から選択される配列と少なくとも80% 同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドデルタ-9デサチュラーゼを含んでもよい。これらおよび他の態様において、トランスジェニック種子は、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：44、配列番号：45、配列番号：48、および配列番号：49からなる群から選択される配列に対して少なくとも60% 同一である核酸配列を含んでもよい。特定の実施態様において、トランスジェニック種子は、飽和脂肪酸 (例えば、パルミチン脂肪酸及び/又はステアリン脂肪酸) レベルの低下を示すことができる。種子は、肥沃なトランスジェニック植物から収穫することができ、上述したように少なくとも1つの核酸配列、および場合によって少なくとも1つの付加的な対象の遺伝子または核酸構築物を含むハイブリッド植物系統を含む形質転換植物の子孫世代を成長させるために使用することができる。

20

30

【0116】

以下の実施例は、ある特定の特徴および/または実施形態を説明するために提供されている。これらの実施例が、記載された特定の機能または形態に本発明を限定するものと解釈されるべきではない。

【実施例】

【0117】

実施例I：ole1欠損酵母におけるアシルCoAデルタ-9デサチュラーゼのクローニングおよび機能解析

【0118】

イネいもち病菌アシルCoAデルタ-9デサチュラーゼのクローニング

イネいもち病菌アシルCoAデルタ-9デサチュラーゼ遺伝子 (MgD9DS) は、「仮想タンパク質」として当初注釈付きの公開されているNCBI/Broad研究所 (Institute) の配列であって、*S. セレビシエ* アシルCoAデルタ-9デサチュラーゼ (すなわち、OLE1) にヌクレオチドレベルで55.4% の同一性を有する配列に基づいてプライマーを用いてゲノムDNAから単離された。フォワードおよびリバースプライマー (長さはそれぞれ41塩基対) が、設計された。フォワードプライマー-MgD9F (配列番号：1) は、5' 末端にEcoRI 部位が含まれていた。リバースプライマー-Mg9DR (配列番号：2) は、3つのリーディングフレームおよび末端XhoI 部位の各々に終止コドンを含んでいた。

40

【0119】

50

MgD9DS遺伝子は、製造業者のプロトコルに従ってタカラEZ Taq (登録商標) PCRキット (タカラバイオ株式会社滋賀県大津市、日本) を用いてPCR増幅した。増幅条件は、94 で1分の後、94 で30秒間、60 で60秒間、および72 で90秒間の伸長の30サイクルであった。最後の伸長ステップを72 で10分間行った。予想された1425塩基対のPCR産物をアガロースゲルから切り出し、メーカーの推奨に従ってモンタージュ (Montage) スピнкаラム (ミリポア、バーリントン、マサチューセッツ州) を用いて精製した。精製断片をpCR (登録商標) 2.1 TOPO (登録商標) クローニングベクター (Invitrogen、Carlsbad、CA) の中にクローン化した。TOPO反応は、サプライヤーの条件でケミカルコンピットップ10大腸菌細胞に形質転換した。推定クローンを含む細菌コロニーを単離した。ミニプラスミドプレップを、マシュレ-ナーゲル (Macherey-Nagel) Nucleospin DNA単離キット (マシュレ-ナーゲル、ノイマンネアンダー-シュトラッセ、デュレン、ドイツ) で行い (preformed)、DNAをEcoRIおよびXhoI制限酵素で消化した。予想される1425 bpのMgD9DS遺伝子断片を含む陽性クローンを同定した。ヌクレオチド配列は、配列決定反応を介して得られた。PCR増幅断片の配列を配列番号: 3として記載した。

【0120】

配列解析はMgD9DS遺伝子の5'末端に位置する小さな (90 bp) のイントロンを明らかにした。イントロンはプライスオーバーラップ伸長PCRを用いて除去した。得られたPCRアンプリコンをゲル精製し、pCR (登録商標) 2.1 TOPO (登録商標) クローニングベクターにクローニングし、トップ10大腸菌細胞に形質転換した。いくつかのクローンを、単一の形質転換体のコロニーからの精製DNAの制限酵素分解物の分析によって同定した。これらのクローンをイントロンMgD9DSクローンの存在を確認するために配列決定した。得られた配列は、配列番号: 4として記載されている。

【0121】

イントロン有りおよび無しのMgD9DS遺伝子を、各々酵母発現ベクターへのEcoRI/XhoI断片としてサブクローニングした。この酵母発現ベクターは、*S. cerevisiae* デルタ-9デサチュラーゼプロモーターおよびデルタ-9デサチュラーゼ3'UTR /ターミネーターに隣接したアスペルギルスニデュランズ (*Aspergillus nidulans*) ・デルタ-9デサチュラーゼ (AnD9DS) 遺伝子を含んでいる。アスペルギルス・ニデュランズデルタ-9デサチュラーゼ遺伝子を、MgD9DS遺伝子含有フラグメントまたはイントロン無しMgD9DS遺伝子含有フラグメントのいずれかと交換したEcoRI/XhoIフラグメント上に切り出した。MgD9DS遺伝子 (1つはイントロンを有するもの、および1つはイントロンのないもの) を含む二つのクローンは、*S. cerevisiae* の形質転換のために進められた (advanced) 。

【0122】

Tween (登録商標) 80を含む酵母ペプトンデキストロース (YPD) 培地上で維持されているデルタ-9デサチュラーゼ欠損*S. cerevisiae*株 (OFY093) を、アルカリカチオン酵母形質転換キット (Qbiogene、モントリオール、カナダ) を用いて形質転換した。補完菌株をTween (登録商標) 80 (一価不飽和脂肪酸補充剤) またはウラシル (SC-URA及び寒天を含むドロップアウトベース) を含まない培地での増殖により同定した。補完株を選択培地上で3回単一コロニー精製した。補完株を、さらにデルタ-9デサチュラーゼ遺伝子のPCR増幅およびPCR産物の配列決定により確認した。また、MgD9DSクローンを含む株をYPD +Tween (登録商標) 80培地で少なくとも3回継代し、次いでTween (登録商標) 80マイナスのDOBA SC-URA培地へパッチングすることにより、脂肪酸およびウラシル依存に戻した。

【0123】

イントロン含有MgD9DSコーディング配列の発現は失敗し、これはイントロンが酵母機構によってスプライシングされなかったことを示す。イントロン無しMgD9DSコーディング配列を含有する酵母株の基質特異性を、さらにFAME分析によって特徴付けた。

【0124】

レプトスファエリア ノドルム (*Leptosphaeria nodorum*) アシルCoAデルタ-9デサチュラーゼのクローニング

二つレプトスファエリア ノドルム (*Leptosphaeria nodorum*) EST配列 (それぞれ1246

10

20

30

40

50

および429塩基対)を、S.セレビスシアシルCoAデルタ-9デサチュラーゼ(OLE1)と配列同一性の高いレベル(それぞれ54.0%および54.2%)を共有するものとしてBLASTN検索を使用して、L. nodorumのESTのコレクションから同定した。アラインメントすると、これらの配列は互いに64.6%同一であった。これは、2つの別個のレプトスファエリア ノドルム(Leptosphaeria nodorum)アシルCoAデルタ-9デサチュラーゼの存在を示唆する。LnD9DS-1遺伝子(配列番号:5)を、1246 bpの遺伝子プローブを用いてL. nodorum cDNAライブラリーをスクリーニングすることによって単離した。この遺伝子の配列が得られ、コード配列を単離した。LnD9DS-2遺伝子の配列全体を、429 bpのEST配列を使用して公開されているブロード研究所のレプトスファエリア ノドルム(Leptosphaeria nodorum)のゲノム配列をまずBLAST検索することによって単離した。この検索では、Supercontig Ln 1.4を、429塩基対の断片に対して100%の相同性(homology)を有する遺伝子を含むものとして同定し、その遺伝子を「仮想タンパク質」をコードするものとして注釈した。次に、LnD9DS-2遺伝子を、Ln1.4 supercontig配列に基づいてPCRプライマーを用いてレプトスファエリア ノドルム(Leptosphaeria nodorum) cDNAライブラリーからクローニングした。使用したプライマー配列はLnd9FAD2F(配列番号:6および) Lnd9FAD2R(配列番号:7)であった。フォワードプライマーは、5' BamHI部位に設計されており、リバープライマーは、3つのリーディングフレームと末端のNcoI部位に停止コドンを含んでいた。

【0125】

レプトスファエリア ノドルム(Leptosphaeria nodorum) cDNAライブラリーのアリコートPCR反応のための鋳型DNA 400 ngを提供するために、1/10に希釈した。PCR増幅は、タカラEZのTaq(商標)PCRキットを用いて、94℃で1分間の後、94℃で30秒間、60℃で60秒間、および72℃で90秒間の伸長の30サイクルの推奨される増幅条件で行った。最後の伸長ステップを72℃で10分間行なった。予想された1370塩基対の産物をアガロースゲルから切り出し、メーカーの推奨に従ってモンタージュスピンカラムを用いて精製した。精製断片をpCR(登録商標)2.1 TOP0(登録商標)クローニングベクターにクローニングした。ライゲーション反応は、製造業者の推奨プロトコルに従って化学的にコンピテントであるトッブ10大腸菌細胞に形質転換した。推定クローンを含むコロニーを単離した。プラスミドミニプレップをマシュレ-ナーゲルNucleospinカラムで行い(preformed)、DNAをBamHI及びNcoI制限酵素で消化した。推定LnD9DS-2クローンを同定し、配列決定した。

【0126】

配列決定の際、LnD9DS-2(配列番号:8)のクローンを「仮想タンパク質」配列と比較することによって確認した。LnD9DS-2の配列における保存的な変化が確認された。コドンTGC(システイン)は、塩基位置271におけるチミジンへのアデニンの置換によってAGC(セリン)に変更され、そのコドンは公開されている配列のアミノ酸89に翻訳された。これは保存的な変更であり、システインは複数の糸状菌の間で高度に保存されたアミノ酸であることが判明しなかったため、補正は試行されなかった。

【0127】

それぞれ配列番号:5および8のLnD9DS-1およびLnD9DS-2遺伝子を、酵母発現ベクターにクローニングした。LnD9DS-1またはLnD9DS-2コード配列のいずれかを含むクローンを制限酵素分析およびDNA配列決定によって確認した。

【0128】

Tween(登録商標)80を含まないYPD培地上に維持されたデルタ-9デサチュラーゼ欠損S. cerevisiae株(OFY093)を、Qbiogeneからのアルカリカチオン酵母形質転換キットを用いて形質転換した。補完株はTween(登録商標)80(一価不飽和脂肪酸補充剤)またはウラシル(DOBA SC-URA)を含んでいなかった培地での増殖により同定された。補完株を選択培地上で3回単一コロニー精製した。補完株はさらにデルタ-9デサチュラーゼ遺伝子のPCR増幅およびPCR産物の塩基配列決定により確認した。また、LnD9DS-2クローンを含む菌株を、YPD +Tween(登録商標)80培地上の各菌株を少なくとも3回継代し、その後、Tween(登録商標)80を含まないDOBA SC-URA培地へパッチングすることによって、脂肪酸およびウラシル依存に戻した。LnD9DS-1またはLnD9DS-2コード配列のいずれかを含む酵母株

の基質特異性は、さらにFAME分析によって特徴付けられた。

【0129】

HxD9DS遺伝子でのデルタ-9デサチュラーゼ欠損*S.cerevisiae*のクローニングとその形質転換

オオタバコガトウモロコシアシルCoAデルタ-9デサチュラーゼ (HxD9DS) (Rosenfield et al. (2001) *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31(10):949-64においてHxPGDS2として識別されている) をコードする植物に最適化された合成遺伝子をDASPIC089 (後述) からBamHI/XhoI断片上に切り出し、モンタージュスピнкаラムを用いてゲル精製した。この断片を、前述した酵母発現ベクターの対応する制限酵素部位にライゲーションし、大腸菌株DH5aへ標準的な分子生物学技術とサプライヤーのプロトコル (インビトロジェン、Carlsbad、CA) を用いて形質転換した。

10

【0130】

制限分析及びDNA配列決定に続いて、HxD9DS遺伝子を含むクローンを、デルタ-9デサチュラーゼ欠損*S.cerevisiae*株OFY093への形質転換のために選択した。Tween (登録商標) 80を含むYPD培地上で維持されたOFY093株を、Qbiogeneからのアルカリカチオン酵母形質転換キットを用いて形質転換した。補完株はトゥイーンを (登録商標) 80 (脂肪酸補充剤) およびウラシル (DOBA SC-URA) が含まれていなかった培地での増殖により同定した。推定補完株を選択培地上で3回単一コロニー精製した。補完菌株を以下によってさらに確認した: i) Qbiogene酵母プラスミド精製キットを用いたプラスミドDNAの抽出に続いて、HxD9DS遺伝子特異的プライマーを用いたPCR増幅; ii) HxD9DS遺伝子特異的PCR産物の配列決定、およびiii) の復帰: YPD +のTween (登録商標) 80培地での少なくとも3回の継代の後、Tween (登録商標) 80培地マイナスのDOBA SC-URAへのパッチングによる脂肪酸およびURA-3依存性への戻し。1つの確認された補完HxD9DS酵母株の基質特異性が、さらにFAMEの分析によって特徴付けられた。

20

【0131】

OLE1欠損酵母株で発現されたLnD9DS-1、LnD9DS-2、MgD9DS、およびHxD9DSの分析

上記のように、3つの例示的なアシルCoAデルタ-9デサチュラーゼ (D9DS) 遺伝子は、植物病原性真菌、イネいもち病菌 (MgD9DS)、およびレプトスファエリア ノドルム (*Leptosphaeria nodorum*) (LnD9DS-1とLnD9DS-2) からクローニングされた。これらの遺伝子およびそのコードされたタンパク質は、これまでに特徴付けされていない。アシルCoAデルタ-9デサチュラーゼは、コエンザイムAの飽和14-、16-、および18-炭素脂肪酸アシルチオエステルの炭素原子9と10の間のシス二重結合の形成を触媒し、その結果、それぞれミリストレイン酸 (14:1)、パルミトレイン酸 (16:1)、またはオレイン酸 (18:1) を産生する。生物特異的な生物学に関連した影響は、同じ生物学的コンテキスト内で異なる真菌アシルCoAデルタ-9デサチュラーゼ遺伝子を発現することによって解消される。それ故に、真菌アシルCoAデルタ-9デサチュラーゼ遺伝子の発現が、パルミトイル-ステアロイルCoAデサチュラーゼ (OLE1) 欠損OFY093酵母菌株内の内在ole1遺伝子プロモーターを用いて駆動された。したがって、このシステムにおける脂肪酸基質特異性に観察された相違は、特定の真菌デルタ-9補完*S. cerevisiae*株で発現デサチュラーゼに起因するものである。

30

【0132】

補完OFY093系統で発現されたMgD9DS、LnD9DS-1、およびLnD9DS-2のCoAデサチュラーゼの基質特異性を特徴付けし、WO/1999/050430に記載されるAnD9DS (sdeA) で補完されたOFY093と比較した。AnD9DS遺伝子 (その発現がOLE1遺伝子プロモーターによって駆動される) を含む酵母発現構築物を、*S. cerevisiae* OFY093株に形質転換し、上記のプロトコルを用いて発現させた。

40

【0133】

補完*S. cerevisiae*株は、24時間30 で脂肪酸の補充のない最少培地で増殖させた。定量的FAMEの分析をた洗淨し凍結乾燥した細胞ペレット上で行った。この分析の結果を表1に示す。LnD9DS-2は、C14:1とC16:1の形成を促進するのに対し、LnD9DS-1およびMgD9DSは、酵母脂肪酸組成分析におけるC16:1/18:1の脂肪酸の比率によって示されるように、

50

C18 : 1に対する優先性を有する。

【表 1】

表 1 : 4 つの異なる真菌デサチュラーゼを発現している OLE1 欠損酵母の脂肪酸組成の比較

デサチュラーゼ	C14 : 0	C14 : 1	C16 : 0	C16 : 1	C18 : 0	C18 : 1	C16 : 1/ 16:0	C18 : 1/ 18 : 0	C16 : 1/ 18:1
LnD9DS-1	1.5	0.0	36.5	8.7	1.8	51.5	0.2	28.2	0.17
LnD9DS-2	1.0	0.1	26.6	38.1	6.3	27.9	1.4	4.4	1.37
AnD9DS	0.5	0.0	26.3	7.8	2.0	63.4	0.3	31.7	0.12
MgD9DS	0.5	0.0	22.7	9.1	1.8	65.9	0.4	37.0	0.14
野生型酵母	0.6	0.0	9.6	38.6	6.9	44.3			
OLE1-ヌル +Tween (登録商標) 80	2.6	0.4	38.0	10.9	7.8	40.4			
空のベクター +Tween (登録商標) 80	2.2	0.3	40.3	8.7	8.7	39.8			

10

【 0 1 3 4 】

新規なデサチュラーゼを、さらに同じ組換え発現環境に移した天然の*S. セレビシエ*ステアロイル-CoAデルタ-9デサチュラーゼ (OLE1) と比較した。WO/2000/011012に記載された*S. cerevisiae*からヌクレオチド配列を含有する酵母発現ベクターを構築した。天然の*S. セレビシエ*ステアロイル-CoAデルタ-9デサチュラーゼを含む酵母発現構築物を、上記の

20

プロトコルを用いて、*S. セレビシエ* OFY093株に形質転換し、発現させた。昆虫種からの別の非真菌アシルCoAデルタ-9デサチュラーゼである、オオタバコガゼア (HzD9DS) も、これらの実験で評価した。

【 0 1 3 5 】

MgD9DS、LnD9DS-2、およびHzD9DS遺伝子の1つを含む補完*S. セレビシエ*株は、ドロップアウトプロスSC-URAで増殖させた。コントロール菌株、pDAB467EV-1 (前述の酵母の形質転換方法論によってOFY093に形質転換したpDAB467B/N) を、DOB SC-URA +Tween (登録商標) 80で増殖させ、親デルタ-9デサチュラーゼ欠損*S. cerevisiae*株である、OFY093を、DOB SCAA +Tween (登録商標) 80で増殖させた。培養物に1.5%寒天を含む同じ培地の新鮮な画線 (streak) プレートからの細胞のループを播種した。菌株を24時間30 で増殖させた。培養物を10分間6,000 rpmで遠心した。ペレットを、水で洗浄し、10分間6,000 rpmで再び遠心分離し、その後FAMEの分析を行うまで、-20 で凍結した。発現培養物の3つのセットを分析した。

30

【 0 1 3 6 】

凍結乾燥酵母ペレットを10% (w/v) のNaOHを含むメタノールで鹸化した。非けん化性の脂質汚染物質 (ステロール) をヘキサンで除去した。メタノール画分を、H₂SO₄の添加により酸性化し、プロトン化された脂肪酸をヘキサンで抽出した。単離したヘキサン画分を乾燥し、脂肪酸を30分間80 で0.5 N MeOHClでメチル化した。生じたFAMEを、内部標準としてウンデカン酸メチルエステルを含むヘキサンで抽出した。FAME抽出物を、SGE (オースティン、テキサス州) からのキャピラリーカラムBPX 70 (15m x 0.25 x 0.25mm) を搭載したHP6890ガスクロマトグラフFlameイオン化検出器 (サンタクララ、カリフォルニア州) を用いて分析した。FAMEを、キャリアガスとしてヘリウムを使用して温度勾配で分離した。各FAME種は、保持時間によって識別され、校正標準として、Matreya, LLC (プレザントギャップ、ペンシルバニア州) からのFAME菜種油基準ミックスを注入することにより定量した。

40

【 0 1 3 7 】

表2は、様々な例示的なアシルCo-Aデルタ-9デサチュラーゼを発現するole1欠損OFY093酵母細胞の脂肪酸組成 (%FAMEとして) を示す。全ての株は良く育ち、外因的MUFAs (一価不飽和脂肪酸) についての要件なしに導入デサチュラーゼによって完全補完された。

50

【表 2】

表 2：アシル CoA デルタ-9 デサチュラーゼを発現する ole1 欠損酵母菌株 OFY093 の脂肪酸組成（%合計 FAME として）。（標準偏差はかっこで囲まれている）。

デサチュラーゼ	n	C14 : 0	C14 : 1	C16 : 0	C16 : 1	C18 : 0	C18 : 1
LnD9DS-2	7	1.4 (0.7)	1.4 (1.0)	26.6 (4.5)	38.8 (2.8)	6.0 (1.3)	25.4 (4.4)
HxD9DS	6	2.6 (1.3)	0.9 (0.5)	34.7 (6.8)	37.5 (4.2)	6.0 (1.1)	18.4 (4.1)
ole1	6	1.1 (0.4)	0.6 (0.4)	14.4 (2.6)	49.2 (1.6)	5.6 (1.1)	24.0 (1.1)
AnD9DS	8	0.5 (0.3)	0.2 (0.2)	23.5 (2.2)	9.3 (3.0)	2.1 (0.5)	64.6 (3.2)
MgD9DS	2	0.9 (0.0)	0.1 (0.0)	21.2 (0.2)	12.1 (0.1)	1.6 (0.1)	64.2 (0.3)

10

【0138】

これらのデータは、補完酵母株の脂肪酸組成が導入した遺伝子に応じて変化することを示す。LnD9DS-2はHxD9DSおよび ole1と同様C16 : 1を比較的多量生成するのに対して、AnD9DSおよびMgD9DSはC18 : 1の比較的高い量を生成する。

【0139】

鎖長に基づく変換の差分レベルは、C14、C16、またはC18の各脂肪酸の鎖長についての総脂肪酸に対するMUFAの割合を計算することによってさらに示すことができる。これらのデータは、LnD9DS-2およびHxD9DS についてのC16 : 1への、ならびにAnD9DSおよびMgD9DS についてのC18 : 1への比較的高い変換率を示す。

20

【0140】

表3. 下の4つの行が追加されたターゲットール、不飽和脂肪酸、またはTween（登録商標）を補完したコントロールサンプルを表している。 JMP統計ソフトウェアスイート（SASインスティテュート社、ケアリー、ノースカロライナ州）で行われたデュキー・クレマーテスト（Tukey-Kramer Test）を介して決定されたように、異なる文字を含むサンプルは、大きく異なっている。

【表 3】

表 3：各鎖長（ $C_{xx} : 1 / (C_{xx} : 0 + C_{xx} : 1)$ ）についての総脂肪酸の MUFA の割合

デサチュラーゼ	C14	C16*	C18
LnD9DS-2	0.49	0.60 (b)	0.81 (b)
HxD9DS	0.30	0.52 (b)	0.75 (c)
ole1	0.34	0.79 (a)	0.81 (b)
AnD9DS	0.25	0.28 (c)	0.97 (a)
MgD9DS	0.07	0.36 (c)	0.98 (a)
なし+ターゲットール	0.06	0	0
なし+ターゲットール+リシノール	0.07	0	0.01
なし+ターゲットール+リノール	0	0	0.04
なし+トウイン	0.65	0.23	0.87

* C16 MUFA は、パルミトレイン酸の伸長（C16 : 1 Δ9）に由来するものであるから、cis-バクセン酸（C18 : 1 Δ11）を含む。

30

40

【0141】

真菌のアシル-CoAデサチュラーゼの系統発生

複数の真菌アシルCoAデルタ-9デサチュラーゼのアミノ酸配列の系統解析は、LnD9DS-2が18:0-優先性デルタ-9デサチュラーゼと異なっていることを示唆している。従って、本

50

発明者らは、18：0-優先性デルタ-9デサチュラーゼまたはLnD9DS-2と密接に関連付けられた他の真菌デルタ-9デサチュラーゼの特徴付けにより、種々の18:0または16:0活性を有するデサチュラーゼを同定し得るという仮説を立てた。本発明者らの仮説は、より密接にLnD9DS-2に関連付けられている真菌デルタ-9デサチュラーゼは、16：0活性を増加しているだろうと予測している。

【0142】

公的なDNA配列データベース（ブロード研究所、NCBIなど）の検索では、イネいもち病菌またはレプトスファエリア ノドルム（*Leptosphaeria nodorum*）でデルタ-9デサチュラーゼとして特に注釈を付けられたいかなる遺伝子配列も同定しなかった。本開示の範囲内で同定されたブロード研究所配列のアミノ酸配列のピーファム（Pfam）分析は、これらのタンパク質が、他の真菌アシルCoAデルタ-9デサチュラーゼでも見出されるシトクロムB5およびデサチュラーゼモチーフを含むことを示す。しかし、それらのタンパク質は、これまでにアシルCoAデルタ-9デサチュラーゼとして同定されていない。本発明者らは、酵母における相補性、反転の研究（reversal studies）、DNA配列分析により、これらのタンパク質のこの機能を実証した。

【0143】

いくつかの真菌デサチュラーゼ遺伝子配列の関係は、MEGAソフトウェアパッケージを介して近隣結合法を用いて系統的に解析した。Tamura et al. (2007) Mol. Biol. and Evolution 24:1596-9。図1は、真菌デサチュラーゼ配列のこの系統解析を示す。これらの配列は、AnD9DS（sdeA）アミノ酸配列を用いたNCBIの配列データベースのBLASTN検索によって回収した。LnD9DS-1およびMgD9DSは、LnD9DS-2に比べて、互いにより高いレベルの配列同一性を共有している。さらに、LnD9DS-1、LnD9DS-2、MgD9DSのClustalWのアライメントは、LnD9DS-1およびMgD9DSからのLnD9DS-2の分岐（divergence）を示す。図2。LnD9DS-1およびMgD9DSの塩基配列は、より高い数の共通の塩基対を共有する。

【0144】

表4および図3はさらに、新たに同定されたタンパク質である、LnD9DS-1、LnD9DS-2、およびMgD9DS、ならびにAnD9DSおよび酵母デサチュラーゼ、ScOLE1の系統関係を示す。LnD9DS-1、MgD9DS、およびAnD9DS（sdeA）のアミノ酸配列は、LnD9DS-2に比べてお互いに大きな割合の同一性を共有している。アミノ酸同一性の保存は、本発明者らが18:0アシルCoAに対する基質特異性は、LnD9DS-1、MgD9DS、およびAnD9DS（sdeA）間で共有され保存された配列に依存していることを予測することを可能にする。比較では、LnD9DS-2のアシル-CoA基質特異性は、その分岐した（divergent）アミノ酸配列の結果として、16:0に対して優先性である。

【表4】

表4：ClustalWを用いてアラインメントした種々の真菌デサチュラーゼ配列のアミノ酸同一性

	LnD9DS-1	LnD9DS-2	MgD9DS	酵母 OLE1
AnD9DS (sdeA)	81%	61%	75%	49%
LnD9DS-1	--	61%	75%	47%
LnD9DS-2	61%	--	62%	49%
MgD9DS	75%	62%	--	49%

【0145】

実施例2：イネいもち病菌、オオタバコガトウモロコシ、およびレプトスファエリア ノドルム（*Leptosphaeria nodorum*）からの最適化されたデルタ-9デサチュラーゼ遺伝子の設計および合成

キャノーラにおける真菌デルタ-9デサチュラーゼ遺伝子の高い発現を得るためには、それらがより効率的に異種遺伝子を含むトランスジェニックキャノーラ細胞で発現されるように、これらの遺伝子を設計した。配列番号：9、配列番号：10および配列番号：11とし

てそれぞれ本明細書に開示される、天然のいもち (*Magnaporthe grisea*)、オオタバコガトウモロコシ、およびレプトスファエリア ノドルム (*Leptosphaeria nodorum*) デルタ-9 デサチュラーゼコード領域のDNA配列の広範な分析により、最適な植物発現、ならびにそのような最適な植物発現用の非最適コドン組成に対して有害であると考えられるいくつかの配列モチーフの存在が明らかになった。デルタ-9デサチュラーゼのタンパク質をコードする最適化された遺伝子を設計するために、本発明者らは、配列の変更が翻訳を妨げず、またはmRNAの不安定性を生じない、性質がより「植物のような」(具体的には、より「キャノーラ様の」) DNA配列を *in silico* で作成した。

【0146】

デルタ-9デサチュラーゼをコードする植物に最適化された遺伝子を設計するために、DNA配列を、特定の宿主植物(すなわち、キャノーラ)についてタンパク質コード配列からコンパイルされたコドンバイアステーブル(codon bias table)から確立された冗長な遺伝子コードを利用して、タンパク質デサチュラーゼのアミノ酸配列をコードするように設計した。キャノーラのための好ましいコドンの使用状況を表5に示す。セイヨウアブラナのコーディング領域に見られるように、表5の列CとGは、各アミノ酸の同義コドンの分布(そのアミノ酸の全てのコドンの使用に対する%)を示す。これは、いくつかのアミノ酸のためのいくつかの同義コドンが植物遺伝子(例えば、キャノーラでCGG)で稀にしか検出されなかったことは明らかである。それはいずれかの植物型の遺伝子に関連するアミノ酸をコードする時間の約10%以下で表される場合、コドンはめったに使用されないと考えられた(表5の列DとHの「DNU」で示す)。アミノ酸の残りのコドン選択の分布のバランスを取るために、各コドンの加重平均表現は次の式を用いて算出した:

$$C1 \text{の加重平均}\% = 1 / (\%C1 + \%C2 + \%C3 + \text{等}) \times \%C1 \times 100、$$

ここで、C1は、問題のコドンであり、%C2、%C3、等は、表5の残りの同義コドンのセイヨウアブラナについての%値の平均値を表している(関連コドンの平均%値が列CおよびGから取得される)。

【0147】

[0001]各コドンの加重平均%値は、表5の列DとHに与えられている。

【表 5】

表 5：(B. ナブス) 遺伝子キャノーラのコーディング領域における同義コドン表示（列 C および G）。植物に最適化された合成遺伝子の設計のためのバランスのとれたバイアスコドン表示セットの値は、列 D と H にある。

A	B	C	D	E	F	G	H
アミノ酸	コドン	キャノーラ%	加重平均	アミノ酸	コドン	キャノーラ%	加重平均
ALA(A)	GCA	23.3	23.3	LEU(L)	CTA	10.1	DNU
	GCC	21.2	21.2		CTC	22.8	28.5
	GCG	14.2	14.2		CTG	11.6	14.6
	GCT	41.3	41.3		CTT	25.2	31.6
ARG(R)	AGA	31.8	43.8		TTA	10.1	DNU
	AGG	22.1	30.5		TTG	20.2	25.3
	CGA	9.9	DNU	LYS(K)	AAA	44.6	44.6
	CGC	8.9	DNU		AAG	55.4	55.4
ASN(N)	CGG	8.6	DNU	MET(M)	ATG	100.0	100.0
	CGT	18.6	25.7	PHE(F)	TTC	58.6	58.6
	AAC	62.6	62.6		TTT	41.4	41.4
	AAT	37.4	37.4	PRO(P)	CCA	29.6	29.6
ASP(D)	GAC	42.5	42.5		CCC	14.6	14.6
	GAT	57.5	57.5		CCG	18.4	18.4
CYS(C)	TGC	49.2	49.2		CCT	37.3	37.3
	TGT	50.8	50.8	SER(S)	AGC	16.0	17.9
END	TAA	38.5	DNU		AGT	14.1	15.8
	TAG	22.1	DNU		TCA	18.2	20.4
	TGA	39.4	100.0		TCC	16.7	18.7
GLN(Q)	CAA	50.0	50.0		TCG	10.7	DNU
	CAG	50.0	50.0		TCT	24.3	27.2
GLU(E)	GAA	43.6	43.6	THR(T)	ACA	26.3	26.3
	GAG	56.4	56.4		ACC	26.9	26.9
GLY(G)	GGA	36.4	36.4		ACG	16.9	16.9
	GGC	16.2	16.2	TRP(W)	ACT	30.0	30.0
	GGG	15.2	15.2		TGG	100.0	100.0
HIS(H)	GGT	32.1	32.1	TYR(Y)	TAC	59.4	59.4
	CAC	49.6	49.6		TAT	40.6	40.6
	CAT	50.4	50.4	VAL(V)	GTA	10.8	DNU
ILE(I)	ATA	21.1	21.1		GTC	24.1	27.0
	ATC	42.7	42.7		GTG	28.3	31.7
	ATT	36.2	36.2		GTT	36.8	41.3

** NA =該当なし

*** DNU =使用しない

【 0 1 4 8 】

それぞれ配列番号：12、配列番号：13、および配列番号：14のイネいもち病菌（*Mangna porthe grisea*）、オオタバコガトウモロコシ（*Helicoverpa zea*）、及びレプトスファエリア ノドルム（*Leptosphaeria nodorum*）デルタ-9デサチュラーゼのアミノ酸配列を本質的にコードする新しいDNA配列が、キャノーラ遺伝子において見いだされた頻繁に使用されるコドンの第一及び第二の選択枝のコドン分布を用いて、キャノーラにおける最適発現のために設計された。新たなDNA配列は、タンパク質アミノ酸配列内各位置での適切なアミノ酸を指定するための、植物優先性（すなわち、第1優先、第2優先、第3優先、または第四優先）のコドンの置換によってデルタ-9デサチュラーゼのタンパク質をコードする天然のDNA配列とは異なる。

【 0 1 4 9 】

植物に最適化されたDNA配列の設計を、表5の列D およびHから構築したキャノーラコドンバイアステーブルを使用して、配列番号：12、配列番号：13、および配列番号：14のタンパク質配列の逆翻訳によって開始した。次いで、初期配列をコドン変化を補償する（全体の加重平均コドン表現を維持しながら）ことによって改変して、制限酵素認識部位を除去し、安定性の高い鎖内の二次構造を削除し、そして植物におけるクローニング操作または操作遺伝子の発現に有害かもしれない他の配列を除去した。次いで、DNA配列を、その改変によって作成されたかもしれない制限酵素認識部位のために再分析した。次いで、識

別された部位を、第一、第二、第三、または第四選択枝の好ましいコドンに、関連するコドン置換することによってさらに改変した。その改変された配列をさらに分析し、さらに、TAとCGダブルレットの頻度を低減するように、そしてTGとCTダブルレットの頻度を増加するように改変した。これらのダブルレットに加えて、約6を超える連続する[G+ C]または[A + T]の残基を有する配列を、他の好ましいコドンと第一または第二の選択枝等のコドン置換することによって改変した。めったに使われないコドンは、遺伝子設計においてかなりの程度に含めなかったし、コドン組成それ自体（例えば、制限酵素認識部位の追加または削除）とは異なる設計基準に対応するためにのみ必要に応じて使用した。このプロセスによって設計された代表的な合成キャノーラ最適化デサチュラーゼDNA配列を、配列番号：15、配列番号：16、および配列番号：17に記載した。

10

【0150】

配列番号：15-17で表される得られたDNA配列は、高度のコドン多様性および望ましい塩基組成を有する。さらに、これらの配列は、戦略的に配置された制限酵素認識部位を含み、および遺伝子の転写、または産物のmRNAの翻訳を妨害する可能性がある配列を含まない。表6-8は、天然の遺伝子、および植物に最適化されたバージョンに見出されるデルタ-9デサチュラーゼタンパク質のコード領域のコドン組成の比較を提示し、表5の列D及びHから計算された植物のために最適化された配列についての推奨コドン組成に対して両方を比較する。

【表6】

表6：MgD9DS タンパク質についてのコード領域のコドン組成。天然の M. grisa デサチュラーゼをコードする領域が、植物に最適化されたバージョンと比較される。

20

アミノ酸	コドン	ネイティブ遺伝子#	ネイティブ遺伝子%	Plnt Opt遺伝子#	Plnt Opt遺伝子%	Plnt Opt Recm'd	アミノ酸	コドン	ネイティブ遺伝子#	ネイティブ遺伝子%	Plnt Opt遺伝子#	Plnt Opt遺伝子%	Plnt Opt Recm'd
ALA(A)	GCA	4	10.5	10	26.3	23.3	LEU(L)	CTA	0	0.0	0	0.0	0.0
	GCG	18	47.4	8	21.1	21.2		CTC	11	28.9	11	28.9	28.5
	GCG	3	7.9	4	10.5	14.2		CTG	11	28.9	5	13.2	14.6
	GCT	13	34.2	16	42.1	41.3		CTT	12	31.6	12	31.6	31.6
ARG(R)	AGA	2	9.5	10	47.6	43.8	LYS(K)	TTA	0	0.0	0	0.0	0.0
	AGG	1	4.8	6	28.6	30.5		TTG	4	10.5	10	26.3	25.3
	CGA	2	9.5	0	0.0	0.0		AAA	1	3.4	13	44.8	44.6
	CGC	12	57.1	0	0.0	0.0	MET(M)	AAG	28	96.6	16	55.2	55.4
	CGG	0	0.0	0	0.0	0.0		ATG	7	100.0	7	100.0	100.0
	CGT	4	19.0	5	23.8	25.7	PHE(F)	TTC	17	89.5	11	57.9	58.6
ASN(N)	AAC	23	100.0	14	60.9	62.6		TTT	2	10.5	8	42.1	41.4
	AAT	0	0.0	9	39.1	37.4	PRO(P)	CCA	0	0.0	6	28.6	29.6
ASP(D)	QAC	17	68.0	11	44.0	42.5		CCC	9	42.9	3	14.3	14.6
	GAT	8	32.0	14	56.0	57.5		CCG	5	23.8	4	19.0	18.4
CYS(C)	TGC	2	66.7	1	33.3	49.2		CCT	7	33.3	8	38.1	37.3
	TGT	1	33.3	2	66.7	50.8	SER(S)	AGC	3	10.7	5	17.9	17.9
	TAA	0	0.0	0	0.0	0.0		AGT	0	0.0	4	14.3	15.8
	TAG	0	0.0	0	0.0	0.0		TCA	5	17.9	7	25.0	20.4
END	TGA	1	100.0	1	100.0	100.0		TCC	9	32.1	4	14.3	18.7
								TGG	9	32.1	0	0.0	0.0
GLN(Q)	CAA	2	9.5	11	52.4	50.0		TGT	2	7.1	8	28.6	27.2
	CAG	19	90.5	10	47.6	50.0	THR(T)	ACA	4	16.7	6	25.0	26.3
GLU(E)	GAA	1	6.7	7	46.7	43.6		ACC	15	62.5	7	29.2	26.9
	GAG	14	93.3	8	53.3	58.4		ACG	1	4.2	4	16.7	16.9
GLY(G)	GGA	8	19.5	15	36.6	38.4		AGT	4	16.7	7	29.2	30.0
	GGC	13	31.7	7	17.1	18.2	TRP(W)	TGG	21	100.0	21	100.0	100.0
	GGG	1	2.4	6	14.6	15.2		TAC	16	94.1	10	58.8	59.4
	GGT	19	46.3	13	31.7	32.1	TYR(Y)	TAT	1	5.9	7	41.2	40.6
HIS(H)	CAC	19	95.0	10	50.0	49.6		GTA	1	2.5	0	0.0	0.0
	CAT	1	5.0	10	50.0	50.4	VAL(V)	GTC	21	52.5	11	27.5	27.0
ILE(I)	ATA	1	4.2	5	20.8	21.1		GTG	4	10.0	13	32.5	31.7
	ATC	15	62.5	10	41.7	42.7		GTT	14	35.0	18	40.0	41.3
	ATT	8	33.3	9	37.5	38.2							
合計		232		232			合計		244		244		

30

【表 7】

表 7: HxD9DS タンパク質についてのコード領域のコドン組成。天然の H. ゼアデサチュラーゼをコードする領域が、植物に最適化されたバージョンと比較される。

アミノ酸	コドン	ネイティブ 遺伝子 #	ネイティブ 遺伝子 %	Plnt Opt 遺伝子 #	Plnt Opt 遺伝子 %	Plnt Opt Recm'd	アミノ酸	コドン	ネイティブ 遺伝子 #	ネイティブ 遺伝子 %	Plnt Opt 遺伝子 #	Plnt Opt 遺伝子 %	Plnt Opt Recm'd
ALA(A)	GGA	4	11.4	9	25.7	23.3	LEU(L)	CTA	2	5.9	0	0.0	0.0
	GCC	7	20.0	7	20.0	21.2		CTG	8	23.5	10	29.4	28.5
	GTG	8	22.9	4	11.4	14.2		GCG	14	41.2	6	17.6	14.6
	GCT	16	45.7	15	42.9	41.3		CTT	6	17.6	10	29.4	31.6
ARG(R)	AGA	1	7.7	6	46.2	43.8	LYS(K)	TTA	2	5.9	0	0.0	0.0
	AGG	5	38.5	4	30.8	30.5		TTG	2	5.9	8	23.5	25.3
	CGA	2	15.4	0	0.0	0.0		AAA	11	44.0	10	40.0	44.6
	CGC	5	38.5	0	0.0	0.0		AAG	14	56.0	15	60.0	55.4
ASN(N)	CGG	0	0.0	0	0.0	0.0	MET(M)	ATG	8	100.0	8	100.0	100.0
	CCT	0	0.0	3	23.1	25.7		TTC	20	83.3	14	58.3	58.6
	AAC	13	72.2	11	61.1	62.6		TTT	4	16.7	10	41.7	41.4
	AAT	5	27.8	7	38.9	37.4		CCA	1	6.3	5	31.3	29.6
ASP(D)	GAC	16	64.0	12	48.0	42.5	PRO(P)	CCG	5	31.3	3	18.8	14.6
	GAT	9	36.0	13	52.0	57.5		CCG	2	12.5	2	12.5	18.4
CYS(C)	TGC	1	100.0	0	0.0	49.2		CCT	8	50.0	6	37.5	37.3
	TGT	0	0.0	1	100.0	50.8		AGC	2	12.5	3	18.8	17.9
END	TAA	1	100.0	0	0.0	0.0	SER(S)	AGT	1	6.3	3	18.8	15.8
	TAG	0	0.0	0	0.0	0.0		TCA	1	6.3	3	18.8	20.4
	TGA	0	0.0	1	100.0	100.0		TCC	6	37.5	3	18.8	18.7
								TCG	3	18.8	0	0.0	0.0
GLN(Q)	CAA	2	33.3	3	50.0	50.0	THR(T)	TCT	3	18.8	4	25.0	27.2
	CAG	4	66.7	3	50.0	50.0		ACA	3	16.7	5	27.8	26.3
GLU(E)	GAA	7	63.6	5	45.5	43.6		ACC	7	38.9	5	27.8	26.9
	GAG	4	36.4	6	54.5	56.4		ACG	4	22.2	3	16.7	16.9
GLY(G)	GGA	8	40.0	9	45.0	36.4	TRP(W)	ACT	4	22.2	5	27.8	30.0
	GGC	6	30.0	4	20.0	16.2		TGG	14	100.0	14	100.0	100.0
	GGG	2	10.0	3	15.0	15.2		TAC	12	80.0	9	60.0	59.4
	GGT	4	20.0	4	20.0	32.1		TAT	3	20.0	6	40.0	40.6
HIS(H)	CAC	11	73.3	8	53.3	49.6	VAL(V)	GTA	0	0.0	0	0.0	0.0
	GAT	4	26.7	7	46.7	50.4		GTC	5	26.3	5	26.3	27.0
ILE(I)	ATA	3	15.0	4	20.0	21.1		GTG	13	68.4	6	31.6	31.7
	ATC	10	50.0	9	45.0	42.7		GTT	1	5.3	8	42.1	41.3
	ATT	7	35.0	7	35.0	36.2							
合計		165		165			合計		189		189		

【表 8】

表 8: LxD9DS-2 タンパク質のコード領域のコドン組成。天然の L. nodorum デサチュラーゼをコードする領域が、植物に最適化されたバージョンと比較される。

アミノ酸	コドン	ネイティブ 遺伝子 #	ネイティブ 遺伝子 %	Plnt Opt 遺伝子 #	Plnt Opt 遺伝子 %	Plnt Opt Recm'd	アミノ酸	コドン	ネイティブ 遺伝子 #	ネイティブ 遺伝子 %	Plnt Opt 遺伝子 #	Plnt Opt 遺伝子 %	Plnt Opt Recm'd
ALA(A)	GGA	3	9.4	7	21.9	23.3	LEU(L)	CTA	7	15.6	0	0.0	0.0
	GCC	9	28.1	7	21.9	21.2		CTG	14	31.1	13	28.9	28.5
	GCG	12	37.5	5	15.6	14.2		CTG	7	15.6	7	15.6	14.6
	GCT	8	25.0	13	40.6	41.3		CTT	5	11.1	14	31.1	31.6
ARG(R)	AGA	4	13.8	13	44.8	43.8	LYS(K)	TTA	3	6.7	0	0.0	0.0
	AGG	3	10.3	9	31.0	30.5		TTG	9	20.0	11	24.4	25.3
	CGA	7	24.1	0	0.0	0.0		AAA	9	45.0	9	45.0	44.6
	CGC	8	27.8	0	0.0	0.0		AAG	11	55.0	11	55.0	55.4
ASN(N)	CGG	5	17.2	0	0.0	0.0	MET(M)	ATG	9	100.0	9	100.0	100.0
	CCT	2	6.9	7	24.1	25.7		TTC	16	80.0	12	60.0	58.6
	AAC	8	50.0	8	66.7	62.6		TTT	4	20.0	8	40.0	41.4
	AAT	6	50.0	4	33.3	37.4		CCA	3	16.7	5	27.8	29.6
ASP(D)	GAC	16	66.7	10	41.7	42.5	PRO(P)	CCG	8	44.4	3	16.7	14.6
	GAT	8	33.3	14	58.3	57.5		CCG	2	11.1	3	16.7	18.4
CYS(C)	TGC	4	80.0	2	40.0	49.2		CCT	5	27.8	7	38.9	37.3
	TGT	1	20.0	3	60.0	50.8		AGC	8	27.8	5	17.2	17.9
END	TAA	0	0.0	0	0.0	0.0	SER(S)	AGT	6	20.7	5	17.2	15.8
	TAG	1	100.0	0	0.0	0.0		TCA	1	3.4	6	20.7	20.4
	TGA	0	0.0	1	100.0	100.0		TCC	6	20.7	5	17.2	18.7
								TCG	7	24.1	0	0.0	0.0
GLN(Q)	CAA	10	55.6	10	55.6	50.0	THR(T)	TCT	1	3.4	8	27.8	27.2
	CAG	8	44.4	8	44.4	50.0		ACA	11	44.0	7	28.0	26.3
GLU(E)	GAA	5	33.3	7	46.7	43.6		ACC	5	20.0	7	28.0	26.9
	GAG	10	66.7	8	53.3	56.4		ACG	7	28.0	4	16.0	16.9
GLY(G)	GGA	13	34.2	14	36.8	36.4	TRP(W)	ACT	2	8.0	7	28.0	30.0
	GGC	10	42.1	6	15.8	16.2		TGG	19	100.0	19	100.0	100.0
	GGG	6	15.8	6	15.8	15.2		TAC	11	64.7	10	58.8	59.4
	GGT	3	7.9	12	31.6	32.1		TAT	6	35.3	7	41.2	40.6
HIS(H)	CAC	12	66.7	9	50.0	49.6	VAL(V)	GTA	6	17.8	0	0.0	0.0
	GAT	8	33.3	9	50.0	50.4		GTC	10	29.4	9	26.5	27.0
ILE(I)	ATA	4	18.2	5	22.7	21.1		GTG	12	35.3	11	32.4	31.7
	ATC	9	40.9	10	45.5	42.7		GTT	6	17.8	14	41.2	41.3
	ATT	9	40.9	7	31.8	36.2							
合計		214		214			合計		236		236		

【 0 1 5 1 】

配列番号 : 15、配列番号 : 16、および配列番号 : 17を含むDNA断片の合成は、商業的な供給業者 (PicoScript、ヒューストン、TX、およびブルーヘロンバイオテクノロジー、Bo thell、ワシントン州) によって行われた。これらのキャノラに最適化された配列は、バージョン2 (v2) として分類された。次いで、下記の実施例に記載のように、合成DNA断片を発現ベクターにクローニングし、アグロバクテリウムおよびキャノラに形質転換した。

【 0 1 5 2 】

実施例3: プラスミドの構築

10

20

30

40

50

以下のプラスミドは、標準的な分子生物学的技術を用いて構築した。植物の転写単位（目的の遺伝子に連結されたプロモーターから構成され、3'UTRによって終了する）または「PTU」を含むポリヌクレオチド断片を構築し、バイナリーベクターのT-ストランド領域内で、付加的な植物の転写ユニットと組み合わせた。

【 0 1 5 3 】

pDAB7318の説明：pDAB7318（図6、配列番号：58）を、標準的な分子生物学的技術を用いて構築した。このプラスミドは2つのデサチュラーゼPTUの配列を含んでいる。第1のデサチュラーゼPTUは、インゲンマメのゼオリンプロモーター（PvPhasプロモーターv2（配列番号67）Genbank：J01263）、インゲンマメの5'非翻訳領域（PvPhasの5'UTR（配列番号：68）；Genbank登録：J01263）、AnD9DS v3の遺伝子（配列番号：49）、インゲンマメの3'非翻訳領域（PvPhasの3'UTR V1（配列番号：69）；Genbank登録：J01263）、およびインゲンマメのマトリックス結合領域（PvPhas 3' MAR V2（配列番号：70）、Genbank登録：J01263）の（配列）を含む。第2のデサチュラーゼPTUは、PvPhasプロモーターV2、PvPhas 5' UTR、LnD9DS-2 V2（配列番号：17）、およびアグロバクテリウムツメファシエンスORF23 3'非翻訳領域（AtuORF23 3'UTR（配列番号：71）；Huang et al. (1990) J. Bacteriol. 172:1814-22)を含む。

【 0 1 5 4 】

デサチュラーゼPTUs内のエレメントは、追加の短い介在配列によって接続されている。2つのデサチュラーゼPTU配列は、アグロバクテリウム形質転換プラスミドへのこれらPTUの発現カセットの転移を容易にするために使用されるInvitrogen社のGateway（登録商標）組換え部位に隣接している。さらに、そのプラスミドは、複製起点、およびカナマイシン選択マーカールを含む。

【 0 1 5 5 】

pDAB7319の説明：pDAB7319（図7、配列番号：60）を、pDAB7318とpDAB7309との間のGateway（登録商標）組換えを介して構築した（図5；配列番号：53）。このプラスミドは、前述の「pDAB7318の説明」に記載した2つのデサチュラーゼPTUの配列を含む。これらPTUsは、植物形質転換バイナリーベクターpDAB7309のT-鎖DNAボーダー領域内の頭部から尾部の向き（Head-to-tail orientation）を向いていた。このバイナリーベクターは、キャッサバ葉脈モザイクウイルスプロモーター（CsVMVプロモーターv2；Verdaguer et al. (1996) Plant Mol. Biol. 31:1129-39）、ホスアセチルトランスフェラーゼ（PAT V5；Wohlleben et al. (1988) Gene 70:25-37）、およびアグロバクテリウムツメファシエンスORF1 3'非翻訳領域（3'UTR V4 AtuORF1；Huang et al. (1990), 前出）で構成されるホスアセチルトランスフェラーゼPTUを、タバコRB7マトリックス結合領域（RB7 MARv2；Genbank：U67919）、オーバードライブ（Toro et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85(22):8558-62）、およびT-ストランド境界配列（T-DNAのボーダーおよびT-DNAボーダーB；Gardner et al. (1986) Science231:725-7, および PCT International Patent Publication No. WO2001/025459A1）のような他の調節エレメントに加えて含んでいる。上記のPTUsを含むプラスミドを単離し、制限酵素消化およびDNA配列決定によって確認した。

【 0 1 5 6 】

pDAB7320の説明：pDAB7320（図8、配列番号：55）を、標準的な分子生物学的技術を用いて構築した。このプラスミドは、1つのデサチュラーゼPTUの配列を含む。デサチュラーゼPTUは、PvPhasプロモーターV2、PvPhas 5' UTR、LnD9DS-2 V2（配列番号：17）、およびAtuORF23 3' UTRを含む。デサチュラーゼPTUs内のエレメントは、追加の短い介在配列によって接続されている。デサチュラーゼPTUの配列も、アグロバクテリウム形質転換プラスミドへの転移を容易にするためにインビトロジェン社のGateway（登録商標）組換え部位に隣接している。さらに、そのプラスミドは複製起点およびカナマイシン選択マーカールを含む。

【 0 1 5 7 】

pDAB7321の説明：pDAB7321（図9、配列番号：61）をpDAB7320とpDAB7309との間のGateway（登録商標）組換えを介して構築した。このプラスミドは、前述の「pDAB7319の説明」

に記載したデサチュラーゼPTUの配列を含む。このPTUは、植物形質転換バイナリーベクターpDAB7309のT-鎖DNAボーダー領域内で頭部から尾部への向き (head-to-tail orientation) を向いていた。このバイナリーベクターは、ホスアセチルトランスフェラーゼPTU: CsVMVプロモーターV2; PAT V5; およびAtuORF1 3'UTR v4、さらに、オーバードライブおよびT-ストランド境界配列 (T-DNAのボーダーAおよびT-DNAボーダーB) のような他の調節エレメントを含む。上記のPTUを含むプラスミドを単離し、制限酵素消化およびDNA配列決定によって確認した。

【0158】

pDAB7323の説明: pDAB7323 (図10、配列番号: 56) を、標準的な分子生物学的技術を用いて構築した。このプラスミドは2つのデサチュラーゼPTUの配列を含んでいる。第1のデサチュラーゼPTUは、PvPhasプロモーターV2、PvPhas 5'UTR、AnD9DS V3 (配列番号: 47)、PvPhas 3'UTR、およびPvPhas 3'MAR V2を含む。第2のデサチュラーゼPTUは、PvPhasプロモーターV2、PvPhas 5'UTR、HzD9DS V2 (配列番号: 16)、およびAtuORF23 3'UTRを含む。デサチュラーゼPTUs内のエレメントは、追加の短い介在配列によって接続されている。2つのデサチュラーゼPTUの配列は、プラスミドアグロバクテリウム形質転換への転移を促進するために、Invitrogen社のGateway (登録商標) 組換え部位が隣接している。さらに、プラスミドは複製起点およびカナマイシン選択マーカーを含んでいる。

10

【0159】

pDAB7324の説明: pDAB7324 (図11、配列番号: 62) を、pDAB7323とpDAB7309との間のGateway (登録商標) 組換えを介して構築した。このプラスミドは、前述の「pDAB7323の説明」に記載した2つのデサチュラーゼPTU配列を含む。これらPTUsは、植物形質転換バイナリーベクターpDAB7309のT-鎖DNAボーダー領域内で頭部から尾部の向きを向いていた。このバイナリーベクターは、ホスアセチルトランスフェラーゼPTU: CsVMVプロモーターv2; PAT V5; およびAtuORF1 3'UTR v4、さらに、オーバードライブおよびT-スタンダーボーダー配列 (T-DNAボーダーAおよびT-DNAボーダーB) のような他の調節エレメントを含んでいる。上記のPTUsを含むプラスミドを単離し、制限酵素消化およびDNA配列決定によって確認した。

20

【0160】

pDAB7325の説明: pDAB7325 (図12、配列番号: 57) を、標準的な分子生物学的技術を用いて構築した。このプラスミドは、1つのデサチュラーゼPTUの配列を含む。このデサチュラーゼPTUは、PvPhasプロモーターV2、PvPhas 5'UTR、HzD9DS V2 (配列番号: 16)、およびAtuORF23 3'UTRを含む。デサチュラーゼPTU内のエレメントは、追加の短い介在配列によって接続され、デサチュラーゼPTUの配列は、アグロバクテリウム形質転換プラスミドへの転移を容易にするために、Invitrogen社のGateway (登録商標) 組換え部位に隣接している。さらに、プラスミドは複製起点およびカナマイシン選択マーカーを含んでいる。

30

【0161】

pDAB7326の説明: pDAB7326 (図13、配列番号: 63) を、pDAB7325とpDAB7309との間のGateway (登録商標) 組換えを介して構築した。このプラスミドは、前項「pDAB7325の説明」に定めるデサチュラーゼPTUの配列を含む。PTUは、植物形質転換のバイナリーベクターpDAB7309のT-鎖DNAボーダー領域内で頭部から尾部への向き (head-to-tail orientation) を向いていた。このバイナリーベクターにはホスアセチルトランスフェラーゼPTU; CsVMVプロモーターv2; PAT V5、およびAtuORF1 3'UTR v4、さらに、オーバードライブおよびT-スタンダーボーダー配列 (T-DNAのボーダーAおよびT-DNAボーダーB) のような他の調節エレメントが含まれている。上記のPTUを含むプラスミドを単離し、制限酵素消化およびDNA配列決定によって確認した。

40

【0162】

pDAB7327の説明: pDAB7327 (図14、配列番号: 58) を、標準的な分子生物学的技術を用いて構築した。このプラスミドは、1つのデサチュラーゼPTUの配列を含む。デサチュラーゼPTUはPvPhasプロモーターV2、PvPhas 5'UTR、AnD9DS v3の遺伝子 (配列番号: 49)、

50

およびAtuORF23 3' UTRを含む。デサチュラーゼPTU内のエレメントは、追加の短い介在配列によって接続されている。デサチュラーゼPTUの配列は、アグロバクテリウム形質転換プラスミドへの転移を容易にするために、インビトロジェン社のGateway（登録商標）組換え部位に隣接している。さらに、プラスミドは複製起点およびカナマイシン選択マーカーを含んでいる。

【0163】

pDAB7328の説明：pDAB7328（図15、配列番号：64）をpDAB7327とpDAB7309との間のGateway（登録商標）組換えを介して構築した。このプラスミドは、前項「pDAB7327の説明」に定めるデサチュラーゼPTUの配列を含む。このPTUは植物形質転換のバイナリーベクターpDAB7309のT-鎖DNAボーダー領域内で頭部から尾部への向き（head-to-tail orientation）を向いていた。このバイナリーベクターには、ホスアセチルトランスフェラーゼPTU：CsVMVプロモーターv2；PAT v5、およびAtuORF1 3'UTR v4、さらに、オーバードライブおよびT-スタンドボーダー配列（T-DNAのボーダーAおよびT-DNAボーダーB）のような他の調節エレメントが含まれている。上記のPTUを含むプラスミドを単離し、制限酵素消化およびDNA配列決定によって確認した。

10

【0164】

pDAB7329の説明：pDAB7329（図16、配列番号：59）を、標準的な分子生物学的技術を用いて構築した。このプラスミドは、PvPhasプロモーターv2、PvPhas 5' UTR、MgD9DS v2（配列番号：15）、およびAtuORF23 3' UTRを含む1つのデサチュラーゼPTUの配列を含む。このデサチュラーゼPTU内のエレメントは、追加の短い介在配列によって接続されている。デサチュラーゼPTUの配列は、アグロバクテリウム形質転換プラスミドへの転移を容易にするために、InvitrogenのGateway（登録商標）組換え部位に隣接している。さらに、プラスミドは複製起点およびカナマイシン選択マーカーを含んでいる。

20

【0165】

pDAB7330の説明：pDAB7330（図17、配列番号：65）をpDAB7329とpDAB7309との間のGateway（登録商標）組換えを介して構築した。このプラスミドは、前項「pDAB7325の説明」に定めるデサチュラーゼPTUの配列を含む。このPTUは、植物形質転換のバイナリーベクターpDAB7309のT-鎖DNAボーダー領域内で頭部から尾部への向き（head-to-tail orientation）を向いていた。このバイナリーベクターには、ホスアセチルトランスフェラーゼPTU：CsVMVプロモーターv2、PAT v5；およびAtuORF1 3'UTR v4、さらに、オーバードライブおよびT-スタンドボーダー配列（T-DNAのボーダーAおよびT-DNAボーダーB）のような他の調節エレメントが含まれている。上記のPTUを含むプラスミドを単離し、制限酵素消化およびDNA配列決定によって確認した。

30

【0166】

pDAB7331の説明：上記に加えて、デサチュラーゼPTUを含んでいなかったコントロールプラスミドを構築した（配列番号：66）。図18。この構築物は、pDAB7309に記載されている他の調節エレメントに加えて、唯一ホスアセチルトランスフェラーゼPTUを含んでいた。

【0167】

実施例4：アグロバクテリウム形質転換

40

エレクトロコンピテントな（electro-competent）アグロバクテリウム細胞（表9）を、ヴァイゲルおよびグレースブルック（2002）（Weigel and Glazebrook (2002) “How to Transform Arabidopsis,” Ch. 5, in *Arabidopsis*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.）からのプロトコルを用いて調製した。コンピテントなアグロバクテリウム細胞50 μ Lを氷上で解凍し、バイナリーベクタープラスミドDNAの300 - 400 ngを使用して形質転換した。細胞ミックスは、あらかじめ冷却したエレクトロポレーションキュベット（0.2 cm）およびバイオ・ラッドジーンパルサー（登録商標）エレクトロ（ヘラクレス、CA）を、次の条件：電圧：2.5kVで、パルスの長さ：5ミリ秒、静電容量出力25 μ F、抵抗200 Ω の下で用いて、DNAの存在下でエレクトロポレーションした。エレクトロポレーション後、YEP液体培地（broth）（酵母エキス（10 g/L）、ペプトン（10 g

50

/L)、およびNaCl (5g/L) の1mLを各キュベットに添加し、細胞YEP懸濁液を15 mLの培養管に移した。細胞を、28℃で4時間穏やかに攪拌しながらインキュベートした後、培養を表9に応じて適切に選択してYEP +寒天上に播種した。プレートに28℃で2-4日間インキュベートし、コロニーを選択し、抗生物質選択を含んだ新鮮なYEP +寒天プレート上に画線し、1~3日間28℃でインキュベートした。コロニーを、Ketolactoseテストを使用してアグロバクテリウムとして検証し、Ketolactose陽性コロニーを、さらに単コロニー分離の二つの経路を用いて単離した。単コロニー分離が完了した後に、最終的なパッチプレートはコロニーでできていた。

【表 9】

表 9 アグロバクテリウム株と抗生物質選択。

菌株	ゲノムの選択	Ti ヘルパーの選択	バイナリーベクターの選択
Z707S	ストレプトマイシン	カナマイシン	スベクチノマイシン
DA2569	エリスロマイシン	カナマイシン	スベクチノマイシン
EHA105	ストレプトマイシン	入手不能	スベクチノマイシン
DA2552	エリスロマイシン	なし	スベクチノマイシン

【 0 1 6 8 】

アグロバクテリウムのコロニー検証：制限消化分析を、ベクター特異的制限酵素消化酵素を使用して無傷のプラスミドの存在を確認するために使用した。マシュレ-ナーゲルNuc leoBond (登録商標) プラスミドDNAキットを造業者の推奨プロトコルに従って使用して、選択された形質転換アグロバクテリウムのコロニーからプラスミドDNAを精製した。アグロバクテリウム形質転換に使用されたバイナリーベクターからのプラスミドDNAをコントロールとして含めた。4つの別々の消化反応を、0.75 - 1 µg のDNAを使用して実行した。反応は1~2時間で進行させた後、アガロースゲル電気泳動およびエチジウムブロマイド染色により分析した。全ての酵素の消化産物がコントロールプラスミドと同一であり、予想されたバンドのサイズと一致していたコロニーを選択した。

【 0 1 6 9 】

A. ツメファシエンス菌株LBA404 (インビトロジェンカールスバッド、カリフォルニア州) を、シロイヌナズナの形質転換に用い、A. ツメファシエンス菌株Z707S (ヘップバーンら (1985) J. 大將Microbiol. 131:2961-9) をキャノーラの形質転換に使用した。

【 0 1 7 0 】

実施例5：シロイヌナズナのアグロバクテリウム媒介形質転換

シロイヌナズナ形質転換：シロイヌナズナを、CloughおよびBent (1998) Plant J. 16: 735-743の方法に基づいてフローラルディップ法を用いて形質転換した。選択されたアグロバクテリウムのコロニーを用いて、選択のための適切な抗生物質を含む一つ以上の30mLのYEP培地の予備培養 (pre-culture) を播種した。培養を、220rpmで一定に攪拌しながら28℃で一晩インキュベートした。それぞれの予備培養を、選択のための抗生物質を含むYEP培地の2つの 500mLの培養液を播種するために使用し、培養を一定に攪拌しながら28℃で一晩インキュベートした。次に、細胞を播種した。約8700gで室温で10分間遠心し、得られた上清を捨てた。細胞ペレットを、1/2 x MurashigeおよびSkoogの塩/Gamborg B5ビタミン、10% (w/v) スクロース、0.044 µMのベンジルアミノプリン (DMSO中の1 mg/mLのストックを10 µL/リットル) および300リットル/µLのSilwet (登録商標) L-77を含む500ml浸透培地中に穏やかに再懸濁した。約1ヶ月齢の植物を、最新の花序を水中に沈めるように注意して、15秒間培地に浸漬した。その後、植物をそれらの両側に敷設し、(透明または不透明で) 24時間覆い、その後、水で洗浄し、直立に配置した。植物を16時間の明/8時間の暗の光周期で、22℃で増殖させた。約4週間浸漬した後、種子を植物から採取した。

【0171】

シロイヌナズナの成長条件：収穫したばかりの種子を、乾燥剤の存在下で室温で7日間乾燥させた。乾燥させた後、種子を0.1%アガロース (Sigma Chemical Co., セントルイス、MO) 溶液に懸濁した。懸濁した種子を、休眠要件を完了し、同期種子発芽 (層別化) を確実にするために、2日間4 で保存した。サンシャインミックスLP5 (Sun Gro Horticulture Inc., Bellevue, WA) を細かいパーミキュライトで覆い、ウェットまでHoaglanのソリューションで半ば灌漑した (sub-irrigated)。土壌ミックスを24時間排水した。成層した種子をパーミキュライトに播種し、湿度ドーム (KORD製品、Bramalea、カナダ、オンタリオ州) で7日間覆った。種子が発芽し、植物は、一定温度 (22) および湿度 (40-50%) 下、120-150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sec}$ の光強度で、長日条件下 (16時間明/8時間暗)、Convion 10
コントローラ (モデルCMP4030およびCMP3244、Controlled Environments Limited、ウィニペグ、マニトバ州、カナダ) 内で生育させた。植物は、最初はHoaglanの溶液を用いて、その後脱イオン水で水やりされ、土壌を湿った状態 (しかしウェットではなく) に維持された。種子の収穫に近づいている (収穫前1~2週間) 植物は、乾燥させた。

【0172】

T1の形質転換植物の選択：T1種子を10.5" × 21"発芽トレイ (T.O. Plastics Inc., クリアウォーター、ミネソタ) に上記の通りに播種し、記載された条件の下で成長させた。ドームは播種5-6日後に取り除いた。播種5日後に、そして再度播種10日後に、苗に、DeVilbiss 20
圧縮空気スプレーチップを使用して10ミリリットル/トレイ (703 L/ha) の噴霧量で除草剤グルホシネート (リバティール) の0.20% 溶液を噴霧し、適用あたり280グラム/ヘクタールのグルホシネートの有効率を送達した。グルホシネート除草剤溶液10mlを、各トレイに噴霧するために20mLのシンチレーションバイアルに分注した。スプレーは、水平と垂直の適用パターンを使用して送達した。各スプレーの後、除草剤名、適用レート、および適用日を記載したスプレーラベルを、各選択トレイに追加した。2回目のスプレーの4~7日後に、除草剤耐性植物を同定し、サンシャイン・ミックスLP5を用いて調製したポットに移植した。移植された植物を、上記の成長条件で温室内に置いた。移植後6~8週間で、各植物から種子を採取し、一意の識別番号をつけ別々に保存した。

【0173】

実施例7：キャノーラのアグロバクテリウム媒介形質転換

アグロバクテリウムの準備：pDAB7319、pDAB7321、pDAB7324、pDAB7326、pDAB7328、pDAB7330またはpDAB7331のいずれかを含有するアグロバクテリウム株を用いて、ストレプトマイシン (100 mg/mL) およびスペクチノマイシン (50 mg/mL) を含有するYEP (バクトペプトン (20.0 g/L) プレートおよび酵母抽出物 (10.0 g/L) プレートに画線し、28 で2日間インキュベートした。2日間の画線プレートのループを、滅菌500mLのバッフルフラスコ (s) 中、ストレプトマイシン (100 mg/ml) およびスペクチノマイシン (50 mg/ml) を含む150mLの改変YEP液に播種し、28 、200rpmで振盪した。培養物を、キャノーラ胚軸の形質転換を行う前に、M-培地 (LS塩; 3%グルコース、改変B5ビタミン、1 μM のカイネチン、1 μM の2,4-D、pH5.8) に再懸濁し、適切な密度 (50クレット単位) に希釈した。

【0174】

キャノーラの形質転換：

種子の発芽：キャノーラの種子 (品種Nexera 710) を、10%クロロックスで10分間の表面滅菌し、滅菌蒸留水で鋼ストレーナーで3回リンスした。種子は、発芽するために、Phytatrays (Phytatrayあたり25種子) に含まれた1/2 MSキャノーラ培地 (1/2MS、2%ショ糖、0.8%寒天) 植えられた。トレイを、25 に設定された成長管理体制、16時間明/8時間暗の光周期で環境成長チャンバー (パーシバルサイエンティフィック社は、ペリー、アイオワ州) 内に置き、5日間発芽させた。

【0175】

前処理：5日目、~3mmの下胚軸片を無菌的に摘出し、根とシュートの切片を廃棄した (胚軸の乾燥を、切除処理中に滅菌ミリQ水10mLにそれらを置くことによって阻止した)。22 - 23 °Cおよび16時間明/8時間暗の光周期に設定成長管理体制での環境成長チャンバー内 50

における3日間の前処理のために、胚軸切片を、カルス誘導培地MSK1D1 (MS; 1 mg/Lのカイネチン、1 mg/Lの2,4-D、3%ショ糖、0.7%Phytagar) 上の滅菌濾紙上に水平に置いた。

【0176】

アグロバクテリウムとの共培養：アグロバクテリウム処理の前日に、適切な抗生物質を含むYEP培地のフラスコを播種した。胚軸切片を、ろ紙から、乾燥から胚軸切片を防ぐために、液体M培地10mLを含む空の100×25mmペトリ皿に移した。スパチュラを、切片をすくって移動するためにこの段階で使用した。液体のM培地をピペットで除去し、アグロバクテリウム懸濁液40mLをシャーレ（アグロバクテリウム溶液40mLを含む500の切片）に添加した。切片を、胚軸がアグロバクテリウム溶液に浸漬したままになるように、ペトリ皿を周期的に回旋しながら30分間処理した。処理期間の終わりには、アグロバクテリウム溶液（アグロバクテリウム溶液が完全にアグロバクテリウムの増殖を防ぐために除去された）を廃棄ピーカーにピペットで入れ、オートクレーブ滅菌し、廃棄した。処理された胚軸は切片が乾燥しないように注意し、慎重に、濾紙でMSK1D1を含む元のプレートにピンセットで移して戻した。胚軸切片を、コントロール切片とともに、減光強度下（アルミ箔でプレートを覆うことにより）で環境成長チャンバーに戻し、処理された胚は3日間アグロバクテリウムと共存培養した。

10

【0177】

選択培地上でカルス誘導：共培養の3日後、胚軸切片をカルス誘導培地MSK1D1H1 (MS; 1 mg/Lのカイネチン、1 mg/Lの2,4-D、0.5 g/L MES、5 mg/LのAgNO₃、300 mg/LのTimentin、200mg/Lのカルベニシリン、1mg/LのHerbiace、3%ショ糖、0.7%Phytagar) 上にピンセットを使用して個別に移した。胚軸切片を、培地上に固定したが、培地に埋め込まなかった。

20

【0178】

選択とシュート再生：カルス誘導培地で7日後、callusing胚軸切片を、MSB3Z1H1 (MS; 3 mg/LのBAP、1 mg/Lのゼアチン、0.5g/LのMESを、5 mg/LでAgNO₃、300 mg/LでTimentin、200mg/Lのカルベニシリン、1mg/LのHerbiace、3%ショ糖、0.7%Phytagar) で選択して、シュート再生培地1に移した。14日後、シュートを有する胚軸を、MSB3Z1H3 (MS; 3 mg/LのBAP、1 mg/Lのゼアチン、0.5g/L MES、5 mg/LのAgNO₃、300 mg/LのTimentin、200mg/Lのカルベニシリン、3 mg/LのHerbiace (登録商標); 3%ショ糖、0.7%Phytagar) での増加した選択により、再生培地2に移した。

30

【0179】

シュートの伸長：14日後、シュートを有する切片をシュート伸長培地MSMESH5 (MS; 300 mg/LのTimentin、5 mg/LのHerbiace (登録商標); 2%ショ糖、0.7%TC寒天) に移した。すでに伸長したシュートを単離し、MSMESH5に移した。14日後、最初のラウンドで伸長していなかった残りのシュートを、MSMESH5上に配置し、同じ組成の新鮮な選択培地に移した。この段階で、すべての残りの胚軸切片を廃棄した。

【0180】

2週間後MSB3Z1H3培地で伸長させたシュートを単離し、MSMESH5培地に移した。MSMESH5上の最初のラウンドで伸長していなかった残りのシュートを単離し、同じ組成の新鮮な選択培地に移した。この段階で、残りのすべての胚軸切片を廃棄した。

40

【0181】

ルート誘導：14日後に、ルート誘導のためシュートは培地MSMEST (MS; 0.7%TC寒天、0.5 g/LのMES、300 mg/LのTimentin; 2%スクロース) に移した。MSMEST媒体上での最初の移動で根付かなかったシュートは、根付いた植物が得られるまでMSMEST媒体上の第二または第三サイクルのために移した。MSMEST媒体上での最初の移動で、伸長/根付かなかったシュートは、根付いた植物が得られるまでMSMEST媒体上の第二または第三サイクルのために移した。MSMESH5またはMSMEST上で根付き、PCR陽性であった植物を、土壌への移植のために移した。硬化後、T₀キャノーラ植物をさらに、導入遺伝子PTUのカセットを含んでいたイベントについて分析した。その後、植物を温室に移し、成熟まで成長させ、そして

50

種子を追加的な分析のために採取した。

【0182】

実施例8：T₁シロイヌナズナ葉組織およびT₀キャノーラ葉組織のDNA分析

T₀キャノーラ植物およびT₁シロイヌナズナ植物を、PTUの発現カセットを含んでいた植物を同定するために分析した。Invader（登録商標）アッセイを、推定的に形質転換した植物のサンプルを最初にスクリーニングするために行い、pat PTUの単一のコピーが含まれていたイベントを識別した。単一コピーのイベントとして同定されたイベントを保存し、さらにPCRによるデサチュラーゼPTU(s)の存在について分析した。デサチュラーゼの発現カセットPTU(s)についてPCR陽性であったイベントを、さらにサザンブロット分析により分析した。サザンブロット分析を、植物を形質転換するために使用されるバイナリーベクターからの遺伝子発現カセットPTUsを植物が含むことを確認するために完了した。PTUsすべてを含む単一コピーのイベントを、さらに進めるために選択した。

【0183】

DNAの単離：全ゲノムDNA(gDNA)をQIAGEN社のDNeasy（登録商標）96プラントキット（Qiagen、バレンシア、CA）を用いて凍結乾燥した葉組織から抽出した。次いで、このgDNAを、PCRおよびコピー数についてInvader（登録商標）アッセイに使用するために、10ng/L（キャノーラ）または0.7 ng/mL（シロイヌナズナ）まで希釈した。

Invader（登録商標）分析：選択マーカーpatのコピー数解析を、Invader（登録商標）アッセイ（Third Wave Technologies、マディソン、WI）を使用して完了した。ゲノムDNAを、製造業者の推奨プロトコルに従って、10分間95℃で変性し、氷上で冷却し、オリゴヌクレオチドプローブ、蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）が可能な色素分子、および切断（cleavage）酵素を含有する試薬のマスターミックスと混合した。反応には、内部リファレンス遺伝子に対するプローブが含まれていた。1-deoxyxylulose-5-リン酸メラーゼ（DXR1）遺伝子をシロイヌナズナInvader（登録商標）アッセイ反応に対する内部参照遺伝子として使用し、高移動度群蛋白質遺伝子（HMGa）を、キャノーラInvader（登録商標）アッセイ反応の内部参照遺伝子として用いた。また、プレートは、1コピー、2コピー、4コピーの基準だけでなく、野生型のコントロールサンプルおよびサンプルが格納されていないブランクのウェルを含んでいた。全体の反応は、1.5時間、63℃でのサーモサイクラーでのインキュベーション前にミネラルオイルを重層した。得られた反応物を蛍光プレートリーダー（Synergy（商標）2、バイオテック・インスツルメンツ、Winooski、バーモント州）で読み取った。読みを、FAM（λ 485 - 528 nm）およびRED（λ 560 - 620 nm）の両方のチャンネルについて収集した。これらから、各チャンネルごとに折り返しゼロ（つまり背景）は、テンプレートなしの生の信号によってサンプルの生の信号を割り算することによって、それぞれのサンプルについて測定した。このデータから、標準曲線を構築し、最高の適合を線形回帰分析によって決定した。その後、この適合から同定されたパラメータを使用して、見かけ上のpatのコピー数を、各試料について決定した。

【0184】

PCR解析：PCR解析を、各植物の転写単位を増幅するプライマーを用いて完了した。これらのプライマーは、プロモーター（ファゼオリン）および3'UTR（ファゼオリンまたはORF23）に位置していた。これらの同じプライマーセットを、キャノーラとシロイヌナズナの両方のPCR分析のために使用した。pDAB7319イベントおよびpDAB7324イベントのPCR分析のために、プライマーMAS414（配列番号：18）およびMAS415（配列番号：19）を最初のPTUを増幅するために使用した。このPTUはゼオリンプロモーター、アスペルギルス・ニデュランスからのアシルCoAデルタ-9デサチュラーゼ遺伝子（AnD9DS v3；配列番号：49）の機能的等価物、およびファゼオリン3'UTRターミネーターで構成されていた。構築物pDAB7319中での第2 PTUのPCR増幅のために、プライマーMAS415およびMAS413（配列番号：20）を使用した。このPTUは、ゼオリンプロモーター、レプトスファエリア ノドルム（Leptosphaeria nodorum）（LnD9DS-2 v2；配列番号：17）からのアシルCoAデルタ-9デサチュラーゼ遺伝子の機能的等価物、およびORF23 3'UTRで構成されている。MAS415およびMAS413プライマーペアもpDAB7324（ゼオリンプロモーター、オオタバコガゼアアシルCoAデルタ-9

デサチュラーゼ遺伝子V2 (HzD9DS v2 ; 配列番号 : 16)、およびORF23 3'UTR) で形質転換することによって生成された第2のPTUイベントを増幅するために使用した。また、MAS415 およびMAS413プライマー対を、構築物pDAB7321およびpDAB7326中でPTUsを増幅するために使用した。

【 0 1 8 5 】

PCR反応を、20 ngのゲノムDNA、5ユニットのEx Taq (タカラ)、1x反応バッファ、0.2 μ Mの各dNTP、および0.8 μ Mの各プライマーを使用して25 μ Lの容量で行った。増幅反応を、DNA Engine Tetrad (登録商標) 2サーマルサイクラー (BioRad社、ヘラクレス、カリフォルニア州)で行った。以下のサイクリング条件を、プライマーMAS413およびMAS415のために使用した : 94 で3分間 ; その後、94 で30秒、63 °Cで30秒、および72 で3分間を35サイクル ; ならびに72 で10分間の最終的な伸長。プライマーMAS414およびMAS415に使われたサイクリング条件は、アニーリング温度が63 から60 に低減したことが唯一の違いで、それ以外同じであった。反応生成物を、1%アガロースゲルで泳動し、エチジウムブロマイドで染色し、Gel-Doc (商標) 上で可視化した。

【 0 1 8 6 】

サザンプロット分析 : サザンプロット分析を使用して、キャノーライイベントの統合パターンを確立した。これらの実験から、キャノーラゲノム内デサチュラーゼ導入遺伝子の統合および整合性を実証したデータが生成された。選択したイベントが、植物形質転換のために使用されるバイナリーベクターからのデサチュラーゼ導入遺伝子の単一コピーを含む、全長の、単純な統合イベントとして特徴付けられた。

【 0 1 8 7 】

詳細サザンプロット分析を、デサチュラーゼ遺伝子に特異的なプローブおよびプラスミド内に位置する部位で切断する記述的制限酵素を用いて行った。これらの消化物は、プラスミドに対して内部的なハイブリダイズフラグメント、またはキャノーラのゲノムDNA (ボーダー断片) のプラスミドとの接合部にまたがるフラグメントを生成した。制限酵素およびプローブの組み合わせについてサザンハイブリダイゼーションから示された分子の大きさは、イベントごとに固有であった。これらの分析はまた、T鎖DNAの再編成なしにキャノーラゲノムDNAにプラスミド断片が挿入されたことを示した。

【 0 1 8 8 】

サザンプロット分析のために、100mgの凍結乾燥されたキャノーラ葉の組織を、Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて抽出した。サンプルあたり5マイクログラム (5 μ g) のgDNAを、SpeIおよびPacI制限エンドヌクレアーゼ (New England Biolabs, Ipswich, MA) で同時に消化して、目的のPTU、および/または選択マーカー (PAT) のいずれかを含む断片を得、コピー数を決定した。消化したDNAを0.8%アガロースゲル上で分離した。

【 0 1 8 9 】

簡単に言えば、DNA断片の電気泳動分離および可視化に続いて、ゲルを約20分間0.25N HClで脱プリン化した後、約30分間変性溶液に曝した後、中和溶液に少なくとも30分間曝した。サザントランスファーを、10×SSCとともにウィッキングシステムを使用して、ナイロン膜 (ミリポア、バーリントン、マサチューセッツ州) の上で一晩行った。トランスファー後、膜を2×SSC溶液で洗浄し、DNAをUV架橋により膜に結合させた。このプロセスにより、ハイブリダイゼーションのための準備ができたサザンプロット膜が生成された。

【 0 1 9 0 】

プローブを生成し、PCR断片をプラスミドDNAから増幅し、QIAquick (登録商標) ゲル抽出キット (Qiagen) を用いてゲル抽出により精製した。LnD9DSプローブを作製するために使用したプライマーは、arw008 (配列番号 : 21) およびarw009 (配列番号 : 22) であった。HzD9プローブを作製するために使用したプライマーはarw010 (配列番号 : 23) およびarw011 (配列番号 : 24) : であった。すべての3つの反応のためのPCR条件は、63 のアニーリング温度および1分間の伸長時間での35サイクルで構成されていた。PCR断片を、Prime-It (登録商標) RmTランダムプライマーラベリングキット (Stratagene、ラホーヤ、カリフォルニア州) を用いて、³²Pで標識した。

【 0 1 9 1 】

ハイブリダイゼーション工程を、約65 で一晩ハイブリダイゼーションオープン内で行った。ナイロンメンブレンプロットをすすぎ、プロットを蛍光画像画面上に一晩露出し、Storm (商標) 860スキャナ (Molecular Dynamics、カリフォルニア州サニーベール) でスキャンした。

【 0 1 9 2 】

実施例9：アシルCoAデルタ-9デサチュラーゼを含有するトランスジェニックシロイヌナズナの種子の脂肪酸組成

シロイヌナズナ植物を、LnD9DS-2 v2 (pDAB7321 ; 配列番号 : 61)、HzD9DS v2 (pDAB7326 ; 配列番号 : 63) またはMgD9DS v2 (pDAB7330 ; 配列番号 : 65) 用の遺伝子を含むアグロバクテリウムベクターで形質転換した。植物もAnD9DS遺伝子 (pDAB7328 ; 配列番号 : 64) を含むベクターで形質転換した。選択マーカーpat遺伝子 (pDAB7331、配列番号 : 66) のみを含む空のベクターを、陰性コントロールとして用いた。形質転換もまた、ステアロイル-優先性デサチュラーゼ (AnD9DS) を、LnD9DS-2 (pDAB7319 ; 配列番号 : 60) またはHzD9DS (pDAB7324 ; SEQ ID NO : 62) のいずれかのパルミトイル優先性デサチュラーゼと組み合わせ、2つのデサチュラーゼを組み合わせ用いて行った。すべての場合において、デサチュラーゼ遺伝子は、種子特異的PvPhasプロモーター (米国特許5504200) によって駆動された。バルクT₂種子は、Invader (登録商標) アッセイの分析によってpat遺伝子、およびPCR分析によってデサチュラーゼPTUを含むことが確認された除草剤耐性のT₁植物から収穫した。

【 0 1 9 3 】

種子サンプルを、スチールボールとボールミルを用いて代用としてヘプタン含有トリヘプタデカノイン (triheptadecanoin) (Nu-Chek prep、エリシアン、ミネソタ州) 中でホモジナイズした。均質化に先立って、MeOH中新たに調製した0.25MのMeONa (シグマ) の溶液を試料に添加した。反応を、軽度の熱 (40) の下で、一定に振盪しながら実施した。反応を、メチル化サロゲートの回収により検証した。FAMEの抽出を3回繰り返した後、すべてのヘプタン層を、分析前にプールした。抽出の完全性を、4回目の抽出/誘導体化においてFAMEの存在を確認することにより検証した。その結果得られるFAMEを、SGEからのキャピラリーカラムBPXスイッチ70 (15m × 0.25 mm × 0.25mm) を用いてGC-FIDによって分析した。各FAMEを保持時間によって識別し、校正標準として、Matreya、LLC (Pleasant Gap、ペンシルバニア州) からの菜種油基準ミックスを注入することにより定量した。

【 0 1 9 4 】

トランスジェニックイベントからのT₂種子のFAME分析は、デサチュラーゼのそれぞれの発現が、イベントの各セットの平均飽和脂肪酸含有量から決定される、種子の総飽和脂肪酸含量を減らすことに重大な影響を有することを示した。表10および図19。この表および次の表では、JMP (登録商標) 統計ソフトウェアパッケージ (SASインスティテュート社、ケアリー、ノースカロライナ州) で行われたテューキー・クレーマー (Tukey-Kramer) のHSD検定を用いて決定されたように、同じ文字で接続されていない値は、大きく異なっている。LnD9DS-2またはHzD9DSとAnD9DSとの組み合わせが、最も低い平均総飽和脂肪酸含量を生じた。

【表 10】

表 10：T2 シロイヌナズナ種子の総飽和脂肪酸含量

遺伝子	T2 サンプル の数				平均総飽和 FA
コントロール	204	A			13.49
WT	60	A			13.16
MgD9DS v2	42		B		10.26
LnD9DS-2 v2	49		B		10.00
HzD9DS v2	70		B		9.58
AnD9DS v3	32			C	8.73
AnD9DS V3 + HzD9DS v2	39			C	8.23
AnD9DS V3 + LnD9DS-2 v2	51			C	8.09

10

【0195】

すべてのデサチュラーゼは、シロイヌナズナ種子中の全飽和脂肪酸含量を低下させているが、酵母の実験から予測されるように、それらは、パルミチン酸及びステアリン酸脂肪酸の含有量に異なる効果を有していた。表11および図20は、イベントの各セットの平均パルミチン酸含有量を示す。表12および図21は、イベントの各セットについての、T2種子の平均ステアリン酸含量を示す。

20

【表 11】

表 11：T2 シロイヌナズナ種子のパルミチン酸含量

遺伝子					パルミチン 酸の平均
コントロール	A				7.72
WT	A				7.54
MgD9DS v2		B			7.19
AnD9DS v3			C		6.02
LnD9DS-2 v2			C		5.98
HzD9DS v2				D	5.57
AnD9DS v3 + LnD9DS-2 v2				D	5.54
AnD9DS v3 + HzD9DS v2				D	5.41

30

40

【表 1 2】

表 12：T2 シロイヌナズナ種子のステアリン酸含量

遺伝子				平均ステアリン酸
コントロール	A			2.96
WT	A			2.94
LnD9DS-2 v2		B		2.09
HxD9DS v2		B		2.04
MgD9DS v2			C	1.53
AnD9DS v3 + HxD9DS v2			C	1.42
AnD9DS v3			C	1.35
AnD9DS v3 + LnD9DS-2 v2			C	1.28

10

20

【0 1 9 6】

AnD9DSおよびMgD9DSは、LnD9DS-2およびHxD9DSよりもステアリン酸含量に大きな影響を及ぼした。逆に、LnD9DS-2およびHxD9DSは、AnD9DSおよびMgD9DSよりもパルミチン酸含量に大きな影響を及ぼした。デサチュラーゼの組み合わせは脂肪酸の両方に大きな影響を与える。これらの結果はまた、パルミチン酸のデルタ-9不飽和化の主要な生成物であるパルミトレイン酸の種子中含量を増加させることに対するデサチュラーゼの効果において観察された。表13および図22。

【表 1 3】

表 13：T2 シロイヌナズナ種子のパルミトレイン酸の含有量

遺伝子						パルミトイル酸の平均
AnD9DS v3 + HxD9DS v2	A					3.32
AnD9DS v3 + LnD9DS-2 v2	A					2.93
HxD9DS v2		B				2.48
AnD9DS v3		B	C			2.10
LnD9DS-2 v2			C			1.91
MgD9DS v2				D		1.40
コントロール					E	0.31
WT					E	0.30

30

40

【0 1 9 7】

位置とコピー数の影響により、分析されたイベント全体で飽和脂肪酸含量に対するデサ

50

チュラーゼの効果にばらつきが予想された。最小限の総飽和脂肪酸含量（5最下位のイベントの平均）を有するイベントの完全な脂肪酸プロファイルの比較は、野生型およびコントロール形質転換植物からの種子のプロファイルと一緒に表14に示されている。

【表 1 4】

表 14：最も低い総飽和脂肪酸含量を有する T_2 トランスジェニックシロイヌナズナの脂肪酸プロファイル。標準偏差は、括弧で囲まれている。

	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	Vacc.*
WT	0.08 (0.02)	7.54 (0.41)	0.31 (0.05)	2.94 (0.19)	14.91 (1.44)	1.47 (0.10)
コントロール	0.08 (0.02)	7.72 (0.05)	0.32 (0.04)	2.96 (0.34)	14.20 (2.04)	1.46 (0.11)
AnD9DS v3	0.07 (0.01)	5.10 (0.38)	2.92 (0.55)	0.72 (0.03)	20.52 (2.12)	1.72 (0.26)
HxD9DS v2	0.06 (0.00)	4.13 (0.23)	4.11 (0.47)	1.26 (0.08)	19.34 (1.01)	1.94 (0.25)
LnD9DS-2 v2	0.05 (0.00)	4.68 (0.30)	3.49 (0.69)	1.53 (0.12)	19.35 (0.81)	2.05 (0.21)
MgD9DS v2	0.08 (0.02)	6.64 (0.26)	1.60 (0.54)	1.05 (0.20)	18.01 (1.86)	1.60 (0.16)
AnD9DS v3 + LnD9DS-2 v2	0.06 (0.00)	4.41 (0.17)	3.71 (0.35)	0.97 (0.33)	19.60 (0.88)	2.03 (0.21)
AnD9DS v3 + HxD9DS v2	0.08 (0.02)	4.86 (0.35)	4.09 (0.65)	1.01 (0.22)	18.10 (2.40)	2.03 (0.31)

* Vacc. = cis-バクセン酸 (18:1 n-7)

10

20

	C18:2	C18:3	C20:0	C20:1	C20:2	C22:0	C22:1	C24:0
WT	28.72 (0.97)	17.85 (0.81)	2.06 (0.16)	20.11 (0.90)	1.78 (0.15)	0.34 (0.10)	1.68 (0.19)	0.21 (0.10)
コントロール	29.28 (1.29)	18.07 (1.35)	2.08 (0.16)	19.62 (1.23)	1.85 (0.17)	0.39 (0.13)	1.70 (0.04)	0.27 (0.14)
AnD9DS v3	29.64 (1.34)	17.59 (1.28)	0.44 (0.04)	18.26 (0.83)	1.42 (0.15)	0.24 (0.16)	1.26 (0.09)	0.10 (0.05)
HxD9DS v2	29.31 (0.94)	17.26 (0.39)	0.81 (0.06)	18.39 (0.66)	1.47 (0.10)	0.18 (0.05)	1.50 (0.04)	0.23 (0.03)
LnD9DS-2 v2	27.72 (0.18)	17.46 (0.55)	1.00 (0.11)	19.33 (0.46)	1.45 (0.11)	0.32 (0.14)	1.48 (0.10)	0.10 (0.09)
MgD9DS v2	29.76 (1.10)	17.98 (0.84)	0.63 (0.63)	19.19 (0.86)	1.60 (0.09)	0.26 (0.20)	1.44 (0.09)	0.16 (0.03)
AnD9DS v3 + LnD9DS-2 v2	29.17 (0.31)	18.84 (0.41)	0.59 (0.27)	17.65 (0.23)	1.40 (0.04)	0.39 (0.03)	1.13 (0.06)	0.03 (0.02)
AnD9DS v3 + HxD9DS v2	29.28 (1.78)	18.83 (1.69)	0.65 (0.21)	17.88 (1.90)	1.55 (0.20)	0.20 (0.12)	1.33 (0.24)	0.11 (0.08)

10

20

【 0 1 9 8 】

30

飽和パルミチン酸およびステアリン脂肪酸の含有量を低減し、一価不飽和脂肪酸の含有量（パルミトレイン酸とオレイン酸）を増加させることに加えて、デサチュラーゼの存在はまた、種子中のアラキジン酸（C20：0）の量を低下させた。これはおそらく、この脂肪酸がステアリン酸とパルミチン酸の伸長に由来するためである。C20：1D9のようにエイコセン酸における付随上昇（C20：1）がないので、導入デサチュラーゼによるC20：0の直接的な不飽和化もなかったようであった。

【 0 1 9 9 】

実施例10：デルタ-9デサチュラーゼ抗体調製

抗体などの診断ツールは、植物においてトランスジェニックデルタ-9デサチュラーゼのタンパク質の発現を特徴付けるために望ましい。アシルCoAデルタ-9デサチュラーゼは、膜結合タンパク質であるため、大腸菌で過剰発現ルーチンは困難である。しかし、抗体は、タンパク質の膜貫通ドメインのいずれも含んでいない各デルタ-9デサチュラーゼタンパク質のC末端断片の過剰発現によって首尾良く生成された。

40

【 0 2 0 0 】

ポリメラーゼ連鎖反応：PCRプライマーは各デサチュラーゼの等価C末端断片を増幅するように設計された。3'プライマーは、C末端6×Hisタグを有するタンパク質の断片をコードするように設計された。NdeI及びBamHI制限部位は、クローニングを容易にするために、それぞれ5'および3'プライマーに組み込まれた。プライマー配列は以下の表15に記載される通りである。予想される増幅産物は、LnD9DS-2についての659 bp、MgD9DSについての683 bp、およびHxD9DSについての335 bpであった。PCR反応を、サブライザーの条件を

50

使用してタカラEx Taq (商標) PCRキット (Clontech社、マウンテンビュー、カリフォルニア州) を用いて行った。全PCR反応容量は50 μ lであった。各反応は、200ngのプラスミドDNAおよび各プライマー50pmolを含んでいた。DNAは、94 で1分間、続いて94 で30秒間、60 で1分間、72 で30秒間の30サイクルで変性させた。最終伸長を10分間72 で行った。各PCR産物を、滅菌0.75%アガロースゲル上で2つのウェルにまたがって行い、DNAをモンタージュスピナラムを用いてゲル精製し、15 μ LのTE緩衝液に溶出した。

【表 1 5】

表 15: LnD9DS-2、MgD9DS、および HzD9DS からの C-末端フラグメントの PCR 増幅に使用されるオリゴヌクレオチドプライマーの配列。

プライマー	配列	目的
AntiLnD9DS2F	配列番号:25 CATATGTTTCGACGACAGACGCACGCCTCGAGAC	LnD9DS2 C 末端のフォワードプライマー
AntiLnD9DS2Rh	配列番号:26 GGATCCGCAGCCACAGCCCCCTCAACCAACCTCTC	LnD9DS2 C 末端のリバースプライマー
AntiMgD9DSF	配列番号:27 CATATGTTTCGACGATCGCAACTCGCCGCGTGATCAC	MgD9DS C 末端のフォワードプライマー
AntiMgD9DSRh	配列番号:28 GGATCCGCGGCCTGAGCACCCGGAACAGGCTG	MgD9DS C 末端のリバースプライマー
AntiHzD9DSF	配列番号:29 CATATGTATGACAAGTCCATCAAGCCTTCC	HzD9DS C 末端のフォワードプライマー
AntiHzD9DSRh	配列番号:30 GGATCCTCGTCTTTAGGGTTGATCCTAATGGCTGC	HzD9DS C 末端のリバースプライマー

【 0 2 0 1 】

TOPOクローニング: 精製したC末端断片を、TOPO (登録商標) pCR (登録商標) 2.1ベクター (インビトロジェン、カールスバッド、カリフォルニア州) にTAクローニングし、製造業者のプロトコル (Invitrogen社) に従って、トップ10大腸菌細胞に形質転換した。形質転換は選択され、プラスミドDNAをNucleoSpin (登録商標) カラム (マシュレ-ナーゲル社 & 株式会社、デュレン、ドイツ) を用いて精製した。3マイクロリットル (3 μ L) のDNAを、37 で90分間、20 μ Lの全容積でNdeIおよびBamHIで消化し、0.8%アガロースゲルにかけた。それぞれのケースでは、遺伝子特異的断片 (プラス3.9キロバイトTOPO (登録商標) ベクターのバンド) が見えた。3個の陽性クローンがそれぞれクローニングされた遺伝子のために選ばれ、増幅されたPCR断片にエラーが無かったことを確認するために配列決定した。MgD9DSクローンのそれぞれには、塩基対45でサイレント点突然変異が含まれており、公表されている配列とPCRのテンプレートとの間の塩基多型、またはサイレントPCRのエラーのいずれかを示している。変異はサイレントであったので、補正の必要はなく、1つのクローンをサブクローニングのために選択した。

【 0 2 0 2 】

デルタ-9デサチュラーゼC末端断片発現プラスミドの作製: PCR増幅デルタ-9デサチュラーゼ断片をNdeIおよびBamHI制限酵素で消化し、pET30b (+) 発現ベクター内の対応する制限部位にライゲーションした。クローニングステップは、全長タンパク質の精製を容易にするために、C末端6 $\times$ Hisタグを構成する15個のC-末端アミノ酸の添加をもたらした。これらの付加的なアミノ酸は、タンパク質の発現に影響を与えないことが予想された。陽性

クローンを得られたことを、制限酵素消化およびシーケンシング反応を介して確認した。

【0203】

大腸菌でのデルタ-9デサチュラーゼC末端ペプチド断片の発現：デルタ-9 デサチュラーゼ/pET30b (+) 発現プラスミドを、メーカーの推奨するプロトコル（ノバゲン、マディソン、WI）に従って、BL21 (DE3) 大腸菌細胞に形質転換した。細胞を、カナマイシン (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) とグルコース (1.25 M) を含むLAプレート上にプレートした。プレートを37 で一晩インキュベートした。細胞の完全なループをプレートから掻き取り、イソプロピルPD-チオガラクトシド (0.75 mM) インデューサーとともに250mLのLB及びカナマイシン (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を含む500mLフラスコに播種した。三つの誘導条件を試験した。培養を、次のように異なる温度で誘導し、異なる時期に収穫した：28 で一晩（～18時間）、16 で一晩、または37 で4時間。細胞は250 mLのボトル中での15分間6000 rpmでの遠心分離によって回収した後、-20 で凍結した。

【0204】

デルタ-9デサチュラーゼC末端ペプチド断片のタンパク質精製：250mLの培養液からの細胞ペレットを10%グリセロールおよび0.5 mLのプロテアーゼインヒビターカクテル（シグマ、セントルイス、MO）を含む50mLの冷リン酸緩衝化生理食塩水（PBS）中で手持ち式ホモジナイザーを使用して解凍し、再懸濁した。細胞をBranson Model 450 Sonifier（ダンブリー、コネチカット州）を用いて約10分間氷上で破壊した。封入体を、15分間、10,000 $\times g$ での遠心分離によってペレット化し、ブラッドフォードタンパク質アッセイによって測定されたを、上清のタンパク質濃度がベースラインに達するまで、0.5%トリトンX-100を含むPBSで2～3回抽出した。回収された封入体は、約1時間室温で撹拌しながら6 M尿素及び5mMのDTTを含むPBS溶液に可溶化した。可溶化されたタンパク質を、15分間、30,000 $\times g$ での遠心分離により不溶性の物質から分離し、保持された上清を5mLのNi-アフィニティークラム（GE Healthcare、HiTrapキレート、Piscataway, NJ）にかけた。金属樹脂に結合したC末端のデルタ-9デサチュラーゼペプチドのヒスチジンタグ、および各断片を、Akt a（登録商標）エクスプローラ100（GEヘルスケア、Piscataway, NJ）を用いて、50 - 200 mMイミダゾール勾配で溶出した。画分（各3 mL）を採取し、溶出ピークをSDS-PAGEで分析した。C末端デルタ-9デサチュラーゼペプチドを含有する画分をプールし、5mL未満の容量にAmicon（登録商標）ウルトラ10,000 MWCOフィルター装置（ミリポア、ビレリカ、MA）を用いて濃縮した。その後、タンパク質試料を、Hi Load（商標）XK16/60 Superdex（商標）200サイズ排除カラム（GE Healthcare、Piscataway, NJ）に注入し、20 mMトリス-HCl、150mMのNaCl、及び1mMのDTT中の6 M尿素で平衡化した。純粋なC末端デルタ-9デサチュラーゼペプチドを含むピーク画分（4 mLずつ）を保存し（SDS-PAGE分析及び他の生化学的特性の評価により検証した後）、抗体産生のために使用した。LnD9DS-2ペプチドについて27kDa、HzD9DSペプチドについて15 kDa、MgD9DSペプチドについて28 kDaの予想サイズを有するペプチドが産生された。誘導条件は、SDS-PAGEゲルのクマシーブルー染色による可視化のための十分なタンパク質を産生した。

【0205】

ポリクローナル抗体作製：契約サービス（Strategic BioSolutions、ニューアーク、デラウェア州）により、3つのC末端デルタ-9デサチュラーゼペプチドの各々に対するウサギの抗体を産生した。彼らの標準的な手順に従って、3つのタンパク質断片のそれぞれについて力価の高い（ELISAを使用して検証）抗血清を得た。各精製C末端デルタ-9デサチュラーゼペプチドを、20mMトリス-HCl、150mMのNaCl、1mMのDTTバッファで、および2-3 Mの最終濃度の尿素で希釈し、タンパク質を溶液中に維持した。約10mgのタンパク質を、ポリクローナル抗体の生成のためにStrategic BioSolutionsに送った。二羽の兎を各免疫原のために選択し、標準的なプロトコル（70日予防接種）を用いた。TiterMax（登録商標）ゴールドと呼ばれる新たなアジュバントを、エマルジョンの調製のために購入した。予防接種時に、プロトコルの終わりにELISA滴定も抗体産生の成功を確保するために行った。抗血清は、2つの別々の時点：1つを標準的な2月のプロシージャから、及び他の1つを放血が

ら、採取した。

【0206】

ウサギ血清から総IgGを単離するためには、約20～30 mLの高力価の抗血清を5 mLのアルカリトランスプロテインAカラム（GEヘルスケア、たHiTrap（商標）MabSelect SuRe（商標）、カタログ番号11-0034-94）に適用した。PBS緩衝液での標準洗浄後、結合したIgGを、0.1Mクエン酸ナトリウム、0.3M NAC1、pH3.3に短い時間暴露することにより樹脂から溶出し、2Mトリス-HCl、pH9の緩衝液の1/10量を各画分へ追加することで直ちに中和した。アフィニティークラムを、IgGのクロスコンタミネーションを避けるために、標準のクリーニング・イン・プレイス（CIP）の手順に従って、0.5N NaOHで処理することによって消毒した。各サンプルから最終的に回収したIgGを、50容量の4 のPBSで一晩透析し、そしてタンパク質濃度を、BSA標準（ピアース、#23208をprod）を使用して、Bradfordアッセイによって決定した。1mLずつ個別のチューブに移し、-80 で保存した。

10

【0207】

これらの抗体は、トランスジェニック植物材料でのデサチュラーゼタンパク質の発現を測定するために使用された診断ツールである。抗体は、低飽和脂肪酸油の表現型の変化およびデルタ-9デサチュラーゼのタンパク質の発現レベルの間の相関関係を開発するために使用された。

【0208】

実施例11：T₂シロイヌナズナ種子におけるアシルCoAデルタ-9デサチュラーゼタンパク質のレベル

20

デルタ-9デサチュラーゼのポリペプチドを、ウェスタンブロット法により成熟トランスジェニック種子サンプルで検出した。種子を分析のために、Kleco（商標）Bead Beater（Garcia Machine、ヴァイセーリア、カリフォルニア州）においてステンレススチール製ビーズを用いて乾燥した種子を分解することによって調製した。抽出緩衝液（50mMトリス、10mMのEDTA、2% SDS）を添加し、サンプルチューブを30分間静かに振盪した。サンプルを3000 RCFで15分間遠心分離した。その後、上清を回収し、分析のために使用した。種子抽出物中の総可溶性タンパク質の量を、Lowryアッセイ（BioRad、Hercules、カリフォルニア州）によって決定した。サンプルを、1.55 mg/mLの総可溶性タンパク質に正規化し、レーン当たり20 µgの全可溶性タンパク質の標準ロードのために、40mMのDTTを含むLDSサンプルバッファー（Invitrogen、Carlsbad、CA）を中で調製した。サンプルを、4-12%Bis-Trisゲル（Invitrogen社）で電気泳動し、ニトロセルロース膜に移した。ブロットをブロッキングバッファーでブロックし、4つの異なるデルタ-9デサチュラーゼポリペプチド（AnD9DS、LnD9DS-2、HzD9DS、およびMgD9DS）（実施例10参照）に対する抗体でプローブした。

30

【0209】

すべての場合において、ポリクローナル抗体を、上記のように個別のデサチュラーゼのHisタグ精製C末端ペプチド断片に対してウサギにおいて開発した。精製されたC末端断片を、ウェスタンブロットの定量化のための基準抗原として用いた。抗ウサギ蛍光標識二次抗体（ヤギ抗ウサギAF 633; Invitrogen）を検出のために使用した。ブロットを、Typhoon（商標）Trio Plus蛍光イメージャー（GEヘルスケア）で可視化した。標準曲線は二次曲線フィッティングを使用して生成し、線形回帰が発現を定量するために使用した。

40

【0210】

特定の抗血清でプローブしたときに、シロイヌナズナのイベントからの成熟したT₂種子からの抽出物のSDS-PAGEウェスタンブロットは、適切なサイズのバンドを示した。これらのバンドを、特定の基準抗原に対して定量した。適切な抗血清を用いたシロイヌナズナのT₂種子抽出物の定量的ウェスタンブロットングにより、平均で63 ng LnD9DS-2/総蛋白mg（tp）（最大228 ng/mg tp）が、成熟した種子で検出され、HzD9DSについては34 ng/mg tp（最大100 ng/mgのtp）が検出されたことが示された。MgD9DSについては、平均58 ng/mg tp（最大1179 ng/mg tp）が、T₂種子で検出された。AnD9DSイベントについては、平均625 ng/mg tp（最大1.5 µg/mg tp）が、成熟T₂種子で検出された。したがって、AnD9DSに

50

対して、10 - 18倍少ないパルミトイル優先性デサチュラーゼであるLnD9DS-2およびHzD9DSが、トランスジェニック種子中で発現した。したがって、これらのデサチュラーゼの発現をより高いレベルにすることにより、飽和脂肪酸、特にパルミチン酸のさらなる低減が駆動される。

【 0 2 1 1 】

実施例12：キャノーラにおけるデルタ-9デサチュラーゼ遺伝子の発現

一連のトランスジェニックキャノーライベントを、pDAB7321（配列番号：61）およびpDAB7326（配列番号：63）（種子特異PvPhasプロモーターによって駆動されるそれぞれLnD9DS-2とHzD9DSの遺伝子を含む）を用いて実施した形質転換から得た。LnD9DS-2遺伝子を含む39個のpDAB7321イベントを、ゲノムDNAのPCR解析により同定し、温室内で生育させて、T1種子を生産した。同様に、80個のpDAB7326イベントがHzD9DS遺伝子を有することが確認され、T1種子を生産した。キャノーラもpDAB7319（配列番号：60）またはpDAB7324（配列番号：62）で形質転換し、これらはLnD9DS-2またはHzD9DS遺伝子と結合したAnD9DS遺伝子（全てPvPhasプロモーターによって駆動される）を含んでいる。44および76個のイベントをそれぞれ回収し、PCR分析によって両方のデサチュラーゼ遺伝子を含んでいることを確認し、温室内で生育させ、T1種子を生産した。

10

【 0 2 1 2 】

pDAB7321（LnD9DS-2 v2）またはpDAB7326（HzD9DS v2）で形質転換されたイベントからのT1種子サンプルのFAMEの分析では、形質転換されていないキャノーラ植物又は空のベクターコントロールで形質転換された植物に対して、飽和脂肪酸濃度の有意な減少を示さなかった。T1種子のウェスタンブロットは、検出可能なレベルのデルタ-9デサチュラーゼタンパク質を示さなかった。また、LnD9DS-2またはHzD9DSについての検出可能なタンパク質は、AnD9DSタンパク質が容易に検出される可能性があるのに対し、pDAB7319（AnD9DS v3およびLnD9DS-2 v2）またはpDAB7324（AnD9DS v3およびHzD9DS v2）で形質転換された植物からのT1種子では検出されなかった。これらのイベントでは、飽和脂肪酸の減少がコントロール植物に対して観察されたが、これはAnD9DSの発現に起因するものであった。

20

【 0 2 1 3 】

デルタ-9デサチュラーゼ遺伝子の相対的なmRNAレベルを評価するために、全RNAをダブルデサチュラーゼ構築物（pDAB7319とpDAB7324）で形質転換したイベントからの発達中のキャノーラ種から抽出し、定量的リアルタイムPCRで解析した。種子を、いくつかのキャノーラ植物から、受粉の20、25、29、32、39、または41日後にドライアイス上で収穫し、-80℃で保存した。全RNAを、製造業者の推奨プロトコルに従って、Plant RNeasy（登録商標）RNA抽出キット（Qiagen）を用いて、50mgのプールされた冷凍の種子から調製した。抽出したRNAを、製造業者の推奨プロトコルに従って定量RT-PCR用のSuperScript（登録商標）IIIファーストストランド合成スーパーミックス（Invitrogen）を用いてcDNA合成のための鋳型として使用した。

30

【 0 2 1 4 】

RT-PCRアッセイを、ロシュアッセイデザインセンター（ロシュ・ダイアグノスティックス、インディアナ州インディアナポリス）を使用して、標的とするデサチュラーゼに対して設計した。アッセイに使用したプライマーは、表16に記載されている。標的アッセイは、FAM標識UPLプローブ（Roche Diagnostics）を用いた。これらのアッセイは、統合型DNA技術によって合成されたテキサスレッド標識キャノーラアクチン参照アッセイで二重の反応で実行された。

40

【表 16】

表 16 : Q-RT-PCR アッセイの詳細

標的	フォワードプライマー	リバースプライマー	プローブ
AnD9Ds	配列番号 : 31 GGACTTCTCTACTCTCACCTTGA	配列番号 : 32 TCCGATCCTCTTTGGTTCT	UPL #9
HxD9Ds	配列番号 : 33 GACCCACACAATGCAACG	配列番号 : 34 CCTAACAAGAAGCCAGCCAAT	UPL #143
LnD9Ds	配列番号 : 35 GTTCTGACTGCGTTGGTCAC	配列番号 : 36 CGGAACTCATGGTGGAAGT	UPL #7
Actin	配列番号 : 37 CTACTGGTATTGTGCTCGACT	配列番号 : 38 CTCTCTCGGTGAGAATCTTCAT	配列番号 : 39 CACGCTATCCTCGGTCTCGATC

10

標的	標識
AnD9Ds	FAM
HxD9Ds	FAM
LnD9Ds	FAM
Actin	Tx-Red

【0215】

RT-PCR反応は、ライトサイクラー（登録商標）480IIリアルタイムPCRサーマルサイクラー（ロシュ）上で実行された。標的UPLアッセイのためのデータを、533 nmの発光フィルターおよび483 nmの励起信号を使用して収集した。アクチン参照アッセイのためのデータを、610 nmのフィルターおよび558 nmの励起信号を使用して収集した。サイクルタイム値および標的-基準比率が、LC480IIソフトウェアの「Advanced相対定量」分析のワークフローを使用して自動的に計算された。各サンプル内のデサチュラーゼ転写レベルの相対的な蓄積は標準 $\Delta\Delta Ct$ 法（Roche）を用いて算出した。

20

【0216】

pDAB7319（AnD9DS v3およびLnD9DS-2 v2）およびpDAB7324（AnD9DS v3およびHxD9DS v2）からの各キャノール種子サンプルについて、HxD9DSまたはLnD9DS-2の導入遺伝子の転写産物の蓄積は、同じイベントでAnD9DSの転写よりも有意に低かった。転写産物の蓄積における観察された差は、3倍以下と20倍以下の間で変化した。図23。したがって、HxD9DSおよびLnD9DS-2の不十分な発現は、これらの遺伝子に起因するポリペプチドの検出の欠如および表現型の非存在を説明する可能性がある。

30

【0217】

実施例13：代替プロモーターによるデルタ-9デサチュラーゼPTUsの発現

LnD9DS-2、HxD9DS、およびMgD9DSタンパク質をコードする遺伝子（群）を発現するために付加的な転写調節領域を使用することにより、キャノール内でこれらのデルタ-9デサチュラーゼの含有量をさらに増大させ得る。発達の初期に、より長い期間にわたって発現する転写調節領域の同定と利用により、種子開発の初期段階で異種遺伝子の堅牢な種子特異的転写を促進することにより、キャノール種子内で異種デルタ-9デサチュラーゼのレベルを向上させることができる。このような転写調節領域の例としては、LfKCS3プロモーター（米国特許7253337）およびFAE 1プロモーター（米国特許6784342）が含まれるが、これらに限定されない。これらのプロモーターは、プラスミドpDAB7319；pDAB7321；pDAB7324；pDAB7326；pDAB7328；およびpDAB7330に以前に記載されているような遺伝子との作動可能な連結を通じて、例えば、LnD9DS-2、HxD9DS、およびMgD9DS発現カセットの発現を駆動するために、単独で、または組み合わせて使用されている。プラスミド内の転写調節領域を交換する方法は、当該技術分野において周知である。このように、PvPhasプロモーターを含むポリヌクレオチドフラグメントは、pDAB7319、pDAB7321、pDAB7324、pDAB7326、pDAB7328、またはpDAB7330（またはpDAB7319、pDAB7321、pDAB7324、pDAB7326、pDAB7328、またはpDAB7330を構築するために使用される先述のプラスミド）から削除され、LfKCS3またはFAE 1プロモーター領域のいずれかと置き換えられる。新しく構築されたプラスミドは、前の実施例で説明された手順にしたがって、安定した植物をキャノール変換するために使用される。トランスジェニックキャノール植物が単離され、分子的に特徴付けされる

40

50

。結果として得られるデルタ-9デサチュラーゼの蓄積が決定され、デルタ-9デサチュラーゼを堅牢に（robustly）発現するキャノーラ植物が同定される。

【0218】

デルタ-9デサチュラーゼの発現増加のための転写調節領域のさらなる改変には、表17に記載された配列のいずれかにより、既存のKozak配列を置換することが含まれる。デルタ-9デサチュラーゼの開始部位の上流の代替Kozak配列の操作は、標準的な分子生物学技術を使用して完了する。合成ポリヌクレオチドの断片を合成し、当該技術分野において周知の技術を用いて上流のデルタ-9デサチュラーゼのコード配列のクローンを作製する。開始コドンの状況は、導入遺伝子の発現レベルに強い影響を有する。表17にリストされているものにKozak配列を変更すると、異種のデルタ-9デサチュラーゼの発現レベルを増加させる

10

【表17】

表 17：発現を増加させるために異種のデルタ-9 デサチュラーゼ遺伝子上流に組み込まれる Kozak 配列。

コザック配列	配列番号：	配列
Kozak #1	配列番号：40	GGATCCAACAATG
Kozak #2	配列番号：41	ACAACCAAAAATG
Kozak #3	配列番号：42	ACAACCAACGTACCATGG
Kozak #4	配列番号：43	ACAACCAAAAATG

20

【0219】

実施例14：オオタバコガトウモロコシとレプトスファエリア ノドルム（*Leptosphaeria nodorum*）からデルタ-9デサチュラーゼ遺伝子の設計および合成

【0220】

植物における異種遺伝子の発現の高いレベルを得るためには、実施例2に記載されたコドン最適化戦略が変更され、そしてHzD9DSおよびLnD9DS-2用の異種遺伝子タンパク質をコードする領域は、新しい設計のプロトコルを使用して再操作された。

【0221】

コドンの選択は、将来の宿主植物のコドンバイアスを計算していたテーブルを使用して行われ、それはこの場合にはキャノーラであった。デルタ-9デサチュラーゼ遺伝子の植物発現をコードする領域を設計する際に、植物によって優先される主要な（「第1の選択」）コドンを選択し、約95%の時間で使用した。「第2の選択」コドンは、約5%の頻度で、控えめに使用された。したがって、新たなDNA配列は各デルタ-9デサチュラーゼのアミノ酸配列をコードするように設計され、ここで、新しいDNA配列は適切なアミノ酸をアミノ酸配列内の各位置で指定する植物による第1優先と第2優先のコドンの置換によって天然のデルタ-9デサチュラーゼ遺伝子とは異なっていた。その後、新しい配列は、その改変によって作成された可能性のある制限酵素部位を分析された。識別された制限酵素部位は、第1または第2の選択枝の優先性コドンによってコドンを置換することにより除去した。目的の遺伝子の転写または翻訳に影響を及ぼす可能性がある配列内の他の部位では、具体的に非常に安定したステムループ構造がまた削除された。

30

40

【0222】

キャノーラの遺伝コードからの好ましいコドン選択枝（第1及び第2の選択枝）の選択は、キャノーラについてのタンパク質コード配列からコンパイルされたコドンバイアス表から決定した。表18および19には、「天然の遺伝子%」というラベルの列は、セイヨウアブラナ（キャノーラ）のコード領域で見つかった、各アミノ酸の同義コドンの分布（そのアミノ酸の全てのコドンの使用に対する%）を提示する。M・病菌、H. ゼア、およびL. nodorumデルタ-9デサチュラーゼのアミノ酸配列を本質的にコードする新しいDNA配列は、キャノーラ遺伝子で見いだされた第1および第2の選択枝コドンの好ましいコドンの分布を用いて、キャノーラにおける最適な発現のために設計された。植物に最適化されたDNA配列の設計は、構築されたキャノーラコドンバイアス表を使用して、配列番号：12（M. 病菌）、

50

配列番号：13 (H・ゼア)、および配列番号：14 (L. nodorum) のタンパク質配列の逆翻訳をすることによって開始された。「Plnt Opt 遺伝子%」というラベルの列が、好ましいコドンおよびそれらがデルタ-9デサチュラーゼ遺伝子の設計に組み込まれた頻度を示す。SEQ ID NO：44および配列番号：45は、それぞれ、新しいキャノーラ最適化されたLnD9DS-2およびHzD9DSデサチュラーゼのヌクレオチド配列を示す。これらの新しいキャノーラ最適化された配列は、LnD9DS-2 v3およびHzD9DS v3として標示した。

【表18】

表 18 HzD9DS タンパク質のコード領域のコドン組成。天然のH・ゼアデサチュラーゼをコードする領域が、植物に最適化されたバージョンと比較されている。

アミノ酸	コドン	天然の遺伝子#	天然の遺伝子%	Plnt Opt 遺伝子#	Plnt Opt 遺伝子%	Plnt Opt Recm'd	アミノ酸	コドン	天然の遺伝子#	天然の遺伝子%	Plnt Opt 遺伝子#	Plnt Opt 遺伝子%	Plnt Opt Recm'd
ALA (A)	GCA	4	11.4	1	2.9	0.0	LEU (L)	CTA	2	5.9	0	0.0	0.0
	GCC	7	20.0	0	0.0	0.0		CTC	8	23.5	0	0.0	0.0
	GCG	8	22.9	0	0.0	0.0		CTG	14	41.2	0	0.0	0.0
	GCT	16	45.7	34	97.1	100.0		CTT	6	17.6	34	100.0	100.0
ARG (R)	AGA	1	7.7	0	0.0	0.0		TTA	2	5.9	0	0.0	0.0
	AGG	5	38.5	13	100.0	100.0		TTG	2	5.9	0	0.0	0.0
	CGA	2	15.4	0	0.0	0.0	LYS (K)	AAA	11	44.0	0	0.0	0.0
	CGC	5	38.5	0	0.0	0.0		AAG	14	56.0	25	100.0	100.0
	CGG	0	0.0	0	0.0	0.0	MET (M)	ATG	8	100	8	100	100.0
	CGT	0	0.0	0	0.0	0.0		TTC	20	83.3	24	100.0	100.0
ASN (N)	AAC	13	72.2	18	100.0	100.0	PHE (F)	TTT	4	16.7	0	0.0	0.0
	AAT	5	27.8	0	0.0	0.0		TTT	4	16.7	0	0.0	0.0
ASP (D)	GAC	16	64.0	2	8.0	0.0	PRO (P)	CCA	1	6.3	16	100.0	100.0
	GAT	9	36.0	23	92.0	100.0		CCC	5	31.3	0	0.0	0.0
CYS (C)	TGC	1	100.0	1	100.0	100.0		CCG	2	12.5	0	0.0	0.0
	TGT	0	0.0	0	0.0	0.0		CCT	8	50.0	0	0.0	0.0
END	TAA	1	100.0	0	0.0	0.0	SER (S)	AGC	2	12.5	0	0.0	0.0
	TAG	0	0.0	0	0.0	0.0		AGT	1	6.3	0	0.0	0.0
	TGA	0	0.0	1	100.0	100.0		TCA	1	6.3	1	6.3	0.0
	TGA	0	0.0	1	100.0	100.0		TCC	6	37.5	0	0.0	0.0
GLN (Q)	CAA	2	33.3	6	100.0	100.0		TCG	3	18.8	0	0.0	0.0
	CAG	4	66.7	0	0.0	0.0		TCT	3	18.8	15	93.8	100.0
GLU (E)	GAA	7	63.6	0	0.0	0.0	THR (T)	ACA	3	16.7	0	0.0	0.0
	GAG	4	36.4	11	100.0	100.0		ACC	7	38.9	18	100.0	100.0
GLY (G)	GGA	8	40.0	20	100.0	100.0		ACG	4	22.2	0	0.0	0.0
	GGC	6	30.0	0	0.0	0.0		ACT	4	22.2	0	0.0	0.0
	GGG	2	10.0	0	0.0	0.0	TRP (W)	TGG	14	100	14	100	0.0
	GGT	4	20.0	0	0.0	0.0		TAC	12	80.0	15	100.0	100.0
HIS (H)	CAC	11	73.3	15	100.0	100.0	TYR (Y)	TAT	3	20.0	0	0.0	0.0
	CAT	4	26.7	0	0.0	0.0		TAT	3	20.0	0	0.0	0.0
ILE (I)	ATA	3	15.0	1	5.0	0.0	VAL (V)	GTA	0	0.0	0	0.0	0.0
	ATC	10	50.0	19	95.0	100.0		GTC	5	26.3	0	0.0	0.0
	ATT	7	35.0	0	0.0	0.0		GTG	13	68.4	0	0.0	0.0
	ATT	7	35.0	0	0.0	0.0		GTT	1	5.3	19	100.0	100.0
Totals		165		165			Totals		189		189		

10

20

30

40

【表 19】

表 19 LnD9DS-2 タンパク質のコード領域のコドン組成。天然の *L. nodorum* デサチュラーゼをコードする領域が、植物に最適化されたバージョンと比較されている。

アミノ酸	コドン	天然の遺伝子 #	天然の遺伝子 %	Plnt Opt 遺伝子 #	Plnt Opt 遺伝子 %	Plnt Opt Recm'd	アミノ酸	コドン	天然の遺伝子 #	天然の遺伝子 %	Plnt Opt 遺伝子 #	Plnt Opt 遺伝子 %	Plnt Opt Recm'd
ALA (A)	GCA	3	9.4	0	0.0	0.0	LEU (L)	CTA	7	15.6	0	0.0	0.0
	GCC	9	28.1	0	0.0	0.0		CTC	14	31.1	0	0.0	0.0
	GCG	12	37.5	0	0.0	0.0		CTG	7	15.6	0	0.0	0.0
	GCT	8	25.0	32	100.0	100.0		CTT	5	11.1	45	100.0	100.0
ARG (R)	AGA	4	13.8	1	3.4	0.0		TTA	3	6.7	0	0.0	0.0
	AGG	3	10.3	28	96.6	100.0	LYS (K)	TTG	9	20.0	0	0.0	0.0
	CGA	7	24.1	0	0.0	0.0		AAA	9	45.0	0	0.0	0.0
	CGC	8	27.6	0	0.0	0.0	MET (M)	AAG	11	55.0	20	100.0	100.0
	CGG	5	17.2	0	0.0	0.0		ATG	9	100	9	100	100.0
	GGT	2	6.9	0	0.0	0.0	PHE (F)	TTC	16	80.0	20	100.0	100.0
ASN (N)	AAC	6	50.0	12	100.0	100.0		TTT	4	20.0	0	0.0	0.0
	AAT	6	50.0	0	0.0	0.0	PRO (P)	CCA	3	16.7	18	100.0	100.0
ASP (D)	GAC	16	66.7	2	8.3	0.0		CCC	8	44.4	0	0.0	0.0
	GAT	8	33.3	22	91.7	100.0		CCG	2	11.1	0	0.0	0.0
CYS (C)	TGC	4	80.0	5	100.0	100.0		CCT	5	27.8	0	0.0	0.0
	TGT	1	20.0	0	0.0	0.0	SER (S)	AGC	8	27.6	0	0.0	0.0
END	TAA	0	0.0	0	0.0	0.0		AGT	6	20.7	0	0.0	0.0
	TAG	1	100.0	0	0.0	0.0		TCA	1	3.4	1	3.4	0.0
	TGA	0	0.0	1	100.0	100.0		TCC	6	20.7	0	0.0	0.0
								TCG	7	24.1	0	0.0	0.0
GLN (Q)	CAA	10	55.6	18	100.0	100.0		TCT	1	3.4	28	96.6	100.0
	CAG	8	44.4	0	0.0	0.0	THR (T)	ACA	11	44.0	0	0.0	0.0
GLU (E)	GAA	5	33.3	1	6.7	0.0		ACC	5	20.0	25	100.0	100.0
	GAG	10	66.7	14	93.3	100.0		ACG	7	28.0	0	0.0	0.0
GLY (G)	GGA	13	34.2	38	100.0	100.0		ACT	2	8.0	0	0.0	0.0
	GGC	16	42.1	0	0.0	0.0	TRP (W)	TGG	19	100	19	100	0.0
	GGG	6	15.8	0	0.0	0.0		TAC	11	64.7	17	100.0	100.0
	GGT	3	7.9	0	0.0	0.0	TYR (Y)	TAT	6	35.3	0	0.0	0.0
HIS (H)	CAC	12	66.7	18	100.0	100.0		GTA	6	17.6	0	0.0	0.0
	CAT	6	33.3	0	0.0	0.0	VAL (V)	GTC	10	29.4	0	0.0	0.0
ILE (I)	ATA	4	18.2	1	4.5	0.0		GTG	12	35.3	0	0.0	0.0
	ATC	9	40.9	21	95.5	100.0		GTT	6	17.6	34	100.0	100.0
	ATT	9	40.9	0	0.0	0.0							
Totals		214		214			Totals		236		236		

【 0 2 2 3 】

配列番号：44および配列番号：45を含むDNA断片の合成は、PicoScriptとブルーヘロン・バイオテクノロジーによって行われた。次いで、合成DNAを発現ベクターにクローニングし、上述した実施例で説明したように、実質的キャノーラに形質転換した。

【 0 2 2 4 】

実施例15：植物におけるアシルCoAデサチュラーゼポリペプチドの蓄積を増加させるためのN-およびC-末端の改変

小胞体（ER）における膜結合蛋白質の蓄積と安定性は、それらのN末端とC末端のアミノ酸配列モチーフおよび改変の影響を受けることがある。Ravid および Hochstrasser (2008) Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 9:679-90。特に、N-およびC-末端のモチーフおよび改変は、菌類および植物ならびに動物の脂質デサチュラーゼの蓄積および安定性を調節することが示されている。McCartney et al. (2004) Plant J. 37:156-73; Mziaut et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97:8883-8。

【 0 2 2 5 】

FAD2またはFAD3のN末端へのMycまたはhemagglutinin (HA) エピトープタグのいずれかの追加は、有意に酵母内でのこれらの酵素の定常状態レベルを向上させる。O'Quin et al.

10

20

30

40

50

(2009) Appl Microbiol Biotechnol 83:117-25。従って、本発明のデルタ-9デサチュラーゼのN末端へのこれら、または類似のエピトープの添加を、植物におけるポリペプチドの発現を増加させるために利用する。Mycタグ（配列番号：46）またはHAタグ（配列番号：47）をコードするポリヌクレオチドリンカーは、デルタ-9デサチュラーゼ（例えば、HzD9DS、MgD9DS、AnD9DS、LnD9DS-1、LnD9DS-2）コーディング配列の5'末端内に連続したオープンリーディングフレームとしてクローニングされる。得られるコード配列を、実施例3に記載のクローニング戦略を用いて植物発現プラスミド内にクローニングする。新しく構築されたプラスミドを、シロイヌナズナおよび/またはキャノーラ植物細胞、材料、または組織に安定に形質転換するために使用する。トランスジェニック植物を、形質転換植物細胞、材料、または組織から再生する。トランスジェニック植物を単離し、分子的に特徴づける。トランスジェニック植物の種子における得られるデルタ-9デサチュラーゼの蓄積が決定され、ポリペプチドデルタ-9デサチュラーゼを堅牢に発現する植物を特定する。

【0226】

シロイヌナズナおよびキャノーラにおけるAnD9DSの発現からの証拠（実施例11および12）は、HzD9DSとLnD9DS-2と比較して、この特定の不飽和化酵素の発現の有意に高いレベルを示す。したがって、AnD9DSのコアデサチュラーゼドメイン（膜貫通セグメントおよび保存された触媒のヒスチジン残基を含む）の外側に位置するN-及びC末端のすべてまたは一部は、低い発現のデサチュラーゼにおける等価な残基を交換し、その発現を増加させるために使用することができる。従って、AnD9DSのN末端残基1-68およびC-末端残基281-455（それぞれ、配列番号：72および配列番号：73）の全部又は一部は、LnD9DS-2（配列番号：14）の68個のN-末端残基（1-68）および168個のC末端残基（281-449）、および/またはHzD9DS（配列番号：13）の76個のN末端残基（1-76）及び60個のC-末端残基（293-353）の全部または一部を置き換えるために使用される。得られるコード配列は、実施例3に記載のクローニング戦略を用いて植物発現プラスミド内にクローニングする。新しく構築されたプラスミドを、シロイヌナズナおよび/またはキャノーラ植物細胞、材料、または組織を安定に形質転換するために使用する。トランスジェニック植物を、形質転換植物細胞、材料、または組織から再生する。トランスジェニック植物を単離し、分子的に特徴づける。トランスジェニック植物の種子において得られるデルタ-9デサチュラーゼの蓄積が決定され、改変HzD9DSまたは改変LnD9DS-2ポリペプチドを堅牢に発現する植物を特定する。

【0227】

実施例16：植物内でのアシルCoAデサチュラーゼのmRNAの発現を増強するための改変mRNAの発現が安定化し、mRNAの蓄積を増加させる遺伝子エレメントを組み込むことによって向上させることができることは当該技術分野で公知である。HzD9DsまたはLnD9DS-2コーディング配列の近接への、5'および3'非翻訳領域（例えば、タバコオスモチン5'および3' UTR配列（Liuら（2003）Nat. Biotechnol. 21:1222-8）、およびタバコモザイクウイルスのΩ配列（Gallie et al. (1987) Nucleic Acids Res. 15:8693-711）、またはイントロン（Kozziel et al. (1996) Plant Mol. Biol. 32:393-405））の組み込みは、上記の遺伝子エレメントを欠いている同じコード配列の発現と比較した場合の導入遺伝子の発現レベルを増加させるために使用されている。デサチュラーゼPTU内にこれらの遺伝子エレメントを1以上加えることは、当技術分野で周知の方法に従って行われる。5'非翻訳領域、3'非翻訳領域、および/またはイントロンを含むポリヌクレオチド断片が、植物発現プラスミド（例えば、pDAB7319、pDAB7321、pDAB7324、pDAB7326、pDAB7328、pDAB7330、またはpDAB7319、pDAB7321、pDAB7324、pDAB7326、pDAB7328、もしくはpDAB7330を構築するために使用された前出のプラスミド）に標準的なクローニング方法を介して追加される。新しく構築されたプラスミドを、シロイヌナズナおよび/またはキャノーラ植物細胞、材料、または組織を安定に形質転換するために使用する。トランスジェニック植物を、形質転換植物細胞、材料、または組織から再生する。トランスジェニック植物を単離し、分子的に特徴づける。トランスジェニック植物の種子において得られるデルタ-9デサチュラ

ーゼの蓄積が決定され、HzD9DSまたはLnD9DS-2ポリペプチドを堅牢に発現する植物を特定する。

【0228】

さらに、OLE1のような酵母デサチュラーゼ遺伝子は高度に制御されていることが、当該技術分野で公知である。膜貫通領域をコードし、シトクロムb5ドメインの一部である配列の欠失は、OLE1の転写物の安定性を低減する。Vemula et al. (2003) J. Biol. Chem. 278(46):45269-79。OLE1内でのこれらの配列の存在はmRNAの安定化配列として作用する。したがって、LnD9DS-2またはHzD9DSコード配列への膜貫通領域およびシトクロムb5ドメインをコードするOLE1配列の取り込みを、コード配列のmRNA転写物の安定性を高めるために利用されることにより、より高いレベルの発現をもたらす。その後のLnD9DS-2またはHzD9DSポリペプチドの増加をもたらす。OLE1の膜貫通領域およびシトクロムb5ドメイン配列を含むキメラLnD9DS-2またはHzD9DSコード配列を、当技術分野で公知の方法を使用して構築する。このように生成されたコード配列を、植物発現プラスミドに組み込み（例えば、上記の実施例で説明したように）、アグロバクテリウム菌による植物の形質転換を経由してトランスジェニック植物を生成するために使用する。トランスジェニック植物は、単離され、特徴付けられる。得られるデルタ-9デサチュラーゼの蓄積が決定され、デルタ-9デサチュラーゼを堅牢に発現する植物が特定される。

10

【0229】

実施例17

代替的な3'非翻訳領域ターミネーターの使用

20

植物内のデルタ-9デサチュラーゼの安定な発現のために

利用可能な3'UTR-ターミネーターの数が限られていることにより、通常、アグロバクテリウムのORF 23の3'UTR-ターミネーター（AtuORF23 3'UTR）が、転写を終結するために使用される。最近、他の3'UTR-ターミネーターがシロイヌナズナで転写リードスルーを終結することにおいてより効果的であることが示された。したがって、インゲンマメファゼオリン3'UTR-terminator（配列番号：69）を、上流遺伝子の転写リードスルーを減らし、それによって転写干渉を低減するために、インゲンマメのゼオリンプロモーターと組み合わせ使用する。

【0230】

インゲンマメファゼオリン3'UTR-ターミネーター（PvPhas 3'UTR v1）が、LnD9DS-2 v2の発現カセット内、および以前にプラスミドpDAB7321およびpDAB7326において記載されたHzD9DS v2の発現カセット内に組み込まれた。当業者に周知である方法に従って、PvPhas 3'UTR v1を含むポリヌクレオチドフラグメントを、LnD9DS-2 v2の遺伝子の下流に配置し、バイナリープラスミドpDAB110110（図4a；配列番号：74）を作成する。PvPhas 3'UTR v1を含むポリヌクレオチドフラグメントはまた、HzD9DS v2の遺伝子の下流に配置し、バイナリープラスミドpDAB110112（図4b；配列番号：75）を作成する。

30

【0231】

得られたバイナリープラスミドを、制限酵素消化および配列決定によって確認した。新しく構築されたプラスミドは、シロイヌナズナおよび/またはキャノーラ植物細胞、材料、または組織を安定に形質転換するために、それぞれ使用される。トランスジェニック植物を、形質転換植物細胞、材料、または組織から再生する。トランスジェニック植物を単離し、分子的に特徴づける。トランスジェニック植物の種子において得られるデルタ-9デサチュラーゼの蓄積が決定され、HzD9DSまたはLnD9DS-2ポリペプチドを堅牢に発現する植物を特定する。

40

【 図 2 a 】

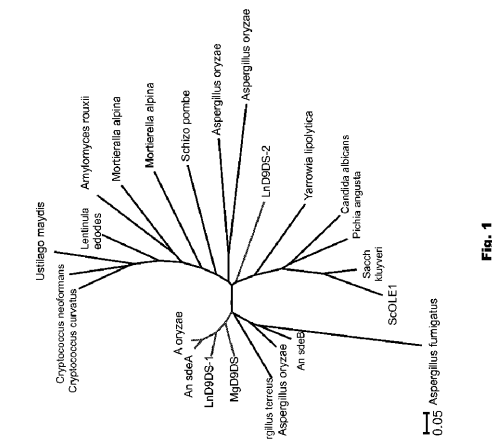


Fig. 1

[illegible]

Fig. 2a

【 図 2 b 】

(597) TCGGATATCGACCGGATATCGGATCTGTCTGGGACGACAGTGTATACACGCGCGTCT
(630) TCGGATATCGACCGGATATCGGATATCGGATCTGTCTGGGATCGTCTCGTCTCGTCTCGT
(284) TCGGATATCTACTCGGATATCACTAGATCTGGGCTCCACGCTCTGTATACAGGCTCTCG
(654) TTCTCTCTGAGATCTGTGCTGTGGCGCGCTCGGCGCTGTGCTGTGAGGGTTCCTATCT
(287) TACTCCGTAAGTACTGTTCTAGGCTCTGACGGCGCGGAGGAGTCTACAGGTAAGTCTGT
(341) TCTCGCGTCAAAATGCTGCTGGGCGCTCTGGGCGCTGTGGCGCTGGAGGCTCTCCATCAT
(711) GCTCTGCTGAGGCTGCTGACGACGCGCGCTGACGCGCGCTGACGCGCGCTGACGACGCG
(344) GATGCTGTGAGCGTCAATCTCGGCGCGCTGACGCGCGCTGACGCGCGCTGACGCGCGCT
(398) GATGCTGTGAGCGTCAATCTCGGCGCGCTGACGCGCGCTGACGCGCGCTGACGCGCGCT
(768) CCTATCAGTGTCTCCGACAAAGGCTCTCTCTACAGCGCTCTCGGATGAGTGTCTCATAGAG
(401) CCTACTCTCGTGTATGCGGCT
(455) CCTACTCTCGTGTATGCGGCT
(825) AGAACCTCAAGCAAGTCTACGCGCGCTGACGCGCTGACGCGCGCTGACGCGCGCTGACGCG
(458) GCGCGCTCAAGCAAGTCTACGCGCGCTGACGCGCTGACGCGCGCTGACGCGCGCTGACGCG
(512) AGAACCTCAAGCAAGTCTACGCGCGCTGACGCGCTGACGCGCGCTGACGCGCGCTGACGCG
(882) TCTCTCTGAGCGACGACGAAGTCT
(515) TACTCTGAGCGACGACGAAGTCT
(569) TCTCTGAGCGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGAC
(912) TCTCTCTGAGCGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGAC
(572) CCTATCTCTGAGCGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGAC
(626) CCTATCTCTGAGCGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGAC
(936) GTATCT
(629) GTATCT
(683) GTATCT
(1053) ATCTGATCTGCGCGGCT
(686) ATCTGATCTGCGCGGCT
(740) ATCTGATCTGCGCGGCT
(1110) CGGCT
(743) CGGCT
(797) CGGCT
(1167) ATCTGATCTGCGCGGCT
(800) ATCTGATCTGCGCGGCT
(854) ATCTGATCTGCGCGGCT

Fig. 2b

【 図 2 c 】

[illegible]

Fig. 2c

【 図 3 a 】

```

(1763)      ttggttgctctctctctctggcgacagagttaatattcaatttcttagcgatcgta
(1371)      -----
(1435)      -----

(1840)      gaaagcatcatgggtacgatgcagtcattgttagatggcctattgtttgtagcttc
(1371)      -----
(1435)      -----

(1897)      ctcgagtgattggstatgaaaagtacctcaccgctagaccagaatgaaaacatt
(1371)      -----
(1435)      -----

(1954)      caccatttcagaaaaaataaaaaaaatactcgaggggggccc
(1371)      -----
(1435)      -----

```

[illegible]

Fig. 3a

Fig. 2d

【 図 4 a 】

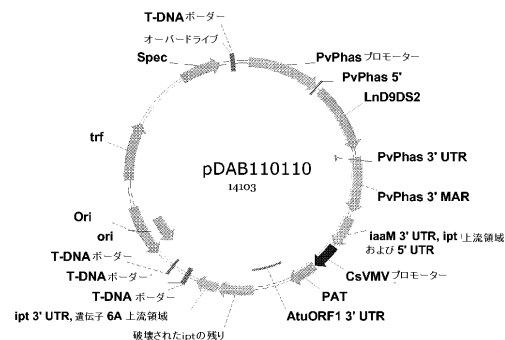
[illegible]

Fig. 4a

Fig. 3b

【 図 6 】

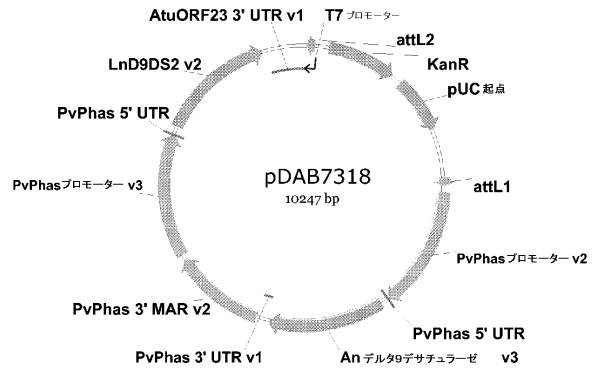


Fig. 6

[illegible]

【 図 8 】

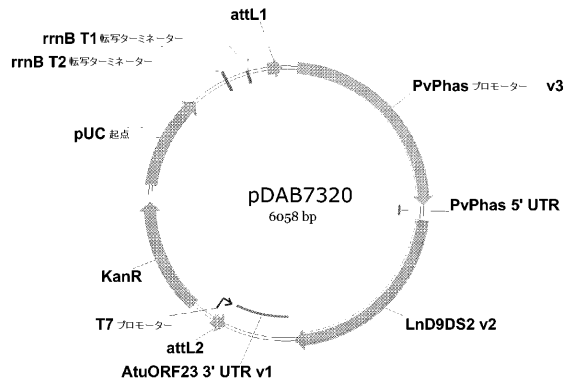
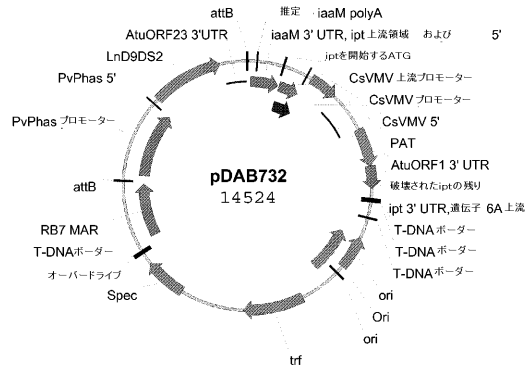
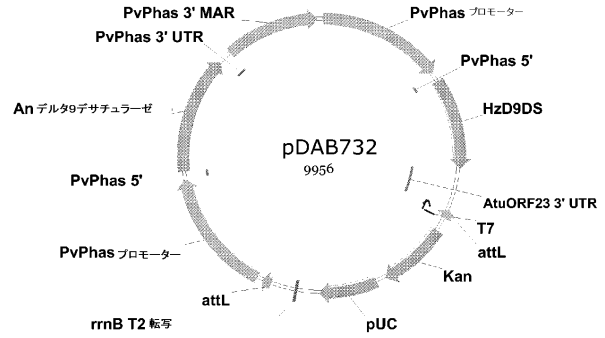


Fig. 8

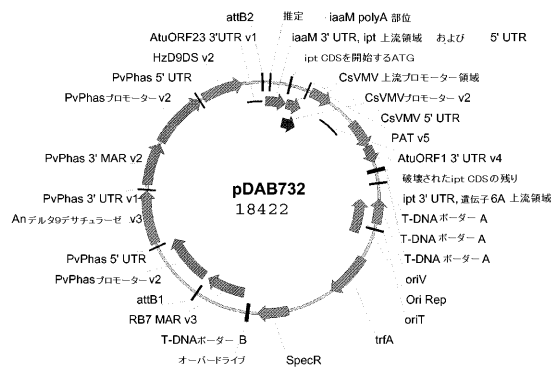
【図 9】



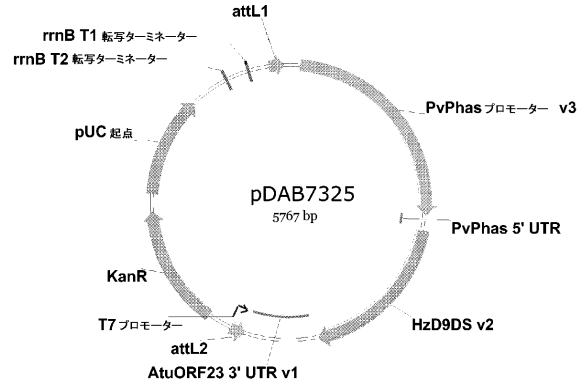
【図 10】



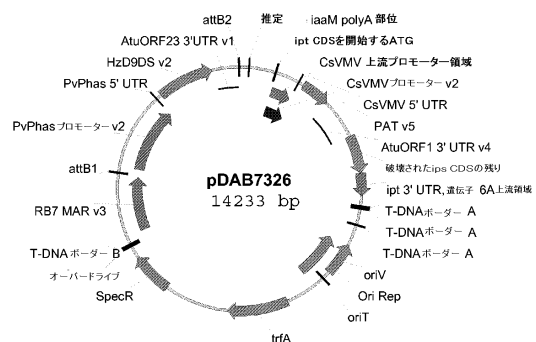
【図 11】



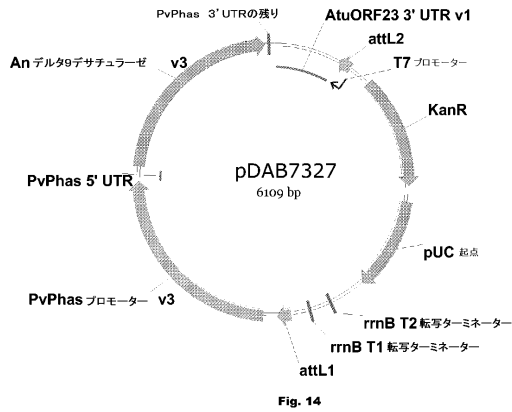
【図 12】



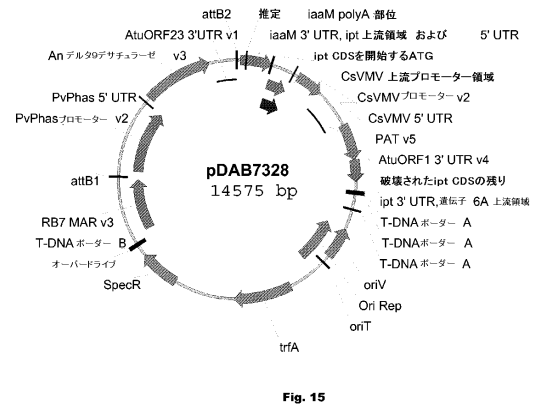
【図 13】



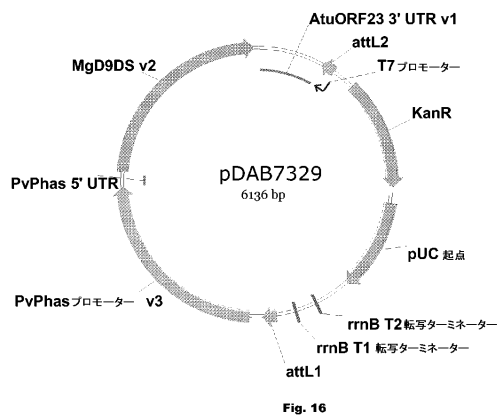
【図 14】



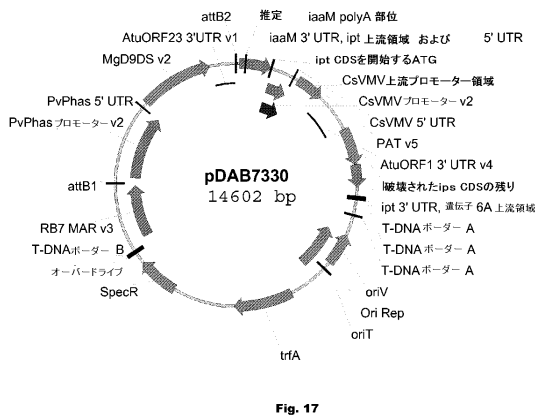
【図 15】



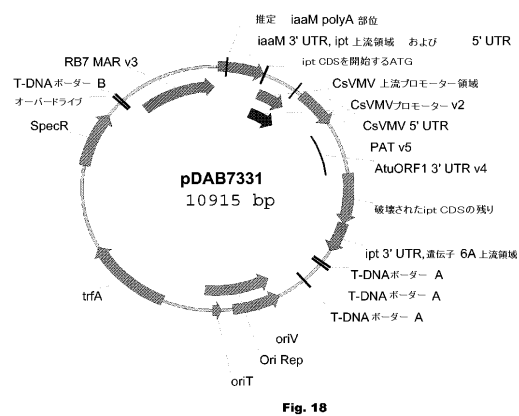
【図 16】



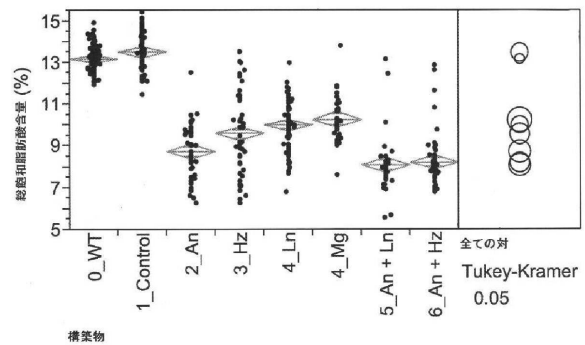
【図 17】



【図 18】



【図 19】



【図 20】

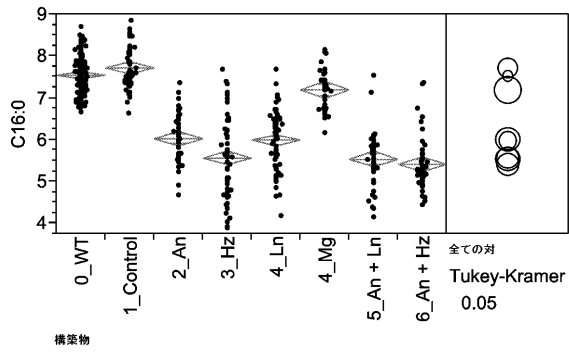


Fig. 20

【図 22】

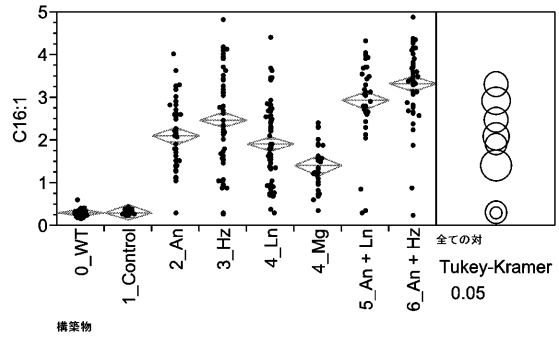


Fig. 22

【図 21】

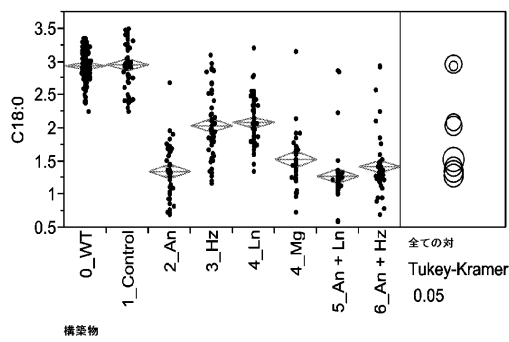


Fig. 21

【図 23】

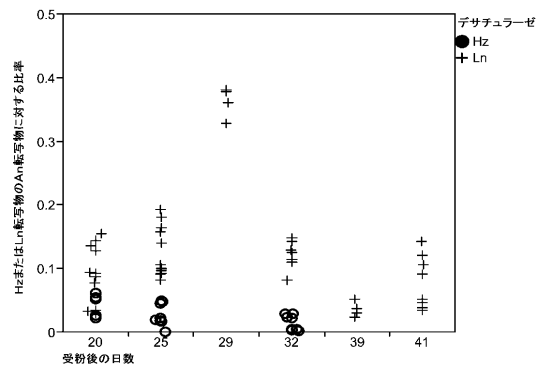


Fig. 23

【配列表】

[0006186463000001.app](#)

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 N 9/02 (2006.01) C 1 2 N 9/02

- (72)発明者 メルロ, アン オーウェンス
アメリカ合衆国 インディアナ州 4 6 0 3 2 , カーメル, ダービン ドライブ 1 1 8 4 5
- (72)発明者 ガショテ, ダニエル, ジェイ
アメリカ合衆国 インディアナ州 4 6 2 6 0 , インディアナポリス, ホリデー レーン 5 5 9
- (72)発明者 トンプソン, マーク, エー.
アメリカ合衆国 インディアナ州 4 6 0 7 7 , ジオンズヴィル, シルバー レイス コート 6 2 3
- (72)発明者 ウォルシュ, テレンス, エー.
アメリカ合衆国 インディアナ州 4 6 0 7 7 , ジオンズヴィル, プロモントリ トレイル 1 1 6 3 8
- (72)発明者 ベヴァン, スコット
アメリカ合衆国 インディアナ州 4 6 2 8 0 , インディアナポリス, ヘーロンズ シーヴィー 9 7 6 7

審査官 森井 文緒

- (56)参考文献 特表2008-515433(JP, A)
特表2002-529049(JP, A)
Database Uniprot [online], Accessin No.Q0TXE8, <<http://www.uniprot.org/uniprot/Q0TXE8.txt?version=32>> 15-Jun-2010 uploaded, Hane J.K. et al., Definition: Full=Putative uncharacterized protein
Database GenBank [online], Accessin No.CH445364, <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/62361722?sat=15&satkey=11445105>> 23-Nov-2007 uploaded, Birren, B. et al., Definition: Phaeosphaeria nodorum SN15 scaffold_40, whole genome shotgun sequence
Mol. Plant Pathol. (2006) vol.7, no.3, p.147-156

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
A 0 1 H 1 / 0 0
P u b M e d
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
W P I D S / W P I X (S T N)
G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q
U n i P r o t / G e n e S e q