

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6039560号
(P6039560)

(45) 発行日 平成28年12月7日(2016.12.7)

(24) 登録日 平成28年11月11日(2016.11.11)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (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)

A O 1 H 5/04 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

A O 1 H 5/00 A

A O 1 H 5/10

A O 1 H 5/02

A O 1 H 5/04

請求項の数 14 (全 42 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-527160 (P2013-527160)
 (86) (22) 出願日 平成23年8月29日(2011.8.29)
 (65) 公表番号 特表2013-538571 (P2013-538571A)
 (43) 公表日 平成25年10月17日(2013.10.17)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2011/049532
 (87) 国際公開番号 W02012/030711
 (87) 国際公開日 平成24年3月8日(2012.3.8)
 審査請求日 平成26年6月26日(2014.6.26)
 (31) 優先権主張番号 61/402,570
 (32) 優先日 平成22年8月30日(2010.8.30)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

前置審査

(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】 サトウキビ桿状ウイルス (S C B V) エンハンサーおよび植物機能ゲノミクスにおけるその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 の 3 3 7 位から 6 1 8 位に示されるサトウキビ桿状ウイルス (S C B V) エンハンサーエレメントの 1 つもしくは複数のコピーと、

それに作動可能に連結して、RNA ポリメラーゼ結合部位および mRNA 開始部位を含む異種プロモーターであって、植物において機能的であるプロモーターとを含むキメラ転写調節領域の核酸であって、

前記プロモーターがトウモロコシプロモーターであり、

対象のヌクレオチド配列が前記キメラ転写調節領域の調節制御下で転写されると、転写産物の量が、前記プロモーターを含み前記 S C B V エンハンサー配列 (複数可) は含まないキメラ転写調節領域を用いて得られる転写産物の量と比べて増強されている、前記キメラ転写調節領域の核酸。

【請求項 2】

3' 転写終結ポリヌクレオチド分子に作動可能に連結した転写可能なポリヌクレオチド分子に作動可能に連結した、請求項 1 に記載のキメラ転写調節領域の核酸を含む構築物。

【請求項 3】

前記転写可能なポリヌクレオチド分子が、それが発現される植物に農業形質を与える、請求項 2 に記載の構築物。

【請求項 4】

請求項 2 に記載の構築物で安定的に形質転換された、トウモロコシ植物であるトランス

10

20

ジェニック植物。

【請求項 5】

転写可能なポリヌクレオチド分子が、それが発現される植物に農業形質を与える、請求項 4 に記載のトランスジェニック植物。

【請求項 6】

請求項 4 に記載のトランスジェニック植物の種子。

【請求項 7】

請求項 1 に記載のキメラ転写調節領域の核酸を含む、トウモロコシ植物細胞であるトランスジェニック植物細胞。

【請求項 8】

請求項 2 に記載の構築物で植物細胞または組織を形質転換することを含む、トウモロコシ植物であるトランスジェニック植物を生産する方法。

【請求項 9】

請求項 2 に記載の構築物で形質転換されたトウモロコシ植物細胞または組織。

【請求項 10】

請求項 5 に記載のトランスジェニック植物から導出することが可能な植物細胞、果実、葉、根、苗条、花、種子、挿し木および有性繁殖または無性繁殖に有用な他の生殖物質、F1 ハイブリッドを含めた子孫植物、雄性不稔植物ならびに他のあらゆる植物および植物産物。

【請求項 11】

配列番号 1 の 337 位から 618 位に示されるサトウキビ桿状ウイルス (SCBV) エンハンサーエレメントの 1 つもしくは複数のコピーと、それに作動可能に連結して、RNA ポリメラーゼ結合部位および mRNA 開始部位を含むトウモロコシプロモーターを含むキメラ転写調節領域の核酸が、トウモロコシ植物細胞、組織または植物体のゲノムに無作為な位置で挿入されている、トウモロコシ植物細胞、組織または植物体。

【請求項 12】

配列番号 1 の 337 位から 618 位に示される前記 SCBV エンハンサーエレメントの 2 つ以上 のコピーを含み、SCBV エンハンサーが、前記 SCBV エンハンサーが非存在下での対象のヌクレオチド配列の転写と比べて、前記 SCBV エンハンサーの調節制御下にある対象のヌクレオチド配列の増強された転写を与える、請求項 11 に記載のトウモロコシ植物細胞、組織または植物体。

【請求項 13】

前記プロモーターが、トウモロコシ Adh1 プロモーター、トウモロコシユビキチン (Ubi) プロモーター、または Emu プロモーターである、請求項 1 に記載のキメラ転写調節領域の核酸。

【請求項 14】

配列番号 1 の 337 位から 618 位に示される前記 SCBV エンハンサーエレメントの 4 つ以上のコピーを含む、請求項 12 に記載の植物細胞、組織または植物体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2010 年 8 月 30 日に出願した米国特許仮出願第 61 / 402570 号の利益を主張するものであり、その全体は参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

本開示は、植物分子生物学および遺伝子工学の分野、ならびに、具体的には、植物において遺伝子発現および / またはタンパク質産生を調節する (たとえば、増強する) のに有用なポリヌクレオチド分子に関する。

【背景技術】

【0003】

たとえば、植物などの遺伝的に操作された生物において使用するために、転写可能な核

10

20

30

40

50

酸（たとえば、トランスジーン）の発現を指示する、制御するまたは他の方法で調節する遺伝子調節エレメントの継続的な必要性が存在する。遺伝子調節エレメントには典型的には、転写因子およびRNAポリメラーゼ結合部位（複数可）を含有する転写開始領域などの5'非翻訳配列、エンハンサー/サイレンサーエレメント、TATAボックスならびにCAATボックスが、3'ポリアデニル化配列、転写停止シグナル、翻訳開始および停止シグナル、スプライスドナー/アクセプター配列ならびにその他同類のものと共に含まれる。

【0004】

遺伝子工学のために、遺伝子調節エレメントは典型的には、発現ベクターまたは他の操作された構築物に含まれて、調節エレメントに作動可能に連結したトランスジーンの発現を調節する。このような様式で使用するプロモーターの周知の例はCaMV35Sプロモーター(Nagy et al. In: Biotechnology in plant science: relevance to agriculture in the eighties. Eds. Zaitlin et al. Academic Press, Orlando, 1985)、トウモロコシユビキチンプロモーター(Ubi; Christensen & Quail, Transgenic Research 5:213, 1996)およびEmuプロモーター(Last et al., Theor. Appl. Genet. 81 581, 1991)であるが、他にも多くのプロモーターが当業者には公知であろう。同様に、エンハンサーは、遺伝子工学において使用するために様々な供給源から単離されており、これらのエンハンサーには、カリフラワーモザイクウイルス(35S CaMV)エンハンサー、ゴマノハグサモザイクウイルス(FMV)エンハンサー、ピーナッツ萎黄病線条カリモウイルス(PCISV)エンハンサーまたはオシロイバナモザイクウイルス(MMV)エンハンサーが含まれる。

【0005】

たとえば、ベクターおよび他の操作された構築物などの異種核酸分子において、それに作動可能に連結した配列の発現を制御するよう利用することが可能なエンハンサードメインなどの遺伝子調節エレメントを同定する継続的な必要性が存在する。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明は以下を提供する。

[1] 配列番号1の337位から618位に示されるサトウキビ桿状ウイルス(SCBV)エンハンサーエレメント、またはその相同体の1つもしくは複数のコピー、ならびにそれに作動可能に連結して、RNAポリメラーゼ結合部位およびmRNA開始部位を含むプロモーターを含むキメラ転写調節領域であって、

対象のヌクレオチド配列が上記キメラ転写調節領域の調節制御下で転写されると、転写産物の量が、上記プロモーターを含み上記SCBVエンハンサー配列（複数可）は含まないキメラ転写調節領域を用いて得られる転写産物の量と比べて増強されている、上記キメラ転写調節領域。

[2] プロモーターが、植物ウイルス遺伝子、細菌遺伝子、真菌遺伝子、植物核遺伝子、植物核外遺伝子、無脊椎動物遺伝子、または脊椎動物遺伝子の上流領域から得られる、上記[1]に記載のキメラ転写調節領域。

[3] 3'転写終結ポリヌクレオチド分子に作動可能に連結した転写可能なポリヌクレオチド分子に作動可能に連結した、上記[1]に記載の転写開始領域を含む構築物。

[4] 上記転写可能なポリヌクレオチド分子が、それが発現される植物に農業形質を与える、上記[3]に記載の構築物。

[5] 上記[3]に記載の構築物で安定的に形質転換されたトランスジェニック植物。

[6] 転写可能なポリヌクレオチド分子が、それが発現される植物に農業形質を与える、上記[5]に記載のトランスジェニック植物。

[7] 上記構築物を含む、上記[5]に記載のトランスジェニック植物の種子。

[8] トウモロコシ植物である、上記[5]に記載のトランスジェニック植物。

[9] 上記[1]に記載のキメラ転写調節領域を含むトランスジェニック植物細胞。

[1 0] 上記 [3] に記載の構築物で植物細胞または組織を形質転換することを含む、トランスジェニック植物を生産する方法。

[1 1] トランスジェニック植物が双子葉植物である、上記 [1 0] に記載の方法。

[1 2] トランスジェニック植物が単子葉植物である、上記 [1 0] に記載の方法。

[1 3] 上記 [3] に記載の構築物で形質転換された植物細胞または組織。

[1 4] 双子葉植物由来である、上記 [1 3] に記載の植物細胞または組織。

[1 5] 単子葉植物由来である、上記 [1 3] に記載の植物細胞または組織。

[1 6] 上記 [6] に記載のトランスジェニック植物から導出することが可能な植物細胞、果実、葉、根、苗条、花、種子、挿し木および有性繁殖または無性繁殖に有用な他の生殖物質、F 1 ハイブリッドを含めた子孫植物、雄性不稔植物ならびに他のあらゆる植物および植物産物。

10

[1 7] 配列番号 1 の 3 3 7 位から 6 1 8 位に示されるサトウキビ桿状ウイルス (S C B V) エンハンサーエレメント、またはその相同体の 1 つもしくは複数のコピーを含み、上記 S C B V エンハンサーエレメントの 1 つまたは複数のコピーがトウモロコシ植物細胞、組織または植物体のゲノムに無作為な位置で挿入されている、トウモロコシ植物細胞、組織または植物体。

[1 8] S C B V エンハンサーが、上記 S C B V エンハンサーが非存在下での対象のヌクレオチド配列の転写と比べて、上記 S C B V エンハンサーの調節制御下にある対象のヌクレオチド配列の増強された転写を与える、上記 [1 7] に記載のトウモロコシ植物細胞、組織または植物体。

20

本開示は、エンハンサードメインおよび前記エンハンサードメインの増強制御下で転写調節ドメインを含む新規の転写調節領域を記載する。前記エンハンサードメインは、天然であるが以前認識されていなかった縦一列に配置された S C B V エンハンサーの複数（たとえば、2 つから 4 つまたはそれよりも多い）のコピーを含む。本開示の転写調節領域（プロモーター）は、前記エンハンサードメインが非存在のプロモーターと比べた場合、増強された転写を提供する。一例では、配列番号 1 の 3 3 7 位から 6 1 8 位に示される S C B V エンハンサーエレメントの 1 つまたは複数のコピーならびにそれに作動可能に連結して、RNA ポリメラーゼ結合部位および mRNA 開始部位を含むプロモーターを含むキメラ転写調節領域であって、対象のヌクレオチド配列が前記キメラ転写調節領域の調節制御下で転写された場合、前記プロモーターは含むが前記 S C B V エンハンサー配列は含まないキメラ転写調節領域を用いて得られる転写産物の量と比べて、転写産物の量が増強されている前記キメラ転写調節領域が開示される。

30

【 0 0 0 7 】

記載された転写調節領域および転写される DNA 配列を含む DNA 構築物も提供される。一例では、DNA 構築物は、3' 転写末端ポリヌクレオチド分子に作動可能に連結した転写可能なポリヌクレオチド分子に作動可能に連結した開示された転写開始領域を含む。前記 DNA 構築物は、転写される DNA 配列の増強された転写を提供する。前記開示された構築物を用いて形質転換されたトランスジェニック植物、植物細胞または組織（たとえば、双子葉または単子葉植物、植物細胞または組織）も開示される。開示されたトランスジェニック植物から誘導可能な植物種子、果実、葉、苗条、花、挿し木および有性繁殖または無性繁殖に有用な他の生殖物質、F 1 ハイブリッドを含めた子孫植物、雄性不稔植物ならびに他のあらゆる植物および植物産物も提供される。開示されたトランスジェニック植物、植物細胞または組織を生産する方法も本明細書において提供される。

40

【 0 0 0 8 】

本開示の前述のおよび他の特長は、添付図を参照して開始する以下の詳細な説明からさらに明らかになる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 0 9 】

【図 1】図 1 は S C B V プロモーターの配列を示す（ジェンバンク受託番号 A J 2 7 7 0

50

91.1 “Sugarcane bacilliform IM virus complete genome, isolate Ireng Maleng” の6758位～7596位に対応しており、この配列は2010年4月15日にオンラインで掲載された通りに参照によりその全体を本明細書に組み込まれる)。この配列は配列番号1にも示される。本研究において定義されるエンハンサー配列は、-222から-503まで伸びており、図では下線が引かれている(配列番号1の337位から618位に対応する)。

【図2】図2Aおよび図2Bは、SCBVプロモーターの解析結果を図示している。図2Aは、転写開始部位の-839bp、-576bpおよび-333bp上流からルシフェラーゼ(LUC)レポーター遺伝子に融合された転写開始部位の106bp下流までの配列を含有するSCBVプロモーターの断片を示している。図2Bは、上記プラスミドとUBI::GUSレポーター構築物を用いて同時形質転換されたHiII細胞由来のLUC/GUS活性の比のヒストグラムを示している。その結果から、転写開始部位の-576bp上流からの配列を含有するプロモーター断片は、開始部位の839bp上流を含有するプロモーター断片の活性の60%を有していたことが示されている。これとは対照的に、開始部位の-333bp上流からの配列を含有するプロモーター断片は完全長プロモーター(転写開始部位の-839上流から)の活性の10%しか有していなかった。したがって、プロモーター活性に関与する配列は-333bpの上流に属する。

【図3A】図3Aおよび図3Bは、本明細書に記載されるSCBVエンハンサーエレメントがトウモロコシAdh1プロモーターからの転写を増強することを図示している。-503から-222までのSCBVプロモーター配列の1、2および4コピーは、ホタルルシフェラーゼ遺伝子に融合された切断されたトウモロコシAdh1プロモーターの上流にクローニングされ(図3A)、比較のために、MMVエンハンサー配列の4コピーならびにMMVエンハンサーの2コピーとSCBVプロモーターの2コピーは切断されたトウモロコシAdh1プロモーターの上流にクローニングされ、ホタルルシフェラーゼ遺伝子に融合された(図3A)。これらの構築物は、UBI::GUSレポーター構築物と一緒にトウモロコシHi-II浮遊細胞に照射された。図3Bに示されるように、SCBVエンハンサーの1、2および4コピーを含有する構築物は、エンハンサーのない切断されたAdh1構築物を用いて照射された細胞のそれぞれ5倍、6倍および10倍を超える活性を有していた。4×MMV構築物は切断されたAdh1構築物の2.5倍の活性を有しており、2×MMV 2×SCBV構築物は切断されたAdh1構築物の6倍の活性を有していた。

【図3B】図3Aおよび図3Bは、本明細書に記載されるSCBVエンハンサーエレメントがトウモロコシAdh1プロモーターからの転写を増強することを図示している。-503から-222までのSCBVプロモーター配列の1、2および4コピーは、ホタルルシフェラーゼ遺伝子に融合された切断されたトウモロコシAdh1プロモーターの上流にクローニングされ(図3A)、比較のために、MMVエンハンサー配列の4コピーならびにMMVエンハンサーの2コピーとSCBVプロモーターの2コピーは切断されたトウモロコシAdh1プロモーターの上流にクローニングされ、ホタルルシフェラーゼ遺伝子に融合された(図3A)。これらの構築物は、UBI::GUSレポーター構築物と一緒にトウモロコシHi-II浮遊細胞に照射された。図3Bに示されるように、SCBVエンハンサーの1、2および4コピーを含有する構築物は、エンハンサーのない切断されたAdh1構築物を用いて照射された細胞のそれぞれ5倍、6倍および10倍を超える活性を有していた。4×MMV構築物は切断されたAdh1構築物の2.5倍の活性を有しており、2×MMV 2×SCBV構築物は切断されたAdh1構築物の6倍の活性を有していた。

【図4】図4は、逆転写とPCR(RT-PCR)を使用して解析された、非トランスジェニック(W)対照植物と比べたトランスジェニック(T)植物における4×SCBVの組込み部位に近い転写物(「フランキング遺伝子」)の蓄積を示している。ハウスキーピング遺伝子GAPDHのレベルは比較のために示されている。4×SCBVエンハンサーはそれが組み込まれる近くの遺伝子の転写物の蓄積の増加を引き起こした。転写物蓄積の

10

20

30

40

50

このような増加はおそらく転写速度の増加によって生じる。

【発明を実施するための形態】

【0010】

配列表

添付の配列表に収載されている核酸および／またはアミノ酸配列は、37 C.F.R. 1.822に定義される通りに、ヌクレオチド塩基を表す標準文字省略形およびアミノ酸を表す3文字コードを使用して示されている。それぞれの核酸配列の一方の鎖のみが示されているが、相補鎖は表示されている鎖を参照することにより含まれていると理解される。核酸配列（配列表または本明細書の他の場所の）は、標準の5'から3'方向に示されており、タンパク質配列は標準のアミノ（N）末端からカルボキシ（C）末端方向に示されている。

10

【0011】

配列番号1はSCBVプロモーターの核酸配列を示している（ジェンバンク受託番号AJ277091.1 “Sugarcane bacilliform IM virus complete genome, isolate Iren g Maleng” の6758位～7596位に対応しており、この配列は2010年4月15日にオンラインで掲載された通りに参照によりその全体を本明細書に組み込まれる）。

【0012】

本明細書に記載されるエンハンサーエレメントは、配列番号1の337位から618位までである。

【0013】

20

I. 省略形

3' UTR	3' - 非翻訳領域
5' UTR	5' - 非翻訳領域
Adh1	アルコールデヒドロゲナーゼ1
asRNA	アンチセンスRNA
cDNA	相補的DNA
dsRNA	二本鎖RNA
GAPDH	グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ
KB	キロバイト
kbp	キロ塩基対
LUC	ルシフェラーゼ
miRNA	マイクロRNA
nt	ヌクレオチド
ORF	オープンリーディングフレーム
PCR	ポリメラーゼ連鎖反応
RT-PCR	逆転写およびPCR
SCBV	トウモロコシ桿状(bacilliform)ウイルス
siRNA	低分子干渉RNA
ssRNA	一本鎖RNA
T _m	熱融解点
UTR	非翻訳領域

30

40

【0014】

II. 用語

他の方法で記述されなければ、専門用語は従来用法に従って使用される。分子生物学における一般用語の定義は、Benjamin Lewin、Genes V、published by Oxford University Press、1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology、published by Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); およびRobert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, published by VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8)に見い出し得る。

50

【 0 0 1 5 】

本発明の様々な実施形態の概説を促進するために、特定の用語の以下の説明が提供される。

【 0 0 1 6 】

5' および/または 3' : 核酸分子(たとえば、DNA および RNA) は、モノヌクレオチドが反応して、一モノヌクレオチドペントース環の 5' リン酸がリン酸ジエステル結合を介してその隣接するモノヌクレオチドの 3' 酸素に一方方向に結合されるような形でポリヌクレオチドを作るために、「5' 末端」および「3' 末端」を有すると言われる。したがって、ポリヌクレオチドの一末端は、その 5' リン酸がモノヌクレオチドペントース環の 3' 酸素に連結されていない場合は「5' 末端」と呼ばれる。ポリヌクレオチドのも
10
う一方の末端は、その 3' 酸素が別のモノヌクレオチドペントース環の 5' リン酸に連結されていない場合は「3' 末端」と呼ばれる。一モノヌクレオチドペントース環の 5' リン酸がその隣接するモノヌクレオチドの 3' 酸素に結合されるにもかかわらず、内部の核酸配列は 5' および 3' 末端を有すると言ってもよい。

【 0 0 1 7 】

直鎖状でも環状核酸分子でも、別々の内部エレメントは、「上流」もしくは 5' のエレメント、またはその「下流」もしくは 3' のエレメントであると呼ばれる。DNA に関しては、この用語法は、転写が DNA 鎖に沿って 5' から 3' 方向に進行することを反映している。プロモーターおよびエンハンサーエレメントは、連結された遺伝子の転写を指示するが、一般にはコード領域の 5' または上流に位置する。しかし、エンハンサーエレ
20
メントはプロモーターエレメントおよびコード領域の 3' に位置している場合でもその効果を発揮することができる。転写終結およびポリアデニル化シグナルはコード領域の 3' または下流に位置している。

【 0 0 1 8 】

農業形質：植物形態、生理機能、成長発育、収量、栄養増強、疾患もしくは有害生物抵抗性、または環境もしくは薬剤耐性が含まれるがこれらに限定されない、植物の特徴的は、農業形質である。「増強された農業形質」は、非ストレス条件下での増加した収量および環境ストレス条件下での増加した収量を含む収量増加を含むがこれに限定されない農業形質の測定可能な改良を指す。ストレス条件には、たとえば、旱魃、日陰、菌類病、ウイルス病、細菌病、昆虫来襲、線虫来襲、低温露出、熱曝露、浸透ストレス、減少した窒素
30
栄養分利用性、減少したリン栄養分利用性および高い植物密度が含まれ得る。「収量」は、草高、さや数、植物上のさや位置、節間の数、さや粉碎(shatter)の発生率、粒径、結節形成および窒素固定の効率、栄養素同化の効率、生物および非生物ストレスへの抵抗性、炭素同化、植物構造、倒伏への抵抗性、パーセント種子発芽、苗力、ならびに未成熟(juvenile)形質を限定なく含む多くの特性により影響を受けることがある。収量は、発芽の効率(ストレスを加えられた条件での発芽を含む)、成長速度(ストレスを加えられた条件での成長速度を含む)、穂数、穂あたりの種子数、種子径、種子の組成(デンプン、油、タンパク質)および種子充填(seed fill)の特徴にも影響を受けることがある。収量の増加は、窒素、リンおよび炭水化物などの重要な生化学化合物の改良された利用から、または寒さ、暑さ、旱魃、塩および有害生物または病原体による攻撃などの環境ストレスに
40
対する改良された応答から生じることもある。本開示において使用される組換え DNA を使用して、植物成長調節物質の発現が改変されるまたは細胞周期もしくは光合成経路が改変された結果として、成長発育が改良され最終的に収量が増加する植物を提供することも可能である。農業形質および植物におけるそのような形質を変更する追加の例は本明細書において提供されるおよび/または当業者により認識されるであろう。

【 0 0 1 9 】

変更；ポリヌクレオチド(たとえば、本発明の核酸によりコードされるポリペプチド)における変更は、この用語が本明細書において使用されるときには、ポリヌクレオチド配列における任意の欠失、挿入および点変異を含む。この定義内に含まれるのは、ポリペプチドをコードするゲノム DNA 配列に対する変更である。同様に、用語「変更」は、ポリ
50

ペプチド配列における欠失、挿入および点変異を指すのに使用されることもある。

【0020】

産生または発現のレベルを変更する：核酸分子またはアミノ酸分子（たとえば、s i R N A、m i R N A、m R N A、遺伝子、ポリペプチド、ペプチド）の産生または発現のレベルを、産生または発現の対照レベルと比べて、増加させるまたは減少させることにより、変えること。

【0021】

増幅：核酸に関連して使用される場合、これは、試料または検体において核酸分子のコピー数を増加させる技法を指す。増幅の例はポリメラーゼ連鎖反応であり、対象から収集された生物学的試料を、試料中の核酸鋳型へのプライマーのハイブリダイゼーションを可能にする条件下で、一对のオリゴヌクレオチドプライマーに接触させる。前記プライマーは適切な条件下で伸長され、鋳型から解離され、次に再アニールされ、伸長され、解離されて核酸のコピー数を増幅する。インビトロ増幅の産物は、標準技法を使用して、電気泳動、制限エンドヌクレアーゼ切断パターン、オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションもしくはライゲーション、および/または核酸塩基配列決定により特徴付けることが可能である。インビトロ増幅法の他の例には、鎖置換増幅（米国特許第5744311号参照）、転写なし等温増幅（米国特許第6033881号参照）、修復連鎖反応増殖（W O 90/01069参照）、リガーゼ連鎖反応増殖（E P - A - 320 308参照）、ギャップ充填リガーゼ連鎖反応増殖（米国特許第5427930号参照）、結合リガーゼ検出(coupled ligase detection)とP C R（米国特許第6027889号参照）、およびN A S B A（商標）R N A転写なし増幅（米国特許第6025134号参照）が含まれる。

【0022】

アンチセンス、センスおよびアンチジーン(Antigene)：D N Aは、2本の逆平行鎖、プラス鎖と呼ばれる5'→3'鎖およびマイナス鎖と呼ばれる3'→5'鎖を有する。R N Aポリメラーゼは核酸を5'→3'方向に付加するために、D N Aのマイナス鎖は転写中R N Aに対して鋳型として働く。したがって、R N A転写物は、マイナス鎖に相補的であり、プラス鎖と同一である配列を有することになる（例外として、Tの代わりにUが使われる）。

【0023】

アンチセンス分子は、R N AまたはD N Aのプラス鎖に特異的にハイブリダイズ可能である(hybridizable)または特異的に相補的である分子である。センス分子は、D N Aのマイナス鎖に特異的にハイブリダイズ可能であるまたは特異的に相補的である分子である。アンチジーン分子は、D N A標的に向けられるアンチセンスまたはセンス分子である。アンチセンスR N A(a s R N A)は、センス(コード)核酸分子に相補的なR N Aの分子である。

【0024】

アンチセンス阻害：この用語は、翻訳されているm R N Aの少なくとも一部に相補的であるR N A分子が細胞内に存在することに起因する遺伝子発現（たとえば、宿主細胞ゲノムまたはウイルスなどの病原体のゲノムの発現）の細胞質、核またはオルガネラ阻害に基づくクラスの遺伝子調節を指す。

【0025】

c D N A（相補的D N A）：内部非コードセグメント（イントロン）および転写調節配列を欠くD N Aの断片。c D N Aは、対応するR N A分子における翻訳制御に関与する非翻訳領域（U T R）も含むことがある。c D N Aは通常、細胞または他の試料から抽出されたメッセンジャーR N Aから逆転写により実験室で合成される。

【0026】

キメラのまたはキメラ：2つまたはそれよりも多い異なるポリヌクレオチドまたはポリペプチド分子の部分の融合産物。たとえば、語句「キメラ配列」および「キメラ遺伝子」は、少なくとも2つの異種部分に由来するヌクレオチド配列を指す。キメラ配列はD N AまたはR N Aを含んでいてもよい。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 7 】

キメラ転写調節領域：それに作動可能に連結した核酸の転写を指示する核酸制御または調節配列のアレイであって、異なるポリヌクレオチド供給源から構築されるアレイ。たとえば、本明細書に記載されるキメラ転写調節領域は、既知のプロモーターまたは他のポリヌクレオチド分子の操作を通じて作製され得る。キメラ転写調節領域は、たとえば、第1の天然プロモーター由来の異種エンハンサードメインをそれ独自の部分的または完全な組の調節エレメント（複数可）を有する第2のプロモーターに融合させることにより、1つまたは複数のエンハンサードメインを1つまたは複数のプロモーターと組み合わせてもよい。本開示は、特に、植物（複数可）において活性なプロモーターに融合された（すなわち、動作可能に連結した）少なくとも1つのS C B Vエンハンサードメインを含有するキメラ転写調節領域を提供する。

10

【 0 0 2 8 】

構築物：任意の供給源に由来し、ゲノム組込みまたは自律複製が可能であり、1つまたは複数の転写可能なポリヌクレオチド分子が作動可能に連結しているポリヌクレオチド分子を含む、プラスミド、コスミド、ウイルス、自律的に複製するポリヌクレオチド分子、ファージ、または直鎖状もしくは環状一本鎖もしくは二本鎖DNAもしくはRNAポリヌクレオチド分子などの任意の組換えポリヌクレオチド分子。

【 0 0 2 9 】

対照植物：トランスジェニック植物において（たとえば）増強されたまたは変更された農業形質を与える組換えDNAを含有していない植物は、たとえば、トランスジェニック植物において増強されたまたは変更された農業形質を同定するために、比較のためのベースラインとして使用される。適切な対照植物はトランスジェニック植物を生み出すために使用される親系統の非トランスジェニック植物、または試験中の特定の形質には少なくとも非トランスジェニックである植物でもよい（つまり、対照植物は、他の異種配列または組換えDNA分子を含有するように操作されていてもよい）。したがって、対照植物は、いくつかの場合には、試験植物において、空のベクターまたはマーカー遺伝子を含むが、組換えDNAを含有していない、または組換えDNAのすべてを含有しているわけではないトランスジェニック植物系統であってもよい。

20

【 0 0 3 0 】

コサプレッション(cosuppression)：内在性遺伝子に対して実質的な相同性を有する外来（異種）遺伝子を発現し、外来性遺伝子と内在性遺伝子の両方の発現を抑制すること。

30

【 0 0 3 1 】

DNA（デオキシリボ核酸）：DNAは大半の生物の遺伝物質を構成する長鎖ポリマーである（一部のウイルスはリボ核酸（RNA）を含む遺伝子を有する）。DNAポリマーにおける繰り返し単位は4種の異なるヌクレオチドであり、そのそれぞれが、リン酸基が結合しているデオキシリボース糖に結合している4種の塩基、アデニン、グアニン、シトシンおよびチミンのうちの1つを含む。ヌクレオチドのトリプレット（コドンと呼ばれる）は、ポリペプチドにおけるそれぞれのアミノ酸を、または停止シグナルをコードしている。コドンという用語は、DNA配列が転写されてできるmRNAにおける3種のヌクレオチドの対応する（および相補的な）配列を表すのにも使用される。

40

【 0 0 3 2 】

他の方法で明記されていなければ、DNA分子へのいかなる言及もそのDNA分子の逆相補体を含む。一本鎖であること(single-strandedness)が本明細書の本文により要求されている場合を除けば、DNA分子は一本鎖のみを描写するように書かれているが、二本鎖DNA分子の両方の鎖を包含する。

【 0 0 3 3 】

コードする：ポリヌクレオチドは、その天然状態でまたは当業者には公知の方法により操作される場合に、前記ポリヌクレオチド分子が転写されるおよび/または翻訳されて、mRNAおよび/またはポリペプチドもしくはその断片を産生するならば、ポリペプチドをコードしていると言われる。アンチセンス鎖は、そのような核酸の相補体であり、コー

50

ド配列はそこから推定することが可能である。

【 0 0 3 4 】

エンハンサードメイン：遺伝子発現の全体的制御の側面を与えるシス作用性転写調節エレメント（シスエレメントとしても知られる）。エンハンサードメインは、転写を調節するトランス作用性タンパク質因子である転写因子に結合するように機能し得る。一部のエンハンサードメインは1よりも多い転写因子に結合し、転写因子は1よりも多いエンハンサードメインと異なる親和性で相互作用することがある。エンハンサードメインは、欠失解析（5'末端または内部からプロモーターまでの1つまたは複数のヌクレオチドを欠失させる）、DNAアーゼIフットプリント法を使用するDNA結合タンパク質解析、メチル化干渉法、電気泳動移動変化アッセイ、ライゲーション媒介PCRによるインビボゲノムフットプリント法、および他の従来のアッセイを含むいくつかの技法により、または従来のDNA配列比較法を使用する既知のシスエレメントモチーフとのDNA配列比較により同定することが可能である。エンハンサードメインの微細構造は、1つもしくは複数のヌクレオチドの変異誘発（または置換）により、または他の従来の方法によりさらに研究することが可能である。エンハンサードメインは、化学合成によりまたはそのようなエレメントを含むプロモーターからの単離により得ることができ、それに続く操作を促進する有用な制限酵素部位を含有する追加の隣接ヌクレオチドを用いて合成することが可能である。

10

【 0 0 3 5 】

（遺伝子）発現：DNA分子の転写されたRNA分子への転写のこと。さらに一般的には、遺伝子にコードされた情報が細胞内において存在し機能する構造物に転換されるプロセスのこと。発現された遺伝子には、mRNAに転写されその後タンパク質に翻訳される遺伝子およびRNAに転写されるがタンパク質には翻訳されない遺伝子（たとえば、siRNA、トランスファーRNAおよびリボソームRNA）が含まれる。したがって、遺伝子または遺伝子のプロモーター領域などの標的配列の発現により、mRNA、タンパク質または両方を発現することができる。標的配列の発現は阻害するまたは増強する（減少させるまたは増加させる）ことができる。遺伝子発現は、時間的、空間的、発生的、または形態的性質ならびに定量的または定性的表示に関連して記載し得る。

20

【 0 0 3 6 】

遺伝子調節活性：作動可能に連結した転写可能なまたは翻訳可能なポリヌクレオチド分子の転写または翻訳に影響を与えるポリヌクレオチドの能力のこと。遺伝子調節活性を有する単離されたポリヌクレオチド分子は、時間的もしくは空間的発現を与えるまたは作動可能に連結した転写可能なポリヌクレオチド分子の発現のレベルおよび速度を調節し得る。遺伝子調節活性を有する単離されたポリヌクレオチド分子には、プロモーター、イントロン、リーダー、または3'転写終結領域が含まれ得る。

30

【 0 0 3 7 】

遺伝子サイレンシング：遺伝子サイレンシングは、クロマチン再構成などのゲノム（DNA）レベルでのまたは転写安定性もしくは翻訳に対する効果を通じた転写後レベルでの効果に限定されないがその結果としての遺伝子発現の欠如（または減少）を指す。現在の証拠では、RNA干渉（RNAi）が転写および転写後遺伝子サイレンシングに関与する主要プロセスであることが示唆される。

40

【 0 0 3 8 】

RNAiは転写および/または転写後レベルでその効果を発揮するために、RNAiを使用して同じ遺伝子からの別の転写物を特異的に阻害することができると考えられている。

【 0 0 3 9 】

異種の：通常では（たとえば、野生型配列では）第2の配列に隣接して見出されることのない種類の配列のこと。一実施形態では、前記配列は、ウイルスまたは生物または種などの、前記第2の配列とは異なる遺伝子供給源由来である。

【 0 0 4 0 】

50

ハイブリダイゼーション：オリゴヌクレオチドおよびその類似体は、ワトソン - クリック、フーグスティーンまたは逆フーグスティーン水素結合を含む水素結合により、相補的塩基間においてハイブリダイズする。一般に、核酸は、ピリミジン（シトシン（C）、ウラシル（U）およびチミン（T））またはプリン（アデニン（A）およびグアニン（G））である窒素含有塩基からなる。これらの窒素含有塩基はピリミジンとプリンとの間において水素結合を形成し、ピリミジンのプリンへの結合は塩基対合と呼ばれる。さらに具体的には、AはTまたはUに水素結合し、GはCに結合する。RNA分子では、GはUにも結合する。相補的であるとは、2つの異なる核酸配列または同じ核酸配列の2つの異なる領域間で起きる塩基対合を指す。

【0041】

10

特定の程度の厳密性を生じるハイブリダイゼーション条件は、一般に好まれるハイブリダイゼーション法の性質ならびにハイブリダイズする核酸配列の組成および長さに応じて変化することになる。一般に、ハイブリダイゼーションの温度およびハイブリダイゼーションバッファのイオン強度（特に、 Na^+ 濃度）がハイブリダイゼーションの厳密性を決定する。特定の程度の厳密性を達成するのに必要なハイブリダイゼーション条件に関する計算はSambrook et al. (ed.), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, chapters 9 and 11により考察されており、この文献は参照により本明細書に組み込まれる。

【0042】

以下はハイブリダイゼーション条件の模範的な組であり、限定的であることを意図していない。

20

超高厳密性（90%配列同一性を共有する配列を検出する）

ハイブリダイゼーション：5×SSCで65、16時間

洗浄2回：それぞれ2×SSCで室温（RT）、15分間

洗浄2回：それぞれ0.5×SSCで65、20分間

高厳密性（80%またはそれよりも大きい配列同一性を共有する配列を検出する）

ハイブリダイゼーション：5×～6×SSCで65～70、16～20時間

洗浄2回：それぞれ2×SSCでRT、5～20分間

洗浄2回：それぞれ1×SSCで55～70、30分間

低厳密性（50%よりも大きい配列同一性を共有する配列を検出する）

30

ハイブリダイゼーション：6×SSCでRTから55、16～20時間

洗浄少なくとも2回：それぞれ2×～3×SSCでRT～55、20～30分間

【0043】

シスで：2つの配列がRNAまたはDNAの同じ断片上に配置されていることを示す。

【0044】

トランスで：2つの配列がRNAまたはDNAの異なる断片上に配置されていることを示す。

【0045】

産業用農作物：主にヒトもしくは動物による消費にまたは工業工程において（たとえば、製造用脂肪酸またはアルコール生産用の糖の供給源として）使用するために栽培される作物。多くの例では、植物または植物から生産される産物（たとえば、甘味料、油、小麦粉または穀物）は消費することが可能であり、したがって、産業用農作物のサブセットは食用作物であることは理解されるであろう。食用作物の例には、トウモロコシ、ダイズ豆、イネ、コムギ、アブラナ、ワタ、カラスムギ、オオムギ、およびジャガイモ植物が含まれるが、これらに限定されない。産業用農作物（食用作物を含む）の他の例は本明細書に収載されている。

40

【0046】

（標的配列の発現を）妨害するまたは阻害する：この語句は、標的配列を担持する分子の発現および/または安定性を測定可能な程度に減少させる siRNAもしくは miRNAなどの小型RNA (small RNA) または他の分子の能力を指す。標的配列は、遺伝子もし

50

くは遺伝子のプロモーター領域などのDNA配列、またはmRNAなどのRNA配列を含むことができる。発現を「妨害するまたは阻害する」は、遺伝子または配列の最終産物、たとえば、コードされたタンパク質もしくはタンパク質、核酸、他の生体分子の発現もしくは機能、または標的配列により影響を受ける生物学的機能の減少を企図しており、したがって、mRNA転写物または他の標的配列の量または寿命の減少を含む。いくつかの実施形態では、小型RNAまたは他の分子は、標的配列の発現を阻害するクロマチン修飾を導く。前記語句は相対的であり、配列の絶対的阻害（抑制）を必要としないことは理解されている。したがって、ある種の実施形態では、標的配列の発現を妨害するまたは阻害するは、小型RNAまたは他の分子（たとえば、1つもしくは複数の小型RNAをコードするベクターまたは他の構築物）の適用に続いて、前記配列は、適用前よりも少なくとも5%低く、少なくとも10%低く、少なくとも15%低く、少なくとも20%低く、少なくとも25%低く、またはそれよりもはるかに減少して発現されることを必要とする。したがって、いくつかの特定の実施形態では、小型RNAまたは他の分子の適用により、標的配列の発現が約30%、約40%、約50%、約60%、またはそれよりも多く減少する。小型RNAまたは他の分子が特に効果的である特定の例では、発現は70%、80%、85%、90%、95%、またはそれよりもはるかに多く減少する。

【0047】

単離された：「単離された」生物学的成分（たとえば、核酸、ペプチドまたはタンパク質）は、前記成分が天然に存在する生物の細胞における他の生物学的成分、たとえば、他の染色体および染色体外DNAおよびRNA、ならびにタンパク質から実質的に分離されている、これらから離れて産生されている、またはこれらから精製されている。したがって、「単離されている」核酸、ペプチドおよびタンパク質には、標準精製法により精製された核酸およびタンパク質が含まれる。前記用語は、宿主細胞において組換え発現により調製された核酸、ペプチドおよびタンパク質ならびに化学的に合成された核酸も包含する。

【0048】

メタボローム：単一の生物、試料、組織、細胞または何であれ他の区分に分割されるものに存在する比較的分子量の分子（代謝物）の全数(complement)のこと。例として、メタボロームは、代謝中間体、ホルモンおよび他のシグナル伝達分子ならびに二次代謝産物を含み得る。代表的なメタボロームは、植物、植物部分もしくは植物試料などの生物学的試料内に、またはその懸濁液もしくは抽出物に見出される代謝物の全数を含む。そのような分子の例には、酸および関連する化合物；モノ-、ジ-およびトリ-カルボン酸（飽和、不飽和、脂肪族および環状、アリル、アルカリール）；アルド酸、ケト酸；ラクトン形(lactone forms)；ジベレリン；アブシジン酸；アルコール、ポリオール、誘導体および関連する化合物；エチルアルコール、ベンジルアルコール、メタノール；プロピレングリコール、グリセロール、フィトール；イノシトール、フルフリルアルコール、メントール；アルデヒド、ケトン、キノン、誘導体および関連する化合物；アセトアルデヒド、ブチルアルデヒド、ベンズアルデヒド、アクロレイン、フルフラール、グリオキサール；アセトン、ブタノン；アントラキノン；炭水化物；モノ-、ジ-、トリ-サッカライド；アルカロイド、アミンおよび他の塩基；ピリジン（ニコチン酸、ニコチンアミドを含む）；ピリミジン（シチジン、チミンを含む）；プリン（グアニン、アデニン、キサンチン/ヒポキサンチン、キネチンを含む）；ピロール；キノリン（イソキノリンを含む）；モルフィナン、トロパン、シンコナン(cinchonans)；ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、誘導体および関連する化合物；グアノシン、シトシン、アデノシン、チミジン、イノシン；アミノ酸、オリゴペプチド、誘導体および関連する化合物；エステル；フェノールおよび関連する化合物；複素環式化合物および誘導体；ピロール、テトラピロール（コリノイドおよびポルフィン/ポルフィリン、w/w/o金属イオン）；フラボノイド；インドール；脂質（脂肪酸およびトリグリセリドを含む）、誘導体および関連する化合物；カロテノイド、フィトエン；ならびにステロール、テルペンを含むイソプレノイドが含まれるが、これらに限定されない。

【 0 0 4 9 】

マイクロRNA (miRNA) : およそ21ヌクレオチド長で、動物および植物を含む多様な生物に見出される小型の非コードRNA遺伝子産物。miRNAは、miRNA遺伝子に由来する構造化したフォールドバック形成(foldback-forming)前駆体転写物から生じること以外はsiRNAに構造的に似ている。miRNA遺伝子の一次転写物はヘアピン構造を形成し、多ドメインRNase III様ヌクレアーゼDICERおよびDROSHA (動物において) またはDICER-LIKE 1 (DCL1; 植物において) によりプロセシングされてmiRNA二重鎖を産生する。成熟miRNAは、二重鎖巻き戻し後にRISC複合体に組み込まれる。植物miRNAは、完全なまたはほぼ完全な相補性を有するそのRNA標的と相互作用する。

10

【 0 0 5 0 】

ヌクレオチド : ヌクレオチドという用語には、ピリミジン、プリンもしくはその合成類似体などの糖に連結している塩基、またはペプチド核酸(PNA)におけるように、アミノ酸に連結している塩基を含むモノマーが含まれるが、これらに限定されない。ヌクレオチドは、オリゴヌクレオチド/ポリヌクレオチドにおける一モノマーである。ヌクレオチド配列は、オリゴヌクレオチド/ポリヌクレオチドにおける塩基の配列を指す。

【 0 0 5 1 】

DNAの主なヌクレオチドは、デオキシアデノシン5'-三リン酸(dATPまたはA)、デオキシグアノシン5'-三リン酸(dGTPまたはG)、デオキシシチジン5'-三リン酸(dCTPまたはC)およびデオキシチミジン5'-三リン酸(dTTPまたはT)である。RNAの主なヌクレオチドは、アデノシン5'-三リン酸(ATPまたはA)、グアノシン5'-三リン酸(GTPまたはG)、シチジン5'-三リン酸(CTPまたはC)およびウリジン5'-三リン酸(UTPまたはU)である。イノシンも、ヌクレオチドにおいてDNAまたはRNAに組み込まれることができる塩基である(それぞれdITPまたはITP)。

20

【 0 0 5 2 】

(植物の)油生産種 : トリアシルグリセロールを生産し、特定の器官に、主に種子に貯蔵する植物種。そのような種には、ダイズ豆(Glycine nizam)、ナタネおよびキャノーラ(たとえば、セイヨウアブラナ(Brassica napus)、ブラッシカ・ラパ(Brassica rapa)およびハクサイ(Brassica campestris))、ヒマワリ(Helianthus annuus)、ワタ(Gossypium hirsutum)、トウモロコシ(Zea mays)、ココア(カカオ(Theobroma cacao))、ベニバナ(Carthus tinctorius)、アブラヤシ(ギニアアブラヤシ(Elaeis guineensis))、ココヤシ(Cocos nucifera)、アマ(Linum usitatissimum)、トウゴマ(Ricinus communis)、ならびにピーナッツ(Arachis hypogaea)が含まれるが、これらに限定されない。

30

【 0 0 5 3 】

オリゴヌクレオチド : オリゴヌクレオチドは、リン酸ジエステル結合により結合された複数のヌクレオチドであり、約6から約300ヌクレオチド長である。オリゴヌクレオチド類似体は、オリゴヌクレオチドに類似して機能するが、天然には存在しない部分を有する化合物を指す。たとえば、オリゴヌクレオチド類似体は、変更された糖部分などの天然には存在しない部分またはホスホロチオエートオリゴデオキシヌクレオチドなどの糖間結合(inter-sugar linkage)を含有することができる。天然に存在するポリヌクレオチドの機能的類似体はRNAまたはDNAに結合することができる。

40

【 0 0 5 4 】

作動可能に連結した : この用語は、成分、特にヌクレオチド配列の、前記成分の正常な機能が遂行され得るような近接した配置を指す。したがって、第1の核酸配列は、前記第1の核酸配列が第2の核酸配列と機能的な関係に配置されている場合は、第2の核酸配列と作動可能に連結している。たとえば、プロモーターは、前記プロモーターがコード配列の転写または発現に影響を与えるならば、コード配列に作動可能に連結している。一般に、作動可能に連結したDNAは近接しており、2つのタンパク質コード領域を結合させることが必要な場合には、同じ読み枠にある。調節配列(複数可)に「作動可能に連結して

50

いる」コード配列は、前記コード配列を前記調節配列の調節制御（たとえば、転写および／または翻訳制御）下で発現することができるヌクレオチド配列の配置を指す。

【0055】

ORF（オープンリーディングフレーム）：終結コドンがない、アミノ酸をコードする一連のヌクレオチドトリプレット（コドン）。これらの配列は通常、ペプチドに翻訳可能である。

【0056】

パーセント配列同一性：2つの配列が最適に整列された場合（適切なヌクレオチド挿入、欠失またはギャップが総数で比較のウィンドウ(window)にわたり基準配列の20%未満である）、試験（「対象」）ポリヌクレオチド分子（またはその相補鎖）と比べた、基準（「クエリー」）ポリヌクレオチド分子（またはその相補鎖）の直鎖状ポリヌクレオチド配列における同一のヌクレオチドのパーセント。比較ウィンドウを整列させるための配列の最適整列化は当業者には周知であり、スミスとウォーターマンの局所的相同性アルゴリズム(local homology algorithm)、ニードルマンとブンシュの相同性整列化アルゴリズム(homology alignment algorithm)、ピアソンとリップマンの類似性探索法(search for similarity method)などのツールを使用して行い得る。そのような比較は、好ましくは、GAP、BESTFIT、FASTAおよびGCG（登録商標）Wisconsin Package（登録商標）(Accelrys Inc.、Burlington、Mass.)の一部として入手可能なTFASTAなどのこれらアルゴリズムのコンピュータ化された実装を使用して実施される。試験配列と基準配列の整列されたセグメントに対する「同一性割合」は、前記2つの整列された配列に共有される同一成分の数割る基準配列セグメントにおける成分の総数（すなわち、全基準配列または基準配列の小さいほうの定義された部分）である。パーセント配列同一性は、同一性割合掛ける100として表される。1つまたは複数のポリヌクレオチド配列の比較は、完全長ポリヌクレオチド配列もしくはその一部まで、またはさらに長いポリヌクレオチド配列までであり得る。実質的なパーセント配列同一性は、少なくとも約80%配列同一性、少なくとも約90%配列同一性、または約98%もしくは約99%配列同一性などのさらに大きな配列同一性である。

【0057】

植物：任意の植物およびその子孫。前記用語は、種子、挿し木、塊茎、果実、花、等を含む植物の部分も含む。様々な実施形態では、植物という用語は、トウモロコシ、ワタ、キャノーラ、ヒマワリ、ダイズ豆、モロコシ、アルファルファ、コムギ、イネ、果実および野菜を生産する植物などの栽培植物種ならびに芝生および鑑賞植物種を指す。本明細書で使用される、植物細胞という用語は、プロトプラストおよびその周囲の細胞壁からなる植物の構造的および生理的単位を指す。本明細書で使用される、植物器官という用語は、根、茎、葉または胚などの植物の異なる明白に区別される部分を指す。

【0058】

さらに一般的には、植物組織という用語は、植物体内(in planta)または培養下における植物の任意の組織を指す。この用語は、全植物、植物細胞、植物器官、プロトプラスト、細胞培養物、または構造的および機能的単位に組織される植物細胞の任意の群を含む。

【0059】

ポリヌクレオチド分子：ゲノムまたは合成起源の一本鎖または二本鎖DNAまたはRNA、すなわち、5'（上流）末端から3'（下流）末端に読み取られる、それぞれデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチド塩基のポリマー。

【0060】

ポリペプチド分子：モノマーが、アミド結合を通じて互いに結合しているアミノ酸残基であるポリマー。アミノ酸がアルファアミノ酸の場合、L-光学異性体でもD-光学異性体でも使用することが可能であり、L-異性体のほうが好ましい。本明細書で使用される、ポリペプチドまたはタンパク質という用語は、任意のアミノ酸配列を包含し、糖タンパク質などの修飾された配列を含む。ポリペプチドという用語は、天然に存在するタンパク質ならびに組換え的にまたは合成的に産生されるタンパク質を含むように特に意図されて

いる。

【 0 0 6 1 】

転写後遺伝子サイレンシング (P T G S) : 阻害機構が転写後に生じる遺伝子サイレンシングの一種。これにより、特定の R N A 標的の定常状態レベルが減少するまたは翻訳が阻害されることがある (Tuschl, ChemBiochem, 2: 239-245, 2001)。前記文献では、R N A 干渉 (R N A i) および転写後同時抑制という用語は、多くの場合、転写後遺伝子サイレンシングを示すのに使用される。

【 0 0 6 2 】

プロモーター：たとえば、R N A ポリメラーゼ I I および他のタンパク質 (トランス作用性転写因子) を認識し結合して転写を開始することにより核酸の転写を指示する一連の核酸制御配列。プロモーターは、ポリメラーゼ I I 型プロモーターの場合の T A T A エlementなどの、転写開始部位近くに不可欠な核酸配列を含む。最小限で、プロモーターは典型的には、少なくとも R N A ポリメラーゼ結合部位と一緒に含み、転写因子による占有に応答して転写を調節する 1 つまたは複数の転写因子結合部位も含み得る。プロモーター (および組み立ててプロモーターを産生することができる Element) の代表例が本明細書には記載されている。プロモーターは、その時間的、空間的または発生的発現パターンにより定義し得る。

10

【 0 0 6 3 】

植物プロモーターは、植物細胞において機能的である天然のまたは非天然のプロモーターである。

20

【 0 0 6 4 】

タンパク質：遺伝子により発現されアミノ酸からなる生体分子、たとえば、ポリペプチド。

【 0 0 6 5 】

プロトプラスト：形質転換されるおよび / または細胞培養物もしくは全植物に再生される潜在力を有する、細胞壁のない単離された植物細胞。

【 0 0 6 6 】

精製された：精製されたという用語は、絶対的純度を必要とせず、むしろ、相対語として意図されている。したがって、たとえば、精製された融合タンパク質調製物は、その生成環境において、たとえば、細胞内または生化学反応室において、融合タンパク質のほうがタンパク質よりも濃縮されている調製物である。好ましくは、融合タンパク質の調製物は、融合タンパク質が前記調製物の全タンパク質含有量の少なくとも 5 0 % に相当するように精製されている。

30

【 0 0 6 7 】

組換え体：組換え核酸は、天然には存在しない配列を有する、または配列の 2 つの別の方法で分離されたセグメントを人為的に組み合わせることにより作製される配列を有する核酸である。この人為的組合せは、化学合成によりまたは、さらに一般的には、核酸の単離されたセグメントの人為的操作により、たとえば、遺伝子操作技法により実現されることが多い。

【 0 0 6 8 】

同様に、組換えタンパク質は、組換え核酸分子によりコードされたタンパク質である。

40

【 0 0 6 9 】

調節可能な (regulatable) プロモーター：その活性が、転写因子、化学化合物、環境条件、または核酸分子などの作用因子により調節される (直接的にまたは間接的に) プロモーター。

【 0 0 7 0 】

遺伝子発現を調節する：遺伝子発現に影響を与える作用因子の発現、産生または活性を増加させるまたは減少させることにより遺伝子の発現を制御するプロセスのこと。作用因子は、遺伝子もしくはその上流の調節配列または前記遺伝子にコードされた m R N A と接触すると、遺伝子発現を増加させるまたは減少させる、転写因子などのタンパク質、また

50

は *miRNA* もしくは *siRNA* などの核酸分子でもよい。

【0071】

調節配列またはエレメント：これらの用語は、一般に、作動可能に連結した転写可能なポリヌクレオチド分子の転写または翻訳、およびそれによって遺伝子の発現に影響を与えるまたは制御するクラスのポリヌクレオチド分子（たとえば、DNA配列を有するDNA分子）を指す。前記用語に含まれるのは、プロモーター、エンハンサー、リーダー、イントロン、遺伝子座調節領域、境界エレメント/インシュレーター、サイレンサー、マトリックス付着領域（スキャフォールド付着領域とも呼ばれる）、リプレッサー、転写ターミネーター（転写終結領域としても知られる）、複製起点、セントロメアおよび減数分裂組換えホットスポットである。プロモーターは、RNAポリメラーゼへの結合部位として機能しそこから転写が開始される遺伝子の5'末端近くのDNAの配列である。エンハンサーは、通常、プロモーターからのエンハンサーの配向または距離とは無関係にプロモーターからの転写レベルを上昇させる制御エレメントである。遺伝子座調節領域（LCR）は、それが連結している遺伝子に組織特異的なおよび時間的に調節された発現を与える。LCRは遺伝子に対するその位置とは無関係に機能するが、コピー数依存性である。LCRは、ヌクレオソーム構造を開くように機能し、したがって他の因子がDNAに結合することができると考えられている。LCRは、複製タイミングおよび開始点使用にも影響を与え得る。インシュレーター（境界エレメントとしても知られる）は、周囲のクロマチンの影響を遮断することにより、遺伝子の転写の活性化（または不活化）を妨げるDNA配列である。サイレンサーおよびリプレッサーは、遺伝子発現を抑制する制御エレメントであり、遺伝子からのその配向または距離とは無関係に遺伝子に作用する。マトリックス付着領域（MAR）は、スキャフォールド付着領域としても知られるが、核スキャフォールドに結合するDNA内の配列である。マトリックス付着領域は、おそらく染色体を調節ドメインに分離することにより、転写に影響を与えることができる。MARは、染色体内で高次ループ構造を媒介すると考えられている。転写ターミネーターは、RNAポリメラーゼが鋳型から放出される遺伝子近傍内の領域である。複製起点は、DNA合成または細胞分裂の複製段階中に、DNAの複製過程を開始するゲノムの領域である。減数分裂組換えホットスポットは、減数分裂中に平均よりも頻繁に組換えを行うゲノムの領域である。調節領域内の特定のヌクレオチドは複数の機能を果たし得る。たとえば、特定のヌクレオチドはプロモーターの一部であり、転写活性化因子タンパク質の結合に関与し得る。

【0072】

細胞内（たとえば、植物または植物細胞内）で機能する単離された調節エレメントは、たとえば、遺伝子操作を通じて、植物表現型を改変するのに有用である。

【0073】

RNA：リン酸ジエステル結合により連結されたリボ核酸モノマーの典型的な直鎖状ポリマー。天然に存在するRNA分子は3つの一般的クラス、すなわち、メッセンジャー（mRNA、タンパク質をコードしている）、リボソーム（rRNA、リボソームの成分）およびトランスファー（tRNA、タンパク質合成中リボソームにアミノ酸モノマーを運ぶのに関与している分子）に分類される。メッセンジャーRNAは、ヘテロ核（hnRNA）および膜結合性ポリソームRNA（粗面小胞体に結合している）を含む。全RNAは、あらゆる種類のRNA分子の異種混合物を指す。

【0074】

RNA干渉（RNAi）：小型RNA（miRNAおよびsiRNAを含む）を伴う遺伝子サイレンシング機構は、RNAiという広義の用語の下で言及されることが多い。RNAiの天然の機能には、トランスポゾンおよびウイルスなどの可動遺伝子エレメントによる侵入に対するゲノムの保護ならびに遺伝子発現の調節が含まれる。

【0075】

RNA干渉により、生物内の遺伝子の発現は不活化されるまたは抑制される。RNAiは、2つの一般的経路のうちの1つにより引き起こすことができる。第一に、RNAiは、抑制のための標的であるRNAに相補的な配列を有する低分子干渉RNA（siRNA

、通常約21ヌクレオチド長であり、2つの不對ヌクレオチドがそれぞれの3'末端にあるdsRNA二重鎖の形で送達される)の直接細胞送達により引き起こすことができる。第二に、RNAiは、siRNAが様々な種類の設計され発現される遺伝子からインビボで形成されるいくつかの方法の1つにより引き起こすことができる。これらの遺伝子は典型的には、分子内または分子間二重鎖(dsRNA)を形成するRNA分子を発現し、この二重鎖は天然の酵素(DICERまたはDCL)によりプロセッシングされてsiRNAを形成する。いくつかの場合、これらの遺伝子は、完全なまたはほぼ完全な塩基対合した「ヘアピン」形成RNA転写物を発現し、不完全なヘアピン形成転写物の一部がマイクロRNA(miRNA)と名付けられた特殊な小型RNAを生じる。どちらの一般的方法でも、RNA分解酵素(RISCと名付けられる)に標的RNAを切断するまたはサイレンスするよう指示する「ガイド配列」として機能するのはsiRNA(またはmiRNA)である。いくつかの場合、RNAi誘導遺伝子をトランスジェニック生物のゲノムに組み込むのは有益である。例は、RNAi誘導トランスジーンにより特定の遺伝子を抑制するよう改変されている植物であろう。現在実施中の大半の方法では、RNAiは、dsRNA(2つの転写物がアニールしてdsRNAを形成する分子内もしくはヘアピン、または分子間)を発現するトランスジーンによりトランスジェニック植物において引き起こされる。

10

【0076】

RNAサイレンシング：RNAベースの遺伝子サイレンシングまたはRNAiを示すのに使用される一般用語。

20

【0077】

配列同一性：2つの核酸配列または2つのアミノ酸配列間の類似性は配列間の類似性の観点から表され、他の点では配列同一性と呼ばれる。配列同一性はパーセンテージ同一性(または類似性または相同性)の観点から測定されることが多く、パーセンテージが高くなるに従って、2つの配列の類似性も多くなる。SCBVエンハンサーエレメントの相同体などの、本明細書で言及されるまたは開示される配列の相同体は、標準法を使用して整列される場合は比較的高い程度の配列同一性を有することになる。

【0078】

比較のための配列の整列化の方法は当技術分野では周知である。様々なプログラムおよび整列化アルゴリズムが、Smith and Waterman (Adv. Appl. Math. 2: 482, 1981); Needleman and Wunsch (J. Mol. Biol. 48: 443, 1970); Pearson and Lipman (PNAS. USA 85: 2444, 1988); Higgins and Sharp (Gene, 73: 237-244, 1988); Higgins and Sharp (CABIOS 5: 151-153, 1989); Corpet et al. (Nuc. Acids Res. 16: 10881-90, 1988); Huang et al. (Comp. Appls Biosci. 8: 155-65, 1992);およびPearson et al. (Methods in Molecular Biology 24: 307-31, 1994)に記載されている。Altschul et al. (Nature Genet., 6: 119-29, 1994)は、配列整列化法および相同性計算の詳細な検討を提示している。

30

【0079】

整列化ツールALIGN(Myers and Miller, CABIOS 4: 11-17, 1989)またはLFASTA(Pearson and Lipman, 1988)を使用して配列比較を実施し得る(Internet Program(著作権)1996, W. R. Pearson and the University of Virginia, fasta20u63" version 2.0u63, release date December 1996)。ALIGNは全配列を互いに比較し、LFASTAは局所的類似性の領域を比較している。これらの整列化ツールおよびその指導書はインターネットのbiology.ncsa.uiuc.edu.で入手可能である。

40

【0080】

開示されている配列のオルソログまたはパラログ(さらに一般的には相同体)は典型的には、デフォルトパラメータに設定されたALIGNを使用してそれが比較される配列との完全長整列化にわたって計測される75%よりも大きな配列同一性を有することにより特徴付けられる。基準配列とのほかに大きな類似性を有する配列は、この方法により評価される場合、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも9

50

2 %、少なくとも95 %、または少なくとも98 %配列同一性などの、パーセンテージ同一性が増加していくことになる。さらに、配列同一性は、開示された融合タンパク質の1つのまたは両方の結合ドメインの完全長にわたって比較することが可能である。そのような場合、パーセンテージ同一性は、完全長配列同一性について考察される同一性に基本的に類似することになる。

【0081】

全配列より著しく少ない配列が配列同一性について比較されている場合、相同体は典型的には、10 ~ 20 アミノ酸の短いウィンドウにわたり少なくとも80 %の配列同一性を有することになり、基準配列とのその類似性に応じて、少なくとも85 %、少なくとも90 %、少なくとも95 %、または少なくとも99 %の配列同一性を有し得る。そのような短いウィンドウにわたる配列同一性は、LFASTAを使用して決定することが可能であり、方法はワールドワイドウェブアドレスbiology.ncsa.uiuc.eduに見出すことができる。当業者であれば、これらの配列同一性の範囲は指導のためのみに提供され、提供された範囲外に分類される極めて重要な相同体が得られることが完全にあり得ることを認識するであろう。本開示は、上に記載されるペプチド相同体のみならず、そのような相同体をコードする核酸分子も提供する。

【0082】

2つの核酸分子は密接に関係していることを別に示すものは、前記2つの分子が厳密な条件下で互いにハイブリダイズすることである。厳密な条件は配列依存性であり、異なる環境パラメータ下では異なる。一般に、定義されたイオン強度およびpHで、特定の配列についての熱融点(T_m)よりも約5 から20 低い厳密な条件が選択される。 T_m は、標的配列の50 %が完全に適合するプローブとハイブリダイズする温度である(定義されたイオン強度およびpH下で)。核酸ハイブリダイゼーションの条件および厳密性の計算は、Sambrook et al. (In Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York, 1989)およびTijssen (Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology Part I, Ch. 2, Elsevier, New York, 1993)に見出すことができる。厳密な条件下で開示されているSCBVエンハンサー配列にハイブリダイズする核酸分子は典型的には、65 、0.2 × SSC、0.1 % SDSの洗浄条件下で、全融合タンパク質コード配列、全結合ドメインまたは前記コード配列の他の選択された部分のいずれかに基づくプローブにハイブリダイズするであろう。

【0083】

高度な同一性を示さない核酸配列が、それにもかかわらず、遺伝コードの縮重により類似するアミノ酸配列をコードすることがある。この縮重を使用して核酸配列に変化を加えて、それぞれが実質的に同じタンパク質をコードする複数の核酸配列を作製することができることは理解されている。

【0084】

低分子干渉RNA(sRNA): DICER酵素(動物において)またはDCL酵素(植物において)によりdsRNAからプロセシングされるおよそ21 ~ 25ヌクレオチドのRNA。最初のDICERまたはDCL産物は二本鎖であり、前記2本の鎖は典型的には21 ~ 25ヌクレオチド長であり、それぞれの3'末端に2つの不對塩基を含有する。前記二本鎖sRNA構造内の個々の鎖は分離され、次に典型的には、前記sRNAの1つがマルチサブユニット複合体であるRNAi-誘導サイレンシング複合体(RISC)と会合する。sRNAの典型的な機能は、塩基対相補性に基づいてRISCを標的まで導くことである。

【0085】

転写可能なポリヌクレオチド分子: RNA分子に転写されることが任意のポリヌクレオチド分子。転写可能なポリヌクレオチド分子が、翻訳されてしたがってタンパク質産物として発現される機能的mRNA分子に転写されるように構築物を細胞内に導入するための方法は当業者には公知である。対象の特定のRNA分子の翻訳を阻害するために、アンチセンスRNA分子を発現することができる構築物も構築し得る。構築物および宿主

細胞を調製し使用するための従来の組成物および方法は当業者には周知である(たとえば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、3rd edition Volumes 1、2、and 3. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press、2000参照)。

【0086】

転写：DNA配列の相補的コピーとしてRNAポリメラーゼによりRNA分子を産生すること。

【0087】

転写終結領域：転写物の3'末端の形成を制御する配列。自己切断リボザイムおよびリアデニル化配列は転写終結配列の例である。

【0088】

転写遺伝子サイレンシング(TGS)：遺伝子プロモーター領域および時にはコード領域と相同であるdsRNAの形成により引き起こされる現象。TGSにより、DNAおよびヒストンメチル化ならびにクロマチン再構築が生じ、それによってRNA分解ではなく転写阻害が引き起こされる。TGSもPTGSもdsRNAに依存しており、dsRNAは低分子(21~25ヌクレオチド)干渉RNAに切断される(Eckhardt、Plant Cell、14:1433-1436、2002; Aufsatz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 99:16499-16506、2002)。

【0089】

トランスジェニック：この用語は、普通このタイプ/種の実体には見出されることはなく、人的操作により問題の実体に(または前記実体の前駆体に)導入されている組換え遺伝物質(すなわち、異種遺伝物質)を含有する植物/真菌/細胞/他の実体または生物を指す。したがって、形質転換により組換えDNAを導入される植物細胞(形質転換された植物細胞)から栽培される植物はトランスジェニック植物であり、(性的であれ無性生殖的に生産されるのであれ)導入されたトランス遺伝子を含有する植物のすべての子孫も同じである。

【0090】

形質転換：異種DNAがレシピエント細胞に入りそれを変化させるプロセス。形質転換は、天然の条件下でまたは当技術分野で周知の様々な方法を使用する人為的条件下で起きてもよい。形質転換は外来核酸配列を原核または真核宿主細胞に挿入するための任意の公知の方法に頼ってもよい。方法の選択は形質転換される宿主細胞に影響され、ウイルス感染、電気穿孔、リポフェクションおよび微粒子銃(particle bombardment)が含まれ得るが、これらに限定されない。

【0091】

形質転換された：形質転換細胞は、分子生物学技法により核酸分子を導入されている細胞である。形質転換細胞には、挿入されたDNAが自律的に複製するプラスミドとしてまたは宿主染色体の一部として複製することができる安定的に形質転換された細胞が含まれる。形質転換細胞には、限られた期間挿入されたDNAまたはRNAを一過性に発現する細胞も含まれる。本明細書で使用されるように、形質転換という用語は、ウイルスベクターを用いるトランスフェクション、プラスミドベクターを用いた形質転換ならびに電気穿孔、リポフェクションおよび微粒子銃加速による裸のDNAの導入を含む、核酸分子をそのような細胞に導入し得るあらゆる技法を包含する。

【0092】

トランスポゾン：位置を移動させるまたは遺伝子、染色体もしくはゲノム内を移動することができるDNAまたはRNA配列などのヌクレオチド配列。

【0093】

トランスジェニック植物：その核ゲノムまたはオルガネラゲノム内に挿入された外来(異種)ヌクレオチド配列を含有する植物。

【0094】

トランスジーン：形質転換技法により宿主細胞(単数または複数)内に挿入される核酸配列。

10

20

30

40

50

【0095】

ベクター：宿主細胞に導入され、それによって形質転換宿主細胞を作製する核酸分子。ベクターは、複製起点などの、宿主細胞においてベクターを複製させる核酸配列を含み得る。ベクターは、1つまたは複数の治療遺伝子および/または選択可能マーカー遺伝子ならびに当技術分野で公知の他の遺伝子エレメントも含み得る。ベクターは、細胞を形質導入する、形質転換するまたは感染し、それによって前記細胞に固有の核酸および/またはタンパク質以外の核酸および/またはタンパク質を発現させることができる。ベクターは、任意選択で、ウイルス粒子、リボソーム、タンパク質コーティングまたは同種のものなどの、核酸の細胞への侵入を達成するのを支援する物質を含む。

【0096】

他の方法で説明されていなければ、本明細書で使用されるすべての専門用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者に一般的に理解されているのと同じ意味を有する。単数語「a」、「an」および「the」は、文脈が他の方法で明白に示していなければ、複数の指示対象を含む。同様に、語「または」は、文脈が他の方法で明白に示していなければ、「および」を含むことが意図されている。したがって、「AまたはBを含む」は、「AまたはB」または「AおよびB」を含むことを意味する。核酸またはポリペプチドについて与えられるすべての塩基サイズまたはアミノ酸サイズおよびすべての分子量または分子質量値は近似であり、記載のために提供されていることはさらに理解されるべきである。本明細書に記載される方法および材料に類似するまたは等価である方法および材料を本発明の実施または試験において使用することが可能であるが、適切な方法および材料は下に記載されている。本明細書で言及されるすべての出版物、特許出願、特許および他の参考文献は、参照によりその全体を組み込まれる。対立する場合は、用語の説明を含む本明細書が支配することになる。さらに、材料、方法および実施例は一例にすぎず、限定することを意図するものではない。

【0097】

III. いくつかの実施形態の概要

本開示は、エンハンサードメインおよび前記エンハンサードメインの増強する制御下で転写調節ドメインを含む新規の転写開始領域を説明する。前記エンハンサードメインは、天然であるがこれまで認識されていなかった直列に配置されたSCBVエンハンサーの複数（たとえば、2個から4個またはそれよりも多い）のコピーを含む。本開示の転写調節領域（プロモーター）は、前記エンハンサードメインの非存在のプロモーターと比べた場合、増強された転写を与える。一実施形態では、配列番号1の337位から618位に示されるSCBVエンハンサーエレメント（またはその相同体）の1つまたは複数のコピー、ならびにそれに作動可能に連結して、RNAポリメラーゼ結合部位およびmRNA開始部位を含むプロモーターを含むキメラ転写調節領域であって、対象のヌクレオチド配列が前記キメラ転写調節領域の調節制御下で転写される場合、転写産物の量が、前記プロモーターは含むが前記SCBVエンハンサー配列（複数可）は含まないキメラ転写調節領域を用いて得られる転写産物の量と比べて、増強されている前記キメラ転写調節領域が開示される。一部の実施形態では、前記キメラ転写調節領域は、植物ウイルス遺伝子、細菌遺伝子、真菌遺伝子、植物核遺伝子、植物核外遺伝子、無脊椎動物遺伝子または脊椎動物遺伝子の上流領域から得られるプロモーターを含む。

【0098】

記載された転写調節領域および転写されるDNA配列を含むDNA構築物も提供される。一部の実施形態では、3'転写終結ポリヌクレオチド分子に作動可能に連結した転写可能なポリヌクレオチド分子に作動可能に連結した転写開始領域を含むDNA構築物が開示される。一実施形態では、転写可能なポリヌクレオチド分子は前記分子が発現される植物に農業形質を与える。

【0099】

トランスジェニック植物も提供される。一実施形態では、トランスジェニック植物は開示されたDNA構築物で安定的に形質転換される。一部の実施形態では、トランスジェニ

10

20

30

40

50

ック植物は双子葉植物である。他の実施形態では、トランスジェニック植物は単子葉植物である。一特定の実施形態では、トランスジェニック植物はトウモロコシ植物である。

【0100】

開示されたトランスジェニック植物の種子がさらに提供される。一実施形態では、前記種子は開示されたDNA構築物を含む。

【0101】

トランスジェニック植物細胞または組織がさらに提供される。一実施形態では、トランスジェニック植物細胞または組織は、開示されたキメラ転写調節領域を含む。一部の実施形態では、前記植物細胞または組織は双子葉植物由来である。他の実施形態では、前記植物細胞または組織は単子葉植物由来である。一特定の実施形態では、前記植物細胞または組織はトウモロコシ植物由来である。

10

【0102】

開示されたトランスジェニック植物、植物細胞、種子または組織を生産する方法も提供される。一部の実施形態では、前記方法は、開示されたDNA構築物で植物細胞または組織を形質転換することを含む。

【0103】

開示されたトランスジェニック植物から導出することが可能な植物細胞、果実、葉、根、苗条、花、種子、挿し木および有性または無性繁殖において有用な他の生殖材料、F1雑種を含む子孫植物、雄性不稔植物ならびに他のあらゆる植物および植物産物も提供される。

20

【0104】

配列番号1の337位から618位に示されるSCBVエンハンサーエレメントの1つまたは複数のコピーを含むトウモロコシ植物細胞、組織または苗木も開示される。一実施形態では、トウモロコシ植物細胞、組織または苗木は、配列番号1の337位から618位に示されるSCBVエンハンサーエレメントの1つまたは複数のコピーであって、前記トウモロコシ植物細胞、組織または苗木のゲノムに無作為な位置で挿入されるSCBVエンハンサーエレメントの前記1つまたは複数のコピーを含む。一部の実施形態では、SCBVエンハンサーは、SCBVエンハンサーが非存在の対象のヌクレオチド配列の転写と比べた場合、SCBVエンハンサーの調節制御下にある対象のヌクレオチド配列の増強された転写を与える。

30

【0105】

IV. SCBVエンハンサーおよびその使用

本開示は、そのエンハンサーが、転写効率を増強して前記エンハンサーの制御下でのDNA配列の転写を増強するのに有用である、サトウキビ桿状バドナウイルス(Sugarcane Badnavirus) (SCBV) ゲノム由来のこれまで認識されていなかったエンハンサー領域を提供する。特に興味深いのは、宿主と同じ遺伝子起源でも外来起源でもよく、天然に存在する配列(センスとアンチセンス配向の両方において)でも合成的に調製された配列でもよい遺伝子配列の増強された転写である。主題のエンハンサーは、これまで認識されていなかった天然のSCBVエンハンサードメイン(その配列は配列番号1の337位から618位に提供されている)の2つまたはそれよりも多いコピーのうちの多数を含む。前記エンハンサーは、エンハンサードメイン配列の少なくとも2つのコピーを含み、一部の実施形態では、直列に配置された3つまたは4つまたはさらに多くのコピーを含む。

40

【0106】

相同なエンハンサーも企図されている。いかなる点でも限定されることを意図せずに、代表的な相同配列は、他のSCBVプロモーター由来の、たとえば、Braithwaite et al. (Plant Cell Rep. 23:319-326, 2004; 参照によりその全体を本明細書に組み込まれる)にまたは米国特許第5994123号(参照によりその全体を本明細書に組み込まれる)に記載される単離物などの異なるSCBV単離物由来の配列を含み得る。

【0107】

50

天然のエンハンサーは、それ本来の環境においてプロモーターの上流でありプロモーターから約 600 bp 内にある DNA 配列を含む。mRNA の開始ヌクレオチドを 0 とすると、エンハンサーを含有する配列は、約 - 50 から約 - 1000 bp、通常は、約 - 50 から - 950 bp であり、一般には約 - 100 から - 800 bp を含む。エンハンサードメインはシス作用性であり、望ましくは増強される転写開始配列から約 1000 bp、通常は約 2000 bp 内に位置しており、さらに通常では約 1000 bp に隣接するまたはその内部に位置している。エンハンサーは、転写開始配列に対してどちらの配向でもよく、そのエンハンサーが増強するプロモーターに対して上流または下流に位置することが可能であるが、通常は上流にある。

【0108】

10

本開示のエンハンサードメインは、天然には、たとえば、シス位置のエンハンサーの制御下に見出されるプロモーター（隣接していて相同である）、ならびに通常は特定のエンハンサーと関連していないプロモーター（たとえば、異種の）を含む、多種多様な開始配列と一緒に使用法が見つかる。エンハンサードメインと転写開始ドメインは、同じまたは異なる界、科または種由来でもよい。対象の種には、細菌、植物、昆虫、哺乳動物等などの原核生物および真核生物が含まれる。組合せには、記載された SCBV（ウイルス）エンハンサードメイン（複数可）と SCBV（たとえば、サトウキビ由来）の宿主、別の植物種（たとえば、同じまたは異なる科の）、昆虫、脊椎動物、細菌、真菌その他の構造遺伝子の転写開始領域が含まれる。

【0109】

20

本開示は、主題の転写開始領域および転写開始領域の制御下で、転写される DNA 配列を含む DNA 構築物も企図している。前記 DNA 配列は、転写された 5' と 3' 隣接領域を含む天然のオープンリーディングフレームを含んでいてもよい。代わりに、前記 DNA 配列は、RNA 分子またはその一部の相補体をコードしている点でアンチセンス配列を含み得る。構築物がタンパク質をコードするオープンリーディングフレーム（ORF）を含んでいる場合、増強された転写開始速度が得られ、通常は遺伝子のポリペプチド発現産物の量が増加する。構築物がアンチセンス配列を含む場合、野生型に相補的な RNA の転写が増強されると野生型 mRNA の発現が抑制され、それによってポリペプチド発現産物の量は減少する。問題の野生型 mRNA は、宿主細胞の天然 mRNA またはウイルスもしくは真菌などの病原体の mRNA に一致し得ることが企図されている。

30

【0110】

様々な実施形態では、転写される DNA 配列には、遺伝子のタンパク質コード配列（複数可）（たとえば、植物、動物、細菌、ウイルスまたは真菌由来の）が含まれ、この配列には、タンパク質産物をコードする天然のオープンリーディングフレーム（複数可）、遺伝子によりコードされる mRNA 由来の相補的 DNA（cDNA）配列、目的のコード配列（複数可）を与える合成 DNA、エクソンライゲーションにより産生されるオープンリーディングフレーム（複数可）などの天然の遺伝子のエクソン由来のタンパク質コード配列（複数可）、および / またはそれらの任意の 2 つもしくはそれよりも多い組合せが含まれ得る。これらの配列に結合しているのは、適切な転写終結 / ポリアデニル化配列；一次 RNA 産物をコードしエクソンとイントロンからなる天然の遺伝子由来の（たとえば、植物、動物、細菌、ウイルスまたは真菌由来の）配列（たとえば、真核生物の天然のポリメラーゼ II およびポリメラーゼ III 転写される遺伝子）；特定の RNA またはタンパク質産物をコードする合成 DNA 配列；変異誘発（たとえば、部位特異的変異誘発）および / もしくは他の遺伝子工学技術により既知のコード配列（たとえば、天然の遺伝子配列）から改変される DNA の配列；融合タンパク質をコードするキメラを含む、DNA 断片のライゲーションにより達成される上記のいずれかのキメラ；ならびに / または RNA 分子の相補体またはその部分をコードする DNA 配列である。

40

【0111】

植物における増強された転写は、植物に特徴的なタンパク質（内在性の、すなわち通常、野生型宿主に見出される）または他の遺伝子供給源由来のタンパク質（外来性の、すな

50

わち通常は野生型宿主に見出されない)の産生を増強するのに使用法を見出し得る。本明細書に記載されるエンハンサーおよびキメラ転写調節領域から発現される類の配列の例には、アンチセンスまたは低分子量阻害性RNA(遺伝子抑制のために);栄養的に重要なタンパク質;成長促進因子;ある種の環境条件下で植物に保護を与えるタンパク質、たとえば、金属、塩または他の毒性に対する抵抗性を与えるタンパク質;極端な温度、凍結等に対する耐性を与えるストレス関連タンパク質;植物に有害生物または感染関連保護を与えるタンパク質、たとえば、細菌、真菌もしくは他の微生物感染に対する抵抗性、または昆虫による捕食に対する(たとえば、バチルス・チューリゲンシス(*B. thuringiensis*)毒素)または他の無脊椎もしくは脊椎動物に対する抵抗性を与えるタンパク質;植物の外で医学的に重要な化合物、たとえば、抗微生物、抗腫瘍、等;特定の商業的価値のあるタンパク質または他の化合物;増加したレベルのタンパク質、たとえば、代謝経路(たとえば、ポリフェノール化合物または他の二次代謝産物の生成のための経路)の酵素;植物宿主にとり構造的価値のある増加したレベルの産物、その他が含まれる。転写される対象の配列は、少なくとも約8bp、少なくとも約12bp、少なくとも約20bpになり、1または複数のキ口塩基対(kbp)長であってもよい。

【0112】

V. 構築物

本開示の構築物は典型的には、プロモーター(通常は少なくともRNAポリメラーゼ結合部位およびmRNA開始部位を含有する)に作動可能に連結した提供されるSCBVエンハンサーエレメントの1つまたは複数のコピーを含むキメラ転写調節領域であって、3'転写終結ポリヌクレオチド分子に作動可能に連結した転写可能なポリヌクレオチド分子に作動可能に連結している前記キメラ転写調節領域を含有する。さらに、構築物は、植物遺伝子の3'非翻訳領域(3'UTR)(たとえば、ジャガイモのPI-II終結領域またはオクトピンもしくはノバリンシンターゼ3'終結領域などのmRNAのmRNA安定性を増加させる3'UTR)由来の追加の調節ポリヌクレオチド分子を含んでもよいがこれに限定されない。構築物は、翻訳開始において重要な役割を果たすことができ、植物発現構築物における遺伝子成分にもなれるmRNAポリヌクレオチド分子の5'非翻訳領域(5'UTR)を含んでもよいがこれに限定されない。たとえば、熱ショックタンパク質遺伝子由来の非翻訳5'リーダーポリヌクレオチド分子は、植物において遺伝子発現を増強することが実証されている(たとえば、米国特許第5659122号および米国特許第5362865号参照。これら特許文献はそれぞれが参照によりその全体を組み込まれる)。構築物に存在するそのような追加の上流および下流調節ポリヌクレオチド分子は、構築物上に存在するその他のエレメントに対して生来であるまたは異種である供給源由来であってもよい。

【0113】

したがって、一実施形態は、前記構築物を植物細胞に導入すると前記転写可能なポリヌクレオチド分子の転写を、目的のレベルでおよび/または目的の組織もしくは発生パターンで指示するように、転写可能なポリヌクレオチド分子に作動可能に連結したプロモーターに作動可能に連結した配列番号1の337位から618位に示されるSCBVエンハンサーエレメント(またはその相同体)の1つまたは複数のコピー(たとえば、2、3、4またはそれよりも多いコピー)をそれ自体が含むキメラ転写調節領域を含む構築物である。一部の例における転写可能なポリヌクレオチド分子は、遺伝子のタンパク質コード領域を含み、キメラ転写調節領域は、翻訳されタンパク質産物として発現される機能的mRNA分子の構築物からの転写を与える。別の実施形態では、転写可能なポリヌクレオチド分子は、遺伝子のアンチセンス領域を含み、キメラ転写調節領域は、標的宿主細胞において対象の特定のRNA分子の発現を阻害するために、アンチセンスRNA分子または他の類似の阻害性RNAの転写に影響を与える。

【0114】

本開示のさらに多くの例となる構築物には、アグロバクテリウム(*Agrobacterium*)細胞により与えられるトランスファー分子と共に、T-DNAの植物細胞のゲノムへの組み込み

10

20

30

40

50

を可能にする、T-DNAを含むアグロバクテリウム・ツメファシエンス(*Agrobacterium tumefaciens*)から単離されたTiプラスミドの右境界(RBまたはAGRtu.RB)および左境界(LBまたはAGRtu.LB)領域を有する二重Tiプラスミド境界DNA構築物が含まれる。前記構築物は、細菌細胞において複製機能および抗生物質選択を与えるプラスミド骨格DNAセグメント、たとえば、ori322などの大腸菌(*Escherichia coli*)複製起点、oriVまたはoriRiなどの広域宿主複製起点、およびスペクチノマイシンもしくはストレプトマイシンに対する耐性を与えるTn7アミノグリコシドアデニルトランスフェラーゼ(aadA)をコードするSpec/Strepなどの選択可能マーカーまたはゲンタマイシン(Gm、Gent)選択可能マーカー遺伝子のコード領域を含有してもよい。植物形質転換では、代表的な宿主細菌株には、アグロバクテリウム・ツメファシエンス(*Agrobacterium tumefaciens*)AB1、C58またはLB4404が含まれるが、植物形質転換の分野の当業者には公知の他の株を使用することが可能である。

10

【0115】

少なくとも1つのSCBVエンハンサーエレメント(任意選択で、キメラ転写調節領域という文脈において)を含み、活性化タギング構築物である構築物も企図されている。活性化タギングは、遺伝子がゲノム全域にわたる規模で無作為に強力に上方調節され、その後特定の表現型についてスクリーニングされて選択される方法である。様々な種類の活性化タギング構築物に有用な成分が知られており、たとえば、Walden et al., *Plant Mol. Biol.* 26: 1521-8, 1994(タバコ細胞培養において遺伝子を活性化して、植物成長ホルモンの非存在下で細胞を増殖させるのに使用される活性化T-DNAタギング構築物を記載している); Miklashevichs et al., *Plant J.* 12: 489-98, 1997; Harling et al., *EMBO J.* 16: 5855-66, 1997; Walden et al., *EMBO J.* 13: 4729-36, 1994(T-DNAタグに隣接している植物ゲノム配列から単離され、植物成長ホルモン応答に関連していると推定される遺伝子の報告); Schell et al., *Trends Plant Sci.* 3: 130, 1998(一群の関連研究の調査を考察している); Kardailsky et al., *Science* 286: 1962-1965, 1999(活性化T-DNAタギングおよび初期顕花表現型についての植物のスクリーニングを記載している); Koncz et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(21):8467-71, 1989(増殖している細胞においてのみ活性であり、その発現に影響を与えるためには植物遺伝子に直接隣接して挿入しなければならないアグロバクテリウム(*Agrobacterium*)遺伝子5プロモーター(pg5)を使用する活性化タギングを記載している); Wilson et al., *Plant Cell* 8: 659-671, 1996(CaMV35Sプロモーターおよびnos::hpt選択カセットを担持している改変されたDsトランスポゾンを利用する活性化タギング)およびSchaffner et al., *Cell* 93: 1219-1229, 1998(隣接する植物遺伝子を上方調節して、優性機能獲得型変異1996を生じるのに使用される同じシステムを例示している); およびWeigel et al., *Plant Physiology*, 122:1003-1013, 2000(形態的表現型について何万個もの形質転換された植物をスクリーニングするのに有用な活性化タギングベクターを例示している)を参照されたい。

20

30

【0116】

VI. 転写増強のためのヌクレオチド配列

本明細書に提供される構築物への組込みによる転写増強のための例となる転写可能なポリヌクレオチド分子には、たとえば、同じ種と一緒に生じまたは同じ種に存在するが、古典的な繁殖または育種法ではなく遺伝子操作法によりレシピエント細胞に組み込まれる標的種または遺伝子以外の種由来のポリヌクレオチド分子または遺伝子が含まれる。前記種類のポリヌクレオチド分子は、標的植物細胞に既に存在しているポリヌクレオチド分子、別の植物由来のポリヌクレオチド分子、異なる生物由来のポリヌクレオチド分子、あるいは遺伝子のアンチセンスメッセージを含有するポリヌクレオチド分子または人為的に、合成的にもしくは他の方法で改変されたトランスジーンをコードするポリヌクレオチド分子などの外部的に作製されたポリヌクレオチド分子を含むことができるが、これらに限定されない。

40

【0117】

50

一実施形態では、配列番号1の337位から618位に示されるポリヌクレオチド分子（またはその2つもしくはそれよりも多いコピー）（たとえば、キメラ転写開始領域という文脈において）は、記載されたSCBVエンハンサー配列（または一連の2つもしくはそれよりも多いそのような配列）が農学的に興味深い遺伝子または他の発現配列（さらに一般的には、対象のヌクレオチド配列）である転写可能なポリヌクレオチド分子に作動可能に連結するように、構築物に組み込まれる。本明細書で使用されるように、用語「農学的に興味深い遺伝子」は、植物形態、生理機能、成長と発達、収量、栄養増強、疾病または有害生物抵抗性、または環境もしくは薬剤耐性に関連する望ましい特徴を与える遺伝子を含むが、これに限定されない転写可能なポリヌクレオチド分子を指す。農学的に興味深い遺伝子の発現は、たとえば、農業的に重要な形質を与えるために望ましい。作物植物に有益な農業形質を与える農学的に興味深い遺伝子は、たとえば、遺伝子を発現する植物に、除草剤抵抗性（たとえば、米国特許第6803501号、米国特許第6448476号、米国特許第6248876号、米国特許第6225114号、米国特許第6107549号、米国特許第5886775号、米国特許第5804425号、米国特許第5633435号、米国特許第5463175号、および米国特許出願公開第2003/0135879号および米国特許出願公開第2003/0115626号参照）、増収（たとえば、米国特許第USRE38446号、米国特許第6716474号、米国特許第6663906号、米国特許第6476295号、米国特許第6441277号、米国特許第6423828号、米国特許第6399330号、米国特許第6372211号、米国特許第6235971号、米国特許第6222098号、米国特許第5716837号参照）、昆虫防除（たとえば、米国特許第6809078号、米国特許第6713063号、米国特許第6686452号、米国特許第6657046号、米国特許第6645497号、米国特許第6642030号、米国特許第6639054号、米国特許第6620988号、米国特許第6593293号、米国特許第6555655号、米国特許第6538109号、米国特許第6537756号、米国特許第6521442号、米国特許第6501009号、米国特許第6468523号、米国特許第6326351号、米国特許第6313378号、米国特許第6284949号、米国特許第6281016号、米国特許第6248536号、米国特許第6242241号、米国特許第6221649号、米国特許第6177615号、米国特許第6156573号、米国特許第6153814号、米国特許第6110464号、米国特許第6093695号、米国特許第6063756号、米国特許第6063597号、米国特許第6023013号、米国特許第5959091号、米国特許第5942664号、米国特許第5942658号、米国特許第5880275号、米国特許第5763245号、米国特許第5763241号参照）、真菌病抵抗性（たとえば、米国特許第6653280号、米国特許第6573361号、米国特許第6506962号、米国特許第6316407号、米国特許第6215048号、米国特許第5516671号、米国特許第5773696号、米国特許第6121436号、米国特許第6316407号、米国特許第6506962号参照）、ウイルス抵抗性（たとえば、米国特許第6617496号、米国特許第6608241号、米国特許第6015940号、米国特許第6013864号、米国特許第5850023号、米国特許第5304730号参照）、線虫抵抗性（たとえば、米国特許第6228992号参照）、細菌病抵抗性（たとえば、米国特許第5516671号参照）、植物の成長と発達（たとえば、米国特許第6723897号、米国特許第6518488号参照）、デンプン生産（たとえば、米国特許第6538181号、米国特許第6538179号、米国特許第6538178号、米国特許第5750876号、米国特許第6476295号参照）、改変された油生産（たとえば、米国特許第6444876号、米国特許第6426447号、米国特許第6380462号参照）、高い油生産（たとえば、米国特許第6495739号、米国特許第5608149号、米国特許第6483008号、米国特許第6476295号参照）、改変された脂肪酸含有量（たとえば、米国特許第6828475号、米国特許第6822141号、米国特許第6770465号、米国特許第6706950号、米国特許第6660849号、米国特許第6596538号、米国特許第658976

10

20

30

40

50

7号、米国特許第6537750号、米国特許第6489461号、米国特許第6459018号参照)、繊維生産(たとえば、米国特許第6576818号、米国特許第6271443号、米国特許第5981834号、米国特許第5869720号参照)、高いタンパク質生産(たとえば、米国特許第6380466号参照)、果実成熟(たとえば、米国特許第5512466号参照)、改良された消化性(たとえば、米国特許第6531648号参照)、改良された風味(たとえば、米国特許第6011199号参照)、低いラフィノース(たとえば、米国特許第6166292号参照)、増強された動物および/またはヒト栄養(たとえば、米国特許第6723837号、米国特許第6653530号、米国特許第6541259号、米国特許第5985605号、米国特許第6171640号参照)、環境ストレス抵抗性(たとえば、米国特許第6072103号参照)、望ましいペプチド(たとえば、製薬または分泌可能な(secretable)ペプチド)(たとえば、米国特許第6812379号、米国特許第6774283号、米国特許第6140075号、米国特許第6080560号参照)、改良された加工特質(たとえば、米国特許第6476295号参照)、工業用酵素生産(たとえば、米国特許第5543576号参照)、窒素固定(たとえば、米国特許第5229114号参照)、雑種種子生産(たとえば、米国特許第5689041号参照)、生体高分子(たとえば、米国特許第USRE37543号、米国特許第6228623号、米国特許第5958745号および米国特許出願公開第2003/0028917号参照)およびバイオ燃料生産(たとえば、米国特許第5998700号参照)を与える1つまたは複数の配列であってもよい。上に収載される特許および公開された出願に記載される遺伝子エレメント、方法およびトランスジーンは参照により本明細書に組み込まれる。

10

20

【0118】

代わりに、転写可能なポリヌクレオチド分子は、内在性遺伝子の発現の標的阻害を引き起こすアンチセンスまたはRNA分子をコードすることにより、たとえば、アンチセンス、阻害性RNA(RNAi)または同時抑制媒介機構を介して上記の(または他の)植物特徴または表現型に影響を与えることができる。前記RNAは、目的の内在性mRNA産物を切断するよう操作された触媒RNA分子(リボザイム)であってもよい。したがって、対象の表現型、生化学的または形態変化に影響を与える転写されるRNA分子をコードする任意の転写可能なポリヌクレオチド分子は、本明細書に提供される配列および構築物により可能になる転写増強から利益を得ることができる。

30

【0119】

記載されたSCBVエンハンサーまたはその1つもしくは複数のコピーを含むキメラ転写調節領域は、1つまたは複数のマーカー遺伝子(その発現についてスクリーニングするまたはある方法で点数化することができる任意の転写可能なポリヌクレオチド分子)と一緒に構築物に組み込み、一過性のまたは安定した植物解析において試験し、安定したトランスジェニック植物における調節エレメントの遺伝子発現パターンの指標を与えることが可能である。そのような実施形態の実行において使用するためのマーカー遺伝子には、βグルクロニダーゼ(米国特許第5599670号に記載されるGUS)および緑色蛍光タンパク質(米国特許第5491084号および米国特許第6146826号に記載されるGFP)、抗生物質耐性を与えるタンパク質、または除草剤耐性を与えるタンパク質をコードする転写可能なポリヌクレオチド分子が含まれるが、これに限定されない。カナマイシン(nptII)、ハイグロマイシンB(aphIV)、ストレプトマイシンまたはスペクチノマイシン(aad、spec/strep)およびゲンタマイシン(aac3およびaacC4)に対する耐性を与えるコードタンパク質を含む、有用な抗生物質耐性マーカーは、当技術分野では公知である。トランスジェニック植物耐性が実証され、本発明の方法を提供することが可能な除草剤には、グリホサート、グルホシネート、スルホニル尿素、イミダゾリノン、プロモキシニル、デラボン、シクロヘキサジオン(cyclohexane dione)、プロトポルフィリノーゲン(protoporphyrionogen)オキシダーゼ阻害剤、およびイソキサスフルトール(isoxasflutole)除草剤が含まれるが、これらに限定されない。除草剤耐性に関与するタンパク質をコードするポリヌクレオチド分子は、当技術分野では公

40

50

知であり、5 - エノールピルビルシキミ酸(enolpyruvylshikimate) - 3 - リン酸シンターゼをコードするポリヌクレオチド分子(米国特許第5627061号、米国特許第5633435号、米国特許第6040497号に記載されるEPSPSおよびグリホサート耐性については米国特許第5094945号に) ; グリホサートオキシドレダクターゼおよびグリホサート - N - アセチルトランスフェラーゼをコードするポリヌクレオチド分子(米国特許第5463175号に記載されるGOXおよび米国特許出願公開第2003/0083480号に記載されるGAT) ; プロモキシニルニトリラーゼをコードするポリヌクレオチド分子(プロモキシニル耐性について米国特許第4810648号に記載されるBxn) ; ノルフルラゾン耐性についてMisawa et al. (Plant J. 4:833-840、1993)およびMisawa et al. (Plant J. 6:481-489、1994)に記載されるフィトエンデサチュラーゼ(crtI)をコードするポリヌクレオチド分子 ; スルホニル尿素除草剤に対する耐性についてSathasivan et al. (Nucl. Acids Res. 18:2188-2193、1990)に記載されるアセトヒドロキシ酸シンターゼ(AHAS、別名ALS)をコードするポリヌクレオチド分子 ; ジカンバ分解オキシゲナーゼ酵素をコードするポリヌクレオチド分子(ジカンバ耐性について米国特許出願公開第2003/0135879号および米国特許出願公開第2003/0115626号に記載される) ; ならびにグルホシネートおよびピアラホス耐性についてDe Block et al. (EMBO J. 6:2513-2519、1987)に記載されるbar遺伝子が含まれるが、これらに限定されない。本開示の調節エレメントは、ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ、グリホサート耐性EPSPS、アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ、ヒドロキシフェニルピルビン酸デヒドロゲナーゼ、ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ、ダラポンデハロゲナーゼ、プロモキシニル耐性ニトリラーゼ、アントラニル酸シンターゼ、グリホサートオキシドレダクターゼおよびグリホサート - N - アセチルトランスフェラーゼをコードする転写可能なポリヌクレオチド分子を発現することができる。

【0120】

対象のマーカー遺伝子または他のヌクレオチド配列に作動可能に連結した少なくとも1つのSCBVエンハンサー(たとえば、キメラ転写調節領域という文脈において)を含有する構築物は、組織に送達し得(たとえば、形質転換される)、前記組織は、転写されているマーカーまたは配列に応じて、適切な機構により分析し得る。そのような定量的または定性的分析は、安定した植物において農業的に興味深い遺伝子に作動可能に連結した場合、調節エレメントの潜在的発現プロファイルを評価するためのツールとして使用し得る。マーカー遺伝子は一過性アッセイにおいて使用することが可能であり、一過性アッセイにおいてマーカー遺伝子発現に対する試験法は当業者には公知である。マーカー遺伝子の一過性発現は、様々な植物、組織およびDNA送達システムを使用して報告されている。たとえば、一過性分析システムには、対象の任意の植物種を使用する任意の一過性植物アッセイにおいて組織の電気穿孔または微粒子銃を介した直接遺伝子送達が含まれるが、これに限定されない。そのような一過性システムは、様々な組織供給源由来のプロトプラストの電気穿孔または対象の特定の組織の微粒子銃が含まれると考えられるが、これらに限定されない。本開示は、マーカー遺伝子または農業的に興味深い遺伝子を含むが、これらに限定されない任意の転写可能なポリヌクレオチド分子に作動可能に連結した調節エレメントを評価するための任意の一過性発現システムの使用を包含する。適切な送達システムを介したトランジェントにおいて試験することを想定される植物組織の例には、葉脚組織、カルス、子葉、根、胚乳、胚、花組織、花粉、および表皮組織が含まれると考えられるが、これらに限定されない。

【0121】

VII. 植物形質転換

本明細書に記載されているなどのエンハンサーエレメント(またはその複数のコピー)またはキメラ転写調節領域を含有する植物形質転換構築物は、任意の植物形質転換法を使用して植物に導入し得る。本発明の実施に際して植物発現構築物を植物ゲノムに導入することにより植物を形質転換するための方法および材料は、電気穿孔(たとえば、米国特許

10

20

30

40

50

第5384253号)、微粒子銃(たとえば、米国特許第5015580号、米国特許第5550318号、米国特許第5538880号、米国特許第6160208号、米国特許第6399861号、および米国特許第6403865号)、アグロバクテリウム媒介形質転換(たとえば、米国特許第5824877号、米国特許第5591616号、米国特許第5981840号、および米国特許第6384301号)、およびプロトプラスト形質転換(たとえば、米国特許第5508184号)を含む、周知の実証された方法のいずれでも含むことができる。いくつかの形質転換方法論は、任意の数の対象の標的作物由来の安定したトランスジェニック植物の生産のために使用し改変することが可能であることは当業者には明らかであろう。

【0122】

10

双子葉植物を形質転換するための特定の方法は当業者には公知である。例として、形質転換および植物体再生法は、ワタ(*Gossypium hirsutum*)、ダイズ豆(*Glycine max*)、ピーナツ(*Arachis hypogaea*)およびアブラナ属のメンバーを含むが、これらに限定されないいくつかの作物について記載されている。

【0123】

同様に、単子葉植物を形質転換するための特定の方法も当業者には公知である。例として、オオムギ(*Hordeum vulgare*)；トウモロコシ(*Zea mays*)；カラスムギ(*Avena sativa*)；オーチャードグラス(*Dactylis glomerata*)；イネ(*Oryza sativa*、インディカおよびジャポニカ種を含む)；モロコシ(*Sorghum bicolor*)；サトウキビ(*Saccharum*種)；トールフェスク(*Festuca arundinacea*)；芝生種(たとえば、コヌカグサ(*Agrostis stolonifera*)、ナガハグサ(*Poa pratensis*)、イヌシバ(*Stenotaphrum secundatum*))；コムギ(*Triticum aestivum*)；およびアルファルファ(*Medicago sativa*)を含むが、これらに限定されないいくつかの作物について記載されている。

20

【0124】

形質転換された植物は、対象の遺伝子(複数可)の存在ならびに本明細書に記載されるキメラ転写調節領域により与えられる発現レベルおよび/またはプロファイルについて分析され得る。形質転換された植物の分析のために、多数の方法が当業者は利用可能である。たとえば、植物分析のための方法には、サザンおよびノーザンブロット分析、PCRベース(または他の核酸増幅ベース)のアプローチ、生化学分析、表現型スクリーニング法、現地評価、ならびに免疫診断アッセイ(たとえば、タンパク質の検出、局在化、および/または定量化)が含まれる。

30

【0125】

記載されたSCBVエンハンサーを使用する遺伝子の増強された発現はトウモロコシにおいて実証されているが、前記エンハンサーは、おそらく単子葉植物だけでなく双子葉植物も含む他の植物種において機能すると予想される。SCBV上流領域の4コピーを有するエンハンサーエレメントは、本明細書で研究された組合せのなかで最も高いレベルの発現を提供した。前記上流領域のもっと少ないまたはもっと多いコピーならびに他の供給源由来のエンハンサーエレメントとの組合せも、遺伝子発現を調節するのに利点を与えることができるであろう。同じ活性化因子、構築物およびアプローチは、そのゲノム配列が入手可能であるまたは進行中であるためにその遺伝子を同定し得る(モロコシ(*Sorghum bicolor*)、コムギ(*Triticum aestivum*)、オオムギ(*Hordeum vulgare*)、アワ(*Setaria italica*)、サトウキビ(*Saccharum officinarum*)、ミスカンザス・ギガンテウス(*Miscanthus giganteus*)を含む)、もしくは将来のゲノム塩基配列決定努力もしくは染色体シンテニーによりその「活性化された遺伝子」を同定し得る(カラスムギ(*Avena sativa*)、ライムギ(*Secale cereale*)、トウジンビエ(*Pennisetum glaucum*)、シコクビエ(*Elysiene coracana*)、野生キビ(*Panicum miliaceum*)、テフキビ(*Eragrostis tef*)を含む)他の作物種に、またはそのゲノム配列が入手可能であるまたは進行中である(セイヨウヤマカモジ(*Purple False Brome*) (*Brachypodium distachyon*)、エノコログサ(*Green bristlegrass*) (*Setaria viridis*)を含む)モデル草種に有用になり得る。

40

【0126】

50

以下の実施例はある種の特長および／または実施形態を説明するために提供される。これらの実施例は、本発明を記載される特定の特長または実施形態に限定すると解釈されるべきではない。

【実施例 1】

【0127】

サトウキビ桿状ウイルス (SCBV) プロモーターのエンハンサーエレメントを含む配列の同定

この実施例は、SCBV プロモーターエンハンサーエレメントを含む配列の同定を実証する。

【0128】

SCBV (ジェンバンク受託番号 A J 2 7 7 0 9 1 および Geijskes et al., Arch. Virol., 147: 2393-2404, 2002 により記載される) のゲノム由来のプロモーター断片は、最初に、プロモーター配列のどの領域がエンハンサーエレメント配列を含有するのかを決定するための一過性発現アッセイにより調べられた。プロモーター分析研究では、転写開始部位 (+1 位と定義される) から -839 から +106 bp (プラスミド pSCBV839)、-576 から +106 bp (プラスミド pSCBV576)、および -333 から +106 bp (プラスミド pSCBV333) の配列を含有する SCBV プロモーター (配列番号 1) 由来の断片はホタルルシフェラーゼ (LUC) レポータータンパク質のコード領域の上流にクローニングされた。転写は、1 コピーのノパリンシンターゼ (Nos) 3' UTR 領域 (ジェンバンク受託番号 V 0 0 0 8 7 . 1 の塩基 1847 から 2103 (この塩基配列はこれによって参照によりその全体を組み込まれる)、および図 1 に開示されている) により終結された。これらの構築物の一過性転写活性は、トウモロコシ Hi-II 懸濁細胞への微粒子銃により細胞を形質転換し (下の実施例 2 において詳細に記載されている)、LUC レポーター遺伝子の活性をモニターすることにより試験された。ルシフェラーゼ活性は、SCBV : LUC 構築物を含有するプラスミド DNA および GUS (ベータグルクロニダーゼ) コード領域の発現を推進し、トウモロコシ Per5 3' UTR 終結因子 (米国特許第 6 6 9 9 9 8 4 号に開示されている。この特許文献はこれによって参照によりその全体を組み込まれている ; たとえば、構築物 ubi1 : GUS) により終結される、トウモロコシユビキチン 1 (ubi1) 遺伝子プロモーター (米国特許第 5 5 1 0 4 7 4 号に開示されている。この特許文献はこれによって参照によりその全体を組み込まれている ; 基本的にジェンバンク受託番号 S 9 4 4 6 4 . 1 の塩基 7 から 1990 であり、この塩基配列はこれによって参照によりその全体を組み込まれている) からなる構築物を宿す基準プラスミドの DNA を当量用いて同時形質転換することによりそれぞれの実験において正規化された。照射 (bombardment) の 2 日後、全タンパク質は形質転換された細胞から単離され、LUC 酵素活性 (ルシフェラーゼ単位 (LU) / mg タンパク質で表される) および GUS 酵素活性 (GUS 活性単位 (GU) / μ g タンパク質で表される) は、たとえば、(Maliga et al., Methods in Plant Molecular Biology. A Laboratory Course Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995) に見出される方法により測定された。これら 3 種の SCBV : LUC 構築物における試験プロモーターの相対活性は、LUC レベルを LU / mg タンパク質対 GU / μ g タンパク質の比として GUS レベルに正規化することにより比較された。一過性試験結果によれば、LUC 活性は照射されたプラスミド DNA の濃度の増加と共に直線的に増加することが示され、LUC 活性が転写物レベルと相関していることを示していた。さらに、転写開始部位の -576 bp 上流から +106 下流までの配列を含有する SCBV プロモーター断片は、完全長プロモーター断片 (ここでは、開始部位の -839 bp 上流から +106 下流までの配列を含有すると定義された) の活性の 66% $\pm$ 2% を有していた。これとは対照的に、転写開始部位の -333 bp 上流から +106 下流までの配列を含有するプロモーター断片は、完全長プロモーターの活性の 17% $\pm$ 1% のみを有していた。したがって、SCBV プロモーター活性の大部分を表す配列は転写開始部位から -333 bp の上流に属する。

【0129】

10

20

30

40

50

SCBVプロモーター配列のうち異種最小プロモーター配列により推進される転写を増強することができる部分が調べられた。これらの実験により定義されるように、エンハンサーエレメントは、異種最小プロモーター配列の5'近位に置かれると、一過性または安定した形質転換系のどちらで試験された場合でも再現性のある測定可能な形で前記異種最小プロモーターの発現活性を増加させる短い(200から300bp)シス作用性DNA配列(TATAボックスを欠く)として機能的に同定される。さらに、直列重複の前記エンハンサーエレメントは、単一コピーのエンハンサーエレメントよりも異種最小プロモーターのはるかに高レベルの発現活性を与える。この実施例において利用される異種最小プロモーターエレメントは、トウモロコシアルコールデハイドロゲナーゼ1(Adh1)遺伝子プロモーターの塩基-100から+106を含む(ジェンバンク受託番号X04049の塩基997から1202に相当する。この塩基配列は2010年8月30日に一般に公表されたので、これによって参照によりその全体を組み込まれる)。

10

【0130】

転写開始部位に対して-503から-222bpおよび-758から-222bpの配列を含む、SCBVプロモーター由来の2つの断片は、ホタルルシフェラーゼ(LUC)タンパク質をコードするコード領域に融合された最小トウモロコシAdh1プロモーターを含む配列の5'にクローニングされた。キメラ遺伝子の転写は、上記のNos3'UTRにより終結された。トウモロコシHi-II懸濁培養細胞は、LUCおよびGUS構築物を宿すプラスミドのDNAを用いて微粒子銃により形質転換され、酵素活性は上記の通りに測定され比較された。前記-503から-222配列または-758から-222配列が前記最小Adh1プロモーターの5'に置かれたLUC構築物を含有するプラスミドは、SCBV配列が付加されていない最小Adh1プロモーターと比べてそれぞれ6倍および4倍のLUC活性を示した。したがって、SCBVプロモーターのこれらの断片内の配列は、異種トウモロコシプロモーターにより媒介される転写活性を増強する。

20

【0131】

最小Adh1プロモーターにより媒介される発現を増加させる前記-503から-222bpのSCBVエンハンサー領域の複数のコピーの能力は、前記-502から-222bp配列の1、2または4コピーを、LUCコード領域に融合された最小トウモロコシAdh1プロモーターの5'にクローニングすることにより試験された(図3A)。前記構築物を宿すプラスミドDNA(ならびに基準ubi1:GUS構築物を有するプラスミドDNA)はトウモロコシHi-II懸濁培養細胞に照射され、LUCおよびGUS活性は上記の通りに測定され比較された。1コピー、2コピーまたは4コピーのSCBVエンハンサー配列領域を含有する構築物を照射された細胞は、SCBVエンハンサー配列を欠く類似する最小Adh1プロモーター構築物を照射された細胞のそれぞれ5倍、6倍および10倍を超えるLUC活性を有していた(図3B)。

30

【0132】

配列番号1に提供されるSCBVプロモーターの-502から-222bpを含む核酸塩基は、植物プロモーターに優れた発現特徴を与えることができる転写活性化活性をコードしている。さらに、転写活性化活性は、配列番号1に提供されるSCBVプロモーターの-502から-222bpを含む塩基の複数の直列コピーのスタッキングにより増加される。さらに、本明細書に提供される方法および試薬は、転写活性化活性を保持するさらに短い配列を提供するようにさらに調べ利用し得る、または他の転写活性化因子エレメントおよび植物プロモーターと新しい組合せで組合せ得る。

40

【実施例2】

【0133】

トウモロコシHi-II懸濁培養細胞におけるSCBV:LUCおよびubi1:GUS構築物の一過性発現試験

この実施例は、トウモロコシHi-II懸濁培養細胞におけるSCBV:LUCおよびubi1:GUS構築物の一過性発現試験を説明する。

【0134】

50

トウモロコシ Hi - I I 懸濁培養細胞 (Armstrong et al., Maize Genet. Coop. Newslett., 65:92-93, 1991) は、上記の通りに構築された LUC および GUS 構築物を宿すプラスミドの DNA を用いて微粒子銃により形質転換され、酵素活性が測定され比較された。プラスミド DNA の大量の調製物は、Qiafilter (商標) Plasmid Maxi Kits (Qiagen, Germantown, Maryland) を使用して調製され、量と質は標準分子法を使用して解析された。

【0135】

照射のためのトウモロコシ Hi - I I 懸濁培養細胞の調製

Hi - I I 細胞は、28℃、暗所で H9CP + 培地中 125 rpm の攪拌器上で維持された (H9CP 培地は、MS 塩 4.3 g/L、ショ糖 3%、カザミノ酸 200 mg/L、ミオイノシトール 100 mg/L、2,4-D 2 mg/L、NAA 2 mg/L、1000 × MS ビタミン 1 mL/L、L-プロリン 700 mg/L およびココナツジュース (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) 62.5 mL/L、pH 6.0 からなる)。照射に先立って、2 日目の Hi - I I 培養物は G - N6 培地 (CHU N6 培地 3.98 g/L、CHU N6 ビタミン 1 mL/L (両方とも Phytotechnology Laboratories (登録商標)、Lenexa、KS 製の CHU 成分)、ミオイノシトール 100 mg/L、2,4-D 2 mg/L およびショ糖 3%、pH 6.0) に移され、24 時間増殖させた。照射当日、G - N6 増殖細胞 (2.5 g の細胞) は、0.5 M D-ソルビトールおよび 0.5 M D-マンニトールを含有する G - N6 培地上に置かれた無菌 Whatman No. 1 フィルターディスク (55 mm) に移され、4 時間インキュベートされた。浸透圧的に調整された細胞が照射のために使用される。

【0136】

プラスミド DNA を有する金粒子の調製および照射アッセイ

金粒子 (1 μm 径、BioRad, Hercules, CA) は 10 分間 70% エタノールで、次に滅菌水で 3 回洗浄された。前記粒子は 120 mg/mL の濃度で 50% グリセロール中に分注された。典型的な実験では、150 μL (18 mg) の金粒子、およそ 5 μg のプラスミド DNA、150 μL の 2.5 M CaCl₂ および 30 μL の 0.2 M スペルミジンが組み合わされた。反応 (全容量 375 μL) は室温で 10 分間インキュベートされ、時折穏やかにボルテックスされた。DNA 被膜金粒子は短時間遠心分離され、420 μL の 70% エタノールで、次に 420 μL の 100% エタノールで洗浄された。最終ペレットは 110 μL の 100% エタノールに再懸濁され、Branson 1450 ソニケーターを用いて短時間超音波処理 (それぞれ 3 秒の 3 回バースト、バースト間は 1 分) に供された。DNA を被膜された金粒子 12.2 μL のアリコットは 9 個のマクロキャリア (BioRad, Hercules, CA) のそれぞれの上に広げられ、BioRad PDS 1000/He システムを使用する照射アッセイにおいて使用された。懸濁培養細胞は、3510 psi ディスクを使用して 9 cm の標的距離で形質転換され、各プレートは 3 回照射された。照射に続いて、細胞は 28℃ 暗所で、最初は D-ソルビトールおよび D-マンニトール培地を含有する G - N6 上で 12 時間、次に G - N6 プレート上でさらに 36 時間インキュベートされた。細胞はプレートから収集され、プロットされてバッファーを除去し、300 μL の 2 × CCLT LUC 抽出バッファー (Promega Corporation, Madison, WI) を用いて抽出された。遠心分離後、約 600 μL のタンパク質抽出物が収集された。タンパク質濃度は Bradford アッセイを使用して推定された。

【0137】

LUC 酵素活性 (ルシフェラーゼ単位 (LU) / mg タンパク質で表される) および GUS 酵素活性 (GUS 活性単位 (GU) / μg タンパク質で表される) は、たとえば、Maliga et al., Methods in Plant Molecular Biology. A Laboratory Course Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995に見出される方法により測定された。SCBV : LUC 構築物における試験プロモーターの相対活性は、LUC レベルを LU / mg タン

パク質対GUS / μ g タンパク質の比としてGUSレベルに正規化することにより比較された。

【実施例3】

【0138】

トウモロコシ植物における活性化タギングのためのプラスミド

この実施例はアグロバクテリウム(Agrobacterium)スーパーバイナリー(superbinary)プラスミドの作製を説明する。

【0139】

スーパーバイナリーシステムはアグロバクテリウム(Agrobacterium)シャトルベクター / 相同組換えシステム (Komari et al., Meth. Mol. Biol. 343:15-41, 2006, Komari et al., Plant Physiol. 114:1155-1160, 2007; 欧州特許第 6 0 4 6 6 2 号および米国特許第 7 0 6 0 8 7 6 号も参照。これら文献のそれぞれが参照によりその全体を組み込まれる) の特殊化した例である。スーパーバイナリーシステムで用いられるアグロバクテリウム・ツメファシエンス(Agrobacterium tumefaciens)宿主株は、L B A 4 4 0 4 (p S B 1) である。L B A 4 4 0 4 (p S B 1) 株は、2つの独立して複製するプラスミド、p A L 4 4 0 4 と p S B 1 を宿している。p A L 4 4 0 4 は無傷のセットの v i r 遺伝子 (T i プラスミド p T i A C H 5 由来) を含有するが、T - D N A 領域がない (したがって、T - D N A 左および右境界反復配列がない) T i プラスミド由来ヘルパープラスミドである。プラスミド p S B 1 は p T i B o 5 4 2 由来の v i r 遺伝子の追加の部分的セットを供給する。スーパーバイナリーシステムにおいて使用されるシャトルベクターの一例は p S B 1 1 であり、これは、植物細胞形質転換に向かうことになっており右と左の T - D N A 境界反復配列に隣接する遺伝子の導入部位として働くクローニングポリリンカーを含有する。シャトルベクター p S B 1 1 は、アグロバクテリウム(Agrobacterium)において独立して複製することはできないが、p S B 1 と p S B 1 1 上に存在する共通の配列間での相同組換えによって p S B 1 に組み込まれると共組み込み体(co-integrand)プラスミドとしてその場所に安定的に維持される。したがって、改変された p S B 1 1 ベクター上の L B A 4 4 0 4 (p S B 1) に導入された完全に改変された T - D N A 領域は、2つの異なるアグロバクテリウム(Agrobacterium) T i プラスミド供給源 (p T i A C H 5 と p T i B o 5 4 2) 由来の V i r タンパク質により増殖性に作用を受け植物細胞内に移される。スーパーバイナリーシステムは単子葉植物種の形質転換において特に有用であることが判明している(Hiei et al., Plant J. 6:271-282, 1994、およびIshida et al., Nat. Biotechnol. 14:745-750, 1996参照)。

【0140】

活性化タグ付きトウモロコシ植物を生産するための形質転換プラスミドは、スーパーバイナリープラスミドの p S B 1 と p E P P 1 0 8 8 との間の相同組換えにより形成され、p S B 1 1 ベクター骨格を有する共組み込み体を含むことができる (欧州特許第 6 0 4 6 6 2 号および米国特許第 7 0 6 0 8 7 6 号参照。これら特許文献はそれぞれこれによって参照により組み込まれる) 。共組み込み体プラスミドは、p S B 1 : : p E P P 1 0 8 8 または Z e a T A G ベクターと呼ばれる。p E P P 1 0 8 8 の構造は、制限酵素分析および構築物の選択された領域の D N A 配列決定により確認された。p E P P 1 0 8 8 は、p S B 1 1 プラスミドにより提供される左 (L B) と右 (R B) T - D N A 境界配列間に位置して、4 コピーの上記 - 5 0 2 から - 2 2 2 b p S C B V エンハンサー配列および関連するイントロン 1 と 5 ' U T R を有するイネ(Oryza sativa) アクチン遺伝子プロモーターを含む選択可能マーカー遺伝子 (基本的に、ジェンバンク受託番号 E U 1 5 5 4 0 8 . 1 の塩基 1 2 から 1 4 1 1 として開示されている。前記塩基はこれによって参照によりその全体を組み込まれている) 、米国特許出願公開第 2 0 0 9 / 0 0 9 3 3 6 6 号に開示されている A A D - 1 除草剤耐性タンパク質に対するコード配列ならびに基本的にジェンバンク受託番号 g b | L 3 5 9 1 3 . 1 | M Z E L I P A S E の塩基 9 2 1 から 1 2 7 7 としておよび米国特許第 7 1 7 9 9 0 2 号に開示されている (前記塩基配列と特許文献はそれぞれがこれによって参照によりその全体を組み込まれている) トウモロコシリパーゼ遺

伝子由来の3'UTRターミネーター配列を含有する。

【0141】

pEPP1088の(およびpSB1::pEPP1088に存在する)T-DNAは、アグロバクテリウム(Agrobacterium)媒介形質転換によりトウモロコシ細胞内に導入されると、トウモロコシ染色体の無作為な位置で組み込まれる。形質転換されたトウモロコシ細胞の選択は、T-DNAにおいて構成的に発現されるAAD1選択可能マーカー遺伝子により提供される。直列コピーの強力な-502から-222bpSCBV転写エンハンサー活性化因子エレメントを担持するT-DNAは、組込み部位近くの天然の遺伝子の異常な発現を引き起こし、それによって一部の例では、形質転換された組織から再生する植物に新しい同定可能な形質を与える。アクセプター部位近くの影響を受けた遺伝子の単離および同定を促進し、したがって、さらなる利用のために単離された遺伝子を提供する現代分子生物学の方法が利用可能である。

10

【実施例4】

【0142】

トウモロコシのアグロバクテリウム(Agrobacterium)媒介形質転換

この実施例は、トウモロコシのアグロバクテリウム(Agrobacterium)媒介形質転換の作製を説明する。

【0143】

未成熟胚生産。B104近交系由来の種子は、Sunshine Custom Blend(登録商標)160(Sun Gro Horticulture、Bellevue、WA)を含有する4ガロン鉢に蒔かれた。植物体は、高圧ナトリウムとメタルハライドランプの16対8時間の明対暗の光周期を組み合わせる温室で栽培した。形質転換のための未成熟胚を得るために、調節されたシブ受粉が実施された。未成熟胚は、胚がおよそ1.4から2.0mmの大きさになる受粉の10から13日後に単離された。

20

【0144】

感染および共培養。トウモロコシ穂は、Tween20(500mLあたり1または2滴)を含む50%市販の漂白剤に10分間浸すことにより表面殺菌され、滅菌水でトリプルにすすがれた。スーパーバイナリーベクター共組み込み体プラスミドを含有するアグロバクテリウム(Agrobacterium)細胞の懸濁液は、50mg/Lのスペクチノマイシン、10mg/Lのリファンピシン、および50mg/Lのストレプトマイシンを含有するYEP固形培地上、28で3日間または25で4日間増殖させた1または2ループの細菌を、100μMのアセトシリンゴンを含む5mLの液体感染培地(MS塩、ISU Modified MSビタミン、3.3mg/Lのジカンバ、68.4gm/Lのショ糖、36gm/Lのグルコース、700mg/LのL-プロリン、pH5.2)に移すことにより調製された。前記溶液は、均一な懸濁液が実現されるまで、無菌5mLピペットを使用して穏やかに上下にピペティングし、濃度はUltraspacer 10 Cell Density Meter(GE Healthcare/Amersham Biosciences、Piscataway、NJ)を使用して600nm(OD₆₀₀)で0.3から0.5の光学密度に調整された。未成熟胚は、2mLの感染培地を含有するマイクロ遠心分離管に直接単離された。前記培地は取り除かれ、1から2mLの新鮮な感染培地で2度置き換えられ、次に取り除かれ、1.5mLのアグロバクテリウム(Agrobacterium)溶液で置き換えられた。アグロバクテリウム(Agrobacterium)と胚溶液は室温で5分間インキュベートされ、その後、MS塩、ISU Modified MSビタミン、3.3mg/Lのジカンバ、30gm/Lのショ糖、700mg/LのL-プロリン、100mg/Lのミオイノシトール、100mg/Lのカゼイン酵素加水分解物、15mg/LのAgNO₃、100μMのアセトシリンゴン、および2.3から3gm/LのGelzan(商標)(Sigma-Aldrich、St. Louis、MO)をpH5.8で含有する共培養培地に移された。共培養インキュベーションは、暗闇または24時間白色蛍光灯条件(およそ50μEm⁻²s⁻¹)下、25で3から4日間であった。

30

40

【0145】

静止および選択。共培養後、胚は、MS塩、ISU Modified MSビタミン、3.3 mg/Lのジカンバ、30 g/Lのショ糖、700 mg/LのL-プロリン、100 mg/Lのミオイノシトール、100 mg/Lのカゼイン酵素加水分解物、15 mg/Lの AgNO_3 、0.5 g/LのMES (2-(N-モルフォリノ)エタンスルホン酸一水和物; Phyto Technologies Labr., Lenexa, KS)、250 mg/Lのカルベニシリン、および2.3 g/LのGelzan (商標)をpH 5.8で含有する非選択MSベースの静止培地に移された。インキュベーションは、暗闇または24時間白色蛍光灯条件(およそ $50 \mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$)下、28℃で7日間継続された。7日間の静止期間に続いて、胚は選択培地に移された。植物発現可能AAD1選択可能マーカー遺伝子を含むスーパーバイナリープラスミドで形質転換されたトウモロコシ組織を選択するために、MSベースの静止培地(上記)がハロキシホップ(Haloxyfop)を補充して使用された。胚は、最初に100 nMハロキシホップを含む選択培地に移され、1から2週間インキュベートされ、その後500 nMハロキシホップに移され、さらに2から4週間インキュベートされた。形質転換された単離物は、暗闇または24時間白色蛍光灯条件(およそ $50 \mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$)下、28℃でおよそ5から8週間の間に得られた。回収された単離物は、再生およびさらなる分析のために、1から2週間の間隔をあけて新鮮な選択培地に移されることにより増大された。

10

【0146】

トウモロコシ形質転換の分野の当業者であれば、他の植物発現可能選択可能マーカー遺伝子(たとえば、除草剤耐性遺伝子)が使用される場合には、形質転換された植物の他の選択方法が利用可能であることを理解するであろう。

20

【0147】

プレ再生。選択プロセスに続いて、24時間照明レジームに曝露された培養物は、MS塩、ISU Modified MSビタミン、45 g/Lのショ糖、350 mg/LのL-プロリン、100 mg/Lのミオイノシトール、50 mg/Lのカゼイン酵素加水分解物、1 mg/Lの AgNO_3 、0.25 g/LのMES、0.5 mg/Lのナフタレン酢酸、2.5 mg/Lのアブシジン酸、1 mg/Lの6-ベンジルアミノプリン、250 mg/Lのカルベニシリン、2.5 g/LのGelzan (商標)、および500 nMのハロキシホップをpH 5.8で含有するMSベースの前再生培地に移された。インキュベーションは、24時間白色蛍光灯条件(およそ $50 \mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$)下、28℃で7日間継続された。

30

【0148】

再生および小植物単離。再生のために、前記培養物は、MS塩、ISU Modified MSビタミン、60 g/Lのショ糖、100 mg/Lのミオイノシトール、125 mg/Lのカルベニシリン、2.5 g/LのGelzan (商標)、および500 nMのハロキシホップをpH 5.8で含有するMSベースの一次再生培地に移された。暗闇または24時間白色蛍光灯条件(およそ $50 \mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$)下、28℃で2週間後、組織は、500 nMのハロキシホップ有りまたはなしで、MS塩、ISU Modified MSビタミン、30 g/Lのショ糖、100 mg/Lのミオイノシトール、3 g/LのGelzan (商標)、pH 5.8で構成されたMSベースの二次再生培地に移された。再生/選択は、16時間または24時間白色蛍光灯条件(およそ $50 \mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$)下、28℃で2週間継続された。小植物が3から5 cm長に到達すると、切除され、二次再生培地(上記の通り、しかしハロキシホップなし)に移され、16時間白色蛍光灯条件(およそ $50 \mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$)下、25℃でインキュベートされて、苗条および根のさらなる成長発育を可能にした。

40

【0149】

種子生産。植物体はMetro-Mix (登録商標) 360無土壌生育培地(Sun Gro Horticulture)に移植され、生育部屋で寒さに慣れさせた。次に、植物体はSunshine Custom Blend 160土壌混合物に移植し、開

50

花まで温室で栽培された。種子生産のための調節受粉が行われた。

【実施例 5】

【0150】

安定的に形質転換されたトウモロコシ細胞におけるSCBVエンハンサー活性

ゲノムDNAは、形質転換されたB104未成熟胚から再生された10のT₀植物から単離され(Qiagen DNeasy(登録商標)Plant Miniキット; Qiagen, Germantown, Maryland)、pSB1::pEPP1088から移入された組み込まれたT-DNAの遺伝子位置は、逆PCRクローニングおよび逆PCR増幅産物のDNA塩基配列決定により決定された。10kbの4×SCBVエンハンサー内に位置する隣接コード領域により表される遺伝子の同一性は、クエリー配列として隣接配列を使用して、BLAST検索(Altschul et al., J. Mol. Biol., 215: 403-410、およびKarlin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-2268, 1990)により決定された。BLAST結果の解析により、T-DNA、したがって4×SCBVエンハンサーは10の系統それぞれにおいて異なる遺伝子位置に組み込まれていることが明らかになり、したがって4×SCBVエンハンサーはそれぞれの系統において異なる遺伝子に隣接している(表1)。

【0151】

全RNAは10のT₀系統の葉組織から単離された(Qiagen DNeasy(登録商標)Plant Miniキット; Qiagen, Germantown, Maryland)。同定された隣接遺伝子の転写物蓄積は、4×SCBVエンハンサーに隣接する関連する遺伝子に特異的なプライマーを使用して、逆転写およびRT-PCR(リアルタイムPCR)により適切なT₀植物と非形質転換対照植物間で比較された。対照として、内在性GAPDH遺伝子の転写物蓄積も決定された。

【0152】

RT-PCR産物により、これらの系統における3つの異なる隣接遺伝子から生じる転写物の蓄積が増加することが明らかになった。4×SCBVエンハンサーは、T₀系統のうちの2つでは影響を受ける隣接遺伝子の2.6kbおよび2.8kb上流に、第3のT₀系統では影響を受ける隣接遺伝子の478bp下流に位置している。したがって、これらの結果から、T-DNAにより送達される4×SCBVエンハンサーが組み込み部位近くの遺伝子転写物の蓄積の鎖非依存性増加を引き起こすことが示される。表1は、同定された隣接遺伝子およびその転写レベルの解析結果を示している。

【0153】

【表1】

表1. 10のT₀植物における隣接遺伝子のRNA蓄積に対する4×SCBVエンハンサーの効果

T ₀ 苗ID	4×SCBVまでの距離(bp)	隣接遺伝子名	RNA蓄積
ZT00031845	1197	P-ループ含有NTPヒドロラーゼ	変化なし
ZT00032132	5'-UTR	小胞融合タンパク質を助けるタンパク質	変化なし
ZT00036435	2644	DEAD-ボックス様ヘリカーゼ	増加
ZT00034545	1972	高移動性基様核タンパク質	変化なし
ZT00036729	EST	未知のタンパク質	変化なし
ZT00035749	2818	未知のタンパク質 (GRMZM2G115661)	増加
ZT00033904	830	未知のタンパク質	変化なし
ZT00036426	79	リボソームタンパク質L22-L17; T ₀ 植物は高い	変化なし
ZT00036426	2150	単一ペプチド	変化なし
ZT00035050	3'末端から478	未知の遺伝子 (GRMZM2G139336)	増加

10

20

30

40

50

【 0 1 5 4 】

トウモロコシ遺伝学および植物分子生物学の分野の当業者であれば、影響を受ける遺伝子の性質に応じて、4 × S C B V エンハンサーにより誘導される隣接する遺伝子の発現の増加が一部の場合に、トランスジェニック植物に新しい価値のある形質を与えることを理解するであろう。まとめると、4 × S C B V エンハンサーを有する植物体は Z e a T A G の付いた集団を表す。前記形質は、たとえば、種子における栄養的に望ましいタンパク質の蓄積の増加のような、影響を受ける遺伝子にコードされたタンパク質それ自体の蓄積の増加の結果、または即時に影響を受ける遺伝子の遺伝子産物が1つまたは多数の他の遺伝子（たとえば、転写活性化因子/リプレッサー遺伝子の場合のような）の発現を制御する下流効果の結果でもよい。導入された T - D N A の組込み場所の無作為性は、標準植物育種法と相俟って、トウモロコシゲノム内のすべてのまたは大半の遺伝子から効果的距離内に活性化因子エレメントが配置されている T - D N A 担持植物体のライブラリーを含む植物体の大集団を確立するのに使用し得、したがって、すべてのまたは大半のトウモロコシ遺伝子が転写的に活性化される機会を与える。

10

【 0 1 5 5 】

経済的に重要な表現型を求める植物体レベルのスクリーニングは、グロースチャンパー、温室またはフィールド環境下で可能である。ここで明らかにされるように、逆 P C R などの分子生物学方法により、組み込まれた T - D N A および前記組み込まれた T - D N A に隣接する相当な長さのゲノム D N A を望ましい表現型を示す植物体から単離することが可能である。さらに、ゲノムウォーキング法などの方法により、はるかに広範囲な領域のゲノム D N A 配列を決定することが可能であり、したがって、導入された活性化因子エレメントに近接して存在する遺伝子の同定が可能になる。マイクロアレイ解析などのハイスループット法およびさらに多くの遺伝子特異的解析法により、影響を受ける転写物レベルの同定および定量化が可能になる。したがって、関連のある農業形質に關与する候補遺伝子が同定され、単離され、さらに特徴付けられ、利用されて、新しい価値ある種類の作物が提供され得る。

20

【 0 1 5 6 】

逆に言えば、新しい形質は、4 × S C B V エンハンサーを有する T - D N A がトウモロコシ遺伝子のコード領域または発現調節領域に組み込まれたことによりトウモロコシ遺伝子機能が破壊される結果である可能性がある。それが事実であれば、4 × S C B V エンハンサーを有する T - D N A と周辺のゲノム領域を単離してさらに特徴付けることが可能である。

30

【 実施例 6 】

【 0 1 5 7 】

Z e a T A G 集団のフォワード遺伝学的スクリーニング(Forward Genetic Screening)
この実施例は、変更された表現型を求める Z e a T A G 集団のフォワード遺伝学的スクリーニングを説明する。

【 0 1 5 8 】

乾燥ストレススクリーニング

乾燥耐性(drought tolerance)を与える変異を含有する Z e a T A G 系統を同定するために、個々の Z e a T A G 事象由来の植物体をフィールドに植える。成長周期の生殖相中、すなわち開花に先立つおよそ2週間から開花後およそ2週間は、乾燥ストレスを与えるために水は控える。標的は開花期に4週間のストレス期間を達成することになる。環境モデリングを使用して、土壌水分モニタリングおよび気象データ（気温、飽差、風速、および純放射量）に基づいて正確なトウモロコシ蒸発散需要(evapotranspiration demand)を予測する。目視による葉ローリング(leaf rolling)、赤外線温度計による葉温度の増加、葉緑素蛍光による光合成の減少および穀物生産量を測定することによる収量の減少などの旱魃徴候について植物体をモニターする。水分ストレス条件下で有意に少ない葉ローリング、低下した葉温度、上昇した光合成速度を示すまたは有意に増大した収量のある植物体が同定され、それに続くスクリーニングに使用される。

40

50

【 0 1 5 9 】

有意に増大した乾燥耐性を示す Z e a T A G 事象を、乾燥耐性表現型を確認するために複製実地試験に導入する。これらの事象を、少なくとも 3 つの複製を用いて、無作為化分割ブロック計画に導入する。1 つのブロックには、水分ストレスを予防するのに十分な水がまかれる。もう一方のブロックは、上記の通りに水不足条件下で栽培される。上記の通りに葉ローリング、葉温度の増加、光合成の減少および収量の減少について植物体をモニターする。非形質転換対照植物体よりも葉ローリングが有意に少なく、葉温度が低く、光合成が多くまたは収量が多い植物体は二次スクリーニングを通過したと見なされる。

【 0 1 6 0 】

窒素利用効率スクリーニング

10

非トランスジェニック対照植物よりも窒素利用効率が大きい Z e a T A G 事象を同定するために、一次スクリーニングが実施される。およそ 4 0 0 0 0 の Z e a T A G 含有事象を含有する植物体は、窒素不足条件下、フィールドで栽培される。植物体は、1 エーカーあたり N が 3 5 l b s 未満のフィールドで栽培される。目視検査による白化、赤外線温度計による葉温度の増加、および穀物収穫による収量の減少について植物体をモニターする。これらのパラメータは、非トランスジェニック対照植物体と比較される。非トランスジェニック対照系統よりも白化が少なく、葉温度が低く、光合成速度が大きくまたは収量が多い Z e a T A G 系統は二次スクリーニングにおいて評価される。

【 0 1 6 1 】

二次スクリーニングとして、有意に大きな窒素利用効率を示す Z e a T A G 事象を、前記表現型を確認するための複製実地試験に導入する。これらの事象を、少なくとも 3 つの複製を用いて、無作為化分割ブロック計画に導入する。1 つのブロックには、窒素ストレスを予防するのに十分な窒素肥料がまかれる。もう一方のブロックは、上記の通りに窒素不足条件下で栽培される。目視検査による白化、赤外線温度計による葉温度の増加、および穀物収穫による収量の減少について植物体をモニターする。非形質転換対照植物体よりも白化が少なく、葉温度が低く、光合成速度が大きくまたは収量が多い植物体は二次スクリーニングを通過したと見なされる。

20

【 0 1 6 2 】

二次スクリーニングにおいて表現型が確認されると、前記表現型は、非形質転換親系統と Z e a T A G 系統間の交配種の子孫をスクリーニングすることにより、Z e a T A G 挿入を有する遺伝連鎖について試験される。Z e a T A G エlementを含有する植物体が前記表現型を示し、Z e a T A G エlementを含有しない植物体が前記表現型を示さない場合、表現型はインサートに遺伝的に関連しており、Z e a T A G エlementによって引き起こされる可能性があると思なされる。その発現が Z e a T A G エlementにより影響を受ける可能性のある遺伝子を同定するために、ゲノム内の Z e a T A G エlementの位置が決定される。

30

【 0 1 6 3 】

Z e a T A G エlementの遺伝子位置は、Z e a T A G エlementに隣接するゲノム配列を単離しこれらの配列をトウモロコシのゲノム配列と比較することにより決定される。Z e a T A G エlementに隣接する配列は、逆 P C R (i P C R) (Ochman et al., Genetics, 120: 621-623 1988)、T A I L (Liu et al., Plant Journal 8: 457-463, 1995) およびライゲーション媒介 P C R (L M P C R) (Prod'homme et al., FEMS Microbiol Lett. 158: 75-81, 1998) を含むがこれらに限定されないいくつかの分子生物学技法により決定することが可能である。これらの配列は、ゲノム内の Z e a T A G エlementの位置を同定するために、B L A S T などの配列整列化ツールによるゲノム配列と比較される。

40

【 0 1 6 4 】

Z e a T A G エlementに隣接しているまたは中断される遺伝子は、注釈付のゲノムを調べることにより決定される。Z e a T A G エlementに隣接する遺伝子の転写は、変異体表現型に関与している可能性がある。これらの遺伝子は、類似の表現型を与えることができるかどうかを試験するために野生型トウモロコシにおいて過剰発現され得る。これを

50

試験するため、前記遺伝子は強力なプロモーターによりまたは隣接して転写を増強するエンハンサー配列を有するそれ自体のプロモーターにより推進される形質転換ベクターにクローニングされる。これらのベクターは、形質転換により野生型トウモロコシに導入され、この形質転換から生じる植物体を前記表現型について試験する。

【0165】

同様に、Z e a T A Gエレメントにより中断される遺伝子は前記表現型を引き起こし得る。前記エレメントにより中断された遺伝子が前記表現型に関与していることを確かめるために、前記遺伝子の発現を妨害することができ、この妨害を含有する植物体は前記表現型について試験することが可能である。特定の遺伝子の発現の妨害は、アンチセンスRNA、人工的マイクロRNAおよびT I L L I N Gによる遺伝子中の変異の同定を含むがこれらに限定されない当業者には公知のいくつかの方法により実現することができる。

10

【実施例7】

【0166】

Z e a T A G集団の逆遺伝子スクリーニング

この実施例は、変異についてのZ e a T A G集団の逆遺伝子スクリーニングを説明する。

【0167】

逆遺伝子スクリーニングは、特定の遺伝子に影響を与える変異を探し、それに続いて変異体表現型について同定された系統を試験する。Z e a T A G集団は、前記集団を表す隣接配列タグ(Flanking Sequence Tags)のコレクションを作製する(Jeong et al., The Plant Journal 45: 123-132, 2006)およびZ e a T A G集団からDNAのプールされた試料の指標付コレクションを作製する(May et al., Molecular Biotechnology 20: 209-221, 2002)を含むが、これらに限定されないいくつかの方法で逆遺伝子解析において使用することができる。

20

【0168】

隣接配列タグのコレクションは、Z e a T A G集団から葉組織を試料採取し、それぞれからDNAを単離し、インサートに隣接する配列を同定し、配列をそれが由来する事象に関連付けられる検索可能なデータベースに前記配列を保存することにより作製される。ゲノムDNAは、製造業者が推奨するプロトコルを使用してQ i a g e n DNAeasy Plantキット(Q i a g e n, G e r m a n t o w n, M a r y l a n d)を使用して単離される。インサートに隣接する配列は、YephremovおよびSaedler (Plant Journal 21: 295-305, 2000)により改変されたライゲーション媒介PCR(Mueller et al., Science 246: 780-786, 1989)を使用して同定される。手短に言えば、Z e a T A G系統由来のゲノムDNAは、断片化された制限酵素消化であり変性される。Z e a T A Gエレメントの末端の配列に相補的なビオチン化されたオリゴヌクレオチドプライマーは、断片化されたDNAにハイブリダイズされ、DNAポリメラーゼにより伸長される。ストレプトアビジン被膜磁気ビーズは混合物に添加されて、このプライマーから伸長されたDNA断片を含有するDNA断片に結合する。既知の配列の二本鎖DNAアダプターは未知の末端にライゲートされる。これらの断片は、Z e a T A Gエレメント内の配列に相補的なオリゴヌクレオチドともう一方の末端のDNAアダプターを使用してPCR増幅される。次に、PCR断片の配列は、B L A S Tにより決定され、トウモロコシゲノム配列にマッピングされる。これらの配列はZ e a T A Gエレメントの挿入部位を位置付ける。約10kbp内の遺伝子は、Z e a T A Gエレメント内のエンハンサー配列により上方調節され得る。

30

40

【0169】

表現型を引き起こすと仮定されている遺伝子内にまたは近くに挿入を含有する植物体は、データベースを検索することにより同定することが可能である。これらの事象を含有する植物体は、表現型について試験することができる。

【0170】

開示された発明の原理を適用し得る多くの可能な実施形態の点から見て、例証された実

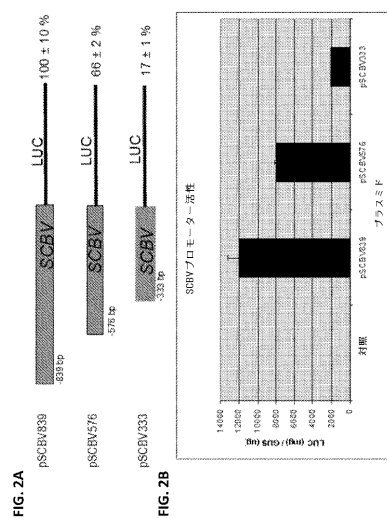
50

施形態は本発明の好ましい実施例にすぎず、本発明の範囲を限定すると解釈すべきではないことは認識されるべきである。むしろ、本発明の範囲は以下の特許請求の範囲により定義される。したがって、我々は、これらの特許請求の範囲の範囲と精神内に収まるすべてのものを我々の発明として主張する。

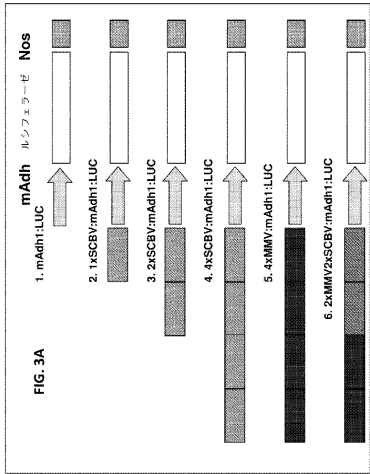
【 図 1 】

[illegible]

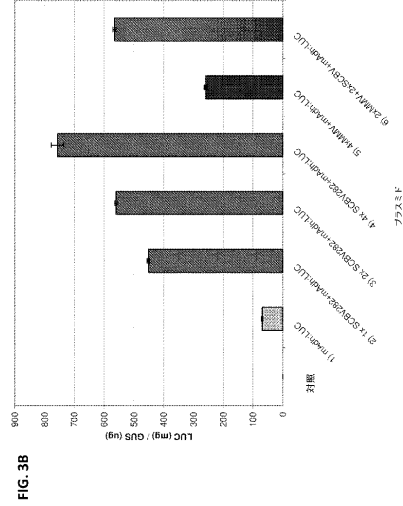
【 図 2 】



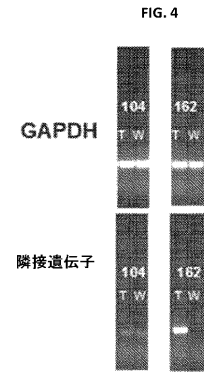
【 図 3 A 】



【 図 3 B 】



【 図 4 】



【配列表】

0006039560000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 0 1 H	5/06	(2006.01)	A 0 1 H 5/06
A 0 1 H	5/08	(2006.01)	A 0 1 H 5/08
A 0 1 H	5/12	(2006.01)	A 0 1 H 5/12
A 0 1 H	1/00	(2006.01)	A 0 1 H 1/00 A
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N 5/10

- (72)発明者 デイビス, ジョン, ピー.
アメリカ合衆国 オレゴン州 9 7 2 1 5, ポートランド, エス.イー.マディソン ストリート
4 6 1 7
- (72)発明者 レディー, ヴァカ, エス.
アメリカ合衆国 オレゴン州 9 7 0 0 7, ビーバートン, エスダブリュー ヨコム レーン 1
9 8 2 3
- (72)発明者 エインリー, ウィリアム, エム.
アメリカ合衆国 インディアナ州 4 6 0 3 2, カーメル, クリアーウォーター コート 1 4 7
4
- (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, ズィオンシビル, シルバー ライス コート 6
2 3

審査官 厚田 一拓

- (56)参考文献 国際公開第2 0 1 0 / 0 8 6 2 7 7 (WO, A 1)
国際公開第2 0 0 2 / 0 4 2 4 5 0 (WO, A 1)
Biotechnology [online], 2 0 1 0 年 8 月 2 7 日, Vol.9, No.3, pp.283-293, <<http://www.scialert.net/fulltext/?doi=biotech.2010.283.293&org=11>> [retrieved on 2015/06/25]
Bouhida M. et al., Accession No.M89923, Definition:Sugarcane bacilliform Mor virus ORF 1, ORF2, and ORF3 genes, complete cds., Database DDBJ/EMBL/Genbank [online], 2 0 0 5 年, <<http://www.dpvweb.net/dpv/showseq.php?seq=m89923>> [retrieved on 2015/06/25]
J. Virol., 1 9 9 2 年, Vol.66, No.5, pp.2846-2852
J. Virol., 1 9 9 1 年, Vol.65, No.1, pp.526-531
J. Virol., 2 0 0 4 年, Vol.78, No.19, pp.10820-10824

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
C A p l u s / M E D L I N E / B I O S I S (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
P u b M e d