

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-536819

(P2009-536819A)

(43) 公表日 平成21年10月22日 (2009. 10. 22)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 A	2 B 0 3 0
C O 7 K 14/195 (2006. 01)	C O 7 K 14/195 Z N A	4 B 0 2 4
C 1 2 N 5/10 (2006. 01)	C 1 2 N 5/00 C	4 B 0 3 3
C 1 2 N 1/21 (2006. 01)	C 1 2 N 5/00 B	4 B 0 6 3
C 1 2 N 1/19 (2006. 01)	C 1 2 N 1/21	4 B 0 6 4
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 63 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2009-508058 (P2009-508058)	(71) 出願人	305039998
(86) (22) 出願日	平成19年5月11日 (2007. 5. 11)		コモンウェルス サイエнтиフィック
(85) 翻訳文提出日	平成21年1月13日 (2009. 1. 13)		アンド インダストリアル リサーチ
(86) 国際出願番号	PCT/AU2007/000640		オーガニゼーション
(87) 国際公開番号	W02007/131276		オーストラリア国 2 6 0 2
(87) 国際公開日	平成19年11月22日 (2007. 11. 22)		リアン キャピタル テリトリー
(31) 優先権主張番号	60/747, 151		キャン
(32) 優先日	平成18年5月12日 (2006. 5. 12)	(71) 出願人	508335657
(33) 優先権主張国	米国 (US)		グレインズ リサーチ
			アンド デヴェロ
			ップメント コーポレイション
			オーストラリア国 オーストラリアン
			キャピタル テリトリー 2 6 0 0, バルト
			ン, ブラックオール ストリート 4 0
		(74) 代理人	100092783
			弁理士 小林 浩
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 除草剤を分解するための酵素

(57) 【要約】

本発明は、アミン含有除草剤（例えばグリホサートおよびグリホシネート）を分解することができる新タイプの酵素、ならびにこれらの酵素をコードするポリヌクレオチドに関する。本発明は、またアミン含有除草剤活性に対して耐性である、これらの酵素を生産するトランスジェニック植物にも関する。加えて、本発明は、この新タイプの酵素の活性に依存するバイオレメディエーション法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

グリホサートを開裂させてグリシンを生産する、実質的に精製されたポリペプチド。

【請求項 2】

グリホサートのホスホノメチル C-3 炭素と窒素の結合を開裂させる、実質的に精製されたポリペプチド。

【請求項 3】

単一アミノ酸鎖を含む、請求項 1 または請求項 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 4】

前記ポリペプチドが可溶性である、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載のポリペプチド。 10

【請求項 5】

グリホサートの開裂の結果として、グリオキシレートが実質的に生産されない、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 6】

グリホサートの開裂の結果として、サルコシンが実質的に生産されない、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 7】

G O X（配列番号 3）を開裂させる効率より大きいグリホサートを開裂させる効率を有する、実質的に精製されたポリペプチド。 20

【請求項 8】

$550 \mu\text{mol 分}^{-1}\text{mg}^{-1}$ より大きい、グリホサートの開裂についての比活性を有する、実質的に精製されたポリペプチド。

【請求項 9】

i) 配列番号 1 に提供されるアミノ酸配列；および
i i) i) と少なくとも 25% 同一であるアミノ酸配列
から選択される配列を含み、
前記ポリペプチドがアミン含有除草剤を開裂させる、
実質的に精製されたポリペプチド。

【請求項 10】

前記アミン含有除草剤が、グリホサートまたはグルホシネートである、請求項 9 に記載のポリペプチド。 30

【請求項 11】

前記ポリペプチドが配列番号 1 と少なくとも 60% 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 9 または請求項 10 に記載のポリペプチド。

【請求項 12】

前記ポリペプチドが配列番号 1 と少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 9 または請求項 10 に記載のポリペプチド。

【請求項 13】

前記ポリペプチドはアルスロバクター属種から精製することができる、請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載のポリペプチド。 40

【請求項 14】

前記アルスロバクター属種が、アルスロバクター属種 T B D である、請求項 13 に記載のポリペプチド。

【請求項 15】

少なくとも 1 つの他のポリペプチドに融合している、請求項 1 から 14 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 16】

i) 配列番号 2、
i i) 請求項 1 から 15 のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチ 50

ドの配列、

i i i) i) と少なくとも 25% 同一であるヌクレオチドの配列、

i v) 低ストリンジェンシー条件下で i) にハイブリダイズするヌクレオチドの配列、

v) i) から i v) に相補的なヌクレオチドの配列

から選択される配列を有するヌクレオチドを含む、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 17】

アミン含有除草剤を開裂させるポリペプチドをコードする、請求項 16 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 18】

前記アミン含有除草剤が、グリホサートまたはグルホシネートである、請求項 17 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 19】

ストリンジェントな条件下で i) にハイブリダイズする配列を含む、請求項 16 から 18 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 20】

植物細胞において機能する 3' ポリアデニル化配列に作動可能に連結されている、請求項 1 から 15 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドをコードする構造 DNA 配列に作動可能に連結されている、前記細胞において機能するプロモーターを含む、組換えポリヌクレオチドであって、前記プロモーターは、前記構造 DNA 配列に対して異種であり、前記構造 DNA 配列を発現して前記細胞のアミン含有除草剤に対する耐性を強化することができる組換えポリヌクレオチド。

【請求項 21】

請求項 16 から 20 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 22】

前記ポリヌクレオチドが、プロモーターに作動可能に連結されている、請求項 21 に記載のベクター。

【請求項 23】

請求項 16 から 20 のいずれか一項に記載の少なくとも一種のポリヌクレオチドおよび／または請求項 21 もしくは請求項 22 に記載の少なくとも 1 つのベクターを含む宿主細胞。

【請求項 24】

植物細胞である、請求項 23 に記載の宿主細胞。

【請求項 25】

グリホサートを開裂させ、グリシンを生産する組換え細胞。

【請求項 26】

グリホサートのホスホノメチル C-3 炭素と窒素の結合を開裂させる導入ポリペプチドを含む組換え細胞。

【請求項 27】

請求項 1 から 15 のいずれか一項に記載のポリペプチドを調製するためのプロセスであって、前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの発現を可能にする条件下で、前記ポリペプチドをコードする請求項 23 に記載の宿主細胞、または前記ポリペプチドをコードする請求項 22 に記載のベクターを培養する工程、および発現されたポリペプチドを回収する工程を含む、前記プロセス。

【請求項 28】

請求項 27 に記載の方法を用いて生産されるポリペプチド。

【請求項 29】

請求項 1 から 15 のいずれか一項に記載のポリペプチドに特異的に結合する、単離された抗体。

【請求項 30】

請求項 1 から 15 のいずれか一項に記載の少なくとも 1 種のポリペプチド、請求項 16

10

20

30

40

50

から 20 のいずれか一項に記載の少なくとも一種のポリヌクレオチド、請求項 21 もしくは請求項 22 に記載のベクター、請求項 23 もしくは請求項 24 に記載の宿主細胞、請求項 25 もしくは請求項 26 に記載の組換え細胞および／または請求項 29 に記載の抗体と 1 つもしくはそれ以上の許容される担体とを含む組成物。

【請求項 31】

アミン含有除草剤を開裂させるための組成物であって、請求項 1 から 15 のいずれか一項に記載の少なくとも一種のポリペプチドと 1 つまたはそれ以上の許容される担体とを含む、組成物。

【請求項 32】

金属イオンをさらに含む、請求項 30 または請求項 31 に記載の組成物。

10

【請求項 33】

前記金属イオンが、 Co^{2+} 、 Zn^{2+} および／または Mg^{2+} である、請求項 32 に記載の組成物。

【請求項 34】

組換え細胞を検出および／または選択するための選択可能マーカーとしての、請求項 1 から 15 のいずれか一項に記載のポリペプチド、または前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの使用。

【請求項 35】

組換え細胞を検出するための方法であって、

i) 細胞または細胞集団と、請求項 1 から 15 のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとを、前記細胞による前記ポリヌクレオチドの取り込みを可能にする条件下で接触させる工程、および

20

ii) 工程 i) からの細胞またはそれらの子孫細胞をアミン含有除草剤に曝露することによって組換え細胞を選択する工程、を含む、前記方法。

【請求項 36】

前記ポリヌクレオチドが、請求項 1 から 15 のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードする第一のオープンリーディングフレーム、および請求項 1 から 15 のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードしない第二のオープンリーディングフレームを含む、請求項 35 に記載の方法。

30

【請求項 37】

前記第二のオープンリーディングフレームが、ポリペプチドをコードする、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

前記第二のオープンリーディングフレームが、翻訳されないポリヌクレオチドをコードする、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 39】

前記翻訳されないポリヌクレオチドが、触媒核酸、dsRNA 分子またはアンチセンス分子をコードする、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

前記細胞が、植物細胞、細菌細胞、真菌細胞または動物細胞である、請求項 35 から 39 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 41】

前記細胞が植物細胞である、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 42】

前記アミン含有除草剤が、グリホサートまたはグルホシネートである、請求項 35 から 41 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 43】

アミン含有除草剤を開裂させるための方法であって、アミン含有除草剤と請求項 1 から 15 のいずれか一項に記載のポリペプチドとを接触させる工程を含む、前記方法。

50

【請求項 4 4】

前記ポリペプチドが、請求項 2 3 または請求項 2 4 に記載の宿主細胞によって生産される、請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 5】

請求項 1 から 1 5 のいずれか一項に記載の少なくとも一種のポリペプチドをコードする外因ポリヌクレオチドを含む、トランスジェニック植物。

【請求項 4 6】

前記ポリペプチドが、前記トランスジェニック植物の空气中で成長する部分において少なくとも生産される、請求項 4 5 に記載のトランスジェニック植物。

【請求項 4 7】

前記ポリヌクレオチドが、前記植物のゲノムに安定して組み込まれている、請求項 4 5 または請求項 4 6 に記載のトランスジェニック植物。

【請求項 4 8】

アミン含有除草剤に対する耐性が強化された植物の生産する方法であって、

a) ポリヌクレオチドを植物細胞のゲノムに挿入する工程であって、該ポリヌクレオチドは、植物細胞において RNA 配列を生産させるように機能するプロモーターであって、作動可能に連結されているプロモーターと；請求項 1 から 1 5 のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードする RNA 配列の生産を生じさせる構造 DNA 配列であって、作動可能に連結されている構造 DNA 配列と；植物細胞において前記 RNA 配列の 3' 末端でポリアデニルヌクレオチドの付加を生じさせるように機能する 3' 非翻訳領域とを含み、前記プロモーターは、前記構造 DNA 配列に対して異種であり、および前記 DNA 分子で形質転換される植物細胞のアミン含有除草剤に対する耐性を強化するために十分なポリペプチドの発現を生じさせるように適合される、工程；

b) 形質転換植物細胞を得る工程；および

c) 前記形質転換植物細胞から、アミン含有除草剤に対する耐性が増された遺伝的に形質転換された植物を再生させる工程を含む、前記方法。

【請求項 4 9】

請求項 4 8 に記載の方法を用いて生産されるトランスジェニック植物。

【請求項 5 0】

サンプル中のアミン含有除草剤を開裂させるための方法であって、請求項 4 5 から 4 7 または 4 9 のいずれか一項に記載のトランスジェニック植物にサンプルを曝露する工程を含む、前記方法。

【請求項 5 1】

前記サンプルが土壌である、請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 2】

請求項 1 から 1 5 のいずれか一項に記載の少なくとも一種のポリペプチドをコードする外因ポリヌクレオチドを含む、トランスジェニック非ヒト動物。

【請求項 5 3】

オーストラリアの国家計量研究所 (National Measurement Institute) に 2006 年 4 月 11 日にアクセス番号 V06/010960 で寄託されたアルスロバクター属種の分離株。

【請求項 5 4】

請求項 5 3 に記載の株と 1 つまたはそれ以上の許容される担体とを含む、アミン含有除草剤を開裂させるための組成物。

【請求項 5 5】

請求項 1 から 1 5 のいずれか一項に記載のポリペプチドを含む、請求項 2 3 もしくは請求項 2 4 に記載の宿主細胞、請求項 2 5 もしくは請求項 2 6 に記載の組換え細胞、請求項 4 5 から 4 7 もしくは 4 8 のいずれか一項に記載のトランスジェニック植物、請求項 5 2 に記載のトランスジェニック非ヒト動物または請求項 5 3 に記載の株の抽出物。

10

20

30

40

50

【請求項 5 6】

請求項 5 5 に記載の抽出物と 1 つまたはそれ以上の許容される担体とを含む、アミン含有除草剤を開裂させるための組成物。

【請求項 5 7】

アミン含有除草剤を開裂されるための方法であって、請求項 5 3 に記載の株および／または請求項 5 5 に記載の抽出物にアミン含有除草剤を曝露することを含む、前記方法。

【請求項 5 8】

請求項 1 から 1 5 のいずれか一項に記載のポリペプチドを生産する、単離された細菌。

【請求項 5 9】

アルスロバクター属種である、請求項 5 8 に記載の細菌。

10

【請求項 6 0】

アミン含有除草剤を開裂させるための、請求項 1 から 1 5 のいずれか一項に記載のポリペプチドを生産する単離された天然に存在する細菌の使用。

【請求項 6 1】

ポリマー多孔質支持体上に固定された請求項 1 から 1 5 のいずれか一項に記載のポリペプチドを含む、アミン含有除草剤を開裂させるためのポリマースポンジまたはフォーム。

【請求項 6 2】

アミン含有除草剤を開裂させるための方法であって、請求項 6 1 に記載のスポンジまたはフォームにアミン含有除草剤を曝露することを含む、前記方法。

【請求項 6 3】

請求項 4 5 から 4 7 または 4 9 のいずれか一項に記載の植物から生産される製品。

20

【請求項 6 4】

請求項 4 5 から 4 7 または 4 9 のいずれか一項に記載の植物の部分。

【請求項 6 5】

種子である、請求項 6 4 に記載の植物の部分。

【請求項 6 6】

アミン含有除草剤を開裂させる能力が強化されたポリペプチドを生産する方法であって、

(i) 請求項 1 から 1 5 のいずれか一項に記載の第一のポリペプチドの 1 つまたはそれ以上のアミノ酸を変更する工程、

30

(i i) 工程 (i) から得られた変更ポリペプチドの、アミン含有除草剤を開裂させる能力を判定する工程、および

(i i i) 第一のポリペプチドと比較してアミン含有除草剤を開裂させる能力が強化されている変更ポリペプチドを選択する工程を含む、前記方法。

【請求項 6 7】

請求項 6 6 に記載の方法によって生産されるポリペプチド。

【請求項 6 8】

アミン含有除草剤を開裂させることができる微生物についてスクリーニングするための方法であって、

40

i) 唯一の窒素源としてのアミン含有除草剤の存在下で候補微生物を培養する工程；および

i i) その微生物が増殖および／または分裂できるかどうかを判定する工程を含む、前記方法。

【請求項 6 9】

請求項 1 から 1 5 、 2 8 もしくは 6 7 のいずれか一項に記載の少なくとも 1 種のポリアミド、請求項 1 6 から 2 0 のいずれか一項に記載の少なくとも一種のポリヌクレオチド、請求項 2 1 もしくは請求項 2 2 に記載のベクター、請求項 2 3 もしくは請求項 2 4 に記載の宿主細胞、請求項 2 5 もしくは請求項 2 6 に記載の組換え細胞、請求項 2 9 に記載の抗体、請求項 3 0 から 3 3 、 5 4 もしくは 5 6 のいずれか一項に記載の組成物、請求項 5 3

50

に記載の少なくとも1つの株、請求項55に記載の少なくとも1つの抽出物、請求項58もしくは請求項59に記載の少なくとも1つの細菌、請求項61に記載の少なくとも1つのポリマースポンジもしくはフォーム、請求項63に記載の少なくとも1つの製品、および／または請求項64もしくは請求項65の一項に記載の請求項の少なくとも1つの部分を含むキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、アミン含有除草剤、例えばグリホサートおよびグルホシネート (glufosinate) を分解することができる新タイプの酵素、ならびにこれらの酵素をコードするポリヌクレオチドに関する。本発明は、アミン含有除草剤活性に対して耐性である、これらの酵素を生産するトランスジェニック植物にも関する。加えて、本発明は、この新タイプの酵素の活性に依存するバイオレメディエーションの方法を提供する。

10

【背景技術】

【0002】

発明の背景

有機ホスホネートは、化学的、熱的および酵素的な分解に対して相対耐性を付与する安定した炭素ーリン (C-P) 結合によって特徴付けられる。天然の有機ホスホネートは、リンの生物地球化学的循環において重要な役割を有し、そして合成有機ホスホネートには、化学工業での様々な応用例を有し、最も目立つところでは、除草剤、例えばグリホサート (N-ホスホノメチルグリシン) およびホスフィノトリシン (BastaTM) がある。

20

【0003】

グリホサート (N-ホスホノメチルグリシン) は、5-エノールピルビル-3-ホスホシキミ酸シンターゼ (EPSPS) 酵素、シキミ酸系路の成分を阻害するホスホネート除草剤である。植物は、必須芳香族アミノ酸およびビタミン類の生産のためにシキミ酸系路を利用し、グリホサートは、EPSPSによるホスホエノールピルビン酸と3-ホスホシキミ酸の5-エノールピルビル-3-ホスホシキミ酸への変換を特異的に中断させる。

【0004】

一旦ホスホネートが土壌に入ると、微生物の活動は、主としてそれらの除去を担当し、この微生物の活動は、以下の2つの主要な経路に分けられる：微生物が唯一のリン源としてホスホネートを利用する、phoレギュロンによって調節されるホスフェート飢餓依存性メカニズム (Wanner, 1994)、ならびに細菌が唯一の炭素、窒素およびリンの源としてホスホネートを利用する、ホスフェート非依存性メカニズム (Ternan et al., 1998a; Ternan et al., 1998b; McGrath et al., 1998)。唯一のホスフェート源としてホスホネート (グリホサートを含む) を利用することができる真菌分離株も記載されており、幾つかの異なる経路 (場合によると細菌のものに類似している) が関与し得ると仮定されている (Kryskol-Lupicka et al., 1997)。試験された真菌分離株は、すべて、グリホサートの分解からの主産物としてAMP Aを生産した。これは、細菌GOX (WO 92/00377) に類似した真菌酵素が関与することを示唆している。

30

40

【0005】

その分子の環境的運命についての懸念と、植物中のEPSPSレベルを増加させることにより、またはグリホサートに対して耐性を付与する修飾EPSPSで天然EPSPSを置換することにより除草剤耐性植物を工学作製するための系をさらに補足するものとしての関心との、両方に起因して、グリホサート除草剤の酵素的な分解または修飾に関心が集まっている。土壌中でのグリホサート分解は、急速であり、大規模であることが判明し、アミノメチルホスホネート (AMP A) が最も一般的な生成物として特定され (Wackett et al. 1987)、グリホサートを分解することができる幾つかの単一の細菌培養物が記載されている (Malik et al., 1989に総説されている)。

【0006】

50

これまでに、純粋な細菌培養物における2つのグリホサート代謝経路が特性付けされている(図1)。AMP Aへの代謝およびそこから完全な無機物化が、フラボバクテリウム属(*Flavobacterium*)種(Balthazor and Hallas, 1986)、シュードモナス属(*Pseudomonas*)種(Jacob et al 1988)およびアルスロバクターアトロシアネウス(*Arthrobacter atrocyaneus*) (Pipke and Amrhein, 1988)について記載されており、その一方で、pho調節性C-Pリアーゼ系によるサルコシンおよび無機ホスフェート(Pi)へのグリホサートの変換が、シュードモナス(*Pseudomonas*)種(Shinabarger and Braymer, 1986; Kishore and Jacob, 1987)、アルカリゲネス属(*Alcaligenes*)種株GL、ストレプトマイセス属(*Streptomyces*)種(Objoska et al., 1999)およびアルスロバクター(*Arthrobacter*)属種(Pipke et al., 1988)について記載されており、好塩菌VH1 (Hayes et al., 2000)およびリゾビウムメリロチ(*Rhizobium meliloti*) 1021 (Liu et al., 1991)について推定されている。 10

【0007】

Yakolevaら(1988)が、最初に、ホスフェート依存性C-Pリアーゼ活性に関与するすべての遺伝子をコードするphnオペロンを大腸菌(*E.coli*)から単離し、発現させた。WhiteおよびMetcalf(2004)が、それに続いて、シュードモナススタツェリ(*Pseudomonas stutzeri*)からの2つの別個のオペロン-1つは、大腸菌phnオペロンの相同体、およびもう1つは、ホスフィット代謝に関与するハイポホスフィット-2-オキシグルタレートジオキシゲナーゼをコードするhtxオペロン-2を記載した。しかし、これらのいずれのC-Pリアーゼ系も、McGrathら(1995)によって記載された基質特異的ホスホノアセテートヒドロラーゼ酵素と同様に、グリホサートを開裂することはできなかった(White and Metcalf, 2004)。Gastleおよび同僚によって発見された(Castle et al., 2004)ような、グリホサートアセチルトランスフェラーゼ(GAT)酵素を使用するグリホサートのN-アセチル化によってもグリホサート耐性を付与することができ、彼らは、3つの異なるgat遺伝子のDNAシャッフリングを利用して、GATの酵素効率を10000倍向上させてもいる(Castle et al., 2004; Siehl et al., 2005)。 20

【0008】

このような微生物除草剤代謝または修飾酵素を利用する雑草防除の見込みは、Padgettら(1996)およびVasil(1996)によって詳細に論じられている。 30

【0009】

特に、植物において発現されたときにグリホサートの分解に利用できる現在の酵素は、あまり高い活性を有さない。したがって、除草剤、例えばグリホサートを分解するために用いることができるさらなる酵素を特定する必要がある。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0010】

発明の要旨

本発明者らは、以前に公知でないグリホサート代謝のメカニズムを利用する細菌を特定した。さらに、本発明者らは、この細菌の新規グリホサート分解性遺伝子-酵素系を単離し、特性付けした。 40

【0011】

1つの態様において、本発明は、グリホサートを開裂してグリシンを生産する、実質的に精製されたポリペプチドを提供する。

【0012】

もう1つの態様において、本発明は、グリホサートのホスホノメチルC-3炭素と窒素の結合(phosphonomethyl C-3 carbon to nitrogen bond)を開裂させる、実質的に精製されたポリペプチドを提供する。

【0013】

特に好ましい実施形態において、前記ポリペプチドは、単一アミノ酸鎖を含む。従って 50

、前記ポリペプチドは、グリホサートを基質として使用する際、グリシンを生産するために多数の反応を必要とする多酵素複合体の一部ではない。

【0014】

さらなる実施形態において、前記ポリペプチドは、グリホサートをグリシンおよびオキシホスホン酸（またはそのイオン形）へと開裂させる。

【0015】

さらなる特に好ましい実施形態において、前記ポリペプチドは、可溶性である。従って、前記ポリペプチドは、膜結合型ではない。

【0016】

もう1つの実施形態において、グリオキシレートは、グリホサートの開裂の結果として、実質的に生産されない。

10

【0017】

さらなる実施形態において、サルコシンは、グリホサートの開裂の結果として、実質的に生産されない。

【0018】

さらなる態様において、本発明は、GOX（配列番号3）を開裂させる効率より大きいグリホサートを開裂させる効力を有する、実質的に精製されたポリペプチドを提供する。

【0019】

さらにもう1つの態様において、本発明は、 $550 \mu\text{mol} \cdot \text{分}^{-1} \text{mg}^{-1}$ より大きい、グリホサートの開裂についての比活性を有する、実質的に精製されたポリペプチドを提供する。

20

【0020】

好ましくは、前記比活性は、 $600 \mu\text{mol} \cdot \text{分}^{-1} \text{mg}^{-1}$ より大きく、さらに好ましくは $700 \mu\text{mol} \cdot \text{分}^{-1} \text{mg}^{-1}$ より大きく、さらにいっそう好ましくは $5,000 \mu\text{mol} \cdot \text{分}^{-1} \text{mg}^{-1}$ より大きい。

【0021】

好ましい実施形態において、前記ポリペプチドの比活性は、本明細書の実施例3において概説するとおり、判定することができる。

【0022】

さらなる態様において、本発明は、

30

i) 配列番号1；および

ii) i) と少なくとも25%同一であるアミノ酸配列

から選択される配列を有するアミノ酸を含む実質的に精製されたポリペプチドを提供し、ここでこのポリペプチドは、アミン含有除草剤を開裂させる。

【0023】

1つの実施形態において、前記ポリペプチドは、配列番号8または配列番号9として提供される配列を含む。

【0024】

アミン含有除草剤の例としては、グリホサート、グルホシネート、ビラナホス (biflufenox) およびグリホシンが挙げられるが、これらに限定されない。好ましい実施形態において、前記アミン含有除草剤は、グリホサートまたはグルホシネートである。

40

【0025】

好ましい実施形態において、本発明のポリペプチドは、アルスロバクター属 (Arthrobacter) 種から精製することができる。好ましくは、前記アルスロバクター属種は、アルスロバクター属種 T B D である。

【0026】

1つの実施形態において、前記ポリペプチドは、少なくとも1種の他のポリペプチドに融合している。

【0027】

前記少なくとも1種の他のポリペプチドは、例えば、本発明のポリペプチドの安定性を

50

強化するポリペプチド、または前記融合タンパク質の精製を助長するポリペプチドであり得る。

【0028】

さらなる態様において、本発明は、単離されたポリヌクレオチドを提供し、このポリヌクレオチドは、

i) 配列番号 2、

ii) 本発明のポリペプチドをコードするヌクレオチドの配列、

iii) i) と少なくとも 25% 同一であるヌクレオチドの配列、

iv) 低ストリンジェンシー条件下で i) にハイブリダイズするヌクレオチドの配列、

v) i) から iv) に相補的なヌクレオチドの配列

から選択される配列を有するヌクレオチドを含む。

10

【0029】

好ましくは、前記ポリヌクレオチドは、アミン含有除草剤を開裂させるポリペプチドをコードする。さらに好ましくは、前記アミン含有除草剤は、グリホサートまたはグルホシネートである。

【0030】

さらなる実施形態において、前記ポリヌクレオチドは、配列番号 8 または配列番号 9 として提供する配列を含むポリペプチドをコードする。

【0031】

好ましい実施形態において、前記ポリヌクレオチドは、中等度ストリンジェンシー条件下で i) にハイブリダイズする配列を含む。より好ましくは、前記ポリヌクレオチドは、ストリンジェントな条件下で i) にハイブリダイズする配列を含む。

20

【0032】

もう 1 つの態様において、本発明は、植物細胞において機能する 3' ポリアデニル化配列に作動可能に連結されている、本発明のポリペプチドをコードする構造 DNA 配列に作動可能に連結されている、前記細胞において機能するプロモーターを含む、組換えポリヌクレオチドを提供し、前記プロモーターは、前記構造 DNA 配列に対して異種であり、前記構造 DNA 配列を発現して前記細胞のアミン含有除草剤に対する耐性を強化することができる。

【0033】

さらなる態様において、本発明は、本発明のポリヌクレオチドを含むベクターを提供する。

30

【0034】

好ましくは、前記ポリヌクレオチドは、プロモーターに作動可能に連結されている。

【0035】

尚、さらなる態様において、本発明は、本発明の少なくとも一種のポリヌクレオチドおよび／または本発明の少なくとも 1 つのベクターを含む、宿主細胞を提供する。

【0036】

前記宿主細胞は、いずれのタイプの細胞であってもよい。1 つの実施形態において、前記宿主細胞は、植物細胞である。

40

【0037】

もう 1 つの態様において、本発明は、グリホサートを開裂させ、グリシンを生産する、組換え細胞を提供する。

【0038】

好ましくは、前記細胞は、本発明のポリヌクレオチドを含み、この場合の細胞は、前記ポリヌクレオチドを天然では含まない。

【0039】

もう 1 つの態様において、本発明は、グリホサートを開裂させてグリシンを生産する導入ポリペプチドを含む組換え細胞を提供する。

【0040】

50

さらなる態様において、本発明は、グリホサートのホスホノメチル C-3 炭素と窒素の結合を開裂させる導入ポリペプチドを含む組換え細胞を提供する。

【0041】

好ましくは、前記ポリペプチドは、本発明のポリヌクレオチドの発現により細胞によって生産される。

【0042】

もう1つの態様において、本発明は、本発明のポリペプチドを調製するためのプロセスを提供し、このプロセスは、前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの発現を可能にする条件下で、前記ポリペプチドをコードする本発明の宿主細胞、または前記ポリペプチドをコードする本発明のベクターを培養する工程、および発現されたポリペプチドを回収する工程を含む。

10

【0043】

また、本発明の方法を用いて生産されるポリペプチドも提供される。

【0044】

さらなる態様において、本発明は、本発明のポリペプチドに特異的に結合する、単離された抗体を提供する。

【0045】

さらにもう1つの態様において、本発明は、本発明の少なくとも一種のポリペプチド、本発明の少なくとも一種のポリヌクレオチド、本発明のベクター、本発明の宿主細胞、本発明の組換え細胞および／または本発明の抗体と1つまたはそれ以上の許容される担体とを含む組成物を提供する。

20

【0046】

さらなる態様において、本発明は、アミン含有除草剤を開裂させるための組成物を提供し、この組成物は、本発明の少なくとも一種のポリペプチド、および1つまたはそれ以上の許容される担体を含む。

【0047】

好ましくは、前記組成物は、金属イオンをさらに含む。好ましい実施形態において、前記金属イオンは、二価金属イオンである。より好ましくは、前記金属イオンは、 Mg^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 、およびこれらの組み合わせから選択される。さらにいっそう好ましくは、前記金属イオンは、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Co^{2+} 、およびこれらの組み合わせから選択される。

30

【0048】

本発明のポリペプチドは、組換え細胞を検出するために、選択可能マーカーとして使用することができる。従って、組換え細胞を検出および／または選択するための検出可能なマーカーとしての、本発明のポリペプチド、または前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの使用も提供する。

【0049】

さらなる態様において、本発明は、組換え細胞を検出するための方法を提供し、この方法は、

i) 細胞または細胞集団と、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとを、前記細胞による前記ポリヌクレオチドの取り込みを可能にする条件下で接触させる工程、および

40

ii) 工程 i) からの細胞またはそれらの子孫細胞をアミン含有除草剤に曝露することによって組換え細胞を選択する工程を含む。

【0050】

好ましくは、前記ポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドをコードする第一のオープンリーディングフレーム、および本発明のポリペプチドをコードしない第二のオープンリーディングフレームを含む。

【0051】

50

1つの実施形態において、前記第二のオープンリーディングフレームは、ポリペプチドをコードする。第二の実施形態において、前記第二のオープンリーディングフレームは、翻訳されないポリヌクレオチドをコードする。両方の事例において、前記第二のオープンリーディングフレームは、適するプロモーターに作動可能に連結されていることが好ましい。

【0052】

好ましくは、前記翻訳されないポリヌクレオチドは、触媒核酸、dsRNA分子またはアンチセンス分子をコードする。

【0053】

適する細胞の例としては、植物細胞、細菌細胞、真菌細胞または動物細胞が挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、前記細胞は、植物細胞である。

10

【0054】

好ましくは、前記アミン含有除草剤は、グリホサートまたはグルホシネートである。

【0055】

さらなる態様において、本発明は、アミン含有除草剤を開裂させるための方法を提供し、この方法は、アミン含有除草剤を本発明のポリペプチドと接触させる工程を含む。

【0056】

1つの実施形態において、前記ポリペプチドは、本発明の宿主細胞によって生産される。

【0057】

20

好ましくは、前記アミン含有除草剤は、グリホサートまたはグルホシネートである。

【0058】

本明細書において提供されるポリペプチドは、植物において生産されて、それら宿主植物の、アミン含有除草剤（例えばグリホサート）に曝露された場合に成長する能力を、強化することができる。

【0059】

従って、なおさらなる態様において、本発明は、本発明の少なくとも一種のポリペプチドをコードする外因ポリヌクレオチドを含む、トランスジェニック植物を提供する。

【0060】

好ましくは、前記アミン含有除草剤は、グリホサートまたはグルホシネートである。

30

【0061】

1つの実施形態において、前記ポリペプチドは、前記トランスジェニック植物の空气中で成長する部分において少なくとも生産される。

【0062】

好ましくは、前記ポリヌクレオチドは、前記植物のゲノムに安定して組み込まれている。

【0063】

アミン含有除草剤に対する耐性が強化された植物を生産する方法も提供され、この方法は、a) ポリヌクレオチドを植物細胞のゲノムに挿入する工程であって、該ポリヌクレオチドは、植物細胞においてRNA配列を生産させるように機能するプロモーターであって、作動可能に連結されているプロモーターと；本発明のポリペプチドをコードするRNA配列の生産を生じさせる構造DNA配列であって、作動可能に連結されている構造DNA配列と；植物細胞において前記RNA配列の3'末端でポリアデニルヌクレオチドの付加を生じさせるように機能する3'非翻訳領域とを含み、ここで前記プロモーターは、前記構造DNA配列に対して異種であり、および前記DNA分子で形質転換される植物細胞のアミン含有除草剤に対する耐性を強化するために十分なポリペプチドの発現を生じさせるように適合される、工程；

40

b) 形質転換植物細胞を得る工程；および

c) 前記形質転換植物細胞から、アミン含有除草剤に対する耐性が増された遺伝的に形質転換された植物を再生させる工程

50

を含む。

【0064】

さらなる態様において、本発明は、本発明の方法を用いて生産されるトランスジェニック植物を提供する。

【0065】

もう1つの態様において、本発明は、サンプル中のアミン含有除草剤を開裂させるための方法を提供し、この方法は、そのサンプルを本発明のトランスジェニック植物に曝露する工程を含む。

【0066】

好ましくは、前記サンプルは、土壌である。そのような土壌は、野原 (field) に存在し得る。

【0067】

もう1つの態様において、本発明は、本発明の少なくとも一種のポリペプチドをコードする外因ポリヌクレオチドを含む、トランスジェニック非ヒト動物を提供する。

【0068】

さらなる態様において、本発明は、オーストラリア国家計量研究所 (National Measurement Institute) に2006年4月11日にアクセッション番号V06/010960で寄託されたアルスロバクター属 (Arthrobacter) 種の分離株を提供する。

【0069】

さらにもう1つの態様において、本発明は、アミン含有除草剤を開裂させるための組成物を提供し、この組成物は、前記本発明の株、および1つまたはそれ以上の許容される担体を含む。

【0070】

さらなる態様において、本発明は、本発明のポリペプチドを含む、本発明の宿主細胞、本発明の組換え細胞、本発明のトランスジェニック植物、本発明のトランスジェニック非ヒト動物または本発明の株の抽出物を提供する。

【0071】

さらにもう1つの態様において、本発明は、アミン含有除草剤を開裂させるための組成物を提供し、この組成物は、前記本発明の抽出物、および1つまたはそれ以上の許容される担体を含む。

【0072】

さらなる態様において、本発明は、アミン含有除草剤を開裂させるための方法を提供し、この方法は、本発明の株および/または本発明の抽出物にアミン含有除草剤を曝露する工程を含む。

【0073】

また、本発明のポリペプチドを生産する、単離された細菌も提供する。

【0074】

好ましくは、前記細菌は、アルスロバクター属 (Arthrobacter) 種である。

【0075】

さらなる態様において、本発明は、アミン含有除草剤を開裂させるための、本発明のポリペプチドを生産する単離された天然に存在する細菌の使用を提供する。

【0076】

もう1つの態様において、本発明は、アミン含有除草剤を開裂させるためのポリマースポンジまたはフォームを提供し、このフォームまたはスポンジは、ポリマー多孔質支持体に固定された本発明のポリペプチドを含む。

【0077】

さらなる態様において、本発明は、アミン含有除草剤を開裂させるための方法を提供し、この方法は、アミン含有除草剤を本発明のスポンジまたはフォームに曝露する工程を含む。

10

20

30

40

50

【0078】

もう1つの態様において、本発明は、本発明の植物から生産される製品を提供する。

【0079】

製品の例としては、デンプン、油、野菜植物繊維、例えば綿、麦芽および小麦粉が挙げられるが、これらに限定されない。

【0080】

さらなる態様において、本発明は、本発明の植物の一部分を提供する。例としては、種子、果実および堅果が挙げられるが、これらに限定されない。

【0081】

本発明のポリペプチドは、変異させることができ、結果として生じた変異を、変更された活性（例えば強化された酵素活性）についてスクリーニングすることができる。このような変異は、インビトロ変異誘発およびDNAシャッフリングを含む（しかし、これらに限定されない）当該分野において公知の任意の技術を用いて行うことができる。

10

【0082】

従って、さらなる態様において、本発明は、アミン含有除草剤を開裂させる能力が強化されたポリペプチドを生産する方法を提供し、この方法は、

（i）本発明の第一のポリペプチドの1またはそれ以上のアミノ酸を変更させる工程、

（ii）工程（i）から得られた変更ポリペプチドの、アミン含有除草剤を開裂させる能力を判定する工程、および

（iii）第一のポリペプチドと比較して、アミン含有除草剤を開裂させる能力が強化されている変更ポリペプチドを選択する工程を含む。

20

【0083】

また本発明のこの方法によって生産されるポリペプチドも提供される。

【0084】

さらにもう1つの態様において、本発明は、アミン含有除草剤を開裂させることができる微生物をスクリーニングするための方法を提供し、この方法は、

i）唯一の窒素源としてのアミン含有除草剤の存在下で候補微生物を培養する工程；および

ii）その微生物が増殖および／または分裂できるかどうかを判定する工程を含む。

30

【0085】

1つの実施形態において、前記微生物は、細菌、真菌または原生動物である。

【0086】

好ましい実施形態において、前記微生物は、組換え微生物である。さらに、多数の異なる外来DNA分子を含む組換え微生物の集団をスクリーニングすることが好ましい。そのような外来DNA分子の例としては、プラスミドまたはコスミドゲノムDNAライブラリが挙げられる。

【0087】

好ましくは、前記アミン含有除草剤は、グリホサートである。

40

【0088】

また、本発明の方法を用いて単離された微生物も提供される。

【0089】

さらなる態様において、本発明は、本発明の少なくとも一種のポリペプチド、本発明の少なくとも一種のポリヌクレオチド、本発明のベクター、本発明の宿主細胞、本発明の組換え細胞、本発明の抗体、本発明の組成物、本発明の少なくとも1つの株、本発明の少なくとも1つの抽出物、本発明の少なくとも1つの細菌、本発明の少なくとも1つのポリマー、スポンジもしくはフォーム、本発明の少なくとも1つの製品、および／または本発明の植物の少なくとも一部分を含むキットを提供する。

【0090】

50

明らかであるが、本発明の1つの態様の好ましい特性および特徴は、本発明の多くの他の態様にあてはまる。

【0091】

本明細書全体をとおして、語「含む (comprise)」または「含む (comprises)」もしくは「含む (comprising)」などの変化形は、述べられている要素、整数もしくは工程または要素、整数もしくは工程の群の包含を意味し、任意の他の要素、整数もしくは工程または要素、整数もしくは工程の群の排除を意味しないことが理解される。

【0092】

以下は、後続の非限定的実施例によって、および添付の図を参照しながら、本発明を説明する。

10

【0093】

配列表の略語一覧

配列番号1 — G l o x A のアミノ酸配列。

配列番号2 — G l o x A をコードするヌクレオチド配列。

配列番号3 — G O X のアミノ酸配列。

配列番号4 および 5 — オリゴヌクレオチドプライマー。

配列番号6 — 5' 末端および 3' 末端に付加されたクローニング部位、ならび開始コドンの直ぐ前に A A C A を含む、植物における発現のために最適化された G l o x A コーディング配列。

配列番号7 — 大腸菌における発現のために最適化された G l o x A コーディング配列。

20

配列番号8 — ブレヴィバクテリウム属 (Brevibacterium) 系統 B L 2 からの B O B L 。

配列番号9 — アルスロバクターアウレセンス (Arthobacter aureescens) T C 1 からの G l o x D 。

【図面の簡単な説明】

【0094】

【図1】グリホサート代謝経路。I. 多酵素膜結合型 C-P リアーゼ系による C-P 結合の開裂。II. アミノメチルホスホン酸 (A M P A) およびグリオキシレートを生産する、C₂-N 結合の開裂。III. G l o x A の推定メカニズム—グリシンおよびオキソホスホン酸を生産する、C₃-N 結合の開裂。

30

【図2】基質としてグリホサートを用いる G l o x A により触媒される推定反応と G O X により触媒される推定反応の比較 (A) およびこれらの酵素反応の結果として生ずる H P L C 反応プロファイルの比較 (B) 。

【図3】G O X または G l o x A をコードするプラスミド DNA への DNA : DNA ハイブリダイゼーション。消化されたプラスミドおよびコスミド DNA 構築物を H y b o n d N⁺ 膜に移し、その後、g o x 遺伝子の 3 2^P-放射性標識 P C R 産物でプローブした。

【図4】グリホサートおよびイミノ二酢酸に対する部分精製された G l o x A の活性と C O X の活性の比較。

【図5】G l o x A のインプラント (In planta) 発現は、標準用量の 5 倍でグリホサートに対する耐性を付与する。耐性スコアを得るために、植物を、除草剤適用後 8 日目の葉の健康状態 (health)、植物半径および開花について目視評価した。同システムのもとで、完全な健康状態の未処理対照は、7~8 のスコアであった。

40

【発明を実施するための形態】

【0095】

発明の詳細な説明

一般技術

特に別様に定義しない限り、本明細書において用いるすべての技術用語および科学用語は、(例えば、細胞培養、分子遺伝学、免疫学、免疫組織化学、タンパク質化学および生化学における) 当業者によって一般に理解されているのと同じ意味を有すると解釈するも

50

のとする。

【0096】

別の指示がない限り、本発明において利用する組換えタンパク質、細胞培養および免疫学的技術は、当業者には周知の標準的手順である。そのような技術は、以下の出典の中の著述、例えば、J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons (1984)、J. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989)、T.A. Brown (editor), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, Volumes 1 and 2, IRL Press (1991)、D.M. Glover and B.D. Hames (editors), DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes 1-4, IRL Press (1995 and 1996)、およびF.M. Ausubel et al. (editors), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley- Interscience (1988、現在までのすべての改訂版を含む)、Ed Harlow and David Lane (editors) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988)、およびJ.E. Coligan et al. (editors) Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (現在までのすべての改訂版を含む) のいたるところに記載および説明されており、これらは、本明細書において参考として援用される。

10

【0097】

アミン含有除草剤

アミン含有除草剤は、植物に外因的に適用されたときに前記植物に対して有害作用を及ぼすアミン基を有する任意の分子を含む。1つの実施形態において、前記アミン含有除草剤は、有機ホスホネートである。アミン含有除草剤の例としては、グリホサート、グルホシネート、ピラナホスおよびグリホシンが挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0098】

本明細書において用いる場合、用語「グリホサート」は、親除草剤N-ホスホノメチルグリシン（別にグリホサート酸としても公知である）；そのイオン形；その塩もしくはエステル；または植物組織においてN-ホスホノメチルグリシンに変換されるか、もしくはイオン形のN-ホスホノメチルグリシン（別にグリホサートイオンとしても公知である）を別様に提供する化合物を集合的に指す。グリホサート塩としては、アルカリ金属塩、例えば、ナトリウムおよびカリウムの塩；アンモニウム塩； $C_{1\sim 16}$ アルキルアンモニウム、例えば、ジメチルアンモニウムおよびイソプロピルアンモニウムの塩； $C_{1\sim 16}$ アルカノールアンモニウム、例えば、モノエタノールアンモニウム塩； $C_{1\sim 16}$ アルキルスルホニウム、例えば、トリメチルスルホニウム塩；およびこれらの混合物などが挙げられるが、これらに限定されない。グリホサート酸分子は、異なるpKa値を有する3つの酸部位を有し、従って、一塩基性、二塩基性および三塩基性の塩、もしくはそれらの任意の混合物、または任意の中間的中和レベルの塩を用いることができる。グリホサートは、RoundupTM (Monsanto Co.) の活性成分である。グリホサートの市販製剤の例としては、Monsanto CompanyによってROUNDUPTM、ROUNDUPTMULTRA、ROUNDUPTMULTRAMAX、ROUNDUPTMWEATHERMAX、ROUNDUPTMCT、ROUNDUPTMEXTRA、ROUNDUPS BIACTIVE、ROUNDUPTMBIOFORCE、RODEOTM、POLARISTM、SPARKTMおよびACCORDTM除草剤として販売されているもの（これらのすべてが、グリホサートをそのイソプロピルアンモニウム塩として含有する）；Monsanto CompanyによってROUNDUPTMDRYおよびRIVALTM除草剤として販売されているもの（これらは、グリホサートをそのアンモニウム塩として含有する）；Monsanto CompanyによってROUNDUPTMGEOFORCEとして販売されているもの（これは、グリホサートをそのナトリウム塩として含有する）；ならびにSyngenta Corp ProtectionによってTOUCHDOWNTM除草剤として販売されているもの（これは、グリホサートをそのトリメチルスルホニウム塩として含有する）が挙げられるが、これらに限定されない。グリホサートは、芳香族アミノ酸の合成のための前駆体を提供するシキミ酸系路を阻害するため、植物毒性である。グリ

30

40

50

ホサートは、植物において見出される酵素 5-エノールピルビル-3-ホスホシキメートシンターゼ (EPSPS) を阻害する。

【0099】

本明細書で用いる「グルホシネート」は、2-アミノ4-(ヒドロキシメチルホスフィニル)ブタン酸ならびにそのイオン形、エステルおよび塩、特にアンモニウム塩を指す。グルホシネートは、BASTATM、RELYTM、FINALETM、CHALLENGETM および LIBERTYTM の活性成分である、非選択的浸透性除草剤である。グルホシネートは、アミノ酸グルタミンの生合成経路およびアンモニア解毒に干渉する。

【0100】

本明細書において用いる場合、「ビラナホス」は、4-ヒドロキシ(メチル)ホスフィノイル-L-ホモアラニル-L-アラニル-L-アラニンならびにそのイオン形、エステルおよび塩を指す。

【0101】

本明細書において用いる場合、「グリホシン」は、N, N-ビス(p-ホスフィノメチル)グリシンならびにそのイオン形、エステルおよび塩を指す。

【0102】

ポリペプチド

「実質的に精製されたポリペプチド」または「精製された」とは、ポリペプチドが1つまたはそれ以上の脂質、核酸、他のポリペプチド、またはそれがその天然の状態のときに会合している他の汚染分子から分離されていることを意味する。実質的に精製されたポリペプチドには、それが天然に会合している他の成分が少なくとも60%ないことが好ましく、より好ましくは少なくとも75%なく、およびより好ましくは少なくとも90%ない。当業者である対象者には理解されるが、この精製されたポリペプチドは、組換えによって生産されたポリペプチドであってもよい。

【0103】

用語「ポリペプチド」および「タンパク質」は、一般に、交換可能に用いており、ならびに非アミノ酸基の付加によって修飾されていても、修飾されていなくてもよい単一ポリペプチド鎖を指す。このようなポリペプチド鎖は、他のポリペプチドもしくはタンパク質、または他の分子(例えば補因子)と会合している場合があることは理解される。本明細書において用いる場合、用語「タンパク質」および「ポリペプチド」は、本明細書に記載するような本発明のポリペプチドの変種、変異体、修飾形、類似体および/または誘導体も包含する。

【0104】

本明細書において用いる場合、「可溶性」ポリペプチドは、脂質二重層(例えば細胞膜)とは会合しない。

【0105】

ポリペプチドの同一性は、GAP (Needleman and Wunsch, 1970) 分析 (GCG プログラム) により、ギャップ生成ペナルティー=5、およびギャップ伸長ペナルティー=0.3 で決定される。クエリー配列は、少なくとも25アミノ酸の長さであり、GAP 分析は、少なくとも25のアミノ酸の領域全体にわたって2つの配列をアラインする。より好ましくは、クエリー配列は、少なくとも50アミノ酸の長さであり、GAP 分析は、少なくとも50のアミノ酸の領域全体にわたって2つの配列をアラインする。より好ましくは、クエリー配列は、少なくとも100アミノ酸の長さであり、GAP 分析は、少なくとも100のアミノ酸の領域全体にわたって2つの配列をアラインする。より好ましくは、クエリー配列は、少なくとも250アミノ酸の長さであり、GAP 分析は、少なくとも250のアミノ酸の領域全体にわたって2つの配列をアラインする。より好ましくは、GAP 分析は、2つの配列をそれらの全長全体にわたってアラインする。

【0106】

本明細書において用いる場合、「生物活性」フラグメントは、全長ポリペプチドについての定義した活性を維持する、すなわち、アミン含有除草剤(特にグリホサート)を開裂

10

20

30

40

50

させることができる、本発明のポリペプチドの一部である。生物活性フラグメントは、それらが定義される活性を維持する限り、いずれのサイズであってもよい。好ましくは、生物活性フラグメントは、少なくとも100アミノ酸、より好ましくは少なくとも200アミノ酸、およびよりいっそう好ましくは少なくとも350アミノ酸の長さである。

【0107】

定義したポリペプチドに関して、上述したものより高い同一％値が好ましい実施形態をもたらすということは、理解される。従って、最低同一％値にかんがみて、あてはまる場合には、前記ポリペプチドは、関連した指定配列番号と少なくとも40％、より好ましくは少なくとも45％、より好ましくは少なくとも50％、より好ましくは少なくとも55％、より好ましくは少なくとも60％、より好ましくは少なくとも65％、より好ましくは少なくとも70％、より好ましくは少なくとも75％、より好ましくは少なくとも80％、より好ましくは少なくとも85％、より好ましくは少なくとも90％、より好ましくは少なくとも91％、より好ましくは少なくとも92％、より好ましくは少なくとも93％、より好ましくは少なくとも94％、より好ましくは少なくとも95％、より好ましくは少なくとも96％、より好ましくは少なくとも97％、より好ましくは少なくとも98％、より好ましくは少なくとも99％、より好ましくは少なくとも99.1％、より好ましくは少なくとも99.2％、より好ましくは少なくとも99.3％、より好ましくは少なくとも99.4％、より好ましくは少なくとも99.5％、より好ましくは少なくとも99.6％、より好ましくは少なくとも99.7％、より好ましくは少なくとも99.8％、およびよりいっそう好ましくは少なくとも99.9％同一であるアミノ酸配列を含むことが好ましい。

10

20

【0108】

本発明のポリペプチドのアミノ酸配列変異体は、適切なヌクレオチド変化を本発明の核酸に導入することにより、または所望のポリペプチドのインビトロ合成により、調製することができる。そのような変異としては、例えば、そのアミノ酸配列内の残基の欠失、挿入または置換が挙げられる。欠失、挿入および置換の組み合わせを行って、最終構築物に到達することもできるが、但し、その最終ポリペプチド産物が、所望の特性を有することを条件とする。

【0109】

変異（変更された）ポリペプチドは、当該分野において公知のいずれの技術を用いて調製してもよい。例えば、本発明のポリヌクレオチドをインビトロ変異誘発に供することができる。そのようなインビトロ変異誘発技術は、適するベクターに本ポリヌクレオチドをサブクローニングすること、そのベクターを「ミューテーター」株、例えば、大腸菌XL-1レッド（Stratagene）に形質転換させること、およびその形質転換させた細菌を適する世代数の間、増殖させることを含む。もう1つの例では、Harayama（1998）によっておおまかに説明されたDNAシャッフリング技術に本発明のポリヌクレオチドを供す。これらのDNAシャッフリング技術は、本発明のものに関連した遺伝子、例えば、細菌からの他のオキシドレダクターゼ（例えば、配列番号8をコードするポリヌクレオチド）を含む場合がある。変異／変更DNAから誘導された産物を、本明細書に記載する技術を用いてスクリーニングして、それらがアミン含有除草剤（例えばグリホサート）を開裂できるかどうかを判定することは容易にできる。

30

40

【0110】

アミノ酸配列変異体を設計する場合、その変異部位の位置およびその変異の性質は、修飾されることとなる特徴に依存する。変異の部位は、例えば、（1）まず、保存アミノ酸選択物で置換し、次に、達成される結果に依存してさらにラジカルな選抜物（radical selection）で置換することによって、（2）ターゲット残基を欠失させることによって、または（3）その局在部位に隣接して他の残基を挿入することによって、個々にまたは連続して修飾することができる。

【0111】

アミノ酸配列欠失は、一般に、約1～15残基、より好ましくは約1～10残基、およ

50

び典型的には約 1 ～ 5 の連続する残基に及ぶ。

【 0 1 1 2 】

置換変異は、そのポリペプチド分子中の少なくとも 1 つのアミノ酸残基が除去され、その場所に別の残基が挿入されている。置換的変異誘発について非常に関心の高い部位としては、機能のために重要であると確認された部位が挙げられる。関心の高い他の部位は、様々な株または種から得られた特定の残基が確認される部位である。これらの位置は、生物活性のために重要であり得る。これらの部位、特に、少なくとも 3 つの他の同様に保存される部位の配列の中に含まれる部位は、比較的保存される様式で置換されることが好ましい。このような保存的置換を表 1 において「例示的置換」という表題の下に示す。

【表 1】

表 1. 例示的置換

もとの残基	例示的置換
Ala (A)	val; leu; ile; gly
Arg (R)	lys
Asn (N)	gln; his
Asp (D)	glu
Cys (C)	ser
Gln (Q)	asn; his
Glu (E)	asp
Gly (G)	pro, ala
His (H)	asn; gln
Ile (I)	leu; val; ala
Leu (L)	ile; val; met; ala; phe
Lys (K)	arg
Met (M)	leu; phe
Phe (F)	leu; val; ala
Pro (P)	gly
Ser (S)	thr
Thr (T)	ser
Trp (W)	tyr
Tyr (Y)	trp; phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala

【 0 1 1 3 】

さらに、所望される場合には、非天然アミノ酸または化学的アミノ酸類似体を、本発明のポリペプチドに置換または付加として導入することができる。このようなアミノ酸としては、一般的なアミノ酸の D-異性体、2, 4-ジアミノ酪酸、 α -アミノイソ酪酸、4-アミノ酪酸、2-アミノ酪酸、6-アミノヘキササン酸、2-アミノイソ酪酸、3-アミノプロピオン酸、オルチニン、ノルロイシン、ノルバリン、ヒドロキシプロリン、サルコ

シン、シトルリン、ホモシトルリン、システイン酸、 ϵ -ブチルグリシン、 ϵ -ブチアラニン、フェニルグリシン、シクロヘキシルアラニン、 β -アラニン、フルオロアミノ酸、デザイナーアミノ酸 (designer amino acid)、例えば β -メチルアミノ酸、 $C\alpha$ -メチルアミノ酸、 $N\alpha$ -メチルアミノ酸、およびアミノ酸類似体が一般に挙げられるが、これらに限定されない。

【0114】

合成中または合成後に、例えば、ビオチン化、ベンジル化、グルコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、公知の保護／脱保護基による誘導体化、タンパク質分解性開裂、抗体分子または他の細胞リガンドへの連結などによって、差別的に修飾される本発明のポリペプチドも、本発明の範囲内に含まれる。これらの修飾は、本発明のポリペプチドの安定性および／または生物活性を増大させるために役立ち得る。

10

【0115】

本発明のポリペプチドは、天然ポリペプチドの生産および回収、組換えポリペプチドの生産および回収、ならびにポリペプチドの化学合成を含む様々な方法で生産することができる。1つの実施形態において、本発明の単離されたポリペプチドは、ポリペプチドを生産するために有効な条件下でそのポリペプチドを発現することができる細胞を培養し、そのポリペプチドを回収することによって生産される。培養するために好ましい細胞は、本発明の組換え細胞である。有効な培養条件としては、ポリペプチド生産を可能にする、有効な培地、バイオリアクター、温度、pHおよび酸素条件が挙げられるが、これらに限定されない。有効な培地は、細胞が培養されて本発明のポリペプチドを生産する任意の培地を指す。このような培地は、同化可能な炭素、窒素およびリン源を有する水性培地、ならびに適切な塩、無機質、金属および他の栄養分（例えばビタミン類）を典型的に含む。本発明の細胞は、従来の発酵バイオリアクター、振盪フラスコ、試験管、マイクロタイター皿、およびベトリ皿において培養することができる。培養は、組換え細胞に適する温度、pHおよび酸素含量で行うことができる。このような培養条件は、当業者の専門技術の範囲内である。

20

【0116】

ポリヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド

DNA、RNAもしくはこれらの組み合わせ（センスもしくはアンチセンス配向または両方の組み合わせで、1または2本鎖のもの）、dsRNAまたはその他を含む、「単離されたポリヌクレオチド」とは、それがその天然の状態のときに会合または連結しているポリヌクレオチド配列から少なくとも部分的に分離されているポリヌクレオチドを意味する。好ましくは、単離されたポリヌクレオチドには、それらが自然に会合している他の成分が少なくとも60%なく、好ましくは少なくとも75%なく、および最も好ましくは少なくとも90%ない。当業者の対象者は知っているが、単離されたポリヌクレオチドは、例えばそのポリヌクレオチドを自然には含まないトランスジェニック生物中に存在する、外因ポリヌクレオチドである場合がある。さらに、用語「ポリヌクレオチド」は、本明細書では用語「核酸」と交換可能に用いている。

30

【0117】

ポリヌクレオチドの同一性は、GAP (Needleman and Wunsch, 1970) 分析 (GCGプログラム) により、ギャップ生成ペナルティー=5、およびギャップ伸長ペナルティー=0.3で決定する。別様に述べていない限り、クエリー配列は、少なくとも45ヌクレオチドの長さであり、GAP分析は、少なくとも45のヌクレオチドの領域全体にわたって2つの配列をアラインする。好ましくは、クエリー配列は、少なくとも150ヌクレオチドの長さであり、GAP分析は、少なくとも150のヌクレオチドの領域全体にわたって2つの配列をアラインする。より好ましくは、クエリー配列は、少なくとも300ヌクレオチドの長さであり、GAP分析は、少なくとも300のヌクレオチドの領域全体にわたって2つの配列をアラインする。よりいっそう好ましくは、GAP分析は、2つの配列をそれらの全長全体にわたってアラインする。

40

【0118】

50

定義したポリヌクレオチドに関して、上述したものより高い同一％値が好ましい実施形態をもたらすということは、理解される。従って、最低同一％値にかんがみて、あてはまる場合には、本発明のポリヌクレオチドは、関連した指定配列番号と少なくとも40％、より好ましくは少なくとも45％、より好ましくは少なくとも50％、より好ましくは少なくとも55％、より好ましくは少なくとも60％、より好ましくは少なくとも65％、より好ましくは少なくとも70％、より好ましくは少なくとも75％、より好ましくは少なくとも80％、より好ましくは少なくとも85％、より好ましくは少なくとも90％、より好ましくは少なくとも91％、より好ましくは少なくとも92％、より好ましくは少なくとも93％、より好ましくは少なくとも94％、より好ましくは少なくとも95％、より好ましくは少なくとも96％、より好ましくは少なくとも97％、より好ましくは少なくとも98％、より好ましくは少なくとも99％、より好ましくは少なくとも99.1％、より好ましくは少なくとも99.2％、より好ましくは少なくとも99.3％、より好ましくは少なくとも99.4％、より好ましくは少なくとも99.5％、より好ましくは少なくとも99.6％、より好ましくは少なくとも99.7％、より好ましくは少なくとも99.8％、およびよりいっそう好ましくは少なくとも99.9％同一である配列を含むことが好ましい。

10

【0119】

本明細書において用いる場合、用語「遺伝子」は、その最も広い文脈で解釈するものとし、ならびに構造遺伝子のタンパク質コーディング領域を含み、且つ、5'および3'両方の末端のコーディング領域に隣接して位置する、いずれの末端においても少なくとも約2 kbの距離にわたる配列を含む、デオキシリボヌクレオチドを包含する。コーディング領域の5'に位置し、mRNA上に存在する配列を、5'非翻訳配列と呼ぶ。コーディング領域の3'または下流に位置し、mRNA上に存在する配列を、3'非翻訳配列と呼ぶ。用語「遺伝子」は、cDNAの形の遺伝子とゲノムの形の遺伝子の両方を包含する。用語「遺伝子」は、本明細書に記載する本発明のタンパク質のすべてまたは一部および上述のもののいずれか1つに対する相補ヌクレオチド配列をコードする合成分子または融合分子を含む。

20

【0120】

本明細書において用いる場合、「ストリンジェントな条件」という語句は、ポリヌクレオチド、プローブ、プライマーおよび／またはオリゴヌクレオチドがそのターゲット配列にハイブリダイズするが、他の配列にはしない条件を指す。ストリンジェントな条件は、配列依存性であり、状況が異なれば異なる。長い配列のほうが、短い配列より高い温度で特異的にハイブリダイズする。一般に、ストリンジェントな条件は、定義されたイオン強度およびpHでの特定の配列についての熱融解点(T_m)より約5℃低くなるように選択される。このT_mは、ターゲット配列に相補的なプローブの50％が平衡でターゲット配列にハイブリダイズする(定義されたイオン強度、pHおよび核酸濃度のもとでの)温度である。典型的に、ターゲット配列は過剰で存在するので、T_mでは、プローブの50％が平衡に使われる。一般に、ストリンジェントな条件は、塩濃度が、pH7.0から8.3で約1.0 Mナトリウムイオンより低く、一般には約0.01から1.0 Mナトリウムイオン(または他の塩)であり、温度が、短いプローブ、プライマーまたはオリゴヌクレオチド(例えば、10 ntから50 nt)については少なくとも約30℃、より長いプローブ、プライマーおよびオリゴヌクレオチドについては少なくとも約60℃であるような条件である。ストリンジェントな条件は、不安定化因子(例えば、ホルムアミド)の添加で達成することもできる。

30

40

【0121】

ストリンジェントな条件は、当業者に公知であり、Ausubel et al. (supra), Current Protocols In Molecular Biology, John Wiley & Sons, N. Y. (1989), 6.3.1-6.3.6、ならびに本明細書に記載する実施例において見出すことができる。好ましくは、この条件は、互いに少なくとも約65％、70％、75％、85％、90％、95％、98％または99％相同な配列が、一般に、互いにハイブリダイズしたままであるような条件である。

50

ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の非限定的な例は、 $6\times\text{SSC}$ 、 50 mM Tris-HCl ($\text{pH } 7.5$)、 1 mM EDTA 、 0.02% PVP 、 0.02% Ficoll 、 0.02% BSA および 500 mg/mL 変性サケ精子DNAを含む高塩バッファ中、 65°C でのハイブリダイゼーション、それに続く、 $0.2\times\text{SSC}$ 、 0.01% BSA 中、 50°C での1回またはそれ以上の洗浄である。もう1つの実施形態では、配列番号2、6および/または7のヌクレオチド配列を含む核酸分子に中等度ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズする核酸配列を提供する。中等度ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件の非限定的な例は、 $6\times\text{SSC}$ 、 $5\times\text{Denhardt}$ 溶液、 0.5% SDS 、 100 mg/mL 変性サケ精子DNA中、 55°C でのハイブリダイゼーション、それに続く、 $1\times\text{SSC}$ 、 0.1% SDS 中、 37°C での1回またはそれ以上の洗浄である。用いることができる他の中等度ストリンジェンシー条件は、当分野では周知であり、例えば、Ausubel et al. (supra), and Kriegler, 1990; Gene Transfer And Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NYを参照のこと。さらにもう1つの実施形態では、配列番号1、6および/または7のヌクレオチド配列を含む核酸分子に低ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズする核酸を提供する。低ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件の非限定的な例は、 35% ホルムアミド、 $5\times\text{SSC}$ 、 50 mM Tris-HCl ($\text{pH } 7.5$)、 5 mM EDTA 、 0.02% PVP 、 0.02% Ficoll 、 0.2% BSA 、 100 mg/mL 変性サケ精子DNA、 10% (wt/vol) 硫酸デキストラン中、 40°C でのハイブリダイゼーション、それに続く、 $2\times\text{SSC}$ 、 25 mM Tris-HCl ($\text{pH } 7.4$)、 5 mM EDTA および 0.1% SDS 中、 50°C での1回またはそれ以上の洗浄である。用いることができる他の低ストリンジェンシー条件は、当該分野では周知であり、例えば、Ausubel et al. (supra) and Kriegler, 1990, Gene Transfer And Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY、ならびに本明細書において提供する実施例を参照のこと。

【0122】

本発明のポリヌクレオチドは、天然に存在する分子と比較したとき、ヌクレオチド残基の欠失、挿入または置換である1つまたはそれ以上の変異を有することができる。変異は、天然に存在する（すなわち、天然源から単離された）変異である場合もあり、または合成の（例えば、核酸に対して部位特異的変異誘発を行うことによる）変異である場合もある。

【0123】

本発明のオリゴヌクレオチドは、RNA、DNAまたはいずれかの誘導体であり得る。用語ポリヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチドは、部分的に重なる意味を有するが、オリゴヌクレオチドは、典型的には、相対的に短い単鎖分子である。このようなオリゴヌクレオチドの最小サイズは、オリゴヌクレオチドとターゲット核酸分子上の相補配列との間に安定したハイブリッドを形成するのに必要なサイズである。好ましくは、本オリゴヌクレオチドは、少なくとも15ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも18ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも19ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも20ヌクレオチド、よりいっそう好ましくは少なくとも25ヌクレオチドの長さである。

【0124】

通常、ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドのモノマーは、ホスホジエステル結合またはそれらに類似体によって連結されて、相対的に短いモノマー単位、例えば12～18、から数百のモノマー単位のサイズにわたるオリゴヌクレオチドを形成する。ホスホジエステル連結の類似体としては、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロセレノエート (phosphoroselenoate)、ホスホロジセレノエート (phosphorodiselenoate)、ホスホロアニロチオエート (phosphoroanilothioate)、ホスホラニリデート (phosphoranilidate)、ホスホラミデート (phosphoramidate) が挙げられる。

【0125】

本発明は、例えば核酸分子を同定するためのプローブまたは核酸分子を生産するための

10

20

30

40

50

プライマーとして使用することができるオリゴヌクレオチドを含む。プローブとして使用される本発明のオリゴヌクレオチドは、一般に、検出可能な標識（例えば、放射性同位体、酵素、ビオチン、蛍光分子または化学発光分子）とコンジュゲートしている。

【0126】

プローブおよび／またはプライマーを使用して、本発明のポリヌクレオチドの相同体を他の種からクローニングすることができる。さらに、当該分野において公知のハイブリダイゼーション技術を用いて、そのような相同体のゲノムまたはcDNAライブラリをスクリーニングすることもできる。

【0127】

組換えベクター

本発明の1つの実施形態は、本発明の少なくとも1つの単離されたポリヌクレオチド分子を含む組換えベクターを含み、このポリヌクレオチド分子は、そのポリヌクレオチド分子を宿主細胞に送達することができる任意のベクターに挿入されている。このようなベクターは、自然には本発明のポリヌクレオチド分子に隣接して見出されず、好ましくは、このポリヌクレオチド分子が由来する種以外の種に由来するポリヌクレオチド配列である、異種由来のポリヌクレオチド配列を含有する。前記ベクターは、RNAまたはDNAのいずれであってもよく、原核性または真核性のいずれであってもよく、典型的には、トランスポゾン（例えば、米国特許第5,792,294号に記載されているもの）、ウイルスまたはプラスミドである。

【0128】

組換えベクターの1つのタイプは、発現ベクターに作動可能に連結された本発明のポリヌクレオチド分子を含む。作動可能に連結されたという語句は、ポリヌクレオチド分子が発現ベクターへ、その分子が宿主細胞に形質転換されたとき発現され得るような様式で挿入することを指す。本明細書において用いる場合、発現ベクターは、宿主を形質転換させることができ、指定のポリヌクレオチド分子を発現させることができる、DNAまたはRNAのベクターである。好ましくは、前記発現ベクターは、宿主細胞の中で複製することでもできる。発現ベクターは、原核性または真核性のいずれであってもよく、典型的には、ウイルスまたはプラスミドである。本発明の発現ベクターは、細菌、真菌、内部寄生生物、節足動物、動物および植物細胞を含む本発明の組換え細胞において機能する（すなわち、遺伝子発現を命ずる）任意のベクターを包含する。本発明のベクターは、無細胞発現系においてポリペプチドを生産するために使用することもでき、そのような系は、当該分野において周知である。

【0129】

本明細書において用いる場合、「作動可能に連結された」は、2つまたはそれ以上の核酸（例えば、DNA）セグメント間の機能的関係を指す。典型的には、これは、転写調節要素と転写配列との機能的関係を指す。例えば、プロモーターは、それが適切な宿主細胞においておよび／または無細胞発現系においてコーディング配列の転写を刺激または変調する場合、そのコーディング配列（例えば、本明細書において定義するポリヌクレオチド）に作動可能に連結されている。一般に、転写配列に作動可能に連結されているプロモーター転写調節要素は、その転写配列に物理的に隣接しており、すなわち、それらはシス作用性である。しかし、一部の転写調節要素（例えばエンハンサー）は、それらが転写を強化するコーディング配列に物理的に隣接している必要も、近接して位置する必要もない。

【0130】

特に、本発明の発現ベクターは、調節配列、例えば、転写制御配列、翻訳制御配列、複製起点、および前記組換え細胞と適合性があり、本発明のポリヌクレオチド分子の発現を制御する他の調節配列を含有する。特に、本発明の組換え分子は、転写制御配列を含む。転写制御配列は、転写の開始、延長および停止を制御する配列である。特に重要な転写制御配列は、転写開始を制御するもの、例えばプロモーター、エンハンサー、オペレーターおよびレプレッサー配列である。適する転写制御配列としては、本発明の組換え細胞の少なくとも1つにおいて機能することができる任意の転写制御配列が挙げられる。様々なそ

のような転写制御配列が当業者には公知である。好ましい転写制御配列としては、細菌、酵母、節足動物、線虫、植物または哺乳動物の細胞において機能するもの、例えば、*tac*、*lac*、*trp*、*trc*、オキシ-*pro*、*omp/lpp*、*rrnB*、バクテリオファージラムダ、バクテリオファージT7、T7*lac*、バクテリオファージT3、バクテリオファージSP6、バクテリオファージSP01、メタロチオネイン、アルファ-接合因子 (mating factor)、ピチア (Pichia) アルコールオキシダーゼ、アルファウイルスサブゲノムプロモーター (例えば、シンドビス (Sindbis) ウイルスサブゲノムプロモーター)、抗生物質耐性遺伝子、バキュロウイルス、ヘリオチスゼア (Heliothis zea) 昆虫ウイルス、ワクシニアウイルス、ヘルペスウイルス、アライグマボックスウイルス、他のボックスウイルス、アデノウイルス、サイトメガロウイルス (例えば、中間初期プロモーター)、シミアンウイルス40、レトロウイルス、アクチン、レトロウイルス長末端反復、ラウス肉腫ウイルス、熱ショック、ホスフェートおよびニトレート転写制御配列、ならびに原核細胞または真核細胞において遺伝子発現を制御することができる他の配列が挙げられる。

10

【0131】

本発明のポリペプチドのコーディング配列は、公知の技術を用いて、特定の宿主細胞における発現を最大にするように最適化することができる。例えば、配列番号6は、植物細胞における発現増進のために構築された配列番号1をコードするオープンリーディングフレームを提供し、これに対して配列番号7は、大腸菌における発現増進のために構築された配列番号1をコードするオープンリーディングフレームを提供する。

20

【0132】

宿主細胞

本発明のもう1つの実施形態は、本発明の1つもしくはそれ以上の組換え分子で形質転換された宿主細胞を含む組換え細胞、またはそれらの子孫細胞を含む。細胞へのポリヌクレオチド分子の形質転換は、ポリヌクレオチド分子をその細胞に挿入することができる任意の方法によって達成することができる。形質転換技術としては、トランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、リポフェクション、吸着、およびプロトプラスト融合が挙げられるが、これらに限定されない。組換え細胞は、単細胞のままである場合もあり、または組織、器官もしくは多細胞生物に成長する場合もある。本発明の形質転換ポリヌクレオチド分子は、染色体外のままとどまる場合もあり、またはその形質転換 (すなわち、組換え) 細胞の染色体内の1つもしくはそれ以上の部位に、発現されるそれらの能力が保持されるような様式で組み込まれている場合もある。

30

【0133】

形質転換に適する宿主細胞としては、本発明のポリヌクレオチドで形質転換することができる任意の細胞が挙げられる。本発明の宿主細胞は、本発明のポリペプチドを内因的に (すなわち、自然に) 生産することができるか、本発明の少なくとも1つのポリヌクレオチド分子で形質転換された後にそのようなポリペプチドを生産することができる。本発明の宿主細胞は、本発明の少なくとも1つのタンパク質を生産することができる任意の細胞であり得、細菌、真菌 (酵母を含む)、寄生虫、線虫、節足動物、動物および植物の細胞を含む。宿主細胞の例としては、サルモネラ属 (Salmonella)、エシェリキア属 (Escherichia)、バシラス属 (Bacillus)、リステリア属 (Listeria)、サッカリミセズ属 (Saccharomyces)、スポドプテラ属 (Spodoptera)、マイコバクテリウム属 (Mycobacteria)、キンウワバ垂科 (Trichoplusia)、BHK (仔ハムスター腎) 細胞、MDCK細胞、CRFK細胞、CV-1細胞、COS (例えば、COS-7) 細胞、およびベロ細胞が挙げられる。宿主細胞のさらなる例としては、大腸菌 (大腸菌K-12誘導体を含む) ; チフス菌 (Salmonella typhi) ; 鼠チフス菌 (Salmonella typhimurium) (弱毒株を含む) ; ヨトウガ (Spodoptera frugiperda) ; イラクサギンウワバ (Trichoplusia ni) ; および非腫瘍形成性マウス筋芽細胞G8細胞 (例えば、ATCC CRL 1246) である。特に好ましい宿主細胞は、植物細胞である。

40

【0134】

50

組換えDNA技術は、例えば、宿主細胞中のポリヌクレオチド分子の多数のコピー、それらのポリヌクレオチド分子を転写する効率、結果として生ずる転写産物を翻訳する効率、および後翻訳修飾の効率を操作することによって、形質転換ポリヌクレオチド分子の発現を増進させるために、用いることができる。本発明のポリヌクレオチド分子の発現を増加させるために有用な組換え技術としては、ポリヌクレオチド分子の高コピー数プラスミド (high-copy number plasmid) への作動可能な連結、ポリヌクレオチド分子の1つまたはそれ以上の宿主細胞染色体への組み込み、ベクター安定配列のプラスミドへの付加、転写制御シグナル (例えば、プロモーター、オペレーター、エンハンサー) の置換または修飾、翻訳制御シグナル (例えば、リボソーム結合部位、Shine-Dalgarno配列) の置換または修飾、宿主細胞のコドン使用量に対応する本発明のポリヌクレオチド分子の修飾、および転写産物を不安定にする配列の欠失が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0135】

トランスジェニック植物

本明細書において名詞として用いる用語「植物」は、全植物を指すが、形容詞として用いる場合は、例えば植物器官 (例えば、葉、幹、根、花)、単個細胞 (例えば、花粉)、種子、植物細胞などによような、植物の中に存在する、植物から得られる、植物に由来する、または植物に関連した任意の物質を指す。

【0136】

本発明の実施の際に使用が考えられる植物は、単子葉植物と双子葉植物の両方を含む。ターゲット植物としては、次のものが挙げられるが、これらに限定されない：穀物 (小麦、大麦、ライ麦、エンバク、米、モロコシおよび関連作物)；ビート (テンサイおよび飼料用ビート)；梨果、核果および小果樹 (リンゴ、ナシ、プラム、モモ、アーモンド、サクランボ、イチゴ、ラズベリーおよびブラックベリー)；マメ科植物 (豆、レンズマメ、エンドウ、大豆)；油脂植物 (ナタネ、カラシ、ケシ、オリーブ、ヒマワリ、ココナッツ、ヒマシ油料植物、カカオ豆、ラッカセイ)；キュウリ植物 (ペポカボチャ (marrow)、キュウリ、メロン)；線維植物 (綿、亜麻、麻、ジュート)；柑橘類果実 (オレンジ、レモン、グレープフルーツ、マンダリン)；野菜 (ホウレンソウ、レタス、アスパラガス、キャベツ、ニンジン、タマネギ、トマト、ジャガイモ、パプリカ)；クスノキ科 (アボガド、シナモン、ショウノウ)；または植物、例えば、トウモロコシ、タバコ、堅果類、コーヒー、サトウキビ、茶、ブドウの木、ホップ、芝生、バナナおよび天然ゴムの木、ならびに装飾植物 (花、低木、広葉樹および常緑樹、例えば針葉樹)。好ましくは、前記植物は、被子植物である。

20

30

【0137】

本発明の文脈において定義されるトランスジェニック植物は、所望の植物または植物器官において本発明の少なくとも一種のポリペプチドを生産させるように組換え技術を用いて遺伝子修飾された植物 (ならびに前記植物の部分および細胞) およびそれらの子孫を含む。トランスジェニック植物は、A. Slater et al., Plant Biotechnology - The Genetic Manipulation of Plants, Oxford University Press (2003)、およびP. Christou and H. Klee, Handbook of Plant Biotechnology, John Wiley and Sons (2004)に一般的に記載されているものなどの当該分野において公知の技術を用いて生産することができる。

40

【0138】

「トランスジェニック植物」は、同じ種、変種または栽培品種の野生型植物では見出すことができない遺伝子構築物 (「トランスジーン」) を含有する植物を指す。本明細書において言及する「トランスジーン」は、バイオテクノロジーの分野における通常の意味を有し、ならびに組換えDNAまたはRNA技術によって生産または変更され、植物細胞に導入された遺伝子配列を含む。トランスジーンは、植物細胞に由来する遺伝子配列を含む。典型的には、トランスジーンは、人的操作によって、例えば形質転換などによって植物に導入されているが、当業者が認識しているような任意の方法を用いることができる。

【0139】

50

好ましい実施形態において、トランスジェニック植物は、導入されたそれぞれのおよびすべての遺伝子（トランスジーン）に対してホモ接合性であり、そのため、それらの子孫は所望の表現型について分離しない。トランスジェニック植物は、例えば雑種種子から成長したF₁子孫の場合のように、導入されたトランスジーンに対してヘテロ接合性である場合もある。このような植物は、当該分野において周知の利点（例えば雑種強勢（hybrid vigour））をもたらすことができる。

【0140】

本発明のポリヌクレオチドは、トランスジェニック植物においてすべての生育期に構成的に発現させることができる。その植物または植物器官の用途に依存して、前記ポリペプチドを期待通りに発現させることができる。さらに、前記ポリヌクレオチドを組織特異的に発現させることができる。

10

【0141】

植物において対象となるポリペプチドをコードする遺伝子を発現させることが公知であるか、またはそれが分かっている調節配列を本発明において使用することができる。使用する調節配列の選択は、対象となるターゲット植物および／またはターゲット器官に依存する。このような調節配列は、植物もしくは植物ウイルスから得ることができ、または化学的に合成することができる。そのような調節配列は、当業者には周知である。

【0142】

植物細胞の安定したトランスフェクションにまたはトランスジェニック植物の樹立に適する多数のベクターは、例えば、Pouwels et al., Cloning Vectors: A Laboratory Manual, 1985, supp. 1987; Weissbach and Weissbach, Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, 1989; および Gelvin et al., Plant Molecular Biology Manual, Kluwer Academic Publishers, 1990に記載されている。典型的には、植物発現ベクターは、例えば、5' および 3' 調節配列の転写制御下の1つまたはそれ以上のクローン化植物遺伝子ならびに優性選択可能マーカを含む。このような植物発現ベクターは、プロモーター調節領域（例えば、誘導もしくは構成的、環境もしくは発育調節、または細胞もしくは組織特異的な発現を制御する調節領域）、転写開始出発部位、リボソーム結合部位、RNAプロセッシングシグナル、転写停止部位、および／またはポリアデニル化シグナルも含有し得る。

20

【0143】

植物細胞において活性である多数の構成的プロモーターが記載されている。植物における構成的発現に適するプロモーターとしては、カリフラワーモザイクウイルス（CaMV）35Sプロモーター、ゴマノハグサ（Figwort）モザイクウイルス（FMV）35S、サトウキビ桿状ウイルスプロモーター、ツユクサ黄色斑紋ウイルスプロモーター、リブローヌス-1、5-ニリン酸カルボキシラーゼの小サブユニットからの光誘導性プロモーター、米サイトゾルトリオースリン酸イソメラーゼプロモーター、アラビドプシス（Arabidopsis）のアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼプロモーター、米アクチン1遺伝子プロモーター、マンノピン（mannopine）シンターゼおよびオクトピンシンターゼプロモーター、Adhプロモーター、スクロースシンターゼプロモーター、R遺伝子複合体プロモーター、ならびにクロロフィルα/β結合タンパク質遺伝子プロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。これらのプロモーターは、植物において発現されるDNAベクターを作るために使用されている；例えば、PCT公報WO 8402913参照。これらのプロモーターのすべてが、様々なタイプの植物発現性組換えDNAベクターを作製するために使用されている。

40

【0144】

植物の源組織（例えば葉、種子、根または幹）における発現の目的のために、本発明において利用するプロモーターは、これらの特定の組織において相対的に高い発現を有することが好ましい。この目的のために、組織または細胞に特異的な発現または組織または細胞で強化された発現を伴う遺伝子に対して多数のプロモーターから選択することができる。文献に報告されているそのようなプロモーターの例としては、エンドウからのクロロプ

50

ラストグルタミンシンセターゼ G S 2 プロモーター、小麦からのクロロプラストフルクトース-1, 6-ビスホスファターゼプロモーター、ジャガイモからの核光合成 S T-L S 1 プロモーター、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) からのセリン/トレオニンキナーゼプロモーターおよびグルコアミラーゼ (C H S) プロモーターが挙げられる。アメリカカラマツ (*Larix laricina*) からのリブロー-1, 5-ニリン酸カルボキシラーゼプロモーター、マツからの C a b 遺伝子、C a b 6、のためのプロモーター、小麦からの C a b-1 遺伝子のためのプロモーター、ハウレンソウからの C a b-1 遺伝子のためのプロモーター、米からの C a b 1 R 遺伝子のためのプロモーター、トウモロコシ (*Zea mays*) からのピルベートオルトホスフェートキナーゼ (P P D K) プロモーター、タバコ L h c b 1*2 遺伝子のためのプロモーター、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) S u c 2 スクロース-H³⁰ 共輸送プロモーター、およびハウレンソウからのチラコイド膜タンパク質遺伝子 (P s a D、P s a F、P s a E、P C、F N R、A t p C、A t p D、C a b、R b c S) からのプロモーターも、光合成活性組織において活性であると報告されている。

【0145】

クロロフィル α/β 結合タンパク質のための他のプロモーター、例えば、シロガラシ (*Sinapis alba*) からの L h c B 遺伝子および P s b P 遺伝子のためのプロモーターも本発明に利用することができる。植物細胞における R N A 結合タンパク質遺伝子の発現には、(1) 熱、(2) 光 (例えば、エンドウ R b c S-3 A プロモーター、トウモロコシ R b c S プロモーター)、(3) ホルモン、例えばアブシジン酸、(4) 創傷 (例えば、W u n I)、または (5) 化学物質、例えばメチルジャスミン酸 (methyl jasminate)、サリチル酸、ステロイドホルモン、アルコール、S a f e n e r s (W O 9 7 0 6 2 6 9) によって調節されるプロモーターを含む、環境、ホルモン、化学および/または発育のシグナルに応答して調節される様々な植物遺伝子プロモーターも使用することができ、または (6) 器官特異的プロモーターを利用するのも有利であり得る。

【0146】

植物のシンク組織、例えば、ジャガイモ植物の塊茎、トマトの実、または大豆、カノーラ、綿、トウモロコシ (*Zea mays*)、小麦、米および大麦の種子における発現の目的のために、本発明において利用するプロモーターは、これらの特定の組織において相対的に高い発現を有することが好ましい。塊茎特異的または塊茎で強化された発現を伴う遺伝子のための多数のプロモーターが公知であり、それらとしては、クラス I パタチンプロモーター、ジャガイモ塊茎 A D P G P P 遺伝子のためのプロモーター、大サブユニットと小サブユニット両方、スクロースシンターゼプロモーター、22 k D タンパク質複合体およびプロテインナーゼ阻害剤を含む、大塊茎タンパク質のプロモーター、顆粒結合デンプンシンターゼ遺伝子 (G B S S) のためのプロモーター、ならびに他のクラス I および I I パタチンプロモーターが挙げられる。他のプロモーターを使用して、特定の組織 (例えば種子または果実) においてタンパク質を発現させることもできる。 β -コングリシニンのためのプロモーターまたは他の種子特異的プロモーター (例えばナピン (napin) およびファセオリン (phaseolin) プロモーター) を使用してもよい。トウモロコシ (*Zea mays*) 内胚乳発現のために特に好ましいプロモーターは、米からのグルテリン遺伝子のためのプロモーター、さらに特には O s g t-1 プロモーターである。小麦における発現に適するプロモーターの例としては、A D P グルコースピロシンターゼ (A D P G P P) サブユニット、顆粒結合型および他のデンプンシンターゼ、分枝および脱分枝酵素 (branching and debranching enzyme)、胚発生で豊富なタンパク質 (embryogenesis-abundant protein)、グリアジン、ならびにグルテニンのためのプロモーターが挙げられる。米におけるそのようなプロモーターの例としては、A D P G P P サブユニット、顆粒結合型および他のデンプンシンターゼ、分枝酵素、脱分枝酵素、スクロースシンセターゼおよびグルテリンのためのプロモーターが挙げられる。特に好ましいプロモーターは、米グルテリン、O s g t-1 遺伝子のためのプロモーターである。大麦のためのそのようなプロモーターの例としては、A D P G P P サブユニット、顆粒結合および他のデンプンシンターゼ、分枝酵素、

脱分枝酵素、スクロースシンセターゼ、ホルデイン、胚グロブリン、およびアリュースロン特異的タンパク質のためのものが挙げられる。

【0147】

根特異的プロモーターも使用することができる。そのようなプロモーターの一例は、酸キチナーゼ遺伝子のためのプロモーターである。根組織における発現は、同定されているCaMV 35Sプロモーターの根特異的サブドメインを利用することによって達成することができる。

【0148】

5'非翻訳リーダー配列は、本発明のポリヌクレオチドの異種遺伝子配列を発現させるために選択されるプロモーターに由来するものであり得、所望される場合には、mRNAの翻訳を増加させるように特異的に修飾することができる。トランスジーンの発現の最適化についての総説については、Kozziel et al. (1996)を参照のこと。そのような最適化リーダー配列の一例は、配列番号6に含まれている。その5'非翻訳領域は、植物ウイルスRNA（とりわけ、タバコモザイクウイルス、タバコエッチウイルス、トウモロコシ萎縮モザイクウイルス、アルファルファモザイクウイルス）から、適する真核遺伝子、植物遺伝子（小麦およびトウモロコシクロロフィルa/b結合タンパク質遺伝子リーダー）から、または合成遺伝子配列から、得ることもできる。本発明は、非翻訳領域が、プロモーター配列を伴う5'非翻訳配列に由来する場合の構築物に限定されない。リーダー配列は、無関係なプロモーターまたはコーディング配列に由来する場合もある。本発明に関連して有用なリーダー配列は、トウモロコシHsp70リーダー（米国特許第5,362,865号および同第5,859,347号）およびTMVオメガ要素を含む。

【0149】

転写の停止は、キメラベクターにおける対象となるポリヌクレオチドに作動可能に連結された3'非翻訳DNA配列によって達成される。組換えDNA分子の3'非翻訳領域は、植物においてそのRNAの3'末端にアデニル化ヌクレオチドを付加させるように機能する、ポリアデニル化シグナルを含有する。この3'非翻訳領域は、植物細胞において発現される様々な遺伝子から得ることができる。ノパリンシンターゼ3'非翻訳領域、エンドウ小サブユニットRubisco遺伝子からの3'非翻訳領域、大豆7S種子貯蔵タンパク質遺伝子からの3'非翻訳領域を、一般に、この能力に関して用いることができる。アグロバクテリウム（Agrobacterium）腫瘍誘導性（Ti）プラスミド遺伝子のポリアデニル化シグナルを含有する3'転写非翻訳領域も適する。

【0150】

細胞への遺伝子の直接送達のための4つの一般的な方法が記載されている：（1）化学的方法（Graham et al., 1973）；（2）物理的方法、例えば、マイクロインジェクション（Capecchi, 1980）；エレクトロポレーション（例えば、WO 87/06614、米国特許第5,472,869号、同第5,384,253号、WO 92/09696およびWO 93/21335参照）；遺伝子銃（例えば、米国特許第4,945,050号および同第5,141,131参照）；（3）ウイルスベクター（Clapp, 1993；Lu et al., 1993；Eglitis et al., 1988）；および（4）受容体媒介メカニズム（Curriel et al., 1992；Wagner et al., 1992）。

【0151】

使用することができる加速(acceleration)法としては、例えば、マイクロプロジェクティルボンバードメントなどが挙げられる。形質転換を起こさせる核酸分子を植物細胞に送達するための方法の一例は、マイクロプロジェクティルボンバードメント（microprojectile bombardment）である。この方法は、Yang et al., Particle Bombardment Technology for Gene Transfer, Oxford Press, Oxford, England (1994)によって総説されている。非生物粒子（マイクロプロジェクティル）に核酸をコーティングし、推進力によってそれらを細胞に送達することができる。例示的粒子としては、タングステン、金、白金などから成るものが挙げられる。マイクロプロジェクティルボンバードメントの特別な利点は、単子葉植物を繁殖可能に形質転換させる有効な手段であることに加えて、プロトプラス

トの単離も、アグロバクテリウム(Agrobacterium)感染に対する感受性も必要としないことである。加速によってトウモロコシ(Zea mays)細胞にDNAを送達するための方法の実例となる実施形態は、DNAをコーティングした粒子を、スクリーン(例えば、ステンレス鋼またはNytexスクリーン)を通して、懸濁液中で培養されているトウモロコシ細胞で覆われたフィルター表面へと進ませるために使用することができる、バイオリスティック(biolistics) α粒子送達システムである。本発明とともに使用するために適する粒子送達システムは、Bio-Rad Laboratoriesから入手できるヘリウム加速PDS-1000/Heガンである。

【0152】

ボンバードメントのために、懸濁液中の細胞をフィルターで濃縮することができる。ボンバードメントに付される細胞を含有するフィルターを、マイクロプロジェクティル停止用プレートの下の適切な距離に配置する。所望される場合には、ガンとボンバードメントに付される細胞との間に1つまたはそれ以上のスクリーンも配置する。

【0153】

あるいは、未成熟胚または他のターゲット細胞を固体培養媒体上に配列してもよい。ボンバードメントに付される細胞を、マイクロプロジェクティル停止用プレートの下の適切な距離に配置する。所望される場合には、加速装置とボンバードメントに付される細胞との間に1つまたはそれ以上のスクリーンも配置する。ここで述べる技術の使用により、マーカー遺伝子を一過的に発現する細胞の1000までまたはそれ以上の細胞増殖巣(foci)を得ることができる。ボンバードメントの48時間後に外因遺伝子産物を発現する1細胞増殖巣内の細胞数は、多くの場合、1~10の範囲であり、平均1~3の範囲である。

【0154】

ボンバードメント形質転換では、最大数の安定した形質転換体を生ずるようにボンバードメント前培養条件およびボンバードメントパラメータを最適化することができる。ボンバードメントの物理的パラメータと生物学的パラメータの両方が、この技術では重要である。物理的因子は、DNA/マイクロプロジェクティル沈着物の操作に関係するもの、またはマイクロプロジェクティルもしくはマイクロプロジェクティルいずれかの飛行および速度に影響を及ぼすものである。生物学的因子としては、ボンバードメントの前および直後の細胞の操作に関係するすべての工程、ボンバードメントに付随する損傷の緩和を助長するためのターゲット細胞の浸透圧調整、およびまた、形質転換DNA(例えば線形化DNAまたはインタクトなスーパーコイル化プラスミド)の性質が挙げられる。ボンバードメント前操作は、未成熟胚の形質転換成功のために特に重要であると考えられる。

【0155】

もう1つの代替実施形態では、プラスミドを安定して形質転換させることができる。高等植物におけるプラスミド形質転換について開示されている方法としては、選択可能マーカーを含有するDNAの粒子ガン送達、および相同組換えによるプラスミドゲノムへのDNAのターゲッティングが挙げられる(米国特許第5,451,513号、同第5,545,818号、同第5,877,402号、同第5,932,479号、およびWO 99/05265)。

【0156】

従って、小規模な試験でボンバードメントパラメータの様々な態様を調節してそれらの条件を十分に最適化することを望むことができると考えられる。特に、物理的パラメータ、例えば、ギャップ距離、飛行距離、組織距離およびヘリウム圧を調節すること望むことができる。レシピエント細胞の生理状態に影響を及ぼし、従って、形質転換および組み込みの効率に影響を及ぼし得る条件を修飾することによって、外傷低減因子(trauma reduction factor)を最小にすることもできる。例えば、浸透圧状態、組織水和、およびレシピエント細胞の二次培養段階または細胞周期を、最適な形質転換のために調整することができる。他のルーチンな調整の実行は、本開示に鑑みて当業者には公知である。

【0157】

アグロバクテリウム媒介移入(Agrobacterium-mediated transfer)は、DNAを植物

全体の組織に導入することができ、それによって、プロトプラストからインタクトな植物に再生させる必要を回避することができるため、植物細胞への遺伝子の導入に広範に適用できるシステムである。植物細胞にDNAを導入するためのアグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 媒介植物組み込みベクターの使用は、当該分野において周知である (例えば、米国特許第 5, 177, 010 号、同第 5, 104, 310 号、同第 5, 004, 863 号、同第 5, 159, 135 号参照)。さらに、T-DNA の組み込みは、ほとんど再配列を生じさせない比較的精密なプロセスである。移入されることとなる DNA の領域は、境界配列 (border sequence) によって規定され、介在 DNA は、通常、その植物のゲノムに導入される。

【0158】

最新のアグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 形質転換ベクターは、大腸菌およびアグロバクテリウム (*Agrobacterium*) において複製することができ、そのため、記載されているような適便な操作が可能となる (Klee et al., In: *Plant DNA Infectious Agents*, Hohn and Schell, eds., Springer-Verlag, New York, pp. 179-203 (1985))。さらに、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 媒介遺伝子移入のためのベクターに関する技術的進歩は、前記ベクター内の遺伝子および制限部位の配列を改善して、様々なポリペプチドコーディング遺伝子を発現することができるベクターの構築を助長する。記載されているベクターは、挿入されたポリペプチドコーディング遺伝子の直接発現のためのプロモーターおよびポリアデニル化部位に隣接する適便な多リンカー (multi-linker) 領域を有し、本目的に適する。加えて、アームを有する Ti 遺伝子とアームを有さない Ti 遺伝子の両方を含有するアグロバクテリウム (*Agrobacterium*) は、形質転換に利用することができる。アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 媒介形質転換が有効である植物品種において、これは、遺伝子移入の容易で定義された性質のため選択される方法である。

【0159】

アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 形質転換法を用いて形成されたトランスジェニック植物は、典型的には、1つの染色体上に単一の遺伝子座を含有する。そのようなトランスジェニック植物は、付加遺伝子に対してヘミ接合性であると言うことができる。付加された構造遺伝子に対してホモ接合性であるトランスジェニック植物、すなわち、2つの付加遺伝子 (染色体対のそれぞれの染色体上の同じ座に1つの遺伝子) を含有するトランスジェニック植物がより好ましい。ホモ接合型トランスジェニック植物は、単一付加遺伝子を含有する独立した分離系トランスジェニック植物 (segregant transgenic plant) を有性交配 (自家受精 (selfing)) させ、生産された種子の一部を発芽させ、結果として生じた植物を対象となる遺伝子について分析することによって得ることができる。

【0160】

2つの異なるトランスジェニック植物を交配させて、2つの独立した分離外因遺伝子を含有する子孫を生産することができることも理解される。適切な子孫からの自家受精は、両方の外因遺伝子に対してホモ接合性である植物を生産することができる。親植物への戻し交配および非トランスジェニック植物との他配 (out-crossing) も考えられ、栄養繁殖も考えられる。異なる形質および作物のために一般に用いられる他の繁殖法の説明は、Fehr, In: *Breeding Methods for Cultivar Development*, Wilcox J. ed., American Society of Agronomy, Madison Wis. (1987) において見出すことができる。

【0161】

植物プロトプラストの形質転換は、リン酸カルシウム沈殿、ポリエチレングリコール処理、エレクトロポレーション、およびこれらの処理の組み合わせに基づく方法を用いて達成することができる。異なる植物品種へのこれらのシステムの適用は、プロトプラストからその特定の植物系統に再生する能力に依存する。プロトプラストからの穀物への再生についての実例となる方法が記載されている (Fujimura et al, 1985; Toriyama et al, 1986; Abdullah et al, 1986)。

【0162】

他の細胞形質転換法も用いることができ、それらとしては、花粉への直接 DNA 移入に

よって、植物の生殖器官へのDNAの直接注入によって、または未成熟胚の細胞へのDNAの直接注入、その後の乾燥胚の再水和によって、植物へDNAを導入することが挙げられるが、これらに限定されない。

【0163】

単一植物プロトプラスト形質転換体からのまたは様々な形質転換外植体からの植物の再生、発生および栽培（培養 cultivation）は、当該分野において周知である（Weissbach et al., In: Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, San Diego, Calif., (1988)）。この再生および成長プロセスは、一般に、形質転換細胞の選択の工程、それらの個々に区別された細胞を、通常の胚発育期を経て根付き苗木期まで栽培する工程を含む。トランスジェニック胚および種子は、同様に再生される。その後、それらの結果として生ずるトランスジェニック根付き新芽を適切な植物成長培地（例えば土壌）に植える。

10

【0164】

外来、外因遺伝子を含む植物の発生または再生は、当該分野において周知である。好ましくは、再生植物を自家受粉させて、ホモ接合型トランスジェニック植物を得る。そうでなければ、再生植物から得た花粉を、農学的に重要な系統の種子から育つ植物（seed-grown plant）に交配する。逆に、これらの重要な系統の植物からの花粉を用いて、再生植物に受粉する。所望の外因核酸を含む本発明のトランスジェニック植物は、当業者に周知の方法を用いて栽培される。

20

【0165】

主として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、双子葉植物を形質転換させるため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5,004,863号、同第5,159,135号、同第5,518,908号）；大豆（米国特許第5,569,834号、同第5,416,011号）；アブラナ属（*Brassica*）（米国特許第5,463,174号）；ラッカセイ（Cheng et al., 1996）；およびエンドウ（Grant et al., 1995）について公表されている。

【0166】

外因核酸の導入により植物に遺伝変異を導入するための小麦および大麦などの穀物植物の形質転換方法、およびプロトプラストまたは未成熟植物胚からの植物の再生方法は、当該分野において周知であり、例えば、カナダ特許出願第2,092,588号、オーストラリア特許出願第61781/94号、オーストラリア特許第667939号、米国特許第6,100,447号、国際特許出願PCT/US97/10621、米国特許第5,589,617号および同第6,541,257号を参照のこと。他の方法は、特許明細書WO99/14314に記載されている。好ましくは、トランスジェニック小麦または大麦植物をアグロバクテリウムツメファシエンス（*Agrobacterium tumefaciens*）媒介形質転換手順によって生産する。所望の核酸構築物を有するベクターを、再生可能な小麦細胞の組織培養植物もしくは外植体、または適する植物系（例えばプロトプラスト）に導入することができる。

30

【0167】

前記再生可能な小麦細胞は、好ましくは、未成熟胚の胚板、成熟胚の胚板、これらから誘導されたカルス、または分裂組織に由来するものである。

40

【0168】

本発明のポリペプチドを発現する植物は、US20050022261号に記載されている方法を用いて生産することができ、この場合、GOXまたはEPSPSタンパク質をコードする核酸の代わりに、本発明のポリヌクレオチドを用いる。

【0169】

グリホサート耐性小麦は、US20040133940号に記載されている方法を用いて生産することができ、この場合、EPSPSをコードするDNAの代わりに、本発明のポリペプチドをコードする核酸分子を用いる。あるいは、グリホサート耐性小麦は、US20030154517号に記載されている方法を用いて、本発明のポリペプチドをコー

50

ドする遺伝子構築物を小麦細胞に導入することによって、生産することができる。

【0170】

トランスジェニック細胞およびトランスジェニック植物においてトランスジーンの有無を確認するために、当業者には公知の方法を用いて、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅またはサザンブロット分析を行うことができる。トランスジーンが発現産物は、その産物の性質に依存して、ウエスタンブロットおよび酵素アッセイを含む、様々な方法のいずれで検出してもよい。タンパク質発現を定量するためにおよび異なる植物組織における複製を検出するために特に有用な方法は、レポーター遺伝子（例えばGUS）の使用である。一旦トランスジェニック植物が得られたら、それらを成長させて、所望の表現型を有する植物の組織または部分を生産することができる。その植物組織または植物部分を収穫してもよいし、および／またはその種子を回収してもよい。この種子は、所望の特徴を有する組織または部分を伴うさらなる植物を成長させるための源として役立ち得る。

10

【0171】

本明細書に記載する方法を用いて生産された植物は、US 20050022261号またはUS 20060059581号に一般に概説されている手順を用いて、除草剤（例えばグリホサート）に対する耐性について試験することができる。

【0172】

本発明のトランスジェニック植物は、アミン含有除草剤に対する植物の許容度／耐性を強化する、本発明のもの以外の、さらなるトランスジーンを含む場合がある。例としては、グリホサートへのより低い親和性を有し、それ故、グリホサートの存在下でそれらの触媒活性を保持する、細菌EPSPS変異体および植物EPSPS変異体の発現（米国特許第5,633,435号、同第5,094,945号、同第4,535,060、および同第6,040,497号）、ならびにGOX（これもグリホサートを分解する）の発現（米国特許第5,776,760号）が挙げられる。

20

【0173】

トランスジェニック非ヒト動物

「トランスジェニック非ヒト動物」は、同じ種または品種の野生型動物において見出されない遺伝子構築物（「トランスジーン」）を含有する、ヒト以外の動物を指す。本明細書において言及する「トランスジーン」は、バイオテクノロジーの分野での通常の意味を有し、ならびに組換えDNAまたはRNA技術によって生産または変更され、動物細胞に導入される遺伝子配列を含む。トランスジーンは、動物細胞に由来する遺伝子配列を含むことができる。典型的には、トランスジーンは、人的操作によって、例えば形質転換などによって動物に導入されているが、当業者が認識しているような任意の方法を使用することができる。

30

【0174】

トランスジェニック動物を生産するための技術は、当該分野において周知である。この主題に関する有用な一般教科書は、Houdebine, Transgenic animals - Generation and Use (Harwood Academic, 1997)である。

【0175】

異種DNAを、例えば受精した哺乳動物卵子に導入することができる。例えば、全能細胞または多能性幹細胞をマイクロインジェクション、リン酸カルシウム媒介沈殿、リボソーム融合、レトロウイルス感染または他の手段によって形質転換させ、その後、その形質転換細胞を胚に導入し、その後、その胚をトランスジェニック動物へと発育させることができる。非常に好ましい方法では、発生中の胚を、所望のDNAを含有するレトロウイルスに感染させ、その感染させた胚からトランスジェニック動物を生じさせる。しかし、最も好ましい方法では、適切なDNAを、好ましくは単細胞期にある胚の前核または細胞質に共注入し、それらの胚を成体トランスジェニック動物へと発育させる。

40

【0176】

トランスジェニック動物を生産するために用いられるもう1つの方法は、標準的な方法による前核期卵子への核酸のマイクロインジェクションを含む。その後、注入された卵子

50

を培養した後、偽妊娠レシピエントの卵管に移入する。

【0177】

トランスジェニック動物は、核移入技術によって生産することもできる。この方法を用いて、ドナー動物からの線維芽細胞を、調節配列の制御のもと、対象となる結合ドメインまたは結合パートナーのコーディング配列が組み込まれているプラスミドで、安定的にトランスフェクトする。その後、安定したトランスフェクタントを除核卵母細胞に融合させ、培養し、雌レシピエントに移入する。

【0178】

組成物

本発明の組成物は、「許容される担体」を含むことができる。そのような許容される担体の例としては、水、食塩水、リンガー溶液、デキストロース溶液、ハंक溶液、および他の生理的平衡塩水溶液が挙げられる。非水性ビヒクル（例えば、固定油、ゴマ油、オレイン酸エチル、またはトリグリセリド）を使用することもできる。「許容される担体」の正確な性質は、その組成物の使用に依存する。本明細書に記載する使用およびその組成物中の本発明の成分の性質を考慮することにより、当業者は、特定の使用に適する「許容される担体」を容易に決定することができる。

【0179】

ポリペプチド、および／またはそれらをコードする発現構築物は、アミン含有除草剤に曝露された患者（例えば人間、動物および魚）を処置するために使用することができる。従って、本発明の組成物は、「医薬組成物」を製造するために「医薬的に許容される担体」を含むことができる。医薬的に許容される担体は、当該分野において周知である（例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Alfonso R. Gennaro, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 19th Edition (1995)参照）。

【0180】

本発明のポリペプチドは、アミン含有除草剤の分解速度および／または分解度を向上させる、もしくはそのポリペプチドの安定性を増大させる組成物中に提供され得る。例えば、本ポリペプチドは、ポリウレタンマトリックス上に固定することができ（Gordon et al., 1999）、または適切なリポソームに封入することができる（Petrikovics et al., 2000a and b）。前記ポリペプチドは、フォーム（例えば消火活動（fire-fighting）の際に常例的に使用されているもの）を含む組成物に組み込むこともできる（LeJeune et al., 1998）。

【0181】

当業者の対象者には理解されるが、本発明のポリペプチドは、WO 00/64539（この内容は、それら全体が本明細書において参考として援用される）に開示されているようなスポンジまたはフォームにおいて容易に使用することができる。

【0182】

本発明の1つの実施形態は、動物、植物、動物もしくは植物の材料、または環境（土壌および水サンプルを含む）に本発明のポリペプチドをゆっくりと放出することができる制御放出製剤である。本明細書において用いる場合、制御放出製剤は、制御放出ビヒクル中に本発明の組成物を含む。適する制御放出ビヒクルとしては、生体適合性ポリマー、他のポリマーマトリックス、カプセル、マイクロカプセル、微粒子、ポーラス調製物、浸透圧ポンプ、拡散デバイス、リポソーム、リポスフェア（liposphere）および経皮送達システムが挙げられるが、これらに限定されない。好ましい制御放出製剤は、生分解性（すなわち、生体内分解性（bioerodible））である。

【0183】

本発明の好ましい制御放出製剤は、アミン含有除草剤（特にグリホサート）を噴霧した領域内に存在する土壌または水に本発明の組成物を放出することができる。この製剤は、好ましくは、約1～約12ヶ月に及ぶ期間にわたって放出される。本発明の好ましい制御放出製剤は、少なくとも約1ヶ月間、より好ましくは少なくとも約3ヶ月間、よりいっそう好ましくは少なくとも約6ヶ月間、よりいっそう好ましくは少なくとも約9ヶ月間、お

よびよりいっそう好ましくは少なくとも約12ヶ月間、処理を行うことができる。

【0184】

アミン含有除草剤を分解するために有効な組成物を製造するために必要となる、本発明のポリペプチド、ベクターまたは宿主細胞などの濃度は、防染すべきサンプルの性質、そのサンプル中のアミン含有除草剤の濃度、およびその組成物の配合に依存する。当業者には理解されるが、前記組成物中のポリペプチド、ベクターまたは宿主細胞などの有効濃度は、実験に基づいて容易に決定することができる。

【0185】

抗体

本発明は、本発明のポリペプチドに対するモノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体、またはそれらのフラグメントも提供する。従って、本発明は、本発明のポリペプチドに対するモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体の生産のためのプロセスをさらに提供する。

【0186】

用語「特異的に結合する」は、本発明の少なくとも一種のポリペプチドに結合するが、他の公知タンパク質には結合しない抗体の能力を指す。

【0187】

本明細書において用いる場合、用語「エピトープ」は、抗体によって結合される本発明のポリペプチドの領域を指す。エピトープを動物に投与してそのエピトープに対する抗体を産生させることができるが、好ましくは、本発明の抗体は、ポリペプチド全体の文脈において、そのエピトープ領域に特異的に結合する。

【0188】

ポリクローナル抗体が所望される場合、選択された哺乳動物（例えば、マウス、ウサギ、ヤギ、ウマなど）を本発明の免疫原性ポリペプチドで免疫する。その免疫された動物から血清を採取し、公知の手順に従って処理する。ポリクローナル抗体含有血清が、他の抗原に対する抗体を含有する場合、それらのポリクローナル抗体を免疫アフィニティークロマトグラフィーによって精製することができる。ポリクローナル抗血清の生産および処理技術は、当該分野において公知である。このような抗体を作ることができるように、本発明は、動物において免疫原として使用するための別のポリペプチドにハプテン化（haptenised）された本発明のポリペプチドまたはそのフラグメントも提供する。

【0189】

本発明のポリペプチドに対するモノクローナル抗体も、当業者には容易に生産することができる。ハイブリドーマによってモノクローナル抗体を作るための一般的方法論は、周知である。不死抗体生産細胞系統は、細胞融合によって、および他の技術（例えば、発癌性DNAでのBリンパ球の直接形質転換、またはエプスタインバーウイルスでの形質転換）によっても作ることができる。生産されたモノクローナル抗体のパネルを様々な特性について、すなわち、アイソタイプおよびエピトープ親和性について、スクリーニングすることができる。

【0190】

代替技術は、例えば、ファージが、非常に様々な相補性決定領域（CDR）を有するそれらのコートの表面でscFvフラグメントを発現する、ファージディスプレイライブラリのスクリーニングを含む。この技術は、当該分野において周知である。

【0191】

本発明の目的のために、用語「抗体」は、相反する指定がない限り、ターゲット抗原に対するそれらの結合活性を保持する全抗体のフラグメントを含む。そのようなフラグメントとしては、Fvフラグメント、F(ab')フラグメントおよびF(ab')₂フラグメント、ならびに単鎖抗体（scFv）が挙げられる。さらに、抗体およびそれらのフラグメントは、例えばEP-A-239400号に記載されているような、ヒト化抗体であってもよい。

【0192】

10

20

30

40

50

本発明の抗体は、固体支持体に結合させることができ、および／または適する試薬、対照、説示などととも適する容器内のキットに包装することができる。

【0193】

1つの実施形態では、本発明の抗体を検出可能に標識する。抗体結合を直接測定し得る例示的な検出可能標識としては、放射性標識、発蛍光団、染料、磁気ビーズ、化学発光体、コロイド粒子などが挙げられる。結合の間接的測定を可能にする標識の例としては、その基質が着色生成物または蛍光生成物をもたらすことができる酵素が挙げられる。追加の例示的な検出可能標識としては、適する基質の付加後に検出可能な生成物シグナルを生じさせることができる共有結合型酵素が挙げられる。コンジュゲートでの使用に適する酵素の例としては、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、リンゴ酸デヒドロゲナーゼなどが挙げられる。市販されていない場合は、そのような抗体-酵素コンジュゲートは、当業者に公知の技術によって容易に製造することができる。さらなる例示的な検出可能標識としては、アビジンまたはストレプトアビジンに高親和性で結合するビオチン；蛍光活性化細胞選別機で使用することができる蛍光色素（例えば、フィコビリプロテイン、フィコエリトリンおよびアロフィコシアニン；フルオロセインおよびテキサスレッド）；ハプテンなどが挙げられる。好ましくは、前記検出可能標識は、プレート照度計で直接測定が可能なもの、例えばビオチンである。そのような標識抗体を当該分野において公知の技術で使用して、本発明のポリペプチドを検出することができる。

10

【0194】

微生物寄託の詳細

20

アルスロバクター属種TBD (Arthrobacter sp. TBD) は、2006年4月11日、オーストラリア国家計量研究所 (National Measurement Institute, 51-65 Clarke Street, South Melbourne, Victoria 3205, Australia) にアクセッション番号V06/010960で寄託された。

【0195】

この寄託は、特許手続上の微生物の寄託の国際承認に関するブダペスト条約 (Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure) およびそのもとでの規則の規定に従って行われた。これは、寄託の日から30年間、生存培養物の保存を保障する。関連特許の発行の際にその培養物の子孫を永久におよび拘束なく公的に利用可能であることを保障するブダペスト条約の約定に従って、前記国家計量研究所はそれらの生物を利用できるようにする。

30

【0196】

本出願の譲受人は、培養寄託物が、適する条件下で培養された場合に死滅したまたは喪失または破壊されたなら、通知に対して速やかに同じ培養物の生存試料を再寄託することに同意している。寄託株の利用可能性を、任意の政府の支配下でその特許法に従って許可される権利に反して本発明を実施するためのライセンスとみなしてはならない。

【実施例】

【0197】

実施例1-グリホサート分解細菌の単離

材料および方法

40

化学物質

N-(ホスホノメチル)グリシン(グリホサート)は、ICNまたはSigmaから入手した。すべての他の分析用試薬は、Sigma-Aldrichから入手した。

【0198】

培地

別様に述べていなければ、窒素源のない最小培地は、M9塩[6g Na₂HPO₄、3g KH₂PO₄、1g NaCl]、微量元素(金属イオンおよびビタミン類を含む)、200μM MgCl₂、200μM CaCl₂、および、炭素源としての1%グルコースを含む。

【0199】

50

グリホサート分解細菌の単離

様々な土壌分離菌および本発明者らの実験室用菌株貯蔵物 (bank) を、液体培養において唯一の窒素源としてグリホサートを利用する能力について試験した。分離菌を濃い液体培地 (栄養ブロス (Merck) または Luria ブロス (例えば、Sambrook et al., 1989) におけるもの) のいずれか) 中、適切な温度で一晩培養し、その後、唯一の窒素源として 0.2% (11.8 mM) グリホサートを含有する最小培地で 0.01 の OD_{600nm} に希釈した。Softmax Pro Platerreader (Molecular Devices) でフレキシプレート (BD Biosciences) 内の 200 μL の培養物の OD_{600nm} を測定することにより、増殖を評価した。

【0200】

10

アルスロバクター属種 TBD (Arthrobacter sp. TBD) の同定

アルスロバクター属種 TBD (Arthrobacter sp. TBD) から抽出したゲノム DNA およびユニバーサルプライマーを使用して 16S rDNA を PCR 増幅し、得られた 1.35 kb 産物の塩基配列を決定した。

【0201】

分析方法

HPLC 分析によるグリホサートおよび AMPA の検出は、Tomita ら (1991) の方法の修正バージョンを用いて行った (カラム: C18 4.6 μM、5 Å カラム)。移動相: 0.2 M K₂HPO₄, 15% アセトニトリル)。分析物を塩化トシルで誘導体化し、240 nm の波長で検出した。1 mL の反応上清を 0.5 mL の 0.4 M NaHPO₄ (pH 11.0) と混合し、その後、200 μL 塩化トシル溶液 (アセトニトリル中、10 mg mL⁻¹ の p-トルエンスルホニルクロライド [Sigma]) を添加した。50 °C で 5 分間のインキュベーションの後、20 μL の濾過した反応生成物を分析のために HPLC に注入した。

20

【0202】

結果

唯一の窒素源としてグリホサートを利用することができるいくつかの細菌が、土壌濃縮物からも、本発明者らの実験室用農薬分解微生物コレクションのスクリーニングからも同定された。これらの分解細菌は、単離アルスロバクター属種株 TBD (Arthrobacter sp. strain TBD) を含んでおり、これは、唯一の窒素源としてグリホサートを利用して液体最小培地中で急速に増殖してコンフルエントになることができることが判明した。

30

【0203】

Ribosomal DataBank (Cole et al., 2005) および BLAST (McGinnis and Madden, 2004) での前記全長 16S rDNA 配列の比較は、前記細菌単離株がアルスロバクター属種株 c138 (Arthrobacter sp. strain c138) (Futamata et al., 2005) に最も類似しており、塩基配列決定した 1.35 kb 16S rDNA 遺伝子に対して 99.49% のヌクレオチド同一性を有することを示した。

【0204】

培養上清の HPLC 分析により、アルスロバクター属種 TBD (Arthrobacter sp. TBD) が、72 時間以内に培養培地中のグリホサートの 70% (8.28 mM) を除去し得ることが判明した。

40

【0205】

実施例 2 - アルスロバクター属種 TBD (Arthrobacter sp. TBD) のグリホサート分解活性の原因である遺伝子の単離

材料および方法

アルスロバクター属種 TBD (Arthrobacter sp. TBD) のゲノム DNA ライブラリの調製およびスクリーニング

Ausubel ら (上記) の方法を用いて、細菌細胞を培養して、唯一の窒素源としてのグリホサートで飽和された状態にし、ゲノム DNA を抽出した。ゲノム DNA を Sau3A1 で部分的に消化し、BamHI で消化された pWEB::TNC (Epicent

50

re) ベクターを使用してコスミドライブラリを作った。そのライブラリをDH10B細胞に形質転換させ、個々のプラスミドを、溶液Cを補足した最小培地中で唯一の窒素源としてグリホサートを利用して増殖をもたらす能力についてスクリーニングした。

【0206】

陽性コロニーを選択し、その後、37℃で振盪しながら増殖させた10mLの培養物において、唯一の窒素源としてグリホサートを用いて増殖をもたらす能力を確認した。その培養物の上清画分をHPLCによって分析して、培地からのグリホサートの除去を確認した。

【0207】

Glox Aをコードする遺伝子の単離

10

コスミドpWEB::A112をEco R1で消化し、生じた6つのバンドを調製したベクターpK18にサブクローニングした。ベクター調製中、pK18をEco R1 (NEB) で線形化し、エビアルカリホスファターゼを製造業者の説示 (Promega) に従って用いて脱リン酸化した。そのコスミドからのEco R1フラグメントのミニライブラリを、上で説明したような活性についてスクリーニングし、9kbフラグメントが大腸菌細胞に対してグリホサート分解活性をもたらすことが判明した。その後、この構築物からの共有フラグメントのショットガンライブラリを、6倍の適用範囲の標準物質 (standard of 6 times coverage) (AGRF、オーストラリア) に対して配列した。配列分析およびヌクレオチドとタンパク質データベースの比較は、Vector NTI Advance 9.0 (Informax、Invitrogen) およびNCBI BLAST (Altschul et al., 1997, 2004) を使用して

20

【0208】

Glox Aに関するバイオインフォマティック分析

Vector NTI v.9 (Informax Inc.USA;Invitrogen,Australia) およびNCBI Blast (Altschul et al, 1997) を使用して、配列データおよび予測アミノ酸配列を分析し、コンプライし、注釈をつけ、データベースと比較した。NCBI GenBankおよびその保存ドメインデータベースCDDが、比較に用いた主データベースであった。

【0209】

結果

Glox Aをコードする遺伝子の単離

30

アルスロバクター属種TBD (Arthrobacter sp. TBD) からのゲノムDNAのコスミドライブラリのスクリーニングにより、唯一の窒素源としてグリホサートを利用して増殖する能力をもたらすことができる唯一のコスミドが判明し、pWEB::A112と名づけた。この構築物からの6つのEco R1制限酵素フラグメントをスクリーニングし、グリホサート分解活性は、構築物pKWE1C12では、9.5kb Eco R1フラグメントに位置した。この9520bp領域の完全配列により、グリホサートを開裂させる能力を有する唯一の予測タンパク質 (ORF 9によってコードされる推定オキシドレダクターゼ) が判明した。

【0210】

このグリホサート分解タンパク質をGlox Aと呼び、glox Aの発現ベクターへのサブクローニングおよびグリホサート分解活性についてのアッセイにより、組み換えGlox Aを発現する細胞はグリホサートを分解することができることが確認され、結果として生じた細胞の生体触媒性アッセイは、 $300 \mu\text{mol分}^{-1}\text{mg湿潤細胞質量}^{-1}$ ($\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg wet cell mass}^{-1}$) のグリホサート分解活性を有し、粗酵素抽出物は、 $841 \mu\text{mol分}^{-1}\text{mg全タンパク質の活性を有した}$ (表2)。重要なのは、グリシンがGlox Aの分析のこの期での産物として検出されなかったことであり、大腸菌休止細胞に含有される他の酵素および粗酵素抽出調製物によって急速に代謝されていると推定される。

40

【表 2】

表 2: 部分的に精製された組換え G l o x A 酵素活性に対する金属イオンおよび補因子の効果。粗比活性は、部分的に精製された抽出物の全タンパク質濃度に基づいたものであり、単なる近似値である。

	触媒活性 ($\mu\text{mol 分}^{-1} \text{mg}^{-1}$ 湿潤細胞 質量)	
	グリホサートの除去	グリシンの生産
静止細胞の生体触媒活性	300	-
	比活性 ($\mu\text{mol 分}^{-1} \text{mg}^{-1}$ タンパク質)	
	グリホサートの除去	グリシンの生産
粗酵素抽出物	841	-
部分的に精製された酵素抽出物 (PPE)		
PPE + FAD + Mg^{2+}	1590	548
PPE - FAD + Mg^{2+}	1450	562
PPE + FAD - Mg^{2+}	838	413

【0211】

G l o x A は、約 52.5 kDa の分子量、5.78 の予測等電点および pH 7 で約 11.61 の電荷を有する、473 アミノ酸タンパク質（配列番号 1）である。そのコーディング配列を配列番号 2 として提供する。特に、開始コドンは、細菌遺伝子には一般的でない、バリン残基をコードする、GTG である。開始 Val の Met での置換は、その酵素のグリホサート分解活性を大きくは変えなかった（表 3）。

【表 3】

表 3: 構築物 pKWE1C12 (GTG-Val 開始コドン) によって発現された組換えタンパク質からの粗酵素活性と構築物 pETGloxA2-4 (ATG-Met 開始コドン) によって発現された組換えタンパク質からの粗酵素活性との比較

組換え構築物	基質活性の除去 ($\mu\text{mol 分}^{-1} \text{mg}^{-1}$)
pKWE1C12 (GTG-Val 開始コドン)	141
pETGloxA2-4 (ATG-Met 開始コドン)	124

【0212】

バイオインフォマティクス分析

G l o x A の推定アミノ酸配列（配列番号 1）は、ストレプトマイセスコエリコロール（*Streptomyces coelicolor*）A3（アクセッション番号 CAA20218）からの推定オキシドレダクターゼと 56% アミノ酸配列同一性（72% 類似性）を共有する。このアミノオキシダーゼフラボプロテインは、アミノ酸、ならびに第一アミンおよび第二アミン（特に、単量体サルコシンオキシダーゼと基質特異性を共有するもの）の酸化的脱アミノ化を触媒すると予測される（Mortl et al., 2004）。アミノオキシダーゼは、定義された代謝的役割を有さないが、低い反応速度効率で小さいアミンに対する広い基質特異性を示す

。

【0213】

実施例3-G1oxAの酵素的活性

材料および方法

酵素アッセイ

大腸菌細胞からの粗酵素抽出物を、次のとおり調製した。細胞を回収し、細胞ペレットを1 mL溶解バッファ(1 mg mL⁻¹ リゾチームを含む25 mM Tris-Cl pH 7.5)に再懸濁させ、氷上での音波処理によって溶解した(Branson音波発生器、60%デューティサイクル、30秒実行、30秒停止を10回反復)。可溶性画分を5分間の5000 gでの遠心分離によって回収し、Bioradタンパク質染料結合アッセイ(BIORAD)を用いてタンパク質含量を測定した。S-プロテインアガロース(Novagen)、Talon HIS-tag Purification System(BD Biosciences)を製造業者の説示に従って使用する可溶性CFEからのSタグ付またはHISタグ付のG1oxAタンパク質の精製によって、部分的に精製された抽出物を調製した。ローディングバッファ中の3 M MgCl₂または2.5 mM イミダゾールのいずれかを使用してカラムから部分的に純粋なG1oxAを溶出させた。25 mM Tris-Cl pH 7.5、1 mM FAD、0.1 mM MgCl₂中の500 μL粗酵素抽出物または250 μL部分的に精製された酵素抽出物(〜10 μg タンパク質溶解産物)を含有する酵素反応物を調製した。37℃で2分間のプレインキュベーションの後、1 mM グリホサートをその反応物に添加し、その後、それをさらに10〜60分間、振盪しながらインキュベートした。必要反応時間の後、上で説明したように、反応物を塩化トシルで誘導体化し、HPLCによって分析した。すべての酵素アッセイは、三重反復で行い、少なくとも2回繰り返してデータを確認した。見掛けの動態パラメータを決定するために、基質濃度を適する範囲にわたって変化させ、Kaleidagraph(Synergy Software)またはHyper 1.1(J. S. Easterby)を使用して指数方程式の合計にそれらのデータを当てはめた。

【0214】

結果

文献の中の大部分の以前の報告に相反して、本発明者らは、G1oxAによるグリホサートからのAMPAの生産を検出しなかった。グリシンは、粗抽出物と部分的に精製されたG1oxAタンパク質の両方のグリホサートとの反応から検出される最も豊富な生成物であった。このことおよびG1oxAの予測アミノ酸配列と他のオキシドレダクターゼフラボプロテインとの相同性から、本発明者らは、G1oxAは、グリホサートのホスホメチルC-3炭素と窒素の結合を開裂させてグリシンとオキシホスホン酸を生じさせるために酸化還元メカニズムを利用する可能性が高いと結論付けた。オキシホスホン酸は、反応上清中では検出されないが、水性条件下で急速に酸化されると予想される。

【0215】

グリシンは、細菌増殖培養物の固相NMR分析によって同定されたようなシュードモナス属種株PG2982(Pseudomonas sp. strain PG2982)(Kent-Moore et al., 1983; Jacob et al., 1985; Fizzgibbon and Braymer, 1990)およびシュードモナス属種株LBr(Pseudomonas sp. strain LBr)(Jacob et al., 1988)において見出されるグリホサートの開裂の副産物でもある。アルスロバクター属種株GLP-10(Arthrobacter sp. strain GLP-10)もグリホサートからグリシンを生じさせると報告されているが、これは、C-Pリアーゼ多酵素複合体によりグリホサートにおけるC-P結合を開裂させてサルコシンを生成し、その後、グリシンに変換されることに由来する(Kishore and Jacob, 1987)(図1参照)。このC-Pリアーゼ反応は、少なくとも4つの異なるタンパク質(これらはいずれもG1oxAとアミノ酸類似性を共有しない)が関与する複合膜結合タンパク質系によって触媒される(Metcalf and Wanner, 1993)。従って、無細胞様式でグリホサートをグリシンに開裂させるG1oxAの活性は、グリホサートの開裂についての新規メカニズムを意味する(図2)。

【0216】

最大G l o x A活性のための正確な反応条件は、これら2つの成分が不在の状態であるときのG l o x Aの相対比活性に基づいて、金属イオンおよびことによると、補因子としてのF A Dの使用を含むようである（表2）。

【0217】

部分的に精製された組換えG l o x A酵素の基質範囲を表4に提供する。特に、G l o x Aは、B a s t aTMにおいて見出される除草剤であるグリホシネートも開裂させることができる。

【表4】

表 4: 部分的に精製された組換えG l o x A酵素活性の基質範囲

基質	基質の除去	相対活性
	比活性 ($\mu\text{mol 分}^{-1}\text{mg}^{-1}$)	
グリホサート (RoundUp, 478g L ⁻¹ の酸を有する)	841	100
AMPA	602	71
イミノ二酢酸	5013	598
グリホシネートアンモニウム (Basta TM は 200g L ⁻¹ を有する)	71	8.5
サルコシン		
グリシン		
ホスフィノトリシン		

10

20

【0218】

表5は、これらの化合物を分解するいくつかの他の公知酵素と比較した、グリホサートおよびグリホシネートに対するG l o x Aの酵素活性の比較を提供するものである。利用した条件のもと、G l o x Aは、前記公知酵素と比較したとき、優れたグリホサート分解活性を有した。

【表5】

表 5: 除草剤基質を使用するG l o x Aの見掛けの動態パラメータと、植物において発現されたとき除草剤耐性をもたらすことが公知の他の酵素の見掛けの動態パラメータの比較

酵素	PAT/bar ¹	天然 GAT ²	最良の evGAT ^{§2}	天然 GOX ³	最良の evGOX ^{§3}	天然 GloxA	
除草剤	グリホサート	グリホサート	グリホサート	グリホサート	グリホサート	グリホサート	グリホシネート
K _{cat} (分 ⁻¹)	470	5-8	1480	40	614	10798	9536
K _M (mM)	0.023	1-1.7	0.05	25-28	2.6	0.056	1.2
K _{cat} /K _M	20400	4	29600	1.6	236	192821	7946

記号解説: § evGAT/GOX- 進化型 GAT(シャッフリング) /GOX (SDM)

¹- Blair-Kerth et al. (2001)

²- Siehl et al. (2005)

³- WO 92/00377.

40

【0219】

上記の表2は、M g²⁺およびF A Dの存在を試験した条件のものが最高の活性を生じさ

50

せたことを示している。さらに、二価金属イオンを試験し（表6）、金属イオンまたはFADが不在の状態で酵素活性が観察された。反応への Co^{2+} の追加は、試験した他の条件と比較したとき、最大活性を生じさせた。

【表6】

表 6: 部分的に精製されたG l o x A酵素活性に対する金属イオンの効果

グリホサート除去 $\mu\text{mol}/\text{分}/\text{mg}$		
A	標準 (Std) (Mg^{2+})	856
B	FAD なし	520
C	金属なし (+EDTA)	432
D	Zn^{2+}	624
E	Co^{2+}	1076

10

【0220】

実施例4—G l o x AとG O Xの比較

材料および方法

DNA: DNAハイブリダイゼーション

ゲノムDNA、プラスミドおよびコスミド構築物を適切な制限酵素で完全に消化し、Hybond N⁺ ナイロン膜 (Amersham、現GE Biosciences) に、その製造業者により説明されたとおりのアルカリ転写を用いて転写した。

20

【0221】

放射性標識プローブは、4 μL 5X Expand HiFidelity (商標) (Roche) バッファ; 12.5 pmol アンチセンスプライマー (CGOX1B; ATGGCTGAGAACCAACAAAGTAG) (配列番号4); 0.1 pmol センスプライマー (CGOX2B; TTAACCTTGCCGGACCCGTTTGCTTG) (配列番号5); dTTP、dCTP、aGTPのそれぞれについて200 μM ; 5 μM dATP; 0.33 μM α -³²P-dATP (Amersham) および2 UのExpand HiFidelity DNAポリメラーゼ (Roche) を含有する反応物中の30 ng テンプレートDNA (pLSGOX) を使用して、非対称PCR (asymmetric PCR) によって生成した。反応を94°Cで3分間サイクリングし、その後、30サイクルの(94°Cで45秒間、48°Cで45秒間、72°Cで30秒間)、最後に72°Cで5分間の伸長を行った。得られた放射性標識PCR産物を、QIA Quick DNA精製カラム (Qiagen) を使用して精製し、30 μL 滅菌水に溶出させた。65°Cで(Hybridオープンにおいて) 2時間インキュベートした6×SSC、5×Denhardt溶液、0.1%ピロリン酸ナトリウム (NaPPi)、0.5% SDSを含有する溶液中で膜をプレハイブリダイズし、その後、5 μL (約50 μCi) の放射性標識プローブをそのハイブリダイゼーションボトルに添加した。その後、そのハイブリダイゼーションを一晩(18時間)、65°C (ストリンジェントな条件) または42°C (低ストリンジェンシー条件) で反応を進行させた。Ausubelら (上記) によって記載されたように様々なストリンジェンシーの洗浄を行った。

30

40

【0222】

G O X発現

酵素間の直接比較の目的のために、米国特許第5,776,760号からの配列番号17に基づくG O X遺伝子をコードする合成構築物を作った。その合成構築物をpLSGOX (カナダのTopgeneによって製造された特注品) から発現ベクターpET29a (Novagen) のEcoRI部位にサブクローニングして、N-末端-Sタグを有する酵素を生じさせた。G O Xの可溶性タンパク質発現を様々な温度およびIPTG条件下で最適化し、Coomassie染色SDS-PAGE分析によってG O Xタンパク質発現を検出

50

し、G l o x Aについて上で説明したようにG O X酵素活性をアッセイし、上記の分析法に従って活性のH P L C分析を用いてグリホサートの除去およびA M P Aの生産について検出した。

【0223】

結果

上で説明したグリホサート分解構築物についての全遺伝子配列を得る前に、単離されたD N Aとg o x遺伝子の相同性をD N A : D N Aハイブリダイゼーションによって試験した。結果として得たサザンプロットは、標準条件下でも、ストリンジェントでない条件下でも、そのD N A構築物とg o x遺伝子との間の検出可能な特異的結合を示さなかった（図3）。

10

【0224】

グリホサートオキシドレダクターゼ（G O X）は、単一の酵素的工程でグリホサートを開裂させることができる、文献に報告されている唯一の他の酵素であり、主張によると、還元されたフラビンを再び酸化して、グリホサートのC 2 -炭素-窒素結合を破壊してA M P Aおよびグリオキシレートを生じさせることによりグリホサートからA M P Aを生じさせる（W O 92/00377；米国特許第5,776,760号）。G O X変異体v.247の比活性は、野生型G O Xの $15\text{ nmol分}^{-1}\text{mg}^{-1}$ より3~4倍高く、 $60\text{ nmol分}^{-1}\text{mg}^{-1}$ の近似的活性であると米国特許第5,776,760号に記載されている。G l o x Aについての本発明者らの最初の粗酵素活性データは、G l o x AがG O Xよりはるかに高い比活性を有することを示した（表3、 $841\text{ }\mu\text{mol分}^{-1}\text{mg}^{-1}$ ）。

20

【0225】

これを確認するには直接比較が必要であり、そのため、本発明者らは、本発明者らのG l o x A変異体と同じ方法で合成G O X構築物の粗抽出物を調製し、2つの酵素を並行してアッセイした。これらの条件下で、グリホサートに対するG l o x Aの比活性は、G O Xよりほぼ2倍高かった（図4）が、イミノ二酢酸に対してはG O Xと同様であった（0.9倍未満、図4）。W O 92/00377のデータと本発明者らのものと間の活性の差は、おそらく、幾つかの要因（本発明者らの場合では、酵素が部分的にしか精製されていないこと、ならびに使用した発現系および条件の差）に関する。

【0226】

両方の酵素がイミノ二酢酸に対して有意に高い活性を示し、両方がグリシンおよびグリオキシレートを生成した。これは、G O XについてのC 2 -炭素-窒素結合開裂の優先性、およびG l o x AについてのC 3 -炭素-窒素結合開裂優先性と矛盾しない。これは、両方の開裂反応が、イミノ二酢酸からグリオキシレートおよびグリシンを生成させるからである（図2参照）。

30

【0227】

実施例5-G l o x Aと他の相同タンパク質の比較

材料および方法

B L A S T I NおよびB L A S T P（Altschul et al., 1997）をそれぞれ使用して、G l o x Aヌクレオチドおよびアミノ酸配列を非重複性ヌクレオチドおよびタンパク質N C B Iデータベースと比較した。その後、選択した推定G l o x A様相同タンパク質を発現させ、グリホサート分解活性についてアッセイした。選択した推定相同体のヌクレオチドコーディング配列は、商業用に合成されており（Geneart, GmBH）、Champion pET200D/TOPO.Expression System（Invitrogen）を、製造業者の説示に従って使用して、クローニングして発現させた。AlphaImager 2200視覚化およびドキュメンテーションシステム（Alpha Innotech）を使用して、Coomassie染色S D S - P A G E分析およびスポットデンシトメトリーにより、組換えタンパク質発現を確認および定量した。

40

【0228】

$20\text{ mM Tris-Cl pH }7.2$ 中の $100\text{ }\mu\text{g}$ 完全無細胞タンパク質（ $\sim 10\text{ }\mu\text{g}$ 酵素抽出物）、 1 mM MgCl_2 、 1 mM グリシンを含有する 1 mL 量中の可溶性無細胞タンパク質抽出物（部分的に精製されたタンパク質）を用いて、グリホサー

50

ト分解を評価するために酵素的アッセイを行った。陰性対照は、発現ベクターを含有せず、また挿入物を伴わない pET200D/TOPO を含有する、大腸菌 BL21 Star からの無細胞抽出物を含むものであった。

【0229】

結果

Glox A は、以前には説明されていないが、アルスロバクターアウレセンス TC1 (*Arthrobacter aureescens* TC1) の完全ゲノムアノテーションから近ごろ予測された推定オキシドレダクターゼタンパク質に最も類似しており (86% アミノ酸同一性; NCBI アクセッション番号 CP000474.1)、およびまた、DadA ファミリーのアミノオキシダーゼタンパク質と推定保存タンパク質ドメインを共有する (CDD COG0665)。

【0230】

Glox A は、前記非重複性タンパク質データベース内の幾つかの他のタンパク質とタンパク質配列同一性を共有する。それらの相同体は、ブレヴィバクテリウム属系統 BL2 (*Brevibacterium linens* BL2) のゲノムのアノテーションから予測された推定グリシンオキシダーゼタンパク質 (NCBI アクセッション番号 ZP_00381186) を含み、それがグリホサートを開裂させてグリシンを生じさせることができることも本発明者らは立証した (表 7)。

【表 7】

表 7: Glox A と、Glox A と有意なアミノ酸同一性を有するタンパク質との比較

名称	源	NCBI アクセッション No./ 参照	Glox A とのアミ ノ酸配列同一性%	部分的に精製された 活性 [グリホサート分解] ($\mu\text{mol}/\text{分}/\text{mg}$)
Glox A	<i>Arthrobacter</i> sp. TBD	本研究 (配列番号 1)	100	841
Glox D	<i>Arthrobacter</i> <i>aureescens</i> TC1	ABM06986 (配列番号 9)	86	nd
GOBL	<i>Brevibacterium</i> 系統 BL2	ZP_00381186 (配列番号 8)	60	480
IdaA	EDTA 分解細菌 BNC1	Liu et al., 2001	28	0

【0231】

実施例 6 - アラビドプシス (*Arabidopsis*) における Glox A の発現

植物発現のために最適化された Glox A をコードする DNA (配列番号 6)。配列番号 6 に提供する配列は、5' 末端および 3' 末端に付加されたクローニング部位、ならびに開始コドンの直前に AAC A を含む。このコーディング配列は、配列番号 6 のヌクレオチド 16 から 1432 にわたる。Glox A をコードする DNA を、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) トランスファーベクター、p277 (オーストラリア、キャンベラの C

S I R O P l a n t I n d u s t r yから入手したもの)にクローニングした。このベクターは、p A R T 7からのN o t Iフラグメントをp A R T 2 7に挿入することによって構築された(Gleave,1992)。このp 2 7 7ベクターは、植物発現のためのC a M V 3 5 SプロモーターおよびO C Sターミネーター、抗生物質選択のためのマーカー、ならびに植物細胞形質転換に必要な配列を含有する。その構築物をP C Rによって合成し、p 2 7 7トランスファープラスミドに一方方向にクローニングした。

【0232】

アグロバクテリウム(Agrobacterium)株G V 3 1 0 1の形質転換は、三親交配(triparental mating)方法を用いて達成した。これは、非選択的L Bプレート上へのA. ツメファシエンス(A. tumefasciens)G V 3 1 0 1の培養物、ヘルパープラスミド(R K 2 0 1 3)を有する大腸菌の培養物、および所望の組換えp 2 7 7プラスミドを有する大腸菌の培養物の共線条接種(co-streaking)を含む。28℃での一晩のインキュベーションによって、混合培養物を得、それを回収し、L Bプレートに希釈線条接種し、p 2 2 7組換えプラスミドを有するA. ツメファシエンス(A. tumefasciens)G V 3 1 0 1についてを選択した。

【0233】

アラビドプシス(Arabidopsis)植物を、23℃、1日18時間の点灯時間で、標準的な方法によって培養した。アラビドプシス(Arabidopsis)植物の形質転換は、花の浸漬によって行った。植物を週齢3~5週まで成長させる(この場合、多くの花茎が発生の種々の段階において花を呈した)。形質転換A. ツメファシエンス(A. tumefasciens)G V 3 1 0 1の一晩培養物をベレットにし、湿潤剤S i l w e t - 7 7を含有する5%スクロースに再び懸濁させる。花を細菌懸濁液に浸漬し、ささっと動かす動作(sweeping motion)を用いることによって完全に湿潤させた。それらの植物をプラスチックフィルムでラップし、一晩、室温でベンチトップの上に放置し、その後、ラップを外し、21℃に維持された植物成長キャビネットに戻した。1~2週間後に浸漬を繰り返して、形質転換種子の数を増加させた。浸漬の3~4週間後に種子を回収し、それぞれの生態型(ecotype)に適する時間長、種子袋(seed envelope)の中で乾燥させ、その後、滅菌し、選択的抗生物質および抗真菌剤を含有するN o b l e 寒天プレートで発芽させた。

【0234】

陽性形質転換体をA r a s y s t e mポット(B e t a t e c h)に移植し、A r a c o nシステムのスリーブ内で成熟するまで成長させ、その種子を慎重に回収した。形質転換アラビドプシス(Arabidopsis)植物(T 1世代)をP C Rおよび逆転写P C R(R T - P C R)によってスクリーニングして、組換え遺伝子の存在および発現を確認した。Extract-N-Amp Plant PCRおよびExtract-N-Amp Reagent kits(Sigma)を使用して、前記構築物で形質転換させた植物の葉からゲノムDNAを抽出した。G l o x Aをコードする配列に特異的なプライマーを使用して、それらの抽出物に関するP C Rを行った。R T - P C Rについては、前記構築物で形質転換させた約8の植物を分析のためにランダムに選択した。これらの植物からの葉を瞬間冷凍し、乳鉢と乳棒を使用して液体窒素中で粉碎する。RNeasy Plant kit(Qiagen)を使用して、R N Aを単離する。iScript cDNA Synthesis kit(Bio-Rad)を使用してそのR N Aからc D N Aを調製する。1 μ Lのc D N A、組換え体T a qポリメラーゼ(I n v i t r o g e n)、54℃のアニーリング温度、およびG l o x A特異的プライマーを使用して、P C Rを行った。それぞれの25 μ L P C R反応物の3 μ Lを、1.2%アガロースゲルで可視化する。アラビドプシス(Arabidopsis)ハウスキーピング遺伝子a r a P T B(T A I Rアクセッション番号A T 3 G 0 1 1 5 0)を参照遺伝子として用い、A p p l i e d B i o s y s t e m s 7 0 0 0 R e a l - T i m e P C Rシステムを使用して、定量的P C Rを行った。選択したカナマイシン耐性T 2およびT 3植物は、前記参照遺伝子より30から100倍大きい範囲にわたるレベルでG l o x A m R N Aを発現した(表8)。

【表 8】

表 8: アラビドプシス(Arabidopsis)植物におけるG l o x A発現の定量的R T - P C R分析

サンプルの名称	dCt (GloxArt -araPTB)	2 ^{dCt} (倍差)
L-er (野生型 <i>Arabidopsis</i>)	-5.03 ± 0.144	P T Bより32.7倍少ない
GloxA T2 #3	5.86 ± 0.142	P T Bより58.1倍多い
GloxA T2 #4	5.50 ± 0.175	P T Bより45.3倍多い
GloxA T2 #5	5.64 ± 0.082	P T Bより49.9倍多い
GloxA T2 #6	6.29 ± 0.145	P T Bより78.2倍多い
GloxA T2 #7	6.81 ± 0.124	P T Bより112.2倍多い
GloxA T2 #8	5.94 ± 0.184	P T Bより61.4倍多い
GloxA T3 #2e	1.77 ± 0.136	P T Bより3.4倍多い

*記号解説: Ct - 閾値サイクル; dCT - 閾値サイクルの差 (ターゲット Glox A - 参照 araPTB)

【0235】

2世代を経た種子のためにT1実生を移植および栽培して、最終的にホモ接合型T3種子を単離することができる。その後、シロイヌナズナ変異体(A. thaliana var.)、C o l u m b i aではなく、L a n d s b e r gを用い、および2.5~25kg a. i. h a⁻¹の範囲の処理用量を用いたが、本質的にはJ a n d e r ら(2003)によって記載された方法を用いて、T2およびT3植物をグリホサートに対する耐性増大についてスクリーニングした。図5に与えるスコアは、予想I₁₀₀用量の5倍の用量(12.5kg a. i. h a⁻¹)についてのものである。

【0236】

全植物タンパク質の抽出(例えば、Pierce P-PER Plant Protein Extraction Kitを使用する)、ならびにウエスタンブロット抗体検出システムと酵素抽出アッセイの両方を使用する植物細胞内のG l o x Aタンパク質発現の評価によって、期T1~T3からのトランスジェニック植物の葉も分析することができる。ウエスタンブロット分析については、まず、植物タンパク質抽出物を20mM T r i s - C l p H 7.2で10倍に希釈し、その後、Biorad Protein Dye (Biorad)によって定量した。等量の植物タンパク質を10% S D S - ポリアクリルアミドゲルのそれぞれのウェルにローディングし、電気泳動によって分離した。その後、M i n i - B l o t 装置(例えば、B i o r a d)を製造業者の説示に従って使用して、それらのタンパク質をニトロセルロース膜にブロットした。その後、精製組換えG l o x Aタンパク質に対して調製した一次抗体(例えば、オーストラリア、アデレードのInstitute of Veterinary and Medical Scienceによって調製された、精製ポリクローナルウサギI g G)を使用して、Western Breeze Chemiluminescent Detection Kit (Invitrogen)の説示に従って、免疫検出を進めることができる。G l o x Aを発現するトランスジェニックアラビドプシス(Arabidopsis)の葉の細胞において(図5)、0.8ng/(ug 全タンパク質)以下のレベルで、G l o x Aタンパク質が検出された。

【0237】

100μgの全タンパク質(ウエスタンブロットデータから80ng G l o x Aと推定された)を25mM T r i s - C l p H 7.2、0.1mM M g C l 2と合わせることで、トランスジェニック植物タンパク質抽出物のG l o x A活性についてもアッセイした。37℃で2分間のプレインキュベーションの後、1mM グリホサートをそ

の反応物に添加し、その後、それを振盪させながらさらに60～120分間、インキュベートした。必要な反応時間の後、上で説明したように、反応物を塩化トシルで誘導体化し、HPLCによって分析した。すべての酵素アッセイは、三重反復で行い、少なくとも2回繰り返してデータを確認した。GloxA mRNA (qPCRデータに基づく) およびタンパク質 (ウェスタンブロットデータに基づく) を発現するT2植物の葉から、有意な活性を検出することができた。

【表9】

表 9: GloxAを発現するアラビドプシス (Arabidopsis) 植物細胞におけるGloxA

サンプル	GloxA 活性 ($\mu\text{mol}/\text{分}/\text{mg}$)
L-er (野生型 <i>Arabidopsis</i>)	0
<i>A. thaliana</i> GloxA T2#3 タンパク質抽出物	77.8
<i>A. thaliana</i> GloxA T2#4 タンパク質抽出物	79.1
<i>A. thaliana</i> GloxA T2#5 タンパク質抽出物	78.5
精製 GloxA-E2 でスパイクされた L-er	413.8
精製 GloxA-E2 (陽性対照)	497.5

【0238】

実施例7—GloxAを発現するトランスジェニックトウモロコシの生産

配列番号1をコードするcDNAを、そのcDNAフラグメントの5'に位置するトウモロコシユビキチンプロモーター (欧州特許第342 926号) およびそのcDNAフラグメントの3'に位置する10kDゼイン3'末端に対してセンス配向で含むキメラ遺伝子を構築することができる。この遺伝子のcDNAフラグメントは、適切なオリゴヌクレオチドプライマーを使用するそのcDNAクローンのポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により作製することができる。消化されたベクターpML103 (ATCCアクセッション番号97366) に挿入したとき、DNAフラグメントの正しい配向が得られるように、そのcDNAの増幅に使用するオリゴヌクレオチドにクローニング部位 (それぞれ、PciIおよびSmaI) を組み込むことができる。その後、標準的なPCR反応で増幅を行う。その後、その増幅されたDNAを適切な制限酵素PciIおよびSmaIで消化し、アガロースゲルで分画する。そのゲルから適切なバンドを単離し、プラスミドpML103と合わせることができる。pML103からのDNAセグメントは、標準的な技術を用いてトウモロコシユビキチンプロモーターと置換される、トウモロコシ27kDゼイン遺伝子の1.05kb SalI-NcoIプロモーターフラグメント、およびベクターpGem9Zf (+) (Promega) 中のトウモロコシ10kDゼイン遺伝子の3'末端からの0.96kb SmaI-SalIフラグメントを含有する。標準的な手順を用いて、ベクターおよび挿入DNAを15℃で一晩、ライゲートすることができる。その後、そのライゲートされたDNAを使用して、大腸菌XL1-Blue (Stratagene) を形質転換させることができる。プラスミドDNAの制限酵素消化、およびジデオキシシチエンターミネーション法を用いる限定ヌクレオチド配列分析によって、細菌形質転換体をスクリーニングすることができる。得られたプラスミド構築体は、トウモロコシユビキチンゼインプロモーターを5'から3'への方向でコードするキメラ遺伝子、GloxAをコードするcDNA、および10kDゼイン3'領域を含む。

【0239】

その後、上で説明したキメラ遺伝子を、以下の手順によってコーン細胞に導入することができる。コーン近交系H99およびLH132の交配に由来する発育中の穀果から未成熟コーン胚を切り離すことができる。それらの胚は、1.0から1.5mmの長さになる

と、受粉から10から11日後に単離する。その後、それらの胚を、軸側が下に向き、アガロース凝固N6培地 (Chu et al., 1975) に接触した状態にする。それらの胚を27℃の暗所で保持する。胚柄構造上に担持された体細胞性前胚様体 (proembryoid) および胚様体を有する細胞の未分化の塊から成るもろい胚形成カルスが、これらの未成熟胚の胚盤から増殖する。一次外植体から単離した胚形成カルスをN6培地で培養し、2～3週ごとにこの培地で二次培養することができる。

【0240】

カルス培養細胞に遺伝子に移入するためにパーティクルボンバードメント法 (Klein et al., 1987) を使用することができる。この方法によると、以下の技術を用いて金粒子 (直径1 μm) をDNAでコーティングする。10 μgのプラスミドDNAを、50 μLの金粒子懸濁液 (1 mLあたり60 mg) に添加する。塩化カルシウム (50 μLの2.5 M溶液) およびスベルミジン不含塩基 (20 μLの1.0 M溶液) をそれらの粒子に添加する。これらの溶液の添加の間、その懸濁液をボルテックス攪拌する。10分後、それらのチューブを短時間、遠心分離 (15,000 rpmで5秒間) し、上清を除去する。それらの粒子を200 μLの無水エタノールに再び懸濁させ、再び遠心分離し、上清を除去する。エタノールリンスを再び行い、それらの粒子を最終体積30 μLのエタノールに再び懸濁させる。DNAがコーティングされた金粒子のアリコート (5 μL) をKaptonTM フライニングディスク (flying disc) (Bio-Rad Labs) の中央に置くことができる。その後、1000 psiのヘリウム圧、0.5 cmのギャップ距離および1.0 cmの飛行距離を用い、BiolistTM PDS-1000/He (カリフォルニア州、ハーキュリーズのBio-Rad Instruments) を用いて、コーン組織の方へそれらの粒子を加速する。

【0241】

ボンバードメントのために、胚形成組織をアガロース凝固N6培地上の濾紙の上に置く。組織を薄い芝生のように配置し、直径約5 cmの円形領域を覆う。その組織が入っているペトリ皿を、PDS-1000/Heのチャンバ内の停止スクリーンから約8 cmに配置することができる。その後、そのチャンバ内の空気をHg 28インチの真空まで排気する。衝撃波管内のHe圧が1000 psiに達すると、破裂する破断膜を使用して、マクロキャリアをヘリウム衝撃波で加速する。

【0242】

ボンバードメントの7日後、グリホサートを含むN6培地に組織を移すことができる (1リットル当たり2 mg)。さらに2週間後、グリホサートを含む新たなN6培地に組織を移すことができる。6週間後、グリホサートを補足した培地が入っているプレートの幾つかで、活発に成長しているカルスの直径約1 cmの領域を識別することができる。これらのカルスは、選択培地上で二次培養すると、成長し続けることができる。

【0243】

まず、N6培地に組織のクラスタを移すことにより、植物をトランスジェニックカルスから再生させることができる。2週間後、組織を再生用培地 (Fromm et al., 1990) に移すことができる。

【0244】

実施例8-G10xAを発現するトランスジェニック大豆の生産

カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター (Odell et al., 1985) と豆インゲンマメ (Phaseolus vulgaris) からの種子貯蔵タンパク質ファセオリンのβサブユニットをコードする遺伝子からの転写ターミネーターで構成される発現カセットを、形質転換大豆におけるインスタント酵素 (instant enzyme) の発現のために使用することができる。

【0245】

本発明の酵素をコードするcDNAフラグメントは、適切なオリゴヌクレオチドプライマーを使用してポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によって生成することができる。発現ベクターに挿入したとき、そのDNAフラグメントの正しい配向が得られるように、そのオリゴヌクレオチドにクローニング部位を組み込むことができる。その後、上で説明したよ

うに増幅を行い、単離されたフラグメントを、前記発現カセットを有する p U C 1 8 ベクターに挿入する。

【0246】

その後、大豆胚を前記発現ベクターで形質転換させることができる。体性胚を誘発するために、大豆栽培品種 A 2 8 7 2 の表面滅菌した未成熟種子から切除した長さが 3 ~ 5 mm の子葉を、明所または暗所で、適切な寒天培地上、26℃で6~10週間、培養することができる。その後、二次胚を生産する体性胚を摘出し、適する液体培地に配置する。初期球形期の胚として増殖させた体性胚のクラスタを繰り返し選択した後、懸濁液を下で説明するように維持した。

【0247】

大豆胚形成用懸濁培養物は、16:8時間の昼/夜スケジュールで蛍光灯を用い、26℃で、ロータリーシェーカー、150rpmを用いて、35mLの液体培地中で維持することができる。35mLの液体培地に約35mgの組織を植え付けることによって、2週間ごとに培養物を二次培養する。

【0248】

その後、大豆胚形成懸濁培養物をパーティクルガンボンバードメント法（米国特許第4,945,050号）によって形質転換させることができる。これらの形質転換には、DuPont Biolistic™ PDS 1000/HE装置（ヘリウムレトロフィット）を使用することができる。

【0249】

大豆形質転換を助長するために使用することができる選択可能マーカー遺伝子は、カリフラワーモザイクウイルスからの35Sプロモーターと、プラスミド p J R 2 2 5（大腸菌からのもの）からのヒグロマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子と、アグロバクテリウムツメファシエンス（*Agrobacterium tumefaciens*）のTiプラスミドのT-DNAからのノパリンシンターゼ遺伝子の3'領域から構成されるキメラ遺伝子である。その発現カセットを制限フラグメントとして単離することができる。その後、このフラグメントを、マーカー遺伝子を有するベクターの固有限制部位に挿入することができる。

【0250】

60mg/mL 1μm 金粒子懸濁液の50μLに、5μL DNA（1μg/μL）、20μL スペルミジン（0.1M）および50μL CaCl₂（2.5M）をこの順序で添加する。その後、その粒子調製物を3分間攪拌し、小型遠心機で10秒間回転させ、上清を除去する。その後、DNAがコーティングされたそれらの粒子を400μL 70% エタノール中で1回洗浄し、40μLの無水エタノールに再び懸濁させる。そのDNA/粒子懸濁液を3回、それぞれ1秒間、音波処理することができる。その後、DNAがコーティングされた5μLの金粒子を、それぞれのマクロキャリアディスクにローディングする。

【0251】

約300~400mgの週齢2週の懸濁培養物を空の60×15mmペトリ皿に入れ、その組織から残留液をピペットで除去する。それぞれの形質転換実験について、通常、約5~10枚の組織プレートをボンバードメントに付す。膜破断圧を1100psiに設定し、そのチャンバを排気して28インチ水銀の真空にする。保持スクリーンから約3.5インチ離して組織を配置し、3回、ボンバードメントに付す。ボンバードメントの後、組織を半分に分割し、液体に戻し、上で説明したように培養することができる。

【0252】

ボンバードメントの5から7日後、液体培地を新たな培地と交換し、そしてボンバードメントの11から12日後、50mg/mL ヒグロマイシンを含有する新たな培地と交換することができる。この選択培地は、毎週、新しくしてもよい。ボンバードメントの7から8週間後、形質転換されていない壊死性胚形成クラスタから増殖する、緑色の形質転換組織を観察することができる。孤立緑色組織を移し、個々のフラスコに植え付け、新規のクローン増殖した形質転換胚形成懸濁培養物を生じさせる。それぞれの新規系統を独立

10

20

30

40

50

した形質転換事象として処理することができる。その後、これらの懸濁物を二次培養し、未成熟胚のクラスタとして維持してもよいし、または個々の体性胚の突然変異および発芽によって植物全体へと再生させてもよい。

【0253】

植物を、グリホサートに曝露された場合に成長する能力について試験する。

【0254】

実施例9-G1oxAを発現するトランスジェニック綿の生産

綿におけるG1oxAの生産のために、本発明のタンパク質のコーディング配列をサブタレニアンクローバー矮化ウイルス(subterranean clover stunt virus)プロモーター(S7; WO 96/06932)に作動可能に連結させることができる。前記キメラ遺伝子を選択可能マーカー遺伝子に作動可能に連結させ、T-DNAベクターに導入する。アグロバクテリウム(Agrobacterium)媒介形質転換技術を用いて、綿植物を形質転換させる。グリホサートに候補の形質転換体を曝露することによって、トランスジェニック綿系統を特定する。

10

【0255】

実施例10-G1oxAを発現するトランスジェニック小麦の生産

小麦においてG1oxAを生産するために、サブタレニアンクローバー矮化ウイルスプロモーターが小麦細胞において遺伝子転写を駆動できるように、配列番号6として提供するようなヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドをpPlexベクター(Schunmann et al., 2003)にサブクローニングする。

20

【0256】

栽培品種Bobwhite 26からの小麦胚の形質転換は、Pellegri nesc h iら(2002)の方法に従って行う。生産された植物が前記構築体含有することを確認するために、Fast DNA(登録商標)キット(米国、カリフォルニア州、ヴィスタのBIO 101 Inc.)を供給業者の説示に従って使用して、葉から抽出したゲノムDNAに対してPCR分析を行う。DNAを100 μL滅菌脱イオン水に溶出し、1 μLをPCRで使用する。

【0257】

植物を、グリホサートに曝露された場合の成長する能力について試験する。

【0258】

実施例11-G1oxAを発現するトランスジェニックカノーラの生産

セイヨウアブラナ(Brassica napus)の実生を5 cmポットに定着させる。それらを成長チャンバにおいて24℃、16/8時間の光周期で成長させる。2.5週間後、それらを15 cmポットに移植し、成長チャンバにおいて15/10℃の昼/夜温度、16/8時間の光周期で成長させる。

30

【0259】

臺立ちの直前の、または臺立ちの過程だが開花前の植物から4つの末端節間を除去し、70% v/v エタノール中で1分間、2% w/v 次亜塩素酸ナトリウム中で20分間、表面を滅菌し、滅菌脱イオン水で3回リンスする。葉が付いている幹を、滅菌前に72時間以下の間、湿ったプラスチックバッグの中に入れて冷凍してもよい。6から7つの幹切片を、基部末端の向きを維持しながら5 mmディスクに切断する。

40

【0260】

配列番号6を発現するアグロバクテリウム(Agrobacterium)を、50 mg/Lカナマイシン、24 mg/Lクロラムフェニコールおよび100 mg/Lスペクチノマイシンを含有する2 mLのLuria Broth中、24℃で、回転器を用いて一晚増殖させる。1:10希釈を行って、1 mL当たり約 9×10^8 の細胞にする。これを660 μmでの光学密度読み取りで確認する。幹ディスク(外植体)に1.0 mLのアグロバクテリウム(Agrobacterium)を接種し、過剰分をそれらの外植体から吸引する。

【0261】

1/10×標準MS塩、B5ビタミン類、3%スクロース、0.8%寒天、pH 5.7

50

、1.0 mg/L 6-ベンジルアデニン (BA) が入っているペトリプレートに、それらの外植体を基部側を下にして配置する。MS塩、B5ビタミン類、3%スクロース、pH 5.7、4.0 mg/L p-クロロフェノキシ酢酸、0.005 mg/L カイネチンを含む1.5 mLの培地をそれらのプレートの上に積層し、滅菌濾紙で覆う。

【0262】

2～3日の共培養の後、選択のため、MS塩、B5ビタミン類、3%スクロース、8%寒天、pH 5.7、1 mg/L BA、500 mg/L カルベニシリン、50 mg/L セフトキシム、200 mg/L カナマイシンまたは175 mg/L ゲンタマイシンが入っている深皿ペトリプレートにそれらの外植体を移した。それぞれのプレートに7つの外植体を配置する。3週間後、それらを新たな培地に、1プレート当たり5つの外植体で移す。外植体を成長室において25℃、連続照明 (Cool White) で培養する。

10

【0263】

植物を、グリホサートに曝露された場合の成長する能力について試験する。

【0264】

実施例12-G1oxAを発現するトランスジェニック大麦の生産

大麦においてG1oxAを生産するために、サブタレニアンクローバー矮化ウイルスプロモーターが大麦細胞において遺伝子転写を駆動できるように、配列番号6として提供するようなヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドをpPlexベクター (Schunmann et al., 2003) にサブクローニングする。

【0265】

大麦胚の形質転換は、一般にはPellegrineschiら (2002) によって記載されたような方法に従って行う。生産された植物が前記構築体を含むことを確認するために、FastDNA (登録商標) キット (米国、カリフォルニア州、ヴィスタのBIO 101 Inc.) を供給業者の説示に従って使用して、葉から抽出したゲノムDNAに対してPCR分析を行う。DNAを100 μL 滅菌脱イオン水に溶出し、1 μLをPCRで使用する。

20

【0266】

植物を、グリホサートに曝露された場合の成長する能力について試験する。

【0267】

広範囲にわたって記載された本発明の趣旨または範囲を逸脱することなく、非常に多数の変型および／または修飾が、具体的な実施形態において示される本発明に対してなされ得ることは、当業者には明らかである。従って、本発明の実施形態は、すべての点で、例証となるものとみなすべきであり、限定するものとみなすべきでない。

30

【0268】

本明細書において論じたおよび／または参照したすべての出版物は、それら全体が本明細書において援用される。

【0269】

本出願は、US 60/747, 151号 (この全内容は、本明細書において参考として援用される) の優先権を主張するものである。

【0270】

本明細書に含まれている文献、行為、材料、デバイス、物品またはこれらに類するものについてのいずれの論述も、単に、本発明の背景を提供する目的のためのものである。これを、これらの事 of のいずれかまたはすべてが、先行技術の基礎部分を形成し、ならびに本出願のそれぞれの請求項の優先日より前に存在したために本発明に関連した分野における共通の一般知識であったということの是認と解釈すべきでない。

40

【表 10】

参考文献

- Abdullah et al. (1986) *Biotechnology* 4:1087.
- Altschul et al. (1997) *Nucl. Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Balthazor and Hallas (1986) *Appl. Environ Microbiol.* 51:432-434.
- Blair-Kerth et al. (2001) *Weed Sci.* 49:375-380.
- Capecchi (1980) *Cell* 22:479-488. 10
- Castle et al. (2004) *Science* 304:1151-1154.
- Cheng et al. (1996) *Plant Cell Rep.* 15:653-657.
- Chu et al. (1975) *Sci. Sin. Peking* 18:659-668.
- Clapp (1993) *Clin. Perinatol.* 20:155-168.
- Cole et al. (2005) *Nucleic Acids Res* 33(Database Issue):D294-D296.
- Curiel et al. (1992) *Hum. Gen. Ther.* 3:147-154.
- Eglitis et al. (1988) *Biotechniques* 6:608-614.
- Fitzgibbon and Braymer (1990) *Appl. Environ. Microbiol.* 56:3382-3388. 20
- Fromm et al. (1990) *Bio/Technology* 8:833-883.
- Futamata et al. (2005) *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 904-911.
- Fujimura et al. (1985) *Plant Tissue Culture Letters* 2:74.
- Gleave (1992) *Plant Mol. Biol.* 20:1203-1207.
- Gordon et al. (1999). *Chemical-Biological Interactions* 14:463-470.
- Graham et al. (1973) *Virology* 54:536-539.
- Grant et al. (1995) *Plant Cell Rep.* 15:254-258.
- Harayama (1998). *Trends Biotechnol* 16:76-82. 30
- Hayes et al. (2000) *FEMS Microbiol. Lett.* 186:171-175.
- Jacob et al. (1985) *J. Biol. Chem.* 10: 5899-5905.
- Jacob et al. (1988) *Appl. Environ. Microbiol.* 54:2953-2958.
- Jander et al. (2003) *Plant Physiology* 131:139-146.
- Kent-Moore et al. (1983) *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 316-320.
- Kishore and Jacob (1987) *J. Biol. Chem.* 262:12164-12168.
- Klein et al. (1987) *Nature* 327:70-73.
- Kozziel et al. (1996) *Plant Mol. Biol.* 32:393-405. 40
- Kryskol-Lupikca et al. (1997) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48:549-552.
- LeJuene et al. (1998). *Nature* 395:27-28.
- Liu et al. (1991) *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1799-1804.
- Lu et al. (1993) *J. Exp. Med.* 178:2089-2096.
- Liu et al. (2001) *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (2):696-701.

【表 1 1】

- Malik et al. (1989) *Biofactors* 2:17-25.
- McGinnis and Madden (2004) *Nucl. Acids Res.* 32:W20-25.
- McGrath et al. (1995) *Eur. J. Biochem.* 234:225-230.
- McGrath et al. (1998) *Appl. Environ. Microbiol.* 64:356-358.
- Metcalf and Wanner (1993) *J. Bacteriol.* 175: 3430-3442.
- Mortl et al. (2004) *J. Biol. Chem.* 279: 29718-29727.
- Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443-453.
- Objoska et al. (1999) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51:872-876.
- Odell et al. (1985) *Nature* 313:810-812.
- Padgett et al. (1996) New Weed Control Opportunities: Development of Roundup Ready™ Gene. In Duke, S.O., ed., *Herbicide-resistant crops, agricultural, environmental, economic, regulatory, and technical aspects*. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, USA. pp. 53-84.
- Pellegrineschi et al. (2002) *Genome* 45:421-430.
- Petrikovics et al. (2000a). *Toxicology Science* 57: 16-21.
- Petrikovics et al. (2000b). *Drug Delivery* 7: 83-89.
- Pipke et al. (1988) *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1293-1296.
- Schunmann et al. (2003) *Functional Plant Biology* 30:453-460.
- Shinabarger and Braymer (1986) *J. Bacteriol.* 168:702-707.
- Siehl et al. (2005) *Pest. Manag. Sci.* 61: 235-240.
- Ternan et al. (1998a) *World J. Microbiol. Biotechnol.* 14: 635-647.
- Ternan et al. (1998b) *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2291-2294.
- Tomita et al. (1991) *J. Chromatogr* 566:239-243.
- Toriyama et al. (1986) *Theor. Appl. Genet.* 205:34.
- Vasil (1996) Phosphinothricin-resistant crops. In Duke, S.O., ed., *Herbicide-resistant crops, agricultural, environmental, economic, regulatory, and technical aspects*. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, USA. pp. 85-93.
- Wackett et al. (1987) *J. Bacteriol.* 169: 710-717.
- Wanner (1994) Phosphate regulated genes for the utilization o phosphonates in the members of the family Enterobacteriaceae. In: *Phosphate in Microorganisms*. Eds. Torrigiani-Gorini, A., Yagil, E. and Silver, S. pp. 13-21. ASM press. Washington D.C.
- Wagner et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6099-6103.
- White and Metcalf (2004) *J. Bacteriol.* 186: 4730-4739.
- Yakoleva et al. (1998) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49: 573-578.

10

20

30

40

【図 1】

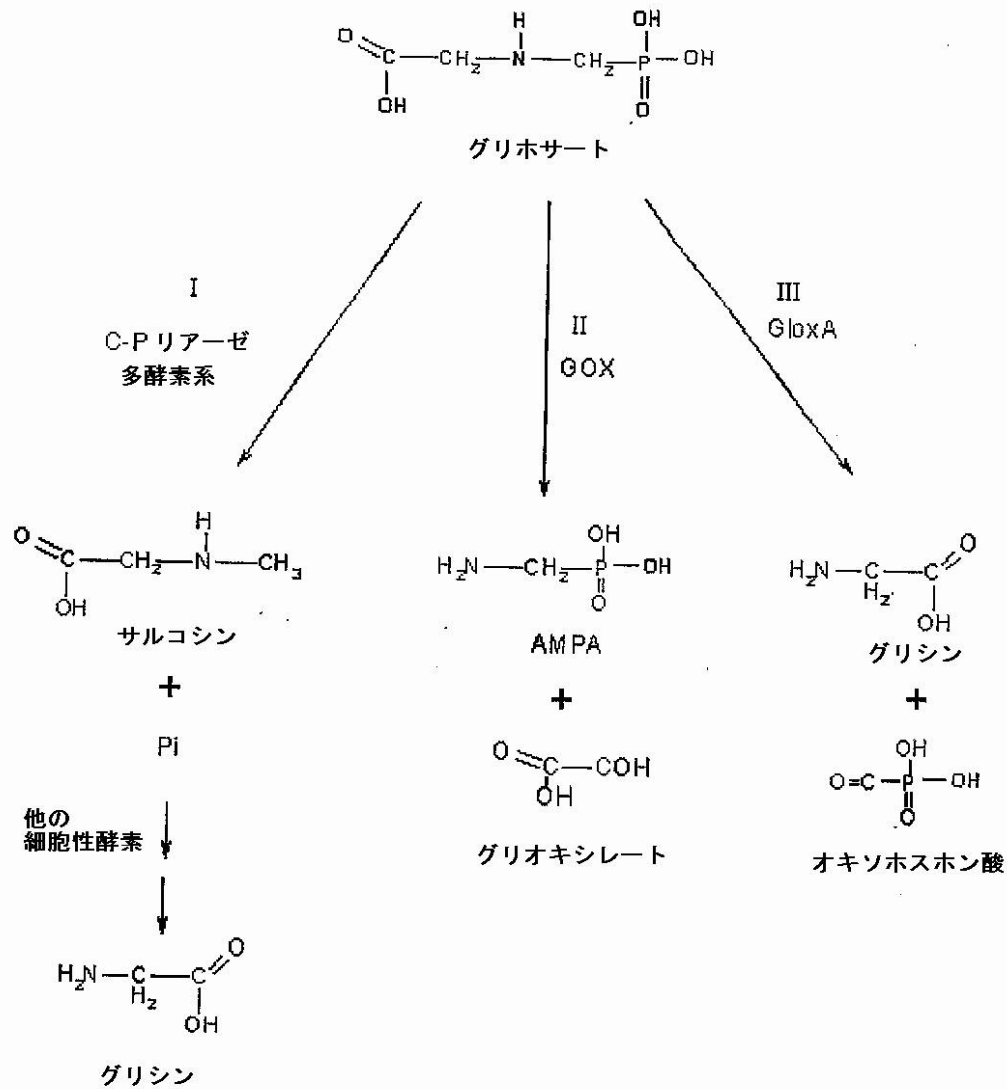
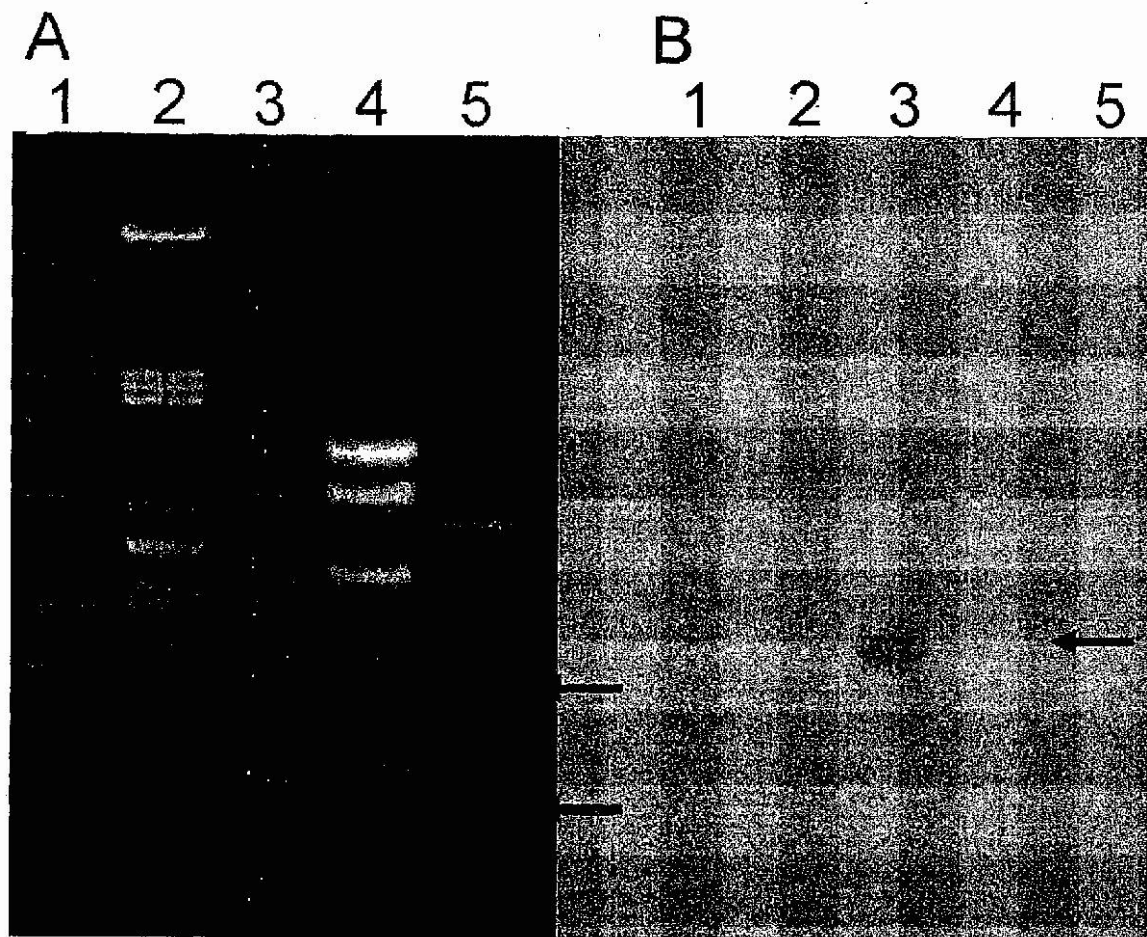


Figure 1

【図 3】



レーン: 1- 1kb Plus 分子量マーカー (Invitrogen),
2- lambda/PstI 分子量マーカー ,
3- pLSGOX/*Xho* I + *Hind*III,
4- pKWE1C12/*Bam* HI,
5- pTGloxA4/*Pae* I.

Figure 3

【 図 4 】

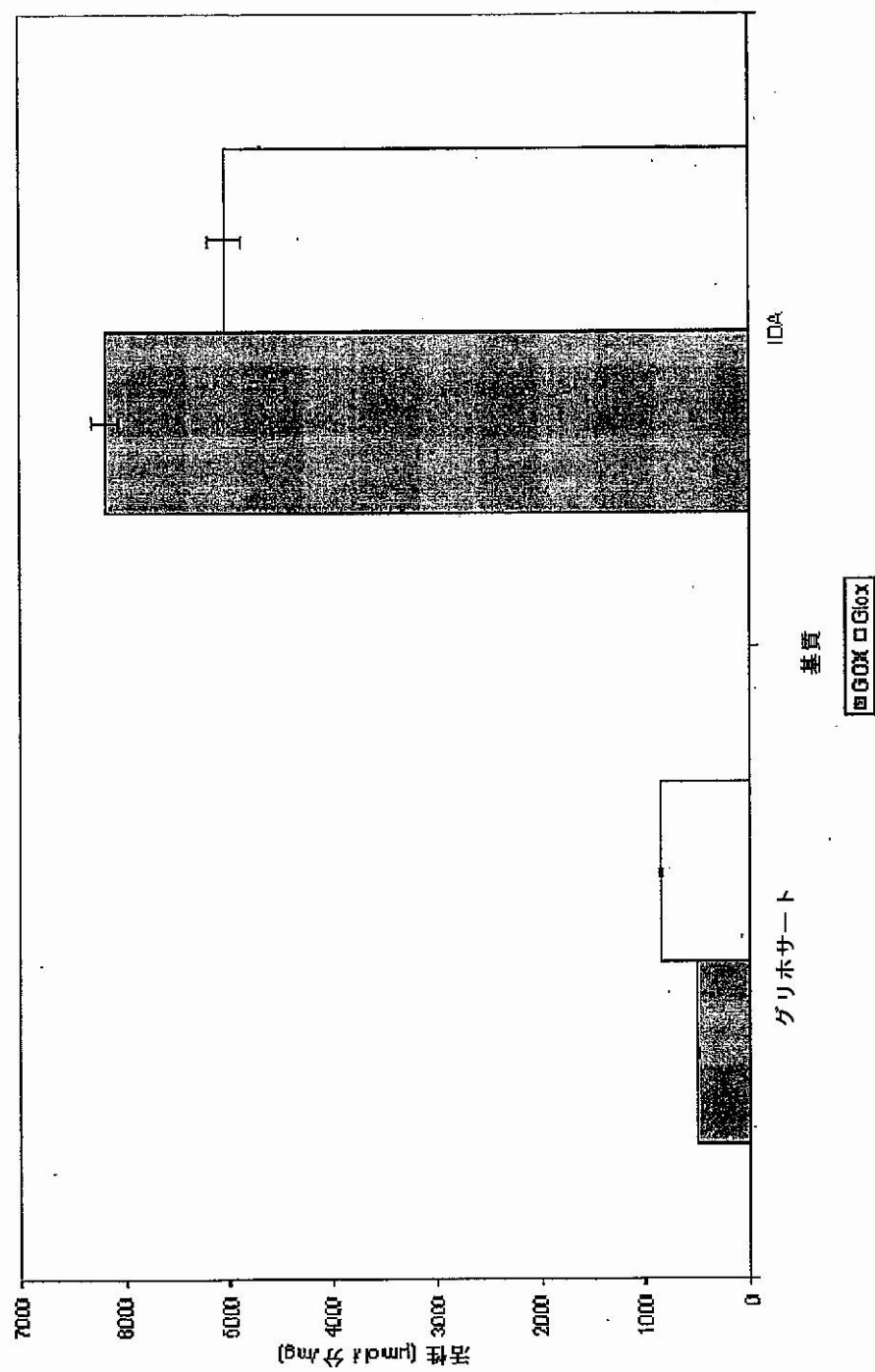


Figure 4

【図 5】

サンプル	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	精製					<i>A. thaliana</i> (Landsberg) GloxA T2 植物				
	GloxA					(μg 葉タンパク質抽出物)				
	(100ng)									
		T2#1	T2#2	T2#3	T2#4	T2#5	ブランク	3	2	1
								(プラス		
								200ng		
								GloxA)		
酵素活性	24870	77.6	0	79.6	0	0	ブランク	14780	0	0
($\mu\text{mol/分/mg}$)										
耐性スコア	#:	na	6	-	6	-	ブランク	na	1	1
(発芽後噴霧剤										
として1.5 kgaiha-1										
で適用された										
グリホサートに										
対して)										
ウエスタンブロット										
免疫検出										

Figure 5

【配列表】

2009536819000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/AU2007/000640

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int. Cl.		
C07K 14/305 (2006.01) C12N 15/31 (2006.01) C07K 16/12 (2006.01) C12N 15/53 (2006.01)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Databases: Chemical Abstracts Registry; GenomeQuest protein databases Sequences: SEQ ID NO: 1 Databases: Medline, Chemical Abstracts, WPIDS, Biosis Keywords: arthrobacter, glyphosate, glycine, oxophosphonic, enzyme		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Pipke R. and Amrhein N. (1988) "Isolation and Characterization of a Mutant of Arthrobacter sp. Strain GLP-1 Which Utilizes the Herbicide Glyphosate as Its Sole Source of Phosphorus and Nitrogen" Applied and Environmental Microbiology 54 (11): 2868-2870 See title, abstract and page 2869 column 2	58, 59, 68
A	GenPept accession number ZP_00381186, submitted 8 April 2005 See whole document	1-69
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C ☒ See patent family annex		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 01 June 2007		Date of mailing of the international search report 27 JUN 2007
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaustalia.gov.au Facsimile No. (02) 6285 3929		Authorized officer ANDREW BRYCE AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No : (02) 6283 3132

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/AU2007/000640

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	RefSeq accession number ZP_01129267, public disclosure date 23 February 2006 See whole document	1-69
A	EP 1 262 562 A2 (THE KITASATO INSTITUTE), 4 December 2002 See SEQ ID NO: 10124 (CA Registry Number 587162-83-2) and SEQ ID NO: 11493 (CA Registry Number 587948-69-4)	1-69
A	Pipke R. and Amrhein N. (1988) "Degradation of the Phosphonate Herbicide Glyphosate by <i>Arthrobacter atrocyaneus</i> ATCC 13752" <i>Applied and Environmental Microbiology</i> 54 (5): 1293-1296 See whole document	1-69
P, A	GenPept accession number ABM06986, submitted 11 October 2006 See whole document	1-69
P, A	GenPept accession number ABL84123, submitted 14 December 2006 See whole document	1-69

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/AU2007/000640

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

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

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

2. ☒ Claims Nos.: 1-10 and 13-69 (all in part)
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
The claims are defined by the result to be achieved or by very broad sequence identity (ie 25% identity).
The search was restricted to the specific protein described in the specification (SEQ ID NO: 1) and closely related proteins.

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

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/AU2007/000640

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report		Patent Family Member			
EP	1262562	CA	2384352	JP	2003284572
		US	2003119018	KR	2002009182
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.					
END OF ANNEX					

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I			テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/19			4 B 0 6 5
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 N 1/15			4 H 0 4 5
C 0 7 K 16/12 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	C		
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 0 7 K 16/12			
A 0 1 H 5/00 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02			
A 0 1 H 1/00 (2006.01)	A 0 1 H 5/00	A		
A 0 1 K 67/027 (2006.01)	A 0 1 H 1/00	A		
C 1 2 N 1/20 (2006.01)	A 0 1 K 67/027			
C 1 2 N 11/02 (2006.01)	C 1 2 N 1/20	A		
	C 1 2 N 11/02			

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

(74)代理人 100095360
弁理士 片山 英二

(74)代理人 100093676
弁理士 小林 純子

(74)代理人 100120134
弁理士 大森 規雄

(74)代理人 100104282
弁理士 鈴木 康仁

(72)発明者 ハートリー, キャロル, ジェイ.
オーストラリア国 オーストラリアン キャピタル テリトリー 2 6 1 1, リベット, ダーウィニア テラス 4 1

(72)発明者 ドリアン, スーザン, ジェイ.
オーストラリア国 オーストラリアン キャピタル テリトリー 2 6 1 5, フレーザー, フォスケット ストリート 1 0

(72)発明者 ブリッグス, リンダール, ジェイ.
オーストラリア国 オーストラリアン キャピタル テリトリー 2 6 1 1, リベット, ダーウィニア テラス 7 5

(72)発明者 ウィリアム, ミッチェル, アール.
オーストラリア国 オーストラリアン キャピタル テリトリー 2 6 1 5, スペンス, キングスフォード スミス ドライブ 2 7 5

(72)発明者 ロズエル, ロビン, ジェイ.
オーストラリア国 オーストラリアン キャピタル テリトリー 2 9 0 3, ワンニアッサ, サリバン クレセント 2 8

(72)発明者 オークスショット, ジョン, ジー.
オーストラリア国 オーストラリアン キャピタル テリトリー 2 9 0 3, ワンニアッサ, サリバン クレセント 2 8

Fターム(参考) 2B030 AA02 AD05 CA17 CB02
4B024 AA08 BA79 CA01 CA11 DA01 EA04 GA11
4B033 NA01 NA22 NB68

4B063	QA18	QQ04	QQ21	QQ42	QQ52	QR01	QR23	QR32	QR35	QR48
	QR62	QR73	QS25	QS34						
4B064	AG01	CA11	CA19	CC24	DA12					
4B065	AA88X	AB01	AC20	BA02	CA47	CA53				
4H045	AA10	AA20	AA30	BA41	CA11	DA75	DA89	EA05	FA74	