

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6164657号
(P6164657)

(45) 発行日 平成29年7月19日 (2017.7.19)

(24) 登録日 平成29年6月30日 (2017.6.30)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)
 C O 7 K 14/415 (2006.01)
 C 1 2 N 1/15 (2006.01)
 C 1 2 N 1/19 (2006.01)
 C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A
 C O 7 K 14/415
 C 1 2 N 1/15
 C 1 2 N 1/19
 C 1 2 N 1/21

請求項の数 20 (全 41 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-514830 (P2014-514830)
 (86) (22) 出願日 平成24年6月8日 (2012.6.8)
 (65) 公表番号 特表2014-516568 (P2014-516568A)
 (43) 公表日 平成26年7月17日 (2014.7.17)
 (86) 国際出願番号 PCT/NL2012/050403
 (87) 国際公開番号 W02012/169893
 (87) 国際公開日 平成24年12月13日 (2012.12.13)
 審査請求日 平成27年6月5日 (2015.6.5)
 (31) 優先権主張番号 61/495,399
 (32) 優先日 平成23年6月10日 (2011.6.10)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 513310601
 シュティッヒティング・テクノロジッシュ
 ・トップインスティテュート・グレーネ・
 ジェネティカ・(ファウンデーション・テ
 クノロジカル・トップ・インスティテュ
 ト・グリーン・ジェネティクス)
 オランダ・2805・パーセー・ハウダ・
 フォッセンブルフカーデ・67
 (74) 代理人 100108453
 弁理士 村山 靖彦
 (74) 代理人 100064908
 弁理士 志賀 正武
 (74) 代理人 100089037
 弁理士 渡邊 隆

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 テルペン生合成を調節する転写因子

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- a) 植物におけるテルペン生合成を増大させることができるポリペプチドをコードする、
 配列番号1の核酸配列を有する核酸；
 b) 配列番号2のアミノ酸配列または配列番号2のアミノ酸配列と少なくとも90%同一なアミ
 ノ酸配列を含む、植物におけるテルペン生合成を増大させることができるポリペプチドを
 コードする核酸；および
 c) 全長にわたって(a)の核酸配列と少なくとも95%同一であり、植物におけるテルペン生合
 成を増大させることができるポリペプチドをコードする核酸
 を含む群から選択される、単離された、合成されたまたは組換えられた核酸。

10

【請求項 2】

請求項1に記載の核酸を含むキメラ遺伝子。

【請求項 3】

請求項1に記載の核酸または請求項2に記載のキメラ遺伝子を含むベクター。

【請求項 4】

請求項2に記載のキメラ遺伝子または請求項3に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 5】

植物におけるテルペン生合成を増大させることができ、

(a) 配列番号2のアミノ酸配列；および

(b) (a) に記載のアミノ酸配列と少なくとも90%同一なアミノ酸配列

20

の群から選択されるアミノ酸配列を有する、DNA結合活性を有するポリペプチド。

【請求項6】

前記植物におけるテルペン生合成に関与するポリペプチドをコードする少なくとも1つのヌクレオチド配列に作動可能に連結しているプロモーターの核酸配列に結合することができる、請求項5に記載のポリペプチド。

【請求項7】

テルペン生合成に関与する前記ポリペプチドがテルペンシンターゼ5(TPS5)およびテルペンシンターゼ11(TPS11)を含む群から選択される、請求項6に記載のポリペプチド。

【請求項8】

前記プロモーターが毛状突起特異的プロモーターである、請求項6または7に記載のポリペプチド。 10

【請求項9】

植物における少なくとも1つのテルペンの生成を増大させるための方法であって、
(a)植物細胞を、配列番号1に対して少なくとも90%の同一性を有し、植物におけるテルペン生合成を増大させることができるポリペプチドをコードする核酸またはその機能的断片を含むベクターを含む組成物と接触させるステップと、
(b)前記ベクターを用いて形質転換した前記植物細胞を選択するステップであって、前記植物細胞が前記核酸または前記断片を過剰発現しており、過剰発現により、前記細胞において、前記少なくとも1つのテルペンのレベルが形質転換されていない植物細胞と比較して増大する、ステップと、
(c)(b)の形質転換された細胞から前記植物を再生させるステップであって、前記植物の前記少なくとも1つのテルペンのレベルが、同じ遺伝的背景の形質転換されていない植物と比較して増大している、ステップと
を含む、方法。 20

【請求項10】

前記テルペンが、昆虫を駆除するモノテルペンおよびセスキテルペンの少なくとも1つを含む、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

前記モノテルペンが、リナロール、パラ-シメン、 α -テルピネン、 β -テルピネン、および γ -フェランドレンの群から選択される少なくとも1つの化合物を含む、請求項10に記載の方法。 30

【請求項12】

前記セスキテルペンが、ネロリドール、ゲルマクレン、R-クルクメンおよび7-エピジギベレンの群から選択される少なくとも1つの化合物を含む、請求項10に記載の方法。

【請求項13】

前記昆虫が、吸液性昆虫を含む、請求項10から12までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項14】

前記吸液性昆虫が、キジラミ、コナジラミ、アブラムシ、コナカイガラムシ、ウンカおよびカイガラムシを含む、請求項13に記載の方法。

【請求項15】 40

前記吸液性昆虫が、アザミウマ、ダニおよびヨコバイをさらに含む、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

前記植物が、トマト、コショウ、ナス、レタス、アブラナ、ブロッコリー、カリフラワー、キャベツ作物、キュウリ、メロン、カボチャ(pumpkin)、カボチャ(squash)、ピーナッツ、ダイズ、トウモロコシ、綿、マメ、キャッサバ、ジャガイモ、サツマイモおよびオクラの群から選択される少なくとも1つの作物である、請求項9から15までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項17】

前記植物が、ナス科から選択される少なくとも1つの植物を含む、請求項16に記載の方 50

法。

【請求項18】

前記植物が、ハイビスカス、ポインセチア、ユリ、アヤメ、バラおよびペチュニアの群から選択される少なくとも1つの観葉植物である、請求項9から15までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項19】

請求項2に記載のキメラ遺伝子を含む植物。

【請求項20】

前記植物がナス科に属する、請求項19に記載の植物。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

本発明は、植物におけるテルペン生合成を調節するジンクフィンガー転写因子、前記転写因子をコードする核酸分子、およびテルペン含有量が変更された植物を作製するための前記転写因子の使用方法に関する。

【背景技術】

【0002】

テルペンは、細菌、真菌、植物および動物という多様な生物によって天然に合成される、構造的に多様な分子の大きな群を構成する。潜在的な商業的活用のために、テルペンまたはそれらの誘導体の生化学的機能および生物学的機能に多くの研究が集中している(GershensonおよびDudareva 2007年 Nat Chem Biol 3巻:408頁)。これらの研究の結果が、抗癌薬パクリタキセルおよび抗マラリア薬アルテミシンなどの医薬品からメントールおよびパチョリなどのフレグランス成分およびアロマ成分にわたる、種々のテルペンを基にした製品である。

20

【0003】

植物の育種の分野では、病原体に抵抗するための、有害生物を駆除するもしくは死滅させるための、または害虫の捕食者もしくは捕食寄生者もしくは植物の花粉媒介者、もしくは他の生物などの有益な生物を誘引するための、多くの植物種によって生成されるテルペンの二次代謝産物に関心が向けられている。野生型植物は、しばしば、それらの栽培種では欠けている有益な二次代謝産物を生成し、したがって、栽培品種に遺伝子移入するための形質の重要な供給源である。揮発性テルペノイド化合物などの二次代謝産物は昆虫の挙動に直接影響し得ることが既知である(Bruceら、2005年 Trends Plant Sci 10巻:269~274頁)。例えば、ソラナム・ハプロカイテス(*Solanum habrochaites*)において同定されたメチルケトンおよびセスキテルペンカルボン酸、ならびにソラナム・ペンネリ(*Solanum pennellii*)由来のアシル-グルコースエステルは、異なる昆虫クラス、例えば、鱗翅目(Lepidoptera)、ダニ、およびアブラムシなどに対して毒性であることが見いだされた(Williamsら、1980年 Science 20巻:888頁; Goffredaら、1990年 Plant Cell 2巻:643頁; Juvikら、1994年 J Econ Entomol 87巻:482頁; FrelichowskiおよびJuvik、2001年 J Econ Entomol 94巻:1249頁)。モノテルペン炭化水素、セスキテルペン炭化水素、セスキテルペン酸、メチルケトンおよび糖エステルは、多くの場合、植物の特殊器官、例えば幹および葉上の腺性突起などに蓄積する。いくつかの研究により、害虫、例えばオオタバコガであるアメリカタバコガ(*Heliothis zea*)およびコロラドハムシに対する抵抗性のレベルと、腺性突起の密度とが関係づけられた(KauffmanおよびKennedy、1989年 J Chem Ecol 15巻:1919~1930頁; Antoniusら、2001年 J Environ Sci Health B 36巻:835~848頁; Antoniusら、2005年 J Environ Sci Health B 40巻:619~631頁)。S.ハプロカイテス(*S. habrochaites*)の腺性突起に蓄積されたメチルケトンである2-ウンデカノンおよび2-トリデカノンは、それぞれ、コロラドハムシの幼虫およびコナジラミであるタバココナジラミ(*B. tabaci*)の成体に対して毒性であることが示された(Antoniusら、2005年 J Environ Sci Health B 40巻:619~631頁)。ギンバイカ油は、その不可欠な構成要素の中にモノテルペンリナロールを含んでおり、マメゾウムシであるインゲンマメゾウムシ(*Acanthoscelides*

30

40

50

obtectus Say)(甲虫目(Coleoptera):マメゾウムシ科(Bruchidae))に対して殺虫効果を有することが示された(Ayvazら、2010年 J Insect Sci 10巻:1536~2442頁)。それぞれ野生型トマトであるS.ハプロカイトスおよびS.ペンネリ(S.pennellii)に由来する、セスキテルペンであるジンギベレンおよびクルクメン、ならびにモノテルペンである -シメン、 -テルピネン、および -フェランドレンは、殺虫性を有することが示された(Bleekerら、2009年 Plant Physiol. 151巻:925頁)。バイオアッセイにより、セスキテルペンである7-エビジンギベレンおよびその誘導体であるR-クルクメンは、成体コナジラミがトマトの木にとまるのを防ぐこと(Bleekerら、2011年 Phytochemistry 72巻:68頁)、およびジンギベレンを内在的に生成する植物はツタ・アブソルタ(Tuta absoluta)に対して抵抗性を示すことが実証された(De Azavedoら、2003年 Euphytica 134巻:247~251頁)。

10

【0004】

異なる種類の腺性突起の発生およびジンギベレンの生成に関連する遺伝子の遺伝的継承(Genetic inheritance)を、ジンギベレンを生成しない栽培トマトであるトマト(S. lycopersicum)と、ジンギベレンを高生成する野生種であるS.ハプロカイトスとの種間交雑において試験した。これらの交雑由来のF2植物において、ジンギベレン含有量はタバココナジラミに対する抵抗性と相関した。この試験により高レベルのコナジラミに対する抵抗性をもたらし得る、高レベルのジンギベレン、2-トリデカノン、および/またはアシル糖を伴う育種植物の実現性が示唆された(Freitasら、2002年 Euphytica 127巻:275~287頁)。しかし、栽培品種に有用な形質を遺伝子移入する計画には時間と費用がかかり、したがって、二次代謝産物を生成しない植物において二次代謝産物を生成させること、またはこれらの代謝産物を合成する植物においてそのレベルを上昇させることは、たとえ不十分なレベルであっても、魅力的な目標である。

20

【0005】

植物におけるテルペンの生合成は広範にわたって研究されており、前駆体から最終産物までの経路のステップをコードする多くの遺伝子が発見された(WitherおよびKeeling、2007年 Agro Microbial Biotechnology 73巻:980~990頁; Sallaudら、2009年 Plant Cell 31巻:301頁)。

【0006】

作物種および観葉植物種への、タバココナジラミおよびオンシツコナジラミであるオンシツコナジラミ(Trialeurodes vaporarum)などの害虫の広範囲な来襲により大きな経済的損失が生じるので、有害生物を駆除するための植物の天然の防御分子を調節する手段が、科学者および植物育種家の新たな関心事となっている。

30

【0007】

転写因子を操作することにより、動物および植物における多数の標的遺伝子が関与する複雑な経路を調節することができることが知られている。これにより、有用な化合物の発現を増大させることができる。あるいは、転写因子を阻害することにより、望ましくない化合物の生成を減少もしくは完全に抑制および/または望ましくない形質を除去することができる。

【0008】

植物の二次代謝に関与する遺伝子を制御するいくつかの転写因子が同定され、クローニングされ、複雑な代謝経路の調節における高い効率が示された。例えば、転写因子WRKYは、綿におけるゴシポールを生成する経路の最初のステップを触媒するセスキテルペンシンターゼである -カデニン(Cadenine)シンターゼAを調節することが示された(Xuら、2004年 Plant Physiol 135巻:507~515頁)。

40

【0009】

さらに、おそらく基質利用性が乏しいために、生合成経路の個々の遺伝子を過剰発現させることによりもたらされる成果は限られることが示されたが、タバコにおいてフラボノール特異的転写因子であるAtMYB12をゲノムワイドに発現させることにより、フェニルプロパノイド経路が調節されただけでなく、この経路に対するフラックス利用性を増大させ、最終的にスポドプテラ・リトラリス(Spodoptera lituralis)およびオオタバコガ(Helicoverpa

50

verpa armigera)という昆虫に対する抵抗性を増大させる他の代謝経路も調節された(Misraら、2010年 Plant Physiol 152巻:2258～2268頁)。

【 0 0 1 0 】

MYB転写因子は、シロイヌナズナ属(Arabidopsis)において、アブラナ科に特異的な二次代謝産物であるグルコシノレートの生成のために必要な多数の酵素を活性化することも示された。MYB51は、それを過剰発現している植物において、インドールグルコシノレートの生合成を活性化し、草食性有害生物であるシロイチモジヨトウ(Spodoptera exigua)に対する抵抗性を増強することが示された(Gigolashviliら、2007年 Plant J 50巻:886～901頁)。他のMYB転写因子、例えば、MYB76、MYB28およびMYB29などは、脂肪族グルコシノレートの生成に関与する酵素を調節することが示されている(Gigolashviliら、2007年 Plant J 51巻:247～261頁; Gigolashviliら、2008年 New Phytol 177巻:627～642頁)。

【先行技術文献】

【特許文献】

【 0 0 1 1 】

【特許文献 1】特許出願WO 2010/099985

【特許文献 2】国際特許出願WO 09/082208

【特許文献 3】WO 2007/037678

【特許文献 4】WO 03/004690

【特許文献 5】WO 03/054142

【特許文献 6】WO 2004/069849

【特許文献 7】WO 20041070005

【特許文献 8】WO 2004/070007

【特許文献 9】WO 2005/003375

【特許文献 10】WO 93/05163

【非特許文献】

【 0 0 1 2 】

【非特許文献 1】GershenzonおよびDudareva 2007年 Nat Chem Biol 3巻:408頁

【非特許文献 2】Bruceら、2005年 Trends Plant Sci 10巻:269～274頁

【非特許文献 3】Williamsら、1980年 Science 20巻:888頁

【非特許文献 4】Goffredaら、1990年 Plant Cell 2巻:643頁

【非特許文献 5】Juvikら、1994年 J Econ Entomol 87巻:482頁

【非特許文献 6】FrelichowskiおよびJuvik、2001年 J Econ Entomol 94巻:1249頁

【非特許文献 7】KauffmanおよびKennedy、1989年 J Chem Ecol 15巻:1919～1930頁

【非特許文献 8】Antoniusら、2001年 J Environ Sci Health B 36巻:835～848頁

【非特許文献 9】Antoniusら、2005年 J Environ Sci Health B 40巻:619～631頁

【非特許文献 10】Ayvazら、2010年 J Insect Sci 10巻:1536～2442頁

【非特許文献 11】Bleekerら、2009年 Plant Physiol. 151巻:925頁

【非特許文献 12】Bleekerら、2011年 Phytochemistry 72巻:68頁

【非特許文献 13】De Azavedoら、2003年 Euphytica 134巻:247～251頁

【非特許文献 14】Freitasら、2002年 Euphytica 127巻:275～287頁

【非特許文献 15】WitherおよびKeeling、2007年 Agro Microbial Biotechnology 73巻:980～990頁

【非特許文献 16】Sallaudら、2009年 Plant Cell 31巻:301頁

【非特許文献 17】Xuら、2004年 Plant Physiol 135巻:507～515頁

【非特許文献 18】Misraら、2010年 Plant Physiol 152巻:2258～2268頁

【非特許文献 19】Gigolashviliら、2007年 Plant J 50巻:886～901頁

【非特許文献 20】Gigolashviliら、2007年 Plant J 51巻:247～261頁

【非特許文献 21】Gigolashviliら、2008年 New Phytol 177巻:627～642頁

【非特許文献 22】Aharoniら、2006年 Phytochemistry Review 5巻:49～58頁

【非特許文献 23】Lewinsonら、2001年 Plant Physiol 127巻:1256～1264頁

10

20

30

40

50

- 【非特許文献 2 4】Aharoniら、2003年 Plant Cell 15巻:2866～2884頁
- 【非特許文献 2 5】Luckerら、2004年 Plant J 39巻:135～145頁
- 【非特許文献 2 6】Luckerら、2004年 Plant Physiol 134巻:510～519頁
- 【非特許文献 2 7】Chenら、2011年 Plant J 66巻:212～229頁
- 【非特許文献 2 8】Schilmillerら、2009年 Proc Natl Acad Sci 106巻:10865～10870頁
- 【非特許文献 2 9】Tholl 2006年 Curr Opin Plant Biol 9巻:297～304頁
- 【非特許文献 3 0】WangおよびOhnuma、2000年 Biochim Biophys Acta 1529巻:33～48頁
- 【非特許文献 3 1】Van Schieら、2007年 Plant Mol Biol 64巻:251～263頁
- 【非特許文献 3 2】Navia-Gineら、2009年 Plant Phys Biochem 47巻:416～425頁
- 【非特許文献 3 3】Herdeら、2008年 Plant Cell 20巻:1152～1168頁 10
- 【非特許文献 3 4】Falaharaら、投稿準備中
- 【非特許文献 3 5】Bleekerら、投稿準備中
- 【非特許文献 3 6】KharelおよびKoyama、2003年 Nat Prod Rep 20巻:11～118頁
- 【非特許文献 3 7】van Der Hoevenら、2000年 Plant Cell 12巻:2283～2294頁
- 【非特許文献 3 8】WeigelおよびGlazebrook編、Laboratory Manual、2002年 Cold Spring Harbor Lab Press
- 【非特許文献 3 9】Sambrookら、1989年 Cold Spring Harbor、NY:Cold Spring Harbor Laboratory Press
- 【非特許文献 4 0】DieffenbachおよびDveksler、1995年 PCR Primer:A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press 20
- 【非特許文献 4 1】McPhersonら、2000年 PCR Basics:From Background to Bench、第1版、Springer Verlag、Germany
- 【非特許文献 4 2】Devereuxら、1984年 Nucleic Acid Research 12巻:387頁
- 【非特許文献 4 3】Altshulら、1990年 J Mol Biol 215巻:403頁
- 【非特許文献 4 4】Meyersら、1988年 Comput Appl Biosci 4巻:11頁
- 【非特許文献 4 5】Needlemanら、1970年 J Mol Biol 48巻:443頁
- 【非特許文献 4 6】FengおよびDollittle、1987年 J Mol Evol:25巻:351～360頁
- 【非特許文献 4 7】Thompsonら、1994年 Nucl. Acid Res 22巻:4573～4680頁
- 【非特許文献 4 8】Higginsら、1996年 Methods Enzymol 266巻:383～402頁
- 【非特許文献 4 9】Ausubelら(編)2000年 Current Protocols Mol Biol、Willey & Sons 30
、New York
- 【非特許文献 5 0】HamiltonおよびBaulcombe、1999年 Science 286巻:950～952頁
- 【非特許文献 5 1】HammondおよびHannon、2001年 Nature Rev Gen 2巻:110～119頁
- 【非特許文献 5 2】Baulcombe、2007年 Science 315巻:199～200頁
- 【非特許文献 5 3】Seoら(2004年)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101巻:5488～93頁
- 【非特許文献 5 4】VeiraおよびMessing、1982年 Gene 19巻:259～268頁
- 【非特許文献 5 5】Bevanら、1983年 Nature 304巻:184～187頁
- 【非特許文献 5 6】Goldschmidt-Clermont、1991年 Nucl Acid Res 19巻:4083～4089頁
- 【非特許文献 5 7】BlochlingerおよびDiggelmann、1984年 Mol Cell Bio 14巻:2929～2931頁 40
- 【非特許文献 5 8】Hincheeら、1988年 Biotechnology 6巻:915～922頁
- 【非特許文献 5 9】Leeら、EMBO Journal 7巻:1241～1248頁
- 【非特許文献 6 0】Whiteら、1990年 Nucl Acid Res 18巻:1062頁
- 【非特許文献 6 1】Spencerら、1990年 Theor Appl Genet 79巻:625～631頁
- 【非特許文献 6 2】Maniatisら、Molecular Cloning、Cold Spring Harbor Laboratory Press(1982年)
- 【非特許文献 6 3】Adams、2007年 Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry、第4版、Allured Pub Corp.、Carol Stream、IL
- 【非特許文献 6 4】HarlowおよびLane、1988年 Antibodies:A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory、New York 50

【非特許文献 6 5】van Engelenら、1995年 Transgenic Res 4巻:288～290頁

【非特許文献 6 6】CortinaおよびCulianez-Macia、2004年、Plant Cell Tissue and Organ Culture 76巻:269～275頁

【非特許文献 6 7】Jefferson R.A.ら、1987年、EMBO J 6巻:3901～3907頁

【非特許文献 6 8】Fridmanら、2005年 Plant Cell 17巻:1252～1267頁、2005年3月16日オンライン公開

【非特許文献 6 9】Hellensら、2000年、Plant Molecular Biology 42巻:819～832頁

【非特許文献 7 0】van Leeuwenら、2000年、Plant Molecular Biology Reporter 18巻:143a～143t頁

【非特許文献 7 1】Althausら 1990年 J Mol Biol 215巻:403～410頁

10

【非特許文献 7 2】Bleekerら、2011年 Phytochemistry 72巻:8～73頁

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

当技術分野では、テルペン生合成を調節する転写因子、具体的には、昆虫または他の生物を駆除または誘引するテルペン化合物の生成を導く、植物または他の生物におけるモノテルペンまたはセスキテルペンの生合成に対する効果を有する転写因子を提供する必要性がある。

【課題を解決するための手段】

【0014】

20

本発明の実施形態は、a)配列番号1の核酸配列;b)配列番号2のアミノ酸配列を有するポリペプチドまたは配列番号2のアミノ酸配列と少なくとも60%同一なアミノ酸配列をコードする核酸配列;c)(a)または(b)の核酸配列と少なくとも60%同一であり、テルペン生合成を調節する転写因子をコードする核酸配列;d)配列番号2のアミノ酸配列を有するポリペプチドから、1つまたは複数のアミノ酸の置換、欠失または挿入によって得られたアミノ酸配列を含み、配列番号2のアミノ酸配列からなるポリペプチドと機能的に等しいポリペプチドをコードする核酸配列;e)ストリンジェントな条件下で(a)、(b)、(c)、または(d)の核酸配列とハイブリダイズする核酸配列;およびf)ストリンジェントな条件下で(a)、(b)、(c)、または(d)の核酸配列の相補配列(場合によって逆相補配列)とハイブリダイズし、テルペン生合成を調節する転写因子をコードする核酸配列を含む群から選択される、単離された、合成されたまたは組換えられた核酸配列を提供する。別の実施形態は、そのような核酸配列を含むキメラ遺伝子、そのような核酸配列またはそのようなキメラ遺伝子を含むベクター、およびそのようなキメラ遺伝子またはそのようなベクターを含む宿主細胞を包含する。

30

【0015】

本発明の関連する実施形態は、植物におけるテルペン生合成を調節するDNA結合活性を有するポリペプチドを提供し、そのようなポリペプチドは、(a)配列番号2のアミノ酸配列;b)少なくとも1つのアミノ酸が置換、欠失、挿入または付加された(a)に記載のアミノ酸配列であって、ポリペプチドが配列番号2のアミノ酸配列からなるポリペプチドと機能的に等しいアミノ酸配列;および(c)(a)に記載のアミノ酸配列と少なくとも60%同一なアミノ酸配列の群から選択されるアミノ酸配列を有する。本発明のポリペプチド(すなわち、転写因子)は、植物におけるテルペン生合成に関与する少なくとも1つの遺伝子に作動可能に連結しているプロモーターの核酸配列に結合することができる。例えば、遺伝子はテルペンシンターゼ5(TPS5)およびテルペンシンターゼ11(TPS11)を含む群から選択される。例えば、プロモーターは毛状突起特異的プロモーターを含む。

40

【0016】

本発明の代替的な実施形態は、植物における少なくとも1つのテルペンの生成を増大させるための方法であって、植物におけるテルペン生合成に関与する少なくとも1つの遺伝子を正に調節する転写因子を上方制御することを伴い、そのような遺伝子がTPS5およびTPS11を含む群から選択されることが好ましい方法を提供する。例えば、転写因子の上方制

50

御は、植物を、配列番号1の核酸配列、または配列番号1の核酸配列に対して少なくとも60%の同一性を有する配列のコピー数が、同じ遺伝的背景の改変されていない植物と比較して増大するように改変し、それにより、改変された植物における少なくとも1つのテルペンのレベルを増大させることを伴う。

【0017】

好ましい実施形態では、植物における少なくとも1つのテルペンのレベルを増大させるための方法であって、(a)植物細胞または植物プロトプラストを、配列番号1の核酸配列または配列番号1の配列に対して少なくとも60%の同一性を有するその断片を有するベクターを含む組成物と接触させるステップと、(b)ベクターを用いて形質転換した植物細胞または植物プロトプラストを選択するステップであって、植物細胞または植物プロトプラストが核酸配列またはその断片を過剰発現し、したがって、過剰発現により、細胞における少なくとも1つのテルペンのレベルが形質転換されていない植物細胞または植物プロトプラストと比較して増大しているステップと、(c)形質転換された細胞またはプロトプラストから植物を再生させるステップであって、植物の少なくとも1つのテルペンのレベルが、同じ遺伝的背景の形質転換されていない植物と比較して増大しているステップとを含む方法が提供される。形質転換された植物を選択的に育種して、少なくとも1つのテルペンのレベルが、同じ遺伝的背景の形質転換されていない植物と比較して増大した形質転換植物集団を作製することによって植物の集団において少なくとも1つのテルペンの生成を増大させるための方法も本発明の範囲内である。

【0018】

さらに別の実施形態では、植物における少なくとも1つのテルペンの生成を低減させるための方法であって、植物におけるテルペン生成に関与する少なくとも1つの遺伝子を正に調節する転写因子を下方制御することを伴い、遺伝子が、TPS5およびTPS11を含む群から選択されることが好ましい方法が提供される。例えば、転写因子の下方制御は、植物を、配列番号1の核酸配列もしくは配列番号1の核酸配列に対して少なくとも60%の同一性を有する配列、または配列番号3の核酸配列もしくは配列番号3の核酸配列に対して少なくとも60%の同一性を有する配列において突然変異を有するように改変することを伴ってよく、突然変異により、同じ遺伝的背景の改変されていない植物と比較して転写因子レベルの減少または転写因子の機能喪失がもたらされ、それにより、改変された植物において少なくとも1つのテルペンのレベルが低減する。例えば、突然変異は、少なくとも1つのヌクレオチドの置換、欠失、挿入または付加を含んでよい。該方法の関連する実施形態では、転写因子の下方制御は、改変されていない同じ遺伝的背景の植物と比較して、配列番号1の核酸配列もしくは配列番号1の核酸配列に対して少なくとも60%の同一性を有する配列、または配列番号3の核酸配列もしくは配列番号3の核酸配列に対して少なくとも60%の同一性を有する配列と少なくとも一部が相補的である核酸配列を有するRNAのレベルが増大するように植物を改変し、それにより、改変された植物における少なくとも1つのテルペンのレベルを減少させることを伴ってよい。

【0019】

特に好ましい実施形態では、植物の集団におけるテルペンレベルを低減させるための方法であって、(a)配列番号1の核酸配列もしくは配列番号1の核酸配列に対して少なくとも60%の同一性を有する核酸配列、または配列番号3の核酸配列もしくは配列番号3の核酸配列に対して少なくとも60%の同一性を有する核酸配列を含む遺伝子に突然変異を含む植物の集団内の少なくとも1つの植物を用意するステップと、(b)(a)の少なくとも1つの突然変異植物を選択的に育種して、テルペンレベルが低減している植物の集団を作製するステップとを含む方法が提供される。

【0020】

具体的には、該方法のテルペンとして、昆虫を駆除するモノテルペンおよびセスキテルペンの少なくとも1つが挙げられる。例えば、モノテルペンとしては、リナロール、 α -ミルセン、パラ-シメン、 α -テルピネン、 β -テルピネン、および α -フェランドレンの群から選択される少なくとも1つの化合物が挙げられる。例えば、セスキテルペンは、ネオリ

ドール、ゲルマクレン、R-クルクメン、S-クルクメンおよび7-エビジンギベレンの群から選択される少なくとも1つの化合物を含む。

【0021】

あるいは、本発明の方法のテルペンとしては、少なくとも、昆虫を誘引するモノテルペンおよびセスキテルペンが挙げられる。例えば、モノテルペンとしては、 α -フェランドレン、リモネンおよび2-カレンの群から選択される少なくとも1つの化合物が挙げられる。例えば、セスキテルペンは、少なくとも β -カリオフィレンを含む。

【0022】

一般に、本発明は、吸液性昆虫(sap-sucking insects)および吸血性昆虫を含む昆虫を誘引または駆除することに関する。例えば、吸液性昆虫としては、キジラミ、コナジラミ、アブラムシ、コナカイガラムシ、ウンカおよびカイガラムシが挙げられる。例えば、吸血性昆虫は、蚊、マダニおよびユスリカを含む。アザミウマ、ダニおよびヨコバイを含む昆虫も本発明の範囲内である。

【0023】

一般に、本発明の方法の植物は、トマト、コショウ、ナス、レタス、アブラナ、ブロッコリー、カリフラワー、キャベツ、キュウリ、メロン、カボチャ(pumpkin)、カボチャ(squash)、ピーナッツ、ダイズ、トウモロコシ、綿、マメ、キャッサバ、ジャガイモ、サツマイモおよびオクラの群から選択される少なくとも1つの作物である。植物は、ナス科(Solanaceae)から選択される少なくとも1つの植物も包含する。本発明の方法は、ハイビスカス、ポインセチア、ユリ、アヤメ、バラおよびペチュニアの群から選択される少なくとも1つの観葉植物を対象とすることもできる。

【0024】

本発明の実施形態は、本明細書に記載の方法によって得ることができるまたは得られた植物も提供する。さらに、本発明は本明細書において提供されるキメラ遺伝子を含む植物に関する。そのような植物は、配列番号1の核酸配列ならびにその変異体および断片を含む、遺伝子操作された植物であってよい。例えば、植物は、ナス科に属してよい。

【0025】

本明細書に記載の植物、例えば、形質転換または改変された植物から開始した組織培養物も本発明の範囲内である。そのような組織培養物は、少なくとも1つのテルペン、テルペン異性体、またはテルペン類似体の生成または分泌が増強されている。

【0026】

関連する実施形態は、テルペン、テルペン異性体、またはテルペン類似体を生成するための方法であって、形質転換植物に由来する組織培養物からテルペン、テルペン異性体またはテルペン類似体を単離することを伴う方法を提供する。

【0027】

本発明の最後の実施形態は、テルペンの植物へのマーカー利用遺伝子移入のための方法であって、(a)ナス科由来の植物と、有性生殖的に適合する(sexually compatible)植物との間の、配列番号2のアミノ酸配列をコードする遺伝子の差異を同定するステップであって、差異を有する遺伝子が、植物におけるテルペンの存在に関連づけられる分子マーカーを含むステップと、(b)分子マーカーを有する植物と有性生殖的に適合する植物を交雑する(making a cross)ステップと、(c)交雑によって生じる後代を、分子マーカーの存在についてスクリーニングするステップと、(d)後代内の分子マーカーを有する植物を同定し、それにより、テルペンを生成する植物を同定するステップとを含む方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0028】

【図1】改変された多重クローニング部位を伴うpMON999ベクターであるPJVII-GUS-sYFP1の概略図である。モノテルペンシンターゼ1(SIMTS1)とも称されるトマト(*S. lycopersicum*)テルペンシンターゼ5(SITPS5)、プロモーターをSacI部位とXbaI部位の間にクローニングし、黄色蛍光タンパク質(sYFP1)と融合した β -グルクロニダーゼ(GUS)をXbaI部位とBamHI部位の間にクローニングした。

10

20

30

40

50

【図2】トランスジェニック5'SITPS5プロモーター欠失植物および対照の幹から単離した毛状突起におけるGUS発現の数量化を示す棒グラフのセットである。各プロモーター構築物(全長(f1)、1045bp、805bp、612bp、408bp、207bp)、空ベクター対照および形質転換されていないMoney maker植物体についての平均の相対的GUS活性である。毛状突起特異的活性は408bpで失われ、その後207bpで部分的に回復した。207bp断片をY1Hアッセイのために選択した。

【図3A】候補遺伝子19(6)についての定量的リアルタイムPCRの結果を示す棒グラフのセットである。図3パネルAは、トマトMoney makerの葉、毛状突起を含む幹全体、むきだしの幹および単離された毛状突起における組織特異的な遺伝子の発現を示す。単離された毛状突起において最高レベルの発現が観察された。

10

【図3B】候補遺伝子19(6)についての定量的リアルタイムPCRの結果を示す棒グラフのセットである。図3パネルBは、対照およびジャスモン酸を噴霧した植物(JA)における遺伝子の毛状突起発現を示す(アクチンに対して補正した値)。

【図4】ベンサミアナタバコ(*N. benthamiana*)植物体における平均の相対的GUS活性を示す棒グラフのセットである。5週齢のベンサミアナタバコの葉を、種々のプロモーター:GUSレポーターおよび35S:19(6)エフェクター構築物を保有するアグロバクテリウム・ツメファシエンス(*A. tumefaciens*)GV3101培養物に共浸透させた。35S:ルシフェラーゼ活性について正規化した平均の相対的GUS活性が示されている。対照35S:RFPエフェクター構築物を用いたベンサミアナタバコにおけるこれらのプロモーター:GUSレポーター構築物の活性はおおよそ0.05であった。粗抽出物の酵素的GUS活性を、4-メチルウンベリフェリル-D-グルクロニド(MUG)を基質として使用して分光光度測定によって決定した。

20

【図5】転写因子TF19(6)をコードする配列番号3のゲノム核酸配列を示す図である。本図において下線が引かれている大文字はエクソンを示し、下線が引かれている小文字はイントロンを示す。太字の大文字は開始コドンおよび終止コドンを示す。下線が引かれていない大文字は、開始コドンの上流の推定TF19(6)4kbプロモーター領域および終止コドンの下流の2kbの'3UTR領域を示す。推定ジンクフィンガーモチーフをコードする配列の位置が灰色の薄い影で示されている。

【発明を実施するための形態】

【0029】

本発明は、本明細書においてTF19(6)と称される、植物におけるテルペン生合成を調節する転写因子に関する。TF19(6)のcDNAは、351アミノ酸のポリペプチド(配列番号2)をコードする単一のオープンリーディングフレームを伴う1056bpの核酸配列(配列番号1)を含む。

30

【0030】

したがって、本発明の配列を植物において発現させることにより、テルペン生合成に関与する1つまたは複数の遺伝子の発現を変化させることができることが当業者には理解されよう。遺伝子の発現に影響を及ぼすことによって、植物の表現型を、昆虫または他の有害生物および病原体に対する抵抗性が改善された植物、または有益な生物、例えば、害虫の捕食者もしくは捕食寄生者もしくは植物の花粉媒介者、もしくは他の生物を誘引する植物を含むように変更することができる。

40

【0031】

本発明の配列は、任意の種、特に植物種、または組換えまたは合成を含む任意の他の供給源が起源であってよい。

【0032】

本発明の転写因子は、1つまたは複数のドメイン結合部位を有する転写因子が経路内の1つまたは複数の遺伝子の調節配列に結合すると植物における1つまたは複数の遺伝子の発現を調節するDNA調節配列も含んでよい。

【0033】

本発明は、テルペン生合成経路の1つまたは複数の遺伝子の発現を変更するための本発明の1つまたは複数のポリヌクレオチドまたはポリペプチドを使用することによって、植

50

物の表現型を改変するための方法にも関する。あるいは、本発明のポリヌクレオチドおよびペプチドには、これだけに限定することなく、突然変異の誘導、PCR反応の実施などの別の反応の基質としての使用、消化およびライゲーション反応を含むクローニング、転写因子の外因性または内在性の修飾因子の同定の基質としての使用、組換えタンパク質の作製における使用、相補的な核酸または部分的に相補的な核酸の存在についての診断プローブとしての使用などを含む種々の追加的な用途がある。

【0034】

テルペン生合成経路とは、種々のテルペン分子を形成する経路を指す。「テルペン」および「テルペノイド」という用語は、本明細書では互換的に使用され、イソプレン単位(C_5H_8)に由来する炭素骨格を有する炭化水素を指す。テルペンは、それらの炭素数に基づく群に細分され、環状分子であっても非環状分子であってもよい。5炭素、10炭素、15炭素、20炭素および30炭素のテルペンは、それぞれヘミテルペン、モノテルペン、セスキテルペン、ジテルペン、およびトリテルペンと称される。

【0035】

例えば、「モノテルペン」という用語は、2つのイソプレン単位からなり、分子式($C_{10}H_{16}$)を有するテルペンのクラスを指す。モノテルペンとしては、これだけに限定されないが、ミルセン、(Z)-オシメン、(E)-オシメン、リナロール、ゲラニオール、ネロール、シトロネロール、ミルセノール、ゲラニアル、シトラールa、ネラル、シトラールb、シトロネラルを含む環式モノテルペン;リモネン、 α -テルピネン、 β -テルピネン、 γ -フェランドレン、 δ -フェランドレン、テルピノレン、メントール、カルベオールを含む単環式モノテルペン; α -ピネン、 β -ピネン、ミルテノール、ミルテナール、ベルバノール、ベルバノン、ピノカルベオールを含む二環式モノテルペン;およびトリシクレンを含む三環式モノテルペンが挙げられる。

【0036】

本明細書で使用される場合、「セスキテルペン」という用語は、3つのイソプレン単位からなり、分子式 $C_{15}H_{24}$ を有するテルペンのクラスを指す。セスキテルペンとしては、これだけに限定されないが、ファルネセンを含む環式セスキテルペン;ジンギベレンおよびフムレンを含む単環式セスキテルペン;カリオフィレン、ベチパズレン、グアイアズレン(*guaizulene*)を含む二環式セスキテルペン;ロンギホレン、コパエン、パチョロールを含む三環式セスキテルペンが挙げられる。

【0037】

本明細書で使用される場合、「ジテルペン」という用語は、4つのイソプレン単位からなり、分子式 $C_{20}H_{32}$ を有するテルペンを指す。既知のジテルペンとしては、例えば、タキソールが挙げられる。

【0038】

本明細書で使用される場合、テルペンという用語は、テルペン類似体、例えばアルコール、アルデヒド、ケトンおよびエステルなど、ならびに立体異性体および互変異性体を含む異性体も指す。本明細書における特定の異性体、例えば、 α -異性体および/または β -異性体などへの言及は、当業者が他の異性体を使用することを妨げるものではなく、機能的である限り、具体的に記載されている異性体を他の異性体または異性体の混合物で置き換えることができることが理解される。例えば、イチゴ由来のネロリドールシンターゼ1遺伝子を過剰発現している形質転換ジャガイモおよび形質転換シロイヌナズナ属(*Arabidopsis*)植物は、リナロールだけでなくE-8-ヒドロキシリナロール、Z-8-ヒドロキシ-リナロールおよびE-8-ヒドロキシ-6,7-ジヒドロリナロールを含むリナロール誘導体も放出することが観察された(Aharoniら、2006年 *Phytochemistry Review* 5巻:49~58頁)。テルペン生合成経路のステップを触媒する酵素を過剰発現させることによって植物におけるテルペノイドを代謝的工学的操作することにより、実質的なレベルのテルペノイドが上首尾に生成されることが示された(Lewinsonら、2001年 *Plant Physiol* 127巻:1256~1264頁; Aharoniら、2003年 *Plant Cell* 15巻:2866~2884頁; Luckerら、2004年 *Plant J* 39巻:135~145頁; Luckerら、2004年 *Plant Physiol* 134巻:510~519頁; Aharoniら、2006年

Phytochemistry Review 5巻:49~58頁)。しかし、経路の個々の遺伝子の発現を操作することによる成功は、時には、必須の前駆体の利用可能性が欠けていることまたは乏しいことに起因して限られる。転写因子を使用して代謝経路に関与する遺伝子の発現を調節することにより、追加的な経路が調節され、前駆体の利用可能性がもたらされることが示された(Misraら、2010年 Plant Physiol 152巻:2258~2268頁)。

【0039】

テルペンは、一般的な前駆体であるイソペンテニルピロリン酸(IPP)およびその異性体であるジメチルアリルニリン酸(DMAPP)から、2つの別個の生合成経路:植物の細胞質ゾルおよび真核生物において見いだされるメバロン酸経路ならびに植物の色素体および原核生物において見いだされるデオキシキシルコース-5-リン酸(DXP)経路を通じて合成される。メバロン酸経路では、IPPの生合成は、アセチルCoAの3つの分子のメバロン酸への変換から開始され、その後、メバロン酸がジホスホメバロン酸に逐次的にリン酸化され、その後、脱カルボキシル化されてIPPが生成する。DXP経路では、DXPの生成は、1-デオキシ-D-キシルコース-5-リン酸シンターゼによって触媒されるビルビン酸およびグリセルアルデヒド-3-リン酸のそれぞれの1つの分子から開始され、その結果、IPPが唯一の生成物であるメバロン酸経路とは対照的に、IPPとDMAPPが生成する。一般に、セスキテルペンは、関連する前駆体から、細胞質ゾルにおいてメバロン酸経路を通じて合成され、モノテルペンおよびジテルペンは色素体においてDXP経路を通じて生成される。色素体と細胞質ゾルの間での前駆体の交換も観察された。

【0040】

どちらの経路においても、IPPは、IPP異性化酵素によってさらに異性化されてDMAPPになり、その後、プレニルトランスフェラーゼによってより高分子量の非環式ポリプレニルピロリン酸前駆体が形成されて、非環式ピロリン酸テルペン前駆体が形成される。例えば、これらの反応により、それぞれ10炭素、15炭素、および20炭素の前駆体であるゲラニル-ピロリン酸(GPP)、ファルネシル-ピロリン酸(FPP)、ゲラニルゲラニル-ピロリン酸(GGPP)が生成する。プレニルトランスフェラーゼは、各伸長サイクルにおいて形成される二重結合の立体化学に基づいて2つの主要なクラスに分けられる。シス立体配置での二重結合を形成するプレニルトランスフェラーゼは、シスプレニルトランスフェラーゼまたはZ-プレニルトランスフェラーゼと称され、トランス配置での二重結合を形成するプレニルトランスフェラーゼは、トランスプレニルトランスフェラーゼ、またはE-プレニルトランスフェラーゼと称される。

【0041】

テルペンシンターゼ(TPS)は、テルペン化合物、モノテルペン化合物またはセスキテルペン化合物の炭素骨格が生成される多段階反応において非環式前駆体の環化を触媒する酵素である。例えば、触媒される環化の最初のステップは、ニリン酸基がイオン化されてアリルカチオンが形成されることであり得る。次いで、基質は異性化および再編成を受け、これは酵素の活性部位によって制御され得る。生成物は、例えば、非環式テルペン、単環式テルペン、二環式テルペンまたは三環式テルペンであってよい。

【0042】

GPPおよびネリルニリン酸(NPP)、GPPのシス異性体はモノテルペン生合成の基質であること、ならびにFPPおよびGGPPはそれぞれセスキテルペンシンターゼおよびジテルペンシンターゼの基質であることが当技術分野で既知である(Chenら、2011年 Plant J 66巻:212~229頁; Schillmillerら、2009年 Proc Natl Acad Sci 106巻:10865~10870頁; Tholl 2006年 Curr Opin Plant Biol 9巻:297~304頁; WangおよびOhnuma、2000年 Biochim Biophys Acta 1529巻:33~48頁)。いくつかのTPSは単一の生成物を生成するが、多くは同じ前駆体から多数の生成物を生成する、または供給される前駆体に応じて多数の化合物を生成することができる(Van Schieら、2007年 Plant Mol Biol 64巻:251~263頁)。

【0043】

誘導性テルペン生合成は、テルペンシンターゼの誘導性発現と相関することが観察された(Navia-Gineら、2009年 Plant Phys Biochem 47巻:416~425頁; Herdeら、2008年 PI

10

20

30

40

50

ant Cell 20巻:1152～1168頁)。

【0044】

植物は、害虫を駆除するため、または有益な昆虫、例えば、害虫の捕食者もしくは捕食寄生者もしくは植物の花粉媒介者を誘引するために、モノテルペンとセスキテルペンの混合物からなる揮発性物質を放出する。トマトにおいて2つのテルペンシンターゼ、TPS5(以前はモノテルペンシンターゼ1、MTS1)およびTPS4(以前はモノテルペンシンターゼ2、MTS2)が同定された(Van Schieら、2007年 Plant Mol Biol 64巻:251～263頁; Falaharaら、投稿準備中; Bleekerら、投稿準備中)。試験により、TPS5が毛状突起において発現されること、およびin vitroにおいてTPS5タンパク質がGPPからのリナロールの形成を触媒することが示されている。トマト毛状突起におけるTPS5の発現は、通常の条件下では低く、ジヤスモン酸を用いた誘導後に上昇したことが観察された(Van Schieら、2007年 Plant Mol Biol 64巻:251～263頁; KharelおよびKoyama、2003年 Nat Prod Rep 20巻:11～118頁)。Van Schieの試験により、TPS4が幹、根において、および毛状突起において発現されること、ならびにこの遺伝子が、GPPからの -ミルセン、 -フェランドレンおよびサビネンを形成する酵素をコードすることも見いだされた(Van Schieら、2007年 Plant Mol Biol 64巻:251～263頁)。

10

【0045】

モノテルペンがトマト(*S. lycopersicum*)において同定されるテルペンの優位を占めると思われるが、トマトゲノムから取り出される大多数のTPS遺伝子はセスキテルペンシンターゼである(Falaharaら、投稿準備中)。トマト(*S. lycopersicum*)および*S. ハプロカイト*の毛状突起に由来するcDNAの配列決定により、既知のセスキテルペンシンターゼに対する類似性を有する多数のTPS配列が同定された(Bleekerら、投稿準備中)。例えば、トマト(*S. lycopersicum*)データベースでは、TPS9(以前はゲルマクレンCシンターゼ; van Der Hoevenら、2000年 Plant Cell 12巻:2283～2294頁)、TPS12(以前は -カリオフィレン/ -フムレンシンターゼ; van Der Hoevenら、2000年 Plant Cell 12巻:2283～2294頁)、TPS15、TPS16、TPS17およびTPS31(以前はジャガイモ由来のベチスプラジエンシンターゼに対する類似性に起因してLeVS2)の転写物が同定された。*S. ハプロカイト*では、cDNA配列がTPS9、TPS12、TPS14、TPS15およびTPS17に対する類似性を有することが同定された。

20

【0046】

本発明の転写因子によって調節することができる化合物としては、限定することなく、本明細書では「誘引物質」と称される、昆虫を誘引するテルペン化合物、例えば、 -フェランドレン、リモネンおよび2-カレンなどが挙げられる。本発明の転写因子によって調節される化合物としては、これらに限定されないが、本明細書では「駆除物質」と称される、昆虫を駆除するテルペン、例えば、R-クルクメン、S-クルクメン、 -ミルセン、パラ-シメン、 -テルピネン、ジンギベレン、7-エピジンギベレン、 -テルピネンおよび -フェランドレンなども挙げられる。これらの化合物は、参照により本明細書に組み込まれる特許出願WO 2010/099985に記載されている。

30

【0047】

さらに、トマト(*S. lycopersicum*)栽培品種MoneyMakerおよび*S. ハプロカイト*(*S. habrochaites*)PI127826の毛状突起に存在するセスキテルペンも本発明の転写因子によって調節することができる(下表を参照されたい; Bleekerら、投稿準備中)。

40

【0048】

【表 1】

Table. トマト (*S. lycopersicum*) 栽培品種 MoneyMaker および *S. ハプロカイテス* PI127826 の毛状突起に存在するセスキテルペン

セスキテルペン	トマト (<i>S. lycopersicum</i>)	<i>S. ハプロカイテス</i>
アズレン	×	
α -コパエン	×	
β -エレメン		×
カリオフィレン	×	×
γ -エレメン	×	×
アルファフムレン	×	×
β -ファルネセン		×
β -アコラジエン		×
クルクメン		×
ゲルマクレン D	×	×
ジンギベレン		×
クパレン	×	
β -ビサボレン		×
β -セスキフェランドレン		×
パレンセン		×
ゲルマクレン C	×	
セリナ-3.7(11)-ジエン		×
ゲルマクレン B		×

10

20

【0049】

トマトにおいて、TPS5遺伝子およびTPS11遺伝子の発現を調節する毛状突起特異的プロモーターが同定された(参照により本明細書に組み込まれる国際特許出願WO 09/082208においてTPS5プロモーターはMTS1プロモーターと称され、TPS11プロモーターはSTS1プロモーターと称された)。

【0050】

本明細書で使用される場合、「プロモーター」という用語は、それに作動可能に連結している核酸配列の転写を開始することができる核酸配列を指す。プロモーターは、遺伝子の転写部位の上流に位置する1つまたは複数の遺伝子の転写を制御する。プロモーターは、構造的には、DNA依存性RNAポリメラーゼの結合部位、転写開始部位、ならびに、これだけに限定されないが、転写因子結合部位、抑制因子および活性化因子タンパク質結合部位を含む任意の他のDNAドメイン(シス調節エレメント)、ならびに、直接的にまたは間接的に作用して、プロモーターからの転写の速度を調節することが当業者に既知である任意の他のヌクレオチドの配列が存在することを特徴とする。真核生物のシス調節エレメントの例としては、転写部位のおよそ25塩基対上流に位置するTATAボックス、最初の転写部位の75~80塩基対上流に位置するCAATボックス、エンハンサーまたはサイレンサーエレメントが挙げられる。本発明のプロモーターとしては、生物の全ての組織および器官において活性である構成的プロモーターが挙げられるが、毛状突起などの特異的な組織において主に活性である組織特異的なプロモーターが好ましい。特に、ナス属(*Solanum*)または他の植物種に属する植物において見いだされるテルペンシンターゼ5、すなわち、リナロールシンターゼ、またはモノテルペンシンターゼ1、およびテルペンシンターゼ11のプロモーターが包含される。

30

40

【0051】

本発明のポリヌクレオチド

本発明は、本明細書において提供される転写因子のポリペプチドまたは変異ポリペプチドをコードする、単離された、組換えられた、または合成されたポリヌクレオチドを提供

50

する。本発明の実施形態は、単離された、組換えられたもしくは合成された配列番号1の核酸配列、または、配列番号1の核酸配列と少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%または99%同一であり、配列番号2に示されているアミノ酸配列を有する転写因子をコードするその変異体、またはテルペン合成を調節することができるその断片もしくは変異体を提供する。

【0052】

この実施形態の別の態様では、核酸配列は、DNA結合活性を有するTF19(6)ポリペプチドのペプチド部分をコードする。そのようなDNA結合ドメインは、特異的な標的DNA配列に結合し、既知のジンクフィンガードメインDNA結合タンパク質のアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を有する。

【0053】

別の実施形態では、コード核酸配列および非コード核酸配列を含有する配列番号3の全長ゲノム核酸配列が提供される。

【0054】

「核酸配列」、「ヌクレオチド配列」、「核酸」、および「ポリヌクレオチド」という用語は、互換的に使用され、ヌクレオチドの配列を意味する。核酸配列は、一本鎖デオキシリボヌクレオチドであっても二本鎖デオキシリボヌクレオチドであってもよく、また任意の長さのリボヌクレオチドであってもよく、遺伝子のコード配列および非コード配列、エクソン、イントロン、センス相補配列、アンチセンス相補配列、ゲノムDNA、cDNA、miRNA、siRNA、mRNA、rRNA、tRNA、組換え核酸配列、単離され、精製された天然に存在するDNA配列および/またはRNA配列、合成のDNA配列およびRNA配列、断片、プライマーならびに核酸プローブを包含する。遺伝暗号の縮重に起因して、種々の核酸配列が同じアミノ酸配列をコードする場合がある。TF19(6)またはその変異体をコードする任意の核酸配列は、本明細書ではTF19(6)コード配列と称される。

【0055】

「単離された」とは、その天然の環境から取り出され、他の核酸配列を実質的に含まない核酸配列を指し、この核酸配列は、例えば機能的な遺伝子またはポリペプチドコード領域などの関連のない配列の部分を含むしない。単離された分子は、分子生物学的技法、生化学的技法および合成による技法を含む任意の方法または方法の組み合わせによって得ることができる。この限定は、単離後に核酸配列に人工的に付加された遺伝子をコードする核酸配列またはコード領域には関連しない。

【0056】

「組換え核酸配列」とは、組換えDNA技術を用いて連結された核酸配列の組み合わせを指す。

【0057】

「組換えDNA技術」とは、例えば、WeigelおよびGlazebrook、2002年 Cold Spring Harbor Lab Press;およびSambrookら、1989年 Cold Spring Harbor, NY:Cold Spring Harbor Laboratory Pressに編集された実験マニュアルに記載されている核酸配列を連結するための分子生物学の手順を指す。

【0058】

配列番号1のポリヌクレオチドの断片とは、少なくとも15bp、少なくとも30bp、少なくとも40bp、少なくとも50bpおよび/または少なくとも60bpの長さであることが好ましい本発明のポリヌクレオチドの連続したヌクレオチドを含む核酸配列を指す。ポリヌクレオチドの断片は、本発明のポリヌクレオチドの少なくとも25個、少なくとも50個、少なくとも75個、少なくとも75個、少なくとも100個、少なくとも150個、少なくとも200個、少なくとも300個、少なくとも400個、少なくとも500個、少なくとも600個、少なくとも700個、少なくとも800個、少なくとも900個、少なくとも1000個、少なくとも1100個の連続したヌクレオチドを含むことが好ましい。限定することなく、本発明のポリヌクレオチドの断片は、PCRプライマーとして、および/またはプローブとして、またはアンチセンス遺伝子サイレンシングのために使用することができる。

【0059】

「プライマー」とは、鋳型核酸配列とハイブリダイズし、鋳型と相補的な核酸配列を重合させるために使用される短い核酸配列を指す。

【0060】

本発明の関連する実施形態では、TF19(6)をコードする核酸配列を検出するためのPCRプライマーおよび/またはプローブが提供される。当業者には、TF19(6)をコードする核酸配列またはその断片を配列番号1に基づいて増幅するために縮重または特異的PCRプライマー対を合成する方法が知られている(DieffenbachおよびDveksler、1995年 PCR Primer: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press; McPhersonら、2000年 PCR Basics: From Background to Bench、第1版、Springer Verlag、Germanyを参照されたい)。TF19(6)をコードする核酸配列の検出キットは、TF19(6)をコードする核酸配列に特異的なプライマーおよび/またはプローブ、ならびにプライマーおよび/またはプローブを使用して試料中のTF19(6)をコードする核酸配列を検出するための関連するプロトコルを含んでよい。そのような検出キットを使用して、植物が改変されているかどうか、すなわち、TF19(6)をコードする配列で形質転換されているかどうかを決定することができる。1つまたは複数のヌクレオチドの突然変異、欠失、挿入、および/または置換を、配列番号1のDNA配列またはより短いその断片に導入することができることが当業者には明らかである。一般に、突然変異は、遺伝子によりコードされるタンパク質のアミノ酸配列を変化させ得る遺伝子のDNA配列の変化である。

【0061】

本発明による変異DNA配列の機能を試験するために、対象の配列を、選択可能なまたはスクリーニング可能なマーカー遺伝子に作動可能に連結し、レポーター遺伝子の発現を、プロトプラストを用いた一過性の発現アッセイにおいてまたは安定に形質転換した植物において試験する。発現を駆動することができるDNA配列はモジュールとして構築されることが当業者には既知である。したがって、短いDNA断片からの発現レベルは、最長の断片からの発現レベルとは異なる可能性があり、また、互いに異なる可能性がある。本発明の転写因子をコードする核酸配列の機能的等価物、すなわち、ストリンジェントな条件下で配列番号1の核酸配列とハイブリダイズするヌクレオチド配列も本発明に包含される。

【0062】

ストリンジェントなハイブリダイゼーションは、65℃、最も好ましくは55℃の温度で、0.1% SDSを含有する2倍強度(2×)のクエン酸緩衝生理食塩水(SSC)中で実施し、その後、同じ温度であるが、SSC濃度を低減させた緩衝液を用いて支持体をすすぐ。そのような濃度を低減させた緩衝液は、一般には、0.1% SDSを含有する10分の1強度のSSC(0.1× SSC)、好ましくは0.1% SSCを含有する0.2× SSC、最も好ましくは0.1% SDSを含有する2分の1強度のSSC(0.5× SSC)である。他の生物由来の転写因子の機能的等価物は、配列番号1を伴う核酸配列を他の生物から単離されたゲノムDNAとハイブリダイズさせることによって見いだすことができる。他の生物における相同な配列を同定するための方法は当業者には既知である。次いで、そのような新しく同定されたDNA分子について配列決定することができ、その配列を配列番号1の核酸配列と比較し、機能的な同等性について試験することができる。配列番号1のヌクレオチド配列に対して少なくとも60%、70%、または75%、好ましくは80%、より好ましくは90%、最も好ましくは95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の配列同一性を有するDNA分子は本発明の範囲内である。

【0063】

2つの配列間の配列同一性の百分率は、標準のアラインメントアルゴリズムに基づくコンピュータプログラムを用いて決定する。配列が、標準のコンピュータプログラムによって同定したところ少なくとも一定の最低限の配列同一性の百分率を共有する場合、その配列は実質的に同一である。本発明の範囲内で好ましいコンピュータプログラムとしては、これだけに限定することなく、CGCプログラムパッケージ(Devereuxら、1984年 Nucleic Acid Research 12巻:387頁)、BestFit、BLASTP、BLASTN、およびFASTA(Altshulら、1990年 J Mol Biol 215巻:403頁)、Meyersら、1988年 Comput Appl Biosci 4巻:11頁のアル

ゴリズム、またはNeedlemanら、1970年 J Mol Biol 48巻:443頁のアルゴリズムが挙げられる。配列同一性とは、配列の長さ全体にわたる配列同一性を指すことが好ましい。

【0064】

本発明の関連する実施形態は、配列番号1に記載の核酸配列と相補的または逆相補的である核酸配列、例えば、阻害性RNA、またはストリンジェントな条件下で配列番号1による配列の少なくとも一部とハイブリダイズする核酸配列または配列番号1と逆相補的な配列(例えば、非コードDNA鎖)などを提供する。

【0065】

本発明のポリヌクレオチドを植物細胞において過剰発現させることができ、植物細胞のいくつかの遺伝子および/またはタンパク質の発現レベルの変化を観察することができる。したがって、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドを使用して、植物における遺伝子および/またはタンパク質、特にテルペン生合成の遺伝子および/またはタンパク質の発現を変化させることができる。あるいは、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、1つまたは複数の遺伝子の発現レベルの変化を導いて植物の特性または形質、特に昆虫抵抗性に関連する形質を改善するノックアウト植物において使用することができる。

【0066】

「遺伝子」という用語は、細胞においてRNA分子、例えば、mRNAに転写される、適切な調節領域、例えば、プロモーターに作動可能に連結している領域を含むDNA配列を意味する。したがって、遺伝子は、いくつかの作動可能に連結している配列、例えば、プロモーター、例えば翻訳開始に関与する配列を含む5'リーダ配列、cDNAまたはゲノムDNAのコード領域、イントロン、および、例えば転写終結部位を含む3'非翻訳配列などを含んでよい。

【0067】

「キメラ遺伝子」または「組換え遺伝子」とは、ある種において通常は天然には見いだされない任意の遺伝子、特に、天然では互いに関連しない核酸配列の1つまたは複数の部分が存在する遺伝子を指す。例えば、プロモーターは、天然では転写領域の一部もしくは全部と、または別の調節領域と関連しない。「キメラ遺伝子」という用語は、プロモーターまたは転写調節配列が、1つまたは複数のコード配列またはアンチセンス、すなわちセンス鎖の逆相補配列、または逆方向反復配列(センスおよびアンチセンス、それにより、転写の際にRNA転写物が二本鎖RNAを形成する)に作動可能に連結している発現構築物を包含するものと理解される。

【0068】

「3'UTR」または「3'非翻訳配列」(3'非翻訳領域、または3'末端とも称される)とは、遺伝子のコード配列の下流に見いだされる、例えば転写終結部位および(全てではないが大部分の真核生物のmRNAにおいて)ポリアデニル化シグナル(例えば、AAUAAAまたはその変異体など)を含む核酸配列を指す。転写が終結した後、mRNA転写物はポリアデニル化シグナルの下流で切断され得、ポリ(A)尾部が付加され得、これは翻訳の部位、例えば、細胞質へのmRNAの輸送に関与する。

【0069】

本明細書で使用される場合、分子マーカーとは、DNA多型を示す任意の形態学的な、生化学的な、または核酸に基づく表現型の差異を指す。分子マーカーの例としては、これだけに限定されないが、AFLP(増幅断片長多型)、RFLP(制限断片長多型)、SNP(一塩基多型)、SSR(単一配列反復)などが挙げられる。例えば、配列番号2のアミノ酸配列およびその断片をコードする遺伝子の種間の差異を同定し、したがって分子マーカーを同定することを含む、トマト(*Solanum lycopersicum*)と有性生殖的に適合する種との間のゲノム多型の検出の仕方は当業者には理解されよう。例えば、配列番号1の核酸配列および配列番号3の核酸配列の少なくとも1つにおいて分子マーカーを同定することができる。そのように同定された分子マーカーは、昆虫または他の生物を駆除する、あるいは誘引する所望のテルペンの組成を有する植物のマーカー利用選抜に使用することができる。

【0070】

本発明のポリペプチド

本発明のある実施形態は、転写因子、転写因子と相同なポリペプチド、およびその変異体を提供する。

【0071】

「転写因子」という句は、生物内のテルペン生合成に関与する1つまたは複数の遺伝子の発現を調節するタンパク質を指す。転写因子は、DNA調節配列に結合するための1つまたは複数のドメインおよび転写因子の特定のファミリーに特徴的な少なくとも1つの保存されたドメインを保有する。転写因子は、テルペン生合成に関与する1つまたは複数の遺伝子の発現を刺激する転写因子-活性化因子、および遺伝子の調節配列に結合することによってそれらの転写を阻害する転写因子-抑制因子を包含する。

10

【0072】

「ジンクフィンガータンパク質転写因子」とは、ジンクフィンガータンパク質ドメイン、およびジンクフィンガータンパク質結合部位の近傍の核酸配列の発現に影響を及ぼすまたはその発現を調節する種々の転写因子エフェクタードメインで構成される活性化因子または抑制因子を指す。ジンクフィンガードメインは、一般に、約25~30アミノ酸残基の長さであり、C-Xn-C-Xn-C-Xn-C-Xn-C型モチーフ内に多数のシステイン残基を含有し、ここでXは変動し得るアミノ酸を示し、nはX残基の数を示す。X残基は一般に極性かつ塩基性であり、核酸との結合に関与する領域を意味する。亜鉛イオンは、核酸分子のヌクレオチドと相互作用し、結合するように設計されたジンクフィンガードメイン構造の不可欠な構成要素である。

20

【0073】

タンパク質とは、共有結合性のペプチド結合によって連結した任意の長さのアミノ酸配列であり、天然に存在するものであるとまたは合成のものであると、オリゴペプチド、ペプチド、ポリペプチドおよび全長のタンパク質を包含する。ポリペプチドとは、継続的に重合したアミノ酸残基、例えば、少なくとも15残基、少なくとも30残基、少なくとも50残基のアミノ酸配列を意味する。

【0074】

「単離された」ポリペプチドという用語は、組換えによる方法、生化学的方法および合成による方法を含む当技術分野で既知の任意の方法または方法の組み合わせによってその天然の環境から取り出されたアミノ酸配列を指す。

30

【0075】

本発明の実施形態は、配列番号2に記載のアミノ酸配列もしくは断片、またはその変異体もしくは誘導体を有する、単離されたまたは組換えられたポリペプチドを提供する。

【0076】

配列番号2のポリペプチドの「断片」という用語は、本発明のポリペプチドの生物学的機能およびテルペン生合成経路の遺伝子の転写レベルを変更する能力を保持するその部分配列(subsequence)を指し、テルペンシンターゼ5(TPS5)およびテルペンシンターゼ11(TPS11)を含む群から選択される少なくとも1つの遺伝子に作動可能に連結しているプロモーターの核酸配列に結合することができることが好ましい。この用語は、組換えポリペプチドおよび/または集合したポリペプチド、例えば、二量体または多量体などを指す場合がある。

40

【0077】

本明細書で使用される場合、配列番号2に記載のポリペプチドの「変異体」または「誘導体」という用語は、本発明のポリペプチドに対してアミノ酸配列の実質的な類似性を有するポリペプチドを指す。本発明のポリペプチドとその変異体のアミノ酸配列は、アミノ酸の1つまたは複数の欠失、付加、および/または置換によって異なるが、ポリペプチドの機能的な同等性を保持する。一実施形態では、TF19(6)の変異体としては、例えば、配列番号2に対して、長さ全体にわたって少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上のアミノ酸配列同一性を有するタンパク質が挙げられる。アミノ酸配列同一性は、NeedlemanおよびWunschのアルゴリズムおよびGAP初

50

期状態のパラメータを使用してペアワイズアラインメントによって決定することができる。

【0078】

変異体は、別の核酸配列、好ましくはTPS5および/またはTPS11などのテルペン生合成を調節する遺伝子に作動可能に連結しているプロモーター配列に結合することができる、配列番号2のアミノ酸配列を有するポリペプチドから1つまたは複数のアミノ酸の置換、欠失または挿入によって得られたタンパク質も包含する。そのようなタンパク質は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上から、約100、90、80、70、60、50、45、40、35、30、25、20、15アミノ酸までの置換、欠失または挿入を含むことが好ましい。例えば、本発明のポリペプチドのアミノ酸は、変異ポリペプチドが本発明のポリペプチドと機能的に等しいままである限りは、アミノ酸残基の疎水性、親水性、溶解性、極性の類似性に基づいて修飾することができる。あるいは、変異体は、ポリペプチドの主鎖に共有結合または非共有結合によって連結している修飾基の付着によって本発明のポリペプチドと異なってもよい。変異体は、N結合またはO結合グリコシル化部位が導入されていること、および/またはシステイン残基が付加されていることによって本発明のポリペプチドと異なるポリペプチドも包含する。当業者には、DNASTAR(Madison, WI, USA)などのコンピュータプログラムを使用してどのようにアミノ酸配列を修飾し、生物活性を保存するかが理解されよう。

10

【0079】

本発明のジンクフィンガーポリペプチドの変異体または誘導体は、テルペン生合成経路の遺伝子の転写レベル、テルペンシンターゼ5(TPS5)および/またはテルペンシンターゼ11(TPS11)をコードする遺伝子の転写レベルを含め、または特にそれを変更する能力を保持する。

20

【0080】

本発明のポリペプチドは、別の核酸配列、好ましくはTPS5および/またはTPS11などのテルペン生合成を調節する遺伝子の核酸配列に作動可能に連結しているプロモーター配列に結合することができる。

【0081】

本発明のポリペプチドをコードする核酸配列は、別の核酸配列、一般にはコード遺伝子に、そのように連結している遺伝子が転写される場合、「作動可能に連結している」。作動可能に連結しているDNA配列は、連続した読み枠を形成して、「融合タンパク質」、すなわち、種々のタンパク質「ドメイン」または「モチーフ」で構成されるタンパク質を生じる。プロモーター配列と会合したヌクレオチド配列は、形質転換される植物に関して相同起源のものであっても異種起源のものであってもよい。同様に、配列は、完全に合成されたものであっても部分的に合成されたものであってもよい。起源にかかわらず、プロモーター配列と会合した核酸配列は、本発明のポリペプチドに結合した後に連結するプロモーターの性質に応じて発現またはサイレンシングされる。

30

【0082】

本発明の好ましい実施形態では、会合した核酸は、植物体全体を通していつでも、あるいは、特定の細胞および組織において発現または抑制されることが望まれるタンパク質をコードし得る。そのようなヌクレオチド配列は、それを用いて改変または形質転換された植物に望ましい表現形質を付与するタンパク質をコードすることが好ましい。会合したヌクレオチド配列により、植物におけるテルペンの生成が導かれることがより好ましい。ヌクレオチド配列は、昆虫抵抗性、病害抵抗性、他の有害生物に対する抵抗性および/または有益な生物、例えば、害虫の捕食者もしくは捕食寄生者もしくは植物の花粉媒介者の誘引を付与するTPS5またはTPS11およびテルペンをコードすることが好ましい。

40

【0083】

相同なポリヌクレオチドおよびポリペプチド

本発明の配列のホモログ、パラログ、オルソログおよび任意の他の変異体は、植物を、昆虫を駆除するまたはそれに抵抗する、あるいは、有益な生物、例えば、害虫の捕食者も

50

しくは捕食寄生者または植物の花粉媒介者を誘引するようにすることによって同様に機能することが予測される。相同な配列は、配列番号1の核酸配列と実質的な配列同一性または類似性を共有する配列である。相同な配列は、単子葉または双子葉類を含む任意の植物、特に、これだけに限定されないが、トマト、コショウ、ナス、レタス、ヒマワリ、アブラナ、ブロッコリー、カリフラワーおよびキャベツ作物、キュウリ、メロン、スイカ、カボチャ(pumpkin)、カボチャ(squash)、ピーナッツ、ダイズ、綿、マメ、アボカド、タマネギ、エンダイブ、ニラ、根、例えば、クズウコン、ニンジン、ビート、カブ、ダイコン、ヤムイモ、キャッサバ、ジャガイモ、サツマイモなど、およびオクラを含む作物から得ることができる。相同な配列は、トウモロコシ、オオムギ、トウジンビエ、コムギ、ライムギ、モロコシ、イネ、タバコおよび飼料草を含む作物種に由来してもよい。相同な配列は、樹木種および新鮮な果実種、例えば、レモン、タンジェリン、オレンジ、ブドウ、モモ、セイヨウスモモ、フクサスグリ、サクランボ、メロン、イチゴ、およびマンゴーなどに由来してもよく、観葉植物種、例えば、ハイビスカス、ポインセチア、ユリ、アヤメ、バラおよびペチュニアなどに由来してもよい。さらに、相同な配列は、作物種の近縁野生種である植物種に由来してよい。

10

【0084】

例えば、相同な配列は、栽培トマトであるトマト(*Solanum lycopersicum*)の野生型近縁生物であるイヌホオズキ、ペラドンナ(*Atropa belladonna*)、またはトウモロコシに関連するテオシント種に由来してよい。

【0085】

20

相同な配列は、オルソログ配列またはパラログ配列を含む。系統学的方法、配列類似性およびハイブリダイゼーション方法を含むオルソログまたはパラログを同定する方法は当技術分野で既知であり、本明細書に記載されている。

【0086】

パラログは、同様の配列および同様の機能を有する2種以上の遺伝子を生じる遺伝子の重複から生じる。パラログは、一般には、関連する植物種内で遺伝子の重複によって集まり、形成される。パラログは、ペアワイズBlast分析(FengおよびDollittle, 1987年 J Mol Evol:25巻:351~360頁)を使用して、またはCLUSTAL(Thompsonら、1994年 Nucl. Acid Res 22巻:4573~4680頁; Higginsら、1996年 Methods Enzymol 266巻:383~402頁)などのプログラムを使用した遺伝子ファミリーの系統発生解析の間に、同様の遺伝子の群において見いだされる。パラログでは、関連する遺伝子内の配列に特徴的であり、同様の遺伝子の機能を有するコンセンサス配列を同定することができる。

30

【0087】

調節エレメントおよび転写因子をコードする遺伝子は、真核生物において保存されている。例えば、共通の祖先を有する植物種は、同様の配列および機能を有する多くの転写因子を含有することが既知である。これらの配列はオルソログと称される。当業者は、例えば、CLUSTALまたはBLASTプログラムを使用して1つの種の遺伝子ファミリーについての多遺伝子性木を構築することによってオルソログ配列を同定し、オルソログの機能を予測することができる。

【0088】

40

相同な配列の間で同様の機能を同定または確認するための方法は、関連するポリペプチドを過剰発現している、またはそれを欠く(ノックアウト/ノックダウン)植物における転写物プロファイルと比較することによる。50%超の共通する調節された転写物、または70%の超共通する調節された転写物、または90%超の共通する調節された転写物を伴う、同様の転写物プロファイルを有する遺伝子は同様の機能を有することが当業者には理解されよう。

【0089】

相同性とは、ポリペプチドまたはその断片と参照配列との間の配列類似性、または同一性を指す。ポリペプチド配列の相同性は、ポリペプチドによって共有される位置にあるアミノ酸配列の数に基づいて決定される。相同な配列は、当技術分野で既知の化学的手段ま

50

たは酵素的手段によって修飾された本発明のポリペプチドのアミノ酸配列を包含する。Ausubelら(編)2000年 Current Protocols Mol Biol、Willey & Sons、New Yorkを参照されたい。

【0090】

「実質的な同一性」を有するポリペプチドとは、配列番号2の転写因子と十分に類似した、植物において過剰発現、異所発現またはノックアウトされた際に転写因子の生物学的機能を保持する配列を指す。本発明のポリペプチドと少なくとも50%同一なポリペプチド配列が十分に同一であるとみなされる。

【0091】

テルペン合成の調節

本発明の実施形態は、テルペンシンターゼ5(TPS5)およびテルペンシンターゼ11(TPS11)の少なくとも1つから選択されることが好ましい、テルペン合成に関与する遺伝子の発現を上方制御または下方制御し、それにより、経路の下流の産物を改変するために使用することができるポリペプチド、ポリヌクレオチド、その断片またはキメラ遺伝子またはベクターを提供する。

【0092】

例えば、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、その断片またはベクターを、害虫を駆除するため、または有益な昆虫、例えば、害虫の捕食者もしくは捕食寄生者もしくは植物の花粉媒介者を誘引するため、またはテルペン合成に関与する遺伝子の転写レベルを調節するため、および、そのような遺伝子の転写物プロファイルを変更するために植物から放出される揮発性物質を調節するために使用する。遺伝子の変更された転写物プロファイルとは、参照の状態の対応する遺伝子の転写物プロファイルとは実質的に異なる転写物プロファイルを指す。発現レベル間の差異および類似性は、当技術分野で既知の統計学的方法によって評価される。

【0093】

本発明の実施形態は、TPS5遺伝子およびTPS11遺伝子の発現を上方制御および下方制御し、それにより、リナロール、ネロリドール、ゲルマクレン、 α -フムレン、 α -カリオフィレン、 α -エレメン、 α -フェランドレン、リモネン、2-カレンおよびジンギベレン(7S 立体配置)、 α -クルクメン、 α -ミルセン、パラ-シメン、 α -テルピネン、7-エピジンギベレン、 α -テルピネンおよび α -フェランドレンの群からの少なくとも1つのテルペンのレベルを改変することによって植物におけるテルペンレベルを改変するための方法を提供する。

【0094】

本発明の関連する実施形態は、テルペン合成を正に調節する本発明の転写因子を上方制御することによって植物におけるテルペンを増大させるための方法を提供する。例えば、上方制御することにより、植物の化学的防御の一部であるテルペンのレベルを増大させ、それにより、昆虫または病原生物を駆除することができる。

【0095】

さらに別の実施形態では、本発明は、テルペン合成を正に調節する転写因子を下方制御することによって植物におけるテルペンを低減させるための方法を提供する。例えば、下方制御することにより、植物から放出される揮発性テルペン化合物のプロファイルを変化させ、それにより、昆虫または他の有害生物に対する植物の誘引性を低下させることができる。一般に、植物または動物系における転写因子の発現の上方制御および下方制御の方法は、当業者に周知である。上方制御は、植物体全体、植物細胞または毛状突起などの特殊植物組織におけるタンパク質またはポリペプチドの過剰発現に起因してよい。あるいは、プロモーターを変更して本発明の転写因子の発現を上方制御することができる。

【0096】

下方制御は、遺伝子の転写に干渉し、それにより、遺伝子の発現を減少させることによってDNAレベルで起こる。あるいは、下方制御は、RNA分子からのタンパク質の翻訳に干渉することによって、またはRNAスプライシングに干渉してmRNA種を生成することによって

10

20

30

40

50

、RNAレベルで起こる。RNAレベルでの下方制御は、二本鎖RNA(dsRNA)、低分子ヘアピン型RNA(shRNA)、マイクロRNA(miRNA)または低分子干渉RNA(siRNA)を使用したRNA干渉(RNAi)手法によって実現される。RNA干渉の現象は、共抑制、転写後遺伝子サイレンシング、およびクエリング(quelling)としても当技術分野で既知である。HamiltonおよびBaulcombe、1999年 Science 286巻:950～952頁; HammondおよびHannon、2001年 Nature Rev Gen 2巻:110～119頁; Baulcombe、2007年 Science 315巻:199～200頁を参照されたい。

【0097】

本発明の実施形態は、化学的方法または物理的方法のいずれかによって突然変異誘発した植物を用意し、集団内の、テルペン合成を正に調節する本発明の転写因子の発現が減少している突然変異した植物を検出し、突然変異した植物を選択的に育種して突然変異した植物の集団を作製し、それにより、植物におけるテルペンレベルを低減させることによって植物の集団におけるテルペンレベルを低減させるための方法を提供する。集団内の、テルペン合成を負に調節する転写因子の発現が減少している突然変異した植物を検出し、選抜することによって植物集団におけるテルペンレベルを増大させるための代替方法が提供される。

10

【0098】

例えば、突然変異誘発した集団のメンバーの標的配列における突然変異を検出するための方法がWO 2007/037678に開示されている。該方法は、突然変異誘発した植物のDNAを単離するステップと、DNAをプールするステップと、DNAプールから標的配列、すなわち、TF 19(6)の核酸配列を、プライマー対を用いて増幅するステップと、増幅断片の核酸配列を、ハイスループットな配列決定を用いて決定するステップと、断片の配列をクラスタリング(位置合わせ)することによって突然変異を同定するステップと、同定された突然変異を、標的配列の改変された機能についてスクリーニングするステップと、突然変異を有するメンバーを同定するステップとを伴う。

20

【0099】

配列決定は、ジデオキシチェーンターミネーション法(Sanger法)を含む当技術分野で既知の方法、ならびにハイスループットな配列決定方法、例えば、参照により本明細書に組み込まれる、WO 03/004690、WO 03/054142、WO 2004/069849、WO 2004/070005、WO 2004/070007、およびWO 2005/003375、Seoら(2004年)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101巻:5488～93頁に開示されている方法、ならびにHelios、Solexa、US Genomicsの技術などによって行うことができる。配列決定は、参照により本明細書に組み込まれる、WO 03/004690、WO 03/054142、WO 2004/069849、WO 2004/070005、WO 2004/070007、およびWO 2005/003375に開示されている装置および/または方法を用いて実施することが最も好ましい。

30

【0100】

本発明の代替的な実施形態は、植物体、植物組織または植物細胞における遺伝子発現を変更するための方法を提供する。例えば、本発明のポリヌクレオチドを植物体、細胞または組織において過剰発現させることができる。「過剰発現」という用語は、任意の発生段階または遺伝子の位置において、植物体、組織または植物細胞における遺伝子の発現が、変更されていないまたは野生型の植物体、組織または細胞における発現と比較して増大することを指す。過剰発現は、本発明の転写因子をコードする遺伝子が強力な構成的または組織特異的プロモーターの制御下にある場合に起こる。

40

【0101】

本発明のポリヌクレオチドの発現の変更により、トランスジェニックまたは突然変異植物における、および対照または野生型植物における異なる発現パターンである「異所性発現」ももたらされる。発現の変更は、本発明のポリペプチドと外因性または内在性の修飾因子の相互作用から、またはポリペプチドの化学的な修飾の結果として起こる。この用語は、検出レベル未満に変更されたまたは活性が完全に抑制された、本発明のポリヌクレオチドの変更された発現パターンも指す。

【0102】

本発明の代替的な実施形態は、以下のステップを含む植物の集団におけるテルペンの生

50

成またはレベルを増大させるための方法を提供する:複数の植物細胞を、配列番号1に記載の核酸分子を組み入れたベクターを含む組成物と接触させるステップ;複数の細胞内で、テルペン合成を正に調節する転写因子のレベルが対照植物細胞と比較して増大しており、それにより、細胞におけるテルペンが増大しているトランスジェニック植物細胞を検出し、選抜するステップ;細胞を植物体に再生し、植物を選択的に育種して、テルペンが増大した植物の集団を作製するステップ。

【0103】

導入遺伝子を宿主細胞のゲノムに挿入するためのベクターは当技術分野で周知である。本明細書で使用される場合、「ベクター」という用語は、外来または外因性DNAを宿主細胞内に送達するために分子生物学の方法および組換えDNA技術を用いて工学的に操作された核酸分子を指す。一般には、ベクターは、導入遺伝子インサートおよび核酸骨格からなるDNA分子である。ベクターとしては、プラスミド、ウイルス、コスミドおよび人工染色体が挙げられる。キメラ遺伝子が挿入されたバイナリーベクターまたは共組み込み型ベクター(co-integrated vector)を、植物を形質転換するために使用することができる。

【0104】

キメラ遺伝子は、一般に、宿主細胞において転写されるコード遺伝子の核酸配列に作動可能に連結しているプロモーター配列を含む。あるいは、プロモーター配列は、転写される核酸配列が、ベクターのプロモーター配列の下流に挿入されるようにベクター内にすでに存在していてよい。ベクターは、一般には、複製開始点、マルチクロニング部位および選択マーカーを有するように工学的に操作される。

【0105】

選択マーカーの例が下に記載されている。異なる標的種に対して異なる抗生物質または除草剤選択マーカーが適用可能であることは当業者には既知であろう。植物の形質転換において常套的に使用される選択マーカーとしては、カナマイシン、パロモマイシン、ジェネテシン、および関連する抗生物質に対する耐性を付与するnpt II遺伝子(VeiraおよびMessing、1982年 Gene 19巻:259~268頁; Bevanら、1983年 Nature 304巻:184~187頁)、抗生物質であるストレプトマイシンまたはスペクチノマイシンに対する耐性を付与するアミノグリコシド3'-アデニルトランスフェラーゼをコードする細菌aadA遺伝子(Goldschmidt-Clermont、1991年 Nucl Acid Res 19巻:4083~4089頁)、ハイグロマイシンに対する耐性を付与するhph遺伝子(BlochlingerおよびDiggelmann、1984年 Mol Cell Bio 14巻:2929~2931頁)が挙げられる。使用することができる他のマーカーとして、グリホサートに対する耐性を付与する突然変異体EPSP遺伝子(Hincheyら、1988年 Biotechnology 6巻:915~922頁)、イミダゾリンまたはスルホニル尿素除草剤に対する耐性を付与する突然変異体アセト乳酸合成酵素(ALS)遺伝子(Leeら、EMBO Journal 7巻:1241~1248頁)、除草剤ホスフィノトリシンに対する耐性を付与するホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ遺伝子(Whiteら、1990年 Nucl Acid Res 18巻:1062頁; Spencerら、1990年 Theor Appl Genet 79巻:625~631頁)が挙げられる。陽性選択をもたらす選択マーカー、例えば、ホスホマンノースイソメラーゼ遺伝子なども使用することができる(WO 93/05163を参照されたい)。

【0106】

本発明の実施形態は、例えば、プロモーター配列などの会合した核酸配列と融合した本発明の核酸配列を含む組換え発現ベクターを提供する。核酸配列の発現がプロモーターの活性によって駆動されるように、ベクターを使用して宿主細胞を形質転換し、キメラ遺伝子を核ゲノムまたは細胞小器官、すなわち、ミトコンドリアまたは色素体のゲノムに挿入することが好ましい。Arabidopsis、Laboratory Manual WeigelおよびGlazebrook編、Cold Spring Harbor Laboratory Press(2002年)およびManiatisら、Molecular Cloning、Cold Spring Harbor Laboratory Press(1982年)を参照されたい。

【0107】

トランスジェニック植物細胞および植物を得るための方法は当技術分野で周知であり、それらとして、これだけに限定されないが、植物外植片のアグロバクテリウム媒介形質転

10

20

30

40

50

換、植物外植片の粒子衝撃、ウィスカー技術を用いた植物外植片の形質転換、ウイルスベクターを使用した形質転換、植物プロトプラストの電気穿孔、ポリエチレングリコールを使用したプロトプラストによるDNAの直接取り込み、植物外植片および/またはプロトプラストのマイクロインジェクションが挙げられる。アグロバクテリウム媒介形質転換は、本発明の核酸分子を植物外植片に導入するための好ましい方法である。アグロバクテリウム・ツメファシエンス(*Agrobacterium tumefaciens*)は、外因性核酸分子を植物ゲノムに導入するために適するように工学的に操作したTiプラスミドと称される天然のベクターを有する。遺伝子形質転換のために、植物由来の外植片をアグロバクテリウム細胞の懸濁液と一緒にインキュベートし、その後、外植片を、形質転換された細胞の生長および再生のみを促進する選択的作用剤を含有する培地で栽培する。

10

【0108】

形質転換または改変された植物を検出するための方法としては、これだけに限定することなく、サザンブロット分析およびPCRに基づく方法が挙げられる。ガスクロマトグラフィ-質量分析(GC-MS)を用いて改変された植物におけるテルペン含有量を分析するための方法は当技術分野で既知であり、Schilmlerら、2009年 Proc Natl Acad Sci 106巻:10865~10870頁およびAdams、2007年 Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry、第4版、Allured Pub Corp.、Carol Stream、ILに記載されている。生じた形質転換または改変された植物を従来の育種において使用して、テルペン化合物のプロファイルの変更を伴うさらに形質転換または改変された植物を作製することができる。

20

【0109】

本発明の実施形態は、本発明のポリペプチドまたはその変異体に特異的な抗体を提供する。転写因子またはその変異体を異種発現系、例えば大腸菌(*Escherichia coli*)において発現させ、精製し、本発明のポリペプチドに特異的なモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を生じさせることができることが当業者には理解されよう。抗体は、転写因子のアミノ酸配列から合成したポリペプチドまたはその変異体に対して生じさせることもできる。抗体を生じさせる方法は当技術分野で既知であり、HarlowおよびLane、1988年 Antibodies: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory、New Yorkに記載されている。そのような抗体は、植物由来の発現ライブラリーをスクリーニングするために使用され、また、例えば、有益な昆虫を誘引する、あるいは害虫を駆除する揮発性物質を放出する植物を同定するための方法において使用することができる。

30

【0110】

本発明の宿主細胞、植物および組織培養物

「宿主細胞」または「形質転換された細胞」という句は、少なくとも1つの核酸分子、特に、転写されると害虫を駆除または誘引するために有用なテルペンをもたらす所望のタンパク質または核酸配列をコードするキメラ遺伝子を含む遺伝子操作された細胞を指す。宿主細胞は、植物細胞であることが好ましいが、真菌細胞、酵母細胞または細菌の細胞であってもよい。宿主細胞は核または細胞小器官のゲノムに組み込まれたキメラ遺伝子を含むことが好ましいが、染色体外に遺伝子を含有してもよい。

40

【0111】

本発明の実施形態は、配列番号1に記載の核酸配列を含む遺伝子操作された植物細胞および細胞から再生された植物も提供する。本発明の遺伝子操作された植物は、同じ遺伝的背景の遺伝子操作されていない植物と比較してテルペンのレベルが増大している植物を含む。本明細書で使用される場合、遺伝的背景とは、育種系統または生物集団の遺伝子型の基礎を指す。

【0112】

本発明の関連する実施形態は、テルペン、テルペン異性体またはテルペン類似体の生成または分泌が増強されている、トランスジェニック植物から得られる組織培養物、および本発明の組織培養物からテルペン、テルペン異性体またはテルペン類似体を単離するための方法も提供する。

50

【0113】

本発明のポリペプチドを発現させるために適した細胞は、原核細胞および真核細胞、例えば、植物細胞などを含む。本発明のポリペプチドを発現させるために適した植物としては、これだけに限定されないが、害虫の天然の宿主である作物種、例えば、トマト、コショウ、ナス、レタス、ヒマワリ、アブラナ、ブロッコリー、カリフラワーおよびキャベツ作物、キュウリ、メロン、スイカ、カボチャ(pumpkin)、カボチャ(squash)、ピーナッツ、ダイズ、綿、マメ、キャッサバ、ジャガイモ、サツマイモおよびオクラなどが挙げられる。作物種としては、トウモロコシ、オオムギ、トウジンビエ、コムギ、ライムギ、モロコシ、イネおよび飼料草も挙げられる。さらに、植物宿主としては、樹木種、多肉果種、例えば、ブドウ、モモ、セイヨウスモモ、イチゴおよびマンゴーなど、ならびに観賞種、例えば、ハイビスカス、ポインセチア、ユリ、アヤメ、バラおよびペチュニアなどが挙げられる。

10

【0114】

ナス属、トウガラシ属(Capsicum)、タバコ属(Nicotiana)、ペチュニア属(Petunia)などに属する植物を含む、ナス科に属する植物が特に好ましい。好ましい実施形態では、野菜種、特にナス属、例えば、トマト(トマト(*S. lycopersicum*))、ナス(ナス(*S. melongena*))、ペピーノ(ペピーノ(*S. muricatum*))などが含まれる。本明細書で使用される場合、「作物種」という句は、食品、飼料を得るために栽培される植物または炭水化物、油および薬効成分を含む植物由来産物を指す。

【0115】

植物におけるテルペンレベルを調節することによって制御される昆虫

本発明の実施形態は、テルペン生合成の遺伝子の下方制御あるいは上方制御によって害虫に対する抵抗性を増大させ、それにより有益な昆虫を誘引するためまたは害虫を駆除するために植物から放出される揮発性テルペンのプロファイルの変更をもたらすための方法を提供する。

20

【0116】

本明細書で使用される場合、「植物昆虫」または「植物有害生物」という句は、宿主作物および観葉植物に來襲し、損傷を与える昆虫種を指す。「來襲」とは、多数の有害生物が、圃場もしくは温室内、宿主植物の表面もしくは宿主植物と接触する可能性がある任意のものの上、または土壌内に存在することを指す。害虫としては、吸液性害虫、例えば、キジラミ、コナジラミ、アブラムシ、コナカイガラムシ、ウンカおよびカイガラムシなどが挙げられ、共通の性質、すなわち植物液汁をそれらの食物供給源として利用することを共有する。害虫は、アザミウマ、セミ、ダニおよびヨコバイも包含する。

30

【0117】

「コナジラミ(whitefly)」または「コナジラミ(whiteflies)」という用語は、ベミシア(*Bemisia*)属の種、特にタバココナジラミ、トリアレウロデス(*Trialeurodes*)属の種、特にオンシツコナジラミであるオンシツコナジラミ(*T. vaporariorum*)およびバンデッドウィングドホワイトフライ(banded winged whitefly)*T. abutino*を指す。タバココナジラミの生物型QおよびBなどの全ての生物型も、卵、幼虫、蛹および成体などの任意の発生段階と同様に包含される。

40

【0118】

本明細書で使用される場合、「アブラムシ」という用語は、これだけに限定されないが、ワタアブラムシ(*Aphis gossypii*)、マメクロアブラムシ(*A. fabae*)、ダイズアブラムシ(*A. glycines*)、キョウチクトウアブラムシ(*A. nerii*)、*A. nasturtii*、モモアカアブラムシ(*Myzus persicae*)、*M. cerasi*、*M. ornatus*、ナソノビア属(*Nasonovia*)特にレタスヒゲナガアブラムシ(*N. ribisnigri*)、マクロシフム属(*Macrosiphum*)、およびブレビコリン属(*Brevicoryne*)を含むアブラムシ(*Aphididae*)科に属する植物害虫を指す。

【0119】

「害虫」という用語は、本明細書では、これだけに限定されないが、動物、特に哺乳動

50

物を攻撃する、血を吸う、またはかみつく昆虫を含む双翅目(Diptera)の昆虫も指す。吸血性のマダニも包含される。そのような昆虫は、マラリアなどのヒトおよび/または哺乳動物の疾患の媒介動物としての機能を果たし得る。

【0120】

「媒介昆虫」とは、ウイルスを保有し植物に伝達することができる昆虫である。哺乳動物疾患媒介動物に関しては、媒介昆虫とは、哺乳動物を攻撃し、疾患を哺乳動物に潜在的に伝達することができる昆虫、例えば、寄生生物であるマラリア原虫をヒトに、またはイヌ糸状虫をイヌに伝達することができる蚊などである。

【0121】

本発明の改変された植物は1つまたは複数の害虫に対する増強された抵抗性を発生することが好ましい。

10

【0122】

「害虫抵抗性」とは、本発明の改変された植物の、1つまたは複数の有害生物の攻撃に抵抗する能力が、野生型または対照植物と比較して増強されていることである。植物における害虫抵抗性を評価するための方法は当技術分野で既知である。例えば、来襲後または害虫との接触後の1つまたは複数の時点で病害の症状を視覚的にスコア化することができる。あるいは、害虫は、植物への来襲の間にアッセイにおいて検出すること、および場合によって数量化することができる。改変された植物は、組織において検出される害虫の数が、対照において検出される昆虫の数と比較して有意に少ない場合、有害生物抵抗性の増強を示している。植物を害虫の圧力下で生長させた際に本発明の改変された植物の平均収率が対照と比較して有意に増大すること(例えば少なくとも1%、2%、5%、10%またはそれ以上)により、害虫に対する抵抗性の増強の間接的な測定がもたらされることが好ましい。有意差の存在を決定するためには統計学的な分析を用いる。

20

【0123】

ここで完全に説明された本発明は下記の実施例および特許請求の範囲において例示されており、これは、さらなる限定と解釈されない。本明細書において引用されている参考文献はこれによってそれらの全体が参照により組み込まれる。

【0124】

本明細書で参照される配列:

転写因子TF19(6)をコードする配列番号1のヌクレオチド配列:

30

【0125】

【化 1】

ATGGCTAATTTCTTTTCATTAGGTGGGAATCAAGAACAACAACATCAAGAAATTAGCAGC
AGCCAAGCATTAGTACCCACAGAGAGTAATAATTGGTTTTTGTACAGAAATGAACATCAT
CATCATCATCATAATCAAGAAATACCCAACACTTACAAAGGTTTTGAGTTATGGCAAAGT
GGTAACACTCCACAACACCAACACCAACACCACCAACAACAACAGTTTCGTCATCC
GATTTATCCTTTGCAAGATCTTTATTCCACTGATGTTGGATTAGGGGTTGGGCCAAGCAG
AAGTGGCTTTGATATATCTGCAGGTGATCATGAGGCGTCGAGGTCTGGGATTCTGTGATGA
TGAGGAGTGGTGGAGGAGGAATAAGTTGCCAAGATTGTGGGAACCAAGCTAAGAAAGA
TTGTCAACATATGAGGTGTAGGACTTGTTGTAAGAGTAGAGGGTTTCAGTGTCAAACCTCA
TGTGAAAAGTACTTGGGTTCCAGCAGCTAAAAGGAGAGAAAGGCAACAACAACCTTGCTG
CTTTGCAACAACAACAAGGACATAATAATAATAATAATCATAAGAATAAAAGGC
AAAGGGAGGATCCAAGTGCTTCTTCTCTTGTGTCTACTCGTTTGCCTTCAAACACTAATG
GGTTAGAAGTGGGAAAATTTCCATCAAAAGTACGTACAAGTGCTGTATTTCAAGTGTATTC
AAATGAGTTCAATTGAGGATGATGAAGATCAATTAGCATATCAAGCTGCTGTGAGCATTG
GTGGACATGTTTTCAAAGGAATTTTATATGATCAAGGTCATGAAAGTCAGTACAATAACA
TGTTTGCAGCCGAGGCGATACGTCTTCCGGTGGTAGTGCTGGCGGAGTTCAGCACCA
CCACCATAATTCCGCTGCAGTAGCTACCGCCACCACTACAAGTGGTGGCGATGCTACTG
CAGCGGGTCCATCGAATTTTCTAGATCCTTCTTTATTTCCAGCTCCCCTTAGCACTTTTAT
GGTAGCTGGTACGCAATTTTTTCCACCTTCAAGATCTCCTTGA

10

20

【 0 1 2 6 】

転写因子TF19(6)の配列番号:2のアミノ酸配列:

【 0 1 2 7 】

【化 2】

MANFFSLGGNQEQQHQEISSSQALVPTESNNWFLYRNEHHHHHHNQEIPNTYKGFELWQS
GNTPQHQQHQQHQQQQFRHPYPLQDLYSTDVGLGVGPSRSGFDISAGDHEASRSGFVM
MRSGGGGISCQDCGNQAKKDCQHMRCTCCKSRGFQCQTHVKSTWVPAKRERERQQQL
AALQQQQQGHNNNNNNHKNKRQREDPSASSLVSTRLPSTNNGLEVGFPSKVRTSAVFQ
CIQMSSIEDDEDQLAYQAAVSIGGHVFKGILYDQGHESQYNNMVAAGGDTSSGGSAGGVQ
HHHHNSAAVATATTTSGGDATAAGPSNFLDPSLFPAPLSTFMVAGTQFFPPSRSP

30

【 0 1 2 8 】

転写因子TF19(6)をコードする配列番号3のゲノム核酸配列

【 0 1 2 9 】

【化 3 A】

GCAAGTCAAATTGTATATGCTCTTAATTAGGGTTTATGCACCTAGAAGTAGTATTTTAATC
GCATATTAGTTATCGATGTTCTTAAATTAATCGCCTATTAGTTATCGATGTTCTTAAATAT
AATTGACCTAATTACAAAATTAAGATAGAAGTATTATTTTTTCAATTTTATCCTTACAA
GGAGCAATTCTTTTTGAAAGTATGAACCACTTTGTAAAGTTTTTTTTTAAAAAAATCTTAA
AGGAGTAAATCAGTAAACTACCTTTCATATTTATGATTTTTTAAGAAGCATGTAAAGAAA
AAATAGAAAATCAATATAGAACGAAAAAGAATTTTATAAACCTCATAACTTAATAAAAA
GAATCATATTTATAAGAAATATTTTCTTCCCACATGGAATAATAAATTGCACAACTGTAA
ATATTCTCTACTACAATATAATGTTATAACACACGTATACCGTTGGTTTTTCAGTATAAATA
TAATATCCATATTTTAGATATATTAGCTGTAAAAACAATATAATATGGATGGAGACAAGT
TAAATGTATGTAATTTTACCTTGTAATCCCAATTCTCAATATATATATATATATATATATA
TATATATTCCTCCAAGACAAAACATTGGATTTTTATTCTAGGAACCTGAATTAAGAATTCA
ATTTACTCGTAAAAATTAAAAAGAAATTTCTTATGATCTTATCAAATATTTAATAGGTGAAT
AGTTAAATTTGACAAGTTAAATTAAGATGTATGTCCATCACCTCATCATAATTCAAATTATT
TTAACAAATATCCTTAATCATGATCTTCTTTCTTTTATAGGTTGAAATAATTATCATTAGATT
TGTACATAGTATAGGAATATATTAAGAGCTAATATATCTAAAATGTGGATAAATAAAACAA
TTCTTGCTCAAAATTTTAAATAGTTTTAATACTTTTACAATACTTGACACGCGGCATTATAT
AGCCAACAATTTTACGGGCTAAGACATAACATTTATCTTGGAATTTCTCTATTATTAATCA
TTAGCTTAGATTGTCTGAGTTTTTGAAGGTCTTTTATTTAGTTATAGGCAATTTTACCTAG
TTTTATAGAATTAATTTATTGTCCGTTGTTATATTTAGGTAAGAAAAAAGTTAATAAATC

10

20

【 0 1 3 0 】

【化 3 B】

AGACAAGAAAATATAAAGAACCGAAATAATTATGTAATGCCTAAAATAGTTGGTTTTATAT
ACATAAAGACTGTTGAAAATTGAAATTAATATTGCGGCTCCTTCATTTATTGGTATTACTG
TTAATTACGTGATTGAAAGGAAAAAAAAAGTTTTACCAAAAAAAAAAGTATAAAAAATAAGTTT
TGTACTTTATGTCAACAGTTAGTCATCAATAGTTACTGCTATAATACTAGGTGCCAACACT
ATGTATAATTCGAATGTGATAATAATTTCTGGAAAAAAAAATTAAAGGATATTTGATTGA
TATGGTCCTAGATAATGTAGATGATGAAGGGGTGTTAATTAGTCGTTTCAAATTGATAGG
TTATTTTGAAAAATTGTGCATATTAATTGTTTATATTTTCAATGATGTATGATTAATAATTAA
AATTTTGAATCTGTCTTAATCGTTTTGGTTTCTCTTTGATTTAGGTATAATTCAAATTGAT
GGTTAATTTTTTAAACGTCATCTAACAACATAAAAATTTGATAAAAAATATTTAAAATTTA
CAATAACATAAAATGAAAATATGTTTTCCAACATAACCAATTTAGGAGGAGAAACATAGTT
ATTGTTTTACTATTATCGCTAGTATTATGAATGAGATATGAAAATTTATATTAATTTATATT
GGAATCTATAATTGATTTTATTAAAAAAATTAAGTGCGTGTACTTTGACATTTTTTTTTGTT
TTAACTCGGCATTCAAAGTTCATATTGAAGTTTTAACTAAATTCGAATCGCACTCTTCAG
AGCAATGCAGGGATGGGTCTCCCAACAACATTTTGTGATAGTCTATACCCAGAGCTCG
AACTTAAGACCTCTGATTAAGAATAAAATACTTCATTTATAAACTGATCATCTTAATATTTT
CAAAATTTAAATGTCACATATTTTCTAAGATATCCTCGAAACATAATAAAGTTGAAATG
TATAATGTTTGATTGAGACTAACTGAGGCGTTTATATATACAATCGTAGAATTAAAATAT
TTAATTGCCATCTGAAAATTAATTTAAATATTTATCTATGTACTATACCTTAATTAATTCCTT
CATGACAACTTTCTTGACATTTTTTTCATGAAAAATGCATATAACTTAAACAAGGCCGAT
ACCTTACACCCAAATTGGACAGTATATTTAGAAGAGGGGGAATAATGGTAAAGAGGGCC
GGTATCAGGTTTACACAGAGATGAAAAGTTAGGTGGAGTTTATTTGTTCCGATGGATTTA
TCAGTTTTTTCGTAGATTTTATATTTATATTAGATTCTTTTTTTTACGTATATATTAAATTAT
AATCCCTAAACAAATTGATTTAGAATCTCAAACCTCATAATCTTAACTTCGCCCTAACTTT
TATATATATATATATATATAATATTTTTAATATATCATTAGTTACACATTATTTTTTATATT
ATGTTGTGTATTACTGATGAATAATGATTTATGGAAATACAAAAAGCTCTTATTCAGTAAT
ACATACATTAGTATGATCATCTTTTTTTCACATTCTTCCATCGCGATATATGTTTTTTTTT
AACTATAACACAATAAACACTGCATTAATAATAATTGTACATATTTTTTGTGTCTCAATTT
ATGTGATACCTTTTAGTTTTTTAAGAGCTAAACAATTTAAATTTGAGCGAGAATTTACGCA
TGAAATTTTCGAAAATTCTAAAAAGAAATTTATATATTAATAAAAACTACGTAAAAATACTA
TAAGACACAATAATTGACAATTCAAAATATTTAAAGTCAAAGATATACCTATTTGAATTC
AAAATCTGAAAAGTATCACATAAATAGGAGGAGAGAGTAACGAATATCAATATTAATGAT
ATATTATATTCACCACTAATATTCTTAAAAATAAATATTAACCAACCATTAATTCGATGT
GAATTATTAGTTTGATCCCTGAACTATTGACAGTATTATAAACACTCCTCTACTGGGTTAG
ATGAACTTAAATACACACTCGATCTTGTACAATGATGAAATACACCCTAATGAAAATCAT
ATTTACTCTTCCTATTTCTAACCATCGGAAAGAGTCATCGTGGCTAGGAACTATACTAG
CGACCTACCCAATTCATTATAGAAATTTTCGCGATCAATGATTGAAAATTTAGAATGTTTC
CAACACTTTATCTGTCAACTTTTTATTAAGAGTTTCAAGCTCGTATAAGAATTTGAAATCA

10

20

30

40

【 0 1 3 1 】

【化 3 C】

CTTTTAGTATATCATGTAGTAGATCTAAATATATTTAAAATTATTATAAATTTTTTTAAAAA
ACTAATAATTCACACTAAATTGACAAATATCTTCAATACTTAGCTTCTCACTTATTTTATAC
GACCTACCAAACAATCGCGAAACTTTTTAAGTTACTGCAAACGTAGCGGTAAAGAGAG
GGGAGGGGGGGGGGGTAGTTGTGGTGCTTTTTAGCGTTGGCGGCGTTTGCAGAGCTG
TAATATATATAATATACCTTTTCTATTAATGTACCCTCACTCACTCACTTCTCTCCATAAT
TCTTTATACAAACAATCATTTTTTCTTAACTTGCTCTATTATAAATTCACATTTTTTCTTTA
TATATACACATACATATAGAGCAAAAAAGAAGTTCTAATTTTGTAACCCTTCAAAAAAAA
GAAAAATAATTTTTTTTGAGATCATAAATGAAGAAATCCAAGGGATACAAACATCATATTT
GTGTTATAAGTTGGTGCACTTTTGTGGTATGGATTGTGATTAATCACTAATCATAATCAAG
ATTAACAACAAGTAATGGCTAATTTCTTTTCATTAGGTGGGAATCAAGAACAACAACATC
AAGAAATTAGCAGCAGCCAAGCATTAGTACCCACAGAGAGTAATAATTGGTTTTTGTACA
GAAATGAACATCATCATCATCATATAATCAAGAAATACCCAACACTTACAAAGGTTTTGA
GTTATGGCAAAGTGGTAACACTCCACAACACCAACACCAACACCACCAACAACAACAAC
AGTTTCGTCATCCGATTTATCCTTTGCAAGATCTTTATTCCACTGATGTTGGATTAGGGG
TTGGGCCAAGCAGAAGTGGCTTTGATATATCTGCAGGTGATCATCAGAAACAGATTTAG
AATTTAACTTTATCTATTTCAGTACTTTCTAAAGTACTTATAGATCTATAATTTAAGTTTGA
TAAATTTAATATTTATGTTCTAAACAATTCACAACATTTTGCAATTAGGGATTTTCGAAACGT
ATTTACTGAAGCATGTTAGAATTCCCAGCCTCGAAAAGGCATGGGAATTTGGTCTATGG
ACTTGGGAAATTCTCCATTCATGAGCTAACTTTTGAGGTAAATTAGGTTTCATATGTCATA
TCTTTACATGATATCAGAGTAAGATTCATCTCAATTCTTTGTTCACCAATATTGGCCCCC
ATATTATTGTGTCCACAATCTAGTTAACCTACGCTGGCCCCCTCCATATTACAGTGTCCAC
GTTCTAGTTAACGAGATCTGGGCTTGCAAGAGTGTAAGAATTCAGAAAAAGGATGA
GTATTTGGTCTCCTTGATATAAACTTGAGCAATCCTTCCTTCATGAGCTAGCTAGTTTTGG
AATTAAGTTAGACTAGATGTCATATCTTTTAATATTTATGTTCTCACTGTAGAACCATATA
GCAACGAACTATAGTACTATTTGTTGCACCGCTCTCTCTATATATATCGTGCATATTAAG
TTCAATTGAATCTGTTGCTAAAAGGCGGGATGGGGATTATTATTGTGCAGGTGATCATGA
GGCGTCGAGGTCGGGATTCGTGATGATGAGGAGTGGTGGAGGAGGAATAAGTTGCCA
AGATTGTGGGAACCAAGCTAAGAAAGATTGTCAACATATGAGGTGTAGGACTTGTTGTA
AGAGTAGAGGGTTTCAGTGTCAAACCTCATGTGAAAAGTACTTGGGTTCCAGCAGCTAAA
AGGAGAGAAAAGGCAACAACAACCTTGCTGCTTTGCAACAACAACAACAAGGACATAATAA
TAATAATAATAATCATAAGAATAAAAGGCAAAGGGAGGATCCAAGTGCTTCTTCTTTGT
GTCTACTCGTTTGCTTCAAACACTAATGGTAAAGTACTTCATGTTTTTCTTACCTTTTCA
TTGCTACGTCTGTTTTAATTTAAAGGTCTTAGTTTGAAGTGAACATGAATATAAGATGTTGA
AATTGAAAAACGTAGATAAATATTTAAATTGAAACGAGGGAATAATTAATTTTTTTTGT
TCACACAAAGACATAGAGTCTTGAGATCCATCATGTAAAGAAGATTAATTTGATCATTGC
CTAAATGAATTCTATATAAAGTAAGTCTATAGAGAAAAGAGACCCTATAGTAAATTCGTCA
GCTTTTTCTTTTTCTATTTGTCATTCTCTTCCATCATCACTCTTCTTTTTTATTACTCTA

10

20

30

40

【 0 1 3 2 】

【化 3 D】

CAAAAGATTGACAAAATTCGTAATGAGATATATTCAAATTTTTGAGTTAATTATGAATTTT
TAATTCTAGTTAATAGAAAGTGTGAATAAATTATTTATATGTATTACTAACAAAATAGCAAA
ACTAAAACTTTACTTGTACCCTTGCGCGTGTGTATGCACAATTTCTTCTCTTAGACCTAC
ACATGATATTTATCTCGACCCTAAAAAGATCACCATTATTCTTAATTTCAATTTTCGTCAAT
TTTTTTTTAAGATAATAACTATTATTTGAGTAATAATATATGTGACTTACCCAAAAAACTGT
TAGTGGAGTGAGTATTTGAGAAACCAACTCTCTAATTCATGTATAATAATTGGTGTATCA
TATATTGTCATTAGTATTGGAATTAACCTATATATCTATTAGTAAATGTACTTTTGAAATAA
TAACTATTATTTGAGTAATAATATATGTTGCTTACCAAAAAAATAACTATTAGTTGAGTGG
CTATTAACCTCTCCAAATATGTATAAATTTGGTGTATCATTTTCATTAGTATTGGAATTA
CTTATATATATAGTAAATGCACTTGCAATTTCAAATTTTTTTACCTGCTTTTCCTTTTAGTTC
GATTAATAAATTGACTATTTTTCAAGCAAGTGTTTATTCTAACTTTTCAGATGAAATGT
TTAAAAAAACCACAAGATTAAATAGTGTTTTGATACATTTGACATATTTTAGTTTTAGACC
ATAAAATTCAAATTGCTTTACTAAATTTCGTGTCAAGTGATACTAGGTAAAAAAAATATT
TATTTGCAATACATTAGTCCAAATAAACCTAATTTTGTATTATGGAATTTTCATGTGTTATTT
TTAGGGTTAGAAGTGGGAAAATTTCCATCAAAGTACGTAAAGTGCTGTATTTCAGTGTA
TTCAAATGAGTTCAATTGAGGATGATGAAGATCAATTAGCATATCAAGCTGCTGTGAGCA
TTGGTGGACATGTTTTCAAAGGAATTTTATATGATCAAGGTCATGAAAGTCAGTACAATA
ACATGGTTGCAGCCGGAGGCGATACGTCTTCCGGTGGTAGTGCTGGCGGAGTTCAGCA
CCACCACCATAATTCCGCTGCAGTAGCTACCGCCACCACTACAAGTGGTGGCGATGCTA
CTGCAGCGGGTCCATCGAATTTCTAGATCCTTCTTTATTTCCAGCTCCCCTTAGCACTT
TTATGGTAGCTGGTACGCAATTTTTTCCACCTTCAAGATCTCCTTGATCGTCCACATTGAT
AATATTGAGGTGCTTTTTTAATTTTATGTCAAGAGATTTGTTTTTAATTGAAGTATTGATG
TTGAATTGAGTTGTTTACATTAATTCTCTTTGATTCTACATGAAGTTGTTTTTTTTCTCT
AGTTCCTTATGGTTAATTATTGGTATCATATAGATTTGCTTTTTTATTTACGTTAAGATGA
TAATATAAGATAAGATGATAATATACTTAAATGTATATATGTTTTGGGTTGAGTCTTACGA
TTACTTATTATTAGAATTTTTTGTATGTGTATTCGGCTCATAATGTGCCAAAAGATAACAA
AAGCAAAATTTAAGAGCATTACATAATATTATAAGTTTGTGATGGACTGTAAGTATATTT
TAGATTTTTTAATTAGAGTTTTTAAATTTAAACCTAAAAGAAATCGTATTTAAAAAGAGCAG
TTTACCCTATAAGTGATTTTTTTAAGAATAAATATGGATTAGTCGAACCCAATAGTCGGGC
AACAGTTAGAAGCTAAAAAAGATTATAATTTTAAGAAAATACCTACTTTATAAAATTGAGA
TATTTGGTTAAGTTTTTAGAGGGGGAAAAGAAATGTGCTTTTGAATAATAGCATGAATTA
ATCTTTACAATTAGAAAAAAAGAAAATTAATAACAAAAAGTAATTGTGAAATTAGGTCA
AGCACAACTAAGGTTCTAAACTGATTTTAAAAAAAACTTTTAAATTAATTAATCAACA
CAAAATTATTACTCTCCAAAAATTTTTCTACATAATACTTATCAAAATAAATATATTTAGA
AAATTTGGCCAACTAACATGACTCTTCTTGATTAAGCACATAAATCAAGTTGTTAATAAA
ACTTTGGCTTTATAGCAATGACTCATTTGCTTTCAAAACATAAAAAAATGAACAAACATTA
AATATATATTTAACGGAGTAAGATATATTCCAACTAGGACACTAGAAATGGTGAAAGCT

10

20

30

40

【 0 1 3 3 】

【化 3 E】

TAGTACGTTTGGAAACATCAATTCAATTAACTCGAATGTCAGTCTTAACTTGTCTTAATA
 TATGTGATAATATTTGATGGATCTTAAATATTATTTCTTTAAAAAATAATTATTCGTTAGAA
 GGACAATAAGTGCTACAATGACTTAAATTTCTAAATTTTCAACTAGGCATAATCCTTCAA
 ATAACCTTTCATCATACTTTTGAATAATTAATATGATATTATTGAAGTTATGTAAATTTTCAT
 GTTTCGGGCTTGTTCGGGTTTTTAAATATCAAATCAAATTATTCGTGTAAAATTTTAA
 ATTATAAATCAGACCAAATTAATAAAATTCAGATTTTTTCGGGGTTTTCAACTCTGGGTTG
 ATTCGTATTTTTCAAGTACCAAACCAAACCATTGTGTGCAATTTTTAAATTTTAAATCAAAC
 CAACTAATAAACTTCGGATTTTTCCAGATTTTTAGATTTTTCGGGTAAAGTTTGCATACA
 AACATATAATTAACCTGTGCTCCAAATATTTCTTTAGTCCAACCATAATATAATTATCTAAG
 GTATTTCTTGAAAAAATTACACAAAAGATGAGATGAGTATTGATGACACAAAAATATTCAA
 TAAAAAATAACAATAAATCATCATATAAAATAAATATTGTAAAGTCATAATGAAAATAATCA
 TAATTTAAATTTTTAAATCATGCTAAATAAGTTTAATAAGTATTAGTTACATTATTAAATA
 TTTAAGGAAAAACAAAATTAGATTATGTAAATAAATATAAACTAAAGAACAAATATTCAA
 TATTATTGTCATTTTTAGTGTTGAATTGATTTTTCTTTTTGCATTAGTATTAATTTAATTTT
 AATTTAAGCTTTATTATAATTATCAATCTATGAACTATAATCTATATTGGACCATTCCAAAT
 TCTATATTTTAACTTGAAACAATATATTAAGTTAACTATGAAATAGTATAAGAAAT
 ATTTTAAATAATATCAACGTAAATATTTTATGTATAAAATAATTTTTACACATATAATATA
 AGGATTTTTTTCCCGATTTGATTCAATT

10

20

【 0 1 3 4 】

(実施例)

(実施例1)

植物性材料、ホルモン処理およびRNA単離

トマト植物体(トマト(*Solanum lycopersicum*)栽培品種MoneyMaker)を、温室内の土壌で、昼/夜温度23 ~ 18 および16/8時間の明/暗レジメンで4週間にわたって生長させた。毛状突起を、液体窒素で凍結させた幹片をボルテックスすることによって、50mlのチューブの底に収集した。残ったきれいな幹セグメントを徹底的にブラシでこすって残っている毛状突起材料を全て除去した(むきだしの幹試料)。幹全体(毛状突起を含む)および葉も液体窒素で凍結させ、材料をすりつぶし、Trizol(Invitrogen、Paisley、UK)を使用して全RNAを単離した。

30

【 0 1 3 5 】

ジャスモン酸(JA)を、水道水を用いて作出した0.05%SilwetL-77を含有する1mM溶液を吹き付けることによって植物に適用した。対照植物には0.05%SilwetL-77を含有する水道水を噴霧した。24時間後に上記の通り毛状突起を採取し、全RNAを単離した。DNase(Ambion、Huntingdon、UK)を製造者に従って使用してDNAを除去し、cDNAを、1.5 μgのRNAからM-MuLV Reverse Transcriptase(Fermentas、St. Leon-Rot、Germany)を製造者に従って使用して20 μlの体積で合成し、それを50 μlまで希釈した後、PCRのために使用した。

40

【 0 1 3 6 】

(実施例2)

構築物および安定な植物の形質転換

完全なSITPS5プロモーターおよびその5'欠失の系列を、PCRを使用して生成した。SacI制限酵素部位を各フォワードプライマーの5'末端に創出し、リバースプライマーの3'末端にXbaI制限酵素部位を創出した。50ngのプラスミドDNA pKG1662adp-SIMTS1 p:GUSを鋳型として使用し、0.25単位のPhusion Hot Startポリメラーゼ(Finnzymes、Espoo、Finland)、0.4mMの濃度の各プライマーおよび反応体積25 μl中0.2mMの濃度のdNTPを用いた。MgCl₂を、最終濃度0.3mMでPCRミックスに加えた。サイクリングプログラムを、98 で1分、98

50

で10秒を30サイクル、58 で30秒、72 で60秒、その後、72 で5分の最終的な伸長、およびサーモサイクラーから取り出すまで12 に冷却することに設定した。

【 0 1 3 7 】

使用したプライマー(5' 3'配列、数字は各プライマーの5'ヌクレオチドの位置を示す。開始コドンATGのAが+1に割り当てられている)：

【 0 1 3 8 】

【化 4】

SI_TPS5p -18 R GCTCTAGATTTATTTGTTCTGCTCAA (配列番号 4)

SI_TPS5p -1253 F2 CGAGCTCGTTTCATTCAAAGTAGTGG (配列番号 5)

10

SI_TPS5p -1045 F CGAGCTCAGCTGAACCAAATCCCAA (配列番号 6)

SI_TPS5p -805 F2 CGAGCTCGTCCTATTTTCCATATTG (配列番号 7)

SI_TPS5p -612 F2 CGAGCTCATCAACAGTATTAAATGTGCTTC (配列番号 8)

SI_TPS5p -408 F2 CGAGCTCAGTAATAATGAAAATCGCATCG (配列番号 9)

SI_TPS5p -207 F2 CGAGCTCACATGTGCTATTTTATGCTA (配列番号 10)

【 0 1 3 9 】

Invitex(Palm Springs, CA, USA)カラムを製造者のプロトコールに従って使用して6つのPCR産物を精製した。その後、それらを、SacIおよびXbaIを用いて二重に消化し、ベクターpJVIIのSacI部位およびXbaI部位にある黄色蛍光タンパク質(sYFP1)と融合した -グルクロニダーゼのATG開始コドンの上流にライゲーションし、CaMV35Sプロモーターと交換した(図1)。PCR産物を配列決定によって検証し、発現カセット(プロモーター断片+GUSsYFP1+NOSターミネーター)をバイナリーベクターpBINplus(van Engelenら、1995年 Transgenic Res 4巻:288~290頁)に、制限酵素SacIおよびSmaIを用いて消化し、同じ制限部位にあるpBINplusの多重クローニング部位にライゲーションすることによって移した。これらの6つの構築物および空のpBINplusベクターをアグロバクテリウム・ツメファシエンズ株EHA105に導入し、以前報告された通り(CortinaおよびCulianez-Macia、2004年、Plant Cell Tissue and Organ Culture 76巻:269~275頁)、トマト(Solanum lycopersicum)栽培品種Moneymaker(MM)の滅菌実生の子葉に由来する外植片を使用してトランスジェニック植物を創出するために使用した。

20

30

【 0 1 4 0 】

(実施例3)

トランスジェニック植物の分析

空のpBINplusベクターから1つのトランスジェニック系統が得られ、全長のSITPS5プロモーター構築物から4つの独立したトランスジェニック系統が得られ、1045bpのSITPS5プロモーター構築物から3つのトランスジェニック系統が得られ、805bpおよび612bpのSITPS5プロモーター構築物については5つのトランスジェニック系統が得られ、408bpのSITPS5プロモーター構築物については8つのトランスジェニック系統が得られ、207bpのSITPS5プロモーター構築物については9つのトランスジェニック系統が得られた。導入遺伝子の挿入を、異なるT0系統の葉から単離されたゲノムDNAに対するPCRによって検証した。

40

【 0 1 4 1 】

使用したプライマー(5' 3'配列)：

【 0 1 4 2 】

【化 5】

pJVII_1182GUS_R CCACCAACGCTGATCAATTC (配列番号11)

pJVII_6936_F ATGTGCTGCAAGGCGATTAAG (配列番号12)

【 0 1 4 3 】

50

PCRを、体積25 μ lのTaq DNAポリメラーゼ(Fermentas、St. Leon-Rot、Germany)を製造者に従って用いて実施し、使用したサイクリングプログラムは、95 で2分、95 で30秒を30サイクル、58 で30秒、72 で90秒、その後、72 で5分の最終的な伸長、およびサーモサイクラーから取り出すまで12 に冷却することに設定した。

【 0 1 4 4 】

T0植物の最初のYFP発現を蛍光立体鏡の下で推定し、それは植物のVI型毛状突起の「頭部」に特異的であることが決定された(データは示していない)。毛状突起を上記の通りT1植物から単離し、粗抽出物をJefferson R.A.ら、1987年、EMBO J 6巻:3901~3907頁に従って調製し、酵素的GUS活性を、4-メチルウンベリフェリル -D-グルクロニド(MUG)を基質として使用して分光光度測定によって決定した(図2)。

10

【 0 1 4 5 】

(実施例4)

酵母ワンハイブリッドおよびクローン19(6)の同定

207bpのSITPS5プロモーター断片は、全長のプロモーターの毛状突起特異的活性よりは弱いものの、毛状突起特異的活性を示し(図2)、したがって、この断片を酵母ワンハイブリッド(Y1H)アッセイのために使用した。

【 0 1 4 6 】

フォワードプライマーの5'末端にEcoRI制限酵素部位を創出し、3'末端にXbaI制限酵素部位を伴うリバースプライマーSI_TPS5p -18RをPCRにおいて使用して、クローニング用の207bp断片を生成した。PCRは、Phusion Hot Startポリメラーゼ(Finnzymes、Espoo、Finland)を用い、伸長時間が72 で30秒であった以外は上記の通り実施した。

20

【 0 1 4 7 】

使用したプライマー(5' 3'配列):

【 0 1 4 8 】

【化 6】

SI_TPS5pEcoRI_207F CGGAATTCACATGTGCTATTTTTATGCTA(配列番号 13)

【 0 1 4 9 】

PCR断片を、Roche(Almere、Netherlands)カラムを使用し、製造者のプロトコールに従って精製した。次いで、それをEcoRIおよびXbaIを用いて二重に消化し、同じ部位にあるpHISiベクター(Clontech、Mountain View、CA、USA)の多重クローニング部位にライゲーションした。配列を検証した後、構築物を、Clontech MATCHMAKER One-Hybrid Systemマニュアルに従って酵母pj69-4aゲノムに組み込んだ。トマト(Solanum lycopersicum)栽培品種Moneymakerの毛状突起由来のmRNAを用いて創出したcDNAライブラリーを製造者のプロトコール(Clontech、Mountain View、CA、USA)に従って3回スクリーニングした。3回のY1Hスクリーニングにより、76クローンがもたらされ、その中の1つの推定転写因子19(6)は32回出現した。クローンについて、ライブラリーベクター(pAD-GAL4-2.1、Stratagene、Santa Clara、CA、USA)に適合するプライマーおよび得られた配列に対して設計した特異的なプライマーを使用して配列決定して、全長のクローンを得た。

30

【 0 1 5 0 】

40

使用したプライマー(5' 3'配列):

【 0 1 5 1 】

【化 7】

pActF TAATACCACTACAATGGATG (配列番号 14)
 pAct_seqR CAACTGTGCATCGTGCAC (配列番号 15)
 19(6)_seqF TTATGGCAAAGTGGTAACA (配列番号 16)
 19(6)_seqF2 TCAGTGTCAAACATCATGTG (配列番号 17)
 19(6)_seqF3 AAGTACGTACAAGTGCTG (配列番号 18)

10

【 0 1 5 2 】

候補転写因子を、JA-誘導能および毛状突起特異性について定量的リアルタイムPCRによって確認した(図3)。異なる組織cDNAおよび対照cDNAおよびJA処理した毛状突起cDNAを上記の通り得た。

【 0 1 5 3 】

(実施例5)

リアルタイム定量的PCR

ABI 7500 Real Time PCR System(Applied Biosystems、Carlsbad、CA、USA)で、Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDGキット(Invitrogen、Paisley、UK)を使用してRT-Q-PCRを実施した。各20 μ lの反応物は0.25 μ lの各プライマー、0.1 μ lのROX参照色素および1 μ lの鋳型cDNAを含有した。サイクリングプログラムを50 で2分、95 で7分、95 で15秒を45サイクル、および60 で1分および融解曲線分析に設定した。プライマー対を、標準のcDNA希釈曲線を用いて特異性および直線性について試験した。トマトアクチン遺伝子(ACT)を構成的に発現される対照遺伝子として使用した。

20

【 0 1 5 4 】

使用したプライマー(5' 3'配列):

【 0 1 5 5 】

【化 8】

ACT_QF TTAGCACCTTCCAGCAGATGT (配列番号 19)

30

ACT_QR2 AACAGACAGGACACTCGCACT (配列番号 20)

19(6)_QF TACAAGTGGTGGCGATGCTAC (配列番号 21)

19(6)_QR ACCTCAATATTATCAATGTGGACAATC (配列番号 22)

【 0 1 5 6 】

(実施例6)

トランス活性化アッセイ

DNA結合活性をトランス活性化アッセイにおいて確認した。NcoI制限酵素部位をフォワードプライマーの5'末端に創出し、SacI制限酵素部位をリバースプライマーの3'末端に創出し、Phusion Hot Startポリメラーゼ(Finnzymes、Espoo、Finland)を使用して上記の通り実施したPCRにおいて全長のcDNA19(6)を生成した。50ngのプラスミドDNA pAD-GAL4-2.1_clone19(6)を鋳型として使用した。

40

【 0 1 5 7 】

使用したプライマー(5' 3'配列):

【 0 1 5 8 】

【化 9】

NcoI_19(6)F catgccATGGCTAATTTCTTTTCATTAGG (配列番号 23)

SacI_19(6)R cgagctcTCAAGGAGATCTTGAAGGTG (配列番号 24)

【 0 1 5 9 】

PCR断片を、Roche(Almere、Netherlands)カラムを使用し、製造者のプロトコールに従って精製した。次いで、それをNcoIおよびSacIを用いて二重に消化し、ベクターpKG1662-35S:GUSの同じ部位にある35Sプロモーターの下流にライゲーションし、 β -グルクロニダーゼと交換した。PCR産物を、配列決定によって検証し、35Sプロモーター、転写因子19(6)およびnosターミネーターを含む発現カセットをバイナリーベクターpBINplus(van Engelenら、1995年 Transgenic Res 4巻:288~290頁)に、制限酵素HindIIIおよびEheIを用いて消化し、HindIIIおよびSmaIを用いて消化したpBINplusの多重クローニング部位にライゲーションすることによって移入した。構築物をアグロバクテリウム・ツメファシエンス株GV3101に導入した。

【 0 1 6 0 】

5週齢のベンサミアナタバコ(Nicotiana benthamiana)の葉を、種々のプロモーター:GUSレポーターおよび35S:19(6)エフェクター構築物を保有するアグロバクテリウム・ツメファシエンスGV3101培養物に共浸透させた。詳細には、使用したプロモーター構築物はpBINplus-ShMKS1 p:GUS、pBINplus-SITPS11 p:GUSおよびpBINplus-SITPS5p:GUSであった。これらの構築物は、PJVII-GUSSYFP1ベクターに、それぞれSITPS5、SITPS11またはソラナム・ハプロカイトスメチルケトンシンターゼ1(ShMKS1;Fridmanら、2005年 Plant Cell 17巻:1252~1267頁、2005年3月16日オンライン公開)プロモーター配列をSacI部位とXbaI部位の間、および黄色蛍光タンパク質(sYFP1)と融合した β -グルクロニダーゼ(GUS)をコードする核酸配列をXbaI部位とBamHI部位の間にクローニングすることによって作出した(PJ VII-GUSSYFP1の概略図が図1に示されている)。対照pGreen-35S:RFPエフェクター構築物も使用した(pGreen;Hellensら、2000年、Plant Molecular Biology 42巻:819~832頁)。浸透エラーについて補正するために、pBINplus-35S:LUCを保有するA. ツメファシエンスGV3101培養物も、各培養混合物に5(プロモーター:GUS):5(35S:TF):1(35S:LUC)の比率で加えた。2日後に、浸透領域からリーフディスクを採取し、液体窒素で凍結させ、25mMのトリスリン酸、pH7.8、2mMのDTT、2mMのCDTA、pH7.8、10%グリセロールおよび1%トリトンX-100を含有する抽出緩衝液中の粗抽出物を調製した。酵素的GUS活性を、4-メチルウンベリフェリル β -D-グルクロニド(MUG)を基質として使用し、Jefferson R.A.ら、1987年、EMBO J 6巻:3901~3907頁に従って分光光度測定によって決定した。ルシフェラーゼアッセイを、同じ抽出緩衝液を使用し、van Leeuwenら、2000年、Plant Molecular Biology Reporter 18巻:143a~143t頁に従って実施した。各試料について酵素的GUS活性をルシフェラーゼ活性について正規化し、結果が図4に示されている。

【 0 1 6 1 】

図4に示されている通り、35S:19(6)エフェクター構築物により、pBINplus-SITPS5p:GUSにおけるGUS活性が対照pBINplus-ShMKS1 p:GUS構築物よりも10倍高く活性化された。さらに、エフェクター構築物により、pBINplus-SITPS11 p:GUSにおけるGUSも対照の7倍活性化することができた。

【 0 1 6 2 】

これらのデータにより、TF19(6)のSITPS5プロモーターおよびSITPS11プロモーターを活性化する能力が確認され、TF19(6)をTPS5およびTPS11の発現レベルの調節において使用することができ、またTF19(6)により植物体、組織または細胞におけるテルペン含有量が変更され得ることが示されている。

【 0 1 6 3 】

(実施例7)

TF19(6)配列同一性

10

20

30

40

50

ポリペプチド配列同一性を、Altschulら 1990年 J Mol Biol 215巻:403~410頁に記載のBLASTアルゴリズムを使用して決定した。BLASTプログラムは、National Institute of Health、USAのウェブサイトでNational Center for Biotechnology Information(NCBI)を通じて公的に入手可能である。

【0164】

BLAST相同性検索により、TF19(6)のアミノ酸配列が、オーキシンによって誘導されるジンクフィンガーモチーフを伴うシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)SRS(短節間関連配列(short internode related sequence))型転写因子のメンバーである側根原基(LRP1)タンパク質と比較して、タンパク質全体の長さにならって40.68%の同一性を有することが同定された。TF19(6)内に2つのジンクフィンガー型ドメイン:N末端部分にあるジンクフィンガードメイン(アミノ酸128~170)およびC末端にある小さな保存されたLRP1型ドメイン(アミノ酸224~272)が見いだされた。本発明のポリペプチドは、SRS型転写因子の、機能特性が知られていない保存されたDUF702ドメインも保有する。BLAST検索により、TF19(6)と45%相同であり、1つのジンクフィンガー型ドメインおよびDUF702ドメインを含有するタンパク質をコードするトマト遺伝子も同定された。このタンパク質の機能は知られていない。

【0165】

(実施例8)

昆虫バイオアッセイ

昆虫バイオアッセイを温室内の制御条件下で実施する。植物を、本発明の方法を用いて改変した。例えば:トマト(*Solanum lycopersicum*)を、pBIN 35S-19(6)(配列番号2のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする)を用い、アグロバクテリウム媒介形質転換の手段によって改変する。あるいは、突然変異誘発した集団内で、本発明の転写因子をコードする配列番号1の核酸配列またはその断片に1つまたは複数の突然変異を有するトマト(*Solanum lycopersicum*)突然変異体を同定する。改変された植物の害虫抵抗性を、Bleekerら、2011年 Phytochemistry 72巻:8~73頁;および特許出願WO 2010/099,985に記載の選択試験および非選択試験において、改変されていない対照植物の害虫抵抗性と比較する。以下の昆虫クラスに対する抵抗性を決定する:鱗翅目;甲虫目;双翅目;半翅目(Hemiptera);ダニ目(Acari);総翅目(Thysanoptera)。

【0166】

昆虫嗜好試験。異なるライフステージ、例えば、幼虫または成体の昆虫に、リナロールまたはネオリドールなどのテルペンを生成する植物(配列番号2のアミノ酸配列をコードする核酸配列を発現させることによって)と対照植物との間で選択させる選択試験を実施する。試験により、配列番号2のタンパク質の活性化効果に起因して生成されるテルペンの駆除活性を決定する。

【0167】

昆虫性能試験(非選択試験)。配列番号2のアミノ酸配列をコードする核酸配列の発現が活性化されることによって生成されるテルペンの毒作用を決定するために非選択試験を実施する。これらの実験では、害虫種に、配列番号2のアミノ酸配列をコードする核酸配列を発現させることによってテルペン生成が改変された(トランスジェニック)植物および対照(または空ベクター)植物を強制的に食べさせる。その後、昆虫の性能、例えば、成長、発生または適応度を毒性の尺度として決定する。

TGAAACAATATATTTAAAGTTAAAACTATGAAATAGTATAAGAAATATTT
AAAAATAATCAACGTAAATTTTATGTATAAAATAATATTTACACATATA
ATATAAGGATTTTTTTCCCGATTGATTCAATT

【配列表】

0006164657000001.app

フロントページの続き

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

(74)代理人 100110364

弁理士 実広 信哉

(72)発明者 ロベルト・コルネリス・シュウリンク

オランダ・NL - 6 7 0 0 ・アーエー・ワーゲニンゲン・ピー・オー・ボックス・2 1 6 内

(72)発明者 マイケル・アルベルタス・ハリング

オランダ・NL - 6 7 0 0 ・アーエー・ワーゲニンゲン・ピー・オー・ボックス・2 1 6 内

(72)発明者 エレーニ・シュパイロポロウ

オランダ・NL - 6 7 0 0 ・アーエー・ワーゲニンゲン・ピー・オー・ボックス・2 1 6 内

審査官 松岡 徹

(56)参考文献 特表2 0 0 8 - 5 2 8 0 1 6 (J P , A)

Eric T. McDowell et al., Comparative Functional Genomic Analysis of Solanum Glandular
Trichome Types, Plant Physiology, 2 0 1 1 年 1 月, Vol.155, pp.524-539

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

C 1 2 N

C 0 7 K

UniProt / GeneSeq / DDBJ

JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)

CAplus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS / WPIDS (STN)