

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6557142号
(P6557142)

(45) 発行日 令和1年8月7日 (2019. 8. 7)

(24) 登録日 令和1年7月19日 (2019. 7. 19)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/53 (2006. 01)
C 1 2 N 15/82 (2006. 01)
C 1 2 N 9/02 (2006. 01)
C 1 2 P 21/02 (2006. 01)
A O 1 H 1/00 (2006. 01)

C 1 2 N 15/53 Z N A
C 1 2 N 15/82 1 5 4 Z
C 1 2 N 9/02
C 1 2 P 21/02 C
A O 1 H 1/00 A

請求項の数 30 (全 71 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-532063 (P2015-532063)
(86) (22) 出願日 平成25年9月13日 (2013. 9. 13)
(65) 公表番号 特表2015-528310 (P2015-528310A)
(43) 公表日 平成27年9月28日 (2015. 9. 28)
(86) 国際出願番号 PCT/US2013/059598
(87) 国際公開番号 W02014/043435
(87) 国際公開日 平成26年3月20日 (2014. 3. 20)
審査請求日 平成28年9月2日 (2016. 9. 2)
(31) 優先権主張番号 61/701, 037
(32) 優先日 平成24年9月14日 (2012. 9. 14)
(33) 優先権主張国・地域又は機関
米国 (US)
(31) 優先権主張番号 61/766, 057
(32) 優先日 平成25年2月18日 (2013. 2. 18)
(33) 優先権主張国・地域又は機関
米国 (US)

(73) 特許権者 507124988
バイエル クロップサイエンス エルピー
BAYER CROPSCIENCE L
P
アメリカ合衆国 27709 ノースカロ
ライナ州 リサーチ トライアングル パ
ーク ティ. ダブリュ. アレクサンダー
ドライブ 2
(73) 特許権者 507203353
バイエル・クロップサイエンス・アクチュ
ンゲゼルシャフト
ドイツ国、40789・モンハイム・アム
・ライン、アルフレート・ノベル・シュト
ラーセ・50

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 HPPD変異体および使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ (HPPD) 酵素をコードする組換え核酸分子であって、前記核酸分子が、配列番号 1 に対して少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列であって (a) ~ (e) からなる群より選択されるアミノ酸置換を有するアミノ酸配列をコードし、

前記 HPPD 酵素が HPPD 阻害除草剤に対して耐性である、組換え核酸分子：

(a) 配列番号 1 のアミノ酸の位置 335 に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、および配列番号 1 のアミノ酸の位置 336 に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、

(b) 配列番号 1 のアミノ酸の位置 335 に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、配列番号 1 のアミノ酸の位置 336 に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、配列番号 1 のアミノ酸の位置 339 に対応するアミノ酸の位置におけるスレオニン、および配列番号 1 のアミノ酸の位置 340 に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン、

(c) 配列番号 1 のアミノ酸の位置 188 に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、および配列番号 1 のアミノ酸の位置 336 に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、

(d) 配列番号 1 のアミノ酸の位置 335 に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、配列番号 1 のアミノ酸の位置 336 に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、および配列番号 1 のアミノ酸の位置 340 に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン酸、な

らびに

(e) 配列番号 1 のアミノ酸の位置 335 に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、配列番号 1 のアミノ酸の位置 336 に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、配列番号 1 のアミノ酸の位置 339 に対応するアミノ酸の位置におけるアラニン、および配列番号 1 のアミノ酸の位置 340 に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン。

【請求項 2】

前記核酸分子の核酸配列が、配列番号 3～59 のいずれかに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 90 % の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードする、請求項 1 に記載の組換え核酸分子。

【請求項 3】

10

前記核酸分子のヌクレオチド配列が、植物における発現のために設計された合成配列である、請求項 1 に記載の組換え核酸分子。

【請求項 4】

前記核酸分子のヌクレオチド配列が、植物細胞内でのヌクレオチド配列の発現を誘導可能なプロモーターに操作可能に連結する、請求項 1 に記載の組換え核酸分子。

【請求項 5】

前記 H P P D 阻害除草剤が、N-（テトラゾール-4-イル）-または N-（トリアゾール-3-イル）アリールカルボキサミド、N-（1, 2, 5-オキサジアゾール-3-イル）ベンズアミド、テンボトリオン、スルコトリオン、トプラメゾン、ビシクロピロン、テフリルトリオン、イソキサフルトール、ピラスルホトール、およびメソトリオンからなる群より選択される、請求項 1 に記載の組換え核酸分子。

20

【請求項 6】

請求項 1 または 2 に記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 7】

異種性のポリペプチドをコードする核酸分子をさらに含む、請求項 6 に記載のベクター。

【請求項 8】

請求項 1～4 のいずれか一項に記載の組換え核酸分子を含む宿主細胞。

【請求項 9】

細菌宿主細胞である、請求項 8 に記載の宿主細胞。

30

【請求項 10】

植物細胞である、請求項 8 に記載の宿主細胞。

【請求項 11】

請求項 1～4 のいずれか一項に記載の組換え核酸分子を含むトランスジェニック植物。

【請求項 12】

前記植物が、トウモロコシ、モロコシ、コムギ、ヒマワリ、トマト、十字花植物、コショウ、ジャガイモ、綿、米、大豆、サトウダイコン、サトウキビ、タバコ、オオムギ、およびアブラナからなる群より選択される、請求項 11 に記載の植物。

【請求項 13】

請求項 1～4 のいずれか一項に記載の組換え核酸分子を含むトランスジェニック種子。

40

【請求項 14】

H P P D 酵素を含む組換えポリペプチドであって、前記 H P P D 酵素が H P P D 阻害除草剤に対して耐性であり、前記ポリペプチドが配列番号 1 に対して少なくとも 90 % の配列同一性を有し、かつ、(a)～(e) からなる群より選択されるアミノ酸置換を含む、組換えポリペプチド：

(a) 配列番号 1 のアミノ酸の位置 335 に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、および配列番号 1 のアミノ酸の位置 336 に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、

(b) 配列番号 1 のアミノ酸の位置 335 に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、配列番号 1 のアミノ酸の位置 336 に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、配列番号

50

1のアミノ酸の位置339に対応するアミノ酸の位置におけるスレオニン、および配列番号1のアミノ酸の位置340に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン、

(c) 配列番号1のアミノ酸の位置188に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、および配列番号1のアミノ酸の位置336に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、

(d) 配列番号1のアミノ酸の位置335に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、配列番号1のアミノ酸の位置336に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、および配列番号1のアミノ酸の位置340に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン酸、ならびに

(e) 配列番号1のアミノ酸の位置335に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、配列番号1のアミノ酸の位置336に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、配列番号1のアミノ酸の位置339に対応するアミノ酸の位置におけるアラニンおよび配列番号1のアミノ酸の位置340に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン。

【請求項15】

前記アミノ酸配列が、配列番号3～59のいずれかに示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%の配列同一性を有する、請求項14に記載の組換えポリペプチド。

【請求項16】

前記HPPD阻害除草剤が、N-(テトラゾール-4-イル)-またはN-(トリアゾール-3-イル)アリアルカルボキサミド、N-(1, 2, 5-オキサジアゾール-3-イル)ベンズアミド、テンボトリオン、スルコトリオン、トプラメゾン、ビシクロピロン、テフリルトリオン、イソキサフルトール、ピラスルホトール、およびメソトリオンからなる群より選択される、請求項14に記載の組換えポリペプチド。

【請求項17】

異種性のアミノ酸配列をさらに含む、請求項14に記載の組換えポリペプチド。

【請求項18】

HPPD阻害除草剤に対する耐性活性を有するポリペプチドを産生するための方法であって、該ポリペプチドをコードする核酸分子が発現する条件下で、請求項8に記載の宿主細胞を培養する工程を含む方法。

【請求項19】

HPPD阻害除草剤に対する耐性を植物に付与する方法であって、請求項1～4のいずれか一項に記載の核酸分子のヌクレオチド配列と操作可能に連結して植物細胞内での発現を駆動するプロモーターを含むDNAコンストラクトによって、前記植物を形質転換する工程を含む方法。

【請求項20】

そのゲノム内にDNAコンストラクトが安定的に取り込まれた植物であって、前記コンストラクトが、請求項1～4のいずれか一項に記載の核酸分子のヌクレオチド配列と操作可能に連結したプロモーターを含む、植物。

【請求項21】

前記植物が、植物細胞、植物組織、および植物種子からなる群より選択される、請求項20に記載の植物。

【請求項22】

前記植物が、トウモロコシ、モロコシ、コムギ、ヒマワリ、トマト、十字花植物、コショウ、ジャガイモ、綿、米、大豆、サトウダイコン、サトウキビ、タバコ、オオムギ、およびアブラナからなる群より選択される、請求項20に記載の植物。

【請求項23】

検出可能な量の、請求項1～4のいずれか一項に記載の核酸分子または請求項14または15に記載の組換えポリペプチドを含む商品。

【請求項24】

請求項20に記載の植物のトランスジェニック種子。

【請求項25】

10

20

30

40

50

耕作地の雑草を防除する方法であって、請求項 20 に記載の植物またはその種子を耕作地に植え付けること、および前記耕作地に有効濃度の H P P D 阻害除草剤を使用することを含む方法。

【請求項 26】

前記 H P P D 阻害除草剤が、N-（テトラゾール-4-イル）-またはN-（トリアゾール-3-イル）アリアルカルボキサミド、N-（1, 2, 5-オキサジアゾール-3-イル）ベンズアミド、テンボトリオン、スルコトリオン、トプラメゾン、ビシクロピロン、テフリルトリオン、イソキサフルトール、ピラスルホトール、およびメソトリオンからなる群より選択される、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

前記植物が、グリホサートに対する耐性を付与する核酸分子およびグルホシネートに対する耐性を付与する核酸分子をさらに含む、請求項 20 に記載のトランスジェニック植物。

【請求項 28】

1 以上の H P P D 阻害除草剤に対する耐性を植物に付与するための、請求項 1～4 のいずれか一項に記載の組換え核酸分子の使用。

【請求項 29】

検出可能な量の請求項 14 に記載の組換えポリペプチドを含んでなる商品。

【請求項 30】

1 以上の H P P D 阻害除草剤に対する耐性を植物に付与するための、請求項 1～4 のいずれか一項に記載の組換え核酸分子を含んでなる組成物。

【発明の詳細な説明】

【関連出願の相互参照】

【0001】

本出願は、米国特許仮出願の、2012年9月14日に提出された第61/701, 037号、2013年2月18日に提出された第61/766, 057号、および2013年3月15日に提出された第61/790, 404に対して優先権を主張するものであり、これらの内容はその全体が参照によって本明細書に取り込まれる。

【0002】

電子提出された配列表への参照

配列表の正式原稿は、2013年9月12日に作製された、ASCIIフォーマットによるサイズ237キロバイトの、ファイル名「2912939_19973WO01_SEQLIST.txt」の配列表であり、これは明細書と同時にEFS-Webを通して提出された。このASCIIフォーマットによる文書に含まれる配列表は明細書の一部であり、その全体が参照により本明細書に取り込まれる。

【技術分野】

【0003】

本発明は、植物分子生物学、特にH P P D阻害除草剤に対する耐性が改善された新規H P P Dポリペプチドに関する。

【背景技術】

【0004】

4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ（H P P D）は、チロシン分解産物であるパラヒドロキシフェニルピルビン酸（本明細書ではH P Pと略称される）を、植物におけるトコフェロールおよびプラストキノンの前駆体であるホモゲンチジン酸（本明細書ではH Gと略称される）へと転換する反応を触媒する酵素である（Crouch N. P. et al. (1997), Tetrahedron, 53, 20, 6993-7010, Fritze et al. (2004), Plant Physiology 134:1388-1400）。トコフェロールは、膜関連の抗酸化剤として作用する。

【0005】

プラストキノンは、最初にP S I Iとチトクロムb 6 / f 複合体との間で電子担体として作用し、次にカロテノイドの生合成に関わるフィトエンデサチュラーゼに対する酸化還元補因子となる。

【0006】

現在までに、NCBIデータベースに収載される様々な生物由来の1000を超える核酸配列が、HPPDドメインを有する推定上のタンパク質をコードするものとしてアノテートされてきた。しかしながらその多くは、*in vitro*アッセイまたは植物体への応用のいずれかにおいてタンパク質がHPPD酵素活性を有することは証明されておらず、また、このようなHPPDタンパク質を植物に発現させた際に、HPPD阻害除草剤に対する耐性を獲得することも証明されていない。幾つかのHPPDタンパク質およびそれらの一次配列が当該技術分野において報告されているが、それらは特にシュードモナス属(*Pseudomonas*) (R u e t s c h i e t a l . , E u r . J . B i o c h e m . , 2005, 459-466, 1992、国際公開第96/38567号)、コルディア属(*Kordia*) (国際公開第2011076889号)、シネコッカス属(*Synechococcus*) (国際公開第2011076877号)、およびロドコッカス属(*Rhodococcus*) (国際公開第2011076892号)のような細菌の、ブレファリズマ属(*Blepharisma*) (国際公開第2011076882号)のような原生生物の、ピクロフィルス属(*Picrophilus*) (国際公開第2011076885号)のようなユリ古細菌門の、シロイヌナズナ属(*Arabidopsis*) (国際公開第96/38567号、GENBANK (登録商標) AF047834)、ニンジン (国際公開第96/38567号、GENBANK (登録商標) 87257)、エンバク(*Avena sativa*) (国際公開第02/046387号、国際公開第11/068567号)、コムギ (国際公開第02/046387号)、メリケンニクキビ(*Bracharia platyphylla*) (国際公開第02/046387号)、シンクリノイガ(*Cenchrus echinatus*) (国際公開第02/046387号)、ボウムギ(*Lolium rigidum*) (国際公開第02/046387号)、オニウシノケグサ(*Festuca arundinacea*) (国際公開第02/046387号)、アキノエノコログサ(*Setaria faberi*) (国際公開第02/046387号)、オヒシバ(*Eleusine indic*) (国際公開第02/046387号)、モロコシ属(*Sorghum*) (国際公開第02/046387号、国際公開第12/021785号)、トウモロコシ (国際公開第12/021785号)のような植物の、コクシジオイデス属(*Coccoides*) (GENBANK (登録商標) COITRP) の、オウレン(*Coptis japonica*) (国際公開第06/132270号) の、コナミドリムシ(*Chlamydomonas reinhardtii*) (スペイン特許第2275365号) / 国際公開第2011/145015号の、またはマウスもしくはブタのような哺乳類のHPPDタンパク質である。

【0007】

HPPDの阻害によって光合成の脱共役および補助集光性色素の欠乏が誘導され、かつ最も重要なことには、通常はカロテノイドの作用である光防護が欠如するために、UV照射および活性酸素種によって葉緑素が破壊される(白化) (Norris et al. (1995), Plant Cell 7:2139-2149)。光合成の活発な組織での白化は、成長の阻害および植物の死をもたらす。

【0008】

HPPDへ特異的に結合することでこの酵素を阻害し、かつHPPのホモゲンチジン酸への変換を阻害する幾つかの分子が、除草剤として非常に有効であることが証明されてきた。

【0009】

現在最も多く市販されているHPPD阻害除草剤は、以下の化学的分類のうちの一つに属している。

1) トリケトン類、例えばスルコトリオン [すなわち 2-[2-クロロ-4-(メチルスルホニル)ベンゾイル]-1,3-シクロヘキサジオン]、メソトリオン [すなわち 2-[4-(メチルスルホニル)-2-ニトロベンゾイル]-1,3-シクロヘキサジオン]、テンボトリオン [すなわち 2-[2-クロロ-4-(メチルスルホニル)-3-

[(2, 2, 2, -トリフルオロエトキシ) メチル] ベンゾイル] -1, 3-シクロヘキサンジオン]、テフリルトリオン [すなわち 2- [2-クロロ-4- (メチルスルホニル) -3- [(テトラヒドロ-2-フラニル) メトキシ] メチル] ベンゾイル] -1, 3-シクロヘキサンジオン]]、ビシクロピロン [すなわち 4-ヒドロキシ-3- [[2- [(2-メトキシエトキシ) メチル] -6- (トリフルオロメチル) -3-ピリジニル] カルボニル] ビシクロ [3, 2, 1] オクト-3-エン-2-オン]、ベンゾビシクロロン [すなわち 3- (2-クロロ-4-メシルベンゾイル) -2-フェニルチオビシクロ [3, 2, 1] オクト-2-エン-4-オン]。

2) ジケトニトリル類、例えば 2-シアノ-3-シクロプロピル-1- (2-メチルスルホニル-4-トリフルオロメチルフェニル) -プロパン-1, 3-ジオンおよび 2-シアノ-1- [4- (メチルスルホニル) -2-トリフルオロメチルフェニル] -3- (1-メチルシクロプロピル) プロパン-1, 3-ジオン。

3) イソキサゾール類、例えばイソキサフルトール [すなわち (5-シクロプロピル-4-イソオキサゾリル) [2- (メチルスルホニル) -4- (トリフルオロメチル) フェニル] メタノン]。植物において、イソキサフルトールは、HPPD 阻害剤の特性を示す DKN、すなわちジケトニトリル化合物へと迅速に代謝される。

4) ピラゾリネート類、例えばトプラメゾン [すなわち [3- (4, 5-ジヒドロ-3-イソオキサゾリル) -2-メチル-4- (メチルスルホニル) フェニル] (5-ヒドロキシ-1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル) メタノン]、およびピラズルホトール [すなわち (5-ヒドロキシ-1, 3-ジメチルピラゾール-4-イル (2-メシル-4-トリフルオロメチルフェニル) メタノン]、ピラゾフェン [すなわち 2- [4- (2, 4-ジクロロベンゾイル) -1, 3-ジメチルピラゾール-5-イルオキシ] アセトフェノン]。

5) N- (1, 2, 5-オキサジアゾール-3-イル) ベンズアミド類 (国際公開第 2011/035874 号)、および

6) N- (テトラゾール-4-イル) -または N- (トリアゾール-3-イル) アリールカルボキサミド類 (国際公開第 2012/028579 号)。

【0010】

これらの HPPD 阻害除草剤は、代謝耐性を示す農業植物、例えば内部で HPPD 阻害除草剤が迅速に分解されるトウモロコシ (*Zea mays*)、米 (*Oryza Sativa*)、およびコムギ (*Triticum aestivum*) の耕作地における草および／または広葉雑草に対して用いることができる (Schulz et al. (1993), FEBS letters, 318, 162-166; Mitchell et al. (2001), Pest Management Science, Vol 57, 120-128; Garcia et al. (2000), Biochem., 39, 7501-7507; Pallett et al. (2001), Pest Management Science, Vol 57, 133-142)。これら HPPD 阻害除草剤の使用範囲を拡大するため、植物、特に代謝耐性をもたないかまたは代謝耐性の低い植物に対して、農学分野の条件下で許容されるレベルの耐性を付与する幾つかの試みが為されてきた。

【0011】

HPPD を介したホモゲンチジン酸の産生を回避する試みに加え (米国特許第 6, 812, 010 号)、除草剤に関して十分な量の植物内の標的酵素が産生されるように、感受性の酵素を過剰発現することも行われてきた (国際公開第 96/38567 号)。HPPD を過剰発現させることで、イソキサフルトール (IFT) のジケトニトリル誘導体 (DKN) に対するより良い発芽前の耐性をもたらされたが、この耐性は発芽後の処理に対して十分なものではなかった (Matringe et al. (2005), Pest Management Science 61: 269-276)。

【0012】

3 番目の試みは HPPD を変異させることであり、この変異によって、HPP のホモゲ

10

20

30

40

50

ンチジン酸への転換を触媒する特性は保持しているが、変異前の天然H P P DよりもH P P D阻害剤に対する感受性の低い標的酵素が得られる。

【0013】

この試みは、ジケトニトリルファミリーに属する二つのH P P D阻害除草剤（国際公開第99/24585号）である2-シアノ-3-シクロプロピル-1-（2-メチルスルホニル-4-トリフルオロメチルフェニル）-プロパン-1, 3-ジオンおよび2-シアノ-1-〔4-（メチルスルホニル）-2-トリフルオロメチルフェニル〕-3-（1-メチルシクロプロピル）プロパン-1, 3-ジオンに対して耐性のある植物の産生に成功した（欧州特許第496630号）。Pro215Leu、Gly336Glu、Gly336Ile、そして特にGly336Trp（変異アミノ酸の位置はシュードモナスH P P Dへの参照により示す）は、これらのジケトニトリル除草剤による処理に対する耐性が増大した変異として同定された。

10

【0014】

さらに最近では、タバコおよび大豆の色素体ゲノムへのシュードモナスH P P D遺伝子の導入によって、発芽後にイソキサフルトールを適用した際の耐性が、核の形質転換よりも効果的に付与されることが示された（Dufourmantel et al. (2007), Plant Biotechnol J. 5(1):118-33）。

【0015】

国際公開第04/024928号では、発明者らが、植物細胞内へのH P P 前駆体の流量を増大させることで、これらの植物細胞におけるプレニルキノンの生合成（例えばプラスチックノン類、トコフェロール類の合成）を増大させることを考えた。このことは、PDH酵素の過剰発現により、前記前駆体の合成を「シキミ酸」経路へ関係させることによって為された。彼らはまた、PDH酵素をコードする遺伝子およびH P P D酵素をコードする遺伝子による植物の形質転換によって前記植物のH P P D阻害剤への耐性の増大が可能となることにも注目した。

20

【0016】

特許出願の国際公開第2009/144079号には、蛍光菌ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ（H P P D）タンパク質の位置336に特異的な変異を有する、H P P Dをコードする核酸配列、およびH P P D阻害除草剤に対して耐性である植物を得るためのその使用について開示されている。

30

【0017】

国際公開第2002/046387号では、様々なH P P D阻害除草剤に対する耐性の付与に関連する可能性のある、植物に由来するH P P Dタンパク質の幾つかのドメインが同定されたが、記載されたドメイン機能の影響を裏付ける植物体におけるデータ、また生化学的データのいずれも示されていない。

【0018】

国際公開第2008/150473号では、H P P D阻害除草剤への耐性を改善する二つの異なる耐性機構、すなわち変異H P P D酵素をコードする改変エンバク遺伝子と、CYP450トウモロコシモノオキシゲナーゼ（nsf 1遺伝子）との組み合わせが例示されているが、両タンパク質の組み合わせに基づく相乗的效果を示すデータは開示されていない。

40

【0019】

さらに米国特許第20110173718号では、例えばエンバクに由来する耐性H P P Dをコードする遺伝子のみではなく、HST（ホモゲンチジン酸ソラネシルトランスフェラーゼ（homogentisate solanesyltransferase））タンパク質をコードする幾つかの植物遺伝子を組み合わせた過剰発現による、H P P D阻害剤に耐性の植物を産生する方法について開示されている。しかしながら、選択された数種のH P P D阻害除草剤に対する耐性のレベルはどちらかといえば限られたものであった。

【0020】

50

国際公開第2011094199号および米国特許第20110185444号では、野生型大豆の数百株について、HPD阻害剤であるイソキサフルトールに対する耐性を評価した。わずかな数株が、除草剤に対する妥当なレベルの耐性を示した。耐性に関する推定上のQTL (quantitative trait loci: 量的形質遺伝子座) が同定された。ゲノムのこの領域では、ABC輸送体をコードする遺伝子が、HPD阻害除草剤に対する耐性の改善が観察される主要な形質として同定された。しかしながら、同定された遺伝子を発現するトランスジェニック植物において、試験したHPD阻害除草剤に対する耐性は改善されなかった。

【0021】

国際公開第2010/085705号では、エンバクHPDの幾つかの変異体(mutants)が開示されている。幾つかの変異形(variants)では、トリケトンである「メソトリオン」に対する*in vitro*での耐性の改善が示されたが、タバコ植物ではわずかな数個の変異体しか発現されなかった。加えて、これらの変異体を発現するタバコ植物のいずれも、野生型エンバクHPD遺伝子を発現するタバコ植物に比較して、メソトリオンまたはイソキサフルトールに対する耐性の改善を示さなかった。

【0022】

米国特許第2012/0042413号には、HPD活性を有するが、少なくとも1のHPD阻害剤に対して幾らか非感受性であるポリペプチドについて記載されている。さらに、HPD酵素の異なる位置におけるある一組の変異について示唆されており、最終的には、このような変異HPDをわずかに含む植物の生化学データおよび耐性レベル

【0023】

欧州特許第21453012号には、幾つかのHPD変異体について記載されているが、記載された変異体は、植物体において数種のHPD阻害除草剤に対する耐性の改善を示さなかった。

【発明の概要】

【0024】

HPD阻害除草剤に対する耐性を付与する組成物および方法が提供される。組成物には、HPD阻害除草剤に耐性のHPDポリペプチド、このようなポリペプチドをコードする単離された、組換えまたはキメラ核酸分子、ならびにこれらの核酸分子を含むベクターおよび宿主細胞が包含される。また、組成物にはこれらのポリペプチドに対する抗体も包含される。ヌクレオチド配列は、微生物および植物を含む生物の形質転換および該生物における発現のためのDNAコンストラクトまたは発現カセット内に用いることができる。ヌクレオチド配列は、微生物および植物を含むが、これらに限定されない生物における発現のために設計された合成配列であってもよい。

【0025】

組成物は除草剤に耐性のポリペプチドをコードする核酸分子を包含し、配列番号1のアミノ酸の位置188、189、215、335、336、339、および340に対応する位置に1以上のアミノ酸置換を有するHPDタンパク質をコードする核酸分子を包含し、配列番号1のアミノ酸の位置188、189、215、335、336、339、および340に対応する位置に1以上のアミノ酸置換が導入された、配列番号1、2、63、64、または65のいずれかに示されるHPDタンパク質を包含し、かつ配列番号3～59のいずれかに示されるアミノ酸配列をコードする核酸配列、ならびにそれらの変異形および断片を包含する。本発明にはさらに、該核酸分子によってコードされる除草剤に耐性のHPDタンパク質が含まれ、および該HPDタンパク質を含む組成物も含まれる。

【0026】

組成物はまた、本発明の核酸配列を細菌、植物、植物細胞、組織、および種子のゲノム内に導入することによって形質転換された、HPD阻害除草剤に対して耐性の細菌、植物、植物細胞、組織、および種子も含む。該生物が植物の場合、該配列の導入によって、

植物にH P P D阻害除草剤を適用した際には、形質転換された生物ではなく、H P P D阻害剤に感受性の雑草またはその他の非形質転換植物が選択的に死滅する。該配列はさらに、1以上のH P P D阻害除草剤の存在下で成長する植物細胞を選択するためのマーカーとしても使用できる。

【0027】

さらに、H P P D阻害剤に対する耐性活性を利用してH P P D酵素を同定する方法も提供される。

【0028】

本発明の組成物および方法は、H P P D阻害除草剤に対する耐性が増強された生物の産生に有用である。これらの生物、および該生物を含む組成物は、農業用に望ましいものである。本発明の核酸配列を含む植物または種子は、植物産物を得るために耕作地で成長かつ収穫可能である。本発明の組成物は、H P P D阻害除草剤に対する耐性活性を有する改変または改善されたタンパク質を産生するために、または、産物または生物におけるH P P D阻害除草剤に耐性のタンパク質もしくは核酸の存在を検出するためにも有用である。

【図面の簡単な説明】

【0029】

【図1】蛍光菌(*Pseudomonas fluorescens*) (配列番号1)、エンバク(*Avena sativa*) (配列番号63)、エンバクに由来するH P P Dの変異形 (配列番号64)、トウモロコシ(*Zea mays*) (配列番号65)、ストレプトマイセス・アベルミティリス(*Streptomyces avermitilis*) (配列番号69)、シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*) (配列番号66)、オオムギ(*Hordeum vulgare*) (配列番号67)、ニンジン(*Daucus carota*) (配列番号68)、コムギ葉枯病菌(*Mycosphaerella graminicola*) (配列番号70)、およびコクシオイデス・イミティス(*Coccicoides immitis*) (配列番号71)を含む微生物ならびに植物種に由来するH P P Dのアミノ酸配列のアラインメントを示した図である。

【発明の具体的説明】

【0030】

以下、すべてではないが幾つかの本発明の実施形態が示された添付の図面への参照により、本発明の全体をさらに記載する。実際に、これらの発明は多くの異なる形態で具体化され得るものであるから、本明細書に示す実施形態に限定されるように解釈されるべきではない。むしろこれらの実施形態はこの開示が法的要件を十分に満たすように提供されるものである。同様の番号は一貫して同様の要素を指す。

【0031】

これらの発明に関わり、前述の記載および添付の図面中の教示の利益を享受する当業者は、本明細書に示される、本発明の多くの改変およびその他の実施形態を思いつくであろう。したがって、本発明は開示される特定の実施形態に限定されるものではなく、改変、およびその他の実施形態は、添付の請求項の範囲内に包含されることを意図することが理解されるべきである。本明細書では特定の用語を採用しているが、これらは限定目的ではなく、一般的かつ説明的な意味でのみ用いられるものである。

【0032】

概要

植物に対し、広範囲のH P P D阻害除草剤に対する農学的に許容されるレベルの耐性を付与する幾つかの試みが為されてきた。これらの試みには、H P P Dを介したホモゲンチジン酸の産生を回避すること (米国特許第6, 812, 010号)、除草剤に関して十分な量の植物内の標的酵素が産生されるように、感受性の酵素を過剰発現すること (国際公開第96/38567号)、およびH P P Dを変異させることであり、この変異によって、H P P Dのホモゲンチジン酸への転換を触媒する特性は保持しているが、変異前の天然H P P DよりもH P P D阻害剤に対する感受性の低い標的酵素を得ることが含まれる。

【0033】

上記の数種のH P P D阻害除草剤に対して耐性を示す植物の開発が成功したにも関わらず、新規の、または幾つかの異なるH P P D阻害剤、特にトリケトン類 (例えばスルコト

10

20

30

40

50

リオン、メソトリオン、テンボトリオン、ベンゾビシクロン、およびビシクロピロン)、ピラゾリネート類(例えばトブラメゾンおよびピラスルホトール)、N-(1, 2, 5-オキサジアゾール-3-イル)ベンズアミド類(国際公開第2011/035874号)、およびN-(テトラゾール-4-イル)-またはN-(トリアゾール-3-イル)アリアルカルボキサミド類(国際公開第2012/028579号)の分類に属するHPPD阻害剤に対する、植物における耐性の発現および/または改善がなお必要とされている。

【0034】

このように本発明は、HPPD阻害除草剤に対する耐性を制御するための改善された組成物および方法を提供する。N-(1, 2, 5-オキサジアゾール-3-イル)ベンズアミド類、N-(テトラゾール-4-イル)-またはN-(トリアゾール-3-イル)アリアルカルボキサミド類、例えば2-クロロ-3-エトキシ-4-(メチルスルホニル)-N-(1-メチル-1H-テトラゾール-5-イル)ベンズアミドおよび2-クロロ-3-(メトキシメチル)-4-(メチルスルホニル)-N-(1-メチル-1H-テトラゾール-5-イル)ベンズアミド、トリケトン類、例えばテンボトリオン、スルコトリオン、およびメソトリオンに分類され得る、イソキサゾール類、例えばイソキサフルトールに分類され得る、またはピラゾリネート類の分類、例えばピラスルホトールおよびトブラメゾン、特にテンボトリオン、スルコトリオン、トブラメゾン、ビシクロピロン、テフリルトリオン、イソキサフルトール、およびメソトリオンから選択されるピラゾリネート類に分類され得るHPPD阻害除草剤は、経済的に重要な単子葉類および双子葉類の一年生有害植物の広範なスペクトルに対して顕著な除草活性を有する。これらの活性物質は、根茎、貯蔵木材、またはその他の多年生器官からシュートを形成し、かつ防除が困難な多年生有害植物に対しても有効に作用する。本発明による意味の範囲において、「除草剤」は、それ自体で除草活性物質となるか、またはその有効性を変化させる添加物、例えばその活性を増大させる薬剤(相乗的薬剤)またはその活性を制限する薬剤(毒性緩和剤)と併用して用いる物質として理解される。除草剤は、固体もしくは液体補助剤または製剤技術において通常用いられる担体(例えば天然または再生鉱物性物質、溶媒、分散剤、湿潤剤、粘着付与剤、乳化剤、成長促進剤など)、および1以上のさらなる除草剤および/または1以上の駆除剤(例えば殺虫剤、抗ウイルス剤、殺菌剤、抗アメーバ剤、駆除剤、抗真菌剤、殺菌剤、抗線虫剤、軟体動物駆除剤など)をさらに含んでもよい。

【0035】

本方法は、本発明のHPPD阻害剤に対する耐性遺伝子をコードするヌクレオチド配列によって生物を形質転換すること、またはこのようなHPPD阻害剤に対する耐性遺伝子を、それを有していない生物に導入すること(例えば交配、細胞融合、または導入された本発明のHPPD阻害剤に対する遺伝子を含む生物と、それを含まない生物とを交雑して、そのような遺伝子を含む子孫を得ることによって)に関与する。本発明のヌクレオチド配列は、HPPD阻害除草剤に対する耐性、特にN-(1, 2, 5-オキサジアゾール-3-イル)ベンズアミド類、N-(テトラゾール-4-イル)-またはN-(トリアゾール-3-イル)アリアルカルボキサミド類、例えば2-クロロ-3-エトキシ-4-(メチルスルホニル)-N-(1-メチル-1H-テトラゾール-5-イル)ベンズアミドおよび2-クロロ-3-(メトキシメチル)-4-(メチルスルホニル)-N-(1-メチル-1H-テトラゾール-5-イル)ベンズアミド、トリケトン類、例えばテンボトリオン、スルコトリオン、およびメソトリオンの分類、イソキサゾール類、例えばイソキサフルトールの分類、またはピラゾリネート類の分類、例えばピラスルホトールおよびトブラメゾン、特にテンボトリオン、スルコトリオン、トブラメゾン、ビシクロピロン、テフリルトリオン、イソキサフルトール、およびメソトリオンから選択されるHPPD阻害除草剤に対する耐性が増大した植物を作製するために有用である。本発明のHPPD阻害剤に対する耐性遺伝子はまた、「クマロン誘導体除草剤」に対しても耐性を示し得る(国際公開第2009/090401号、国際公開第2009/090402号、国際公開第2008/071918号、国際公開第2008/009908号に記載されている)。これに関して、本発明のHPPD阻害剤に対する耐性遺伝子のうちのいずれか一つは、国際公

開第2011/145015号、国際公開第2013/064987号、国際公開第2013/064964号、または国際公開第2010/029311号に記載される、ホモゲンチジン酸ソラネシルトランスフェラーゼ (HST: homogentisate solanesyl transferase) 阻害除草剤に耐性の植物を得るためにキメラHST遺伝子または変異HST遺伝子を発現させた植物に、さらに発現させることができる。本明細書で用いられる「クマロン誘導体除草剤」または「HST阻害除草剤」は、IUPAC命名法による化合物、5H-チオピラノ[4, 3-b]ピリジン-8-オール、5H-チオピラノ[3, 4-b]ピラジン-8-オール、オキサチイノ[5, 6-b]ピリジン-4-オール、およびオキサチイノ[5, 6-b]ピラジン-4-オールを包含する。

10

【0036】

このように、本発明の「HPPD阻害除草剤に対する耐性」遺伝子は、細胞または生物に発現させた際、これを発現しない細胞または生物よりも高濃度のHPPD阻害除草剤に対する耐性が付与されるタンパク質、または特定の濃度のHPPD阻害除草剤に対して、これを発現しない細胞または生物よりも長時間耐性となるタンパク質、またはこれを発現しない細胞または生物よりも、損傷または成長阻害が少ない状態で光合成、成長、および/または再生を行う能力が付与されるタンパク質をコードする遺伝子を意図する。「HPPD阻害剤耐性タンパク質」は、細胞または生物に、これを発現しない細胞または生物よりも高濃度のHPPD阻害除草剤に対する耐性が付与されるタンパク質、または特定の濃度のHPPD阻害除草剤に対して、これを発現しない細胞または生物よりも長時間耐性となるタンパク質、またはこれを発現しない細胞または生物よりも、損傷または成長阻害が少ない状態で光合成、成長、および/または再生を行う能力が付与されるタンパク質を包含する。「耐性がある」または「耐性」は、特定のHPPD阻害除草剤の存在下で生存すること、または光合成、タンパク質合成、または呼吸、および再生のような必須の細胞機能を、無処理の細胞または生物と容易に識別できないほどに遂行する能力、または植物をHPPD阻害除草剤で処理した際、このような除草剤で処理していない（しかしHPPD阻害除草剤の使用以外の機序、例えばその全体が参照によって本明細書に取り込まれる国際公開第2011/100302号に記載される方法によって雑草が除去されたかまたは抑制された場合の）植物と比較して収穫に有意差がみられないかまたは収穫が改善される能力を意図する。

20

30

【0037】

本発明のHPPD核酸配列は、HPPD阻害剤に対する耐性を細胞に付与する活性に加え、HPPD活性、すなわちパラヒドロキシフェニルピルビン酸 (pHPP) をホモゲンチジン酸へ変換する反応を触媒する活性を有するポリペプチドをコードする。選択的に、*in vitro* で試験した際の本発明のHPPDタンパク質による触媒活性は、同一条件下で、かつ上記のHPPD阻害除草剤の非存在下で、参照HPPDタンパク質による触媒活性の90%を超えて、70%を超えて、または50%を超えて同様である。幾つかの実施形態によれば、該触媒活性は、参照HPPDタンパク質と比較して改善される。HPPD酵素の触媒活性は、当該技術分野において公知の様々な方法によって定義され得る。国際公開第2009/144079号には、適した様々なスクリーニング法について記載されている。

40

【0038】

HPPD阻害除草剤に対して増強された耐性を示すHPPD酵素は、参照HPPDと比較した際、以下によって耐性の増強を示し得る。a) 天然基質である4-ヒドロキシフェニルピルビン酸に対する高い K_m 値、b) 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸をホモゲンチジン酸への変換に対する低い k_{cat} 値、c) 酵素：HPPD阻害除草剤複合体の形成を左右する速度定数である k_{on} 値の低下、d) 酵素：HPPD阻害除草剤複合体の解離を左右する速度定数である k_{off} 値の増大、および/またはe) c) およびd) のうちの一つまたは両方が変化した結果としての、酵素：HPPD阻害除草剤複合体の解離を左右する平衡定数 K_i (K_d とも称される) 値の増大。

50

【0039】

HPPDタンパク質の酵素活性は、HPPまたは O_2 基質の量の減少の測定、または酵素反応に由来するいずれかの産物、すなわちホモゲンチジン酸または CO_2 の蓄積の測定のどちらかを可能にするいずれかの方法によって測定できる。HPPD活性は特に、参照により本明細書に取り込まれる国際公開第2009/144079号、Garcia et al. (1999), Plant Physiol. 119, 1507-1516、または国際公開第2012/021785号に記載される方法によって測定することができる。

【0040】

本発明の目的のための「参照」HPPDタンパク質（またはHPPD遺伝子）とは、それに対して本発明のHPPDタンパク質またはHPPD核酸が比較される、いずれかのHPPDタンパク質または核酸である。参照HPPDは、天然の植物、細菌、または動物のHPPDであってよい、または当該技術分野において公知の変異HPPDであってよい。このような参照HPPDは、本発明のHPPDタンパク質または核酸が、特に関心のある特性（例えば改善された、同程度の、または減少したHPPD阻害除草剤に対する耐性またはHPPD酵素活性、改善された、同程度の、または減少した宿主細胞における発現、改善された、同程度の、または減少したタンパク質安定度など）を有するか否かを決定するために用いることができる。

【0041】

本明細書の様々な実施形態によれば、HPPD阻害除草剤に耐性の核酸（その単離された、組換えおよびキメラ遺伝子、該核酸を含むベクター、宿主細胞、植物、植物の部分、および種子、該核酸によってコードされるHPPDポリペプチドおよびその組成物、ならびに植物のHPPD阻害除草剤に対する耐性を増大させるため、特にN（1，2，5-オキサジアゾール-3-イル）ベンズアミド類、N-（テトラゾール-4-イル）-またはN-（トリアゾール-3-イル）アリールカルボキサミド類、例えば2-クロロ-3-エトキシ-4-（メチルスルホニル）-N-（1-メチル-1H-テトラゾール-5-イル）ベンズアミドおよび2-クロロ-3-（メトキシメチル）-4-（メチルスルホニル）-N-（1-メチル-1H-テトラゾール-5-イル）ベンズアミド、トリケトン類、例えばテンボトリオン、スルコトリオン、およびメソトリオンの分類、イソキサゾール類、例えばイソキサフルトールの分類、またはピラゾリネート類の分類、例えばピラスルホトールおよびトプラメゾン、特にテンボトリオン、スルコトリオン、トプラメゾン、ビシクロピロン、テフリルトリオン、イソキサフルトール、およびメソトリオンから選択されるHPPD阻害除草剤に対する耐性を増大させるための該核酸の使用法を含む）は、2、3、4、5、6、または7アミノ酸置換を含む1以上のアミノ酸置換を、配列番号1のアミノ酸の位置188、189、215、335、336、339、および/または340に対応する位置に含むように改変されたHPPDタンパク質をコードする。「対応する」は、本明細書の他所に記載する標準的なアラインメントアルゴリズムを用いて二つの（またはそれを超える）配列を整列させた際の、配列番号1の位置に関連するヌクレオチドまたはアミノ酸の位置を意図する。様々な微生物および植物種に由来するHPPDアミノ酸配列を用いた、配列番号1の代表的なアラインメントを図1に示す。例えば、配列番号1のアミノ酸の位置188、189、215、335、336、339、および340は、それぞれ、エンバク由来のHPPD（配列番号63）のアミノ酸の位置241、242、271、412、413、416、および417に対応し、それぞれ、オオムギ由来のHPPD（配列番号67）のアミノ酸の位置235、236、265、406、407、410、および411に対応し、かつ、それぞれ、トウモロコシ由来のHPPD（配列番号65）のアミノ酸の位置242、243、272、413、414、417、および418に対応する。したがって、配列番号1の配列よりも多いかまたは少ない残基を有する、関連するHPPDアミノ酸配列の長さに依存して、関連するHPPDタンパク質において対応する位置は、位置188、189、215、335、336、339、および340とは異なる位置であってよい。

10

20

30

40

50

【0042】

一実施形態によれば、本発明のHPPDは、

(a) 配列番号1のアミノ酸の位置188に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、グリシン、またはセリン、

(b) 配列番号1のアミノ酸の位置189に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、システイン、またはアルギニン、

(c) 配列番号1のアミノ酸の位置335に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、セリン、ヒスチジン、アラニン、グリシン、またはグルタミン、

(d) 配列番号1のアミノ酸の位置336に対応するアミノ酸の位置におけるセリンまたはトリプトファン、

(e) 配列番号1のアミノ酸の位置339に対応するアミノ酸の位置におけるスレオニン、アラニン、またはセリン、

(f) 配列番号1のアミノ酸の位置340に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン、アラニン、バリン、またはグルタミン酸、および

(g) 配列番号1のアミノ酸の位置215に対応するアミノ酸の位置におけるロイシンからなる群より選択される、1以上のアミノ酸置換を含むように改変された。

【0043】

別の実施形態によれば、HPPDは、

(a) 配列番号1のアミノ酸の位置335に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、および配列番号1のアミノ酸の位置336に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、

(b) 配列番号1のアミノ酸の位置335に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、配列番号1のアミノ酸の位置336に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、配列番号1のアミノ酸の位置339に対応するアミノ酸の位置におけるスレオニン、および配列番号1のアミノ酸の位置340に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン、

(c) 配列番号1のアミノ酸の位置188に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、および配列番号1のアミノ酸の位置336に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、

(d) 配列番号1のアミノ酸の位置335に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、配列番号1のアミノ酸の位置336に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、および配列番号1のアミノ酸の位置340に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン酸、

(e) 配列番号1のアミノ酸の位置335に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、配列番号1のアミノ酸の位置336に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、配列番号1のアミノ酸の位置339に対応するアミノ酸の位置におけるアラニン、および配列番号1のアミノ酸の位置340に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン、または

(f) 配列番号1のアミノ酸の位置335に対応するアミノ酸の位置におけるプロリンのアミノ酸置換を含むように改変された。

【0044】

特定の実施形態によれば、本発明のHPPDは、本明細書に配列番号1として示すアミノ酸配列に対して少なくとも53%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有し、ここで該HPPDは、

(a) 配列番号1のアミノ酸の位置335に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、および配列番号1のアミノ酸の位置336に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、

(b) 配列番号1のアミノ酸の位置335に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、配列番号1のアミノ酸の位置336に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、配列番号

10

20

30

40

50

1のアミノ酸の位置339に対応するアミノ酸の位置におけるスレオニン、および配列番号1のアミノ酸の位置340に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン、

(c) 配列番号1のアミノ酸の位置188に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、および配列番号1のアミノ酸の位置336に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、

(d) 配列番号1のアミノ酸の位置335に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、配列番号1のアミノ酸の位置336に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、および配列番号1のアミノ酸の位置340に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン酸、

(e) 配列番号1のアミノ酸の位置335に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、配列番号1のアミノ酸の位置336に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、配列番号1のアミノ酸の位置339に対応するアミノ酸の位置におけるアラニン、および配列番号1のアミノ酸の位置340に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン、または

(f) 配列番号1のアミノ酸の位置335に対応するアミノ酸の位置におけるプロリンのアミノ酸置換を含むように改変された。

【0045】

別の実施形態によれば、本発明のHPPDは、本明細書に配列番号1として示すアミノ酸配列に対して少なくとも53%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有し、ここで前記HPPDは、

(a) アミノ酸の位置188におけるトリプトファンおよびアミノ酸の位置336におけるトリプトファン、または

(b) アミノ酸の位置335におけるプロリンのアミノ酸置換を含む。

【0046】

さらに別の実施形態によれば、本発明のHPPDは、本明細書に配列番号63として示すアミノ酸配列に対して少なくとも53%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有し、ここで該HPPDは、

(a) 配列番号1のアミノ酸の位置335に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、および配列番号1のアミノ酸の位置336に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、

(b) 配列番号1のアミノ酸の位置335に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、配列番号1のアミノ酸の位置336に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、配列番号1のアミノ酸の位置339に対応するアミノ酸の位置におけるスレオニン、および配列番号1のアミノ酸の位置340に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン、

(c) 配列番号1のアミノ酸の位置188に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、および配列番号1のアミノ酸の位置336に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、

(d) 配列番号1のアミノ酸の位置335に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、および配列番号1のアミノ酸の位置336に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、

(e) 配列番号1のアミノ酸の位置335に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、配列番号1のアミノ酸の位置336に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、配列番号1のアミノ酸の位置339に対応するアミノ酸の位置におけるアラニン、および配列番号1のアミノ酸の位置340に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン、または

10

20

30

40

50

(f) 配列番号1のアミノ酸の位置335に対応するアミノ酸の位置におけるプロリンのアミノ酸置換を含むように改変された。

【0047】

さらに別の実施形態によれば、本発明のHPPDは、本明細書に配列番号64として示すアミノ酸配列に対して少なくとも53%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有し、ここで該HPPDは、

(a) 配列番号1のアミノ酸の位置335に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、および配列番号1のアミノ酸の位置336に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、

(b) 配列番号1のアミノ酸の位置335に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、配列番号1のアミノ酸の位置336に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、配列番号1のアミノ酸の位置339に対応するアミノ酸の位置におけるスレオニン、および配列番号1のアミノ酸の位置340に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン、

(c) 配列番号1のアミノ酸の位置188に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、および配列番号1のアミノ酸の位置336に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、

(d) 配列番号1のアミノ酸の位置335に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、および配列番号1のアミノ酸の位置336に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、

(e) 配列番号1のアミノ酸の位置335に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、配列番号1のアミノ酸の位置336に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、配列番号1のアミノ酸の位置339に対応するアミノ酸の位置におけるアラニン、および配列番号1のアミノ酸の位置340に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン、または

(f) 配列番号1のアミノ酸の位置335に対応するアミノ酸の位置におけるプロリンのアミノ酸置換を含むように改変された。

【0048】

さらに別の実施形態によれば、本発明のHPPDは、本明細書に配列番号65として示すアミノ酸配列に対して少なくとも53%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有し、ここで該HPPDは、

(a) 配列番号1のアミノ酸の位置335に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、および配列番号1のアミノ酸の位置336に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、

(b) 配列番号1のアミノ酸の位置335に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、配列番号1のアミノ酸の位置336に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、および配列番号1のアミノ酸の位置339に対応するアミノ酸の位置におけるスレオニン、

(c) 配列番号1のアミノ酸の位置188に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、および配列番号1のアミノ酸の位置336に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、

(d) 配列番号1のアミノ酸の位置335に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、配列番号1のアミノ酸の位置336に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、および配列番号1のアミノ酸の位置340に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン酸、

(e) 配列番号1のアミノ酸の位置335に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、配列番号1のアミノ酸の位置336に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、および配列番号1のアミノ酸の位置339に対応するアミノ酸の位置におけるアラニン

10

20

30

40

50

、または

(f) 配列番号1のアミノ酸の位置335に対応するアミノ酸の位置におけるプロリンのアミノ酸置換を含むように改変された。

【0049】

別の実施形態によれば、本発明のHPDは、本明細書に配列番号57として示すアミノ酸配列に対して少なくとも53%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の配列同一性を有するか、または、本明細書に配列番号60として示すヌクレオチド配列に対して少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の配列同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされる。本実施形態のHPDは、

(a) 配列番号1のアミノ酸の位置335に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、および配列番号1のアミノ酸の位置336に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、

(b) 配列番号1のアミノ酸の位置335に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、配列番号1のアミノ酸の位置336に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、配列番号1のアミノ酸の位置339に対応するアミノ酸の位置におけるスレオニン、および配列番号1のアミノ酸の位置340に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン、

(c) 配列番号1のアミノ酸の位置188に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、および配列番号1のアミノ酸の位置336に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、

(d) 配列番号1のアミノ酸の位置335に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、配列番号1のアミノ酸の位置336に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、および配列番号1のアミノ酸の位置340に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン酸、

(e) 配列番号1のアミノ酸の位置335に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、配列番号1のアミノ酸の位置336に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、配列番号1のアミノ酸の位置339に対応するアミノ酸の位置におけるアラニン、および配列番号1のアミノ酸の位置340に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン、または

(f) 配列番号1のアミノ酸の位置335に対応するアミノ酸の位置におけるプロリンのアミノ酸置換をさらに含んでもよい。

【0050】

別の実施形態によれば、本発明のHPDは、本明細書に配列番号58として示すアミノ酸配列に対して少なくとも53%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の配列同一性を有するか、または、本明細書に配列番号61として示すヌクレオチド配列に対して少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の配列同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされる。本実施形態のHPDは、

(a) 配列番号1のアミノ酸の位置335に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン

、および配列番号1のアミノ酸の位置336に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、

(b) 配列番号1のアミノ酸の位置335に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、配列番号1のアミノ酸の位置336に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、配列番号1のアミノ酸の位置339に対応するアミノ酸の位置におけるスレオニン、および配列番号1のアミノ酸の位置340に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン、

(c) 配列番号1のアミノ酸の位置188に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、および配列番号1のアミノ酸の位置336に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、

(d) 配列番号1のアミノ酸の位置335に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、配列番号1のアミノ酸の位置336に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、および配列番号1のアミノ酸の位置340に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン酸、

(e) 配列番号1のアミノ酸の位置335に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、配列番号1のアミノ酸の位置336に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、配列番号1のアミノ酸の位置339に対応するアミノ酸の位置におけるアラニン、および配列番号1のアミノ酸の位置340に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン、または

(f) 配列番号1のアミノ酸の位置335に対応するアミノ酸の位置におけるプロリンのアミノ酸置換をさらに含んでもよい。

【0051】

別の実施形態によれば、本発明のHPDは、本明細書に配列番号59として示すアミノ酸配列に対して少なくとも53%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の配列同一性を有するか、または、本明細書に配列番号62として示すヌクレオチド配列に対して少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の配列同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされる。本実施形態のHPDは、

(a) 配列番号1のアミノ酸の位置335に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、および配列番号1のアミノ酸の位置336に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、

(b) 配列番号1のアミノ酸の位置335に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、配列番号1のアミノ酸の位置336に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、配列番号1のアミノ酸の位置339に対応するアミノ酸の位置におけるスレオニン、および配列番号1のアミノ酸の位置340に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン、

(c) 配列番号1のアミノ酸の位置188に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、および配列番号1のアミノ酸の位置336に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、

(d) 配列番号1のアミノ酸の位置335に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、配列番号1のアミノ酸の位置336に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、および配列番号1のアミノ酸の位置340に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン酸、

(e) 配列番号1のアミノ酸の位置335に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、配列番号1のアミノ酸の位置336に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、配列番号1のアミノ酸の位置339に対応するアミノ酸の位置におけるアラニン、および配列番号1のアミノ酸の位置340に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン、または

(f) 配列番号1のアミノ酸の位置335に対応するアミノ酸の位置におけるプロリンのアミノ酸置換をさらに含んでもよい。

【0052】

別の実施形態によれば、本発明のHPPDは、本明細書に配列番号1として示すアミノ酸配列に対して少なくとも85%の配列同一性を有し、ここで該HPPDは、

(a) 配列番号1のアミノ酸の位置335に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、および配列番号1のアミノ酸の位置336に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、

(b) 配列番号1のアミノ酸の位置335に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、配列番号1のアミノ酸の位置336に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、配列番号1のアミノ酸の位置339に対応するアミノ酸の位置におけるスレオニン、および配列番号1のアミノ酸の位置340に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン、

(c) 配列番号1のアミノ酸の位置188に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、および配列番号1のアミノ酸の位置336に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、

(d) 配列番号1のアミノ酸の位置335に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、配列番号1のアミノ酸の位置336に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、および配列番号1のアミノ酸の位置340に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン酸、

(e) 配列番号1のアミノ酸の位置335に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、配列番号1のアミノ酸の位置336に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、配列番号1のアミノ酸の位置339に対応するアミノ酸の位置におけるアラニン、および配列番号1のアミノ酸の位置340に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン、または

(f) 配列番号1のアミノ酸の位置335に対応するアミノ酸の位置におけるプロリンのアミノ酸置換を含むように改変された。

【0053】

別の実施形態によれば、本発明のHPPDは、本明細書に配列番号1として示すアミノ酸配列に対して少なくとも85%の配列同一性を有し、ここで前記HPPDは、

(a) アミノ酸の位置188におけるトリプトファンおよびアミノ酸の位置336におけるトリプトファン、または

(b) アミノ酸の位置335におけるプロリンのアミノ酸置換を含む。

【0054】

別の実施形態によれば、本発明のHPPDは、本明細書に配列番号57として示すアミノ酸配列に対して少なくとも85%の配列同一性を有する。本実施形態のHPPDは、

(a) 配列番号1のアミノ酸の位置335に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、および配列番号1のアミノ酸の位置336に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、

(b) 配列番号1のアミノ酸の位置335に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、配列番号1のアミノ酸の位置336に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、配列番号1のアミノ酸の位置339に対応するアミノ酸の位置におけるスレオニン、および配列番号1のアミノ酸の位置340に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン、

(c) 配列番号1のアミノ酸の位置188に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、および配列番号1のアミノ酸の位置336に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、

(d) 配列番号1のアミノ酸の位置335に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、配列番号1のアミノ酸の位置336に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、および配列番号1のアミノ酸の位置340に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン酸、

(e) 配列番号1のアミノ酸の位置335に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、配列番号1のアミノ酸の位置336に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン

10

20

30

40

50

、配列番号1のアミノ酸の位置339に対応するアミノ酸の位置におけるアラニン、および配列番号1のアミノ酸の位置340に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン、または

(f) 配列番号1のアミノ酸の位置335に対応するアミノ酸の位置におけるプロリンのアミノ酸置換をさらに含んでもよい。

【0055】

別の実施形態によれば、本発明のHPPDは、本明細書に配列番号58として示すアミノ酸配列に対して少なくとも85%の配列同一性を有する。本実施形態のHPPDは、

(a) 配列番号1のアミノ酸の位置335に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、および配列番号1のアミノ酸の位置336に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、

10

(b) 配列番号1のアミノ酸の位置335に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、配列番号1のアミノ酸の位置336に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、配列番号1のアミノ酸の位置339に対応するアミノ酸の位置におけるスレオニン、および配列番号1のアミノ酸の位置340に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン、

(c) 配列番号1のアミノ酸の位置188に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、および配列番号1のアミノ酸の位置336に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、

(d) 配列番号1のアミノ酸の位置335に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、配列番号1のアミノ酸の位置336に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、および配列番号1のアミノ酸の位置340に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン酸、

20

(e) 配列番号1のアミノ酸の位置335に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、配列番号1のアミノ酸の位置336に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、配列番号1のアミノ酸の位置339に対応するアミノ酸の位置におけるアラニン、および配列番号1のアミノ酸の位置340に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン、または

(f) 配列番号1のアミノ酸の位置335に対応するアミノ酸の位置におけるプロリンのアミノ酸置換をさらに含んでもよい。

【0056】

別の実施形態によれば、本発明のHPPDは、本明細書に配列番号59として示すアミノ酸配列に対して少なくとも85%の配列同一性を有する。本実施形態のHPPDは、

30

(a) 配列番号1のアミノ酸の位置335に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、および配列番号1のアミノ酸の位置336に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、

(b) 配列番号1のアミノ酸の位置335に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、配列番号1のアミノ酸の位置336に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、配列番号1のアミノ酸の位置339に対応するアミノ酸の位置におけるスレオニン、および配列番号1のアミノ酸の位置340に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン、

(c) 配列番号1のアミノ酸の位置188に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、および配列番号1のアミノ酸の位置336に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、

40

(d) 配列番号1のアミノ酸の位置335に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、配列番号1のアミノ酸の位置336に対応するアミノ酸の位置におけるセリン、および配列番号1のアミノ酸の位置340に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン酸、

(e) 配列番号1のアミノ酸の位置335に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン、配列番号1のアミノ酸の位置336に対応するアミノ酸の位置におけるトリプトファン、配列番号1のアミノ酸の位置339に対応するアミノ酸の位置におけるアラニン、および配列番号1のアミノ酸の位置340に対応するアミノ酸の位置におけるグルタミン、または

(f) 配列番号1のアミノ酸の位置335に対応するアミノ酸の位置におけるプロリン

50

のアミノ酸置換をさらに含んでもよい。

いずれのH P P D配列も、本明細書に開示される置換の1以上を含むように改変されてよい。例えば本発明のH P P Dは、上に記載した置換の1以上を含むように改変された、自然に存在する細菌、植物、または動物のH P P D酵素のいずれも包含する。

【0057】

本発明のH P P Dタンパク質を得るために、現存するタンパク質からの出発アミノ酸配列は、本出願において定義されるように、少なくとも1のアミノ酸を用いた人の手による置換で改変される必要があるが、これは、別のアミノ酸をコードする別のコドンを用いて特定のコドンを置換することでこのようなタンパク質をコードするDNAを改変することにより、最も便利に行われる。

10

【0058】

本発明に従って改変されてよい代表的なH P P D配列としては、細菌、例えば蛍光菌(*Pseudomonas fluorescens*)のようなシュードモナス種(*Pseudomonas* sp.)、またその他には、シネコシスティス(*Synechocystis*)属のシアノバクテリアに由来するH P P D配列が挙げられる。該配列はまた、植物、特に双子葉類植物、セリ科植物、またその他には、単子葉類植物に由来してもよい。引用してもよい有利な例としては、タバコ、シロイヌナズナ属、ニンジン、トウモロコシ(*Zea mays*または*corn*)、コムギ、オオムギ、エンバク、メリケンクキビ、シンクリノイガ、ボウムギ、オニウシノケグサ、アキノエノコログサ、オヒシバ、モロコシ属、シンクリノイガ、オニウシノケグサのような植物が挙げられる。コード配列およびそれらを単離してクローニングする方法は当該技術分野において公知であるか、または本明細書の他所に記載している(例えば配列番号63~76)。本発明の特定の実施形態によれば、本発明に従って改変されてよいH P P Dは、細菌由来、詳細にはシュードモナス種、さらに詳細には蛍光菌、ロドコッカス種、ベニミズケムシ、シネコッカス種、ピクロフィルス・トリダス、コルディア・アルジシダ由来であるか、またはシロイヌナズナ、モロコシ、イネ、コムギ、オオムギ、ボウムギ、およびエンバクのような植物由来である。

20

【0059】

本発明の目的のために、本発明のH P P Dはさらに改変されてよく、例えばクローニング目的や輸送ペプチドとの融合などのために、幾つかのアミノ酸(例えば1ないし10アミノ酸)が置換され、付加され、または欠失していてもよく、この場合H P P D活性、すなわちパラヒドロキシフェニルピルビン酸からホモゲンチジン酸への変換を触媒する特性が保持されているか、またはさらに改善されたH P P Dとなっていてよい。例えば本明細書に記載する、改変によってさらに改善されたH P P Dは、配列番号2として示される蛍光菌由来の変異H P P D、配列番号64として示されるエンバク由来の変異H P P D、その全体が参照により本明細書に取り込まれる国際公開第2012/021785号の配列番号3~326、383~389、393、395、および397~459のいずれかに示される変異H P P D配列、その全体が参照により本明細書に取り込まれる国際公開第2011/068567号の配列番号2~14および20~50のいずれかに示されるH P P D配列、その全体が参照により本明細書に取り込まれる国際公開第2010/085705号の配列番号15~26のいずれかに示されるH P P D配列、それぞれにその全体が参照により本明細書に取り込まれる国際公開第09/144079または米国特許第6,245,968号に記載される、1以上の置換を有するH P P D、国際公開第2010/085705号の表1、2、5、または6に記載される、1以上の置換を有するH P P D、および/または国際公開第2011/068567号の表1に記載される、1以上の置換を有するH P P Dであってよい。

30

40

【0060】

幾つかの実施形態によれば、本発明のヌクレオチド配列(その単離された、組換えおよびキメラ遺伝子、該核酸配列を含むベクター、宿主細胞、植物、植物の部分、および種子、該核酸配列によってコードされるアミノ酸配列およびその組成物、ならびに植物のH P P D阻害除草剤に対する耐性を増大させるため、特にN(1, 2, 5-オキサジアゾール

50

ー 3-イル) ベンズアミド類の分類、N- (テトラゾールー 4-イル) -またはN- (トリアゾールー 3-イル) アリールカルボキサミド類、例えば 2-クロロ-3-エトキシ-4- (メチルスルホニル) -N- (1-メチル-1H-テトラゾールー 5-イル) ベンズアミドおよび 2-クロロ-3- (メトキシメチル) -4- (メチルスルホニル) -N- (1-メチル-1H-テトラゾールー 5-イル) ベンズアミド、トリケトン類、例えばテンボトリオン、スルコトリオン、およびメソトリオンの分類、イソキサゾール類、例えばイソキサフルトールの分類、またはピラゾリネート類の分類、例えばピラスルホトールおよびトプラメゾン、特にテンボトリオン、スルコトリオン、トプラメゾン、ビスクロピロン、テフリルトリオン、イソキサフルトール、およびメソトリオンから選択される HPPD 阻害除草剤に対する耐性を増大させるための該核酸配列の使用法を含む) は、HPPD 阻害除草剤に耐性のポリペプチドをコードする配列番号 3~59 のいずれか一つに示されるアミノ酸配列、ならびにその断片および変異形をコードする。このように本実施形態によれば、本発明の HPPD は、HPPD 阻害除草剤に対する耐性を宿主細胞に付与する、配列番号 3~59 のいずれか一つに示されるアミノ酸配列、ならびにその断片および変異形を含む。

10

【0061】

A. HPPD 阻害剤に対する耐性の測定方法

本発明の HPPD 配列を評価するため、いずれかの適切な、HPPD 阻害剤に対する耐性の測定方法を用いることができる。耐性は、細胞または生物が特定の HPPD 阻害除草剤の存在下で生存すること、またはこれらが光合成、タンパク質合成、または呼吸、および再生のような必須の細胞機能を、無処理の細胞または生物と容易に識別できないほどに遂行する能力、または植物を HPPD 阻害除草剤で処理した際、このような除草剤で処理していない (しかし HPPD 阻害除草剤の使用以外の機序によって雑草が除去されたかまたは抑制された場合の) 植物と比較して収穫に有意差がみられないかまたは収穫が改善される能力をモニターすることによって測定できる。幾つかの実施形態によれば、耐性は、それぞれの HPPD タンパク質をコードする遺伝子を含む核酸によって形質転換された細胞または生物の、明らかな指標となる表現型に従って測定できるか、または異なる濃度の様々な HPPD 阻害剤の存在下における HPPD タンパク質の *in vitro* アッセイによって測定できる。用量反応、およびこれらの指標となる表現型 (茶色の形成、成長阻害、白化、除草効果など) に付随する、用量反応における相対的なシフトは、例えば GR 50 (成長を 50% 減少させる濃度) または MIC (最小発育阻止濃度) 値に関連して便利に出現し、ここで値の増加は、除草剤の異なる濃度範囲における植物の損傷、成長点の白化症状などに基づいた通常の様式において、発現した HPPD に固有の耐性の増大に対応する。これらのデータは、例えば x 軸にプロットされた「用量」および y 軸にプロットされた「死滅パーセンテージ」、「除草効果」、「緑色植物の出現数」などを有する用量/反応曲線に由来する GR 50 値に関連して表現することができ、ここで GR 50 値の増大は、発現した HPPD に固有の耐性の、レベルの増大に対応する。除草剤は、発芽前または発芽後に、適切に使用することができる。

20

30

【0062】

様々な実施形態によれば、本発明の HPPD タンパク質をコードする核酸または遺伝子または本発明の HPPD タンパク質の耐性レベルは、タバコのような試験植物または大豆または綿のような農業植物の遺伝子組換え、再生、育種、およびスプレー試験を通してスクリーニングすることができる。このようなスクリーニングによって得られた結果に従って、このような植物は、HPPD 阻害剤 (例えば、N (1, 2, 5-オキサジアゾールー 3-イル) ベンズアミド類、N- (テトラゾールー 4-イル) -またはN- (トリアゾールー 3-イル) アリールカルボキサミド類、例えば 2-クロロ-3-エトキシ-4- (メチルスルホニル) -N- (1-メチル-1H-テトラゾールー 5-イル) ベンズアミドおよび 2-クロロ-3- (メトキシメチル) -4- (メチルスルホニル) -N- (1-メチル-1H-テトラゾールー 5-イル) ベンズアミド、トリケトン類、例えばテンボトリオン、スルコトリオン、およびメソトリオンの分類、イソキサゾール類、例えばイソキサフ

40

50

ルトールの分類、またはピラゾリネート類の分類、例えばピラスルホトールおよびトプラメゾン、特にテンボトリオン、スルコトリオン、トプラメゾン、ビシクロピロン、テフリルトリオン、イソキサフルトール、およびメソトリオンから選択されるH P P D阻害除草剤) に対し、H P P Dタンパク質をコードするいずれの外因性遺伝子も含まないような植物よりも、または本発明のH P P Dタンパク質をコードする核酸と同一のプロモーターによって制御される、参照H P P DをコードするDNA、例えばシロイヌナズナH P P DをコードするDNAを含む遺伝子を含む植物よりもさらに耐性であり、望ましくは耕作地への適用に推奨される通常用量の少なくとも2倍の量に対して耐性であり、さらに好ましくは耕作地への適用に推奨される通常用量の4倍までの量に対して耐性である。したがって、用語「H P P Dに作用する少なくとも1の除草剤に対する植物の耐性を増大させられる」は、本発明のH P P Dを発現する植物による、H P P D阻害除草剤の耕作地での通常用量の少なくとも2×、または3×、または4×、またはそれを超える量に対する、内在性H P P Dのみを発現する植物または参照H P P D酵素を発現する植物に比較した耐性を意味する。これに関して、用語「H P P Dに作用する除草剤」は、公知の物質および／または除草剤として使用される物質に限定されず、H P P Dタンパク質の触媒活性を阻害するいずれの物質も指す。

10

【0063】

あるいは本発明のH P P Dタンパク質に対して、 pI_{50} (pI_{50} 値は、モル濃度における酵素活性の50%を阻害するために必要な阻害剤の濃度のlog値を意味する) のような定量レベルでのデータを得て、いずれかのH P P D阻害除草剤それぞれの存在下または非存在下で、参照H P P D配列と比較することができる。

20

【0064】

限定はされないが、本発明のH P P D配列を評価するために用いることのできる特定のアッセイの種類は、比色アッセイである。このアッセイでは、1%アガロース、5mM L-チロシン、および42mM コハク酸塩を含み、かつベクターpSE420 (Invitrogen、カールスルーエ、独国) または改変型pSE420 (pSE420 (RI) NX) のための選択薬剤を含むYTブロス型の培地を、深底ウェルプレートに注ぎ込む。指数関数増殖期にある、ベクターpSE420-H P P D x (H P P D x は、推定上のH P P D酵素／タンパク質をコードするいずれかの遺伝子を意味する) を含む大腸菌培養液を各ウェル内に入れる。37℃にて16時間後、培地を含まないウェル、空のベクターpSE420を含む大腸菌培養液をまいたウェルは透明であり、また、不活性のH P P Dをコードする遺伝子を含むベクターpSE420-H P P D xを含む大腸菌培養液をまいたウェルも透明であるが、活性のあるH P P DをコードするベクターpSE420-H P P D xを含む大腸菌培養液まいたウェルは茶色である。この活性が何に由来するかに関わらず、本試験はH P P D活性を反映するものであり、かつH P P D活性の同定を定性的レベルで可能にすることがこれまでに示されてきた(米国特許第6, 768, 044号)。

30

【0065】

B. H P P D配列への変異の導入方法

本発明の核酸によってコードされる変異H P P Dタンパク質では、上で定義したように、少なくとも1のアミノ酸が置換されている。

40

【0066】

置換は上で定義したように、参照H P P Dをコードする核酸配列において、置換に適したいずれかの方法によって行うことができ、前記配列では、置換されるアミノ酸をコードするコドンが置換するアミノ酸に対応するコドンによって置換され、前記コドンは広く文献に記載され、かつ当業者に周知である。

【0067】

この置換を行うため、幾つかの分子生物学的方法を用いることができる。本発明の変異核酸配列および対応するタンパク質の調製に有用な方法は、予め選択した1以上のアミノ酸をコードするコドンに対して部位特異的な変異誘発を行うことを含む。このような部位

50

特異的変異を得るための方法は当業者に周知であり、かつ広く文献に記載されている（特に、Directed Mutagenesis: A Practical Approach, 1991, Edited by M. J. McPHERSON, IRL PRESS）。また、該方法は市販のキットを用いて行うこともできる（例えばQiagenから市販される、QUICKCHANGE（商標）lightening mutagenesis kit）。部位特異的変異誘発を行った後、適切なスクリーニングの補助を用いてHPD阻害剤に対する感受性の低い変異HPDを含む細胞を選択することが有用である。これを達成するための適切なスクリーニング方法は上記のとおりである。

【0068】

あるいは、参照HPDをコードするDNA配列は、本明細書で説明する置換の1以上を有するHPDタンパク質をコードするようにコンピュータ上で改変した後、新規合成してもよい。変異HPDタンパク質をコードするヌクレオチド配列は、本明細書の他所に記載するように、宿主細胞内へ導入してもよい。

【0069】

A. 単離されたポリヌクレオチドならびにその変異形および断片

幾つかの実施形態によれば、本発明は、単離された、または組換えたポリヌクレオチドを含む。本明細書で定義される「単離された」もしくは「組換え」ポリヌクレオチドまたはポリペプチド／タンパク質、またはその生物学的活性部分は、それらが異種性の宿主細胞内、またはトランスジェニック植物細胞、種子、または植物内に含まれる際には、既に元の天然状態の生物として存在するのではない。一実施形態によれば、「単離された」ポリヌクレオチドは、該ポリヌクレオチドが由来する生物のゲノムDNA内の核酸（すなわち核酸の5'および3'末端に位置する配列）に当然隣接する配列（例えば、タンパク質をコードする、または調節性の配列）を含まない。用語「組換え」は、天然のポリヌクレオチドまたはポリペプチドを操作した、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドを包含し、このようなポリヌクレオチドまたはポリペプチドは天然のものとは（例えば化学組成または構造において）異なっている。別の実施形態によれば、「単離された」または「組換え」ポリヌクレオチドは、該ポリヌクレオチドが由来する生物のゲノムDNA内に当然に存在する内部配列（すなわちイントロン）を含まない。このようなポリヌクレオチドの典型例は、いわゆる相補性DNA（cDNA）である。例えば様々な実施形態によれば、単離されたHPD阻害除草剤に対する耐性をコードするポリヌクレオチドは、該ポリヌクレオチドが由来する細胞のゲノムDNA内のポリヌクレオチドに当然に隣接するヌクレオチド配列よりも、約5 kb、4 kb、3 kb、2 kb、1 kb、0.5 kb、または0.1 kbよりも短いヌクレオチド配列を含み得る。本発明の核酸分子は、本発明のHPDコードする核酸分子、例えば配列番号60～62のいずれかに示されるヌクレオチド配列を包含する。

【0070】

本発明はさらに、配列番号3～59のいずれかに示されるアミノ酸配列をコードするいずれかの核酸配列の変異形および断片を企図する。ポリヌクレオチドの「断片」は、ポリペプチドの生物学的活性部分をコードしてよいか、または本明細書の他所に記載する方法において用いるハイブリダイゼーションプローブまたはPCRプライマーとして使用できる断片であってもよい。ポリヌクレオチドの断片であるポリヌクレオチドは、少なくとも約15、20、50、75、100、200、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1050、1100、1150の連続するヌクレオチド、または意図された使用（例えば本明細書に記載するHPD核酸）に応じて、本明細書に開示する完全長ポリヌクレオチドに存在するヌクレオチドの数までを含む。「連続する」ヌクレオチドとは、互いが直接に隣接するヌクレオチド残基を意図する。

【0071】

本発明のポリヌクレオチドの断片は、一般に、完全長HPD阻害除草剤耐性タンパク質の生物活性、すなわち除草剤に対する耐性活性を保持するポリペプチド断片をコードし

10

20

30

40

50

得る。「除草剤に対する耐性活性を保持する」は、該断片が、配列番号2として本明細書に開示される、完全長H P P D阻害除草剤耐性タンパク質の除草剤に対する耐性活性の少なくとも約30%、少なくとも約50%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、85%、90%、95%、100%、110%、125%、150%、175%、200%、250%、少なくとも約300%、またはそれを超える耐性活性を有することを意図する。除草剤に対する耐性活性を測定するための方法は、当該技術分野において公知であり、かつ代表的な方法は本明細書に記載される。限定されない例によれば、本発明の断片は、H P P D阻害除草剤の同用量に対して耐性であるか、またはH P P D阻害除草剤の2×、3×、4×、またはそれよりも多い用量に対して耐性であり、または該断片は、該断片と配列番号2との間のp I 50またはK_iに基づいて、またはそれよりもさらに耐性である。

10

【0072】

本発明のポリペプチドの生物学的活性部分をコードするポリヌクレオチドの断片は、少なくとも約150、175、200、250、300、350の連続するアミノ酸、または本発明の完全長ポリペプチドに存在するアミノ酸の総数までをコードする。限定されない例によれば、本発明のポリペプチドの生物学的活性部分をコードするポリヌクレオチドの断片は、配列番号2のアミノ酸の位置188、189、215、335、336、339、および340の1以上を含む。

【0073】

本発明はまた、上記の変異ポリヌクレオチドも包含する。ポリヌクレオチドの「変異体」は、本発明のH P P Dをコードするが遺伝コードの縮重のため保存的に異なる配列、および十分に同一である配列もまた包含する。本発明の変異体は、H P P D酵素活性およびH P P D除草剤阻害剤に対する耐性を保持し得る。用語「十分に同一」は、標準的なパラメータを用いたアラインメントプログラムによって参照配列と比較した際、少なくとも約60%または65%の配列同一性、約70%または75%の配列同一性、約80%または85%の配列同一性、約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有するポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列を意図する。当業者はこれらの値が、コドンの縮重、アミノ酸の類似性、読み枠の位置などを考慮した上で適切に調整され、2つのポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドの対応する同一性が決定されることを認識するであろう。

20

30

【0074】

細菌遺伝子は、翻訳開始領域の近傍に、非常にしばしば複数のメチオニン開始コドンを含む。しばしばこれらの開始コドンの1以上における翻訳開始によって、機能的タンパク質が生成される。これらの開始コドンはA T Gコドンを含み得る。しかしながら、バチルス種のような細菌はコドンG T Gもまた開始コドンとして認識し、かつG T Gコドンにおいて翻訳が開始されるタンパク質は、最初のアミノ酸としてメチオニンを含む。さらに、細菌においてこれらのコドンのうちのどれが天然の状態で用いられるかについて演繹的に判定されることは少ない。このように、メチオニンコドンの代替コドンのうちの一つを用いることで、除草剤に対する耐性を付与する変異形が生成されるであろうことが理解される。これらの除草剤耐性タンパク質は本発明に包含され、本発明の方法において使用され得る。天然の対立遺伝子変異形は、以下に概説する周知の分子生物学技術、例えばポリメラーゼ連鎖反応（P C R）およびハイブリダイゼーション技術を用いて同定できる。変異ポリヌクレオチドには、例えば部位特異的またはその他の変異誘発法を用いて産生されたが、所望の生物活性を有するポリペプチドをなおコードする、合成由来のポリヌクレオチドもまた含まれる。

40

【0075】

当業者は、本発明のポリヌクレオチドのさらなる変異によって変更が導入され、これによってポリペプチドの生物活性を変化させることなく、コードされたポリペプチドのアミノ酸配列にさらなる変更が導入されることをさらに理解するであろう。このように、単離された変異ポリヌクレオチドは、対応する本発明のH P P Dをコードするポリヌクレオチ

50

ドに、1以上のさらなるヌクレオチドによる置換、付加、または欠失を導入すること、例えばコードされたポリペプチドに1～5、1～10、もしくは1～15アミノ酸の置換、付加、または欠失、または1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、もしくは15アミノ酸の置換、付加、または欠失を導入することによって作製できる。標準的な技術、例えば部位特異的変異誘発およびPCRを介した変異誘発、または遺伝子シャッフリング技術によってさらなる変異が導入され得る。このような変異ポリヌクレオチドもまた本発明に包含される。

【0076】

変異ポリヌクレオチドは、飽和変異誘発(saturation mutagenesis)または置換変異誘発(permutational mutagenesis)のような、コード配列の全部または一部に沿った無作為な変異の導入によって作製可能であり、かつ得られた変異体は、活性を保持する変異体を同定するため、除草剤に対する耐性活性を付与する能力についてスクリーニングすることができる。

10

【0077】

変異形を産生するためのさらなる方法としては、本明細書に開示するタンパク質を発現する細胞（またはそのライブラリー）を、タンパク質の活性にストレスを与える特異的条件下に供することが挙げられる。特異的条件としては、温度変化、pHの変化、および基質または阻害剤の濃度の変化が挙げられる（しかしこれらに限定されない）。タンパク質ライブラリーは、タンパク質発現（例えば大腸菌またはその他の宿主における）の間に、またはタンパク質抽出物の作製後もしくはタンパク質の精製後に、これらの条件下に供してよい。

20

【0078】

ストレス条件に供されたタンパク質ライブラリーの機能的または酵素的活性は、次に参照タンパク質と比較することで、改善された特性を有するタンパク質を同定することができる。この活性比較は、成長スクリーニングの一部として、あるいはタンパク質の活性を定量する酵素アッセイの一部として行うことができる。改善されたものとして同定される特性としては、HPPD阻害除草剤に対する耐性、動態定数（ K_m 、 K_i 、 V_{max} を含む）における変化、タンパク質の安定性、タンパク質の熱安定性、またはタンパク質温度の至適性が挙げられる。

【0079】

30

C. 単離されたタンパク質ならびにその変異体および断片

除草剤に耐性のポリペプチドもまた、本発明に包含される。除草剤に耐性のポリペプチドとしては、除草剤に耐性ではないポリペプチド（本明細書では、「混入タンパク質」とも称される）の約30%、20%、10%、または5%よりも少ない重量の（乾燥重量による）ポリペプチドの調製が挙げられる。本発明における「除草剤耐性タンパク質」は、本明細書に開示されるHPPDポリペプチドを意図する。その断片、生物学的活性部分、および変異形もまた供給され、本発明の方法を実践するために用いられ得る。

【0080】

「断片」または「生物学的活性部分」としては、除草剤に対する耐性活性を保持する、除草剤耐性タンパク質をコードするアミノ酸配列の一部を含むポリペプチド断片が挙げられる。除草剤耐性タンパク質の生物学的活性部分は、例えば、長さとして10、25、50、100またはそれを超えるアミノ酸を有するポリペプチドであってよい。このような生物学的活性部分は組換え技術によって調製され、除草剤に対する耐性活性について評価され得る。

40

【0081】

「変異形」は、配列番号3～59のいずれかに、少なくとも約60%、65%、約70%、75%、約80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一のアミノ酸配列を有するタンパク質またはポリペプチドを意図し、ここで前記変異形はHPPD酵素活性およびHPPD阻害除草剤に対する耐性を有する。当業者はこれらの値が、コドンの縮重、アミノ酸の類似性、読み枠の

50

位置などを考慮した上で適切に調整され、2つのポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドの対応する同一性が決定されることを認識するであろう。

【0082】

例えば「保存的なアミノ酸置換」は、1以上の非必須アミノ酸残基に対して行われてよい。「非必須」アミノ酸残基は、生物活性を変化させることなく、ポリペプチドの参照配列から変更可能な残基であるが、「必須」アミノ酸残基は生物活性に必要である。「保存的なアミノ酸置換」では、アミノ酸残基が、同様の側鎖を有するアミノ酸残基によって置換される、同様の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該技術分野において定義されている。これらのファミリーとしては、塩基性側鎖（例えばリジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えばアスパラギン酸、グルタミン酸）、極性無電荷側鎖（例えばグリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、ベータ分岐側鎖（例えばスレオニン、バリン、イソロイシン）、および芳香族側鎖（例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を有するアミノ酸が挙げられる。アミノ酸置換は、機能が保持されている、保存されていない領域において行われてもよい。一般にこのような置換は、保存されたアミノ酸残基に対して、または保存されたモチーフ内に存在するアミノ酸残基に対して、これらの残基がポリペプチド活性に必須である場合には行わない。しかしながら当業者は、機能的な変異形が、保存された残基において、保存されたかまたは保存されていない少数の変更を有し得ることを理解するであろう。

【0083】

本発明のHPPDに対する、またはその変異形もしくは断片に対する抗体もまた含まれる。抗体を産生するための方法は当該技術分野において公知である（例えば、Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY、米国特許第4,196,265号を参照されたい）。

【0084】

このように本発明の一態様は、本発明のタンパク質もしくはペプチド分子の1以上に特異的に結合する抗体、単鎖抗原結合分子、またはその他のタンパク質、およびそれらのホモログ、融合体、または断片に関する。特に好ましい実施形態によれば、抗体は、配列番号3～59に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質またはその断片に特異的に結合する。別の実施形態によれば、抗体は、配列番号3～59に示されるアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列を含む融合タンパク質またはその断片に特異的に結合する。

【0085】

本発明の抗体は、本発明のタンパク質もしくはペプチド分子を定量的または定性的に検出するため、またはタンパク質の翻訳後修飾を検出するために用いられてよい。本明細書で用いられる抗体またはペプチドは、これらの本発明のタンパク質またはペプチド分子への結合が関連しない分子の存在によって競合的に阻害されない場合、「特異的に結合」すると考えられる。

【0086】

D. 遺伝子スタッキング

農作物の商業的産生においては、信頼のおける駆除剤による管理の下で、農業植物の耕作地から不要な植物（すなわち「雑草」）を除去することが望ましい。理想的な処理は、耕作地全体に適用可能であるが、不要な植物のみが除去されて、農業植物は影響されない。このような処理システムの一つは、除草剤に対して耐性である農業植物の耕作地に除草剤をスプレーした際、農業植物は成長し続けるが、除草剤に対する耐性をもたない雑草は死滅するかまたはひどく損傷されるように、除草剤に対して耐性である農業植物を使用することに関連し得る。理想的には、このような処理システムは、雑草の防除によって柔軟性と経済性との可能な最良の組み合わせが提供され得るように、除草剤の特性を変化させ

ることの利点を享受し得る。例えば、耕作地において個別の除草剤の持続性は様々であり、幾つかの除草剤は耕作地に散布された後、比較的長期間有効であるが、その他の除草剤は、他の化合物および／または無効な化合物へと迅速に分解される。理想的な処理システムにおいては、栽培者が特定の状況に応じて除草剤を選択できるように、異なる除草剤の使用が許容され得る。

【0087】

多数の、除草剤に対して耐性である農業植物が現在市販されているが、市販の除草剤および除草剤／農作物の組み合わせの多くに発生する問題は、一般的な雑草種に対する個々の除草剤の活性スペクトルが、典型的には不完全なことである。これまで使用されてきた個々の除草剤の多くに対して、除草剤に抵抗性である雑草の種および生物型がさらに蔓延している（例えばTranel and Wright (2002) Weed Science 50:700-712; Owen and Zelaya (2005) Pest Manag. Sci. 61:301-311を参照されたい）。1を超える除草剤に耐性のトランスジェニック植物について記載されているが（例えば国際公開第2005/012515号を参照されたい）、農作物の産生、雑草防除の選択、残った雑草に対する防除の延長、および農作物収穫の改善についてのすべての態様の改善が必要とされ続けている。

10

【0088】

本発明のHPPDタンパク質またはヌクレオチド配列は、これらの植物に有用な農学的特性を付与するタンパク質またはRNAをコードするその他の遺伝子と有利に組み合わせられる。形質転換された植物に有用な農学的特性を付与するタンパク質またはRNAをコードする遺伝子のうち、化学構造がHPPD阻害除草剤とは異なる、1以上の除草剤に対する耐性を付与するタンパク質、特定の昆虫に対する耐性を付与するその他のタンパク質、および特定の疾病に対する耐性を付与するタンパク質をコードするDNA配列、線虫または昆虫防除に役立つRNAをコードするDNAなどについて言及することができる。

20

【0089】

このような遺伝子については特に、それぞれにその全体が参照により本明細書に取り込まれる、PCT特許出願の国際公開第91/02071号および国際公開第95/06128号、ならびに米国特許第7,923,602号および米国特許出願公開第20100166723号に記載されている。

30

【0090】

形質転換された植物細胞および植物に、特定の除草剤に対する耐性を付与するタンパク質をコードするDNA配列のうち、国際公開第2009/152359号に記載される、グルホシネート除草剤に対する耐性を付与するbarもしくはPAT遺伝子またはストレプトマイセス・セリカラー遺伝子、例えばグリホサートおよびその塩のようなEPSPSが標的である除草剤に対する耐性を付与する、適切なEPSPSをコードする遺伝子（米国特許第4,535,060号、米国特許第4,769,061号、米国特許第5,094,945号、米国特許第4,940,835号、米国特許第5,188,642号、米国特許第4,971,908号、米国特許第5,145,783号、米国特許第5,310,667号、米国特許第5,312,910号、米国特許第5,627,061号、米国特許第5,633,435号）、グリホサート-n-アセチルトランスフェラーゼをコードする遺伝子（例えば、米国特許第8,222,489号、米国特許第8,088,972号、米国特許第8,044,261号、米国特許第8,021,857号、米国特許第8,008,547号、米国特許第7,999,152号、米国特許第7,998,703号、米国特許第7,863,503号、米国特許第7,714,188号、米国特許第7,709,702号、米国特許第7,666,644号、米国特許第7,666,643号、米国特許第7,531,339号、米国特許第7,527,955号、および米国特許第7,405,074号）、またはグリホサート酸化還元酵素をコードする遺伝子（例えば、米国特許第5,463,175号）について言及することができる。

40

【0091】

50

E P S P S が標的である除草剤に対する耐性を付与する、適切なE P S P SをコードするDNA配列のうち、さらに、植物E P S P S、特にトウモロコシE P S P S、特に二つの変異を有するトウモロコシE P S P S、特にアミノ酸の位置102における変異およびアミノ酸の位置106における変異（国際公開第2004/074443号）、および以下二重変異トウモロコシE P S P Sまたは2mE P S P Sと称される、米国特許第6566587号に記載されるE P S P Sをコードする遺伝子、またはアグロバクテリウムから分離したE P S P Sをコードする遺伝子、および米国特許第5,633,435号の配列番号2および配列番号3に記載され、C P 4とも称されるE P S P Sをコードする遺伝子について特に言及され得る。

【0092】

10

E P S P S が標的である除草剤に対する耐性を付与する、適切なE P S P SをコードするDNA配列のうち、さらに、アルスロバクター・グロビフォルミス(*Arthrobacter globiformis*)由来のE P S P S G R G 2 3をコードする遺伝子、また国際公開第2008/100353号に記載される変異体G R G 2 3 A C E 1、G R G 2 3 A C E 2、またはG R G 2 3 A C E 3、特に国際公開第2008/100353号の配列番号29であるG R G 2 3 (a c e 3) R 1 7 3 Kのような変異体または変異形G R G 2 3についても特に言及され得る。

【0093】

E P S P S をコードする、さらに詳細には上記の遺伝子をコードするDNA配列の場合に、これらの酵素をコードする配列は、輸送ペプチド、特に米国特許第5,510,471号または第5,633,448号に記載される「最適化された輸送ペプチド」をコードする配列の後に、有利に配置される。

20

【0094】

本発明の核酸配列と組み合わせてよい代表的な除草剤耐性形質としてはさらに、少なくとも1のA L S（アセト乳酸合成酵素）阻害剤（国際公開第2007/024782号）、変異シロイヌナズナ属A L S/A H A S 遺伝子（米国特許第6,855,533号）、代謝によって2,4-D（2,4-ジクロロフェノキシ酢酸）に対する耐性を付与する2,4-D-モノオキシゲナーゼをコードする遺伝子（米国特許第6,153,401号）、および代謝によってジカンバ（3,6-ジクロロ-2-メトキシ安息香酸）に対する耐性を付与するジカンバモノオキシゲナーゼをコードする遺伝子（米国特許第2008/0119361号および米国特許第2008/0120739号）が挙げられる。

30

【0095】

様々な実施形態によれば、本発明のH P P Dには1以上のさらなるH P P D阻害除草剤に耐性の遺伝子を含む1以上の除草剤に耐性の遺伝子、および／または1以上のグリホサートおよび／またはグルホシネートに耐性の遺伝子がスタックされる。一実施形態によれば、本発明のH P P Dは、2mE P S P Sおよびb a rと組み合わせられる。

【0096】

昆虫に対する耐性の特性に関わるタンパク質をコードするDNA配列のうち、文献に広く記載され、かつ当業者に周知のB t タンパク質について特に言及され得る。フォトラブダス属のような細菌から抽出したタンパク質についても言及され得る（国際公開第97/17432号および国際公開第98/08932号）。

40

【0097】

昆虫に対する耐性の新規な特性を付与する、関心のあるタンパク質をコードするDNA配列のうち、さらに、文献に広く記載され、かつ当業者に周知のB t C r y またはV I P タンパク質について特に言及され得る。これらとしては、C r y 1 F タンパク質またはハイブリッド由来のC r y 1 F タンパク質（例えば米国特許第6,326,169号、米国特許第6,281,016号、米国特許第6,218,188号に記載されるハイブリッドC r y 1 A - C r y 1 F タンパク質またはその毒性断片）、C r y 1 A 型タンパク質またはその毒性断片、好ましくはC r y 1 A c タンパク質またはC r y 1 A c タンパク質由来のハイブリッド（例えば米国特許第5,880,275号に記載のハイブリッドC r

50

y1Ab-Cry1Acタンパク質)または欧州特許第451878号に記載されるCry1AbもしくはBt2タンパク質またはそれらの殺虫性断片、国際公開第02/05766号に記載されるCry2Ae、Cry2Af、もしくはCry2Agタンパク質またはその毒性断片、国際公開第2007/140256号(配列番号7)に記載されるCry1A、105タンパク質またはその毒性断片、NCBI受託番ABG20428のVIP3Aa19タンパク質、NCBI受託番号ABG20429(国際公開第2007/142840号の配列番号2)のVIP3Aa20タンパク質、COT202またはCOT203綿(それぞれ国際公開第2005/054479号および国際公開第2005/054480号)において産生されるVIP3Aタンパク質、国際公開第01/47952号に記載されるCryタンパク質、Estruch et al. (1996), Proc Natl Acad Sci USA. 28;93(11):5389-94および米国特許第6,291,156号に記載されるVIP3Aaタンパク質またはその毒性断片、ゼノラブダス属(国際公開第98/50427号に記載される)、セラチア属(S. エントモフィラ由来の)またはフォトラブダス属の株に由来する殺虫性タンパク質、例えば国際公開第98/08932号に記載されるフォトラブダス属由来のTcタンパク質(例えばWaterfield et al., 2001, Appl Environ Microbiol. 67(11):5017-24; French-Constant and Bowen, 2000, Cell Mol Life Sci. ;57(5):828-33)が挙げられる。これらのタンパク質のいずれかにおいて、上記配列のいずれかに由来する幾つかの(1~10、好ましくは1~5)アミノ酸が異なる、いずれかの変異形または変異体、特にそれらの毒性断片の、または色素体輸送ペプチドのような輸送ペプチドの、またはその他のタンパク質もしくはペプチドとの融合物の配列もまた、本明細書に包含される。

【0098】

様々な実施形態によれば、植物において本発明のHPPD配列は、除草剤耐性、昆虫耐性、乾燥耐性、線虫防除された、効率良い水使用、効率良い窒素使用、改善された栄養値、疾病抵抗性、改善された光合成、改善された繊維品質、ストレス耐性、改善された再生などのような望ましい形質を付与する1以上の遺伝子と組み合わせることができる。

【0099】

同種の植物において本発明の遺伝子と組み合わせてもよい(例えば交雑によって、または本発明のキメラ遺伝子による別のトランスジェニック体(transgenic event)を含む植物を再形質転換することによって)、特に有用なトランスジェニック体としては、トランスジェニック体(Event)531/PV-GHBK04(綿、昆虫防除、国際公開第2002/040677号に記載される)、トランスジェニック体1143-14A(綿、昆虫防除、寄託されていない、国際公開第06/128569号に記載される)、トランスジェニック体1143-51B(綿、昆虫防除、寄託されていない、国際公開第06/128570号に記載される)、トランスジェニック体1445(綿、除草剤耐性、寄託されていない、米国特許出願公開A2002-120964号または国際公開第02/034946号に記載される)、トランスジェニック体17053(米、除草剤耐性、PTA-9843として寄託される、国際公開第10/117737号に記載される)、トランスジェニック体17314(米、除草剤耐性、PTA-9844として寄託される、国際公開第10/117735号に記載される)、トランスジェニック体281-24-236(綿、昆虫防除-除草剤耐性、PTA-6233として寄託される、国際公開第05/103266号または米国特許出願公開A2005-216969号に記載される)、トランスジェニック体3006-210-23(綿、昆虫防除-除草剤耐性、PTA-6233として寄託される、米国特許出願公開A2007-143876号または国際公開第05/103266号に記載される)、トランスジェニック体3272(トウモロコシ、品質形質、PTA-9972として寄託される、国際公開第06/098952号または米国特許出願公開A2006-230473号に記載される)、トランスジェニック体33391(コムギ、除草剤耐性、PTA-2347として寄託される、国際公開第2002/

10

20

30

40

50

027004号に記載される)、トランスジェニック体40416(トウモロコシ、昆虫防除-除草剤耐性、ATCC PTA-11508として寄託される、国際公開第11/075593号に記載される)、トランスジェニック体43A47(トウモロコシ、昆虫防除-除草剤耐性、ATCC PTA-11509として寄託される、国際公開第11/075595号に記載される)、トランスジェニック体5307(トウモロコシ、昆虫防除、ATCC PTA-9561として寄託される、国際公開第10/077816号に記載される)、トランスジェニック体ASR-368(ベントグラス、除草剤耐性、ATCC PTA-4816として寄託される、米国特許出願公開A2006-162007号または国際公開第04/053062号に記載される)、トランスジェニック体B16(トウモロコシ、除草剤耐性、寄託されていない、米国特許出願公開A2003-126634号に記載される)、トランスジェニック体BPS-CV127-9(大豆、除草剤耐性、NCIMB No. 41603として寄託される、国際公開第10/080829号に記載される)、トランスジェニック体BLR1(アブラナ、雄性不稔の回復、NCIMB 41193として寄託される、国際公開第号2005/074671号に記載される)、トランスジェニック体CE43-67B(綿、昆虫防除、DSM ACC2724として寄託される、米国特許出願公開A2009-217423または国際公開第06/128573号に記載される)、トランスジェニック体CE44-69D(綿、昆虫防除、寄託されていない、米国特許出願公開A2010-0024077号に記載される)、トランスジェニック体CE44-69D(綿、昆虫防除、寄託されていない、国際公開第06/128571号に記載される)、トランスジェニック体CE46-02A(綿、昆虫防除、寄託されていない、国際公開第06/128572号に記載される)、トランスジェニック体COT102(綿、昆虫防除、寄託されていない、米国特許出願公開A2006-130175号または国際公開第04/039986号に記載される)、トランスジェニック体COT202(綿、昆虫防除、寄託されていない、米国特許出願公開A2007-067868号または国際公開第05/054479号に記載される)、トランスジェニック体COT203(綿、昆虫防除、寄託されていない、国際公開第05/054480号に記載される)、トランスジェニック体DAS21606-3/1606(大豆、除草剤耐性、PTA-11028として寄託される、国際公開第2012/033794号に記載される)、トランスジェニック体DAS40278(トウモロコシ、除草剤耐性、ATCC PTA-10244として寄託される、国際公開第11/022469号に記載される)、トランスジェニック体DAS-44406-6/pDAB8264.44.06.1(大豆、除草剤耐性、PTA-11336として寄託される、国際公開第2012/075426号に記載される)、トランスジェニック体DAS-14536-7/pDAB8291.45.36.2(大豆、除草剤耐性、PTA-11335として寄託される、国際公開第2012/075429号に記載される)、トランスジェニック体DAS-59122-7(トウモロコシ、昆虫防除-除草剤耐性、ATCC PTA-11384として寄託される、米国特許出願公開A2006-070139号に記載される)、トランスジェニック体DAS-59132(トウモロコシ、昆虫防除-除草剤耐性、寄託されていない、国際公開第09/100188号に記載される)、トランスジェニック体DAS68416(大豆、除草剤耐性、ATCC PTA-10442として寄託される、国際公開第11/066384号または国際公開第11/066360号に記載される)、トランスジェニック体DP-098140-6(トウモロコシ、除草剤耐性、ATCC PTA-8296として寄託される、米国特許出願公開A2009-137395号または国際公開第08/112019号に記載される)、トランスジェニック体DP-305423-1(大豆、品質形質、寄託されていない、米国特許出願公開A2008-312082号または国際公開第08/054747号に記載される)、トランスジェニック体DP-32138-1(トウモロコシ、ハイブリダイゼーション系、ATCC PTA-9158として寄託される、米国特許出願公開A2009-0210970号または国際公開第09/103049号に記載される)、トランスジェニック体DP-356043-5(大豆、除草剤耐性、ATCC PTA-8287として寄託される、米

10

20

30

40

50

国特許出願公開A2010-0184079号または国際公開第08/002872号に
 記載される)、トランスジェニック体EE-1(ナス、昆虫防除、寄託されていない、国
 際公開第07/091277号に記載される)、トランスジェニック体FI117(トウ
 モロコシ、除草剤耐性、ATCC 209031として寄託される、米国特許出願公開A
 2006-059581号または国際公開第98/044140号に記載される)、トラ
 ンスジェニック体FG72(大豆、除草剤耐性、PTA-11041として寄託される、
 国際公開第2011/063413号に記載される)、トランスジェニック体GA21(
 トウモロコシ、除草剤耐性、ATCC 209033として寄託される、米国特許出願公
 開A2005-086719号または国際公開第98/044140号に記載される)、
 トランスジェニック体GG25(トウモロコシ、除草剤耐性、ATCC 209032と
 して寄託される、米国特許出願公開A2005-188434号または国際公開第98/
 044140号に記載される)、トランスジェニック体GHB119(綿、昆虫防除-除
 草剤耐性、ATCC PTA-8398として寄託される、国際公開第08/15178
 0号に記載される)、トランスジェニック体GHB614(綿、除草剤耐性、ATCC
 PTA-6878として寄託される、米国特許出願公開A2010-050282号また
 は国際公開第07/017186号に記載される)、トランスジェニック体GJ11(
 トウモロコシ、除草剤耐性、ATCC 209030として寄託される、米国特許出願公開
 A2005-188434号または国際公開第98/044140号に記載される)、トラ
 ンスジェニック体GM RZ13(サトウダイコン、ウイルス抵抗性、NCIMB-4
 1601として寄託される、国際公開第10/076212号に記載される)、トランス
 ジェニック体H7-1(サトウダイコン、除草剤耐性、NCIMB 41158またはN
 CIMB 41159として寄託される、米国特許出願公開A2004-172669号
 または国際公開第04/074492号に記載される)、トランスジェニック体JOPL
 IN1(コムギ、疾病耐性、寄託されていない、米国特許出願公開A2008-0640
 32号に記載される)、トランスジェニック体LL27(大豆、除草剤耐性、NCIMB
 41658として寄託される、国際公開第06/108674号または米国特許出願公開
 A2008-320616号に記載される)、トランスジェニック体LL55(大豆、除
 草剤耐性、NCIMB 41660として寄託される、国際公開第06/108675号
 または米国特許出願公開A2008-196127号に記載される)、トランスジェニッ
 ク体LLcotton25(綿、除草剤耐性、ATCC PTA-3343として寄託され
 る、国際公開第03/013224号または米国特許出願公開A2003-0976
 87号に記載される)、トランスジェニック体LLRICE06(米、除草剤耐性、AT
 CC 203353として寄託される、米国特許第6,468,747号または国際公開
 第00/026345号に記載される)、トランスジェニック体LLRice62(米、
 除草剤耐性、ATCC 203352として寄託される、国際公開第2000/0263
 45号に記載される)、トランスジェニック体LLRICE601(米、除草剤耐性、A
 TCC PTA-2600として寄託される、米国特許出願公開A2008-22890
 60号または国際公開第00/026356号に記載される)、トランスジェニック体L
 Y038(トウモロコシ、品質形質、ATCC PTA-5623として寄託される、米
 国特許出願公開A2007-028322号または国際公開第05/061720号に記
 載される)、トランスジェニック体MIR162(トウモロコシ、昆虫防除、PTA-8
 166として寄託される、米国特許出願公開A2009-300784号または国際公開
 第07/142840号に記載される)、トランスジェニック体MIR604(トウモロ
 コシ、昆虫防除、寄託されていない、米国特許出願公開A2008-167456号また
 は国際公開第05/103301号に記載される)、トランスジェニック体MON159
 85(綿、昆虫防除、ATCC PTA-2516として寄託される、米国特許出願公開
 A2004-250317号または国際公開第02/100163号に記載される)、トラ
 ンスジェニック体MON810(トウモロコシ、昆虫防除、寄託されていない、米国特
 許出願公開A2002-102582号に記載される)、トランスジェニック体MON8
 63(トウモロコシ、昆虫防除、ATCC PTA-2605として寄託される、国際公

10

20

30

40

50

開第04/011601号または米国特許出願公開A2006-095986号に記載される)、トランスジェニック体MON87427(トウモロコシ、受粉コントロール、ATCC PTA-7899として寄託される、国際公開第11/062904号に記載される)、トランスジェニック体MON87460(トウモロコシ、ストレス耐性、ATCC PTA-8910として寄託される、国際公開第09/111263号または米国特許出願公開A2011-0138504号に記載される)、トランスジェニック体MON87701(大豆、昆虫防除、ATCC PTA-8194として寄託される、米国特許出

願公開A2009-130071号または国際公開第09/064652号に記載される)、トランスジェニック体MON87705(大豆、品質形質-除草剤耐性、ATCC PTA-9241として寄託される、米国特許出願公開A2010-0080887号または国際公開第10/037016号に記載される)、トランスジェニック体MON87708(大豆、除草剤耐性、ATCC PTA-9670として寄託される、国際公開第11/034704号に記載される)、トランスジェニック体MON87712(大豆、収穫高、PTA-10296として寄託される、国際公開第2012/051199号に記載される)、トランスジェニック体MON87754(大豆、品質形質、ATCC PTA-9385として寄託される、国際公開第10/024976号に記載される)、トランスジェニック体MON87769(大豆、品質形質、ATCC PTA-8911として寄託される、米国特許出願公開A2011-0067141号または国際公開第09/102873号に記載される)、トランスジェニック体MON88017(トウモロコシ、昆虫防除-除草剤耐性、ATCC PTA-5582として寄託される、米国特許出願公開A2008-028482号または国際公開第05/059103号に記載される)、トランスジェニック体MON88913(綿、除草剤耐性、ATCC PTA-4854として寄託される、国際公開第04/072235号または米国特許出願公開A2006-059590号に記載される)、トランスジェニック体MON88302(アブラナ、除草剤耐性、PTA-10955として寄託される、国際公開第2011/153186号に記載される)、トランスジェニック体MON88701(綿、除草剤耐性、PTA-11754として寄託される、国際公開第2012/134808号に記載される)、トランスジェニック体MON89034(トウモロコシ、昆虫防除、ATCC PTA-7455として寄託される、国際公開第07/140256号または米国特許出願公開A2008-260932号に記載される)、トランスジェニック体MON89788(大豆、除草剤耐性、ATCC PTA-6708として寄託される、米国特許出願公開A2006-282915号または国際公開第06/130436号に記載される)、トランスジェニック体MSI 1(アブラナ、受粉コントロール-除草剤耐性、ATCC PTA-850またはPTA-2485として寄託される、国際公開第01/031042号に記載される)、トランスジェニック体MS8(アブラナ、受粉コントロール-除草剤耐性、ATCC PTA-730として寄託される、国際公開第01/041558号または米国特許出願公開A2003-188347号に記載される)、トランスジェニック体NK603(トウモロコシ、除草剤耐性、ATCC PTA-2478として寄託される、米国特許出願公開A2007-292854号に記載される)、トランスジェニック体PE-7(米、昆虫防除、寄託されていない、国際公開第08/114282号に記載される)、トランスジェニック体RF3(アブラナ、受粉コントロール-除草剤耐性、ATCC PTA-730として寄託される、国際公開第01/041558号または米国特許出願公開A2003-188347号に記載される)、トランスジェニック体RT73(アブラナ、除草剤耐性、寄託されていない、国際公開第02/036831号または米国特許出願公開A2008-070260号に記載される)、トランスジェニック体SYHT0H2/SYN-000H2-5(大豆、除草剤耐性、PTA-11226として寄託される、国際公開第2012/082548号に記載される)、トランスジェニック体T227-1(サトウダイコン、除草剤耐性、寄託されていない、国際公開第02/44407号または米国特許出願公開A2009-265817号に記載される)、トラン

10

20

30

40

50

スジェニック体T25（トウモロコシ、除草剤耐性、寄託されていない、米国特許出願公開A2001-029014号または国際公開第01/051654号に記載される）、トランスジェニック体T304-40（綿、昆虫防除-除草剤耐性、ATCC PTA-8171として寄託される、米国特許出願公開A2010-077501号または国際公開第08/122406号に記載される）、トランスジェニック体T342-142（綿、昆虫防除、寄託されていない、国際公開第06/128568号に記載される）、トランスジェニック体TC1507（トウモロコシ、昆虫防除-除草剤耐性、寄託されていない、米国特許出願公開A2005-039226号または国際公開第04/099447号に記載される）、トランスジェニック体VIP1034（トウモロコシ、昆虫防除-除草剤耐性、ATCC PTA-3925として寄託される、国際公開第03/052073号に記載される）、トランスジェニック体32316（トウモロコシ、昆虫防除-除草剤耐性、PTA-11507として寄託される、国際公開第11/084632号に記載される）、トランスジェニック体4114（トウモロコシ、昆虫防除-除草剤耐性、PTA-11506として寄託される、国際公開第11/084621号に記載される）、トランスジェニック体EE-GM3/FG72（大豆、除草剤耐性、ATCC受託番号PTA-11041、国際公開第2011/063413A2号）、トランスジェニック体DAS-68416-4（大豆、除草剤耐性、ATCC受託番号PTA-10442、国際公開第2011/066360A1号）、トランスジェニック体DAS-68416-4（大豆、除草剤耐性、ATCC受託番号PTA-10442、国際公開第2011/066384A1号）、トランスジェニック体DP-040416-8（トウモロコシ、昆虫防除、ATCC受託番号PTA-11508、国際公開第2011/075593A1号）、トランスジェニック体DP-043A47-3（トウモロコシ、昆虫防除、ATCC受託番号PTA-11509、国際公開第2011/075595A1号）、トランスジェニック体DP-004114-3（トウモロコシ、昆虫防除、ATCC受託番号PTA-11506、国際公開第2011/084621A1号）、トランスジェニック体DP-032316-8（トウモロコシ、昆虫防除、ATCC受託番号PTA-11507、国際公開第2011/084632A1号）、トランスジェニック体MON-88302-9（アブラナ、除草剤耐性、ATCC受託番号PTA-10955、国際公開第2011/153186A1号）、トランスジェニック体DAS-21606-3（大豆、除草剤耐性、ATCC受託番号PTA-11028、国際公開第2012/033794A2号）、トランスジェニック体MON-87712-4（大豆、品質形質、ATCC受託番号PTA-10296、国際公開第2012/051199A2号）、トランスジェニック体DAS-44406-6（大豆、スタックされた除草剤耐性、ATCC受託番号PTA-11336、国際公開第2012/075426A1号）、トランスジェニック体DAS-14536-7（大豆、スタックされた除草剤耐性、ATCC受託番号PTA-11335、国際公開第2012/075429A1号）、トランスジェニック体SYN-000H2-5（大豆、除草剤耐性、ATCC受託番号PTA-11226、国際公開第2012/082548A2号）、トランスジェニック体DP-061061-7（アブラナ、除草剤耐性、受託番号該当なし、国際公開第2012071039A1号）、トランスジェニック体DP-073496-4（アブラナ、除草剤耐性、受託番号該当なし、米国特許第2012131692号）、トランスジェニック体8264.44.06.1（大豆、スタックされた除草剤耐性、受託番号PTA-11336、国際公開第2012075426A2号）、トランスジェニック体8291.45.36.2（大豆、スタックされた除草剤耐性、受託番号PTA-11335、国際公開第2012075429A2号）、トランスジェニック体SYHT0H2（大豆、ATCC受託番号PTA-11226、国際公開第2012/082548A2号）、トランスジェニック体MON88701（綿、ATCC受託番号PTA-11754、国際公開第2012/134808A1号）、トランスジェニック体KK179-2（アルファルファ、ATCC受託番号PTA-11833、国際公開第2013003558A1号）、トランスジェニック体pDAB8264.42.32.1（大豆、スタックされた除草剤耐性、ATCC受託番号P

10

20

30

40

50

TA-11993、国際公開第2013010094A1号)、トランスジェニック体MZDT09Y(トウモロコシ、ATCC受託番号PTA-13025、国際公開第2013012775A1号)が挙げられる。

【0100】

E. ポリヌクレオチドコンストラクト

本発明のHPPDポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、植物細胞に発現させるか、または発現を増大させるために改変されてよい。本明細書で同定するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、関心のある植物に発現させるための発現カセット内に供給される。「植物発現カセット」には、組換えDNAコンストラクトを包含する、植物細胞内にポリヌクレオチドを発現させることができるDNAコンストラクトが含まれる。カセットには、5'-3'の転写方向へ、関心のある1以上のポリヌクレオチドへ操作可能に連結する(operably-linked)転写開始領域(すなわちプロモーター、特に異種性プロモーター)および/または植物内で機能する翻訳および転写終止領域(すなわち終止領域)が含まれてよい。カセットには、生物に導入される少なくとも1のさらなるポリヌクレオチド、例えば選択性マーカー遺伝子がさらに含まれてもよい。あるいは複数の発現カセット内に、単数または複数のさらなるポリヌクレオチドが供給されてもよい。このような発現カセットには、単数または複数のポリヌクレオチドを、これらが調節性領域によって転写調節されるように挿入するための複数の制限酵素部位が設けられる。

【0101】

さらなる実施形態によれば、本発明は、植物に発現可能なプロモーターに操作可能に連結する異種性の本発明の核酸ならびに任意に転写終止およびポリアデニル化領域を含む配列をコードするキメラ遺伝子に関する。「異種性の」は一般に、細胞に内在しないかまたはそれが存在する天然のゲノムの位置に内在せず、かつ感染、トランスフェクション、微量注入法、エレクトロポレーション、顕微鏡投影法などによって細胞に加えられたポリヌクレオチドまたはポリペプチドを指す。「操作可能に連結する」は、二つのポリヌクレオチドの間の操作可能な結合を意図する。例えばプロモーターがDNA配列へ操作可能に連結すると、プロモーター配列はDNA配列の転写を開始および仲介する。操作可能連結するポリヌクレオチドは、連続してよい、または連続していなくてもよく、かつこの語が二つのポリペプチドのコード領域の連結を指すために用いられる場合には、該ポリペプチドは同じ読み枠において発現することが認識される。

【0102】

プロモーターは、選択された植物細胞、植物の部分、または植物において転写活性を示すいずれかのポリヌクレオチド配列であってよい。プロモーターは、植物宿主に対して、かつ/または本発明のDNA配列に対して、天然もしくは類似、または外来性もしくは異種性であってよい。プロモーターが植物宿主に対して「天然」または「類似」である場合、プロモーターを導入する天然植物内に該プロモーターが見出されることを意図する。プロモーターが本発明のDNA配列に対して「外来性」または「異種性」である場合、該プロモーターは、操作可能に連結された本発明のDNA配列のための自然に存在するかまたは天然のプロモーターではないことが意図される。プロモーターは誘導性または恒常性であってよい。プロモーターは自然に存在してよい、または自然に存在する様々なプロモーターの一部から構成されてよい、または部分的もしくは完全に合成されてもよい。プロモーターの設計に対するガイダンスが、Harley and Reynolds (1987) Nucleic Acids Res. 15:2343-2361のようなプロモーター構造の研究によって提供されている。また、転写開始点に対するプロモーターの配置も最適化され得る。例えばRoberts et al. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:760-764を参照されたい。植物における使用に適した多くのプロモーターが当該技術分野において公知である。

【0103】

例えば植物における使用に適した恒常性プロモーターとしては、ピーナッツ退緑条斑カリモウイルス(PC1SV)プロモーターのような植物ウイルス由来のプロモーター(米

10

20

30

40

50

国特許第5, 850, 019号)、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)由来の35Sプロモーター(Odell et al. (1985) Nature 313:810-812)、クロレラウイルスメチルトランスフェラーゼ遺伝子のプロモーター(米国特許第5, 563, 328号)、およびゴマノハグサモザイクウイルス(FMV)由来の完全長転写プロモーター(米国特許第5, 378, 619号)、米アクチン(McElroy et al. (1990) Plant Cell 2:163-171および米国特許第5, 641, 876号)、ユビキチン(Christensen et al. (1989) Plant Mol. Biol. 12:619-632およびChristensen et al. (1992) Plant Mol. Biol. 18:675-689)、pEMU(Last et al. (1991) Theor. Appl. Genet. 81:581-588)、MAS(Velten et al. (1984) EMBO J. 3:2723-2730、および米国特許第5, 510, 474号)、トウモロコシH3ヒストン(Lepetit et al. (1992) Mol. Gen. Genet. 231:276-285およびAtanassova et al. (1992) Plant J. 2(3):291-300)、セイヨウアブラナALS3(PCT出願国際公開第97/41228号)、植物リブロービスカルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ(RuBisCO)小サブユニット遺伝子、サーコウイルス(オーストラリア特許第689311号)、またはキャッサバ葉脈モザイクウイルス(CsVMV、米国特許第7, 053, 205号)のような遺伝子由来のプロモーター、および様々なアグロバクテリウム遺伝子のプロモーター(米国特許第4, 771, 002号、第5, 102, 796号、第5, 182, 200号、および第5, 428, 147号)が挙げられる。

【0104】

植物における使用に適した誘導性プロモーターとしては、銅に反応するACE1系に由来するプロモーター(Mett et al. (1993) PNAS 90:4567-4571)、ベンゼンスルホンアミド除草剤の毒性緩和剤に反応するトウモロコシIn2遺伝子のプロモーター(Hershey et al. (1991) Mol. Gen. Genetics 227:229-237およびGatz et al. (1994) Mol. Gen. Genetics 243:32-38)、およびTn10に由来するTet抑制因子のプロモーター(Gatz et al. (1991) Mol. Gen. Genet. 227:229-237)が挙げられる。植物において用いられる別の誘導性プロモーターは、植物が通常反応しない誘導薬剤に反応するものである。この型の代表的な誘導性プロモーターは、その転写活性が糖質コルチコステロイドホルモンによって誘導される、ステロイドホルモン遺伝子由来の誘導性プロモーター(Schena et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10421)、またはエストラジオールにより活性化される、エストロゲン受容体に基づいた誘導性の植物発現系において用いるための、キメラ転写活性化因子であるXVEの最近の応用である(Zuo et al. (2000) Plant J., 24:265-273)。植物において用いられるその他の誘導性プロモーターは、その全体が参照によって本明細書に取り込まれる、欧州特許第332104号、PCT国際公開第93/21334号、およびPCT国際公開第97/06269号に記載される。その他のプロモーターの一部から構成されるプロモーター、および部分的または完全な合成プロモーターもまた用いることができる。例えばこのようなプロモーターの植物における使用について記載される、Ni et al. (1995) Plant J. 7:661-676およびPCT国際公開第95/14098号を参照されたい。

【0105】

本発明の一実施形態によれば、植物の特定の領域または組織に特異的なプロモーター配列は、本発明のHPPDタンパク質を発現させるために用いることができ、このようなプロモーターとしては、種子特異的なプロモーター(Datla, R. et al., 1997, Biotechnology Ann. Rev. 3, 269-296)、特にナピンプロモーター(欧州特許第255378A1号)、ファゼオリンプロモ-

ター、グルテニンプロモーター、ヘリアンシニン (h e l i a n t h i n i n) プロモーター (国際公開第 9 2 / 1 7 5 8 0 号)、アルブミンプロモーター (国際公開第 9 8 / 4 5 4 6 0 号)、オレオシンプロモーター (国際公開第 9 8 / 4 5 4 6 1 号)、S A T 1 プロモーターまたは S A T 3 プロモーター (P C T / 米国特許出願公開第 9 8 / 0 6 9 7 8 号) が挙げられる。

【0106】

フェニルアラニンアンモニアリアーゼ (P A L)、H M G - C o A 還元酵素 (H M G)、キチナーゼ、グルカナーゼ、プロテイナーゼ阻害剤 (P I)、P R 1 ファミリー遺伝子、ノパリン合成酵素 (n o s)、および v s p B プロモーター (米国特許第 5 6 7 0 3 4 9 号、表 3)、H M G 2 プロモーター (米国特許第 5 6 7 0 3 4 9 号)、リンゴベータガラクトシダーゼ (A B G 1) プロモーター、およびリンゴアミノシクロプロパンカルボン酸合成酵素 (A C C 合成酵素) プロモーター (国際公開第 9 8 / 4 5 4 4 5 号) から有利に選択される誘導性プロモーターもまた使用され得る。本発明のコンストラクトには複数のプロモーターが用いられてよく、これらを連続して用いてもよい。

【0107】

プロモーターは 1 以上のエンハンサーエレメントを含んでよく、またはこれを含むように改変されてもよい。幾つかの実施形態によれば、プロモーターは複数のエンハンサーエレメントを含んでよい。エンハンサーエレメントを含むプロモーターの転写レベルは、これを含まないプロモーターに比較して高い。植物における使用に適したエンハンサーエレメントとしては、P C 1 S V エンハンサーエレメント (米国特許第 5, 8 5 0, 0 1 9 号)、C a M V 3 5 S エンハンサーエレメント (米国特許第 5, 1 0 6, 7 3 9 号および第 5, 1 6 4, 3 1 6 号)、および F M V エンハンサーエレメント (M a i t i e t a l. (1997) T r a n s g e n i c R e s. 6 : 1 4 3 - 1 5 6)、国際公開第 8 7 / 0 7 6 4 4 号に記載されるタバコモザイクウイルス (T M V) の翻訳活性化因子、または C a r r i n g t o n & F r e e d 1990, J. V i r o l. 64 : 1590 - 1597 に記載されるタバコエッチウイルス (T E V) の翻訳活性化因子、または、例えばトウモロコシの a d h 1 イントロンまたは米アクチンのイントロン 1 のようなイントロンが挙げられる。P C T 国際公開第 9 6 / 2 3 8 9 8 号、国際公開第 2 0 1 2 / 0 2 1 7 9 4 号、国際公開第 2 0 1 2 / 0 2 1 7 9 7 号、国際公開第 2 0 1 1 / 0 8 4 3 7 0 号、および国際公開第 2 0 1 1 / 0 2 8 9 1 4 号も参照されたい。

【0108】

このようなコンストラクトはしばしば 5 ' および 3 ' 非翻訳領域を含み得る。このようなコンストラクトは、関心のあるペプチドの、葉緑体 (またはその他の色素体)、小胞体、またはゴルジ装置のような特定の細胞内構造への、翻訳と同時の、または翻訳後の輸送を促進するか、または分泌を促進する、「シグナル配列」または「リーダー配列」を含んでよい。例えばコンストラクトは、ペプチドの小胞体への移行を促進するシグナルペプチドを含むように改変されてよい。「シグナル配列」は、翻訳と同時の、または翻訳後の、細胞膜を横断するペプチド輸送をもたらすことが知られているか、またはもたらすと考えられている配列を意図する。このことは真核生物において、典型的には、幾らかのグリコシル化がもたらされるゴルジ装置への分泌に関わる。「リーダー配列」は、翻訳時にペプチド鎖を細胞内の細胞小器官へ翻訳と同時に輸送開始するために十分なアミノ酸配列である、いずれかの配列を意図する。このように、この語には、小胞体の通過、液胞、葉緑体を含む色素体、ミトコンドリアなどの通過による輸送および/またはグリコシル化を標的とするリーダー配列が包含される。発現には m R N A におけるイントロンのプロセッシングが必要であることから、植物発現カセットがイントロンを含むように操作することもまた好ましい。

【0109】

「3 ' 非翻訳領域」は、コード配列の下流に位置するポリヌクレオチドを意図する。m R N A 前駆体の 3 ' 末端へのポリアデニル酸の付加経路に影響し得るポリアデニル化シグナル配列およびその他の調節性シグナルをコードする配列は 3 ' 非翻訳領域である。「5

「非翻訳領域」は、コード配列の上流に位置するポリヌクレオチドを意図する。

【0110】

その他の上流または下流の非翻訳エレメントにはエンハンサーが含まれる。エンハンサーはプロモーター領域の発現増大に作用するポリヌクレオチドである。エンハンサーは当該技術分野において公知であり、SV40エンハンサー領域および35Sエンハンサーエレメントが挙げられるがこれらに限定されない。

【0111】

終止領域は転写開始領域に従った天然のものであってよい、本発明の配列に従った天然のものであってよい、またはその他の源に由来してもよい。オクトピン合成酵素およびノパリン合成酵素終止領域のような便利な終止領域が、A. ツメファシエンス(*A. tumefaciens*)のTiプラスミドから利用可能である。Guérineau et al. (1991) Mol. Gen. Genet. 262:141-144; Proudfoot (1991) Cell 64:671-674; Sanfalcon et al. (1991) Genes Dev. 5:141-149; Mogen et al. (1990) Plant Cell 2:1261-1272; Munroe et al. (1990) Gene 91:151-158; Ballas et al. (1989) Nucleic Acids Res. 17:7891-7903; Joshi et al. (1987) Nucleic Acid Res. 15:9627-9639、および欧州特許第0633317A1号も参照されたい。

【0112】

本発明の一態様によれば、合成DNA配列は、本発明のポリペプチドのような所定のポリペプチドのために設計される。細胞内で合成DNA配列の翻訳領域が発現されると、本発明のポリペプチドが産生される。合成DNA配列は、単に必要な制限エンドヌクレアーゼ部位を除去するため、DNAクローニングの方法を容易にするため、コドンバイアスの可能性があるいずれかの部位を変更または除去するため、GC含量を変更または改善するため、別の読み枠を除去または変更するため、および／または天然のDNA配列に存在し得るイントロン／エクソンスプライシング認識部位、ポリアデニル化部位、シャイン・ダルガノ配列、必要のないプロモーターエレメントなどを変更または除去するために有用であり得る。合成DNA配列はまた、DNA配列へのその他の改善の導入、例えばイントロン配列の導入、葉緑体輸送ペプチド、アポプラスト／液胞ターゲティングペプチド、または得られたペプチドを小胞体内に保持するペプチド配列のような細胞小器官へのターゲティング配列と融合したタンパク質として発現されるDNA配列の作製のために利用されてもよい。合成遺伝子はまた、発現を改善させるために宿主細胞に優先的なコドンを用いて合成されてよい、または宿主に優先的なコドンの使用頻度にあるコドンを用いて合成されてもよい。例えば参照により本明細書に取り込まれる、Campbell and Gowri (1990) Plant Physiol. 92:1-11、米国特許第6,320,100号、第6,075,185号、第5,380,831号、および第5,436,391号、米国特許出願公開第20040005600号および第20010003849号、ならびにMurray et al. (1989) Nucleic Acids Res. 17:477-498を参照されたい。

【0113】

一実施形態によれば、関心のあるポリヌクレオチドは、葉緑体への発現を標的としたものである。このように関心のあるポリヌクレオチドが葉緑体に直接挿入されない場合に、発現カセットは、該関心のあるヌクレオチドを葉緑体へ方向付けるため、輸送ペプチドをコードするポリヌクレオチドをさらに含み得る。このような輸送ペプチドは当該技術分野において公知である。例えば、Von Heijne et al. (1991) Plant Mol. Biol. Rep. 9:104-126; Clark et al. (1989) J. Biol. Chem. 264:17544-17550; Della-Cioppa et al. (1987) Plant Physiol. 84:965-968; Romer et al. (1993) Biochem. Biophys. Res.

Commun. 196:1414-1421; および Shah et al. (1986) Science 233:478-481 を参照されたい。

【0114】

葉緑体を標的とする関心のあるポリヌクレオチドは、植物の核と当該細胞小器官との間でのコドン使用の違いを考慮して、葉緑体における発現を最適化してよい。このように関心のあるポリヌクレオチドは、葉緑体に優先的なコドンを用いて合成され得る。例えば参照により本明細書に取り込まれる、米国特許第5,380,831号を参照されたい。

【0115】

この植物発現カセットは、植物形質転換ベクター内へ挿入することができる。「形質転換ベクター」は、細胞の形質転換を可能にするDNA分子を意図する。このような分子は1以上の発現カセットからなってよく、かつ1を超えるベクターDNA分子内へ構築されてよい。例えばバイナリーベクターは、植物細胞の形質転換に対して必要なすべてのシスおよびトランス作用機能をコードするため、二つの隣接しないDNAベクターを利用する植物形質転換ベクターである (Hellens and Mullineaux (2000) Trends in Plant Science 5:446-451)。「ベクター」は、異なる宿主細胞間での移行のために設計されたポリヌクレオチドコンストラクトを指す。「発現ベクター」は、異質な細胞内に異種性のDNA配列または断片を取り入れ、組み込み、かつ発現させることのできるベクターを指す。

【0116】

植物形質転換ベクターは、植物を形質転換させるための、1以上のDNAベクターを含む。例えば1を超える連続したDNAセグメントを含む植物形質転換ベクターを利用することは、当該技術分野において一般に実践されている。これらのベクターは当該技術分野においてしばしばバイナリーベクターと称される。バイナリーベクターおよびヘルパープラスミドを含むベクターは、効率的な形質転換を達成するために必用なDNAセグメントの大きさおよび複雑さが極めて大きな場合に、アグロバクテリウムを介した形質転換において最もよく使用されており、これらは別々のDNA分子上に機能を分けることが有利である。バイナリーベクターには、典型的にはT-DNA移行に必用なシス作用配列（例えば左境界および右境界）を含むプラスミドベクター、植物細胞内で発現可能なように改変された選択性マーカー、および「関心のあるポリヌクレオチド」（トランスジェニック植物の作製が望まれる植物細胞において発現可能なように改変されたポリヌクレオチド）が含まれる。このプラスミドベクターには、細菌の複製に必用な配列も存在する。シス作用配列は、効率的な植物細胞内への移行およびそこでの発現が可能となるように配列される。例えば、選択性マーカー配列および関心のある配列は、左境界と右境界との間に配置される。第2のプラスミドベクターには、しばしばアグロバクテリウムから植物細胞へのT-DNA移行を仲介するトランス作用因子が含まれる。当該技術分野において理解されるように、このプラスミドには、しばしばアグロバクテリウムによる植物細胞の感染、ならびに境界配列における切断によるDNAの移行およびvir仲介性のDNA移行を可能にする毒性因子 (Vir遺伝子) が含まれる (Hellens and Mullineaux (2000) Trends in Plant Science, 5:446-451)。幾つかの型のアグロバクテリウム株（例えばLBA4404、GV3101、EHA101、EHA105など）が、植物を形質転換させるために用いられ得る。第2のプラスミドベクターは、顕微鏡投影法、微量注入法、エレクトロポレーション、ポリエチレングリコールなどのようなその他の方法によって植物内にポリヌクレオチドを導入する場合には必用でない。

【0117】

F. 植物の形質転換

本発明の方法は、植物内へヌクレオチドコンストラクトを導入することに関わる。「導入する」は、ヌクレオチドコンストラクトが植物細胞の内部へ接近可能な様式において、該コンストラクトを植物に提示することを意図する。本発明の方法では、植物にヌクレオチドコンストラクトを導入するために特別の方法を用いることは必用とされず、ヌクレオ

10

20

30

40

50

チドコンストラクトが植物の少なくとも一つの細胞の内部へ接近可能であることのみが必要とされる。植物内へヌクレオチドコンストラクトを導入するための方法は当該技術分野において公知であり、安定形質転換法、一過性形質転換法、およびウイルスを介した方法が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、米国特許第4,459,355号、米国特許第4,536,475号、米国特許第5,464,763号、米国特許第5,177,010号、米国特許第5,187,073号、欧州特許第267,159A1号、欧州特許第604662A1号、欧州特許第672752A1号、米国特許第4,945,050号、米国特許第5,036,006号、米国特許第5,100,792号、米国特許第5,371,014号、米国特許第5,478,744号、米国特許第5,179,022号、米国特許第5,565,346号、米国特許第5,484,956号、米国特許第5,508,468号、米国特許第5,538,877号、米国特許第5,554,798号、米国特許第5,489,520号、米国特許第5,510,318号、米国特許第5,204,253号、米国特許第5,405,765号、欧州特許第442174A1号、欧州特許第486233A1号、欧州特許第486234A1号、欧州特許第539563A1号、欧州特許第674725A1号、国際公開第91/02071号、国際公開第95/06128号、および国際公開第2011/095460号に記載される植物細胞の形質転換法および植物の再生法を参照されたい。これらの文献それぞれは、特にこれらに記載される形質転換法に関して、参照により本明細書に取り込まれる。

【0118】

一般に植物の形質転換法は、異種性のDNAを標的植物細胞（例えば未熟または成熟胚、懸濁培養、未分化のカルス、プロトプラストなど）内へ移行させ、続いて最大閾値濃度での適切な選択を行って（選択性マーカー遺伝子にしたがって）、非形質転換細胞集団の群から形質転換した植物細胞を回収することを含む。外植体は、典型的には補給した新鮮な同培地中に移した後、日常的に培養される。次に形質転換細胞を、最大閾値濃度の選択薬剤を加えた再生培地中に移した後、シュートへと分化させる。続いてシュートを選択性の発根培地に移し、根付いたシュートまたは小植物を回収する。トランスジェニック小植物は、次に成熟植物へと成長し、稔性の種子を産生する（例えばHiei et al. (1994) *The Plant Journal* 6:271-282; Ishida et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14:745-750）。外植体は、典型的には補給した新鮮な同培地中に移した後、日常的に培養される。トランスジェニック植物を産出するための技術および方法についての一般的記述は、Ayres and Park (1994) *Critical Reviews in Plant Science* 13:219-239およびBommineni and Jauhar (1997) *Maydica* 42:107-120に見出される。形質転換した材料には多くの細胞が含まれることから、標的とされたカルス、または組織、または細胞群のいずれかの部分には、形質転換および非形質転換細胞の両方が存在する。非形質転換細胞を死滅させ、かつ形質転換細胞の増殖を可能にする能力により、形質転換された植物の培養が可能となる。非形質転換細胞を除去する能力はしばしば、形質転換された植物細胞の迅速な回収およびトランスジェニック植物産出の成功に対する制限となる。分子的小および生化学的方法は、トランスジェニック植物のゲノム内に組み込まれた、関心のある異種性遺伝子の存在を確認するために用いることができる。

【0119】

トランスジェニック植物の産出は、限定はされないが、アグロバクテリウムによる植物細胞内への異種性DNAの導入（アグロバクテリウムを介した形質転換）、粒子に付着した異種性の外来DNAを用いた、植物細胞への微粒子銃の使用、およびその他の様々な非粒子性の直接法（例えばHiei et al. (1994) *The Plant Journal* 6:271-282; Ishida et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14:745-750; Ayres and Park (1994) *Critical Reviews in Plant Science* 13:219-239; Bommineni and Jauhar (1997) *Ma*

y d i c a 42:107-120)を含む、DNAを移行させるための幾つかの方法のうちの一つによって行われてよい。

【0120】

葉緑体の形質転換方法は、当該技術分野において公知である。例えば、Svab et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:8526-8530; Svab and Maliga (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:913-917; Svab and Maliga (1993) EMBO J. 12:601-606を参照されたい。該方法は、選択性マーカーを含むDNAの微粒子銃による送達、および相同組換えを通した、色素体ゲノムへのDNAのターゲティングを利用するものである。加えて、色素体の形質転換は、核においてコードされ、かつ色素体に方向付けられたRNAポリメラーゼの組織優先的な発現による、サイレント色素体由来の導入遺伝子のトランス活性化によって達成され得る。このようなシステムは、McBride et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:7301-7305に報告されている。

10

【0121】

形質転換された細胞は、従来法に従って植物へと成長し得る。例えば、McCormick et al. (1986) Plant Cell Reports 5:81-84を参照されたい。これらの植物は、成長した後、同じ形質転換株または異なる株によって授粉し、所望の表現型の特性を恒常的に発現するハイブリッドが同定され得る。2世代以上の成長によって所望の表現型の特性の発現が安定的に維持、かつ継承されることが確実になり、次に種子が収穫されることで所望の表現型の特性の発現が達成されたことが確実となる。このように本発明は、本発明のヌクレオチドコンストラクト、例えば本発明の発現カセットをそのゲノム内に安定的に取り込んだ、形質転換された種子(「トランスジェニック種子」とも称される)を提供する。様々な実施形態によれば、種子は、少なくとも1の抗真菌剤および/または少なくとも1の殺虫剤、少なくとも1の除草剤および/または少なくとも1の毒性緩和剤、またはそれらのいずれかの組み合わせによってコートされてよい。

20

【0122】

G. 植物の形質転換の評価

植物細胞内への異種性の外来DNAの導入に従い、形質転換または植物ゲノム内への異種性遺伝子の組み込みが、組み込まれた遺伝子に関連する核酸、タンパク質、および代謝産物の分析のような、様々な方法によって確認される。

30

【0123】

PCR分析は、土壌に移植する前の早い段階で、形質転換細胞、組織、またはシュート内に取り込まれた遺伝子の存在を迅速にスクリーニングする方法である(Sambrook and Russell (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY))。PCRは、関心のある遺伝子またはアグロバクテリウムベクターのバックグラウンドなどに特異的なオリゴヌクレオチドプライマーを用いて行われる。

40

【0124】

植物の形質転換は、ゲノムDNAのサザンブロット分析によって確認され得る(上記のSambrook and Russell (2001))。一般には形質転換体から全DNAを抽出し、適切な制限酵素で消化した後、アガロースゲルにて分画し、ニトロセルロースまたはナイロンメンブレンに転写する。メンブレンまたは「ブロット」に対しては、次に、標準的な技術(上記のSambrook and Russell, 2001)に従い、例えばプローブとして³²Pにより放射性標識した標的DNA断片を用いることで、植物ゲノム内へ導入した遺伝子の取り込みを確認する。

【0125】

ノーザンブロット分析においては、形質転換体の特定の組織からRNAを分離し、ホル

50

ムアルデヒドアガロースゲルにて分画した後、当該技術分野において日常的に用いられる標準的な手順（上記の Sambrook and Russell（2001））に従ってナイロンフィルター上にブロットする。次に、当該技術分野において公知の方法（上記の Sambrook and Russell（2001））に従って、フィルターをGDC由来の放射性プローブとハイブリダイズすることにより、本発明のヌクレオチド配列がコードするRNAの発現を試験する。

【0126】

除草剤耐性タンパク質に存在する1以上のエピトープに結合する抗体を用いた標準的な手順（上記の Sambrook and Russell（2001））に従うことで、トランスジェニック植物に対してウェスタンブロット、ELISA、ラテラルフロー試験、および生化学アッセイなどを行い、除草剤に対する耐性遺伝子によってコードされるタンパク質の存在を決定する。

10

【0127】

本発明の一態様によれば、本明細書に記載されるHPPD遺伝子は、細菌または植物細胞の形質転換を評価するためのマーカーとして有用である。

【0128】

H. 形質転換に対するマーカーとしての使用

本発明はまた、植物の形質転換法における、本発明のHPPDをコードする核酸のマーカー遺伝子としての、またはHPPD阻害剤である除草剤への耐性を植物に付与し得るコード配列としての使用、および本発明のHPPDをコードする核酸配列を含む植物における1以上のHPPD阻害剤の使用に関する。例えば、その全体が参照により本明細書に取り込まれる米国特許第6,791,014号を参照されたい。

20

【0129】

この実施形態では、コンピテント植物細胞が形質転換工程の前に白化するように、前記細胞の培地中にHPPD阻害剤を添加する。白化したコンピテント細胞を、次に、選択マーカーとしてのHPPD阻害剤に対する耐性遺伝子によって形質転換した後、前記選択マーカーがゲノム内に組み込まれた形質転換細胞は緑となることから、選択が可能となる。このような方法により、形質転換細胞を選択するために必要な時間が短縮され得る。

【0130】

このように本発明の一実施形態は、異種性遺伝子と、選択マーカーとしてのHPPD阻害剤に対する耐性遺伝子とを共に植物細胞内に導入することによって前記植物細胞を形質転換させるための方法からなり、該方法は、適切な培地中で異種性遺伝子を受け入れることのできるコンピテント植物細胞を調製および培養すること、およびコンピテント植物細胞の適切な培地中に適切な量のHPPD阻害剤を添加することを含む。次にコンピテント細胞を異種性遺伝子および選択マーカーによって形質転換した後、異種性遺伝子を含む形質転換細胞を適切な培地中で成長させて、そこから形質転換体を選択する。形質転換細胞は、次に稔性の形質転換植物へと再生させることができる。

30

【0131】

I. 植物および植物の部分

「植物」は、植物全体、植物器官（例えば葉、茎、根など）、種子、植物細胞、繁殖体、胚およびその子孫を意図する。植物細胞は分化していてよい、または未分化（例えばカルス、懸濁培養細胞、プロトプラスト、葉細胞、根細胞、師部細胞、花粉）であってよい。本発明は、単子葉植物および双子葉植物を含むがこれらに限定されない、いずれかの植物種へのポリヌクレオチドの導入のために用いられてよい。関心のある植物の例としては、トウモロコシ（maize）、モロコシ、コムギ、ヒマワリ、トマト、十字花植物、コショウ、ジャガイモ、綿、米、大豆、サトウダイコン、サトウキビ、タバコ、オオムギ、アブラナ、アブラナ属の種、アルファルファ、ライムギ、アワ、ベニバナ、ピーナッツ、サツマイモ、キャッサバ、コーヒー、ココナツ、パイナップル、柑橘類、ココア、茶、バナナ、アボカド、イチジク、グアバ、マンゴー、オリーブ、パパイヤ、カシュー、マカダミア、アーモンド、カラスムギ類、野菜類、装飾花類、および針葉樹類が挙げられるが

40

50

、これらに限定されない。

【0132】

野菜類としては、トマト、レタス、緑豆、ライマメ、エンドウマメ、ならびにキュウリ属のメンバー、例えばキュウリ、カンタロープ、およびマスクメロンが挙げられるが、これらに限定されない。装飾花としては、ツツジ、アジサイ、ハイビスカス、バラ、チューリップ、ラッパズイセン、ペチュニア、カーネーション、ポインセチア、およびキクが挙げられるが、これらに限定されない。農作物植物にもまた関心がもたれるが、例えば、トウモロコシ、モロコシ、コムギ、ヒマワリ、トマト、十字花植物、コショウ、ジャガイモ、綿、米、大豆、サトウダイコン、サトウキビ、タバコ、オオムギ、アブラナなどが挙げられる。

10

【0133】

本発明は、トウモロコシ、米、オオムギ、カラスミギ類、コムギ、モロコシ、ライムギ、パイナップル、ヤムイモ、タマネギ、バナナ、ココナツ、およびデーツを含むが、これらに限定されない単子葉植物ファミリーのいずれかのメンバーに適している。

【0134】

J. 植物の収穫高を増大させる方法

植物の収穫高を増大させる方法が提供される。該方法は、本発明のHPPDをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを含む植物を提供することまたは該ポリヌクレオチドを植物もしくは植物細胞内に導入すること、該植物またはその種子を耕作地において成長させること、および前記植物または種子を収穫することを含む。本明細書で定義

20

される植物の「収穫高」は、植物によって生じる現存量の品質および／または量を指す。「現存量」は、計測されたいずれかの植物産物を意図する。生じる現存量の増大は、計測された植物産物の収穫高における何らかの改善を意味する。植物収穫高の増大により、幾つかの商業的応用が為される。例えば植物葉現存量の増大により、ヒトまたは動物が消費するための葉菜の収穫高が増大し得る。加えて、葉現存量の増大は、植物由来の医薬品または工業製品の産生を増大させるために利用可能である。収穫高の増大は統計的に有意ないずれかの増大を含んでよく、限定はされないが、少なくとも1%の増大、少なくとも3%の増大、少なくとも5%の増大、少なくとも10%の増大、少なくとも20%の増大、少なくとも30%、少なくとも50%、少なくとも70%、少なくとも100%、またはそれを超える増大が挙げられる。

30

【0135】

特定の方法では、本発明のHPPD配列を含む植物は、有効濃度のHPPD除草剤、例えばN(1, 2, 5-オキサジアゾール-3-イル)ベンズアミド類の分類、N-(テトラゾール-4-イル)-またはN-(トリアゾール-3-イル)アリアルカルボキサミド類、例えば2-クロロ-3-エトキシ-4-(メチルスルホニル)-N-(1-メチル-1H-テトラゾール-5-イル)ベンズアミドおよび2-クロロ-3-(メトキシメチル)-4-(メチルスルホニル)-N-(1-メチル-1H-テトラゾール-5-イル)ベンズアミド、トリケトン類、例えばテンボトリオン、スルコトリオン、およびメソトリオンの分類、イソキサゾール類、例えばイソキサフルトールの分類、またはピラゾリネート類の分類、例えばピラスルホトールおよびトプラメゾン、特にテンボトリオン、スルコトリオン、トプラメゾン、ビシクロピロン、テフリルトリオン、イソキサフルトール、およびメソトリオンから選択されるHPPD阻害除草剤からなる群より選択される1以上のHPPD阻害除草剤によって処理され、除草剤の使用によって植物の収穫高は改善される。

40

【0136】

植物または植物の部分に、除草剤に対する耐性を付与する方法もまた提供される。このような方法では、本発明のHPPDをコードするヌクレオチド配列が植物内に導入され、ポリヌクレオチドの発現によってHPPD阻害除草剤に対する耐性がもたらされる。この方法によって産生された植物は、有効濃度の除草剤(例えばN(1, 2, 5-オキサジアゾール-3-イル)ベンズアミド類、N-(テトラゾール-4-イル)-またはN-(トリアゾール-3-イル)アリアルカルボキサミド類、例えば2-クロロ-3-エトキシ-

50

4-（メチルスルホニル）-N-（1-メチル-1H-テトラゾール-5-イル）ベンズアミドおよび2-クロロ-3-（メトキシメチル）-4-（メチルスルホニル）-N-（1-メチル-1H-テトラゾール-5-イル）ベンズアミド、トリケトン類、例えばテンボトリオン、スルコトリオン、およびメソトリオンの分類、イソキサゾール類、例えばイソキサフルトールの分類、またはピラゾリネート類の分類、例えばピラスルホトールおよびトプラメゾン、特にテンボトリオン、スルコトリオン、トプラメゾン、ビスクロピロン、テフリルトリオン、イソキサフルトール、およびメソトリオンから選択されるHPPD阻害除草剤からなる群より選択される1以上のHPPD阻害除草剤）によって処理可能であり、除草剤に対する耐性の増大を示す。本出願における除草剤の「有効濃度」は、除草剤に対して自然に耐性ではなく。また耐性を付与されてもいない植物または植物の部分の成長を遅延または停止させるために十分な量である。

10

【0137】

K. 耕作地における雑草の防除方法

したがって本発明は、不要な植物の防除または本発明のHPPDをコードするヌクレオチド配列を含む農作物植物の成長を調節するための方法にも関し、該方法においては、例えば、N（1，2，5-オキサジアゾール-3-イル）ベンズアミド類の分類、N-（テトラゾール-4-イル）-またはN-（トリアゾール-3-イル）アリアルカルボキサミド類、例えば2-クロロ-3-エトキシ-4-（メチルスルホニル）-N-（1-メチル-1H-テトラゾール-5-イル）ベンズアミドおよび2-クロロ-3-（メトキシメチル）-4-（メチルスルホニル）-N-（1-メチル-1H-テトラゾール-5-イル）ベンズアミド、トリケトン類、例えばテンボトリオン、スルコトリオン、およびメソトリオンの分類、イソキサゾール類、例えばイソキサフルトールの分類、またはピラゾリネート類の分類、例えばピラスルホトールおよびトプラメゾン、特にテンボトリオン、スルコトリオン、トプラメゾン、ビスクロピロン、テフリルトリオン、イソキサフルトール、またはメソトリオンから選択される1以上のHPPD阻害除草剤が、植物（例えば単子葉類もしくは双子葉類の雑草または不要な農業植物のような有害植物）、種子（例えば穀物、種子、または、塊茎または芽を有するシュート部分のような野菜の繁殖体）、または植物が成長する区域（例えば栽培区域）へ適用される。これに関連して、例えばN（1，2，5-オキサジアゾール-3-イル）ベンズアミド類の分類、N-（テトラゾール-4-イル）-またはN-（トリアゾール-3-イル）アリアルカルボキサミド類、例えば2-クロロ-3-エトキシ-4-（メチルスルホニル）-N-（1-メチル-1H-テトラゾール-5-イル）ベンズアミドおよび2-クロロ-3-（メトキシメチル）-4-（メチルスルホニル）-N-（1-メチル-1H-テトラゾール-5-イル）ベンズアミド、トリケトン類、例えばテンボトリオン、スルコトリオン、およびメソトリオンの分類、イソキサゾール類、例えばイソキサフルトールの分類、またはピラゾリネート類の分類、例えばピラスルホトールおよびトプラメゾン、特にテンボトリオン、スルコトリオン、トプラメゾン、ビスクロピロン、テフリルトリオン、イソキサフルトール、およびメソトリオンから選択されるHPPD阻害除草剤からなる群より選択される1以上のHPPD阻害除草剤の有効濃度を、例えば植え付け前（土壌への取り込みもまた適切である場合に）、発芽前または発芽後に使用することができ、かつ農作物が自然に耐性であるか、または1以上のその他の除草剤抵抗性の導入遺伝子の発現を通して抵抗性となるその他の除草剤と併用してもよい。例えば米国特許出願公開第2004/0058427号およびPCT出願国際公開第98/20144号を参照されたい。「有効濃度」は、HPPD阻害剤に耐性の植物または植物種子に有意に影響することなく、雑草またはその他の非形質転換植物の成長または拡散を制御する濃度を意図する。当業者は、除草剤の使用が多くの変った形態をとり得ること、ならびに種子の植え付けおよび成長過程に先立ち、および／またはそれらの間を通して、様々な時間において起こり得ることを理解する。「発芽前」使用は、植物の土壌からの発芽が目に見える前の、関心のある区域（例えば耕作地または栽培区域）での除草剤の使用を指す。「発芽後」使用は、植物の土壌からの発芽が目に見えた後の、区域での除草剤の使用を指す。幾つかの例では、「発芽前」および「発芽後」の用語は関心

20

30

40

50

のある区域における雑草に関して用いられ、幾つかの例では、これらの用語は関心のある区域内の農業植物に関して用いられる。雑草に関して用いられる場合、これらの用語は、関心のある区域に存在するか、または存在すると考えられる雑草または種の特定の型に対して用いられ得る。除草剤の「植え付け前の取り込み」は、植え付け前の化合物の土壌中への取り込みに関する。

【0138】

このように、本発明は耕作地における雑草を防除するための方法を含み、該方法は、本発明のHPPDを含む植物またはその種子を耕作地に植え付けること、および前記植物または前記植物の周囲の区域に、1以上のHPPD阻害除草剤を有効濃度にて使用することを含む。

10

【0139】

本発明の一実施形態によれば、本発明のHPPDヌクレオチド配列を含む植物（例えば大豆、綿、トウモロコシ、またはコムギ植物）を植え付けた耕作地は、植物を植え付けるか、または種子をまく前に、イソキサフルトール（IFT）のようなHPPD阻害除草剤によって処理してよく、HPPD阻害剤によって雑草が死滅することで、耕作地は耕す必要なくきれいになり、続いて、前処理されたこの耕作地に植物の植え付けまたは種まきが行われる（HPPD阻害除草剤を用いた、焼き払いの応用）。IFTの残余の活性も、初期の成長段階で、植物の発芽および成長を雑草との競合から保護し得る。植物がいったんある大きさになり、雑草が再びみられるようになると、グルホシネートまたはグリホサート、またはHPPD阻害剤、またはHPPD阻害剤と別の除草剤、例えばグリホサートとの混合物が、このような植物が前記除草剤に対して耐性の場合に、発芽後の除草剤として植物の上部から使用できる。

20

【0140】

本発明の別の実施形態によれば、本発明のHPPDヌクレオチド配列を含む種子がまかれた耕作地は、種子がまかれた後ではあるが、植物が発芽する前に、IFTのようなHPPD阻害除草剤によって処理することができる（耕作地は、種まきの前にその他の手段、典型的にはプラウ、チゼル・プラウ、または播床の準備のような従来の耕作の実践によって雑草の無い状態にすることができる）が、耕作地では除草剤によって死滅した雑草の無い状態が残余の活性によって維持され、出芽および成長する植物と雑草とが競合しない（HPPD阻害除草剤の発芽前使用）。植物がいったんある大きさになり、雑草が再びみられるようになると、グルホシネートまたはグリホサート、またはHPPD阻害剤、またはHPPD阻害剤と別の除草剤、例えばグリホサートとの混合物が、このような植物が前記除草剤に対して耐性の場合に、発芽後の除草剤として植物の上部から使用できる。

30

【0141】

本発明の別の実施形態によれば、本発明のHPPDヌクレオチド配列を含む植物は、まかれた種子から出芽した植物の上部からHPPD阻害除草剤によって処理することができ、HPPD阻害剤によって雑草が死滅することで、耕作地は耕す必要なくきれいになるが、HPPD阻害剤は、植物の上部から使用する発芽後除草剤としてのグリホサートまたはグルホシネートと共に（例えばスプレータンク内で混合して）、グリホサートまたはグルホシネートによる処理の後または前に、植物がこのような除草剤に対して耐性である場合に使用可能である（HPPD阻害除草剤（単独またはグリホサートとの併用）の発芽後使用）。

40

【0142】

HPPD阻害除草剤によって防除可能な、代表的な単子葉類および双子葉類の雑草それぞれの例としては、

単子葉類有害植物の属としてエギロプス属(Aegilops)、カモジグサ属(Agropyron)、コムカグサ属(Agrostis)、スズメノテッポウ属(Alopecurus)、セイヨウヌカボ属(Apera)、カラスムギ属(Avena)、ビロードキビ属(Brachiaria)、スズメノチャヒキ属(Bromus)、クリノイガ属(Cenchrus)、ツユクサ属(Commelina)、ギョウギシバ属(Cynodon)、カヤツリグサ属(Cyperus)、タツノツメガヤ属(Dactyloctenium)、メヒシバ属(Digitaria)、ヒエ属(E

50

chinochloa)、ハリイ属(Eleocharis)、オヒシバ属(Eleusine)、スズメガヤ属(Eragrostis)、ナルコビエ属(Eriochloa)、ウシノケグサ属(Festuca)、テンツキ属(Fimbristylis)、アメリカコナギ属(Heteranthera)、チガヤ属(Imperata)、カモノハシ属(Ischaemum)、アゼガヤ属(Leptochloa)、ドクムギ属(Lolium)、ミズアオイ属(Monochoria)、キビ属(Panicum)、スズメノヒエ属(Paspalum)、クサヨシ属(Phalaris)、アワガエリ属(Phleum)、イチゴツナギ属(Poa)、ツノアイアシ属(Rottboellia)、オモダカ属(Sagittaria)、ホタルイ属(Scirpus)、セタリア属(Setaria)、モロコシ属(Sorghum)が挙げられ、

双子葉類雑草の属としてアブチロン属(Abutilon)、アマランサス属(Amaranthus)、ブタクサ属(Ambrosia)、アノダ属(Anoda)、ローマカミツレ属(Anthemis)、イワムシロ属(Aphanes)、ヨモギ属(Artemisia)、ハマアカザ属(Atriplex)、ヒナギク属(Bellis)、センダングサ属(Bidens)、ナズナ属(Capsella)、ヒレアザミ属(Carduus)、センナ属(Cassia)、ヤグルマギク属(Centaurea)、アカザ属(Chenopodium)、アザミ属(Cirsium)、セイヨウヒルガオ属(Convolvulus)、チョウセンアサガオ属(Datura)、ヌスビトハギ属(Desmodium)、イヌスイバ属(Emex)、エゾスズシロ属(Erysimum)、トウダイグサ属(Euphorbia)、チシマオドリコソウ属(Galeopsis)、コゴメギク属(Galinsoga)、ヤエムグラ属(Galium)、フヨウ属(Hibiscus)、サツマイモ属(Ipomoea)、ホウキギ属(Kochia)、オドリコソウ属(Lamium)、マメグンバイナズナ属(Lepidium)、アゼナ属(Lindernia)、シカギク属(Matricaria)、ハッカ属(Mentha)、ヤマアイ属(Mercurialis)、ザクロソウ属(Mullugo)、ワスレナグサ属(Myosotis)、ケシ属(Papaver)、アサガオ属(Pharbitis)、オオバコ属(Plantago)、タデ属(Polygonum)、スベリヒユ属(Portulaca)、キンボウゲ属(Ranunculus)、ダイコン属(Raphanus)、イヌガラシ属(Rorippa)、キカシグサ属(Rotala)、ギシギシ属(Rumex)、オカヒジキ属(Salsola)、キオン属(Senecio)、ツノクサネム属(Sesbania)、キンゴジカ属(Sida)、シロガラシ属(Sinapis)、ナス属(Solanum)、ノゲシ属(Sonchus)、ナガボノウルシ属(Sphenoclea)、ハコベ属(Stellaria)、タンポポ属(Taraxacum)、グンバイナズナ属(Thlaspi)、シャジクソウ属(Trifolium)、イラクサ属(Urtica)、クワガタソウ属(Veronica)、スミレ属(Viola)、オナモミ属(Xanthium)が挙げられる。

【0143】

限定はされないが、例としてN(1, 2, 5-オキサジアゾール-3-イル)ベンズアミド類の分類、N-(テトラゾール-4-イル)-またはN-(トリアゾール-3-イル)アリールカルボキサミド類、例えば2-クロロ-3-エトキシ-4-(メチルスルホニル)-N-(1-メチル-1H-テトラゾール-5-イル)ベンズアミドおよび2-クロロ-3-(メトキシメチル)-4-(メチルスルホニル)-N-(1-メチル-1H-テトラゾール-5-イル)ベンズアミド、トリケトン類、例えばテンボトリオン、スルコトリオン、およびメソトリオンの分類、イソキサゾール類、例えばイソキサフルトールの分類、またはピラゾリネート類の分類、例えばピラスルホトールおよびトプラメゾン、特にテンボトリオン、スルコトリオン、トプラメゾン、ビスクロピロン、テフリルトリオン、イソキサフルトール、およびメソトリオンであるHPPD阻害除草剤が挙げられる、本発明において有用なHPPD阻害除草剤は、主な生物学的および/または物理化学的パラメータに依存して、様々な方法で処方することができる。可能な処方の例としては、水和剤(WP)、水溶剤(SP)、水溶性濃縮製剤、乳剤(EC)、エマルション(EW)、例えば水中油エマルションおよび油中水エマルション、スプレー溶液、懸濁濃縮製剤(SC)、油または水ベースの分散剤、油混和性溶液、カプセル懸濁液(CS)、ダスト剤(DP)、種子粉衣産物、広範囲の土壌に使用するための顆粒、微粒剤の形態である顆粒(GR)、スプレー顆粒、コートされた顆粒および吸着顆粒、水和性顆粒(WG)、水溶性顆粒(SG)、ULV製剤、マイクロカプセル、およびワックスが挙げられる。

【0144】

これらの処方の個々の型は原則的には公知であり、例えばWinnacker-Kuchler, "Chemische Technologie" [Chemical technology], volume 7, C. Hanser Verlag Munich, 4th Ed. 1986; Wade van Valkenburg, "Pesti

10

20

30

40

50

cide Formulations”, Marcel Dekker, N. Y., 1973; K. Martens, “Spray Drying” Handbook, 3rd Ed. 1979, G. Goodwin Ltd. Londonに記載されている。

【0145】

必要とされる不活性材料、界面活性剤、溶媒、およびさらなる添加物のような処方用の助剤もまた公知であり、例えばWatkins, “Handbook of Insecticide Dust Diluents and Carriers”, 2nd Ed., Darland Books, Caldwell N. J., H. v. Olphen, “Introduction to Clay Colloid Chemistry”; 2nd Ed., J. Wiley & Sons, N. Y.; C. Marsden, “Solvents Guide”; 2nd Ed., Interscience, N. Y. 1963; McCutcheon’s “Detergents and Emulsifiers Annual”, MC Publ. Corp., Ridgewood N. J.; Sisley and Wood, “Encyclopedia of Surface Active Agents”, Chem. Publ. Co. Inc., N. Y. 1964; Schonfeldt, “Grenzflächenaktive Äthylenoxidaddukte” [Interface-active ethylene oxide adducts], Wiss. Verlagsgesell., Stuttgart 1976; Winnacker-Kuchler, “Chemische Technologie” [Chemical technology], volume 7, C. Hanser Verlag Munich, 4th Ed. 1986に記載されている。

10

20

【0146】

これらの処方にに基づき、その他の駆除用活性剤、例えば、殺虫剤、ダニ駆除剤、除草剤、抗真菌剤と共に、かつ毒性緩和剤、肥料および／または制御因子と共に、例えば調合済またはタンク混合の形態で併用物を調製することも可能である。

【0147】

L. 別の植物への本発明の遺伝子の導入方法

本明細書では、別の植物への本発明のHPPDヌクレオチド配列の導入方法も提供される。本発明のHPPDヌクレオチド配列またはその断片は、反復選択、戻し交雑、系統育種、系統選択、集団選択、変異育種、および／または高感度遺伝子マーカー選択によって第2の植物へ導入することができる。

30

【0148】

このように一実施形態によれば、本発明の方法は、本発明のHPPDヌクレオチド配列を含む第1の植物と、第2の植物とを交雑してF1子孫植物を産出すること、および、HPPD阻害除草剤に耐性であるかまたは本発明のHPPDヌクレオチド配列を含む、F1子孫植物を選択することを含む。該方法は選択した子孫植物と、本発明のHPPDヌクレオチド配列を含む第1の植物とを交雑して、戻し交雑による子孫植物を産出すること、および、HPPD阻害除草剤に耐性であるかまたは本発明のHPPDヌクレオチド配列を含む、戻し交雑子孫植物を選択することをさらに含んでもよい。HPPD阻害除草剤に対する耐性を評価する方法は、本明細書の他所に記載される。該方法は、これらの工程を1回以上連続的に反復し、HPPD阻害除草剤に耐性であるかまたは本発明のHPPDヌクレオチド配列を含む、選択された第2の、またはそれを超える戻し交雑子孫植物を産出することをさらに含んでもよい。

40

【0149】

本発明の方法では、所望の表現型についての植物の選択に関与する、いずれかの育種法を用いることができる。幾つかの実施形態によれば、F1植物は、分離されたF2世代を産出するために自家受粉されてもよい。次に、所望の表現型（例えばHPPD阻害除草剤に耐性）を呈する個々の植物を、各世代（F3、F4、F5など）において、該形質がホモ接合性となるかまたは育種集団内部で固定されるまで選択してよい。

50

【0150】

第2の植物は、除草剤耐性、昆虫耐性、乾燥耐性、線虫防除された、効率良い水使用、効率良い窒素使用、改善された栄養値、疾病抵抗性、改善された光合成、改善された繊維品質、ストレス耐性、改善された再生などのような所望の形質を有する植物であってよい。第2の植物は、本明細書の他所に記載するエリート体であってもよい。

【0151】

様々な実施形態によれば、植物の部分（植物全体、植物器官（例えば葉、茎、根など）、種子、植物細胞、繁殖体、胚など）は、得られた交雑体から収穫されてよく、それに由来する使用（例えば食品、食餌、生物燃料、油、小麦粉、穀粉など）のために、繁殖させるかまたは収集される。

10

【0152】

M. 植物産物を得るための方法

本発明はまた、商品を得るための過程にも関し、該過程は、本発明のHPPD配列を含む農作物由来の穀物を収穫および／または製粉して商品を得ることを含む。農学的および商業的に重要な産物および／または物質組成物として、限定はされないが、ヒトが消費する食品としての使用が意図されたか、またはヒトが消費する組成物および物品における使用が意図された、動物用の餌、物品、および植物産物、ならびに副生成物、特に、失活した穀物／種子から産生された（半）処理製品を含む、失活した種子／穀物製品が挙げられ、前記産物は、全体のまたは処理された種子または穀物、動物用の餌、コーンミールまたは大豆かす、トウモロコシ粉または大豆粉、トウモロコシ、コーンスターチ、大豆かす、大豆粉、フレーク、大豆かすタンパク質濃縮物、大豆タンパク質分離物、組織化大豆タンパク質濃縮物、化粧品、毛髪手入れ用品、大豆バター、納豆、テンペ、加水分解大豆タンパク質、ホイップトッピング、ショートニング、レシチン、食用丸大豆（生の、ローストした、または枝豆としての）、大豆ヨーグルト、大豆チーズ、豆腐、湯葉、および調理した、脱穀した、蒸した、焼いた、または半ゆでにした穀物などであるか、またはこれらを含むものであり、これらの産物および物質組成物が、このようなヌクレオチド配列を含むいずれかの植物の特徴として、本明細書に示すヌクレオチド配列および／またはアミノ酸配列を検出可能な量含む場合、これらの産物および物質組成物は本発明の範囲内にあることが意図される。

20

【0153】

以下の実施例は例証を目的とするものであり、限定を目的とするものではない。

30

【0154】

実施例

実施例1：蛍光菌(Pseudomonas fluorescens)HPPD変異体G336W (PfG336W)の調製およびHPPD酵素の動態特性決定

本明細書に配列番号1として示され、かつ国際公開第2009144079号、国際公開第96/38567号、およびRuetschi et al. (Eur. J. Biochem., 205, 459-466, 1992)にも記載されるアミノ酸配列をコードする、天然の蛍光菌HPPDヌクレオチド配列（国際公開第2009144079号に記載されるPfHPPD、1077bp）を、まず開始コドンを提供する発現ベクターpKK233-2 (Pharmacia)に固有のNcoI部位にクローン化した。

40

【0155】

5'末端において、ATGのすぐ下流にアラニンアミノ酸をコードする核酸配列およびN末端HIS6-Tag (cat cac cat cac cat cacによりコードされる6×HIS (配列番号77))をコードする核酸配列を挿入した。ATGの上流には、制限酵素NcoIの認識部位に対応する配列を得るために二つのさらなるシステインの塩基対を加え、終止コドンの下流には制限酵素XbaIの認識部位に対応する配列を加えた。HIS-TAGをコードする配列を含む、遺伝子に対応するDNA配列を制限酵素NcoIおよびXbaIによって切断した後、改変した発現ベクターpSE420 (RI)NX (5261bp)内へクローン化した。

50

【0156】

クローニングおよび発現ベクター pSE420 (RI)NX (5261bp) は、Invitrogen (カールスルーエ、独国) のプラスミド pSE420 に基づくものである。このベクターの改変には、抗生物質カナマイシンへの耐性を付与し、大部分のスーパーリンカー領域 (マルチクローニング部位) を有さない nptII 遺伝子 (ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ、Sambrook and Russell, 2001, Molecular Cloning: a laboratory manual (Third edition)) の付加が含まれる。

【0157】

該プラスミドは、trp-lac (trc) プロモーター、およびすべての大腸菌宿主株に lac リプレッサーを供給する lacI^q 遺伝子を有する。lac リプレッサーは lac オペレーター (lacO) に結合して標的遺伝子の発現を制限するが、この阻害は、イソプロピル β-D-1-チオガラクトピラノシド (IPTG) を用いた誘導によって減少させることができる。

【0158】

得られたベクターを pSE420 (RI)NX-PfHPPD と称し、大腸菌 BL21 細胞 (Merck、ダルムシュタット、独国) を形質転換するために用いた。

【0159】

プラスミド pSE420 (RI)NX-PfHPPD を、PCR を介した部位特異的変異誘発に供し、PfHPPD 遺伝子の対応部位において規定されたコドンを変化させた。位置 336 のグリシン (G) をコードするコドンを、トリプトファン (W) をコードするコドンによって置換した。得られた変異体を PfG336W と称し、ベクター pSE420 (RI)NX-PfG336W を得た。

【0160】

pSE420 (RI)NX-PfHPPD または pSE420 (RI)NX-PfG336W を含む大腸菌 K-12 BL21 内で HPPD を発現させた。OD が 0.5 に達するまで細胞を増殖させ、次に、lac リプレッサーに結合して、その lac オペロンからの解離を引き起こす 1mM IPTG を用いた誘導によって、trp-lac (trc) プロモーターからの発現を開始させた。発現は 28℃ にて 15 時間行った。

【0161】

前スターター培養液を調製するため、2mL の TB 培地 (100 μg * mL⁻¹ のカルベニシリン) に 50 μL の大腸菌 K-12 BL21 グリセロールストックを植菌した。前スターター培養液を 140 rpm で振盪しながら 37℃ にて 15 時間インキュベートした。200 μL の前培養液を用いてスターター培養 (100 μg * L⁻¹ の を加えた 5 mL の TB) を開始し、37℃ にて 3 時間インキュベートした。

【0162】

メイン培養液を調製するため、400 mL の TB 培地 (100 μg * mL⁻¹ のカルベニシリン) に 4 mL のスターター培養液を植菌した。このスターター培養液を 140 rpm で振盪しながら 37℃ にて OD₆₀₀ が 0.5 になるまでインキュベートした。次に 400 μL の 1M IPTG 溶液を加えて組換えタンパク質の発現を誘導した。細胞をこのような条件下でさらに増殖させた後、温度を 28℃ に低下させて、培養液を 140 rpm で 15 時間振盪した。細胞を 6000 × g、15 分間 4℃ にて遠心分離することにより回収した。次に細胞ペレットを -80℃ にて保管した。

【0163】

未変性 HiS₆-PfHPPD および HiS₆-PfG336W の分離ならびに精製細胞の溶解

細菌の細胞壁を構成するペプチドグリカン中の N-アセチルムラミン酸と N-アセチル-D-グルコサミン残基との間の 1, 4-β 結合を切断する酵素である リゾチーム を用いて、細胞を溶解した。次に細菌細胞の内圧によって細胞膜を破壊した。加えて、タンパク質を損傷させることなくすべての型の DNA および RNA を加水分解する エンドヌクレア

10

20

30

40

50

ーゼであるベンゾナーゼ（登録商標）ヌクレアーゼを含む溶解緩衝液を用いて、細胞ライセートの粘度を大きく低下させた。未変性状態の溶解は、氷上で行った。Q I A E X P R E S S（登録商標）N i - N T A F a s t S t a r t キットをユーザーマニュアルの指示に従って用いることで、H i s₆-タグ化タンパク質を精製した。

【0164】

固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィー（IMAC）によるH i s₆-タグ化タンパク質の精製

溶解反応の遠心分離後に得た清澄な細胞ライセート（10 mL）をQ I A E X P R E S S（登録商標）N i - N T A F a s t S t a r t キットのN i - N T A F a s t S t a r t カラム（Q i a g e n、ヒルデン、独国）に負荷し、取扱説明書に従って精製した。H i s₆-タグ化タンパク質を、2.5 mLの溶出緩衝液によって溶出した。

【0165】

ゲル濾過によるH P P D溶液の脱塩

2.5 mLの溶出緩衝液によってN i - N T A F a s t S t a r t カラムから溶出したH P P D溶液を、ユーザーマニュアルの指示に従ってS e p h a d e x G - 2 5 P D - 1 0 カラム（G E H e a l t h c a r e、フライブルク、独国）にアプライした。ゲル床に全試料を入れた後、3.5 mLの保存緩衝液によって溶出した。

【0166】

脱塩カラムから溶出したH P P D溶液を、1 mLの一定分量で、-80℃にて凍結した。

【0167】

ブラッドフォードタンパク質アッセイを用いたH P P Dタンパク質濃度の決定

標準的なブラッドフォードアッセイ（Bradford, (1976), Anal Biochem 72:248-254）を用いてタンパク質濃度を決定した。

【0168】

S D S - P A G Eを用いたH P P D溶液の純度の決定

ゲルN U P A G E（登録商標）N o v e x 4~12%ビスートリスゲル（I n v i t r o g e n、カールスルーエ、独国）を用いたS D S - P A Gタンパク質ゲル電気泳動によって、溶出したタンパク質の完全性を調べ、おおよそ約10 μgのタンパク質を負荷した。1~10 μlのタンパク質溶液に10 μlのレムリサンプルバッファーを加え、混合物を90℃にて10分間インキュベートした。短い遠心分離工程の後、全混合物を、N U P A G E（登録商標）M O P S S D Sランニングバッファー（20×溶液からd d H₂Oによって希釈した）を満たしたX C E L L S U R E L O C K（商標）N o v e x M i n i - C e l l g e l c h a m b e r内で予め固定化したS D Sゲルのスロット内へ負荷した。ゲルチャンバーに150ボルトを1時間適用した。タンパク質バンドを染色するため、クマシーブリリアントブルー R-250染色液中にゲルを浸した。ポリアクリルアミドゲルの脱染のため、これをクマシーブリリアントブルー R-250脱染液中に、白いゲルに青のタンパク質バンドが現れるまで浸した。

【0169】

実施例2：H P P D酵素であるP f H P P DおよびP f G 3 3 6 Wの動態特性およびH P P D阻害剤に対する耐性

標準的な分光光度アッセイ（その全体が参照により本明細書に取り込まれる国際公開第2009/144079号に記載される）によって、H P P D活性を調べた。

【0170】

H P P Dのi n v i t r oにおける動態特性の決定

H P P D活性を測定するためにH P L Cアッセイを用い、異なるH P P D酵素調製物についてはK_m、V_{m a x}、およびk_{c a t}値を、および異なるH P P D阻害剤についてはK_i、K₁=K_{o n}、およびK₁=K_{o f f}を決定したか、または決定することができる。1 mLの150 mM トリス-H C l緩衝液 pH 7.8中のアッセイ混合物には、10 mM アスコルビン酸ナトリウム、650単位のウシカタラーゼ（S i g m a C 3 0

10

20

30

40

50

(Sigma-Aldrich、ミュンヘン、独国)、34 mg タンパク質/ml、23,000 単位/mg)、ならびに適切な量の HPP、精製 HPPD 酵素、および HPPD 阻害剤が含まれる。 K_m 、 V_{max} 、および k_{cat} 値を決定するために、アッセイ混合物中の HPP 濃度は 10 ないし 400 μM に変動した。 K_i 、 $K_1 = K_{on}$ 、および $K_1 = K_{off}$ 値を決定するために、2 mM HPP を使用したか、または使用することができる。すべてのアッセイは、アッセイ混合物への HPPD 酵素の添加によって開始し、0 ないし 240 秒の一連の時間に、200 μl の反応混合物を、20 μl の 10% 過塩素酸を含む反応アッセイ管内に加えることによって終了した。沈殿したタンパク質は、10,000 g にて 5 分間遠心分離することによってペレット化した。100 μl の上清を、10% メタノール、0.1% トリフルオロ酢酸 (緩衝液 A) によって平衡化した 250 $\times$ 4 mm Knauer (ベルリン、独国) Eurospher 100-5 C18 カラムに負荷した。カラムは、緩衝液 A による 4 分間の洗浄、続いて 95% メタノールによる 3 分間の洗浄、および緩衝液 A によるさらなる 2 分間の洗浄を用いて、1.5 ml/分で溶出した。HGA (ホモゲンチジン酸) および HPP (ヒドロキシフェニルピルビン酸) の溶出を、292 nm にてモニターした。HGA は 5 分あたりで溶出し、HPP はそれよりも遅く溶出した。HGA 濃度に対する HGA ピークの 292 nm における吸光度を校正するため、HGA 濃度の標準的な一組を用いて検量線を描いた。

10

【0171】

K_m および V_{max} 値を決定するために、ID Business Solutions Ltd. (www.idbs.com) XLfit ソフトウェアスイートを用いて、異なる基質濃度における HPPD 反応の初速度を、生成した HGA の時間に対するプロットから決定した後、定常反応状態の酵素に対するミカエリス・メンテン式に適用した。 K_i 、 $K_1 = K_{on}$ 、および $K_1 = K_{off}$ 値を決定するために、異なる阻害剤濃度における HPPD 反応の経時変化を、ID Business Solutions Ltd. XLfit ソフトウェアスイートを用いて、強固に結合した阻害剤に対する競合阻害である機序 A についての方程式 (Cha, S. (1975) Tight-binding inhibitors-1. Kinetic behaviour. Biochemical Pharmacology 24, 2177-2185) に適用した。

20

【0172】

表 1: HPPD 酵素 (PfHPPD および PfG336W) の動態特性

30

下の表 1 に示す「 K_m 」(ミカエリス・メンテン定数)は、酵素の性質決定に用いられる動態パラメータを意味し、反応の最大速度の半分の速度をもたらす基質濃度として定義される。 K_m はさらに、反応速度がその最大値の半分 ($V_{max}/2$) に達する際の基質濃度として定義され、ここでは V_{max} が反応の最大速度を意味する。

【0173】

$K_{on} = K_1$ は、酵素-基質の結合の会合速度定数を表し、 $K_{off} = K_1$ は、酵素-阻害剤複合体の解離の速度定数を表す。 K_i は阻害定数を表す。酵素の特異的活性を決定するために、試料をインキュベートして、反応を 24 分後に停止させた。特異的活性をタンパク質の μg によって推定した。

【0174】

40

【表 1】

	HPP	HPP	特異的活性
	K_m (μM)	K_{cat} (s^{-1})	$\Delta E/24$ 分 μg タンパク質
PfHPPD	187	4.4	0.76
PfG336W	141	5.4	0.40

10

【0175】

表 1 は、野生型細菌 HPPD (PfHPPD) と変異 HPPD (PfG336W) との間で、動態パラメータである K_m および K_{cat} に有意差は見られなかったことを示す。しかしながら変異体では、野生型タンパク質に比較して特異的活性が有意に低下している。

【0176】

数種の HPPD 阻害剤の存在下での、HPPD 活性の決定

20

これに関連して、 pI_{50} 値は、モル濃度での、酵素活性の 50% を阻害するために必要な阻害剤濃度の $\log$ 値を表す。

【0177】

HPPD 阻害剤に対する pI_{50} 値は、国際公開第 2009/144079 号に詳細に記載される、2 mM に固定した HPP 濃度および 3 分間に固定したインキュベーション時間によるアッセイを行い、ID Business Solutions Ltd. XLfit ソフトウェアスイートを用いて作成した、阻害剤濃度に対する HPPD 活性の用量反応プロットから決定した。

【0178】

分光光度法を用いて PfHPPD および PfG336W 酵素の pI_{50} を測定した。以下に挙げる幾つかの HPPD 阻害剤、テンボトリオン、ジケトニトリル、メソトリオンに対する耐性を測定した。記号「>」は、値が表示するものよりもはるかに大きかったが、試験した阻害剤の濃度の範囲内 (5.0×10^{-6} 、 1.0×10^{-5} 、 2.5×10^{-5} 、 4.0×10^{-5} 、 7.0×10^{-5} 、 1.0×10^{-4} 、 2.0×10^{-4} 、および $5.0 \times 10^{-4} M$) では正確に算出できなかったことを意味する。本実験において、読み取りは実験開始の 24 分後に行った。結果を表 2 に示す。

30

【0179】

【表 2】

	テンボトリオン	ジケトニトリル	メソトリオン
PfHPPD	>5.6	>5.6	>5.6
PfG336W	>5.6	4.9	5.3

40

【0180】

HPPD 酵素の pI_{50} もまた、HPLC に基づいた方法を用いて測定した。HPPD 阻害剤であるテンボトリオン、ジケトニトリル、およびメソトリオンに対する耐性を測定した。本実験において、測定は実験開始の 3 分後に行った。結果を表 3 に示す。

【0181】

50

【表 3】

	テンボトリオン	ジケトニトリル	メソトリオン
PfHPPD	4.9	4.7	4.7
PfG336W	4.6	4.2	4.3

【0182】

HPPD活性、およびHPPD阻害剤に対するHPPD耐性を測定する別の方法では、全量1ml中に200mM トリス-HCl pH7.6、10mM アスコルビン酸塩、20μM FeSO₄、650単位のカタラーゼ、8μg HGAジオキシゲナーゼ（HGA：ホモゲンチジン酸）、および10～100μM HPPを含む溶液中に、適切な量のHPPDを加えることによって、室温にてHPPD活性を測定した。反応初速度は、マレイルアセト酢酸の生成による、318nmにおける吸光度の増大から決定した（ $\epsilon_{318} = 11,900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ）。K_mおよびV_{max}値は、ID Business Solutions Ltd Xlfitバージョン5.1.0.0ソフトウェアスイートのモデル350を用いて、異なるHPP濃度において決定したHPPターンオーバーの初速度をミカエリス・メンテン式に適用することによって決定した。この方法はHGDアッセイと称される。

【0183】

HPPD酵素のpI₅₀もまた、HPPD共役アッセイを用いて測定し（HGD；PfHPPDおよびPfG336W）、HPPD阻害剤であるテンボトリオン、ジケトニトリル、およびメソトリオンに対する、それぞれの耐性を測定した。結果を表4に示す。

【0184】

【表 4】

	テンボトリオン	ジケトニトリル	メソトリオン
PfHPPD	6.4	5.8	5.8
PfG336W	6.0	5.3	5.3

【0185】

表2、3、および4では、蛍光菌由来のHPPDの位置336における変異により、数種のHPPD阻害剤に対するHPPDの耐性が有意に増大したことが明らかである。

【0186】

実施例3：第一世代の点変異体ライブラリー

PfG336W変異体の位置16をさらに変異させた。これらの位置の無作為化は、QUICKCHANGER lightningキットを用いて行った。ライブラリーの理論上の多様性は約300であった。変異体をプールして、DH5アルファ大腸菌細胞を形質転換した。個別の600クローンについて、HPPD阻害剤であるテンボトリオン（TBT）に対する耐性をスクリーニングした。クローンは、カナマイシンを加えたLB培地中で、37℃の振盪機内にてOD_{600nm}が0.3に達するまで増殖させた。次に培養を30℃に切り換え、さらに17時間インキュベートした。培養液を遠心分離した後、細胞ペレットを10mM HEPES/KOH pH7.6、4mM MgCl₂、1mM DTT中に再懸濁させた。ビーズ破碎によって細胞を溶解し、遠心分離後に可溶性の細胞抽出物を得た。

【0187】

変異体は、茶色アッセイ（brown color assay）を用いて分析した。

具体的には、96ウェルフォーマット内で、LB寒天、カナマイシン、5mM チロシン、42mM コハク酸塩、およびHPPD阻害剤を含む固形培地上にHPPD抽出物をスポットすることにより、HPPD阻害剤に対する耐性をアッセイした。最初のスクリーニングでは、250μMのテンボトリオンを含むプレート上に、20μlの抽出物を三通りにスポットした。プレートをair pore tapeで覆い、37℃にてインキュベートした。24時間後、PfG336Wを含む試料と比較して、茶色色素の生成を視覚的に観察した。TBTの存在下で色素の生成を増大させた変異体を、250μM TBT、およびイソキサフルトール（IFT）の250μM ジケトニトリル（DKN）活性化化合物によって再アッセイした。再び阻害剤耐性の改善を示したそれらの変異形を再び発現させ、改善の範囲を決定するために、抽出物の用量を250μM TBTおよび250μM DKNにおいて漸増させた。抽出物試料に対してはSDS-PAGEによる分析も行い、含まれるHPPDタンパク質の量が等しいことを確認した。

10

【0188】

用量の漸増により、変異形PfHPPDEV033（配列番号6）のTBTおよびDKNに対する耐性は、PfG336Wに比較して4倍改善されていることが示された。この変異形では、PfG336Wに比較すると、位置335のグルタミン酸がプロリンに置換されている。この変異は、活性部位へのゲートとして作用するc末端のアルファヘリックスに位置する。

【0189】

実施例4：第二世代置換ライブラリーのスクリーニング

20

最初に生成した変異形のうち最良の作用を示した変異形の配列を解析し、位置335、336、339、340を組み合わせた領域において、第二世代置換ライブラリーを作製した。このライブラリーの理論上の多様性は約640であった。実施例3に記載したように、スクリーニングを行った。位置188、189、および190を標的とする、別の第二世代置換ライブラリーを作製し、茶色アッセイ（brown color assay）を用いて測定した。

【0190】

用量を漸増したデータにより、変異形PfHPPDEV036（配列番号7）のTBTおよびDKNに対する耐性は、PfG336Wに比較して16倍改善されていることが示された。PfHPPDEV033に比較した場合には、該耐性は4倍改善されていた。再びタンパク質発現をSDS-PAGEによって分析すると、変異形が発現するHPPDタンパク質の量は等しいことが確認された。PfHPPDEV036では、PfG336Wに比較すると、位置335のグルタミン酸がセリンに置換され、位置336のトリプトファンがセリンに置換され、位置339のリジンがスレオニンに置換され、かつ位置340のアラニンがグルタミンに置換されている。

30

【0191】

用量を漸増したデータにより、変異形PfHPPDEV037（配列番号3）のTBTおよびDKNに対する耐性は、PfG336Wに比較して改善されていることが示された。PfHPPDEV037では、PfG336Wに比較すると、位置188のアラニンがトリプトファンに置換されている。SDS-PAGEによる分析を行うと、変異形の間でHPPDの発現量に違いは無いことが確認された。

40

【0192】

用量を漸増した以下のデータは、変異形PfHPPDEV040（配列番号8）のTBTおよびDKNに対する耐性が、PfG336Wに比較して改善されていることを示している。SDS-PAGEによる分析を行うと、変異形の間でHPPDの発現量に違いは無いことが確認された。

【0193】

変異体はまた、HPPDを発現する大腸菌細胞全部を様々なHPPD阻害剤を含む培地にまくことによって試験した。このような実験のために、HPPDの発現プラスミドを含むDH5アルファ細胞を、LB培地+カナマイシン中でOD600nm=0.5に達す

50

るまで増殖させた。0.016、0.008、0.004、および0.002のOD600値に対応するように、細胞をLB培地＋カナマイシン中で連続希釈した。それぞれの希釈液の10マイクロリットルを、HPPD阻害剤を含まないか、または250 μ M TBT、250 μ M DKN、または250 μ M メソトリオン (MST) を含むプレートに三通りにまいた。プレートを37℃にて18時間インキュベートした。SDS-PAGEによる分析を行うと、変異形の間でHPPDの発現量に違いは無いことが確認された。

【0194】

このアッセイでは、PfHPPDE v o 4 0 および PfHPPDE v o 4 1 (配列番号16) のTBTおよびMSTに対する耐性が、PfG336Wに比較して改善されていることが示された。

10

【0195】

実施例5：置換変異体の酵素的な分析

PfHPPD酵素の動態活性を幾つかの置換変異体と比較した結果を、以下の表5に示す。「 K_m 」(ミカエリス・メンテン定数)は、酵素の性質決定に用いられる動態パラメータを意味し、反応の最大速度の半分の速度をもたらす基質濃度として定義される。 K_m はさらに、反応速度がその最大値の半分($V_{max}/2$)に達する際の基質濃度として定義され、ここでは V_{max} が反応の最大速度を意味する。

【0196】

酵素の特異的活性を決定するために、試料をインキュベートして、反応を24分後に停止させた。特異的活性をタンパク質の μ gによって推定した。

20

【0197】

【表 5】

	HPP	HPP	配列番号
	K_m (μ M)	K_{cat} (s^{-1})	
PfHPPD	187	4.4	1
PfG336W	141	5.4	2
PfHPPDEvo37	220	3.0	3
C023E6	424	6.9	4
C024H11	188	0.8	5
PfHPPDEvo33	581	2.3	6
PfHPPDEvo36	602	3.3	7
PfHPPDEvo40	509	3.2	8
CO210d10	1181	1.4	9
CO212f3	297	0.9	10
C644	232	0.5	11
C645	156	0.8	12
c0216C6	1541	1.2	14
c0213H10	489	2.6	15
PfHPPDEvo41	336	1.1	16

【0198】

分光光度法を用いて、蛍光菌HPPD（PfHPPD）およびその変異体に由来するHPPDの特異的活性を測定した。試料をインキュベートして、反応を24分後に停止させた。特異的活性をタンパク質の μ gによって推定した。

【0199】

【表 6】

HPPD	特異的活性(デルタ吸光度/ 24 分/ μg タンパク質)	配列番号
PfHPPD	0.76	1
PfG336W	0.4	2
PfHPPDEvo37	0.36	3
C023E6	0.38	4
C024H11	0.07	5
PfHPPDEvo33	0.25	6
PfHPPDEvo36	0.82	7
PfHPPDEvo40	0.42	8
CO210d10	0.43	9
CO212f3	0.42	10
C644	0.38	11
C645	0.36	12
c0218A5	0.13	13
c0216C6	0.50	14
c0213H10	0.51	15
PfHPPDEvo41	0.44	16
C0228G9	0.17	17
C0232D2	0.06	18
C0234A4	0.33	19
C0235F6	0.53	20
C0235E2	0.34	21
C0236H7	0.36	22
C0236F8	0.47	23
C0240D2	0.32	24
C0240D12	0.29	25
C0242D4	0.21	26
C0244A2	0.25	27
C0244F5	0.22	28
C0247B6	0.37	29

10

20

30

40

C0247H7	0.28	30
C0252F11	0.26	31
C0255B12	0.21	32
C0255C1	0.17	33
C0255C3	0.19	34
C0255E6	0.15	35
C0255E10	0.24	36
C0256B1	0.31	37
C0256G11	0.33	38
C0256H4	0.19	39
C0257C5	0.3	40
C0260E11	0.79	41
C0260C6	0.51	42
C0262C4	0.81	43
C0262F11	0.76	44
C0263B7	0.43	45
C0263G12	0.77	46
C0261H2	0.42	47
C0264G5	0.71	48
C0264G7	0.35	49
C0266A11	0.33	50

10

20

30

【0200】

表6に示すように、酵素の野生型と大半の変異体との間に活性の有意差はみられなかった。したがって、観察された耐性は酵素に固有の特性であり、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸のホモゲンチジン酸への変換の機能障害または活性の遅延によるものではないと考えられる。

【0201】

ジケトニトリル（イソキサフルトールの活性型）およびメソトリオンに対する耐性もまた、分光光度アッセイを用いて測定した。値は pI_{50} を表す。「>」は、値がこのアッセイの測定範囲外であることを意味する（例えば、酵素がその後に示す値よりもさらに感受性であった場合）。

40

【0202】

【表 7】

HPPD	pI ₅₀ ジケトニトリル	pI ₅₀ メソトリオン
	OD	OD
PfHPPD	>5.6	>5.6
PfG336W	4.9	5.3
PfHPPDEvo37	4.7	5.3
C023E6	4.4	5.5
C024H11	4.1	4.6
PfHPPDEvo33	4.3	5.1
PfHPPDEvo36	4.5	n.d.
PfHPPDEvo40	3.5	4.9
CO210d10	4.3	5.7
CO212f3	4.7	5.4
C644	5.3	>5.6
C645	>5.6	>5.6
c0218A5	4.4	5.1
c0216C6	4.0	4.9
c0213H10	4.9	5.2
PfHPPDEvo41	3.4	4.7
C0228G9	5.4	5.7
C0232D2	5.1	5.5
C0234A4	4.9	>5.6
C0235F6	4.7	5.5
C0235E2	4.7	5.4
C0236H7	4.7	5.3
C0236F8	4.9	>5.6
C0240D2	4.9	5.4
C0240D12	4.5	5.0
C0242D4	3.6	4.5
C0244A2	4.7	5.6
C0244F5	4.3	5.3

10

20

30

40

C0247B6	5.1	>5.6
C0247H7	4.4	5.2
C0252F11	3.7	4.6
C0255B12	4.0	5.0
C0255C1	3.6	4.7
C0255C3	4.8	5.5
C0255E6	3.7	4.4
C0255E10	4.8	>5.6
C0256B1	5.0	>5.6
C0256G11	4.9	5.5
C0256H4	3.6	4.8
C0257C5	3.8	4.6
C0260E11	4.7	5.4
C0260C6	4.6	5.3
C0262C4	4.8	5.3
C0262F11	5.0	5.5
C0263B7	4.1	4.6
C0263G12	4.9	5.6
C0261H2	4.5	5.3
C0264G5	4.9	5.6
C0264G7	4.1	4.8
C0266A11	4.0	4.9

10

20

30

【0203】

テンボトリオン、ジケトニトリル（イソキサフルトールの活性型）、およびメソトリオンに対する耐性もまた、HPLCに基づいたアッセイを用いて測定した。値は pI_{50} を表す。「>」は、値がこのアッセイの測定範囲外であることを意味する（例えば、酵素がその後を示す値よりもさらに感受性であった場合）。

40

【0204】

【表 8】

HPPD	pI ₅₀ テンボトリオン	pI ₅₀ ジケトニトリル	pI ₅₀ メソトリオン
	HPLC	HPLC	HPLC
PfHPPD	4.9	4.7	4.7
PfG336W	4.6	4.2	4.3
PfHPPDEvo37	4.1	3.6	n.d.
C023E6	4.3	3.5	n.d.
C024H11	4.8	4.0	n.d.
PfHPPDEvo33	5.2	3.6	n.d.
PfHPPDEvo36	5.2	4.2	n.d.
PfHPPDEvo40	5.0	3.2	n.d.
CO210d10	5.9	3.9	n.d.
CO212f3	4.8	3.8	n.d.
C644	5.5	4.5	5.1
C645	5.2	4.7	5.1
c0218A5	5.0	3.7	4.6
c0216C6	4.8	3.1	4.2
c0213H10	4.5	3.4	4.3
PfHPPDEvo41	4.9	3.4	n.d.
C0228G9	4.6	4.2	4.2
C0232D2	n.d.	n.d.	n.d.
C0234A4	5.0	n.d.	n.d.
C0235F6	5.0	n.d.	n.d.
C0235E2	4.9	n.d.	n.d.
C0236H7	5.1	n.d.	n.d.
C0236F8	4.9	n.d.	n.d.
C0240D2	4.8	n.d.	n.d.
C0240D12	4.9	n.d.	n.d.

【0205】

表 8 に示すように、幾つかの H P P D 変異体が、テンボトリオン、ジケトニトリル（イソキサフルトール）、およびメソトリオンそれぞれに対して耐性の改善を示した。

【0206】

選択した H P P D 変異体の、テンボトリオン、ジケトニトリル、およびメソトリオンに対する耐性もまた、H P P D 共役アッセイ（実施例 2 に記載される）を用いて測定した。値は p I ₅₀ を表す。

【0207】

【表9】

HPPD	pI ₅₀ テンボトリオン	pI ₅₀ ジケトニトリル	pI ₅₀ メソトリオン	K _m (μM)	配列 番号
	HGD	HGD	HGD		
PfHPPD	6.4	5.8	5.8	187	1
PfG336W	6.0	5.3	5.5	141	2
PfHPPDEvo33	6.2	4.6	5.5	581	6
PfHPPDEvo40	6.2	4.2	4.8	509	8
PfHPPDEvo41	5.6	4.2	4.3	336	16

10

【0208】

表9に示すように、試験したいずれのHPPD阻害剤に対しても、HPPD変異体は野生型HPPD酵素に比較して耐性であった。このように本発明には、有意に改善された耐性を幾つかのHPPD阻害剤に対して同時に示す、変異HPPD酵素が含まれる。

20

【0209】

表10に挙げるHPPD酵素については、国際公開第2012/028579号（その全体が、特に本明細書の表10に記載される化合物に関して参照により本明細書に取り込まれる）に記載される分類の、その他のHPPD阻害剤に対する耐性も測定した。耐性は、上記のHPPD共役アッセイ（HGD）を用いて *in vitro* にて推定した。値は pI₅₀ を表す。

【0210】

【表10】

	pI ₅₀ (HGD アッセイ)	
	国際公開第2012/028579号において規定される化合物番号4～253	国際公開第2012/028579号において規定される化合物番号4～278
PfG336W	6.2	6.6
PfHPPD	6.4	5.9
PfHPPDEvo40	5.5	6.1
PfHPPDEvo41	5.4	5.6

30

40

【0211】

このように、選択された変異体は広範囲のHPPD阻害除草剤に対する耐性を示した。

【0212】

実施例6：植物体における、HPPD阻害剤に対する耐性の分析

グリホサートに対する耐性を付与する遺伝子およびグルホシネートに対する耐性を付与する遺伝子と共に本発明のHPPD阻害剤耐性酵素を発現する大豆植物の、テンボトリオンに対する耐性を試験した。各スプレーの前に、DeVries Tracker Sprayerを校正した。テンボトリオンを試験するために用いた化学製剤は、LAUDIS（登録商標）SC製剤であった。スプレー試験は、184グラム／ヘクタール、34.

50

5 % T B Tを用いて行った。スプレー後1週間目に耐性を評価した。「+」の評価は、活発に成長する組織において完全に白化した植物に割り当てた。「++」の評価は、わずかに耐性がみられた植物、すなわち最も新しい植物組織はある程度緑であり、完全には白化していない植物に割り当てた。「+++」の評価は、スプレーによる効果が非常に少なかった植物、すなわちある程度の白化または非常にわずかな白化がみられた植物に割り当てた。これらの試験の結果を表11に示す。

【0213】

【表11】

HPPD	処理した植物の数	+	++ または +++	++ または +++ のパーセント
PfG336W	2248	811	160	7.12
PfHPPDEvo37	35	17	3	8.57
PfHPPDEvo33	151	50	54	35.76
PfHPPDEvo40	207	60	65	31.4
PfHPPDEvo41	852	412	279	32.75
PfHPPDEvo36	88	47	18	20.45

10

20

【0214】

PfG336WおよびPfHPPDEvo41の発現体（それぞれがグリホサートに対する耐性を付与する遺伝子およびグルホシネートに対する耐性を付与する遺伝子も発現する）を耕作地での試行によって評価した。植物には、v2～v3段階において1×グルホシネートをスプレーした。グルホシネートによる処理後5日目に、生存した植物に2×テンボトリオン、2×メソトリオン、または2×イソキサフルトールをスプレーし、7日後に植物毒性を評価した。PfHPPDEvo41を発現する18体のうち9体、およびPfG336Wを発現する18体のうち0体が、テンボトリオンを200 g ai/haにて発芽後に使用した際の20%の平均植物毒性よりも少ないか、または同等の植物毒性を示した。

30

【0215】

アルゼンチンの耕作地における試行では、10体のT2 PfHPPDEvo41のうち5体、および3体のPfGW336のうち1体が、イソキサフルトールを210 g ai/haにて発芽後に使用した際の18%の最大植物毒性よりも少ないか、または同等の植物毒性を示した。

【0216】

米国（ミネソタ州）で行った耕作地における試行では、7体のT2 PfHPPDEvo41のうち7体、および11体のPfGW336のうち1体が、テンボトリオンを200 g ai/haにて発芽後に使用した際の25%の最大植物毒性よりも少ないか、または同等の植物毒性を示した。

40

【0217】

実施例7：その他のHPPD酵素変異体の作製

HPPD活性がピンク／オレンジ色として視覚的に検出可能なアッセイを用いて、ATX22717株およびATX1974株を同定した。アッセイの感度を改善するため、キノン抑制剤を取り込ませた。キノン抑制剤としては、MBTHまたは3-メチル-2-ベンジソチアゾリノンヒドラジンを用いた。フェノール酸化酵素およびHPPDの両方は、中間体産物としてキノン化合物を産生するジオキシゲナーゼ酵素であり、これらのキノンは迅速かつ自発的に電子再構成を行って、さらに安定な下流産物、例えばメラニン（フェ

50

ノール酸化酵素の場合)またはホモゲンチジン酸(HPPDの場合)を形成し、不溶性となる。キノンと複合する場合、MBTH-キノン産物がピンク/オレンジ色となる。MBTH抑制剤の添加によって、アッセイの感度がおおよそ5倍に増大する。

【0218】

株はLB寒天中でおおよそ24時間増殖させた。細胞を遠心分離によってペレット化し、1/2量の20mM HEPES緩衝液 pH7.1に再懸濁した後、ビーズ破碎によって溶解した。50μlの株抽出物を、円錐底96ウェルブロック内の、150μlのMBTHアッセイ混合液に加えた。最終的なアッセイ混合物には、10mM MBTH、0または1mM ヒドロキシフェニルピルビン酸(HPP)、20mM HEPES緩衝液 pH7.1、および0、10μMまたは1mM テンボトリオン(TBT)が含まれた。スコア化の前に、96ウェルアッセイブロックを、床型振盪機内で、30℃、200rpmにておおよそ22時間振盪した。ATX22717株およびATX1974株はTBTに対する耐性を示した。

10

【0219】

ATX22717株は、米国ノースカロライナ州の土壌試料から分離した緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)株である。

【0220】

ATX1974株は、米国ノースカロライナ州の土壌試料から分離したシュードモナス・アガリシ株(*Pseudomonas agarici*)である。

【0221】

20

以下の工程を用いて、株からHPPD遺伝子を同定した。

- ・株からの全DNAの調製。全DNAにはゲノムDNAおよび染色体外DNAの両方が含まれる。染色体外DNAは、様々な大きさのプラスミド、ファージ染色体、および特性が明らかではないその他の染色体外分子のうちの幾つかまたは全部の混合物を含む。

- ・DNAの配列決定。次世代シーケンシング法によって全DNAの配列決定を行う。

- ・Newbler、phredPhrapm、およびCLCを含む様々なソフトウェアプログラムによるDNA配列の構築。

- ・DNAおよびタンパク質の相同性アルゴリズムによるHPPD遺伝子の同定。

【0222】

Axm i 305HはATX22717株から同定された。Axm i 305Hをコードするヌクレオチド配列は配列番号60に示され、アミノ酸配列は配列番号57に示される。Axm i 305Hは、米国特許出願公開第20070020624号の配列番号29696に対して99.7%同一である。

30

【0223】

Axm i 309HはATX1974株から同定された。Axm i 309Hをコードするヌクレオチド配列は配列番号61に示され、アミノ酸配列は配列番号58に示される。Axm i 309Hは、GENBANK(登録商標)受託番号YP_348648に対して99.7%同一である。

【0224】

コマモナス・テストステローニ(*Comamonas testosteroni*)株は、HPPD活性の産物としてのホモゲンチジン酸の誘導体であるピオメラニンを産生すると報告されていることから(Turick et al., 2005, Microbial Metabolite Field Deployment Report. WSRC-TR-2005-00455)、酵素的に好ましいHPPDの潜在的な源として選択した。

40

【0225】

BLAST公開データベースの検索により、細菌種コマモナス・テストステローニには二つの異なるHPPDが存在することが示された。一つは長さが362アミノ酸であり、もう一つは長さが373アミノ酸である。BLASTデータベースに見出される、コマモナス・テストステローニ株であるCNB-2、KF-1、およびS44の報告済のヌクレオチド配列に基づき、二つのHPPD遺伝子それぞれに対して設計したプライマーを用い

50

て、コマモナス・テストステローニゲノムDNA（ATCCRカタログ番号700441）をPCR増幅した。

【0226】

PCR産物をBspHIおよびXbaIによって消化し、NcoIおよびXbaIによって切断したpSE420内にクローン化した。

【0227】

BLASTサーチによれば、長さが373アミノ酸のHPPDの、ヌクレオチド配列および由来するアミノ酸配列は、報告されているコマモナス・テストステローニHPPDのいずれの配列とも一致しないが、コマモナス・テストステローニS44とは99%同一である。以後、この新規配列をAxmi428Hと称する。Axmi428Hをコードするヌクレオチド配列を配列番号62に示し、アミノ酸配列を配列番号59に示す。

【0228】

活性のあるHPPD酵素はヒドロキシフェニルピルビン酸をホモゲンチジン酸に変換することから、茶色の色素であるピオメラニンを生産する。この色素の生成は可視化することができる。Axmi428Hタンパク質を発現するDH5アルファ細胞を、LB培地で飽和状態に増殖させた後、10μlの飽和培養液を、0、0.5、1.0、および2.0mMのテンボトリオンを含む100μlのLB寒天プレート上にスポットした。細胞を37℃にておおよそ16時間さらに増殖させた後、写真撮影を行った。

【0229】

ホモゲンチジン酸1,2-ジオキシゲナーゼ（HGO）酵素によるホモゲンチジン酸の産生に関連する*in vitro*動態アッセイを用いて、Axmi428Hを動態的にも特徴付けた。HGOはホモゲンチジン酸をマレイルアセト酢酸に変換するが、これは321nmにおいてみられる強い吸収によってモニターされる。96ウェル分光光度計により、限定された濃度から飽和濃度まで変化させた基質の存在下で、産物のリアルタイムでの産生を継続的にモニターすることで、標準的なミカエリス・メンテン速度式を用いた酵素の K_m の決定が可能になる。様々な濃度の阻害剤テンボトリオンの存在下での K_m の変化をグラフにすることにより、 K_i の決定が可能になる。

【0230】

このアッセイのために、形質転換したDH5アルファ細胞を250rpm、37℃にて振盪しながら、培養液のOD600が0.6~0.7に達するまで増殖させることによってAxmi428H酵素を調製した。次に温度を30℃に低下させ、培養液をおおよそ20時間振盪し続けた。細胞培養液を遠心分離によってペレットにした後、1/20量の20mM HEPES、pH7.0、50mM NaCl緩衝液に再懸濁した。細胞にLYSONASE（商標）（Novagen）を加えて45分間室温で溶解させた後、-20℃にて少なくとも1時間凍結した。細胞抽出物をアッセイの直前に融解し、遠心分離によって清澄にした後、様々な濃度の基質および阻害剤、ならびに過剰のHGO酵素の存在下で活性を測定した。動態データの分析によって得られた動態定数を以下の表に示す。テンボトリオンに対するAxmi428Hの耐性は変異PfG336W遺伝子と同等であり、両方の耐性は未変性的大豆HPPDよりも高かった。

【0231】

【表12】

遺伝子	K_m HPP (μ M)	V_{max}	K_i TBT (μ M)
大豆 HPPD	32.5	79	0.04
W336	152	35	2.49
Axmi428H	52	22.6	1.37

【0232】

本明細書に記載する変異HPPD酵素の幾つかに存在する変異を、Axmi305H、Axmi309H、およびAxmi428Hを含むその他の未変性のHPPD酵素の対応する位置に導入することで、これら酵素の耐性の改善を試みた。

【0233】

異なるHPPDタンパク質間の配列同一性を表13に示す。アラインメントはAlignXを用いて行った。

【0234】

【表13】

	PfG336W	Axmi309H	Axmi428H	Axmi305H
PfG336W	100	94	56	53
Axmi309H	94	100	56	54
Axmi428H	56	56	100	54
Axmi305H	53	54	54	100

10

【0235】

ベクターpSE420内の遺伝子に部位特異的変異を誘発するため、QUIKCHANGE（登録商標）Lightning site-directed mutagenesisキットを用いた。このアプローチによって作製した変異体によってB121-DE3*細胞を形質転換させ、LB培地中で飽和状態まで増殖させた。次に一定分量を、様々な量のテンボトリオンを含むLB寒天プレート上にスポットした。この方法によれば、プレート上でおよそ24時間増殖させた後、活性のあるHPPD酵素は茶色の色素を生成する。このアッセイを用いることにより、作製したすべての変異体が、テンボトリオンによる阻害に対する抵抗性の高いHPPD活性を有することが示された。

20

【0236】

HPPD共役法を用いて、変異体のテンボトリオン、ジケトニトリル（イソキサフルトール）、およびメソトリオンに対する耐性もまた測定した。結果を表14に示す。「≫」は、測定の範囲外であるが、その後に示す数値よりもかなり大きな数値であることを意味する。

30

【0237】

【表 1 4】

	pI ₅₀ テンボトリオン	pI ₅₀ ジケトニトリル	pI ₅₀ メソトリオン	K _m (μM)
PfG336W	6.4	5.8	5.8	187
PfHPPDEvo40	6.2	4.2	4.8	509
PfHPPDEvo41	5.6	4.2	4.3	336
Axmi305H	6.7	6.5	6.7	116
Axmi305H-Evo40	5.8	5.5	5.3	721
Axmi305H-Evo41	6.8	5.0	5.2	816
Axmi309H	6.4	6.4	6.1	318
Axmi309H-Evo40	5.9	4.4	5.2	290
Axmi309H-Evo41	6.2	4.5	4.7	807
Axmi428H	7.2	7.0	6.7	47
Axmi428H-Evo40	6.1	5.2	5.5	1490
Axmi428H-Evo41	5.6	4.3	5	>>1000

【0238】

表14のデータは、本明細書で同定した変異または変異の組み合わせが、導入されたHPPDタンパク質の性質に関わらず、HPPD阻害剤に対する耐性の改善に効果的に関与することを示している。

【0239】

実施例8：植物発現カセット内へのHPPD遺伝子のクローニング

本明細書に記載するHPPD遺伝子それぞれにつき、翻訳領域(ORF)は完全長DNAの鋳型からPCRによって増幅されてよい。PCRを行う間、各ORFの末端にHindIII制限酵素部位が付加されてもよい。さらに、翻訳効率を増大させるため、遺伝子の開始コドン直上の5'側に、ヌクレオチド配列ACCを付加してもよい(Kozak(1987)Nucleic Acids Research 15:8125-8148; Joshi(1987)Nucleic Acids Research 15:6643-6653)。PCR産物は、PCRを行った間に変異が導入されていないことを確認するため、当該技術分野において公知の技術を用いてクローン化および配列決定を行ってよい。

【0240】

PCR産物を含むプラスミドはHindIIIによって消化されてよく、これによって未変化のORFを含む断片が分離され得る。この断片は、プラスミド、例えば米アクチンプロモーター(McElroy et al. (1991)Molec. Gen. Genet. 231:150-160)およびPinIターミネーター(An et al. (1989)The Plant Cell 1:115-122)を含む植物発現ベクターであるpAX200のHindIII部位内へクローン化されてよい。この中間体プラスミドからのプロモーター-遺伝子-ターミネーター断片は、プラスミドpSB11(日本たばこ産業株式会社)内へサブクローン化してよく、これによって最終的なpSB11ベースのプラスミドが形成される。これらのpSB11ベースのプラスミドは、典型的には、プロモーター-遺伝子-ターミネーターコンストラクトを含むDNA断片が、KpnIおよびPmeIのような制限酵素を用いた二重消化によって切り出され、エアロゾルビーム注入によって植物を形質転換するために用いられるように構築される。得られた

p S B 1 1 ベースのクローンの構造は、制限酵素による消化およびゲル電気泳動、ならびに様々なクローニングジャンクションにまたがった配列決定によって確認され得る。

【0241】

該プラスミドは、プラスミド p S B 1（日本たばこ産業株式会社）を有しているアグロバクテリウム・ツメファシエンス株である L B A 4 4 0 4 内へ、当該技術分野において公知である三親接合の手順を用いて導入した後、スペクチノマイシンを含む培地にまいてよい。p S B 1 1 ベースのプラスミドクローンはスペクチノマイシン抵抗性ではあるが、宿主範囲の狭いプラスミドであり、アグロバクテリウム内では複製できない。p S B 1 1 ベースのプラスミドを、相同組換えを通して宿主範囲の広いプラスミドである p S B 1 に組み込むと、スペクチノマイシン抵抗性のコロニーが出現する。p S B 1 と p S B 1 1 ベースのプラスミドとの同時組み込みによる産物は、サザンハイブリダイゼーションによって確認してよい。同時組み込みされたアグロバクテリウム株は、当該技術分野において公知の方法、例えば P u r e l n t r o 法（日本たばこ産業株式会社）によって、トウモロコシを形質転換させるために用いてよい。

【0242】

実施例 9：大豆の形質転換

大豆の形質転換は、当該技術分野において公知の方法、例えば記載されている方法で、基本的には P a z e t a l.（2006）, P l a n t c e l l R e p. 25: 206 に記載される方法によるアグロバクテリウム・ツメファシエンスを介した大豆半種子外植体の形質転換を用いる方法によって行われる。形質転換体は、選択マーカーとしてイソキサフルトールまたはテンボトリオンを用いて同定した。グリーンシュートの出現を観察し、除草剤であるイソキサフルトールまたはテンボトリオンに対する耐性の指標として記録した。耐性のトランスジェニックシュートは、イソキサフルトールまたはテンボトリオンによって処理していない野生型大豆シュートと同等の正常な緑色を示すが、同量のイソキサフルトールまたはテンボトリオンによって処理した野生型大豆シュートは完全に白化する。このことは、H P P D タンパク質が存在すると、イソキサフルトールまたはテンボトリオンのような H P P D 阻害除草剤に対して耐性となることを示している。

【0243】

耐性のグリーンシュートは、発根培地に移されるか、または移植される。根付いた小植物は、順応期間後に温室へ移される。導入遺伝子を含む植物には、次に H P P D 阻害除草剤、例えばテンボトリオンを 100 g A I / h a の比率においてスプレーする。使用後 10 日目に、除草剤の使用による徴候を評価し、同じ条件下で野生型植物に観察される徴候と比較する。

【0244】

実施例 10：綿 T O 植物の樹立および選択

綿の形質転換は、当該技術分野において公知の方法、特に好ましくは P C T 国際公開第 00 / 7 1 7 3 3 号に記載される方法を用いて行われる。再生した植物は温室に移される。順応期間後、十分に成長した植物に、H P P D 阻害除草剤、例えば硫酸アンモニウムおよび菜種油メチルエステルを加えたテンボトリオンを 100 g A I / h a にてスプレーする。スプレー後 7 日目に、除草剤を用いた処理による徴候を評価し、同じ条件下で同じ処理を施した野生型綿植物に観察される徴候と比較する。

【0245】

実施例 11：アグロバクテリウムを介した形質転換による、トウモロコシ植物細胞の形質転換

受粉後 8 ~ 12 目に穂を最適な状態で収穫する。穂から胚を分離するが、これらの胚を形質転換に用いるためには大きさ 0.8 ~ 1.5 mm であることが好ましい。胚盤側を上にして、胚を適切なインキュベーション培地にまき、暗所で 25 °C にて一晚インキュベートする。

【0246】

しかしながら本来、胚を一晚インキュベートする必要はない。T i プラスミドを介した

10

20

30

40

50

移入のため、胚を、本発明のヌクレオチド配列を有する適切なベクターを含むアグロバクテリウム株に約5～10分間接触させた後、共培養培地上にまいて、約3日間培養する（暗所で25℃）。共培養後、外植体を回復期間用の培地に約5日間移す（暗所で25℃）。使用する特定の選択方法の性質および特性に従い、外植体を選択培地中で最長8週間インキュベートする。選択期間後に得られたカルスを、成熟した体細胞胚の形成が観察されるまで胚成熟用の培地に移す。次に、得られた成熟体細胞胚を微光下に置き、当該技術分野において公知の再生過程を開始させる。得られたシュートを発根培地中で根付かせた後、得られた植物を苗床に移して、トランスジェニック植物として繁殖させる。

【 0 2 4 7 】

本明細書で言及したすべての刊行物および特許出願は、本発明に係る当業者の技術水準を示すものである。すべての刊行物および特許出願は、刊行物または特許出願それぞれが、具体的かつ個別に参照として取り込まれるよう指示された場合と同じ範囲によって、本明細書に参照として取り込まれる。

【 0 2 4 8 】

前述の発明は、明確な理解のための例証および実例を目的としてある程度詳細に記載しているが、添付の請求項の範囲内で特定の変更および改変が行われてよいことは明らかであろう。

【图 1 A】

黄光菌	MDLVYENHMGLENG	---FEF 16
エンバク	MPPPTAT -ATGAAAAAAVTEHAAR--	---FPRVVVPNRSPDEFVLSPH 50
エンバク	MPPPTAT -ATGAAAAAAVTEHAAR--	---FPRVVVPNRSPDEFVLSPH 50
トウモロコシ	MPPPTTAAAGAAAVAAASAAAGQAV	RLVGHHRHVFVPRPSPDEFHTLAFH 55
ストロベリイセイ、アベルミイシス	MIQTHTHTDITARQAADVF	
シロイヌナズナ	MGHQAVENKQVGHQVGHQVGHQVGHQV	GSFQFLGV -PSKVFPRSPDEFVPRFH 60
オオムギ	MPPPTTAAATGAAGAVTEHAPR--	---HMVPRPSPDEFHTLSPH 55
ニンジン	MKGK -QGEAE ILNSGNSHTSPATFLGV	-FNNFVPRPSPDEFVPRFH 60
コトハギ葉枯病菌	APAPADITVSGNRTGTPLYSDSGYVAP	---AALVGVGVVGRGTH 64
コクシノオビダス、イミタシ	MAPAADPTLQAPGSDLN	---QYRGTH 66
黄光菌	IFEASPPTGPTLEIFIMGTFVATHRSKN	---VHLTQENLIL 59
エンバク	VELNLCADAAASAGRF FALGAPLAARSDLTGNSARASILLSSGALFAL 95	
エンバク	VELNLCADAAASAGRF FALGAPLAARSDLTGNSARASILLSSGALFAL 95	
トウモロコシ	VELNLCADAAASAGRF FALGAPLAARSDLTGNSARASILLSSGALFAL 95	
ストロベリイセイ、アベルミイシス	VFVAGVATQAA -TAFQGNVTVLGVGEMTE	---VLTITNGSAPFL 76
シロイヌナズナ	IFEFGDGVTVARFESFQGLGHRSAKSDLTGNSHVASTLLTGSLDFRL 99	
オオムギ	VELNLCADAAASAGRF FALGAPLAARSDLTGNSARASILLSSGALFAL 95	
ニンジン	IFEFGDGVTVARFESFQGLGHRSAKSDLTGNSHVASTLLTGSLDFRL 99	
コトハギ葉枯病菌	AEHNGDGVTVARFESFQGLGHRSAKSDLTGNSHVASTLLTGSLDFRL 99	
コクシノオビダス、イミタシ	IVHNYGVNAQQAITYTVTMGFEFVATVGLTGSKAVASVPHIGHIT 100	
		1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
黄光菌	NIHPNS	---IASYFAAGRGPSVGMARVKED 88
エンバク	TAPIYPPQGA -AT -AATASIPFSADAAATFAAHLGVGVGVVAFV 143	
エンバク	TAPIYPPQGA -AT -AATASIPFSADAAATFAAHLGVGVGVVAFV 143	
トウモロコシ	TAPIYH	---GADAAATALPSTGAAARFPAADGLGVALVAFV 144
ストロベリイセイ、アベルミイシス	TCVTKFATPWTG -HFLA	---DVAHGAGVGLVLAIDEVPA 100
シロイヌナズナ	TAPIYPSGLAGEIKPTTASIPFSDHGRSGFSGSLGVAFVAFV 144	
オオムギ	TAPIYH	---GCDAAATIPFSADAAARFSGADGLGVALVAFV 143
ニンジン	TAPISPTTT	---LIFIPFGAGFVAFVAFVAFVAFVAFV 144
コトハギ葉枯病菌	TSVPFGSAGPT	---LKAPALADGLVGLHDKRGDGVGVAFVVDV 141
コクシノオビダス、イミタシ	TPSLRVSQAGD -RFFA	---DEALLKILHAHLRGDGVGVAFVVDV 120
		* * * * *
黄光菌	QKAVNRALELAGAP	---THITGPMHNLNPAIGIGAPVILDFPFG 134
エンバク	AEAFRVSVAGGAPAFAPADGLG	---HGFGLAEVLGVGVVLFVSPYPT 190
エンバク	AEAFRVSVAGGAPAFAPADGLG	---HGFGLAEVLGVGVVLFVSPYPT 191
トウモロコシ	AEAFRVSVAGGAPAFAPADGLG	---HGFGLAEVLGVGVVLFVSPYPT 190
ストロベリイセイ、アベルミイシス	RAAHATVIEHGRASVPEYELKDEHGTVLLAAIATGTHLIVERTV 159	
シロイヌナズナ	EAASFVANGAIPGSPFLV	---SGVFAEVLGVGVVLFVSPH 187
オオムギ	AEAFACGRBGRAPAPAVDGLG	---SGVFAEVLGVGVVLFVSPH 187
ニンジン	EAASFVANGAIPGSPFLV	---DQNLAEVLGVGVVLFVSGFEE 191
コトハギ葉枯病菌	LEVESAUVANAGVSVSSPDSGCEGVDI	SAIAITGTHITGTHITGTHIT 170
コクシノオビダス、イミタシ	LGVSVAARNGAEVSDVREDEGDIKMAITGTHITGTHITGTHIT 170	

【 ㊦ 1 B 】

黄光魚	S-D-GTIDTDFPYLKE--VEHNPVAGVIGVTDHLLTNVYGRPFMAIFY 179
エンバク	D-LPFLFGFGRVSV--SPGADVGLTFRDPIVGV--VPEHAPVIVYD 231
エンバク	D-LPFLFGFGRVSV--SPGADVGLTFRDPIVGV--VPEHAPVIVYD 232
トウモロコシ	AG-EPFPLFGFGRVAV--SPGADVGLTFRDPIVGV--VPELAPAAVY 233
シロストロマセス・アペルミディス	CG--PFLGVGAGVGV--TPQADLDCVCELPGRHPRHPRFT 234
シロストロマセス	TEGESEDFGFGVERDA--SEEP-LGVGRILDRHIVGV--VPELGALTY 236
オオナギ	D-GVTFVFGFGVGT--NPDAVDGLTFRDPIVGV--VPELAPAAVY 236
ニンジン	--GLTFLFGFAEVGE--ACFDFGLDGRILDRHIVGV--VTELGSGVY 234
コナガサキ樹皮菌	CG--PFLGVGAGVGV--TPQADLDCVCELPGRHPRHPRFT 234
コナガサキ樹皮菌・イヌイタシス	CG--GMEYFEMENADATSEFLVYLERIDHCVGNQDMEHRCVYDT 217
	: : : : * * * * : : : :
黄光魚	ELKLVFPRRPF--DISEGTLTGKMAKAPGAPLPIHLE--EKGGA 244
エンバク	KQGLGFHFAETAFDQVOTEGSLGVGLANNVGLVLPVPHVGTGR 281
エンバク	KQGLGFHFAETAFDQVOTEGSLGVGLANNVGLVLPVPHVGTGR 282
トウモロコシ	AGTGTHFAETAFDQVOTEGSLGVGLANNVGLVLPVPHVGTGR 283
シロストロマセス・アペルミディス	HYVYGVTHREFFVGDIATSEALMKVAVAGTLVYEFVTFHAFK-F 286
シロストロマセス	AGTGTHFAETAFDQVOTEGSLGVGLANNVGLVLPVPHVGTGR 286
オオナギ	AGTGTHFAETAFDQVOTEGSLGVGLANNVGLVLPVPHVGTGR 286
ニンジン	KQGLGFHFAETAFDQVOTEGSLGVGLANNVGLVLPVPHVGTGR 284
コナガサキ樹皮菌	ERCLGTHFAFVDDREITSEALSKVGVNSGPGVGVNHSAGDAGK 287
コナガサキ樹皮菌・イヌイタシス	ERLGLTHFAFVDDREITSEALSKVGVNSGPGVGVNHSAGDAGK 286
	* * : * * * * : : : : * * * * :
黄光魚	QGIETFLVYFGHGGVGVQIALAGSDVLTLEPMARPHYGGGFEMAPPGAK 270
エンバク	QGIETFLVYFGHGGVGVQIALAGSDVLTLEPMARPHYGGGFEMAPPGAK 271
エンバク	QGIETFLVYFGHGGVGVQIALAGSDVLTLEPMARPHYGGGFEMAPPGAK 332
トウモロコシ	QGIETFLDHGGHGGVGVQIALAGSDVLTLEPMARPHYGGGFEMAPPT 323
シロストロマセス・アペルミディス	SGIETLEFYGGAGVGVQIALAGSDVLTLEPMARPHYGGGFEMAPPT 326
シロストロマセス	SGIETFLVYFGHGGVGVQIALAGSDVLTLEPMARPHYGGGFEMAPPT 327
オオナギ	SGIETFLVYFGHGGVGVQIALAGSDVLTLEPMARPHYGGGFEMAPPT 326
ニンジン	SGIETFLVYFGHGGVGVQIALAGSDVLTLEPMARPHYGGGFEMAPPT 326
コナガサキ樹皮菌	SGIETFLVYFGHGGVGVQIALAGSDVLTLEPMARPHYGGGFEMAPPT 326
コナガサキ樹皮菌・イヌイタシス	SGIETFLVYFGHGGVGVQIALAGSDVLTLEPMARPHYGGGFEMAPPT 326
	* * * * : * * * * : : : : : : * * * * :
黄光魚	YEHMLGGHLPDRG--SEPTVQAGRLGLAGGVGVNDRMLLQITFT 316
エンバク	YGVGVRRVLAGVLV--EQATKEQCGQLGVLD--RDQGVQLQITFTFP 376
エンバク	YGVGVRRVLAGVLV--EQATKEQCGQLGVLD--RDQGVQLQITFTFP 376
トウモロコシ	YGVGVRRVLAGVLV--EQATKEQCGQLGVLD--RDQGVQLQITFTFP 377
シロストロマセス・アペルミディス	YVTLTGHEGVGT--RVVDTLEKLEKGLAD--RDQGVQLQITFTFP 339
シロストロマセス	YVTLTGHEGVGT--RVVDTLEKLEKGLAD--RDQGVQLQITFTFP 339
オオナギ	YGVGVRRVLAGVLV--EQATKEQCGQLGVLD--RDQGVQLQITFTFP 376
ニンジン	YVTLTGHEGVGT--RVVDTLEKLEKGLAD--RDQGVQLQITFTFP 378
コナガサキ樹皮菌	YEHNRLRLFAAGHLEKLEQITQRLNLGLD--FDQGVQLQITFTFP 378
コナガサキ樹皮菌・イヌイタシス	YEHNRLRLFAAGHLEKLEQITQRLNLGLD--FDQGVQLQITFTFP 357
	* * : : : * * * * : : * * * * :

10

黄光菌	MG-----PVFEEIQRK-----	GGDGGCGEGNFALFEAIEDRG	349
エンバク	GRDPTFLFLEHQRICHERDEVEQVGKGGCGGFGHNFSELFEIEDE	425	
エンバク	GRDPTFLFLEHQRICHERDEVEQVGKGGCGGFGHNFSELFEIEDE	426	
トウモロコシ	GRDPTFLFLEHQRICHERDEVEQVGKGGCGGFGHNFSELFEIEDE	427	
シロイヌナズナ	GRDPTFLFLEHQRICHERDEVEQVGKGGCGGFGHNFSELFEIEDE	435	
オオムギ	GRDPTFLFLEHQRICHERDEVEQVGKGGCGGFGHNFSELFEIEDE	420	
ニンジン	MDRPTFLFLEIQHN-----	HFDFGAGNFGALFEAIEARG	413
コムギ芽枯病菌	MDRPTFLFLEIQHN-----	HFDFGAGNFGALFEAIEARG	392
コウジシイタゲス・イミタシ	-----*--*--*--*--	-----	
黄光菌	VRRGSLTAD-----	358	
エンバク	KSLEVKQGVVAQKS-----	439	
エンバク	KSLEVKQGVVAQKS-----	440	
トウモロコシ	KSLEAKQAQAQAQAQGS	444	
シロイヌナズナ	EKKGHL-----	380	
シロイヌナズナ	KSLEAKQLQGV-----	445	
オオムギ	KSLEAKQAQAQAQGS-----	434	
オオムギ	KLEAQKQIGTGAAL-----	419	
コムギ芽枯病菌	DLRGHL-----	412	
コムギシイタゲス・イミタシ	ALRGTL-----	399	

0006557142000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A O 1 H 5/00 (2018.01) A O 1 H 5/00 A

(31)優先権主張番号 61/790,404

(32)優先日 平成25年3月15日(2013.3.15)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(74)代理人 100091982

弁理士 永井 浩之

(74)代理人 100091487

弁理士 中村 行孝

(74)代理人 100082991

弁理士 佐藤 泰和

(74)代理人 100105153

弁理士 朝倉 悟

(74)代理人 100126099

弁理士 反町 洋

(74)代理人 100188651

弁理士 遠藤 広介

(72)発明者 ファビアン、ポレ

ドイツ連邦共和国フランクフルト、アム、マイン、ドゥナントリング、89

(72)発明者 フォルカー、ハインリッヒス

ドイツ連邦共和国バーデマルク、ファルンベーク、10

(72)発明者 グードルン、ランゲ

ドイツ連邦共和国ケルクハイム、アム、バルデック、51

(72)発明者 ベルント、ラバー

ドイツ連邦共和国イトシュタイン、グラーフフォンシュタウフェンベルクシュトラッセ、12

(72)発明者 シェリル、ピーターズ

アメリカ合衆国ノースカロライナ州、ローリー、バリー、エステーツ、ドライブ、6308

(72)発明者 ローラ、スハウテン

アメリカ合衆国ノースカロライナ州、ピッツボロ、ホーリー、リッジ、ロード、71

審査官 福澤 洋光

(56)参考文献 欧州特許出願公開第02453012 (EP, A1)

特表2001-522608 (JP, A)

特表2001-503625 (JP, A)

国際公開第2009/144079 (WO, A1)

特表2000-517166 (JP, A)

European Journal of Biochemistry, 1992年, Volume 205, Issue 2, p.459-466

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 1/00-15/90

CA/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

PubMed