



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년07월03일

(11) 등록번호 10-1995698

(24) 등록일자 2019년06월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/82 (2006.01) A01H 5/00 (2018.01)

C12N 15/63 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-7000586

(22) 출원일자(국제) 2011년06월07일

심사청구일자 2016년06월07일

(85) 번역문제출일자 2013년01월09일

(65) 공개번호 10-2013-0083433

(43) 공개일자 2013년07월22일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2011/002895

(87) 국제공개번호 WO 2011/154159

국제공개일자 2011년12월15일

(30) 우선권주장

10005941.9 2010년06월09일

유럽특허청(EPO)(EP)

61/355,849 2010년06월17일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

WO2009114321 A2

JP2009511085 A

(73) 특허권자

바이엘 크롭사이언스 앤.브이.

벨기에 디에켐 1831 제이.이. 모마에르트슬란 14

(72) 발명자

달루인 카틀린

벨기에 비-9030 마리아케르케 후이랜드 48

(74) 대리인

특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 11 항

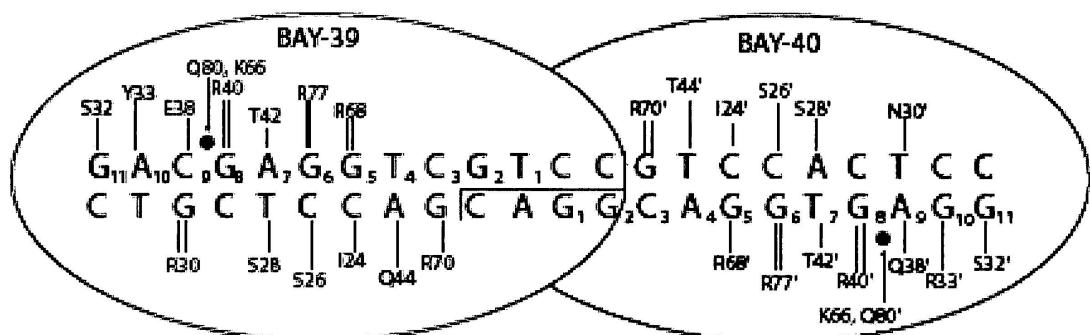
심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 식물 게놈 공학에서 통상적으로 사용되는 뉴클레오티드 서열에서 식물 게놈을 변경하는 방법 및 수단

(57) 요 약

본 발명은 키메라 유전자를 포함하는 형질전환 식물의 식물 게놈을 표적화된 방식으로 변경하는 방법 및 수단을 제공하고, 키메라 유전자는 식물 분자 생물학에서 통상적으로 사용되는 DNA 요소를 갖는다. 또한, 본 발명은 식물 분자 생물학에서 통상적으로 사용되는 요소를 절단하기 위해 재고안된 메가뉴클레아제를 제공한다.

대 표 도



명세서

청구범위

청구항 1

- (a) 미리 정해진 부위에 이중 가닥 DNA 단절을 유도하는 단계;
- (b) 식물 세포에 외래 DNA 분자를 도입하는 단계; 및
- (c) 외래 DNA가 미리 정해진 부위에 도입된 식물 세포를 선택하는 단계

를 포함하는, 식물 세포의 계놈에서 미리 정해진 부위에 외래 DNA 분자를 도입하는 방법으로서, 상기 미리 정해진 부위가 스트렙토마이세스 히그로스코피쿠스(*Streptomyces hygroscopicus*)에 의해 암호화되는 포스피노트리신 아세틸트랜스페라제를 암호화하는 DNA 영역(바(bar) 암호화 영역) 내에 포함되고, 상기 이중 가닥 DNA 단절이 동시에 미리 정해진 부위를 인식하고 이중 가닥 단절을 유도하는 단일 쇄 메가뉴클레아제 또는 한 쌍의 메가뉴클레아제의 도입에 의해 유도되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

바 암호화 영역이 서열번호 3의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 방법.

청구항 3

- (a) 미리 정해진 부위에 이중 가닥 DNA 단절을 유도하는 단계;
- (b) 식물 세포에 외래 DNA 분자를 도입하는 단계; 및
- (c) 외래 DNA가 미리 정해진 부위에 도입된 식물 세포를 선택하는 단계

를 포함하는, 식물 세포의 계놈에서 미리 정해진 부위에 외래 DNA 분자를 도입하는 방법으로서, 상기 미리 정해진 부위가 서열번호 1 또는 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 상기 이중 가닥 DNA 단절이 동시에 미리 정해진 부위를 인식하고 이중 가닥 단절을 유도하는 단일 쇄 메가뉴클레아제 또는 한 쌍의 메가뉴클레아제의 도입에 의해 유도되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

청구항 1 내지 청구항 3 중 어느 한 항에 있어서,

단일 쇄 메가뉴클레아제 또는 한 쌍의 메가뉴클레아제가 서열번호 16으로 나타내는 아미노산 서열을 갖는 엔도뉴클레아제 I-CreI로부터 유래되고, 하기 아미노산이 메가뉴클레아제 단위체 1에 존재하고:

- (a) 위치 32에서 S;
- (b) 위치 33에서 Y;
- (c) 위치 38에서 E;
- (d) 위치 40에서 R;
- (e) 위치 66에서 K;
- (f) 위치 80에서 Q;
- (g) 위치 42에서 T;
- (h) 위치 77에서 R;
- (i) 위치 68에서 R;
- (j) 위치 70에서 R;

(k) 위치 44에서 Q;

(l) 위치 24에서 I;

(m) 위치 26에서 S;

(n) 위치 28에서 S;

(o) 위치 30에서 R;

하기 아미노산이 메가뉴클레아제 단위체 2에 존재하고:

(p) 위치 70에서 R;

(q) 위치 44에서 T;

(r) 위치 24에서 I;

(s) 위치 26에서 S;

(t) 위치 28에서 S;

(u) 위치 30에서 N;

(v) 위치 32에서 S;

(w) 위치 33에서 R;

(x) 위치 38에서 Q;

(y) 위치 80에서 Q;

(z) 위치 40에서 R;

(aa) 위치 66에서 K;

(bb) 위치 42에서 T;

(cc) 위치 77에서 R;

(dd) 위치 68에서 R,

상기 (a) 내지 (dd) 의 위치는 서열번호 16 을 기준으로 하는, 방법.

청구항 5

청구항 1 내지 청구항 3 중 어느 한 항에 있어서,

한 쌍의 메가뉴클레아제가 서열번호 5 및 서열번호 6의 아미노산 서열을 각각 포함하거나 단일 쇄 메가뉴클레아제가 서열번호 18의 위치 1 내지 167 및 위치 206 내지 362의 아미노산 서열을 포함하는 방법.

청구항 6

청구항 1 내지 청구항 3 중 어느 한 항에 있어서,

외래 DNA가 관심있는, 식물에서 발현가능한 유전자를 포함하는 방법.

청구항 7

청구항 6에 있어서,

관심있는, 식물에서 발현가능한 유전자가 제초제 내성 유전자, 곤충 저항성 유전자, 질병 저항성 유전자, 무생물 스트레스 저항성 유전자, 오일 생합성 또는 탄수화물 생합성에 관련된 효소를 암호화하는 유전자, 섬유질 강도 또는 섬유질 길이에 관련된 효소를 암호화하는 유전자, 및 2차 대사산물의 생합성에 관련된 효소를 암호화하는 유전자로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 8

청구항 1 내지 청구항 3 중 어느 한 항에 있어서,
식물 세포가 추가로 식물로 재생되는 방법.

청구항 9

청구항 1 내지 청구항 3 중 어느 한 항에 따른 방법에 의해 수득된, 외래 DNA가 미리 정해진 부위에 도입된 식물 세포.

청구항 10

청구항 9에 따른 식물 세포로 이루어진 식물을 또다른 식물과 함께 또는 그 자체로 교배시키는 단계를 포함하는, 바 암호화 영역에 통합된 외래 DNA를 포함하는 식물을 제조하는 방법.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 식물에서 종자를 수확하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 농업 경제학 분야에 관한 것이다. 보다 구체적으로 본 발명은 형질전환 식물의 계놈에서 정확히 국한된 뉴클레오티드 서열에서 표적화된 변경, 예컨대 삽입, 결절 또는 치환을 도입하기 위한 방법 및 수단을 제공하고, 여기서 뉴클레오티드 서열은 식물의 유전자 이식(transgenesis)에서 자주 사용되는 요소 또는 DNA 절편, 예를 들어 통상적으로 사용되는 선택가능한 표지 유전자 내에 포함된다. 변경은 제1 단계에서 인식 부위를 인식하고 그것을 단절시키도록 재고안된(re-designed), 자연적으로 존재하는 메가뉴클레아제(meganuclease)로부터 유래된 메가뉴클레아제를 사용하여 인식 뉴클레오티드 서열에 이중 가닥 단절을 도입하여 일어난다.

배경기술

[0002] 식물 계놈에 표적화된 변경을 도입, 예컨대 식물에서 외래 DNA의 통합 위치에 대한 제어의 필요성은 점점 더 중요해져 이러한 필요성을 충족시키기 위한 노력으로 몇가지 방법이 개발되었다(리뷰를 위해 문헌[Kumar and Fladung, 2001, Trends in Plant Science, 6, pp155-159] 참조). 이를 방법은 주로 표적화된 위치에 이중 가닥 DNA 단절의 초기 도입을 필요로 한다.

[0003] 래어 커팅(rare-cutting) 엔도뉴클레아제, 예를 들어 I-SceI를 통한 이중 가닥 DNA 단절의 도입을 통한 표적 유전자좌의 활성화 및/또는 공여자 DNA의 복구는 상동 재조합의 빈도를 몇 자릿수 만큼 증가시키는 것으로 나타났다(Puchta et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 93, pp5055-5060; Chilton and Que, Plant Physiol., 2003; D'Halluin et al. 2008 Plant Biotechnol. J. 6, 93-102). 국제특허출원공개 제W096/14408은 효소 I-SceI를 암호화하는 분리된 DNA를 기재한다. 이 DNA 서열은 클로닝 및 발현 벡터, 형질전환된 세포주 및 형질전환 동물에 흔입될 수 있다. 벡터는 유전자 지도 작성 및 유전자의 부위 지시된(site-directed) 삽입에 유용하다.

[0004] 국제특허출원공개 제W000/46386호는 I-SceI 도입된 이중 가닥 단절을 통해 세포 내의 유전자 또는 다른 염색체 DNA를 변경하고, 복구하고, 약화시키고 불활성화시키는 방법을 기재한다. 또한 필요로 하는 개체에서 유전적 질병을 치료 또는 예방하는 방법을 개시한다. 추가로 키메라 제한 엔도뉴클레아제가 개시된다.

- [0005] 또한, 효소의 기질 또는 서열 특이성을 변경시키기 위해 래어 클리빙(rare cleaving) 엔도뉴클레아제를 고안하여 임의의 자연의 래어 클리빙 엔도뉴클레아제의 인식 부위의 존재에 상관없이 관심있는 유전자좌에 이중 가닥 단절을 도입할 수 있도록 하는 방법이 기재되었다. 간략히, 특이적인 뉴클레오티드 서열을 인식하도록 고안된 징크 팅거(zinc-finger) 도메인과 자연적인 제한 효소, 예를 들어 FokI으로부터 온 비특이적인 DNA 절단 도메인 사이에 하이브리드를 사용하여 키메라 제한 효소가 제조될 수 있다. 그러한 방법은 예를 들어 국제특허출원공개 제W003/080809호, 제W094/18313호 또는 제W095/09233호 및 문헌[Isalan et al., 2001, *Nature Biotechnology* 19, 656- 660; Liu et al. 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 5525-5530]에 기재되었다. 변이의 라이브리로부터 선택에 의해 주문 제작한 메가뉴클레아제를 생산하는 또 다른 방법이 국제특허출원공개 제W02004/067736호에 기재되었다. 변경된 서열 특이성 및 DNA 결합 친화도를 갖는 주문 제작한 메가뉴클레아제 또는 재고안된 메가뉴클레아제가 또한 국제특허출원공개 제W02007/047859호에 기재된 합리적인 고안을 통해 수득될 수 있다.
- [0006] 국제특허출원공개 제W02007/049095호는 2개의 별개의 하위도메인에 돌연변이를 갖고 엔도뉴클레아제 변이가 각각의 하위도메인에 의해 결합된 뉴클레오티드를 포함하는 키메라 DNA 표적 서열을 절단할 수 있도록 각각이 변경된 DNA 표적 절반 부위의 별개의 부분에 결합하는 "LADGLIDADG" 호밍(homing) 엔도뉴클레아제 변이를 기재한다.
- [0007] 국제특허출원공개 제W02007/049156호 및 제W02007/093836호는 신규한 절단 특이성을 갖는 I-CreI 호밍 엔도뉴클레아제 변이 및 그 용도를 기재한다.
- [0008] 국제특허출원공개 제W02007/047859호는 변경된 서열 특이성 및 DNA 결합 친화도를 갖는 합리적으로 고안된 메가뉴클레아제를 기재한다.
- [0009] 국제특허출원공개 제W02006/105946호는 식물 세포 및 식물에서 상동 재조합을 통해 관심있는 DNA 서열을 표적 DNA 서열과 정확하게 교환하는 방법을 기재하는데, 이에 따라 유전자 교체 이벤트(event)의 일시적인 선택을 위한 상동 재조합 기 동안 사용되는 선택가능한 또는 스크리닝 가능한 표지는 이후에 풋 프린트(foot-print)를 남기지 않고 제거 단계 동안 시험관내 배양에 의존하지 않고 래어 클리빙 엔도뉴클레아제를 유도하는 이중 가닥 단절의 소포자 특이적인 발현에 의해 선택된 DNA의 제거를 위해 상기 문헌에 기재된 방법을 사용하여 제거될 수 있다.
- [0010] 미국가출원 제60/828,042호 및 유럽특허출원 제06020370.0호 및 국제특허출원공개 제W02008/037436호는 국제특허출원공개 제W02006/105946호(여기서 래어 클리빙 엔도뉴클레아제를 유도하는 이중 가닥 단절에 의해 유도되는 선택된 DNA 절편의 제거 단계는 생식세포 계열 특이적인 프로모터의 제어 하에 있다)의 방법 및 수단의 변이를 기재한다. 상기 방법의 다른 구현예는 복구 DNA의 한 말단에서 비상동 말단결합(non-homologous endjoining) 및 다른 말단에서의 상동 재조합에 의존한다.
- [0011] 문헌[Gao et al. 2009, *The Plant Journal*, pp 1-11]은 재고안된 엔도뉴클레아제를 사용하여 옥수수에서 유전적으로 표적화된(heritable targeted) 돌연변이를 기재한다.
- [0012] 재고안된 메가뉴클레아제가 자연적으로 존재하는 엔도뉴클레아제로부터 유래하기 때문에 이용가능한 잠재적인 인식 부위는 전적으로 랜덤한 것이 아니라 재고안된 메가뉴클레아제가 기초가 되는, 자연적으로 발생하는 엔도뉴클레아제에 의해 본래 인식되는 뉴클레오티드 서열과 어느 정도 유사한 것으로 나타난다. 상기 문헌[Gao et al, 2009]에 기술된 바와 같이 I-CreI의 DNA 결합 특성을 변경시키기 위한 구조를 기초로 한 단백질 고안 방법은 I-CreI-DNA 공결정 구조의 시각적 정밀 검사를 기초로 하여 그 인식 부위의 특정 위치에서 I-CreI 엔지 선호도를 변화시키는 다수의 아미노산 치환을 예측하게 한다. 개별 아미노산 치환은 실험적으로 평가되고 엔지 선호도에 원하는 변화를 부여하는 것들이 "흔합되고 매칭되어" 매우 다른 DNA 부위를 인식하는 I-CreI 유도체를 생성시킬 수 있는 돌연변이 데이터베이스에 첨가되었다. 이론상으로 현재의 돌연변이 데이터베이스를 사용하여 이용가능한 조합적 다양성은 랜덤 DNA 서열에서 대략 1000bp 마다 조작된 엔도뉴클레아제를 표적화하기에 충분하다.
- [0013] 따라서 여전히 형질전환 유전자(transgene)의 통상적으로 사용되는 부분으로서 형질전환 식물로 이전에 도입된 DNA 요소 또는 영역에서 인식 부위를 인식하고 충분한 효율로 그 영역 내에 이중 가닥 DNA 단절을 유도하여 예를 들어 이중 가닥 단절 부위에서 상동 재조합 또는 비상동 말단결합에 의해 외래 DNA의 삽입, 결실 또는 치환에 필요한 이벤트를 개시할 수 있는 기능적으로 재고안된 메가뉴클레아제에 대한 필요성이 남아있다. 그러한 한 쌍의 인식 부위 및 재고안된 메가뉴클레아제의 확인은 래어 클리빙 엔도뉴클레아제, 예를 들어 I-SceI(식물

세포에서 자연적으로 존재하지는 않음)을 위해 역사적으로 도입된 인식 부위의 존재에 의존할 필요 없이 이전에 도입된 형질전환 유전자의 위치에 유도된 이중 가닥 DNA 단절의 부근에서 DNA를 삽입, 결실 또는 치환하여 표적화된 방식으로 식물 계놈을 변경시키기 위해 이용가능한 수단을 증진시킨다.

[0014] 이들 및 다른 문제는 청구항 뿐만 아니라 본 발명의 여러 가지 상세한 구현예에 이후 기재된 바와 같이 해결된다.

발명의 내용

[0015] 본 발명의 한 구현예에서

[0016] (a) 미리 정해진 부위에 이중 가닥 DNA 단절을 유도하는 단계;

[0017] (b) 식물 세포에 외래 DNA 분자를 도입하는 단계;

[0018] (c) 외래 DNA가 미리 정해진 부위에 도입된 식물 세포를 선택하는 단계; 및

[0019] (d) 임의적으로 식물 세포를 식물로 재생시키는 단계

[0020] 를 포함하는, 형질전환 식물의 계놈에서 미리 정해진 부위에 외래 DNA 분자를 도입하는 방법을 제공하고 상기 미리 정해진 부위는 자연적으로 존재하는 메가뉴클레아제에 대한 인식 부위와 상이한 뉴클레오티드 서열이 되 형질전환 식물에 형질전환 유전자의 일부로 통상적으로 도입되는 뉴클레오티드 서열이고, 상기 이중 가닥 DNA 단절은 동시에 미리 정해진 부위를 인식하고 이중 가닥 단절을 유도하는 자연적으로 존재하지 않는 단일 쇄 메가뉴클레아제 또는 한 쌍의 자연적으로 존재하지 않는 메가뉴클레아제의 도입에 의해 유도되는 것을 특징으로 한다.

[0021] 본 발명의 또 다른 구현예에서

[0022] (a) 미리 정해진 부위에 이중 가닥 DNA 단절을 유도하는 단계;

[0023] (b) 식물 세포에 외래 DNA 분자를 도입하는 단계;

[0024] (c) 외래 DNA가 미리 정해진 부위에 도입된 식물 세포를 선택하는 단계; 및

[0025] (d) 임의적으로 식물 세포를 식물로 재생시키는 단계

[0026] 를 포함하는, 식물 세포의 계놈에서 미리 정해진 부위에 외래 DNA 분자를 도입하는 방법을 제공하고 상기 미리 정해진 부위는 서열번호 3의 뉴클레오티드 서열을 가질 수 있는, 에스.히그로코피쿠스로부터(*S. hygrophilus*)의 포스피노트리신 아세틸 트랜스퍼라제 암호화 영역(바(bar) 암호화 영역) 내에 포함되고, 상기 이중 가닥 DNA 단절은 동시에 미리 정해진 부위를 인식하고 이중 가닥 단절을 유도하는 단일 쇄 메가뉴클레아제 또는 한 쌍의 메가뉴클레아제의 도입에 의해 유도되는 것을 특징으로 한다. 미리 정해진 부위는 서열번호 1 또는 서열 번호 2의 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다.

[0027] 본 발명의 또 다른 구현예에서

[0028] (a) 미리 정해진 부위에 이중 가닥 DNA 단절을 유도하는 단계;

[0029] (b) 식물 세포에 외래 DNA 분자를 도입하는 단계;

[0030] (c) 외래 DNA가 미리 정해진 부위에 도입된 식물 세포를 선택하는 단계; 및

[0031] (d) 임의적으로 식물 세포를 식물로 재생시키는 단계

[0032] 를 포함하는, 식물 세포의 계놈에서 미리 정해진 부위에 외래 DNA 분자를 도입하는 방법을 제공하고 상기 미리 정해진 부위는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 상기 이중 가닥 DNA 단절은 동시에 미리 정해진 부위를 인식하고 이중 가닥 단절을 유도하는 단일 쇄 메가뉴클레아제 또는 한 쌍의 메가뉴클레아제의 도입에 의해 유도되는 것을 특징으로 한다. 예를 들어 메가뉴클레아제 또는 한 쌍의 메가뉴클레아제는 I-CreI(서열번호 16으로 나타냄)로부터 유래되고 하기 아미노산이 서브유니트 중 하나에 존재한다: 위치 32에서 S; 위치 33에서 Y; 위치 38에서 E; 위치 40에서 R; 위치 66에서 K; 위치 80에서 Q; 위치 42에서 T; 위치 77에서 R; 위치 68에서 R; 위치 70에서 R; 위치 44에서 Q; 위치 24에서 I; 위치 26에서 S; 위치 28에서 S 및 위치 30에서 R 또는 위치 70에서 R; 위치 44에서 T; 위치 24에서 I; 위치 26에서 S; 위치 28에서 S; 위치 30에서 N; 위치 32에서 S; 위치 33에서 R; 위치 38에서 Q; 위치 80에서 Q; 위치 40에서 R; 위치 66에서 K; 위치 42에서

T; 위치 77에서 R 및 위치 68에서 R(위치는 I-CreI 아미노산 서열에 상응함). 그러한 메가뉴클레아제의 예는 서열번호 4의 뉴클레오티드 위치 2004 내지 뉴클레오티드 위치 2525 또는 내지 2522의 뉴클레오티드 서열 또는 서열번호 4의 뉴클레오티드 위치 4885 내지 뉴클레오티드 위치 5405 또는 내지 5403의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산에 의해 각각 암호화된 서열번호 5 및 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 단백질이다. 본 발명에 따른 단일 쇄 메가뉴클레아제는 서열번호 17의 뉴클레오티드 위치 1267 내지 1605 및 1795 내지 2541의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화된 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 단백질 또는 서열번호 17의 뉴클레오티드 위치 1267 내지 1605, 1795 내지 1956 및 2071 내지 2541의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화된 서열번호 18의 아미노산 위치 1 내지 167 및 208 내지 362의 아미노산 서열을 포함하는 단백질일 수 있다.

[0033] 임의의 구현예에서 외래 DNA는 복구 DNA 내에 포함될 수 있고 복구 DNA는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열의 상류 또는 하류 서열과 상동인 하나 이상의 측면(flanking) 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 외래 DNA는 선택가능한 표지 유전자 및/또는 관심있는, 예를 들어 제초제 내성 유전자, 곤충 저항성 유전자, 질병 저항성 유전자, 무생물 스트레스 저항성 유전자, 오일 생합성 관련된 효소, 탄수화물 생합성, 섬유질 강도 또는 섬유질 길이와 관련된 효소, 2차 대사산물의 생합성과 관련된 효소의 식물 발현 유전자를 포함할 수 있다. 외래 DNA는 또한 예를 들어, 즉 비상동 말단결합에 의한 통합을 위해 (임의의 추가 DNA 없이) 미리 정해진 표적 부위 주위의 영역에 상동인 측면 서열 없이 통합될 수 있다.

[0034] 메가뉴클레아제 또는 메가뉴클레아제의 쌍은 키메라 유전자 또는 한 쌍의 키메라 유전자로부터 발현될 수 있고 각각은 메가뉴클레아제 또는 한 쌍의 메가뉴클레아제 중 하나를 암호화하는 암호화 영역에 작동가능하게 연결되고 추가로 식물 세포에서 전사 종료 및 폴리아데닐화 기능에 관련된 DNA 영역에 작동가능하게 연결된, 식물에서 발현가능한 프로모터를 포함한다.

[0035] 본 발명은 추가로 식물 세포 및 식물 및 종자 또는 증식 부분을 제공하고, 여기서 외래 DNA는 미리 정해진 부위에 도입되고 이는 본원에 제공되는 방법에 의해 수득된다.

[0036] 본 발명은 또한 식물을 성장시키는 방법을 제공하고, 여기서 외래 DNA는 미리 정해진 부위에 도입되고 이는 식물과 함께 또는 식물이 성장하는 기질에 화학물질을 적용하는 단계를 포함하는, 본원에서 제공된 방법에 의해 수득된다.

[0037] 본 발명의 또 다른 구현예는 또 다른 식물과 함께 또는 그 자체로 본원의 방법에 의해 수득된 식물 세포로 본질적으로 이루어진 식물을 교배시키는 단계 및 임의적으로 종자를 수확하는 단계를 포함하는, 바 암호화 영역에서 통합된 외래 DNA를 포함하는 식물 제조 방법에 관한 것이다.

[0038] 본 발명은 또한 화학적 화합물을 본원에서 제공되는 방법에 의해 수득된, 외래 DNA가 미리 정해진 부위에 도입된 식물 또는 식물의 종자에 적용하는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다.

[0039] 본 발명의 또 다른 구현예는 식물 세포에서 바 암호화 영역으로 외래 DNA를 도입하기 위해 본원에 기재된 바와 같은 메가뉴클레아제 또는 한 쌍의 메가뉴클레아제의 용도에 관한 것이다.

[0040] 본 발명의 또 다른 구현예는 식물 세포의 미리 정해진 부위에 관심있는 외래 DNA를 도입하기 위한 주문 제작한 메가뉴클레아제의 용도에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0041] 도 1은 상이한 메가뉴클레아제 단량체 단위체 BAY 39 및 BAY 40의 인식 부위 및 아미노산과의 상호작용의 개략도이다.

도 2는 BAY 39/40 단량체 단위체 2("40")의 아미노산 서열이다(상기 아미노산 서열은 SV40 핵 위치 신호(아미노산 1 내지 10)을 포함한다).

도 3은 BAY 39/40 단량체 단위체 1("39")의 아미노산 서열이다(상기 아미노산 서열은 SV40 핵 위치 신호(아미노산 1 내지 10)을 포함한다).

도 4는 단일 쇄 BAY 39/40 메가뉴클레아제의 아미노산 서열이다(상기 아미노산 서열은 SV40 핵 위치 신호(아미노산 1 내지 12) 및 링커 영역(아미노산 168 내지 205)를 포함한다).

도 5는 식물에서 발현가능한 바 유전자 및 BAY 39/40의 단량체 단위체에 대한 식물에서 발현가능한 유전자를 포함하는 형질전환 식물로부터 유래된 포스피노트리신 민감성 라인에서 바 암호화 영역의 인식 부위 주위의 PCR

앰플리콘의 뉴클레오티드 서열의 정렬이다. 1. 대조 시료의 뉴클레오티드 서열; 2. 포스피노트리신 내성 라인의 뉴클레오티드 서열; 3 내지 9: 포스피노트리신 민감성 라인의 뉴클레오티드 서열.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0042]

본 발명은 뉴클레오티드 서열(서열번호 1 및 서열번호 2, 도 1)을 특이적으로 인식하고 절단하는 기능적으로 채고안된 메가뉴클레아제가 수득될 수 있다는 관찰에 기초를 두고, 상기 뉴클레오티드 서열은 스트렙토마이세스 히그로스코피쿠스로부터의 포스피노트리신 아세틸트랜스퍼라제 유전자(바 유전자)의 암호화 영역의 뉴클레오티드 서열에서 발견될 수 있고(Thompson, C., Mowa, R., Tizard, R., Cramer, R., Davies, J., Lauwerys, M. and Botterman, J. (1987) Characterization of the herbicide-resistance gene bar from *Streptomyces hygroscopicus*. The EMBO Journal 6: 2519-2523 (Accession X05822)) 상기 뉴클레오티드 서열은 식물 형질전환에서 통상적으로 사용되는 선택가능한 표지 유전자에 존재한다.

[0043]

서열번호 3은 바 유전자의 뉴클레오티드 서열을 나타낸다. 서열번호 1(서열번호 2)의 인식 부위의 상보체는 서열번호 3의 뉴클레오티드 132 내지 153의 뉴클레오티드 서열에 상응한다. 그러므로 본원에 기술된 메가뉴클레아제는 스트렙토마이세스 히그로스코피쿠스로부터의 포스피노트리신 아세틸트랜스퍼라제 유전자(바)를 암호화하는 DNA 영역에 작동가능하게 연결된 식물에서 발현가능한 작동가능한 프로모터를 갖고 3' 전사 종결 및 식물에서 기능을 갖는 폴리아데닐화 영역에 의해 이어지는, 식물에서 발현가능한 유전자를 포함하는 형질전환 식물에서 뉴클레오티드 서열을 인식하고 절단할 수 있고, 바 암호화 영역은 서열번호 1의 뉴클레오티드의 상보체, 예를 들어 서열번호 3의 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0044]

바 암호화 영역은 상업화되었거나 상업화되거나 상업화될 수많은 형질전환 식물, 예컨대 하기 이벤트를 포함하는 식물에 혼입되었다:

[0045]

치커리(시코리움 인티부스(*Cichorium intybus*)):

-조절 파일 97-148-01p에 기재된 바와 같은 이벤트 RM3-3, RM3-4, RM3-6

[0047]

유채꽃(브라시카 나푸스(*Brassica napus*)):

-조절 파일 DD95-04(CA) 또는 98-278-01p(US)에 기재된 바와 같은 이벤트 MS1

[0049]

-조절 파일 DD96-17(CA) 또는 98-278-01p(US) 또는 국제특허출원공개 제W02001/041558호에 기재된 바와 같은 이벤트 MS8

[0050]

-조절 파일 DD95-04(CA) 또는 98-278-01p(US)에 기재된 바와 같은 이벤트 RF1

[0051]

-조절 파일 DD95-04(CA) 또는 98-278-01p(US)에 기재된 바와 같은 이벤트 RF2

[0052]

-조절 파일 DD96-17(CA) 또는 98-278-01p(US) 또는 국제특허출원공개 제W02001/041558호에 기재된 바와 같은 이벤트 RF3

[0053]

-일본 탈조절 파일에 기재된 바와 같은 이벤트 PHY14, PHY35, PHY36

[0054]

면(고시피움 히르수툼(*Gossypium hirsutum*)):

-조절 파일 02-042-01p(US) 또는 국제특허출원공개 제W02003/013224호에 기재된 바와 같은 이벤트 LLcotton 25

[0056]

-국제특허출원공개 제W02008/122406호에 기재된 바와 같은 이벤트 T303-40

[0057]

-조절 파일 08-340-01p(US) 또는 국제특허출원공개 제W02008/151780호에 기재된 바와 같은 이벤트 GHB119

[0058]

옥수수(제아 메이스(*Zea mays*)):

-조절 파일 03-181-01p(US)에 기재된 바와 같은 이벤트 TC-6275(=DAS-06275-8)

[0060]

-조절 파일 94-319-01p(US)에 기재된 바와 같은 이벤트 Bt176

[0061]

-미국의 탈조절 문서 95-145-01p 또는 국제특허출원공개 제W09506128호에 기재된 바와 같은 이벤트 B16(=DLL25)

[0062]

-미국의 탈조절 문서 96-291-01p(US)에 기재된 바와 같은 이벤트 DBT418

[0063]

-이벤트 ZMA101

- [0064] -미국의 탈조절 문서 97-265-01p(US)에 기재된 바와 같은 이벤트 CBH351
- [0065] -미국의 탈조절 파일 95-228-01p(US)에 기재된 바와 같은 이벤트 MS3
- [0066] -미국의 탈조절 파일 98-349-01p(US)에 기재된 바와 같은 이벤트 MS6
- [0067] 쌀(오리자 사티바(*Oryza sativa*)):
- [0068] -미국의 탈조절 문서 98-329-01p 또는 국제특허출원공개 제W02001/083818호에 기재된 바와 같은 이벤트 LLRice62
- [0069] -미국의 탈조절 문서 06-234-01p 또는 미국특허출원 제2008289060호에 기재된 바와 같은 이벤트 LLRice601
- [0070] 대두(글리신 맥스(*Glycine max*)):
- [0071] -조절 파일 96-068-01p(US)에 기재된 바와 같은 이벤트 W62 및 W98
- [0072] 그러므로 이들 이벤트를 포함하는 형질전환 식물은 본원에 기재된 메가뉴클레아제에 대한 인식 서열을 포함하고 본 발명의 방법에 적합한 개체이다. 또한 식물에서 발현가능한 바 유전자는 일반적으로 선택가능한 표지로서 사용되어 또한 본 발명의 방법에 적합한 개체인 많은 형질전환 식물이 생성되었다.
- [0073] 따라서, 한 구현예에서 본 발명은
- [0074] (a) 미리 정해진 부위에 이중 가닥 DNA 단절을 유도하는 단계;
- [0075] (b) 식물 세포에 외래 DNA 분자를 도입하는 단계; 및
- [0076] (c) 외래 DNA가 미리 정해진 부위에 도입된 식물 세포를 선택하는 단계
- [0077] 를 포함하는, 형질전환 식물 세포의 (핵) 게놈에서 미리 정해진 또는 미리 선택된 부위에 외래 DNA 분자를 도입하는 방법에 관한 것이고, 상기 미리 정해진 부위는 자연적으로 존재하는 메가뉴클레아제에 대한 인식 부위와 상이한 뉴클레오티드 서열이고 형질전환 식물에 형질전환 유전자의 일부로 통상적으로 도입되는 뉴클레오티드 서열이고, 상기 이중 가닥 DNA 단절은 동시에 미리 정해진 부위를 인식하고 이중 가닥 단절을 유도하는 자연적으로 존재하지 않는 단일 쇄 메가뉴클레아제 또는 한 쌍의 자연적으로 존재하지 않는 메가뉴클레아제 단량체 단위체의 도입에 의해 유도된다.
- [0078] 본원에서 사용되는 바와 같이 "식물에 형질전환 유전자의 일부로 통상적으로 도입되는 뉴클레오티드 서열"은 식물에 도입된 키메라 유전자의 요소로서 이전에 사용되고 그렇게 함으로써 형질전환 식물이 용이하게 이용가능하고 특히 그렇게 함으로써 형질전환 식물이 상업화되었거나 상업화되거나 상업화될 것이고 규제 승인이 인가되어 공개적으로 이용가능한 DNA 영역의 뉴클레오티드 서열을 일컫는다. 규제 승인에 대한 적용 정보를 요약하고 제 공하는 몇몇 데이터베이스, 예컨대 온라인상에서 협의될 수 있는, 환경 위험 평가 센터의 GM 작물 데이터베이스 (http://www.cera-gmc.org/?action=gm_crop_database&) 또는 http://www.aphis.usda.gov/brs/not_reg.htm의 온라인 상에서 이용가능한, APHIS에 의해 등록되거나 계류중인 비규제 상태의 청원 요약 목록이 이용가능하다.
- [0079] 식물에서 형질전환 유전자의 일부로 통상적으로 도입되는 DNA 영역은 프로모터 영역, 예를 들어 CaMV 35S 전사체의 35S 프로모터(Odell et al. (1985), Nature 313 : 810-812); FMV 35S 프로모터(Richins R.D., Scholthof H.B., Shepherd R.J. (1987) Sequence of the figwort mosaic virus (caulimovirus group). Nucleic Acids Research 15: 8451-8466); 아라비돕시스 탈리아나 루비스코 유전자의 소 서브유니트의 프로모터(Krebbbers E., Seurinck J., Herdies L., Cashmore A. R., Timko M. P. (1988). Four genes in two diverged subfamilies encode the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit polypeptides of *Arabidopsis thaliana*. Plant Molecular Biology, 11, 745-759); 카사바 베인 모자이크 바이러스 프로모터(Verdaguer et al (1996) Plant Mol. Biol. 31 : 1129 또는 Verdaguer et al (1998) Plant Mol. Biol. 37: 1055); 아라비돕시스로부터의 액틴2 프로모터(An Y.Q., McDowell J.M., Huang S., McKinney E.C., Chambliss S., Meagher R.B. (1996) Strong, constitutive expression of the *Arabidopsis* ACT2/ACT8 actin subclass in vegetative tissues. The Plant Journal 10: 107-121) 또는 쌀로부터의 액틴2 프로모터(McElroy D., Zhang W., Cao J., Wu R. (1990) Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transfection. The Plant Cell 2: 163-171); 히스톤 H3 프로모터 또는 히스톤 H4 프로모터(Chaboute M, Chaubet N, Philipps G, Ehling M and Gigot C (1987) Genomic organization and nucleotide sequences of two histone H3 and two histone H4 genes of *Arabidopsis thaliana*. Plant Mol. Biol. 8: 179-191); 옥수수(제아 메이즈) 유비퀴틴-1 유전자의 프로모터

(Christensen et al (1992) *Plant Mol. Biol.* 18: 675); 5' UTR 리더 서열, 예를 들어 cab22L 리더(Harpster M, Townsend J, Jones J, Bedbrook J and Dunsmuir P.(1988) Relative strengths of the 35S cauliflower mosaic virus, Γ , 2' and nopaline synthase promoters in transformed tobacco, sugarbeet and oilseed rape callus tissue. *Mol Gen Genet.* 212: 182-190); 5' 테브(Carrington J and Freed D (1990) Cap-independent enhancement of translation by a plant potyvirus 5' nontranslated region. *J Virol* 64(4): 1590-1597); 노팔린 신타제 유전자의 3' 말단(Depicker A., Stachel S., Dhaese P., Zambryski P., Goodman H.M. (1982). Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. *Journal of Molecular and Applied Genetics* 1, 561-573); 옥토핀 신타제 유전자의 3' 말단(De Greve H., Dhaese P., Seurinck J., Lemmers M., Van Montagu M., Scheff J. (1982). Nucleotide sequence and transcript map of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid-encoded octopine synthase gene. *Journal of Molecular and Applied Genetics*, 1, 499-511); CaMV35S 터미네이터(Sanfacon et al (1991) *Genes Dev.* 5: 141); 옥토핀 유형 T-DNA 벡터의 유전자 7의 전사 종결 및 폴리아데닐화 영역(D'Haese et al, 1983, *The EMBO Journal*, 2, 419-426) 및 선택가능한 표지, 예를 들어 바(Thompson, C, Mowa, R., Tizard, R., Crameri, R., Davies, J., Lauwereys, M. and Botterman, J. (1987) Characterization of the herbicide-resistance gene bar from *Streptomyces hygroscopicus*. *The EMBO Journal* 6: 2519-2523 (Accession X05822)); 패트(Wohlleben,W., Arnold, W., Broer,L, Hillemann,D., Strauch,E. and Puhler,A. Nucleotide sequence of the phosphinothricin N-acetyltransferase gene from *Streptomyces viridochromogenes* Tu494 and its expression in *Nicotiana tabacum*. *Gene* 70 (1), 25-37 (1988)); 2mepsps(미국특허 제US6566587호 또는 EMBL 번호 AR337832로부터의 서열 4); CP4(Padgett S.R., Re D., Barry G., Eichholtz D., Delannay X., Fuchs R.L., Kishore G.M., Fraley R.T. (1996). New weed control opportunities: development of soybeans with a Roundup Ready gene. In *Herbicide-Resistant Crops: Agricultural, Environmental, Economic..., neo Accession V00618; Beck et al (1982) Gene 19(3) p327-336); 또는 hpt(Kaster et al., (1983), *NAR* 11, 6895-6911)를 포함한다.*

[0080] 본 발명의 맥락에서 바람직한 DNA 영역은 상기된 바와 같은 바 유전자의 암호화 영역의 뉴클레오티드 서열이다.

[0081] 본원에 기재된 재고안된 메가뉴클레아제는 스캐폴드로서의 사용을 위해 자연적으로 존재하는 메가뉴클레아제 I-CreI를 기초로 한다. I-CreI는 클라미도모나스 레인하르트티(*Chlamydomonas rheinhardtii*)의 염록체에서 발견되는 호밍 엔도뉴클레아제이다(Thompson et al. 1992, *Gene* 119, 247-251). 이 엔도뉴클레아제는 23SrRNA에서 유사 회문식(pseudo-palindromic) 22bp DNA 부위를 인식하고 인트론의 도입에 사용되는 이중 가닥 DNA 단절을 생성하는 동형이량체이다. I-CreI는 단일 LAGLIDADG 모티프를 갖는 엔도뉴클레아제 군의 일원이다. LAGLIDADG 효소는 콘센서스 모티프의 1 또는 2개의 복사본을 포함한다. 단일 모티프 효소, 예를 들어 I-CreI는 동형이량체로서 작용하고 반면에 이중 모티프 효소는 2개의 별개의 도메인을 갖는 단량체이다. 따라서 관심있는 22bp 뉴클레오티드 서열을 인식하도록 I-CreI 스캐폴드로부터 유래된 메가뉴클레아제를 재고안할 때 2개의 단량체 단위체가 고안되고 각각은 22bp 인식 부위의 일부를 인식하고 이는 22bp 인식 부위에서 이중 가닥 단절을 동시에 유도하는데 필요하다(국제특허출원공개 제WO2007/047859호). 예를 들어 국제특허출원공개 제WO2007/047859호에 기재된 바와 같이 2개의 단량체 단위체를 하나의 단일 쇄 메가뉴클레아제로 연결시킴으로써 또한 이형이량체의 형성을 촉진시킴으로써 일치된 행동이 달성될 수 있다.

[0082] 자연적으로 존재하는 I-CreI 단량체의 아미노산 서열은 서열번호 16으로 제공된다. 그의 이형이량체가 서열번호 1 및/또는 2의 뉴클레오티드 서열을 인식하도록 I-CreI 단량체를 재고안하기 위해 하기 아미노산이 언급된 위치에 존재한다:

[0083] 1. 메가뉴클레아제 단위체 1에서:

[0084] a. 위치 32에서 S;

[0085] b. 위치 33에서 Y;

[0086] c. 위치 38에서 E;

[0087] d. 위치 40에서 R;

[0088] e. 위치 66에서 K;

[0089] f. 위치 80에서 Q;

[0090] g. 위치 42에서 T;

- [0091] h. 위치 77에서 R;
- [0092] i. 위치 68에서 R;
- [0093] j. 위치 70에서 R;
- [0094] k. 위치 44에서 Q;
- [0095] l. 위치 24에서 I;
- [0096] m. 위치 26에서 S;
- [0097] n. 위치 28에서 S;
- [0098] o. 위치 30에서 R.
- [0099] 2. 메가뉴클레아제 단위체 2에서:
 - p. 위치 70에서 R;
 - q. 위치 44에서 T;
 - r. 위치 24에서 I;
 - s. 위치 26에서 S;
 - t. 위치 28에서 S;
 - u. 위치 30에서 N;
 - v. 위치 32에서 S;
 - w. 위치 33에서 R;
 - x. 위치 38에서 Q;
 - y. 위치 80에서 Q;
 - z. 위치 40에서 R;
 - aa. 위치 66에서 K;
 - bb. 위치 42에서 T;
 - cc. 위치 77에서 R;
 - dd. 위치 68에서 R.
- [0115] 그 개략도는 도 1에 제공된다.

[0116] 재고안된 이중 가닥 단절 유도 효소는 핵 위치 신호(nuclear localization signal, NLS), 예를 들어 SV40 거대 T 항원의 NLS를 포함할 수 있지만 반드시 포함할 필요는 없다(Raikhel, Plant Physiol. 100: 1627-1632 (1992) 및 그의 참고문헌; Kalderon et al. Cell 39: 499-509 (1984)). 핵 위치 신호는 단백질 내의 어디든 위치할 수 있으나 적합하게는 단백질의 N-말단 끝에 위치한다. 핵 위치 신호는 이중 가닥 단절 유도 효소의 하나 이상의 아미노산을 대체할 수 있다. 재고안된 메가뉴클레아제에 단백질의 N-말단의 NLS, 예를 들어 SV40의 10 또는 12개의 아미노산 NLS가 제공되면 그에 따라 아미노산 위치가 이동(증가)할 것임이 주지되어야 한다. 이처럼 2 개의 단량체 단위체가 단일 쇄 메가뉴클레아제로 연결되는 이벤트에서 제2 단위체의 위치 또한 이동할 것이다. I-CreI 아미노산 서열과 관련하여 상응하는 아미노산 위치는 또한 아래 기재된 바와 같이 최적 정렬을 측정하여 확인될 수 있다. 단일 쇄의 재고안된 메가뉴클레아제에서 단위체의 순서는 무관함이 분명할 것이다, 즉 상기 단위체 1 및 2가 단일 아미노산 쇄에서 실제로 그 순서로 존재하는지 또는 단일 아미노산 쇄에서 단위체 2가 단위체 1을 앞서는지는 2개의 단위체가 결합하여 표적 서열을 인식할 수 있게 하는데는 차이가 없다.

[0117] 본 발명에 적합한 재고안된 메가뉴클레아제는 서열번호 5 및 6에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함할 수 있거나(이형이량체로서 인식 부위를 절단할 수 있는 단량체 단위체) 서열번호 18에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함할 수 있거나(아미노산 168 내지 205에 의해 제시되는 링커 서열에 의해 연결된, 아미노산 1 내지 167 및 208 내지 362에 의해 각각 제시되는 2개의 단위체를 포함하는 단일 쇄 메가뉴클레아제) 서열번호 18의 1

내지 167 및 206 내지 362의 아미노산을 포함하는 아미노산 서열을 포함할 수 있다(각각 링커 없는 단일 쇄 메가뉴클레아제의 단위체 1 및 2).

[0118] 적합하게는 재고안된 메가뉴클레아제는 그러한 메가뉴클레아제를 암호화하는, 식물에서 발현가능한 재조합 유전자의 발현에 의해 제공될 수 있다. 이러한 목적을 위해 재고안된 메가뉴클레아제 또는 메가뉴클레아제 단량체 단위체를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 DNA 영역이 식물에서 발현가능한 프로모터 및 전사 종결 및 폴리아데닐화에 관련된 DNA 영역에 작동가능하게 연결되어 식물 또는 식물 세포로 도입될 수 있다. 재고안된 메가뉴클레아제를 암호화하는 재조합 유전자는 일시적으로 또는 안정적으로 도입될 수 있다.

[0119] 본 발명의 목적을 위해 용어 "식물 작동 프로모터" 및 "식물에서 발현가능한 프로모터"는 식물, 식물 조직, 식물 기관, 식물 일부 또는 식물 세포에서 전사를 추진할 수 있는 프로모터를 의미한다. 이는 식물 유래의 임의의 프로모터를 포함하나 또한 식물 세포에서 전사를 지시할 수 있는 비식물 유래의 임의의 프로모터를 포함한다.

[0120] 이 점에서 사용될 수 있는 프로모터는 항시 발현(constitutive) 프로모터, 예를 들어 컬리풀라워 모자이크 바이러스(CaMV) 35S 전사체의 프로모터(Hapster et al., 1988, Mol. Gen. Genet. 212: 182-190), CaMV 19S 프로모터(미국특허 제5,352,605호; 국제특허출원공개 제W084/02913호; Benfey et al., 1989, EMBO J. 8:2195-2202), 지하 클로버 바이러스 프로모터 4번 또는 7번(국제특허출원공개 제W096/06932호), 루비스코 소 서브유니트 프로모터(미국특허 제4,962,028호), 유비퀴틴 프로모터(Holterf et al., 1995, Plant Mol. Biol. 29:637-649), T-DNA 유전자 프로모터, 예를 들어 아그로박테리움으로부터의 옥토핀 신타제(octopine synthase, OCS) 및 노팔린 신타제(nopaline synthase, NOS) 프로모터 및 식물에서 항시 발현하는 것으로 당업자에게 알려진 유전자의 추가적인 프로모터이다.

[0121] 이 점에서 사용될 수 있는 추가적인 프로모터는 조직 특이적 또는 기관 특이적 프로모터, 바람직하게는 종자 특이적 프로모터, 예를 들어 2S 알부민 프로모터(Joseffson et al., 1987, J. Biol. Chem. 262: 12196-12201), 파세올린 프로모터(미국특허 제5,504,200호; Bustos et al., 1989, Plant Cell 1 (9):839-53), 레구민 프로모터(Shirsat et al., 1989, Mol. Gen. Genet. 215(2):326-331), "무명의 종자 단백질(unknown seed protein, USP)" 프로모터(Baumlein et al., 1991, Mol. Gen. Genet. 225(3):459-67), 나핀 프로모터(미국특허 제5,608,152호; Stalberg et al., 1996, Planta 199:515-519), 아라비듐시스 올레오신 프로모터(국제특허출원공개 제W098/45461호), 브라시카 Bce4 프로모터(국제특허출원공개 제W091/13980호) 및 식물에서 종자 특이적으로 발현하는 것으로 당업자에게 알려진 유전자의 추가적인 프로모터이다.

[0122] 사용될 수 있는 다른 프로모터는 원시세포(primordia) 특이적인 프로모터(An et al., 1996, Plant Cell 8: 15-30), 줄기 특이적인 프로모터(Keller et al., 1988, EMBO J. 7(12): 3625-3633), 잎 특이적인 프로모터(Hudspeth et al., 1989, Plant Mol. Biol. 12: 579-589), 엽육 특이적인 프로모터(예를 들어 광 유도성 루비스코 프로모터), 뿌리 특이적인 프로모터(Keller et al., 1989, Genes Dev. 3: 1639-1646), 괴경 특이적인 프로모터(Keil et al., 1989, EMBO J. 8(5): 1323-1330), 관다발 조직 특이적인 프로모터(Peleman et al., 1989, Gene 84: 359-369), 수술 선택성 프로모터(국제특허출원공개 제W089/10396호, 제W092/13956호), 열개 영역 특이적인 프로모터(국제특허출원공개 제W097/13865호) 등과 같이 종자 특이적인 또는 기관 특이적인 프로모터이다.

[0123] 본 발명에 적합한 재고안된 메가뉴클레아제를 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 서열번호 4의 뉴클레오티드 위치 2004 내지 뉴클레오티드 위치 2525 또는 2522의 뉴클레오티드 서열 또는 서열번호 4의 뉴클레오티드 위치 4885 내지 뉴클레오티드 위치 5404 또는 5403의 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 클로닝 및 다른 재조합 DNA 기술을 용이하게 하기 위해 식물에서 작용하는 인트론을 메가뉴클레아제, 특히 단일 쇄 메가뉴클레아제를 암호화하는 영역에 포함시키는 것이 유리할 수 있다. 그러한 인트론은 예를 들어 서열번호 17의 뉴클레오티드 위치 1606 내지 1794의 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다.

[0124] 재고안된 메가뉴클레아제를 암호화하는 DNA 영역은 GC 함량, 코돈 사용빈도, 원치않는 뉴클레오티드 서열의 제거를 도입함으로써 식물에서의 발현을 위해 최적화될 수 있다. 암호화 영역은 식물에서의 발현을 위해 추가로 최적화될 수 있고 합성 암호화 영역은 다음 기준을 만족시키기 위해 고안된 뉴클레오티드 서열을 가질 수 있다:

[0125] (a) 뉴클레오티드 서열은 본원에 기재된 바와 같이 기능적으로 재고안된 호밍 엔도뉴클레아제를 암호화하고;

[0126] (b) 뉴클레오티드 서열은 약 50% 내지 약 60%의 GC 함량을 갖고;

[0127] (c) 뉴클레오티드 서열은 GATAAT, TATAAA, AATATA, AATATT, GATAAA, AATGAA, AATAAG, AATAAA, AATAAT,

AACCAA, ATATAA, AATCAA, ATACTA, ATAAAA, ATGAAA, AAGCAT, ATTAAT, ATACAT, AAAATA, ATTAAA, AATTAA, AATACA 및 CATAAA로 이루어진 군으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열을 포함하지 않고;

[0128] (d) 뉴클레오티드 서열은 CCAAT, ATTGG, GCAAT 및 ATTGC로 이루어진 군으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열을 포함하지 않고;

[0129] (e) 뉴클레오티드 서열은 ATTTA, AAGGT, AGGTA, GGTA 및 GCAGG로 이루어진 군으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열을 포함하지 않고;

[0130] (f) 뉴클레오티드 서열은 G 및 C의 군으로부터 선택된 7개의 연속적인 뉴클레오티드로 이루어진 GC 스트레치 (stretch)를 포함하지 않고;

[0131] (g) 뉴클레오티드 서열은 A 및 T로 이루어진 군으로부터 선택된 5개의 연속적인 뉴클레오티드로 이루어진 AT 스트레치를 포함하지 않고;

[0132] (h) 뉴클레오티드 서열은 위치 2 및 3에 TA 또는 CG 듀플릿(duplet)을 포함하는, Leu, Ile, Val, Ser, Pro, Thr, Ala를 암호화하는 코돈을 포함하지 않는다(즉 뉴클레오티드 서열은 코돈 TTA, CTA, ATA, GTA, TCG, CCG, ACG 및 GCG를 포함하지 않는다).

[0133] 그러한 최적화된 서열의 예는 서열번호 17의 뉴클레오티드 위치 1267 내지 1605 및 뉴클레오티드 위치 1795 내지 2541에 의해 제시된다(여기서 2개의 메가뉴클레아제 단위체 사이에 존재하는 링커를 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 뉴클레오티드 1957 내지 2070에 의해 제시된다).

[0134] 또한 방법을 기재하는데 사용되는 용어, 예를 들어 "DNA 절편의 도입" 및 "세포로부터의 식물의 재생"은 그러한 DNA 절편이 반드시 형질전환 기술에 의해 도입되어야 함을 의미하지 않음이 분명하다. 실제로 관심있는 DNA 분자가 또한 한 식물로부터 다른 식물로의 육종 또는 교배에 의해 도입될 수 있다는 것은 당업자에게 분명할 것이다.

[0135] 그러나 관심있는 DNA 분자가 당업계에 공지된 임의의 방법, 예컨대 아그로박테리움 매개된 형질전환에 의해서 뿐만 아니라 직접적인 DNA 전달 방법에 의해 식물 세포에 도입될 수 있다는 것이 분명할 것이다. 형질전환 DNA 분자는 임의의 종래의 방법, 예컨대 직접적인 DNA 전달 방법(이에 한정되지 않음)을 사용하여 식물 세포에 전달될 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이 "직접적인 DNA 전달"은 자연의 아그로박테리움 종의 사용과 관련이 없이 식물 세포에 DNA를 도입하는, 식물 세포에 DNA를 도입할 수 있는 임의의 방법이다. 이는 당업계에 공지된 방법, 예를 들어 전기천공법에 의한 원형질체로의 DNA의 도입, 전기천공법에 의한 온전한 식물 세포 또는 부분적으로 절편된(partially degraded) 조직 또는 식물 세포로의 도입, 제제, 예를 들어 PEG 등의 작용을 통한 원형질체로의 DNA의 도입, 실리콘 위스커의 사용 및 DNA 코팅된 미세별사체를 사용한 충격을 포함한다.

[0136] 미리 선택된 부위에 이중 가닥 단절을 유도하는 능력은 몇몇 잠재적인 적용을 가능하게 한다. 관심있는 외래 DNA는 상동 재조합에 의해 또는 비상동 말단결합의 방법에서 미리 선택된 부위에 도입될 수 있다. 이중 가닥 단절은 또한 미리 선택된 부위에 작은 결실 또는 삽입의 형성을 유도하여 미리 선택된 부위의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 키메라 유전자를 잠재적으로 불활성화시키는데 사용될 수 있다. 국제특허출원공개 제 WO06/105946호, 제WO08/037436호 또는 제WO08/148559호에 기재된 바와 같이 미리 선택된 부위에서의 이중 가닥 단절은 또한 관심있는 DNA 영역에 대한 부위 근처의 DNA 영역의 교체를 용이하게 할 것이다.

[0137] 미리 선택된 부위에 상동 재조합에 의해 외래 DNA를 삽입하기 위해 외래 DNA는 복구 DNA 내에 포함될 수 있고, 여기서 외래 DNA는 미리 선택된 부위의 상류 또는 하류 DNA 영역의 뉴클레오티드 서열과 유사한 뉴클레오티드 서열을 갖는 하나 이상의 측면 DNA 영역에 의해 이웃하고 있다. 복구 DNA는 외래 DNA의 상류 및 하류에 2개의 측면 DNA 영역에 의해 이웃하여 삽입된 외래 DNA를 포함할 수 있고 2개의 측면 DNA 영역은 미리 선택된 부위의 상류 또는 하류의 DNA 영역의 뉴클레오티드 서열과 유사하다. 대안적으로 외래 DNA는 예를 들어, 즉 미리 정해진 표적 부위 주위의 영역과 상동인 측면 서열 없이(임의의 추가적인 DNA 없이) 비상동 말단결합에 의한 통합으로 통합될 수 있다.

[0138] 본원에서 사용되는 바와 같이 "측면 DNA 영역"은 표적 DNA 서열 또는 미리 선택된 부위의 상류 또는 하류 각각에 DNA 영역과 상동인 뉴클레오티드 서열을 갖는 DNA이다. 이는 관심있는 외래 DNA 또는 DNA 분자의 삽입을 더 잘 조절할 수 있게 한다. 실제로 상동 재조합에 의한 통합은 뉴클레오티드 수준까지 식물 핵 게놈으로 외래 DNA 절편의 정확한 결합을 가능하게 할 것이다.

[0139] 측면 DNA 영역은 길이가 다양할 수 있고 길이가 약 10개 뉴클레오티드 이상이어야 한다. 그러나 측면 영역은

실질적으로 가능한 만큼 길 수 있다(예, 완전한 박테리아 인공 염색체(bacterial artificial chromosome, BAC)와 같이 약 100 내지 150kb까지). 바람직하게는 측면 영역은 약 50bp 내지 약 2000bp일 것이다. 게다가 관심있는 외래 DNA에 이웃하는 영역은 미리 선택된 부위에 이웃하는 DNA 영역과 동일할 필요가 없고 미리 선택된 부위에 이웃하는 DNA 영역과 약 80% 내지 약 100% 서열 동일성, 바람직하게는 약 95% 내지 약 100% 서열 동일성을 가질 수 있다. 측면 영역이 더 길수록 상동성의 필요조건은 더 엄격하다. 또한 서열 동일성이 외래 DNA의 정확한 삽입 위치 부근에서 실질적으로 가능한 만큼 높은 것이 바람직하다. 또한 인접한 DNA 서열의 DNA 서열을 변경시키지 않고 표적 DNA 서열의 교환을 달성하기 위해 측면 DNA 서열이 바람직하게는 미리 선택된 부위에 이웃하는 DNA 영역과 동일해야 한다.

[0140] 게다가 관심있는 외래 DNA와 이웃하는 영역은 미리 선택된 부위와 바로 이웃하는 영역과 상동일 필요가 없으나 미리 선택된 부위와 더 떨어진 핵 계놈의 DNA 영역과 상동일 수 있다. 그리고나서 외래 DNA의 삽입은 미리 선택된 삽입 부위와 상동인 DNA 영역 사이에서 표적 DNA의 제거를 초래할 것이다. 즉, 상동 영역 사이에 위치한 표적 DNA는 관심있는 외래 DNA로 치환될 것이다. 그러므로 이중 가닥 DNA 단절의 복구를 위해 외래 DNA의 적합한 배치를 선택하여 본 발명에 따라 외래 DNA 분자를 도입함으로써 삽입에 추가하여 또한 상동 영역 사이에 위치한 계놈 영역의 표적화된 교체 또는 표적화된 결실을 만들 수 있다.

[0141] 삽입될 외래 DNA는 또한 삽입 후에 제거되거나 제거되지 않을 수 있는 선택가능한 또는 스크리닝가능한 표지를 포함할 수 있다.

[0142] 본원에서 사용되는 바와 같이 "선택가능한 또는 스크리닝가능한 표지"는 당업계 통상의 의미를 갖고 식물에서 발현가능한 포스피노트리신 아세틸트랜스퍼라제, 네오마이신 포스포트랜스퍼라제, 글리포세이트 옥시다제, 글리포세이트 내성 EPSP 효소, 니트릴라제 유전자, 돌연변이 아세토락테이트 신타제 또는 아세토히드록시산 신타제 유전자, β -글루코로니다제(glucoronidase, GUS), R-유전자좌 유전자, 녹색 형광 단백질 등을 포함하나 이에 한정되지는 않는다.

[0143] 선택가능한 또는 스크리닝 가능한 표지 및 나머지 외래 DNA 분자가 측면 DNA 영역을 통해 상동 재조합에 의해 도입된 식물 세포 또는 식물의 선택은 예를 들어 형질전환 DNA에 존재하지만 측면 DNA 영역의 밖에 위치한 서열의 부재를 스크리닝함으로써 달성될 수 있다. 실제로 측면 DNA 영역 밖의 형질전환 DNA로부터의 서열의 존재는 형질전환된 식물 세포의 유래가 랜덤 DNA 삽입에 의한 것임을 나타낼 것이다. 이 목적을 위해 선택가능한 또는 스크리닝가능한 표지가 측면 DNA 영역 밖의 형질전환 DNA 분자에 포함될 수 있고 그리고나서 이는 형질전환 DNA 밖에 위치한 선택가능한 또는 스크리닝가능한 표지를 갖지 않는 식물 세포를 확인하는데 사용될 수 있고 이는 측면 DNA 영역을 통한 상동 재조합에 의해 일어날 수 있다. 대안적으로 형질전환 DNA 분자는 그러한 유전자(음성적으로 선택가능한 표지 유전자)의 부재를 선택가능하게 하는 측면 DNA 영역 밖의 선택가능한 표지를 포함할 수 있다.

[0144] 본 발명에 따른 방법이, 관심있는 임의의 DNA, 예컨대 예를 들어 후속 확인을 위한 특정 뉴클레오티드 서열 특징을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 DNA를 포함하는 DNA의 삽입을 가능하게 하는 것이 분명하다. 관심있는 DNA는 또한 하나 이상의 식물에서 발현가능한 유전자, 예컨대 제초제 내성 유전자, 곤충 저항성 유전자, 질병 저항성 유전자, 무생물 스트레스 저항성 유전자, 오일 생합성 또는 탄수화물 생합성에 관련된 효소, 섬유질 강도 및/또는 길이에 관련된 효소, 2차 대사산물의 생합성에 관련된 효소(이에 한정되지 않음)일 수 있다.

[0145] 제초제 내성 유전자는 효소 5-엔올피루빌시키메이트-3-포스페이트 신타제(EPSPS)를 암호화하는 유전자를 포함한다. 그러한 EPSPS 유전자의 예는 박테리아 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*)의 AroA 유전자(돌연변이 CT7)(Comai et al., 1983, *Science* 221, 370-371), 박테리아 아그로박테리움 종의 CP4 유전자(Barry et al., 1992, *Curr. Topics Plant Physiol.* 7, 139-145), 페튜니아 EPSPS를 암호화하는 유전자(Shah et al., 1986, *Science* 233, 478-481), 토마토 EPSPS(Gasser et al., 1988, *J. Biol. Chem.* 263, 4280-4289) 또는 엘루신 EPSPS(국제특허출원공개 제W001/66704호)이다. 또한 예를 들어 유럽 특허 제0837944호, 국제특허출원공개 제W000/66746호, 제W000/66747호 또는 제W002/26995호에 기재된 바와 같이 돌연변이된 EPSPS일 수 있다.

[0146] 글리포세이트 내성 식물은 또한 미국특허 제5,776,760호 및 제5,463,175호에 기재된 바와 같이 글리포세이트 옥시도-리덕타제 효소를 암호화하는 유전자를 발현시켜 수득될 수 있다. 글리포세이트 내성 식물은 또한 예를 들어 국제특허출원공개 제W002/36782호, 제W003/092360호, 제W005/012515호 및 제W007/024782호에 기재된 바와 같이 글리포세이트 아세틸 트랜스퍼라제 효소를 암호화하는 유전자를 발현시켜 수득될 수 있다. 글리포세이트 내성 식물은 또한 예를 들어 국제특허출원공개 제W001/024615호 또는 제W003/013226호에 기재된 바와 같이 상기 유전자의 자연적으로 존재하는 돌연변이를 포함하는 식물을 선택하여 수득될 수 있다. 글리포세이트 내성을 부

여하는 EPSPS 유전자는 예를 들어 미국특허출원 제11/517,991호, 제10/739,610호, 제12/139,408호, 제12/352,532호, 제11/312,866호, 제11/315,678호, 제12/421,292호, 제11/400,598호, 제11/651,752호, 제11/681,285호, 제11/605,824호, 제12/468,205호, 제11/760,570호, 제11/762,526호, 제11/769,327호, 제11/769,255호, 제11/943801호 또는 제12/362,774호에 기재되어 있다. 글리포세이트 내성을 부여하는 다른 유전자, 예를 들어 디카르복실라제 유전자는 예를 들어 미국특허출원 제11/588,811호, 제11/185,342호, 제12/364,724호, 제11/185,560호 또는 제12/423,926호에 기재되어 있다.

[0147] 다른 제초제 내성 유전자는 예를 들어 미국특허출원 제11/760,602호에 기재된 제초제를 해독하는 효소 또는 억제에 저항성인 돌연변이 글루타민 신타제 효소를 암호화할 수 있다. 하나의 그러한 효과적인 해독 효소는 포스피노트리신 아세틸트랜스페라제를 암호화하는 효소(예를 들어 스트렙토마이세스 종으로부터의 바 또는 패트 단백질)이다. 포스피노트리신 아세틸트랜스페라제는 예를 들어 미국특허 제5,561,236호, 제5,648,477호, 제5,646,024호, 제5,273,894호, 제5,637,489호, 제5,276,268호, 제5,739,082호, 제5,908,810호 및 제7,112,665호에 기재되어 있다.

[0148] 제초제 내성 유전자는 또한 효소 히드록시페닐피루베이트디옥시게나제(hydroxyphenylpyruvated dioxygenase, HPPD)를 억제하는 제초제에 내성을 부여할 수 있다. 히드록시페닐피루베이트디옥시게나제는 파라-히드록시페닐피루베이트(hydroxyphenylpyruvate, HPP)가 호모겐티세이트로 변형되는 반응을 촉매화하는 효소이다. 국제특허 출원공개 제W096/38567호, 제W099/24585호 및 제W099/24586호, 제W02009/144079호, 제W02002/046387호 또는 미국특허 제6,768,044호에 기재된 바와 같이 HPPD 억제자에 대한 식물 내성은 자연적으로 존재하는 저항성 HPPD 효소를 암호화하는 유전자, 또는 돌연변이된 또는 키메라 HPPD 효소를 암호화하는 유전자로 형질전환될 수 있다. HPPD 억제자에 의한 본래의 HPPD 효소의 억제에도 불구하고 HPPD 억제자에 대한 내성은 또한 호모겐티세이트의 형성을 가능하게 하는 특정 효소를 암호화하는 유전자로 식물을 형질전환시켜 수득될 수 있다. 그러한 식물 및 유전자는 국제특허출원공개 제W099/34008호 및 제W002/36787호에 기재되어 있다. 국제특허출원공개 제2004/024928호에 기재된 바와 같이 HPPD 억제자에 대한 식물의 내성은 또한 HPPD 내성 효소를 암호화하는 유전자에 추가하여 프리페네이트 틸수소효소(prephenate dehydrogenase, PDH) 활성을 갖는 효소를 암호화하는 유전자로 식물을 형질전환시켜 향상될 수 있다. 나아가 식물은 식물의 게놈에 HPPD 억제자를 대사하거나 분해할 수 있는 효소, 예를 들어 국제특허출원공개 제W02007/103567호 및 제W02008/150473호에 나타낸 CYP450 효소를 암호화하는 유전자를 첨가함으로써 HPPD 억제자 제초제에 보다 내성있게 만들어질 수 있다.

[0149] 더 나아가 제초제 내성 유전자는 예를 들어 문헌[Tranel and Wright (2002, Weed Science 50:700-712)] 뿐만 아니라 미국특허 제5,605,011호, 제5,378,824호, 제5,141,870호 및 제5,013,659호에 기재된 바와 같이 변이 ALS 효소(아세토히드록시산 신타제(acetohydroxyacid synthase), AHAS로도 공지됨)를 암호화한다. 설포닐우레아 내성 식물 및 이미다졸리논 내성 식물의 제조는 미국특허 제5,605,011호, 제5,013,659호, 제5,141,870호, 제5,767,361호, 제5,731,180호, 제5,304,732호, 제4,761,373호, 제5,331,107호, 제5,928,937호 및 제5,378,824호, 및 국제특허출원공개 제W096/33270호에 기재되어 있다. 다른 이미다졸리논 내성 유전자는 또한 예를 들어 국제특허출원공개 제W02004/040012호, 제W02004/106529호, 제W02005/020673호, 제W02005/093093호, 제W02006/007373호, 제W02006/015376호, 제W02006/024351호 및 제W02006/060634호에 기재되어 있다. 추가적인 설포닐우레아 및 이미다졸리논 내성 유전자는 예를 들어 국제특허출원공개 제W007/024782호 및 미국특허출원 제61/288958호에 기재되어 있다.

[0150] 곤충 저항성 유전자는 다음을 암호화하는 암호화 서열을 포함할 수 있다:

[0151] (1) 바실러스 투린지엔시스(*Bacillus thuringiensis*)로부터의 살충 결정 단백질 또는 그의 살충 부분, 예를 들어 Crickmore 등(1998, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62: 807-813)에 의해 열거되고 Crickmore 등(2005)에 의해 온라인상의 http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neill_Crickmore/Bt/의 바실러스 투린지엔시스 독성 명명법에 업데이트되는 살충 결정 단백질 또는 그의 살충 부분, 예, Cry 단백질 클래스 Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1B, Cry1C, Cry1D, Cry1F, Cry2Ab, Cry3Aa 또는 Cry3Bb의 단백질 또는 그의 살충 부분(예, 유럽특허 제1999141호 및 국제특허출원공개 제W02007/107302호) 또는 예를 들어 미국특허출원 제12/249,016호에 기재된 합성 유전자에 의해 암호화된 단백질; 또는

[0152] (2) 바실러스 투린지엔시스로부터의 제2의 다른 결정 단백질 또는 그 일부의 존재하에 살충성인 바실러스 투린지엔시스로부터의 결정 단백질 또는 그 일부, 예를 들어 Cry34 및 Cry35 결정 단백질로부터 제조된 2성분 독소 (Moellenbeck et al. 2001, *Nat. Biotechnol.* 19: 668-72; Schnepf et al. 2006, *Applied Environm. Microbiol.* 71, 1765-1774), 또는 Cry1A 또는 Cry1F 단백질 및 Cry2Aa 또는 Cry2Ab 또는 Cry2Ae 단백질로부터

제조된 2성분 독소(미국특허출원 제12/214,022호 및 유럽특허 제08010791.5호); 또는

[0153] (3) 바실러스 투린지엔시스로부터의 상이한 살충 결정 단백질의 일부를 포함하는 하이브리드 살충 단백질, 예를 들어 상기 (1)의 단백질의 하이브리드 또는 상기 (2)의 단백질의 하이브리드, 예, 옥수수 이벤트 MON89034에 의해 생성된 Cry1A.105 단백질(국제특허출원공개 제W02007/027777호); 또는

[0154] (4) 클로닝 또는 형질전환 동안 암호화 DNA에 도입된 변화로 인해 몇몇, 특히 1 내지 10개의 아미노산이 또 다른 아미노산에 의해 교체되어 표적 곤충 종에 대해 더 높은 살충 활성을 수득하고/거나 영향받는 표적 곤충 종의 범위를 확대하는 상기 (1) 내지 (3) 중 임의의 하나의 단백질, 예를 들어 옥수수 이벤트 MON863 또는 MON88017에서 Cry3Bb1 단백질, 또는 옥수수 이벤트 MIR604에서 Cry3A 단백질; 또는

[0155] (5) 바실러스 투린지엔시스 또는 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*)로부터 분비된 살충 단백질 또는 그의 살충 부분, 예를 들어 http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/vip.html에 열거된 식물성 살충(vegetative insecticidal, VIP) 단백질, 예, VIP3Aa 단백질 클래스로부터의 단백질; 또는

[0156] (6) 바실러스 투린지엔시스 또는 바실러스 세레우스로부터 분비된 제2 단백질의 존재하에 살충성인 바실러스 투린지엔시스 또는 바실러스 세레우스로부터 분비된 단백질, 예를 들어 VIP1A 및 VIP2A 단백질로부터 제조된 2성분 독소(국제특허출원공개 제W094/21795호); 또는

[0157] (7) 바실러스 투린지엔시스 또는 바실러스 세레우스로부터 분비된 상이한 단백질로부터의 일부를 포함하는 하이브리드 살충 단백질, 예를 들어 상기 (1)의 단백질의 하이브리드 또는 상기 (2)의 단백질의 하이브리드; 또는

[0158] (8) (여전히 살충 단백질을 암호화하는) 클로닝 또는 형질전환 동안 암호화 DNA에 도입된 변화로 인해 몇몇, 특히 1 내지 10개의 아미노산이 또 다른 아미노산에 의해 교체되어 표적 곤충 종에 대해 더 높은 살충 활성을 수득하고/거나 영향받는 표적 곤충 종의 범위를 확대하는 상기 (5) 내지 (7) 중 임의의 하나의 단백질, 예를 들어면 이벤트 COT102에서 VIP3Aa 단백질; 또는

[0159] (9) 바실러스 투린지엔시스로부터의 결정 단백질의 존재하에 살충성인 바실러스 투린지엔시스 또는 바실러스 세레우스로부터 분비된 단백질, 예를 들어 VIP3 및 Cry1A 또는 Cry1F로부터 제조된 2성분 독소(미국특허출원 제61/126083호 및 제61/195019호) 또는 VIP3 단백질 및 Cry2Aa 또는 Cry2Ab 또는 Cry2Ae 단백질로부터 제조된 2성분 독소(미국특허출원 제12/214,022호 및 유럽특허 제08010791.5호); 또는

[0160] (10) (여전히 살충 단백질을 암호화하는) 클로닝 또는 형질전환 동안 암호화 DNA에 도입된 변화로 인해 몇몇, 특히 1 내지 10개의 아미노산이 또 다른 아미노산에 의해 교체되어 표적 곤충 종에 대해 더 높은 살충 활성을 수득하고/거나 영향받는 표적 곤충 종의 범위를 확대하는 상기 (9)의 단백질.

[0161] 본원에서 사용되는 바와 같이 "곤충 저항성 유전자"는 예를 들어 국제특허출원공개 제W02007/080126호, 제W02006/129204호, 제W02007/074405호, 제W02007/080127호 및 제W02007/035650호에 기재된 바와 같이 식물 해충에 의한 섭취 시 해충의 성장을 억제하는 이중 가닥 RNA를 발현 시 생산하는 서열을 포함하는 형질전환 유전자를 추가로 포함한다.

[0162] 무생물 스트레스 내성 유전자는

[0163] (1) 국제특허출원공개 제W000/04173호, 제W02006/045633호, 유럽특허 제04077984.5호 또는 유럽특허 제06009836.5호에 기재된 바와 같이 식물 세포 또는 식물에서 폴리(ADP-리보스)폴리머라제(PARP) 유전자의 발현 및/또는 활성을 감소시킬 수 있는 형질전환 유전자.

[0164] (2) 예를 들어 국제특허출원공개 제W02004/090140호에 기재된 바와 같이 식물 또는 식물 세포의 PARG 암호화 유전자의 발현 및/또는 활성을 감소시킬 수 있는 형질전환 유전자.

[0165] (3) 예를 들어 유럽특허 제04077624.7호, 국제특허출원공개 제W02006/133827, PCT/EP07/002433, 유럽특허 제1999263호 또는 국제특허출원공개 제W02007/107326호에 기재된 바와 같이 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드 구조 합성 경로의 식물 작용성 효소, 예컨대 니코틴아미다제, 니코티네이트 포스포리보실트랜스퍼라제, 니코틴 산 모노뉴클레오티드 아데닐 트랜스퍼라제, 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드 신타제 또는 니코틴 아미드 포스포리보실트랜스퍼라제를 암호화하는 형질전환 유전자

[0166] 를 포함한다.

[0167] 탄수화물 생합성에 관련된 효소는 예를 들어 유럽특허 제0571427호, 국제특허출원공개 제W095/04826호, 유럽특

허 제0719338호, 국제특허출원공개 제W096/15248호, 제W096/19581호, 제W096/27674호, 제W097/11188호, 제W097/26362호, 제W097/32985호, 제W097/42328호, 제W097/44472호, 제W097/45545호, 제W098/27212호, 제W098/40503호, 제W099/58688호, 제W099/58690호, 제W099/58654호, 제W000/08184호, 제W000/08185호, 제W000/08175호, 제W000/28052호, 제W000/77229호, 제W001/12782호, 제W001/12826호, 제W002/101059호, 제W003/071860호, 제W02004/056999호, 제W02005/030942호, 제W02005/030941호, 제W02005/095632호, 제W02005/095617호, 제W02005/095619호, 제W02005/095618호, 제W02005/123927호, 제W02006/018319호, 제W02006/103107호, 제W02006/108702호, 제W02007/009823호, 제W000/22140호, 제W02006/063862호, 제W02006/072603호, 제W002/034923호, 유럽특허 제06090134.5호, 제06090228.5호, 제06090227.7호, 제07090007.1호, 제07090009.7호, 국제특허출원공개 제W001/14569호, 제W002/79410호, 제W003/33540호, 제W004/078983호, 제W001/19975호, 제W095/26407호, 제W096/34968호, 제W098/20145호, 제W099/12950, 제W099/66050호, 제W099/53072호, 미국특허 제6,734,341호, 국제특허출원공개 제W000/11192호, 제W098/22604호, 제W098/32326호, 제W001/98509호, 제W02005/002359호, 미국특허 제5,824,790호, 제6,013,861호, 국제특허출원공개 제W094/04693호, 제W094/09144호, 제W094/11520호, 제W095/35026호 또는 제W097/20936호에 기재된 것들 또는 유럽특허 제0663956호, 국제특허출원공개 제W096/01904호, 제W096/21023호, 제W098/39460호 및 제W099/24593호에 개시된 바와 같이 폴리프력토스, 특히 이눌린 및 레반 유형의 생산에 관련된 효소, 국제특허출원공개 제W095/31553호, 미국특허 제2002031826호, 제6,284,479호, 제5,712,107호, 국제특허출원공개 제W097/47806호, 제W097/47807호, 제W097/47808호 및 제W000/14249호에 개시된 바와 같이 알파-1,4-글루칸의 생산에 관련된 효소, 국제특허출원공개 제W000/73422호에 개시된 바와 같이 알파-1,6 분지된 알파-1,4-글루칸의 생산에 관련된 효소, 예를 들어 국제특허출원 제W000/47727호, 제W000/73422호, 유럽특허 제06077301.7호, 미국특허 제5,908,975호 및 유럽특허 제0728213호에 개시된 알터난의 생산과 관련된 효소, 예를 들어 국제특허출원공개 제W02006/032538호, 제W02007/039314호, 제W02007/039315호, 제W02007/039316호, 일본특허 제2006304779호 및 국제특허출원공개 제W02005/012529호에 개시된 히알루로난의 생산에 관련된 효소를 포함한다.

[0168] 본 발명은 또한

[0169] (a) 미리 정해진 부위에 이중 가닥 DNA 단절을 유도하는 단계; 및

[0170] (b) 상기 미리 정해진 부위에 결실을 갖는 식물 세포를 선택하는 단계

[0171] 를 포함하는 형질전환 식물 세포의 (핵) 계놈에서 미리 정해진 또는 미리 선택된 부위에 결실을 도입하는 방법을 제공하고, 상기 미리 정해진 부위는 자연적으로 존재하는 메가뉴클레아제에 대한 인식 부위와 상이한 뉴클레오티드 서열이고 형질전환 식물에 형질전환 유전자의 일부로 통상적으로 도입되는 뉴클레오티드 서열이고, 상기 이중 가닥 DNA 단절은 동시에 미리 정해진 부위를 인식하거나 이중 가닥 단절을 유도하는 자연적으로 존재하지 않는 단일 쇄 메가뉴클레아제 또는 한쌍의 자연적으로 존재하지 않는 메가뉴클레아제 단량체 단위체의 도입에 의해 유도된다.

[0172] 본원에 기재된 바와 같이 재고안된 메가뉴클레아제를 암호화하는 키메라 유전자를 제공하는 것 또한 본 발명의 구현예이고, 여기서 키메라 유전자는 32 위치의 S; 33 위치의 Y; 38 위치의 E; 40 위치의 R; 66 위치의 K; 80 위치의 Q; 42 위치의 T; 77 위치의 R; 68 위치의 R; 70 위치의 R; 44 위치의 Q; 24 위치의 I; 26 위치의 S; 28 위치의 S 및 30 위치의 R 또는 70 위치의 R; 44 위치의 T; 24 위치의 I; 26 위치의 S; 28 위치의 S; 30 위치의 N; 32 위치의 S; 33 위치의 R; 38 위치의 Q; 80 위치의 Q; 40 위치의 R; 66 위치의 K; 42 위치의 T; 77 위치의 R 및 68 위치의 R(재고안된 메가뉴클레아제에서 아미노산 위치에 상응하는 I-CreI의 아미노산 서열에 대한 위치는 정렬에 의해 결정될 수 있다)을 포함하는, 스캐폴드로서 I-CreI의 아미노산 서열에 상응하는 아미노산 서열을 포함하는 단백질, 예를 들어 서열번호 5 또는 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 단백질, 또는 서열번호 18의 위치 1 내지 167의 아미노산 서열 및 위치 206 내지 362의 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 암호화하는 DNA 영역에 작동가능하게 연결된, 식물에서 발현가능한 프로모터를 포함한다.

[0173] 본 발명의 수단 및 방법은 임의의 식물, 예컨대 옥수수, 담배, 시리얼 식물, 예컨대 밀, 귀리, 보리, 호밀, 쌀, 잔디, 수수, 기장 또는 사탕수수 식물에서 사용될 수 있음이 이해될 것이다. 본 발명의 방법은 또한 임의의 식물(속씨식물 또는 겉씨식물), 예컨대 면, 카놀라, 유채꽃, 대두, 야채, 감자, 템나 종(*Lemna* spp.), 니코티나 종, 아라비돕시스, 알팔파, 보리, 콩, 옥수수, 면, 아마, 완두콩, 유채꽃, 쌀, 호밀, 잇꽃, 수수, 대두, 해바라기, 담배, 밀, 아스파라거스, 비트 및 슈가비트, 브로콜리, 양배추, 당근, 콜리플라워, 셀러리, 오이, 가지, 상추, 양파, 유채꽃, 후추, 감자, 호박, 무, 시금치, 애호박, 토마토, 긴 호박, 아몬드, 사과, 살구, 바나나, 블랙베리, 블루베리, 카카오, 체리, 코코넛, 크랜베리, 대추, 포도, 자몽, 구아바, 키위, 레몬, 라임, 망고, 멜

론, 승도복승아, 오렌지, 파파야, 패션 프루트, 복승아, 땅콩, 배, 파인애플, 피스타치오, 자두, 라즈베리, 딸기, 감귤, 호두 및 수박(이에 한정되지 않음)에 적용될 수 있다.

[0174] 본 발명의 목적은 또한 본 발명의 방법에 따라 생성된 식물 세포 및 식물을 제공하는 것이다. 전통적인 육종 방법에 의해 생산되는 DNA 삽입 이벤트를 포함하는 생식 세포, 종자, 배아, 접합자 또는 체세포, 자손 또는 하이브리드 또한 본 발명의 범주 내에 포함된다. 그러한 식물은 표적 서열에 또는 표적 서열 대신에 삽입된 비상동 또는 외래 DNA 서열을 포함할 수 있고 교환 후 비상동 DNA 또는 DNA 서열의 존재에 의해 그들의 선조 식물과 상이할 것이다.

[0175] 본원에 기재된 방법에 의해 수득된 식물은 추가로 다른 식물과의 전통적인 육종 기술에 의해 교배되어 본 발명에 따라 수득된 표적화된 DNA 삽입 이벤트를 포함하는 자손 식물을 수득할 수 있다.

[0176] 본 발명에 따른 식물 및 종자는 추가로 화학적 화합물, 예를 들어 하기 목록에서 선택된 화학적 화합물로 처리될 수 있다:

[0177] · 과일/야채 제초제: 아트라진(Atrazine), 브로마실(Bromacil), 디우론(Diuron), 글리포세이트(Glyphosate), 리누론(Linuron), 메트리부진(Metribuzin), 시마진(Simazine), 트리플루랄린(Trifluralin), 플루아지프(Fluazifop), 글루포시네이트(Glufosinate), 할로설푸론 고완(Halosulfuron Gowan), 파라왓(Paraquat), 프로피자미드(Propyzamide), 세톡시דים(Sethoxydim), 부타페나실(Butafenacil), 할로설푸론(Halosulfuron), 인다지플람(Indaziflam)

[0178] · 과일/야채 살충제: 알디카르브(Aldicarb), 바실러스 투린지엔시스(Bacillus thuringiensis), 카르바릴(Carbaryl), 카르보푸란(Carbofuran), 클로르피리포스(Chlorpyrifos), 시퍼메트린(Cypermethrin), 델타메트린(Deltamethrin), 아바멕틴(Abamectin), 시플루트린/베타-시플루트린(Cyfluthrin/beta-cyfluthrin), 에스펜발러레이트(Esfenvalerate), 람다-시할로트린(Lambda-cyhalothrin), 아세퀴노실(Acequinocyl), 비페나제이트(Bifenazate), 메톡시페노지드(Methoxyfenozide), 노발루론(Novaluron), 크로마페노지드(Chromafenozyde), 티아클로프리드(Thiaclorpid), 디노테푸란(Dinotefuran), 플루아크리피림(Fluacrypyrim), 스피로디클로펜(Spirodiclofen), 감마-시할로트린(Gamma-Cyhalothrin), 스피로메시펜(Spiromesifen), 스피노사드(Spinosad), 리낙시피르(Rynaxypyr), 시아지피르(Cyazypyrr), 트리플루무론(Triflumuron), 스피로테트라맛(Spirotetramat), 이미다클로프리드(Imidacloprid), 플루벤디아미드(Flubendiamide), 티오디카르브(Thiodicarb), 메타플루미존(Metaflumizone), 설포사플로르(Sulfoxaflor), 시플루메토펜(Cyflumetofen), 시아노피라펜(Cyanopyrafen), 클로티아니딘(Clothianidin), 티아메톡삼(Thiamethoxam), 스피노토람(Spinotoram), 티오디카르브(Thiodicarb), 플로니카미드(Flonicamid), 메티오카르브(Methiocarb), 에마멕틴-벤조에이트(Emamectin-benzoate), 인독사카르브(Indoxacarb), 펜아미포스(Fenamiphos), 피리프록시펜(Pyriproxifen), 펜부타틴-옥시드(Fenbutatin-oxid)

[0179] · 과일/야채 살진균제: 아메토트라дин(Ametoctradin), 아족시스트로빈(Azoxystrobin), 벤티아밸리카르브(Benthiavalicarb), 보스칼리드(Boscalid), 캡탄(Captan), 카르벤다짐(Carbendazim), 클로로탈로닐(Chlorothalonil), 구리, 시아조파미드(Cyazofamid), 시플루웬아미드(Cyflufenamid), 시목사닐(Cymoxanil), 시프로코나졸(Cyproconazole), 시프로디닐(Cyprodinil), 디페노코나졸(Difenoconazole), 디메토모르프(Dimetomorph), 디티아논(Dithianon), 펜아미돈(Fenamidone), 펜헥사미드(Fenhexamid), 플루아지남(Fluazinam), 플루디옥소닐(Fludioxonil), 플루오피콜리드(Fluopicolide), 플루오피람(Fluopyram), 플루옥사스트로빈(Fluoxastrobin), 플럭사파록사드(Fluxapyroxad), 폴펫(Folpet), 포세틸(Fosetyl), 이프로디온(Iprodione), 이프로발리카르브(Iprovalicarb), 이소피라掮(Isopyrazam), 크레속심-메틸(Kresoxim-methyl), 만코제브(Mancozeb), 만디프로파미드(Mandipropamid), 메탈락실-메페녹삼((Metalaxyl/mefenoxam), 메티람(Metiram), 메트라페논(Metrafenone), 미클로부타닐(Myclobutanil), 펜코나졸(Penconazole), 펜티오피라드(Penthiopyrad), 피콕시스트로빈(Picoxystrobin), 프로파모카르브(Propamocarb), 프로피코나졸(Propiconazole), 프로피네브(Propineb), 프로퀴나지드(Proquinazid), 프로토이코나졸(Prothioconazole), 피라클로스트로빈(Pyraclostrobin), 피리메타닐(Pirimethanil), 퀴녹시펜(Quinoxyfen), 스피록사민(Spiroxamine), 황, 테부코나졸(Tebuconazole), 티오파네이트-메틸(Thiophanate-methyl), 트리플록시스트로빈(Trifloxystrobin)

[0180] · 시리얼 제초제: 2.4-D, 아미도설푸론(amidosulfuron), 브로목시닐(bromoxynil), 카르펜트라존-e(carfentrazone-e), 클로로톨루론(chlorotoluron), 클로로설푸론(chlorsulfuron), 클로디나讽-p(clodinafop-p), 클로피랄리드(clopyralid), 디캄바(dicamba), 디클로포-m(diclofop-m), 디플루페니칸(diflufenican), 페녹사프롭(fenoxaprop), 플로라설람(florasulam), 플루카르바존-na(flucarbazone-na), 플루페나셋(flufenacet),

플루피르설푸론-m(flupyrulsulfuron-m), 플루록시피르(fluroxypyrr), 피우르타몬(fiurtamone), 글리포세이트(glyphosate), 요오도설푸론(iodosulfuron), 이옥시닐(ioxynil), 이소프로토론(isoproturon), mcpa, 메소설푸론(mesosulfuron), 메트설푸론(metsulfuron), 펜디메탈린(pendimethalin), 피녹사텐(pinoxaden), 프로포시카르바존(propoxycarbazone), 프로설포카르브(prosulfocarb), 피록스설탈(pyroxosulam), 설포설푸론(sulfosulfuron), 티펜설푸론(thifensulfuron), 트랄코시דים(tralkoxydim), 트리아설푸론(triasulfuron), 트리베누론(tribenuron), 트리플루랄린(trifluralin), 트리토설푸론(tritosulfuron)

[0181]

· 시리얼 살진균제: 아족시스트로빈(Azoxystrobin), 비사펜(Bixafen), 보스칼리드(Boscalid), 카르벤다짐(Carbendazim), 클로로탈로닐(Chlorothalonil), 시플루펜아미드(Cyflufenamid), 시프로코나졸(Cyproconazole), 시프로디닐(Cyprodinil), 디목시스트로빈(Dimoxystrobin), 에폭시코나졸(Epoxiconazole), 펜프로피딘(Fenpropidin), 펜프로피모르프(Fenpropimorph), 플루오피람(Fluopyram), 플루옥사스트로빈(Fluoxastrobin), 플루퀸코나졸(Fluquinconazole), 플럭사피록사드(Fluxapyroxad), 이소피라зам(Isopyrazam), 크레속심-메틸(Kresoxim-methyl), 메트코나졸(Metconazole), 메트라페논(Metrafenone), 펜티오피라드(Penthiopyrad), 피록시스트로빈(Picoxystrobin), 프로클로라즈(Prochloraz), 프로피코나졸(Propiconazole), 프로퀴나지드(Proquinazid), 프로티오코나졸(Prothioconazole), 피라클로스트로빈(Pyraclostrobin), 퀴녹시펜(Quinoxyfen), 스피록사민(Spiroxamine), 테부코나졸(Tebuconazole), 티오파네이트-메틸(Thiophanate-methyl), 트리플록시스트로빈(Trifloxystrobin)

[0182]

· 시리얼 살충제: 디메토에이트(Dimethoate), 람다-시할트린(Lambda-cyhalothrin), 델타메트린(Deltamethrin), 알파-시페메트린(alpha-Cypermethrin), 베타-시플루트린(β -cyfluthrin), 비펜트린(Bifenthrin), 이미다클로프리드(Imidacloprid), 클로티아니딘(Clothianidin), 티아메톡삼(Thiamethoxam), 티아클로프리드(Thiacloprid), 아세트아미프리드(Acetamiprid), 디네토푸란(Dinetofuran), 클로르피리포스(Clorphyrifos), 피리미카르브(Pirimicarb), 메티오카르브(Methiocarb), 설포사플로르(Sulfoxaflor)

[0183]

· 옥수수 제초제: 아트라진(Atrazine), 알라클로르(Alachlor), 브로목시닐(Bromoxynil), 아세토클로르(Acetochlor), 디캄바(Dicamba), 클로피랄리드(Clopyralid), (S-)디메텐아미드(Dimethenamid), 글루포시네이트(Glufosinate), 글리포세이트(Glyphosate), 이속사플루톨(Isoxaflutole), (S-)메톨라클로르(Metolachlor), 메소트리온(Mesotrione), 니코설푸론(Nicosulfuron), 프리미설푸론(Primisulfuron), 림설푸론(Rimsulfuron), 셀코트리온(Sulcotrione), 포람설푸론(Foramsulfuron), 토프라메존(Topramezone), 템보트리온(Tembotriione), 사플루페나실(Saflufenacil), 티엔카르바존(Thienkarbazone), 플루페나셋(Flufenacet), 피록사설푼(Pyroxasulfon)

[0184]

· 옥수수 살충제: 카르보푸란(Carbofuran), 클로르피리포스(Chlorpyrifos), 비펜트린(Bifenthrin), 피프로닐(Fipronil), 이미다클로프리드(Imidacloprid), 람다-시할로트린(Lambda-Cyhalothrin), 테플루트린(Tefluthrin), 테르부포스(Terbufos), 티아메톡삼(Thiamethoxam), 클로티아니딘(Clothianidin), 스피로메시펜(Spiromesifen), 플루벤디아미드(Flubendiamide), 트리플루무론(Triflumuron), 리낙시피르(Rynaxypyrr), 델타메트린(Deltamethrin), 티오디카르브(Thiodicarb), 베타-시클루트린(β -Cyfluthrin), 시페메트린(Cypermethrin), 비펜트린(Bifenthrin), 루페누론(Lufenuron), 테부피리포스(Tebupirimphos), 에티프롤(Ethiprole), 시아지피르(Cyazypyrr), 티아클로프리드(Thiacloprid), 아세트아미프리드(Acetamiprid), 디네토푸란(Dinetofuran), 아베르멕틴(Avermectin)

[0185]

· 옥수수 살진균제: 아족시스트로빈(Azoxystrobin), 비사펜(Bixafen), 보스칼리드(Boscalid), 시프로코나졸(Cyproconazole), 디목시스트로빈(Dimoxystrobin), 에폭시코나졸(Epoxiconazole), 페니트로판(Fenitropan), 플루오피람(Fluopyram), 플루옥사스트로빈(Fluoxastrobin), 플럭사피록사드(Fluxapyroxad), 이소피라зам(Isopyrazam), 메트코나졸(Metconazole), 펜티오피라드(Penthiopyrad), 피록시스트로빈(Picoxystrobin), 프로피코나졸(Propiconazole), 프로티오코나졸(Prothioconazole), 피라클로스트로빈(Pyraclostrobin), 테부코나졸(Tebuconazole), 트리플록시스트로빈(Trifloxystrobin)

[0186]

· 쌀 제초제: 부타클로르(Butachlor), 프로파닐(Propanil), 아짐설푸론(Azimsulfuron), 벤설푸론(Bensulfuron), 시할로포(Cyhalofop), 다이무론(Daimuron), 펜트라즈아미드(Fentrazamide), 이마조설푸론(Imazosulfuron), 메페나셋(Mefenacet), 옥사지클로메폰(Oxaziclofone), 피라조설푸론(Pyrazosulfuron), 피리부티카르브(Pyributicarb), 퀸클로락(Quinclorac), 티오벤카르브(Thiobencarb), 인다노판(Indanofan), 플루페나셋(Flufenacet), 펜트라즈아미드(Fentrazamide), 할로설푸론(Halosulfuron), 옥사지클로메폰(Oxaziclofone), 벤조비시클론(Benzobicyclon), 피리프탈리드(Pyriflatalid), 페녹설탈(Penoxsulam), 비스피리(Oxaziclofone)

박(Bispyribac), 옥사디아르길(Oxadiargyl), 에톡시설푸론(Ethoxysulfuron), 프레틸라클로르(Pretilachlor), 메소트리온(Mesotriione), 테푸릴트리온(Tefuryltrione), 옥사디아존(Oxadiazone), 페녹사프롭(Fenoxyaprop), 피리미설판(Pyrimisulfan)

[0187] · 쌀 살충제: 디아지논(Diazinon), 페노부카르브(Fenobucarb), 벤푸라카르브(Benfuracarb), 부프로페진(Buprofezin), 디노테푸란(Dinotefuran), 피프로닐(Fipronil), 이미다클로프리드(Imidacloprid), 이소프로카르브(Isoprocarb), 티아클로프리드(Thiacloprid), 크로마페노지드(Chromafenozide), 클로티아닌(Clothianidin), 에티프롤(Ethiprole), 플루벤디아미드(Flubendiamide), 리나시피르(Rynaxypyr), 델타메트린(Deltamethrin), 아세트아미프리드(Acetamiprid), 티아메톡삼(Thiamethoxam), 시아지피르(Cyazypyr), 스피노사드(Spinosad), 스피노토람(Spinotoram), 에마멕틴-벤조에이트(Emamectin-Benzene), 시페메트린(Cypermethrin), 클로르피리포스(Chlorpyriphos), 에토펜프록스(Etofenprox), 카르보푸란(Carbofuran), 벤푸라카르브(Benfuracarb), 설포사플로르(Sulfoxaflo)

[0188] · 쌀 살진균제: 아족시스트로빈(Azoxystrobin), 카르벤다짐(Carbendazim), 카르프로파미드(Carpropamid), 디클로시멧(Dicloctymet), 디페노코나졸(Difenoconazole), 에디펜포스(Edifenphos), 페림존(Ferimzone), 젠타마이신(Gentamycin), 헥사코나졸(Hexaconazole), 히맥사졸(Hymexazol), 이프로벤포스(Iprobenfos, IBP), 이소프로티올란(Isoprothiolane), 이소티아닐(Isotianil), 카수가마이신(Kasugamycin), 만코제브(Mancozeb), 메토미노스트로빈(Metominostrobin), 오리사스트로빈(Orysastrobin), 펜시쿠론(Pencycuron), 프로베나졸(Probenazole), 프로피코나졸(Propiconazole), 프로피네브(Propineb), 피로퀼론(Pyroquilon), 테부코나졸(Tebuconazole), 티오파네이트-메틸(Thiophanate-methyl), 티아디닐(Tiadinal), 트리시클라졸(Tricyclazole), 트리플록시스트로빈(Trifloxystrobin), 발리다마이신(Validamycin)

[0189] · 면 제초제: 디우론(Diuron), 플루오메투론(Fluometuron), MSMA, 옥시플루오르펜(Oxyfluorfen), 프로메트린(Prometryn), 트리플루랄린(Trifluralin), 카르펜트라존(Carfentrazone), 클레토dim(Clethodim), 플루아지폼-부틸(Fluazifop-butyl), 글리포세이트(Glyphosate), 노르플루라존(Norflurazon), 펜디메탈린(Pendimethalin), 피리티오박-나트륨(Pyri thiobac-sodium), 트리플록시스설푸론(Trifloxysulfuron), 테프랄록시딘(Tepraloxydim), 글루포시네이트(Glufosinate), 플루미옥사진(Flumioxazin), 티디아주론(Thidiazuron)

[0190] · 면 살충제: 아세페이트(Acephate), 알리카르브(Aldicarb), 클로르피리포스(Chlorpyrifos), 시페메트린(Cypermethrin), 델타메트린(Deltamethrin), 아바멕틴(Abamectin), 아세트아미프리드(Acetamiprid), 에마멕틴-벤조에이트(Emamectin-Benzene), 이미다클로프리드(Imidacloprid), 인독사카르브(Indoxacarb), 람다-시 할로트린(Lambda-Cyhalothrin), 스피노사드(Spinosad), 티오디카르브(Thiodicarb), 감마-시 할로트린(Gamma-Cyhalothrin), 스피로메시펜(Spiromesifen), 피리달릴(Pyridalyl), 플로니카미드(Flonicamid), 플루벤디아미드(Flubendiamide), 트리플루무론(Triflumuron), 리나시피르(Rynaxypyr), 베타-시플루트린(Beta-Cyfluthrin), 스피로테트라맛(Spirotetramat), 클로티아닌(Clothianidin), 티아메톡삼(Thiamethoxam), 티아클로프리드(Thiacloprid), 디네토푸란(Dinetofuran), 플루벤디아미드(Flubendiamide), 시아지피르(Cyazypyr), 스피노사드(Spinosad), 스피노토람(Spinotoram), 감마-시 할로트린(gamma Cyhalothrin), 4-[(6-클로르피리딘-3-일)메틸](2,2-디플루오르에틸)아미노]푸란-2(5H)-온, 티오디카르브(Thiodicarb), 아베르멕틴(Avermectin), 플로니카미드(Flonicamid), 피리달릴(Pyridalyl), 스피로메시펜(Spiromesifen), 설포사플로르(Sulfoxaflo)

[0191] · 면 살진균제: 아족시스트로빈(Azoxystrobin), 비사펜(Bixafen), 보스칼리드(Boscalid), 카르베나짐(Carbendazim), 클로로탈로닐(Chlorothalonil), 구리, 시프로코나졸(Cyproconazole), 디페노코나졸(Difenoconazole), 디목시스트로빈(Dimoxystrobin), 에폭시코나졸(Epoxiconazole), 펜아미돈(Fenamidone), 플루아지남(Fluazinam), 플루오피람(Fluopyram), 플루옥사스트로빈(Fluoxastrobin), 플럭사피록사드(Fluxapyroxad), 이프로디온(Iprodione), 이소피라잔(Isopyrazam), 이소티아닐(Isotianil), 만코제브(Mancozeb), 마네브(Maneb), 메토미노스트로빈(Metominostrobin), 펜티오피라드(Penthiopyrad), 피콕시스트로빈(Picoxystrobin), 프로피네브(Propineb), 프로티오코나졸(Prothioconazole), 피라클로스트로빈(Pyraclostrobin), 퀸토젠(Quintozene), 테부코나졸(Tebuconazole), 테트라코나졸(Tetraconazole), 티오파네이트-메틸(Thiophanate-methyl), 트리플록시스트로빈(Trifloxystrobin)

[0192] · 대두 제초제: 알라클로르(Alachlor), 벤타존(Bentazone), 트리플루랄린(Trifluralin), 클로르이무론-에틸(Chlorimuron-Ethyl), 클로르안설람-메틸(Clorsulam-Methyl), 페녹사프롭(Fenoxyaprop), 포메사펜(Fomesafen), 플루아지폼(Fluazifop), 글리포세이트(Glyphosate), 이마자목스(Imazamox), 이마자퀸(Imazaquin), 이마제타피르(Imazethapyr), (S-)메톨라클로르(Metolachlor), 메트리부진(Metribuzin), 펜디메탈

린(Pendimethalin), 테프랄록시דים(Tepraloxoxydim), 글루포시네이트(Glufosinate)

[0193]

· 대두 살충제: 람다-시할로트린(Lambda-cyhalothrin), 메토밀(Methomyl), 이미다클로프리드(Imidacloprid), 클로티아니딘(Clothianidin), 티아메톡삼(Thiamethoxam), 티아클로프리드(Thiacloprid), 아세트아미프리드(Acetamiprid), 디네토푸란(Dinetofuran), 플루벤디아미드(Flubendiamide), 리낙시피르(Rynaxypyr), 시아지피르(Cyazypyr), 스피노사드(Spinosad), 스피노토람(Spinotoram), 에마멕틴-벤조에이트(Emamectin-Benzene), 피프로닐(Fipronil), 에티프롤(Ethiprole), 델타메트린(Deltamethrin), 베타-시플루트린(β -Cyfluthrin), 감마 및 람다 시할로트린(gamma and lambda Cyhalothrin), 4-[(6-클로르피리딘-3-일)메틸](2,2-디플루오르에틸)아미노]푸란-2(5H)-온, 스피로테트라맛, 스피노디클로펜(Spinodiclofen), 트리플루무론(Triflumuron), 플로니카미드(Flonicamid), 티오디카르브(Thiodicarb), 베타-시플루트린(beta-Cyfluthrin)

[0194]

· 대두 살진균제: 아족시스트로빈(Azoxystrobin), 비사펜(Bixafen), 보스칼리드(Boscalid), 카르벤다짐(Carbendazim), 클로로탈로닐(Chlorothalonil), 구리, 시프로코나졸(Cyproconazole), 디페노코나졸(Difenoconazole), 디목시스트로빈(Dimoxystrobin), 에폭시코나졸(Epoxiconazole), 플루아지남(Fluazinam), 플루오피람(Fluopyram), 플루옥사스트로빈(Fluoxastrobin), 플루트리아폴(Flutriafol), 플럭사피록사드(Fluxapyroxad), 이소피라зам(Isopyrazam), 이프로디온(Iprodione), 이소티아닐(Isotianil), 만코제브(Mancozeb), 마네브(Maneb), 메트코나졸(Metconazole), 메토미노스트로빈(Metominostrobin), 미클로부타닐(Myclobutanil), 펜티오피라드(Penthiopyrad), 피콕시스트로빈(Picoxystrobin), 프로피코나졸(Propiconazole), 프로피네브(Propineb), 프로티오코나졸(Prothioconazole), 피라클로스트로빈(Pyraclostrobin), 테부코나졸(Tebuconazole), 테트라코나졸(Tetraconazole), 티오파네이트-메틸(Thiophanate-methyl), 트리플록시스트로빈(Trifloxystrobin)

[0195]

· 슈가비트 제초제: 클로리다존(Chloridazon), 데스메디팜(Desmedipham), 에토푸메세이트(Ethofumesate), 펜메디팜(Phenmedipham), 트리알레이트(Triallate), 클로피랄리드(Clopyralid), 플루아지폼(Fluazifop), 레나실(Lenacil), 메타미트론(Metamitron), 퀸메락(Quinmerac), 시클록시דים(Cycloxydim), 트리플루설푸론(Triflusulfuron), 테프랄록시דים(Tepraloxoxydim), 퀴잘로폼(Quizalofop)

[0196]

· 슈가비트 살충제: 이미다클로프리드(Imidacloprid), 클로티아니딘(Clothianidin), 티아메톡삼(Thiamethoxam), 티아클로프리드(Thiacloprid), 아세트아미프리드(Acetamiprid), 디네토푸란(Dinetofuran), 델타메트린(Deltamethrin), 베타-시플루트린(β -Cyfluthrin), 감마/람다 시할로트린(gamma/lambda Cyhalothrin), 4-[(6-클로르피리딘-3-일)메틸](2,2-디플루오르에틸)아미노]푸란-2(5H)-온, 테플루트린(Tefluthrin), 리낙시피르(Rynaxypyr), 시악시피르(Cyaxypyr), 피프로닐(Fipronil), 카르보푸란(Carbofuran)

[0197]

· 카놀라 제초제: 시클로피랄리드(Clopyralid), 디클로폼(Diclofop), 플루아지폼(Fluazifop), 글루포시네이트(Glufosinate), 글리포세이트(Glyphosate), 메타자클로르(Metazachlor), 트리플루랄린(Trifluralin) 에타메트설푸론(Ethametsulfuron), 퀸메락(Quinmerac), 퀴잘로폼(Quizalofop), 클레토dim(Clethodim), 테프랄록시דים(Tepraloxoxydim)

[0198]

· 카놀라 살진균제: 아족시스트로빈(Azoxystrobin), 비사펜(Bixafen), 보스칼리드(Boscalid), 카르벤다짐(Carbendazim), 시프로코나졸(Cyproconazole), 디페노코나졸(Difenoconazole), 디목시스트로빈(Dimoxystrobin), 에폭시코나졸(Epoxiconazole), 플루아지남(Fluazinam), 플루오피람(Fluopyram), 플루옥사스트로빈(Fluoxastrobin), 플루실라졸(Flusilazole), 플럭사피록사드(Fluxapyroxad), 이프로디온(Iprodione), 이소피라зам(Isopyrazam), 메피왓-클로라이드(Mepiquat-chloride), 메트코나졸(Metconazole), 메토미노스트로빈(Metominostrobin), 파클로부트라졸(Pacllobutrazole), 펜티오피라드(Penthiopyrad), 피콕시스트로빈(Picoxystrobin), 프로클로라즈(Prochloraz), 프로티오코나졸(Prothioconazole), 피라클로스트로빈(Pyraclostrobin), 테부코나졸(Tebuconazole), 티오파네이트-메틸(Thiophanate-methyl), 트리플록시스트로빈(Trifloxystrobin), 빈클로졸린(Vinclozolin)

[0199]

· 카놀라 살충제: 카르보푸란(Carbofuran), 티아클로프리드(Thiacloprid), 델타메트린(Deltamethrin), 이미다클로프리드(Imidacloprid), 클로티아니딘(Clothianidin), 티아메톡삼(Thiamethoxam), 아세트아미프리드(Acetamiprid), 이네토피란(Dinetofiran), 베타-시플루트린(β -Cyfluthrin), 감마 및 람다 시할로트린, 타우-플루발러리에이트(tau-Fluvalerate), 에티프롤(Ethiprole), 스피노사드(Spinosad), 스피노토람(Spinotoram), 플루벤디아미드(Flubendiamide), 리낙시피르(Rynaxypyr), 시악시피르(Cyaxypyr), 4-[(6-클로르피리딘-3-일)메틸](2,2-디플루오르에틸)아미노]푸란-2(5H)-온.

- [0200] 본원에서 사용된 바와 같이 "포함하는"은 지칭되는 바와 같은 기술된 특징, 정수, 단계 또는 성분의 존재를 특정하는 것으로 해석되지만 하나 이상의 특징, 정수, 단계 또는 성분, 또는 그의 군의 존재 또는 첨가를 불가능하게 하는 것은 아니다. 그러므로 예를 들어 뉴클레오티드 또는 아미노산의 서열을 포함하는 핵산 또는 단백질은 실제로 인용된 것들보다 더 많은 뉴클레오티드 또는 아미노산을 포함할 수 있다. 즉 더 큰 핵산 또는 단백질에 들어있을 수 있다. 기능적으로 또는 구조적으로 정의된 DNA 영역을 포함하는 키메라 유전자는 추가적인 DNA 영역 등을 포함할 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이 "식물 일부"는 임의의 식물 기관 또는 식물 조직, 예컨대 열매, 종자, 배아, 분열(meristematic) 영역, 캘러스 조직, 잎, 뿌리, 짹, 꽃, 배우체, 포자체, 꽃가루 및 소포자(이에 한정되지 않음)를 포함한다.
- [0201] 본 발명의 목적을 위해 %로 표현되는, 2개의 관련된 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열의 "서열 동일성"은 2개의 최적으로 정렬된 서열에서 동일한 잔기를 갖는 위치의 수(x 100)를 비교된 위치의 수로 나눈 것을 지칭한다. 차이, 즉 정렬에서 잔기가 하나의 서열에는 존재하나 다른 서열에는 존재하지 않는 위치는 동일하지 않은 잔기를 갖는 위치로 여겨진다. 2개의 서열의 정렬은 니들만과 운슈 알고리즘에 의해 수행된다(Needleman and Wunsch 1970). 상기의 컴퓨터 보조의 서열 정렬은 표준 소프트웨어 프로그램, 예를 들어 50의 캡 크리에이션 페널티(gap creation penalty) 및 3의 캡 익스텐션 페널티(gap extension penalty)를 갖는 표준 점수 행렬을 사용하는 위스콘신 패키지 버전 10.1(유전학 컴퓨터 그룹(Genetics Computer Group), 미국 위스콘신주 매디슨 소재)의 일부인 GAP를 사용하여 편리하게 수행될 수 있다.
- [0202] RNA 분자의 뉴클레오티드 서열이 상응하는 DNA 분자의 뉴클레오티드 서열을 참조하여 정의될 때마다 뉴클레오티드 서열 중의 티민(T)이 우라실(U)에 의해 교체되어야 한다는 것은 분명할 것이다. RNA 분자에 대해 참조되는지 또는 DNA 분자에 대해 참조되는지는 적용의 맥락으로부터 분명할 것이다.
- [0203] 하기 비제한 예는 식물 게놈에 이미 존재하는 바 암호화 영역의 부위에서 식물을 변경시키기 위한 재고안된 메가뉴클레아제의 용도를 기재한다.
- [0204] 실시예에서 달리 기술되지 않으면 모든 재조합 DNA 기술은 문헌[Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY and in Volumes 1 and 2 of Ausubel et al. (1994) Current Protocols in Molecular Biology, Current Protocols, USA]에 기재된 바와 같은 표준 프로토콜에 따라 수행된다. 식물 분자 작업을 위한 표준 물질 및 방법은 문헌[Plant Molecular Biology Labfax (1993) by R.D.D. Croy, jointly published by BIOS Scientific Publications Ltd (UK) and Blackwell Scientific Publications, UK]에 기재된다. 표준 분자 생물학 기술에 대한 다른 참조는 문헌[Sambrook and Russell (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, Volumes I and II of Brown (1998) Molecular Biology LabFax, Second Edition, Academic Press (UK)]을 포함한다. 폴리머라제 연쇄 반응을 위한 표준 물질 및 방법은 문헌[Dieffenbach and Dveksler (1995) PCR Primer: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, and in McPherson et al. (2000) PCR - Basics: From Background to Bench, First Edition, Springer Verlag, Germany]에서 발견될 수 있다.
- [0205] 본원에 언급된 모든 특허, 특허출원 및 특허공개는 모든 목적을 위해 전체가 참조로 본원에 혼입된다.
- [0206] 상세한 설명 및 실시예에 걸쳐 하기 서열에 대해 참조가 이루어진다:
- [0207] 서열번호 1: 재고안된 메가뉴클레아제 BAY 39/BAY 40 인식 부위의 뉴클레오티드 서열
- [0208] 서열번호 2: 재고안된 메가뉴클레아제 BAY 39/BAY 40 인식 부위의 상보체의 뉴클레오티드 서열
- [0209] 서열번호 3: 바 유전자 암호화 영역의 뉴클레오티드 서열
- [0210] 서열번호 4: 한 쌍의 이형이량체 메가뉴클레아제 BAY 39 및 BAY 40을 발현하는 벡터 pCV177의 뉴클레오티드 서열
- [0211] 서열번호 5: 메가뉴클레아제 BAY 39/40 단량체 단위체 2("40")의 아미노산 서열
- [0212] 서열번호 6: 메가뉴클레아제 BAY 39/40 단위체 1("39")의 아미노산 서열
- [0213] 서열번호 7: BAY 39/40 인식 부위 주위의 바 암호화 영역의 PCR 앰플리콘의 뉴클레오티드 서열(대조군)
- [0214] 서열번호 8: BAY 39/40 인식 부위 주위의 바 암호화 영역의 PCR 앰플리콘의 뉴클레오티드 서열(PPT 내성 라인)

- [0215] 서열번호 9: BAY 39/40 인식 부위 주위의 바 암호화 영역의 PCR 앰플리콘의 뉴클레오티드 서열(PPT 민감성 라인 1)
- [0216] 서열번호 10: BAY 39/40 인식 부위 주위의 바 암호화 영역의 PCR 앰플리콘의 뉴클레오티드 서열(PPT 민감성 라인 2)
- [0217] 서열번호 11: BAY 39/40 인식 부위 주위의 바 암호화 영역의 PCR 앰플리콘의 뉴클레오티드 서열(PPT 민감성 라인 3)
- [0218] 서열번호 12: BAY 39/40 인식 부위 주위의 바 암호화 영역의 PCR 앰플리콘의 뉴클레오티드 서열(PPT 민감성 라인 4)
- [0219] 서열번호 13: BAY 39/40 인식 부위 주위의 바 암호화 영역의 PCR 앰플리콘의 뉴클레오티드 서열(PPT 민감성 라인 5)
- [0220] 서열번호 14: BAY 39/40 인식 부위 주위의 바 암호화 영역의 PCR 앰플리콘의 뉴클레오티드 서열(PPT 민감성 라인 6)
- [0221] 서열번호 15: BAY 39/40 인식 부위 주위의 바 암호화 영역의 PCR 앰플리콘의 뉴클레오티드 서열(PPT 민감성 라인 7)
- [0222] 서열번호 16: I-CreI의 자연적인 변이의 아미노산 서열(단량체)
- [0223] 서열번호 17: 단일 쇄 BAY 39/BAY 40 메가뉴클레아제를 발현하는 벡터 pCV170의 뉴클레오티드 서열
- [0224] 서열번호 18: 단일 쇄 BAY 39/BAY 40 메가뉴클레아제의 아미노산 서열
- [0225] 실시예
- [0226] 본원에 기재된 모든 재고안된 메가뉴클레아제는 프리시즌 바이오사이언시즈 인코포레이티드(Precision Biosciences Inc., 미국 노쓰캐롤라이나주 27713 리서치 트라이앵글 파크 티더블유 알렉산더 드라이브 104 소재)에 의해 고안되었다.
- [0227] **실시예 1: 본 발명에 따른 재고안된 메가뉴클레아제를 암호화하는 T-DNA 벡터의 기재**
- [0228] 종래 재조합 DNA 기술을 사용하여 이형이량체로서 서열번호 1 또는 2의 뉴클레오티드 서열을 인식하는 한 쌍의 재고안된 메가뉴클레아제를 암호화하는 키메라 유전자(hd BAY 39/40)를 구축하였고 다음의 작동가능하게 연결된 DNA 절편을 포함한다:
- CaMV35S 프로모터를 암호화하는 DNA 영역(서열번호 6의 뉴클레오티드 위치 1516 내지 뉴클레오티드 위치 1933, 예를 들어 서열번호 4의 뉴클레오티드 위치 1516 내지 뉴클레오티드 위치 1997)
 - N-말단에서 SV40 NLS에 작동가능하게 연결된, BAY 39/40 단량체 단위체 2 암호화 영역을 포함하는 DNA 영역(서열번호 4의 뉴클레오티드 위치 2004 내지 2525, 예컨대 종료 코돈 또는 종료 코돈을 제외한 2522)
 - 노발린 신타제 유전자의 3' 말단 전사 종결 및 폴리아데닐화에 관련된 DNA 영역(서열번호 4의 뉴클레오티드 위치 2530 내지 2783)
 - CaMV35S 프로모터를 암호화하는 DNA 영역(서열번호 4의 뉴클레오티드 위치 4397 내지 뉴클레오티드 위치 4814, 예를 들어 서열번호 4의 뉴클레오티드 위치 4397 내지 뉴클레오티드 위치 4878)
 - N-말단에서 SV40 NLS에 작동가능하게 연결된, BAY 39/40 단량체 단위체 1을 포함하는 DNA 영역(서열번호 4의 뉴클레오티드 위치 4885 내지 5405, 예컨대 종료 코돈 또는 종료 코돈을 제외한 5403)
 - 노발린 신타제 유전자로부터의 3' 말단 전사 종료 및 폴리아데닐화에 관련된 DNA 영역(서열번호 4의 뉴클레오티드 위치 5411 내지 5664)
- [0235] 생성된 플라스미드의 뉴클레오티드 서열은 서열번호 4로 제시된다.
- [0236] 종래 재조합 DNA 기술을 사용하여 서열번호 1 또는 2의 뉴클레오티드 서열을 인식하는 단일 쇄의 재고안된 메가뉴클레아제를 암호화하는 키메라 유전자(sc BAY 39/40)를 구축하였고 다음의 작동가능하게 연결된 DNA 절편을 포함한다:

- [0237] · CaMV35S 프로모터를 암호화하는 DNA 영역(서열번호 17의 뉴클레오티드 위치 691 내지 뉴클레오티드 위치 1223)
- [0238] · 아라비돕시스 탈리아나 *rbcS* ATS1A 유전자로부터의 리더 서열; 서열번호 17의 뉴클레오티드 위치 1224 내지 뉴클레오티드 위치 1266; Krebbers et al. 1988 Plant Molecular Biology 11:745-759
- [0239] · 담배에서의 발현에 최적화된, N-말단에서 SV40 NLS에 작동가능하게 연결된 단일 쇄 BAY 39/40 메가뉴클레아제의 N-말단 영역을 암호화하는 DNA 영역
- [0240] · 감자의 광 유도가능한 조직 특이적인 ST-LS1 유전자의 제2 인트론을 암호화하는 DNA 영역(서열번호 17의 뉴클레오티드 위치 1606 내지 1794; X04753; Eckes et al. 1986 Mol. Gen. Genet. 205, 14-22)
- [0241] · 담배에서의 발현에 최적화된, 링커 서열을 암호화하는 DNA 영역(서열번호 17의 뉴클레오티드 위치 1757 내지 2070)을 포함하는, 단일 쇄 BAY 39/40 메가뉴클레아제의 C-말단 영역을 암호화하는 DNA 영역(서열번호 17의 뉴클레오티드 위치 1795 내지 1798, 예컨대 종료 코돈 또는 종료 코돈을 제외한 2541)
- [0242] · 35S 유전자로부터의 3' 말단 종료 및 폴리아데닐화에 관련된 DNA 영역(서열번호 17의 뉴클레오티드 위치 2545 내지 2678)
- [0243] 생성된 플라스미드의 뉴클레오티드 서열은 서열번호 17로 제시된다.
- [0244] **실시예 2: 표적 담배 라인의 기재 및 분석**
- [0245] 이중 가닥 DNA 단절 도입을 위한 분석을 개발하기 위해 식물에서 발현가능한 프로모터의 제어 하에 바 암호화 영역을 포함하는, 포스피노트리신(phosphinotricin, PPT) 내성 담배 형질전환 식물 라인을 선택하였다.
- [0246] hd BAY 39/40 메가뉴클레아제를 암호화하는 키메라 유전자가 안정적으로 또는 일시적으로 히그로마이신에 저항성을 부여하는 히그로마이신포스포트랜스퍼라제를 포함하는, 식물에서 발현가능한 키메라 유전자와 함께 도입된 형질전환에서 상기 형질전환 라인을 시작 물질로 사용하였다.
- [0247] BAY 39/40 이형이량체를 암호화하는 식물에서 발현가능한 키메라 유전자의 발현을 통해 바 암호화 영역의 인식 부위에 이중 가닥 DNA 단절 유도 후, 단절은 복구 DNA 부재 하에 비상동 말단결합에 의해 복구될 수 있어 하나 이상의 염기 쌍의 결실 또는 삽입을 초래하여 바 암호화 영역을 파괴함으로써 포스피노트리신 민감성을 초래한다.
- [0248] 포스피노트리신 민감성 및 히그로마이신 저항성을 나타내는 몇몇 식물 라인을 선택하였다. 이들 식물 라인으로부터 DNA 절편을 바 암호화 영역의 인식 부위(서열번호 1 또는 2)의 양 옆에 위치한 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 증폭하여 앰플리콘의 뉴클레오티드 서열을 결정하였다. 상이한 뉴클레오티드 서열의 정렬은 도 5에 제시하였다.
- [0249] PPT 민감성 식물 라인(3 내지 9)에서 BAY 39/40의 인식 부위는 결실(3 내지 8) 또는 삽입(9)에 의해 변경된 반면 PPT 저항성 식물 라인(2)에서는 변경이 발견되지 않았음이 분명하다.
- [0250] 그러므로 이들 실험으로부터 hd BAY 39/40이 미리 선택된 부위에서 절단 활성을 나타낸다고 결론지을 수 있다.
- [0251] **실시예 3: 비상동 말단결합에 의한 표적화된 삽입**
- [0252] 선택가능한 표지, 예를 들어 2mepsp 암호화 영역을 포함하는 식물에서 발현가능한 키메라 유전자를 포함하는 복구 DNA와 함께 hd BAY 39/40 메가뉴클레아제를 암호화하는 키메라 유전자를 포함하는 pCV177 또는 sc BAY 39/40을 암호화하는 키메라 유전자를 포함하는 pCV170를 (표적 영역과의 추가적인 상동성 없이) 게놈에 통합된, 식물에서 발현가능한 키메라 바 유전자를 포함하는 식물 세포로 공동 전달하는 것 및 선택 화합물, 예를 들어 글리포세이트에 내성인 포스피노트리신 민감성 식물의 선택은 복구 DNA 서열이 바 암호화 영역에 통합된 식물 세포의 확인을 가능하게 한다.
- [0253] **실시예 4: 상동 말단결합에 의한 표적화된 삽입**
- [0254] 선택가능한 표지, 예를 들어 서열번호 3의 뉴클레오티드 1 내지 뉴클레오티드 132의 바 암호화 영역과 서열 유사성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 측면 서열에 의해 상류에 이웃하고 서열번호 3의 뉴클레오티드 154 내지 뉴클레오티드 552의 바 암호화 영역에 서열 유사성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 측면 서열에 의해 하류에 이웃한 2mepsp 암호화 영역을 포함하는, 식물에서 발현가능한 키메라 유전자를 포함하는 복구 DNA와

함께 hd BAY 39/40 메가뉴클레아제를 암호화하는 키메라 유전자를 포함하는 pCV177 또는 sc BAY 39/40를 암호화하는 키메라 유전자를 포함하는 pCV170를 계놈에 통합된, 식물에서 발현가능한 키메라 바 유전자를 포함하는 식물 세포에 공동 전달하는 것 및 선택 화합물, 예를 들어 글리포세이트에 내성인 포스피노트리신 민감성 식물을 선택하는 것은 복구 DNA가 바 암호화 영역에 통합된 식물 세포의 확인을 가능하게 한다.

[0255] **실시예 5: 면에서 BAY 39/40 단일 쇄 및 이형이량체 메가뉴클레아제를 사용한 표적화된 이중 가닥 DNA 단절 유도**

[0256] CSVMV 프로모터 조절 하에 바 유전자를 포함하는 키메라 유전자를 포함하는 PPT 저항성 면 식물로부터의 배발생 캘러스를 2g/L 활성 탄소를 갖는 M100 기질(MS 염, B5 비타민, MES 0.5g/L, MgCl₂.6H₂O 0.94g/L, 젤라이트 2g/L, 글루코스 30 g/L, pH 5.8)에서 성장시켰다. 이들 캘러스를 문헌[Sanford et al., 1992]에 기재된 바와 같이 본질적으로 바이오라드(BioRAD) PPS_1000/He 생물학적 입자(Biostatic Particle) 전달 시스템을 사용한 미세입자 충격을 가하였고 이에 따라 입자는 이형이량체 BAY 39/40 메가뉴클레아제를 암호화하는 pCV177 벡터 또는 단일 쇄 BAY 39/40 메가뉴클레아제를 암호화하는 pCV170 벡터로 코팅되었다. 선택가능한 표지 유전자로서 글리포세이트 내성을 부여하는 식물에서 발현가능한 프로모터의 제어 하에 2mepsp 유전자를 포함하는 벡터와 함께 메가뉴클레아제 벡터를 동시 전달하였다. 충격 후 캘러스를 1mM 글리포세이트를 포함하는 배지에 옮겨 약 3000개의 글리포세이트 저항성 배발생 캘러스를 초래하였다. 이들 중 PPT 민감성인 85 이벤트가 나타났고 이들 중 79 이벤트를 추가로 분자적으로 분석하였다. 이들 79 이벤트를 표적 부위에 이웃하는 프라이머를 사용한 PCR 및 PCR 산물의 후속 서열분석에 의해 유전자형에 대해 특징지었다. PCR 산물이 없는 것은 표적 부위 주위의 큰 결실의 표시이다(표 1).

표 1

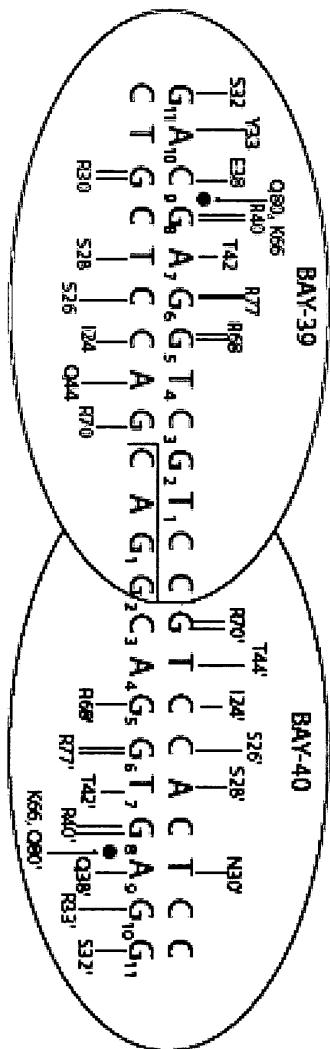
PPT 민감성이고 글리포세이트 저항성인 형질전환 이벤트의 특성화

pCV170(sc) 수득가능한 PCR 산물	이벤트 수	표적 부위에서의 변화	이벤트 수
없음	11	큰 결실	11
있음	8	돌연변이 없음	6
		교체/삽입	1
		결실	1
pCV177(hd) 수득가능한 PCR 산물	이벤트 수	표적 부위에서의 변화	이벤트 수
없음	33	큰 결실	33
있음	27	돌연변이 없음	19
		교체/삽입	4
		결실	4

[0258] 그러므로 이들 결과는 단일 쇄 및 이형이량체 BAY 39/40 메가뉴클레아제 둘 다 원하는 위치에서 표적화된 이중 가닥 DNA 단절을 유도할 수 있고 표적화된 결실, 교체 및 삽입 이벤트가 면에서 이들 메가뉴클레아제를 사용하여 수득될 수 있음을 입증한다.

도면

도면1



도면2

Mat Al a pro lvs lvs lvs Arg lvs Val His Mat Ann Thr lvs Tvr Ann

Met	Ala	Pro	Lys	Lys	Lys	Arg	Lys	Val	His	Met	Asn	Thr	Lys	Tyr	Asn
1										10				15	
Glu	Glu	Phe	Ile	Leu	Leu	Tyr	Leu	Ala	Gly	Phe	Val	Asp	Gly	Asp	Gly
										25				30	
Ile	Ile	Ala	Ser	Ile	Ser	Pro	Arg	Gln	Ser	Tyr	Lys	Phe	Lys	His	Glu
										35				45	
Ile	Arg	Leu	Thr	Phe	Gln	Val	Thr	Gln	Lys	Thr	Gln	Arg	Arg	Trp	Phe
										50				60	
Ileu	Asp	Glu	Leu	Val	Asp	Glu	Ile	Gly	Val	Gly	Lys	Val	Arg	Asp	Arg
										65				80	
Gly	Ser	Val	Ser	Asp	Tyr	Arg	Leu	Ser	Gln	Ile	Lys	Pro	Ileu	His	Asn
										85				95	
Phe	Leu	Thr	Gln	Leu	Gln	Pro	Phe	Leu	Glu	Ileu	Lys	Gln	Lys	Gln	Ala
										100				110	
Asn	Leu	Val	Leu	Lys	Ile	Ile	Glu	Gln	Ileu	Pro	Ser	Ala	Lys	Glu	Ser
										115				125	
Pro	Asp	Lys	Phe	Leu	Glu	Val	Cys	Thr	Trp	Val	Asp	Gln	Ile	Ala	Ala
										130				140	
Ileu	Asn	Asp	Ser	Lys	Thr	Arg	Lys	Thr	Thr	Ser	Glu	Thr	Val	Arg	Ala
										145				155	
Val	Leu	Asp	Ser	Leu	Ser	Glu	Lys	Lys	Lys	Ser	Ser	Pro			
										160					
										165				170	

도면4

Met Ala Lys Pro Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val His Met Asn Thr Lys
 1 5 10 15
 Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp
 20 25 30
 Gly Ser Ile Ile Ala Ser Ile Ser Pro Arg Gln Ser Tyr Lys Phe Lys
 35 40 45
 His Gln Leu Arg Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln Lys Thr Gln Arg Arg
 50 55 60
 Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Lys Val Arg
 65 70 75 80
 Asp Arg Gly Ser Val Ser Asp Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu
 85 90 95
 His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys
 100 105 110
 Gln Ala Asn Leu Val Ile Leu Lys Ile Ile Gln Leu Pro Ser Ala Lys
 115 120 125
 Glu Ser Pro Asp Lys Phe Ile Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile
 130 135 140
 Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Ser Glu Thr Val
 145 150 155 160
 Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly Gly Leu Ser Pro
 165 170 175
 Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ser Ser Ser Ser Pro Gly Ser
 180 185 190
 Gly Ile Ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Thr Lys Ser Lys Glu Phe
 195 200 205
 Ieu Ieu Tyr Ieu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala
 210 215 220
 Ser Ile Ser Pro Asn Gln Ser Arg Lys Phe Lys His Gln Leu Arg Leu
 225 230 235 240
 Thr Phe Thr Val Thr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys
 245 250 255
 Ieu Val Asp Glu Ile Gly Val Lys Val Arg Asp Arg Gly Ser Val
 260 265 270
 Ser Asp Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Ile Thr
 275 280 285
 Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val
 290 295 300
 Ieu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys
 305 310 315 320
 Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp
 325 330 335
 Ser Lys Thr Arg Lys Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp
 340 345 350
 Ser Leu Ser Glu Lys Lys Ser Ser Pro
 355 360

도면5

1. cggtaacttccgtaccggccggcaggaaaccggcaggatgtggacggaccctcggtctggggac
 2. cggtaacttccgtaccggccggcaggaaaccggcaggatgtggacggaccctcggtctggggac
 3. cggtaacttccgtaccggccggcaggaaaccggcaggatgtggacggaccctcggtctggggac
 4. cggtaacttc-----cgtccgtctggggac
 5. cggtaacttccgtaccggccggcaggaaaccggcaggatgtggacggaccctcggtctggggac
 6. cggtaacttccgtaccggccggcaggaaaccggcaggatgtggacggaccctcggtctggggac
 7. cggtaacttccgtaccggccggcaggaaaccggcaggatgtggacggaccctcggtctggggac
 8. cggtaacttccgtaccggccggcaggaaaccggcaggatgtggacggaccctcggtctggggac
 9. cggtaacttccgtaccggccggcaggaaaccggcaggatgtggacggaccctcggtctggggac

a

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Bayer CropScience N.V.

<120> Methods and means to modify a plant genome at a nucleotide sequence commonly used in plant genome engineering

<130> BCS10-2010-KRw1

<140> PCT/EP2011/002895

<141> 2011-06-07

<150> EP10005941.9

<151> 2010-06-09

<150> US61/355,849

<151> 2010-06-17

<160> 18

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Recognition site for BAY39/40

<400> 1

gacgaggctcg tccgtccact cc 22

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Complement of the recognition site for BAY39/40

<400> 2

ggagtggacg gacgacctcg tc 22

<210> 3

<211> 552

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Coding region of the phosphinotricin acetyltransferase gene

derived from *S. hygroscopicus* (bar)

<400> 3

atgagcccag aacgacgccc ggccgacatc cgccgtgccca ccgaggcgga catgccggcg 60

gtctgcacca tcgtcaacca ctacatcgag acaagcacgg tcaacttccg taccgagccg 120

caggAACCGC aggagtggac ggacgaccc tcgtccgtcc gggagcgcta tccctggctc 180

gtcggcgagg tggacggcga ggtcgccggc atcgctacg cggccctgt gaaggcacgc 240

aacgcctacg actggacggc cgagtcgacc gtgtacgtct ccccccggca ccagcggacg 300

ggactgggct ccacgctcta cacccacctg ctgaagtccc tggaggcaca gggcttcaag 360

agcgtggtcg ctgtcatcggt gctgccaac gacccgagcg tgccatgca cgaggcgctc 420

ggatatgccc ccccgccat gtcggccggc gccggcttca agcacggaa ctggcatgac 480

gtgggtttct ggcagctgga cttcagcctg ccgttaccgc cccgtccggc cctggccgtc 540

accgagatct ga 552

<210> 4

<211> 6234

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Plasmid pCV177

<220><221> CDS

<222> (2004)..(2522)

<220><221> CDS

<222> (4885).. (5403)

<400> 4

gacgaaaggc cctcggtata cgcttatttt tataggtaa tgtcatgata ataatggttt 60

cttagacgtc aggtggact tttcgggaa atgtgcggg aaccctatt tgtttatttt 120

tctaaataca ttcaaataatg tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat 180

aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc aacattccg tgtgcctt attcccttt 240
 ttgcggcatt ttgccttcct gttttgctc acccagaaac gctggtaaaa gtaaaagatg 300
 ctgaagatca gtgggtgca cgagtggtt acatgaaact ggatctcaac agcgtaaga 360
 tccttgagag tttcgcccc gaagaacgtt ttccaatgtat gagcactttt aaagttctgc 420
 tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg ccggcaaga gcaactcggt cgccgcatac 480
 actattctca gaatgacttg gttgagtaact caccagtac agaaaagcat cttacggatg 540
 gcatgacagt aagagaatta tgcagtgcgt ccataaccat gagtgataac actgcggca 600
 acttacttct gacaacgatc ggaggaccga aggagctaac cgcttttg cacaacatgg 660
 gggatcatgt aactgcctt gatcggtggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg 720
 acgagcgtga caccacgatc cctgttagcaa tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg 780
 gcgaactact tactctagct tccggcaac aattaataga ctggatggag gcggataaag 840
 ttgcaggacc acttctgcgc tcggcccttc cggctggctg gtttattgct gataaatctg 900
 gagccggtga gcgtgggtct cgcggatca ttgcagcact gggccagat ggtaagccct 960
 cccgtatcgt agttatctac acgacgggaa gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac 1020
 agatcgctga gataggtgcc tcactgatta agcattgta actgtcagac caagttact 1080
 catatataact ttagattgat taaaacttc attttaatt taaaaggatc taggtgaaga 1140

tcctttgc tagcgagagg cggttgcgt attggctaga gcagctgcc aacatgggg 1200

agcacgacac tctcgctac tccaagaata tcaaagatac agtctcagaa gaccaaaggg 1260

ctattgagac tttcaacaa aggtaatat cggaaacct cctcgattc cattgccag 1320

ctatctgtca ctcatcaaa aggacagtag aaaaggaagg tggcacctac aaatgccatc 1380

attgcgataa aggaaggct atcggtcaag atgcctctgc cgacagtgg cccaaagatg 1440

gacccccacc cacgaggagc atcggtgaaa aagaagacgt tccaaccacg tcttcaaagc 1500

aagtggattt atgtgaacat ggtggagcac gacactctcg tctactccaa gaatatcaaa 1560

gatacagtct cagaagacca aaggctatt gagactttc aacaaagggt aatatcgga 1620

aacccctcg gattccattt cccagctatc tgcacttca taaaaggac agtagaaaaag 1680

gaaggtggca cctacaaatg ccatcattgc gataaaggaa aggctatcgt tcaagatgcc 1740

tctggcaca gtggccaa agatggaccc ccacccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa 1800

gacgttccaa ccacgtttc aaagcaagtg gattgatgtg atatctccac tgacgtaagg 1860

gatgacgcac aatcccacta tccttcgcaa gacccttcct ctatataagg aagttcattt 1920

catttggaga ggacacgctg aaatcaccag tctctctta caaatctatc tctctcgagc 1980

tttgcagat ctgtcgaacc acc atg gca ccg aag aag aag cgc aag gtg cat 2033

Met Ala Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val His

1

5

10

atg aac acc aag tac aac aag aag ttc ctg ctc tac ctg gcg gyc ttc	2081		
Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Lys Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe			
15	20	25	
gtg gac ggg gac ggc tcc atc atc gcc tcc atc tcc ccg aac cag tcc	2129		
Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Ser Ile Ser Pro Asn Gln Ser			
30	35	40	
cgc aag ttc aag cat cag ctg cgc ctc acc ttc acc gtc acc cag aag	2177		
Arg Lys Phe Lys His Gln Leu Arg Leu Thr Phe Thr Val Thr Gln Lys			
45	50	55	
aca cag cgc cgt tgg ttc ctc gac aag ctg gtg gac aaq atc ggg gtg	2225		
Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Lys Ile Gly Val			
60	65	70	
ggc aag gtg cgc gac cgc ggc agc gtc tcc gac tac cgc ctg tcc cag	2273		
Gly Lys Val Arg Asp Arg Gly ser Val Ser Asp Tyr Arg Leu Ser Gln			
75	80	85	90
atc aag cct ctg cac aac ttc ctg acc cag ctc cag ccc ttc ctg aag	2321		
Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys			
95	100	105	
ctc aag cag aag cag gcc aac ctc gtg ctg aag atc atc gag cag ctg	2369		
Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu			
110	115	120	
ccc tcc gcc aag gaa tcc ccg gac aag ttc ctg gag gtg tgc acc tgg	2417		
Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp			
125	130	135	
gtg gac cag atc gcc gct ctg aac gac tcc aag acc cgc aag acc act	2465		
Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr			
140	145	150	
tcc gag acc gtc cgc gcc gtt cta gac agt ctc tcc gag aag aag aag	2513		
Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys			
155	160	165	170
tcg tcc ccc tagcatgccg ttcaaacatt tggcaataaa gtttcttaag	2562		

Ser Ser Pro

attgaatcct gttgccggtc ttgcgatgtatcatataa ttctgttga attacgttaa 2622

gcatgtataa attaacatgt aatgcgtac gttattatg agatgggtt ttatgattag 2682

agtccgc当地 ttatacatt aatacgcat agaaaacaaa atatagcgc当地 caaactagga 2742

taaattatcg cgcgcgtgt catctatgtt actagatcg gcccggaaat aaaatatctt 2802

tattttcatt acatctgtgt gttgggtttt tgtgtgaatc gatagtacta acatacgtc 2862

tccatcaaaa caaaacgaaa caaaacaaac tagcaaataa ggctgtcccc agtgc当地 2922

caggtgccag aacatttctc tgctagcctc atgaccaaaa tcccttaacg tgagtttcg 2982

ttccactgag cgtcagaccc cgtagaaaag atcaaaggat cttttgaga tcctttttt 3042

ctgcgc当地 tctgctgctt gcaaacaaaa aaaccaccgc taccagcggt gtttgggg 3102

ccgatcaag agctaccaac tcttttccg aaggtaactg gttcagcag agcgc当地 3162

ccaaatactg ttcttctagt gtagccgtag ttaggccacc acttcaagaa ctctgttagca 3222

ccgc当地 acctcgctct gctaattcctg ttaccagtgg ctgctgccag tggcgataag 3282

tcgtgtctt ccgggttgga ctcaagacga tagttacggg ataaggcgca gcggtcgccc 3342

tgaacggggg gttcgtgcac acagcccagc ttggagcgaa cgacctacac cgaactgaga 3402

tacctacagc gtgagctatg agaaagcgcc acgcttcccg aaggagaaaa ggcggacagg 3462

tatccgttaa gcggcagggt cggaacagga gagcgcacga gggagcttcc agggggaaac 3522

gcctggatac ttatagtc tgtcggttt cgccacctct gacttggcg tcgattttg 3582

tgatgctcg cagggggcgc gaggctatgg aaaaacgcca gcaacgcggc cttttacgg 3642

ttcctggcct ttgctggcc tttgctcac atgttcttc ctgcgttac ccctgattct 3702

gtggataacc gtattaccgc ctttgagtga gctgataccg ctgcgcgcag ccgaacgacc 3762

gagcgcagcg agtcagttag cgaggaagcg gaagagcgcc caatacgcaa accgccttc 3822

cccgcgcggtt gggcgttca ttaatgcgc tggcacgaca ggttccgta ctggaaagcg 3882

ggcagtgagc gcaacgcaat taatgtgagt tagctactc attaggcacc ccaggctta 3942

cacttatgc ttccggctcg tatgttgtt ggaattgtga gcgataaca atttcacaca 4002

ggaaacagct atgaccatga ttacgccaag cttgagaggc ggttgcgtt ttggctagag 4062

cagcttgcca acatggtgga gcacgacact ctgcgtact ccaagaatat caaagataca 4122

gtctcagaag accaaaggc tattgagact tttcaacaaa ggtaatatc gggaaacctc 4182

ctcggttcc atgcccagc tatctgtcac ttcatcaaaa ggacagtaga aaaggaaggt 4242

ggcacctaca aatgccatca ttgcgataaa ggaaaggctt tcgttcaaga tgcctgtcc 4302

gacagtggtc ccaaagatgg acccccaccc acgaggagca tcgtggaaaa agaagacgtt 4362

ccaaccacgt ctcaaaagca agtggattga tgtgaacatg gtggagcagc acactctcg 4422

ctactccaag aatatcaaag atacagtctc agaagaccaa agggctattg agactttca 4482

acaaggta atatcgaa acctcctcg attccattgc ccagctatct gtcacttcat 4542

caaaggaca gtagaaaagg aaggtggcac ctacaaatgc catcatgag ataaaggaaa 4602

ggctatcggtt caagatgcct ctgcccacag tggccaaa gatggacccc caccacag 4662

gagcatcggtt gaaaaagaag acgttccaaac cacgtttca aagcaagtgg attgtatgt 4722

tatctccact gacgtaaagg atgacgcaca atcccactat cttcgcaag accttcctc 4782

tatataagga agttcatttc atttggagag gacacgctga aatcaccagt ctctctctac 4842

aaatctatct ctctcgagct ttgcagatc tggcaacca cc atg gca ccg aag 4896

Met Ala Pro Lys

175

aag aag cgc aag gtg cat atg aac acc aag tac aac gag gag ttc ctg 4944

Lys Lys Arg Lys Val His Met Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Glu Phe Leu

180

185

190

ctc tac ctg gcg ggc ttc gtg gac ggg gac ggc tcc atc atc gcc tcc 4992

Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Ser Ile Ile Ala Ser

195

200

205

atc tcc ccg cgc cag tcc tac aag ttc aag cat gag ctg cgc ctc acc 5040

Ile Ser Pro Arg Gln Ser Tyr Lys Phe Lys His Glu Leu Arg Leu Thr

210 215 220 225

ttc cag gtc acg cag aag aca cag cgc cgt tgg ttc ctc gac gag ctg 5088

Phe Gln Val Thr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Glu Leu

230

235

240

gtg gac gag atc ggg gtg ggc aag gtg cgc gac cgc ggc agc gtc tcc 5136

Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Lys Val Arg Asp Arg G]y Ser Val Ser

245 250 255
gac tac cgc ctg tcc cag atc aag cct ctg cac aac ttc ctg acc cag 5184

260 265 270

ctc cag ccc ttc ctg gag ctc aag cag aag cag gcc aac ctc gtg ctg 5232
Leu Gln Pro Phe Leu Glu Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu
275 280 285

```

aag atc atc gag cag ctg ccc tcc 9CC aag gaa tcc ccg gac aag ttc      5280
Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe
390           395           390           395

```

ctg gag gtg tgc acc tgg gtg gac cag atc gcc gct ctg aac gac tcc 5328
Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser

310 315 320
aag acc cgc aag acc act tcc gag acc gtc cgc gcc gtt cta gac agt 5376
Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser

ctc tcc gag aag aag aag tcg tcc ccc tagcatgccg ttcaaacatt 5423
Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser Ser Pro

340 345

tggcaataaa gtttcttaag attgaatcct gttgccggc ttgcgtat tatcatataa 5483

tttctgttga attacgttaa gcatgtataa attaacatgt aatgcgtac gttattttatg 5543

agatgggtt ttatgattag agtccgcaa ttatacattt aatacgcgat agaaaacaaa 5603

atatacgccaaacttaggataaattatcgcgcggtgtcatctatgttactagatcg 5663

gcccggaat aaaatatctt tattttcatt acatctgtgt gtttgtttt tgtgtgaatc 5723

gatagtacta acatacgctc tccatcaaaa caaaaacgaaa caaaaacaaac tagcaaaata 5783

ggctgtcccc agtgcaagtg caggtgccag aacatttcgg taccgagctc gaattcactg 5843

gccgtcgtt tacaacgtcg tgactggaa aaccctggcg ttacccaact taatcgcc 5903

gcagcacatc ccccttcgc cagctggcgt aatagcgaag agggccgcac cgatcgccct 5963

tcccaacagt tgcgcagcct gaatggcgaa tggcgctga tgcggtattt tctccttacg 6023

catctgtgcg gtatttcaca ccgcatatgg tgcactctca gtacaatctg ctctgtatgcc 6083

gcatagttaa gccagccccg acacccgcca acacccgctg acgcgccttg acgggcttgt 6143

ctgctcccg catccgctta cagacaagct gtgaccgtct ccgggagctg catgtgtcag 6203

aggtttac cgtcatcacc gaaacgcgca a 6234

<210> 5

211 <211> 173

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 5

Met Ala Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val His Met Asn Thr Lys Tyr Asn

1 5 10

15

Lys Lys Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser

20

25

30

Ile Ile Ala Ser Ile Ser Pro Asn Gln Ser Arg Lys Phe Lys His Gln

35

40

45

Leu Arg Leu Thr Phe Thr Val Thr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe

50

55

60

Leu Asp Lys Leu Val Asp Lys Ile Gly Val Gly Lys Val Arg Asp Arg

65 70 75 80

85 90 95

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala

100 105 110

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser

115 120 125

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala

130 135 140

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala

145 150 155 160

Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Ser Ser Pro

165 170

<210> 6

<211> 173

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Construct

<400> 6

Met Ala Pro Lys Lys Arg Lys Val His Met Asn Thr Lys Tyr Asn

1 5 10 15

Glu Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser

20 25 30

Ile Ile Ala ser Ile Ser Pro Arg Gln ser Tyr Lys Phe Lys His Glu

35 40 45

Leu Arg Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe

50 55 60

Leu Asp Glu Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Lys Val Arg Asp Arg

65 70 75 80

Gly Ser Val Ser Asp Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn

85 90 95

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Glu Leu Lys Gln Lys Gln Ala

100	105	110
Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser		
115	120	125
Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala		
130	135	140

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala		
145	150	155
		160

Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Ser Ser Pro		
165	170	

<210> 7

<211> 68

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> PCR amplicon of bar coding region around the BAY 39/40
recognition site (control)

<400> 7

cggtaacctt ccgtaccgag ccgcaggaac cgcaggagtg gacggacgac ctcgtccgtc	60
tgcgggac	68

<210> 8

<211> 68

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> PCR amplicon of bar coding region around the BAY 39/40

recognition site (PPT tolerant plant line)

<400> 8

cggtaacctt ccgtaccgag ccgcaggaac cgcaggagtg gacggacgac ctcgtccgtc	60
tgcgggac	68

<210> 9

<211> 67

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> PCR amplicon of bar coding region around the BAY 39/40
recognition site (PPT sensitive plant line 1)

<400> 9

cggtcaacctt ccgtaccgag ccgcaggaac cgccaggagtg gacgacgacc tcgtccgtct 60
gccccggac 67

<210> 10

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> PCR amplicon of bar coding region around the BAY 39/40
recognition site (PPT sensitive plant line 2)

<400> 10

cggtaactt ccgtccgtct gcgggac 27

<210> 11

<211> 61

<212> DNA

<213> Artificial
<220><223> PCR amplicon of bar coding region around the BAY 39/40
recognition site (PPT sensitive plant line 3)

<400> 11

cggtcaactt ccgtaccgag ccgcaggaac cgcaaggatg gacctcgccgttgcggga 60

<210> 12

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> PCR amplicon of bar coding region around the BAY 39/40
recognition site (PPT sensitive plant line) 4

<400> 12

cggtaacctt ccgtaccgag ccgcaggaac cctcgccgt ctgcggac 49

<210> 13

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> PCR amplicon of bar coding region around the BAY 39/40
recognition site (PPT sensitive plant line 5)

<400> 13

cggtaacctt ccgtaccgag ccgcaggaac ctgcgtccgtc tgccggac 48

<210> 14

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> PCR amplicon of bar coding region around the BAY 39/40
recognition site (PPT sensitive plant line 6)

<400> 14

cggtaacctt ccgtaccgag ccgcaggaac cgcacgacct cgtccgtctg cgggac 56

<210> 15

<211> 68

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> PCR amplicon of bar coding region around the BAY 39/40
recognition site (PPT sensitive plant line 7)

<400> 15

cggtaacctt ccgtaccgag ccgcaggaac cgcaggagtg gacggacgac ctgcgtccgtc 60

tgccggac 68

<210> 16

<211> 163

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> I-CreI

<400> 16

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe

1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Ser

20 25 30

Tyr Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Thr Phe Gln Val Thr Glu Lys
 35 40 45
 Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60
 Gly Tyr Val Arg Asp Arg Gly Ser Val Ser Asp Tyr Ile Leu Ser Glu
 65 70 75 80
 Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95

 Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110
 Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125
 Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140
 Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160

 Ser Ser Pro

<210> 17
 <211> 4925
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220><223> vector

<220><221> CDS

<222> (1267)..(1605)

<220><221> CDS

<222> (1795)..(2541)

<400> 17

ctaaattgta agcgtaata ttttgtaaa attcgctta aattttgtt aaatcagctc 60

atttttaac caataggccg aaatcgcaa aatccttat aaatcaaaag aatagaccga 120
 gatagggttg agtgttggc cagttggaa caagagtcca ctattaaaga acgtggactc 180
 caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca gggcgatggc ccactacgt aaccatcacc 240
 ctaatcaagt ttttgggtt cgaggtgccc taaagacta aatcgaaacc ctaaaggag 300
 ccccccattt agagcttgac ggggaaagcc ggcgaacgtg gcgagaaagg aaggaaagaa 360
 agcgaaagga gccccgccta gggcgctggc aagtgttagcg gtcacgctgc gcgttaaccac 420
 cacacccgcc ggcgttaatg cgccgctaca gggcgctcc cattcgccat tcaggctgct 480
 caactgttgg gaagggcgat cggcggcggc ctcttcgcta ttacgcccagc tggcgaaagg 540
 gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt aacgccaggg tttccactt cacgacgtt 600
 taaaacgacg gccagtggc ggcgtataa cgactcacta tagggcgaat tgggtacggc 660
 cgtcaaggcc aagttcccg tggggatcc accatacatg gagtcaaaaa ttcatcgatcga 720
 ggatctaaca gaactcgccg tgaagactgg cgaacagttc atacagagtc tttacgact 780
 caatgacaag aagaaaaatct tcgtcaacat ggtggagcac gacactctcg tctactccaa 840
 gaatatcaaa gatacagtct cagaagacca aagggttatt gagactttc aacaaagggt 900
 aatatcgga aacccctcg gattccattt cccagctatc tgtcacttca tcaaaaggac 960
 agtagaaaaag gaaggtggca cctacaaatg ccatcattgc gataaaggaa aggctatcgt 1020
 tcaagatgcc tctggccaca gtggtccaa agatggaccc ccacccacga ggagcatcgt 1080

gaaaaaagaa gacgttccaa ccacgtctc aaagcaagtg gattgatgtg atatctccac 1140
 tgacgttaagg gaigacgcac aatcccacta tccttcgcaa gacccttcct ctatataagg 1200
 aagttcattt cattggaga ggactcgaga attaagcaaa agaagaagaa gaagaagtcc 1260
 aaaacc atg gct aaa ccg cct aag aaa aag cgg aag gtt cat atg aat 1308
 Met Ala Lys Pro Pro Lys Lys Arg Lys Val His Met Asn
 1 5 10
 acc aaa tac aac aaa gaa ttc ctt ctc tac cta gct ggt ttc gta gac 1356
 Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp
 15 20 25 30
 gga gat gga tct att atc gca tca att agc cct cgg caa tcg tac aaa 1404
 Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Ser Ile Ser Pro Arg Gln Ser Tyr Lys
 35 40 45
 ttc aag cat gaa ctg cga ctt act ttc caa gtg aca cag aaa acc caa 1452
 Phe Lys His Glu Leu Arg Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln Lys Thr Gln
 50 55 60
 agg aga tgg ttc ctt gat aaa ctc gtg gac gaa atc ggc gtt gga aag 1500
 Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Lys
 65 70 75
 gtc aga gat aga ggg tcg gtg tcc gac tat agg ctc agt cag att aaa 1548
 Val Arg Asp Arg Gly Ser Val Ser Asp Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys
 80 85 90
 cct ttg cat aac ttc cta act caa ctt caa cca ttt ctg aaa ttg aag 1596
 Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys
 95 100 105 110
 cag aag cag gtaagttct gcttctacct ttgatataataataatt 1645
 Gln Lys Gln
 atcattaatt agtagtaata taatattca aatattttt tcaaaataaa agaatgtagt 1705

atatacgaaat	tgctttctg	tagttataa	gtgtgtatat	ttaatttat	aactttcta	1765	
atatatgacc	aaaacatggt	gatgtgcag	gca aat	ctg gtt	ctc aag	ata ata	1818
			Ala Asn	Leu Val	Leu Lys	Ile Ile	
			115		120		
gag caa cta cca	agc gca aag	gaa tct	cca gac aag	ttt ttg	gaa gtg	1866	
Glu Gln Leu Pro	Ser Ala Lys	Glu Ser	Pro Asp	Lys Phe	Leu Glu Val		
125		130		135			
tgt acc tgg gtt	gac caa atc	gca gct	ttg aat	gat tcc	aag aca cga	1914	
Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Asn Asp Ser Lys Thr Arg							
140		145		150			
aag aca act tct	gag act	gtg aga	gca gtc	ctt gat	tca tta	ccc ggt	1962
Lys Thr Thr Ser	Glu Thr Val	Arg Ala Val	Leu Asp	Ser Leu	Pro Gly		
155		160		165			
tcg gtt ggt ggc	tta agc cct	agt cag	gct agt	tct gcc	gct agt	tct	2010
Ser Val Gly	Gly Leu Ser	Pro Ser	Gln Ala Ser	Ser Ala	Ala Ser	Ser	
170		175		180		185	
gcc tca agc tct cca ggt tct ggg ata tcc gaa gcc ctt aga gct ggt							2058
Ala Ser Ser	Ser Pro	Gly Ser	Gly Ile	Ser Glu	Ala Leu	Arg Ala Gly	
190		195		200			
gct act aag agc	aag gag ttt	ctc ctg	tat tta	gcc gga	ttt gtt	gat	2106
Ala Thr Lys	Ser Lys	Glu Phe	Leu Leu	Tyr Leu	Ala Gly	Phe Val Asp	
205		210		215			
ggg gat gyt tca atc	att 9CC	tct atc	tca cca	aat cag	agc cgt	aag	2154
Gly Asp Gly	Ser Ile	Ile Ala	Ser Ile	Ser Pro	Asn Gln	Ser Arg Lys	
220		225		230			
ttt aag cac caa	ctg agg	ttg aca	ttc acc	gtg aca	cag aag	act caa	2202
Phe Lys His	Gln Leu	Arg Leu	Thr Phe	Thr Val	Thr Gln	Lys Thr Gln	
235		240		245			
aga aga tgg ttt	ctg gat	aag ctt	gtc gat	gaa att	ggc gtg	gga aag	2250
Arg Arg Trp	Phe Leu	Asp Lys	Leu Val	Asp Glu	Ile Gly	Val Gly Lys	

250	255	260	265	
gtt cgt gat aga gga tct gtt agt gac tat cgc cta tcc cag att aaa				2298
Val Arg Asp Arg Gly Ser Val Ser Asp Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys				
270	275	280		
cct ctt cac aac ttc ctg acc cag ctt caa cct ttc ttg aaa tta aag				2346
Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys				
285	290	295		
cag aag cag gct aac ctg gtt ctc aaa atc att gag caa ctc cca tca				2394
Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser				
300	305	310		
315	320	325		
caa att gct gct ctg aac gat tca aag act cga aaa acc act agt gag				2490
Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu				
330	335	340	345	
aca gtt cgt gct gtc tta gat tcc ttg tcc gag aaa aag aaa agc tct				2538
Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Ser Ser				
350	355	360		
ccc tgattccag ataaggaaat tagggtcct atagggttc gctcatgtgt				2591
Pro				
tgagcatata agaaaccctt agtatgtatt tgtatttcta aaatacttct atcaataaaa 2651				
tttctaattc ctaaaaccaa aatccagect gcaggtctag ataagtggaa tatcacgtga 2711				
agcttgcaag ctccagctt tggcccttt agtgagggtt aattgcgcgc ttggcgtaat 2771				
catggcata gctgtttctt gtgtgaaatt gttatccgct cacaattcca cacaacatac 2831				

gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaatg agtgagctaa ctcacattaa 2891
 ttgcgttgcg ctcaactgccc gctttccagt cggaaacct gtcgtgccag ctgcattaaat 2951
 gaatcgccca acgcgcgggg agaggcgggt tgcttattgg ggcgtcttcc gcttcctcgc 3011
 tcactgactc gctgcgcctcg gtcgttcggc tgccgcgagc ggtatcagct cactcaaagg 3071
 cggttaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg tgagcaaaag 3131
 gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcttttc cataggctcc 3191
 gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga aaccgcacag 3251
 gactataaaag ataccaggcg tttcccttg gaagctccct cgtgcgcctc cctgttccga 3311
 ccctgcccgt tacggatac ctgtccgcct ttctcccttc gggaaaggcgtg ggccttctc 3371
 atagctcacg ctgttaggtat ctcagttcgg tgtaggtcgt tcgctccaag ctggcgttg 3431
 tgcacgaacc ccccggttcag cccgaccgct ggccttatac cgtaactat cgttttgagt 3491
 ccaaccgggt aagacacgac ttatgccac tggcagcagc cactggtaac aggattagca 3551
 gagcgaggta tggtagccgt gctacagagt tcttgaagtgt gtggcctaactacggctaca 3611
 ctagaaggac agtatttggat atctgcgcctc tgctgaagcc agttacccctc ggaaaaagag 3671
 ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cggtggtttt tttgtttgca 3731
 agcagcagat tacgcgcaga aaaaaggat ctcaagaaga tccttgcata ttttctacgg 3791
 ggtctgacgc tcagtgaaac gaaaactcac gttaagggat tttggctatg agattatcaa 3851
 aaaggatctt cacctagatc cttaattt aaaaatgaag tttaatca atctaaagta 3911

tataatgagta aacttggctc gacagttacc aatgcttaat cagtgaggca cctatctcag 3971

cgatctgtct attcggtca tccatagttg cctgactccc cgtcgtgttag ataactacga 4031

tacgggaggg cttaaccatct ggccccagtg ctgcaatgtat accgcgagat ccacgctcac 4091

cggctccaga ttatcagca ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc agaagtggtc 4151

ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta ttaattgttgc cgggaagct agagtaagta 4211

gttcgccagt taatagtttgc cgcaacgttgc ttgccattgc tacaggcatc gtgggtcac 4271

gctcgctgtt tggatggct tcattcagct ccggttccca acgatcaagg cgagttacat 4331

gatccccat gtgtgc当地 aaagcggtta gtccttcgg tcctccgatc gttgtc当地 4391

gtaagttggc cgcaatgttgc tcaactcatgg ttatggcagc actgcataat tctttactg 4451

tcatgccatc cgtaaagatgc tttctgtga ctggtagtca ctcaaccaag tcattctgag 4511

aatagtgtat gccccgaccg agttgctttt gcccggcgtc aatacggat aataccgcgc 4571

cacatagcag aactttaaaa gtgctcatca ttggaaaacg ttcttcgggg cgaaaactct 4631

caaggatctt accgctgttgc agatccagtt cgtatgtacc cactcgtc当地 cccaaactgt 4691

cttcagcatc tttactttc accagcgttt ctgggtgagc aaaaacagga aggcaaaatg 4751

ccgcaaaaaa gggataagg ggcacacggc aatgttgaat actcataactc ttcctttc 4811

aatattatttgc aagcattttt cagggttattt gtctcatgag cggatacata tttgaatgt 4871

tttagaaaaa taaacaata ggggttccgc gcacattcc ccgaaaagtgcac 4925

<210> 18

<211> 362

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 18

Met Ala Lys Pro Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val His Met Asn Thr Lys

1 5 10 15

Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp

20 25 30

Gly Ser Ile Ile Ala Ser Ile Ser Pro Arg Gln Ser Tyr Lys Phe Lys

35 40 45

His Glu Leu Arg Leu Thr Phe Gln Val Thr Gln Lys Thr Gln Arg Arg

50 55 60

Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Lys Val Arg

65 70 75 80

Asp Arg Gly Ser Val Ser Asp Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu

85 90 95

His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys

100 105 110

Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys

115 120 125

Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile

130 135 140

Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val
 145 150 155 160

Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly Gly Leu Ser Pro
 165 170 175

Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser Ser Pro Gly Ser
 180 185 190

Gly Ile ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Thr Lys Ser Lys Glu Phe

195 200 205

Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala
 210 215 220

Ser Ile Ser Pro Asn Gln Ser Arg Lys Phe Lys His Gln Leu Arg Leu
 225 230 235 240

Thr Phe Thr Val Thr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys
 245 250 255

Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Lys Val Arg Asp Arg Gly Ser Val

260 265 270

Ser Asp Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr
 275 280 285

Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val
 290 295 300

Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys
 305 310 315 320

Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp

325

330

335

Ser Lys Thr Arg Lys Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp

340

345

350

Ser Leu Ser Glu Lys Lys Ser Ser Pro

355

360