

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-500895

(P2017-500895A)

(43) 公表日 平成29年1月12日(2017.1.12)

(51) Int.Cl.

C 12 N	15/09	(2006.01)
A 01 H	5/00	(2006.01)
A 01 H	5/10	(2006.01)
C 12 N	5/10	(2006.01)

F 1

C 12 N	15/00
A 01 H	5/00
A 01 H	5/10
C 12 N	5/10

Z N A A

テーマコード(参考)

2 B 0 3 0

A

4 B 0 6 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 56 頁)

(21) 出願番号 特願2016-561995 (P2016-561995)
 (86) (22) 出願日 平成26年12月31日 (2014.12.31)
 (85) 翻訳文提出日 平成28年8月15日 (2016.8.15)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/072913
 (87) 国際公開番号 WO2015/103347
 (87) 国際公開日 平成27年7月9日 (2015.7.9)
 (31) 優先権主張番号 61/922,522
 (32) 優先日 平成25年12月31日 (2013.12.31)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 501035309
 ダウ アグロサイエンシズ エルエルシ
 ー
 アメリカ合衆国 インディアナ州 462
 68, インディアナポリス, ジオナス
 ヴィレ ロード, 9330
 (74) 代理人 100092783
 弁理士 小林 浩
 (74) 代理人 100095360
 弁理士 片山 英二
 (74) 代理人 100120134
 弁理士 大森 規雄
 (74) 代理人 100126354
 弁理士 藤田 尚

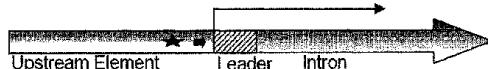
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】新規トウモロコシユビキチンプロモーター

(57) 【要約】

トウモロコシ (*Zea mays*) c . v . B 7 3 ユビキチン - 1 (トウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 7 3 U b i - 1) プロモーターは、植物において高レベルの構成的導入遺伝子発現を推進する。多遺伝子構築物で同じトウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 7 3 U b i - 1 プロモーターを繰り返し使用すると、遺伝子サイレンシングをもたらすこともあり、それによりトランスジェニック産物の有効性が低くなる。異なるトウモロコシ (*Z. mays*) 遺伝子型である、トウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 1 0 4 の U b i - 1 プロモーター由来の遺伝子調節エレメントを使用して、植物細胞および/または植物組織において導入遺伝子を発現させるための遺伝子調節プロモーターエレメント、構築物、および方法が提供される。

FIG. 1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

導入遺伝子に作動可能に連結されているプロモーターを含む遺伝子発現力セットであって、前記プロモーターが、配列番号 2 に対して少なくとも 90 % の配列同一性を有するポリヌクレオチドを含む、遺伝子発現力セット。

【請求項 2】

前記プロモーターが、配列番号 2 の相補体に対する少なくとも 90 % の配列同一性を含むポリヌクレオチドプローブに厳密な条件下でハイブリダイズする、請求項 1 に記載の遺伝子発現力セット。

【請求項 3】

前記作動可能に連結された導入遺伝子がポリペプチドまたは小分子 RNA をコードする、請求項 1 に記載の遺伝子発現力セット。

【請求項 4】

前記導入遺伝子が、殺虫剤抵抗性導入遺伝子、除草剤耐性導入遺伝子、窒素利用効率導入遺伝子、水利用効率導入遺伝子、栄養品質導入遺伝子、DNA 結合導入遺伝子、および選択可能マーカー導入遺伝子からなる群から選択される、請求項 1 に記載の遺伝子発現力セット。

【請求項 5】

3' - 非翻訳領域をさらに含む、請求項 1 に記載の遺伝子発現力セット。

【請求項 6】

請求項 1 に記載の遺伝子発現力セットを含む組換えベクター。

【請求項 7】

プラスミド、コスミド、細菌人工染色体、ウイルス、およびバクテリオファージからなる群から選択される、請求項 6 に記載の組換えベクター。

【請求項 8】

請求項 1 に記載の遺伝子発現力セットを含むトランスジェニック細胞。

【請求項 9】

トランスジェニック植物細胞である、請求項 8 に記載のトランスジェニック細胞。

【請求項 10】

請求項 9 に記載のトランスジェニック植物細胞を含むトランスジェニック植物。

【請求項 11】

単子葉または双子葉植物である、請求項 10 に記載のトランスジェニック植物。

【請求項 12】

前記単子葉植物が、トウモロコシ植物、イネ植物、およびコムギ植物からなる群から選択される、請求項 11 に記載のトランスジェニック植物。

【請求項 13】

請求項 10 に記載のトランスジェニック植物由来のトランスジェニック種子。

【請求項 14】

配列番号 2 に対して少なくとも 90 % の配列同一性を有する合成ポリヌクレオチドを含むトランスジェニック細胞。

【請求項 15】

前記合成ポリヌクレオチドが、配列番号 2 の相補体に対する少なくとも 90 % の配列同一性を含むポリヌクレオチドプローブに厳密な条件下でハイブリダイズする、請求項 14 に記載のトランスジェニック細胞。

【請求項 16】

トランスジェニック植物細胞である、請求項 14 に記載のトランスジェニック細胞。

【請求項 17】

前記トランスジェニック植物細胞が植物形質転換法により生産される、請求項 16 に記載のトランスジェニック細胞。

【請求項 18】

10

20

30

40

50

前記植物形質転換法が、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 媒介形質転換法、微粒子銃形質転換法、炭化珪素形質転換法、プロトプラスト形質転換法、およびリポソーム形質転換法からなる群から選択される、請求項 17 に記載のトランスジェニック細胞。

【請求項 19】

請求項 14 に記載のトランスジェニック植物細胞を含むトランスジェニック植物。

【請求項 20】

単子葉植物である、請求項 19 に記載のトランスジェニック植物。

【請求項 21】

前記単子葉植物が、トウモロコシ植物、イネ植物、およびコムギ植物からなる群から選択される、請求項 20 に記載のトランスジェニック植物。 10

【請求項 22】

請求項 21 に記載のトランスジェニック植物由来のトランスジェニック種子。

【請求項 23】

請求項 14 に記載の遺伝子発現カセットを含む組換えベクター。

【請求項 24】

プラスミド、コスミド、細菌人工染色体、ウイルス、およびバクテリオファージからなる群から選択される、請求項 23 に記載の組換えベクター。 20

【請求項 25】

トランスジェニック植物において異種コード配列を発現させるための方法であって、
a) 3' - 非翻訳領域に作動可能に連結されている、前記異種コード配列に作動可能に連結されている配列番号 2 を含むポリヌクレオチド配列を含む遺伝子発現カセットで植物細胞を形質転換すること、 20

b) 前記遺伝子発現カセットを含む前記形質転換された植物細胞を単離すること、

c) 前記形質転換された植物細胞をトランスジェニック植物に再生させること、および

d) 配列番号 2 を含む前記ポリヌクレオチド配列を含む前記遺伝子発現カセットを含む前記トランスジェニック植物を得ること

を含む方法。

【請求項 26】

前記異種コード配列が、殺虫剤抵抗性コード配列、除草剤耐性コード配列、窒素利用効率コード配列、水利用効率コード配列、栄養品質コード配列、DNA 結合コード配列、および選択可能マーカーコード配列からなる群から選択される、請求項 25 に記載の方法。 30

【請求項 27】

植物細胞を形質転換することが植物形質転換法である、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 28】

前記植物形質転換法が、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 媒介形質転換法、微粒子銃形質転換法、炭化珪素形質転換法、プロトプラスト形質転換法、およびリポソーム形質転換法からなる群から選択される、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

前記トランスジェニック植物が単子葉または双子葉トランスジェニック植物である、請求項 25 に記載の方法。 40

【請求項 30】

前記単子葉トランスジェニック植物が、トウモロコシ植物、コムギ植物、およびイネ植物からなる群から選択される、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

請求項 25 に記載のトランスジェニック植物由来のトランスジェニック種子。

【請求項 32】

前記異種コード配列がトランスジェニック植物組織において発現される、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 33】

前記トランスジェニック植物組織が、トランスジェニック植物根、苗条、茎、または花 50

粉組織である、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 3 4】

配列番号 2 に対する少なくとも 90 % の配列同一性を含むポリヌクレオチド配列を単離するための方法であって、

a) 配列番号に対する少なくとも 90 % の配列同一性を含むポリヌクレオチド配列を同定すること、

b) 配列番号に対する少なくとも 90 % の配列同一性を含む前記ポリヌクレオチド配列に結合する複数のオリゴヌクレオチドプライマー配列を作製すること、

c) 前記複数のオリゴヌクレオチドプライマー配列から選択されるオリゴヌクレオチドプライマー配列を用いて、DNA 試料から配列番号に対する少なくとも 90 % の配列同一性を含む前記ポリヌクレオチド配列を增幅させること、および

d) 配列番号に対する少なくとも 90 % の配列同一性を含む前記ポリヌクレオチド配列を単離すること

を含む方法。

【請求項 3 5】

配列番号 2 に対する少なくとも 90 % の配列同一性を含む前記単離されたポリヌクレオチド配列が導入遺伝子に作動可能に連結されている、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記作動可能に連結された導入遺伝子がポリペプチドまたは小分子 RNA をコードする、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 7】

導入遺伝子の発現を促進する、配列番号 2 に対する少なくとも 90 % の配列同一性を含む精製されたポリヌクレオチド配列。

【請求項 3 8】

配列番号 2 の相補体に対する少なくとも 90 % の配列同一性を含むポリヌクレオチドプローブ配列が、請求項 3 7 に記載の精製されたポリヌクレオチド配列に厳密な条件下でハイブリダイズする、請求項 3 7 に記載の精製されたポリヌクレオチド配列。

【請求項 3 9】

導入遺伝子に作動可能に連結されている、請求項 3 7 に記載の精製されたポリヌクレオチド配列。

【請求項 4 0】

ポリペプチドをコードする、請求項 3 9 に記載の作動可能に連結されている導入遺伝子。

【請求項 4 1】

3' - 非翻訳領域に作動可能に連結されている、請求項 3 7 に記載の導入遺伝子に作動可能に連結されている精製されたポリヌクレオチド配列を含む遺伝子発現力セット。

【請求項 4 2】

前記導入遺伝子が、殺虫剤抵抗性導入遺伝子、除草剤耐性導入遺伝子、窒素利用効率導入遺伝子、水利用効率導入遺伝子、栄養品質導入遺伝子、DNA 結合導入遺伝子、および選択可能マーカー導入遺伝子からなる群から選択される、請求項 4 1 に記載の遺伝子発現力セット。

【請求項 4 3】

請求項 4 1 に記載の遺伝子発現力セットを含む組換えベクター。

【請求項 4 4】

プラスミドベクター、コスミドベクター、および BAC ベクターからなる群から選択される、請求項 4 3 に記載の組換えベクター。

【請求項 4 5】

請求項 3 7 に記載の精製されたポリヌクレオチド配列を含むトランスジェニック細胞。

【請求項 4 6】

トランスジェニック植物細胞である、請求項 4 5 に記載のトランスジェニック細胞。

10

20

30

40

50

【請求項 4 7】

請求項 4 6 に記載のトランスジェニック植物細胞を含むトランスジェニック植物。

【請求項 4 8】

単子葉植物である、請求項 4 7 に記載のトランスジェニック植物。

【請求項 4 9】

前記単子葉植物が、トウモロコシ植物、コムギ植物、およびイネ植物からなる群から選択される、請求項 4 8 に記載のトランスジェニック植物。

【請求項 5 0】

請求項 4 9 に記載のトランスジェニック植物由来のトランスジェニック種子。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】**【0 0 0 1】**

関連出願の相互参照

本出願は、2013年12月31日出願の米国特許仮出願第61/922522号の35 U S C § 119(e) の下での利益を主張し、その開示全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0 0 0 2】

電子的に提出される配列表への言及

配列表の公式謄本は、ファイル名「69893_ST25.txt」、2014年12月30日作成、サイズ13.6キロバイトのA S C I I フォーマット配列表としてE F S - W e b により電子的に提出し、本明細書と同時に提出される。本A S C I I フォーマット文書に含まれる配列表は本明細書の一部であり、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

20

【0 0 0 3】

本発明は一般的には植物分子生物学の分野に関し、さらに詳細には植物における導入遺伝子の発現の分野に関する。

【背景技術】**【0 0 0 4】**

30

多くの植物種が導入遺伝子で形質転換されて農学的に望ましい形質または特徴を導入することができる。植物種は特定の望ましい形質を有するように開発されるおよび／または改変される。一般的には、望ましい形質には、例えば、栄養価品質を改善する、収率を増加させる、害虫もしくは病害への抵抗性を与える、耐乾燥性およびストレス耐性を増加させる、園芸品質（例えば、色素沈着および成長）を改善する、除草剤抵抗性を分け与える、植物由来の工業的に有用な化合物および／もしくは材料の生産を可能にする、ならびに／または医薬品の生産を可能にすることが含まれる。

【0 0 0 5】

单一のゲノム遺伝子座にスタッツクされている複数の導入遺伝子を含むトランスジェニック植物種は植物形質転換技術により生産される。植物形質転換技術により、導入遺伝子の植物細胞への導入、植物ゲノムに導入遺伝子の安定的に組み込まれたコピーを含有する稔性導入遺伝子植物の回収がもたらされ、植物ゲノムの転写および翻訳によるその後の導入遺伝子の発現により望ましい形質および表現型を有するトランスジェニック植物が生じる。しかし、形質スタッツクとして工学的に作製された複数の導入遺伝子を高度に発現するトランスジェニック植物種の生産を可能にするメカニズムが望ましい。

40

【0 0 0 6】

同様に、植物の特定の組織または器官での導入遺伝子の発現を可能にするメカニズムが望ましい。例えば、土壤伝播性病原体による感染に対する植物の抵抗性の増加は、病原体抵抗性タンパク質が植物の根内で強く発現されるように、病原体抵抗性遺伝子で植物ゲノムを形質転換することにより実現し得る。代わりに、例えば、細胞分裂または伸長などの特定の成長または発生期にある植物組織において導入遺伝子を発現させることが望ましい場合がある。

50

【0007】

プロモーター、上流プロモーター、5' - UTR、およびイントロンを含むトウモロコシ (*Zea mays*) Ub i - 1 プロモーター調節エレメントが本明細書では説明される。遺伝子調節エレメントを利用する構築物および方法がさらに説明される。

【発明の概要】

【0008】

植物細胞および/または植物組織において導入遺伝子を発現させるためのプロモーター、構築物、および方法が本明細書で開示される。一実施形態では、導入遺伝子の発現はプロモーターの使用を含む。一実施形態では、プロモーターはポリヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、プロモーターポリヌクレオチド配列は上流プロモーター、5' - 非翻訳領域 (5' - UTR) またはリーダー配列、およびイントロンを含む。一実施形態では、プロモーターポリヌクレオチド配列はユビキチン - 1 遺伝子 (Ub i - 1) を含む。一実施形態では、プロモーターポリヌクレオチド配列はトウモロコシ (*Zea mays*、*Z. mays*) の Ub i - 1 遺伝子を含む。

10

【0009】

一実施形態では、構築物はトウモロコシ (*Z. mays*) の Ub i - 1 遺伝子から得られたプロモーターポリヌクレオチド配列を含む遺伝子発現力セットを含む。一実施形態では、トウモロコシ (*Z. mays*) 由来の Ub i - 1 プロモーターポリヌクレオチド配列は、上流プロモーター領域、5' - UTR またはリーダー配列、およびイントロンを含む。一実施形態では、構築物は、フィアリジウム種 (*Phialidium species*) 由来黄色蛍光タンパク質 (*Phialidium* YFP) をコードする遺伝子由来のイントロンに融合されているトウモロコシ (*Z. mays*) Ub i - 1 遺伝子から得られたプロモーターポリヌクレオチド配列を含む遺伝子発現力セットを含む。一実施形態では、構築物は、フィアリジウム種 (*Phialidium species*) 由来黄色蛍光タンパク質 (*Phialidium* YFP) をコードする遺伝子由来のイントロンに融合されているトウモロコシ (*Z. mays*) Ub i - 1 遺伝子から得られたプロモーターポリヌクレオチド配列、それに続くトウモロコシ (*Z. mays*) のペルオキシダーゼ 5 遺伝子 (*Zm Per 5*) 由来の 3' - 非翻訳領域 (3' - UTR) を含む遺伝子発現力セットを含む。こうして得られたポリヌクレオチド配列は新規のプロモーター遺伝子調節エレメントを含む。

20

【0010】

30

一実施形態では、遺伝子発現力セットは、導入遺伝子または異種コード配列に作動可能に連結された遺伝子プロモーター調節エレメントを含む。一実施形態では、遺伝子発現力セットは少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 またはそれよりも多くの導入遺伝子を含む。

【0011】

40

新規の遺伝子プロモーター調節エレメント (例えば、上流プロモーター、5' - UTR、およびイントロン) を使用して導入遺伝子を発現する植物を生育する方法が本明細書で開示されている。新規の遺伝子プロモーター調節エレメントを使用して導入遺伝子を発現する植物組織および細胞を培養する方法も本明細書で開示されている。一実施形態では、本明細書に開示されている方法は、植物葉、根、カルス、および花粉における構成的遺伝子発現を含む。新規の遺伝子プロモーター調節エレメントを含むポリヌクレオチド配列を精製する方法も本明細書で開示される。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図 1】トウモロコシ (*Zea mays*) c. v. B73 Ub i - 1 遺伝子を含む模式的な新規プロモーターを示す図である。プロモーターは、上流エレメント、5' - UTR またはリーダー配列、およびイントロンから構成される。上流エレメントは転写開始部位 (TSS) の 5' 上流に位置し、長い矢で示している。上流エレメントは TATA ボックスなどの調節エレメントから構成され、短い矢で示され、熱ショックエレメントは星印で示されている。

50

【図2】トウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 1 0 4 U b i - 1 遺伝子のPCR增幅プロモーター配列を含むベクター p D A B 1 0 5 7 1 2 のプラスミドマップを示す図である。

【図3】トウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 7 3 U b i - 1 制御プロモーターのポリヌクレオチド配列（配列番号1）を示す図であり、上流プロモーター領域には下線を付し、5' - UTR / リーダー配列には網掛けし、イントロン領域を小文字で示す。

【図4】トウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 1 0 4 U b i - 1 プロモーターのポリヌクレオチド配列（配列番号2）を示す図であり、上流プロモーター領域には下線が付され、5' - UTR / リーダー配列には網掛けし、イントロン領域を小文字で示す。

【図5-1】トウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 7 3 制御上流プロモーター配列（配列番号3）と比較したトウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 1 0 4 の上流プロモーター領域（配列番号4）のポリヌクレオチド配列アライメントを示す図である。 10

【図5-2】トウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 7 3 制御上流プロモーター配列（配列番号3）と比較したトウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 1 0 4 の上流プロモーター領域（配列番号4）のポリヌクレオチド配列アライメントを示す図である。

【図6】トウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 7 3 制御 5' - UTR / リーダー配列（配列番号5）と比較したトウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 1 0 4 の 5' - UTR / リーダー領域（配列番号6）のポリヌクレオチド配列アライメントを示す図である。 20

【図7-1】トウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 7 3 制御イントロン配列（配列番号7）と比較したトウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 1 0 4 のイントロン領域（配列番号8）のポリヌクレオチド配列アライメントを示す図である。

【図7-2】トウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 7 3 制御イントロン配列（配列番号7）と比較したトウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 1 0 4 のイントロン領域（配列番号8）のポリヌクレオチド配列アライメントを示す図である。

【図8】制御エントリーベクター、p D A B 1 0 5 7 4 2（トウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 7 3）を含み、デスティネーションベクター、p D A B 1 0 1 9 7 に挿入されたバイナリー発現構築物、p D A B 1 0 5 7 4 8 のベクターマップを示す図である。

【図9】エントリーベクター、p D A B 1 0 5 7 3 9（トウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 1 0 4）を含み、デスティネーションベクター、p D A B 1 0 1 9 7 に挿入されたバイナリー発現構築物、p D A B 1 0 5 7 4 5 のベクターマップを示す図である。 30

【図10】バイナリー発現構築物 p D A B 1 0 5 7 4 8（トウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 7 3）および p D A B 1 0 5 7 4 5（トウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 1 0 4）についての T₀ 植物カルスにおける Ph i Y F P 遺伝子発現を示す図である。

【図11】バイナリー発現構築物 p D A B 1 0 5 7 4 8（トウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 7 3）、p D A B 1 0 5 7 4 5（トウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 1 0 4）、および陰性対照についての T₁ 植物花粉における Ph i Y F P 遺伝子発現を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0013】

定義

本明細書で使用されるように、冠詞「1つの（a）」、「1つの（a n）」および「その（the）」は、文脈が他の方法で明瞭かつ明確に指示していなければ、複数の対象を含む。

【0014】

本明細書で使用されるように、用語「戻し交配」とは、栽培者が雑種子孫をその親の1つに戻し交雑させる、例えば、第1世代の交雑F1をF1交雑の親遺伝子型の1つと交雑させるプロセスを指す。

【0015】

本明細書で使用されるように、用語「イントロン」とは、遺伝子（または対象の発現されたヌクレオチド配列）に含まれ、転写されるが翻訳はされない任意の核酸配列を指す。

10

20

30

40

50

イントロンには、DNAの発現される配列内の非翻訳核酸配列、および、そこから転写されるRNA分子内の対応する配列が含まれる。

【0016】

本明細書に記載される構築物は、イントロンなどの翻訳および/またはmRNA安定性を増強する配列を含有していてもよい。1つのこのようなイントロンの例は、シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)のヒストンH3バリアントの遺伝子IIの第1イントロンまたは他の一般に知られている任意のイントロン配列である。イントロンはプロモーター配列と組み合わせて使用すれば、翻訳および/またはmRNA安定性を増強することができる。

【0017】

本明細書で使用されるように、用語「5' - 非翻訳領域」または「5' - UTR」とは、プレmRNAまたは成熟mRNAの5'末端にある非翻訳セグメントを指す。例えば、成熟mRNA上では、5' - UTRは典型的にはその5'末端に7-メチルグアノシンキヤップを保有し、スプライシング、ポリアデニル化、細胞質へのmRNA核外輸送、翻訳機構によるmRNAの5'末端の確認、および分解に対するmRNAの保護などの多くのプロセスに関与している。

【0018】

本明細書で使用されるように、用語「3' - 非翻訳領域」または「3' - UTR」とは、プレmRNAまたは成熟mRNAの3'末端にある非翻訳セグメントを指す。例えば、成熟mRNA上では、この領域はポリ(A)尾部を保有し、mRNA安定性、翻訳開始、およびmRNA輸送に多くの役割を有することが知られている。

【0019】

本明細書で使用されるように、用語「ポリアデニル化シグナル」とは、mRNA転写物中に存在し、ポリ(A)ポリメラーゼが存在している場合には、例えば、ポリ(A)シグナルの10~30塩基下流に位置するポリアデニル化部位で転写物をポリアデニル化することが可能な核酸配列を指す。多くのポリアデニル化シグナルが当技術分野では既知であり、本発明に有用である。例となる配列には、Loke J., et al., (2005) *Plant Physiology* 138(3); 1457-1468に記載されているAAUAAAおよびそのバリエントが含まれる。

【0020】

本明細書で使用されるように、用語「単離された」とは、生物学的成分（核酸またはタンパク質を含む）であって、成分が天然に存在する生物の細胞中の他の生物学的成分（すなわち、他の染色体DNAおよび染色体外DNA）から分離されている成分を指す。

【0021】

本明細書で使用されるように、核酸分子に関して、用語「精製された」は至純（例えば、均質な調製物）である必要はない。代わりに、「精製された」は、配列がその天然の細胞環境にあるよりも比較的純度が高いという指示を表す。例えば、「精製された」レベルの核酸は、その天然のレベルと比べた場合、濃度または遺伝子発現レベルの点で少なくとも2~5倍であるはずである。

【0022】

特許請求しているDNA分子は、全DNAからまたは全RNAから直接得ることができる。さらに、cDNAクローンは天然には存在していないが、むしろ部分的に精製された天然に存在する物質（メッセンジャーRNA）の操作により得るのが好ましい。mRNAからのcDNAライブラリーの構築は、合成物質（cDNA）の作製を含む。個別のcDNAクローンは、cDNAライブラリーを有する細胞のクローン選択により合成ライブラリーから精製することができる。したがって、mRNAからのcDNAライブラリーの構築および異なるcDNAクローンの精製を含むプロセスにより、天然のメッセージのおよそ 10^6 倍の精製がもたらされる。同様に、プロモーターDNA配列はプラスミドにクローニングすることができる。このようなクローンは天然には存在していないが、むしろ、ゲノムDNAライブラリーなどの、部分的に精製された天然に存在する物質の操作により得るのが好ましい。したがって、少なくとも1桁、好ましくは2または3桁、さらに好ま

10

20

30

40

50

しくは4または5桁の精製がこれらの技法においては好都合である。

【0023】

同様に、精製は、成分DNA配列の化学的または機能的变化が起きたという指示を表す。「精製された」核酸分子およびタンパク質には、標準精製法により精製される核酸分子およびタンパク質が含まれる。用語「精製された」には、宿主細胞(例えば、植物細胞)において組換えDNA法により調製される核酸およびタンパク質、ならびに化学的に合成される核酸分子、タンパク質、およびペプチドも包含される。

【0024】

用語「組換えの」とは、遺伝子組換えが起きた細胞または生物を意味する。前記用語は、ヒトの介入により人工的にまたは合成的に(すなわち、非天然に)改变された分子(例えば、ベクター、プラスミド、核酸、ポリペプチド、または小分子RNA)も含まれる。改变はその天然環境もしくは状態内の分子でも、またはそこから取り除いた分子でも実施することができる。

10

【0025】

本明細書で使用されるように、用語「発現」とは、ポリヌクレオチドがmRNA(小分子RNA分子を含む)に転写されるプロセスおよび/または転写されたmRNA(「転写物」とも呼ばれる)がその後ペプチド、ポリペプチド、もしくはタンパク質に翻訳されるプロセスのことである。遺伝子発現は外部シグナル、例えば、遺伝子発現を増加させるまたは減少させる薬剤への細胞、組織、または生物の曝露により影響されることがある。遺伝子の発現は、DNAからRNAさらにタンパク質へ向かう経路のいずれの地点で調節することもできる。遺伝子発現の調節は、例えば、転写、翻訳、RNA輸送およびプロセッシング、mRNAなどの媒介分子の分解に作用する制御を通じて、または作製された後の特定のタンパク質分子の活性化、不活性化、区画化、もしくは分解を通じて、またはその組合せにより起こる。遺伝子発現は、限定なしで、ノーザンプロット、RT-PCR、ウェスタンプロット、またはin vitro、in situ、もしくはin vivoタンパク質活性アッセイ(複数可)を含む、当技術分野で既知のいかなる方法によっても、RNAレベルでまたはタンパク質レベルで測定することができる。

20

【0026】

本明細書で使用されるように、用語「相同性ベースの遺伝子サイレンシング」または「H B G S」は、転写遺伝子サイレンシングと転写後遺伝子サイレンシングの両方を含む一般名称である。非連結サイレンシング遺伝子座による標的遺伝子座のサイレンシングは、それぞれプロモーターまたは転写される配列に対応する二本鎖RNA(dsRNA)の產生のために、転写阻害(例えば、転写遺伝子サイレンシング; TGS)またはmRNA分解(例えば、転写後遺伝子サイレンシング; PTGS)から生じることがある。それぞれのプロセスに異なる細胞成分が関与していることから、dsRNA誘導TGSおよびPTGSがおそらく古くからの共通のメカニズムの多様化から生じることが示唆される。しかし、TGSとPTGSの厳密な比較を達成するのは困難であった。なぜならば、前記比較は一般的に異なるサイレンシング遺伝子座の分析に頼っているからである。単一の導入遺伝子の遺伝子座は、異なる標的遺伝子のプロモーターと転写される配列に対応するdsRNAの产生のために、TGSおよびPTGSの両方を始動させると説明することができる。

30

【0027】

本明細書で使用されるように、用語「核酸分子」、「核酸」または「ポリヌクレオチド」(3つの用語全てが互いに同義である)とは、ポリマー型のヌクレオチドを指し、これにはRNAのセンス鎖とアンチセンス鎖の両方、cDNA、ゲノムDNA、および合成型、ならびにその混合ポリマーが含まれ得る。「ヌクレオチド」はリボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、またはどちらかの種類のヌクレオチドの改変型を指し得る。核酸分子は、他の方法で明記されなければ、通常少なくとも10塩基長である。前記用語は未定の長さのRNAまたはDNAの分子を指し得る。前記用語は一本鎖および二本鎖型のDNAを含む。核酸分子は、天然に存在するおよび/または天然には存在しないヌクレオチ

40

50

ド連結により互いに連結された天然に存在するヌクレオチドおよび改変されたヌクレオチドのいずれかまたは両方を含んでいてもよい。

【0028】

当業者であれば容易に認識するように、核酸分子は化学的にもしくは生化学的に修飾されていてもよく、または非天然のもしくは誘導体化されたヌクレオチド塩基を含有してもよい。このような修飾には、例えば、標識、メチル化、天然に存在するヌクレオチドのうちの1つまたは複数の類似体での置換、ヌクレオチド間の修飾（例えば、メチルホスホン酸、リン酸トリエステル、ホスホロアミド酸、カルバミン酸などの非電荷連結；ホスホロチオエート、ジチオリン酸などの電荷連結；ペプチドなどのペンドント部分；アクリジン、ソラレンなどの介入物；キレート剤；アルキル化剤；およびアルファアノマー核酸などの修飾連鎖）が含まれる。用語「核酸分子」には、一本鎖、二本鎖、部分的二重鎖、三重鎖、ヘアピン状、環状、およびパドロック立体構造を含む、いかなるトポロジー立体構造も含まれる。

【0029】

転写はDNA鎖に沿って5'から3'への様式で進行する。これは、RNAは、ピロリノ酸の必要な脱離を伴い、伸長する鎖の3'末端へのリボヌクレオチド-5'-三リン酸の逐次付加により作製されることを意味する。線形核酸分子でも環状核酸分子でも、別々のエレメント（例えば、特定のヌクレオチド配列）は、他のエレメントから5'方向にある同じ核酸に結合しているまたは結合していると考えられる場合、そのエレメントに対して「上流」にあると称することができる。同様に、別々のエレメントは、他のエレメントから3'方向にある同じ核酸に結合しているまたは結合していると考えられる場合、そのエレメントに対して「下流」にあると称することができる。

【0030】

本明細書で使用されるように、用語「塩基位」とは指定された核酸内での所与の塩基またはヌクレオチド残基の位置を指す。指定された核酸は、参照核酸とのアライメントによって定義することができる。

【0031】

本明細書で使用されるように、用語「ハイブリダイゼーション」とは、オリゴヌクレオチドおよびその類似物が、相補的塩基間でのワツソンクリック、フーグスティーン、または逆フーグスティーン水素結合を含む水素結合によりハイブリダイズするプロセスを指す。一般には、核酸分子は、シトシン(C)、ウラシル(U)、およびチミン(T)などのピリミジン、またはアデニン(A)およびグアニン(G)などのプリンのいずれかである窒素含有塩基からなる。窒素含有塩基はピリミジンとプリンの間で水素結合を形成し、ピリミジンのプリンへの結合は「塩基対合」と呼ばれる。さらに具体的には、AはTまたはUと特異的な水素結合を形成し、GはCと特異的に結合する。「相補的」とは、2つの異なる核酸配列または同じ核酸配列の2つの異なる領域の間で生じる塩基対合のことである。

【0032】

本明細書で使用されるように、用語「特異的にハイブリダイズ可能な」および「特異的に相補的な」とは、オリゴヌクレオチドとDNAまたはRNA標的の間に安定で特異的な結合が生じるのに十分な程度の相補性を指す。オリゴヌクレオチドは、特異的にハイブリダイズするのに標的配列に対して100%相補的である必要はない。オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドが標的DNAまたはRNA分子に結合すると標的DNAまたはRNAの正常な機能が妨げられ、特異的な結合が望ましい条件下、例えば、in vivoアッセイまたは系の場合には生理的条件下で、オリゴヌクレオチドの非標的配列への非特異的結合を回避するのに十分な程度の相補性がある場合には特異的にハイブリダイズ可能である。このような結合は特異的ハイブリダイゼーションと称される。特定程度の厳密性をもたらすハイブリダイゼーション条件は、選択されるハイブリダイゼーション法の性質ならびにハイブリダイズする核酸配列の組成および長さに応じて変動することになる。一般に、ハイブリダイゼーションの温度およびハイブリダイゼーションバッファーのイオン

10

20

30

40

50

強度（特に、 Na^+ および／または Mg^{2+} 濃度）はハイブリダイゼーションの厳密性に寄与することになるが、洗浄回数も厳密性に影響を及ぼす。特定程度の厳密性を達成するのに必要なハイブリダイゼーション条件に関する計算はSambrook et al. (ed.), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989において論じられている。

【0033】

本明細書で使用されるように、用語「厳密な条件」は、ハイブリダイゼーション分子とDNA標的の間にあるミスマッチが50%未満の場合にのみハイブリダイゼーションが起きる条件を包含する。「厳密な条件」はさらに特定レベルの厳密性を含む。したがって、本明細書で使用されるように、「中程度の厳密性」条件とは、50%を超える配列ミスマッチを有する分子がハイブリダイズしない条件であり、「高厳密性」の条件とは、20%を超えるミスマッチを有する配列がハイブリダイズしない条件であり、「超高厳密性」の条件とは、10%を超えるミスマッチを有する配列がハイブリダイズしない条件である。特定の実施形態では、厳密な条件は、65°でのハイブリダイゼーションとそれに続く65°での、0.1×SSC/0.1%SDSによる、40分間の洗浄を含むことが可能である。以下は代表的な、非限定的ハイブリダイゼーション条件である。

・超高厳密性：5×SSCバッファー中、65°で、16時間のハイブリダイゼーション；2×SSCバッファー中、室温で、それぞれ15分間の2度の洗浄；および0.5×SSCバッファー中、65°で、それぞれ20分間の2度の洗浄

・高厳密性：5～6×SSCバッファー中、65～70°で、16～20時間のハイブリダイゼーション；2×SSCバッファー中、室温で、それぞれ5～20分間の2度の洗浄；および1×SSCバッファー中、55～70°で、それぞれ30分間の2度の洗浄

・中程度の厳密性：6×SSCバッファー中、室温～55°で、16～20時間のハイブリダイゼーション；2～3×SSCバッファー中、室温～55°で、それぞれ20～30分間の少なくとも2度の洗浄

一実施形態では、特異的にハイブリダイズ可能な核酸分子は超高厳密性ハイブリダイゼーション条件下で結合したままであってよい。一実施形態では、特異的にハイブリダイズ可能な核酸分子は高厳密性ハイブリダイゼーション条件下で結合したままであってよい。一実施形態では、特異的にハイブリダイズ可能な核酸分子は中程度の厳密性ハイブリダイゼーション条件下で結合したままであってよい。

【0034】

本明細書で使用されるように、用語「オリゴヌクレオチド」とは短い核酸ポリマーを指す。オリゴヌクレオチドは、長い核酸セグメントの切断により、または個々のヌクレオチド前駆体を重合化することにより形成することができる。自動合成装置により、数百塩基対長までのオリゴヌクレオチドの合成が可能である。オリゴヌクレオチドは相補的ヌクレオチド配列に結合することができるので、DNAまたはRNAを検出するためのプローブとして使用することができる。DNAから構成されているオリゴヌクレオチド（オリゴデオキシリボヌクレオチド）は、小DNA配列の增幅のための技法である、ポリメラーゼ連鎖反応で使用することができる。ポリメラーゼ連鎖反応では、オリゴヌクレオチドは典型的には「プライマー」と呼ばれ、これのおかげでDNAポリメラーゼはオリゴヌクレオチドを伸長させて相補鎖を複製することが可能になる。

【0035】

本明細書で使用されるように、用語「ポリメラーゼ連鎖反応」または「PCR」とは、米国特許第4,683,195号に記載されているように、微量の核酸、RNA、および／またはDNAを増幅させる手順または技法を指す。一般には、オリゴヌクレオチドプライマーを設計することができるように、対象の領域の末端またはその後ろからの配列情報が入手可能である必要がある。PCRプライマーは、増幅される核酸錠型の反対の鎖と配列が同一であるまたは類似していることになる。2つのプライマーの5'末端ヌクレオチドは増幅される材料の末端と一致していてもよい。PCRを使用して全ゲノムDNAおよび全細胞RNAから転写されたcDNA由来の特定のRNA配列またはDNA配列、バ

10

20

30

40

50

クテリオファージ、もしくはプラスミド配列などを増幅させることができる。一般には、Mullis et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 51:263 (1987); Erlich, ed., PCR Technology, (Stockton Press, NY, 1989) を参照されたい。

【0036】

本明細書で使用されるように、用語「プライマー」とは、条件がプライマー伸長産物の合成に適している場合に、相補鎖に沿って合成の開始点として働くことができるオリゴヌクレオチドを指す。合成条件には、4種の異なるデオキシリボヌクレオチド三リン酸（すなわち、A、T、GおよびC）および逆転写酵素またはDNAポリメラーゼなどの少なくとも1つの重合化誘導剤または酵素の存在が含まれる。これらの試薬は、典型的には、コファクターである成分または種々の適切な温度で、pHなどの条件に影響を与える成分を含んでいてもよい適切なバッファー中に存在する。プライマーは、増幅効率が最適化されるように一本鎖配列であることが好ましいが、二本鎖配列を利用してもよい。

10

【0037】

本明細書で使用されるように、用語「プローブ」とは、標的配列にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド配列を指す。TaqMan（登録商標）またはTaqMan（登録商標）スタイルアッセイ法では、プローブは2つのプライマーのアニーリング部位の間に位置する標的の一部にハイブリダイズする。プローブは、約8ヌクレオチド、約10ヌクレオチド、約15ヌクレオチド、約20ヌクレオチド、約30ヌクレオチド、約40ヌクレオチド、または約50ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、プローブは約8ヌクレオチド～約15ヌクレオチドを含む。

20

【0038】

サザンプロットアッセイ法では、プローブは膜に結合しているDNA断片にハイブリダイズする。プローブは、約10ヌクレオチド、約100ヌクレオチド、約250ヌクレオチド、約500ヌクレオチド、約1,000ヌクレオチド、約2,500ヌクレオチド、または約5,000ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、プローブは約500ヌクレオチド～約2,500ヌクレオチドを含む。

20

【0039】

プローブは、放射性標識、ビオチン化標識、フルオロフォア（例えば、Texas-Red（登録商標）、フルオレセインイソチオシアネートなど）などの検出可能な標識をさらに含むことができる。検出可能な標識は、プローブの5'末端または3'末端に位置するようにプローブオリゴヌクレオチドに直接共有結合することができる。フルオロフォアを含むプローブは、クエンチャー色素（例えば、Black Hole Quencher（商標）、Iowa Black（商標）など）をさらに含むこともできる。

30

【0040】

本明細書で使用されるように、用語「配列同一性」または「同一性」とは、互換的に使用することができ、特定の比較窓にわたって最大一致するように整列された場合に同一である2つの配列における核酸残基を指す。

【0041】

本明細書で使用されるように、用語「配列同一性のパーセンテージ」または「配列相同性のパーセンテージ」とは、比較窓にわたり2つの最適に整列された配列（例えば、核酸配列またはアミノ酸配列）を比較することにより決定される値を指し、比較窓の配列の部分は、2つの配列の最適なアライメントを得るために参照配列と比べた場合、付加、置換、ミスマッチ、および／または欠失（すなわち、ギャップ）を含むことがある。パーセンテージは、両方の配列に同一の核酸またはアミノ酸残基が存在する位置の数を決定して、マッチする位置の数を得、マッチする位置の数を比較窓における全位置数で割り、その結果に100を掛けて配列同一性のパーセンテージを得ることにより計算される。比較のために配列を整列させるための方法は周知である。種々のバイオインフォマティックスまたはコンピュータプログラムならびにClustalWおよびSequenceXerなどのアライメントアルゴリズムも当技術分野では周知でありおよび／または、例えば、Smith and Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482; Needleman and Wunsch (1970) J. Mol.

40

50

Biol. 48:443; Pearson and Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:2444; Higgins and Sharp (1988) Gene 73:237-44; Higgins and Sharp (1989) CABIOS 5:151-3; Corpet et al. (1988) Nucleic Acids Res. 16:10881 - 90; Huang et al. (1992) Comp. Appl. Biosci. 8:155 - 65; Pearson et al. (1994) Methods Mol. Biol. 24:307-31; Taliana et al. (1999) FEMS Microbiol. Lett. 174:247-50に記載されている。

【0042】

国立バイオテクノロジー情報センター（NCBI）Basic Local Alignment Search Tool（BLAST（商標）；Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10）は、いくつかの配列分析プログラムに関連して使用するためには、国立バイオテクノロジー情報センター（Bethesda、MD）を含むいくつかの供給源からおよびインターネット上で利用することが可能である。このプログラムを使用して配列同一性を決定する方法の説明は、インターネット上のBLAST（商標）の「help」セクション下で入手可能である。核酸配列の比較では、BLAST（商標）（blastn）プログラムの「blast2配列」機能を、デフォルトパラメータを使用して用いることができる。参照配列に対してはるかに大きな類似性を有する核酸配列は、この方法によって評価した場合、パーセンテージ同一性の増加を示すことになる。

10

【0043】

本明細書で使用されるように、用語「作動可能に連結された」とは、核酸が別の核酸と機能的な関係に置かれていることを指す。一般に、「作動可能に連結された」は、連結された核酸が近接していることを意味することがある。連結は、都合の良い制限部位でのライゲーションにより達成され得る。このような部位が存在しない場合には、合成オリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーを核酸にライゲートさせるまたはアニールさせ、これを使用して近接するポリヌクレオチド断片を連結させる。しかし、エレメントは、作動可能に連結されるために近接している必要はない。

20

【0044】

本明細書で使用されるように、用語「プロモーター」とは、DNAのうち、一般に遺伝子の上流に位置しており（すなわち、遺伝子の5'末端方向）、遺伝子の転写を開始させ推進するのに必要な領域を指す。プロモーターは、それが制御している遺伝子の適切な活性化または抑制を可能にすることができる。プロモーターは転写因子により認識される特異的な配列を含有し得る。これらの因子はプロモーターDNA配列に結合することができ、これにより、遺伝子のコード領域からRNAを合成する酵素であるRNAポリメラーゼが動員される。プロモーターとは一般には、5' - UTR、イントロン、およびリーダー配列を含む、遺伝子の上流に位置するあらゆる遺伝子調節エレメントを指す。

30

【0045】

本明細書で使用されるように、用語「上流プロモーター」とは、転写の開始を指示するのに十分である近接ポリヌクレオチド配列を指す。本明細書で使用されるように、上流プロモーターは、TATAボックス、イニシエーター（Intr）配列、TFIIB認識エレメント（BRE）、および他のプロモーターモチーフを含むいくつかの配列モチーフを有する転写開始部位を包含する（Jennifer, E.F. et al., (2002) Genes & Dev., 16: 2583-2592）。上流プロモーターは、TFIIA、B、D、E、F、およびHのような基本的または一般的転写因子を有する多サブユニット酵素であるRNAポリメラーゼIIに作用部位を提供する。これらの因子は会合して転写開始複合体（PIC）となり、DNA錆型からのRNAの合成を触媒する。

40

【0046】

上流プロモーターの活性化は、調節DNA配列エレメントの付加により遂行され、このエレメントに種々のタンパク質が結合し引き続いて転写開始複合体と相互作用して遺伝子発現を活性化する。これらの遺伝子調節エレメント配列は特定のDNA結合因子と相互作用する。これらの配列モチーフはcis-エレメントと称されることもある。このようなcis-エレメントは、組織特異的または発生特異的転写因子が結合するが、独立してまたは組み合わせて、プロモーターの時空間的発現パターンを転写レベルで決定することが

50

できる。これらのc i s - エレメントは、それが作動可能に連結された遺伝子に及ぼす制御の種類が広く異なる。いくつかのエレメントは環境応答（例えば、温度、湿度、および傷）に呼応して作動可能に連結された遺伝子の転写を増加するように作用する。他のc i s - エレメントは、発生上の合図（例えば、発芽、種子成熟、および開花）にまたは空間情報（例えば、組織特異性）に応答することができる。例えば、Langridge et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:3219-23を参照されたい。これらのc i s - エレメントは転写開始点から様々な距離に位置している。いくつかのc i s - エレメント（近位エレメントと称される）は最小コアプロモーター領域に隣接しており、他のエレメントはプロモーターの数キロ塩基5'上流にまたは3'下流に位置していることがある（エンハンサー）。

10

【0047】

本明細書で使用されるように、用語「形質転換」は核酸分子を細胞内に導入することができるあらゆる技法を包含する。例には、ウイルスベクターを用いるトランスフェクション、プラスミドベクターを用いる形質転換、エレクトロポレーション、リポフェクション、マイクロインジェクション（Mueller et al. (1978) Cell 15:579-85）、アグロバクテリウム（Agrobacterium）媒介導入、直接DNA取込み、WHISKERS（商標）媒介形質転換、および微粒子銃が含まれるがこれらに限定されない。これらの技法は、植物細胞の安定な形質転換と一過性形質転換の両方のために使用することができる。「安定な形質転換」とは、遺伝子的に安定した遺伝をもたらす宿主生物のゲノム内への核酸断片の導入を指す。安定的に形質転換されると、核酸断片は宿主生物およびそれに続くいかなる世代のゲノムにも安定的に組み込まれる。形質転換された核酸断片を含有する宿主生物は「トランスジェニック」生物と称される。「一過性形質転換」とは、遺伝子的に安定した遺伝のない遺伝子発現をもたらす、宿主生物の核またはDNA含有オルガネラ内への核酸断片の導入を指す。

20

【0048】

本明細書で使用されるように、用語「形質導入する」とは、ウイルスが核酸を細胞内に移入させるプロセスである。

【0049】

本明細書で使用されるように、用語「導入遺伝子」とは、外来性核酸配列を指す。一例では、導入遺伝子は遺伝子配列（例えば、除草剤抵抗性遺伝子）、産業的にまたは薬剤的に有用な化合物をコードする遺伝子、または望ましい農業上の形質をコードする遺伝子である。さらに別の例では、導入遺伝子はアンチセンス核酸配列であり、アンチセンス核酸配列の発現により標的核酸配列の発現が阻害される。導入遺伝子は、導入遺伝子に作動可能に連結された調節配列（例えば、プロモーター、イントロン、5' - UTR、または3' - UTR）を含有することができる。いくつかの実施形態では、対象の核酸は導入遺伝子である。しかし、他の実施形態では、対象の核酸は、その追加のゲノムコピーが望まれる内在性核酸、または宿主生物における標的核酸の配列に関してアンチセンス方向である核酸である。

30

【0050】

本明細書で使用されるように、用語「ベクター」とは、細胞内に導入され、それによって形質転換細胞を生成する核酸分子を指す。ベクターは、宿主細胞においてベクターが複製するのを可能にする、複製起点などの核酸配列を含むことができる。例には、プラスミド、コスミド、バクテリオファージ、細菌人工染色体（BAC）、または外来性DNAを細胞内に運搬するウイルスが含まれるがこれらに限定されない。ベクターは、1つまたは複数の遺伝子、アンチセンス分子、選択可能なマーカー遺伝子、および当技術分野で既知の他の遺伝子エレメントも含むことができる。ベクターは細胞を形質導入し、形質転換し、または細胞に感染し、それによってベクターにコードされている核酸分子および／またはタンパク質を細胞に発現させる。ベクターは、核酸分子の細胞内への進入を達成するのを支援する材料（例えば、リポソーム）を場合によって含んでいてもよい。

40

【0051】

50

本明細書で使用されるように、用語「カセット」、「発現カセット」、および「遺伝子発現カセット」とは、特異的な制限部位でまたは相同組換えにより核酸またはポリヌクレオチドに挿入することができるDNAのセグメントを指す。DNAのセグメントは、対象の小分子RNAまたはポリペプチドをコードする対象の遺伝子を含有するポリヌクレオチドを含み、カセットおよび制限部位は、転写および翻訳のための適切なリーディングフレームへのカセットの挿入を確実にするように設計される。一実施形態では、発現カセットは対象の小分子RNAまたはポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むことができ、ポリヌクレオチドに加えて特定の宿主細胞の形質転換を促進するエレメントを有することができる。一実施形態では、遺伝子発現カセットは、宿主細胞での対象のポリペプチドをコードする小分子RNAまたはポリヌクレオチドの増強された発現を可能にするエレメントも含むことができる。これらのエレメントには、プロモーター、最小プロモーター、エンハンサー、応答エレメント、イントロン、5' - UTR、3' - UTR、終結配列、ポリアデニル化配列などを含むことができるが、これらに限定されない。

10

【0052】

本明細書で使用されるように、用語「異種コード配列」は、正常には宿主生物には存在せず、適切な条件下で宿主細胞において発現させることができるペプチドまたはタンパク質またはその等価なアミノ酸配列、例えば、酵素をコードする、または最終的にコードする任意のポリヌクレオチドを示すのに使用される。したがって、「異種コード配列」は、細胞が、正常にはその細胞に存在しないコード配列の追加のコピーを発現するように、正常には宿主細胞に存在しないコード配列の1つまたは追加のコピーを含むことができる。異種コード配列は、RNAもしくはその任意の種類（例えば、mRNA）、DNAもしくはその任意の種類（例えば、cDNA）、またはハイブリッドRNA/DNAであってよい。コード配列の例には、コード配列、イントロン、プロモーター領域、5' - UTR、3' - UTR、およびエンハンサー領域などの特長を含む完全長転写単位が含まれるがこれに限定されない。

20

【0053】

「異種コード配列」は、ペプチドもしくは酵素のコード部分（すなわち、cDNAもしくはmRNA配列）、完全長転写単位のコード部分（すなわち、イントロンとエキソンを含む遺伝子）、「コドン最適化」配列、切断型配列または酵素をコードするもしくは、等価なアミノ酸配列が機能的なタンパク質を生じる限り、その等価なアミノ酸配列をコードする他の形の改変された配列も含む。このような等価なアミノ酸配列は、1つまたは複数のアミノ酸の欠失を有してもよく、欠失はN末端、C末端、または内部である。切断型は、それが本明細書に示される触媒能力を有する限り、企図されている。

30

【0054】

本明細書で使用されるように、用語「対照」とは、比較目的で分析手順において使用される試料を指す。対照は「陽性」でも「陰性」でも可能である。例えば、分析手順の目的が細胞または組織において差次的に発現される転写物またはポリペプチドを検出することである場合、一般には、所望の発現を示す既知の植物由来の試料などの陽性対照、および所望の発現を欠く既知の植物由来の試料などの陰性対照を含むことが好ましい。

40

【0055】

本明細書で使用されるように、用語「植物」は、植物ならびに、植物細胞および葉、カルス、茎、根、花、花粉と種子などの植物組織を含むがこれらに限定されない植物部分を含む。本発明で使用することができる植物の種類は、一般に、被子植物、裸子植物、シダ類、および多細胞の藻類を含む、変異原性を受け入れられる高等および下等植物の種類と同じだけ広い。したがって、「植物」は双子葉植物および单子葉植物を含む。双子葉植物の例には、タバコ、シロイヌナズナ (Arabidopsis)、ダイズ、トマト、パパイヤ、キャノーラ、ヒマワリ、ワタ、アルファルファ、ジャガイモ、ブドウ、キマメ、エンドウマメ、アブラナ属 (Brassica)、ヒヨコマメ、サトウダイコン、ナタネ、スイカ、メロン、コショウ、ピーナッツ、カボチャ (pumpkin)、ダイコン、ホウレンソウ、カボチャ (squash)、ブロッコリー、キャベツ、ニンジン、カリフラワー、セロリ、ハクサイ、キュウリ

50

、ナス、およびレタスが含まれる。単子葉植物の例には、トウモロコシ、イネ、コムギ、サトウキビ、オオムギ、ライムギ、モロコシ、ラン、タケ、バナナ、ガマ、ユリ、カラスムギ、タマネギ、アワ、およびライコムギが含まれる。

【0056】

本明細書で使用されるように、用語「植物原料」とは、葉、カルス、茎、根、花もしくは花部、果実、花粉、卵細胞、接合体、種子、切り枝、細胞もしくは組織培養物、または植物の他の任意の部分もしくは産物を指す。一実施形態では、植物原料には子葉および葉が含まれる。一実施形態では、植物原料には根組織および地下に位置する他の植物組織が含まれる。

【0057】

本明細書で使用されるように、用語「選択可能なマーカー遺伝子」とは、例えば、植物細胞を選択剤から保護するためにまたは選択剤に対する抵抗性／耐性を与えるために、場合により植物形質転換において使用される遺伝子を指す。さらに、「選択可能なマーカー遺伝子」はレポーター遺伝子を包含することを意味する。機能的選択可能マーカーを受け入れる細胞または植物のみが、選択剤を有する条件下で分裂するまたは成長することができる。選択剤の例には、例えば、スペクチノマイシン、ネオマイシン、カナマイシン、パロモマイシン、ゲンタマイシン、およびハイグロマイシンを含む抗生物質を含むことができる。これらの選択可能マーカーには、抗生物質カナマイシンに対する耐性を与える酵素を発現するネオマイシンホスホトランスフェラーゼ(*npt* II)、関連抗生物質であるネオマイシン、パロモマイシン、ゲンタマイシン、およびG 4 1 8の遺伝子、またはハイグロマイシンに対する耐性を与える酵素を発現するハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ(*hpt*)の遺伝子が含まれる。他の選択可能マーカー遺伝子は、*barr*または*pat*(グルホシネットアンモニウムまたはホスフィノトリシンに対する抵抗性)、アセト乳酸シナーゼ(ALS)、スルホニル尿素(SU)、イミダゾリノン(IMI)、トリアゾロピリミジン(TP)、ピリミジニルオキシベンゾエート(POB)、および分岐鎖アミノ酸の合成の第1段階を妨げるスルホニルアミノカルボニルトリアゾリノンなどの阻害剤に対する抵抗性)、グリホサート、2,4-D、および金属抵抗性または感受性を含む除草剤抵抗性をコードする遺伝子を含むことができる。選択可能マーカー遺伝子として使用することができる「レポーター遺伝子」の例には、グルクロニダーゼ(GUS)をコードするタンパク質、ルシフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質(GFP)、黄色蛍光タンパク質(YFP)、DsRed、ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)、アルカリホスファターゼなどの発現されたレポーター遺伝子タンパク質の目視観察が含まれる。語句「マーカー陽性」とは、選択可能マーカー遺伝子を含むように形質転換された植物を指す。

【0058】

本明細書で使用されるように、用語「検出可能なマーカー」とは、例えば、放射性同位元素、蛍光化合物、生物発光化合物、化学発光化合物、金属キレート、または酵素などの検出可能な標識を指す。検出可能なマーカーの例には以下のもの、蛍光標識(例えば、FITC、ローダミン、ランタニド蛍光体)、酵素標識(例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ)、化学発光、ビオチニル基、二次レポーターにより認識される所定のポリペプチドエピトープ(例えば、ロイシンジッパー配列、二次抗体の結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ)が含まれるがこれらに限定されない。一実施形態では、検出可能なマーカーには、潜在的な立体障害を減らす種々の長さのスペーサーアームが結合することができる。

【0059】

本明細書で使用されるように、用語「検出する」は、特定の分子の定性的および定量的測定の両方、例えば、特定のポリペプチドの測定を含むもっとも広い意味で使用される。

【0060】

他の方法で明確に説明されなければ、本明細書で使用される専門用語および科学用語全てが、本開示が属する技術分野の当業者により一般的に理解されているのと同じ意味を有

する。分子生物学における共通語の定義は、例えば、Lewin, Genes V, Oxford University Press, 1994; Kendrew et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, Blackwell Science Ltd., 1994; and Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference, VCH Publishers, Inc., 1995に見出すことができる。

【0061】

遺伝子発現調節エレメントとしてのプロモーター

基礎研究またはバイオテクノロジー応用のために使用される植物プロモーターは一般に一方向性であり、その3'末端(下流)に融合された導入遺伝子の構成的発現を指示する。多くの場合、代謝工学および形質スタッキングのために植物内で導入遺伝子を強く発現させる必要がある。さらに、複数の遺伝子の発現を推進するためには、トランスジェニック作物中に複数の新規プロモーターが典型的には必要である。3'末端で融合された導入遺伝子の発現を指示することが可能な構成的プロモーターが本明細書では開示されている。

10

【0062】

トランスジェニック産物の開発はますます複雑になっており、これは導入遺伝子を強く発現させ、単一遺伝子座に複数の導入遺伝子をスタックすることを必要とする。従来では、それぞれの導入遺伝子は発現のための独自のプロモーターを必要とし、1つの遺伝子スタック内で異なる導入遺伝子を発現させるには複数のプロモーターが必要である。遺伝子スタックのサイズが増えるに従って、この方法では、単一の多遺伝子形質の発現のために異なる導入遺伝子の類似するレベルの発現パターンを得るのに同一プロモーターを繰り返し使用する場合が多くなる。

20

【0063】

同一プロモーターにより推進される多遺伝子構築物は、遺伝子サイレンシングを引き起こし、圃場でのトランスジェニック産物の効果が低くなることで知られている。プロモーター繰り返しに起因する過剰な転写因子(TF)結合部位のために、内在性TFが枯渇し転写不活化をもたらし得る。導入遺伝子のサイレンシングは、導入遺伝子を発現する生産されたトランスジェニック植物の性能に望ましくない影響を及ぼす可能性がある。導入遺伝子内の反復配列のために、遺伝子遺伝子座内相同組換えをもたらして、ポリヌクレオチド再編成が生じことがある。

30

【0064】

構成的プロモーターに加えて、組織特異的、または器官特異的プロモーターは、植物のカーネル、根、葉、カルス、花粉、またはタペータムなどのある種の組織における遺伝子発現を推進する。組織および発生段階特異的プロモーターは、特定の組織でまたは植物発生中の特定の時期に発現される遺伝子の発現を推進する。組織特異的プロモーターはトランスジェニック植物産業におけるある種の適用に必要であり、組織におけるおよび/または選択された発生段階における異種遺伝子の特異的発現を可能にし、種々の器官、組織、および/または異なる時間での異種遺伝子の発現を差次的に示すが他では示さないので望ましい。

【0065】

例えば、土壤伝播性病原菌による感染に対する植物の抵抗性の増加は、病原菌抵抗性タンパク質が植物内で強く発現されるように、植物ゲノムを病原菌抵抗性遺伝子で形質転換することにより達成し得る。代わりに、例えば、細胞分裂または伸長などの特定の増殖または発生期にある植物組織において導入遺伝子を発現させるのが望ましい場合がある。別の応用では、プロモーターが農学的形質をコードする導入遺伝子の発現を発生中の植物部分(すなわち、根、葉、カルス、または花粉)に限局するように、組織特異的プロモーターを使用することが望ましい。

40

【0066】

本明細書に記載されるプロモーターは、複数の遺伝子を含有する商業的導入遺伝子構築物を作製するための有望なツールである。これらのプロモーターは、導入遺伝子サイレン

50

シングを減少させるなどの、細菌宿主における構造的安定性および植物細胞における機能的安定性も与えて、導入遺伝子発現を可能にする。発現範囲が変化するプロモーターも、本明細書に記載される方法を用いることにより得ることができる。単一のプロモーターを複数回使用する導入遺伝子構築物と比べて、本出願に記載される多様化したプロモーター構築物は、トランスジェニック事象の下流分子分析により適合性がある。本明細書に記載される多様化したプロモーターを使用すれば、亜鉛フィンガー技術を用いたターゲティング中のトランスジェニック多遺伝子座の再編成も軽減することができる (SHUKLA et al. 2009)。

【0067】

トウモロコシ (*Zea mays*) ユビキチン - 1 プロモーター

10

トウモロコシ (*Zea mays*) U b i - 1 プロモーターはバイオテクノロジー産業標準であり、主にトウモロコシにおける安定した高トランスジェニック発現のために使用されている (CHRISTENSEN and QUAIL 1996; CHRISTENSEN et al. 1992; TOKI et al. 1992)。それぞれの導入遺伝子は通常、十分な発現のために特異的なプロモーターを必要とする。1つの遺伝子スタック内で異なる導入遺伝子を発現させるためには典型的には複数のプロモーターが必要である。このパラダイムは、多くの場合、その所望の高レベルなタンパク質発現および構成的発現パターンにより、トウモロコシ (*Z. mays*) U b i - 1 プロモーターを繰り返し使用する。

【0068】

しかし、トランスジェニック遺伝子座に反復配列を計画的に導入すると、導入遺伝子発現および安定性に対して望ましくない負の効果をもたらすこともある (FLADUNG and KUMAR 2002; KUMAR and FLADUNG 2000a; KUMAR and FLADUNG 2000b; KUMAR and FLADUNG 2001a; KUMAR and FLADUNG 2001b; KUMAR and FLADUNG 2002; METTE et al. 1999; MOURRAIN et al. 2007)。複数の協調的導入遺伝子発現という難問は、プロモーター多様性アプローチを使用して取り組むことができ、異なるプロモーターを使用して同じ発現プロファイルを有する異なる導入遺伝子を推進する (PEREMARTI et al. 2010)。本出願は、異なるトウモロコシ (*Zea mays*) 遺伝子型から新規のプロモーターを同定し精製することにより得られた多様化した U b i - 1 プロモーター配列を記載している。

20

【0069】

植物遺伝子における遺伝子発現の転写開始および調節は、プロモーターと称されるより大きな配列において集合的に配置された種々のDNA配列エレメントにより指示される。真核生物プロモーターは典型的には最小コアプロモーターおよび上流調節配列からなる。コアプロモーターは、転写の正確な開始を指示するのに十分である最小ストレッチの近接DNA配列である。植物のコアプロモーターは、一般に、C A A T およびT A T A ボックスなどの転写開始と関連のあるカノニカル領域 (コンセンサス配列 T A T A W A W) を含む。T A T A ボックスエレメントは通常、転写開始部位 (T S S) のおよそ 20 ~ 35 塩基対 (bp) 上流に位置している。コアプロモーターの活性化は上流調節配列により達成され、その配列に種々のタンパク質が結合し、引き続いて転写開始複合体と相互作用して遺伝子発現を活性化する。これらの調節エレメントは、プロモーターの時空間的発現パターンを決定するDNA配列を含む。

30

【0070】

図1を参照すると、トウモロコシ (*Z. mays*) U b i - 1 遺伝子プロモーターはトウモロコシ (*Z. mays*) 自殖細胞株 B 7 3 由来である。トウモロコシ (*Z. mays*) U b i - 1 プロモーターは、T S S の 5' 上流に位置するおよそ 8 9 5 bp のDNA配列 (すなわち、上流エレメント) から構成される。さらに、トウモロコシ (*Z. mays*) U b i - 1 プロモーターは、T S S の 3' 下流に位置する約 1 0 9 3 bp のDNA配列から構成される (米国特許第 5,510,474 号参照)。したがって、トウモロコシ (*Z. mays*) U b i - 1 プロモーターは、およそ 2 キロ塩基対 (kb) の全DNA配列から構成される。

40

【0071】

トウモロコシ (*Z. mays*) U b i - 1 プロモーターの上流エレメントは、T S S のおよ

50

そ30bp 5' 上流に位置するTATAボックスを含む(図1および図3)。さらに、上流エレメントはTSSの直ぐ5' 上流に位置する2つの重複している熱ショックコンセンサスエレメントを含む。82bp 5' - UTRまたはリーダー配列はTSSの直ぐ3' 下流に位置しており、続いてイントロンが塩基83~1093まで伸びている(図1および図3)。

【0072】

以前の研究では、トウモロコシ(*Z. mays*) Ub*i*-1プロモーターにより調節される遺伝子および/または導入遺伝子の遺伝子発現の増加が記載された。例えば、クロラムフェニコールアセチルトランスクレオチド(CAT)遺伝子をトウモロコシ(*Z. mays*) Ub*i*-1プロモーターに転写融合させると、トウモロコシプロトプラストにおいて、カリフラワー-モザイクウイルス35Sプロモーターにより推進される発現の10倍を超えるレベルのCAT活性が得られた(CHRISTENSEN and QUAIL 1996; CHRISTENSEN et al. 1992)。

10

【0073】

制御トウモロコシ(*Z. mays*) Ub*i*-1プロモーターに加えて、本出願は新規のトウモロコシUb*i*-1プロモーターを説明する。トウモロコシ(*Z. mays*)遺伝子型c.v.B73由来の制御Ub*i*-1プロモーターとは違って、新規のUb*i*-1プロモーターはトウモロコシ(*Z. mays*)遺伝子型c.v.B104由来であった。ポリヌクレオチド配列を含むトウモロコシ(*Z. mays*)Ub*i*-1プロモーターを使用する構築物および方法が提供される。一実施形態では、プロモーターは、以下のトウモロコシ(*Z. mays*)c.v.B73 Ub*i*-1遺伝子由来のポリヌクレオチド配列を含むことができる。

20

【0074】

【化1-1】

```
GTGCAGCGTGACCCGGTCGTGCCCTCTAGAGATAATGAGCATTGCATGTC
TAAGTTATAAAAAATTACCATATTTCAGACTACACTTAACTTACTCTACGAATAATATAATCTA
TTTATCTATCTTATACATATATTAACTTACTCTACGAATAATATAATCTA
TAGTACTACAATAATATCAGTGTAGAGAACATATAATGAACAGTTAGA
CATGGTCTAAAGGACAATTGAGTATTTGACAACAGGACTCTACAGTTTATC
TTTTAGTGTGCATGTGTTCTCCTTTTGCAAATAGCTCACCTATATAAT
ACTTCATCCATTATTAGTACATCCATTAGGGTTAGGGTAATGGTTTTA
TAGACTAATTAGTACATCTATTCTATTAGCTAAAGTAACTAAAGAATTTAAG
AAAACAAAAACTCTATTAGTTTTATTAAATAGTTAGATATAAAATAGA
ATAAAATAAAAGTACTAAAAATTAAACAAATACCCTTAAGAAATTAAAAAA
ACTAAGGAAACATTTCCTGTTGAGTAGATAATGCCAGCCTGTTAACGC
CGTCGACGAGTCTAACGGACACCAACCAGCGAACAGCAGCGTCGCGTCGGG
CCAAGCGAAGCAGACGGCACGGCATCTCTGTCGCTGCCTCTGGACCCCTCTCG
```

30

40

【0075】

【化1-2】

AGAGTTCCGCTCCACCGTTGGACTTGCTCCGCTGTCGGCATCCAGAAATTGCG
 TGGCGGAGCGGCAGACGTGAGCCGGCACGGCAGGCGGCCTCCTCCTCCTC
 ACGGCACCGGCAGCTACGGGGATTCCCTCCCACCGCTCCTCGCTTCCCT
 CCTCGCCCCGCCGTAAATAAATAGACACCCCCCTCCACACCCTTTCCCCAACCT
 CGTGTGTTGGAGCGCACACACACAACCAGATCTCCCCAAATCCACCCG
 TCGGCACCTCCGCTCAAGGTACGCCGCTCGTCCTCCCCCCCCCCCCCTCTC
 10 TACCTTCTCTAGATCGCGTCCGGTCCATGCATGGTAGGGCCCGTAGTTC
 TACTTCTGTTCATGTTGTGTTAGATCCGTGTTGTGTTAGATCCGTGCTGCTA
 GCGTCGTACACGGATGCGACCTGTACGTACAGACACGTTCTGATTGCTAACTT
 GCCAGTGTCTCTGGGAATCCTGGATGGCTCTAGCGTCCGCAGACG
 GGATCGATTCAATATGCCGTGCACTTGTTGTCGGTCATCTTCAATGCTTT
 CCTTATTCAATATGCCGTGCACTTGTTGTCGGTCATCTTCAATGCTTT
 TTTTGTCTGGTGTGATGATGTGGTCTGGTGGCGGTCGTTAGATCGGA
 GTAGAATTCTGTTCAAACACTACCTGGTGGATTATTAATTGGATCTGTATGT
 20 GTGTGCCATACATATTCAAGTACGAAATTGAAGATGATGGATGGAAATATCG
 ATCTAGGATAGGTATACATGTTGATGCCGGTTACTGATGCATACAGAGA
 TGCTTTGTCGCTGGTGTGATGATGTGGTGGTGGCGGTCGTTCTAGATCGGA
 CGTTCTAGATCGGAGTAGAAACTACGTTCAAACACTACCTGGTGTATTATTAATT
 TTGGAACTGTATGTGTGTCATACATCTICATAGTTACGAGTTAAGATGGA
 TGGAAATATCGATCTAGGATAGGTATACATGTTGATGTGGGTTACTGATGC
 30 ATATACATGATGGCATATGCAGCATCTATTCAATGCTCTAACCTGAGTAC
 TATCTATTATAATAACAAGTATGTTTATAATTATTCGATCTGATATACTT
 GGATGATGGCATATGCAGCATATGTGGATTAGCCCTGCCTTCAT
 ACGCTATTATTGCTGGTACTGTTCTTGTGATGCTCACCCGTGTTGTTG
 GTGTTACTTCTGCA (配列番号1)

【0076】

別の実施形態では、プロモーターは、以下のトウモロコシ (*Z. mays*) c. v. B10
 4 Ubi-1 遺伝子由来のポリヌクレオチド配列を含むことができる。

【0077】

10

20

30

40

【化2-1】

CCCGGTCGTGCCCTCTAGAGATAAAGAGCATTGCATGTCTAAAGTATAAA
AAATTACACATATTTTTGTCACACTTATTGAAGTGTAGTTATCTATCTC
TATACATATTTAAACTTCACTCTACAAATAATATAGTCTATAACTAAAAA
TAATATTAGTGTAGAGGATCATATAAAACTGCTAGACATGGTCTAAA
GGATAATTGAATATTTGACAATCTACAGTTATCTTTAGTGTGCATGTGA
TCTCTCTGTTTTTGCAAATAGCTTGACCTATATAACTTCATCCATTAT

10

【0078】

【化2-2】

TAGTACATCCATTAGGATTAGGGTTGATGGTTCTATAGACTAATTTTAGT
 ACATCCATTATTCTTTAGTCTCTAATTTTAAACTAAAACCTATT
 AGTTTTATTATAATAATTAGATATAAAATGAAATAAAATAATTGACTACA
 AATAAAACAAATACCCTTAAGAAATAAAAAACTAAGCAAACATTTCTT
 GTTCGAGTAGATAATGACAGGCTGTTAACGCCGTCGACGAGTCTAACGGA
 CACCAACCAGCGAACCGAGCAGCGTCGCGTGGCCAAGCGAACGACGGC
 ACGGCATCTCTGTAGCTGCCTCTGGACCCCTCTCGAGAGTTCCGCTCCACCGT
 TGGACTTGCTCCGCTGTCGGCATCCAGAAATTGCGTGGCGAGCGGCAGACG
 TGAGGCAGGCACGGCAGGCCCTTCCTCCTCACGGCACCCGAGCTACG
 GGGGATTCTTCCCACCGCTCCTCGCTTCCCTCGCCCCGCCGTAATAA
 ATAGACACCCCTCCACACCCCTTTCCCCAACCTCGTGTTCGGAGCGC
 ACACACACGCAACCAGATCTCCCCAAATCCAGCCGTCGGCACCTCCGCTCA
 AGGTACGCCGCTCATCCTCCCCCCCCCTCTCTACCTCTAGATCGGCGA
 TCCGGTCCATGGTTAGGGCCCGTAGTTCTACTCTGTTCATGTTGTGTTAGA
 GCAAACATGTTCATGTTCATGTTGTGATGATGTGGTCTGGTGGCGGCGT
 TCTAGATCGGAGTAGGAACTGTTCAAGCTACCTGGTGGATTATTAAATT
 GTATCTGTATGTGTGCCATACATCTTCATACGAGTTAAGATGATGG
 ATGGAAATATCGATCTAGGATAGGTATACTGTTGATGCGGGTTACTGATG
 CATATACAGAGATGCTTTCTCGCTGGTGTGATGATATGGTCTGGTGG
 GCGGTCGTTCTAGATCGGAGTAGAATACTGTTCAAACACTACCTGGTGGATT
 TTAAAGGGCGTTCTAGATCGGAGTAGAATACTGTTCAAACACTACCTGGTGG
 TTTATTAAAGGATCTGTATGTATGTGCCTACATCTTCATAGTTACGAGTTAAG
 ATGATGGATGGAAATATCGATCTAGGATAGGTATACTGTTGATGCGGGTT
 ACTGATGCATATACAGAGATGCTTTCTCGCTGGTGTGATGATGTGGCTG
 GTTGGCGGCGTCTAGATCGGAGTAGAATACTGTTCAAACACTACCTGGTGG
 ATTATTAAATTGTTATCTTATGTGTGCCATACATCTTCATAGTTACGAGT
 TTAAGATGATGGATGGAAATATTGATCTAGGATAGGTATACTGTTGATGTGG
 GTTTACTGATGCATATACATGATGGCATATGCGGCATCTATTGATATGCTCA
 ACCTTGAGTACCTATCTATTATAATAAAACAAGTATGTTATAATTATTGAT
 CTTGATATACTGGATGATGGCATATGCAGCAGCTATATGTGGATTAGC
 CCTGCCTTCATACGCTATTATTGCTGGTACTGTTCTTGCCGATGCTCA
 CCCTGTTGTTGGTACTTCTGCAG (配列番号2)

10

20

30

40

50

【0079】

本明細書に記載されるプロモーターは、プロモーターの特異的領域（すなわち、上流プロモーター、5' - UTR、およびイントロン領域）を同定するためのクローニングおよ

びそれに続くDNA配列相同分析により特徴付けられた。植物において導入遺伝子を発現させるための上流プロモーター領域、5' - UTRまたはリーダー領域、およびイントロンのポリヌクレオチド配列を含む構成的トウモロコシ(*Z. mays*)Ub i - 1プロモーターを使用する構築物および方法が提供される。一実施形態では、プロモーターは以下のトウモロコシ(*Z. mays*)c.v.B73 Ub i - 1遺伝子由来の上流プロモーターポリヌクレオチド配列を含むことができる。

【0080】

【化3】

GTGCAGCGTGACCCGGTCGTGCCCTCTAGAGATAATGAGCATTGCATGTC
 TAAGTTATAAAAAATTACCACATATTTTTTGTCAACACTGTTGAAGTGCAG
 TTTATCTATCTTATACATATTTAAACTTACTCTACGAATAATATAATCTA
 TAGTACTACAATAATATCAGTGTAGAGAACATATAAATGAACAGTTAGA
 CATGGTCTAAAGGACAATTGAGTATTTGACAACAGGACTCTACAGTTTATC
 TTTTAGTGTGCATGTGTTCTCCTTTTGCAAATAGCTCACCTATATAAT
 ACTTCATCCATTATTAGTACATCCATTAGGTTAGGGTAATGGTTTTA
 TAGACTAATTTTTAGTACATCTATTCTATTCTATTAGCCTCTAAATTAAG
 AAAACTAAAATCTATTAGTTTTATTAAATAGTTAGATATAAAATAGA
 ATAAAATAAGTGAACAAAAATTAAACAAATACCCCTTAAGAAATTAAAAA
 ACTAAGGAAACATTTCCTGTTGAGTAGATAATGCCAGCCTGTTAACGC
 CGTCGACGAGTCTAACGGACACCAACCAGCGAACCGAGCGTCGCGTCGGG
 CCAAGCGAAGCAGACGGCACGGCATCTCTGTCGCTGCCTCTGGACCCCTCTCG
 AGAGTTCCGCTCCACCGTTGGACTTGCTCCGCTGCGCATCCAGAAATTGCG
 TGGCGGAGCGGCAGACGTGAGCCGGCACGGCAGGCGGCCTCCTCCCTCTC
 ACGGCACCGGCAGCTACGGGGATTCCCTCCACCGCTCCTCGCTTCCCT
 CCTCGCCCCGCGTAATAATAGACACCCCCCTCCACACCCCTCTT (配列番号3)

10

20

30

【0081】

別の実施形態では、プロモーターは以下のトウモロコシ(*Z. mays*)c.v.B104 Ub i - 1遺伝子由来の上流プロモーターポリヌクレオチド配列を含むことができる。

【0082】

【化4】

CCCGGTCGTGCCCTCTAGAGATAAAGAGCATTGCATGTCTAAAGTATAAA
 AAATTACACATATTTTTGTCACACTTATTGAAGTGTAGTTATCTATCTC
 TATACATATATTAACTTCACTCTACAAATAATATAGTCTATAACTAAAAA
 TAATATTAGTGTAGAGGATCATATAAAACTGCTAGACATGGTCTAAA
 GGATAATTGAATATTTGACAATCTACAGTTATCTTGTGCATGTGA
 TCTCTCTGTTTTGCAAATAGCTGACCTATATAACTTCATCCATTAT
 TAGTACATCCATTAGGATTAGGGTTGATGGTTCTATAGACTAATTAGT
 ACATCCATTATTCTTTAGTCTCTAATTAAACTAAACTCTATT
 AGTTTTTATTAAATAATTAGATATAAAATGAAATAAAATTGACTACA
 AATAAAACAAATACCCTTAAGAAATAAAAAACTAACGAAACATTCTT
 GTTCGAGTAGATAATGACAGGCTGTTAACGCCGTCGACGAGTCTAACGGA
 CACCAACCAGCGAACCAAGCAGCGTCGCGTCGGCCAAGCGAACGACGGC
 ACGGCATCTCTGTAGCTGCCTCTGGACCCCTCTCGAGAGTCCGCTCCACCGT
 TGGACTTGCTCCGCTGTCGGCATCCAGAAATTGCGTGGCGAGCGGCAGACG
 TGAGGCGGCACGGCAGGCGGCCTTCCTCCTCACGGCACCGCAGCTACG
 GGGGATTCCCTTCCCACCGCTCCTCGCTTCCCTCGCCCCGCCGTAATAA
 ATAGACACCCCTCCACACCCCTTT (配列番号4)

10

20

30

【0083】

追加の遺伝子調節エレメント

導入遺伝子発現は、上流プロモーター配列の3'下流に位置する5' - UTRおよび/またはイントロン領域によっても調節することができる。5' - UTRおよび/またはイントロンに作動可能に連結された上流プロモーター領域を含むプロモーターは導入遺伝子発現を調節することが可能である。上流プロモーターは転写を推進するのに必要であるが、5' - UTRおよび/またはイントロンが存在すれば発現レベルを増加させ、翻訳およびタンパク質合成のためのmRNA転写物をより多く産生することが可能である。上流プロモーターポリヌクレオチド配列に5' - UTRおよび/またはイントロンを付加させると、導入遺伝子の安定した発現を助けることが可能である。

40

【0084】

さらに、植物における導入遺伝子の発現を助けるため、上流プロモーターポリヌクレオチド配列を含む構成的プロモーターに5' - UTRまたはリーダー領域が続いてよい。一実施形態では、プロモーターは以下のトウモロコシ(*Z. mays*)c.v.B73 Ub i-1遺伝子由来の5' - UTRまたはリーダーポリヌクレオチド配列を含むことができる。

40

【0085】

【化5】

TCCCCAACCTCGTGTGTCGGAGCGCACACACACACAACCAGATCTCCCCCA
 AATCCACCGTCGGCACCTCCGCTTCAAG (配列番号5)

【0086】

別の実施形態では、プロモーターは以下のトウモロコシ(*Z. mays*)c.v.B104

50

U b i - 1 遺伝子由来の 5' - U T R またはリーダーポリヌクレオチド配列を含むことができる。

【 0 0 8 7 】

【 化 6 】

TCCCCAACCTCGTGTTCGGAGCGCACACACACGCAACCAGATCTCCCCC
AAATCCAGCCGTCGGCACCTCCGCTTCAAG (配列番号 6)

【 0 0 8 8 】

さらに、植物における導入遺伝子の発現を助けるため、上流プロモーターポリヌクレオチド配列に続いて 5' - U T R またはリーダー領域を含む構成的プロモーターにイントロンが続いてもよい。一実施形態では、プロモーターは以下のトウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 7 3 U b i - 1 遺伝子由来のイントロンポリヌクレオチド配列を含むことができる。

10

【 0 0 8 9 】

【 化 7 】

GTACGCCGCTCGCCTCCCCCCCCCCCTCTACCTTCTCTAGATCGGCG
TTCCGGTCCATGCATGGTAGGGCCCGTAGTTCTACTCTGTTCATGTTGTG
TTAGATCCGTGTTGTGTTAGATCCGTGCTGCTAGCGTCGTACACGGATGCG
ACCTGTACGTCAGACACGTTCTGATTGCTAACTGCCAGTGTTCTTTGGGG
AATCCTGGGATGGCTCTAGCCGTCAGACGGGATCGATTGATGATTTTT
TTTGTTCGTTGCATAGGGTTGGTTGCCCTTCCTTATTCAATATATGCC
GTGCACTGTTGCGGTCATCTTCATGCTTTTTGTCTGGTTGTGATG
ATGTGGTCTGGTTGGCGGTCGTTAGATCGGAGTAGAATTCTGTTCAAAC
TACCTGGTGGATTATTAATTGGATCTGTATGTGTGCCATACATATTCA
AGTTACGAATTGAAGATGATGGATGGAAATATCGATCTAGGATAGGTATA
TGGATGCGGGTTTACTGATGCATATACAGAGATGCTTTGTCGCTGGT
TGTGATGATGTGGTGTGGTTGGCGGTCGTTAGATCGGAGTAG
AATACTGTTCAAACACCTGGTGTATTATTAATTGGAACTGTATGTGTG
GTCATACATCTTCATAGTTACGAGTTAAGATGGATGGAAATATCGATCTAGG
ATAGGTATACATGTTGATGTGGTTTACTGATGCATATACATGATGGCATAT
GCAGCATCTATTGATGCTAACCTTGAGTACCTATCTATTATAATAACA
AGTATGTTATAATTTCGATCTGATATACTGGATGATGGCATATGCAG
CAGCTATATGTGGATTTAGCCCTGCCTCATACGCTATTATTGCTTGG
TACTGTTCTTGTGATGCTACCCCTGTTGGTGTACTCTGCA

20

(配列番号 7)

30

【 0 0 9 0 】

別の実施形態では、プロモーターは以下のトウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 1 0 4 U b i - 1 遺伝子由来のイントロンポリヌクレオチド配列を含むことができる。

40

【 0 0 9 1 】

【化8】

GTACGCCGCTCATCCTCCCCCCCCCTCTCTACCTTCTCTAGATCGCGATC
 CGGTCCATGGTTAGGGCCCGGTAGTTCTACTTCTGTTCATGTTGTGTTAGAGC
 AAACATGTTCATGTTCATGTTGTGATGATGTGGTCTGGTGGCGTCGTTCT
 AGATCGGAGTAGGATACTGTTCAAGCTACCTGGTGGATTATTAAATTGTA
 TCTGTATGTGTGCCATACATCTCATAGTTACGAGTTAAGATGATGGATG
 GAAATATCGATCTAGGATAGGTATACATGTTGATGCGGGTTTACTGATGCAT
 ATACAGAGATGCTTTCTCGCTTGGTGTGATGATATGGTCTGGTGGCG
 GTCGTTCTAGATCGGAGTAGAATACTGTTCAAACACTACCTGGTGGATTATTAA
 AAGGGTCGTTCTAGATCGGAGTAGAATACTGTTCAAACACTACCTGGTGGATT
 ATTAAAGGATCTGTATGTATGTGCCTACATCTCATAGTTACGAGTTAAGAT
 GATGGATGGAAATATCGATCTAGGATAGGTATACATGTTGATGCGGGTTTAC
 TGATGCATATACAGAGATGCTTTTCGCTTGGTGTGATGATGTGGTCTGGT
 TGGCGGTCGTTCTAGATCGGAGTAGAATACTGTTCAAACACTACCTGGTGGAT
 TTATTAAATTGTATCTTATGTGTGCCATACATCTCATAGTTACGAGTT
 AAGATGATGGATGGAAATATTGATCTAGGATAGGTATACATGTTGATGTGGG
 TTTACTGATGCATATACATGATGGCATATGCGGCATCTATTCATATGCTCTAA
 CCTTGAGTACCTATCTATTATAATAACAAAGTATGTTATAATTATTGATC
 TTGATATACTGGATGATGGCATATGCAGCAGCTATATGTGGATTAGCC
 CTGCCTTCATACGCTATTATTGCTTGGTACTGTTCTTGTCCGATGCTCAC
 CCTGTTGTTGGTGTACTTCTGCAG (配列番号8)

10

20

30

【0092】

導入遺伝子およびレポーター遺伝子発現力セット

導入遺伝子発現は遺伝子発現力セットによっても調節することができる。一実施形態では、遺伝子発現力セットはプロモーターを含む。一実施形態では、遺伝子発現力セットは Ubi - 1 プロモーターを含む。一実施形態では、遺伝子発現力セットは植物由来の Ubi - 1 プロモーターを含む。一実施形態では、遺伝子発現力セットは、トウモロコシ (*Z. mays*) c. v. B104 由来の Ubi - 1 プロモーターを含む。

【0093】

一実施形態では、遺伝子発現力セットは、トウモロコシ (*Z. mays*) c. v. B104 Ubi - 1 プロモーターであって、配列番号2に少なくとも 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.8%、または 100% 同一であるプロモーターを含む。一実施形態では、遺伝子発現力セットは、レポーター遺伝子または導入遺伝子に作動可能に連結されている、トウモロコシ (*Z. mays*) c. v. B104 Ubi - 1 プロモーターなどの構成的プロモーターを含む。一実施形態では、遺伝子発現力セットは、導入遺伝子に作動可能に連結されている構成的プロモーターを含み、導入遺伝子は、殺虫剤抵抗性導入遺伝子、除草剤耐性導入遺伝子、窒素利用効率導入遺伝子、水利用効率導入遺伝子、栄養品質導入遺伝子、DNA結合導入遺伝子、選択可能マーカー導入遺伝子、またはそれらの組合せであってよい。一実施形態では、構成的プロモーターを含む遺伝子発現力セットは 1つまたは複数の

40

50

導入遺伝子またはレポーター遺伝子の発現を推進することができる。一実施形態では、構成的プロモーターを含む遺伝子発現力セットは2つ以上の導入遺伝子またはレポーター遺伝子の発現を推進することができる。

【0094】

一実施形態では、遺伝子発現力セットは、トウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 1 0 4 U b i - 1 プロモーターであって、その上流プロモーター配列が配列番号4に少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.8%、または100%同一であるプロモーターを含む。一実施形態では、遺伝子発現力セットは、レポーター遺伝子または導入遺伝子に作動可能に連結されている、トウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 1 0 4 U b i - 1 上流プロモーターなどの構成的プロモーターを含む。一実施形態では、遺伝子発現力セットは、導入遺伝子に作動可能に連結されている構成的上流プロモーターを含み、導入遺伝子は、殺虫剤抵抗性導入遺伝子、除草剤耐性導入遺伝子、窒素利用効率導入遺伝子、水利用効率導入遺伝子、栄養品質導入遺伝子、DNA結合導入遺伝子、選択可能マーカー導入遺伝子、またはそれらの組合せであってよい。一実施形態では、構成的上流プロモーターを含む遺伝子発現力セットは1つまたは複数の導入遺伝子またはレポーター遺伝子の発現を推進することができる。一実施形態では、構成的上流プロモーターを含む遺伝子発現力セットは2つ以上の導入遺伝子またはレポーター遺伝子の発現を推進することができる。追加の実施形態では、上流プロモーターはイントロンを含むことができる。一実施形態では、上流プロモーターは、レポーター遺伝子または導入遺伝子に作動可能に連結されているイントロン配列を含むことができる。別の実施形態では、上流プロモーターは5' - UTRまたはリーダー配列を含むことができる。一実施形態では、上流プロモーターは、レポーター遺伝子または導入遺伝子に作動可能に連結されている5' - UTRまたはリーダー配列を含むことができる。さらに別の実施形態では、上流プロモーターは5' - UTRまたはリーダー配列およびイントロン配列を含むことができる。一実施形態では、上流プロモーターは、レポーター遺伝子または導入遺伝子に作動可能に連結されている5' - UTRまたはリーダー配列およびイントロン配列を含むことができる。

10

20

30

40

【0095】

一実施形態では、遺伝子発現力セットは、トウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 1 0 4 U b i - 1 プロモーターであって、その5' - UTRまたはリーダー配列が配列番号6に少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.8%、または100%同一であるプロモーターを含む。一実施形態では、遺伝子発現力セットは、プロモーターに作動可能に連結されているユビキチン-1タンパク質をコードするトウモロコシ遺伝子由来の5' - UTRまたはリーダーを含み、プロモーターは、トウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 1 0 4 U b i - 1 プロモーター、または植物(例えば、トウモロコシ (*Z. mays*) ユビキチン-1プロモーター)、ウイルス(例えば、キャッサバ葉脈モザイクウイルスプロモーター)、もしくは細菌(例えば、アグロバクテリウムツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) デルタ *m a s*)を起源とするプロモーターである。例示的実施形態では、遺伝子発現力セットは、導入遺伝子に作動可能に連結されているユビキチンタンパク質をコードするトウモロコシ遺伝子由来のトウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 1 0 4 5' - UTRまたはリーダー配列を含み、導入遺伝子は、殺虫剤抵抗性導入遺伝子、除草剤耐性導入遺伝子、窒素利用効率導入遺伝子、水利用効率導入遺伝子、栄養品質導入遺伝子、DNA結合導入遺伝子、選択可能マーカー導入遺伝子、またはそれらの組合せであってよい。

【0096】

一実施形態では、遺伝子発現力セットは、トウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 1 0 4 U b i - 1 プロモーターであって、そのイントロン配列が配列番号8に少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.8%、または100%同一であるプロモーターを含む。

50

一実施形態では、遺伝子発現力セットは、プロモーターに作動可能に連結されているユビキチン - 1タンパク質をコードするトウモロコシ遺伝子由来のイントロンを含み、プロモーターは、トウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 1 0 4 U b i - 1 プロモーター、または植物（例えば、トウモロコシ (*Zea mays*) ユビキチン - 1 プロモーター）、ウイルス（例えば、キャッサバ葉脈モザイクウイルスプロモーター）、もしくは細菌（例えば、アグロバクテリウムツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) デルタ *m a s*）を起源とするプロモーターである。例示的実施形態では、遺伝子発現力セットは、導入遺伝子に作動可能に連結されているユビキチンタンパク質をコードするトウモロコシ遺伝子由来のイントロンを含み、導入遺伝子は、殺虫剤抵抗性導入遺伝子、除草剤耐性導入遺伝子、窒素利用効率導入遺伝子、水利用効率導入遺伝子、栄養品質導入遺伝子、DNA結合導入遺伝子、選択可能マーカー導入遺伝子、またはそれらの組合せであってよい。

10

【 0 0 9 7 】

一実施形態では、ベクターは本明細書に記載される遺伝子発現力セットを含むことができる。一実施形態では、ベクターは、プラスミド、コスミド、細菌人工染色体 (BAC)、バクテリオファージ、ウイルス、またはドナーDNAなどの、直接形質転換もしくは遺伝子ターゲティングにおいて本発明者らのために切除されたポリヌクレオチド断片でもよい。

20

【 0 0 9 8 】

一実施形態では、細胞または植物は本明細書に記載される遺伝子発現力セットを含む。一実施形態では、細胞または植物は、本出願において開示される遺伝子発現力セットを含むベクターを含む。一実施形態では、ベクターは、プラスミド、コスミド、細菌人工染色体 (BAC)、バクテリオファージ、またはウイルスでもよい。それにより、遺伝子発現力セットを含む細胞または植物は、それぞれトランスジェニック細胞またはトランスジェニック植物である。

30

【 0 0 9 9 】

一実施形態では、トランスジェニック植物は単子葉植物でも双子葉植物でもよい。トランスジェニック単子葉植物の一実施形態は、トウモロコシ、コムギ、イネ、モロコシ、カラスムギ、ライムギ、バナナ、サトウキビ、およびアワでもよいがこれらに限定されない。トランスジェニック双子葉植物の一実施形態は、ダイズ、ワタ、ヒマワリ、またはキャノーラでもよいがこれらに限定されない。本明細書に記載されるように、一実施形態にはトランスジェニック植物由来のトランスジェニック種子も含まれる。

40

【 0 1 0 0 】

選択可能マーカー

種々の選択可能マーカーは、レポーター遺伝子とも言われるが、形質転換された植物（「形質転換体」）の同定および選択を可能にするために、選択された発現ベクター内に組み込むことができる。例えば、DNAシークエンシングとポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)、サザンプロットティング、RNAプロットティング、ホスフィノトリシン抵抗性を媒介する沈殿タンパク質などのベクターから発現されたタンパク質の検出のための免疫学的方法、または グルクロニダーゼ (GUS)、ルシフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質 (GFP)、黄色蛍光タンパク質 (YFP)、Ds Red、ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT)、アルカリホスファターゼなどをコードするレポーター遺伝子などの他のタンパク質の目視観察を含む、形質転換された植物における選択可能マーカーの発現を確かめるための多くの方法が利用可能である (Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition, Cold Spring Harbor Press, N.Y., 2001参照。その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。

50

【 0 1 0 1 】

選択可能マーカー遺伝子は形質転換された細胞または組織の選択のために利用される。選択可能マーカー遺伝子には、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼII (NEO) およびハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ (HPT) をコードする遺伝子などの抗生物質抵抗性をコードする遺伝子ならびに除草剤化合物に対する抵抗性を与える遺伝子が

50

含まれる。除草剤抵抗性遺伝子は一般に、除草剤に非感受性の改変された標的タンパク質を、または除草剤が作用できる前に植物内において除草剤を分解するまたは解毒する酵素をコードしている。例えば、グリホサートに対する抵抗性は、変異標的酵素、5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸シンターゼ(EPSPS)をコードする遺伝子を使用することにより得られてきた。EPSPSの遺伝子および変異体は周知であり、下でさらに説明される。グルホシネートアンモニウム、プロモキシニル、および2,4-ジクロロフェノキシアセテート(2,4-D)に対する抵抗性は、それぞれの除草剤を解毒する、patをコードする細菌遺伝子またはDSM-2、ニトリラーゼ、aad-1またはaad-12遺伝子を使用することにより得られてきた。

【0102】

10

一実施形態では、イミダゾリノンまたはスルホニル尿素、ならびにアセトヒドロキシ酸シンターゼ(AHAS)およびアセト乳酸シンターゼ(ALS)の抵抗性/耐性の遺伝子を含む、除草剤は成長点または分裂組織を阻害することができる。グリホサート抵抗性遺伝子は、組換え核酸の導入ならびに/またはそれぞれ天然のEPSP遺伝子、aroA遺伝子、およびグリホサートアセチルトランスフェラーゼ(GAT)遺伝子の種々の形態のin vivo変異誘発による、変異5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸シンターゼ(EPSP)およびdgt-28遺伝子を含む。他のホスホノ化合物の抵抗性遺伝子には、ストレプトミセスハイグロスコピクス(*Streptomyces hygroscopicus*)およびストレプトミセスピリドクロモゲネス(*Streptomyces viridichromogenes*)を含む、ストレプトミセス種由来のBAR遺伝子、ならびにピリジノキシまたはフェノキシプロピオン酸およびシクロヘキソン(ACCアーゼ阻害剤コード遺伝子)が含まれる。シクロヘキサンジオンおよび/またはアリールオキシフェノキシプロパン酸(Haloxylfop、Diclofop、Fenoxyprop、Fluazifop、Quizalofopを含む)に対する抵抗性を与える例となる遺伝子には、アセチル補酵素Aカルボキシラーゼ(ACCアーゼ)-Acc1-S1、Acc1-S2およびAcc1-S3の遺伝子が含まれる。一実施形態では、トリアジン(psbaおよび1s+遺伝子)またはベンゾニトリル(ニトリラーゼ遺伝子)を含む、除草剤は光合成を阻害することが可能である。

20

【0103】

30

一実施形態では、選択可能マーカー遺伝子には、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼI I、シアナミドヒドラーゼ、アスパラギン酸キナーゼ、ジヒドロジピコリネートシンターゼ、トリプトファンデカルボキシラーゼ、ジヒドロジピコリネートシンターゼおよび脱感作アスパラギン酸キナーゼ、bar遺伝子、トリプトファンデカルボキシラーゼ、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ(NEO)、ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ(HPTまたはHYG)、ジヒドロ葉酸レダクター(DHFR)、ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ、2,2-ジクロロプロピオン酸デハロゲナーゼ、アセトヒドロキシ酸シンターゼ、5-エノールピルビルシキミ酸リン酸シンターゼ(aroA)、ハロアリルニトリラーゼ、アセチル補酵素Aカルボキシラーゼ、ジヒドロプロテロイン酸シンターゼ(sul I)、ならびに32kD光化学系IIポリペプチド(psba)をコードする遺伝子が含まれるがこれらに限定されない。

40

【0104】

一実施形態には、クロラムフェニコール、メトレキサート、ハイグロマイシン、スペクチノマイシン、プロモキシニル、グリホサート、およびホスフィノトリシンに対する抵抗性をコードする遺伝子も含まれる。

【0105】

選択可能マーカー遺伝子の上記リストは限定的であることを意図してはいない。本発明にはいかなるレポーターまたは選択可能マーカー遺伝子でも包含される。

【0106】

50

選択可能マーカー遺伝子は植物における最適発現のために合成される。例えば、一実施形態では、遺伝子のコード配列は、植物における発現を増強するためにコドン最適化により改変されている。選択可能マーカー遺伝子は特定の植物種における発現のために最適化

することができる、または代わりに双子葉植物または単子葉植物における最適発現のために改変することができる。植物の好みのコドンは、対象の特定の植物種においてもっとも大量に発現されるタンパク質におけるもっとも高い出現頻度のコドンから決定することができる。一実施形態では、選択可能マークー遺伝子は、植物においてより高いレベルで発現されて、より高い形質転換効率を生じるように設計される。遺伝子の植物最適化のための方法は周知である。合成ポリヌクレオチド配列の最適化および製造に関する手引きは、例えば、WO 2013 / 016546、WO 2011 / 146524、WO 1997 / 013402、米国特許第6,166,302号、および米国特許第5,380,831号に見出すことができ、これら特許文献は参考により本明細書に組み込まれる。

【0107】

10

導入遺伝子

開示された方法および組成物は、植物ゲノム内のポリヌクレオチド遺伝子配列を発現させるのに使用することができる。したがって、除草剤耐性、昆虫抵抗性、栄養分、抗生物質、または治療分子をコードする遺伝子を新規プロモーターにより発現させることができる。

【0108】

20

一実施形態では、主題の開示の構成的プロモーター調節エレメントは、グリホサート、2,4-D グルホシネート、または別の除草剤に対する抵抗性または耐性を与え、選択した昆虫もしくは病害に対する抵抗性および/または滋養強壮作用、改良された農学的特徴、タンパク質、または餌、食物に有用な他の産物、産業上の、医薬上のもしくは他の使用を提供するポリヌクレオチド配列をコードする1つまたは複数の遺伝子と組み合わされるまたは作動可能に連結される。導入遺伝子は、植物ゲノム内で2つ以上の対象の核酸配列と一緒に「スタックする」ことができる。スタッキングは、例えば、2つ以上の事象を使用する従来の植物育種、対象の配列を含有する構築物を用いた植物の形質転換、トランスジェニック植物の再形質転換、または相同組換えによる標的を狙った組込みを通じた新しい形質の追加により達成することができる。

【0109】

30

対象のこのようなポリヌクレオチド配列には、下に提供される例が含まれるがこれらに限定されない。

【0110】

40

1. 有害生物または病害に対する抵抗性を与える遺伝子またはコード配列（例えば、iRNA）

(A) 植物耐病性遺伝子。植物防御は多くの場合、植物中の耐病性遺伝子の産物 (R) と病原体中の対応する非病原性 (Avr) 遺伝子の産物の間の特異的な相互作用により活性化される。植物品種はクローニングされた抵抗性遺伝子で形質転換して、特異的な病原体株に対して抵抗性である植物を工学的に作製することができる。このような遺伝子の例には、クラドスボリウムフルバム (*Cladosporium fulvum*) に対する抵抗性のトマト Cf-9 遺伝子 (Jones et al., 1994 *Science* 266:789)、シュードモナスシンリング pvr. トマトに対する抵抗性の、タンパク質キナーゼをコードするトマト Pto 遺伝子 (Martin et al., 1993 *Science* 262:1432)、およびシュードモナスシンリング (*Pseudomonas syringae*) に対する抵抗性のシロイヌナズナ RSSP2 遺伝子 (Mindrinos et al., 1994 *Cel* 178:1089) が含まれる。

(B) バチルスチューリングンシス (*Bacillus thuringiensis*) タンパク質、その誘導体またはそれをモデルとする合成ポリペプチド、例えば、Bt エンドトキシン遺伝子 (Geiser et al., 1986 *Gene* 48:109) および植物殺虫性 (VIP) 遺伝子 (例えば、Estruch et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:5389-94 参照) のヌクレオチド配列。さらに、エンドトキシン遺伝子をコードするDNA分子は、ATCC受託番号 40098、67136、31995 および 31998 の下、アメリカ合衆国培養細胞系保存機関 (Rockville, Md.) から購入することが可能である。

(C) レクチン、例えば、いくつかのクリビアミニアタ (*Clivia miniata*) マンノース

50

結合レクチン遺伝子のヌクレオチド配列 (Van Damme et al., 1994 Plant Molec. Biol. 24:825)。

(D) ビタミン結合タンパク質、例えば、害虫に対する幼虫駆除剤として有用であるアビジンおよびアビジン相同体。米国特許第5,659,026号参照。

(E) 酵素阻害剤、例えば、プロテアーゼ阻害剤またはアミラーゼ阻害剤。このような遺伝子の例には、イネシスティンプロティナーゼ阻害剤 (Abe et al., 1987 J. Biol. Chem. 262:16793)、タバコプロティナーゼ阻害剤 I (Huub et al., 1993 Plant Molec. Biol. 21:985)、および アミラーゼ阻害剤 (Sumitani et al., 1993 Biosci. Biotech. Biochem. 57:1243) が含まれる。

(F) 昆虫特異的ホルモンまたはフェロモン、例えば、エクジステロイド、および幼若ホルモン、その変異体、それに基づく模倣体、またはそのアンタゴニストもしくはアゴニスト、例えば、幼若ホルモンの失活剤であるクローン化された幼若ホルモンエステラーゼのバキュロウイルス発現、(Hammock et al., 1990 Nature 344:458)。

(G) 発現すると冒された害虫の生理機能を破壊する昆虫特異的ペプチドまたは神経ペプチド (J. Biol. Chem. 269:9)。このような遺伝子の例には、昆虫利尿ホルモン受容体 (Regan, 1994)、ジプロプロテラパンクタタ (*Diptoptera punctata*) において同定されたアロスタチン (Pratt, 1989)、および昆虫特異的麻痺性神経毒 (米国特許第5,266,361号) が含まれる。

(H) サソリ昆虫障害性ペプチドなどの、ヘビ、スズメバチなどにより天然において産生される昆虫特異的毒液 (Pang, 1992 Gene 116:165)。

(I) モノテルペン、セスキテルペン、ステロイド、ヒドロキサム酸、フェニルプロパノイド誘導体または殺虫活性のある別の非タンパク質分子の高度集積の原因となる酵素。

(J) 生物活性分子の翻訳後修飾を含む、修飾に関する酵素、例えば、天然であれ合成であれ、解糖酵素、タンパク質分解酵素、脂肪分解酵素、ヌクレアーゼ、シクラーゼ、アミノ基転移酵素、エステラーゼ、加水分解酵素、ホスファターゼ、キナーゼ、ホスホリーゼ、ポリメラーゼ、エラスターーゼ、キチナーゼ、およびグルカナーゼ。このような遺伝子の例には、オランダカイウ (*calla*) 遺伝子 (PCT公開出願WO93/02197)、キチナーゼコード配列 (例えば、受託番号3999637および67152の下、ATCCから入手可能である)、タバコ鉤虫キチナーゼ (Kramer et al., 1993 Insect Mol. Biol. 23:691)、およびパセリub4-2ポリユビキチン遺伝子 (Kawalleck et al., 1993 Plant Molec. Biol. 21:673) が含まれる。

(K) シグナル伝達を刺激する分子。このような分子の例には、リヨクトウカルモジュリンcDNAクローンのヌクレオチド配列 (Botella et al., 1994 Plant Molec. Biol. 24:757)、およびトウモロコシカルモジュリンcDNAクローンのヌクレオチド配列 (Gries et al., 1994 Plant Physiol. 104:1467) が含まれる。

(L) 疎水性メントペプチド。米国特許第5,659,026号および米国特許第5,607,914号参照。後者は耐病性を与える合成抗菌ペプチドを教示している。

(M) トランスジェニックタバコ植物をシュードモナスソラナセアラム (*Pseudomonas solanacearum*1) に対して抵抗性にするセクロピン - 溶菌性ペプチド類似体 (Jaynes et al., 1993 Plant Sci. 89:43) などの、膜パーミアーゼ、チャネルフォーマー (channel former) またはチャネルプロッカー。

(N) ウィルス侵入性タンパク質またはそれに由来する複合毒素。例えば、形質転換された植物細胞内にウィルスコートタンパク質が蓄積すると、ウィルス感染および/またはコートタンパク質遺伝子が由来するウィルスにより、ならびに関連するウィルスによりもたらされる病害の発症に対する抵抗性が与えられる。アルファアルファモザイクウィルス、キュウリモザイクウィルス、タバコ条斑病ウィルス、ジャガイモウィルスX、ジャガイモウィルスY、タバコエッチ病ウィルス、タバコラットルウィルスおよびタバコモザイクウィルスに対するコートタンパク質媒介抵抗性が形質転換された植物に与えられてきた。例えば、Beachy et al. (1990) Ann. Rev. Phytopathol. 28:451参照。

(O) 昆虫特異的抗体またはそれに由来する免疫毒素。したがって、昆虫腸における極

10

20

30

40

50

めて重要な代謝機能を標的にした抗体であれば冒された酵素を不活化し、昆虫を死滅させることになる。例えば、Taylor et al. (1994) Abstract #497, Seventh Int'l. Symposium on Molecular Plant-Microbe Interactionsは、一本鎖抗体断片を產生することによるトランスジェニックタバコにおける酵素不活化を明らかにしている。

(P) ウィルス特異的抗体。例えば、組換え抗体遺伝子を発現しているトランスジェニック植物がウィルス攻撃から保護されていることを明らかにするTavladoraki et al. (1993) Nature 266:469を参照されたい。

(Q) 病原体または寄生虫により天然に產生される発育遅延タンパク質。したがって、真菌エンド - 1 , 4 - D ポリガラクトロナーゼは、植物細胞壁ホモ - 1 , 4 - D - ガラクトロナーゼを可溶化することにより真菌定着および植物養分放出を促進する (Lamb et al., 1992) Bio/Technology 10:1436。マメエンドポリガラクトロナーゼ阻害タンパク質をコードする遺伝子のクローニングおよび特徴付けはToubart et al. (1992 Plant J. 2:367) に記載されている。

(R) 真菌病に対する増加した抵抗性を与えるオオムギリボソーム不活化遺伝子などの、植物により天然に產生される発育遅延タンパク質(Longemann et al., 1992). Bio/Technology 10:3305。

(S) RNA分子を使用して標的遺伝子の発現を阻害するRNA干渉。一例でのRNA分子は部分的にまたは完全に二本鎖であり、これがサイレンシング応答を始動させ、ds RNAを小分子干渉RNAに切断して、その後この小分子干渉RNAはターゲティング複合体に組み込まれて、相同mRNAを破壊する。例えば、Fire et al., 米国特許第6,506,559号; Graham et al., 米国特許第6,573,099号を参照されたい。

【0111】

2. 除草剤に対する抵抗性を与える遺伝子

(A) イミダゾリノン、スルホンアニリドまたはスルホニル尿素除草剤などの、成長点または分裂組織を阻害する除草剤に対する抵抗性または耐性をコードする遺伝子。この範疇での例となる遺伝子は、アセトヒドロキシ酸シンターゼ(AHAS)酵素(Miki et al., 1990 Theor. Appl. Genet. 80:449)としても知られる変異アセト乳酸シンターゼ(ALS)(Lee et al., 1988 EMBOJ. 7:1241)をコードする。

(B) 変異EPSPシンターゼおよびaroA遺伝子により、またはDGT-28、2mEPSPS、GAT(グリホサートアセチルトランスフェラーゼ)もしくはGOX(グリホサートオキシダーゼ)などの遺伝子ならびにグルホシネート(pat、barおよびdsm-2遺伝子)およびアリールオキシフェノキシプロピオン酸およびシクロヘキサンジオン(ACCアーゼ阻害剤コード遺伝子)などの他のホスホノ化合物による代謝不活化を通して与えられるグリホサートに対する抵抗性もしくは耐性をコードする1つもしくは複数の追加の遺伝子。例えば、グリホサート抵抗性を与えることができるEPSPの形態のヌクレオチド配列を開示する、米国特許第4,940,835号を参照されたい。変異aroA遺伝子をコードするDNA分子は、ATCC受託番号39256の下で入手可能であり、変異遺伝子のヌクレオチド配列は米国特許第4,769,061号に開示されている。欧州特許出願第0333033号および米国特許第4,975,374号は、L-ホスフィノトリシンなどの除草剤に対する抵抗性を与えるグルタミンシンセターゼ遺伝子のヌクレオチド配列を開示している。ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ遺伝子のヌクレオチド配列は欧州特許出願第0242246号に提供されている。De Greef et al. (1989) Bio/Technology 7:61は、ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ活性をコードするキメラbar遺伝子を発現するトランスジェニック植物の生成を記載している。セトキシジムおよびハロキシホップなどの、アリールオキシフェノキシプロピオン酸およびシクロヘキサンジオンに対する抵抗性を与える遺伝子の例は、Marshall et al. (1992) Theor. Appl. Genet. 83:435により記載されているAcc1-S1、Acc1-S2およびAcc1-S3遺伝子である。

(C) トリアジン(psbAおよびgs+遺伝子)およびベンゾニトリル(ニトリラー

10

20

30

40

50

ゼ遺伝子)などの、光合成を阻害する除草剤に対する抵抗性または耐性をコードする遺伝子。Przibilla et al. (1991) Plant Cell 3:169はクラミドモナス (*Chlamydomonas*) を形質転換するための変異 p s b A 遺伝子をコードするプラスミドの使用を記載している。ニトリラーゼ遺伝子のスクレオチド配列は米国特許第4,810,648号に開示されており、これらの遺伝子を含有するDNA分子はATCC受託番号53435、67441および67442下で入手可能である。グルタチオンSトランスフェラーゼをコードするDNAのクローニングおよび発現はHayes et al. (1992) Biochem. J. 285:173により記載されている。

(D) パラヒドロキシフェニルピルビン酸(HPP)がホモゲンチジン酸に変換される反応を触媒する酵素である、ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ(HPPD)に結合する除草剤に対する抵抗性または耐性をコードする遺伝子。これには、イソキサゾール(EP418175、EP470856、EP487352、EP527036、EP560482、EP682659、米国特許第5,424,276号)、特にトウモロコシの選択性除草剤であるイソキサフルトルール、ジケトニトリル(EP496630、EP496631)、特に2-シアノ-3-シクロプロピル-1-(2-SO₂CH₃-4-CF₃フェニル)プロパン-1,3-ジオンおよび2-シアノ-3-シクロプロピル-1-(2-SO₂CH₃-4-2,3C12フェニル)プロパン-1,3-ジオン、トリケトン(EP625505、EP625508、米国特許第5,506,195号)、特にスルコトリオンおよびピラゾリネートなどの除草剤が含まれる。例えば、米国特許第6,268,549号および米国特許第6,245,968号ならびに米国特許出願公開第2003/0066102号に記載される遺伝子を含む、植物において過剰なHPPDを産生する遺伝子は、このような除草剤に対する耐性または抵抗性を与えることが可能である。10

(E) 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)などのフェノキシオーキシン除草剤に対する抵抗性または耐性をコードし、アリールオキシフェノキシプロピオン酸(AOPP)除草剤に対する抵抗性または耐性も与えることができる遺伝子。このような遺伝子の例には、米国特許第7,838,733号に記載されている、-ケトグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼ酵素(aad-1)遺伝子が含まれる。20

(F) 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)などのフェノキシオーキシン除草剤に対する抵抗性または耐性をコードし、フルロキシピルまたはトリクロビルなどのピリジルオキシオーキシン除草剤に対する抵抗性または耐性も与えることができる遺伝子。このような遺伝子の例には、WO2007/053482 A2に記載されている、-ケトグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼ酵素遺伝子(aad-12)が含まれる。30

(G) ジカンバに対する抵抗性または耐性をコードする遺伝子(例えば、米国特許出願公開第20030135879号参照)。

(H) プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ(PPO)を阻害する除草剤に対する抵抗性または耐性を与える遺伝子(米国特許第5,767,373号参照)。

(I) 光化学系II反応中心(PSII)のコアタンパク質に結合するトリアジン系除草剤(アトラジンなど)および尿素誘導体(ジウロンなど)除草剤に対する抵抗性または耐性を与える遺伝子(Brussian et al., (1989) EMBO J. 1989, 8(4): 1237-1245参照)。40

。

【0112】

3. 付加価値形質を与えるまたはこれに寄与する遺伝子

(A) 植物のステアリン酸含有量を増加させるために、例えば、トウモロコシまたはアブラナ属(*Brassica*)をアンチセンス遺伝子またはステアロイルACPデサチュラーゼで形質転換することによる改変された脂肪酸代謝(Knultzon et al., 1992) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 89:2624。

(B) 減少したフィターゼ含有量

(1) クロコウジカビ(*Aspergillus niger*)フィターゼ遺伝子(Van Hartingsveldt et al., 1993 Gene 127:87)などのフィターゼコード遺伝子を導入すると、フィチン酸

10

20

30

40

50

の分解が増強され、形質転換された植物にさらに多くの遊離リン酸を加える。

(2) フィチン酸含有量を減少させる遺伝子を導入することが可能であった。トウモロコシでは、これは、例えば、低レベルのフィチン酸を特徴とするトウモロコシ変異体の原因である単一の対立遺伝子と関連のあるDNAをクローニングし次に再導入することにより達成することが可能であった(Raboy et al., 1990 Maydica 35:383)。

(C) 例えば、デンプンの分枝パターンを変化させる酵素をコードする遺伝子で植物を形質転換することによりもたらされる改変された炭水化物組成。このような酵素の例には、ストレプトコッカス(*Streptococcus*)粘液フルクトシルトランスフェラーゼ遺伝子((Shiroza et al., 1988) J. Bacteriol. 170:810)、枯草菌(*Bacillus subtilis*)レバンスクラーーゼ遺伝子(Steinmetz et al., 1985 Mol. Gen. Genel. 200:220)、バチルスリケニフォルミス(*Bacillus licheniformis*)アミラーゼ(Pen et al., 1992 Bio/Technology 10:292)、トマトイソベルターゼ遺伝子(Elliott et al., 1993)、オオムギアミラーゼ遺伝子(Sogaard et al., 1993 J. Biol. Chem. 268:22480)、およびトウモロコシ胚乳デンプン分枝酵素II(Fisher et al., 1993 Plant Physiol. 102:10450)が含まれる。

【0113】

形質転換

植物の形質転換に適した方法には、DNAを細胞内に導入することができるいかなる方法でも、例えばおよび限定なしで、エレクトロポレーション(例えば、米国特許第5,384,253号参照)、微粒子銃(例えば、米国特許第5,015,580号、米国特許第5,550,318号、米国特許第5,538,880号、米国特許第6,160,208号、米国特許第6,399,861号、および米国特許第6,403,865号参照)、アグロバクテリウム(*Agrobacterium*)媒介形質転換(例えば、米国特許第5,635,055号、米国特許第5,824,877号、米国特許第5,591,616号、米国特許第5,981,840号、および米国特許第6,384,301号参照)、およびプロトプラスト形質転換(例えば、米国特許第5,508,184号参照)が含まれる。これらを使用すれば、植物を安定的に形質転換することも一過性に形質転換することもできる。

【0114】

DNA構築物は炭化珪素纖維を用いた攪拌などの技法を使用して植物細胞のゲノムDNA内に直接導入することができる(例えば、米国特許第5,302,523号および米国特許第5,464,765号参照)。DNA構築物は、DNA粒子銃などの微粒子銃法を使用して植物組織に直接導入することができる(例えば、Klein et al., (1987) Nature 327:70-73参照)。代わりに、DNA構築物は、ナノ粒子形質転換により植物細胞に導入することができる(例えば、米国特許出願公開第2009/0104700号参照、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。

【0115】

さらに、遺伝子導入は、根粒菌種(*Rhizobium* sp.)NGR234、アルファルファ根粒菌(*Sinorhizobium meliloti*)、ミヤコグサ根粒菌(*Mesorhizobium loti*)、ジャガイモウイルスX、カリフラワー・モザイクウイルス、キャッサバ葉脈モザイクウイルス、および/またはタバコモザイクウイルスなどの非アグロバクテリウム(*Agrobacterium*)細菌またはウイルスを使用して達成することができる(例えば、Chung et al. (2006) Trends Plant Sci. 11(1):1-4参照)。

【0116】

形質転換技法の適用を通じて、ほぼどんな植物種の細胞でも安定的に形質転換することができ、これらの細胞は周知の技法によりトランスジェニック植物に成長させることができる。例えば、ワタ形質転換という文脈で特に有用である可能性がある技法は、米国特許第5,846,797号、米国特許第5,159,135号、米国特許第5,004,863号、および米国特許第6,624,344号に記載されており、特にアブラナ属(*Brassica*)植物を形質転換するための技法は、例えば、米国特許第5,750,871号に

10

20

30

40

50

記載されており、ダイズを形質転換するための技法は、例えば、米国特許第6,384,301号に記載されており、ならびにトウモロコシを形質転換するための技法は、例えば、米国特許第7,060,876号および米国特許第5,591,616号、ならびに国際PCT公開WO95/06722に記載されている。

【0117】

レシピエント細胞への外来性核酸の送達をもたらした後、形質転換された細胞は一般には、さらなる培養および植物体再生のために同定される。形質転換体を同定する能力を改善するために、形質転換体を生成するのに使用される形質転換ベクターと一緒に選択可能マーカー遺伝子を用いるのが望ましいことがある。例示的な一実施形態では、形質転換された細胞集団は、細胞を選択剤（単数または複数）に曝露することによりアッセイすることができる、または所望のマーカー遺伝子形質について細胞をスクリーニングすることができる。

10

【0118】

選択剤への曝露を生き延びる細胞、またはスクリーニングアッセイにおいてプラスのスコアを得た細胞は、植物の再生を支持する培地において培養することができる。一実施形態では、いかなる適切な植物組織培養培地でも、成長調節物質などの追加の物質を含むことにより改変することができる。植物組織は、植物体再生の試みを開始するのに十分な組織が入手可能になるまで成長調節物質のある基本培地上で維持することができる。代わりに、組織の形態が再生に適するまで（例えば、少なくとも2週間）の手作業での選別の繰り返しラウンドに続いて、その後組織は苗条形成に役立つ培地に移すことができる。培養物は十分な苗条形成が起こるまで定期的に移される。苗条が形成された後は、根形成に役立つ培地に移される。十分な根が形成された後、植物はさらなる成長と成熟のために土壤に移すことができる。

20

【0119】

再生中の植物に与えられた構築物を含む所望の核酸の存在を確かめるために、種々のアッセイを実施することができる。このようなアッセイには、サザンおよびノーザンプロットティングならびにPCRなどの分子生物学的アッセイ；ELISA、ウェスタンプロットおよび／もしくはLC-MS/MS分光光度法などの免疫学的手段により、または葉、カルス、もしくは花粉アッセイなどの植物部分アッセイによりなどの酵素機能によるタンパク質産物の存在を検出することなどの生化学的アッセイ；ならびに／あるいは全再生植物の表現型の分析が含まれ得る。

30

【0120】

トランスジェニック事象は、例えば、対象の核酸分子に特異的なオリゴヌクレオチドプライマーを使用するPCR增幅によりスクリーニングすることができる。PCR遺伝子型判定は、ゲノムに組み込まれた対象の核酸分子を含有すると予想される単離されたおよび／または精製された宿主植物組織由来のゲノムDNAのPCR增幅、続いて標準クローニング、ならびにPCR增幅産物の配列分析を含むがこれらに限定されないと理解されている。PCR遺伝子型判定の方法は十分に説明されており（例えば、Rios et al. (2002) Plant J. 32:243-53参照）、細胞培養物を含む任意の植物種または組織型由来のゲノムDNAに適用することができる。

40

【0121】

標的配列と導入配列の両方に結合するオリゴヌクレオチドプライマーの組合せは、PCR増幅反応において順次使用することも多重化する(multiplex)こともできる。標的部位、導入核酸配列、および／または2種類の核酸配列の組合せにアニールするように設計されたオリゴヌクレオチドプライマーを生成することができる。したがって、PCR遺伝子型判定戦略は、例えばおよび限定なしで、植物ゲノム中の特異的な配列の増幅、植物ゲノム中の複数の特異的な配列の増幅、植物ゲノム中の非特異的な配列の増幅、および前述のいずれかの組合せを含むことができる。当業者であれば、ゲノムを調べるためにプライマーおよび増幅反応の追加の組合せを工夫することができる。例えば、一組のフォワードおよびリバースオリゴヌクレオチドプライマーを設計して、導入された核酸配列の境界の

50

外側の標的に特異的な核酸配列（複数可）にアニールさせることができる。

【0122】

フォワードおよびリバースオリゴヌクレオチドプライマーを設計して、例えば、そこに含まれる対象のヌクレオチド配列内のコード領域に一致する配列で、導入された核酸分子、または核酸分子の他の部分に特異的にアニールさせることができる。プライマーは本明細書に記載されるプライマーと併せて使用することができる。オリゴヌクレオチドプライマーは所望の配列に従って合成してもよく、市販されている（例えば、Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, IAより）。増幅後にクローニングおよびシークエンシング、または増幅産物の直接配列分析が続いてもよい。一実施形態では、遺伝子標的に特異的なオリゴヌクレオチドプライマーはPCR増幅において用いる。10

【0123】

導入遺伝子を発現させる方法

一実施形態では、植物において少なくとも1つの導入遺伝子を発現させる方法は、少なくとも1つの導入遺伝子に作動可能に連結されているトウモロコシ(*Z. mays*)c.v.B104 Ub i - 1プロモーター（配列番号2）を含む植物を生育することを含む。一実施形態では、植物組織または植物細胞において少なくとも1つの導入遺伝子を発現させる方法は、少なくとも1つの導入遺伝子に作動可能に連結されているトウモロコシ(*Z. mays*)c.v.B104 Ub i - 1プロモーター（配列番号2）を含む植物組織または植物細胞を培養することを含む。20

【0124】

一実施形態では、植物において少なくとも1つの導入遺伝子を発現させる方法は、少なくとも1つの導入遺伝子に作動可能に連結されているトウモロコシ(*Z. mays*)c.v.B104 Ub i - 1プロモーター（配列番号2）を含む遺伝子発現力セットを含む植物を生育することを含む。別の実施形態では、植物組織または植物細胞において少なくとも1つの導入遺伝子を発現させる方法は、少なくとも1つの導入遺伝子に作動可能に連結されているトウモロコシ(*Z. mays*)c.v.B104 Ub i - 1プロモーター（配列番号2）を含む遺伝子発現力セットを含む植物組織または植物細胞を培養することを含む。30

【0125】

一実施形態では、植物、植物組織、または植物細胞は導入遺伝子に作動可能に連結されているトウモロコシ(*Z. mays*)c.v.B104 Ub i - 1プロモーター（配列番号2）を含む遺伝子発現力セットを含む。その中で、トウモロコシ(*Z. mays*)c.v.B104 Ub i - 1プロモーター（配列番号2）は、上流プロモーター（配列番号4）、5' - UTR（配列番号6）、およびイントロン（配列番号8）から構成される。一実施形態では、植物、植物組織、または植物細胞は、トウモロコシ(*Z. mays*)c.v.B104 Ub i - 1上流プロモーター（配列番号4）、5' - UTR（配列番号6）、およびイントロン（配列番号8）を含む遺伝子発現力セットを含む。一実施形態では、植物、植物組織、または植物細胞は、トウモロコシ(*Z. mays*)c.v.B104 Ub i - 1遺伝子のトウモロコシ(*Z. mays*)c.v.B104 Ub i - 1上流プロモーター（配列番号4）、5' - UTR（配列番号6）、およびイントロン（配列番号8）を含む遺伝子発現力セットを含む。一実施形態では、植物、植物組織、または植物細胞は、トウモロコシ(*Z. mays*)c.v.B104 Ub i - 1遺伝子のトウモロコシ(*Z. mays*)c.v.B104 Ub i - 1上流プロモーター（配列番号4）、5' - UTR（配列番号6）、およびイントロン（配列番号8）を含む遺伝子発現力セットを含む。40

【0126】

一実施形態では、植物、植物組織、または植物細胞はトウモロコシ(*Z. mays*)c.v.B104 Ub i - 1プロモーターを含む。一実施形態では、トウモロコシ(*Z. mays*)c.v.B104 Ub i - 1プロモーターは配列番号2であってよい。一実施形態では、植物、植物組織、または植物細胞は、配列番号2に少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99%50

. 5 %、99.8%、または100%同一であるプロモーターを含む遺伝子発現力セットを含む。一実施形態では、植物、植物組織、または植物細胞は、導入遺伝子に作動可能に連結されているトウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 1 0 4 U b i - 1 プロモーターを含む遺伝子発現力セットを含む。例示的な一実施形態では、植物、植物組織、または植物細胞は、導入遺伝子に作動可能に連結されているトウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 1 0 4 U b i - 1 プロモーターを含む遺伝子発現力セットを含み、導入遺伝子は殺虫剤抵抗性導入遺伝子、除草剤耐性導入遺伝子、窒素利用効率導入遺伝子、水利用効率導入遺伝子、栄養品質導入遺伝子、DNA結合導入遺伝子、選択可能マーカー導入遺伝子、またはそれらの組合せであってよい。

【0127】

一実施形態では、植物、植物組織、または植物細胞はトウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 1 0 4 U b i - 1 上流プロモーターを含む。一実施形態では、トウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 1 0 4 U b i - 1 上流プロモーターは配列番号4であってよい。一実施形態では、植物、植物組織、または植物細胞は、配列番号4に少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.8%、または100%同一である上流プロモーターを含む遺伝子発現力セットを含む。一実施形態では、植物、植物組織、または植物細胞は、導入遺伝子に作動可能に連結されているトウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 1 0 4 U b i - 1 上流プロモーターを含む遺伝子発現力セットを含む。例示的な一実施形態では、植物、植物組織、または植物細胞は、導入遺伝子に作動可能に連結されているトウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 1 0 4 U b i - 1 上流プロモーターを含む遺伝子発現力セットを含み、導入遺伝子は殺虫剤抵抗性導入遺伝子、除草剤耐性導入遺伝子、窒素利用効率導入遺伝子、水利用効率導入遺伝子、栄養品質導入遺伝子、DNA結合導入遺伝子、選択可能マーカー導入遺伝子、またはそれらの組合せであってよい。

【0128】

一実施形態では、植物、植物組織、または植物細胞はトウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 1 0 4 U b i - 1 5' - UTR またはリーダー配列を含む。一実施形態では、トウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 1 0 4 U b i - 1 5' - UTR またはリーダー配列は配列番号6のポリヌクレオチドであってよい。一実施形態では、植物、植物組織、または植物細胞は、配列番号6に少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.8%、または100%同一である5' - UTR またはリーダー配列を含む遺伝子発現力セットを含む。一実施形態では、遺伝子発現力セットはプロモーターに作動可能に連結されているトウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 1 0 4 U b i - 1 5' - UTR またはリーダーを含み、プロモーターは、ユビキチンプロモーター、または植物（例えば、トウモロコシ (*Zea mays*) ユビキチン-1プロモーター）、ウイルス（例えば、キャッサバ葉脈モザイクウイルスプロモーター）、もしくは細菌（例えば、アグロバクテリウムツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) デルタ *m a s*）を起源とするプロモーターである。一実施形態では、植物、植物組織、または植物細胞は、導入遺伝子に作動可能に連結されているトウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 1 0 4 U b i - 1 5' - UTR またはリーダーを含む遺伝子発現力セットを含む。例示的な一実施形態では、植物、植物組織、または植物細胞は、導入遺伝子に作動可能に連結されているトウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 1 0 4 U b i - 1 5' - UTR またはリーダーを含む遺伝子発現力セットを含み、導入遺伝子は殺虫剤抵抗性導入遺伝子、除草剤耐性導入遺伝子、窒素利用効率導入遺伝子、水利用効率導入遺伝子、栄養品質導入遺伝子、DNA結合導入遺伝子、選択可能マーカー導入遺伝子、またはそれらの組合せであってよい。

【0129】

一実施形態では、植物、植物組織、または植物細胞はU b i - 1イントロンを含む。一実施形態では、植物、植物組織、または植物細胞はトウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 1 0 4 U b i - 1イントロンを含む。一実施形態では、トウモロコシ (*Z. mays*) c .

10

20

30

40

50

v . B 1 0 4 U b i - 1 イントロンは配列番号 8 のポリヌクレオチドであってよい。一実施形態では、植物、植物組織、または植物細胞は、配列番号 8 に少なくとも 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.8%、または 100% 同一であるイントロンを含む遺伝子発現力セットを含む。一実施形態では、遺伝子発現力セットはプロモーターに作動可能に連結されているトウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 1 0 4 U b i - 1 イントロンを含み、プロモーターは、ユビキチンプロモーター、または植物（例えば、トウモロコシ (*Zea mays*) ユビキチン - 1 プロモーター）、ウイルス（例えば、キャッサバ葉脈モザイクウイルスプロモーター）、または細菌（例えば、アグロバクテリウムツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) デルタ *m a s*）を起源とするプロモーターである。一実施形態では、植物、植物組織、または植物細胞は、導入遺伝子に作動可能に連結されているトウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 1 0 4 U b i - 1 イントロンを含む遺伝子発現力セットを含む。例示的な一実施形態では、植物、植物組織、または植物細胞は、導入遺伝子に作動可能に連結されているトウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 1 0 4 U b i - 1 イントロンを含む遺伝子発現力セットを含み、導入遺伝子は殺虫剤抵抗性導入遺伝子、除草剤耐性導入遺伝子、窒素利用効率導入遺伝子、水利用効率導入遺伝子、栄養品質導入遺伝子、DNA 結合導入遺伝子、選択可能マークー導入遺伝子、またはそれらの組合せであってよい。

10

【 0 1 3 0 】

一実施形態では、植物、植物組織、または植物細胞は、導入遺伝子に作動可能に連結されているトウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 1 0 4 U b i - 1 上流プロモーター、U b i - 1 イントロン、および U b i - 1 5' - UTR を含む遺伝子発現力セットを含む。遺伝子発現力セットが 2 つ以上の導入遺伝子を含む場合、トウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 1 0 4 U b i - 1 上流プロモーター、U b i - 1 イントロン、および U b i - 1 5' - UTR を遺伝子発現力セット内の異なる導入遺伝子に作動可能に連結させることが可能である。例示的な一実施形態では、遺伝子発現力セットは、導入遺伝子に作動可能に連結されているトウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 1 0 4 U b i - 1 プロモーターを含み、導入遺伝子は殺虫剤抵抗性導入遺伝子、除草剤耐性導入遺伝子、窒素利用効率導入遺伝子、水利用効率導入遺伝子、栄養品質導入遺伝子、DNA 結合導入遺伝子、選択可能マークー導入遺伝子、またはそれらの組合せであってよい。例示的な一実施形態では、遺伝子発現力セットは、導入遺伝子に作動可能に連結されているトウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 1 0 4 U b i - 1 イントロンを含み、導入遺伝子は殺虫剤抵抗性導入遺伝子、除草剤耐性導入遺伝子、窒素利用効率導入遺伝子、水利用効率導入遺伝子、栄養品質導入遺伝子、DNA 結合導入遺伝子、選択可能マークー導入遺伝子、またはそれらの組合せであってよい。一実施形態では、遺伝子発現力セットは、プロモーターに作動可能に連結されているトウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 1 0 4 U b i - 1 イントロンを含み、プロモーターは、ユビキチンプロモーター、または植物（例えば、トウモロコシ (*Zea mays*) ユビキチン - 1 プロモーター）、ウイルス（例えば、キャッサバ葉脈モザイクウイルスプロモーター）、または細菌（例えば、アグロバクテリウムツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) デルタ *m a s*）を起源とするプロモーターである。例示的な一実施形態では、遺伝子発現力セットは、導入遺伝子に作動可能に連結されているトウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 1 0 4 U b i - 1 5' - UTR を含み、導入遺伝子は殺虫剤抵抗性導入遺伝子、除草剤耐性導入遺伝子、窒素利用効率導入遺伝子、水利用効率導入遺伝子、栄養品質導入遺伝子、DNA 結合導入遺伝子、選択可能マークー導入遺伝子、またはそれらの組合せであってよい。

20

30

40

【 0 1 3 1 】

一実施形態では、植物、植物組織、または植物細胞は、本明細書に開示されている構成的遺伝子プロモーター調節エレメントを含むベクターを含む。一実施形態では、植物、植物組織、または植物細胞は、導入遺伝子に作動可能に連結されている、本明細書に開示されている構成的遺伝子プロモーター調節エレメントを含むベクターを含む。一実施形態で

50

は、本明細書に開示されているように、植物、植物組織、または植物細胞は遺伝子発現力セットを含むベクターを含む。一実施形態では、ベクターはプラスミド、コスミド、細菌人工染色体（BAC）、バクテリオファージ、またはウイルス断片であってもよい。

【0132】

一実施形態では、植物、植物組織、または植物細胞は、本明細書に開示された方法に従えば、単子葉であってよい。単子葉植物、植物組織、または植物細胞は、トウモロコシ、イネ、コムギ、サトウキビ、オオムギ、ライムギ、モロコシ、ラン、タケ、バナナ、ガマ、ユリ、カラスムギ、タマネギ、アワ、およびライコムギであってよいがこれらに限定されない。別の実施形態では、植物、植物組織、または植物細胞は、本明細書に開示された方法に従えば、双子葉であってよい。双子葉植物、植物組織、または植物細胞は、ナタネ、キャノーラ、カラシナ、エチオピアマスター、ダイズ、ヒマワリ、およびワタであってよいがこれらに限定されない。

10

【0133】

遺伝子改変された植物の生産に関して、植物を遺伝子工学的に作製するための方法は当技術分野では周知である。例えば、双子葉植物および単子葉植物のための生物学的および物理学的形質転換プロトコルを含む、植物形質転換のための数多くの方法が開発されてきた（例えば、Goto - Fumiyuki et al., Nature Biotech 17:282-286 (1999); Miki et al., Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, Glick, B. R. and Thompson, J. E. Eds., CRC Press, Inc., Boca Raton, pp. 67 - 88 (1993)）。さらに、植物細胞または組織形質転換のためのベクターおよびin vitro培養法ならびに植物の再生は、例えば、Gruber et al., Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, Glick, B. R. and Thompson, J. E. Eds., CRC Press, Inc., Boca Raton, pp. 89-119 (1993)において入手可能である。

20

【0134】

当業者であれば、外来性配列は、トランスジェニック植物に安定的に組み込まれており作動可能であることが確認された後、性的交雑により他の植物に導入することができるることは認識するであろう。交雑させる種に応じて、いくつかの標準育種法のいずれでも使用することができる。

【0135】

形質転換された植物細胞、根、葉、カルス、花粉、組織、または植物は、トランスフォーミングDNA上に存在するマークー遺伝子によりコードされている形質について工学的に作製された植物材料を選択するまたはスクリーニングすることにより同定し単離することができる。例えば、選択は、トランスフォーミング遺伝子構築物が抵抗性を与える対象となる阻害量の抗生物質または除草剤を含有する培地で工学的に作製された植物材料を生育することにより実施することができる。さらに、形質転換された細胞は、組換え核酸構築物上に存在する可能性があるいかなる可視マークー遺伝子（例えば、YFP、GFP、

30

グルクロニダーゼ、ルシフェラーゼ、BまたはC1遺伝子）の活性についてスクリーニングすることにより同定することもできる。このような選択およびスクリーニング法は当業者には周知である。

40

【0136】

物理的および生化学的方法を使用して、挿入された遺伝子構築物を含有する植物または植物細胞形質転換体を同定することもできる。これらの方法は、これらに限定されないが、1)組換えDNAインサートを検出しその構造を決定するためのサザン分析もしくはPCR增幅；2)遺伝子構築物のRNA転写物を検出し調べるためのノーザンプロット、S1 RNase保護、プライマー伸長、もしくは逆転写酵素-PCR增幅；3)酵素もしくはリボザイム活性を検出するための酵素アッセイであり、ここではこのような遺伝子産物は遺伝子構築物によりコードされている；4)次世代シーケンシング（NGS）分析；または5)タンパク質ゲル電気泳動法、ウェスタンプロット法、免疫沈降、もしくは酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）を含み、ここで、遺伝子構築物産物はタンパク質である。in situハイブリダイゼーション、酵素染色、および免疫染色などの追加

50

の技法を使用して、特定の植物器官および組織において組換え構築物の存在または発現を検出することもできる。これらのアッセイの全てを実行するための方法は当業者には周知である。

【0137】

本明細書で開示される方法を使用する遺伝子操作の効果は、例えば、対象の組織から単離されたRNA（例えば、mRNA）のノーザンプロットにより観察することができる。典型的には、mRNAが存在しているまたはmRNAの量が増加している場合には、対応する導入遺伝子が発現されていると想定することができる。遺伝子および／またはコードされているポリペプチド活性を測定する他の方法を使用することができる。使用する基質および反応産物または副産物の増加または減少を検出する方法に応じて、異なる種類の酵素アッセイを使用することができる。さらに、発現されるポリペプチドのレベルは、ELISA、RIA、EIA、および、電気泳動検出アッセイ（染色またはウェスタンブロッティングを用いて）など、当業者には周知の他の抗体ベースのアッセイを用いることにより免疫化学的に測定することができる。1つの非限定的例として、ELISAアッセイを使用するAAD-1（アリールオキシアルカノエートジオキシゲナーゼ；WO 2005/107437参照）およびPAT（ホスフィノトリシン-N-アセチル-トランスフェラーゼ）タンパク質の検出は、米国特許出願公開第20090093366号に記載されており、前記特許文献は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。導入遺伝子は、植物のいくつかの細胞型もしくは組織でまたはいくつかの発生段階で選択的に発現させることもできる。導入遺伝子は、全ての植物組織においておよびその全生活環に沿ってかなり発現させることもできる。しかし、いかなる組合せの発現様式でも適用可能である。

10

20

30

【0138】

本開示は、上記のトランスジェニック植物の種子であって、レポーター遺伝子、導入遺伝子、または遺伝子発現カセットを含む種子も包含する。本開示は、上記のトランスジェニック植物の子孫、クローン、細胞株、または細胞であって、レポーター遺伝子、導入遺伝子、または遺伝子構築物を含む子孫、クローン、細胞株、または細胞をさらに包含する。

【0139】

本発明は特定の方法および実施形態に関連して説明してきたが、本明細書に記載される本発明から逸脱することなく種々の改変および変更を加えることができることを認識すべきである。

30

【実施例】

【実施例1】

【0140】

新規プロモーターの同定および単離

トウモロコシ (*Zea mays*) c.v.B104のubi-1遺伝子由来の新規プロモーター配列は、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を使用して增幅させた。新規のプロモーター、トウモロコシ (*Z. mays*) c.v.B104を增幅するように設計したオリゴヌクレオチド（表1）は、対照としての働きをするトウモロコシ (*Z. mays*) c.v.B73 ubi-1プロモーター配列の保存領域に由來した。PCR産物はトウモロコシ (*Z. mays*) c.v.B104から得られ、特徴付けた。

40

【0141】

新規のプロモーターを含むPCR産物は、Invitrogen Zero Blunt (登録商標) TOPO (登録商標) PCRクローニングキットを製造業者の使用説明書に従って使用してTopo (商標) ベクター内にクローニングした。新規プロモーターPCR産物を含むクローン化されたプラスミドを示すベクターマップを提供する。プラスミドpDAB105712はトウモロコシ (*Z. mays*) c.v.B104 (図2)に対応する。

【0142】

【表1】

表1:新規 Ubi-1 プロモーターの PCR 增幅のために使用されるプライマー	
	配列番号
フォワードプライマー: GCTACCGCGG <u>A</u> CCGGT <u>C</u> GTGCC <u>C</u> CT <u>T</u> AGAGATAATG	9
リバースプライマー: AGTCAGGT <u>A</u> CC <u>C</u> TC <u>G</u> CAGAAGTAAC <u>AC</u> CAACAA <u>AC</u> AG	10
PCR プライマーのプロモーター特異的配列には下線を付している。プロモーター特異的配列の 5'上流に位置するプライマー配列はクローニングのために使用するリンクー配列である。	10

【0143】

クローニング後、PCR 産物を含有するプロモーターインサートは当業者に既知の方法を使用して塩基配列決定した。トウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 1 0 4 のプロモーターポリヌクレオチド配列 (図 4) はコンピュータ処理的に整列させ、続いてトウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 7 3 U b i - 1 対照配列 (図 3) に対する配列相同意について分析した。当業者には既知である、Clustal W または Sequencher などの生物情報学的方法および / またはソフトウェアプログラムを使用して、配列相同意分析を実施した。

【実施例 2】

【0144】

新規プロモーター特徴付け

トウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 7 3 U b i - 1 対照配列 (配列番号 1 : 図 3) との配列アライメントおよび比較を含む、配列相同意分析 (図 3 ~ 7) により、さらに特徴付けするための新規の U b i - 1 プロモーターが明らかにされた。トウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 1 0 4 (配列番号 2 ; 図 4) から得られた新しい U b i - 1 プロモーター配列は、3 つの異なる領域；1) 上流プロモーター領域 (配列番号 4) 、2) 5' UTR (配列番号 6) 、および 3) イントロン (配列番号 8) のポリヌクレオチド配列を含んでいることも観察された。トウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 1 0 4 由来のプロモーター領域および特異的なプロモーターエレメントは、トウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 7 3 U b i - 1 対照配列に対する配列相同意について分析した (図 5 ~ 7)。さらに具体的には、配列アライメントを実施して、トウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 1 0 4 プロモーターの上流プロモーター、5' - UTR、およびイントロン領域、ならびに T A T A ボックスおよび熱ショックエレメント (H S E) 調節エレメントを、トウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 7 3 U b i - 1 対照配列の対応する領域と個別に比較した (図 5 ~ 7、表 2)。

【0145】

【表2】

表2:トウモロコシ(<i>Z. mays</i>)c.v.B73 Ubi-1 プロモーターと新規 Ubi-1 プロモーターの間の配列相同意(%)						
プロモーター	合計	上流プロモーター	5'-UTR/リーダー	イントロン	TATAボックス	熱ショックエレメント
トウモロコシ (<i>Z. mays</i>) c.v.B104	85.7	93.4	96.4	78.2	100	100

【0146】

図 5 は、トウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 7 3 U b i - 1 対照プロモーター配列

10

20

30

40

50

の上流プロモーター領域と比較したトウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 1 0 4 プロモーターの上流プロモーター領域の配列アライメントを示している。図 6 は、トウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 7 3 U b i - 1 対照プロモーター配列の 5' U T R またはリーダー配列と比較したトウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 1 0 4 プロモーターの 5' U T R またはリーダー配列の配列アライメントを示している。図 7 は、トウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 7 3 U b i - 1 対照プロモーター配列のイントロン配列と比較したトウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 1 0 4 プロモーターのイントロン領域の配列アライメントを示している。

【 0 1 4 7 】

トウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 1 0 4 から得られるプロモーターエレメントは、トウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 7 3 U b i - 1 配列に対して 85.7 % の全体配列同一性 (表 2) を示した。トウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 1 0 4 由来の新規プロモーター配列の特徴付けにより、機能的プロモーターに典型的に見出されるプロモーター調節エレメント (すなわち、TATAボックスまたは熱ショックエレメント) の大半がトウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 1 0 4 プロモーターのコアプロモーター領域内に高度に保存されていることも確かめられた (表 2)。例えば、図 5 は、新規のトウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 1 0 4 U b i - 1 プロモーターの上流プロモーター領域において同定され T S S のおよそ 5 0 b p 5' 上流に位置することが見出された高度に保存された TATAボックス (斜字体で示され下線が付されている塩基対 8 6 9 ~ 8 7 6) を示している。同様に、図 5 は、2つの重複している熱ショックエレメント (HSE) 配列 (それぞれ下線で示している塩基対 4 5 7 ~ 4 8 1 および二重下線で示している 4 8 2 ~ 5 0 0) が、本研究で分析した新規のトウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 1 0 4 U b i - 1 プロモーターに保存されており、T S S のおよそ 2 0 0 b p 5' 上流に位置していたことを示している。

【 0 1 4 8 】

トウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 7 3 U b i - 1 対照配列と比べた場合、新規のトウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 1 0 4 U b i - 1 プロモーターの 5' U T R またはリーダー配列にはわずかなレベルの変動しか観察されなかつたが (図 6)、上流プロモーター領域 (図 5) およびイントロン領域 (図 7) における配列保存がさらに低い領域も同定された。実際、トウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 1 0 4 プロモーターにおける配列変動の大半が特にトウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 7 3 U b i - 1 イントロンに対してわずか 78.2 % の配列類似性しか示さなかつたイントロン配列 (図 7、表 2) により与えられていた。特に、トウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 1 0 4 イントロンの 5' 末端に位置する 3 1 0 b p ランのポリヌクレオチドがもっとも多様であり (塩基対 3 0 ~ 3 4 0)、イントロンの 3' 末端はかなり保存されていることが分かつた (図 7)。反対に、トウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 1 0 4 プロモーターの上流プロモーターおよび 5' U T R 領域は比較的保存されており (図 5 および 6)、トウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 7 3 U b i - 1 プロモーターに対してそれぞれ 93.4 % および 96.4 % の配列同一性を有していた (表 2)。

【 0 1 4 9 】

さらに、T S S の 1 0 0 ~ 2 0 0 b p 5' 上流に伸長しているトウモロコシ (*Z. mays*) U b i - 1 上流プロモーター領域には追加の調節モチーフが存在している。これらのモチーフは、転写開始複合体と相互作用しその構築を促進する転写因子に結合する、その安定性を改善する、または転写機構が始動した後はプロモーターエスケープの効率を増加させる (PEREMARTI et al. 2010)。したがって、この調節領域内に欠失、置換、およびミスマッチがあるとプロモーター強度と特異性の両方に潜在的に影響するおそれがある。

【 実施例 3 】

【 0 1 5 0 】

遺伝子発現のための新しいプロモーターを使用するベクター構築物

他の方法で示されていなければ、ここに記載される分子生物学的および生化学的操作な

10

20

30

40

50

らびにそれに続く実施例は、例えば、Ausubel et al. (1995), およびSambrook et al. (1989)およびその更新版に開示されている標準法により実施した。実験で使用した構築物は下でさらに詳細に説明される(表3)。

【0151】

上流プロモーター、5'UTR、およびイントロン領域を含むトウモロコシ(*Z. mays*)プロモーターは、前述のように、トウモロコシ(*Z. mays*)種のUb*i*-1遺伝子から抽出し、PCRアンプリコンはQIAquick Gel Extraction Kit(登録商標)(Qiagen Carlsbad, CA)を使用してゲル精製した。次に、プロモーターポリヌクレオチド配列は、当技術分野で既知の標準クローニング技法を使用してGateway Entry Vector(登録商標)(Invitrogen)にクローニングした。トウモロコシ(*Z. mays*)c.v.B104のUb*i*-1プロモーター配列を含む得られたGateway Entry Vector(登録商標)は、制限消化およびシークエンシングにより確かめた。トウモロコシ(*Z. mays*)c.v.B73 Ub*i*-1プロモーター配列を含む対照エントリーベクターも当技術分野の標準クローニング技法を使用してgateway entry vectorにクローニングした。

【0152】

Ub*i*-1プロモーター配列に加えて、エントリーベクターは、コザラクラゲ(*Phialidium*)種由来の黄色蛍光タンパク質レポーター遺伝子(PhiYFP; Shagin, D. A., (2004) Mol Biol Evol. 21;841-50)も、前記配列に組み込まれたST-LS1イントロン(Vananneyt, G., (1990) Mol Gen Genet. 220;245-50)およびトウモロコシ(*Zea mays*)パートオキシダーゼ5遺伝子の3'-UTR領域(ZmPer5、米国特許第6,699,984号)と一緒に含んでいた。プロモーター配列のそれぞれを含むクローン化されたエントリーベクターを示すベクターマップを提供する。構築物pDAB105742はトウモロコシ(*Z. mays*)c.v.B73 Ub*i*-1プロモーター配列を含む対照エントリーベクターに対応している。構築物pDAB105739はトウモロコシ(*Z. mays*)Ub*i*-1 B104プロモーター配列を含むエントリーベクターに対応している。このようにして、トウモロコシ(*Z. mays*)Ub*i*-1プロモーター、PhiYFP遺伝子、およびZmPer5 3'-UTRを含む遺伝子発現力セットを含むエントリーベクターを確立した。

【0153】

表3に記載されているように、新しいプロモーター配列により推進されZmPer5 3'-UTRにより終結されるPhiYFPレポーター遺伝子を含むバイナリー発現ベクター構築物を構築した。アグロバクテリウム(Agrobacterium)媒介トウモロコシ胚形質転換のための形質転換または発現ベクターは、上記の通りに、標準クローニング法ならびに標準デステイネーションバイナリーベクター、pDAB101917および遺伝子発現力セットを含むエントリーベクターを用いるGateway(登録商標)組換え反応の使用を通じて構築した。

【0154】

バイナリーデステイネーションベクター、pDAB101917は、除草剤耐性遺伝子、ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ(PAT; Wehrmann et al., 1996, Nature Biotechnology 14:1274-1278)を含んでいた。pDAB101917ベクターでは、PAT遺伝子発現はトウモロコシ(*Z. mays*)Ub*i*-1プロモーター、5'-UTR、およびイントロンの制御下にあった。pDAB101917ベクターはトウモロコシ(*Z. mays*)リバーゼ遺伝子由来の3'-UTR領域(ZmLip;米国特許第7,179,902号)も含んでいた。ZmLip 3'-UTRを使用して、PAT mRNAの転写を終結させた。Gateway(登録商標)組換え反応により、遺伝子発現力セット(すなわち、トウモロコシ(*Z. mays*)c.v.B104またはトウモロコシ(*Z. mays*)c.v.B73 Ub*i*-1プロモーター、PhiYFP遺伝子、およびZmPer5 3'-UTR)を含むそれぞれのエントリーベクターのpDAB101917デステイネーションバイナリーベクター内への挿入が可能になった。エントリーベクターは、pDAB

10

20

30

40

50

101917デスティネーションベクター内のT-DNAボーダーAとBの間およびPA
T発現カセットの上流に挿入された。

【0155】

【表3】

表3:バイナリー遺伝子発現ベクター構築物

エントリーベクター構築物			デスティネーションベクター構築物				
バイナリーベクター構築物	プロモーター	導入遺伝子	3'-UTR	プロモーター	レポータ遺伝子	3'-UTR	図
pDAB105748	トウモロコシ(<i>Z. mays</i>) c.v. B73 Ubi-1	<i>Ph1YFP</i>	<i>ZmPer5</i>	トウモロコシ(<i>Z. mays</i>) Ubi-1	PAT	<i>ZmLip</i>	8
pDAB105745	トウモロコシ(<i>Z. mays</i>)c.v. B104 Ubi-1	<i>Ph1YFP</i>	<i>ZmPer5</i>	トウモロコシ(<i>Z. mays</i>) Ubi-1	PAT	<i>ZmLip</i>	9

【0156】

バイナリー発現構築物、pDAB101917を、組み込まれているトウモロコシ(*Z. mays*) Ubi-1プロモーター、*Ph1YFP*遺伝子、および*ZmPer5* 3'-UTRを含む遺伝子発現カセットと一緒に示すべクターマップが提供される。対照構築物、pDAB105748は、トウモロコシ(*Z. mays*) c.v. B73 Ubi-1プロモーターを含む遺伝子発現カセットに対応する(図8)。さらに、構築物、pDAB105745は、トウモロコシ(*Z. mays*) c.v. B104 Ubi-1プロモーター配列を含む遺伝子発現カットセットに対応する(図9)。

【実施例4】

【0157】

植物形質転換

バイナリーベクター構築物、pDAB105748(トウモロコシ(*Z. mays*) c.v. B73)およびpDAB105745(トウモロコシ(*Z. mays*) c.v. B104)はそれぞれ、当技術分野で既知の標準形質転換技法を使用して、アグロバクテリウムツメファシエンス(*Agrobacterium tumefaciens*)株、EHA101に形質転換した。細菌コロニーを単離し、バイナリープラスミドDNAを抽出し、精製し、制限酵素消化により確認した。

【0158】

トウモロコシ植物の形質転換は、アグロバクテリウム(*Agrobacterium*)媒介形質転換および選択可能な植物マーカーとしてホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ遺伝子(PAT; Wehrmann et al., 1996, *Nature Biotechnology* 14:1274-1278)を用いるVega et al., 2008, *Plant Cell Rep* 27:297-305に記載されているプロトコルに従って実施した。バイナリーベクター構築物(上記)を含むアグロバクテリウムツメファシエンス(*Agrobacterium tumefaciens*)培養物を使用して、トウモロコシ(*Z. mays*) c.v. *Hi-I*植物を形質転換し第1ラウンドT₀トランスジェニックトウモロコシ事象を生成した(表4)。未成熟接合体胚を生成し、調製し、形質転換の2.5か月後に収穫した。

【0159】

個々の遺伝子発現構築物についての形質転換結果は表4にさらに説明されている。生成した胚の総数、カルス段階および全植物において観察されるトランスジェニック事象の総数、ならびに全体形質転換効率のパーセンテージを開示している。バイナリー発現構築物の全体形質転換効率は、多くの実験における胚の生育量が不十分だったために以前に報告された(Vega et al., 2008)よりも低い。

【0160】

【表4】

表4:第1ラウンド、T ₀ 、トウモロコシ形質転換の結果				
バイナリーベクター構築物	胚総数	カルスの数	トランスジェニック事象の数	効率(%)
pDAB105748	545	221	33	6.1
pDAB105745	454	227	25	5.5

【実施例5】

【0161】

導入遺伝子コピー数分析

10

トランスジェニックトウモロコシ (*Z. mays*) 植物のゲノム内での Phi YFP 導入遺伝子の安定的組込みは、加水分解プローブアッセイにより確かめた。カルスから発生した安定的に形質転換したトランスジェニックトウモロコシ (*Z. mays*) 小植物が得られ、分析して、低コピー数（すなわち、1～2コピー）の完全長 T 鎖インサートを含有する事象を同定した。

【0162】

20

Roche Light Cycler 480 (商標) システムを使用して、製造業者の使用説明書に従って導入遺伝子コピー数を決定した。前記方法は、1回のアッセイで、Phi YFP 遺伝子および内在性参照遺伝子、トウモロコシ (*Z. mays*) インベルターゼ (ZmInv; Genbank 受託番号 U16123.1) に特異的なオリゴヌクレオチドを用いるバイプレックス TaqMan (登録商標) PCR 反応を利用した。コピー数および接合状態は、既知のコピー数標準物質と比べた場合の、ZmInv 特異的蛍光に対する Phi YFP 特異的蛍光の強度を測定することにより決定した。

【0163】

30

Phi YFP 遺伝子特異的 DNA 断片を、FAM (商標) 蛍光色素で標識されたプローブを含有する1つのTaqMan (登録商標) プライマー/プローブセットを用いて増幅し、ZmInv を、HEX (商標) 蛍光で標識されたプローブを含有する別のTaqMan (登録商標) プライマー/プローブセットを用いて増幅した（表5）。コピー数分析のためのプライマーおよびプローブは Integrated DNA Technologies (Coralville, IA) により商業的に合成された。FAM (商標) 蛍光部分は光学密度 465 / 510 nm で励起され、HEX (商標) 蛍光部分は光学密度 533 / 580 nm で励起された。

【0164】

30

PCR 反応は表6に記載される試薬を使用して最終 10 μl の反応体積で調製した。遺伝子特異的 DNA 断片は表7に記載される熱サイクリング条件に従って増幅した。試料のコピー数および接合状態は、既知のコピー数標準物質と比べた場合の、参照遺伝子 ZmInv に特異的な蛍光に対するレポーター遺伝子 Phi YFP に特異的な蛍光の相対強度を測定することにより決定した。

【0165】

40

コピー数標準物質は、ベクター pDAB108706 をトウモロコシ (*Z. mays*) c. v. B104 ゲノム DNA (gDNA) に希釈し、pDAB108706 : gDNA が既知の比である標準物質を得ることにより作製した。例えば、1 コピーのトウモロコシ (*Z. mays*) c. v. B104 gDNAあたり 1、2、および 4 コピーのベクター DNA を有する試料を調製した。トウモロコシ (*Z. mays*) c. v. B104 gDNA 標準物質と混ぜ合わせた pDAB108706 の 1 および 2 コピー希釈液は、ヘミ接合性であることが分かっている対照トウモロコシ (*Z. mays*) 事象およびホモ接合性であることが分かっている対照トウモロコシ (*Z. mays*) 事象（すなわち、トウモロコシ (*Z. mays*) 事象 278；PCT 国際特許公開第 WO 2011 / 022469 A2 号参照）に対して確証された。

50

【0166】

PAT 遺伝子および内在性 ZmInv 参照遺伝子それぞれに特異的なオリゴヌクレオチドを利用する TaqMan (登録商標) バイブレックス PCR 増幅アッセイを実施した。1つのTaqMan (登録商標) プライマーセットおよびFAM (商標) 蛍光色素で標識されたプローブを用いて PAT の遺伝子特異的DNA断片を検出するPCR増幅を用いた(表5)。別のプライマーセットおよびHEX (商標) 蛍光色素で標識されたプローブも使用して ZmInv 内在性参照 / 対照遺伝子を増幅し検出した(表5)。PAT TaqMan (登録商標) 反応混合物を表6に記載される通りに調製し、特異的断片は表7に記載される条件に従って増幅させた。

【0167】

異なるプロモーター構築物を用いた形質転換により得られたトランスジェニック植物の導入遺伝子コピー数分析からの結果を表8に示している。1~2コピーのPhiYFP導入遺伝子を有する植物のみを温室に移し、さらなる発現分析のために生育した。

【0168】

【表5】

表5:コピー数アッセイのためのプライマーおよびプローブ

遺伝子	プライマー/プローブ	ヌクレオチド配列	配列番号
PhiYFP	フォワードプライマー	CGTGTTGGAAAGAACCTTGGA	11
	リバースプライマー	CCGTGGTTGGCTTGGTCT	12
	プローブ(蛍光標識/配列)	5'FAM/CACTCCCCACTGCCT	13
ZmInv 対照	フォワードプライマー	TGGCAGACGACGACTTGT	14
	リバースプライマー	AAAGTTGGAGGCTGCCGT	15
	プローブ(蛍光標識/配列)	5'HEX/CGAGCAGACCGCCGTGTACTT	16
PAT	フォワードプライマー	ACAAGAGTGGATTGATGATCTAGAGAGGT	17
	リバースプライマー	CTTGATGCCTATGTGACACGTAAACAGT	18
	プローブ(蛍光標識/配列)	5'FAM/GGTGTTGGCTGGTATTGCTTACGCTGG	19

【0169】

【表6】

表6:Taqman(登録商標)コピー数PCR反応試薬

試薬	作用濃度	体積 (μl)	最終濃度
水	--	0.5	--
Roche ライトサイクラーマスターMix	2X	5	1X
PhiYFP フォワードプライマー	10μM	0.4	400nM
PhiYFP リバースプライマー	10μM	0.4	400nM
PhiYFP プローブ-FAM 標識	5 μM	0.4	200nM
ZmInv フォワードプライマー	10μM	0.4	400nM
ZmInv リバースプライマー	10μM	0.4	400nM
ZmInv プローブ-HEX 標識	5 μM	0.4	200nM
ポリビニルピロリドン(PVP)	10%	0.1	0.10%
ゲノムDNA 鑄型	約 5ng/μl	2	10ng/μl

【0170】

10

20

30

40

【表7】

表7:コピー数 PCR 増幅のための熱サイクリング条件

PCR ステップ	温度(°C)	時間	サイクル数
1	95	10分	1
2	95	10秒	40
	58	35秒	
	72	1秒	
3	40	10秒	1

10

【0171】

【表8】

表8:トランスジェニック植物の導入遺伝子コピー数分析

構築物	分析された事象	単純(1~2 コピー)	複雑(2 よりも多いコピー)
105748	21	15	6
105745	11	9	2

【実施例6】

【0172】

Ph i Y F P および P A T タンパク質の E L I S A 定量化

植物は葉 E L I S A アッセイを使用して発生の V 4 ~ 5 段階で試料採取した。試料は 9 6 ウェル収集チューブプレートに収集し、4 葉ディスク（紙穴パンチサイズ）を試料ごとに採取した。2 つの 4 . 5 mm の B B (D a i s y c o r p o r a t i o n 、 R o g e r 、 A R) および 2 0 0 μ L の抽出バッファー [0 . 0 5 % の T w e e n (登録商標) - 2 0 および 0 . 0 5 % の B S A を補充された 1 × P B S (M i l l i p o r e P r o b u m i n (登録商標) 、 E M D M i l l i p o r e C o r p . 、 B i l l e r i c a 、 M A)] をそれぞれのチューブに添加した。追加の 2 0 0 μ L の抽出バッファーをそれぞれのチューブに添加し、続いて反転させて混合した。プレートは 3 0 0 0 r p m で 5 分間回転させた。上澄みは氷上に保存したディープウェル 9 6 の対応するウェルに移した。E L I S A 用には、 N u n c (登録商標) 9 6 ウェル M a x i - S o r p プレート (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c I n c . 、 R o c k f o r d 、 I L) を使用した。プレートはマウスモノクローナル抗 Y F P 捕捉抗体 (O r i G e n e T e c h n o l o g i e s I n c . 、 R o c k v i l l e 、 M D) で被覆した。抗体は P B S (1 μ g / m L) に希釈し、ウェルあたり 1 5 0 μ L の希釈 P B S を添加した。プレートは 4 で一晩インキュベートした。一晩プレートは室温に 2 0 ~ 3 0 分間保持し、その後 3 5 0 μ L の洗浄バッファー [0 . 0 5 % の T w e e n (登録商標) - 2 0 を補充された 1 × P B S (S i g m a - A l d r i c h 、 S t . L o u i s 、 M O)] で 4 × 洗浄した。プレートは、ウェルあたり 2 0 0 μ L のブロッキングバッファー [0 . 0 5 % の T w e e n (登録商標) - 2 0 プラス 0 . 5 % の B S A を補充された 1 × P B S (M i l l i p o r e P r o b u m i n (登録商標))] で + 3 7 で最低でも 1 時間ブロックし、続いて 3 5 0 μ L の洗浄バッファー (T o m t e c Q u a d r a W a s h (商標) 2 、 T o m t e c , I n c . 、 H a m d e n 、 C T) で 4 × 洗浄した。

20

【0173】

Y F P E L I S A では、 E v r o g e n 組換え Ph i - Y F P 1 m g / m L (A x x o r a L L C 、 F a r m i n g d a l e 、 N Y) を標準物質として使用した。5 パラメータフィット標準曲線 (1 n g / m l と 0 . 1 2 5 n g / m l 標準の間) を使用して、曲線の直線部分で全てのデータフォールを確実にした。1 0 0 μ L の標準物質または試料をウェルに添加した。アッセイバッファー中最低でも 1 対 4 希釈の試料を使用した。プレートは、プレート振盪機 (2 5 0 r p m ; T i t e r P l a t e s h a k e r) 上、

40

50

室温で1時間インキュベートし、続いて350 μLの洗浄バッファー（Tomtec Quadra Wash（商標）2）で4×洗浄した。約100 μLの1 μg/mL Evrogenウサギポリクローナル抗PhiYFP一次抗体（Axxora）をそれぞれのウェルに添加した。プレートは、250 rpmのプレート振盪機上、室温で1時間インキュベートし、続いて350 μLの洗浄バッファー（Tomtec Quadra Wash（商標）2）で4×洗浄した。次に、100 μLの抗ウサギIgG HRP二次抗体（Thermo Scientific）をプロッキング／アッセイバッファー中で1対5000に希釈し、このPATタンパク質をEnvirologix（Portland, ME）製のキットを使用して定量化した。ELISAは、植物抽出物の複数の希釈液ならびに基本的には供給業者により提供される試薬および説明書を使用して実施した。

10

【実施例7】

【0174】

新規プロモーターに作動可能に連結されている導入遺伝子の安定的植物発現

トランスジェニック植物組織においてタンパク質発現が観測された。例えば、PhiYFP発現は、アグロバクテリウム（Agrobacterium）との共培養により安定的に形質転換されたT₀植物のカルスにおいて観察された。トランスジェニック植物は、新規のプロモーターpDAB105745（トウモロコシ（Z. mays）c. v. B104、図9）および対照プロモーターpDAB105748（トウモロコシ（Z. mays）c. v. B73、図8）を含むバイナリーベクター構築物を使用して形質転換されたトウモロコシ（Z. mays）胚から生育された。植物カルスは、YFPフィルターおよび500 nm光源を使用して実体顕微鏡（Leica Microsystems, Buffalo Grove, IL）下で観察された。対照pDAB105748と比べた場合のpDAB105745を含むトランスジェニックT₀トウモロコシ植物のカルス組織において観察されたPhiYFPの安定的発現の代表例を図10に示す。データによれば、pDAB105745（トウモロコシ（Z. mays）c. v. B104）を含む新規のプロモーターは、本明細書に記載される通りに、T₀トランスジェニック植物のカルス組織においてPhiYFP遺伝子の強い発現を推進できることが確認されている。

20

【0175】

表8に記載されるように、低コピー数（すなわち、1～2コピー）のPhiYFP導入遺伝子を含有する全植物は温室で生育させた。一般に、構築物あたり約5～約10事象および事象あたり約5の植物がT₁発現分析のために使用された。ELISAデータから、対照構築物pDAB105748（トウモロコシ（Z. mays）c. v. B73）と比べた場合の新規のプロモーターpDAB105745（トウモロコシ（Z. mays）c. v. B104）を含むベクター構築物を使用するT₁トウモロコシ植物の葉においてPhiYFPタンパク質の一貫した発現が明らかになった。

30

【0176】

対照構築物pDAB105748（トウモロコシ（Z. mays）c. v. B73、図8）を含む対照植物により産生されるおよそ285.3 ng/mg (+/- 22.7 ng/mg)のPhiYFPタンパク質と比べた場合、新規のプロモーター構築物pDAB105745（トウモロコシ（Z. mays）c. v. B104、図9）を含むT₁植物について約347 ng/mg (+/- 22.9 ng/mg)のPhiYFPの平均PhiYFPタンパク質発現が観察された。これらの結果により、トウモロコシ（Z. mays）c. v. B104由来の新規のプロモーターは、本明細書に記載されるように、高レベルのタンパク質产生でトランスジェニック形質を作り出すのに有用であったことが確認される。

40

【0177】

さらに、トウモロコシ（Z. mays）c. v. B73プロモーター由来のpDAB105748を含む対照植物により産生されるおよそ105.8 ng/mg (+/- 7.4 ng/mg)のPATタンパク質と比べた場合、pDAB105745（トウモロコシ（Z. mays）c. v. B104）を含む全てのT₁植物について平均PAT発現はおよそ93.7 ng/mg (+/- 7.4 ng/mg)であった。全体的に見て、全てのトウモロコシ

50

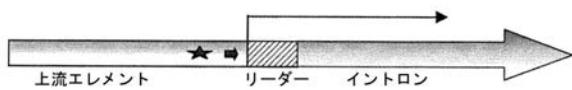
植物についての P A T タンパク質の発現は、トウモロコシ植物において Ph1YFP 遺伝子について観察される発現よりも有意に低かった。

【 0 1 7 8 】

P h i Y F P タンパク質発現は、本明細書に記載されるそれぞれの新規のプロモーター構築物を表す選択された T₁ トランスジェニック植物の尾房由来の花粉においても測定した。図 11 に示されるように、トランスジェニック花粉の画像分析から、p D A B 1 0 5 7 4 5 (トウモロコシ (*Z. mays*) c . v . B 1 0 4) を含む新規のプロモーターは、本出願において記載されるように、花粉において P h i Y F P タンパク質の高度な発現を推進することが確証される。

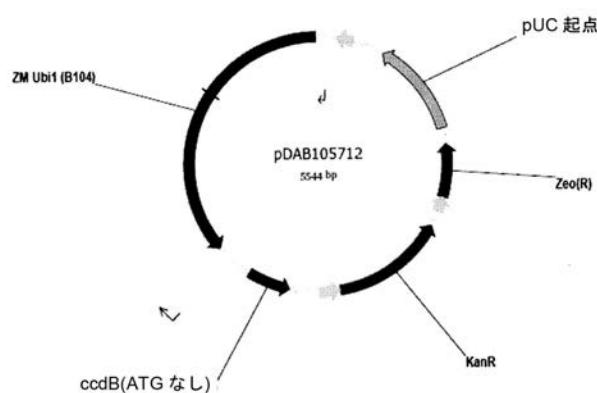
〔 1 〕

四 1



【 四 2 】

図 2



〔 図 3 〕

3

【 図 4 】

圖 4

【図5-1】

図 5

【図5-2】

図 5(続き)

トウモロコシ(Zea mays) cv. B104	Ubi-1	上流	(489)	AACACAATACCTTAAAGGAAATTAAA	540
トウモロコシ(Zea mays) cv. B73	Ubi-1	上流	(508)	AAACAAATCCCTTTAAGAAATTAAA	540
トウモロコシ(Zea mays) cv. B104	Ubi-1	上流	(518)	CTAAGCAACCATTTCTTGTTCTGAGTAG	570
トウモロコシ(Zea mays) cv. B73	Ubi-1	上流	(538)	CTAAGGAACCATTTCTTGTTCTGAGTAG	570
トウモロコシ(Zea mays) cv. B104	Ubi-1	上流	(548)	ATAATGACGGACGTGTCAACGCCGTCAGCAG	600
トウモロコシ(Zea mays) cv. B73	Ubi-1	上流	(568)	ATAATGCCAGCGCTTAAACGCCGTCAGCAG	600
トウモロコシ(Zea mays) cv. B104	Ubi-1	上流	(578)	AGTCTAACGGACACCAACCAGCGAACAGCAG	630
トウモロコシ(Zea mays) cv. B73	Ubi-1	上流	(598)	AGTCTAACGGACACCAACCAGCGAACAGCAG	630
トウモロコシ(Zea mays) cv. B104	Ubi-1	上流	(608)	AGCGTGCCTCGGCCAACGCCGAAACAGCAG	660
トウモロコシ(Zea mays) cv. B73	Ubi-1	上流	(628)	AGCGTGCCTCGGCCAACGCCGAAACAGCAG	660
トウモロコシ(Zea mays) cv. B104	Ubi-1	上流	(638)	GCACGGCATCTCTGTAAGCTGCCCTCTGGACC	690
トウモロコシ(Zea mays) cv. B73	Ubi-1	上流	(658)	GCACGGCATCTCTGTAAGCTGCCCTCTGGACC	690
トウモロコシ(Zea mays) cv. B104	Ubi-1	上流	(668)	CTCTCTGAGAGTTCGGCTCCACCGTTGGAC	720
トウモロコシ(Zea mays) cv. B73	Ubi-1	上流	(688)	CTCTCTGAGAGTTCGGCTCCACCGTTGGAC	720
トウモロコシ(Zea mays) cv. B104	Ubi-1	上流	(698)	TTGCTCCGCTGTCGGCATCCGAAATTGGC	750
トウモロコシ(Zea mays) cv. B73	Ubi-1	上流	(718)	TTGCTCCGCTGTCGGCATCCGAAATTGGC	750
トウモロコシ(Zea mays) cv. B104	Ubi-1	上流	(728)	TGGCGGAGCGCAGACGTGAGGCGCGACCG	780
トウモロコシ(Zea mays) cv. B73	Ubi-1	上流	(748)	TGGCGGAGCGCAGACGTGAGGCGCGACCG	780
トウモロコシ(Zea mays) cv. B104	Ubi-1	上流	(758)	CAGGGGGCCCTCTCCCTCTCACGGCAC	810
トウモロコシ(Zea mays) cv. B73	Ubi-1	上流	(778)	CAGGGGGCCCTCTCCCTCTCACGGCAC	810
トウモロコシ(Zea mays) cv. B104	Ubi-1	上流	(788)	GGCAGCTACGGGGATTCTCTTCCCACCGC	840
トウモロコシ(Zea mays) cv. B73	Ubi-1	上流	(808)	GGCAGCTACGGGGATTCTCTTCCCACCGC	840
トウモロコシ(Zea mays) cv. B104	Ubi-1	上流	(818)	TCTCTGGCTTCTCCCTCTCGCCCGCCGTA	870
トウモロコシ(Zea mays) cv. B73	Ubi-1	上流	(838)	TCTCTGGCTTCTCCCTCTCGCCCGCCGTA	870
トウモロコシ(Zea mays) cv. B104	Ubi-1	上流	(848)	ATAAAATGACACCCCCCTTCCACACCTCTT	899
トウモロコシ(Zea mays) cv. B73	Ubi-1	上流	(868)	ATAAAATGACACCCCCCTTCCACACCTCTT	899

【 図 7 - 1 】

圖 7

トウモロコシ(Zea mays).cv.	B73	Ubi-1	イントロン	(1)	1	GTACGCCGCGTCGCTCCTGGCCCCCCCCCCCCCCC	30
トウモロコシ(Zea mays).cv.	B104	Ubi-1	イントロン	(1)	2	GTACGCCGCGTCATCCCTCCCCCCCCCCCCTC-	60
トウモロコシ(Zea mays).cv.	B73	Ubi-1	イントロン	(31)	31	CCTCTTACCTCTCTAGATCGGCGTTCCCG	60
トウモロコシ(Zea mays).cv.	B104	Ubi-1	イントロン	(29)	32	-TCTCTACCTCTCTAGATCGGCGATCGATC-	120
トウモロコシ(Zea mays).cv.	B73	Ubi-1	イントロン	(61)	61	TCTCATGATGGTTAGGGGGGGCGTAGTCTG	90
トウモロコシ(Zea mays).cv.	B104	Ubi-1	イントロン	(58)	62	TCATGAT---GTTAGGGGGGGCGTAGTCTG	120
トウモロコシ(Zea mays).cv.	B73	Ubi-1	イントロン	(91)	91	CCTCTGTTCACTGTTGCTTCTAGATC-	150
トウモロコシ(Zea mays).cv.	B104	Ubi-1	イントロン	(84)	92	CCTCTGTTCACTGTTGCTTCTAGATGAAACAA	150
トウモロコシ(Zea mays).cv.	B73	Ubi-1	イントロン	(116)	121	-----CGTTGTTGTTGTTGAGATCGGT	150
トウモロコシ(Zea mays).cv.	B104	Ubi-1	イントロン	(114)	122	TGTTCTAGTTCACTGTTGATG-TATGCTG	180
トウモロコシ(Zea mays).cv.	B73	Ubi-1	イントロン	(136)	151	GCTGCTTGATC-GTTGCTGACAGGGATGCGA	180
トウモロコシ(Zea mays).cv.	B104	Ubi-1	イントロン	(143)	152	TCTGGTTGGGGGGCGCTCTCTAGAT-CATGG	210
トウモロコシ(Zea mays).cv.	B73	Ubi-1	イントロン	(164)	181	CTG---TAC-GTCAGACACGCTCTGATGTC	210
トウモロコシ(Zea mays).cv.	B104	Ubi-1	イントロン	(172)	211	TAGGAACTACTGTTCAAGCTTACCTGGTTGA	240
トウモロコシ(Zea mays).cv.	B73	Ubi-1	イントロン	(191)	240	AACCTGCAGATGTTCTCTTGGGGAGTC	240
トウモロコシ(Zea mays).cv.	B104	Ubi-1	イントロン	(190)	241	TTATAATTTTGTGATGTTGATGTTGATG	270
トウモロコシ(Zea mays).cv.	B73	Ubi-1	イントロン	(221)	270	TGGGATGCTGCTTCTAGC---CGTTGGCGACAG	270
トウモロコシ(Zea mays).cv.	B104	Ubi-1	イントロン	(232)	271	ATACATCTTCATAGTACGAGTTAAGATG	300
トウモロコシ(Zea mays).cv.	B73	Ubi-1	イントロン	(249)	300	-----GGATCGATTTCATGATTTTTTTT-G-	300
トウモロコシ(Zea mays).cv.	B104	Ubi-1	イントロン	(262)	301	ATGGATGATGAAATATCGATCTAGGAAATG	330
トウモロコシ(Zea mays).cv.	B73	Ubi-1	イントロン	(275)	330	TC---GTTGCTCATGGGGTTGGTT-	330
トウモロコシ(Zea mays).cv.	B104	Ubi-1	イントロン	(292)	331	TAATCATGTTGATGGGGTTTTACTGATGCTA	360
トウモロコシ(Zea mays).cv.	B73	Ubi-1	イントロン	(295)	360	-----TCCCTTCTTCCCTTATTATTC	360
トウモロコシ(Zea mays).cv.	B104	Ubi-1	イントロン	(322)	361	ATACAGAGAGATGCTTCTTCTCGCTTGTG	390
トウモロコシ(Zea mays).cv.	B73	Ubi-1	イントロン	(316)	390	TATATGCCGTGCACTTGTGTTGTTGGGTCA	390
トウモロコシ(Zea mays).cv.	B104	Ubi-1	イントロン	(352)	391	GTGATGATGATGGCTGTTGGGGGGCG	420
トウモロコシ(Zea mays).cv.	B73	Ubi-1	イントロン	(346)	420	-----CTTCTCATGTTTCTTGTGCTTGGGTG	420
トウモロコシ(Zea mays).cv.	B104	Ubi-1	イントロン	(382)	421	CTTCTGAGTACGAGTTAATCTGTCATCA	450
トウモロコシ(Zea mays).cv.	B73	Ubi-1	イントロン	(376)	450	KTGATGTTGTTGTTGGGGGGCTCTTCA	450
トウモロコシ(Zea mays).cv.	B104	Ubi-1	イントロン	(412)	451	ACCTGGTGTGGATTTAATAAAGGGTCTGCT	480
トウモロコシ(Zea mays).cv.	B73	Ubi-1	イントロン	(406)	480	GATGCGGAGTATGTTCTGTTGATCTAACCT	510
トウモロコシ(Zea mays).cv.	B104	Ubi-1	イントロン	(442)	481	GATGCGGAGTAGATACTTCTGATCTAACCC	510
トウモロコシ(Zea mays).cv.	B73	Ubi-1	イントロン	(436)	510	TGGTGGATTTATTAATTTGATCTGATG	510
トウモロコシ(Zea mays).cv.	B104	Ubi-1	イントロン	(472)	510	TGTTGGATTTATTAATAAAGGATGATG	510

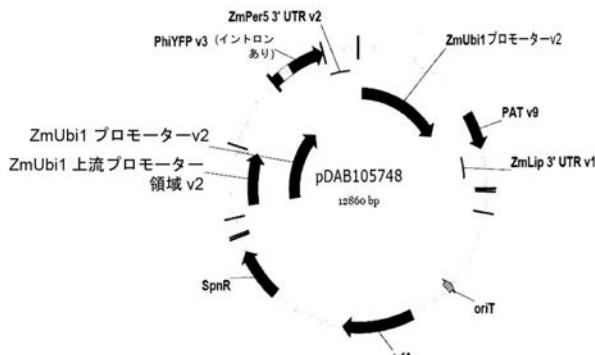
【図7-2】

図7(続き)

トウモロコシ(Zea mays) c.v. B73 Ubi-1 イントロン (466) TGTGTCGCACATACATATTGATAGTTACGAAT
トウモロコシ(Zea mays) c.v. B104 Ubi-1 イントロン (499) TATGTCGC-TACATCTCATAGTACGGAT
541 570
トウモロコシ(Zea mays) c.v. B73 Ubi-1 イントロン (496) TGAAGATGATGGATGGAAATATCGATCTAG
トウモロコシ(Zea mays) c.v. B104 Ubi-1 イントロン (528) TTAAGATGATGGATGGAAATATCGATCTAG
571 600
トウモロコシ(Zea mays) c.v. B73 Ubi-1 イントロン (526) GATAGGTATACATGTTGATTCGGGTTTAC
トウモロコシ(Zea mays) c.v. B104 Ubi-1 イントロン (558) GATAGGTATACATGTTGATTCGGGTTTAC
601 630
トウモロコシ(Zea mays) c.v. B73 Ubi-1 イントロン (556) TGAIFCATATACAGAGATGCTTTTGITCG
トウモロコシ(Zea mays) c.v. B104 Ubi-1 イントロン (588) TGATGCATATACAGAGATGCTTTT-TTCG
631 660
トウモロコシ(Zea mays) c.v. B73 Ubi-1 イントロン (586) CTTCGTTGATGATGGTGGGTTGGC
トウモロコシ(Zea mays) c.v. B104 Ubi-1 イントロン (617) CTTGTTGATGATGGTGGGTTGGC
661 690
トウモロコシ(Zea mays) c.v. B73 Ubi-1 イントロン (616) GGTCGTCATTGTTCTAGATCGGAGTAGA
トウモロコシ(Zea mays) c.v. B104 Ubi-1 イントロン (647) GGT-----CGTTCTAGATCGGAGTAGA
691 720
トウモロコシ(Zea mays) c.v. B73 Ubi-1 イントロン (646) ATACTGTTTCAAACCTACCTGGGTATTAT
トウモロコシ(Zea mays) c.v. B104 Ubi-1 イントロン (669) ATACTGTTTCAAACCTACCTGGGTATTAT
721 750
トウモロコシ(Zea mays) c.v. B73 Ubi-1 イントロン (676) TAATTTGAACTGATGTTGTCATAC
トウモロコシ(Zea mays) c.v. B104 Ubi-1 イントロン (699) TAATTTGAACTGATGTTGTCATAC
751 780
トウモロコシ(Zea mays) c.v. B73 Ubi-1 イントロン (706) ATCTTCATAGTTACGAGTTAAAGATG---G
トウモロコシ(Zea mays) c.v. B104 Ubi-1 イントロン (729) ATCTTCATAGTTACGAGTTAAAGATGATGG
781 810
トウモロコシ(Zea mays) c.v. B73 Ubi-1 イントロン (733) ATGGAAATATCGATCTAGGATAGGTATACA
トウモロコシ(Zea mays) c.v. B104 Ubi-1 イントロン (759) ATGGAAATATTGATCTAGGATAGGTATACA
811 840
トウモロコシ(Zea mays) c.v. B73 Ubi-1 イントロン (763) TGTTGATGTGGTTTACTGATGCATATAC
トウモロコシ(Zea mays) c.v. B104 Ubi-1 イントロン (789) TGTTGATGTGGTTTACTGATGCATATAC
841 870
トウモロコシ(Zea mays) c.v. B73 Ubi-1 イントロン (793) ATGATGGCATATCGCAGCATATTCATATG
トウモロコシ(Zea mays) c.v. B104 Ubi-1 イントロン (819) ATGATGGCATATCGCAGCATCTATTCAATG
871 900
トウモロコシ(Zea mays) c.v. B73 Ubi-1 イントロン (823) CTCTAACCTTGAGTACCCATATATAAAT
トウモロコシ(Zea mays) c.v. B104 Ubi-1 イントロン (849) CTCTAACCTTGAGTACCCATATATAAAT
901 930
トウモロコシ(Zea mays) c.v. B73 Ubi-1 イントロン (853) AAACAAGTATGTTTATAATTTCGATC
トウモロコシ(Zea mays) c.v. B104 Ubi-1 イントロン (879) AAACAAGTATGTTTATAATTTCGATC
931 960
トウモロコシ(Zea mays) c.v. B73 Ubi-1 イントロン (883) TTGATATACTTGGATGATGGCATATGCAAC
トウモロコシ(Zea mays) c.v. B104 Ubi-1 イントロン (909) TTGATATACTTGGATGATGGCATATGCAAC
961 990
トウモロコシ(Zea mays) c.v. B73 Ubi-1 イントロン (913) AGCTATATGTGGATTTTACGCCCTGGCT
トウモロコシ(Zea mays) c.v. B104 Ubi-1 イントロン (939) AGCTATATGTGGATTTTACGCCCTGGCT
991 1020
トウモロコシ(Zea mays) c.v. B73 Ubi-1 イントロン (943) TCATACGGCTATTTATTTGCTTGGTACTGTT
トウモロコシ(Zea mays) c.v. B104 Ubi-1 イントロン (968) TCATACGGCTATTTATTTGCTTGGTACTGTT
1021 1050
トウモロコシ(Zea mays) c.v. B73 Ubi-1 イントロン (973) TCTTTTGTC-GATGCTCACCCCTGTGTTG
トウモロコシ(Zea mays) c.v. B104 Ubi-1 イントロン (998) TCTTTTGTC-CGATGCTCACCCCTGTGTTG
1051 1065
トウモロコシ(Zea mays) c.v. B73 Ubi-1 イントロン (1002) GTGTTACTTCTGCA-
トウモロコシ(Zea mays) c.v. B104 Ubi-1 イントロン (1028) GTGTTACTTCTGCA

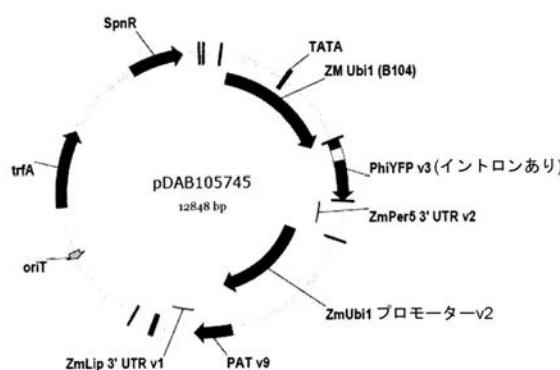
【図8】

図8



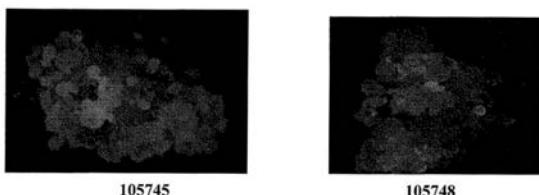
【図9】

図9



【図10】

図10



【図11】

図11



【配列表】

2017500895000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 14/72913
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12N 15/00, C12N 5/00, C12N 5/02, C12N 5/04, C12N 5/10, C12N 15/82, C12N 15/87 (2015.01) CPC - C12N 2799/021, C12N 2800/10, C12N 2820/65, C12N 2830/65, C12N 5/10, C12N 15/82 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED <small>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)</small> CPC- C12N 2799/021, C12N 2800/10, C12N 2820/65, C12N 2830/65, C12N 5/10, C12N 15/82		
<small>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched</small> CPC- C12N 15/8213, C12N 15/8217, C12N 15/8241; USPC- 435/320.1, 435/410, 435/418, 435/419, 800/278, 800/279, 800/287, 800/285, 800/286, 800/288, 800/320, 800/320.1, 800/320.2, 800/320.3		
<small>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)</small> PubWEST(PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB); PatBase, Google/Scholar; Ub1 promoter; ubiquitin promoter, transgenic, plant, maize, Zea mays, rice, wheat, GenBank: AY373338.1. Binary vector pGA1611, UbqM1 GenCore 6.4.1: SEQ ID NO:2		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2012/0246763 A1 (Flasinski) 27 September 2012 (27.09.2012) SEQ ID NO:49, Fig 8; para [0015], [0019], [0020], [0085], [0142]-[0144], [0181], [0185]-[0187]	1-7, 37-50
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 07 May 2015 (07.05.2015)	Date of mailing of the international search report 08 JUN 2015	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT CSP: 571-272-7774	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 14/72913

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

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

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

2. Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

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

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

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

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1.

Group I: claims 1-7, 37-50, drawn to a gene expression cassette comprising a promoter having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO: 2 linked to a transgene.

Group II: claims 8-24, drawn to a transgenic cell comprising the gene expression cassette of claim 1 or a synthetic polynucleotide with at least 90% sequence identity to SEQ ID NO: 2.

Group III: claims 25-33, drawn to a method for expressing a heterologous coding sequence in a transgenic plant by a) transforming a plant cell with a gene expression cassette comprising SEQ ID NO: 2.

***** See Supplemental Sheet to continue *****

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

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-7, 37-50

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 14/72913

***** Supplemental Sheet *****

In Continuation of Box III. Observations where unity of invention is lacking:

Group IV: claims 34-36, drawn to a method for isolating a polynucleotide sequence with at least 90% sequence identity to SEQ ID NO: 2.

The inventions listed as Groups I-IV do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features

The inventions of Groups I-III do not include the shared or common technical feature of a method for isolating a polynucleotide, as required by Group IV.

The inventions of Group IV do not include the shared or common technical feature of a transgenic cell, as required by Group II, or a method for expressing a heterologous coding sequence in a transgenic plant, as required by Group III.

The inventions of Groups I and II do not include the shared or common technical feature of a method for expressing a heterologous coding sequence in a transgenic plant, as required by Group III.

Common Technical Features

The inventions of Groups I-IV share the technical feature of a gene expression cassette comprising a promoter having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO: 2 linked to a transgene; the inventions of Groups I, II and III share the technical feature of a transgenic cell or a transgenic plant comprising said gene expression cassette; the inventions of Groups I and II share the technical feature of a recombinant vector. However, these shared technical features do not represent a contribution over prior art as being anticipated by US 2012/0246763 A1 to Flasinski (27 September 2012) (hereinafter "Flasinski").

Flasinski discloses a transgenic cell (para [0142], "Wheat Leaf Protoplast Cells, TABLE 34 and its legend, "Mean CP4 [glyphosate tolerance] Protein Expression in Wheat Leaf Protoplast Cells") comprising
 - a gene expression cassette (para [0144], EXP-Zm.UbqM1:1:2, wherein EXP is "ubiquitin transcriptional regulatory elements, or transcriptional regulatory expression element group (EXP) sequences" (para [0085], Example 1) comprising
 — a promoter having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO: 2 (SEQ ID NO:49, 98.2% identity; para [0020], "SEQ ID NOS... 49... are sequences of transcriptional regulatory expression element groups or EXP sequences comprising a promoter sequence operably linked 5' to a leader sequence which is operably linked 5' to an intron sequence"; para [0015], "FIGS. 4a-4e depict alignment of transcriptional regulatory expression element group variants derived from the grass Zea mays subsp. mexicana. In particular, FIGS. 4a-4e compare a 2005 bp transcriptional regulatory expression element group termed EXP-Zm.UbqM1:1:2 (SEQ ID NO: 49) with allelic variant EXP-Zm.UbqM1:1:5 (SEQ ID NO: 53)...");
 — linked to a transgene (para [0142], CP4 [glyphosate tolerance]; TABLE 34 and its legend, "Mean CP4 Protein Expression in Wheat Leaf Protoplast Cells", pMON129200 EXP-SET1.Ubq1:1:5"; para [0144], "EXP-Zm.UbqM1:1:2 drove expression of CP4 at the highest level, with expression levels being 2.2 to 3.4 fold higher than EXP-Os.Act1+CaMV.35S.2.times.A1-B3+Os.Act1:1:1 and EXP-CaMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Os.Act1:1:1, respectively"). Flasinski further discloses transgenic cell, transgenic plant and recombinant vector comprising said regulatory element (para [0007], [0057]). As said technical features were known in the art at the time of the invention, these cannot be considered special technical feature that would otherwise unify the groups.

Groups I-IV therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,D0,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(74)代理人 100139310

弁理士 吉光 真紀

(74)代理人 100104282

弁理士 鈴木 康仁

(72)発明者 クマー , サンディープ

アメリカ合衆国 46032 インディアナ州 , カーメル , ウィンドット ドライブ 201

(72)発明者 グプタ , マンジュ

アメリカ合衆国 46032 インディアナ州 , ノーブルズビル , ウィナマック コート 134
63

(72)発明者 ライト , テリー , アール .

アメリカ合衆国 46074 インディアナ州 , カーメル , チャリティ チェイス サークル 1
4162

(72)発明者 ジャイン , スーザン , エム .

アメリカ合衆国 46077 インディアナ州 , ズイオンスヴィレ , カマルグ ドライブ 196
2

(72)発明者 スミス , ダグ , エー .

アメリカ合衆国 46060 インディアナ州 , ノーブルズビル , エドワーズ グローブ ドライブ
19038

(72)発明者 アービド , ディア

アメリカ合衆国 46074 インディアナ州 , カーメル , ゴールデン ゲート ドライブ イースト
13310

F ターム(参考) 2B030 AB04 AD04 CA17

4B065 AA88X AB01 AC20 BA02 CA53