

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5770089号
(P5770089)

(45) 発行日 平成27年8月26日(2015. 8. 26)

(24) 登録日 平成27年7月3日(2015. 7. 3)

(51) Int. Cl.

F I

A O 1 H 1/00 (2006. 01)
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)A O 1 H 1/00 Z N A A
C 1 2 N 15/00 A

請求項の数 1 (全 49 頁)

(21) 出願番号 特願2011-525277 (P2011-525277)
 (86) (22) 出願日 平成21年8月31日(2009. 8. 31)
 (65) 公表番号 特表2012-501190 (P2012-501190A)
 (43) 公表日 平成24年1月19日(2012. 1. 19)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2009/055555
 (87) 国際公開番号 W02010/025465
 (87) 国際公開日 平成22年3月4日(2010. 3. 4)
 審査請求日 平成24年8月9日(2012. 8. 9)
 (31) 優先権主張番号 61/190, 581
 (32) 優先日 平成20年8月29日(2008. 8. 29)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

前置審査

(73) 特許権者 511053698
 ロス アラモス ナショナル セキュリ
 ティー, リミテッド ライアビリティー カ
 ンパニー
 LOS ALAMOS NATIONAL
 SECURITY, LLC
 アメリカ合衆国, 87545 ニューメキ
 シコ州, ロス アラモス, ロス アラモス
 ナショナル ラボラトリー, エルシー/
 アイピーーエムエス エー187
 Los Alamos National
 Laboratory, LC/IP-M
 S A187, Los Alamos, N
 ew Mexico 87545, Uni
 ted States of Ameri
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 植物性グルタミンフェニルピルビン酸トランスアミナーゼ遺伝子、およびそれを運搬するトランスジェニック植物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

類似の野生型植物または非形質転換植物と比較して植物の成長特性を向上させる方法であって、

(a) 複数の植物細胞に G P T 導入遺伝子を導入する工程と、
 (b) 上記植物細胞において G P T 導入遺伝子を発現させる工程と、
 (c) G P T 導入遺伝子を含まない同一種の植物と比較して増大された成長特性を有する、G P T 導入遺伝子を含むトランスジェニック植物を、上記植物細胞から再生された複数のトランスジェニック植物から選抜する工程と、
 を包含し、

上記 G P T 導入遺伝子は、配列番号 2 および配列番号 10 からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する G P T タンパク質をコードするものであり、

上記増大された成長特性は、増大されたバイオマス、増大された草高、増大された開花、増大された発芽、増大された果実またはさやの収率、および増大された種子の収率からなる群より選択される、方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

〔連邦政府が後援する研究または開発に基づいてなされる発明に対する権利に関する明

細書]

本発明は、米国エネルギー省がカルフォルニア大学の理事に対して与えた規約番号 W - 7 4 0 5 - E N G - 3 6、および米国エネルギー省がロスアラモス国家安全保障有限責任会社に対して与えた規約番号 D E - A C 5 2 - 0 6 N A 2 5 3 9 6 に基づく支援によってなされた。政府は本発明の所定の権利を有する。

【 0 0 0 2 】

〔関連文献〕

本明細書は、2008年8月29日に提出された米国仮特許番号第61/190,581号に対して優先権を主張するものである。

【 0 0 0 3 】

〔背景技術〕

世界的に人口が増加し、使用可能な農地が失われるか、または使用不能になり続けるため、より効率的で、かつ、地球に優しい農業システムに対する必要性は、人類にとって興味のある最優先事項である。収量、タンパク質含有量、および植物の成長速度を向上させることは、目下の課題により効果的に対処し得る農業システムの開発において主な目的になっている。

【 0 0 0 4 】

近年では、十分に開発された多くの農作物の生産量は横這い状態になる傾向にあるため、改良された農作物の生産技術の重要性が高まるばかりである。多くの農作業は、コストおよび収益が農作物の迅速な回転率または市場までの時間に依存することから、時間に注

10

20

【 0 0 0 5 】

遺伝子工学は、いまだ持続的な農業技術の開発において賛否両論があるもののますます重要な役割を果たしており、今後もその役割を果たし続ける。近年、数多くの遺伝的に改変された植物および関連技術が開発されており、今日では当該植物および関連技術の多くが広く用いられている (Factsheet: Genetically Modified Crops in the United States, Pew Initiative on Food and Biotechnology, August 2004, <http://pewagbiotech.org/resources/factsheets>)。現在、採用されるトランスジェニック植物の種類は非常に多く、また増加しており、2006年には約2億5000万エーカーでトランスジェニック植物を栽培している。

30

【 0 0 0 6 】

トランスジェニック植物技術の承認は徐々に増加しているかもしれないが(特に、米国、カナダおよびオーストラリアにおいて)、世界中の多くの地域(特に、ヨーロッパ)では農業における遺伝的に改変された植物の導入は未だに遅れている。そのため、信頼性があり、持続的な農業の方針を追い求めることと一致して、毒素または他の潜在的に問題のある物質を植物および/または環境に取り込むことのない遺伝的に設計された植物の開発への強い関心がある。また、目的(除草剤耐性、ペストおよび疾病抵抗性、ならびに全体的な収穫率を改良することなど)達成のコストを最小限にすることへの強い関心がある。したがって、これらの目的を満足させることが可能なトランスジェニック植物に関する必

40

【 0 0 0 7 】

植物の早い成長という目標は、様々な植物調節システムに関する数多くの研究によって追求されている。この調節システムの多くはいまだ完全には理解されていない。特に、炭素および窒素の代謝を調整する植物調節機構は、完全に明らかになっていない。これらの調節機構は植物の成長および発達に欠かせない影響力があると推定される。

【 0 0 0 8 】

光合成生物における炭素および窒素の代謝は、植物資源およびエネルギーの効果的な利用を保証する調整方法において調節されなければならない。炭素および窒素の代謝に関する従来の理解は、所定のステップおよびより大きなシステムのサブシステムである代謝経

50

路の詳細を含む。光合成生物において、炭素代謝は CO_2 固定によって始まり、2つの主な処理(C-3代謝およびC-4代謝と呼ばれる)によって進行する。C-3代謝を伴う植物において、酵素リブローズ二リン酸カルボキシラーゼ(ribulose biphosphate carb oxylase: RuBisCo)は、 CO_2 とリブローズ二リン酸との結合を触媒し、3-ホスホグリセリン酸塩を産生する。当該3-ホスホグリセリン酸塩は、植物が炭素含有化合物を合成するために用いる3炭素化合物(C-3)である。C-4代謝を伴う植物において、 CO_2 は、酵素ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼによって触媒される反応において、ホスホエノールピルビン酸塩と結合されて4炭素を含有する酸を形成する。この酸は、脱炭酸されて CO_2 を放出する場である維管束鞘細胞に輸送されて、その後、C-3植物に用いられた同じ反応中でリブローズ二リン酸と結合される。

10

【0009】

数多くの研究では、様々な代謝産物が窒素代謝の植物調整に重要であることがわかっている。これらの化合物としては、有機酸であるリンゴ酸、ならびにアミノ酸であるグルタミン酸およびグルタミンが挙げられる。窒素は、酵素であるグルタミンシンターゼ(glutamine synthetase: GS)の働きによって光合成生物に吸収される。グルタミンシンターゼは、アンモニアとグルタミン酸との結合を触媒し、グルタミンを作る。GSは、植物における窒素吸収に重要な役割を果たしており、グルタミン酸に対するアンモニアの付加を触媒することによってATP依存性反応の中でグルタミンを作り出す(Mifflin and Habash, 2002, Journal of Experimental Botany, Vol. 53, No. 370, pp. 979-987)。また、GSは、光吸収ならびにタンパク質および窒素輸送化合物の機能停止の結果として放出されたアンモニアを再吸収する。GS酵素は2つの一般分類に分けられ得る。その1つは細胞質の形態(GS1)を表し、もう1つは色素体(すなわち、葉緑体)の形態(GS2)を表す。

20

【0010】

これまでの研究では、GS1の増大した発現量がGS活性および植物成長のレベルを増加させることを証明しているが、報告は一貫性が欠けている。例えば、Fuentesらには、タバコ中のCaMV 35プロモーターによるアルファルファGS1(細胞質の形態)の過剰発現は、葉組織内におけるGS発現およびGS活性のレベルを増加させたり、窒素欠乏状態で成長を増大させたりするが、最適な窒素肥沃状態における成長に影響を及ぼさないことが報告されている(Fuentes et al., 2001, J. Exp. Botany 52: 1071-81)。Templeらには、非常に高いレベルのGS転写産物を含有する全長アルファルファGS1をコードする配列を過剰発現するトランスジェニックタバコ植物、および活性な酵素に組み込まれるGSポリペプチドについて報告されているが、成長における表現型の作用について報告されていない(Temple et al., 1993, Molecular and General Genetics 236: 315-325)。Corruziらには、CaMV 35プロモーターの制御下でエンドウマメの細胞質ゾルGS1導入遺伝子を過剰に発現するトランスジェニックタバコが、増加されたGS活性、増加された細胞質ゾルGSタンパク質、および改善された成長特性を示すことが報告されている(米国特許出願第6,107,547号明細書)。さらに最近、Unkeferらには、葉状組織内においてアルファルファGS1を過剰発現するトランスジェニックタバコ植物(葉から根において増大されたGS活性に関してスクリーニングした後、増大したGS1導入遺伝子のコピー数が得られるように、自家受粉によって遺伝的に分離した植物)が、それらの葉状部位において増大された量の2-ヒドロキシ-5-オキソプロリンを製造することを見出したことが報告されている。当該2-ヒドロキシ-5-オキソプロリンは、野生型のタバコ植物全体に顕著に増大された成長速度を導くことが見出されている(米国特許出願第6,555,500号明細書、米国特許出願第6,593,275号明細書、米国特許出願第6,831,040号明細書を参照)。

30

40

【0011】

さらに、Unkeferらには、植物の発育を改良するための2-ヒドロキシ-5-オキソプロリン(また、2-オキソグルタラメート(2-oxoglutaramate)として知られる)の使用について記載されている(米国特許第6,555,500号明細書、米国特許第6,59

50

3, 275号明細書、米国特許第6, 831, 040号明細書)。特に、Unkeferらには、葉状組織(根幹組織に関連する)における増加された濃度の2-ヒドロキシ-5-オキソプロリンが、植物発育特性を増強させることになる事象のカスケードの引き金になることが開示されている。Unkeferらには、2-ヒドロキシ-5-オキソプロリンの葉状濃度が植物発育特性を増強させる引き金となるために増加され得る(具体的には、植物の葉状部分に直接2-ヒドロキシ-5-オキソプロリンの溶液を投与し、葉組織に特異的にグルタミンシンターゼを過剰発現させることによって)方法が記載されている。

【0012】

動物の2-ヒドロキシ-5-オキソプロリンの合成に関連があることが知られる数多くのトランスアミナーゼおよびヒドロリアーゼ酵素は、動物の肝組織および膵組織において同定されている(Cooper and Meister, 1977, CRC Critical Reviews in Biochemistry, pages 281-303; Meister, 1952, J. Biochem. 197: 304)。植物では2-ヒドロキシ-5-オキソプロリンの生化学的合成が知られているが、十分に特性が示されていない。さらに、植物における2-ヒドロキシ-5-オキソプロリンの機能、およびその液溜まりの大きさ(組織濃度)の重要性は知られていない。結局、当該技術では、どのような(複数の)トランスアミナーゼまたは(複数の)加水分解酵素が存在し得るか、および/またはどのような(複数の)トランスアミナーゼまたは(複数の)加水分解酵素が植物中で2-ヒドロキシ-5-オキソプロリンの合成を触媒するとき機能し得ることに關してははっきりと明確な指針を提供しておらず、当該植物トランスアミナーゼが報告されたり、単離または特徴づけられたりしていない。

【0013】

〔発明の概要〕

本発明は、増強された成長速度、種子および果実の収量、ならびに総バイオマス収量を示すトランスジェニック植物、また、成長が増強されたトランスジェニック植物を産生する方法に関する。一実施形態においては、グルタミンフェニルピルビン酸トランスアミナーゼ(glutamine phenylpyruvate transaminase: GPT)を過剰に発現するために設計されたトランスジェニック植物が提供される。

【0014】

出願人は、酵素であるグルタミンフェニルピルビン酸トランスアミナーゼ(GPT)を植物における2-ヒドロキシ-5-オキソプロリン(2-オキソグルタラメート)シンターゼの触媒として同定する。2-オキソグルタラメートは、光合成用途、炭素固定および窒素代謝に関連のある多数の遺伝子の機能を調節する強力なシグナル代謝産物である。

【0015】

シグナル代謝産物2-オキソグルタラメートの濃度を特異的に増加させることによって(すなわち、葉状組織において)、本発明の導入遺伝子植物は短期間でより高い総収量を生産することが可能であるため、幅広い農作物にわたって増強された生産性を有する農業を提供し得る。重要なことに、今日までに説明されている多くのトランスジェニック植物とは異なり、本発明は天然の植物酵素をコードする天然の植物遺伝子を利用する。本発明のトランスジェニック植物の増強された成長特性は、植物に追加のGPT能力を取り込むことによって本質的に達成される。このように、本発明のトランスジェニック植物は、有毒な物質、成長ホルモン、ウイルス性または細菌性の遺伝産物のいずれも発現せず、またそれゆえ、世界の一部の地域においてこれまで遅れていたトランスジェニック植物の採用についての多くの懸念がなくなる。

【0016】

一実施形態において、本発明はGPT導入遺伝子を含むトランスジェニック植物を提供しており、ここで、当該GPT導入遺伝子は植物プロモーターに対して操作可能に結合される。特定の実施形態において、GPT導入遺伝子は、(a)配列番号2、配列番号4、配列番号10、配列番号14、配列番号16、配列番号19、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30および配列番号31のアミノ酸配列、ならびに、(b)配列番号2、配列番号4、配列番号10、配列番号14、

10

20

30

40

50

配列番号 16、配列番号 19、配列番号 25、配列番号 26、配列番号 27、配列番号 28、配列番号 29、配列番号 30 および配列番号 31 のいずれか 1 つと少なくとも 75 % 同一であり、かつ、GPT 活性を有するアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を有しているポリペプチドをコードする。

【0017】

いくつかの実施形態において、GPT 導入遺伝子は植物のゲノムに取り込まれている。本発明のトランスジェニック植物は単子葉植物または双子葉植物であり得る。

【0018】

また、本発明は、本発明のトランスジェニック植物の任意の世代の種子を提供しており、ここで、当該子孫は GPT 導入遺伝子を含む。同様に、本発明は、本発明のトランスジェニック植物の任意の世代の種子を提供しており、ここで、上記種子は GPT 導入遺伝子を含む。本発明のトランスジェニック植物は、類似の野生型植物または非形質転換植物と比較した場合に、1 つ以上の増強された成長特性を示し得る。当該成長特性としては、増強された成長速度に制限されず、増大したバイオマス収量、増大した種子収量、増大した花または花芽の収量、増大した果実またはさやの収量、大型の葉、ならびに増大された GPT 活性のレベルおよび / または増大された 2 - オキソグルタラメートのレベルが挙げられる。いくつかの実施形態において、本発明のトランスジェニック植物は、向上された窒素利用効率を示す。

【0019】

また、本発明のトランスジェニック植物およびその種子を生産する方法を提供しており、類似の野生型植物または非形質転換植物と比較して増強された成長特性、向上された窒素利用効率、および塩または塩分を含む環境において発芽または成長に対して増大された耐性を有する植物の生産に関する方法を含む。

【0020】

〔図面の簡単な説明〕

図 1 . 窒素吸収および 2 - オキソグルタラレート化学合成 : 概略的な代謝経路。

【0021】

図 2 . 野生型のタバコ植物に対して、GPT を過剰発現しているトランスジェニックタバコ植物の比較を示す写真である。左から右に向かって、野生型植物、アルファルファ GS1 導入遺伝子、シロイヌナズナ (Arabidopsis) GPT 導入遺伝子。後述する実施例 3 参照。

【0022】

図 3 . 野生型のトマト植物に対して GPT を過剰に発現するトランスジェニックミクロームトマト植物の比較を示す写真である。(A) 野生型植物、(B) シロイヌナズナ GPT 導入遺伝子。後述する実施例 4 を参照。

【0023】

図 4 . 野生型のタバコ植物 (上の葉) と GPT トランスジェニックのタバコ植物 (下の葉) との葉の大きさの比較を示す写真である。

【0024】

〔発明の詳細な説明〕

(定義)

特に規定されない限り、本明細書において用いられるすべての技術用語、注釈、および他の科学専門用語は、本発明に関連する分野の当業者に通常理解される意味を有することが意図される。ある場合には、一般的に理解される意味を有する用語が本明細書において定義づけされており、関係を明らかにしたり、および / または整えたりする。また、本明細書においてそのような定義に含まれるものは、当該分野において一般的に理解されるものに対して実質的に差異を表すために必ずしも説明されるべきではない。本明細書において説明されるか、または参照される技術および方法は、従来理論を用いて当業者に一般的に十分理解され、通常用いられる。当該技術および方法としては、例えば、Sambrookらにおいて広く用いられる分子クローニングの手法などがあり、分子クローニング : A Labo

10

20

30

40

50

ratory Manual 3rd. edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.、分子生物学における従来のプロトコル (Ausbel et al., eds., John Wiley & Sons, Inc. 2001)、トランスジェニック植物：方法およびプロトコル (Leandro Pena, ed., Humana Press, 1st edition, 2004)、およびアグロバクテリウムプロトコル (Wan, ed., Humana Press, 2nd edition, 2006) が挙げられる。適切な場合、市販のキットおよび試薬の使用を含む方法は、他に記載されていない限り、工業的に規定されるプロトコルおよび/またはパラメータによって一般的に実施される。

【0025】

用語「核酸」は、一本鎖か、または二本鎖いずれかの形態におけるデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチド、およびそれらのポリマー（「ポリヌクレオチド」）を指す。特に制限されない限り、用語「ポリヌクレオチド」は天然ヌクレオチドの公知の類似物を含んでいる核酸を包含する。当該類似物は、参照核酸と同様の結合特性を有しており、天然に存在するヌクレオチドと同様の方法で代謝される。また、他に指示されない限り、特定の核酸配列は保存的に改変されたそれらのバリエーション（例えば、変質コドン置換体）および相補的な配列、ならびに明示的に示された配列を暗に含む。具体的には、変質コドン置換体は、1つ以上の選択された（またはすべての）コドンの第3位に生成している配列が、混合塩基および/またはデオキシイノシン残基と置換されることによって取得され得る (Batzer et al., 1991, Nucleic Acid Res. 19: 5081; Ohtsuka et al., 1985 J. Biol. Chem. 260: 2605-2608; and Cassol et al., 1992; Rossolini et al., 1994, Mol. Cell. Probes 8: 91-98)。用語核酸は、遺伝子、cDNAおよび遺伝子にコードされるmRNAと同義的に用いられる。

【0026】

用語「プロモーター」は、操作可能に結合された核酸の転写を方向づける核酸制御配列または核酸配列を指す。本明細書において用いられるとき、「植物プロモーター」とは植物の中で機能するプロモーターである。プロモーターは、転写の開始領域（ポリメラーゼII型プロモーターの場合、TATA因子など）付近の核酸配列を必然的に含む。また、プロモーターは、任意により、末端部のエンハンサー因子またはレセプター因子を含む。当該エンハンサー因子またはレセプター因子は、転写の開始領域からほぼ数千塩基対に配置され得る。「恒常的」プロモーターは、ほとんどの環境条件下および発生条件下において活性なプロモーターである。「誘導」プロモーターは、環境または発生調節下において活性なプロモーターである。用語「操作可能に結合された」とは、核酸発現制御配列（例えば、プロモーターまたは転写因子結合部位のアレイ）と、第2の核酸配列との機能的な結合を指す。ここで、発現制御配列は、第2の配列に対応する核酸の転写を方向づける。

【0027】

用語「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」は、本明細書において同義的に用いられており、アミノ酸残基のポリマーを指す。当該用語は、1つ以上のアミノ酸残基が対応する天然に存在するアミノ酸、ならびに天然に存在するアミノ酸ポリマーおよび非天然に存在するアミノ酸ポリマーの人為的な化学擬態であるアミノ酸ポリマーに適用される。

【0028】

用語「アミノ酸」は、天然に存在するアミノ酸および合成的なアミノ酸、ならびに天然に存在するアミノ酸とある程度同様に機能するアミノ酸類似物およびアミノ酸模倣物を指す。天然に存在するアミノ酸は、遺伝コードによってコードされたアミノ酸、および後修飾されるアミノ酸である。そのようなアミノ酸としては、例えば、ヒドロキシプロリン、γ-カルボキシグルタミン酸、およびO-ホスホセリンが挙げられる。アミノ酸類似物とは、天然に存在するアミノ酸と同じ基本化学構造（すなわち、水素、カルボキシル基、アミノ基、およびR基と結合するα炭素）を有する化合物を指す。当該アミノ酸類似物としては、例えば、ホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウムが挙げられる。当該類似物は、改変されたR基（例えば、ノルロイシン）または改変されたペプチド骨格を有するが、天然に存在するアミノ酸のような同じ基本化学

構造を維持する。アミノ酸模倣物は、アミノ酸の一般化学構造とは異なる構造を有するが、天然に存在するアミノ酸とある程度同じように機能する化学物質を指す。

【 0 0 2 9 】

本明細書において、アミノ酸は、一般的に知られる 3 つの文字記号か、または国際純正応用化学連合 - 国際生化学連合 (I U P A C - I U B) 生化学命名委員によって推奨されている 1 つの記号によって表され得る。同様に、ヌクレオチドは一般的に認められている 1 つの文字コードによって表され得る。

【 0 0 3 0 】

用語「植物」は、植物全体、植物組織（例えば、葉、幹、花、根、胚およびそれらの一部など）、苗、種子および植物細胞、ならびにそれらの子孫を含む。本発明の方法に用いられ得る植物の分類は、通常、形質転換技術に影響を受け易い高等植物の分類と同様である。当該高等植物としては、被子植物（単子葉植物および双子葉植物）および裸子植物が挙げられる。これらは、多様な倍数性段階（多数体、二倍体、半数体および半接合が挙げられる）の植物を含む。

【 0 0 3 1 】

用語「GPT ポリヌクレオチド」および「GPT 核酸」は本明細書において同義的に用いられており、2 - オキソグルタラメートの合成を触媒することに関連するポリヌクレオチドをコードする遺伝子の全長か、もしくは一部の長さのポリヌクレオチド配列を指す。当該「GPT ポリヌクレオチド」および「GPT 核酸」としては、翻訳（コーディング）配列および非翻訳配列、ならびにそれらの相補体を共に包含するポリヌクレオチドが挙げられる。用語「GPT コード配列」は、転写されて GPT タンパク質をコードする遺伝子の一部を指す。用語「ターゲッティング配列」は、タンパク質を細胞の細胞内コンパートメント（例えば、植物細胞内の葉緑体）に方向づけるタンパク質のアミノ末端部を指す。さらに、GPT ポリヌクレオチドは、規定条件下で GPT ポリヌクレオチドと、または GPT ポリヌクレオチド由来の PCR 産物とハイブリダイズさせる能力によって規定される。

【 0 0 3 2 】

「GPT 導入遺伝子」は、核酸分子をもち、トランスジェニック植物または植物胚、組織もしくは種子に対して外因性であるか、または GPT ポリヌクレオチドをもつトランスジェニック植物の原種植物またはその植物胚、組織もしくは種子に対して外因性である GPT ポリヌクレオチドを含む核酸分子である。

【 0 0 3 3 】

本発明の GPT ポリヌクレオチドの例は本明細書に示されており、当該 GPT ポリヌクレオチドとしては、シロイヌナズナ、イネ、オオムギ、バンブー、ダイズ、ブドウ、およびゼブラフィッシュの GPT が挙げられる。

【 0 0 3 4 】

部分長 GPT ポリヌクレオチドとしては、N 末端または C 末端がトランケートした GPT をコードするポリヌクレオチド配列、成熟 GPT（ターゲッティング配列を含まない）をコードするポリヌクレオチド配列、および GPT のドメインをコードする配列が挙げられる。N 末端がトランケートした GPT をコードする GPT ポリヌクレオチドの例としては、シロイヌナズナの - 30 コンストラクト、- 45 コンストラクト、および - 56 コンストラクトが挙げられる。これらは、配列番号 2 の全長 GPT 構造のアミノ酸からそれぞれ最初の 30、45、および 56 のアミノ酸が除去されているコード配列である。

【 0 0 3 5 】

形質転換された細胞およびトランスジェニック植物の生産において、本発明の GPT ポリヌクレオチドを用いるとき、挿入されたポリヌクレオチド配列が同一である必要はないが、以下にさらに述べるように、由来する本発明の GPT ポリヌクレオチドの遺伝子の配列と「実質的に同一」でありさえすればよいことを当業者は理解する。用語「GPT ポリヌクレオチド」は、厳密に言うと、当該実質的に同一のバリエーションを包含する。同様に、当業者は、コドン縮重のために数多くのポリヌクレオチド配列が同じポリペプチドをコー

10

20

30

40

50

どし、すべての当該ポリヌクレオチド配列が用語 G P T ポリヌクレオチドの中に含まれると意図されることを理解する。さらに、具体的にいうと、当該用語は、本明細書において開示される G P T ポリヌクレオチド配列と実質的に同一であり、野生型 G P T ポリペプチドの突然変異によるか、または G P T ポリペプチドの機能（例えば、G P T ポリペプチドにおけるアミノ酸の保存的な置換に起因する）を保持するポリペプチドをコードする配列（後述のように決定される）を含む。よって、用語「G P T ポリヌクレオチド」もまた、当該実質的に同一のバリエーションを含む。

【 0 0 3 6 】

用語「保存的に改変されたバリエーション」とは、アミノ酸配列および核酸配列の両者に適用できる。特定の核酸配列に関して、保存的に改変されたバリエーションは同一の、または実質的に同一のアミノ酸配列をコードする核酸を指すか、または実質的に同一の配列に対してアミノ酸配列をコードしない核酸を指す。遺伝コードの縮退が原因で、数多くの機能的に同一の核酸が任意の所定のタンパク質をコードする。例えば、コドン G C A、G C C、G C G および G C U は、すべてアミノ酸アラニンをコードする。

【 0 0 3 7 】

このように、コドンによってアラニンが指定されるすべての位置において、当該コドンは、コードされるタンパク質が変更されることなく対応する任意のコドンへ変換され得る。当該核酸バリエーションは「サイレントバリエーション」であり、保存的に修飾されるバリエーションの一種である。また、本明細書においてポリペプチドをコードするすべての核酸配列は、当該核酸の起こり得るサイレントバリエーションすべてを表現する。当業者は、核酸中の各コドン（通常、メチオニンに関するコドンのみである A U G、および通常トリプトファンに関するコドンのみである T G G を除く）は、機能的に同一の分子を産生するように修飾され得ることを理解する。したがって、ポリペプチドをコードする核酸配列のサイレントのバリエーションはそれぞれ記載される各配列に関与している。

【 0 0 3 8 】

アミノ酸配列に関して、当業者は、核酸、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質の配列に対する個々の置換、欠失または付加は、「保存的に修飾されたバリエーション」であることを理解する。当該置換、欠失または付加では、コードされた配列のうち 1 つのアミノ酸または数パーセントのアミノ酸を変更、付加または削除しており、「保存的に修飾されたバリエーション」において、変更は化学的に類似しているアミノ酸とのアミノ酸の置換をもたらす。機能的に類似しているアミノ酸を示す同類置換表は、本技術分野において公知である。当該保存的に修飾されたバリエーションは本発明の多形性バリエーション、種間ホモログおよび対立遺伝子に加えられ、取り除かれない。

【 0 0 3 9 】

以下の 8 つの群は互いに同類置換であるアミノ酸をそれぞれ含む： 1) アラニン (A)、グリシン (G)； 2) アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E)； 3) アスパラギン (N)、グルタミン (Q)； 4) アルギニン (R)、リシン (K)； 5) イソロイシン (I)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、バリン (V)； 6) フェニルアラニン (F)、チロシン (Y)、トリプトファン (W)； 7) セリン (S)、スレオニン (T)；および 8) システイン (C)、メチオニン (M)（例えば、Creighton, Proteins (1984) を参照）。

【 0 0 4 0 】

高分子構造（例えば、ポリペプチド構造）は、組織体の様々な段階の観点から説明され得る。この組織体の一般的な議論に関しては、例えば、Alberts et al., Molecular Biology of the Cell (3rd ed., 1994) および Cantor and Schimmel, Biophysical Chemistry Part I: The Conformation of Biological Macromolecules (1980) を参照すればよい。「一次構造」は、特定のペプチドのアミノ酸配列を指す。「二次構造」は局所的に配置されたポリペプチド内の 3 次元構造を指す。これらの構造は、通常ドメインとして知られる。ドメインはポリペプチドの小型の単位を形成するポリペプチドの一部であり、典型的に、25 からおよそ 500 のアミノ酸長である。標準的なドメインは、さらに小さなユニッ

10

20

30

40

50

トの組織体からなる（例えば、 β - シートおよび α - ヘリックスの一带）。「三次構造」は、ポリペプチドモノマーの完全な三次元構造を指す。「四次構造」は、独立した三次単位の非共有の関係によって形成される三次元構造を指す。

【 0 0 4 1 】

用語「単離された」は、野生型か、もしくは天然の状態において見られるような物質と通常同時に生じる成分から、実質的または本質的に遊離した物質を指す。しかしながら、当該用語「単離された」は、電気泳動ゲルか、または別の分離培地に存在する成分を指すことを意図するものではない。単離された成分は、この分離培地から離れて、別の用途に使用する状態にあるか、またはすでに新たな用途 / 環境において使用されている状態にある。「単離された」抗体は、特定されて自然環境の成分から分離されるか、および / または回収された抗体である。

10

【 0 0 4 2 】

自然環境の汚染成分は、診断上の抗体の利用、または薬学的な抗体の利用に干渉し得る物質であり、酵素、ホルモン、および他のタンパク性の溶質もしくは非タンパク性の溶質を含み得る。好ましい実施形態において、抗体は、（ 1 ）ローリー法で測定したとき、95 %（抗体重量）以上であり、最も好ましくは99 %（重量）以上に精製されるか、（ 2 ）回転キャップ配列決定装置によって少なくとも15残基のN末端のアミノ酸配列または内部のアミノ酸配列を得るのに十分な量に精製されるか、または（ 3 ）クマシーブルー、または好ましくは銀染色により還元条件または非還元条件においてSDS - PAGEによって均質に精製される。自然環境の抗体の少なくとも1つの成分が存在しないため、単離された抗体としては、組換え細胞内のインシチュにある抗体を含む。しかし、通常、単離された抗体は少なくとも1回の精製工程によって調製される。

20

【 0 0 4 3 】

核酸の一部に対して用いられるとき、用語「異種」とは、当該核酸が2つ以上のサブ配列（天然において、互いに同じ関係に見られない）を含むことを示す。例えば、新たな機能的な核酸を作るために配置された関連のない遺伝子からの2つ以上の配列（例えば、1つの原料からのタンパク質をコードする核酸、および別の原料からのペプチド配列をコードする核酸）を有している核酸が、典型的に組換えにより作られる。同様に、異種タンパク質とは、当該タンパク質が、天然において互いに同じ関係に見られない2つ以上のサブ配列を含むことを示す（例えば、融合タンパク質）。

30

【 0 0 4 4 】

2つ以上の核酸配列またはポリペプチド配列に関して、用語「同一の」または割合の「同一性」とは、比較領域全体を比較して整列させたときか、または配列比較アルゴリズムもしくは手動の配列検査および目視によって測定されるような領域を指定したとき、最大限の一致を考慮して同一か、または同じ（すなわち、特定の領域全体で約70 %の同一性、好ましくは約75 %、約80 %、約85 %、約90 %もしくは約95 %の同一性である）アミノ酸残基またはヌクレオチドを特定の割合で含む2つ以上の配列またはサブ配列を指す。また、この定義は、試験配列が基準配列と実質的に同一であるとき、実質的に配列相補性またはサブ配列相補性を有している試験配列の相補体を指す。また、この定義は、試験配列が基準配列と実質的に同一であるとき、実質的に配列相補性またはサブ配列相補性を有している試験配列の相補体を指す。

40

【 0 0 4 5 】

配列同一性の割合がポリペプチドに関して用いられるとき、同一でない残基部分はしばしばアミノ酸の同類置換によって異なるということが理解される。ここで、アミノ酸残基は同様の化学的特性（例えば、電荷または疎水性）を有する別のアミノ酸残基と置き換えられるため、ポリペプチドの機能特性は変化しない。配列が同類置換ではない場合、保存的な天然の置換に関して修正するために、配列同一性の割合が上流に向かって修正される。

【 0 0 4 6 】

配列比較に関して、典型的に1つの配列は基準配列として働き、試験配列は当該基準配

50

列と比較される。配列比較アルゴリズムを用いるとき、試験配列および基準配列はコンピュータに入力され、サブ配列座標が指定され、必要ならば、配列アルゴリズムプログラムのパラメータが指定される。初期設定プログラムのパラメータが用いられるか、または代替的なパラメータが指定される。そして、配列比較アルゴリズムは、当該プログラムのパラメータに基づき、基準配列に対する試験配列の配列同一性の割合を算出する。

【 0 0 4 7 】

本明細書において用いられるとき、「比較領域 (comparison window)」は、2つの配列を最適に配列させた後、同数の連続した位置の基準配列と比較され得る配列のうち、20から600、通常は約50から約200、より通常は約100から約150からなる群から選択される複数の連続した位置の任意の1つのセグメントに関する。比較のための配列の配置方法は、当分野において周知である。比較のための配列の最適な配置は、例えば、Smith & Waterman, 1981, Adv. Appl. Math. 2:482の局所相同アルゴリズムによって、Needleman & Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443の相同配置アルゴリズムによって、Pearson & Lipman, 1988, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444の類似方法に関する研究によって、これらアルゴリズム (the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WIのGAP、BESTFIT、FASTA、およびTFASTA) のコンピュータ制御の実施によって、または手動の位置合わせによって、および目視 (例えば、Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds. 1995 supplement)を参照) によって、実行され得る。

【 0 0 4 8 】

配列同一性および配列類似性の割合の測定に適したアルゴリズムの好ましい例としては、BLASTおよびBLAST2.0アルゴリズム (それぞれ、Altschul et al., 1977, Nuc. Acids Res. 25:3389-3402およびAltschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410に記載されている) が挙げられる。BLASTおよびBLAST2.0は、典型的に本明細書に記載される初期パラメータとともに使用され、本発明の核酸およびタンパク質の配列同一性の割合を決定する。BLAST分析を実行するためのソフトウェアは、全米バイオテクノロジー情報センターによって公に利用可能である。このアルゴリズムは、まず、クエリシーケンスにおいて長さWの短いワードを特定することによって、ハイスコアの配列ペア (high scoring sequence pairs: HSPs) を特定することを含む。ここで、当該クエリシーケンスは、データベースシーケンスにおいて同じ長さのワードとともに配列されたとき、ある正の数の基準スコアTと一致するか、または満足する。Tは、基準点に近いワードとみなされる (上述のAltschul ら)。これら冒頭付近のワードのヒットは、当該ワードを含んでいる長いHSPsを見つけるための検索を開始するための根源として働く。当該ワードのヒットは、累積の配列スコアが増加し得る限り、各配列に沿って両方向に拡張される。ヌクレオチド配列に関して、累積のスコアはパラメータM (一致する残基の対に関するリワードスコア; 常に > 0)、およびパラメータN (一致しない残基に関するペナルティスコア; 常に < 0) によって算出される。アミノ酸配列に関して、採点マトリクスが用いられて、累積のスコアを算出する。それぞれの方向におけるワードのヒットの拡張は、累積の配列スコアが数量Xによって達成される最大値から低減したときか、累積スコアが1つ以上の負に採点された残基の配列の累積のためにゼロもしくはそれ以下になったときか、またはいずれかの配列の末端が標的に到達したときに停止される。BLASTアルゴリズムのパラメータW, TおよびXは、配列の検出感度および配列の速度を決定する。BLASTNプログラム (ヌクレオチド配列のための) では、ワード長 (W) 11を初期設定値、10を期待値 (E)、 $M = 5$ 、 $N = -4$ 、および両ストランドの比較として用いる。アミノ酸配列に関して、BLASTPプログラムでは、ワード長3を初期設定値、10を期待値 (E)、および50をBLOSUM62スコアマトリクス (Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989)) 配置 (B)、10を期待値 (E)、 $M = 5$ 、 $N = -4$ 、および両ストランドの比較として用いる。

【 0 0 4 9 】

また、BLASTアルゴリズムは、2つの配列間の類似性に関して統計に基づく分析を

実行する（例えば、Karlin & Altschul, 1993, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90:5873-5877を参照）。BLASTアルゴリズムによって提供される類似性の測定の1つには、最小合計確率（ $P(N)$ ）がある。この最小合計確率は、2つのヌクレオチド配列間か、または2つのアミノ酸配列間の一致が偶然生じ得ることによる確率の表れを示す。例えば、核酸は、参照核酸との試験核酸の比較において最小合計確率が約0.2以下、より好ましくは約0.01以下、最も好ましくは約0.001以下である場合に、基準配列と類似しているとみなされる。

【0050】

「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」という用語は、典型的に、核酸の複合混合物においてその標的サブ配列へハイブリダイズするが、別の配列にハイブリダイズしないプローブにおける条件を指す。ストリンジェントな条件は配列依存性であり、様々な環境において異なる。長い配列は特に高い温度にてハイブリダイズする。核酸のハイブリダイゼーションへの広範な指針は、Tijssen（生化学および分子生物学における技術——核酸によるハイブリダイゼーション、「ハイブリダイゼーションの原理および核酸アッセイの概論」（1993））において見出される。一般的に、高いストリンジェント条件では、特定の配列に関して、規定されたイオン強度のpHにおいて融解点（ T_m ）以下の約5～10になるよう選択される。 T_m は、50%のプローブが平衡状態でのターゲットシーケンスに対するターゲットハイブリダイズに相補的な温度である（ターゲットシーケンスが過度に存在し、 T_m において50%のプローブが平衡状態にあるとき）。ストリンジェントな条件は、塩濃度が約1.0Mナトリウムイオン以下、典型的には、pH7.0から8.3において約0.01から1.0Mナトリウムイオン濃度（または他の塩）であり、短いプローブ（例えば、10から50ヌクレオチド）に関しては温度が少なくとも約30であり、長いプローブ（例えば、50ヌクレオチド以上）に関しては少なくとも約60であることが条件である。また、ストリンジェントな条件は、不安定化試薬（ホルムアミドなど）の付加によって達成され得る。選択的な、または特定のハイブリダイゼーションに関して、ポジティブシグナルは少なくとも2倍のバックグラウンドであり、好ましくは10倍のバックグラウンドのハイブリダイゼーションである。

【0051】

ストリンジェントな条件において互いにハイブリダイズしない核酸は、それらがコードするポリペプチドが実質的に同一であるのであれば、実質的に同一のままである。これは、例えば、核酸のコピーが遺伝コードによって許容されるコドンの最大量の縮退によって作られるときに、生じる。そのような場合において、核酸は適度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件において典型的にハイブリダイズする。

【0052】

GPTポリペプチドを含んでいるゲノムDNAまたはcDNAは、本明細書に開示されるGPTポリヌクレオチド配列によって、ストリンジェントな条件下での標準的なサザンプロットにおいて同定され得る。この目的に関して、当該ハイブリダイゼーションに最適なストリンジェントな条件としては、40%ホルムアミド、1M NaCl、1%SDSの緩衝液において、37でのハイブリダイゼーション、および少なくとも約50、通常、約55から約60の温度で20分間0.2×SSC中での少なくとも1回の洗浄を含む。

【0053】

2つのポリヌクレオチドが実質的に同一であるというさらなる目安としては、基準配列（一对のオリゴヌクレオチドプライマーによって増幅される）がストリンジェントなハイブリダイゼーション条件においてプローブとして使用されるとき、cDNAもしくはゲノムライブラリーから試験配列を単離することが可能であるか、または、例えばノウザンもしくはサザンプロットで試験配列を同定することが可能であるかである。

【0054】

（トランスジェニック植物）

本発明は、成長特性および他の農学的な性質が十分に向上している新規なトランスジェ

10

20

30

40

50

ニック植物を提供する。十分に向上した農学的な性質は、促進された生育、増大した成熟植物の生体重および全現存量、より早期かつより豊富な量の開花、ならびに果実および種子におけるより多くの収量を含むがこれらの限定されない。本発明のトランスジェニック植物は、1つ以上の発現可能な遺伝的コンストラクトを植物に対して導入することにより生成される。この遺伝的コンストラクトは、グルタミンフェニルピルビン酸トランスアミナーゼ (glutamine phenylpyruvate transaminase: GPT) をコードする1つ以上のポリヌクレオチドの発現を促進することができる。本発明は、例えば、異種のシロイヌナズナのGPT遺伝子を保有し、かつ発現するトランスジェニックタバコ植物の生成によって実証されている(後述する実施例2)。また、同じ代謝経路、すなわちシグナル代謝産物2-ヒドロキシ-5-オキソプロリン(2-hydroxy-5-oxoproline)の生合成、において機能するGPTホモログは、全ての植物種に含まれていることが期待される。このように、本発明の実施において、GPTホモログまたはその機能的な変異体をコードする全ての植物遺伝子が、本発明のトランスジェニック植物の生成に有用であり得る。

【0055】

本発明における安定な形質転換の実施形態では、発現可能な遺伝的コンストラクトの1つ以上のコピーが宿主植物ゲノム中に組み込まれるようになる。これによって、植物内におけるGPT酵素能力を増加させる。これは、2-オキソグルタラメート(2-oxoglutarate)の合成、言い換えればシグナル代謝遺伝子発現、の増加を仲介するのに役立つ。その結果、植物の生育が増大し、かつ植物の成長特性および他の農学的な性質が向上する。2-オキソグルタラメートは、代謝産物であり、遺伝子発現、代謝および植物生育における極めて強力なエフェクターである(米国特許第6,555,500号)。そして、この代謝産物は、炭素および窒素の代謝システムの調整において極めて重要な役割を果たし得る(Lancien et al., 2000, Enzyme Redundancy and the Importance of 2-Oxoglutarate in Higher Plants Ammonium Assimilation, Plant Physiol. 123: 817-824)。図1に示す2-オキソグルタラメート経路の概略図も参照されたい。

【0056】

本発明の一局面において、出願人らは、シロイヌナズナのグルタミンフェニルピルビン酸トランスアミナーゼ(GPT)酵素をコードする核酸分子を同定した(後述する実施例1を参照)。そして、発現された組換え酵素が活性を有し、シグナル代謝産物、2-オキソグルタラメートの合成を促進させ得ることを最初に示した(後述する実施例2)。さらに、出願人らは、このシロイヌナズナのグルタミントランスアミナーゼ遺伝子を、形質転換された異種植物において過剰発現させた結果、CO₂固定の割合を向上させ、かつ生育特性を増加させることを最初に示した(後述する実施例3)。

【0057】

また、本明細書に記載するように(後述する実施例3を参照)、トランスジェニックタバコ植物において、シロイヌナズナのGPTコード配列の全長を含む導入遺伝子を過剰発現させると、CO₂固定を速め、かつ全タンパク質、グルタミンおよび2-オキソグルタラメートの量を増加させる結果となる。また、これらのトランスジェニック植物は、野生型の植物よりも速く生育する(図2)。同様に、トマト植物に関する試験では(後述する実施例4を参照)、シロイヌナズナのGPT導入遺伝子が形質転換されたトマト植物は、野生型のコントロール植物と比較して、生育速度、開花、および種子収量の顕著な向上を示した(図3および後述する実施例4)。

【0058】

上述したトランスジェニックタバコ植物に加えて、トマト、コショウ、マメ類、ササゲ、アルファルファ、カンタループ、カボチャ、シロイヌナズナおよびカミレナ(Camilena)の2種において、GPTを含み、かつ向上された生育特性を示す他の種々のトランスジェニック植物種が生成された(共同所有され、同時係属された出願であり、その内容の全てが本願に引用して援用される、2009年8月31日に提出された米国特許出願明細書第12/551,271号を参照)。上述のトランスジェニック植物は、種々の形質転換方法を用いて生成された。種々の形質転換方法は、アグロバクテリウム媒介されたカルス

10

20

30

40

50

、花の浸漬、種子の播種、さやの播種、および花の直接の接種、これらの組合せ、ならびに種々のGPT導入遺伝子を用いた、1種類の導入遺伝子を持つ植物における有性の異種交配を介する方法を含む。

【0059】

本発明はまた、生育および他の農学的性質が向上されたトランスジェニック植物を生成する方法を提供する。一実施形態において、生育および他の農学的性質が向上されたトランスジェニック植物を生成する方法は、GPT導入遺伝子をコードする核酸分子を含む発現カセットを植物細胞に導入することにより形質転換された植物細胞を生産する工程と、コードされたGPTを発現するトランスジェニック植物を取得する工程とを含む。GPT導入遺伝子は、この導入遺伝子の発現を促進することが可能な適切なプロモーターの制御下にある。他の実施形態において、生育および他の農学的性質が向上されたトランスジェニック植物を生成する方法は、GPT導入遺伝子をコードする核酸分子を含む1個以上の核酸コンストラクトまたは発現カセットを植物細胞に導入することにより形質転換された植物細胞を生産する工程と、生物学的に活性なGPTタンパク質を産生するためにGPT導入遺伝子を発現するトランスジェニック植物を取得する工程とを含む。GPT導入遺伝子は、この導入遺伝子の発現を促進することが可能な1個以上の適切なプロモーター（および、任意に、他の制御エレメント）の制御下にある。

10

【0060】

多数のGPTポリヌクレオチドが、本発明に係るトランスジェニック植物を生成するために使用され得る。GPTタンパク質は、種々の植物種の間で高く保存されており、密接に関連している非植物のGPT（例えばゼブラフィッシュのGPT）もまた使用され得ることは、本明細書に記載の実験データから明らかである。GPTに関して、異なる種由来の多数のGPTポリヌクレオチドが活性を有しかつGPT導入遺伝子として有用であることが示されている。

20

【0061】

特定の実施形態において、GPT導入遺伝子は、シロイヌナズナ由来のGPT（例えば配列番号2、配列番号16および配列番号25に示すGPT）をコードするGPTポリヌクレオチドである。このGPT導入遺伝子は、配列番号1に示す塩基配列；配列番号1と少なくとも75%およびより好ましくは少なくとも80%の同一性を有する塩基配列であって、GPT活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列；配列番号2に示すポリペプチド、またはこれと少なくとも75%およびより好ましくは少なくとも80%の配列同一性を有するとともにGPT活性を有するポリペプチド、をコードする塩基配列；ならびにアミノ末端の30～56アミノ酸残基がトランケートされた、配列番号2に示すポリペプチド、またはこれと少なくとも75%およびより好ましくは少なくとも80%の配列同一性を有するとともにGPT活性を有するポリペプチド、をコードする塩基配列によってコードされ得る。

30

【0062】

他の特定の実施形態において、GPT導入遺伝子は、ブドウ由来のGPT（例えば配列番号4および配列番号26に示すブドウGPTs）をコードするGPTポリヌクレオチドである。このGPT導入遺伝子は、配列番号3に示す塩基配列；配列番号3と少なくとも75%およびより好ましくは少なくとも80%の同一性を有する塩基配列であって、GPT活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列；配列番号4もしくは配列番号26に示すポリペプチド、またはこれらと少なくとも75%およびより好ましくは少なくとも80%の配列同一性を有するとともにGPT活性を有するポリペプチド、をコードする塩基配列によってコードされ得る。

40

【0063】

さらに他の特定の実施形態において、GPT導入遺伝子は、イネ由来のGPT（例えば配列番号6および配列番号27に示すイネGPTs）をコードするGPTポリヌクレオチドである。このGPT導入遺伝子は、配列番号5に示す塩基配列；配列番号5と少なくとも75%およびより好ましくは少なくとも80%の同一性を有する塩基配列であって、G

50

P T活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列；配列番号6もしくは配列番号27に示すポリペプチド、またはこれらと少なくとも75%およびより好ましくは少なくとも80%の配列同一性を有するとともにG P T活性を有するポリペプチド、をコードする塩基配列によってコードされ得る。

【0064】

さらに他の特定の実施形態において、G P T導入遺伝子は、ダイズ由来のG P T（例えば配列番号8、配列番号28または配列番号28のN末端にイソロイシンがさらに付加された配列に示すダイズG P T s）をコードするG P Tポリヌクレオチドである。このG P T導入遺伝子は、配列番号7に示す塩基配列；配列番号7と少なくとも75%およびより好ましくは少なくとも80%の同一性を有する塩基配列であって、G P T活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列；配列番号8もしくは配列番号28もしくは配列番号28のN末端にイソロイシンがさらに付加された配列に示すポリペプチド、またはこれらと少なくとも75%およびより好ましくは少なくとも80%の配列同一性を有するとともにG P T活性を有するポリペプチド、をコードする塩基配列によってコードされ得る。

【0065】

さらに他の特定の実施形態において、G P T導入遺伝子は、オオムギ由来のG P T（例えば配列番号10および配列番号29に示すオオムギG P T s）をコードするG P Tポリヌクレオチドである。このG P T導入遺伝子は、配列番号9に示す塩基配列；配列番号9と少なくとも75%およびより好ましくは少なくとも80%の同一性を有する塩基配列であって、G P T活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列；配列番号10もしくは配列番号29に示すポリペプチド、またはこれらと少なくとも75%およびより好ましくは少なくとも80%の配列同一性を有するとともにG P T活性を有するポリペプチド、をコードする塩基配列によってコードされ得る。

【0066】

さらに他の特定の実施形態において、G P T導入遺伝子は、ゼブラフィッシュ由来のG P T（例えば配列番号12および配列番号30に示すゼブラフィッシュG P T s）をコードするG P Tポリヌクレオチドである。このG P T導入遺伝子は、配列番号11に示す塩基配列；配列番号11と少なくとも75%およびより好ましくは少なくとも80%の同一性を有する塩基配列であって、G P T活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列；配列番号12もしくは配列番号30に示すポリペプチド、またはこれらと少なくとも75%およびより好ましくは少なくとも80%の配列同一性を有するとともにG P T活性を有するポリペプチド、をコードする塩基配列によってコードされ得る。

【0067】

さらに他の特定の実施形態において、G P T導入遺伝子は、バンブー由来のG P T（例えば配列番号31に示すバンブーG P T）をコードするG P Tポリヌクレオチドである。このG P T導入遺伝子は、配列番号31に示すポリペプチド、またはこれと少なくとも75%およびより好ましくは少なくとも80%の配列同一性を有するとともにG P T活性を有するポリペプチド、をコードする塩基配列によってコードされ得る。

【0068】

当業者によって理解され得るように、本発明の実施におけるG P T導入遺伝子としての使用に適した他のG P Tポリヌクレオチドは、種々の方法により取得され得、組換え発現システム（すなわち、大腸菌（E. coli）（実施例20～23を参照）、植物体における一過性の発現システム（実施例19を参照）、または遺伝子導入植物における（実施例1～18を参照））において、G P Tの発現を導く能力についてG P T活性を用いて試験する方法である。

【0069】

（導入遺伝子コンストラクト／発現ベクター）

本発明に係るトランスジェニック植物を生成するために、所望の導入遺伝子に関する遺伝子コード配列は、形質転換された植物細胞内で導入遺伝子配列の発現を導くことができる核酸コンストラクト（本明細書中において、（導入遺伝子）発現ベクター／発現ベクタ

10

20

30

40

50

二、発現カセット、発現コンストラクトまたは遺伝的コンストラクトとしても交換可能に引用される)中に組み込まれなければならない。所定の導入遺伝子を保有する核酸コンストラクトは、多数の公知の方法を用いて、植物細胞または種々の細胞内に導入され得る。公知の方法は、限定されないが、エレクトロポレーション、DNAボンバードメントまたは遺伝子銃、マイクロインジェクション、ならびに種々のDNAベースのベクター(例えばアグロバクテリウム・ツメファシエンス(*Agrobacterium tumefaciens*)およびアグロバクテリウム・リゾゲネス(*Agrobacterium rhizogenes*)のベクター)の使用を介する方法を含む。形質転換植物細胞中にいったん導入されると、核酸コンストラクトは、一過的に、あるいは安定的に、組み込まれた導入遺伝子(すなわちGPT)の発現を導くであろう。安定的に発現させることが好ましく、安定的な発現は、核酸コンストラクトをクロモソームに組み込ませることができる植物の形質転換ベクターを利用することにより達成される。一度植物細胞への形質転換が成功すれば、これを栽培することによりトランスジェニック植物を再生し得る。

10

【0070】

形質転換植物における挿入遺伝子の本質的な発現または発現誘導の促進に適した、多数の発現ベクターが知られている。さらに、種々の一過性の発現ベクターおよびシステムが知られている。大体において、遺伝子の形質転換における特定の方法に使用するために、適切な発現ベクターが選択される(以下を参照)。概して、トランスジェニック植物を生成するための典型的な植物発現ベクターは、プロモーターの発現制御コントロール下にある所定の導入遺伝子、形質転換体の選択を助けるための選択マーカー、および転写終結配列を含み得る。

20

【0071】

より具体的には、本発明に係るトランスジェニック植物の生成に使用するための核酸コンストラクトの基本要素は、以下である:形質転換植物細胞において(1つもしくは複数の)導入遺伝子の機能的な発現を促進することができる適切なプロモーター、このプロモーターに実施可能に連結された(1つもしくは複数の)導入遺伝子(すなわちGPTコード配列)、好ましくは、この導入遺伝子に実施可能に連結された適切な転写終結配列(すなわちノバリン合成酵素遺伝子のターミネーター)、およびときにこの導入遺伝子の発現を制御するために有用な他の要素、ならびに所望のトランスジェニック産物を選択するために適した1つ以上の選択マーカー遺伝子(すなわち抗生物質耐性遺伝子)。

30

【0072】

アグロバクテリウム・ツメファシエンスは、トランスジェニック植物を生成するために使用する初期の形質転換システムであるため、アグロバクテリウム形質転換用に設計された多数のベクターが存在する。安定な形質転換のため、アグロバクテリウムのシステムは、大腸菌およびアグロバクテリウムの両方で操作可能なプラスミドである「バイナリー」ベクターを利用する。このベクターは、典型的に、形質転換された植物を回収するための1つ以上の選択マーカーを含有する(Hellens et al., 2000, Technical focus: A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. Trends Plant Sci 5:446-451)。アグロバクテリウム形質転換システムに使用するバイナリーベクターは、典型的に、T-DNAのボーダー領域、マルチクローニングサイト、大腸菌およびアグロバクテリウム・ツメファシエンスのための複製機能、ならびに選択マーカーおよびレポーター遺伝子を含む。

40

【0073】

いわゆる「スーパー-バイナリー」ベクターは、高い形質転換効率を提供し、一般的にTi由来の別の病原性遺伝子を含む(Komari et al., 2006, Methods Mol. Biol. 343: 15-41)。スーパーバイナリーベクターは、一般的に、低い形質転換効率を示す植物(例えば穀類)に用いられる。別の病原性遺伝子は、限定されないが、virB, virE, およびvirGを含む(Vain et al., 2004, The effect of additional virulence genes on transformation efficiency, transgene integration and expression in rice plants using the pGreen/pSoup dual binary vector system. Transgenic Res. 13: 593-603; Srivatanakul et al., 2000, Additional virulence genes influence transgene expres

50

ssion: transgene copy number, integration pattern and expression. J. Plant Physiol. 157, 685-690; Park et al., 2000, Shorter T-DNA or additional virulence genes improve Agrobacterium-mediated transformation. Theor. Appl. Genet. 101, 1015-1020; Jin et al., 1987, Genes responsible for the supervirulence phenotype of Agrobacterium tumefaciens A281. J. Bacteriol. 169: 4417-4425)。

【 0 0 7 4 】

本明細書において実証された実施形態（後述する実施例を参照）では、挿入される導入遺伝子を C a M V 3 5 S プロモーターの制御下に配置する発現ベクターが使用される。C a M V 3 5 S プロモーターを利用する多数の発現ベクターが知られており、および / または市販されている。しかしながら、当該導入遺伝子の発現を方向づけるために適した多くのプロモーターが知られており、そのようなプロモーターを後述においてさらに説明するように本発明の実施に用いてもよい。

10

【 0 0 7 5 】

（植物プロモーター）

植物内で機能する多数のプロモーターが公知である。G P T 導入遺伝子コンストラクトを構築する際、選択されるプロモーターは、恒常的な非特異的プロモーターであってもよく、例えばカリフラワーモザイクウイルス 3 5 S リボソーマルプロモーター（C a M V 3 5 S プロモーター）であってもよい。このプロモーターは、植物内における導入遺伝子の発現のために広く使用されている。他の強力な恒常的プロモーターの具体例は、限定されないが、イネのアクチン 1 プロモーター、C a M V 1 9 S プロモーター、T i プラスミドのノパリン合成酵素プロモーター、アルコールデヒドロゲナーゼプロモーターおよびスクロース合成酵素プロモーターを含む。

20

【 0 0 7 6 】

あるいは、ある実施形態において、導入遺伝子コンストラクトにより形質転換させたい植物細胞、導入遺伝子の所望の発現量、導入遺伝子を発現させたい組織または細胞内コンパートメント、目標とする発生段階などに基づいてプロモーターを選択することが望ましい。

【 0 0 7 7 】

例えば、光合成組織およびコンパートメントにおいて発現させたいときには、リブローズ 2 リン酸カルボキシラーゼ（ribulose biphosphate carboxylase：R u B i s C o）遺伝子のプロモーターが使用され得る。種子で発現させたいときには、種々の貯蔵タンパク質遺伝子のプロモーターが使用され得る。果実内で発現させるためには、果実特異的なプロモーター（例えばトマトの 2 A 1 1）が使用され得る。他の組織特異的プロモーターの具体例は、レクチンをコードするプロモーター（Vodkin et al., 1983, Cell 34:1023-31; Lindstrom et al., 1990, Developmental Genetics 11:160-167）、トウモロコシのアルコールデヒドロゲナーゼ 1（Vogel et al, 1989, J. Cell. Biochem. (Suppl. 0) 13:Part D; Dennis et al., 1984, Nucl. Acids Res., 12(9): 3983-4000）、トウモロコシの集光性複合体（Simpson, 1986, Science, 233: 34-38; Bansal et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 3654-3658）、トウモロコシの熱ショックタンパク質（Odell et al., 1985, Nature, 313: 810-812; Rochester et al., 1986, EMBO J., 5: 451-458）、エンドウマメのスモールサブユニット R u B P カルボキシラーゼ（Poulsen et al., 1986, Mol. Gen. Genet., 205(2): 193-200; Cashmore et al., 1983, Gen. Eng. Plants, Plenum Press, New York, pp 29-38）、T i プラスミドのマノノピン合成酵素および T i プラスミドのノパリン合成酵素（Langridge et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 86: 3219-3223）、ベチュニアのカルコンイソメラーゼ（Van Tunen et al., 1988, EMBO J. 7(5): 1257-1263）、マメのグリシンリッチタンパク質 1（Keller et al., 1989, EMBO J. 8(5): 1309-1314）、トランケートされた C a M V 3 5 s（Odell et al., 1985, supra）、ポテトのパタチン（Wenzler et al., 1989, Plant Mol. Biol. 12: 41-50）、根細胞（Conkling et al., 1990, Plant Physiol. 93: 1203-1211）、トウモロコシのゼイン（Reina et al., 1990, Nucl. Acids Res. 18(21): 6426; Kriz et al., 1987,

30

40

50

Mol. Gen. Genet. 207(1): 90-98; Wandelt and Feix, 1989, Nuc. Acids Res. 17(6): 2354; Langridge and Feix, 1983, Cell 34: 1015-1022; Reina et al., 1990, Nucl. Acids Res. 18(21): 6426)、グロブリン - 1 (Belanger and Kriz, 1991, Genetics 129: 863-872)、 α -チューブリン (Carpenter et al., 1992, Plant Cell 4(5): 557-571; Uribe et al., 1998, Plant Mol. Biol. 37(6): 1069-1078)、c a b (Sullivan, et al., 1989, Mol. Gen. Genet. 215(3): 431-440)、P E P C a s e (Hudspeth and Grula, 1989, Plant Mol. Biol. 12: 579-589)、R 遺伝子複合体 (Chandler et al., 1989, The Plant Cell 1: 1175-1183)、カルコン合成酵素 (Franken et al., 1991, EMBO J. 10(9): 2605-2612) およびグルタミン合成酵素プロモーター (U.S. Pat. No. 5,391,725; Edwards et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 3459-3463; Brears et al., 1991, Plant J. 1(2): 235-244) を含む。

10

【 0 0 7 8 】

恒常的プロモーターに加えて、トランスジェニック植物が再生し、成熟し、開花するなどに従って導入遺伝子の発現を制御したい場合には、種々の誘導性プロモーター配列が使用され得る。このような誘導性プロモーターの具体例は、熱ショック遺伝子、防御応答遺伝子 (すなわち、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ; 例えばBevan et al., 1989, EMBO J. 8(7): 899-906を参照)、創傷応答遺伝子 (すなわち、細胞壁タンパク質の遺伝子)、化学的誘導性遺伝子 (すなわち、硝酸還元酵素、キチナーゼ) および暗誘導性遺伝子 (すなわち、アスパラギン合成酵素; 例えば、米国特許第 5, 256, 558 号を参照) のプロモーターを含む。また、主要なクロロフィル a / b 結合タンパク質 (c a b) をコードする遺伝子ファミリー、およびリブローズ - 1, 5 - 2 リン酸カルボキシラーゼ (r b c S) のスモールサブユニットをコードする遺伝子ファミリーを含む多くの植物の核内遺伝子は、光によって活性化される (例えば、Tobin and Silverthorne, 1985, Annu. Rev. Plant Physiol. 36: 569-593; Dean et al., 1989, Annu. Rev. Plant Physiol. 40: 415-439. を参照)。

20

【 0 0 7 9 】

他の誘導性プロモーターは、A B A 誘導性プロモーターおよび膨圧誘導性プロモーター、オーキシン結合タンパク質遺伝子プロモーター (Schwob et al., 1993, Plant J. 4(3): 423-432)、U D P グルコース フラボノイド グリコシルトランスフェラーゼ遺伝子プロモーター (Ralston et al., 1988, Genetics 119(1): 185-197); M P I プロテインインヒビタープロモーター (Cordero et al., 1994, Plant J. 6(2): 141-150)、グリセルアルデヒド - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子プロモーター (Kohler et al., 1995, Plant Mol. Biol. 29(6): 1293-1298; Quigley et al., 1989, J. Mol. Evol. 29(5): 412-421; Martinez et al., 1989, J. Mol. Biol. 208(4): 551-565)、およびエンドウマメ由来の光誘導性プラスチド グルタミン合成酵素遺伝子 (米国特許第 5, 391, 725 号; Edwards et al., 1990, supra) を含む。

30

【 0 0 8 0 】

トランスジェニック植物技術において使用される植物プロモーターのレビューについては、Potenza et al., 2004, In Vitro Cell. Devel. Biol - Plant, 40(1): 1-22を参照されたい。植物の合成プロモーター工学のレビューについては、例えば、Venter, M., 2007, Trends Plant Sci., 12(3): 118-124を参照されたい。

40

【 0 0 8 1 】

(グルタミンフェニルピルビン酸トランスアミナーゼ (G P T) 導入遺伝子)

本発明は、シグナル代謝産物である 2 - ヒドロキシ - 5 - オキソプロリンの合成に直接的に機能する、グルタミンフェニルピルビン酸トランスアミナーゼ (G P T) 酵素を含む植物を最初に開示する。これまで、機能が明らかになった植物のトランスアミナーゼは全く記載されていない。出願人は、いくつかの植物種および動物種由来の G P T ポリヌクレオチドコード配列を同定し、試験した。そして、この遺伝子を宿主植物に組み込み、生育がより速く、葉のタンパク質量が向上され、そして C O₂ 固定速度がより速い、生育特性が顕著に向上されている異種性のトランスジェニック植物とすることに成功した。

50

【 0 0 8 2 】

シグナル代謝産物 2 - ヒドロキシ - 5 - オキシプロリンの生合成を包含する同様の代謝経路で機能する G P T は、全ての植物種に含まれていることが期待される。したがって、本発明の実施において、G P T ホモログまたはその機能的な変異体をコードするあらゆる植物の遺伝子は、本発明に係るトランスジェニック植物を生成するために有用であり得る。さらに、種々の植物 G P T タンパク質構造と、ゼブラフィッシュ (Danio rerio (Zebrafish)) 由来の推定上の (および生物学的に活性な) G P T ホモログとの間の構造的な同一性、を考慮すれば (実施例 22 を参照)、他の非植物 G P T ホモログは、本発明に係るトランスジェニック植物の生成に使用するための G P T 導入遺伝子の調製に使用される。配列番号 25 に示すシロイヌナズナの成熟タンパク質配列と (B L A S T アライメントにより) 個々に比較された際、以下の成熟 G P T タンパク質配列について、以下の配列同一性および相同性 (B L A S T 「陽性」、類似アミノ酸を含む) が得られた。

10

【 0 0 8 3 】

【表 1】

[配列番号]	由来	% 同一性	% 陽性
[26]	ブドウ	84	93
[27]	イネ	83	91
[28]	ダイズ	83	93
[29]	オオムギ	82	91
[30]	ゼブラフィッシュ	83	92
[31]	パンブー	81	90
	トウモロコシ	79	90
	キャスター	84	93
	ポプラ	85	93

20

【 0 0 8 4 】

G P T タンパク質構造では多くの植物種を超えて特徴が保存されていることを強調するように、この保存は、上述した植物種内だけでなく、ゼブラフィッシュおよびクラミドモナス由来の推定上の非ヒト G P T s にまで及んで見られる。ゼブラフィッシュの場合、同一性の範囲は非常に高い (配列番号 25 で示すシロイヌナズナの成熟 G P T とアミノ酸配列で 83 % の同一性、かつ類似アミノ酸残基を計算に加えれば 92 % の相同性)。ゼブラフィッシュの成熟 G P T は、大腸菌においてこれを発現させ、かつ生物学的活性 (2 - オキシグルタラメート合成) を証明することにより確認された。

30

【 0 0 8 5 】

推定上の G P T ホモログが、本発明における生育が向上されたトランスジェニック植物を生成するために適しているかどうかを調べるためには、そのコード配列を大腸菌あるいは他の適した宿主内で発現させ、そして合成される 2 - オキシグルタラメートシグナル代謝産物の量が増加するかどうかを調べればよい (実施例 19 ~ 23 を参照)。このような増加が示される場合には、次にそのコード配列を、同種の植物宿主および異種の植物宿主の両方に導入させた後に生育特性を評価してもよい。この目的のために、2 - オキシグルタラメートを特異的に検出することができるあらゆるアッセイを使用することができる。あらゆるアッセイは、限定されないが、後述する実施例 2 に記載の N M R および H P L C アッセイを含む。また、成熟 G P T 活性を直接測定するためのアッセイを用いてもよい。

40

【 0 0 8 6 】

本発明に係るトランスジェニック植物を生成するために、2 - オキシグルタラメート合成活性を有するあらゆる植物 G P T が、植物細胞を形質転換するために使用され得る。植物種間における構造的な相同性のレベルは高いと考えられ、種々の植物 G P T タンパク質と、ゼブラフィッシュの推定上の G P T ホモログとの間の密接な相同性によって証明されるように、この高いレベルは、植物を超えて及ぶと考えられる。したがって、種々の植物

50

G P T 遺伝子が、種々の異種の植物種において生育が向上されたトランスジェニック植物を生成するために使用され得る。さらに、同種植物において G P T 導入遺伝子を発現させた場合には、異種細胞においては起こりえないであろう何らかの方法で、同種細胞内の制御が、導入遺伝子の発現を減じ得る可能性もある。しかし、たいていは生育特性が所望に向上される結果になることが期待されるであろう（すなわち、イネのグルタミントランスアミナーゼを、トランスジェニックイネ植物内で過剰発現させる）。

【 0 0 8 7 】

（転写終結）

好ましい実施形態において、転写終結を導き、m R N A 転写産物のポリアデニル化を正常にさせるために、3' 転写終結配列が導入遺伝子の下流に組み込まれる。好適な転写終結因子は、植物において機能することが知られている転写終結因子であり、限定されないが、アグロバクテリウム・ツメファシエンズのノパリン合成酵素（nopaline synthase : N O S ）およびオクトピン合成酵素（octopine synthase : O C S ）遺伝子、オクトピン合成酵素遺伝子由来の T 7 転写産物、ジャガイモまたはトマト由来のプロテアーゼインヒビター I または I I 遺伝子の 3' 末端、C a M V 3 5 S ターミネーター、t m l ターミネーターおよびエンドウマメの r b c S E 9 ターミネーターを含む。さらに、天然の遺伝子における転写終結因子が使用され得る。ある実施形態では、実施例として後述するが、ノパリン合成酵素の転写終結因子が使用される。

【 0 0 8 8 】

（選択マーカー）

選択マーカーは、形質転換体を選抜する手段を可能にするために、導入遺伝子の発現ベクターに通常含まれる。種々のタイプのマーカーが使用可能であるが、種々のネガティブセレクションマーカーが通常利用される。ネガティブセレクションマーカーは、形質転換されていない細胞を阻害し、または殺す選択剤に対する耐性を付与するマーカーを含み、例えば、抗生物質（例えばカナマイシン、ゲンタマイシン、アナマイシン（anamycin）、ハイグロマイシンおよびハイグロマイシン B ）に対する耐性、または除草剤（例えばスルホニル尿素、グルホシネート（gulfosinate）、ホスフィノトリシンおよびグリフォセート）に対する耐性を付与する遺伝子を含む。スクリーニング可能なマーカーは、例えば、β - グルクロニダーゼをコードする遺伝子（Jefferson, 1987, Plant Mol. Biol. Rep 5: 387-405）、ルシフェラーゼをコードする遺伝子（Ow et al., 1986, Science 234: 856-859）およびアントシアニン色素の生産もしくは制御に関わるタンパク質をコードする種々の遺伝子（例えば米国特許第 6, 5 7 3, 4 3 2 号を参照）を含む。大腸菌のグルクロニダーゼ遺伝子（g u s , g u s A または u i d A ）は、植物の遺伝子導入において広く使用されてきた選択マーカーである。この大きな理由は、グルクロニダーゼ酵素の安定性、高い感受性および検出の容易性（例えば、蛍光定量的方法、分光光度的方法、種々の組織化学的方法）にある。さらに、最も高等な植物種には、検出可能なグルクロニダーゼが基本的に存在しない。

【 0 0 8 9 】

（形質転換の手法およびシステム）

本発明における導入遺伝子の発現ベクターコンストラクトを、植物または植物細胞に導入するための種々の方法は、当業者によく知られており、あらゆる形質転換可能な植物または植物細胞が標的として利用され得る。

【 0 0 9 0 】

アグロバクテリウムによって媒介される形質転換は、おそらく植物の遺伝子導入に利用される最も一般的な方法である。そして、アグロバクテリウムに媒介される、多数の植物における形質転換プロトコルは、広く文献に記載されている（例えば、Agrobacterium Protocols, Wan, ed., Humana Press, 2nd edition, 2006を参照）。アグロバクテリウム・ツメファシエンスは、腫瘍を誘導する D N A （「T - D N A」、「トランスファー D N A」）の小断片の植物細胞への挿入を介して、非常に多数の双子葉植物種において腫瘍（クラウンゴール疾患）を引き起こすグラム陰性土壌細菌である。T - D N A は、植物ゲノム

10

20

30

40

50

中の半ランダムな位置に組み込まれ、そして最終的にそこに安定的に組み込まれ得る。T-DNA ボーダーとよばれる直接繰り返しDNA配列が、T-DNAの左端および右端を規定している。T-DNAは、「バイナリーベクター」システムを作り出すために、Tiプラスミドの残りの部分から物理的に分離されることができる。

【0091】

アグロバクテリウム形質転換は、双子葉植物、単子葉植物、およびこれらの細胞を安定的に形質転換するために使用され得る (Rogers et al., 1986, Methods Enzymol., 118: 627-641; Hernalsteen et al., 1984, EMBO J., 3: 3039-3041; Hoykass-Van Slogteren et al., 1984, Nature, 311: 763-764; Grimsley et al., 1987, Nature 325: 167-1679; Boulton et al., 1989, Plant Mol. Biol. 12: 31-40; Gould et al., 1991, Plant Physiol. 95: 426-434)。アグロバクテリアにDNAを導入する種々の方法が知られており、10
、エレクトロポレーション、凍結融解法、および三親接合 (triparental mating) を含む。外部DNAをアグロバクテリウム内に配置する最も効率的な方法は、エレクトロポレーションを介する方法である (Wise et al., 2006, Three Methods for the Introduction of Foreign DNA into Agrobacterium, Methods in Molecular Biology, vol. 343: Agrobacterium Protocols, 2/e, volume 1; Ed., Wang, Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp. 43-53)。さらに、T-DNAの大部分は組み込まれないことを考慮すれば、アグロバクテリウムにより媒介される形質転換を使用することにより、組み込まれていない導入遺伝子コンストラクト分子の転写能力を介した導入遺伝子の一過的な発現を得ることができる (Helens et al., 2005, Plant Methods 1:13)。

【0092】

多数のアグロバクテリウム形質転換ベクターおよび方法が記載されてきた (Karimi et al., 2002, Trends Plant Sci. 7(5): 193-5)。そして、これらの多くのベクターは商業的に手に入れることができる (例えばインビトロジェン, カールズバッド, CA)。さらに、より多くの「オープンソース」のアグロバクテリウム形質転換ベクターが使用可能である (例えば pCambia ベクター; Cambia, Canberra, Australia)。また、本明細書中に上述した「導入遺伝子コンストラクト」の項を参照されたい。さらに実施例に記載した特定の実施形態において、生育が向上したタバコおよびトマトのトランスジェニック植物を生成するために、Horschらのリーフディスク形質転換システム (Horsch et al., 1995, Science 227:1229-1231) において、pMON316 由来のベクターが使用された。

【0093】

本発明に係るトランスジェニック植物の生成に使用され得る、他に一般に使用される形質転換法は、限定されないが、微粒子銃 (microprojectile bombardment もしくは biolistic) 形質転換法、カルシウムによるネイキッドDNAのプロトプラスト形質転換、ポリエチレングリコール (PEG) またはエレクトロポレーション (Paszkowski et al., 1984, EMBO J. 3: 2727-2722; Potrykus et al., 1985, Mol. Gen. Genet. 199: 169-177; Fromm et al., 1985, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 82: 5824-5828; Shimamoto et al., 1989, Nature, 338: 274-276) を含む。

【0094】

微粒子銃形質転換は、DNAによってコートされた数百万個の金属粒子を、微粒子銃装置 (もしくは「遺伝子銃」) を用いて標的の細胞または組織に注入する。様々な種類の微粒子銃が商業的に入手可能である。いったん細胞中に入れば、DNAが粒子から溶出され、一部が安定的に細胞の1つ以上のクロモソーム中に組み込まれ得る (レビューのために、Kikkert et al., 2005, Stable Transformation of Plant Cells by Particle Bombardment/Biolistics, in: Methods in Molecular Biology, vol. 286: Transgenic Plants: Methods and Protocols, Ed. L. Pena, Humana Press Inc., Totowa, NJを参照)。

【0095】

エレクトロポレーションは、短い、高強度の電場を利用して、細胞膜の脂質二重層を可逆的に透過可能にする技術である (例えば、Fisk and Dandekar, 2005, Introduction an

10

20

30

40

50

d Expression of Transgenes in Plant Protoplasts, in: Methods in Molecular Biology, vol. 286: Transgenic Plants: Methods and Protocols, Ed. L. Pena, Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp. 79-90; Fromm et al., 1987, Electroporation of DNA and RNA into plant protoplasts, in Methods in Enzymology, Vol. 153, Wu and Grossman, eds., Academic Press, London, UK, pp. 351-366; Joersbo and Brunstedt, 1991, Electroporation: mechanism and transient expression, stable transformation and biological effects in plant protoplasts. *Physiol. Plant.* 81, 256-264; Bates, 1994, Genetic transformation of plants by protoplast electroporation. *Mol. Biotech.* 2: 135-145; Dillen et al., 1998, Electroporation-mediated DNA transfer to plant protoplasts and intact plant tissues for transient gene expression assays, in *Cell Biology*, Vol. 4, ed., Celis, Academic Press, London, UK, pp. 92-99を参照)。この技術は、細胞膜に水溶性の細孔を作り出すことにより行なう。細孔は、DNA分子（および他の高分子）が細胞に入るのに十分な大きさのサイズである。そして、導入遺伝子発現コンストラクト（T-DNA等）は、植物ゲノムDNA中に安定的に組み込まれることができ、形質転換細胞の生成が導かれ、その後に形質転換細胞はトランスジェニック植物に再生され得る。

【0096】

より新しい形質転換法は、いわゆる「フローラルディップ (floral dip)」法を含む。フローラルディップ法は、他の一般に使用される全ての形質転換方法のように植物組織培養が要求されず、単純性が期待される (Bent et al., 2006, *Arabidopsis thaliana* Floral Dip Transformation Method, *Methods Mol Biol*, vol. 343: *Agrobacterium* Protocols, 2/e, volume 1; Ed., Wang, Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp. 87-103; Clough and Bent, 1998, Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*, *Plant J.* 16: 735-743)。しかしながら、シロイヌナズナを除いて、これらの方法は、広範囲の種類の植物種にわたって広く使用されていない。簡単にいえば、フローラルディップによる形質転換は、アグロバクテリウム・ツメファシエンスの適切な菌株を用いて、開花している植物を浸漬し、もしくは開花している植物に噴霧することにより成し遂げられる。その後、3つのT₀植物から回収した種子を発芽させ、トランスジェニックT₁個体を同定して選択した。実施例16は、花の浸漬によりシロイヌナズナを接種し、トランスジェニックシロイヌナズナ植物を生成したことを示す。

【0097】

他の形質転換法は、アグロバクテリウムベクター等を用いて、生育中の植物の種子または苗を形質転換させる方法を含む。例えば、このようなベクターは、ベクター（すなわちアグロバクテリア）の懸濁液または混合物を、生育中の種子のさやにおける空洞中に直接的に注入することによって、生育中の種子を形質転換するために使用し得る (Wang and Waterhouse, 1997, *Plant Mol. Biol. Reporter* 15: 209-215)。苗は、Yasseem, 2009, *Plant Mol. Biol. Reporter* 27: 20-28に記載のように形質転換され得る。発芽した種子は、Chee et al., 1989, *Plant Pysiol.* 91: 1212-1218に記載のように形質転換され得る。ベクターが果実または生育中の果実内に注入される果実内部法もまた使用し得る。他の形質転換法は、花器官をベクター接種のための標的とする方法、例えば花接種法などをも含む。

【0098】

上述した植物形質転換法は、導入遺伝子を多くの種類の植物細胞および組織に導入するために使用され得る。植物細胞および組織は、限定されないが、植物全体、葉緑体を含む組織および器官の移植片、葉緑体を含む組織および器官の移植片、開花組織および細胞、プロトプラスト、分裂組織細胞、カルス、小孢子などの未成熟の胚および配偶子細胞、花粉、精子および卵細胞、上述した組織の培養細胞、再生された繁殖性のトランスジェニック植物が生成され得る他のあらゆる細胞を含む。カルスは、組織源から生じる。組織源は、限定されないが、未成熟の胚、苗の頂端分裂組織、小孢子などを含む。カルスとして増

殖可能な細胞もまた、遺伝的形質転換を受ける細胞である。

【0099】

形質転換された植物細胞、組織および器官から個々の植物を再生する方法は、多くの植物種について知られており、かつ記載されている。

【0100】

例として、形質転換された小植物（形質転換細胞または組織由来）を、形質転換法に使用する選択剤（つまり、カナマイシンなどの抗生物質）が添加された植え付け可能な生育培地において培養する。この形質転換された小植物を、根を下ろした後に土壌に移し、十分に成長させる。開花した後、成熟植物に好ましくは自家受粉させる。そして、その結果生じた種子を回収し、次の世代を生育させるために使用する。実施例3～6は、トランスジェニックタバコ植物およびトランスジェニックトマト植物の再生について記載する。

10

【0101】

T₀トランスジェニック植物は、第1の形質転換体もしくは第2の形質転換体の自家受粉によって、または他の植物（形質転換植物もしくは非形質転換植物）の第1もしくは第2の形質転換体の雌雄交雑によって、次の世代（例えば、T₁、T₂など）を生成するために使用され得る。

【0102】

（生育が向上されたトランスジェニック植物の選抜）

トランスジェニック植物は、標準的な方法を用いて選抜され、スクリーニングされ、そして同定され得る。本発明の好ましいトランスジェニック植物は、向上された生育および/または他の所望の農学的性質を示す1つ以上の表現型の特徴を提示し得る。トランスジェニック植物は、通常、形質転換体を選抜するために、選択圧下で再生され、その後トランスジェニック植物生成が行なわれる。さらに、使用される選択圧は、所望の導入遺伝子発現コンストラクトまたはカセットの存在を確認するために、T₀世代を超えて使用され得る。

20

【0103】

T₀形質転換された植物細胞、カルス、組織または植物は、形質転換に用いる導入遺伝子発現コンストラクトに含まれるマーカー遺伝子の遺伝的組成物、および/またはマーカー遺伝子によりコードされる表現型の特徴を選抜し、またはスクリーニングすることにより、同定され、かつ単離され得る。例えば、遺伝的コンストラクトによって耐性を付与することができる抗生物質または除草剤の成長抑圧的な量を含む生育培地において、形質転換されている可能性のある植物、組織または細胞を生育させることによって、選抜が行なわれ得る。さらに、形質転換された植物細胞、組織および植物は、導入遺伝子発現コンストラクト内に存在し得るマーカー遺伝子（すなわち、β-グルクロニダーゼ）の活性をスクリーニングすることによっても同定され得る。

30

【0104】

周知のとおり、所望の導入遺伝子発現コンストラクトを含む植物を同定するために、種々の物理的方法および生化学的方法が使用され得る。これらの方法の具体例は、例えば、導入遺伝子、導入遺伝子発現コンストラクトまたはその要素を同定するためのサザンブロット解析または種々の核酸増幅法（いわゆるPCR）、RNA転写産物を検出しかつ決定するためのノザンブロッティング、S1 RNase保護法、逆転写酵素PCR（RT-PCR）増幅法、導入遺伝子によってコードされかつ発現されるタンパク質を同定するためのタンパク質ゲル電気泳動、ウェスタンブロッティング、免疫沈降、および酵素免疫測定などが用いられ得る。

40

【0105】

他の手段では、形質転換体を同定するために、標的植物における導入遺伝子の発現により改変されることが知られている遺伝子、タンパク質および/または代謝化合物の発現量が使用され得る。本発明に係る一実施形態において、シグナル代謝産物2-オキソグルタラメートの量の増加は、所望の形質転換体をスクリーニングするために使用され得る。

【0106】

50

最後に、本発明の形質転換植物は、向上された生育および/または他の所望の農学的性質を用いてスクリーニングされ得る。実際、特にその後の自家受粉、異種交配および戻し交配による植物を同定する際には、最も速い生育速度、最も高い種子の収量などを有する形質転換ラインを同定するために、ある一定の表現型のスクリーニングが通常望ましい。この目的のために、種々のパラメータが使用できる。パラメータは、限定されないが、生育速度、全生体重、乾燥重量、種子および果実の収量（数、重量）、種子および/または種子のさやのサイズ、種子のさやの収量（例えば数、重量）、葉のサイズ、植物のサイズ、開花の向上、開花の時期、全体のタンパク質量（種子、果実、植物組織内）、特定のタンパク質量（すなわちGS）、窒素量、遊離アミノ酸、および特定の代謝化合物量（すなわち2-オキソグルタレート）を含む。一般的に、これらの表現型の測定値は、親と同一もしくは類似の植物ライン、形質転換されていない植物と同一もしくは類似の植物、または野生型植物と同一もしくは類似の植物（すなわち、標準の植物もしくは親植物）から得られた測定値と比較される。好ましくは、そして少なくとも最初に、標的トランスジェニック植物における選択された表現型の特徴の測定は、標準の植物もしくは親植物における同じ特徴の測定と並行に行なわれる。通常、特定の表現型の特徴について、トランスジェニック植物における表現型の好ましさおよび/または優位性を確立するために、複数の植物が使用される。

10

【0107】

好ましくは、最初の形質転換体は、導入遺伝子の遺伝子型が先祖の形質を維持する（すなわち、植物が、導入遺伝子について同型となる）まで、選択された後にT₁およびこれに続く世代を自家受粉により生成するために使用される。実際には、これは、各世代について自家受粉させ、各世代において所望の形質についてスクリーニングし、そしてそれら個々を自家受粉させること（たいてい繰り返し（すなわち、3または4世代））により成し遂げられる。

20

【0108】

安定なトランスジェニックラインは、いくつもの所望の形質を有する変種を作り出すために交雑され、かつ戻し交配されてもよい。変種は、積み重ねられた導入遺伝子を有する変種、導入遺伝子のマルチコピーを有する変種などを含む。種々の一般的な育種方法は当業者に公知である（例えば、Breeding Method for Cultivar Development, Wilcox J. ed., American Society of Agronomy, Madison Wis. (1987)を参照）。さらに、安定なトランスジェニック植物は、これらの植物に導入遺伝子もしくは親の導入遺伝子のさらなるコピーをさらに形質転換することによって、遺伝的にさらに改変されてもよい。また、所定の導入遺伝子もしくは複数の導入遺伝子のマルチコピーを導入する形質転換を1回行なうことによって、トランスジェニック植物を作り出すことが検討される。

30

【0109】

〔実施例〕

本発明の様々な態様を、いくつかの実施例によりさらに記載および説明するが、いずれも本発明の範囲を限定するものではない。

【0110】

<実施例1：シロイヌナズナのグルタミルフエニルピルビン酸トランスアミナーゼ（GPT）遺伝子の単離>

40

シグナル代謝産物である2-オキソグルタレートの合成に直接的に関与する植物酵素を見出す試みとして、出願人は、推定される植物酵素が、2-オキソグルタレートの合成に関与していると特徴づけられているヒトのタンパク質と、ある程度の構造上の関連性を有しているであろうとの仮説を立てた。ヒトのタンパク質であるグルタミントランスアミナーゼK（E.C.2.6.1.64）（文献では、システイン共役β-リアーゼ、キヌレニンアミノトランスフェラーゼ、グルタミルフエニルピルビン酸トランスアミナーゼ、等ともいわれている）は、ハロゲン化した生体異物のシステイン共役の処理に関与していることがわかっている（Perry et al., 1995, FEBS Letters 360:277-280）。ヒトのシステイン共役β-リアーゼは、窒素同化に関与する活性を有するよりも、むしろヒトお

50

よび動物において解毒活性を有する（上述のCooper and Meister, 1977）。とはいえ、2 - オキシグルタラメートの合成におけるこのタンパク質の潜在的な関与は重要であった。

【0111】

ヒトのシステイン共役β-リアーゼのタンパク質配列を用いて、TIGRシロイヌナズナ植物のタンパク質配列のデータベースを検索して、関連する可能性がある1つの配列、すなわち、シロイヌナズナの遺伝子のAt1g77670に位置する部分的な配列によりコードされるポリペプチドを同定した。このポリペプチドは、アライメントした領域で約36%の配列相同性を共有する。

【0112】

全長の遺伝子コーディング領域は、下記のプライマーによりシロイヌナズナのcDNAライブラリーから増幅した。

【0113】

5' - CCCATCGATGTACC TGGACATAAATGGTGTGATG-3' [配列番号32]

5' - GATGGTACCTCAGACTTTTCTCTTAAGCTTCTGCTTC-3' [配列番号33]

これらのプライマーは、後述のトランスジェニック植物を作成するための発現ベクターでのサブクローニングを促進するため、ClaI (ATCGAT) およびKpnI (GGTACC) の制限酵素部位を含むように設計した。Takara ExTaq DNAポリメラーゼ酵素を用いて、次の条件により高性能のPCRを行なった：まず94℃で4分間変性し、94℃で30秒間の変性、55℃で30秒間のアニーリング、および72℃で90秒の伸長反応を30サイクル行ない、最後に72℃で7分間伸長反応させる。増幅産物はClaIおよびKpnI制限酵素で切断し、アガロースゲル電気泳動法で単離して、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV: cauliflower mosaic virus) 35Sの構成的プロモーターおよびノパリンシンターゼ (NOS: nopaline synthase) 3' ターミナーを含むベクターpMon316 (Rogers, et. al. 1987 Methods in Enzymology 153:253-277) にライゲーションした。ライゲーション産物をDH5α細胞に形質転換し、挿入されたことを確認するために形質転換体の配列を決定した。

【0114】

1.3kbのcDNAを単離して配列を決定したところ、推定される葉緑体のシグナル配列を含む、長さ440アミノ酸の全長タンパク質をコードすることを見出した。

【0115】

<実施例2：生物学的に活性なシロイヌナズナのグルタミンフェニルピルビン酸トランスアミナーゼの産生>

上述の実施例1に記載したように、単離したcDNAによりコードされたタンパク質が、2 - オキシグルタラメートの合成を触媒することが可能か否かを調べるため、当該cDNAを大腸菌で発現させて、2 - オキシグルタラメートの合成能を標準的な方法で検定した。

【0116】

(2 - オキシグルタラメートのNMRアッセイ)

簡潔に言えば、精製したタンパク質の産物を、150mM Tris-HCl (pH 8.5)、1mM β-メルカプトエタノール、200mM グルタミン、100mM グリオキシル酸および200μM ピリドキサル5'-リン酸を含む反応液に加えた。試験するタンパク質を加えていない反応液をコントロールとして用いた。試験反応液およびコントロール反応液を37℃で20時間インキュベートし、遠心分離によって浄化して沈殿物を取り除いた。化学的に合成した標準の2 - オキシグルタラメートを参照として、¹³C NMRを用いて、2 - オキシグルタラメートの存在と量を分析するために上清を試験した。反応産物は2 - オキシグルタラメートおよびグリシンであり、一方、基質（グルタミンおよびグリオキシル酸）は存在比が減少した。サイクリック2 - オキシグルタラメートは、オープンチェーンのグルタミン前駆体から容易に区別できる、まったく異なるシグナルを生じさせた。

【0117】

(2 - オキシグルタラメートの H P L C アッセイ)

G P T 活性に関する代替的なアッセイは、Calderon et al., 1985, J Bacteriol 161(2): 807-809の変性に続いて、H P L Cを用いて2 - オキシグルタラメート産物を測定した。簡潔に言えば、25 mM T r i s - H C l (p H 8 . 5)、1 mM E D T A、20 μ M F A D、10 mM システインおよび~ 1 . 5 % (v / v) メルカプトエタノールを含む、変性抽出バッファーを用いた。検査物質からの組織サンプル(すなわち、植物組織)を約1 / 3の比率(w / v)で抽出バッファーに加え、37 で30分間インキュベートし、200 μ Mの20 % T C Aによって停止させた。約5分後、アッセイ溶液を遠心分離し、その上清を用いてH P L C (0 . 0 1 N H₂ S O₄の移動相、約0 . 2 m l / m i nの流速、40 、でのI O N - 300 7 . 8 m m I D X 30 c m L c o l u m nを用いる)によって2 - オキシグルタラメートを定量した。注入量は約20 μ lであり、保持時間はおよそ38分から39分である。検出は210 n mのU V光で行なう。

10

【 0 1 1 8 】

(N M R アッセイの結果)

本実験は、試験タンパク質が2 - オキシグルタラメートの合成を触媒することができるということを証明した。ゆえに、これらのデータは、単離したc D N Aが、植物において2 - オキシグルタラメートの合成に直接的に関与するグルタミンフェニルピルビン酸トランスアミナーゼをコードするというを示す。よって、試験タンパク質はシロイヌナズナのグルタミンフェニルピルビン酸トランスアミナーゼ、すなわちG P Tといえる。

20

【 0 1 1 9 】

シロイヌナズナG P Tのコード配列のヌクレオチド配列を配列番号1に示す。G P Tタンパク質の翻訳されたアミノ酸配列を、配列番号2に示す。

【 0 1 2 0 】

< 実施例3 : シロイヌナズナのG P Tを過剰発現するトランスジェニックタバコ植物の作成 >

(植物の発現ベクター p M O N - P J U の生成)

簡潔に、植物の発現ベクター p M o n 3 1 6 - P J Uを以下のように作製した。単離したシロイヌナズナのG P Tをコードするc D N A (実験例1)をp M o n 3 1 6ベクターのC l a I - K p n Iポリリンカー部位に入れて、クローニングした。これにより、G P T遺伝子は、カリフラワーモザイクウイルス(C a M V) 3 5 Sプロモーターおよびノバリンシンターゼ(N O S) 転写ターミネーターの制御下におかれる。選択マーカーを提供するためにカナマイシン耐性遺伝子を加えた。

30

【 0 1 2 1 】

(アグロバクテリウムを介した植物の形質転換)

p M O N - P J Uおよびコントロールベクター p M o n 3 1 6 (挿入したD N Aなし)は標準的なエレクトロポレーション法(McCormac et al., 1998, Molecular Biotechnology 9:155-159)を用いてアグロバクテリウム・ツメファシエンズ株のp T i T T 3 7 A S Eに形質転換し、続いて抗生物質スペクチノマイシン(100 μ g / m l)およびカナマイシン(50 μ g / m l)を含んだL Bプレートに塗り広げた。アグロバクテリウムの抗生物質耐性コロニーをP C Rによって試験し、プラスミドを含むことを確認した。

40

【 0 1 2 2 】

ニコチアナ・タバカムc v クサンチ(Nicotiana tabacum cv Xanthi)植物を、Horschらのリーフディスク形質転換法(Horsch et al., 1995, Science 227:1229-1231)を用いて、アグロバクテリウムを形質転換したp M O N - P J Uにより形質転換させた。つまり、無菌のリーフディスクに接種し、2日間培養して、100 μ g / m lのカナマイシンおよび500 μ g / m lのクラファラン(clafaran)を含んでいる選択M S培地に移植した。選択培地中で根を形成する能力により形質転換体を確認した。

【 0 1 2 3 】

(G P Tトランスジェニックタバコ植物の生成)

50

無菌の葉の切片を、Murashige & Skoog (M & S) 培地上でカルスに発達させ、そこから形質転換小植物体が出現した。そして、これらの小植物体を発根可能な選択培地（選択試薬としてカナマイシンを含むM & S培地）に移植した。その後、正常で、発根した、形質転換したタバコの小植物体を土壌に移植し、成熟期まで生育させて、花が咲いた植物を自家受精させて、得られた種子を収穫した。成長期の間、植物の成長表現型を調べ、多くの若いトランスジェニック植物でCO₂固定速度を測定した。

【0124】

（T₁およびT₂世代のGPTトランスジェニック植物の生成）

トランスジェニックタバコ植物のT₀世代から収穫した種子を、カナマイシン（100 mg / L）を含むM & S培地で発芽させて、導入遺伝子の質を高めた。種子のうち少なくとも1 / 4がこの培地で発芽せず（カナマイシンは、通常の遺伝子分離の結果もたらされ得る、耐性のない種子の発芽を阻害すると期待される）、残りの種子のうち半分以上がカナマイシンに対して感受性（ごく弱い）を示したため取り去られた。

10

【0125】

生き残った植物（T₁世代）を成長させ、これらの植物をT₂世代の種子を生産するために自家受精させた。T₁世代からの種子は、形質転換体の系統のためにカナマイシン（10 mg / L）が追加されたMS培地で発芽させた。14日後、種子を砂地に移し、25 mMの硝酸カリウムが追加された4分の1の濃度のホーグランド栄養液を与えた。これを900マイクロモル / m² / 秒の光の強さで16時間の明期および8時間の暗期という光周期にして、24で成長させた。それらを砂地培養に移植した14日後に収穫した。

20

【0126】

（GPTトランスジェニック植物のキャラクタリゼーション）

収穫されたトランスジェニック植物（GPT形質転換体およびベクターコントロール形質転換体の両方）を根および葉のグルタミシンセターゼ活性、乾燥させていない植物の総量、根および葉の総タンパク質ならびにCO₂固定速度（Knight et al., 1988, Plant Physiol. 88: 333）を分析した。形質転換していない野生型A. ツメファシエンズ植物もベースラインコントロールを設けるため、同じパラメータで分析した。

【0127】

生育特性の結果は、下記の表1に示す。さらに、野生型のコントロール植物と比較したGPTトランスジェニック植物の写真を図2に示す（GS1トランスジェニックタバコ植物と一緒に示す）。評価した全パラメータにわたって、GPTトランスジェニックタバコ植物は促進された生育特性を示す。特に、GPTトランスジェニック植物は、野生型のコントロール植物と比較して、CO₂固定速度において50%増を示し、葉の組織におけるグルタミシンセターゼ活性は2倍を示した。さらに、葉と根とのGS比は、トランスアミナーゼのトランスジェニック植物では野生型のコントロールと比較してほぼ3倍に増加した。生体重および全タンパク質量も、トランスジェニック植物では野生型のコントロールと比較して、それぞれ約50%および80%（葉）増加した。これらのデータは、シロイヌナズナGPT導入遺伝子が過剰発現したタバコ植物が、有意に促進された成長とCO₂固定速度を獲得することを実証する。

30

【0128】

40

【表 2】

表 I

タンパク質mg / gram 生体重	葉	根
野生型—コントロール	8.3	2.3
PN1—8系統 第二コントロール	8.9	2.98
PN9—9系統	13.7	3.2
グルタミンシンセターゼ活性 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ タンパク質		
野生型 (葉:根=4.1:1)	4.3	1.1
PN1—8系統 (葉:根=4.2:1)	5.2	1.3
PN9—9系統 (葉:根=10.9:1)	10.5	0.97
植物の総生体重 g		
野生型	21.7	
PN1—8系統	26.1	
PN9—9系統	33.1	
CO ₂ 固定速度 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$		
野生型	8.4	
PN1—8系統	8.9	
PN9—9系統	12.9	

【0129】

データ = 3 個体の平均値である。

【0130】

野生型 - コントロール植物；再生または形質転換されていない。

【0131】

PN1 系統は導入遺伝子を有していないコンストラクトで形質転換した後、再生により生成した。

【0132】

再生および形質転換の処理に対するコントロール。PN9 系統はシロイヌナズナ GPT 遺伝子を有するコンストラクトで形質転換した後、再生により生成した。

【0133】

< 実施例 4：シロイヌナズナ GPT 遺伝子を持つトランスジェニックトマト植物の生成 >

シロイヌナズナ GPT 遺伝子を持つトランスジェニックトマト (*Lycopersicon esculentum*) (マイクロトマト) 植物を、実施例 3 で記載したベクターおよび方法を用いて作成した。T₀ トランスジェニックトマト植物を作成し、成熟期まで生育させた。トランスジェニックトマト植物の初期生育特性のデータを表 2 に示す。トランスジェニック植物は野生型のコントロール植物と比較して、成長速度、開花および種子の収穫量の有意な促進を示した。さらに、トランスジェニック植物は複数の主茎を発達させた、一方、野生型の植物は単数の主茎を発達させた。野生型の植物と比較した GPT トランスジェニックトマト植物の写真を図 3 に示す。

【0134】

10

20

30

40

【表 3】

表 I I

生育特性	野生型トマト	GPTトランスジェニックトマト
茎の高さ, cm	6, 5	18, 12, 11 主茎
茎	1	主茎3, その他0
つばみ	2	16
花	8	12
果実	0	3

10

【0135】

< 実施例 5 : 植物体におけるオオムギ G P T 導入遺伝子の活性 >

本実施例では、オオムギの G P T の推定コード配列を、植物体への一過性発現アッセイによって導入遺伝子コンストラクトから単離し、発現させた。生物学的に活性な組換えオオムギ G P T が生成され、H P L C で確認したところ、2 - オキシグルタラメートの増加した合成を触媒した。

【0136】

オオムギ (*Hordeum vulgare*) G P T のコード配列を決定し、合成した。この実施例で用いるオオムギ G P T のコード配列の D N A 配列を配列番号 9 に示し、コードされた G P T タンパク質のアミノ酸配列を配列番号 10 に示す。

20

【0137】

オオムギ G P T のコード配列を 1305 . 1 カンピアベクターに挿入し、標準的なエレクトロポレーション法 (McCormac et al., 1998, Molecular Biotechnology 9:155-159) を用いて、アグロバクテリウム・ツメファシエンス株の L B A 404 に形質転換し、ハイグロマイシン (50 μ g / ml) を含んだ L B プレートに塗り広げた。アグロバクテリウムの抗生物質耐性コロニーを解析のために選択した。

【0138】

タバコ葉の一過性発現アッセイは、形質転換したアグロバクテリウム (1 . 5 - 2 . 0 O D₆₅₀) の懸濁液を、急速に成長するタバコ葉へ注入することから成る。皮内注射は有意な量の葉の表面がアグロバクテリウムにさらされることを確実にするため、葉の表面にわたる格子内で行った。植物を 3 - 5 日間生育させて、組織を他の全ての組織抽出で説明したように抽出し、G P T 活性を測定した。

30

【0139】

接種した葉の組織の G P T 活性 (1217 nmol / g F W t / h) は、コントロール植物の葉の組織で測定した活性 (407 nmol / g F W t / h) の 3 倍であり、ダイズ (*Hordeum*) G P T コンストラクトはトランスジェニック植物において生物学的に活性な G P T の発現に導かれることを示した。

【0140】

< 実施例 6 : 組換えイネ G P T 遺伝子コード配列の単離および発現ならびに生物学的活性の解析 >

40

本実施例では、イネの G P T の推定コード配列を単離し、大腸菌で発現させた。生物学的に活性な組換えイネ G P T が作成され、H P L C で確認したところ、2 - オキシグルタラメートの増加した合成を触媒した。

【0141】

〔材料と方法〕

(イネ G P T コード配列と大腸菌における発現)

イネ (*Oryza sativa*) の G P T コード配列を決定し、合成して、P E T 28 ベクターに導入し、大腸菌で発現させた。つまり、大腸菌細胞を発現ベクターにより形質転換し、L

50

B 培養液で一晩培養した形質転換体を希釈し、OD 0.4 まで成長させて、イソプロピル - β - D - チオガラクトシド (0.4 μ M) で誘導して発現させ、3 時間培養して集菌した。そして、合計 2.5×10^6 個の細胞の生物学的活性に関して、以下の NMR アッセイによって分析した。形質転換していない野生型の大腸菌細胞をコントロールとして分析した。追加のコントロールには、空のベクターで形質転換した大腸菌細胞を用いた。

【0142】

本実施例で用いるイネ GPT のコード配列の DNA 配列を 配列番号 5 に示し、コードされた GPT タンパク質のアミノ酸配列を 配列番号 6 に示す。

【0143】

(2 - オキシグルタラメートの HPLC アッセイ)

Calderon et al., 1985, J Bacteriol 161(2): 807-809 の変性に続いて、HPLC を用いて GPT を過剰発現している大腸菌細胞における 2 - オキシグルタラメートの産生量を測定した。つまり、25 mM Tris - HCl (pH 8.5)、1 mM EDTA、20 μ M ピリドキサルリン酸、10 mM システインおよび ~ 1.5% (v/v) メルカプトエタノールを含む変性抽出バッファーを用いた。サンプル (大腸菌細胞 2.5×10^6 個の溶菌液) を抽出バッファーに約 1/3 比率 (w/v) で加え、37 で 30 分間インキュベートし、200 μ M の 20% TCA で停止した。約 5 分後、アッセイ溶液を遠心分離し、上清を用いて、0.01 N H_2SO_4 の移動相、流速約 0.2 ml/分、40 において ION - 300 7.8 mm ID X 30 cm L column を用いた HPLC により、2 - オキシグルタラメートを定量した。注入量は約 20 μ l であり、保持時間はおおよそ 38 分から 39 分である。検出は 210 nm の UV 光で行なった。

【0144】

標準の 2 - オキシグルタラメートとの NMR アッセイの比較は、シロイヌナズナの全長配列が、2 - オキシグルタラメート合成活性を持つ GPT を発現することを立証するために用いた。つまり、アッセイの産物 (発現 GPT に対する応答において合成された分子) および標準の 2 - オキシグルタラメートが同じ保持時間で溶出することを確認することによって、上記の HPLC アッセイを有効なものとするために、化学的合成により標準の 2 - オキシグルタラメート (NMR で確認した構造) を作製した。加えて、アッセイ産物および標準の化合物を共に混合すると単一のピークとして溶出した。さらに、HPLC アッセイの有効化は、基質であるグルタミンの消失のモニタリングおよびグルタミンの消費と 2 - オキシグルタラメートの生成との間に 1:1 のモル比があることを示すことも含んでいた。分析の工程には常に 2 つのコントロールを含んでおり、1 つは酵素の添加がなく、1 つはグルタミンの添加がない。第一に、2 - オキシグルタラメートの生成物は酵素の存在に依存することを示し、第二に 2 - オキシグルタラメートの生成は基質であるグルタミンに依存することを示す。

【0145】

(結果)

配列番号 5 のイネ GPT コード配列の発現は、2 - オキシグルタラメート合成触媒の生物学的活性を持つ組換え GPT タンパク質の過剰発現という結果になった。特に、1.72 nmol の 2 - オキシグルタラメートの活性が組換えイネ GPT を過剰発現している大腸菌細胞においてみられ、コントロールの大腸菌細胞における、わずか 0.02 nmol の 2 - オキシグルタラメートの活性に比べて、86 倍の活性レベルの増加がみられた。

【0146】

< 実施例 7 : 組換えダイズ GPT 遺伝子コード配列の単離および発現ならびに生物学的活性の解析 >

本実施例では、ダイズの GPT の推定コード配列を単離し、大腸菌で発現させた。生物学的に活性な組換えダイズ GPT が生成され、HPLC で確認したところ、2 - オキシグルタラメートの増加した合成を触媒した。

【0147】

(材料と方法)

(ダイズGPTコード配列と大腸菌における発現)

ダイズ (*Glycine max*) のGPTコード配列を決定し、合成して、PET28ベクターに導入し、大腸菌で発現させた。つまり、大腸菌細胞を発現ベクターにより形質転換し、LB培養液で一晩培養した形質転換体を希釈し、OD0.4まで培養して、イソプロピル-β-D-チオガラクトシド (0.4 μM) で誘導して発現させ、3時間培養して、集菌した。合計 2.5×10^6 個の細胞により、下記のHPLCアッセイを用いて生物学的活性を分析した。形質転換していない野生型の大腸菌をコントロールとして分析した。追加のコントロールには、空のベクターを形質転換した大腸菌細胞を用いた。

【0148】

本実施例で用いるダイズGPTのコード配列のDNA配列を配列番号7に示し、コードされたGPTタンパク質のアミノ酸配列を配列番号8に示す。

10

【0149】

(2-オキシグルタラメートのHPLCアッセイ)

上記の実施例20に記載したように、GPTを過剰発現している大腸菌細胞における2-オキシグルタラメートの生成を判定するためにHPLCを用いた。

【0150】

(結果)

配列番号7のダイズGPTコード配列の発現は2-オキシグルタラメート合成触媒の生物学的に活性な組換えGPTタンパク質の過剰発現という結果になった。特に、 31.9 nmol の2-オキシグルタラメートの活性が組換えダイズGPTを過剰発現している大腸菌細胞においてみられ、コントロールの大腸菌細胞における、わずか 0.02 nmol の2-オキシグルタラメートの活性に比べて、1600倍近くの活性レベルの増加がみられた。

20

【0151】

<実施例8：組換えゼブラフィッシュGPT遺伝子コード配列の単離および発現ならびに生物学的活性の解析>

本実施例では、ゼブラフィッシュのGPTの推定コード配列を単離し、大腸菌で発現させた。生物学的活性のある組換えゼブラフィッシュGPTが作成され、HPLCで確認したところ、2-オキシグルタラメートの増加した合成を触媒した。

【0152】

30

(材料と方法)

(ゼブラフィッシュGPTコード配列および大腸菌における発現)

ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) のGPTコード配列を決定し、合成して、PET28ベクターに導入し、大腸菌で発現させた。つまり、大腸菌細胞を発現ベクターにより形質転換し、LB培養液で一晩培養した形質転換体を希釈し、OD0.4まで培養して、イソプロピル-β-D-チオガラクトシド (0.4 μM) で誘導して発現させ、3時間培養して、集菌した。合計 2.5×10^6 個の細胞により、下記のHPLCアッセイを用いて生物学的活性を分析した。形質転換していない野生型の大腸菌をコントロールとして分析した。追加のコントロールには、空のベクターで形質転換した大腸菌細胞を用いた。

【0153】

40

この実施例で用いるゼブラフィッシュGPTのコード配列のDNA配列を配列番号11に示し、コードされたGPTタンパク質のアミノ酸配列を配列番号12に示す。

【0154】

(2-オキシグルタラメートのHPLCアッセイ)

上記の実施例6に記載したように、GPTを過剰発現している大腸菌細胞における2-オキシグルタラメートの生成を判定するためにHPLCを用いた。

【0155】

(結果)

配列番号16のゼブラフィッシュGPTコード配列の発現は2-オキシグルタラメート合成触媒の生物学的活性を持つ組換えGPTタンパク質の過剰発現という結果になった。

50

特に、 28.6 nmol の2-オキソグルタラメートの活性が組換えゼブラフィッシュGPTを過剰発現している大腸菌細胞においてみられ、コントロールの大腸菌細胞における、わずか 0.02 nmol の2-オキソグルタラメートの活性に比べて、1400倍以上の活性レベルの増加がみられた。

【0156】

<実施例9：トランケートされた組換えシロイヌナズナGPT遺伝子コード配列の単離および発現ならびに生物学的活性の解析>

この実施例では、シロイヌナズナのGPTの推定コード配列の異なる2つの断片を構築し、推定される葉緑体のシグナルペプチドが欠失しているまたはトランケートされたGPTタンパク質の活性を評価するために、大腸菌で発現させた。最初の30個のアミノ末端のアミノ酸残基または最初の45個のアミノ末端のアミノ酸残基を欠失するようにトランケートされた、配列番号2のシロイヌナズナGPTの全長アミノ酸配列に対応する組換え断片GPTタンパク質は、無事に発現し、HPLCで確認したところ、2-オキソグルタラメートの増加した合成を触媒する生物学的活性を示した。

【0157】

(材料と方法)

(トランケートされたシロイヌナズナGPTコード配列と大腸菌における発現)

配列番号1のシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)のGPTコード配列の断片のDNAコード配列を構築し、合成して、PET28ベクターに導入し、大腸菌で発現させた。本実施例で用いたトランケートされたシロイヌナズナGPTコード配列のDNA配列を配列番号15(-45AAコンストラクト)に示し、対応するトランケートされたGPTタンパク質のアミノ酸配列を配列番号16に示す。つまり、大腸菌細胞を発現ベクターにより形質転換し、LB培養液で一晩培養した形質転換体を希釈し、OD0.4まで培養して、イソプロピル- β -D-チオガラクトシド($0.4 \mu\text{M}$)で誘導して発現させ、3時間培養して、集菌した。合計 25×10^6 個の細胞により、実施例20に記載したように、HPLCアッセイを用いて生物学的活性を分析した。形質転換していない野生型の大腸菌をコントロールとして分析した。追加のコントロールには、空のベクターで形質転換した大腸菌細胞を用いた。

【0158】

配列番号15のトランケートされた-45のシロイヌナズナGPTコード配列の発現は、生物学的活性(2-オキソグルタラメートの合成を触媒する生物学的活性)を持つ、組換えGPTタンパク質の過剰発現という結果になった。特に、 16.1 nmol の2-オキソグルタラメートの活性がトランケートされた-45のGPTを過剰発現している大腸菌細胞においてみられ、コントロールの大腸菌細胞における、わずか 0.02 nmol の2-オキソグルタラメートの活性に比べて、800倍以上の活性レベルの増加がみられた。比較として、同じ*E. coli*で発現するシロイヌナズナ遺伝子の全長コード配列では、 2.8 nmol の2-オキソグルタラメートの活性が生じ、トランケートされた組換えGPTタンパク質のおよそ1/5の活性がみられた。

【0159】

この明細書中で引用されている全ての出版物、特許および特許出願は、個々の出版物または特許出願が参照として組み込まれると明確におよび個々に表示されているように、参照として本明細書に組み込まれる。

【0160】

この発明は本明細書で明らかにされた具体例によって範囲を限定されるものではなく、具体例は発明の個々の態様の一例とする意図であり、機能的に同等のものはいずれも発明の範囲内である。本明細書に記載されたもの加えて、発明のモデルおよび方法の様々な変更が前記の説明および手引きから、当業者にとって明白になるであろうし、同様に発明の範囲に含まれることを意図する。そのような変更または他の具体例は、発明の正当な範囲および趣旨から離れることなく実施され得る。

【0161】

〔配列表〕

【0162】

【表4】

配列番号1 シロイヌナズナのグルタミンフェニルピルビン酸トランスアミナーゼDNAの
コード配列

```

ATGTACCTGGACATAAATGGTGTGATGATCAAACAGTTTAGCTTQAAAAGCCTC
TCTTCTCCOATTCTCTTCTAATTTCCGACAAAGCTCCGCCAAAATCCATCGTC
CTATCGGAGCCACCATGACCACAGTTTCGACTCAGAACGAGTCTACTCAAAA
ACCCGTCCAGGTGGCGAAGAGATTAGAGAAGTTCAAGACTACTATTTTCACT
CAAATGAGCATATTGGCAGTTAAACATGGAGCGATCAATTTAGGCCAAGGCT
TTCCCAATTTGACGGTCTGATTTTGTAAAGAAGCTGCGATCCAAGCTATT
AAAGATGCTAAAAACCAGTATGCTCCTGGATACGGCATTCCTCAGCTCAACT
CTGCTATAGCTGCGCGGTTCCTGAAGATACGGGTCTTGTGTTGATGCTGA
GAAAGAAGTTACTGTTACATCTGGTTGCACAGAAGCCATAGCTGCAGCTATG
TTGGGTTTAATAAACCCCTGGTGATGAAGTCATTCTCTTTGCACCGTTTTATGA
TTCTATGAAGCAACACTCTCTATGGCTGGTGCTAAAGTAAAAGGAATCACTT
TAGCTCCACCGGACTTCTCCATCCCTTTGGAAGAGCTTAAAGCTGCGGTAAAC
TAACAAGACTCGAGCCATCCTTATGAACACTCCGACACAACCCGACCGGGAA
GATGTTCACTAGGGAGGAGCTTGAACCAATTGCATCTCTCTGCATTGAAAAC
GATGTGCTTGTGTTCTGGATGAAGTATAGGATAAGCTTGGGTTTGAATGG
ATCACATTTCTATAGCTTCTCTTCCCGGTATGTATGAAAGAACTGTGACCATG
AATTCCTTGGGAAAGACTTTCTCTTAAACCGATGGAAGATCGGCTGGGCGA
TTGGCGCCGCTCATCTGACTTGGGGAGTTCCACAAGCACACTCTTACCTCAC
ATTGCCACATCAACACCAGGACAATGGGCAGCCGTTGCAGCTCTCAAGGC
ACCAGAGTCTTACTTCAAAGAGCTGAAAAGAGATTACAATGTGAAAAAGGAG
ACTCTGTTAAGGGTTTGAAGGAAGTCCGATTTACAGTGTTCCTATCGAOCG
GGACTTACTTTGTGTTGCTGATCACACTCCATTTGGAATGGAGAACGATGT
TGCTTTCTGTGAGTATCTTATTGAAGAAGTTGGGGTCTTGGATCCCAACG
AGCGTCTTTTATCTGAATCCAGAAGAAGGGAAGAATTTGGTTAGGTTTGCCTT
CTGTAAGACGAAGAGACGTTGCGTGGTGCAATTGAGAGGATGAAGCAGAA
GCTTAAGAGAAAAGTCTGA

```

10

20

【0163】

【表5】

配列番号2 シロイヌナズナGPTのアミノ酸配列

```

MYLDINGVMIKQFSFKASLLPFSSNFRQSSAKIHRPIGATMTTVSTQNESTQKPVQVAKR
LEKFKTTIFTQMSILAVKHGAINLGQGFPNFDGPDFVKEAAIQAIKDGNQYARGYGIPQ
LNSAIAARFREDTGLVVDPEKEVTVTSGCTEAIAAAMLGLINPGDEVILFAPFYDSYEAT
LSMAGAKVKGITLRPPDFSIPLEELKAAVTNKTRAILMNTPHNPTGKMFTREELETIASL
CIENDVLVFSDEVYDKLAFEMDHISIASLPGMYERTVTMNSLGKTFSLTGWKIGWAIAPP
HLTWGVRQAHSYLTFATSTPAQWAAVAALKAPESYFKELKRDNVKKETLVKGLKEV
GFTVFPSSGTYFVVADHTPPGMENDVAFCEYLIEEVGVVAIPTSVFYLNPEEGKNLVRFA
FCKDEETLRGAIERMKQKLKRKY

```

30

【0164】

【表 6】

配列番号 3 ブドウ GPT の DNA 配列

(3' 末端の) r b c S 3 C + ビティス属 (ブドウ) を有する C a m b i a 1 3 0 5 . 1 を示す。太字の A T G は開始部位、括弧内は c a t 1 イントロン、および下線が引かれた a c t a g t はオオムギ遺伝子中にスプライシングするために用いられるクローニング部位のスペルである。

```

AAAAAAGAAAAAAAACATATCTTGTTTGTCAAGTATGGGAAGTTTGAGATAA
GGACGAGTGAGGGGTTAAAATTTCAGTGGCCATTGATTTTGTAAATGCCAAGAA
CCACAAAATCCAATGGTTACCAATTCCTGTAAGATGAGGTTTGCTAACTCTTTT
TGTCCGTTAGATAGGAAGCCTTATCACTATATATACAAGGCGCTCCTAATAACC
TCTTAGTAACCAATTATTTTCAGCACCATAGTATGATCTGAGG(GTAAATTTCTAG
TTTTCTCCTTCATTTTCTTGTTAGGACCCTTTTCTCTTTTTATTTTTTTGAGC
TTTGATCTTTCTTTAACTGATCTATTTTTTAATTGATTGGTTATGGTGTAATA
TTACATAGCTTTAACTGATAATCTGATTACTTTATTTTCGTGTGTCTATGATGAT
GATGATAGTTACAG)AACCGACGAACTAGTATGCAGCTCTCTCAATGTACCTG
GACATTCCTCAGAGTTGCTTAAAAGACCAGCCTTTTTTAAGGAGGAGTATTGATA
GTATTTTCGAGTAGAAGTAGGTCCAGCTCCAAGTATCCATCTTTCATGGCGTC
CGCATCAACGGTCTCCGCTCCAAATACGGAGGCTGAGCAGACCCATAACCC
CCCTCAACCTCTACAGGTTGCAAAGCGCTTGGAGAAATTCAAAACAACAATC
TTTACTCAAATGAGCATGCTTGCCATCAAACATGGAGCAATAAACCTTGCCA
AGGGTTTCCCAACTTTGATGGTCTGAGTTTGTCAAAGAAGCAGCAATTCAA
GCCATTAAGGATGGGAAAAACCAATATGCTCGTGGATATGGAGTTCCTGATC
TCAACTCTGCTGTTGCTGATAGATTCAAGAAGGATACAGGACTCGTGGTGGA
CCCCGAGAAGGAAGTTACTGTTACTTCTGGATGTACAGAAGCAATTGCTGCT
ACTATGCTAGGCTTGATAAATCCTGGTGATGAGGTGATCCTCTTTGCTCCATT
TTATGATTCCATGAAGCCACTCTATCCATGGCTGGTGCCCAAATAAAATCCA
TCACTTTACGTCCTCCGGATTTTGCTGTGCCCATGGATGAGCTCAAGTCTGC
AATCTCAAAGAATACCCGTGCAATCCTTATAAACACTCCCCATAACCCACAG
GAAAGATGTTCACAAGGGAGGAACTGAATGTGATTGCATCCCTCTGCATTGA
GAATGATGTGTTGGTGTCTTACTGATGAAGTTTACGACAAGTTGGCTTTTGGAAA
TGGATCACATTTCCATGGCTTCTCTTCCCTGGGATGTACGAGAGGACCGTGAC
TATGAATTCCTTAGGGGAAAACTTTCTCCCTGACTGGATGGAAGATTGGTTGG
ACAGTAGCTCCCCCACACCTGACATGGGGAGTGAGGCAAGCCCACTCATTG
CTCACGTTTGCTACCTGCACCCCAATGCAATGGGCAGCTGCAACAGCCCTC
CGGGCCCCAGACTCTTACTATGAAGAGCTAAAGAGAGATTACAGTGCAAAGA
AGGCAATCCTGGTGGAGGGATTGAAGGCTGTGCGTTTCAGGGTATACCCAT
CAAGTGGGACCTATTTTGTGGTGGTGGATCACACCCCATTTGGGTTGAAAGA
CGATATTGCGTTTGTGAGTATCTGATCAAGGAAGTTGGGGTGGTAGCAATT
CCGACAAGCGTTTTCTACTTACACCCAGAAGATGGAAAGAACCTTGTGAGGT
TTACCTTCTGTAAAGACGAGGGAACTCTGAGAGCTGCAGTTGAAAGGATGAA
GGAGAACTGAAGCCTAAACAATAGGGGACGCTGA

```

【 0 1 6 5 】

【表 7】

配列番号 4 ブドウ GPT の アミノ酸配列

```

MVDLRNRRTSMLSQCTWTFPELLKRPAFLRRSIDSISSRSRSSSKYPSFMASA
STVSAPNTEAEQTHNPPQPLQVAKRLEKFKTTIFTQMSMLAIKHGAINLGQGFN
FDGPEFVKEAAIQAIKDQKNQYARGYGVPDLNSAVADRFKKDTGLVVDPEKEVT
VTSGCTEIAAATMLGLINPGDEVILFAPFYDSYEATLSMAGAIKISITLRPPDFAVP
MDELKSAISKNTAILINPTGKMFTRIELNVIASLCIENDVLVFTDEVYDKLA
FEMDHISMASLPQMYERTVTMNSLGKTFSLTGWKIGWTVAPPHLTWQVRQAHS
FLTATCTPMQWAAATALRAPDSYEEELKRDYSAKKAILVEGLKAVGFRVYPSS
GTYFVVDHTPFGLKDDIAFCEYLIKEVGVAIPTSVFYLHPEDGKNLVRFTFCKD
EGTLRAAVERMKEKLKPKQ

```

【 0 1 6 6 】

【表 8】

配列番号5 イネGPTのDNA配列

大腸菌における発現のために最適化されたイネGPTのコドン；非翻訳配列は小文字で示す。

atgtggATGAACCTGGCAGGCTTTCTGBCAACCCCGCAACCGCAAC
 CCGTCATGAAATGCCGCTGAACCGAGCAGCAGCGGAGCTTTCTGCTGAG
 CAGCCTGCGTCGTAGCCTGGTGGCGAGCCTGCGTAAAGCGAGCCCGGCAG
 CAGCAGCAGCACTGAGCCCGATGGCAAGCGCAAGCACCGTGGCAGCAGAA
 AACGGTGCAGCAAAAGCAGCAGCAGAAAAACAGCAGCAGCAGCCGGTGCA
 GGTGGCGAAACGTCTGGAAAAATTTAAACCCACCATTTTTACCCAGATGAGC
 ATGCTGGCGATTAAACATGGCGCGATTAACTGGGCCAGGGCTTTCC
 GAACTTTGATGGCCCGGATTTTGTGAAAGAAGCGGCGATTACGGCGATTAAAC
 GCGGGCAAAAACCAAGTATGCGCGTGGCTATGGCGTGCCGGAACGAACAGC
 CGGATTGCGGAACGTTTTCTGAAAGATAGCGGCCCTGCAGGTGGATCCGGAA
 AAAGAAGTGACCGTGACCAGCGGCTGCACCGAAGCGATTGCGGCGACCAT
 CTGGGCCTGATTAAACCGGGCGATGAAGTGATTCTGTTTGGCGCGTTTTATG
 ATAGCTATGAAGCGACCCCTGAGCATGGCGGGCGCGAACGTGAAAGCGGATTA
 CCCTGCGTCCGCGGATTTTAGCGTGCCGCTGGAAGAACTGAAAGCGGCCG
 TGAGCAAAAACACCCGTGCGATTATGATTAAACCCCGCATAACCCGACCGG
 CAAAATGTTTACCCGTGAAGAACTGGAATTTATTGCGACCCCTGTGCAAAGAA
 AACGATGTGCTGCTGTTTGGCGATGAAGTGATGATAAACTGGCGTTTGAAG
 CGGATCATATTAGCATGGCGAGCATTCCGGGCATGTATGAACGTACCGTGAC
 CATGAACAGGCTGGGCAAAAACCTTTAGCCTGACCGGCTGBAAAATTGGCTG
 GGCGATTGGCGCCCGCGCATCTGACCTGGGGCGTGCGTCAGGCACATAGCTT
 TCTGACCTTTGCAACCTGCACCCCGATGCAGGCGAGCCCGCGCAGCAGCACT
 GCGTGACCCGGATAGCTATTATGAAGAACTGCGTCTGTGATTATGGCGCGAAA
 AAAGCCCTGCTGGTGAACGGCGCTGAAAGATGCGGGCTTTATTGTGTATCCG
 AGCAGCGGCACCTATTTTGTGATGGTGGATCATACCCCGTTTGGCTTTGATA
 ACGATATTGAATTTTGCGAATATCTGATTGTTGAAGTGGGCGTGGTGGCGAT
 TCCGCGGAGCGTGTTTTATCTGAACCCGGAAGATGGCAAAAACCTGGTGCG
 TTTTACCTTTTGCAAAGATGATGAAACCCCTGCGTGCGGCGGTGGAACGTATG
 AAAACCAAACCTGCGTAAAAAAAAGCTTgaggcgccactcgagcaaccacacccacccacactg

10

20

※

【0167】

【表 9】

配列番号6 イネGPTのアミノ酸配列

アミノ末端のアミノ酸であるクローニングに関するMWおよびp e t 2 8 ベクターからのH
 i s タグ配列は斜体で示す。

30

MWMNLAGFLATPATATATRHEMPLNPSSSASFLLSSLRRSLVASLRKASPA
 ALSPMASASTVAAENGAAKAAAEKQQQQPVQVAKRLEKFKTTIFTQMSMLAIKH
 GAINLGQGFNFDGPDFVKEAAIQAINAGKNQYARGYGVPENLSAIAERFLKDSG
 LQVDPEKEVTVTSGCTEIAAATILGLINPGDEVILFAPFYDSYEATLSMAGANVKAI
 TLRPPDFSVPLEELKAAVSKNTRAIMINTPHNPTGKMFTREELEFIATLCKENDVL
 LFADEVYDKLAFEADHISMASIPGMYERTVTMNSLGKTFSLTGWKIGWAIAPPHL
 TWGVRQAHSLTFATCTPMQAAAAAALRAPDSYEEELRRDYGAKKALLVNGLK
 DAGFIVYPSSGTYFVMVDHTPFPGFDNDIEFCEYLIREVGVAIPPSVFYLNPEDG
 KNLVRFTECKDDETLRAAVERMKTCLRKKKLAAALEHHHHHHH

【0168】

【表 10】

配列番号7 ダイズGPTのDNA配列

大腸菌における発現に関し、ダイズと一体になっている、開始コドンからのT O P O 1 5 1
D。ベクター配列は斜体で示す。

ATGCAATCATCAACCATCAACCATGGTAAGCCTATCCCTAACCCCTCTCCTCGGTC
TCGATTCTACGGAACCTGTATTTTCAGGGAAATTGATCCGCTTCACCGCGAAA
CGTCTGGAAAAATTTACAGACCACCATTTTTACCCAGATGAGCCTGCTGGCGA
TAAACATGGCGCGATTAAACCTGGGCCAGGGCTTTCCGAACCTTGATGGCCC
GGAATTTGTGAAAGAAGCGCGCATTGAGCGGATTCGTGATGGCAAAAACCA
GTATGCGCGTGGCTATGGCGTGCCGGATCTGAACATTGCGATTGCGGAACG
TTTTAAAAAGATACCGGCCTGGTGGTGATCCGGAAAAAGAAATTACCGTG
ACCAGCGGCTGCACCGAAGCGATTGCGGCGACCATGATTGGCCTGATTAAC
CCGGGCGATGAAGTGATTATGTTTGCGCCGTTTTATGATAGCTATGAAGCGA
CCCTGAGCATGGCGGGCGCGAAAGTGAAAGGCATTACCTGCGTCCGCCG
GATTTTGGCGTGCCGCTGGAAGAACTGAAAAGCACCATAGCAAAAAACCCC
GTGCGATTCTGATTAACACCCCGCATACCCGACCGGCAAAATGTTTACCCG
TGAAGAACTGAACTGCATTGCGAGCCTGTGCATTGAAAACGATGTGCTGGTG
TTTACCGATGAAGTGATGATAAACTGGCGTTTGATATGGAACATATTAGCAT
GGCGAGCCTGCCGGGCATGTTTGAACGTAGCGTGACCCCTGAACAGCCTGGG
CAAAACCTTTAGCCTGACCGGCTGGAAAATTGGCTGGGCGATTGCGCCGCC
GCATCTGAGCTGGGGCGTGCCTCAGGCGCATGCGTTTCTGACCTTTGCAAC
CGCACATCCGTTTTCAAGTGCAGCAGCAGCAGCAGCAGTGCCTGCACCGGATAG
CTATTATGTGGAAGTGAACGTGATTATATGGCGAAACGTGCGATTCTGATTG
AAGGCCTGAAAGCGGTGGGCTTTAAAGTGTTCAGCAGCAGCGGCACCTATTT
TGTGGTGGTGGATCATACCCGTTTGGCCTGGAAAACGATGTGGCGTTTTCG
GAATATCTGGTGAAGAAGTGGGCGTGGTGGCGATTCCGACCGCGTGT
TATCTGAACCCGGAAGAAGGCAAAAACCTGGTGGCTTTTACCTTTGCAAAG
ATGAAGAAACCATTCGTAGCCGCGTGGAAACGTATGAAAGCGAACTGCGTAA
AGTCGAATAA

10

20

【0169】

【表 11】

配列番号8 ダイズGPTのアミノ酸配列

翻訳されたタンパク質産物、ベクター配列は斜体で示す。

MHHHHHHGKPIPNPLLGLDSTENLYFQGIDPFTAKRLEKFQTTIFTQMSLLAIKHG
AINLGQGFNFDGPEFVKEAAIQAIRDGKNQYARGYGVPDLNIAIERFKKDTGL
VVDPEKEITVSGTEAIAATMIGLINPGDEVIMFAPFYDSYEATLSMAGAKVKGIT
LRPPDFAVPLEELKSTISKNTAILINTPHNPTGKMFREELNCIASLCIENDVLVF
TDEVYDKLAFDMEHISMASLPGMFERTVTLNSLGKTFSLTGWKIGWAIAPPHLS
WGVQRQAHAFLTAFATAHPFQCAAAAALRAPDSYYVELKRDYMAKRILIEGLKAV
GFKVFPSSGTYFVVVDHTPFGLENDVAFCEYLVKEVGVAIPTSVFYLNPEEGK
NLVRFTFCCKDEETIRSAVERMKAKLRKVD

30

【0170】

【表 1 2】

配列番号 9 オオムギGPTのDNA配列

イントロンが除去されている、開始部位からのコード配列

ATGGTAGATCTGAGGAACCGACGA**ACTAGT**ATGGCATCCGCCCCCGCCTCCGC
 CTCGCGGGCCCTCTCCACCGCCGCCCGCGACAACGGGGCCGCCAAGCCC
 ACGGAGCAGCGGCCGGTACAGGTGGCTAAGCGATTGGAGAAGTTCAAAACAAC
 AATTTTCACACAGATGAGCATGCTCGCAGTGAAGCATGGAGCAATAAACCTTGG
 ACAGGGGTTTCCCAATTTTGATGGCCCTGACTTTGTCAAAGATGCTGCTATTGA
 GGCTATCAAAAGCTGGAAAGAATCAGTATGCAAGAGGATATGGTGTGCCTGAATT
 GAACTCAGCTGTTGCTGAGAGATTTCTCAAGGAACAGTGGATTGCACATCGATCC
 TGATAAGGAAGTTACTGTTACATCTGGGTGCACAGAAGCAATAGCTGCAACGAT
 ATTGGGTCTGATCAACCCTGGGGATGAAGTCATACTGTTTGCTCCATTCTATGAT
 TCTTATGAGGCTACACTGTCCATGGCTGGTGCGAATGTCAAAGCCATTACACTC
 CGCCCTCCGGACTTTGCAGTCCCTCTTGAAGAGCTAAAGGCTGCAGTCTCGAA
 GAATACCAGAGCAATAATGATTAATACACCTCACAAACCCTACGGGAAAATGTTG
 ACAAGGGAGGAACTTGAGTTCATTGCTGATCTCTGCAAGGAAAATGACGTGTTG
 CTCTTTGCCGATGAGGTCTACGACAAGCTGGCGTTTGAGGCGGATCACATATCA
 ATGGCTTCTATTCTGTCATGTATGAGAGGACCGTCACTATGAACTCCCTGGGG
 AAGACGTTCTCCTTGACCGGATGGAAGATCGGCTGGGCGATAGCACCAACCGCA
 CCTGACATGGGGCGTAAGGCAGGCACACTCCTTCCTCACATTGCGCACCTCCA
 CGCGGATGCAATCAGCAGCGGCGGGCGGCCCTGAGAGCACCGGACAGCTACTT
 TGAGGAGCTGAAGAGGGACTACGGCGCAAAGAAAGCGCTGCTGGTGGACGGG
 CTCAAGGCGGCGGGCTTCATCGTCTACCCCTTCGAGCGGAACCTACTTCAATCATG
 GTCGACCAACACCCCGTTCCGGTTCGACAACGACGTCGAGTTCTGCGAGTACTT
 GATCCGCGAGGTCCGGCTCGTGCCATCCCGCCAAGCGTGTTCCTACCTGAACC
 CGGAGGACGGGAAGAACCCTGGTGAGGTTCACTTCTGCAAGGACGACGACACG
 CTAAGGGCGGCGGTGGACAGGATGAAGGCCAAGCTCAGGAAGAAATGA

10

20

【0 1 7 1】

【表 1 3】

配列番号 10 オオムギGPTのアミノ酸配列

開始部位（イントロンが除去されている）から翻訳された配列

MVDLRNRRTSMASAPASASAALSTAAPADNGAAKPTEQRPVQVAKRLEKFKTTI
 FTQMSMLAVKHGAINLGQGFNFDGPDFVKDAAIEAIKAGKNQYARGYGVPELN
 SAVAERFLKDSGLHIDPDKEVTVTSGCTEIAAATILGLINPGDEVILFAPFYDSYEA
 TLSMAGANVKAITLRPPDFAVPLEELKAAVSKNTRAIMINTPHNPTGKMFTREEL
 EFIADLOCKENDVLLFADEVYDKLAFEADHISMASIPGMYERTVTMNSLGKTFSLT
 GWKIGWAIAPPHLTWGVRAHSFLTATSTPMQSA AAAALRAPDSYFEELKRQY
 GAKKALLVDGLKAAGFIVYPSSGTYFIMVDHTPFPGFDNDVEFCGYLIREVOVVAIP
 PSVFYLNPEDGKNLVRFTFCDDDTLRAAVDRMKAKLRKK

30

【0 1 7 2】

【表 1 4】

配列番号 1 1 ゼブラフィッシュ G P T の DNA 配列

大腸菌で発現するように設計されたゼブラフィッシュ (Danio rerio) 配列。太字の斜体はクローニングのためにか、または p E T 2 8 b ベクターから付加されたヌクレオチドを示す。

ATGTCCGTGGCGAAACGTCTGGAAAAATTTAAACCACCATTTTTACCCAGAT
 GAGCATGCTGGCGATTAAACATGGCGCGATTAACTGGGCCAGGGCTTTCC
 GAACTTTGATGGCCCCGATTTTGTGAAAGAAGCGGCGGATTGAGGCGATTTCGT
 GATGGCAACAACCCAGTATGCGCGTGGCTATGGCGTGCCGGATCTGAACATT
 GCGATTAGCGAACGTTATAAAAAAGATACCGGCGCTGGCGGTGGATCCGGAA
 AAAGAAATTACCGTGACCAGCGGCTGCACCGAAGCGATTGCGGCGACCGTG
 CTGGGCGCTGATTAACCCGGGCGATGAAGTGATTGTGTTTGGCGCGTTTATG
 ATAGCTATGAAGCGACCCCTGAGCATGGCGGGCGCGAAAGTGAAAGGCATTA
 CCCTGCGTCCCGCGGATTTTGGCGTGCCGATTGAAGAACTGAAAAGCACCA
 TTAGCAAAAACACCCGTGCGATTCTGCTGAACACCCCGCATACCCGACCG
 GCAAAATGTTTACCCCGGAAGAACTGAACACCATTGCGAGCCTGTGCATTGA
 AAACGATGTGCTGGTGTGTAGCGATGAAGTGATGATAAACTGGCGTTTGAT
 ATGGAACATATTAGCATTGCGAGCCTGCCGGGCGATGTTTGAACGTACCGTGA
 CCATGAACAGCCTGGGCAAAACCTTTAGCCTGACCGGCTGGAAAATTGGCT
 GGGCGATTGCGCGCGCCGATCTGACCTGGGGCGTGCGTCAAGGCGCATGCG
 TTTCTGACCTTTGCAACCAGCAACCCGATGCAGTGGGCAGCAGCAGTGCGA
 CTGCGTGCGACCGGATAGCTATTATACCGAACTGAAACGTGATTATATGGCGA
 AACGTAGCATTCTGGTGGAAGGCCTGAAAGCGGTGGGCTTTAAAGTGTTTCC
 GAGCAGCGGCACTATTTTGTGGTGGTGATCATACCCCGTTTGGGCATGAA
 AACGATATTGCGTTTTGCGAATATCTGGTGAAAGAAGTGGGCGTGGTGGCGA
 TTCCGACCGAGCGTGTTTATCTGAACCCGGAAGGAAGGCAAAAACCTGGTGCG
 TTTTACCTTTTGCAAGATGAAGGCACCCCTGCGTGCGGCGGTGGATGATG
 AAAGAAAACTGCGTAAAGT**CGACAAGCTTGGCGGCCGCACTCGAGCACCAAC**
CACCAACCACTGA

10

20

【 0 1 7 3 】

【表 1 5】

配列番号 1 2 ゼブラフィッシュ G P T の アミノ酸配列

大腸菌においてクローニングされ、発現したゼブラフィッシュのアミノ酸配列 (太字の斜体で示すアミノ酸は、ベクター／クローニング、および C 末端における His タグから付加された)

MSVAKRLEKFKTTIFTQMSMLAIKHGAINLGQGFNFDGPDFVKEAAIQAIRDGN
NQYARGYGVPDLNIAISERYKKDTGLAVDPEKEITVTSCTEAIATVLGLINPGD
EVVIFAPFYDSYEATLSMAGAKVKGITLRPPDFALPIEELKSTISKNTRAILLNTPH
NPTGKMFTPEELNTIASLCIENDVLVFSDEVYDKLAFDMEHISIASLPGMFERTVT
MNSLGKTFSLTGWKIGWAIAPPHLTWGVROAHAFLLFATSNPMQWAAVALRA
PDSYYTELKRDYMAKRSILVEGLKAVGFKVFPSSGTYFVVVDHTPFQGHENDIAFC
EYLVKEVGVVAIPTSVFYLNPEEGKNLVRFTFOKDEGTLRAAVDRMKEKLRKVD
KLAAALEHHHHHHH-

30

【 0 1 7 4 】

【表 16】

配列番号 13 シロイヌナズナのトランケートされたGPT-30コンストラクトのDNA
配列

ターゲッティング配列から30のアミノ酸が除去されているシロイヌナズナGPT。

ATGGCCAAAATCCATCGTCCTATCGGAGCCACCATGACCACAGTTTCGACTCAG
AACGAGTCTACTCAAAAACCCGTCAGGTGGCGAAGAGATTAGAGAAGTTCAAG
ACTACTATTTTCACTCAAATGAGCATATTGGCAGTTAAACATGGAGCGATCAATT
TAGGCCAAGGCTTTCCCAATTTGACGGTCTGATTTTGTAAAGAAGCTGCGA
TCCAAGCTATTAAAGATGGTAAAAACAGTATGCTCGTGGATACGGCATTCTCA
GCTCAACTCTGCTATAGCTGCGCGGTTTCGTGAAGATACGGGTCTTGTGTTGA
TCCTGAGAAAGAAGTTACTGTTACATCTGGTTGCACAGAAGCCATAGCTGCAGC
TATGTTGGGTTTAATAAACCCCTGGTGATGAAGTCATTCTCTTGCACCGTTTTAT
GATTCCTATGAAGCAACACTCTCTATGGCTGGTGCTAAAGTAAAAGGAATCACTT
TACGTCCAACCGGACTTCTCCATCCCTTTGGAAGAGCTTAAAGCTGCGGTAACCTA
ACAAGACTCGAGCCATCCTTATGAACACTCCGCACAACCCGACCGGGAAGATGT
TCACTAGGGAGGAGCTTGAAACCATTGCATCTCTCTGCATTGAAAACGATGTGC
TTGTGTTCTCGGATGAAGTATACGATAAGCTTGCGTTTGAAATGGATCACATTTCT
TATAGCTTCTCTTCCCGGTATGTATGAAAGAACTGTGACCATGAATTCCTGGGA
AAGACTTTCTCTTTAACCGGATGGAAGATCGGCTGGGCGATTGCGCCGCTCAT
CTGACTTGGGGAGTTGACAAAGCAGCTTACCTCACATTGCGCCACATCAACA
CCAGCACAATGGGCAGCCGTTGCAGCTCTCAAGGCACAGAGTCTTACTTCAAA
GAGCTGAAAAGAGATTACAATGTGAAAAAGGAGACTCTGGTTAAGGGTTTGAAG
GAAGTCGGATTACAGTGTTCCCATCGAGCGGACTTACTTTGTGGTTGCTGAT
CACACTCCATTTGGAATGGAGAACGATGTTGCTTTCTGTGAGTATCTTATTGAAG
AAGTTGGGGTCGTTGCGATCCCAACGAGCGTCTTTTATCTGAATCCAGAAGAAG
GGAAGAATTTGGTTAGGTTTGCCTTCTGTAAAGACGAAGAGACGTTGC
GTGGTGCAATTGAGAGGATGAAGCAGAAGCTTAAGAGAAAAGTCTGA

10

20

【0175】

【表 17】

配列番号 14 シロイヌナズナのトランケートされたGPT-30コンストラクトのアミノ
酸配列

MAKIHRRPIGATMTTVSTQNESTQKPQVAKRLEKFKTTIFTQMSILAVKHGAINLG
QGFPNFDGPDFVKEAAIQAIKDGNQYARGYGIPQLNSAIAARFREDTGLVVDPE
KEVTVTSGCTEAIAAAMLGLINPGDEVILFAPFYDSYEATLSMAGAKVKGITLRPP
DFSIPLEELKAAVTNKTRAILMNTPHNPTGKMFTREELETIASLCIENDVLVFSDEV
YDKLAFEMDHISIASLPGMYERTVTMNSLGKTFSLTGWKIGWAIAPPHLTWGV
QAHSYLT FATSTPAQWAAVAALKAPESYFKELKRDYNVKKETLVKGLKEVGFTV
FPSSGTYFVVADHTPF GMENDVAFCEYLIEEVGVVAIPTSVFYLNPEEGKNLVRF
AFCKDEETLRGAIERMKQKLKRKV

30

【0176】

【表 18】

配列番号 15 シロイヌナズナのトランケートされた GPT-45 コンストラクトの DNA
配列

ターゲッティング配列中の 45 残基が除去されているシロイヌナズナ GPT

ATGGCGACTCAGAACGAGTCTACTCAAAAACCCGTCCAGGTGGCGAAGAGA
TTAGAGAAGTTCAAGACTACTATTTTCACTCAAATGAGCATATTGGCAGTTAA
ACATGGAGCGATCAATTTAGGCCAAGGCTTTCCCAATTTGACGGTCTCTGAT
TTTGTTAAAGAAAGCTGCGATCCAAGCTATTAAAGATGGTAAAAACCAAGTATGC
TCGTGGATACGGCATTCTCAGCTCAACTCTGCTATAGCTGCGCGGTTTCGT
GAAGATACGGGTCTTGTTGTTGATCCTGAGAAAGAAGTTACTGTTACATCTG
GTTGCACAGAAGCCATAGCTGCAGCTATGTTGGGTTTAATAAACCCCTGGTGA
TGAAGTCATTCTCTTTGCACCGTTTTATGATTCCCTATGAAGCAACACTCTCTAT
GGCTGGTGCTAAAGTAAAAGGAATCACTTTACGTCCACCGGACTTCTCCATC
CCTTTGGAAGAGCTTAAAGCTGCGGTAACCTAACAAGACTCGAGCCATCCTTA
TGAACACTCCGCACAACCCGACCGGGAAGATGTTCACTAGGGAGGAGCTTG
AAACCATTGCATCTCTCTGCATTGAAAACGATGTGCTTGTGTTCTCGGATGAA
GTATACGATAAGCTTGCGTTTGAAATGGATCACATTTCTATAGCTTCTCTTCC
CGGTATGTATGAAAGAACTGTGACCATGAATTCCTGGGAAAGACTTTCTCTT
TAACCGGATGGAAGATCGGCTGGGCGATTGCGCCGCTCATCTGACTTGGG
GAGTTCGACAAGCAGACTCTTACCTCACATTGCGCACATCAACACCAGCACAA
ATGGGCGAGCCGTTGCAGCTCTCAAGGCACCAGAGTCTTACTTCAAAGAGCT
GAAAAGAGATTACAATGTGAAAAAGGAGACTCTGGTTAAGGGTTTGAAGGAA
GTCGGATTTACAGTGTTCCCATCGAGCGGGACTTACTTTGTGGTTGCTGATC
ACACTCCATTTGGAATGGAGAACGATGTTGCTTTCTGTGAGTATCTTATTGAA
GAAGTTGGGGTCTGTTGCGATCCCAACGAGCGTCTTTTATCTGAATCCAGAAG
AAGGGAAGAATTTGGTTAGGTTTGCGTTCTGTAAAGACGAAGAGACGTTGCG
TGGTGCAATTGAGAGGATGAAGCAGAAGCTTAAGAGAAAAGTCTGA

10

20

【0177】

【表 19】

配列番号 16 シロイヌナズナのトランケートされた GPT-45 コンストラクトのアミノ
酸配列

MATQNESTQKPQVAKRLEKFKTTIFTQMSILAVKHGAINLQQGFNFDGPDFVK
EAAIQAIKDGKNQYARGYGIPQLNSAIAARFREDTGLVVDPEKEVTVTSGCTEIAIA
AAMLGLINPGDEVILFAPFYDSYEATLSMAGAKVKGITLRPPDFSIPLEELKAAVT
NKTRAILMNTPHNPTGKMFTREELETIASLOIENDVLVFSDEVYDKLAFEMDHISI
ASLPGRMYERTVTMNSLGKTFSLTGWKIGWAIAPPHLTWGVVQAHSYLTFFATSTP
AQWAAVAALKAPESYFKELKRDYNNVKETLVKGLKEVGFTVFPSSGTYFVVADH
TPFGMENDVAFCEYLIEEVGVVAIPTSVFYLNPEEGKNLVRFAFCKDEETLRGAI
ERMKQKLRKV

30

【0178】

【表 20】

配列番号17 トマトルビスコ (Tomato Rubisco) のプロモーター

トマトルビスコのKpnIからNcoIまでのrbcs3Cプロモーター配列

GGTACCGTTTGAATCCTCCTTAAAGTTTTCTCTGGAGAACTGTAGTAATTT
 TACTTTGTTGTGTTCCCTTCATCTTTGAATTAATGGCATTGTTTTAATACTAA
 TCTGCTTCTGAACTTGTAAATGTATGTATATCAGTTTCTTATAATTTATGCAAG
 TAATATCTTCCATTCTCTATGCAATTGCCTGCATAAGCTCGACAAAAGAGTAC
 ATCAACCCCTCCTCCTCTGGACTACTCTAGCTAACTTGAATTTCCCTTAAAG
 ATTATGAAATTGATATATCCTTAACAAACGACTCCTTCTGTTGGAAAATGTAGT
 ACTTGTCTTTCTCTTTTGGGTATATATAGTTTATATACACCATACTATGTACA
 ACATCCAAGTAGAGTGAAATGGATACATGTACAAGACTTATTTGATTGATTGA
 TGACTTGAGTTGCCCTTAGGAGTAACAAATTCTTAGGTCAATAAATCGTTGATT
 TGAAATTAATCTCTCTGTCTTAGACAGATAGGAATTATGACTTCCAATGGTCC
 AGAAAGCAAAGTTTCGCACTGAGGGTATACTTGAATTTGAGACTTGCACAGGT
 CCAGAAACCAAAGTTCCCATCGAGCTCTAAAATCAATCTTTGGAATGAAATT
 CAATTAGAGATAAGTTGCTTCATAGCATAGGTAAAATGGAAGATGTGAAGTAA
 CCTGCAATAATCAGTGAAATGACATTAATACACTAAATACTTCATATGTAATTA
 TCCTTTCCAGGTTAACAATACTCTATAAAGTAAGAATTATCAGAAATGGGCTC
 ATCAAACTTTTGTACTATGTATTTGATATAAGGAAGTATAACTATACATAAGTG
 TATACACAACCTTTATTCCTATTTTGTAAAGGTGGAGAGACTGTTTTCGATGGA
 TCTAAAGCAATATGTCTATAAAATGCATTGATATAATAATTATCTGAGAAAATC
 CAGAAATTGGCGTTGGATTATTTGAGCCAAATAGAAGTTTGTACCATACTTGT
 GATTCCTTCTAAGTTAAGGTGAAGTATCATTCAAAACAGTTTTCCCAAAGT
 ACTACTCAACAAAGTTTCCCTTTGTAGAATTAACAGTTCAAATATATGGCGCAG
 AAATTACTCTATGCCCAAACCAAACGAGAAAGAAACAAAATACAGGGGTTG
 CAGACTTTATTTTCTGTGTTAGGGTGTGTTTTTTCATGTAATTAATCAAAAAATA
 TTATGACAAAAACATTTATACATATTTTACTCAACACTCTGGGTATCAGGGTG
 GGTTGTGTTTCGACAATCAATATGGAAAGGAAGTATTTTCTTATTTTTTAGTT
 AATATTTTCAAGTTATACCAAACATACCTTGTGATATTATTTTTAAAAATGAAAAA
 CTCGTGAGAAAGAAAAAGCAAAAGCAACAAAAAATTGCAAGTATTTTTTAAA
 AAAGAAAAAATAACATATCTTGTGTTGTCAGTATGGGAAGTTTGAAGTAAGGA
 CGAGTGAGGGGTTAAATTCAGTGGCCATTGATTTTGTAAATGCCAAGAACCA
 CAAAATCCAATGGTTACCATTCCTGTAAGATGAGGTTTGTAACTCTTTTTGT
 CCGTTAGATAGGAAGCCTTATCACTATATATACAAGGCGCTCCTAATAACCTCT
 TAGTAACCAATTATTTGAGCACCATTGG

10

20

【0179】

【表 21】

配列番号18 バンブーGPTのDNA配列

ATGGCCCTCCGCGGGCGCTCTCCACCGTCCGCCACCGCCGCGGACGGCGTCCG
 GAAGCCGACGGAGAAAGCAGCCGGTACAGGTCGCAAGCGTTTGGAAAAGTT
 TAAGACAACAATTTTACACAGATGAGCATGCTTGCCATCAAGCATGGAGCA
 ATAAACCTCGGCCAGGGCTTTCCGAATTTTGATGGCCCTGACTTTGTGAAAG
 AAGCTGCTATTCAAGCTATDAATGCTGGGAAGAATCAGTATGCAAGAGGATA
 TGGTGCTGCTGAACTGAACTCGGCTGTTGCTGAAAGGTTCTGAAAGGACAGT
 GGCTTGCAAGTCGATCCCGAGAAGGAAGTTACTGTCAATCTGGGTGCACG
 GAAGCGATAGCTGCAACGATATTGGGTCTTATCAACCCTGGCGATGAAGTGA
 TCTTGTGTTGCTCCATTCTATGATTATACAGGGCTACGCTGTGATGGCTGGT
 GCCAATGTAAAAGCCATTACTCTCCGCTCCTCCAGATTTTGCAGTCCCTCTTGA
 GGAGCTAAAGGGCCACAGTCTCTAAGAACACCAGAGCGATAATGATAAACACA
 CCACACAATCCTACTGGGAAAATGTTTTCTAGGGAAGAACTTGAATTCATTGC
 TACTCTCTGCAAGAAAAATGATGTGTTGCTTTTTGCTGATGAGGTCTATGACA
 AGTTGGCATTGAGGCAGATCATATATCAATGGCTTCTATTCTGBCATGTAT
 GAGAGGACTGTGACTATGAACTCTCTGGGAAGACATTCTCTAACAGGAT
 GGAAGATCGGTTGGGCAATAGCACCCACACCTGACATGGGGTGTAAAGGC
 AGGCACACTCATTCCTCACATTTGCCACCTGCACACCAATGCAATCGGCGGC
 GSCGGCGGCTCTTAGAGCACCAGATAGCTACTATGGGGAGCTGAAGAGGGA
 TTACGGTGCAAGAAAGCGATACTAGTCGACGGACTCAAGGCTGCAGGTTTT
 ATTGTTTACCCTTCAAGTGGAAACATACTTTGTGATGGTGCATCACACCCCGTT
 TGGTTTCGACAATGATATTGAGTTCTGCGAGTATTTGATCCGCGAAGTCGGT
 GTTGTGCGCATACCACCAAGCGTATTTTATCTCAACCTGAGGATGGGAAGA
 ACTTGGTGAGGTTACCTTCTGCAAGGATGATGATACGCTGAGAGCCGCAGT
 TGAGAGGATGAAGACAAAGCTCAGGAAAAAATGA

30

40

【0180】

50

配列番号 19 : バンブーGPTのアミノ酸配列

MASAAVSTVATAADGVAKPTEKQPVQVAKRLEKFKTTIFTQMSMLAIKHGAINLG
QGFPNFDGPDFVKEAAIQAINAGKNQYARGYGVPELNSAVAERFLKDSGLQVDP
EKEVTVTSGCTEAIATILGLINPGDEVILFAPFYDSYEATLSMAGANVKAITLRPP
DFAVPLEELKATVSKNTRAIMINTPHNPTGKMFSREELEFIATLOKKNDVLLFADE
VYDKLAFEADHISMASIPGMYERTVTMNSLGKTPSLTGWKIGWAIAPPHLTWGV
RQAHSLTFATCTPMQSAAAAALRAPDSYYGELKRDYGAKKAILVDGLKAAGFIV
YPSSGTYFVMVDHTFPFGFDNDIEFCEYLIREVGVAIPPSVFYLNPEDGKNLVR
TFCKDDDTLRAAVERMKTKLRKK

【 0 1 8 1 】

10

【表 2 3】

配列番号20:1305. 1+rbcS3cプロモーター+イネGPT遺伝子を含むcat1
イントロン

(3' 末端の) r b c S 3 c + イネ G P T 遺伝子を含む C a m b i a 1 3 0 5 . 1。下線が付された A T G は開始部位であり、括弧内は c a t 1 イントロンであり、下線が付された a c t a g t はイネ遺伝子中でスプライシングするために用いられるクローニング部位のスペルである。

AAAAAAGAAAAAACAATATCTTGTGTTTGTCAGTATGCGAAGTTTGAGATAA
GGACGAGTGAGGGGTTAAATCTCAGTGGCCATTGATTTTGAATGCCAAGAA
CCACAAAATCCAATGGTTACCATTCTGTAAAGATGAGGTTTGCTAACTCTTTT
TGTCGGTTAGATAGGAAGCCTTATCACTATATATAAAGGCGCTCCTAATAACC
TCTTAGTAACCAATTATTTGAGCACCATGGTAGATCTGAGG(GTAAATTTCTAG
TTTTCTCCTTCATTTTCTTGTTAGGACCCCTTTCTCTTTTATTTTTTTGAGC
TTTGATCTTTCTTTAAACTGATCTATTTTTTAATTGATTGGTTATGGTGTAATA
TTACATAGCTTTAACTGATAATCTGATTACTTTATTTCTGTGTCTATGATGAT
GATGATAGTTAAG)AACCGACGAAGTATGAATCTGCGCGGCTTTCTCG
CCACGCGCGCGACCGCGACCGCGACGCGGCATGAGATGCCGTTAAATCCC
TCCTCCTCGCGCTCCTTCTCCTCTCCTCGCTCGCGCGCTCGCTCGTCTCGG
CGCTCGGGAAGGCTCCTCGCGCGCGCGCGCGCGCTCTCCCCATGGC
CTCCGCGTCCACCGTCTCGCGCGCGAGAACGCGCGCGCAAGGCGGCGGCG
GAGAAGGAGCAGCAGCAGCCTGTGCAGGTTGCAAAGCGGTTGGAAAAGTTT
AAGACGACCATTTTACACAGATGAGTATGCTTGCATCAAGCATGGAGCAA
TAAACCTTGGCCAGGTTTTCCGAATTTGATGGCCCTGACTTTGTAAAGA
GGCTGCTATTCAAGCTATCAATGCTGGGAAGAATCAGTACGCAAGAGGATAT
GGTGTGCTGAACTGAACTCAGCTATTGCTGAAAGATTCTGAAGGACAGCG
GACTGCAAGTCGATCCGGAGAAGGAAGTTACTGTCACATCTGGATGCACAG
AAGCTATAGCTGCAACAATTTAGGTCTAATTAATCCAGGCGATGAAGTGATA
TTGTTTGCTCCATTCTATGATTCATATGAGGCTACCTGTCAATGGCTGGTGC
CAAGGTAAAGCCATTACTCTCGGCTCCTCAGTTTTTTCAGTCCCTCTTGAAG
AGCTAAAGGCTCGACTCTCGAAGCACCAGAGCTATTATGATAAACACCCCC
GCACAATCCTACTGGGAAAAATGTTTACAAGGGAAGAACTTGAGTTTATTGCC
ACTCTCTGCAAGGAAAATGATGTGCTGCTTTTTGCTGATGAGGTCTACGACA
AGTTAGCTTTTGAGGCAGATCATATATCAATGGCTTCTATTCTGBCATGTAT
GAGAGGACCGTGACCATGAACTCTCTTGGGAAGACATTCTCTCTTACAGGAT
GGAAGATCGGTTGGGCAATGACACCGCCACACCTGACATGGGGTGTAAGGC
AGGCACACTCATTCTCACGTTTGCGACCTGCACACCAATGCAAGCAGCTGC
AGCTGCAGCTCTGAGAGCACCAGATAGCTACTATGAGGAACCTGAGGAGGGA
TTATGGAGCTAAGAAGGCATTGCTAGTCAACGACTCAAGGATGCAGGTTTC
ATTGTCTATCCTTCAAGTGGAACATACTTCTGTCATGGTGCACACACCCOATT
TGGTTTCGACAATGATTTGAGTTCTGCGAGTATTTGATTCCGGAAGTCCGT
GTTGTCGCCATACCACCTAGTGTATTTATCTCAACCCTGAGGATGGGAAGA
ACTTGGTGAGGTTCACTTTTGAAGGATGATGAGACGCTGAGAGCCGCGG
TTGAGAGGATGAAGACAAAGCTCAGGAAAAAATGA

20

30

40

【 0 1 8 2 】

【表 2 4】

配列番号 2 1 ベクター中のオオムギ属の G P T 配列

(3' 末端の) r b c S 3 c + オオムギ属の I D I 4 を含む C a m b i a 1 3 0 5 . 1 。 下線が付された A T G は開始部位であり、括弧内は c a t 1 イントロンであり、下線が付された a c t a g t はオオムギ属遺伝子中でスプライシングするために用いられるクローニング部位のスペルである。

```

AAAAAAGAAAAAAAAAACATATCTTGTTTGTCTAGTATGGGAAGTTTGAGATAA
GGACGAGTGAGGGGTTAAAATTTCAGTGGCCATTGATTTTGTAAATGCCAAGAA
CCACAAAAATCCAATGGTTACCATTCCTGTAAGATGAGGTTTGCTAACTCTTTT
TGTCCGTTAGATAGGAAGCCTTATCACTATATATAACAAGCCGTCTTAATAACC
TCTTAGTAACCAATTATTTTCAGCACCATGGTAGATCTGAGG(GTAAATTTCTAG
TTTTCTCCTTCATTTTCTTGGTTAGGACCCTTTTCTCTTTTATTTTTTTGAGC
TTTGATCTTTCTTTAACTGATCTATTTTTTAATTGATTGGTTATGGTGTAAATA
TTACATAGCTTTAACTGATAATCTGATTACTTTATTTTCGTGTGTCTATGATGAT
GATGATAGTTACAG)AACCGACGAACTAGTATGGCATCCGCCCCCGCCTCCG
CCTCCGCGGCCCTCTCCACCGCCCGCCCCCGCCGACAACGGGGCCGCCAAG
CCCACGGAGCAGCGGCCGGTACAGGTGGCTAAGCGATTGGAGAAGTTCAAA
ACAACAATTTTCACACAGATGAGCATGCTCGCAGTGAAGCATGGAGCAATAA
ACCTTGGACAGGGGTTTCCCAATTTTGATGGCCCTGACTTTGTCAAAGATGC
TGCTATTGAGGCTATCAAAGCTGGAAAGAATCAGTATGCAAGAGGATATGGT
GTGCCTGAATTGAACTCAGCTGTTGCTGAGAGATTTCTCAAGGACAGTGGAT
TGCACATCGATCCTGATAAGGAAGTTACTGTTACATCTGGGTGCACAGAAGC
AATAGCTGCAACGATATTGGGTCTGATCAACCCTGGGGATGAAGTCATACTG
TTTGCTCCATTCTATGATTCTTATGAGGCTACACTGTCCATGGCTGGTGCGAA
TGTCAAAGGCCATTACACTCCGCCCTCCGGACTTTGCAGTCCCTCTTGAAGAG
CTAAAGGCTGCAGTCTCGAAGAATACDAGAGCAATAATGATTAATACACCTC
ACAACCCTACCGGGAAAAATGTTTCAAAAGGGAGGAACCTTGAGTTCATTGCTGA
TCTCTGCAAGGAAAAATGACGTGTTGCTCTTTGCCGATGAGGTCTACGACAAG
CTGGCGTTTGAGGCGGATCACATATCAATGGCTTCTATTCTTGGCATGTATG
AGAGGACCGTCACTATGAACTCCCTGGGGAAGACGTTCTCCTTGACCGGAT
GGAAAGATCGGCTGGGCGATAGCACCACCGCACCTGACATGGGGCGTAAGG
CAGGCACACTCCTTCCTCACATTCCGCCCTCCACGCCGATGCAATCAGCAG
CGGCGGCGGCCCTGAGAGCACCGGACAGCTACTTTGAGGAGCTGAAGAGG
GACTACGGCGCAAAGAAAGCGCTGCTGGTGGACGGGCTCAAGGCGGCGGG
CTTCATCGTCTACCCTTCGAGCGGAACCTACTTCATCATGGTTCGACCACACC
CCGTTCCGGTTTCGACAACGACGTCGAGTTCTGCGAGTACTTGATCCGCGAG
GTCGGCGTCTGTCGATCCCGCCAAGCGTGTCTACCTGAACCCGGAGGAC
GGGAAGAACCTGGTGAGGTTACCTTCTGCAAGGACGACGACACGCTAAGG
GCGGCGGTGGACAGGATGAAGGCCAAGCTCAGGAAGAAATGATTGAGGGG
CGCACGTGTGA

```

10

20

30

【 0 1 8 3 】

【表 25】

配列番号 22 Cambia1201+シロイヌナズナGPTの配列 (CaMVからの35S

プロモーターは斜体)

CATGGAGTCAAAGATTCAAATAGAGGACCTAACAGAACTCGCCGTAAAGACT
 GGCGAACAGTTTCATACAGAGTCTCTTACGACTCAATGACAAGAAGAAAATCT
 TCGTCAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGA
 TACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATA
 TCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCGAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAA
 GATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGA
 AAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCC
 CCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCCAGTCTTCA
 AAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAAT
 CCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCTCTATATAAGGAAGTTTCATTTCAATTG
 GAGAGAACACGGGGGACTCTTGACCATGTACCTGGACATAAATGGTGTGAT
 GATCAAACAGTTTAGCTTCAAAGCCTCTCTTCTCCCATTTCTTCTAATTTCC
 GACAAAGCTCCGCCAAAATCCATCGTCCTATCGGAGCCACCATGACCACAGT
 TTCGACTCAGAACGAGTCTACTCAAAAACCCGTCAGGTGGCGAAGAGATTA
 GAGAAGTTCAAGACTACTATTTTCACTCAAATGAGCATATTGGCAGTTAAACA
 TGGAGCGATCAATTTAGGCCAAGGCTTTCCCAATTTGACGGTCCTGATTTT
 GTTAAAGAAGCTGCGATCCAAGCTATTAAGATGGTAAAAACCAAGTATGCTC
 GTGGATACGGCATTCTCAGCTCAACTCTGCTATAGCTGCGCGGTTTCGTGA
 AGATACGGGCTTTGTTGTTGATCCTGAGAAAGAAGTACTGTTACATCTGTT
 GCACAGAAGCCATAGCTGCAGCTATGTTGGGTTTAATAAACCCCTGGTGATGA
 AGTCATTCTCTTTGCACCGTTTATGATTCCTATGAAGCAACACTCTCTATGG
 CTGGTGCTAAAGTAAAGGAATGACTTTACGTCCACCGGACTTCTCCATCCC
 TTTGGAAGAGCTTAAAGCTGCGGTAACCTAACAAGACTCGAGCCATCCTTATG
 AACACTCCGCACAACCCGACCGGGAAGATGTTCACTAGGGAGGAGCTTGAA
 ACCATTGCATCTCTCTGCATTGAAAACGATGTGCTTGTGTTCTCGGATGAAGT
 ATACGATAAGCTTGCGTTTGAAATGGATCACATTTCTATAGCTTCTCTTCCCG
 GTATGTATGAAAGAACTGTGACCATGAATCCCTGGGAAAGACTTTCTCTTTA
 ACCGGATGGAAGATCGGCTGGGCGATTGCGCCGCTCATCTGACTTGGGGA
 GTTCGACAAGCACACTCTTACCTCACATTGCCCACATCAACACCAGCACAAAT
 GGGCAGCCGTTGCAGCTCTCAAGGCACCAGAGTCTTACTTCAAAGAGCTGA
 AAAGAGATTACAATGTGAAAAAGGAGACTCTGGTTAAGGGTTTGAAGGAAGT
 CGGATTTACAGTGTTCATCGAGCGGGACTTACTTTGTGGTTGCTGATCAC
 ACTCCATTTGGAATGGAGAACGATGTTGCTTTCTGTGAGTATCTTATTGAAGA
 AGTTGGGGTCGTTGCGATCCCAACGAGCGTCTTTTATCTGAATCCAGAAGAA
 GGGGAAGAATTTGTTAGGTTTGCCTTCTGTAAAGACGAAGAGACGTTGCGTG
 GTGCAATTGAGAGGATGAAGCAGAAGCTTAAGAGAAAAGTCTGA

10

20

30

【0184】

【表 2 6】

配列番号 23 rbcS3c+シロイヌナズナGPTを含むCambiap1305. 1

下線が付されたATGは開始部位であり、括弧内はcat1イントロンであり、下線が付されたactagtはシロイヌナズナ遺伝子中でスプライシングするために用いられるクローニング部位のスペルである。

```

AAAAAAGAAAAAACAATATCTTGTGTCAGTATGGGAAGTTTGAGATAA
GGACGAGTGAGGGGTTAAAATTCAGTGGCCATTGATTTTGTAAATGCCAAGAA
CCACAAAATCCAATGGTTACCATTCCTGTAAGATGAGGTTTGCTAACTCTTTT
TGTCCGTTAGATAGGAAGCCTTATCACTATATATACAAGGCGTCCTAATAACC
TCTTAGTAACCAATTATTTGAGCACCATGGATAGATCTGAGG(GTAAATTTCTAG
TTTTCTCCTTCATTTTCTTGGTTAGGACCCTTTCTCTTTTATTTTTTTGAGC
TTTGATCTTTCTTAAACTGATCTATTTTTTAATTGATTGGTTATGGTGTAATA
TTACATAGCTTTAACTGATAATCTGATTACTTTATTTCTGTGTCTATGATGAT
GATGATAGTTACAG)AACCGACGAACTAGTATGTACCTGGACATAAATGGTGT
GATGATCAAACAGTTTAGCTTCAAAGCCTCTCTTCTCCCATTCCTTCTAATTT
CCGACAAAGCTCCGCCAAAATCCATCGTCCTATCGGAGGCCACCATGACCACA
GTTTCTGACTCAGAACGAGTCTACTCAAAAACCCGTCACAGGTGGCGAAGAGAT
TAGAGAAGTTCAAGACTACTATTTCACTCAAATGAGCATATTGGCAGTTAAA
CATGGAGCGATCAATTTAGGCCAAGGCTTTCCCAATTTGACGCGTCCTGATT
TTGTTAAAGAAGCTGCGATCCAAGCTATTAAAGATGGTAAAAACCAGTATGCT
CGTGGATACGGCATTCTCAGCTCAACTCTGCTATAGCTGCGCGGTTTCGTG
AAGATACGGGTCTTGTGTTGATCCTGAGAAAGAAGTTACTGTTACATCTGGT
TGCACAGAAGCCATAGCTGCAGCTATGTTGGGTTTAATAAACCCCTGGTGATG
AAGTCATTCTCTTTGCACCGTTTTATGATTCCATGAAGCAACACTCTCTATG
GCTGGTGCTAAAGTAAAAGGAATCACTTTACGTCCACCGGACTTCTCCATCC
CTTTGGAAGAGCTTAAAGCTGCGGTAACCAAGACTCGAGCCATCCTTAT
GAACACTCGGCACAACCCGACCGGGAAGATGTTCACTAGGGAGGAGCTTGA
AACCATTGCATCTCTCTGCATTGAAAACGATGTGCTTGTGTTCTCGGATGAAG
TATACGATAAGCTTGGGTTTGAAATGGATCACATTTCTATAGCTTCTCTTCCC
GGTATGTATGAAAGAAGCTGTGACCATGAATCCCTGGGAAAGACTTTCTCTTT
AACCAGATGGAAGATCGGCTGGGCGATTGCGCCGCCTCATCTGACTTGGGG
AGTTGACAAAGCACACTCTTACCTCAGATTGCGCACATCAACACCAGCAGAA
TGGGCAGCCGTTGCAGCTCTCAAGGCACGAGAGTCTTACTTCAAAGAGCTG
AAAAGAGATTACAATGTGAAAAAGGAGACTCTGGTTAAGGGTTTGAAGGAAG
TCGGATTTACAGTGTTCCCATCGAGCGGGACTTACTTTGTGGTTGCTGATCA
CACTCCATTTGGAATGGAGAACGATGTTGCTTTCTGTGAGTATCTTATTGAAG
AAGTTGGGGTCTGTTGCGATCCCAACGAGCGTCTTTTATCTGAATCCAGAAGA
AGGGAAGAATTTGGTTAGGTTTGGCTTCTGTAAAGACGAAGAGACGTTGGGT
GGTGCAATTTGAGAGGATGAAGCAGAAGCTTAAGAGAAAAGTCTGA

```

10

20

30

【0185】

【表 27】

配列番号 24 シロイヌナズナGPTのコード配列 (成熟タンパク質、ターゲッティング配列がない)

GTGGCGAAGAGATTAGAGAAGTTCAAGACTACTATTTTCACTCAAATGAGCAT
 ATTGGCAGTTAAACATGGAGCGATCAATTTAGGCCAAGGCTTTCCCAATTTG
 GACGGTCCTGATTTTGTAAAGAAGCTGCGATCCAAGCTATTAAGATGGTA
 AAAACGAGTATGCTCGTGGATACGGCATTCTCAGCTCAACTCTGCTATAGC
 TGCGCGGTTTCTGTAAGATACGGGTCTTGTGTTGATCCTGAGAAAGAAGTT
 ACTGTTACATCTGGTTGCACAGAAGCCATAGCTGCAGCTATGTTGGGTTTAA
 TAAACCCCTGGTGATGAAGTCATTCTCTTTGCACCGTTTTATGATTCCTATGAA
 GCAACACTCTCTATGGCTGGTGCTAAAGTAAAAGGAATCACTTTACGTCCAC
 CGGACTTCTCCATCCCTTTGGAAGAGCTTAAAGCTGCGGTAACCAAGAC
 TCGAGCCATCCTTATGAACACTCCGCACAACCCGACCGGGAAGATGTTCACT
 AGGGGAGGAGCTTGAACCATTCGATCTCTCTGCATTGAAAACGATGTGCTTG
 TGTCTCGGATGAAGTATACGATAAGCTTGGCTTTGAAATGGATCACATTTCT
 ATAGCTTCTCTTCCCGGTATGTATGAAAGAACTGTGACCATGAATTCCCTGG
 GAAAGACTTTCTCTTTAACCGGATGGAAGATCGGCTGGGCGATTGCGCCGC
 CTCATCTGACTTGGGGAGTTGACACAAGCACACTCTTACCTCACATTGCGCCAC
 ATCAACACCAGCACAATGGGCAGCCGTTGCAGCTCTCAAGGCAACCAGAGTC
 TTACTTCAAAGAGCTGAAAAGAGATTACAATGTGAAAAGGAGACTCTGGTTA
 AGGGTTTGAAGGAAGTCGGATTTACAGTGTTCCCATCGAGCGGGACTTACTT
 TGTGGTTGCTGATCACACTCCATTTGGAATGGAGAACGATGTTGCTTTCTGT
 GAGTATCTTATTGAAGAAGTTGGGGTCTGCGATCCCAACGAGCGTCTTTT
 ATCTGAATCCAGAAGAAGGAAGAATTTGGTTAGGTTTGGCTTCTGTAAAGA
 CGAAGAGACGTTGCGTGGTGCAATTGAGAGGATGAAGCAGAAGCTTAAGAG
 AAAAGTCTGA

10

20

【0186】

【表 28】

配列番号 25 シロイヌナズナGPTのアミノ酸配列 (成熟タンパク質、ターゲッティング配列がない)

VAKRLEKFKTTIFTQMSILAVKHGAINLGQGFPNFDGPDFVKEAAIQAIKDQKNQY
 ARGYGIPQLNSAIAARFREDTGLVVDPEKEVTVTSGCTEAIAAAMLGLINPGDEVI
 LFAPFYDSYEATLSMAGAKVKGITLRPPDFSIPLEELKAAVTNKTTRAILMNTPHNP
 TGKMFTRBEELETIASLCIENDVLVFSDEVYDKLAFEMDHISIASLPGMYERTVTMN
 SLGKTFSLTGWKIGWAIAPPHLTWGVVQAHSYLTATSTPAQWAAVAALKAPES
 YFKELKRDYNVKKETLVKGLIKEVGFTVFPSSGTYFVVADHTPFGMENDVAFCEY
 LIEEVGVVAIPTSVFYLNPEEGKNLVRFAFCKDEETLRGAJERMKQKLKRIK

30

【0187】

【表 29】

配列番号 26 ブドウGPTのアミノ酸配列 (成熟タンパク質、ターゲッティング配列がない)

VAKRLEKFKTTIFTQMSMLAIKHGAINLGQGFPNFDGPEFVKEAAIQAIKDQKNQYAR
 GYGVPDLNSAVADRFFKDTGLVVDPEKEVTVTSGCTEAIAATMLGLINPGDEVILFA
 PFYDSYEATLSMAGAIKSITLRPPDFAVPMDELKSAISKNTTRAILINTPHNPTGKMF
 REELNVIASLCIENDVLVFTDEVYDKLAFEMDHISMASLPGMYERTVTMNSLGKTFS
 LTGWKIGWTVAPPHLTWGVVQAHSFLTFATCTPMQWAAATALRAPDSYEEELKRD
 YSAKKAILVEGLKAVGFRVYFPSSGTYFVVVDHTPFGLKDDIAFCEYLIKEVGVAIPT
 SVFYLHPEDGKNLVRFTFCKDEGTLRAAVERMKEKLKPKQ

40

【0188】

【表 3 0】

配列番号 27 イネGPTのアミノ酸配列 (成熟タンパク質、ターゲッティング配列がない)

VAKRLEKFKTTIFTQMSMLAIKHGAINLGQGFPNFDGPDFVKEAAIQAINAGKNQ
YARGYGVPDLNIAIAERFLKDSGLQVDPEKEVTVTSGCTEIAAATILGLINPGDEV
ILFAPFYDSYEATLSMAGANVKAITLRPPDFSVPLEELKAAVSKNTRAIMINTPHN
PTGKMFTRREELEFIATLCKENDVLLFADEVYDKLAFEADHISMASIPGMYERTVT
MNSLGKTFSLTGWKIGWAIAPPHLTWGVQRQAHSFLTTFATCTPMQAAAAAALRAP
DSYEEELRRDYGAKKALLVNLKDGAFIVYPSSGTYFVMVDHTPFQFDNDIEFC
EYLIREVGVAIPPSVFYLNPEDEGKNLVRFTFCKDDETLRAAVERMKTCLRKK

【0189】

10

【表 3 1】

配列番号 28 ダイズGPTのアミノ酸配列 (ー1成熟タンパク質、ターゲッティング配列がない)

AKRLEKFQTTIFTQMSLLAIKHGAINLGQGFPNFDGPEFVKEAAIQAIRDGKNQYA
RGYGVDPDLNIAIAERFKKDTGLVVDPEKEITVTSGCTEIAAATMIGLINPGDEVIMF
APFYDSYEATLSMAGAKVKGITLRPPDFAVPLEELKSTISKNTRAILINTPHNPTG
KMFTREELNCIASLCIENDVLVFTDEVYDKLAFDMEHISMASLPGMFERTVTLNS
LGKTFSLTGWKIGWAIAPPHLSWGVQRQAHAFLTFATAHPFQAAAAAALRAPDSY
YVELKRDYMAKRILIEGLKAVGFKVFPSSGTYFVVDHTPFGLENDVAFCEYLV
KEVGVAIPTSVFYLNPEEGKNLVRFTFCKDEETIRSAVERMKAKLRKVD

20

【0190】

【表 3 2】

配列番号 29 オオムギGPTのアミノ酸配列 (成熟タンパク質、ターゲッティング配列がない)

VAKRLEKFKTTIFTQMSMLAVKHGAINLGQGFPNFDGPDFVKDAAIEAIKAGKNQ
YARGYGVPDLNIAISERYKKDTGLAVDPEKEITVTSGCTEIAAATVLGLINPGDEV
ILFAPFYDSYEATLSMAGANVKAITLRPPDFAVPLEELKAAVSKNTRAIMINTPHN
PTGKMFTRREELEFIADLOKENDVLLFADEVYDKLAFEADHISMASIPGMYERTVT
MNSLGKTFSLTGWKIGWAIAPPHLTWGVQRQAHSFLTTFATSTPMQSAAAAAALRAP
DSYFEELKRDYGAKEALLVDGLKAAGFIVYPSSGTYFIMVDHTPFQFDNDVEFOE
YLIREVGVAIPPSVFYLNPEDEGKNLVRFTFCKDDDTLRAAVDRMKAKLRKK

30

【0191】

【表 3 3】

配列番号 30 ゼブラフィッシュGPTのアミノ酸配列 (成熟タンパク質、ターゲッティング配列がない)

VAKRLEKFKTTIFTQMSMLAIKHGAINLGQGFPNFDGPDFVKEAAIQAIRDGNQYA
RGYGVDPDLNIAISERYKKDTGLAVDPEKEITVTSGCTEIAAATVLGLINPGDEVIVFAP
FYDSYEATLSMAGAKVKGITLRPPDFALPIEELKSTISKNTRAILINTPHNPTGKMFPT
EELNTIASLCIENDVLVFSDEVYDKLAFDMEHISIASLPGMFERTVTMNSLGKTFSLT
GWKIGWAIAPPHLTWGVQRQAHAFLTFATSNPMQWAAVAALRAPDSYYTELKRDYM
AKRSILVEGLKAVGFKVFPSSGTYFVVDHTPFQGHENDIAFCEYLVKEVGVAIPTSV
FYLNPEEGKNLVRFTFCKDEGTLRAAVDRMKELRK

40

【0192】

【表 3 4】

配列番号 31 バンパーGPTのアミノ酸配列(成熟タンパク質、ターゲッティング配列がない)

VAKRLEKFKTTIFTQMSMLAIKHGAINLGQGFNPDGPDFVKEAAIQAINAGKNQ
YARGYGVPELNSAVAERFLKDSGLQVDPEKEVTVTSGOTEAIAATILGLINPGDE
VILFAPFYDSYEATLSMAGANVKAILRPPDFAVPLEELKATVSKNTRAIMINTPH
NPTGKMFSREELEFIATLCKKNDVLLFADEVYDKLAFEADHISMASIPGMYERTV
TMNSLGKTFSLTGWKIGWAIAPPHLTWGWVRQAHSFLTATCTPMQSAAAAAALRA
PDSYYYGELKRDYGAKKAILVDGLKAAGFIVYPSSGTYFVMVDHTPFGFONDIEFC
EYLIREVGVAIPPSVFYLNPEDGKNLVRFTFOKDDDTLRAAVERMKTCLRKK

【図面の簡単な説明】

10

【 0 1 9 3 】

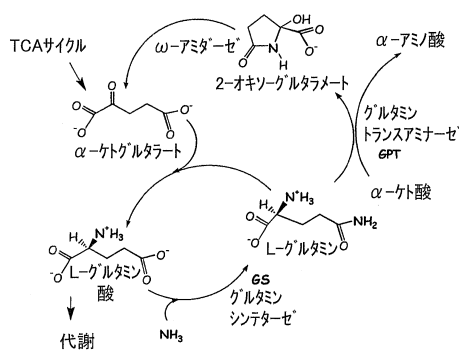
【図 1】窒素吸収および 2 - オキソグルタラメート化学合成の概略的な代謝経路を示す図である。

【図 2】野生型のタバコ植物に対して、GPT を過剰発現しているトランスジェニックタバコ植物の比較を示す写真である。

【図3】野生型のトマト植物に対してGPTを過剰に発現するトランスジェニックミクロームトマト植物の比較を示す写真である。

【図 4】野生型のタバコ植物（上の葉）と G P T トランスジェニックのタバコ植物（下の葉）との葉の大きさの比較を示す写真である。

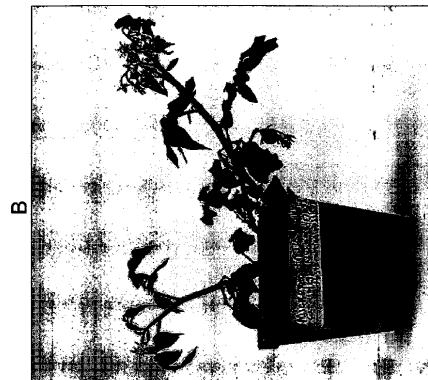
【圖 1】



【 図 3 A 】



【 ㄨ 3 B 】



【 図 2 】

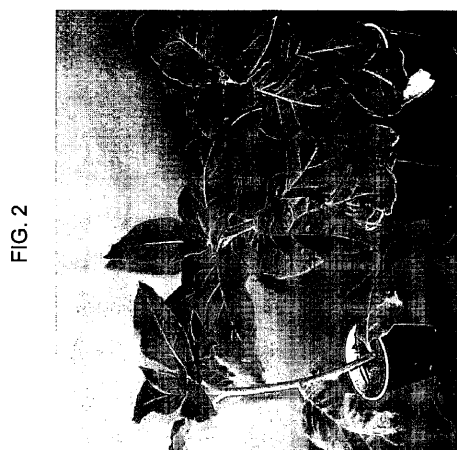
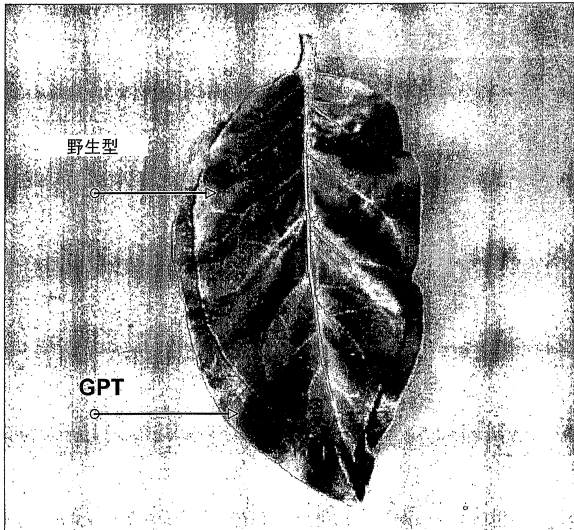


FIG. 2

【図 4】



【配列表】

0005770089000001.app

フロントページの続き

(73)特許権者 511053698

ロス アラモス ナショナル セキュリティー, リミテッド ライアビリティー カンパニー
 LOS ALAMOS NATIONAL SECURITY, LLC
 アメリカ合衆国, 87545 ニューメキシコ州, ロス アラモス, ロス アラモス ナショナル
 ラボラトリー, エルシー/アイピー - エムエス エー187
 Los Alamos National Laboratory, LC/IP-MS A187
 , Los Alamos, New Mexico 87545, United States of
 America

(73)特許権者 511053713

ユニバーシティ オブ メイン システム ボード オブ トラスティーズ
 UNIVERSITY OF MAINE SYSTEM BOARD OF TRUSTEES
 アメリカ合衆国, 04401 メイン州, バンゴー, セントラル ストリート 16
 16 Central Street, Bangor, Maine 04401, United
 States of America

(74)代理人 110000338

特許業務法人HARAKENZO WORLD PATENT & TRADEMARK

(72)発明者 アンキーファー, パット, ジェー.

アメリカ合衆国, 87544 ニューメキシコ州, ロス アラモス, ヘメス レーン 2

(72)発明者 アンダーソン, ペネロペ, エス.

アメリカ合衆国, 87544 ニューメキシコ州, ロス アラモス, ウォルナット 3245 ビ
 ー

(72)発明者 ナイト, トマス ジェー.

アメリカ合衆国, 04701 メイン州, レイモンド, ピー. オー. ボックス 382

審査官 吉門 沙央里

(56)参考文献 国際公開第2008/070179 (WO, A1)

国際公開第2006/076423 (WO, A1)

Database GenBank [online], Accession No. BT028918, 06-SEP-2006 uploaded [Retrieved on
 2014-2-14], Definition: Arabidopsis thaliana unknown protein (At1g77670) mRNA, complete
 cds., URL, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/BT028918>

Database GenPept [online], Accession No. Q9CAP1, 31-OCT-2006 uploaded [Retrieved on 20
 14-2-14], Definition: Putative aminotransferase; 101422-99564 (At1g77670)., URL, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/Q9CAP1>

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

A01H 5/00 - 5/12

CAP1us/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS
 /WP1X(STN)