

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4303314号  
(P4303314)

(45) 発行日 平成21年7月29日(2009.7.29)

(24) 登録日 平成21年5月1日(2009.5.1)

(51) Int. Cl.			F I		
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	A
A O 1 H	5/00	(2006.01)	A O 1 H	5/00	A
A O 1 N	63/02	(2006.01)	A O 1 N	63/02	
C O 7 K	14/325	(2006.01)	C O 7 K	14/325	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	C

請求項の数 9 (全 12 頁)

(21) 出願番号	特願平7-523623
(86) (22) 出願日	平成7年3月10日(1995.3.10)
(65) 公表番号	特表平10-511261
(43) 公表日	平成10年11月4日(1998.11.4)
(86) 国際出願番号	PCT/US1995/002900
(87) 国際公開番号	W01995/024492
(87) 国際公開日	平成7年9月14日(1995.9.14)
審査請求日	平成14年2月28日(2002.2.28)
審判番号	不服2006-15873(P2006-15873/J1)
審判請求日	平成18年7月24日(2006.7.24)
(31) 優先権主張番号	08/209,951
(32) 優先日	平成6年3月11日(1994.3.11)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	500087589
	カルジーン エルエルシー
	アメリカ合衆国 95616 カリフォルニア州, デイヴィス, フィフス ストリート 1920

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 植物色素体内でのバチルス・チューリンゲンシス c r y タンパク質の発現

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

作用可能な状態で連結された成分として、以下の：

( i ) その 5 から 3 までの転写方向における

( a ) 植物色素体内で機能することができるプロモーター；

( b ) 殺虫性バチルス・チューリンゲンシス毒素をコーディングする 生来のDNA配列；( c ) 植物色素体内で転写を終結させることができる転写終結領域；及び( d ) そのマーカーを発現する色素体を含んで成る植物細胞の選択のためのマーカーをコーディングする遺伝子；並びに( ii ) ( e ) 前記 ( a ) ないし ( d ) の両端外側に隣接する、その色素体のゲノムに対し 10  
相同性をもつDNA領域

を含んで成る構築物。

## 【請求項 2】

植物色素体が、葉緑体である請求項 1 に記載の構築物。

## 【請求項 3】

DNAコーディング配列が、プロトキシンをコードする請求項 1 に記載の構築物。

## 【請求項 4】

請求項 1 に記載の構築物を含む植物細胞色素体。

## 【請求項 5】

請求項 1 に記載の構築物を含む植物、植物種子、植物細胞又はその子孫。

## 【請求項 6】

植物細胞内で殺虫性バチルス・チューリンゲンシス毒素を発現させる方法であって、その植物細胞の色素体内でそのバチルス・チューリンゲンシス毒素を発現させることを含み、ここに毒素が請求項 1 ないし 3 いずれか 1 記載の構築物から発現される方法。

## 【請求項 7】

該植物色素体が、葉緑体である請求項 6 に記載の方法。

## 【請求項 8】

請求項 6 に記載の方法に従って作出された植物細胞。

## 【請求項 9】

請求項 8 に記載の植物細胞を含んで成る植物、植物種子又は植物部分。

10

## 【発明の詳細な説明】

導入

発明の分野

本発明は、植物への遺伝子工学技術の適用に関する。より特に、本発明は、植物細胞の色素体 (plastid) 内での着目の殺虫性バチルス・チューリンゲンシス (*Bacillus thuringiensis*) 毒素タンパク質の発現のための組成物及び方法に関する。

背景

高等植物の色素体、すなわち、葉緑体 (chloroplasts)、アミロプラスト (amyloplasts) 及び有色体 (chromoplasts) は、同一の遺伝子内容物を持ち、そしてそれ故、プロプラステド (proplastid) として知られる共通の前駆体由来すると信じられている。この色素体のゲノムは、環状であり、そして植物種の中においてサイズにおいて約120~約217キロ塩基対 (kb) に変動する。このゲノムは、典型的には、大きな逆の反復を含み、これは、約76キロ塩基対までを含むことができるが、より典型的には約20~約30キロ塩基対のレンジ内にある。さまざまな生物の色素体ゲノム内に存在する逆反復について、記載されている (Palmer, J.D. (1990) Trends Genet. 6: 115-120)。

20

核形質転換を超える植物色素体形質転換の1の利点は、ほとんどの植物の色素体が母系遺伝され、そしてその結果として異種色素体遺伝子が花粉散布されないということである。この特徴は、変更された農業経済特性をもつトランスジェニック植物にとって特に魅力的である。なぜなら天然又は化学的条件に対する導入された抵抗性又は許容性が、野生型の親類に伝達されないであろうからである。

30

植物色素体は、主要な生合成中心でもある。葉緑体内での光合成に加えて、色素体は、重要な化合物、例えば、アミノ酸、複雑な炭水化物、脂肪酸、及び色素の産生に責任を負う。

色素体は、ひじょうに高いコピー数において、葉緑体ゲノムについては存在する細胞当たり50,000までのコピー数において、植物細胞内に存在することができる (Bendich, A.J. (1987) Bio Essays 6: 279-282)。従って、色素体形質転換を通じて、植物細胞は、ひじょうに高いコピー数において導入された着目の遺伝子を維持するように操作されることができる。

上記理由の全てにより、高等植物の色素体は、遺伝子操作のための魅力的な標的を提供する。

40

色素体の安定した形質転換は、緑藻類 (green algae) クラミドモナス (*Chlamydomonas*) (Boynton et al. (1988) Science 240: 1534-1538) そしてより最近、高等植物 (Svab et al. (1990) Proc.Natl.Acad.Sci. USA 87: 8526-8530; Svab and Maliga (1993) Proc. Natl.Acad.Sci. USA 90: 913-917); (Staub, J.M. and Maliga, P. (1993), EMBO J. 12: 601-606) 中に報告されている。高等植物における色素体形質転換のために開示された方法は、選択マーカーを含むDNAの粒子銃デリバリー及び相同時組換えを通じての色素体ゲノムへのそのDNAの標的化に頼る。

穀物植物内に新たに発見された又は他のバチルス・チューリンゲンシス (*Bacillus thuringiensis*) 遺伝子を導入するという継続した必要性がある。バチルス・チューリンゲンシスからのCryタンパク質 ( - 内毒素) は、多数のチョウ目 (Lepidopteran)、ハエ目 (D

50

ipteran)、及びコンチュウ目(Coleopteran)に対して有効な殺虫活性をもつ。これらのタンパク質は、アミノ酸配列の相同性及び殺虫活性に基づき、Cry I ~ Cry V に分類される。最も大きいCry I タンパク質は、プロトキシン(約130 ~ 約140kDa)として合成され、次に可溶化され、そして活性毒素断片(約60 ~ 70kDa)にタンパク質分解によりプロセスされる。

植物の核からのプロトキシンの僅かな発現は、これまでこれらの遺伝子の“切断(truncated)”変種の使用を必要としてきた。この切断変種は、活性な毒素断片だけをコードしている。その発現効率を高める他の試みは、植物に好まれるコドンを利用するようにバチルス・チューリングエンシスの毒素遺伝子を再合成することを含んでいた。これらの大きなcry遺伝子(約3.5kb)のこのような広範な再構築においては、多くの問題が生じることが

10

でき、そしてその方法は、骨の折れるものであり、かつ、費用のかかるものである。新たな昆虫害虫が流行し、又は現存集団がバチルス・チューリングエンシス毒素の特定のレベル又はタイプに耐性に進化するときにも、問題が生じる。従って、植物におけるバチルス・チューリングエンシス毒素のより高い、そしてそれ故より有効なレベルを作り出す特別な必要性が在り、この必要性は、時がたつにつれて高まるであろう。

#### 発明の要約

本発明により、植物細胞の遺伝子操作のために有用であり、そして植物細胞色素体内でのバチルス・チューリングエンシスcryタンパク質の高められた発現を提供する色素体発現構築物を提供する。この形質転換された色素体は、代謝的に活性な色素体であるはずであり、そしてこの色素体は好ましくは、着目の植物組織、最も好ましくは、葉又は子葉のよう

20

な緑色植物組織内にある葉緑体内に高いコピー数において維持される。本発明における使用のための色素体発現構築物は、一般的に、色素体プロモーター領域、バチルス・チューリングエンシスcryタンパク質をコーディングするDNA配列及び植物色素体内での転写を終結させることができる転写終結領域を含む。

本発明の色素体発現構築物は、植物色素体内で発現されることができると選択マーカーをコードするDNA配列をもつ構築物に連結されることができると。この選択マーカーの発現は、そのマーカーを発現する色素体を含んで成る植物細胞の同定を許容する。

好ましい態様においては、植物細胞内への本構築物の伝達のための形質転換ベクターは、その色素体ゲノム内にその発現及び選択構築物を挿入するための手段を含む。これは、好ましくは、その構築物に隣接する標的色素体ゲノムに相同性をもつ領域を含んで成る。

30

本発明の構築物は、好ましくは、そのプロトキシンをコーディングする配列であることができる、生来のバチルス・チューリングエンシスDNAコーディング配列を含んで成る。好ましい態様においては、このDNAコーディング配列は、Cry I A (C) 遺伝子である。

本構築物を含む植物細胞色素体も、本発明内にあると企図され、また、本構築物を含んで成る色素体を含む植物、植物種子、植物細胞又はその子孫も同様である。この目的のために好ましい植物は、綿(cotton)である。

本発明は、植物細胞の色素体内でバチルス・チューリングエンシス毒素を発現させることにより、その植物細胞内で殺虫性バチルス・チューリングエンシス毒素の発現を強化する方法をも含む。本方法により、その発現は、色素体形質転換における増加されたコピー数から生じる強化とは別個に強化される。

40

本発明によって、殺虫性バチルス・チューリングエンシス毒素が、昆虫摂食検定により測定されるような、昆虫耐性表現型の高められた発現レベルをもって、生来のDNAコーディング配列から植物細胞の色素体内で作られされる。

#### 図面の説明

図1は、それぞれ、トランスプラストーム(transplastomes) Nt-pZS223 ptDNAとNt-pZS224 ptDNAを作るための、野生型色素体ゲノム(Nt-ptDNA)内へのベクターpZS223とpZS224からのcry遺伝子の組み込みを示す。

#### 発明の詳細な説明

本発明の色素体発現構築物は、一般的に、植物色素体内で機能するプロモーター、バチルス・チューリングエンシスcryタンパク質をコードするDNA配列及び植物色素体内での転写を

50

終結することができる転写終結領域を含んで成る。これらの要素は、転写の5' ~ 3' の方向において作用可能な状態で接続された成分として提供される。

本構築物の開発においては、その調節領域及びオープン・リーディング・フレームを含んで成るさまざまな断片を、異なるプロセッシング条件、例えば、ライゲーション、制限酵素消化、PCR、インビトロ突然変異誘発、リンカー及びアダプター付加、その他に供することができる。従って、ヌクレオチド・トランジショントランスバージョン、挿入、欠失その他を、その色素体内での発現のための調節領域又は着目のDNA配列内で使用されるDNA上で行うことができる。制限消化、Klenowプラント末端処理、ライゲーションその他は、当業者によく知られており、そして例えば、Maniatis et al.により (Molecular cloning : a laboratory manual (1982) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY中に) 記載されている。

10

本構築物の調製の間、さまざまなDNA断片が、DNAの増幅、DNAの修飾又は配列、リンカーその他を結合又は除去することによるDNAの操作を許容する、適当なクローニング・ベクター内でしばしばクローン化されるであろう。好ましくは、このベクターは、大腸菌 (*E. coli*) 内で少なくとも比較的高いコピー数まで複製されることができよう。pBR322のようなベクター、pUCシリーズのベクター、M13シリーズ・ベクター、及びpBlue Scriptベクター (Stratagene ; La Jolla, CA) を含む多数のベクターが、クローニングのために容易に入手可能である。

所望の植物細胞を選択する手段を提供するために、色素体形質転換のためのベクターは、典型的には、選択マーカー遺伝子の発現を提供する構築物を含む。マーカー遺伝子は、選択物質、すなわち、抗生物質、除草剤、等による天然の阻害に抵抗し、これを弱化し、又は失活させるポリペプチドを発現する植物発現性DNA配列である。

20

あるいは、マーカー遺伝子は、いくつかの他の目に見える反応応答を提供することができ、すなわち、その植物又は植物細胞に直接適用されるか又はその植物又は植物細胞成長培地中に存在するときのいずれかにおいて、いくつかの物質の存在中その選択マーカー遺伝子が発現しない植物又は植物細胞に対して明確に区別でき、外観又は成長パターンを引き起こすことができる。

いずれの場合においても、このような選択マーカー遺伝子を含む植物又は植物細胞は、同定の目的のために明確に区別できる表現型をもつであろうし、すなわち、それらは非形質転換細胞から区別されることができよう。この特徴的な表現型は本構築物を含む、細胞、細胞群、組織、器官、植物部分又は植物全体の同定を許容する。

30

マーカー表現型の検出は、そのマーカー遺伝子が連結された第2遺伝子をもつ細胞の選択を可能にする。この第2の遺伝子は、典型的には、その選択マーカーの表現型自体が明らかでない条件下でさえも、形質転換細胞内では容易に同定されることができないがその植物細胞又はその誘導体が成熟体まで成長するときに存在する所望の表現型を含んで成る。色素体構築物を含む植物細胞の同定のためのこのようなマーカーの使用が、記載されている (Svab et al. (1993前掲))。以下に提供する実施例において、バクテリアのaadA遺伝子は、葉緑体5' プロモーター及び3' 転写終結領域、特に、タバコ16S rRNAプロモーターrrn領域及びrps16 3' 終結領域の調節制御下に上記マーカーとして発現される。多くの追加のプロモーター領域であって、植物色素体内で機能することが示されているさまざまな色素体プロモーター及びバクテリア・プロモーターを含むものも、その選択マーカー遺伝子の発現を駆動するために使用されることができよう。

40

このaadA遺伝子の発現は、スペクチノマイシン (spectinomycin) 及びストレプトマイシン (streptomycin) に対する耐性を付与し、そしてこれ故、このマーカーを発現する植物細胞の同定を許容するこのaadA遺伝子産物は、その葉緑体とその選択マーカー遺伝子産物を含んで成る細胞の連続成長及び緑化を許容する。この選択マーカー遺伝子産物を含まない細胞は、白くなる。従って、aadA遺伝子マーカーについての選択は、その植物成長培地中の、ストレプトマイシン、又はより好ましくはスペクチノマイシンの存在により白くならない植物細胞の同定に基づく。

多数のマーカー、例えば、クロラムフェニコール、アミノグリコシドG418、ハイグロマイ

50

シンその他に対する耐性が、植物細胞を用いての使用のために開発されてきた。葉緑体代謝に関係する生成物をコードする他の遺伝子も、選択マーカーとして使用されることができる。例えば、植物除草剤、例えば、グリフォセート (glyphosate)、プロモキシニル (bromoxynil) 又はイミダゾリノン (imidazolinone) に対する耐性を提供することができる遺伝子が、特定の用途を見い出されることができる。このような遺伝子が、報告されている (Stalker et al., J.Biol.Chem. (1985) 260: 4724-4728 (グリフォセート耐性EPSP); Stalker et al., J.Biol.Chem. (1985) 263: 6310-6314 (プロモキシニル耐性ニトリラーゼ遺伝子); 及びSathasivan et al., Nucl.Acids Res. (1990) 18: 2188 (AHASイミダゾリノン耐性遺伝子))。

粒子砲撃によるタバコ色素体ゲノムの安定した形質転換が報告されている (Svab et al. (1990前掲) 及びSvab et al. (1993前掲))。これらの中に記載された方法は、色素体発現構築物についてホモ形質の (homoplasmic) 植物を得るために使用されることができる。

一般的に、砲撃された組織は、細胞分裂促進培地上で約2日間培養され、その後その植物組織は、特定の選択剤の阻害量並びに、その特定の植物種のための再生を得るのに必要な特定のホルモン及び他の物質を含む選択培地に移される。次に苗条 (Shoots) が、ホモ形質の苗条の生産及び選択を確保するために同一の選択培地上で継代培養される。

ホモ形質は、サザン分析により証明される。以下に提供する実施例においては、BamH I - 消化全細胞DNAを、各種プローブ、特に、色素体標的化断片の一部、aadA断片、1.8kb cry I A断片及びCry73コーディング領域の3.5kb断片によりテストされる。これらのプローブを用いたサザン・プロット分析は、トランスプラストーム系統を得るためのタバコ色素体ゲノム内のキメラcry遺伝子の組み込みを確信させる。

苗条形成の第2ラウンドに対する別法として、最初に選択された苗条を、成熟植物まで成長させ、そしてその挿入された遺伝子構築物についてホモ形質である形質転換植物を提供するための隔離が、頼りにされる。

形質転換及び再生方法が、アグロバクテリウム (Agrobacterium) - 仲介形質転換、砲撃又はいくつかの他の方法のいずれかにより、所定の植物種のために改作されてきたので、これらの確立された技術を、色素体 - 形質転換植物を生産するための選択及び再生方法における使用のために修正することができる。例えば、タバコについて本明細書中に記載する方法は、他のナス科 (solanaceous) の種、例えば、トマト、ペチュニア及びポテトに容易に改作されることができる。

アブラナ (Brassica) においては、アグロバクテリウム - 仲介形質転換及び再生プロトコールは、一般的に、胚軸 (hypocotyl) 組織、低色素体含量を含むことができるであろう非緑色組織に関係する。従って、アブラナにおいては、好ましい標的組織は、小孢子 (microspore) - 由来胚軸又は子葉組織 (緑色であり、そしてこれ故多数の色素体を含む) 又は葉組織の外植体を含む。このような組織からの再生速度は低いものであることができるけれども、例えば、アグロバクテリウム - 仲介形質転換に伴い見られる位置効果 (positional effects) は、期待できない。従って、所望の表現型を得るためには多数の首尾よく形質転換された植物をスクリーニングする必要はないであろう。

綿のためには、アグロバクテリウム・チュームファシエンスとの同時栽培によるGossypium hirsutum Lの子葉の形質転換が、Firoozabady et al., Plant Mol.Bio. (1987) 10: 105-116及びUmbeck et al., Bio/Technology (1987) 5: 263-266により記載されている。

再び、アブラナのためのように、この組織は、葉緑体形質転換のために不十分な色素体含量を含むことができる。従って、アブラナのためのように、葉緑体を含む他の標的組織の形質転換及び再生のための別法、例えば、緑色胚形成組織を標的化することも、望ましいかもしれない。

他の植物種も、関連技術を使用して同様に形質転換されることができる。例えば、Klein et al. (Bio/Technology 10: 286-291) により記載されたようなマイクロインジェクタイル砲撃方法を、本明細書中に記載するウイルスの単一サブユニットRNAポリメラーゼ発現構築物を含んで成る核形質転換植物を得るために使用することもできる。粒子砲撃 (銃

10

20

30

40

50

)による綿の形質転換は、1992年9月17日に公開されたWO 92/15675中に報告されている。

色素体形質転換における使用のためのベクターは、好ましくはその色素体ゲノム内へのその色素体発現構築物及び選択マーカー構築物の安定した移入を提供するための手段を含む。これは、最も便利にはその標的色素体ゲノムに相同な領域により提供される。相同性をもつ領域は、移入されるべき構築物に隣接し、そしてそのゲノム内への2交叉(double crossover)を介して、相同的組換えによりその色素体ゲノムへの移入を提供する。タバコの色素体ゲノムの全DNA配列が報告されている(Shinozaki et al. (1986) EMBO J. 5:2043-2049)。スハマソウ(liverwort)(Ohyama et al. (1986) Nature 322:572-574)及び米(Hiratsuka et al. (1989) Mol.Gen.Genet. 217:185-194)からの色素体ゲノムの全DNA配列も、報告されている。

10

相同性をもつ領域が(IRA及びIRBとして知られる)色素体ゲノムの逆反復領域内に存在する場合、形質転換された色素体当り、このメランスジーンの2つのコピーが、期待される。この色素体ゲノム内の相同性をもつ領域は、サイズにおいて約1 kbである。相同性をもつより小さな領域を使用することもでき、そして100塩基対程の小さなものも、その色素体ゲノム内への相同的組換えを提供することができる。しかしながら、組換えの頻度そしてそれ故、形質転換された色素体をもつ植物を得る頻度は、その相同領域のサイズの減少に伴って低下する。

色素体ゲノム内に相同性をもつ領域をもつ構築物の例が、Svab et al. (1990前掲)及びSvab et al. (1993前掲)中に記載されている。タバコ及びアブラナ色素体ゲノム内への組換えに有用な領域は、以下の実施例中にも同定されるが、相同的組換え及び選択構築物は、多くの色素体DNA配列を使用して、そしていずれかの標的植物種に調製されることができる。本明細書中に提供する実施例においては、その色素体発現構築物のフランキング・タバコ色素体相同領域は、パチルス・チューリングゲンシスのトランスジーンの挿入をtrnVとrps12オペロンとの間のタバコ・ゲノム内に向ける。この色素体ゲノム内への組込みは、相同的組換えにより生じ、そしてその標的部位はその色素体ゲノムの逆反復領域内にあるので、色素体ゲノム当りトランスジーンの2つのコピーが期待される。aadA遺伝子により発現されるスペクチノマイシン耐性マーカー表現型について、選択が行われる。

20

本実施例においては、生来のcry遺伝子、すなわち、そのプロトキシシンに対して非修飾のコーディング領域をもつものが、その植物色素体からのパチルス・チューリングゲンシスの毒素の発現のために色素体発現構築物内に配置される。

30

合成パチルス・チューリングゲンシス遺伝子は、そのプロトキシシン遺伝子と同一の発現構築物内に置かれる。この合成遺伝子は、タバコのRuBPCOの小サブユニットのコードンの用い方をもつように設計され、その生来の遺伝子含量に対してそのグアニン・プラス・シトシン含量における全体の増加は39%~55%であり、そしてその毒素の活性断片をコードするような配列だけを残すように切断されている。このような遺伝子は、その植物の核ゲノムからの最適な発現を提供することが知られている。

両コーディング配列が、葉緑体形質転換ベクターを介して導入される(図1)。プロトキシシンに対する生来のコーディング配列を含むタバコ系統は、昆虫摂食検定により測定されるような、強い殺虫生物活性を示す。生来のコーディング配列を含む形質転換された植物においてはパチルス・チューリングゲンシス毒素は、全葉タンパク質の約5%以上までの成分として存在し、そのレベルは、核形質転換から生じる植物の葉内に存在するものよりも高い。合成cry I A(C)遺伝子をもつタバコ系統は、観察できる生物学的活性を全く示さない。その植物ゲノムの好ましいコドン我真似るように再合成された遺伝子を含む植物においては、その毒素に対するmRNAは、分解されるようであり、そして毒素タンパク質は、ほとんど又は全くその葉内に存在しないようである。

40

今般、生来のパチルス・チューリングゲンシス遺伝子が、同一遺伝子に対する再合成された配列を用いて可能であるよりも色素体発現においてより高い発現レベルを達成することが示され、これ故、生来のバクテリアのコーディング配列をもつ遺伝子が植物色素体内での高レベルの発現を達成することができることが立証された。上記結果は、植物における高

50

レベル発現のためにバチルス・チューリングシス毒素遺伝子を再合成する必要性を取り除く。

本発明をこれまで一般的に記載してきたが、説明の目的のみをもって包含され、そして本発明を限定することを意図されていない以下の実施例を参照することにより、本発明は、より容易に理解されるであろう。

#### 実施例

以下の実験開示においては、特にことわらない限り、全ての温度を、摂氏(°)で与え、質量をグラム(g)、ミリグラム(mg)又はマイクログラム(μg)で与え、濃度を、モル(M)、ミリモル(mM)又はマイクロモル(μM)で与え、そして全ての容量を、リッター(L)、ミリリッター(ml)又はマイクロリッター(μl)で与える。

10

#### 実施例1 色素体形質転換ベクター

高等植物の色素体の形質転換における使用のための構築物及び方法は、Svab et al. (1990前掲)、Svab et al. (1993前掲)及びStaub et al. (1993前掲)中に記載されている。タバコの色素体ゲノムの全DNA配列は、Shinozaki et al. (1986前掲)により報告されている。以下の記載における全ての色素体DNAは、そのタバコからのヌクレオチド番号に対して参照される。

cry I A (C) 遺伝子は、プラスミドpBtkHD73 (Toagosei Chemical Co., Japan) から得られる。この遺伝子は、さらにSam I / Nsi I を用いた消化によりプロセスされ、そして合成アダプターが挿入される(上ストランド: 5' - CCCGGATCCATGGATAACAATCCGAACATCAATG AATGCA - 3' ; 下ストランド: 5' - TTCATTGATGTTCCGATTGTTATCCATGGATCCGGG - 3' )。

20

cry I A (C) 遺伝子からの5' 非翻訳領域全体を次に取り出し、そしてNco I 部位を天然の開始コドン(そのヌクレオチド配列の163位(Adang et al. (1985) Gene 36; 289-300))に導入した。BamHI 部位を、このNco I 部位の上流直近に導入した。オリゴヌクレオチド突然変異誘発を、そのコーディング領域3' 側の不所望のDNAの除去を容易にするために、cry I A (C) 遺伝子の終結コドンに直接的に隣接するようにBgl II とSal I 部位を導入するように行った。この残りの配列は、上記プロトキシシン対する全コーディング領域を含む。

活性毒素断片をコーディングする合成cry I A (C) 遺伝子を、記載されたような方法において(Wosnik et al. (1987) Gene 60; 115-127)、70と90塩基のオリゴヌクレオチドをアニーリングし、そしてライゲートすることにより構築する。その毒素のアミノ酸配列を未だコーディングしながら、その開始コドンにNco I 部位を、そしてその終結コドンにSal I 部位をもち、55%のグアミン及びシトシン含量を含む合成遺伝子を、タバコRuBISCO 小サブユニットのコドンの用い方をもつように設計した。しかしながら、この合成遺伝子も、そのコーディング領域だけがそのプロトキシシンの活性断片に対するアミノ酸配列を提供するように、切断される。

30

色素体形質転換ベクターであって、ポリリンカー制限酵素部位をもつ、Prn(L)rbcl(S) / Trps 16発現カセット内にパッセンジャー遺伝子を担持するものを、使用する。このPrn(L)rbcl(S)断片は、Svab et al. (1993前掲)中に記載されている。mRNAの安定性をさらに保証するためにTrps 16断片を、そのパッセンジャー遺伝子コーディング領域の下流にクローン化する。このTrps 16断片は、タバコ・プラスミドDNA内のヌクレオチド5,087~4,939の3' - 調節領域にそのrps 16遺伝子を含んで成る。

40

キメラ遺伝子は、好ましくは、そのrrnオペロンに向かってそれらの転写を指令するように上記ベクター内に挿入される。従って、色素体ゲノム内では、キメラ遺伝子は、タバコ色素体ゲノムのヌクレオチド102,561~102,677の長いrrnオペロン・プロモーター断片を含んで成るPrn(L)rbcl(S) 5' - 調節領域から転写され、これが、その色素体DNA内のヌクレオチド57,569と57,584間のrbcl遺伝子リーダー後に設計された合成リーダー配列と融合される。

この色素体形質転換ベクターも、psbA遺伝子発現シグナルの制御下に選択可能なスペクチノマイシン耐性遺伝子(aadA)を担持する。この調節及びコーディング配列は、その限界が、タバコ色素体ゲノムの138,447塩基対(EcoRI)~140,219(Hinc II)と140,219(Hi

50

nc 11) ~ 141,382 (Egl 11) である色素体DNA相同性領域にも隣接する。これは、上記フ  
ランキング領域間に位置する外来遺伝子を trnV 遺伝子と rps 12 / 7 オペロンの間の色素  
体内に挿入することを指令する。

この色素体形質転換ベクターは、パッセンジャー遺伝子のコーディング領域を除去するた  
めに Nco I / Sal I 制限エンドヌクレアーゼにより消化され、これが次に、合成 cry I A (C)  
コーディング領域を含む Nco I / Sal I 断片と置換されて、pZS223 と命名したベクター  
を得る (図 1)。野生型 cry I A (C) プロトキシン遺伝子は、Nco I / Sal I 断片と同様にク  
ローン化され、pZS224 と命名するプラスミドを得る。このアプローチにより、そのタン  
パク質コーディング領域の 3 側のパチルス・チューリンゲンシス DNA が、両プラスミ  
ド、pZS223 と pZS224 から削除される。

それぞれ、トランスプラストーム Nt-pZS223 と Nt-pZS224 を得るための、野生型色素体ゲノ  
ム (Nt-ptDNA) 内へのベクター pZS223 と pZS224 からの対応 cry 遺伝子の挿入を、図 1 に示  
す。図 1 中に使用する略号は、以下のものである：16S、16S rRNA 遺伝子；trnV、trnV  
遺伝子；aadA、スペクチノマイシン耐性遺伝子；cry I A と cry73 は、それぞれ、合成と生  
来のパチルス・チューリンゲンシスの d - 内毒素遺伝子である。制限エンドヌクレアーゼ  
解裂部位を、以下のように命名した：

B, BamHI ; Bg, Bgl II ; H, Hind III ; N, Nco I ; RI, EcoRI ; RV, EcoRV ; S,  
Sal I。

#### 実施例 2 植物色素体形質転換

粒子砲撃 (particle bombardment) (粒子銃) によるタバコ色素体ゲノムの安定した形質  
転換は、Svab et al. (1990 前掲) 及び Svab et al (1993 前掲) 中に報告されている。こ  
の中に記載された方法は、本明細書中に記載された色素体発現構築物により形質転換され  
た植物を得るために使用されることができる。このような方法は、一般的に、標的宿主外  
植体、好ましくは、代謝的に活性な色素体に富む組織、例えば、葉又は子葉を含む緑色植  
物組織から作られた外植体の DNA 砲撃を含む。

タバコの種 (*N. tabacum* v. Xanthi N/C) を、50% chlorox 溶液 (2.5% 次亜塩素酸ナトリ  
ウム) 中で 20 分間表面滅菌し、そして滅菌 H<sub>2</sub>O 中で 4 回濯ぐ。これらを、0.2 倍 MS 塩培地上  
に無菌的にプレートし、そして発芽させる。この苗木 (seedling) を、30 g / 1 スクロー  
スを補った寒天固化 MS 培地上で成長させる (Murashige et al. (1962) *Physiol. Plant* 15  
: 493-497)。

タングステンマイクロプロジェクトイル (microprojectiles) (1.0 μ M) を、Maliga  
(Maliga, P. (1993) *Methods in Plant Molecular Biology-A Laboratory Manual*, eds.  
Pal Maliga, Daniel Kleegig, Anthony Cashmore, Wilhelm Gruissem and Joseph Varner  
; Cold Spring Harbor Press) に従ってプラスミド DNA でコートし、そして RMOP 培地 ; MS  
塩、1 mg / 1 BAP、0.1 mg / 1 NAA、30 g / 1 スクロース及び 0.7% phytagar 上に背軸 (ab  
axial) 側を上にして置いた成熟した葉を砲撃するために使用した。Bio-Rad PDS 1000 He  
システム (Sanford et al., An Improved, heliwm-driven Biolistie device, *Technique*  
3 : 3-16) を使用した) Svab et al (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 : 8526-8530。

プラスミド pZS223 と pZS224 を、上記コーディング・プラスミド DNA として使用する。

砲撃された組織を次に、約 2 日間、細胞分裂促進培地上で培養し、その後、その植物組織  
を、特定の選択剤の阻害量を含む選択培地に移す。形質転換された外植体は、約 3 ~ 8 週  
間以内に緑の苗条を形成した。これらの苗条からの葉を次に、同一の選択培地上で継代培  
養して、ホモ形質の苗条の生産及び選択を保証する。

#### 実施例 3 トランスプラストミック系統の DNA ゲル・プロット分析

マーカー aadA マーカー遺伝子発現について選択された形質転換植物を、その植物の全色素  
体含量が形質転換されているか (ホモ形質の形質転換体であるか) どうかを決めるために  
分析する。典型的には、2 ラウンドの苗条形成とスペクチノマイシン選択の後に、分析され  
たトランスジェニック苗木 (plantlets) の約 50% が、色素体 DNA のサザン・プロット分  
析により測定されるとき、ホモ形質であった。ホモ形質苗木を、さらなる栽培のために選  
択する。

10

20

30

40

50

第2ラウンドの苗条形成とスペクチノマイシン選択の後、各構築物について2つのトランスプラスターミック系統、Nt-pZS223とNt-pZS224を得る。これらの系統を、ホモ形質性(homoplasmy)についてチェックする。サザン・ブロット分析を、タバコ色素体ゲノム内の上記キメラcry遺伝子の組み込みを確認するために使用する。調製、電気泳動、そしてDNAのフィルターへの転写は、記載されたようなものである(Svab et al., (1993前掲))

組み込みの領域をカバーするプローブによるNt-pZS223とNt-pZS224形質転換体内での3.3kb生来のタバコBamHI断片の完全な消失、そしてそれぞれ、5.5kbと7.3kbの(図1参照)、これらの形質転換体内での挿入されたDNAについての予想されたサイズのバンドの出現は、これらの形質転換体植物が、意図された構築物に関してホモ形質であることを確立させた。aadA、cry I A (C) プロトキシン、及び合成cry I A (C) 遺伝子による同一フィルターのプロービングは、予想された5.5と7.3kb BamHI断片へのaadAとcry I A (C) 遺伝子の連絡並びに生来対照内でのこれらの遺伝子の欠如を、立証した。

#### 実施例4 昆虫バイオアッセイ

記載されたように、形質転換植物系統Nt-pZS223とNt-pZS224の発達を、500mg/l スペクチノマイシン・ジヒドロクロライドを補ったRMOP培地上で達成する。植物を、Svab et al. (1990前掲)に従った方法により、同一の選択培地上で継代培養した。次に選択された植物を、1mg/l IBA、500mg/l スペクチノマイシン・ジヒドロクロライド及び0.6% phytagarを含むMS培地中で根付けさせる。

*Helicoverpa zea*と*Heliothis virescens*の卵を、Stoneville, MSのUSDA-ARSから得て、そして孵化させた新生幼虫を、Bioserve (Frenchtown, NJ)からのTabacco Budworm Diet上に置き、5日間28°Cにおいて16:8の光期間においてインキュベートする。この幼虫は、この時~第2後期又は第3前期の齡(instar)の間、成長した。

5日目に、十分に大きくなった幼虫を、そのタバコ植物から摘出し、そしてCD International (Pitman, NJ)からの32ウェル飼養(rearing)トレー内で3mlの2%寒天上に置く。この幼虫を、ウェル当り1に置き、シールし、そして同一条件で5日間インキュベートする。10日目に、その昆虫により消費された葉材料を見積り、そして昆虫を死亡率についてチェックする。幼虫を、それらがピンセットにより突き刺した後に動きを示さなくなる場合に、死と考えた。

#### 実施例5 殺虫剤摂食活性

生来のプロトキシン及び合成“切断”cry I A (C) 遺伝子発現構築物に関してホモ形質である上記タバコ系統内での活性バチルス・チューリンゲンシスd-トキシンの存在及び相対量を測定するために、第3齡の*Heliothis virescens*(タバコ芽食虫(budworm))及び*Helicoverpa zea*(トウモロコシ果穂食虫(earworm)/綿実食い虫(cotton bollworm))の幼虫についてテストする(表参照)。両テスト昆虫は、*H. virescens*よりも10倍耐性である*H. zea*を用いてcry I A (C) 毒素に対して感受性である(MacIntosh et al. (1990) J. Invertebr. Pathol. 56: 258-266)。

第3齡幼虫を、上記バイオアッセイのために選択する。なぜならこの昆虫は、第1齡であるよりもこの段階において上記毒素に対しより耐性であり、これ故、その対照とテスト植物との間のより説得力のある比較を許容するからである。pZS223中で使用されたのと同じ合成cry I A (C) 遺伝子による核形質転換により得られ、そして第3齡*H. virescens*に対してより高く毒性であることが示された4083と4084と命名されたタバコ系統を、上記バイオアッセイにおけるポジティブ・コントロールとして使用する。*Nicotiana tabacum*変種“Petite Havana”は、ネガティブ・コントロールとして役立つ。なぜなら、これは、上記トランスプラスターミック系統を生成するために使用された遺伝的背景であるからである。

表1は、バチルス・チューリンゲンシス・タバコ昆虫摂食検定の要約である。これらのデータは、トランスプラスターミック系統Nt-pZS224が両*H. virescens*と*H. zea*に対してひじょうに毒性であることを示す。なぜなら、それは、2%の全葉損傷を維持しながらこれらの昆虫に対し100%の死亡率を生じさせるからである。*H. zea*を用いて検定されるとき

10

20

30

40

50

、上記4083-2-4植物は、100%の死亡率を引き起こすが、より少ない毒素の生産を示すNt-pZS224タバコ系統よりも大きなレベルの葉摂食損傷を維持する。タバコ系統4084-4-1を、摂食においてNt-pZS224タバコと比較して行った。但し、全葉タンパク質の成分として測定されるときNt-pZS224中で生産される毒素のレベルに対し、それを、比較しなかった。タバコ系統Nt-pZS223は、検出可能な生物学的活性を全く示さない。

表 1		BTタバコ昆虫摂食検定の要約				
葉緑体	ベクター	テスト植物	<i>Heliothis virescens</i> <sup>^^</sup>	食べた葉の割合	<i>Helioconvessa zea</i> <sup>^^</sup>	食べた葉の割合
合成毒素遺伝子	pZS223	223-3	死亡無	100%	死亡無	100%
		223-5	死亡無	75%	死亡無	100%
		223-12	NT*		死亡無	100%
		223-13	死亡無	75%	NT*	
野生型プロト	pZS224	224-5	死亡率100%	2%	死亡率100%	2%
キシン遺伝子		224-9	死亡率100%	2%	死亡率100%	2%
核対照						
合成毒素遺伝子	pCGN4083	4083-1-2	死亡率100%	2%	NT*	
		4083-2-4	NT*		死亡率100%	40%
	pCGN4084	4084-8-5	死亡率100%	2%	NT*	
		4084-1-1	NT*		死亡率100%	2%
非形質転換対照						
		対照 1	死亡率25%	75%	死亡無	100%
		対照 2	死亡無	100%	NT*	
		対照 3	死亡率50%	75%	NT*	

^^ 10の第3齢幼虫を、植物毎に個々にテストした。

\*NT: 植物についてテストせず。

行物又は特許明細書が引用により特別に、かつ、個々に取り込まれることを意図されているのと同程度に、引用により本明細書中に取り込む。

これまで、理解の明瞭さの目的をもって説明及び実施例により、いくぶん詳細に説明してきたが、特定の変更及び修正が添付クレームの範囲内で行われることができることは、自明であろう。

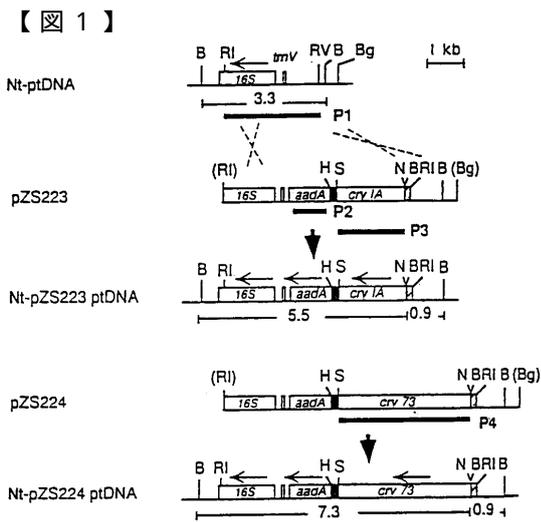


FIG. 1

## フロントページの続き

(73)特許権者 506252967

ステイト ユニバーシティ オブ ニュージャージー ルトガーズ  
STATE UNIVERSITY OF NEW JERSEY RUTGERS  
アメリカ合衆国08901ニュージャージー州ニュー・ブランズウィック、アドミニストレイティ  
ブ・サービス・ビルディング4、オフィス・オブ・コーポレート・リエゾン・アンド・テクノロジー  
・トランスファー

(74)代理人 100081422

弁理士 田中 光雄

(74)代理人 100106231

弁理士 矢野 正樹

(72)発明者 マクブライド, ケビン イー.

アメリカ合衆国, カリフォルニア 95616, デイビス, マリナ サークル 1309

(72)発明者 マリガ, パル

アメリカ合衆国, ニュージャージー 08816, イースト ブランズウィック, ミッチェル ア  
ベニュー 51

## 合議体

審判長 鶴飼 健

審判官 鈴木 恵理子

審判官 小暮 道明

(56)参考文献 特開昭60-94041(JP, A)

Curr. Microbiol. (1990) Vol. 21, No. 5, p. 283 - 288

Plant. Mol. Biol. (1990) Vol. 15, No. 6, p. 809 - 819

Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) Vol. 90, p. 913 - 917

Plant J. (1993) Vol. 3, No. 5, p. 729 - 738

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N15/00-90

A01H5/00

C07K14/325

PUBMED