

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6679643号  
(P6679643)

(45) 発行日 令和2年4月15日(2020.4.15)

(24) 登録日 令和2年3月23日(2020.3.23)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 15/11 (2006.01)	C 1 2 N 15/11 Z N A Z
C 1 2 N 5/04 (2006.01)	C 1 2 N 5/04
C 1 2 N 5/14 (2006.01)	C 1 2 N 5/14
A O 1 H 5/00 (2018.01)	A O 1 H 5/00 A
A O 1 H 1/00 (2006.01)	A O 1 H 1/00 A

請求項の数 15 外国語出願 (全 37 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-67710 (P2018-67710)	(73) 特許権者	501231613
(22) 出願日	平成30年3月30日 (2018.3.30)		モンサント テクノロジー エルエルシー
(62) 分割の表示	特願2016-501559 (P2016-501559) の分割		アメリカ合衆国63167ミズーリ州セン トルイス、ノース・リンドバーグ・プール バード800番
原出願日	平成26年3月12日 (2014.3.12)	(74) 代理人	100106518
(65) 公開番号	特開2018-113983 (P2018-113983A)		弁理士 松谷 道子
(43) 公開日	平成30年7月26日 (2018.7.26)	(74) 代理人	100156122
審査請求日	平成30年3月30日 (2018.3.30)		弁理士 佐藤 剛
(31) 優先権主張番号	61/785,245	(72) 発明者	スタニスラフ・フラシンスキー
(32) 優先日	平成25年3月14日 (2013.3.14)		アメリカ合衆国63167ミズーリ州セン トルイス、ノース・リンドバーグ・プール バード800番
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 植物調節エレメントおよびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

DNA配列を含む組換えDNA分子であって、  
前記配列は、

- a) 配列番号13の全長と少なくとも90%の配列同一性を有するDNA配列であって、  
プロモーター活性を有する、DNA配列、および
  - b) 配列番号13を含むDNA配列
- からなる群から選択されるDNA配列であって、前記配列は、異種性の転写可能なポリヌクレオチド分子へ操作可能に連結されている、組換えDNA分子。

【請求項2】

前記DNA配列は、配列番号13の全長のDNA配列と少なくとも95%の配列同一性を有する、請求項1に記載の組換えDNA分子。

【請求項3】

前記DNA配列は、配列番号13の全長のDNA配列と少なくとも99%の配列同一性を有する、請求項1に記載の組換えDNA分子。

【請求項4】

前記異種性の転写可能なポリヌクレオチド分子は、農学上関心対象の遺伝子を含む、請求項1に記載の組換えDNA分子。

【請求項5】

前記農学上関心対象の遺伝子は、植物における除草剤耐性を与える、請求項4に記載の

組換えDNA分子。

【請求項6】

前記農学上関心対象の遺伝子は、植物における昆虫抵抗性を与える、請求項4に記載の組換えDNA分子。

【請求項7】

DNA配列を含む組換えDNA分子を含むトランスジェニック植物細胞であって、前記配列は、

a) 配列番号13の全長と少なくとも90%の配列同一性を有するDNA配列であって、プロモーター活性を有する、DNA配列、および

b) 配列番号13を含むDNA配列

からなる群から選択されるDNA配列であって、前記配列は、異種性の転写可能なポリヌクレオチド分子へ操作可能に連結されている、トランスジェニック植物細胞。

【請求項8】

前記トランスジェニック植物細胞は、単子葉植物細胞である、請求項7に記載のトランスジェニック植物細胞。

【請求項9】

前記トランスジェニック植物細胞は、双子葉植物細胞である、請求項7に記載のトランスジェニック植物細胞。

【請求項10】

DNA配列を含む組換えDNA分子を含むトランスジェニック植物またはその部分であって、

前記配列は、

a) 配列番号13の全長と少なくとも90%の配列同一性を有するDNA配列であって、プロモーター活性を有する、DNA配列、および

b) 配列番号13を含むDNA配列

からなる群から選択されるDNA配列であって、前記配列は、異種性の転写可能なポリヌクレオチド分子へ操作可能に連結されている、トランスジェニック植物またはその部分。

【請求項11】

請求項10に記載のトランスジェニック植物の子孫植物またはその部分であって、前記組換えDNA分子を含む、トランスジェニック植物の子孫植物またはその部分。

【請求項12】

請求項10に記載のトランスジェニック植物のトランスジェニック種子であって、前記組換えDNA分子を含む、トランスジェニック植物のトランスジェニック種子。

【請求項13】

請求項10に記載のトランスジェニック植物またはその部分を得ること、およびそこから商品用産物を生産することを含む、商品用産物を生産する方法。

【請求項14】

前記商品用産物は、加工した種子、穀粒、植物部分、および食品である、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

トランスジェニック植物を作出する方法であって、

a) 請求項1に記載の組換えDNA分子を用いて植物細胞を形質転換して、形質転換した植物細胞を産生すること、および

b) 前記形質転換した植物細胞からトランスジェニック植物を再生することを含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願に対する参照)

本出願は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる2013年3月14日出願の

10

20

30

40

50

米国仮出願番号第 6 1 / 7 8 5 , 2 4 5 号の利益を請求する。

【 0 0 0 2 】

( 配列表の組み込み )

5 4 . 4 キロバイト ( M i c r o s o f t W i n d o w s ( 登録商標 ) において測定 ) であり、かつ 2 0 1 4 年 3 月 1 2 日に作成されたファイル名「 M O N S 3 3 1 W O . t x t 」に含まれている配列表は、本明細書とともに電子提出によって出願され、参照により本明細書に組み込まれる。

【 0 0 0 3 】

( 本発明の分野 )

本発明は、植物における遺伝子発現を調節するのに有用な植物分子生物学、植物遺伝子工学、および DNA 分子の分野に関する。

10

【 背景技術 】

【 0 0 0 4 】

調節エレメントは、操作可能に連結された転写可能な DNA 分子の転写を調節することによって遺伝子活性を調節する遺伝的要素である。このようなエレメントにはプロモーター、リーダー、イントロン、および 3 ' 非翻訳領域を含み、植物分子生物学および植物遺伝子工学の分野において有用である。

【 発明の概要 】

【 0 0 0 5 】

本発明は、植物における使用のための新規の遺伝子調節エレメント、ならびに当該調節エレメントを含む植物およびコンストラクトを提供する。本発明はまた、当該調節エレメントを含むトランスジェニック植物、植物細胞、植物部分、および種子を提供する。一実施形態において、本発明は、転写可能な DNA 分子へ操作可能に連結された、本明細書に開示される調節エレメントを提供する。ある実施形態において、当該転写可能な DNA 分子は、本明細書に提供される調節配列に関して異種性である。また、当該調節エレメントを含むコンストラクト、ならびに当該調節エレメントに関して異種性である転写可能な DNA 分子へ操作可能に連結された当該調節エレメントを含むトランスジェニック植物、植物細胞、植物部分、および種子を含む、本明細書に開示される調節エレメントを作製および使用するための方法も本明細書が提供される。

20

【 0 0 0 6 】

したがって、一態様において、本発明は、( a ) 配列番号 1 ~ 2 0 のうちのいずれかと少なくとも約 8 5 % の配列同一性を有する DNA 配列、( b ) 配列番号 1 ~ 2 0 のうちのいずれかを含む DNA 配列、および ( c ) 配列番号 1 ~ 2 0 のうちのいずれかの断片からなる群から選択される DNA 配列を含む組換え DNA 分子を提供し、この中で、当該 DNA 配列は、異種性の転写可能な DNA 分子へ操作可能に連結される。「異種性の転写可能な DNA 分子」によって意図されるのは、当該転写可能な DNA 分子が当該 DNA 配列に関して異種性であることである。具体的な実施形態において、当該組換え DNA 分子は、配列番号 1 ~ 2 0 のうちのいずれかの DNA 配列と少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 8 6 %、少なくとも約 8 7 %、少なくとも約 8 8 %、少なくとも約 8 9 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 1 %、少なくとも約 9 2 %、少なくとも約 9 3 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、または少なくとも約 9 9 % の配列同一性を有する DNA 配列を含む。詳細な実施形態において、当該異種性の転写可能な DNA 分子は、植物における除草剤抵抗性または病虫害抵抗性を提供することのできる遺伝子などの農学上関心対象の遺伝子を含む。さらに他の実施形態において、本発明は、本明細書に提供されるような組換え DNA 分子を含むコンストラクトを提供する。

30

40

【 0 0 0 7 】

別の態様において、本明細書に提供されるのは、( a ) 配列番号 1 ~ 2 0 のうちのいずれかと少なくとも約 8 5 % の配列同一性を有する DNA 配列、( b ) 配列番号 1 ~ 2 0 のうちのいずれかを含む DNA 配列、および ( c ) 配列番号 1 ~ 2 0 のうちのいずれかの断

50

片からなる群から選択されるDNA配列を含む組換えDNA分子を含むトランスジェニック植物細胞であって、この中で、当該断片は遺伝子調節活性を有し、この中で当該DNA配列は異種性の転写可能なDNA分子へ操作可能に連結される。ある実施形態において、当該トランスジェニック植物細胞は、単子葉植物細胞である。他の実施形態において、当該トランスジェニック植物細胞は、双子葉植物細胞である。

【0008】

さらにまた別の態様において、本明細書にさらに提供されるのは、(a)配列番号1~20のうちのいずれかと少なくとも約85%の配列同一性を有するDNA配列、(b)配列番号1~20のうちのいずれかを含むDNA配列、および(c)配列番号1~20のうちのいずれかの断片からなる群から選択されるDNA配列を含む組換えDNA分子を含むトランスジェニック植物またはその部分であって、この中で当該断片は遺伝子調節活性を有し、この中で当該DNA配列は異種性の転写可能なDNA分子へ操作可能に連結される。具体的な実施形態において、当該トランスジェニック植物は、出発トランスジェニック植物に対する何らかの世代の子孫植物であり、当該組換えDNA分子を含む。生育した場合にこのようなトランスジェニック植物を作出する組換えDNA分子を含むトランスジェニック種子も本発明によって提供される。

10

【0009】

別の態様において、本発明は、本発明の組換えDNA分子を含有するトランスジェニック植物から商品用産物を生産する方法を提供する。本発明の商品用産物は、検出可能な量の配列番号1~20を含有する。本明細書で使用する場合、「商品用産物」とは、本発明の組換えDNA分子を含有するトランスジェニック植物、植物部分、植物細胞、または種子に由来する材料から構成された何らかの組成物または生成物を指す。商品用産物には、加工した種子、穀粒、植物部分、および食品を含むが、これらに限定されない。本発明の組換えDNA分子を含有するトランスジェニック植物を使用して、植物から典型的に獲得される何らかの商品用産物を製造することができる。本発明の商品用産物は、本発明の組換えDNA分子に対応する検出可能な量のDNAを含有する。試料におけるこの組換えDNA分子のうちの1つ以上の検出は、商品用産物の含有量または源を測定するのに使用してもよい。本明細書に開示される検出方法を含むDNA分子のための何らかの標準的な検出方法を使用してもよい。

20

【0010】

さらにまた別の態様において、本発明は、本発明の組換えDNA分子を含有するトランスジェニック植物を得てかつ当該植物を栽培することによってトランスジェニック植物における農学上関心対象の遺伝子などの転写可能なDNA分子を発現する方法を提供する。

30

【0011】

また本明細書に提供されるのは、形質転換した植物細胞を産生するために本発明の組換えDNA分子を用いて植物細胞を形質転換すること、およびトランスジェニック植物を作出するために当該形質転換した植物細胞を再生することによってトランスジェニック植物を提供する方法である。

【0012】

また本発明によって提供されるのは、コドンを再設計したエシェリカ・コリ (*Escherichia coli*) (*E. coli*) - グルクロニダーゼ (GUS) コード配列であり、この中で当該コドン再設計したGUSコード配列は、無損傷の*E. coli* GUSコード配列よりもトランスジェニック植物における高い発現を示す。一実施形態において、当該コドン再設計したGUSコード配列は、配列番号29および30からなる群から選択することができる。当該トランスジェニック植物は、単子葉植物であってもよい。一実施形態において、当該単子葉植物は、トウモロコシ (ギョクシヨクシヨ)、コメ (イネ)、コムギ (トリチカム属)、オオムギ (*Barley*) (オオムギ (*Hordeum vulgare*))、モロコシ (モロコシ種)、アワ (*Millet*)、トウジンビエ (*Pearl Millet*) (トウジンビエ (*Pennisetum glaucum*))、シコクビエ (*Finger Millet*) (シコクビエ (*Eleusine*

40

50

coracana))、キビ(野生キビ)、アワ(Foxtail Millet)(アワ(Setaria italica))、カラスムギ(エンバク)、ライコムギ、ライムギ(Rye)(ライムギ(Secale cereale))、フォニオ(メヒシバ属)、タマネギ(ネギ種)、パイナップル(パイナップル種)、芝草、サトウキビ(サトウキビ種)、ヤシ(ヤシ科)、タケ(Bamboo)(タケ(Bambuseae))、バナナ(パショウ科)、ショウガ科(Ginger family)(ショウガ科(Zingiberaceae))、ユリ(ユリ属)、ラッパズイセン(スイセン属)、アイリス(Irises)(アイリス(Iris))、アマリリス(ラン科)、カンナ、ブルーベル(ヒアシントイデス属)、およびチューリップ(チューリップ属)からなる群から選択される。当該トランスジェニック植物はまた、双子葉植物であってもよい。一実施形態において、当該双子葉植物は、ダイズ(Soybean)(ダイズ(Glycine max))、ツルマメ(Wild Soybean)(ツルマメ(Glycine soja))、ワタ(ワタ属)、トマト(Tomato)(トマト(Solanum lycopersicum))、コショウ(コショウ属)、カボチャ(カボチャ属)、エンドウマメ(エンドウ)、アルファルファ(ムラサキウマゴヤシ)、タルウマゴヤシ、マメ(インゲンマメ属)、ヒヨコマメ(Chick pea)(ヒヨコマメ(Cicer arietinum))、ヒマワリ(Sunflower)(ヒマワリ(Helianthus annuus))、ジャガイモ(パレイショ)、ピーナッツ(ラッカセイ)、キノア、ソバ(Buckwheat)(ソバ(Fagopyrum esculentum))、イナゴマメ(オニア・シリクア(onia siliqua))、テンサイ(サトウダイコン)、ホウレンソウ(Spinach)(ホウレンソウ(Spinacia oleracea))、およびキュウリ(Cucumber)(キュウリ(Cucumis sativus))からなる群から選択される。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1a-1c】図1a~図1cは、無傷のE.coli - グルクロニダーゼ(GUS)コード配列(CR-Ec.uidA-1:1:4、配列番号31)およびコドンを再設計したE.coli GUSコード配列(CR-Ec.uidA\_nno-1:1:1、配列番号30)の間の配列比較を示す。当該配列比較における同一のヌクレオチドは、星印によって示される。

【0014】

(配列の簡単な説明)

配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、および23はプロモーター配列である。

【0015】

配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22および24はリーダー配列である。

【0016】

配列番号25~28は増幅プライマー配列である。

【0017】

配列番号29および30は、コドン再設計したGUSコード配列である。配列番号29は加工可能なイントロンを含むのに対し、配列番号30は連続したコード配列である。

【0018】

配列番号31は、無傷の大腸菌 - グルクロニダーゼコード配列である。

【0019】

配列番号32は、配列番号31の無傷のE.coliのグルクロニダーゼを基にした加工可能なイントロンを有するGUSコード配列である。

【0020】

配列番号33、39および40は、3'UTR配列である。

【0021】

10

20

30

40

50

配列番号34～37、41および44は、イントロン配列へ操作可能に5'で連結されたリーダー配列へ操作可能に5'で連結されたプロモーター配列、または、配列番号44の場合、リーダー配列へ操作可能に5'で連結されたプロモーター配列のいずれかを含む、転写調節発現エレメント群(EXP)の配列である。

【0022】

配列番号38は、イントロン配列である。

【0023】

配列番号42および44はそれぞれ、ホタル(*Photinus pyralis*)およびウミシイタケ(*Renilla reniformis*)由来のルシフェラーゼタンパク質についてのコード配列である。

【発明を実施するための形態】

【0024】

本発明は、植物における遺伝子調節活性を有するDNA分子を提供する。これらのDNA分子のヌクレオチド配列は配列番号1～20として提供される。これらのDNA分子は、例えば、植物組織における操作可能に連結された転写可能なDNA分子の発現に影響することができ、それゆえ、トランスジェニック植物において操作可能に連結された導入遺伝子の遺伝子発現を調節する。本発明はまた、本発明の組換えDNA分子を含有するトランスジェニック植物細胞、植物、植物部分および種子を含む組成物、ならびにこれらを調製および使用するための方法を提供する。

【0025】

以下の定義および方法は、本発明をより良好に定義するよう、および本発明の実施において当業者を誘導するよう提供される。別段の記載がない限り、用語は、関連技術分野における当業者による従来の使用法に従って理解されることになっている。

【0026】

(DNA分子)

本明細書で使用する場合、用語「DNA」または「DNA分子」は、ゲノム起源または合成起源の二本鎖DNA分子、すなわち、デオキシリボヌクレオチド塩基の重合体を指す。本明細書で使用する場合、用語「DNA配列」は、DNA分子のヌクレオチド配列を指す。本明細書で使用する命名法は、合衆国法典の特許、商標および著作権に関する連邦規則第1.822条の命名法に対応し、WIPO標準ST.25(1998)、補遺2、表1および表3における表に示されている。

【0027】

本明細書で使用する場合、「組換えDNA分子」とは、人間の介在無しでは互いに天然に生じることがないであろうDNA分子の組み合わせを含むDNA分子である。例えば、組換えDNA分子は、互いに関して異種性の少なくとも2つのDNA分子から構成されたDNA分子、天然に存在するDNA配列から逸脱するDNA配列を含むDNA分子、または遺伝子形質転換によって宿主細胞のDNAへと組み込まれたDNA分子であってもよい。

【0028】

本明細書で使用する場合、用語「配列同一性」とは、2つの最適に整列したポリヌクレオチド配列または2つの最適に整列したポリペプチド配列が同一である程度を指す。最適な配列整列化は、2つの配列、例えば、基準配列および別のDNA配列を手動で整列させて、適切な内部ヌクレオチド挿入、欠失、または間隙を伴う配列整列化におけるヌクレオチドの一致数を最大限にすることによってなされる。本明細書で使用する場合、用語「基準配列」とは、配列番号1～20として提供されたDNA配列を指す。

【0029】

本明細書で使用する場合、用語「パーセント配列同一性」または「パーセント同一性」または「%同一性」とは、100を乗じられた同一性分率である。基準配列と最適に整列した配列についての「同一性分率」とは、基準配列におけるヌクレオチドの総数、例えば完全な基準配列の全長におけるヌクレオチドの総数によって除された最適な整列化にお

10

20

30

40

50

るヌクレオチド一致数である。したがって、本発明の一実施形態は、配列番号1~20として本明細書に提供される基準配列に対して最適に整列した場合に、基準配列と少なくとも約85%の同一性、少なくとも約86%の同一性、少なくとも約87%の同一性、少なくとも約88%の同一性、少なくとも約89%の同一性、少なくとも約90%の同一性、少なくとも約91%の同一性、少なくとも約92%の同一性、少なくとも約93%の同一性、少なくとも約94%の同一性、少なくとも約95%の同一性、少なくとも約96%の同一性、少なくとも約97%の同一性、少なくとも約98%の同一性、少なくとも約99%の同一性、または少なくとも約100%の同一性を有する配列を含むDNA分子を提供する。

#### 【0030】

(調節エレメント)

プロモーター、リーダー、エンハンサー、イントロン、および転写終結領域(もしくは3'UTR)などの調節エレメントは、生細胞における遺伝子の全体的な発現における統合部分を担っている。用語「調節エレメント」とは、本明細書で使用する場合、遺伝子調節活性を有するDNA分子を指す。用語「遺伝子調節活性」とは、本明細書で使用する場合、例えば操作可能に連結された転写可能なDNA分子の転写および/または翻訳に影響することによって、当該操作可能に連結された転写可能なDNA分子の発現に影響する能力を指す。植物において機能するプロモーター、リーダー、エンハンサー、イントロンおよび3'UTRなどの調節エレメントはそれゆえ、遺伝子工学を通じて植物の表現型を修飾するのに有用である。

#### 【0031】

本明細書で使用する場合、「調節発現エレメント群」または「EXP」配列とは、エンハンサー、プロモーター、リーダー、およびイントロンなどの操作可能に連結された調節エレメントの群を指してもよい。したがって、調節発現エレメント群は、例えば、リーダー配列へ5'で操作可能に連結されたプロモーターから構成されてもよく、これが順にイントロン配列へ5'で操作可能に連結される。

#### 【0032】

調節エレメントは、その遺伝子発現パターン、例えば、恒常的な発現または時間的、空間的、発達上の、組織の、環境の、生理学的、病理学的、細胞周期の、および/もしくは化学的に応答性のある発現、ならびにこれらの何らかの組み合わせによって、ならびに定量的もしくは定性的な示度によって特徴づけられることがある。本明細書で使用する場合、「遺伝子発現パターン」とは、操作可能に連結されたDNA分子から転写されたRNA分子への転写に関する何らかのパターンである。転写されたRNA分子は、タンパク質分子を生成するよう翻訳されもよく、またはアンチセンス分子もしくは、二本鎖RNA(dsRNA)、転移RNA(tRNA)、リボソームRNA(rRNA)、マイクロRNA(miRNA)、およびこれらに類するものなど、他の調節RNA分子を提供してもよい。

#### 【0033】

本明細書で使用する場合、用語「タンパク質発現」とは、転写されたRNA分子からタンパク質分子への翻訳に関する何らかのパターンである。タンパク質発現は、時間的、空間的、発達上の、もしくは形態学的な量によって、および定量的もしくは定性的な示度によって特徴づけられてもよい。

#### 【0034】

プロモーターは、操作可能に連結された転写可能なDNA分子の発現を調節するための調節エレメントとして有用である。本明細書で使用する場合、用語「プロモーター」とは概して、転写を開始するためのRNAポリメラーゼIIおよび、トランス作用型転写因子などの他のタンパク質の認識および結合に関与するDNA分子を指す。プロモーターは、遺伝子の5'非翻訳領域(5'UTR)から生じ得る。あるいは、プロモーターは、合成で生成されたまたは操作されたDNA分子であってもよい。プロモーターはまた、キメラであってもよい。キメラプロモーターは、2つ以上の異種性DNA分子の融合を通じて生

10

20

30

40

50

成される。本発明を実施する上で有用なプロモーターには、その断片またはバリエーションを含む配列番号 1、3、5、7、9、11、13、15、17、および 19 を含む。本発明の具体的な実施形態において、このような DNA 分子および本明細書に説明されるようなその何らかのバリエーションまたは誘導体は、プロモーター活性を含むものとしてさらに定義されてもよく、すなわち、トランスジェニック植物などにおける宿主細胞におけるプロモーターとして作用することができる。さらなる具体的な実施形態において、断片は、由来する出発プロモーター分子によって有されるプロモーター活性を呈示するものとして定義してもよく、または断片は、基本レベルの転写を提供しかつ転写の開始のための RNA ポリメラーゼ I の認識および結合のための T A T A ボックスまたは等価の DNA 配列から構成された「最小プロモーター」を含んでもよい。

10

## 【0035】

一実施形態において、本明細書に開示されるプロモーター配列の断片が提供される。プロモーター断片は、先に説明したようにプロモーター活性を含んでいてもよく、単独で、またはキメラプロモーターを構築するなどの上で他のプロモーターおよびプロモーター断片と組み合わせで有用であってもよい。具体的な実施形態において、本明細書に開示されるプロモーター活性を有するポリヌクレオチド分子の少なくとも約 50、少なくとも約 75、少なくとも約 95、少なくとも約 100、少なくとも約 125、少なくとも約 150、少なくとも約 175、少なくとも約 200、少なくとも約 225、少なくとも約 250、少なくとも約 275、少なくとも約 300、少なくとも約 500、少なくとも約 600、少なくとも約 700、少なくとも約 750、少なくとも約 800、少なくとも約 900、または少なくとも約 1000 の連続したヌクレオチドまたはそれより長いものを含むプロモーターの断片が提供される。このような断片を出発プロモーター分子から生成するための方法は、当該技術分野で周知である。

20

## 【0036】

内部のもしくは 5' の欠失など、配列番号 1、3、5、7、9、11、13、15、17、および 19 として呈されるプロモーターのうちの何らかに由来する組成物は、例えば、発現に及ぼす正もしくは負のいずれかの効果を有する要素を除去すること、発現に及ぼす正もしくは負の効果を有する要素を複製すること、および/または発現に及ぼす組織特異的もしくは細胞特異的な効果を有する要素を複製もしくは除去することによって発現を改善もしくは変更するために、当該技術分野で公知の方法を用いて生成することができる。T A T A ボックスエレメントまたはその等価の配列および下流の配列が除去された 3' での欠失から構成された、配列番号 1、3、5、7、9、11、13、15、17、および 19 として呈されるプロモーターのうちのいずれかに由来する組成物を使用して、例えば、エンハンサーエレメントを作ることができる。さらなる欠失は、発現に及ぼす正もしくは負の、組織特異的、細胞特異的、もしくはタイミング特異的（概日リズムなどだがこれに限定されない。）な効果を有する何らかのエレメントを除去するために行うことができる。配列番号 1、3、5、7、9、11、13、15、17、および 19 として呈されるプロモーターのうちの何らか、およびそこから由来する断片もしくはエンハンサーを使用して、配列番号 1、3、5、7、9、11、13、15、17、および 19 として呈されるプロモーターならびにそこから由来し他のエンハンサーおよびプロモーターへ操作可能に連結された断片もしくはエンハンサーのうちの何らかから構成されるキメラ転写調節エレメント組成物を作ることができる。

30

40

## 【0037】

本発明に従って、プロモーターまたはプロモーター断片は、公知のプロモーターエレメント、すなわち、T A T A ボックスおよび他の公知の転写因子結合部位モチーフなどの、DNA 配列特徴の存在について分析されてもよい。このような公知のプロモーターエレメントの識別は、元のプロモーターと類似の発現パターンを有するプロモーターのバリエーションを設計するために、当業者によって使用されてもよい。

## 【0038】

本明細書で使用する場合、用語「リーダー」とは、遺伝子の非翻訳 5' 領域（5' U T

50



R)由来のDNA分子を指し、概して、転写出発部位(TSS)とタンパク質コード配列出発部位の間のヌクレオチドセグメントとして定義される。あるいは、リーダーは、合成で生成または操作されたDNAエレメントであってもよい。リーダーは、操作可能に連結された転写可能なDNA分子の発現を調節するための5'調節エレメントとして使用することができる。リーダー分子は、異種性のプロモーターとともにまたはその天然のプロモーターとともに使用してもよい。本発明のプロモーター分子はしたがって、その無傷のリーダーへ操作可能に連結されてもよく、または異種性のリーダーへ操作可能に連結されてもよい。本発明を実施する上で有用なリーダーには、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、および20またはその断片もしくはバリエーションを含む。具体的な実施形態において、このようなDNA配列は、例えば、トランスジェニック植物細胞を含む宿主細胞におけるリーダーとして作用することができるものとして定義してもよい。一実施形態において、このようなDNA配列は、リーダー活性を含むものとして解読される。

10

**【0039】**

配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、および20として呈されるリーダー配列(5'UTR)は、調節エレメントから構成されてもよく、または操作可能に連結されたDNA分子の転写もしくは翻訳に及ぼす効果を有することのできる二次構造を採用してもよい。配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、および20として呈されるリーダー配列は本発明に従って使用して、操作可能に連結されたDNA分子の転写もしくは翻訳に影響するキメラ調節エレメントを作ることができる。加えて、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、および20として呈されるリーダー配列を使用して、操作可能に連結されたDNA分子の転写もしくは翻訳に影響するキメラリーダー配列を作ることができる。

20

**【0040】**

本明細書で使用する場合、用語「イントロン」とは概して、遺伝子から識別されてもよくかつ翻訳の前に伝令RNA(mRNA)プロセッシングの間にスプライスして外れる領域として定義されてもよいDNA分子を指す。あるいは、イントロンは、合成で生成または操作されたDNAエレメントであってもよい。イントロンは、操作可能に連結された転写可能なDNA分子の発現を調節するための調節エレメントとして使用してもよい。コンストラクトはイントロンを含んでいてもよく、当該イントロンは、転写可能なDNA分子に関して異種性であってもよくまたは異種性でなくてもよい。当該技術分野におけるイントロンの例として、コメアクチンイントロンおよびトウモロコシHSP70イントロンがある。

30

**【0041】**

植物において、遺伝子コンストラクトにおけるいくつかのイントロンの包含は、当該イントロンを欠失するコンストラクトと比較して高いmRNAおよびタンパク質の蓄積をもたらす。この効果は、遺伝子発現の「イントロン仲介性亢進」(IME)と呼ばれる(Mascarenhasら, Plant Mol. Biol. 15: 913~920, 1990)。植物における発現を刺激することが公知のイントロンは、トウモロコシ遺伝子において(例えば、tubA1、Adh1、Sh1、およびUbi1)、コメ遺伝子において(例えば、tpi)、ならびにペチュニア(例えば、rbcs)、ジャガイモ(例えば、st-1s1)由来およびシロイヌナズナ(例えば、ubq3およびpat1)由来のもののような双子葉植物遺伝子においてすでに識別されている。イントロンのスプライシング部位内の欠失もしくは突然変異が遺伝子発現を低下させることはすでに示されており、このことは、スプライシングがIMEに必要なかもしれないことを示す。しかしながら、双子葉植物におけるIMEがシロイヌナズナ由来のpat1遺伝子のスプライシング部位内の点突然変異によって示されているので、スプライシングはそれ自体、必要ではないのかもしれない。1つの植物における同じイントロンの複数回使用は、不利を呈することが示されている。それらの場合において、適切な組換えDNAエレメントの構築のための基本制御エレメントの収集を有することは必要である。

40

50

## 【0042】

本明細書で使用する場合、本明細書における用語「3'転写終結分子」、「3'非翻訳領域」または「3'UTR」とは、mRNA分子の3'部分の非翻訳領域への転写中に使用されるDNA分子を指す。mRNA分子の3'非翻訳領域は、特異的開裂およびポリA尾部としても公知の3'ポリアデニル化によって生じてよい。3'UTRは、転写可能なDNA分子へ操作可能に連結されて当該DNA分子の下流に位置してもよく、ポリアデニル化シグナルおよび転写、mRNAプロセッシング、または遺伝子発現に影響することのできる他の調節シグナルを含んでもよい。ポリA尾部は、mRNAの安定性において、および翻訳の開始において機能すると考えられている。当該技術分野における3'転写終結分子の例は、ノパリンシンターゼの3'領域、コムギhsp17の3'領域、エンドウマメリブロースピスリン酸カルボキシラーゼ小サブユニットの3'領域、ワタE6の3'領域、およびコイキシシ(coinixin)の3'UTRである。

10

## 【0043】

3'UTRによって、典型的には、特異的DNA分子の組換え発現のための有益な使用が見出される。弱い3'UTRは、リードスルーを生じる能力を有し、このことは、隣接する発現カセットに位置するDNA分子の発現に影響するかもしれない。転写終止の適切な制御は、下流に局在するDNA配列(例えば、他の発現カセット)へのリードスルーを防止することができ、さらに、RNAポリメラーゼの効率的な再利用が遺伝子発現を改善することを可能にすることができる。転写の効率的な終止(DNAからのRNAポリメラーゼIIの放出)は、転写の再開のための前提条件であり、それにより全体的な転写レベルに直接影響する。転写終結の後、成熟mRNAは、合成部位から放出され、テンプレートは細胞質へと輸送される。真核生物mRNAは、インビボでポリ(A)形態として蓄積され、そのことによって、従来の方法によって転写終結部位を検出することは困難となる。さらに、バイオインフォマティクス法による機能的かつ効率的な3'UTRの予測は、有効な3'UTRの容易な予測を許容するであろう保存されたDNA配列がない点で困難である。

20

## 【0044】

実務的な見地から、発現カセットにおいて使用される3'UTRが次の特徴を有することは典型的には有益である。3'UTRは、転写可能なDNA分子の転写を効率的かつ有効に終結することができるべきであり、かつある転移DNA(T-DNA)、またはT-DNAが挿入した隣接する染色体DNAに存在する多重発現カセットにおけるような別の発現カセットから構成することのできる何らかの隣接するDNA配列への転写産物のリードスルーを防止することができるべきである。3'UTRは、当該DNA分子の発現を駆動するのに使用されるプロモーター、リーダー、エンハンサー、およびイントロンによって与えられる転写活性における低下を生じるべきではない。植物生物学において、3'UTRはしばしば、形質転換した植物から抽出される逆転写したRNAの増幅反応の刺激に使用され、かつ(1)植物染色体へ一旦組み込まれた発現カセットの転写活性または発現を評価するために、(2)当該植物DNA内の挿入のコピー数を評価するために、および(3)育種後に結果として生じる種子の接合状態を評価するために使用される。3'UTRはまた、挿入されたカセットの無傷性を特徴づけるために、形質転換された植物から抽出されたDNAの増幅反応において使用される。

30

40

## 【0045】

本明細書で使用する場合、用語「エンハンサー」または「エンハンサーエレメント」とは、全体的な発現パターンの態様を与えるが、操作可能に連結されたDNA配列の転写を駆動するために単独では通常不十分な、シス作用性調節エレメント、別名シスエレメントを指す。プロモーターと違い、エンハンサーエレメントは通常、転写開始部位(TSS)あるいはTATAボックスまたは等価のDNA配列を含まない。プロモーターまたはプロモーター断片は、操作可能に連結されたDNA配列の転写に影響する1つ以上のエンハンサーエレメントを天然に含んでもよい。エンハンサーエレメントはまた、プロモーターへ融合してキメラプロモーターシスエレメントを生成してもよく、このことが遺伝子発現の

50

全体的な調節の態様を与える。

【0046】

多くのプロモーターエンハンサーエレメントは、DNA結合タンパク質を結合しおよび/またはDNAトポロジーに影響すると考えられており、DNAテンプレートへのRNAポリメラーゼのアクセスを選択的に許容または制限し、あるいは転写開始部位における二重らせんの選択的開口を容易にする局所的なコンフォメーションを生じる。エンハンサーエレメントは、転写を調節する転写因子を結合するよう機能し得る。いくつかのエンハンサーエレメントは、1つを超える転写因子を結合し、転写因子は、1つを超えるエンハンサードメインと異なる親和性で相互作用し得る。エンハンサーエレメントは、欠失分析、すなわち5'末端からまたはプロモーターに対して内部の1つ以上のヌクレオチドを欠失すること、DNase Iフットプリント法を用いるDNA結合タンパク質分析、メチル化干渉、電気泳動移動度-シフトアッセイ、ライゲーション仲介性ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によるインピボでのゲノムフットプリント法、および他の従来のアッセイを含むいくつかの技術によって、あるいはBLASTなどの従来のDNA配列比較法を用いて標的配列または標的モチーフとして公知のシスエレメントモチーフまたはエンハンサーエレメントを用いるDNA配列類似性分析によって識別することができる。エンハンサードメインの微細構造は、1つ以上のヌクレオチドの突然変異誘発(または置換)によって、または当該技術分野で公知の他の従来法によってさらに研究することができる。エンハンサーエレメントは、化学合成によってまたはこのようなエレメントを含む調節エレメントからの分離によって得ることができ、当該エレメントは、有用な制限酵素部位を含有してその後の操作を容易にする追加的な隣接するヌクレオチドを用いて合成することができる。したがって、操作可能に連結された転写可能なDNA分子の発現を調節するための、本明細書に開示される方法によるエンハンサーエレメントの設計、構築、および使用は、本発明によって包含される。

10

20

【0047】

本明細書で使用する場合、用語「キメラの」とは、第一のDNA分子を第二のDNA分子と融合させることによって生成される単一のDNA分子を指し、ここで、第一のDNA分子も第二のDNA分子もその立体配置で正常に見られず、すなわち、もう一方に融合している。キメラDNA分子はしたがって、天然では通常含有されない新たなDNA分子である。本明細書で使用する場合、用語「キメラプロモーター」とは、DNA分子のこのような操作を通じて生成されるプロモーターを指す。キメラプロモーターは、2つ以上のDNA断片、例えば、プロモーターのエンハンサーエレメントへの融合を組み込んでよい。したがって、操作可能に連結された転写可能なポリヌクレオチド分子の発現を調節するための本明細書に開示される方法によるキメラプロモーターの設計、構築、および使用は、本発明によって包含される。

30

【0048】

本明細書で使用する場合、用語「バリエント」とは、第一のDNA分子と組成においては類似しているが同一ではない、調節エレメントなどの第二のDNA分子を指し、この中で第二のDNA分子は、第一のDNA分子の一般的な機能性、すなわち同じまたは類似の発現パターンをなおも維持する。バリエントは、第一のDNA分子の短くなつたもしくは先端を切ったバージョンならびに/あるいは、異なる制限酵素部位を有するものおよび/または内部の欠失、置換、および/もしくは挿入を有するもの第一のDNA分子のDNA配列の変化したバージョンであってもよい。調節エレメントの「バリエント」はまた、細菌細胞および植物細胞の形質転換において天然に生じる突然変異から生じるバリエントを包含する。本発明において、配列番号1~20として提供されるDNA配列を使用して、元の調節エレメントの一般的な機能性、すなわち同じまたは類似の発現パターンをなおも維持しながら、元の調節エレメントのDNA配列と組成では類似しているが当該DNA配列と同一ではないバリエントを作製してもよい。本発明のこのようなバリエントの生成は、本開示の点において当該技術分野の通常の技術内に十分あり、および本発明の範囲内に包含される。

40

50

## 【 0 0 4 9 】

キメラ調節エレメントは、制限酵素切断およびライゲーション、ライゲーション非依存性クローニング、増幅中のPCR産物のモジュール組み立て、または調節エレメントの直接的な化学合成などの当該技術分野で公知の種々の方法、ならびに当該技術分野で公知の他の方法によって操作上連結されてもよい種々の構成因子エレメントを含むよう設計することができる。結果として生じる種々のキメラ調節エレメントは、当該キメラ調節エレメント、またはそのバリエーションからなることができるが、構成因子エレメントは、構成因子部分が操作上連結できる連結している1つのもしくは複数のDNA配列を含む1つのもしくは複数のDNA配列において異なる。本発明において、配列番号1～20として提供されるDNA配列は、調節エレメント基準配列を提供し得、この中で、当該基準配列を含む構成因子エレメントは、当該技術分野で公知の方法によって接合してもよく、ならびに1つ以上のヌクレオチドの置換、欠失、および/もしくは挿入、または細菌細胞および植物細胞の形質転換において天然に生じる突然変異を含んでもよい。

10

## 【 0 0 5 0 】

特定の導入遺伝子の所望の発現態様に及ぼす、本明細書に説明される修飾、重複または欠失の効力は、結果を確認するために本明細書の作業実施例において説明されるものなど、安定したおよび一過性の植物アッセイにおいて経験的に検査してもよく、当該結果は、出発DNA分子においてなされた変化および変化の目標に応じて変わり得る。

## 【 0 0 5 1 】

(コンストラクト)

本明細書で使用する場合、用語「コンストラクト」とは、少なくとも1つのDNA分子が別のDNA分子へ、機能的に操作する様式で連結された、すなわち操作可能に連結されたDNA分子を含む、ゲノム組み込みまたは自己複製が可能な、何らかの源に由来する、プラスミド、コスミド、ウイルス、ファージ、または直鎖もしくは環状のDNA分子もしくはRNA分子などの、何らかの組換えDNA分子を意味する。本明細書で使用する場合、用語「ベクター」は、形質転換、すなわち、異種性DNAまたはRNAの宿主細胞への導入の目的に使用してもよい何らかのコンストラクトを意味する。コンストラクトには典型的には、1つ以上の発現カセットを含む。本明細書で使用する場合、「発現カセット」とは、1つ以上の調節エレメント、典型的には少なくともプロモーターおよび3'UTRへ操作可能に連結された少なくとも転写可能なDNA分子を含むDNA分子を指す。

20

30

## 【 0 0 5 2 】

本明細書で使用する場合、用語「操作可能に連結された」とは、第二のDNA分子へ結合した第一のDNA分子を指し、この中で当該第一のおよび第二のDNA分子は、当該第一のDNA分子が当該第二のDNA分子の機能に影響するよう配置される。当該2つのDNA分子は、単一の連続したDNA分子の一部であってもよくまたはそうでなくてもよく、隣接していてもよくまたはそうでなくてもよい。例えば、プロモーターは、細胞における関心対象の転写可能なDNA分子の転写を調節する場合、当該転写可能なDNA分子へ操作可能に連結されている。例えば、リーダーは、DNA配列の転写または翻訳に影響することができる場合、当該DNA配列へ操作可能に連結されている。

## 【 0 0 5 3 】

本発明のコンストラクトは、一実施形態において、アグロバクテリウム・ツメファシエンスによって提供される転移分子とともに、植物細胞のゲノムへのT-DNAの組み込みを可能にするT-DNAを含むアグロバクテリウム・ツメファシエンスから単離された二重腫瘍誘導(Ti)プラスミドの右の太線領域(RBまたはAGRTU・RB)および左の太線領域(LBまたはAGRTU・LB)を有するTiプラスミド境界コンストラクトとして提供してもよい(例えば、米国特許第6,603,061号を参照されたい)。当該コンストラクトはまた、細菌細胞における複製機能および抗生物質選択を提供するプラスミド骨格DNAセグメント、例えば、大腸菌のori322などの複製起点、oriVまたはoriRiなどの広範な宿主範囲の複製起点、およびスペクチノマイシンもしくはストレプトマイシン、またはゲンタマイシン(Gm、Gent)選択的マーカー遺伝子

40

50

に対する耐性を与える T n 7 アミノグリコシドアデニルトランスフェラーゼ ( a a d A ) についてコードする S p e c / S t r p などの選択可能なマーカーについてのコード領域を含有してもよい。植物の形質転換については、宿主細菌株はしばしば、アグロバクテリウム・ツメファシエンス A B I、C 5 8、または L B A 4 4 0 4 であるが、植物の形質転換に関する当業者に公知の他の株は、本発明において機能することができる。

【 0 0 5 4 】

転写可能な D N A 分子が、タンパク質として翻訳および発現する機能的 m R N A 分子へと転写されるような様式で、コンストラクトを組み立てて細胞へと導入するための方法は、当該技術分野で公知である。本発明の実施のために、コンストラクトおよび宿主細胞を調製および使用するための従来の組成物および方法は、当業者に周知である。より高次の植物における核酸の発現に有用な典型的なベクターは、当該技術分野で周知であり、アグロバクテリウム・ツメファシエンスの T i プラスミドおよび p C a M V C N 転移制御ベクターに由来するベクターを含む。

10

【 0 0 5 5 】

種々の調節エレメントは、本明細書に提供されるもののうちの何らかを含むコンストラクトに含まれてもよい。このような何らかの調節エレメントは、他の調節エレメントと組み合わせて提供してもよい。このような組み合わせは、望ましい調節特徴を生じるよう設計または改変することができる。一実施形態において、本発明のコンストラクトは、3' U T R へ操作可能に連結された転写可能な D N A 分子へ操作可能に連結された少なくとも 1 つの調節エレメントを含む。

20

【 0 0 5 6 】

本発明のコンストラクトは、本明細書に提供されるまたは当該技術分野で公知の何らかのプロモーターまたはリーダーを含んでもよい。例えば、本発明のプロモーターは、熱ショックタンパク質遺伝子に由来するものなど、異種性の非翻訳の 5' リーダーへ操作可能に連結されてもよい。あるいは、本発明のリーダーは、カリフラワーモザイクウイルス 3 5 S 転写プロモーターなどの異種性プロモーターへ操作可能に連結してもよい。

【 0 0 5 7 】

発現カセットはまた、特に葉緑体、白色体、もしくは他のプラスミド小器官、ミトコンドリア、ペルオキシソーム、液泡、または細胞外位置へ操作可能に連結されたタンパク質の細胞内標的化に有用なペプチドをコードする移行ペプチドコード配列を含んでもよい。多くの葉緑体局在性タンパク質は、前駆体として核遺伝子から発現し、葉緑体移行ペプチド ( C T P ) によって葉緑体へ標的化される。このような単離された葉緑体タンパク質の例としては、リブロース - 1 , 5 , - ニリン酸カルボキシラーゼの小サブユニット ( S S U )、フェレドキシン、フェレドキシンオキシドリダクターゼ、光収穫複合体タンパク質 I およびタンパク質 I I、チオレドキシン F、ならびにエノールピルビルシキマートホスファートシンターゼ ( E P S P S ) と結合しているものを含むが、これらに限定されない。葉緑体移行ペプチドは、例えば、米国特許第 7 , 1 9 3 , 1 3 3 号に説明されている。非葉緑体タンパク質が、非葉緑体タンパク質をコードする導入遺伝子へ操作可能に連結された異種性 C T P の発現によって、葉緑体へ標的化されてもよいことは実証されている。

30

【 0 0 5 8 】

( 転写可能な D N A 分子 )

本明細書で使用する場合、用語「転写可能な D N A 分子」とは、タンパク質コード配列を有するものおよび遺伝子抑制に有用な配列を有する R N A 分子を生成するものを含むがこれらに限定されない、R N A 分子へ転写することのできる何らかの D N A 分子を指す。D N A 分子の種類には、同じ植物由来の D N A 分子、別の植物由来の D N A 分子、異なる生体由来の D N A 分子、あるいは遺伝子のアンチセンスメッセージを含有する D N A 分子または導入遺伝子の人工的な、合成の、もしくは修飾されたバージョンをコードする D N A 分子などの合成 D N A 分子を含むことができるが、これらに限定されない。本発明のコンストラクトへの組み込みのための例示的な転写可能な D N A 分子には、例えば、D N A 分子が組み込まれた種以外の種に由来する D N A 分子または遺伝子、あるいは、同じ種に

40

50

由来するもしくは存在するが、古典的な育種技術よりもむしろ遺伝子工学法によって受け手細胞へと組み込まれる遺伝子を含む。

【0059】

「導入遺伝子」とは、少なくとも宿主細胞ゲノムにおけるその位置に関する宿主細胞に対して異種性の転写可能なDNA分子、および/または当該細胞の現行世代もしくは何らかの先行世代における宿主細胞のゲノムへ人工的に組み込まれた転写可能なDNA分子を指す。

【0060】

本発明のプロモーターなどの調節エレメントは、当該調節エレメントに関して異種性である転写可能なDNA分子へ操作可能に連結してもよい。本明細書で使用する場合、用語「異種性の」とは、2つ以上のDNA分子の組み合わせが通常では天然に認められない場合のこのような組み合わせを指す。例えば、当該2つのDNA分子は異なる種に由来してもよく、および/または当該2つのDNA分子は、異なる遺伝子、例えば、同じ種由来の異なる遺伝子、または異なる種由来の同じ遺伝子に由来してもよい。調節エレメントはしたがって、このような組み合わせが通常天然では認められない場合、すなわち、転写可能なDNA分子が調節エレメントへ操作可能に連結されるのが天然では生じない場合、操作可能に連結された転写可能なDNA分子に関して異種性である。

【0061】

転写可能なDNA分子は概して、転写産物の発現が所望の何らかのDNA分子であってもよい。このような転写産物の発現は結果的に、結果的として生じるmRNA分子の翻訳、したがってタンパク質の発現を生じてもよい。あるいは例えば、転写可能なDNA分子は、特異的な遺伝子もしくはタンパク質の発現低下を究極的に生じるよう設計してもよい。一実施形態において、このことは、アンチセンス方向に向いている転写可能なDNA分子を用いることによって達成してもよい。当業者は、このようなアンチセンス技術を用いることに精通している。何らかの遺伝子はこの様式で負に調節されてもよく、一実施形態において、転写可能なDNA分子は、dsRNA、siRNAまたはmiRNAの発現を通じての特異的な遺伝子の抑制について設計してもよい。

【0062】

したがって、本発明の一実施形態は、当該コンストラクトがトランスジェニック植物細胞のゲノムに組み込まれる場合に所望の水準でまたは所望のパターンで転写可能なDNA分子の転写を調節するよう、異種性の転写可能なDNA分子へ操作可能に連結された、配列番号1~20として提供されるものなどの、本発明の調節エレメントを含む組換えDNA分子である。一実施形態では、転写可能なDNA分子は、遺伝子のタンパク質コード領域を含み、別の実施形態では、転写可能なDNA分子は、遺伝子のアンチセンス領域を含む。

【0063】

(農学上関心対象の遺伝子)

転写可能なDNA分子は、農学上関心対象の遺伝子であってもよい。本明細書で使用する場合、用語「農学上関心対象の遺伝子」とは、特定の植物の組織、細胞、または細胞型において発現した場合に所望の特徴を与える、転写可能なDNA分子を指す。農学上関心対象の遺伝子の産物は、植物の形態、生理学的状態、生育、発達、収量、穀粒組成、栄養特性、疾患もしくは病害虫への抵抗性、および/または環境上のもしくは化学的な耐性に及ぼす効果を生じるために、当該植物内で作用してもよく、あるいは、当該植物において供給する病害虫の食餌における殺虫薬として作用してもよい。本発明の一実施形態において、本発明の調節エレメントは、農学上関心対象の遺伝子である転写可能なDNA分子へ調節エレメントが操作可能に連結されるよう、コンストラクトへと組み込まれる。このようなコンストラクトを含有するトランスジェニック植物において、農学上関心対象の遺伝子の発現は、有益な農学的形質を与えることができる。有益な農学的形質には、除草剤耐性、昆虫駆除、改変された収量、疾患抵抗性、病原体抵抗性、改変された植物の生育および発達、改変されたデンプン含有量、改変された含油量、改変された脂肪酸含有量、改変

10

20

30

40

50

されたタンパク質含有量、改変された果実成熟、亢進した動物およびヒトの栄養状態、生体高分子産生、環境ストレス抵抗性、医薬ペプチド、改善されたプロセシングの質、改善された風味、複合種子産生有用性、改善された繊維産生、ならびに所望のバイオ燃料産生を含んでもよいがこれらに限定されない。

【0064】

当該技術分野で公知の農学上関心対象の遺伝子の例としては、除草剤抵抗性（米国特許第6,803,501号、第6,448,476号、第6,248,876号、第6,225,114号、第6,107,549号、第5,866,775号、第5,804,425号、第5,633,435号、および第5,463,175号）、収量の増加（米国特許第USRE38,446号、第6,716,474号、第6,663,906号、第6,476,295号、第6,441,277号、第6,423,828号、第6,399,330号、第6,372,211号、第6,235,971号、第6,222,098号、および第5,716,837号）、昆虫駆除（米国特許第6,809,078号、第6,713,063号、第6,686,452号、第6,657,046号、第6,645,497号、第6,642,030号、第6,639,054号、第6,620,988号、第6,593,293号、第6,555,655号、第6,538,109号、第6,537,756号、第6,521,442号、第6,501,009号、第6,468,523号、第6,326,351号、第6,313,378号、第6,284,949号、第6,281,016号、第6,248,536号、第6,242,241号、第6,221,649号、第6,177,615号、第6,156,573号、第6,153,814号、第6,110,464号、第6,093,695号、第6,063,756号、第6,063,597号、第6,023,013号、第5,959,091号、第5,942,664号、第5,942,658号、第5,880,275号、第5,763,245号、および第5,763,241号）、菌類病抵抗性（米国特許第6,653,280号、第6,573,361号、第6,506,962号、第6,316,407号、第6,215,048号、第5,516,671号、第5,773,696号、第6,121,436号、第6,316,407号、および第6,506,962号）、ウイルス抵抗性（米国特許第6,617,496号、第6,608,241号、第6,015,940号、第6,013,864号、第5,850,023号、および第5,304,730号）、線虫抵抗性（米国特許第6,228,992号）、細菌病抵抗性（米国特許第5,516,671号）、植物の生育および発達（米国特許第6,723,897号および第6,518,488号）、デンプン産生（米国特許第6,538,181号、第6,538,179号、第6,538,178号、第5,750,876号、第6,476,295号）、改変された産油性（米国特許第6,444,876号、第6,426,447号、および第6,380,462号）、高い産油性（米国特許第6,495,739号、第5,608,149号、第6,483,008号、および第6,476,295号）、改変された脂肪酸含有量（米国特許第6,828,475号、第6,822,141号、第6,770,465号、第6,706,950号、第6,660,849号、第6,596,538号、第6,589,767号、第6,537,750号、第6,489,461号、および第6,459,018号）、高いタンパク質産生（米国特許第6,380,466号）、果実成熟（米国特許第5,512,466号）、高い動物およびヒトの栄養状態（米国特許第6,723,837号、第6,653,530号、第6,5412,59号、第5,985,605号、および第6,171,640号）、生体高分子（米国特許第USRE37,543号、第6,228,623号、および第5,958,745号、および第6,946,588号）、環状ストレス抵抗性（米国特許第6,072,103号）、医薬ペプチドおよび分泌性ペプチド（米国特許第6,812,379号、第6,774,283号、第6,140,075号、および第6,080,560号）、改善されたプロセシング形質（米国特許第6,476,295号）、改善された消化性（米国特許第6,531,648号）低ラフィノース（米国特許第6,166,292号）、産業用酵素産物（米国特許第5,543,576号）、改善された風味（米国特許第

10

20

30

40

50

6, 011, 199号)、窒素固定(米国特許第5, 229, 114号)、複合種子産生(米国特許第5, 689, 041号)、繊維産生(米国特許第6, 576, 818号、第6, 271, 443号、第5, 981, 834号、および第5, 869, 720号)、ならびにバイオ燃料産生(米国特許第5, 998, 700号)のためのものがある。

【0065】

あるいは、農学上関心対象の遺伝子は、例えば、アンチセンス(例えば、米国特許第5, 107, 065号を参照されたい)、阻害性RNA(例えば、公開された出願U.S. 2006/0200878およびU.S. 2008/0066206において、ならびに米国特許出願第11/974, 469号において説明されるようなmiRNA仲介性、siRNA仲介性、トランス作用性siRNA仲介性、および段階的なsRNA仲介性の機序による遺伝子発現の調節を含む、「RNAi」)、または共抑制仲介性機序によって内在性遺伝子の遺伝子発現の標的化された調節を生じるRNA分子をコードすることによって、先に記載した植物の特徴または表現型に影響することができる。当該RNAはまた、所望の内在性mRNA産物を開裂するよう操作された触媒性RNA分子(例えば、リボザイムまたはリボスイッチ、例えば、U.S. 2006/0200878を参照されたい)であり得る。遺伝子抑制を生じることのできる分子へと転写可能なDNA分子が転写されるような様式で、コンストラクトを構築して細胞へと導入するための方法は、当該技術分野で公知である。

10

【0066】

植物細胞における転写可能なDNA分子の発現はまた、植物細胞における植物病害虫摂餌を抑制するのに使用することができ、例えば、甲虫類病害虫から単離された組成物および先週病害虫から単離された組成物である。植物病害虫としては、節足動物病害虫、線虫病害虫、および真菌病害虫もしくは微生物病害虫があるが、これらに限定されない。

20

【0067】

(選択可能なマーカー)

選択可能なマーカー導入遺伝子はまた、本発明の調節エレメントともに使用してもよい。本明細書で使用する場合、用語「選択可能なマーカー導入遺伝子」とは、トランスジェニック植物、組織または細胞における発現あるいはその欠失がいくつかの方法でスクリーニングされ、または点数化することのできる何らかの転写可能なDNA分子を指す。本発明の実施における使用のための選択可能なマーカー遺伝子ならびにその関連する選択およびスクリーニングの技術は、当該技術分野で公知であり、 $\beta$ -グルクロニダーゼ(GUS)、緑色蛍光タンパク質(GFP)、抗生物質抵抗性を与えるタンパク質、および除草剤耐性を与えるタンパク質をコードする転写可能なDNA分子を含むが、これらに限定されない。

30

【0068】

( $\beta$ -グルクロニダーゼ)

大腸菌K-12から単離された $\beta$ -グルクロニダーゼ(GUS)は、植物生物学においてもっとも広範に使用されるリポート遺伝子のうちの1つである。大腸菌GUS遺伝子uidAは、細菌染色体上のGUSオペロンの一部である。uidAは、広範な種々のD-グルクロニドによって誘導される。当該GUS酵素は、D-グルクロニドからD-グルクロン酸およびアグリコンへの加水分解を触媒するエキソヒドロラーゼである。大腸菌は、ヒトを含む脊椎動物の消化管の中で生きている。脊椎動物は、グルクロン酸抱合経路を利用して、薬物動態ならびにステロイド類、脂肪族アルコール類、フェノール類、カルボン酸類、糖類および種々の他の代謝産物などの内在性廃棄化合物を解毒する。グルクロン酸抱合は、D-グルクロン酸との共役を包含する。このことは主として肝臓で生じるが、腎臓、副腎、および消化管などの他の組織および器官においても生じる。グルクロン酸は、大腸菌によって炭素およびエネルギーのための主要源として利用することができる。大腸菌GUSタンパク質はそれゆえ、当該細菌が脊椎動物の消化管におけるグルクロン酸抱合経路の産物を分解してグルクロン酸を炭素およびエネルギーの源として生じることができる手段を提供する。またGUS酵素によって遊離するアグリコンは概して、当

40

50



該細菌によって分解されるだけでなく、D - グルクロン酸のためのシャトルとしても利用される ( G i l l i s s e n ら , T r a n s g e n i c R e s e a r c h , 7 : 1 5 7 ~ 1 6 3 , 1 9 9 8 ) 。

#### 【 0 0 6 9 】

リポーターとしての大腸菌 - グルクロニダーゼ遺伝子の使用は、 J e f f e r s o n ら ( P r o c . N a t l . A c a d . S c i . , 8 3 : 8 4 4 7 ~ 8 4 5 1 , 1 9 8 6 ) によって最初に説明され、その導入以来最初に説明されたのとほぼ同じ様式で使用されてきた。当該 G U S 遺伝子は、植物遺伝子発現をモニターするのに使用され、プロモーターまたは他の発現エレメントを特徴づけるのに頻繁に採用される。しかしながら、いくつかの植物プロモーターは非常に低水準で発現するので、G U S 系アッセイを用いて検出することはできないことがある。これらの比較的強く発現するプロモーターは、改善された収量などの所望の発現型を有するトランスジェニック作物の開発に価値があるかもしれない。

10

#### 【 0 0 7 0 】

トランスジェニック作物植物の開発において初期には、高い恒常的発現を提供するプロモーターが最も望まれていた。カリフラワーモザイクウイルスおよびゴマノハグサモザイクウイルスなどの植物ウイルスゲノムに由来するこれらの高い恒常的プロモーターを使用して、除草剤耐性または昆虫抵抗性を与える導入遺伝子を駆動した。植物生物学の分野が複雑性を増すにつれ、より特異的な発現パターンまたはより低水準の発現を必要とするさらに新たなトランスジェニック形質が開発中である。不適切な植物組織における過剰発現または発現は、形質転換した植物における望ましくない効果をもたらす可能性がある。例えば、植物における酵素遺伝子の異所性発現 ( 生体の異常な場所における遺伝子の発現 ) は結果的に、代謝経路の分岐点における前駆体の不足により、所望の最終産物の減少を生じる可能性がある ( I w a s e ら , P l a n t B i o t e c h . 2 6 : 2 9 ~ 3 8 , 2 0 0 9 ) 。

20

#### 【 0 0 7 1 】

転写因子 ( T F ) は、細胞内過程の主要調節因子として天然に作用するので、T F は、作物植物における複雑な形質を改変するための優れた候補であると期待され、T F 系の技術は、好結果の生物学作物に関する次世代の傑出した部分であるようである。T F 技術はしばしば、生育遅滞などの望ましくない副作用を低下させるため、または所望の形質を商業的価値がある水準まで高めるためのいずれかのために最適化を必要とする。最適化はしばしば、T F 導入遺伝子の発現を改変することによってアプローチされる。通常の恒常的プロモーターよりもむしろ、組織特異的、発達上の、または誘導性のプロモーターは、導入遺伝子の発現を適切な組織または環境条件に制限するのに利用することができる ( C e n t u r y ら , P l a n t P h y s i o l o g y , 1 4 7 : 2 0 ~ 2 9 , 2 0 0 8 ) 。

30

#### 【 0 0 7 2 】

これらの開発の一部起因して、所望の発現水準および発現パターンを提供する発現エレメントを識別するために、発現エレメント特徴づけのためのより感度のあるアッセイが必要である。本発明は、プロモーターへ操作可能に連結された場合に、当該技術分野で通常使用される天然の大腸菌 G U S コード配列よりも良好に発現する、改善されコドンの再設計された G U S コード配列を提供する。この改善されコドンの再設計された G U S コード配列を使用して、量的および定性的の両方でより優れたアッセイ感度を提供することができ、天然の大腸菌 G U S コード配列では不可能であり得る、プロモーターおよび他の発現エレメントの特徴づけが可能となる。改善されコドンの再設計された G U S コード配列を使用して、単子葉植物および双子葉植物における発現エレメントを特徴づけることができる。本発明を実施するのに有用な単子葉植物には、トウモロコシ ( ギョクシヨクシヨ ) 、コメ ( イネ ) 、コムギ ( トリチカム属 ) 、オオムギ ( B a r l e y ) ( オオムギ ( H o r d e u m v u l g a r e ) ) 、モロコシ ( モロコシ種 ) 、アワ ( M i l l e t ) 、トウジンビエ ( P e a r l M i l l e t ) ( トウジンビエ ( P e n n i s e t u m g l

40

50

aucum))、シコクビエ(Finger Millet)(シコクビエ(Eleusine coracana))、キビ(野生キビ)、アワ(Foxtail Millet)(アワ(Setaria italica))、カラスムギ(エンバク)、ライコムギ、ライムギ(Rye)(ライムギ(Secale cereale))、フォニオ(メヒシバ属)、タマネギ(ネギ種)、パイナップル(パイナップル種)、芝草、サトウキビ(サトウキビ種)、ヤシ(ヤシ科)、タケ(Bamboo)(タケ(Bambuseae))、バナナ(バショウ科)、ショウガ科(Ginger family)(ショウガ科(Zingiberaceae))、ユリ(ユリ属)、ラッパズイセン(スイセン属)、アイリス(Irises)(アイリス(Iris))、アマリリス(ラン科)、カンナ、ブルーベル(ヒアシントイデス属)、およびチューリップ(チューリップ属)が含まれるが、これらに限定されない。本発明を実施するのに有用な双子葉植物には、ダイズ(Soybean)(ダイズ(Glycine max))、ツルマメ(Wild Soybean)(ツルマメ(Glycine soja))、ワタ(ワタ属)、トマト(Tomato)(トマト(Solanum lycopersicum))、コショウ(コショウ属)、カボチャ(カボチャ属)、エンドウマメ(エンドウ)、アルファルファ(ムラサキウマゴヤシ)、タルウマゴヤシ、マメ(インゲンマメ属)、ヒヨコマメ(Chick pea)(ヒヨコマメ(Cicer arietinum))、ヒマワリ(Sunflower)(ヒマワリ(Helianthus annuus))、ジャガイモ(パレイショ)、ピーナツ(ラッカセイ)、キノア、ソバ(Buckwheat)(ソバ(Fagopyrum esculentum))、イナゴマメ(オニア・シリクア(onia siliqua))、テンサイ(サトウダイコン)、ホウレンソウ(Spinach)(ホウレンソウ(Spinacia oleracea))、およびキュウリ(Cucumber)(キュウリ(Cucumis sativus))が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0073】

(細胞の形質転換)

本発明はまた、転写可能なDNA分子へ操作可能に連結された1つ以上の調節エレメントを含む形質転換した細胞および植物を作る方法に関する。

#### 【0074】

用語「形質転換」とは、受け手宿主へのDNA分子の導入を指す。本明細書で使用する場合、用語「宿主」とは、細菌、真菌、または植物の何らかの細胞、組織、器官、または子孫を含む、細菌、真菌、または植物を指す。特定の関心対象の植物の組織および細胞には、原形質体、カルス、根、塊茎、種子、茎、葉、実生、胚、および花粉を含む。

#### 【0075】

本明細書で使用する場合、用語「形質転換した」とは、コンストラクトなどの外来のDNA分子が導入された細胞、組織、器官、または生体を指す。導入されたDNA分子は、導入されたDNA分子はその後の子孫によって受け継がれるよう、受け手の細胞、組織、器官、または生体のゲノムDNAへと組み込まれてもよい。「トランスジェニック」細胞もしくは生体または「形質転換した」細胞もしくは生体はまた、当該細胞もしくは当該生体の子孫、あるいは交差における親のようなトランスジェニック生体を採用しかつ外来のDNA分子の存在から結果的に生じる変化した表現型を呈する育種プログラムから生じる子孫を含んでもよい。導入されたDNA分子はまた、導入されたDNA分子はその後の子孫によって受け継がれないように、受け手の細胞へと一過性に導入されてもよい。用語「トランスジェニック」とは、1つ以上の異種性のDNA分子を含有する細菌、真菌、または植物を指す。

#### 【0076】

植物細胞へDNA分子を導入するための、当業者に周知の多くの方法がある。当該過程は概して、適切な宿主細胞を選択する工程、当該宿主細胞をベクターで形質転換する工程、および当該形質転換した宿主細胞を得る工程を含む。本発明の実施においてコンストラクトを植物ゲノムへ導入することによって植物細胞を形質転換するための方法および材料

10

20

30

40

50

には、周知のおよび実証された方法のうちの何らかを含むことができる。適切な方法にはとりわけ、細菌感染（例えば、アグロバクテリウム）、パイナリーBACベクター、DNAの直接的な送達（例えば、PEG仲介性形質転換、乾燥/阻害仲介性DNA取り込み、電気穿孔法、炭化ケイ素繊維を用いた攪拌、ならびにDNA被覆した粒子の加速）が含まれるがこれらに限定されない。

【0077】

宿主細胞は、植物細胞、藻類細胞、藻類、真菌細胞、真菌、細菌細胞、または昆虫細胞などの何らかの細胞または生体であってもよい。具体的な実施形態において、宿主細胞および形質転換した細胞には、作物植物由来の細胞を含んでもよい。

【0078】

トランスジェニック植物はその後、本発明のトランスジェニック植物細胞から再生してもよい。従来 of 育種技術または自家受粉を使用して、種子は、このトランスジェニック植物から産生してもよい。このような種子、およびこのような種子から生育する結果として生じる子孫植物は、本発明の組換えDNA分子を含有し、それゆえトランスジェニックである。

【0079】

本発明のトランスジェニック植物は自家受粉して、本発明のホモ接合性トランスジェニック植物（組換えDNA分子についてホモ接合性）のための種子を提供することができ、または非トランスジェニック植物もしくは異なるトランスジェニック植物と交雑して本発明のヘテロ接合性トランスジェニック植物（組換えDNA分子についてヘテロ接合性）のための種子を提供することができる。このようなホモ接合性およびヘテロ接合性のトランスジェニック植物は両方とも、本明細書で「子孫植物」と呼ばれる。子孫植物とは、本発明の組換えDNA分子を含有する元のトランスジェニック植物から下ったトランスジェニック植物である。本発明のトランスジェニック植物を用いて産生した種子は、収穫して、本発明のコンストラクトを含みおよび農業上関心対象の遺伝子を発現する本発明のトランスジェニック植物、すなわち、子孫植物の世代を生育させることができる。異なる作物に通常使用される育種方法に関する説明は、いくつかの参考書籍のうちの一つに見ることができ、例えば、Allard, 植物育種の原理 (Principles of Plant Breeding), John Wiley & Sons, ニューヨーク, カリフォルニア大学, カリフォルニア州デイヴィス市, 50~98 (1960)、Simmonds, 作物改良の原理 (Principles of Crop Improvement), Longman社, ニューヨーク, 369~399 (1979)、SneepおよびHendriksen, 植物育種の展望 (Plant breeding Perspectives), Wageningen (編), Center for Agricultural Publishing and Documentation (1979)、Fehr, ダイズ: 改良、生産および使用 (Soybeans: Improvement, Production and Uses), 第2版, モノグラフ, 16:249 (1987)、Fehr, 種の発達、理論および技術に関する原理 (Principles of Variety Development, Theory and Technique), (第1巻)ならびに作物種ダイズ (Crop Species Soybean) (第2巻), アイオワ州立大学, Macmillan Pub.社, ニューヨーク, 360~376 (1987)を参照されたい。

【0080】

形質転換した植物は、関心対象の1つのまたは複数の遺伝子の存在、ならびに本発明の調節エレメントによって与えられる発現水準および/または発現特性について分析してもよい。当業者は、形質転換した植物の分析について利用可能な数多くの方法に気付いている。例えば、植物分析のための方法には、サザンプロットもしくはノザンプロット、PCR系のアプローチ、生化学的分析、表現型スクリーニング法、現地調査、および免疫診断アッセイを含むがこれらに限定されない。転写可能なDNA分子の発現は、TaqMan (登録商標) (Applied Biosystems, カリフォルニア州フォスター市

10

20

30

40

50

) 試薬および製造元によって説明されるような方法、ならびに TaqMan (登録商標) 検査マトリックスを用いて測定される PCR サイクル時間を用いて測定することができる。あるいは、Invader (登録商標) (Third Wave Technologies, ウィスコンシン州マジソン市) 試薬および製造元によって説明されるような方法を使用して、導入遺伝子の発現を評価することができる。

#### 【0081】

本発明はまた、本発明の植物の複数の部分を提供する。植物の複数の部分には、葉、茎、根、塊茎、種子、内胚乳、胚珠および花粉を含むがこれらに限定されない。本発明の複数の植物部分は、生存可能、生存不可能、再生可能および/または再生不可能であってもよい。本発明はまた、本発明の DNA 分子を含む形質転換した植物細胞を含みおよび当該植物細胞を提供する。本発明の形質転換した植物細胞またはトランスジェニック植物細胞には、再生可能なおよび/または再生不可能な植物細胞を含む。

10

#### 【0082】

本発明は、以下の実施例に対する参照を通じてより容易に理解され得、当該実施例は、説明として提供されているものであって、別段の指定がない限り、本発明を制限するよう意図するものではない。以下の実施例において開示される技術が、本発明の実施において十分に機能するよう本発明者らによって発見された技術を表すことは当業者によって認められるべきである。しかし、当業者は、本開示の点において、多くの変更が開示された具体的な実施形態においてなされることができ、ならびに本発明の精神および範囲から逸脱することなく同様なまたは類似の結果をなすことができることを認めるべきであり、それゆえ、添付の図に明らかにされまたは示されるものはすべて、実例として解釈されることになっており、制限する意味にはない。

20

#### 【実施例】

#### 【0083】

(実施例1)

(調節エレメントの識別およびクローニング)

新規の RCc3 プロモーターおよびリーダーを単子葉植物種ハトムギ (*Coix*) (ハトムギ (*Coix lacryma-jobi*))、オニメヒシバ (*Hairy crabgrass*) (オニメヒシバ (*Digitaria sanguinalis* (L.) Scop.))、イトススキ (*Maiden grass*) (イトススキ (*Miscanthus sinensis* f. *gracillimus*))、ガマグラス (*Gama grass*) (トリブサクム・ダクチロイデス (*Tripsacum dactyloides*)) およびサトウキビ (*Sugarcane*) (サトウキビ (*Saccharum officinarum*)) のゲノム DNA から識別およびクローニングした。RCc3 タンパク質は、プロラミンスーパーファミリーに属し、その名前は、穀類のアルコール可溶性プロリンおよびグルタミン富化貯蔵タンパク質に由来する。プロラミンスーパーファミリー (プロテアーゼ阻害薬/脂質転移タンパク質/種子貯蔵 2S アルブミンファミリーとも呼ぶ; Pfam ID: PF00234) は、当該植物ゲノムにおける最も広範性のあるタンパク質スーパーファミリーのうちの1つを表す。プロラミンスーパーファミリーのメンバーは、種々の植物の果実、木の実、種子、および野菜において豊富である。当該メンバーは、種子の貯蔵および防護、脂質の結合もしくは輸送、ならびに酵素阻害を含む多岐にわたる機能を呈することが知られている。脂質輸送タンパク質 (LTP) は、プロラミンスーパーファミリーに属し、種々の植物組織において発現する。コメ RCc3 タンパク質は、コメの根に発現する LTP であるが、LTP タンパク質がすべて根に特異的であるわけではない。

30

40

#### 【0084】

DNA 増幅プライマー (配列番号 25 ~ 28 として表す) は、ギョクシヨクシヨ、イネ、モロコシおよびミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) 由来の二十四 (24) の LTP タンパク質のコード配列を用いて設計した。増幅プライマーを、製造元のプロトコルに従って構築した GenomeWalker (商標) (Clo

50

ntech Laboratories社、カリフォルニア州マウンテンビュー市)ライブラリーとともに使用して、対応するゲノムDNA配列の5'領域をクローン化した。

【0085】

バイオインフォマティクス分析を実施して、増幅したDNA内の調節エレメントを識別した。この分析結果を用いて、調節エレメントをDNA配列内で定義し、プライマーを設計して調節エレメントを増幅した。各調節エレメントについての対応するDNA分子を、独特な制限酵素部位を含有するプライマーならびにハトムギ、オニメヒシバ、トリブサカム・ダクチロイデス (*T. dactyloides*) およびサトウキビから単離したゲノムDNAを用い、標準的なポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 条件を用いて増幅した。結果として生じるDNA断片をベクターへとライゲートし、配列決定した。

10

【0086】

識別したRCc3プロモーターおよびリーダーのDNA配列を表1に列挙する。プロモーター配列は本明細書で配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、および19として提供する。リーダー配列は本明細書で配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、および20として提供する。

【表1】

表1. 種々の草本種から単離したRCc3プロモーターおよびリーダー

配列の種類	配列番号	属/種
P-Cl.RCc3:3	1	ハトムギ
L-Cl.RCc3:2	2	ハトムギ
P-Ds.RCc3_1:1	3	オニメヒシバ
L-Ds.RCc3_1:1	4	オニメヒシバ
P-Ds.RCc3_2:1	5	オニメヒシバ
L-Ds.RCc3_2:1	6	オニメヒシバ
P-Ds.RCc3_3:1	7	オニメヒシバ
L-Ds.RCc3_3:1	8	オニメヒシバ
P-MISgr.RCc3_1:1	9	イトススキ
L-MISgr.RCc3_1:1	10	イトススキ
P-MISgr.RCc3-2:2	11	イトススキ
L-MISgr.RCc3-2:1	12	イトススキ
P-Td.RCc3_1:1	13	トリブサカム・ダクチロイデス ( <i>Tripsacum dactyloides</i> )
L-Td.RCc3_1:1	14	トリブサカム・ダクチロイデス
P-Td.RCc3_2:1	15	トリブサカム・ダクチロイデス
L-Td.RCc3_2:1	16	トリブサカム・ダクチロイデス
P-Td.RCc3_3:1	17	トリブサカム・ダクチロイデス
L-Td.RCc3_3:1	18	トリブサカム・ダクチロイデス
P-So.RCc3:2	19	サトウキビ
L-So.RCc3:2	20	サトウキビ

20

30

40

【0087】

(実施例2)

(トランスジェニックトウモロコシにおけるGUSを駆動する調節エレメントの分析)  
トウモロコシ植物をベクター、具体的には - グルクロニダーゼ (GUS) 導入遺伝子の発現を駆動する天然のRCc3リーダーへ操作可能に連結したRCc3プロモーターを含むバイナリープラスミドコンストラクトを用いて形質転換した。結果として生じる形質

50

転換した植物をGUSタンパク質発現について分析した。

【0088】

これらの実験に利用するベクターは、当該技術分野で公知のクローン化方法を用いて構築した。結果として生じるベクターは、アグロバクテリウム・ツメファシエンス由来の右側境界領域、アワS-アデノシルメチオニンシンテターゼ1遺伝子由来の3'UTR(T-SETit.Ams1-1:1:1、配列番号159)へ5'で操作可能に連結されたプロセッシング可能なイントロンGOI-Ec.uidA+St.LS1.nno:3(配列番号29)を有するGUSについてのコドンの再設計されたコード配列へ操作可能に連結されたRCc3プロモーター/リーダー配列を分析するための第一の導入遺伝子発現カセット、除草剤グリホサートに対する抵抗性を与える形質転換した植物細胞(コメアクチン1プロモーターによって駆動)の選択に使用する第二の導入遺伝子発現カセット、ならびにアグロバクテリウム・ツメファシエンス由来の左側境界領域からなった。結果として生じるプラスミドを用い、当該技術分野で公知の方法を用いてトウモロコシ植物を形質転換した。新規のRCc3プロモーターおよびリーダーによって与えられるGUS発現を、アワおよびコメのRCc3ホモログプロモーターおよびリーダーによって駆動される発現と比較した。表2は、プラスミドコンストラクト、RCc3プロモーターおよびリーダーの配列、ならびに配列番号を提供する。

10

【表2】

表2. バイナリー植物形質転換プラスミドおよび関連するRCc3プロモーター/リーダー配列

20

プラスミド コンストラクト	プロモーター配列 の種類	配列 番号	リーダー配列の種 類	配列 番号
pMON264146	P-Cl.RCc3:3	1	L-Cl.RCc3:2	2
pMON264148	P-Ds.RCc3_1:1	3	L-Ds.RCc3_1:1	4
pMON264088	P-Ds.RCc3_2:1	5	L-Ds.RCc3_2:1	6
pMON264107	P-Ds.RCc3_3:1	7	L-Ds.RCc3_3:1	8
pMON264186	P-MISgr.RCc3_1:1	9	L-MISgr.RCc3_1:1	10
pMON264187	P-MISgr.RCc3-2:2	11	L-MISgr.RCc3-2:1	12
pMON264049	P-Td.RCc3_1:1	13	L-Td.RCc3_1:1	14
pMON264050	P-Td.RCc3_2:1	15	L-Td.RCc3_2:1	16
pMON264147	P-Td.RCc3_3:1	17	L-Td.RCc3_3:1	18
pMON264166	P-So.RCc3:2	19	L-So.RCc3:2	20
pMON264108	P-SETit.Rcc3-1:1:10	21	L-SETit.Rcc3-1:1:2	22
pMON264206	P-Os.Rcc3-1:1:24	23	L-Os.Rcc3-1:1:2	24

30

【0089】

ある場合において、植物を当該技術分野で公知の、および米国特許出願公開第2009/0138985号において説明するような、アグロバクテリウム仲介性形質転換法を用いて形質転換した。

40

【0090】

形質転換した植物の定性的発現分析に組織化学的GUS分析を用いた。組織全体の切片をGUS染色溶液X-Gluc(5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-b-グルクロニド)(1mg/ml)とともに適切な長さの時間インキュベートし、すすぎ、青色の着色について目視検査した。GUS活性は、選択された植物の器官および組織を用いた直接的な目視検査または顕微鏡下での検査によって定性的に判定した。R<sub>0</sub>植物を根および葉ならびに葯、生糸、ならびに発達中の種子および受粉後21日胚(21DAP)における発現について検査した。

【0091】

定量的な分析については、形質転換したトウモロコシ植物の選択した組織から総タンバ

50

ク質を抽出した。50  $\mu$ l の総反応容積において、総タンパク質 1  $\mu$ g を蛍光発生基質 4 - メチルウンベリフェリル (methylumbelliferyl) - D - グルクロニド (MUG) とともに使用した。反応産物 4 - メチルウンベリフェロン (methylumbelliferone) (4-MU) は、高 pH で最大に蛍光を発生し、当該 pH ではヒドロキシ基がイオン化されている。炭酸ナトリウムの塩基性溶液の添加は、本アッセイを即時停止させ、蛍光産物を定量化するために pH を調整した。励起時 2 nm、発光時 3 nm にスリット幅を設定した Micromax Reader を備えた Fluoromax - 3 (堀場製作所、日本国京都市) を用いて、励起時 365 nm、発光時 445 nm で蛍光を測定した。平均発現値は、4 MUpmol / タンパク質  $\mu$ g / 時として提供した。

10

## 【0092】

各形質転換について観察された平均 R<sub>0</sub> GUS 発現を記録し、平均発現水準および標準誤差は、複数回の形質転換事象に由来する試料について取った測定値を基に判定した。

## 【0093】

(実施例 3)

(調節エレメント由来のエンハンサー)

エンハンサーは、配列番号 1、3、5、7、9、11、13、15、17、および 19 として呈されるものなど、本明細書に提供されるプロモーターエレメントに由来し得る。これらのエンハンサーエレメントは、プロモーターエレメントへ 5' もしくは 3' で操作可能に連結されたまたはプロモーターへ操作可能に連結された追加的なエンハンサーエレメントへ 5' もしくは 3' で操作可能に連結された場合、転写可能な DNA 分子の発現を亢進もしくは調節することができ、あるいは特異的な細胞型もしくは植物器官におけるまたは発達もしくは該リズムの特定の時点における転写可能な DNA 分子の発現を提供することができる 1 つ以上のシス調節エレメントから構成してもよい。エンハンサーは、TATA ボックスもしくは機能的に類似のエレメントおよび何らかの下流の DNA 配列を、その断片を含む先に説明したような本明細書に提供されるプロモーターから開始できるように転写するプロモーターから除去することによって作られ、当該プロモーターにおいて、TATA ボックスもしくは機能的に類似のエレメントおよび TATA ボックスの下流の DNA 配列は除去される。

20

## 【0094】

エンハンサーエレメントは、本明細書に提供されるプロモーターエレメントに由来し、当該技術分野で公知の方法を用いてクローン化してプロモーターエレメントへ 5' もしくは 3' で操作可能に連結され、またはプロモーターへ操作可能に連結された追加的なエンハンサーエレメントへ 5' もしくは 3' で操作可能に連結され得る。エンハンサーエレメントは、異なる属の生体由来のプロモーターへ 5' もしくは 3' で操作可能に連結されるよう、あるいは他の属の生体由来の追加的なエンハンサーエレメントへ 5' もしくは 3' で操作可能に連結され、あるいは同じもしくは異なる属のいずれかの生体に由来するプロモーターへ操作可能に連結された他の属の生体もしくは同じ属の生体に由来する追加的なエンハンサーエレメントへ 5' もしくは 3' で操作可能に連結されるようクローン化して、結果的にキメラ調節エレメントを生じることができる。先行実施例において説明したコンストラクトと類似の GUS 発現ベクターを、当該技術分野で公知の方法を使用して構築し得、当該先行実施例において、結果として生じる植物発現ベクターは、アグロバクテリウム・ツメファシエンス由来の右側境界領域；アグロバクテリウム・ツメファシエンス由来のノパリンシンターゼ 3' UTR (T-AGRtu.nos-1:1:13、配列番号 39) もしくはコメ脂質輸送タンパク質遺伝子由来の 3' UTR (T-Os.LTP-1:1:1、配列番号 40) へ操作可能に連結されたプロセシング可能なイントロン (GUS-2、配列番号 32) もしくはイントロンなし (CR-Ec.uidA-1:1:4 (GUS.nat)、配列番号 31) のいずれかを有する GUS についてのコード配列へ操作可能に連結された、ギョクシヨクシヨの HPS70 熱ショックタンパク質由来のイントロン (I-Zm.DnaK-1:1:1、配列番号 38) もしくは本明細書に呈されるイ

30

40

50

ントロンのうちのいずれかもしくはその他のイントロンへ操作可能に連結された、調節エレメントもしくはキメラ調節エレメント；除草剤グリホサート（コメアクチン1プロモーターによって駆動）もしくはそれに替わるものとして抗生物質カナマイシン（コメアクチン1プロモーターによって駆動）に対する抵抗性を与える形質転換された植物細胞の選択に使用される第二の導入遺伝子選択カセット；ならびにアグロバクテリウム・ツメファシエンス由来の左側境界領域から構成される。結果として生じるプラスミドを使用して、先に説明した方法によって、もしくは当該技術分野で公知の他の方法によって、トウモロコシ植物もしくは他の属の植物を形質転換してもよい。あるいは、トウモロコシまたは他の属の植物に由来する原形質体細胞を当該技術分野で公知の方法を用いて形質転換して、一過性アッセイを実施してもよい。

10

## 【0095】

1つ以上のエンハンサーを含む調節エレメントによって駆動されるGUS発現は、導入遺伝子の発現に及ぼすエンハンサーエレメントの効果を判定するために、安定したもしくは一過性の植物アッセイにおいて評価してもよい。1つ以上のエンハンサーエレメントに対する修飾または1つ以上のエンハンサーエレメントの複製は、経験的な実験法および各調節エレメント組成を用いて観察される結果として生じる遺伝子発現調節を基に実施してもよい、結果として生じる調節エレメントまたはキメラ調節エレメントにおける1つ以上のエンハンサーの相対的な位置を変更することは、調節エレメントまたはキメラ調節エレメントの転写活性または特異性に影響することがあるので、トウモロコシ植物または他の属の植物内での所望の導入遺伝子発現特性についての最良のエンハンサーを識別するよう経験的に判断される。

20

## 【0096】

## （実施例4）

コドンの再設計された - グルクロニダーゼ（GUS）を用いたより高いアッセイ感度植物プロモーターはしばしば、多くの定量的アッセイの正常検出閾値を下回る水準で発現するにもかかわらず、当該プロモーターの発現特徴は、ある導入遺伝子の発現について非常に価値があり得る。より初期の植物生物学において、高い恒常的発現を駆動するプロモーターは望ましく、当該プロモーターを用いて、除草剤耐性もしくは昆虫抵抗性などの高い恒常的発現を必要とする特異的な表現型を生じる転写可能なDNA分子を駆動した。これらの高い恒常的プロモーターはしばしば、植物ゲノムよりもむしろ植物ウイルスのゲノムに由来し、例えば、35Sプロモーターはカリフラワーモザイクウイルスおよびゴマノハグサモザイクウイルスに由来した。明白に、ある場合においては、ある転写可能なDNA分子の高い恒常的発現は、導入遺伝子のサイレンシング、表現型の発現停止、または収量低下など、負の結果をもたらす。例えば、サトウキビ由来の2つの異なるユビキチンプロモーターおよびトウモロコシのユビキチンプロモーターを用いたトランスジェニックサトウキビ植物におけるGUS遺伝子の高い発現は、GUS遺伝子の転写後遺伝子サイレンシングを結果として生じた（Weira, J. Plant Physiol. 160: 1241~1251, 2003）。

30

## 【0097】

さらに、近年、特異的な発現パターンを示すまたは植物の特定の組織により高度に発現するプロモーターについての需要がある。例えば、植物における酵素遺伝子の異所性発現は、代謝経路の分岐点における前駆体の不足により、所望の最終産物の減少を生じる可能性がある（Iwase, Plant Biotech. 26: 29~38, 2009）。これらの場合において、正確な組織もしくは細胞型におけるまたは特定の発達窓における操作可能に連結された転写可能なDNA分子を発現させるプロモーターを使用することが望ましい。植物ゲノム由来のプロモーターはしばしば、所望の組織細胞または発達中の発現特徴を実証することができる。これらの植物プロモーターのより低い発現水準により、発現アッセイはしばしば、定量的アッセイにおける検出を可能にするよう発現水準を上げるためにエンハンサーの使用を必要とする。しかしながら、このようなエンハンサーの使用はしばしば、植物プロモーターの全体的な発現パターンを変化させる。

40

50



## 【 0 0 9 8 】

本アッセイにおいて使用するリポーター遺伝子の発現を改善することは、植物由来のプロモーターの亢進についての必要性を排除し、したがって、プロモーターによって与えられた発現パターンのより正確な評価を提供する。本実施例は、イントロン配列へ5'で操作可能に連結されたリーダー配列へ5'で操作可能に連結されたプロモーター配列から構成された数個の異なるEXPを特徴づける上で定量的アッセイの感度を改善するための、コドンの再設計されたGUSコード配列の使用を実証する。

## 【 0 0 9 9 】

天然の大腸菌 - グルクロニダーゼ (GUS) 導入遺伝子またはコドンの再設計された - グルクロニダーゼ (GUS<sub>nn0</sub>) 導入遺伝子のいずれかの発現を駆動するEXP配列を含有する植物発現ベクターを用いてトウモロコシ植物を形質転換し、結果として生じる植物をGUSタンパク質発現について分析した。EXPおよびGUSコード配列は、当該技術分野で公知の方法を用いて、バイナリープラスミドコンストラクトへとクローン化した。

10

## 【 0 1 0 0 】

結果として生じる植物発現コンストラクトは、アグロバクテリウム・ツメファシエンス由来の右側境界領域；天然の大腸菌GUSコード配列 (CR - Ec . uidA - 1 : 1 : 4 (GUS<sub>nat</sub>)、配列番号31) またはコメ脂質輸送タンパク質遺伝子由来の3'UTR (T - Os . LTP - 1 : 1 : 1、配列番号40) へ5'で操作可能に連結されたコドンの再設計されたGUSコード配列 (CR - Ec . uidA<sub>nn0</sub> - 1 : 1 : 1 (GUS<sub>nn0</sub>)、配列番号30) のいずれかへ操作可能に連結されたEXPから構成される2つのGUSコード配列のアッセイ感度を実証する第一の導入遺伝子カセット；除草剤グリホサートに対する抵抗性 (コメアクチン1プロモーターによって駆動) を与える形質転換された植物細胞の選択に使用される第二の導入遺伝子選択カセット；ならびにアグロバクテリウム・ツメファシエンス由来の左側境界領域を含有する。図1a ~ 図1cは、天然のGUSコード配列 (CR - Ec . uidA - 1 : 1 : 4) およびコドンの再設計されたGUSコード配列 (CR - Ec . uidA<sub>nn0</sub> - 1 : 1 : 1) の間の整列化を示す。当該整列化における同一のヌクレオチドは、星印によって示される。コドンの再設計されたGUS配列は、天然のGUSコード配列と77.9%同一であり、当該植物においてより良好に発現するよう設計されている。

20

30

## 【 0 1 0 1 】

三つ (3つ) の異なるEXPクラスを使用し、各々特異的な発現パターンを与えた。EXP - SETit . Cab3 + Zm . DnaK : 1 : 1 (配列番号34) およびEXP - SETit . Cab3 + Zm . DnaK : 1 : 2 (配列番号35) というEXPは、トウモロコシにおける葉の発現特性を与え、EXP - SETit . Cab3 + Zm . DnaK : 1 : 2 のヌクレオチド位置1408 ~ 1412における5' - CCGGA - 3' の5ヌクレオチドの挿入を除き、本質的に同一である。EXP配列 (EXP - CaMV . 35S - enh + Os . Rcc3 + Zm . DnaK : 1 : 5 (配列番号36)) は、トウモロコシにおける亢進した根の発現特性を提供する。EXP配列 (EXP - zm . UbqM1 : 1 : 2 (配列番号37)) は、トウモロコシにおける高い恒常的発現特性を提供する。結果として生じるプラスミドを用い、当該技術分野で公知の方法を用いてトウモロコシ植物を形質転換した。表3は、プラスミドコンストラクトの名称、ならびに対応するEXP配列およびGUS配列を列挙する。

40

## 【表 3】

表 3. 天然の G U S コード配列およびコドンの再設計された G U S コード配列を比較するのに使用するプラスミドコンストラクト、E X P 配列および発現パターン

プラスミドコンストラクト	EXP の種類	発現パターン	配列番号	GUS	配列番号
pMON122599	EXP-SETit.Cab3+Zm.DnaK:1:2	葉	35	CR-Ec.uidA-1:1:4	31
pMON122595	EXP-SETit.Cab3+Zm.DnaK:1:1	葉	34	CR-Ec.uidA_nno-1:1:1	30
pMON144050	EXP-CaMV.35S-enh+Os.Rcc3+Zm.DnaK:1:5	亢進した根	36	CR-Ec.uidA-1:1:4	31
pMON122597	EXP-CaMV.35S-enh+Os.Rcc3+Zm.DnaK:1:5	亢進した根	36	CR-Ec.uidA_nno-1:1:1	30
pMON144051	EXP-Zm.UbqM1:1:2	恒常的	37	CR-Ec.uidA-1:1:4	31
pMON122598	EXP-Zm.UbqM1:1:2	恒常的	37	CR-Ec.uidA_nno-1:1:1	30

10

## 【 0 1 0 2 】

ある場合において、当該技術分野で公知のおよび米国特許出願公開第 2 0 0 9 / 0 1 3 8 9 8 5 号において説明されるようなアグロバクテリウム仲介性形質転換法を用いて、植物を形質転換した。

20

## 【 0 1 0 3 】

形質転換した植物の定性的発現分析に組織化学的 G U S 分析を用いた。組織全体の切片を G U S 染色溶液 X - G l u c ( 5 - ブロモ - 4 - クロロ - 3 - インドリル - b - グルクロニド ) ( 1 m g / m l ) とともに適切な長さの時間インキュベートし、すすぎ、青色の着色について目視検査した。G U S 活性は、選択された植物の器官および組織を用いた直接的な目視検査または顕微鏡下での検査によって定性的に判定した。R 0 植物を根および葉ならびに莖、生糸、ならびに発達中の種子および受粉後 2 1 日胚 ( 2 1 D A P ) における発現について検査した。

## 【 0 1 0 4 】

定量的な分析については、形質転換したトウモロコシ植物の選択した組織から総タンパク質を抽出した。5 0 μ l の総反応容積において、総タンパク質 1 μ g を蛍光発生基質 4 - メチルウンベリフェリル ( m e t h y l e u m b e l l i f e r y l ) - D - グルクロニド ( M U G ) とともに使用した。反応産物 4 - メチルウンベリフェロン ( m e t h y l y u m b e l l i f e r o n e ) ( 4 - M U ) は、高 pH で最大に蛍光を発生し、当該 pH ではヒドロキシ基がイオン化されている。炭酸ナトリウムの塩基性溶液の添加は、本アッセイを即時停止させ、蛍光産物を定量化するために pH を調整した。励起時 2 n m 、発光時 3 n m にスリット幅を設定した M i c r o m a x R e a d e r を備えた F l u o r o m a x - 3 ( 堀場製作所、日本国京都市 ) を用いて、励起時 3 6 5 n m 、発光時 4 4 5 n m で蛍光を測定した。

30

40

## 【 0 1 0 5 】

R 0 世代の形質転換体についての平均 G U S 発現値は、表 4 、 5 および 6 に提供する。

【表 4】

表 4. 天然のおよびコドンの再設計された G U S コード配列の、葉の発現特性を有する E X P を用いた平均的な R<sub>0</sub> 世代の G U S 発現

組織	pMON122599 EXP-SETit.Cab3+Zm.DnaK:1:2/CR-Ec.uidA-1:1:4	pMON122595 EXP-SETit.Cab3+Zm.DnaK:1:1/CR-Ec.uidA_nno-1:1:1
V4 葉	798	1807
V7 葉	230	1863
VT 葉	508	2097
V4 根	0	0
V7 根	0	0
VT 根	14	0
葯	95	1056
生糸	154	1590
21DAP 胚	24	31
21 DAP 内胚乳	18	61

10

【表 5】

表 5. 天然のおよびコドンの再設計された G U S コード配列の、亢進した根の発現特性を有する E X P を用いた平均的な R<sub>0</sub> 世代の G U S 発現

組織	pMON144050 EXP-CaMV.35S-enh+Os.Rcc3+Zm.DnaK:1:5/CR-Ec.uidA-1:1:4	pMON122597 EXP-CaMV.35S-enh+Os.Rcc3+Zm.DnaK:1:5/CR-Ec.uidA_nno-1:1:1
V4 葉	0	50
V7 葉	0	51
VT 葉	0	82
V4 根	26	486
V7 根	16	257
VT 根	18	343
葯	19	67
生糸	0	12
21DAP 胚	14	125
21 DAP 内胚乳	17	45

20

30

## 【表6】

表6. 天然のおよびコドンの再設計されたGUSコード配列の、恒常的な発現特性を有するEXPを用いた平均的なR<sub>0</sub>世代のGUS発現

組織	pMON144051 EXP-Zm.UbqM1:1:2/ CR-Ec.uidA-1:1:4	pMON122598 EXP-Zm.UbqM1:1:2/CR-Ec .uidA_nno-1:1:1
V4 葉	988	3327
V7 葉	963	2771
VT 葉	1777	3787
V4 根	693	2149
V7 根	402	1443
VT 根	776	3170
葯	2247	3190
生糸	975	3324
21DAP 胚	511	894
21 DAP 内胚乳	791	2298

10

## 【0106】

表4～表6でわかるように、天然のGUSコード配列と比較した場合、コドンの再設計されたGUSコード配列を用いた定量的アッセイにおいてより高い感度がある。T-DNAの挿入部位によって発現が影響され得るので、GUS\_nno集団およびGUS\_nat集団の間のいくばくかの変動性は期待されることになるが、しかしながら、感度の全体的な傾向は、GUS\_nnoを用いて非常により高い感度を実証する。EXP-SETit.Cab3+Zm.DnaK:1:1(配列番号34)およびEXP-SETit.Cab3+Zm.DnaK:1:2(配列番号35)により駆動されるGUSは、GUS\_natと比較した場合、GUS\_nnoを用いると2.26～8.1倍高い感度を実証した。同様に、EXP-CaMV.35S-enh+Os.Rcc3+Zm.DnaK:1:5(配列番号36)によって提供される亢進した根の特性は、GUS\_natよりもGUS\_nnoを用いた場合、16.06～19.06倍高く、このコドンの再設計されたGUSコード配列を、根のプロモーター、特に低水準で発現する当該プロモーターについてのスクリーニングに対して理想的にし、天然のGUSコード配列を用いた場合、背景水準以下のGUS水準を実証し得る。EXP-Zm.UbqM1:1:2(配列番号37)によって与えられる高い恒常的な発現特性は、GUS\_natと比較してGUS\_nnoを用いた場合、1.42～4.09倍高い定量的感度を実証した。

20

30

## 【0107】

定性的には、GUS染色は、より高感度であり、コドンの再設計されたGUSコード配列を用いた組織試料において一貫して観察された。概して、定性的な染色の観察は、定量的なアッセイよりも感度が低い傾向にある。コドンの再設計されたGUSコード配列の使用は、染色した組織のより良好かつより一貫した顕微鏡検査を提供する。例えば、GUSをEXP-CaMV.35S-enh+Os.Rcc3+Zm.DnaK:1:5(配列番号36)によって駆動する根組織においては、コドンの再設計されたGUSコード配列を用いて形質転換した組織の組織化学的染色はより顕著であり、皮層、表皮、内胚乳、根毛および二次根端からなるV7の根の試料全部において見えた。対照的に、GUS染色は、天然のGUSコード配列がEXP-CaMV.35S-enh+Os.Rcc3+Zm.DnaK:1:5によって駆動された場合、対応するV7の根の組織において定性的に観察されなかった。改善されたコドンの再設計されたGUSコード配列(CR-Ec.uidA\_nno-1:1:1、配列番号30)は、より高いアッセイ感度を提供し、低水準で発現するプロモーターの発現を測定する上で特に価値があった。

40

## 【0108】

50

(実施例5)

(トウモロコシの葉および根の原形質体におけるGUSを駆動する調節エレメントの分析)

トウモロコシの葉および根の原形質体を、 $\beta$ -グルクロニダーゼ(GUS)導入遺伝子の発現を駆動する天然のRCc3リーダーへ操作可能に連結されたRCc3プロモーターを含むベクターを用いて形質転換し、結果として生じる形質転換した原形質体をGUSタンパク質発現について分析した。RCc3プロモーター配列およびリーダー配列を、当該技術分野で公知のおよび実施例2においてすでに説明したとおりの方法を用いて、バイナリープラスミドコンストラクトへとクローン化した。

【0109】

同時形質転換およびデータの標準化における使用のための2つのプラスミドコンストラクトも、当該技術分野で公知の方法を用いて構築した。これらのプラスミドコンストラクトの各々は、恒常的なEXPによって駆動される特異的なルシフェラーゼコード配列を含有していた。ベクターpMON19437は、アグロバクテリウム・ツメファシエンスノパリンシンターゼ遺伝子(T-AGRtu.nos-1:1:13、配列番号39)由来の3'UTRへ5'で操作可能に連結されたホタル(Photinus pyralis)ルシフェラーゼコード配列(LUCIFERASE:1:3、配列番号42)へ5'で操作可能に連結されたイントロン(EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1、配列番号41)へ5'で操作可能に連結された恒常的プロモーターを備えた発現カセットを含んでいた。ベクターpMON63934は、アグロバクテリウム・ツメファシエンスノパリンシンターゼ遺伝子(T-AGRtu.nos-1:1:13、配列番号39)由来の3'UTRへ5'で操作可能に連結されたウミシイタケ(Renilla reniformis)ルシフェラーゼコード配列(CR-Ren.hRenillaLucife-0:0:1、配列番号43)へ5'で操作可能に連結された恒常的EXP配列(EXP-CaMV.35S-enh-Lhcb1、配列番号44)を備えた発現カセットを含んでいた。

【0110】

トウモロコシの根および葉の原形質体を、当該技術分野で周知であるポリエチレングリコール(PEG)系の形質転換法を用いて形質転換した。原形質体細胞をpMPN19437、pMON63934を用いて形質転換し、当該プラスミドのうちの1つを表7に呈した。形質転換後、形質転換した原形質体を全体として暗所で一晩インキュベートした。次に、GUSおよびルシフェラーゼの両方の測定を、先に記載したとおり形質転換した細胞の溶解した調製物の一定分量を2つの異なる小孔トレイへと入れることによって実施した。1つのトレイはGUS測定に使用し、第二のトレイは二重ルシフェラーゼリポーターアッセイシステムを用いた二重ルシフェラーゼアッセイを実施するために使用した(Promega社、ウィスコンシン州マジソン市、例えば、Promega Notes Magazine, 第57巻, 1996, p.02を参照されたい)。

【0111】

各EXPまたはプロモーター+リーダー+イントロン配列について4つの形質転換を実施した。各EXPまたはプロモーター+リーダー+イントロン配列についての平均発現値を、各形質転換由来のいくつかの試料から測定した。試料の測定は、各EXPまたはプロモーター+リーダー+イントロン配列プラスミドコンストラクト形質転換の4つの複製物を用いて実施した。背景GUS発現は、GUS導入遺伝子を欠失している陰性対照プラスミドコンストラクトを用いて測定した。平均GUSおよびルシフェラーゼ発現水準は、表7(葉)および表8(根)に提供する。これらの表において、ホタルルシフェラーゼ値(例えば、pMON19437の発現由来)は、「FLUC」と標識した列に提供し、ウミシイタケルシフェラーゼ値(例えば、pMON63934の発現由来)は、「RLUC」と標識した列にあるものとして提供する。また、表7および表8に提供されるのは、平均のGUS/FLUC比およびGUS/RLUC比であり、当該比は、原形質体アッセイにおける発現強度の相対的な尺度を提供する。

10

20

30

40

50

【表 7】

表 7. 形質転換したトウモロコシの葉の原形質体由来のGUS、FLUCおよびRLUCの平均値

プラスミド コンストラ クト	プロモーター リーダー	配列 番号	平均 GUS	平均 FLUC	平均 RLUC	平均 GUS/FLU C	平均 GUS/RL UC
pMON26414 6	P-Cl.RCc3:3 L-Cl.RCc3:2	1 2	5328064 .75	105434	253107. 5	50.73	21.15
pMON26414 8	P-Ds.RCc3_1:1 L-Ds.RCc3_1:1	3 4	773613	147918	338149. 5	5.23	2.28
pMON26408 8	P-Ds.RCc3_2:1 L-Ds.RCc3_2:1	5 6	2883555 .75	129947. 5	309268. 5	22.33	9.45
pMON26410 7	P-Ds.RCc3_3:1 L-Ds.RCc3_3:1	7 8	1093785	124864. 75	306178. 75	8.70	3.55
pMON26418 6	P-MISgr.RCc3_1: 1 L-MISgr.RCc3_1: 1 1	9 10	2613839 .75	128887. 25	301412. 75	20.45	8.83
pMON26418 7	P-MISgr.RCc3-2: 2 L-MISgr.RCc3-2: 1 1	11 12	2370706 .25	149383. 5	370443. 75	15.95	6.53
pMON26404 9	P-Td.RCc3_1:1 L-Td.RCc3_1:1	13 14	7506585 .75	150939. 25	368035. 5	50.15	20.88
pMON26405 0	P-Td.RCc3_2:1 L-Td.RCc3_2:1	15 16	4447254 .25	155356. 25	364604. 5	28.78	12.40
pMON26414 7	P-Td.RCc3_3:1 L-Td.RCc3_3:1	17 18	1100118 .75	153451	316691. 5	7.13	3.48
pMON26416 6	P-So.RCc3:2 L-So.RCc3:2	19 20	3062045	143684. 5	332394. 5	21.55	9.45
pMON26410 8	P-SETit.Rcc3-1:1: 10 L-SETit.Rcc3-1:1 :2	21 22	147483	129834. 25	300917. 25	1.15	0.50
pMON26420 6	P-Os.Rcc3-1:1:24 L-Os.Rcc3-1:1:2	23 24	184905. 25	171440. 75	386387. 25	1.08	0.50

10

20

30

## 【表 8】

表 8. 形質転換したトウモロコシの根の原形質体由来のGUS、FLUCおよびRLUCの平均値

プラスミド コンストラ クト	プロモーター リーダー	配列 番号	平均 GUS	平均 FLUC	平均 RLUC	平均 GUS/FL UC	平均 GUS/RL UC
pMON264146	P-Cl.RCc3:3 L-Cl.RCc3:2	1 2	185142.3	18310	34502.5	10.18	5.43
pMON264148	P-Ds.RCc3_1:1 L-Ds.RCc3_1:1	3 4	16306.5	17008	31233	0.98	0.53
pMON264088	P-Ds.RCc3_2:1 L-Ds.RCc3_2:1	5 6	101603.8	19201. 25	43298	5.23	2.33
pMON264107	P-Ds.RCc3_3:1 L-Ds.RCc3_3:1	7 8	29196	14483. 5	34700.7 5	2.03	0.88
pMON264186	P-MISgr.RCc3_1: 1 L-MISgr.RCc3_1 :1	9 10	87232	18411. 75	44755.7 5	4.80	1.95
pMON264187	P-MISgr.RCc3-2: 2 L-MISgr.RCc3-2: 1	11 12	510761.5	19093. 75	41948.5	26.98	12.30
pMON264049	P-Td.RCc3_1:1 L-Td.RCc3_1:1	13 14	884517.8	23881. 75	55790	37.23	16.18
pMON264050	P-Td.RCc3_2:1 L-Td.RCc3_2:1	15 16	91634.5	18385	43509.5	5.03	2.18
pMON264147	P-Td.RCc3_3:1 L-Td.RCc3_3:1	17 18	50257.25	18716. 75	34489	2.65	1.45
pMON264166	P-So.RCc3:2 L-So.RCc3:2	19 20	508345.3	22335. 25	51655.7 5	22.98	10.13
pMON264108	P-SETit.Rcc3-1:1 :10 L-SETit.Rcc3-1:1 :2	21 22	8123	17750. 75	37872.2 5	0.45	0.23
pMON264206	P-Os.Rcc3-1:1:24 L-Os.Rcc3-1:1:2	23 24	336095.3	17709. 5	40179.5	19.65	8.63

## 【 0 1 1 2 】

表 7 に示すように、RCc3 ホモログプロモーターはすべて、トウモロコシの葉の原形質体における導入遺伝子の発現を駆動する能力を実証した。RCc3 ホモログプロモーターのうちいくつかはGUS/FLUC比およびGUS/RLUC比を基にした本アッセイにおいてその他のものより高い発現を駆動した。さらに先の表 8 に示すように、RCc3 ホモログプロモーターはすべて、トウモロコシの根の原形質体における導入遺伝子の発現を駆動する能力を変動する程度まで実証した。

## 【 0 1 1 3 】

(実施例 6)

トランスジェニックトウモロコシにおけるGUSを駆動する調節エレメントの分析

- グルクロニダーゼ (GUS) 導入遺伝子の発現を駆動する天然のRCc3 リーダーへ操作可能に連結したRCc3 プロモーターを含むベクターを用いて、トウモロコシ植物を形質転換した。結果として生じる形質転換した植物を、GUSタンパク質発現について分析した。

## 【 0 1 1 4 】

RCc3 プロモーター配列およびリーダー配列を、実施例 2 において説明したものなど、当該技術分野で公知の方法を用いてバイナリープラスミドコンストラクトへとクローン化した。結果として生じるバイナリープラスミドコンストラクトは、pMON264146

、 pMON264148、 pMON264088、 pMON264107、 pMON264186、 pMON264187、 pMON264049、 pMON264050、 pMON264147およびpMON264166であった。トウモロコシ植物はまた、 pMON264108およびpMON264206を用いて安定的に形質転換した。定性的および定量的なGUS発現分析は、実施例2において説明したとおり実施した。当該植物は、V4、V7およびVTの発達段階においてアッセイした。R1およびR3における試料採取を示す。表9は、安定的に形質転換したトウモロコシ植物についての平均の定量的なGUS発現を示す。

【表9】

表9. 安定的に形質転換したトウモロコシ植物における平均の定量的なGUS発現

プラスミドコンストラクト	プロモーター	配列番号	V4葉	V4根	V7葉	V7根	VT葉	VT根	VT花/葯	R1 Cob/生糸	R3 21D AP 胚	R3 21DAP 内胚乳
pMON264146	P-CI.RC c3:3	1										
	L-CI.RC c3:2	2	25.15	61.3 1	20.7 1	42.6 4	35.9 6	95.19	298	125. 12	21.97	186.52
pMON264148	P-Ds.R Cc3_1:1	3										
	L-Ds.R Cc3_1:1	4	48.34	36.8 1	42.4 9	125. 25	69.7 6	55.44	277.9 3	58	67.08	115.71
pMON264088	P-Ds.R Cc3_2:1	5										
	L-Ds.R Cc3_2:1	6	28.31	51.1 8	59.2	149. 2	70.9 3	158.3 2	214.4 7	120. 72	141.8 5	164.68
pMON264107	P-Ds.R Cc3_3:1	7										
	L-Ds.R Cc3_3:1	8	67.1	327. 44	85.0 2	365. 51	161. 65	202.1 7	787.2 5	103. 63		
pMON264186	P-MISgr .RCc3_1 :1	9										
	L-MISgr .RCc3_1 :1	10	38.66	40.2 5	39.7	139. 98	105. 24	308.2 4	406.3 8	239. 35	118.5 4	196.48
pMON264187	P-MISgr .RCc3-2 :2	11										
	L-MISgr .RCc3-2 :1	12	25.9	193. 25	42.1 3	291. 5	48.0 2	549.3 7	87.89	41.8 3		
pMON264049	P-Td.R Cc3_1:1	13										
	L-Td.R Cc3_1:1	14	283.8 6	238. 31								
pMON264050	P-Td.R Cc3_2:1	15										
	L-Td.R Cc3_2:1	16	51.82	653. 38								
pMON264147	P-Td.R Cc3_3:1	17										
	L-Td.R Cc3_3:1	18	42.49	55.8 7	41.4 9	197. 51	117. 77	282.6 3	1182. 96	938. 3	815.3 6	1240.9 2
pMON264166	P-So.RC c3:2	19										
	L-So.R Cc3:2	20	34.11	215. 86	125. 91	855. 23	79.3 3	237.2 5	347.9 9	177. 13		

【0115】

表9に示すように、RCc3プロモーターホモログはすべて、安定的に形質転換したトウモロコシ植物におけるGUS導入遺伝子の発現を駆動することができた。さらに、各プロモーターは、特定のプロモーターに対して独特である発現パターンを有していた。例え

10

20

30

40

50



ば、V T花/葯における発現は、R C c 3プロモーターホモログ間で異なっていた。P - T d . R C c 3 \_ 3 : 1 (配列番号17)によって駆動される発現は、プロモーターすべてについて観察される最高の発現であったのに対し、P - M I S g r . R C c 3 - 2 : 2 (配列番号11)によって駆動される発現は最低であった。R 1 C o b / 生糸発現に関して、P - T d . R C c 3 \_ 3 : 1 (配列番号17)はこれらの組織における最高の発現を実証し、P - M I S g r . R C c 3 - 2 : 2 (配列番号11)は最低で発現した。P - T d . R C c 3 \_ 3 : 1 (配列番号17)によって駆動される発現は、より後期の発達する組織で高まった。発現はV 4 ~ V T段階で根において高まり、V T花/葯、R 1 C o b / 生糸ならびにR 3 2 1 D A Pの胚および内胚乳においてより高かった。P - T d . R C c 3 \_ 3 : 1によって駆動される発現は、V T花/葯、R 1 C o b / 生糸ならびにR 3 2 1 D A Pの胚および内胚乳におけるR C c 3プロモーターホモログのうちで最高であった。

10

## 【0116】

葉および根の発現に関して、R C c 3プロモーターホモログのうちのいくつかは、根における発現が葉に対して高いことを実証した。表10は、アッセイしたR C c 3プロモーターすべてについての根：葉の発現比を示す。

## 【表10】

表10. 安定的に形質転換したトウモロコシ植物についての根/葉発現比

プラスミド コンストラ クト	プロモーター リーダー	配列 番号	平均の根/葉		
			V4	V7	VT
pMON264146	P-Cl.RCc3:3	1			
	L-Cl.RCc3:2	2	2.44	2.06	2.65
pMON264148	P-Ds.RCc3_1:1	3			
	L-Ds.RCc3_1:1	4	0.76	2.95	0.79
pMON264088	P-Ds.RCc3_2:1	5			
	L-Ds.RCc3_2:1	6	1.81	2.52	2.23
pMON264107	P-Ds.RCc3_3:1	7			
	L-Ds.RCc3_3:1	8	4.88	4.30	1.25
pMON264186	P-MISgr.RCc3_1:1	9			
	L-MISgr.RCc3_1:1	10	1.04	3.53	2.93
pMON264187	P-MISgr.RCc3-2:2	11			
	L-MISgr.RCc3-2:1	12	7.46	6.92	11.44
pMON264049	P-Td.RCc3_1:1	13			
	L-Td.RCc3_1:1	14	0.84		
pMON264050	P-Td.RCc3_2:1	15			
	L-Td.RCc3_2:1	16	12.61		
pMON264147	P-Td.RCc3_3:1	17			
	L-Td.RCc3_3:1	18	1.31	4.76	2.40
pMON264166	P-So.RCc3:2	19			
	L-So.RCc3:2	20	6.33	6.79	2.99

20

30

40

## 【0117】

表10に示すように、各R C c 3プロモーターホモログは、異なる根：葉発現比および異なるパターンをV 4 ~ V T段階で示した。例えば、P - C l . R C c 3 : 3 (配列番号1)は、V 4 ~ V Tで類似の発現比を維持するとともに、V 7段階でわずかな低下が生じた。表9に見られるような根における発現は、V 4 ~ V 7でわずかに低下した後、V T段階によって高まった。プロモーターP - D s . R C c 3 \_ 3 : 1 (配列番号7)は、V 4 ~ V T段階で発現比の変化を示すとともに、V 4およびV 7段階における葉に対する根に

50

おけるより高い発現の後に、V T段階における根に対する葉におけるほぼ等しい発現へと移行した(1.25)。このプロモーターを用いて、表9に示す平均の発現は、V4~V T段階で葉における発現の亢進を示すのに対し、根における発現はV7~V T段階で低下した。プロモーターP - S o . R C c 3 : 2 (配列番号19)は、V4で6.33およびV7段階で6.79の根:葉発現比を維持したが、後にV T段階で2.99まで低下した。しかしながら、このプロモーターを用いた発現は、V4~V7段階で葉および根においてそれぞれ3.69および3.96倍高まった後、V T段階でV4に対して2.33および1.10まで低下した。

#### 【0118】

明らかに、プロモーターのすべてがより高い根:葉比を有しているわけではなかった。例えば、プロモーターP - D s . R C c 3 \_ 1 : 1 (配列番号3)およびP - T d . R C c 3 \_ 1 : 1 (配列番号13)は、V4段階において1未満の根/葉比を有していた。しかしながら、P - T d . R C c 3 \_ 1 : 1によって駆動される発現は、V4根においてP - D s . R C c 3 \_ 1 : 1よりも6.6倍高かった。V4段階における根/葉の最高比は、P - T d . R C c 3 \_ 2 : 1 (配列番号15)を用いて達成された。P - D s . R C c 3 \_ 1 : 1によって駆動される根/葉の発現比は、V4(0.76)~V7(2.95)で高まった後、V4(0.79)における比と類似の比まで戻った。

#### 【0119】

プロモーターP - M I S g r . R C c 3 - 2 : 2 (配列番号11)は、V4~V T段階では葉および根の両方における発現の亢進を実証した。このプロモーターは、3つの段階すべてを通じて6.9を上回る根:葉の比を有していたが、当該比は、V4段階における7.46からV7段階における6.92へと進んだ後、V T段階における11.44まで上昇した。P - M I S g r . R C c 3 - 2 : 2によって駆動される発現は、V4~V T段階の葉および根において高まった。

#### 【0120】

R C c 3ホモログプロモーターの各々は、特にトウモロコシなどの異種性の種を形質転換するのに使用した場合に、相同遺伝子に由来することでは必ずしも推定できない安定的に形質転換したトウモロコシにおける発現パターンを示した。当該プロモーターのほとんどはV4、V7またはV T段階のいずれかにおいて、あるいはアッセイした全段階において、いくつかの時点で葉に関して根におけるより高い発現を実証した。明らかに、発現の程度は当該プロモーター間で広範に異なっていた。R C c 3プロモーターホモログの各々の独特な発現特性は、ある種類の転写可能なDNA分子発現について、いくつかをその他のものよりも適切とする。例えば、土壌における栄養物質の同化に対して決定的であり得る、および当該植物が繁殖し始めて種子を産生しようとしている場合により後期の発達段階において最良に発現する、転写可能なDNA分子の発現は、V T段階の根における発現を高めるP - M I S g r . R C c 3 - 2 : 2 (配列番号11)などのプロモーターから最良に恩恵を受けるかもしれない。

\* \* \* \* \*

#### 【0121】

本発明の原理を例証および説明したが、本発明が、このような原理から逸脱することなく配置および詳細において改変することができることは、当業者に対して明白である。本発明者らは、特許請求の範囲に関する精神および範囲内である改変をすべて請求する。本明細書に引用される公開物および公開された特許文書はすべて、各個々の公開物または特許出願が、参照により組み込まれるよう具体的かつ個々に示される場合と同じ程度まで、参照により本明細書により組み込まれる。



【配列表】

0006679643000001.app

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
A 0 1 H 5/10 (2018.01) A 0 1 H 5/10

(72)発明者 ジュン・ジャン  
アメリカ合衆国 6 3 1 6 7 ミズーリ州セントルイス、ノース・リンドバーグ・ブルバード 8 0 0  
番

(72)発明者 スリン・ジャオ  
アメリカ合衆国 6 3 1 6 7 ミズーリ州セントルイス、ノース・リンドバーグ・ブルバード 8 0 0  
番

審査官 小倉 梢

(56)参考文献 国際公開第 2 0 0 6 / 1 0 1 9 3 8 (WO, A 1)  
米国特許出願公開第 2 0 0 6 / 0 1 0 1 5 4 1 (US, A 1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0  
A 0 1 H 1 / 0 0 - 1 / 0 8  
C 1 2 N 5 / 0 0 - 5 / 2 8  
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )  
W P I D S / W P I X ( S T N )