

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成18年9月28日(2006.9.28)

【公表番号】特表2002-534115(P2002-534115A)

【公表日】平成14年10月15日(2002.10.15)

【出願番号】特願2000-593728(P2000-593728)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

A 0 1 H 5/00 (2006.01)

C 0 7 K 14/415 (2006.01)

C 0 7 K 19/00 (2006.01)

C 1 2 N 9/12 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 R 1/91 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

A 0 1 H 5/00 A

C 0 7 K 14/415

C 0 7 K 19/00

C 1 2 N 9/12

C 1 2 N 5/00 C

C 1 2 N 9/12

C 1 2 R 1:91

【手続補正書】

【提出日】平成18年8月10日(2006.8.10)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) 配列識別番号第1-67、131-481及び833-888番に提供された配列と、(b) 配列識別番号第1-67、131-481及び833-888番に列挙された配列の相補体と、(c) 配列識別番号第1-67、131-481及び833-888番に列挙された配列の逆相補体と、(d) 配列識別番号第1-67、131-481及び833-888番に列挙された配列の逆配列と、(e) 配列識別番号第1-67、131-481及び833-888番に提供された配列に対し、コンピューターアルゴリズムBLASTNを用いて、少なくとも40%同一のヌクレオチドを有する配列と、(f) 配列識別番号第1-67、131-481及び833-888番に提供された配列に対し、コンピューターアルゴリズムBLASTNを用いて、少なくとも60%同一のヌクレオチドを有する配列と、(g) 配列識別番号第1-67、131-481及び833-888番に提供された配列に対し、コンピューターアルゴリズムBLASTNを用いて、少なくとも75%同一のヌクレオチドを有する配列と、(h) 配列識別番号第1-67、131-481及び833-888番に提供された配列に対し、コンピューターアルゴリズムBLASTNを用いて、少なくとも90%同一のヌクレオチドを有する配列と、(i) 上記の(a)ないし(d)に列挙された配列の200マーのヌクレオチド配列と、(j) 上記の(a)ないし(d)に列挙された配列の100マーのヌクレオチド配列と、(k) 上記の

( a ) ないし ( d ) に列挙された配列の 40 マーのヌクレオチド配列と、( 1 ) 上記の ( a ) ないし ( d ) に列挙された配列の 20 マーのヌクレオチド配列とからなるグループから選択される配列を含む、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 2】

請求項 1 に記載のポリヌクレオチドにエンコードされる、単離されたポリペプチド。

【請求項 3】

( a ) 配列識別番号第 68 - 130、482 - 832 及び 889 - 945 番の配列と、( b ) ( a ) の配列に対し少なくとも 50 % 同一の残基を有する配列と、( c ) ( a ) の配列に対し少なくとも 70 % 同一の残基を有する配列と、( d ) ( a ) の配列に対し少なくとも 90 % 同一の残基を有する配列とからなるグループから選択されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

【請求項 4】

請求項 3 に記載のポリペプチドをエンコードする、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 5】

請求項 1 に記載のポリヌクレオチドを含む、DNA コンストラクト。

【請求項 6】

請求項 5 に記載の DNA コンストラクトを含む、トランスジェニック細胞。

【請求項 7】

5' から 3' の方向に、( a ) 遺伝子プロモーター配列と、( b ) 請求項 1 に記載の単離されたポリヌクレオチドにエンコードされるポリペプチドの少なくとも機能性のある部分をコードするオープン・リーディング・フレームと、( c ) 遺伝子ターミネーション配列とを含む、DNA コンストラクト。

【請求項 8】

オープン・リーディング・フレームはセンス方向である、請求項 7 に記載の DNA コンストラクト。

【請求項 9】

オープン・リーディング・フレームはアンチセンス方向である、請求項 7 に記載の DNA コンストラクト。

【請求項 10】

遺伝子プロモーター配列と遺伝子ターミネーション配列は植物宿主で機能性がある、請求項 7 に記載の DNA コンストラクト。

【請求項 11】形質転換細胞の同定用のマーカーを含む、請求項 7 に記載の DNA コンストラクト。

【請求項 12】5' から 3' への方向に、( a ) 遺伝子プロモーター配列と、( b ) 請求項 1 ないし 6 及び 9 のいずれか 1 つの単離されたポリヌクレオチドのノンコーディング領域と、( c ) 遺伝子ターミネーション配列とを含む、DNA コンストラクト。

【請求項 13】

ノンコーディング領域はセンス方向である、請求項 12 に記載の DNA コンストラクト。

【請求項 14】

ノンコーディング領域はアンチセンス方向である、請求項 12 に記載の DNA コンストラクト。

【請求項 15】

遺伝子プロモーター配列と遺伝子ターミネーション配列は植物宿主において機能性がある、請求項 12 に記載の DNA コンストラクト。

【請求項 16】

請求項 7 ないし 15 のいずれか 1 つの DNA コンストラクトを含む、トランスジェニック植物細胞。

【請求項 17】

請求項 16 に記載のトランスジェニック植物細胞を含む植物あるいはその部分、零余子

又は子孫。

【請求項 18】

植物は木本植物である、請求項 17 に記載の植物。

【請求項 19】

植物はユーカリ、マツ、アカシア、ポプラ、スイートゴム、チーク及びマホガニーの種からなるグループから選択される、請求項 18 に記載の植物。

【請求項 20】

請求項 7 ないし 15 のいずれか 1 つに記載の DNA コンストラクトを植物ゲノムに安定的に取り込むことを含む、植物の細胞シグナル伝達を改変するための方法。

【請求項 21】

植物は木本植物である、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

植物はユーカリ、マツ、アカシア、ポプラ、スイートゴム、チーク及びマホガニーの種からなるグループから選択される、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

(a) トランスジェニック細胞を提供するために請求項 7 ないし 15 のいずれか 1 つに記載の DNA コンストラクトで植物細胞を形質転換することと、(b) 再生及び成熟した植物の成長に導く条件下で前記トランスジェニック細胞を培養することを含む、細胞シグナル伝達を改変された植物を作出する方法。

【請求項 24】

植物は木本植物である、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

植物はユーカリ、マツ、アカシア、ポプラ、スイートゴム、チーク及びマホガニーの種からなるグループから選択される、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

請求項 7 ないし 15 のいずれか 1 つに記載の DNA コンストラクトを植物ゲノムに安定的に取り込むことを含む、植物のポリペプチドの活性を改変するための方法。

【請求項 27】

植物は木本植物である、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

植物はユーカリ、マツ、アカシア、ポプラ、スイートゴム、チーク及びマホガニーの種からなるグループから選択される、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

請求項 1 に列挙されたヌクレオチド配列の 10 個の連続した残基と相補的な少なくとも 10 個の連続した残基を含む、単離されたオリゴヌクレオチドプローブ又はプライマー。

【請求項 30】

請求項 29 に記載の複数のオリゴヌクレオチドプローブ又はプライマーを含むキット。

【請求項 31】

複数のポリヌクレオチドを記録した記録媒体であって、少なくとも 1 つのポリヌクレオチドは請求項 1 に列挙されたヌクレオチド配列を含む、記録媒体。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】発明の詳細な説明

【補正方法】変更

【補正の内容】

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明の技術分野

本発明は、環境の変化のような外界からの信号及び発生過程での合図に対する植物細胞の応答を改変することに関する。より具体的には本発明は、植物細胞膜に内在し細胞のシ

グナル伝達の過程を媒介するポリペプチドをエンコードする、単離されたポリヌクレオチドを提供する。

#### 【0002】

##### 本発明の背景

植物はその生涯にわたり所定の発生プログラムを経て成長する。この点は特に胚発生と花の発生において顕著である。植物の特定の細胞によって産生され、他の細胞、特に分裂組織領域での細胞が応答準備を整えている、さまざまなシグナル分子が存在する。これらのシグナル分子は、他と全く別な、例えば花や子葉の形成につながる発生プログラムを、特定の時に開始する引き金となる。前記のプログラム化された発生経路に加えて植物は、温度変化、日照量、水分補給の可能性、機械的な損傷による創傷及び病原体による攻撃のような、さまざまな環境的な刺激に曝されている。光、熱、寒冷、乾燥等への曝露のような環境的因子は、環境シグナルへの適切な応答及びこれを通じての植物の健全な発生に必須な、遺伝子の発現及びタンパク質その他の化合物の合成を活性化する。これらの応答は、発生経路と同様にシグナル分子により媒介される。

#### 【0003】

これらのシグナル分子に応答するために植物細胞は細胞シグナルの検出器、調節器及び/又は変換器としての役割を果たす表面受容体タンパク質を産生する。シグナルの細胞内伝達は、正常発生のため又は環境からの挑戦に対抗するために適切な細胞の応答を誘発する遺伝子の転写において頂点に達する、分子のリン酸化カスケードを介してしばしば伝えられる。

#### 【0004】

受容体タンパク質の1つの大きなクラスは1回膜貫通型ファミリーで、これにはいくつかのサブクラスがある。これらのタンパク質は、細胞外シグナル(又はリガンド)の認識/結合ドメインと、細胞膜を1回貫通するドメインと、通常はタンパク質キナーゼである細胞内のシグナル伝達ドメインとの3つのドメインが特徴である。全てではないが多くの植物の1回膜貫通型タンパク質は受容体様キナーゼ(receptor-like kinase、RLK)として知られるサブクラスに属する。植物RLKの細胞内キナーゼドメインは全てセリン/スレオニンタンパク質キナーゼであるが、RLKの細胞外ドメインは異なるタイプである。RLKの1つのタイプは、自家受粉を阻害する自家不和合性座位糖タンパク質(self-incompatibility-locus glycoproteins)において最初に記載された細胞外Sドメインの存在が特徴である。Sドメインは他の保存された残基と組み合わせられた10個のシステイン残基の配列(array)により認識される。別のクラスのRLKは、タンパク質-タンパク質間相互作用に関与するロイシン含量の高い繰り返し配列(leucine rich repeat、LRR)により識別される細胞外ドメインを有する。リガンドの細胞外ドメインへの結合に続いて受容体の2量体化、自己リン酸化及びシグナルの核への伝達に役立つ一連の細胞内タンパク質の活性化が起こる。植物のRLKの構造は動物の細胞シグナル伝達経路に見られる受容体と非常に類似している。

#### 【0005】

植物PLKの1つの例は、植物の病原体 *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* race 6 に対する耐性を与える *Xa21* 遺伝子である。この遺伝子は *Xanthomonas* 菌感受性と耐性のイネの系統を比較する遺伝的な手段を用いてクローン化され(Songら、*Science* 270:1804-1806、1995)、その後シロイヌナズナにおいても *Xanthomonas* 菌への耐性を与えることが示された。1025個のアミノ酸からなるこのタンパク質は、アミノ末端の23個のアミノ酸残基のシグナルペプチドを含む既知タンパク質ドメインと類似する多数の特徴を示し、このタンパク質は形質膜に局在することを表す。81番目から634番目のアミノ酸は24個のアミノ酸のLRRの23回の不完全な繰り返し(copy)を含む。651番目から676番目のアミノ酸は膜貫通ドメインを形成する可能性のある26個のアミノ酸の疎水性セグメントをエンコードする。C末端アミノ酸はタンパク質キナーゼに典型的な

15個の不変の(invariant)アミノ酸からなる11個のサブドメインを含む細胞内セリンスレオニンキナーゼドメインと予測されるものを含む。サブドメインV I及びV I I Iはセリンスレオニンリン酸化の特異性を表す。X a 2 1はシロイヌナズナの受容体様キナーゼタンパク質R L K 5及びT M K 1のような、他のR L Kと類似性が高く、L R R及びタンパク質キナーゼの両ドメインの保存が見られる。X a 2 1がその病原体認識シグナルをいかなるタンパク質に伝達するかは不明である。

#### 【0006】

植物細胞で発現される膜受容体分子の別のファミリーは、ヒスチジンキナーゼ(H K)である。H Kは、2要素(two-component)シグナルシステムの一方の片割れとなる、細菌のシグナル伝達系においてしばらく前から知られてきた。細菌のH Kは浸透圧調整物(osmoticum)、栄養素及び毒物の変化のような細胞外シグナルに対する検出器分子として役立つ。H Kはリガンドの結合に反応してヒスチジン残基に自己リン酸化する。このホスホヒスチジンは自らのリン酸基を応答調節体(response regulator、R R)として知られる2要素システムの第2の構成要素のアスパラギン酸基に供与する。リン酸化されたR Rは配列特異的にD N Aに結合し、前記細胞外刺激に対する応答を媒介するタンパク質をコードする特異的な遺伝子を直接的に活性化する役割を果たす。一定の場合にはH Kは複合的な構造を有する。具体的には、これらのタンパク質はR Rドメインをカルボキシル末端に含む。H Kのホスホヒスチジンはそのリン酸基をこのR Rドメインの活性部位のアスパラギン酸残基に転移する。これらの場合においては、前記R Rドメインは膜に結合しているため、シグナルはR RがD N Aに結合することにより直接的に伝達されることはありえない。かわりに、ヒスチジンリン酸転移(H P t)タンパク質がさらにシグナルを伝達するのに役割を果たす。複合的なH K/R Rタンパク質のホスホアスパラギン酸はリン酸基をH P tタンパク質の活性部位ヒスチジンに供与する。このH P tのホスホヒスチジンは今度はリン酸基を真のR Rに供与し、その後R Rは外界のシグナルに反応して遺伝子発現を活性化させる。

#### 【0007】

細菌と同様に植物細胞は検出器の要素を持つH KとR Rとからなる2要素シグナル伝達システムを有する。さらに、カルボキシル末端にR Rドメインを持つ複合的なH Kタンパク質(以下ハイブリッドH K/R Rタンパク質という)は細菌と植物の両方に見いだされる。H Kタンパク質は特異的な順序で生起する良く保存されたアミノ酸モチーフにより識別される。アミノ末端から前記の保存された領域はH、N、G 1、F及びG 2ボックスとして識別される。これらのモチーフは通常は前記タンパク質の200ないし250個のアミノ酸の範囲に見いだされる。細菌におけるのと同様に、細胞外シグナルを受け取るとH KはHボックスに含まれるヒスチジン残基を自己リン酸化する。このリン酸基はその後前記R Rに転移される。代替策として、一部のH Kは自らのヒスチジン残基を構成的に自己リン酸化し、この活性は細胞外シグナルの結合により抑制される。全てのH Kはシグナル伝達の絶対的な(obligate)一部としてR Rをリン酸化すると信じられている。R RはH Kのホスホヒスチジンによりリン酸化されるアスパラギン酸とリジン残基との絶対的な保存が特徴である。細菌とは異なり、植物のR RはD N Aと直接は結合しないことが示されている。むしろ、今日までに調べられた全ての植物のR Rは、一見してシグナルをタンパク質キナーゼカスケードに伝達するようであり、ついにはこのカスケードが転写因子をリン酸化して遺伝子発現を活性化するか不活性化するかのいずれかをする。細菌と同様に、植物はタンパク質のカルボキシル末端にR Rドメインを含む複合的H Kをも含む。この観察にもとづいて予測されるように、植物ゲノムはH P t遺伝子も有することも見いだされている。しかし、いずれかの植物H P tタンパク質が複合的H Kあるいは可溶性のR Rとの間で相互作用していることは未だに直接示されていない。

#### 【0008】

エチレン受容体(E T R 1、Changら、Science 262:539-544、1993)は最も周知の植物の2要素シグナル伝達システムである。エチレンは受精の調整、老化、暗/光形態形成及び病原体と機械的な損傷に対する応答とともに植物の発生

の調節に關与する周知のシグナル分子である。エチレン受容体はハイブリッドHK/RRタンパク質である。前記シグナルはRaf類似タンパク質キナーゼであるCTR1タンパク質を介して伝達される。CTR1はシグナル伝達経路の下流のステップの負の調節因子である。この経路の詳細は未だ明らかではないが、HKはエチレン非存在下で構成的に活性があり、そして常にCTR1をリン酸化し、CTR1はエチレン応答経路の他の遺伝子を抑制する。エチレンのETR1への結合は前記受容体のHK機能を阻害し、エチレンシグナル伝達カスケードの下流のタンパク質の活性化を可能にする。これはエチレン応答遺伝子の活性化で頂点に達する。

#### 【0009】

植物成長調節因子サイトカイニンに応答して誘導されるIBC6とIBC7という2個のRR遺伝子が、最近シロイヌナズナからクローン化され解析された(BrandstatterとKieber、Plant Cell 10:1009-1019、1998)。IBC6とIBC7は植物におけるサイトカイニンシグナルの伝達に關与するらしい。ハイブリッドHK/RRタンパク質CKI1をエンコードする遺伝子(Kakimoto、Science 274:982-985、1996)がトランスジェニック植物で異所的に発現されたときにサイトカイニン様の効果を生じる事実に照らしてこれは特に興味深い。したがって2要素HK/RRシステムはサイトカイニンシグナル伝達に關与することもあり得るようである。サイトカイニンは、栄養代謝、葉の伸長と老化及び側方分枝のような生理学的な事象を含む植物の成長と発生を調節することが知られている。

#### 【0010】

植物細胞シグナル伝達に關与するタンパク質をエンコードするポリヌクレオチドは一定の植物種については単離されてきたが、多くのかかるタンパク質をエンコードする遺伝子は広範囲の植物種において未だ同定されていない。そこで、この技術分野における細胞シグナル伝達の改変に有効に用いられる材料についての必要性はまだある。

#### 【0011】

##### 発明の概要

簡潔には本発明は、ユーカリとマツから単離され細胞シグナル伝達に關与するポリペプチドをエンコードするポリヌクレオチドを、かかるオリゴヌクレオチド及びポリペプチドの利用方法とともに提供する。かかるポリペプチドは検出器・調節器又は受容体キナーゼとして機能する。前記の単離されたポリヌクレオチドとポリペプチドは、植物の成長及び発生においてかあるいは病原体又は環境因子を原因とするストレス条件下かのいずれかでの植物細胞応答の改変に有効に用いられる。

#### 【0012】

第1の局面では本発明は、RLK、HK、RR、HPt又はハイブリッドHK/RRタンパク質をエンコードする、ユーカリとマツから入手可能な単離精製されたポリヌクレオチドを提供する。1の実施態様では、前記単離されたポリヌクレオチドは、(a)配列識別番号第1-67、131-481及び833-888番に列挙された配列、(b)配列識別番号第1-67、131-481及び833-888番に列挙された配列の相補体、(c)配列識別番号第1-67、131-481及び833-888番に列挙された配列の逆相補体、(d)配列識別番号第1-67、131-481及び833-888番に列挙された配列の逆配列及び(e)(a)ないし(d)の配列と以下に定義されるところにより40%、60%、75%又は90%同一である配列を有する配列からなるグループから選択されたDNA配列を含む。

#### 【0013】

さらなる局面では、本発明のDNA配列にエンコードされた単離されたポリペプチドが提供される。ある実施態様ではかかるポリペプチドは配列識別番号第68-130、482-832及び889-945番からなるグループから選択されたアミノ酸配列を含む。

#### 【0014】

別の局面では本発明は、本発明のポリヌクレオチドを含むDNAコンストラクトを単独でか、ここで開示される1以上のポリヌクレオチドとの組合せあるいは1以上の既知のD

N A 配列との組合せで、かかるコンストラクトを含むトランスジェニック細胞とともに提供する。

【0015】

関連した局面では本発明は、5'から3'の方向に、遺伝子プロモーター配列、本発明のポリペプチドの少なくとも機能的な部分をコードするオープン・リーディング・フレーム及び遺伝子ターミネーション配列を含むDNAコンストラクトを提供する。前記オープン・リーディング・フレームはセンス方向又はアンチセンス方向に配列されてもよい。上記のポリヌクレオチドにエンコードされた酵素をコードする遺伝子の、ノンコーディング領域又はノンコーディング領域に相補的なヌクレオチド配列を、遺伝子プロモーター配列と遺伝子ターミネーター配列とともに含む遺伝子コンストラクトも提供される。遺伝子プロモーターとターミネーション配列は宿主植物で機能するものであることが好ましい。遺伝子プロモーターとターミネーション配列は本来の(original)遺伝子のものが最も好ましいが、その他のカリフラワーモザイクウイルス(CaMV)プロモーターのような本発明の技術分野で一般に用いられるものも、Kozak配列又はオメガエンハンサーのようなエンハンサー及びアグロバクテリウム・ツメファシエンス(Agrobacterium tumefaciens)菌のノパリンシンターゼ(nopalinsynthase)遺伝子のターミネーターとともにあるいは単独で、本発明において有効に利用できる。組織特異的なプロモーターは1以上の所望の組織を標的として発現させるための用いられる。DNAコンストラクトはさらに形質転換細胞の同定のためのマーカーを含むこともある。

【0016】

さらなる局面では、本発明のDNAコンストラクトを含むトランスジェニック細胞、好ましくは植物細胞が、かかるトランスジェニック細胞を含む生物、好ましくは植物と、かかる植物の果実、種子その他の生産物、由来物あるいは子孫とともに提供される。かかるトランスジェニック植物の零余子(むかご、propagule)も本発明に含まれる。ここで用いられる「零余子」という語は挿し木を含む有性的あるいは無性的な繁殖又は増殖に利用される植物のいかなる部分をも意味する。

【0017】

さらに別の局面では、植物のような標的生物における細胞シグナル伝達を改変するための方法であって、本発明のDNAコンストラクトを該植物のゲノムに安定的に取り込むことを含む方法が提供される。好ましい実施態様においては標的生物は木本植物であり、ユーカリとマツの種からなるグループから選択されるものが好ましく、Eucalyptus grandis及びPinus radiataからなるグループから選択されるものが最も好ましい。関連した局面では、細胞シグナル伝達の改変された、植物のような標的生物を作出するための方法であって、トランスジェニック細胞を提供するために本発明のDNAコンストラクトで形質転換することと前記トランスジェニック細胞を再生及び成熟植物の成長に導く条件下で培養することを含む方法が提供される。

【0018】

又更なる局面では本発明は、本発明のDNAコンストラクトを植物のゲノムに安定的に取り込むことを含む、植物のような標的生物におけるポリペプチドの活性を改変するための方法を提供する。好ましい実施態様においては、標的生物は木本植物であり、ユーカリとマツの種からなるグループから選択されるものが好ましく、Eucalyptus grandis及びPinus radiataからなるグループから選択されるものが最も好ましい。

【0019】

以下の詳細な説明を参照することにより、本発明の上記の及びさらなる特徴及びその入手法は明らかとなり、本発明は最も良く理解される。ここで開示された全ての引用文献は、引用によりそれらの全体があたかも各々が個別に取り込まれたかのごとくに取り込まれる。

【0020】

### 詳細な説明

本発明は植物細胞シグナル伝達に關与するポリペプチドをエンコードする単離精製されたポリヌクレオチドを提供する。上記の通り細胞シグナル伝達は、植物の成長と発生及び環境因子と病原体のような外界刺激に対する細胞の応答に重大な役割を果たすことが知られている。そこで、細胞シグナル伝達に關与するポリペプチドをエンコードするポリヌクレオチドで植物を形質転換することは、細胞の増殖、分化、伸長及び生存、疾病抵抗性及び栄養代謝のような性質を改変するために利用される。

#### 【0021】

例えばハイブリッドHK/RRタンパク質ETR1は、エチレンシグナル伝達に關与することが知られている。したがってETR1の発現の改変は、果実の熟成のようなエチレンで調節される生理学的な性質及び葉と花の老化を改変することにつながる。そこでトランスジェニック植物におけるこのタンパク質の発現の改変は、老化の遅延により切り花の有効期間(usable life)を延長するために用いられる。さらにETR1の発現の改変は、生殖器官の老化を選択的に促進するために用いられ、工学的な不稔植物の作出をもたらす。

#### 【0022】

ハイブリッドHK/RRタンパク質CKI1はサイトカイニンのシグナル伝達に關与するとされてきた。このタンパク質の過剰発現は突然変異植物でサイトカイニン様の効果をもたらすことが知られている。サイトカイニンは、生理学的現象の中でも側方分枝、発現の伸展(expansion)、細胞分裂、栄養の分配及び老化の遅延に重要な役割を果たすことが示されてきた。したがってCKI1の発現の改変は、例えば選択された細胞タイプ又は器官での老化の遅延をもたらす。これは収穫から消費までの果実と野菜の貯蔵期間を延長することにつながる。代替策としてCKI1の発現の改変は、林産木種での分枝頻度を減少させるのに用いられて、堅い木の家具と合板用の節のない無傷の(clear)長い材木を得ることにつながる。

#### 【0023】

本発明の方法と材料を用いて、ポリペプチドをエンコードする遺伝子の追加のコピーを植物のような標的生物のゲノムに取り込むことにより、特定の植物細胞ポリペプチドの量を増加又は減少させることができる。同様に、かかる遺伝子のアンチセンスコピーで標的生物を形質転換することによりポリペプチドを増加又は減少させることもできる。

#### 【0024】

1の実施態様では本発明は、細胞シグナル伝達に關与する植物ポリペプチドをエンコードし又は部分的にエンコードする単離されたポリヌクレオチドであって、ユーカリとマツ由来のポリヌクレオチドを提供する。具体的には、本発明はEucalyptus grandis由来(配列識別番号第2、8、9、11、15、18、19、21-25、33、34、38、131-301、448-463、848、858-874及び882-887番)及びPinus radiata由来(配列識別番号第1、3-7、10、12-14、16、17、20、26-32、35-37、39-41、302-447、833-847、875-881及び888番)のRLKをエンコードする単離ポリヌクレオチドと、Eucalyptus grandis由来(配列識別番号第42、48-52、55-58、67、464-471、474-478及び850-857番)及びPinus radiata由来(配列識別番号第43-47、53、54、59-66、472、473、479-481及び849番)の2要素シグナル伝達システムの少なくとも1つの構成要素(HK、RR又はハイブリッドHK/RRタンパク質)をエンコードする単離ポリヌクレオチドを提供する。かかる単離ポリヌクレオチドの相補体、かかる単離ポリヌクレオチドの逆相補体及びかかる単離ポリヌクレオチドの逆配列も以下に定義するかかる配列の変異体とともに提供される。

#### 【0025】

別の実施態様では本発明は、本発明のポリヌクレオチドにエンコードされた単離されたポリペプチドを提供する。配列識別番号第1-59、63、64、66、67、131-

481、833-848、851及び853-888番のDNA配列にエンコードされたアミノ酸配列は、それぞれ配列識別番号第68-130、482-832及び889-945番に提供される。そこで一定の実施態様では本発明のポリペプチドは、第68ないし130、482ないし832、889ないし945番からなるグループから選択されたアミノ酸配列とその変異体を含む。

#### 【0026】

ここで開示されるポリペプチドは、林産植物資源、主に *Eucalyptus grandis* と *Pinus radiata* に由来した。本発明のポリヌクレオチドの一部は、完全長ポリペプチドをエンコードする完全長遺伝子を意味しないという点で、「部分的な (partial)」配列である。ここで用いられる「ポリヌクレオチドにエンコードされたポリペプチド」という用語は、本発明の部分的な単離されたDNA配列を含むヌクレオチド配列にエンコードされたポリペプチドを含む。かかる部分配列は、プライマー及び/又はプローブと周知の雑種形成技術及び/又はPCR技術とを用いて様々なDNAライブラリを分析し配列決定することにより拡張できる。部分配列は、ポリペプチドをエンコードするオープン・リーディング・フレーム、完全長ポリヌクレオチド及び/又はポリペプチドを発現可能な遺伝子あるいは別のゲノムの有用な部分が同定されるまで拡張できる。完全長ポリヌクレオチド及び遺伝子を含むかかる拡張配列は、前記拡張配列が同定された配列又はその変異体あるいはここで開示された配列の1つの連続した部分 (x-マー) 又はその変異体を含むとき、ここで開示された配列又はその変異体あるいはここで開示された配列の1つの部分又はその変異体に「対応する (corresponding to)」と記載される。同様に、本発明のポリヌクレオチドに対応するRNA配列、逆配列、相補配列、アンチセンス配列等は、配列識別番号第1-67、131-481及び833-888番に列挙された配列として同定されたcDNA配列を用いて決まり切った手順で (routinely) 確認し取得することができる。

#### 【0027】

上記の通りここに開示されたポリヌクレオチドは、オープン・リーディング・フレーム (ORF) 又はポリペプチドをエンコードする部分的なオープン・リーディング・フレームを含む。さらにポリペプチドをエンコードするオープン・リーディング・フレームは、配列識別番号第1-67、131-481及び833-888番として提示された配列に対応する拡張配列又は完全長配列の中に同定できることもある。オープン・リーディング・フレームは当業者に周知の技術を用いて同定できる。これらの技術は、例えば既知の開始及び終了コドンの位置の解析、コドン頻度にもとづく最も可能性の高い読み枠の同定その他これらに類するものを含む。ORF解析のために適当なツールとソフトウェアは、例えばインターネット上 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html> で入手可能である。オープン・リーディング・フレーム及びオープン・リーディング・フレームの部分 (portion) は本発明のポリヌクレオチドの中に同定できる。ひとたび部分的なオープン・リーディング・フレームが同定されると、ポリヌクレオチドは、完全なオープン・リーディング・フレームのポリヌクレオチドが同定できるまで、当業者に周知の技術を用いて部分オープン・リーディング・フレームの領域を拡張することができる。よって、ポリペプチドをエンコードするオープン・リーディング・フレームは本発明のポリヌクレオチドを用いて同定できる。

#### 【0028】

ひとたびオープン・リーディング・フレームが本発明のポリヌクレオチドで同定されると、該オープン・リーディング・フレームは単離及び/又は合成できる。前記オープン・リーディング・フレームと、当業者に周知の適当なプロモーター、イニシエーター、ターミネーター等を含む、発現可能なDNAコンストラクトが構築できる。かかる遺伝子コンストラクトは、前記オープン・リーディング・フレームにエンコードされたポリペプチドを発現するために宿主細胞に導入される。適当な宿主細胞は植物細胞、哺乳類細胞、細菌細胞、藻類等を含む様々な前核及び真核細胞を含む。

#### 【0029】

本発明のポリヌクレオチドにエンコードされたポリペプチドは、その生物活性を決定するために発現され様々な分析法に使用される。かかるポリペプチドは抗体作成に、相互作用する相手の蛋白質又はその他の化合物の単離に及び相互作用する蛋白質又はその他の化合物のレベルの定量的な測定に用いることができる。

【0030】

ここで用いられる「ポリヌクレオチド」という用語はデオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチドの塩基の1本鎖又は2本鎖のポリマーを意味し、DNA及び対応するセンス鎖とアンチセンス鎖の両方のRNA分子でHnRNAとmRNA分子を入れたRNA分子とを含み、全合成又は部分合成されたポリヌクレオチドとともにcDNA、ゲノムDNA及び組み換えDNAを含む。HnRNAはイントロンを含み、DNA分子と一般的に1対1に対応する。mRNAはイントロンが切り出されたHnRNA及びDNA分子に対応する。ポリヌクレオチドは遺伝子全体又はその部分を含む。操作可能なアンチセンスポリヌクレオチドは対応するポリヌクレオチドの断片を含み、「ポリヌクレオチド」の定義は全てのかかる操作可能なアンチセンス断片を含む。アンチセンスポリヌクレオチド及びアンチセンスポリヌクレオチドが関与する技術は当業者に周知で例えば、Robinson - Benionら、Methods in Enzymol. 254(23):363-375、1995及びKawasakiら、Artific. Organs 20(8):836-848、1996に記載される。

【0031】

ここで使用されたところの「ポリペプチド」という用語は、アミノ酸残基が共有結合で連結された、完全長を含むいかなる長さのアミノ酸鎖をも含む。本発明のポリペプチドは、精製された天然物であっても、組み換え技術又は合成技術を用いて部分的にあるいは全面的に生産されてもよい。

【0032】

ここで記載されたポリヌクレオチドとポリペプチドの全ては当業者に慣用される条件下で単離精製される。

【0033】

ここで使用されたところの「相補体」、「逆相補体」、及び「逆配列」という用語の定義は以下の例で最も良く示されている。5'AGGACC3'という配列に対して、相補体、逆相補体及び逆配列は以下の通りである。

相補体	3' T C C T G G 5'
逆相補体	3' G G T C C T 5'
逆配列	5' C C A G G A 3'

【0034】

ここで使用されるところの「変異体」という用語は、約40%以上、より好ましくは約60%以上、さらにより好ましくは約75%以上、最も好ましくは約90%以上本発明の配列と同一性を示す(ヌクレオチド又はアミノ酸のいずれかの)残基をいう。同一性の百分率は、以下に記載の通り比較する2つの配列のアライメントをとり(alignment)、アライメントがとれた部分の同一残基の数を決定し、該同一残基の数を本発明の又はクエリーの配列中の全長で除算し、その結果を100倍したものをいう。

【0035】

公開で入手可能なコンピューターアルゴリズムを用いて、ポリヌクレオチド配列又はポリペプチド配列のアライメントをとることもでき、特定の領域の同一ヌクレオチドの百分率を別の配列に対して決定することもできる。ポリヌクレオチド配列のアライメントと類似性同定のための2つの代表的なアルゴリズムは、BLASTN及びFASTAアルゴリズムである。ポリペプチド配列の同一性の百分率は、BLASTPアルゴリズムを用いて調べることができる。前記BLASTNとBLASTPの両方のソフトウェアとも、NCBIの匿名FTPサーバー(ftp://ncbi.nlm.nih.gov)上のblast/executables/で入手可能である。説明書に記載され、前記アルゴリズムとともに配布された、デフォルトのパラメーター値に設定したBLASTNアル

ゴリズムバージョン2.0.6(1998年9月16日)を、本発明による変異体の決定に用いるのが好ましい。BLASTN及びBLASTPを含むBLASTファミリーのアルゴリズムの使用法は、NCBIのウェブサイトのURL(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/newblast.html>)と、AltschulらによるNucleic Acids Res. 25:3389-3402、1997の刊行物とに記載されている。コンピュータアルゴリズムのFASTAは、インターネット上のftpサイトftp://ftp.virginia.edu/pub/fasta/で入手可能である。説明書に記載され、アルゴリズムとともに配布されたデフォルトのパラメータ値に設定された、1998年8月のバージョン3.1t11を、本発明による変異体の決定に用いるのが好ましい。FASTAアルゴリズムの使用法は、Pearson WRとLipman DJのProc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-2448、1988と、Pearson WRのMethods in Enzymol. 183:63-98、1990とに記載される。

#### 【0036】

以下のランニングパラメータを、ポリヌクレオチド配列の以下に説明するE値(E values)及び同一性百分率に寄与する、BLASTNを使うアライメント及び類似性の決定に用いるのが好ましい。Unix(登録商標)のランニングコマンドは、「blastall p blastn d embldb e 10 G 0 E 0 r 1 v 30 b 30 i queryseq o results」、パラメータは以下の通りである。

p プログラムの名称 [文字列]  
d データベース [文字列]  
e 期待値 (E) [実数]  
G ギャップを空けるためのコスト (ゼロはデフォルトの行動を呼び起こす) [整数]  
E ギャップを拡張するためのコスト (ゼロはデフォルトの行動を呼び起こす) [整数]  
r ヌクレオチドのマッチの報酬 (blastnのみ) [整数]  
v 1行説明(one-line descriptions)の数 (V) [整数]  
b 表示するアライメントの数 (B) [整数]  
i クエリーファイル [File In]  
o BLASTレポートアウトプットファイル [File Out] 任意  
BLASTPについては「blastall p blastp d swissprot db e 10 G 0 E 0 v 30 b 30 i queryseq o results」というランニングパラメータが好ましい。

p プログラムの名称 [文字列]  
d データベース [文字列]  
e 期待値 (E) [実数]  
G ギャップを空けるためのコスト (ゼロはデフォルトの行動を呼び起こす) [整数]  
E ギャップを拡張するためのコスト (ゼロはデフォルトの行動を呼び起こす) [整数]  
r ヌクレオチドのマッチの報酬 (blastnのみ) [整数]  
v 1行説明(one-line descriptions)の数 (V) [整数]  
b 表示するアライメントの数 (B) [整数]  
i クエリーファイル [File In]  
o BLASTレポートアウトプットファイル [File Out] 任意

#### 【0037】

B L A S T N、B L A S T P、F A S T A又は同様のアルゴリズムにより作成された、クエリー配列による1以上のデータベース配列への「ヒット」は、配列の類似部分のアライメントをとって同定する。前記のヒットは類似性の程度と重複する配列の長さの順に並べられる。データベース配列へのヒットは、前記クエリー配列の配列長の一部としか重複しないことを意味するのが一般的である。

【0038】

B L A S T N及びF A S T Aアルゴリズムは、アライメントの「期待」(E)値をも算出する。E値は、一定の規模のデータベースを検索したときに偶然一定数の隣接した配列にわたって発見が「期待」できるヒットの数を示す。E値は、好ましいE M B Lデータベースのようなデータベースへのヒットが真の類似性を表すかどうかを決定するための、有意性の閾値として用いられる。例えば、あるポリヌクレオチドのヒットに付与されたE値0.1は、E M B Lデータベースの規模のデータベースにおいて、同様のスコアの配列のアライメントをとった部分にわたって、偶然0.1回マッチすることが期待できると解釈される。この判定基準により、当該ポリヌクレオチド配列のアライメントがとれてマッチした部分は、90%が同一である確率を有することになる。アライメントがとれてマッチした部分にわたって0.01未満のE値を有する配列については、B L A S T N又はF A S T Aアルゴリズムを用いてE M B Lデータベースで偶然マッチするものを見つける確率は1%未満である。

【0039】

1の実施態様によると、本発明のポリヌクレオチドのそれぞれに関して「変異体」のポリヌクレオチドは、本発明のポリヌクレオチドのそれぞれよりも核酸の数が同じか少ない配列で、かつ本発明のポリヌクレオチドと比べて0.01以下のE値となる配列を含むのが好ましい。すなわち、変異体ポリヌクレオチドは、本発明のポリヌクレオチドと同一である確率が99%以上あり、上記のパラメーター設定でB L A S T N又はF A S T Aアルゴリズムを用いてE値が0.01以下となる、いかなる配列をもいう。

【0040】

変異体ポリヌクレオチドは、前記の列挙されたポリヌクレオチド配列と、ストリンジェントな条件下で雑種形成するのが一般的である。ここで用いられるところの「ストリンジェントな条件」とは、6 X S S C及び0.2% S D Sの溶液で前洗浄し、6 X S S C及び0.2% S D S中で65°C、終夜(overnight)雑種形成させ、その後1 X S S C及び0.1% S D S中で65°C、各30分ずつ2回洗浄し、0.2 X S S C及び0.1% S D S中で65°C、各30分ずつ2回洗浄することを指す。

【0041】

本発明は、開示された配列とは相違するが、ここに開示されるポリヌクレオチドによりエンコードされるポリペプチドと遺伝暗号の縮退の結果同一のポリペプチドをエンコードするポリヌクレオチドとともに前記の開示された配列の対立変異体遺伝子も含む。したがって、保存的置換の結果、配列識別番号第1-67、131-481及び833-888番として列挙されたポリヌクレオチド配列又はこれらの配列の相補体、逆配列又は逆相補体と異なる配列を含むポリヌクレオチドは本発明により意図され本発明に含まれる。さらに、合計が前配列長の10%未満の欠失及び/又は挿入の結果として、配列識別番号第1-67、131-481及び833-888番に列挙された配列、又はこれらの配列の相補体、逆配列又は逆相補体と異なる配列を含むポリヌクレオチドも本発明により意図され、かつ本発明に含まれる。同様に、合計が全配列長の10%未満のアミノ酸置換、挿入及び/又は欠失の結果として、配列識別番号第68-130、482-832及び889-945番に列挙された配列と異なる配列を含むポリペプチドは、当該変異体ポリペプチドがリグニン生合成経路で活性を有することを条件として、本発明により意図され、かつ本発明に含まれる。

【0042】

ここで用いられるところの「x-マー」という用語は、「x」の特定の値に関して、配列識別番号第1-67、131-481及び833-888番として同定されたポリヌク

レオチドいずれかの少なくとも特定された数(「x」)の連続した残基を含むポリヌクレオチドを指す。xの値は、特定の配列に依存して、約20から約600までである。

【0043】

本発明のポリヌクレオチドは、配列識別番号第1-67、131-481及び833-888番として同定されたポリヌクレオチド又はそれらの変異体のいずれかの少なくとも特定された数の連続した残基(x-マー)を含むポリヌクレオチドを含む。好ましい実施態様によると、xの値は20以上が好ましく、40以上がより好ましく、60以上がさらに好ましく、80以上が最も好ましい。よって、本発明のポリヌクレオチドは配列識別番号第1-67、131-481及び833-888番として同定されたポリヌクレオチド及び配列識別番号第1-67、131-481及び833-888番として同定されたポリヌクレオチドの中の1つの変異体の20マー、40マー、60マー、80マー、100マー、120マー、150マー、180マー、220マー、250マー又は300マー、400マー、500マー又は600マーを含むポリヌクレオチドを含む。

【0044】

本発明のポリヌクレオチドは、以下の実施例1及び2に記載される通り、Eucalyptus grandis及びPinus radiataから調製されたcDNAライブラリのハイスループットシーケンシングにより単離されたものでもよい。代替策として、配列識別番号第1-67、131-481及び833-888番に提供された配列にもとづくオリゴヌクレオチドプローブが合成され、雑種形成又はPCR技術を用いてEucalyptus grandis及びPinus radiataからのcDNA又はゲノムDNAライブラリのどちらかの中で陽性クローンを同定するのに用いられる。プローブはここに提供された配列より短くてもよいが、少なくとも10個、好ましくは少なくとも約15個、最も好ましくは少なくとも20個のヌクレオチド長である。かかるオリゴヌクレオチドプローブで用いるのに適する雑種形成及びPCR技術は本発明の技術分野で周知であり、Sambrookら、「分子クローニング：実験室マニュアル(Molecular cloning: a laboratory manual)」Cold Spring Harbor Laboratory Press社(ニューヨーク州、Cold Spring Harbor)刊、1989年に教示するものを含む。陽性クローンは制限酵素消化、DNA配列決定等により解析される。

【0045】

さらに、本発明のDNA配列は本発明の技術分野で周知の技術を用いる合成手段によって生成することができる。オリゴヌクレオチドの自動合成用の設備はPerkin Elmer/Applied Biosystems Division(カリフォルニア州、Foster City)のような供給者から商業的に入手可能であり、製造者の指示に従って運転するとよい。

【0046】

1の実施態様では本発明のDNAコンストラクトは、本発明のポリヌクレオチド又はその変異体にエンコードされるポリペプチドの少なくとも機能性のある部分をコードするオープン・リーディング・フレームを含む。ここで使用されるところのポリペプチドの「機能性のある部分」とは、該ポリペプチドの結合部位又は触媒的なシグナル伝達部位を含む部分をいう。ポリペプチドの機能性のある部分は、本発明の技術分野で周知のプロトコルを用いる標的突然変異解析と改変されたポリペプチド産物のスクリーニングとにより決定することができる。正常では機能性のある部分は10個ないし20個のアミノ酸長であるが、より長くても短くてもよい。活性部位は、1以上のポリペプチド鎖上に存在する離れた部分から構成されることもあり、一般的には高い結合親和性を示す。

【0047】

オープン・リーディング・フレームは、標的植物への該DNAコンストラクトの形質転換が野生型植物に比較したポリペプチド量の変化をもたらすように、DNAコンストラクトにセンス又はアンチセンス方向に挿入される。オープン・リーディング・フレームをセンス方向に含むDNAコンストラクトでの形質転換は、選択された遺伝子の発現の改変と

いう結果をもたらすのが一般的であり、オープン・リーディング・フレームをアンチセンス方向に含む遺伝子コンストラクトでの形質転換は、選択された遺伝子の発現の減少をもたらすのが一般的である。本発明のオープン・リーディング・フレームをセンス又はアンチセンス方向のどちらかに含むDNAコンストラクトで形質転換された植物の集団は、当業者に周知の技術を用いて、問題の遺伝子の発現が増大又は減少していることについてスクリーニングされ、所望の表現型を有する植物が単離される。

【0048】

代替策として植物細胞のシグナル伝達に關与する遺伝子の発現は、本発明のオープン・リーディング・フレームの部分センス又はアンチセンスのいずれかの方向に挿入することにより阻害できる。かかる部分は完全長である必要はないが、本発明のポリヌクレオチドの25個の残基以上を含むことが好ましく、50個以上を含むことがより好ましい。しかし、より長い部分又は完全なオープン・リーディング・フレームに対応する完全長ポリヌクレオチドも用いることができる。前記のオープン・リーディング・フレームの部分は、標的遺伝子の阻害を達成するのに十分な配列類似性があることを条件として、内在配列と正確に同一である必要はない。したがって、1つの種由来の配列が異なる種の遺伝子の発現を阻害するのに用いられてもよい。

【0049】

別の実施態様では本発明のDNAコンストラクトは、本発明のポリヌクレオチドにエンコードされたポリペプチドをコードする遺伝子のノンコーディング領域を含むDNA配列又はかかるノンコーディング領域に相補的なDNA配列を含む。かかるコンストラクトに有効に用いることができるノンコーディング領域の例は、イントロン及び5'ノンコーディングリーダー配列を含む。かかるDNAコンストラクトによる標的植物の形質転換は、例えばNapoliら、Plant Cell 2:279-290、1990及びde Carvalho Niebelら、Plant Cell 7:347-358、1995によって論じられたのと同様の手法の、コサプレッションのプロセスによる植物の合成するイソプレノイド化合物の量の減少をもたらす。

【0050】

代替策としてポリペプチド発現の調節は、適当な配列又はサブ配列(例えばDNA又はRNA)をリボザイムコンストラクトに挿入することにより達成できる(McIntyre CLとManners JM、Transgenic Res. 5(4):257-262、1996)。リボザイムは2つの領域に相補的な雑種形成領域を含む合成RNA分子である。各々の領域は、本発明のポリヌクレオチドの1つにエンコードされるmRNA分子の少なくとも5個以上の連続したヌクレオチドを含むのが好ましい。リボザイムは非常に特異性の高いエンドヌクレアーゼ活性を有し、自己触媒的に前記mRNAを切断する。

【0051】

本発明の遺伝子コンストラクトは、さらに、転写されるべきDNA配列に操作可能に結合させた遺伝子プロモーター配列及び遺伝子ターミネーション配列を含み、遺伝子発現を制御する。遺伝子プロモーター配列は一般的には転写されるDNA配列の5'末端に位置して、該DNA配列の転写の開始に用いられる。遺伝子プロモーター配列は一般的には遺伝子の5'ノンコーディング領域に見いだされるが、オープン・リーディング・フレームの下流又はイントロン内に存在することもあり(Luehrsen KR、Mol. Gen. Genet. 225:81-93、1991)、例えば植物防御遺伝子のようにコーディング領域内に存在することもある(Douglasら、EMBO J. 10:1767-1775、1991)。

【0052】

本発明のDNAコンストラクトに有効に利用できる様々な遺伝子プロモーター配列は本発明の技術分野で周知である。遺伝子プロモーター配列及び遺伝子ターミネーション配列は、標的植物宿主に内在するものでもよく、該標的宿主内で機能性を有するときは、外来のものでもよい。例えば、プロモーター及びターミネーション配列は他の植物種、植物ウ

イルス、細菌プラスミドその他これらに類するもの由来のものでもよい。遺伝子プロモーター及びターミネーション配列は本発明の配列自体由来であることが好ましい。

【0053】

プロモーターの選択に影響を与える要因には、コンストラクトの所望の組織特異性及び転写と翻訳のタイミングが含まれる。例えば、35Sカリフラワーモザイクウイルス(CaMV35S)プロモーターのような構成的なプロモーターは、植物の全ての部分における酵素活性に影響を及ぼす。組織特異的なプロモーターを使うことは、関心のある組織においてのみ所望のセンス又はアンチセンスRNAを産生することになる。誘導可能な遺伝子プロモーター配列を用いる遺伝子コンストラクトでは、RNAポリメラーゼ結合及び転写開始の速度は、光、熱、嫌気性ストレス、栄養条件の変化等のような外界の刺激により変動させることができる。時間的に調節されたプロモーターは、形質転換細胞の発生の間の特定の時にRNAポリメラーゼ結合及び転写開始の速度の変動に影響を与えるために用いられる。問題の酵素遺伝子由来の本来のプロモーターか、ユーカリ又はマツのような形質転換される生物の特定の組織にだけ発現する遺伝子由来のプロモーターかを使うのが好ましい。本発明に有効に利用できる遺伝子プロモーターの他の例には、マンノピンシンターゼ(mannopine synthase, mas)、オクトピンシンターゼ(octopine synthase, ocs)及びChuaら、Science 244: 174181、1989により総説されたものが含まれる。

【0054】

転写されるDNA配列の3'側に位置する遺伝子ターミネーション配列は、遺伝子プロモーター配列と同じ遺伝子由来のものでもよく、異なる遺伝子由来のものでもよい。アグロバクテリウム・ツメファシエンスのノパリンシンターゼ遺伝子の3'末端のように当業者に周知の多くの遺伝子ターミネーション配列が本発明に有効に利用できる。1の実施態様では遺伝子ターミネーター配列は、本来の酵素遺伝子又は形質転換される標的の種に由来するものである。

【0055】

本発明のDNAコンストラクトは、本発明のコンストラクトを含む形質転換細胞の検出ができるように、植物細胞で有効な選択マーカーを含むこともある。本発明の技術分野で周知のかかるマーカーは、1以上の毒素の耐性を有するのが典型的である。かかるマーカーの1つの例は、その発現により中程度の濃度で植物細胞に通常は毒性のあるカナマイシン又はハイグロマイシンの耐性をもたらすNPTII遺伝子である(Rogersら、Weissbach AとWeissbach H編集、「植物分子生物学の方法(Methods for Plant Molecular Biology)」Academic Press Inc.社(カリフォルニア州 San Diego)刊、1988年)。形質転換細胞は問題の抗生物質を含む培地中で増殖する能力により同定できる。代替策として、形質転換細胞中に所望のコンストラクトが存在することは、サザン及びウェスタンブロット法のような本発明の技術分野に周知の他の技術によって決定することができる。

【0056】

本発明のDNAコンストラクトの構成要素を操作可能に結合させるための技術は本発明の技術分野で周知であり、例えば、Sambrookら、「分子クローニング：実験室マニュアル(Molecular cloning: a laboratory manual)」Cold Spring Harbor Laboratory Press社(ニューヨーク州、Cold Spring Harbor)刊、1989年に記載された、1以上の制限エンドヌクレアーゼ部位を含む合成リンカーの利用を含む。本発明のDNAコンストラクトは、各操作毎の後に出来上がったコンストラクトがクローン化され配列決定されて操作の正確さを決定することが可能な、例えば、大腸菌のような1以上の複製システムを有するベクターと連結されてもよい。

【0057】

本発明の遺伝子コンストラクトは、単子葉類被子植物(例、牧草、トウモロコシ、穀類

、カラスムギ、コムギ、オオムギ)と双子葉類被子植物(例、シロイヌナズナ、タバコ、マメ科植物、アルファルファ、オーク、ユーカリ、カエデ)及び裸子植物(例、オウシュウアカマツ(Aronen、Finnish Forest Res. Papers、第595巻、1996)、ホワイトスプルス(Ellisら、Biotechnology 11:84-89、1993)、及びカラマツ(Huangら、In vitro Cell 27:201-207、1991)の両方を含むさまざまな植物の形質転換に使われる。好ましい実施態様においては、本発明のDNAコンストラクトは、その茎が複数年生存して木質組織の追加により毎年直径が増大するような樹木又は灌木とここでは定義される、木本植物の形質転換に用いられる。標的植物は、好ましくはユーカリ及びマツの種を含むグループから選択され、最も好ましくはEucalyptus grandisとPinus radiataからなるグループから選択される。本発明のDNAコンストラクトで有用に形質転換される他の種には、Pinus banksiana、Pinus brutia、Pinus caribaea、Pinus clausa、Pinus contorta、Pinus coulteri、Pinus echinata、Pinus eldarica、Pinus ellioti、Pinus jeffreyi、Pinus lambertiana、Pinus monticola、Pinus nigra、Pinus palustris、Pinus pinaster、Pinus ponderosa、Pinus resinosa、Pinus rigida、Pinus serotina、Pinus strobus、Pinus sylvestris、Pinus taeda、Pinus virginianaのようなマツと、Abies amabilis、Abies balsamea、Abies concolor、Abies grandis、Abies lasiocarpa、Abies magnifica、Abies procera、Chamaecyparis lawsoniana、Chamaecyparis nootkatensis、Chamaecyparis thyoides、Huniperus virginiana、Larix decidua、Larix laricina、Larix leptolepis、Larix occidentalis、Larix siberica、Libocedrus decurrens、Picea abies、Picea engelmanni、Picea glauca、Picea mariana、Picea pungens、Picea rubens、Picea sitchensis、Pseudotsuga menziesii、Sequoia gigantea、Sequoia sempervirens、Taxodium distichum、Tsuga canadensis、Tsuga heterophylla、Tsuga mertensiana、Thuja occidentalis、Thuja plicataのような他の裸子植物と、Eucalyptus alba、Eucalyptus bancroftii、Eucalyptus botyroides、Eucalyptus bridgesiana、Eucalyptus calophylla、Eucalyptus camaldulensis、Eucalyptus citriodora、Eucalyptus cladocalyx、Eucalyptus coccifera、Eucalyptus curtisii、Eucalyptus dalrympleana、Eucalyptus deglupta、Eucalyptus delagatensis、Eucalyptus diversicolor、Eucalyptus dunni、Eucalyptus ficifolia、Eucalyptus globulus、Eucalyptus gomphocephala、Eucalyptus gunnii、Eucalyptus henryi、Eucalyptus laevopinea、Eucalyptus macarthurii、Eucalyptus macrohyncha、Eucalyptus maculata、Eucalyptus marginata、Eucalyptus megacarpa、Eucalyptus melliodora、Eucalyptus nicholii、Eucalypt

us nitens、Eucalyptus nova-anglica、Eucalyptus obliqua、Eucalyptus obtusiflora、Eucalyptus oreades、Eucalyptus pauciflora、Eucalyptus polybractea、Eucalyptus regnans、Eucalyptus resinifera、Eucalyptus robusta、Eucalyptus rudis、Eucalyptus saligna、Eucalyptus sideroxylon、Eucalyptus stuartiana、Eucalyptus tereticornis、Eucalyptus torelliana、Eucalyptus urnigera、Eucalyptus urophylla、Eucalyptus viminalis、Eucalyptus viridis、Eucalyptus wandoo、Eucalyptus youmanniのようなユーカリと、上記の種のいずれかのハイブリッドとを含むが、これらに限定されない。

【0058】

DNAコンストラクトを標的植物のゲノムに安定的に取り込むための技術は本発明の技術分野で周知であり、アグロバクテリウム・ツメファシエンス菌を介した導入法、エレクトロポレーション法、プロトプラスト融合法、生殖器官注入法、未熟胚注入法、高速発射体導入法 (high velocity projectile introduction)、その他これらに類するものが含まれる。技術の選択は、形質転換される標的植物に依存する。例えば、双子葉類植物及びある種の単子葉類及び裸子植物は、例えばBevan (Nucleic Acids Res. 12: 8711-8721, 1984)により記載されたように、アグロバクテリウムTiプラスミド技術によって形質転換できる。本発明の遺伝子コンストラクトの導入の標的には、葉組織のような組織、散布された細胞、プロトプラスト、種子、胚、分裂組織領域、子葉、胚軸およびこれらに類するものが含まれる。ユーカリ及びマツを形質転換する1つの方法は、花粉 (例えば、Aronen、Finnish Forest Res. Papers, Vol. 595: 53, 1996を参照) 又は容易に再生可能な胚組織を用いるバイオリスティック (biolistic) な方法である。

【0059】

ひとたび細胞が形質転換されると、ゲノムに取り込まれた本発明のDNAコンストラクトを有する細胞は、上記のカナマイシン耐性マーカーのようなマーカーにより選択できる。トランスジェニックな細胞は、本発明の技術分野で周知の技術を用いて、植物全体を再生するための適当な培地中で培養される。プロトプラストの場合は細胞壁は適当な浸透圧条件下で再生させられる。種子又は胚の場合には、適当な発芽又はカルス誘導培地が用いられる。外植体については適当な再生培地が用いられる。植物の再生は、多くの種について十分に確立している。林木の再生の総説としては、Dunstanら、「木本植物における体細胞的胚形成 (Somatic embryogenesis in woody plants)」、(Thorpe TA編集、植物の試験管内胚形成 (In vitro embryogenesis of plants)、Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture 20(12): 471-540, 1995)を参照のこと。スプルースの再生についての具体的なプロトコールはRobertsの「トウヒ (spruce) の体細胞的胚形成 (Somatic embryogenesis of spruce)」(Redenbaugh K編集、「シンシード：人工的な種子の収穫の改善への応用 (Synseed: applications of synthetic seed to crop improvement)」、CRC Press社刊：第23章、427-449頁, 1993年)に説明されている。得られた形質転換植物は、本発明の分野で周知の技術を用いて、次世代以降のトランスジェニック植物を得るために、有性的又は無性的な生殖で増やされることもある。

【0060】

前記の説明の通り、標的細胞中のRNA産生は、プロモーター配列の選択により制御できる。標的植物は、2以上の本発明のコンストラクトで形質転換され、2以上のポリペプチド活性を改変し、2以上の組織でのポリペプチド活性に影響を与え、又は2以上の発現時でのポリペプチド活性に影響を与えることもある。同様に遺伝子コンストラクトは、本発明のポリペプチドをコードする2以上のオープン・リーディング・フレームを含むように、又はかかるポリペプチドをコードする遺伝子の2以上のノンコーディング領域を含むように構築されてもよい。本発明のポリヌクレオチドは、また、植物細胞シグナル伝達に關与するポリペプチドをエンコードする他の既知配列との組み合わせで用いてもよい。

#### 【0061】

本発明の単離されたポリヌクレオチドは、DNA雑種形成及びPCR技術で決まり切って用いられるような本発明の技術分野で周知の技術を用いて、他の植物種由来の細胞シグナル伝達に關与するポリペプチドをエンコードするDNA配列を単離するためのプローブとして用いることもできる。

#### 【0062】

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド及びかかるポリペプチドに対する抗体はかかるポリヌクレオチド及び/又はポリペプチドと相互作用し、それにより細胞シグナル伝達を改変する分子をスクリーニングするために用いられる。かかる検定法を実施するための技術は本発明の技術分野で周知である。同様に、本発明のポリヌクレオチドとポリペプチドは細胞シグナル伝達経路を解明するためにデザインされた研究に用いられることもある。

#### 【0063】

以下の実施例は例示として与えられ、限定として与えられるのではない。

#### 【0064】

##### 実施例1

*Eucalyptus grandis* 由来のcDNAクローンの単離とキャラクタリゼーション

*Eucalyptus grandis* cDNA発現ライブラリは、以下の通り構築されスクリーニングされた。

#### 【0065】

mRNAは、Changら(Plant Molecular Biology Reporter 11:113-116、1993)のプロトコールに少し修正を加えたものを用いて、幹の木部のような特定の植物組織から抽出された。具体的にはサンプルは、CPC-RNAXB(100mM Tris-Cl、pH8.0、25mM EDTA、2.0M NaCl、2% CTAB、2% PVP及び0.05% スペルミジン3塩酸塩)に溶解し、クロロフォルム：イソアミルアルコールが24：1の混合液で抽出された。mRNAはエタノールで沈殿され、全RNA調製物はポリ(A)クイックmRNAアイソレーションキット(Stratagene社、カリフォルニア州La Jolla)を用いて精製された。cDNA発現ライブラリは、前記精製mRNAから製造者のプロトコールに従ってZAPエキスプレスcDNA合成キット(Stratagene)を用いて逆転写酵素合成した後、cDNAクローンをラムダZAPへ挿入して構築された。得られたcDNAは、5 $\mu$ lのライゲーションミックスに1 $\mu$ lのサンプルDNAを用いて、ギガバックIIパッケージングエキストラクト(Stratagene)でパッケージングをした。ライブラリの大量切り出し(mass excision)は、XL1-Blue MRF'細胞及びXLOLR細胞(Stratagene)をExAssistヘルパーファージ(Stratagene)とともに用いて行われた。切り出されたファージミドは、NZYプロス(Gibco BRL社、メリーランド州Gaithersburg)で希釈され、X-gal及びイソプロピルチオ-ベータ-ガラクトシド(IPTG)を含むLB-カナマイシン寒天プレート上に播かれた。

#### 【0066】

DNAミニプレップ用にプレートされ釣り上げられたコロニーのうち、99%は配列決

定に適したインサートを含んでいた。陽性クローンはカナマイシン入りのNZYブロス中で培養され、cDNAはアルカリ溶菌法とポリエチレングリコール(PEG)沈殿法により精製された。1%のアガロースゲルがシーケンシング用鑄型に染色体の混入があるかどうかをスクリーニングするために用いられた。ダイプライマー配列はターボカタリスト800マシン(Perkin Elmer/Applied Biosystems Division、カリフォルニア州 Foster City)を製造者のプロトコールに従って用いて調製された。

#### 【0067】

陽性クローンのDNA配列は、Perkin Elmer/Applied Biosystems DivisionのPrism377シーケンサーを用いて得られた。cDNAクローンは、まず5'末端側から、そして場合によっては3'末端側からも配列決定された。いくつかのクローンについては、既知配列の末端と雑種形成するプライマーを設計し、これらを配列情報量を拡張するための配列決定用プライマーとして用いることにより、内部の配列が得られた。代替策として内部配列は、公開された方法(Henikoff、Gene 28:351-359、1984)を用いて、関心のある遺伝子の「入れ子になった(nested)」欠失クローンを生成することにより得られた。

#### 【0068】

配列決定されたcDNA配列は、コンピュータアルゴリズムFASTA及び/又はBLASTNを用いて、EMBLデータベース(リリース58、1999年3月)の既知配列と比較された。冗長な配列のマルチプルアライメントが、信頼できるコンセンサス配列を組み立てるために用いられた。他の植物種由来の既知配列との類似性にもとづき、単離されたDNAは、RLK(配列識別番号第2、8、9、11、15、18、19、21-25、33、34、38、131-301、448-463、848、858-874及び882-887番)又は2要素シグナル伝達システムの少なくとも1の構成要素(HK、RR又はハイブリッドHK/RRタンパク質、配列識別番号第42、48-52、55-58、67、464-471、474-478及び850-857番)をエンコードするものとして同定された。配列識別番号第2、8、9、11、15、18、19、21-25、33、34及び38番は(上記の通りの決定法により)既知配列と同一の残基が10%未満しか見つからなかった。配列識別番号第848、854、855、856、859、860、862、863、864、865、866、867、868、869、871、872、873、874、882、883及び885番は、それぞれ配列識別番号第232、467、468、48、282、288、488、453、289、268、297、278、290、449、299、301、270、269、276、454及び300番の拡張配列を表し、配列識別番号第848、854-856、859、860、862-865、868、869及び871-874番は完全長配列である。

#### 【0069】

##### 実施例2

Pinus radiata由来のcDNAクローンの単離とキャラクタリゼーション  
Pinus radiataのcDNA発現ライブラリが実施例1に記載の通り木部のような特定の組織から構築され、スクリーニングされた。陽性クローンのDNA配列はPerkin Elmer/Applied Biosystems DivisionのPrism377シーケンサーで順方向及び逆方向プライマーを用いて得られ、決定された配列は上記の通りデータベース中の既知配列と比較された。

#### 【0070】

他の植物種由来の既知配列との類似性にもとづき単離されたDNA配列は、RLK(配列識別番号第1、3-7、10、12-14、16、17、20、26-32、35-37、39-41、302-447、833-847、875-881及び888番)又は2要素シグナル伝達システムの少なくとも1の構成要素(HK、RR又はハイブリッドHK/RRタンパク質、配列識別番号第43-47、53、54、59-66、472、473、479-481及び849番)をエンコードするものとして同定された。配列識別

番号第3-7、10、12-14、16、17、20、26、28-32、35-37及び39-41番の配列は(上記の通り決定された)既知配列と同一の残基が10%未満であることがわかった。配列識別番号第480番の配列はスプライシングされなかったイントロンと予測されるものを含むことがみつき、翻訳は2つのオープン・リーディング・フレームに切り離される。これらの2つのオープン・リーディング・フレームにエンコードされたアミノ酸配列は配列識別番号第830及び831番に提供される。配列識別番号第411、413、317、421、415、434及び416番はそれぞれ配列識別番号第26、17、28、39、16、30及び41番の拡張配列を表す。配列識別番号第833、834、835、836、837、838、839、840、841、842、843、844、875、876、877、878、879、880及び888番はそれぞれ配列識別番号第411、413、317、29、421、415、434、416、35、37、36、40、438、426、445、418、435、411及び427番の拡張配列を表し、第833-837、839-841、844及び878-881番は完全長配列である。

#### 【0071】

##### 実施例3

植物の成長を改変するためのエチレン受容体遺伝子の利用

タバコ植物体の *Pinus radiata* エチレン受容体遺伝子ホモログによる形質転換は以下の通りに行われる。*Pinus radiata* 由来のエチレン受容体ホモログ(配列識別番号第43番)のコーディング領域を含むDNA配列を含むセンス及びアンチセンスコンストラクトを含むDNAコンストラクトが構築され、公開された方法(An、バイナリーベクター(Binary Vectors)、Gelvin SBとSchilperoort RA編集、植物分子生物学マニュアル(Plant Molecular Biology Manual)、Kluwer Academic Publishers社刊、Dordrecht、1988年)を用いて直接形質転換法によりアグロバクテリウム・ツメファシエンス菌に挿入する。センスDNAのコンストラクトはPBK-CMVプラスミドのcDNA挿入配列をpART7プラスミドにクローン化し、次に該pART7ベクターからNotIで消化した35S-インサート-OCS3'UTR断片をpART27植物発現ベクターにクローン化することにより作製される(Gleave、Plant Mol. Biol. 20: 1203-1207、1992)。トランスジェニックコンストラクトの存在と完全性(integrity)は、制限酵素消化とDNA配列決定により確認される。

#### 【0072】

タバコ(*Nicotiana tabacum* cv. Samsun)の葉の切片はHorschら、Science 227: 1229-1231、1985の方法にもとづく方法を用いて前記のセンス及びアンチセンスのエチレン受容体コンストラクトで形質転換される。適当なコンストラクトを含む形質転換植物はサザンブロット実験を用いて確認される。前記*Pinus*属のエチレン受容体ホモログの形質転換植物での発現はセンス及びアンチセンスコンストラクトを用いて作出された独立の形質転換植物株のそれぞれから全RNAを単離することにより確認される。該RNAサンプルはノザンブロット実験で分析されそれぞれの形質転換株での外来遺伝子の発現レベルを決定する。センス及びアンチセンスコンストラクトで作出されたそれぞれの形質転換植物株について、*Pinus*属のエチレン受容体遺伝子と内在性のタバコのエチレン受容体遺伝子とによりエンコードされたエチレン受容体ポリペプチドの発現レベルが、野生型対照実験の植物の発現レベルと比較される。

#### 【0073】

本発明は明解にするため例示の目的である程度の詳細が説明されているが、請求の範囲のみにより制限されることが意図されている本発明の範囲から逸脱することなく、変更及び改変はなされうる。