

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4691733号  
(P4691733)

(45) 発行日 平成23年6月1日(2011.6.1)

(24) 登録日 平成23年3月4日(2011.3.4)

(51) Int. Cl. F I  
**AO1H 5/00 (2006.01)** AO1H 5/00 A  
**C12N 15/09 (2006.01)** C12N 15/00 ZNAA

請求項の数 12 (全 21 頁)

(21) 出願番号	特願平9-506365	(73) 特許権者	510087933
(86) (22) 出願日	平成8年7月18日(1996.7.18)		バイエル・エス・アー・エス
(65) 公表番号	特表平11-510043		フランス国、69009・リヨン、リュ・
(43) 公表日	平成11年9月7日(1999.9.7)		ジャン・マリー・ルクレール・16
(86) 国際出願番号	PCT/FR1996/001125	(74) 代理人	110001173
(87) 国際公開番号	W01997/004103		特許業務法人川口国際特許事務所
(87) 国際公開日	平成9年2月6日(1997.2.6)	(74) 代理人	100062007
審査請求日	平成15年2月3日(2003.2.3)		弁理士 川口 義雄
審判番号	不服2007-19702(P2007-19702/J1)	(72) 発明者	ルブラン, ミツシエル
審判請求日	平成19年7月13日(2007.7.13)		フランス国、エフ-69009・リヨン、
(31) 優先権主張番号	95/08979		リュ・ドウ・サン・シール、224
(32) 優先日	平成7年7月19日(1995.7.19)	(72) 発明者	サイヤン, アラン
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		フランス国、エフ-69009・リヨン、
			リュ・エルネストーフアブレーギユ、38

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 変異5-エノールピリビルシキミ酸-3-リン酸シタターゼ、この蛋白質をコードする遺伝子及びこの遺伝子を有する形質転換植物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号5に記載の配列からなる変異型5-エノールピリビルシキミ酸-3-リン酸シタターゼ(E P S P S)をコードする植物DNAで形質転換された植物。

【請求項2】

前記植物DNAがグリシン101のアラニンによる置換からなる変異をさらに含むことを特徴とする、請求項1に記載の植物。

【請求項3】

前記植物DNAが配列番号4に示す配列からなることを特徴とする、請求項1に記載の植物。

【請求項4】

コード配列並びに異種であり且つ植物中で機能し得る5'および3'位の調節成分を含むキメラ遺伝子で形質転換され、当該キメラ遺伝子がコード配列として、前記植物DNAを含むことを特徴とする請求項1から3のいずれか1項に記載の植物。

【請求項5】

前記キメラ遺伝子が植物ウイルスプロモーターを含むことを特徴とする、請求項4に記載の植物。

【請求項6】

前記キメラ遺伝子が植物プロモーターを含むことを特徴とする、請求項4に記載の植物。

【請求項7】

植物細胞を再生させることにより得られることを特徴とする植物であって、該植物細胞は、配列番号 5 に記載の配列からなるコード配列並びに異種であり且つ植物中で機能し得る 5' および 3' 位の調節成分を含むキメラ遺伝子を含むことを特徴とする、前記植物。

【請求項 8】

E P S P シンターゼを標的とする除草剤に対する耐性が改善された植物を作出する方法であって、植物細胞又はプロトプラストを、配列番号 4 に記載の配列からなる変異型 5 - エノールピルピルシキミ酸 - 3 - リン酸シンターゼ ( E P S P S ) をコードする植物 DNA で形質転換し、次いで形質転換された細胞を再生させることを特徴とする方法。

【請求項 9】

前記植物 DNA がグリシン 1 0 1 のアラニンによる置換からなる変異をさらに含むことを特徴とする、請求項 8 に記載の方法。

10

【請求項 1 0】

前記植物 DNA が配列番号 4 に示す配列からなることを特徴とする、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 1 1】

E P S P S を標的とする除草剤で植物を処理する方法であって、除草剤を請求項 7 に記載の植物に施用することを特徴とする方法。

【請求項 1 2】

グリホサート又はグリホサート前駆体を施用することを特徴とする、請求項 1 1 に記載の方法。

20

【発明の詳細な説明】

本発明は、新しい 5 - エノールピルピルシキミ酸 - 3 - リン酸シンターゼ ( 又は E P S P S ) に関する。この E P S P S は、E P S P S 活性のホスホエノールピルビン酸 ( P E P ) に関して競合的阻害剤である除草剤に関して増加した耐性を発揮する。このより耐性のある E P S P シンターゼは少なくとも一つの「イソロイシンによるスレオニン」置換を有する。本発明は、このような蛋白質をコードする遺伝子、この遺伝子を有するキメラ遺伝子構築物により形質転換された植物細胞、これらの細胞から再生された植物及びこれらの形質転換植物を用いる交配から生成する植物にも関する。

グリホセート ( glyphosate )、スルホセート ( sulfosate ) 及びフォサメチン ( fosametin e ) はホスホノメチルグリシンファミリーである。それらは本質的に P E P ( ホスホエノールピルビン酸 ) に関して 5 - エノールピルピルシキミ酸 - 3 - リン酸シンターゼ ( E C 2 . 5 . 1 . 1 9 ) 又は E P S P S の競合的阻害剤として作用する。それらの植物への適用後、それらは植物を移動して、急速に成長する部分、特に茎及び根の先端に集積され、敏感な植物の駆除部分に損傷を生じさせる。

30

これらの産物の主要標的であるプラスチド E P S P S は芳香族アミノ酸の生合成の経路の酵素であり、それは一又はそれ以上の核遺伝子によりコードされ、細胞質前駆体の形で合成され、ついでプラスチドに移行され、成熟体としてそこに蓄積される。

グリホセート及びそのファミリー産物への植物の耐性は、植物又は細菌の起源の、この遺伝子の生成物のグリホセートによる阻害の特性に関して変異され又はそうではない E P S P S 遺伝子を、それらのゲノムへ安定して導入することにより、得られる。グリホセートの作用の様式及び使用される遺伝子の生成物のグリホセートへの耐性の程度の観点から、プラスチドに実質的な量で蓄積されるように、この遺伝子の翻訳産物が発現されるようにするのが有利である。

40

プラスチド区画内にこの E P S P S 酵素を局在化させると、その競合的阻害剤 ( グリホセート ) に対してこの酵素をより抵抗性にする少なくとも一つの変異を有する E P S P S をコードする遺伝子を植物のゲノムに導入することにより、上記の種類の除草剤、特に N - ホスホノメチルグリシン又はグリホセートへの耐性を植物に与えることは、例えば、米国特許第 4 , 5 3 5 , 0 6 0 号により既知である。しかし、これらの方法は、農業条件下でこれらの植物の使用においてより大きい信頼性を得るように改良される必要がある。

本記述では、「植物」は光合成の可能な分化した多細胞生物体を意味すると理解され、「

50

植物細胞」は植物を起源とし、カルスのような未分化組織又は胚又は植物部分又は種子のような分化組織を構成可能な細胞を意味すると理解される。

本発明の主題は、ホスホノメチルグリシンファミリー除草剤への耐性遺伝子を含む新しいキメラ遺伝子により形質転換された細胞の再生による、これらの除草剤への増加した耐性を有する形質転換植物の生成である。

本発明の主題は、その標的としてE P S P Sを有する植物に除草剤に関して増加した耐性を与えるキメラ遺伝子でもある。このキメラ遺伝子は、転写方向順に、プロモーター領域、必要によりトランジットペプチド領域、グリホセート耐性酵素をコードする遺伝子配列及び3'末端の非翻訳ポリアデニル化シグナル領域からなり、このグリホセート耐性遺伝子は、それから誘導される遺伝子と比較して、「*aroA*」(E P S P S)領域において「イソロイシンによるスレオニン102」置換を含むことで特徴づけられるものである。好ましくは、さらに、同じ領域に「セリンによるプロリン106」置換を有する。これらの置換は何らかの起源、特に植物、細菌、藻類又は菌類起源のE P S P S配列に導入され又は存在する。

トランジットペプチド領域において使用できるトランジットペプチドは、それ自体既知であり、例えばトウモロコシ、ヒマワリ、マメ、タバコ、又は同類を起源とする、植物由来である。第一及び第二のトランジットペプチドは、同一であるか、類似しているか又は異なっている。それらは、さらに、それぞれ、欧州特許第0508909号にあるように、一又はそれ以上のトランジットペプチドユニットからなる。この特性領域の役割は、成熟及び天然蛋白質を、及び特に上記変異E P S P Sを、プラスミド区画で最大の効率で放出させることである。

本発明によるキメラ遺伝子のプロモーター領域は、有利には、植物で自然に発現される(チュープリン、イントロン、アクチン、ヒストン)少なくとも一つのプロモーター遺伝子又はプロモーターフラグメントからなりうる。

キメラ遺伝子の3'末端における非翻訳転写終止シグナル領域はいずれの起源でもよく、例えば、ノパリンシンターゼ遺伝子のような細菌起源のもの、又は欧州特許出願(欧州出願633317)にある*Arabidopsis thaliana*ヒストンH4A748遺伝子のような植物起源のものであってもよい。

本発明によるキメラ遺伝子は、上記必須部分に加えて、少なくとも一つの非翻訳中間(リンカー)領域を含み、上記異なる転写領域の間に配置される。この中間領域は何らかの起源、例えば、細菌、ウイルス、又は植物起源である。

トウモロコシE P S P SをコードするcDNAの単離：

以下に、二つの変異の導入のための基質としてのトウモロコシE P S P S cDNAの取得の、異なる段階を述べる。下記の操作全ては実施例の方法で与えられ、同じ結果に到達するために利用可能な異なる方法の中から行われる選択に対応する。この選択は結果の質に影響がなく、従って、いずれの適当な方法も同じ結果に到達するために当業者によって使用される。DNAフラグメントの操作の方法の大部分は、Green Publishing Associates及びWiley-Interscienceにより出版された、Ausubel F.M. et al., 「Current Protocols in Molecular Biology」第1巻及び2巻(1989)に記載されている(以後、この研究で記述されたプロトコルへの参照は「参照CPMB」と示されるであろう)。この研究で記述されたプロトコルによって行われたDNAに関する操作は特に次の通りである：DNAフラグメントの連結、Klenow DNAポリメラーゼ及びT4 DNAポリメラーゼによる処理、少量調製又は大量調製のいずれかとしての、プラスミド及びバクテリオファージDNAの調製、及びそれぞれサザン法及びノーザン法によるDNA並びにRNA分析。この研究で記述された他の方法にも従い、これらのプロトコルへの重要な修正又は追加のみが以下に記述される。

#### 実施例 1

1. *Arabidopsis thaliana* E P S P Sフラグメントの取得

a) それぞれの配列の二種の20量体オリゴヌクレオチド：

10

20

30

40

50

5' - GCTCTGCTCATGTCTGCTCC - 3'

5' - GCCCGCCCTTGACAAAGAAA - 3'

が *Arabidopsis thaliana* EPSPS 遺伝子 (Klee H. J. et al. (1987) Mol. Gen. Genet., 210, 437-442) の配列から合成された。これら二種のオリゴヌクレオチドはそれぞれ公にされた配列の 1523 から 1543 まで及び 1737 から 1717 までの位置で、逆の配向である。

b) *Arabidopsis thaliana* (変種コロンビア) 全 DNA は Clontech (カタログ参照: 6970-1) から得られた。

c) 50 ナノグラム (ng) の DNA がオリゴヌクレオチドの各々の 300 ng と混合され、供給者により推奨されている増幅用の標準媒体の条件下にて、Perkin-Elmer 9600 装置にて 35 増幅周期に付される。生じた 204-bp フラグメントは *Arabidopsis thaliana* EPSPS フラグメントを構成している。

10

2. BMS トウモロコシ細胞系からの cDNA ライブラリーの構築

a) ろ過された細胞の 5 g が液体窒素中で磨砕され、全核酸が以下の修正を加えた Shure et al. により記述された方法によって抽出される:

- 溶解緩衝液の pH は pH 9.0 に調製され;

- イソプロパノールによる沈澱後、ペレットを水中に入れ、溶解後、2.5 M LiCl にされる。12 時間でインキュベーション後、4 で 30,000 g で 15 分間遠沈のペレットを再溶解する。ついで LiCl 沈澱段階を繰り返す。再溶解したペレットは全核酸の RNA 画分を構成している。

20

b) RNA 画分のポリ(A)<sup>+</sup> RNA 画分が「Current Protocol in Molecular Biology」に記載のようにオリゴ(dT)-セルロースカラム上のクロマトグラフィーにより得られる。

c) 合成 EcoRI 末端を有する二本鎖 cDNA の合成: これは、この合成に必要とされる異なる試薬のキットの形での供給者からのプロトコルにより行われる: In Vitro Gen 社からの「コピーキット」。

次のそれぞれの配列の、二つの一本鎖及び部分的に相補的なオリゴヌクレオチド:

5' - AATTC CCGGG - 3'

5' - CCCGGG - 3' (後者はリン酸化されている)

が平滑端二本鎖 cDNA と結合される。

30

このアダプターの連結は二本鎖 cDNA に付いた SmaI 部位及び二本鎖 cDNA の各末端の付着形の EcoRI 部位の生成をもたらす。

d) ライブラリーの創成:

末端に人工的な付着 EcoRI 部位を有する cDNA を、供給者 New England Biolabs のプロトコルにより EcoRI で切断し脱リン酸したバクテリオファージ gt10 cDNA と結合する。

連結反応の一部を、供給者の指示により、キャプシド封入抽出物、すなわち Gigapack Gold にてインビトロでキャプシド封入された。このライブラリーは細菌 *E. coli* C600 hfl を用いて力価測定された。それによって得られたライブラリーは増幅され、同じ供給者の指示によって貯蔵され、BMS トウモロコシ細胞けん濁液 cDNA ライブラリーを構成する。

40

3. *Arabidopsis thaliana* EPSP プローブを用いる BMS トウモロコシ細胞けん濁液 cDNA の選別

続くプロトコルは、Greene Publishing Association 及び Wiley-Interscience (1989) により公にされた Ausubel F. M. et al., 「Current Protocols in Molecular Biology」1 巻及び 2 巻 (CPMB) のものである。簡潔に言えば、約 10<sup>6</sup> 個の組換えファージが 100 ファージ/cm<sup>2</sup> の平均密度で LB 皿上に塗布される。溶菌斑は Amersham Hybond N 膜上で重複してレプリカされる。

DNA は 1600 kJ UV 処理 (Stratagene Stratalinker)

50

によりフィルタ上に固定された。フィルタは  $6 \times \text{SSC} / 0.1\% \text{SDS} / 0.25$  スキムミルク中で  $65^\circ\text{C}$  で2時間予備ハイブリダイズされた。 *Arabidopsis thaliana* EPSPSプローブは供給者の指示 (Pharmacia Ready to Goキット) によるランダムプライミングにより [ $^{32}\text{P}$ ] dCTPを用いて標識された。得られた比活性はフラグメント  $\mu\text{g}$  当たり  $10^8$  cpmである。 $100^\circ\text{C}$  で5分間の変性後、プローブは予備ハイブリダイゼーション媒体に加えられ、ハイブリダイゼーションを  $55^\circ\text{C}$  で14時間続けられる。フィルタはKodak XAR5フィルム及びAmersham HyperScreen RPN強化スクリーンで  $-80^\circ\text{C}$  48時間蛍光撮影される。陽性スポットが生じた皿とフィルタ上の陽性スポットを配列させると、 *Arabidopsis thaliana* EPSPSプローブと陽性ハイブリダイゼーション反応を示すファージに対応する区域を皿から拾うことを可能にする。この塗布し、移し、ハイブリダイズさせ及び回収するステップは、皿中のすべてのスポットが引き続き精製されたファージの100%がハイブリダイゼーションで陽性となるまで繰り返される。次いで個別のファージ溶菌斑は希釈剤 媒体 (Tris - Cl pH7.5; 10mM  $\text{MgSO}_4$ ; 0.1M NaCl; 0.1%ゼラチン) 中に取り出され; 溶液中のこれらのファージはBMSトウモロコシ細胞けん濁液のEPSP - 陽性クローンを構成する。

4. BNSトウモロコシ細胞けん濁液のEPSPクローンのDNAの調製及び分析  
約  $5 \times 10^8$  のファージが  $2 / \text{ml}$  の  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  値の C600 hfl 細菌の  $20 \text{ml}$  に加えられ、  $37^\circ\text{C}$  で15分間インキュベートされる。このけん濁液はついで  $1 - \text{l}$  Erlenmeyer 中の  $200 \text{ml}$  の細菌成長培地中に希釈され、  $250 \text{rpm}$  で回転攪拌機で攪拌される。培地が透明になると、濁った細菌の溶菌に対応する溶菌とし、これは約4時間の攪拌後に起こる。この上澄みはついで「Current Protocols in Molecular Biology」に記載のように処理される。得られたDNAはBMSトウモロコシ細胞けん濁液のEPSPクローンに対応する。

このDNAの1から  $2 \mu\text{g}$  がEcoRIで切断され、  $0.8\%$  LGTA/TBEアガロースゲル (CPMB参照) 上で分離される。最終的証明は、生成したDNAが *Arabidopsis thaliana* EPSPSプローブとハイブリダイゼーションシグナルを実際に示すことを調べることにある。電気泳動後、DNAフラグメントは「Current Protocol in Molecular Biology」に記載されたサザンのプロトコルにより Amersham Hybond N膜上に移される。フィルタは上記3節に記載された条件により *Arabidopsis thaliana* EPSPSプローブとハイブリダイズさせられる。 *Arabidopsis thaliana* EPSPSプローブとハイブリダイゼーションシグナルを示し、最長のEcoRIフラグメントを含むクローンは約  $1.7 \text{kbp}$  のゲル上で推定された寸法を有する。

5. クローンpRPA - ML - 711の取得

$1.7 - \text{kbp}$  挿入断片を含むファージクローンの  $10 \mu\text{g}$  がEcoRIで消化され、  $0.8\%$  LGTA/TBEアガロースゲル (CPMB参照) 上で分離される。  $1.7 - \text{kbp}$  挿入断片を含むゲルフラグメントは供給者、New England Biolabsのプロトコルにより -アガロースで処理される。  $1.7 - \text{kbp}$  フラグメントの精製DNAは、「Current Protoccol in Molecular Biology」に記載された連結反応プロトコルによりEcoRIで切断されたプラスミドpUC19 (New England Biolabs) のDNAと  $12^\circ\text{C}$  で14時間連結される。上記連結反応混合物の  $2 \mu\text{l}$  がエレクトロポレーションコンピートE. coli DH10Bの一部の形質転換のために使用され、形質転換は次の条件を用いるエレクトロポレーションで達成される: コンピート細菌の混合物及び連結反応媒体は、予め  $0^\circ\text{C}$  まで冷却された厚さ  $0.2 \text{cm}$  (Biorad) のエレクトロポレーションセルに導入される。Bioradで作られたエレクトロポレータを用いるエレクトロポレーションの物理的条件は  $2500 \text{V}$ 、  $25 \mu\text{F}$  及び  $200^\circ\text{C}$  である。これらの条件下で、コンデンサの平均放電時間は  $4.2$  ミリ秒のオーダーである。細菌はついでSOC培地 (CPMB参照) の  $1 \text{ml}$  中に採られ、  $15 - \text{ml}$  Corning 管中回転攪拌機上で  $200 \text{rpm}$  で1

10

20

30

40

50

時間攪拌される。100 µg/mlのカルベニシリンが補足されたLB/寒天培地上に塗布後、37℃一夜成長した細菌クローンの少量調製は、「Current Protocol in Molecular Biology」に記載されたプロトコルにより生成される。EcoRIによるDNAの消化及び0.8% LGTA/TBEアガロースゲル(CPMB参照)上の電気泳動での分離の後、1.7-kbp挿入断片を有するクローンが保持される。最終的証明は、精製DNAが実際にArabidopsis thaliana EPSPSプローブとのハイブリダイゼーションシグナルを示すことを調べることにより行う。電気泳動後、DNAフラグメントは「Current Protocol in Molecular Biology」に記載されたサザンのプロトコルによりAmersham Hybond N膜上に移される。フィルタは上記3節に記載された条件によりArabidopsis thaliana EPSPSプローブとハイブリダイズされる。1.7-kbp挿入断片を有し、Arabidopsis thaliana EPSPSプローブとハイブリダイズするプラスミドクローンは大規模に調製され、細菌の溶菌から生じるDNAは「Current Protocol in Molecular Biology」に記載されたようにCsCl勾配上で精製された。精製DNAは、供給者の指示によるPharmaciaキットを用いて、同じ供給者により指示されたM13直接及び逆共通プライマーをプライマーとして使用して、部分的に配列決定された。精製した部分配列は約0.5 kbpに及ぶ。成熟蛋白質(約50アミノ酸残基)の領域の誘導されたアミノ酸配列は、米国特許USP4,971,908に記載された成熟トウモロコシEPSPSの対応するアミノ酸配列と100%同一性を示す。BMSトウモロコシ細胞けん濁液のEPSPDNAの1.7-kbpEcoRIフラグメントに対応するこのクローンは、pRPA-ML-711と命名された。このクローンの完全な配列はPharmaciaキットのプロトコルを用い、相補的オリゴヌクレオチド及び反対配向のものを各250bp近似的に合成して両方のストランドについて決定された。この1713-bpクローンの得られた完全な配列は配列番号1に示される。

10

20

#### 6. クローンpRPA-ML-715の取得

クローンpRPA-ML-711の配列の分析、及び特に誘導されたアミノ酸配列とトウモロコシのそれとの比較は、トウモロコシEPSPSの成熟部分のNH<sub>2</sub>末端アラニンにコードするGCGコドンの92bp上流の配列延長を示す(米国特許第4,971,908号)。同様に、トウモロコシEPSPSの成熟部分のCOOH末端アスパラギンをコードするAATコドンの288bp下流の延長が観察される(米国特許第4,971,908号)。これら二つの部分は、NH<sub>2</sub>末端延長の場合には、プラスチド局在化に対するシグナルペプチドの配列の部分に、COOH末端延長の場合には、cDNAの非翻訳3'領域に対応するであろう。

30

米国特許第4,971,908号に記載されたように、トウモロコシEPSPScDNAの成熟部分をコードするcDNAを得るために、次の操作が行われた:

#### a) 非翻訳3'領域の除去: pRPA-ML-712の構築:

クローンpRPA-ML-711は制限酵素AseIで切断され、この開裂から生じる末端はCPMBに記載されたプロトコルによりDNAポリメラーゼIのKlenowフラグメントによる処理で平滑端とされた。制限酵素SacIIによる開裂がすでに行われた。これらの操作から生じるDNAは1% LGTA/TBEアガロースゲル(CPMB参照)上で電気泳動で分離された。

40

0.4-kbp「AseI-平滑末端/SacII挿入断片」を含むゲルフラグメントはゲルから切り取られ、上記5節に記載されたプロトコルにより精製された。クローンpRPA-ML-711のDNAはクローン化ベクターpUC19のポリリンカーに位置したHindIII部位で制限酵素HindIIIで切断され、この開裂から生じる末端はDNAポリメラーゼIのKlenowフラグメントによる処理で平滑端とされた。制限酵素SacIIによる開裂がすでに行われた。これらの操作から生じるDNAは0.7% LGTA/TBEアガロースゲル(CPMB参照)上で電気泳動で分離された。

約3.7-kbpHindIII平滑断端/SacII挿入断片を含むゲルフラグメント

50

はゲルから切り取られ、上記5節に記載されたプロトコルにより精製された。

二つの挿入断片は連結され、連結反応混合物の2  $\mu$  lが5節で記載のようにE. coli DH10Bを形質転換するために使用された。

異なるクローンのプラスミドDNAの内容はpRPA-ML-711について記載された方法により分析された。選ばれたプラスミドクローンの一つは約1.45-kbp EcoRI-HindIII挿入断片を含む。このクローンの末端の配列から、挿入断片の5'末端がpRPA-ML-711の対応する末端に正確に対応すること、及び3'末端が次の配列を有することが明らかになる：

「5' - . . . AAATTAAGCTCTAGAGTCTGACCTGCAGGCATGCAAGCTT - 3'」。

下線を付けた配列はCOOH末端アミノ酸アスパラギンのコドンに対応し、次のコドンは翻訳停止コドンに対応する。下流のヌクレオチドはpUC19ポリリンカーの配列要素に対応する。成熟トウモロコシEPSPSの翻訳末端部位までのpRPA-ML-711配列からなり、HindIII部位までのpUCポリリンカーの配列が続くこのクローンは、pRPA-ML-712と命名された。

b) pRPA-ML-712の5'末端の修飾：pRPA-ML-715の構築：

クローンpRPA-ML-712は制限酵素PstI及びHindIIIで切断された。これらの操作から生じるDNAは0.8% LGA/TBEアガロースゲル(CPMB参照)上で電気泳動により精製された。1.3-kbp PstI-EcoRI挿入断片を含むゲルフラグメントはゲルから切り取られ、上記5節に記載されたプロトコルにより精製された。この挿入断片は、次の配列の二つの部分的に相補的なオリゴヌクレオチドの各々の等分子量の存在で：

オリゴ1：5' - GAGCCGAGCTCCATGGCCGGCGCCGAGGAGATCGTGCTGCA - 3'

オリゴ2：5' - GCACGATCTCTCTCGGCGCCGGCCATGGAGCTCGGCTC - 3'

及び制限酵素BamHI並びにHindIIIで消化されたプラスミドpUC19の存在で、連結された。

2  $\mu$  lの連結反応混合物は5節で記載のようにE. coli DH10Bを変換するために使用された。5節の記載の方法により異なるクローンのプラスミドDNA内容の分析後、約1.3-kbp挿入断片を有するクローンの一つは引き続き分析のために保持された。選ばれたクローンの5'末端の配列は、この領域のDNA配列が次であることを明らかにする：EcoRIからBamHI部位までのpUC19ポリリンカーの配列、クローン化で使用されたオリゴヌクレオチドの配列が続く。このクローンはpRPA-ML-712に存在する配列の残りが続く。このクローンはpRPA-ML-713と命名された。このクローンは成熟EPSPシターゼのN末端アラニンコドンの上流のNcoI部位に含まれるメチオンATGコドンを有する。さらに、N末端のアラニン及びグリシンコドンは保存されたが、第三番目可変塩基において修飾された：最初のGCGGTは修飾されたGCCGCGCを与える。

クローンpRPA-ML-713は制限酵素HindIIIで切断され、この開裂の末端はDNAポリメラーゼIのKlenowフラグメントによる処理で平滑端とされた。制限酵素SacIによる開裂がついで行われた。この処理から生じるDNAは0.8% LGA/TBEアガロースゲル(CPMB参照)上で電気泳動で分離された。1.3-kbp「HindIII平滑端/SacI」挿入断片を含むゲルフラグメントはゲルから切り取られ、上記5節に記載されたプロトコルにより精製された。この挿入断片は制限酵素XbaIで消化されたプラスミドpUC19の存在下に連結され、この開裂の末端はDNAポリメラーゼIのKlenowフラグメントによる処理で平滑断端とされた。制限酵素SacIによる開裂がついで行われた。2  $\mu$  lの連結反応混合物が5節で記載のようにE. coli DH10Bを形質転換するために使用された。5節で記載の方法により異なるクローンのプラスミドDNA内容の分析後、約1.3-kbp挿入断片を有するクローンの一

10

20

30

40

50

つが引き続く分析のために保持された。選ばれたクローンの末端の配列はDNA配列が次であることを明らかにする：E c o R IからS a c I部位までのp U C 1 9ポリリンカーの配列、それから上記のオリゴヌクレオチド1の4 b p G A T C Cが削除されたクローニングに使用されたオリゴヌクレオチドの配列が続き、H i n d I I I部位までのp R P A - M L - 7 1 2に存在する配列の残り及びX b a IからH i n d I I Iまでのp U C 1 9ポリリンカーの配列が続く。このクローンはp R P A - M L - 7 1 5と命名された。

#### 7. 変異トウモロコシE P S P Sをコードするc D N Aの取得

全ての変異誘発段階は供給者の指示によるP h a r m a c i a U . S . E .変異誘発キットで行われた。この変異誘発システムの原理は次の通りである：プラスミドDNAは熱で変成され、一方で変異誘発オリゴヌクレオチド、他方で除去されるべきポリリンカーに存在する独特の制限酵素部位の存在を可能にするオリゴヌクレオチドの過剰モル量の存在で再連結される。再連結段階後、相補的ストランドの合成が、供給される適当な緩衝液中のT 4 D N Aリガーゼ及び遺伝子3 2蛋白質の存在下で、T 4 D N Aポリメラーゼの作用で行われる。合成生成物は、それに対する部位が変異誘発で消失したと推定される制限酵素の存在下にインキュベートされる。特にm u t S変異を有するE . c o l i株はこのDNAの形質転換のためのホストとして使用される。液体培地中にて増殖させた後、全プラスミドDNAは調製され、前に使用した制限酵素の存在下でインキュベートされる。これらの処理の後、E . c o l i株D H 1 0 Bは形質転換のためのホストとして使用される。単離されたクローンのプラスミドDNAは調製され、導入された変異の存在が配列決定により証明される。

A) - E P S Pシンターゼ活性の競合的阻害剤である産物に対してトウモロコシのE P S P S抵抗性に原則的に影響することのない部位又は配列の修飾：p R P A - M L - 7 1 5から内部N c o I部位の除去。

p R P A - M L - 7 1 5配列をN末端のアラニンコドンG C Cの最初の塩基を位置1と置くことにより任意に番号を付ける。この配列は位置1 2 1 7にN c o I部位を有する。部位修飾オリゴヌクレオチドは次の配列を有する：

5' - C C A C A G G A T G G C G A T G G C C T T C T C C - 3'。

上述の参考文献による配列決定すると、変異誘発後に読まれた配列は使用したオリゴヌクレオチドのものに対応している。N c o I部位は実際に除去され、この領域でアミノ酸への翻訳はp R P A - M L - 7 1 5に存在する最初の配列を保存している。

このクローンはp R P A - M L - 7 1 6と命名する。

このクローンの1 3 4 0 - b p配列は配列番号2及び配列番号3で示される。

B) - 増加すべきE P S Pシンターゼ活性の競合的阻害剤である産物に対するトウモロコシのE P S P S抵抗性を可能にする配列修飾。

次のオリゴヌクレオチドが使用された：

a) 変異T h r 1 0 2 I l e。

5' - G A A T G C T G G A A T C G C A A T G C G G C C A T T G A C A G C - 3'。

b) 変異P r o 1 0 6 S e r。

5' - G A A T G C T G G A A C T G C A A T G C G G T C C T T G A C A G C - 3'。

c) 変異G l y 1 0 1 A l a及びT h r 1 0 2 I l e。

5' - C T T G G G G A A T G C T G C C A T C G C A A T G C G G C C A T T G - 3'。

d) 変異T h r 1 0 2 I l e及びP r o 1 0 6 S e r。

5' - G G G G A A T G C T G G A A T C G C A A T G C G G T C C T T G A C A G C - 3'。

配列決定後、三個の変異したフラグメントにおける変異誘発後に読まれた配列は、使用した変異誘発オリゴヌクレオチドのものに対応する変異領域を除いて、親p R P A - M L - 7 1 6 - DNA配列に同じである。これらのクローンは次のように命名される：変異T h r 1 0 2 I l eについてp R P A - M L - 7 1 7、変異P r o 1 0 6 S e rについてp R P A - M L - 7 1 8、変異G l y 1 0 1 A l a及びT h r 1 0 2 I l eについてp R P A - M L - 7 1 9並びに変異T h r 1 0 2 I l e及びP r o 1 0 6 S e rにつ

10

20

30

40

50

いて pRPA - ML - 720。

pRPA - ML - 720 の 1340 - bp 配列は配列番号 4 及び配列番号 5 で示される。1395 - bp NcoI - HindIII 挿入断片は、EPSPS の競合的阻害剤である除草剤への抵抗性、特にグリホセート抵抗性の導入のために使用された全ての構築物の基礎である。この挿入断片は、明細書の残りでは「トウモロコシ EPSPS 二重変異株」と呼ばれるだろう。

#### 実施例 2 :

異なる変異株のグリホセートインビトロ耐性

2 . a : EPSP シンターゼの抽出

異なる EPSP シンターゼ遺伝子は NcoI - HindIII カセットの形で NcoI 及び HindIII で切断されたプラスミドベクター pTrc99a (Pharmacia、参照 : 27 - 5007 - 01) に導入される。異なる EPSP シンターゼを過剰発現する組換え E. coli DH10B 細菌はペレット化した細胞の 10g 当たり 40ml の緩衝液中で超音波処理され、この同じ緩衝液 (200mM Tris - HCl、pH 7.8、50mM メルカプトエタノール、5mM EDTA 及び 1mM PMSF) で洗浄され、それに 1g のポリビニルピロリドンが加えられる。けん濁液は 4 で 15 分間攪拌され、ついで 27,000g 及び 4 で 20 分間遠沈される。

硫酸アンモニウムが溶液を硫酸アンモニウムに関して 40% 飽和になるように上澄液に加えられる。混合物は 27,000g 及び 4 で 20 分間遠沈される。硫酸アンモニウムが溶液を硫酸アンモニウムに関して 70% 飽和になるように新しい上澄液に加えられる。混合物は 27,000g 及び 4 で 30 分間遠沈される。この蛋白質ペレットに存在する EPSP シンターゼは 1ml の緩衝液 (20mM Tris - HCl pH 7.8 及び 50mM メルカプトエタノール) 中に取り出される。この溶液は 4 でこの同じ緩衝液の 2リットルに対して一夜透析される。

2 . b : 酵素活性

各酵素の活性及びそのグリホセート抵抗性は次の反応混合物中 37 で 10 分にわたってインビトロで測定される : 100mM マレイン酸、pH 5.6、1mM ホスホエノールピルビン酸、3mM シキミ酸 3 - リン酸 (Knowel P. F. 及び Sprinson D. B. 1970、Methods in Enzymol 17A、351 - 352 により Aerobacter aerogenes ATCC 25597 株から調製された) 及び 10mM フッ化カリウム。酵素抽出物はグリホセートの添加後最後の瞬間に加えられ、その最終濃度は 0 から 20mM まで変化する。

活性は、Tausky H. A. 及び Shorr E. 1953、J. Biol. Chem. 202、675 - 685 の方法により遊離されたリン酸を分析することにより測定される。

これらの条件下で、野性型 (WT) 酵素は 0.12mM のグリホセート濃度ですでに 85% 阻害される。この濃度で、Ser106 として知られている変異酵素は 50% だけ阻害されるが、他の三種の変異体、Ile102、Ile102 / Ser106 及び Ala101 / Ile102 はほとんど又は全く阻害を示さなかった。

グリホセート濃度を、変異酵素 Ile102 の 50% 阻害を生じるために 10 倍、すなわち 1.2mM にせねばならず、変異 Ile102 / Ser106、Ala / Ile 及び Ala はまだ阻害されない。

変異 Ala / Ile 及び Ala の活性は 10mM のグリホセート濃度まで阻害されないこと、及び変異 Ile / Ser106 のそれはグリホセート濃度が 2 倍、すなわち 20mM でさえも、減少しないことは注目されるべきである。

#### 実施例 3

形質転換タバコ植物の抵抗性

1 - 1 - 形質転換

ベクター pRPA - RD - 173 が、コスミド pTVK291 (Komari et al., 1986) を運ぶ Agrobacterium tumefaciens 株 EHA

10

20

30

40

50

101 (Hood et al., 1987) に導入される。形質転換技術はHorsheit et al. (1985) の方法に基づく。

#### 1-2-再生

葉外植片からのPBD6タバコ(起源SEITAフランス)の再生は、30g/lの蔗糖及び200µg/mlのカナマイシンからなるMurashige及びSchoog(MS)基本培地で行われる。葉外植片は温室又はインビトロで栽培された植物から移され、三逐次段階により葉ディスク技術(Science, 1985, Vol. 227, pp. 1229-1231)により形質転換される: 第一は0.05mg/lのナフチル酢酸(NAA)及び2mg/lのベンジルアミノプリン(BAP)を含む30g/lの蔗糖を補足した培地上での芽の誘導からなる。この段階中に形成された芽はついで30g/lの蔗糖が補足されているが、いかなるホルモンも含まないMS培地での栽培により10日間発育させられる。発育した芽はついで塩類、ビタミン及び糖の含量の半分を有するがいかなるホルモンも含まない発根MS培地に移され、栽培される。約15日後、根が付いた芽は土壌に移される。

10

#### 1-3-グリホセート抵抗性

20本の形質転換植物が再生され、pRPA-RD-173の構築物について温室に移された。これらの植物は5葉段階においてヘクタール当たり0.8kgのグリホセート活性物質に対応する「ラウンドアップ」の水性けん濁液で処理された。

結果は、処理後3週間記録された植物毒性の観察に対応する。これらの条件下で、pRPA-RD-173構築物で形質転換された植物が非常に良い耐性を示すが、非形質転換対照植物は完全に破壊された。

20

これらの結果は、同じグリホセート耐性をコードする遺伝子について本発明によるキメラ遺伝子の使用でもたらされた改良を明白に示す。

#### 実施例 4

##### トウモロコシ細胞の形質転換及び選択

指数的成長段階のBMS(Black Mexican Sweet)トウモロコシ細胞に、Klein et al. 1987(Klein T.M., Wolf E.D., Wu R. 及びSandford J.C. (1987): High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells, NATURE Vol. 327 pp. 70-73)により記載された原理及びプロトコルによって構築物pRPA-RD-130により衝撃(bombard)を与えられる。

30

衝撃後二日、2mM N-(ホスホノメチル)グリシンを含む同じ培地に移される。

この培地で選別の8週間後、発育したカルスが選ばれ、ついで増幅され、PCRで分析され、キメラOTP-EPSPS遺伝子の存在を明らかにされる。

衝撃が与えられず2mM N-(ホスホノメチル)グリシンを含む同じ培地で育てられた細胞は除草剤で阻止され、発育しない。

本発明による形質転換植物は、導入されたキメラ遺伝子の発現に対応する表現型性格を有する系統及び雑種を得るための親として使用されるだろう。

##### プラスミド構築の説明

40

pRPA-RD-124: pRPA-ML-720への「nos」ポリアデニル化シグナルの付加による、トウモロコシ二重変異EPSPS遺伝子(Thr 102 Ile及びPro 106 Ser)を含むクローニングカセットの形成。pRPA-ML-720をHindIIIで切断し、E.coli DNAポリメラーゼIのクレノウフラグメントで処理して平滑末端を得る。NcoIで2回目の切断を行い、EPSPSフラグメントを精製する。次いで、EPSPS遺伝子を、精製したpRPA-RD-12(ノパリンシスターゼのポリアデニル化シグナルを含むクローニングカセット)と連結して、pRPA-RD-124を得る。有用な精製ベクターpRPA-RD-12を得るためには、該ベクターを前もってSalIで切断し、クレノウDNAポリメラーゼで処理し、次いでNcoIで2回目の切断を行う必要があった。

50

p R P A - R D - 1 2 5 : p R P A - R D - 1 2 4 への最適化トランジットペプチド ( O T P ) の付加による、プラスミドを標的とする E P S P S 遺伝子を含むクローニングカセットの形成。p R P A - R D - 7 ( ヨーロッパ特許出願 E P 6 5 2 2 8 6 号 ) を S p h I で切断、T 4 DNAポリメラーゼで処理し、次いで S p e I で切断し、O T P フラグメントを精製する。この O T P フラグメントを、前もって N c o I で切断しておいた p R P A - R D - 1 2 4 中にクローン化し、クレノウ DNA フラグメントで処理して突出する 3 部分を除去し、次いで、S p e I で切断する。次いで、このクローンの配列を決定して、O T P と E P S P S 遺伝子との正しい翻訳融合を確実にすることにより、p R P A - R D - 1 2 5 を得る。

p R P A - R D - 1 3 0 : p R P A - R D - 1 2 5 への H 3 C 4 トウモロコシヒストンプロモーター及び p R P A - R D - 1 2 3 ( ヨーロッパ特許出願 E P 5 0 7 6 9 8 号 ) の a d h 1 イントロン 1 配列の付加による、モノコチレドンの組織中で二重突然変異 E P S P S 遺伝子を発現させるために植物中で発現させるカセットの形成。p R P A - R D - 1 2 3 ( a d h 1 イントロン 1 と融合した H 3 C 4 トウモロコシヒストンプロモーターを含むカセット ) を N c o I 及び S a c I で切断する。次いで、p R P A - R D - 1 2 3 由来のプロモーターを含む DNA フラグメントを精製し、前もって N c o I 及び S a c I で切断しておいた p R P A - R D - 1 2 5 と連結する。

p R P A - R D - 1 5 9 : p R P A - R D - 1 2 5 への H 4 A 7 4 8 A r a b i d o p s i s ヒストン二プロモーター ( ヨーロッパ特許出願 E P 5 0 7 6 9 8 号 ) の付加による、双子葉植物の組織中で「O T P - 二重変異 E P S P S 遺伝子」を発現させるために植物中で発現させるカセットの形成。p R P A - R D - 1 3 2 [ H 4 A 7 4 8 二プロモーター ( ヨーロッパ特許出願 E P 5 0 7 6 9 8 ) を含むカセット ] を N c o I 及び S a c I で切断する。次いで、精製したプロモーターフラグメントを、前もって E c o I 及び S a c I で切断しておいた p R P A - R D - 1 2 5 中にクローン化する。

p R P A - R D - 1 7 3 : プラスミド p R P A - B L - 1 5 0 A ( ヨーロッパ特許出願第 5 0 8 9 0 9 号 ) への p R P A - R - D - 1 5 9 の「H 4 A 7 4 8 プロモーター - O T P - 二重変異 E P S P S 遺伝子」遺伝子の付加による、A g r o b a c t e r i u m t u m e f a c i e n s 形質転換ベクターの形成。p R P A - R D - 1 5 9 を N o t I で切断し、クレノウポリメラーゼで処理する。次いで、このフラグメントを S m a I を含む p R P A - B L - 1 5 0 A 中にクローン化する。

#### 配列表

配列番号 : 1

配列の長さ : 1 7 1 3

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : c D N A

起源

生物名 : Z e a m a y s

株名 : B l a c k M e x i c a n S w e e t

組織の種類 : カルス

直接の起源

ライブラリー名 : g t 1 0

クローン名 : p R P A - M L - 7 1 1

配列

10

20

30

40

AATCAATTC ACACAGGAAA CAGCTATGAC CATGATTACG AATTGGGGCC CGGGGGGGTG	60	
ATCCGGGGGC GGCAGGGGCG GCGCGGGTGC AGGGGGGTGC CGAGGAGATC GTGCTGCAGC	120	
CCATCAAGGA GATCTCGGGC ACGGTCAAGC TCGCGGGGTC CAAGTGGCTT TCCACCGGA	180	
TCTCCCTACT GCGCGGCGTG TCGAGGGGA CACACTGGT TGAZAACTG CTGACAGTG	240	
AGGATGTCCA CTACATGCTC GGGGCGTTGA GGACTCTTGG TCTCTCTGTC GAAGGGGACA	300	
AAGCTGCCA AAGAGCTGTA GTTGTGGCT GTGGTGGAAA GTTCCAGTT GAGGATGCTA	360	
AAGAGGAAT GCAGCTCTC TTGGGGAAG CTGGAAGTGC AATGGGCCA TTGACAGCAG	420	
CTGTACTGTC TGCTGGTGA AATGCACTT ACGTCTTGA TGGAGTACCA AGAATGAGG	480	
AGAAACCCAT TGGGACTTG GTTGTGGAT TGAATCAACT TGGTACAGAT GTTGATTGTT	540	10
TCTTTGAC TGACTGGCA CTTTGTGTC TCAATGGAT CGGAGTCTA CTTGCTGCA	600	
AATTCAGAT GTCTGTGTC ATCACTGTC ATTACTTGAG TGCTTCTGTC ATGGCTGCTC	660	
CTTGGCTCT TGGGATGTC GAGATTGAAA TCATTGATAA ATTAATCTCC ATTCCGTACG	720	
TGAAATGAC ATTGAGATG ATGGAGCTT TTGGTGTGAA AGCAGAGCAT TCTGATAGCT	780	
GGACAGATT CTACATTAAG GGAGTCAAA AATACAAGTC CCTAAAAAT GCTTATGTTG	840	
AAGGTGATGC CTCAGGCCA AGCTATTCT TGCTGGTGC TGCAATTACT GGAGGGACTG	900	
TGACTGTGGA AGTGTGTGC ACCACAGTT TCGAGGGTGA TGTGAAGTTT GCTGAGGTAC	960	
TGGAGATGAT GGGAGCGAAG GTTACATGGA CCGAGACTAG CGTAACTGTT ACTGGGCCAC	1020	
CGCGGGAGCC ATTGGGAGG AAACAOTCA AGGCGATTGA TGTCACATG AACAGATGC	1080	20
CTGATGTGCG CATGACTCTT GCTGTGGTTC CCTCTTTGC CGATGGGCGG ACAGCCATCA	1140	
GAGAGTGGC TTCTTGAGA GTAAGGAGA CCGAGAGGAT GGTTCGGATC CGGACGGAGC	1200	
TAAACAAGCT GGGAGCTCT GTTGGAGAG GCGGGACTA CTGCATCATC ACCCGCGGG	1260	
AGAAGCTGAA CGTGACGGCG ATGCAAGGT AGACGACCA CAGGATGGCC ATGGCTTCT	1320	
CCTTGGGCG CTGTGCGAG GTCCCGTCA CCTCCGGGA CCTGGGTC ACCCGGAGA	1380	
CCTTCCCGA CTACTTGGAT GTGCTGAGCA CTTTGGTCAA GAATTAZAA AGGTGGGAT	1440	
ACTACCAGCC AGCTTGATG AAGTGAZAG CTTGTGCTGA GGAATACAT TCTTTTGT	1500	
CTGTTTTCT CTTTACGGG ATTAAGTTT GATCTGTA CTTTATTTT TTGZAGCAAG	1560	
TTTCTATTTC GGATCTTAAG TTTGTCACT GTAAGCCAA TTTCATTCA AGAGTGGTTC	1620	30
GTGGAAATA TAAGATAAT AATTAGCTT TCAZGAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA	1680	
AAAAAAAAA AAAAAAAAAA AACCGGGA TTC	1713	

配列番号：2

配列の長さ：1340

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

起源

生物名：Zea mays

株名：Black Mexican Sweet

直接の起源

クローン名：pRPA-ML-716

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：6...1337

配列

40

CCATG GCC GGC GGC GAG GAG ATC GTG CTG CAG CCC ATC AAG GAG ATC	47
Ala Gly Ala Glu Glu Ile Val Leu Gln Pro Ile Lys Glu Ile	
1 5 10	
TCC GGC ACC GTC AAG CTG CCG GGG TCC AAG TCG CTT TCC AAC CCG ATC	95
Ser Gly Thr Val Lys Leu Pro Gly Ser Lys Ser Leu Ser Asn Arg Ile	
15 20 25 30	
CTC CTA CTC GCC GCC CTG TCC GAG GGG ACA ACA GTG GTT GAT AAC CTG	143
Leu Leu Leu Ala Ala Leu Ser Glu Gly Thr Thr Val Val Asp Asn Leu	
35 40 45	
CTG AAC AGT GAG GAT GTC CAC TAC ATG CTC GGG GGC TTG AGG ACT CTT	191
Leu Asn Ser Glu Asp Val His Tyr Met Leu Gly Ala Leu Arg Thr Leu	

	50		55		60		
GTT CTC TCT	ATC GAA GCG GAC	AAA GCT GCC	AAA AGA GCT	GTA GTT GTT	238		
Gly Leu Ser	Val Glu Ala Asp	Lys Ala Ala	Lys Arg Ala	Val Val Val			
	55	70	75				
CTC TCT GGT	GGA AAG TTC	CCA GTT GAG	GAT GCT	AAA GAG GAA	GTG CAG	239	
Gly Cys Gly	Gly Lys Phe	Pro Val Glu	Asp Ala	Lys Glu Glu	Val Val Gln		
	80	95	90				
CTC TTC TTG	GGG AAT GCT	GGA ACT GCA	ATG CCG	CCA TTG	ACA GCA GCT	335	
Leu Phe Leu	Gly Asn Ala	Gly Thr Ala	Met Arg	Pro Leu Thr	Ala Ala Ala		
	95	100	105		110		
GTT ACT GCT	GCT GGT GGA	AAT GCA ACT	TAC GTG	CTT GAT	GGA GTA CCA	383	
Val Thr Ala	Ala Gly Gly	Asn Ala Thr	Tyr Val	Leu Asp Gly	Val Val Pro		
	115	120	125				
AGA ATG AGG	GAG AGA CCC	ATT GGC GAC	TTG GTT	GTC GGA	TTG AAG CAG	431	
Arg Met Arg	Glu Arg Pro	Ile Gly Asp	Leu Val	Val Val Gly	Leu Lys Gln		
	130	135	140				
CTT GGT GCA	GAT GTT GAT	TGT TTC	CTT GGC	ACT GAC	TCC CCA CCT	479	
Leu Gly Ala	Asp Val Asp	Cys Phe	Leu Gly Thr	Asp Cys	Pro Pro Val		
	145	150	155				
GGT GTC AAT	GGA ATC GGA	GGG CTA	CCT GGT	GGC AAG	GTC AAG CTG	527	
Arg Val Asn	Gly Ile Gly	Leu Pro	Gly Gly Lys	Val Val Lys	Leu Ser		
	160	165	170				
GGC TCC ATC	AGC AGT CAG	TAC TTG	AGT GCC	TTG CTG	ATG GCT GCT	575	
Gly Ser Ile	Ser Ser Gln	Tyr Leu	Ser Ala	Leu Leu	Met Ala Ala	Pro	
	175	180	185		190		
TTG GCT CTT	GGG GAT GTG	GAG AIT	GAA ATC	ATT GAT	AAA TTA ATC	623	
Leu Ala Leu	Gly Asp Val	Glu Ile	Glu Ile	Ile Asp	Lys Leu Ile	Ser	
	195	200	205				
ATT CCG TAC	GTC GAA ATG	ACA TTG	AGA TTG	ATG GAG	CGT TTT GGT	671	
Ile Pro Tyr	Val Glu Met	Thr Leu	Arg Leu	Met Glu	Arg Phe Gly	Val	
	210	215	220				
AAA GCA GAG	CAT TCT GAT	AGC TGG	GAC AGA	TTC TAC	ATT AAG GGA	719	
Lys Ala Glu	His Ser Asp	Ser Trp	Asp Arg	Phe Tyr	Ile Lys Gly	Gly	
	225	230	235				
CAA AAA TAC	AAG TCC CCT	AAA AAT	GCC TAT	GTT GAA	GGT GAT GCC	767	
Gln Lys Tyr	Lys Ser Pro	Lys Asn	Ala Tyr	Val Glu	Gly Asp Ala	Ser	
	240	245	250				
AGC GCA AGC	TAT TTC TTG	GCT GGT	GCT GCA	ATT ACT	GGA GGG ACT	815	
Ser Ala Ser	Tyr Phe Leu	Ala Ala Gly	Ala Ala	Ile Thr	Gly Gly Thr	Val	
	255	260	265		270		
ACT GTG GAA	GGT TGT GGC	ACC ACC	AGT TTG	CAG GGT	GAT GTG AAG	863	
Thr Val Glu	Gly Cys Gly	Thr Thr Ser	Leu Gln	Gly Asp	Val Val Phe		
	275	280	285				
GCT GAG GTA	CTG GAG ATG	ATG GGA	GCG AAG	GTT ACA	TGG ACC GAG	911	
Ala Glu Val	Leu Glu Met	Met Gly	Ala Lys	Val Thr	Trp Thr Glu	Thr	
	290	295	300				
AGC GTA ACT	GTT ACT GGC	CCA CCG	CGG GAG	CCA TTT	GGG AGG AAA	959	
Ser Val Thr	Val Thr Gly	Pro Pro	Arg Glu	Pro Phe	Gly Arg Lys	His	
	305	310	315				
CTC AAG GCG	ATT GAT GTC	AAC ATG	AAC AAG	ATG CCT	GAT GTC GCC	1007	
Leu Lys Ala	Ile Asp Val	Asn Met	Asn Lys	Met Pro	Asp Val Ala	Met	
	320	325	330				
ACT CTT GCT	GTG GTT GCC	CTC TTT	GCC GAT	GGC CCG	ACA GCC ATC	1055	
Thr Leu Ala	Val Val Ala	Leu Phe	Ala Asp	Gly Pro	Thr Ala Ile	Arg	
	335	340	345		350		
GAC GTG GCT	TCC TGG AGA	GTA AAG	GAG ACC	GAG AGG	ATG GTT GCG	1103	
Asp Val Ala	Ser Trp Arg	Val Val Lys	Glu Thr	Glu Arg	Met Val Ala	Ile	
	355	360	365				
CGG ACC GAG	CTA ACC AAG	CTG GGA	GCA TCT	GTT GAG	GAA GGG CCG	1151	
Arg Thr Glu	Leu Thr Lys	Leu Glu	Ala Ser	Val Glu	Glu Gly Pro	Asp	

370

375

380

10

20

30

40



Arg Glu Arg Pro Ile Gly Asp Leu Val Val Gly Leu Lys Gln Leu Gly  
 130 135 140  
 Ala Asp Val Asp Cys Phe Leu Gly Thr Asp Cys Pro Pro Val Arg Val  
 145 150 155 160  
 Asn Gly Ile Gly Gly Leu Pro Gly Gly Lys Val Lys Leu Ser Gly Ser  
 165 170 175  
 Ile Ser Ser Gln Tyr Leu Ser Ala Leu Leu Met Ala Ala Pro Leu Ala  
 180 185 190  
 Leu Gly Asp Val Glu Ile Glu Ile Ile Asp Lys Leu Ile Ser Ile Pro  
 195 200 205  
 Tyr Val Glu Met Thr Leu Arg Leu Met Glu Arg Phe Gly Val Lys Ala  
 210 215 220  
 Glu His Ser Asp Ser Trp Asp Arg Phe Tyr Ile Lys Gly Gly Gln Lys  
 225 230 235 240  
 Tyr Lys Ser Pro Lys Asn Ala Tyr Val Glu Gly Asp Ala Ser Ser Ala  
 245 250 255  
 Ser Tyr Phe Leu Ala Gly Ala Ala Ile Thr Gly Gly Thr Val Thr Val  
 260 265 270  
 Glu Gly Cys Gly Thr Thr Ser Leu Gln Gly Asp Val Lys Phe Ala Glu  
 275 280 285  
 Val Leu Glu Met Met Gly Ala Lys Val Thr Trp Thr Glu Thr Ser Val  
 290 295 300  
 Thr Val Thr Gly Pro Pro Arg Glu Pro Phe Gly Arg Lys His Leu Lys  
 305 310 315 320  
 Ala Ile Asp Val Asn Met Asn Lys Met Pro Asp Val Ala Met Thr Leu  
 325 330 335  
 Ala Val Val Ala Leu Phe Ala Asp Gly Pro Thr Ala Ile Arg Asp Val  
 340 345 350  
 Ala Ser Trp Arg Val Lys Glu Thr Glu Arg Met Val Ala Ile Arg Thr  
 355 360 365  
 Glu Leu Thr Lys Leu Gly Ala Ser Val Glu Glu Gly Pro Asp Tyr Cys  
 370 375 380  
 Ile Ile Thr Pro Pro Glu Lys Leu Asn Val Thr Ala Ile Asp Thr Tyr  
 385 390 395 400  
 Asp Asp His Arg Met Ala Met Ala Phe Ser Leu Ala Ala Cys Ala Glu  
 405 410 415  
 Val Pro Val Thr Ile Arg Asp Pro Gly Cys Thr Arg Lys Thr Phe Pro  
 420 425 430  
 Asp Tyr Phe Asp Val Leu Ser Thr Phe Val Lys Asn  
 435 440

10

20

30

40

配列番号 : 4

配列の長さ : 1 3 4 0

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA

起源

生物名 : Zea mays

株名 : Black Mexican Sweet

直接の起源

クローン名 : pRPA-ML-720

配列の特徴

特徴を表す記号 : CDS

存在位置 : 6 . . 1 3 3 7

配列

CCATG GGC GGC GGC GAG GAG ATC GTG CTG CAG CCC ATC AAG GAG ATC 47  
 Ala Gly Ala Glu Glu Ile Val Leu Gln Pro Ile Lys Glu Ile  
 1 5 10

TCC GGC ACC GTC AAG CTG CCG GGG TCC AAG TCG CTT TCC AAC CCG ATC 95  
 Ser Gly Thr Val Lys Leu Pro Gly Ser Lys Ser Leu Ser Asn Arg Ile  
 15 20 25 30

CTC CTA CTC GGC GGC CTG TCC GAG GGG ACA ACA GTG GTT GAT AAC CTG 143  
 Leu Leu Leu Ala Ala Leu Ser Glu Gly Thr Thr Val Val Asp Asn Leu  
 35 40 45

CTG AAC AGT GAG GAT GTC CAC TAC ATG CTC GGG GCC TTG AGG ACT CTT 191  
 Leu Asn Ser Glu Asp Val His Tyr Met Leu Gly Ala Leu Arg Thr Leu  
 50 55 60

GGT CTC TCT GTC GAA GCG GAC AAA GCT GGC AAA AGA GCT GTA GTT GTT 239  
 Gly Leu Ser Val Glu Ala Asp Lys Ala Ala Lys Arg Ala Val Val Val  
 65 70 75

CTC Gly	CTT Cys	GCT Gly	GGA Gly	AAG Lys	TTC Phe	CCA Pro	GTT Val	GAG Glu	GAT Asp	GCT Ala	AAA Lys	GAG Glu	GAA Glu	GTG Val	CAG Gln	287
CTC Gly	CTT Phe	CTC Leu	GGA Gly	AAG Lys	TTC Phe	CCA Pro	GTT Val	GAG Glu	GAT Asp	GCT Ala	AAA Lys	GAG Glu	GAA Glu	GTG Val	CAG Gln	315
GTT Val	ACT Thr	GCT Ala	GCT Ala	GCT Gly	GGA Gly	AAT Asn	GCA Ala	ACT Thr	TAC Tyr	GTG Val	CTT Leu	GAT Asp	GGA Gly	GTA Val	CCA Pro	383
AGA Arg	ATG Met	AGG Arg	GAG Glu	AGA Arg	CCC Pro	ATT Ile	GCC Gly	GAC Asp	TTG Leu	GTT Val	GTC Val	GGA Gly	TTG Leu	AAG Lys	CAG Gln	431
CTT Leu	GGT Gly	GCA Ala	GAT Asp	GTT Val	GAT Asp	TGT Cys	TTC Phe	CTT Leu	GGC Gly	ACT Thr	GAC Asp	TGC Cys	CCA Pro	CCT Pro	GTT Val	479
GCT Arg	GTC Val	AAT Asn	GGA Gly	ATC Ile	GGA Gly	GGG Gly	CTA Leu	CCT Pro	GGT Gly	GGC Gly	AAG Lys	GTC Val	AAG Lys	CTG Leu	TCT Ser	527
GGC Gly	TCC Ser	ATC Ile	AGC Ser	AGT Ser	CAG Gln	TAC Tyr	TTG Leu	AGT Ser	GCC Ala	TTG Leu	CTG Leu	ATG Met	GCT Ala	GCT Ala	CCT Pro	575
TTG Leu	GCT Ala	CTT Leu	GGG Gly	GAT Asp	GTG Val	GAG Glu	ATT Ile	GAA Glu	ATC Ile	ATT Ile	GAT Asp	AAA Lys	TTA Leu	ATC Ile	TCC Ser	623
ATT Ile	CCG Pro	TAC Tyr	GTC Val	GAA Glu	ATG Met	ACA Thr	TTG Leu	AGA Arg	TTG Leu	ATG Met	GAG Glu	CGT Arg	TTT Phe	GGT Gly	GTG Val	671
AAA Lys	GCA Ala	GAG Glu	CAT His	TCT Ser	GAT Asp	AGC Ser	TGG Trp	GAC Asp	AGA Arg	TTC Phe	TAC Tyr	ATT Ile	AAG Lys	GGA Gly	GGT Gly	719
CAA Gln	AAA Lys	TAC Tyr	AAG Lys	TCC Ser	CCT Pro	AAA Lys	AAT Asn	GCC Ala	TAT Tyr	GTT Val	GAA Glu	GGT Gly	GAT Asp	GCC Ala	TCA Ser	767
AGC Ser	GCA Ala	AGC Ser	TAT Tyr	TTC Phe	TTG Leu	GCT Ala	GGT Gly	GCT Ala	GCA Ala	ATT Ile	ACT Thr	GGA Gly	GGG Gly	ACT Thr	GTG Val	815
ACT Thr	GTG Val	GAA Glu	GGT Gly	TGT Cys	GGC Gly	ACC Thr	ACC Thr	AGT Ser	TTG Leu	CAG Gln	GGT Gly	GAT Asp	GTG Val	AAG Lys	TTT Phe	863
GCT Ala	GAG Glu	GTA Val	CTG Leu	GAG Glu	ATG Met	ATG Met	GGA Gly	GCG Ala	AAG Lys	GTT Val	ACA Thr	TGG Trp	ACC Thr	GAG Glu	ACT Thr	911
AGC Ser	GTA Val	ACT Thr	GTT Val	ACT Thr	GGC Gly	CCA Pro	CCG Pro	CGG Arg	GAG Glu	CCA Pro	TTT Phe	GGG Gly	AGG Arg	AAA Lys	CAC His	959
CTC Leu	AAG Lys	GGG Ala	ATT Ile	GAT Asp	GTC Val	AAC Asn	ATG Met	AAC Asn	AAG Lys	ATG Met	CCT Pro	GAT Asp	GTG Val	GCC Ala	ATG Met	1007
ACT Thr	CTT Leu	GCT Ala	GTG Val	GTT Val	GCC Ala	CTC Leu	TTT Phe	GCC Ala	GAT Asp	GGC Gly	CCG Pro	ACA Thr	GCC Ala	ATC Ile	AGA Arg	1055
GAC Asp	GTG Val	GCT Ala	TCC Ser	TGG Trp	AGA Arg	GTA Val	AAG Lys	GAG Glu	ACC Thr	GAG Glu	AGG Arg	ATG Met	GTT Val	GCG Ala	ATC Ile	1103
CGG Arg	ACG Thr	GAG Glu	CTA Leu	ACC Thr	AAG Lys	CTG Leu	GGA Gly	GCA Ala	TCT Ser	GTT Val	GAG Glu	GAA Glu	GGG Gly	CCG Pro	GAC Asp	1151
TAC Tyr	TGC Cys	ATC Ile	ATC Ile	ACG Thr	CCG Pro	CCG Pro	GAG Glu	AAG Lys	CTG Leu	AAC Asn	GTG Val	ACG Thr	GCG Ala	ATC Ile	GAC Asp	1199

10

20

30

40

ACT TAC GAC CAC CAC AGG ATG GGT ATG GCC TTC TCC CTT GCC GCC TGT 1247  
 Thr Tyr Asp Asp His Arg Met Ala Met Ala Phe Ser Leu Ala Ala Cys  
 100 405 410

GCC CAG GTC CCC CTC ACC ATC CCG GAC CCT GAG TGC ACC CCG AAG ACC 1285  
 Ala Glu Val Pro Val Thr Ile Arg Asp Pro Gly Cys Thr Arg Lys Thr  
 415 420 425 430

TTC CCC GAC TAC TTC GAT GTG CTG AGC ACT TTC GTC AAG AAT 1337  
 Phe Pro Asp Tyr Phe Asp Val Leu Ser Thr Phe Val Lys Asn  
 435 440

TAA 1340

配列番号 : 5

配列の長さ : 4 4 4

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

配列

Ala Gly Ala Glu Glu Ile Val Leu Gln Pro Ile Lys Glu Ile Ser Gly  
 1 5 10 15  
 Thr Val Lys Leu Pro Gly Ser Lys Ser Leu Ser Asn Arg Ile Leu Leu  
 20 25 30  
 Leu Ala Ala Leu Ser Glu Gly Thr Thr Val Val Asp Asn Leu Leu Asn  
 35 40 45  
 Ser Glu Asp Val His Tyr Met Leu Gly Ala Leu Arg Thr Leu Gly Leu  
 50 55 60  
 Ser Val Glu Ala Asp Lys Ala Ala Lys Arg Ala Val Val Val Gly Cys  
 65 70 75 80  
 Gly Gly Lys Phe Pro Val Glu Asp Ala Lys Glu Glu Val Gln Leu Phe  
 85 90 95  
 Leu Gly Asn Ala Gly Ile Ala Met Arg Ser Leu Thr Ala Ala Val Thr  
 100 105 110

10

20

Ala Ala Gly Gly Asn Ala Thr Tyr Val Leu Asp Gly Val Pro Arg Met  
 115 120 125

Arg Glu Arg Pro Ile Gly Asp Leu Val Val Gly Leu Lys Gln Leu Gly  
 130 135 140

Ala Asp Val Asp Cys Phe Leu Gly Thr Asp Cys Pro Pro Val Arg Val  
 145 150 155 160

Asn Gly Ile Gly Gly Leu Pro Gly Gly Lys Val Lys Leu Ser Gly Ser  
 165 170 175

Ile Ser Ser Gln Tyr Leu Ser Ala Leu Leu Met Ala Ala Pro Leu Ala  
 180 185 190

Leu Gly Asp Val Glu Ile Glu Ile Ile Asp Lys Leu Ile Ser Ile Pro  
 195 200 205

Tyr Val Glu Met Thr Leu Arg Leu Met Glu Arg Phe Gly Val Lys Ala  
 210 215 220

Glu His Ser Asp Ser Trp Asp Arg Phe Tyr Ile Lys Gly Gly Gln Lys  
 225 230 235 240

Tyr Lys Ser Pro Lys Asn Ala Tyr Val Glu Gly Asp Ala Ser Ser Ala  
 245 250 255

Ser Tyr Phe Leu Ala Gly Ala Ala Ile Thr Gly Gly Thr Val Thr Val  
 260 265 270

Glu Gly Cys Gly Thr Thr Ser Leu Gln Gly Asp Val Lys Phe Ala Glu  
 275 280 285

Val Leu Glu Met Met Gly Ala Lys Val Thr Trp Thr Glu Thr Ser Val  
 290 295 300

Thr Val Thr Gly Pro Pro Arg Glu Pro Phe Gly Arg Lys His Leu Lys  
 305 310 315 320

Ala Ile Asp Val Asn Met Asn Lys Met Pro Asp Val Ala Met Thr Leu  
 325 330 335

Ala Val Val Ala Leu Phe Ala Asp Gly Pro Thr Ala Ile Arg Asp Val  
 340 345 350

Ala Ser Trp Arg Val Lys Glu Thr Glu Arg Met Val Ala Ile Arg Thr  
 355 360 365

Glu Leu Thr Lys Leu Gly Ala Ser Val Glu Glu Gly Pro Asp Tyr Cys  
 370 375 380

Ile Ile Thr Pro Pro Glu Lys Leu Asn Val Thr Ala Ile Asp Thr Tyr  
 385 390 395 400

Asp Asp His Arg Met Ala Met Ala Phe Ser Leu Ala Ala Cys Ala Glu  
 405 410 415

Val Pro Val Thr Ile Arg Asp Pro Gly Cys Thr Arg Lys Thr Phe Pro  
 420 425 430

Asp Tyr Phe Asp Val Leu Ser Thr Phe Val Lys Asn  
 435 440

10

20

30

---

フロントページの続き

- (72)発明者 フレシネ, ジョルジュ  
フランス国、エフ - 6 9 4 5 0 ・サン - シール - オ - モン - ドール、リュ・ド・ネルビユー、2 1
- (72)発明者 デグリース, エリック  
フランス国、エフ - 6 7 1 0 0 ・ストラスブール、リュ・デ・ザリシエ・4

合議体

審判長 鈴木 恵理子

審判官 加々美 一恵

審判官 鶴飼 健

- (56)参考文献 特開昭64 - 39984 (JP, A)  
国際公開第95 / 6128 (WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N15/00-90

BIOSIS

MEDLINE

WPIDS

CA

JSTPLUS