

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-530497

(P2005-530497A)

(43) 公表日 平成17年10月13日(2005.10.13)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	4 B O 5 0
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 9/10	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 20 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2004-503640 (P2004-503640)	(71) 出願人	504415968 北京大学 中華人民共和国 北京市海淀区頤和元路5号
(86) (22) 出願日	平成14年8月5日 (2002.8.5)	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(85) 翻訳文提出日	平成16年12月24日 (2004.12.24)	(74) 代理人	100108774 弁理士 橋本 一憲
(86) 国際出願番号	PCT/CN2002/000539	(74) 代理人	100128048 弁理士 新見 浩一
(87) 国際公開番号	W02003/095649	(72) 発明者	サン イェチエン 中華人民共和国 ペキン ハイディアン ディストリクト イェユアン ロード ナンバー 5
(87) 国際公開日	平成15年11月20日 (2003.11.20)		
(31) 優先権主張番号	02117647.7		
(32) 優先日	平成14年5月10日 (2002.5.10)		
(33) 優先権主張国	中国 (CN)		
(31) 優先権主張番号	02117991.3		
(32) 優先日	平成14年5月28日 (2002.5.28)		
(33) 優先権主張国	中国 (CN)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 グリフォセート耐性5-エノールピルビルシキメート-3-ホスフェートシンターゼおよびそれらをコードする遺伝子

(57) 【要約】

本発明は、新規グリフォセート耐性5-エノールピルビルシキメート-3-ホスフェートシンターゼ(5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: EPSPS)に関する。これは、基質ホスホエノールピルビン酸(PEP)の競合阻害剤であるグリフォセートに対して高度に耐性である。本発明はまた、このシンターゼをコードする遺伝子、前述の遺伝子を含む構築物およびベクター、ならびに前述の構築物またはベクターで形質転換された宿主細胞に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

(i) 配列番号:3に示すアミノ酸配列を含む、または
(ii) (i)のアミノ酸配列の1つもしくは複数のアミノ酸の置換、欠失、および/または付加によって改変されたグリフォセート耐性5-エノールピルビルシキメート-3-ホスフェートシンターゼ(EPSPS)であることを特徴とする、
グリフォセート耐性5-エノールピルビルシキメート-3-ホスフェートシンターゼ(EPSPS)をコードする単離された核酸配列。

【請求項2】

(i) 配列番号:2に示すヌクレオチド配列を含み、好ましくは配列番号:2のヌクレオチド574~1803に示す配列を含む、または
(ii) (i)のヌクレオチド配列の1つもしくは複数のヌクレオチドの置換、または3つもしくは3の倍数のヌクレオチドの欠失および/または付加により改変されたヌクレオチド配列を含み、該ヌクレオチド配列によってコードされるタンパク質がグリフォセート耐性5-エノールピルビルシキメート-3-ホスフェートシンターゼ(EPSPS)の活性およびグリフォセート耐性を含むことを特徴とする、
請求項1記載の単離された核酸配列。

【請求項3】

グリフォセート耐性5-エノールピルビルシキメート-3-ホスフェートシンターゼ(EPSPS)の活性およびグリフォセート耐性を有する、請求項1または2記載の単離された核酸配列によってコードされるタンパク質。

【請求項4】

請求項1または2記載の単離された核酸配列を含む核酸構築物。

【請求項5】

請求項1または2記載の単離された核酸配列を有する、または請求項4記載の核酸構築物を有するベクター。

【請求項6】

請求項4記載の核酸構築物または請求項5記載のベクターにより形質転換された宿主細胞。

【請求項7】

請求項1または2記載の単離された核酸配列、請求項4記載の核酸構築物、または請求項5記載のベクターを含む、請求項6記載の宿主細胞またはその子孫細胞。

【請求項8】

グリフォセート耐性を有する、請求項6または7記載の宿主細胞。

【請求項9】

請求項1または2記載の核酸を適切な調節配列と機能的に連結する段階、これを適切なベクターに導入する段階、該ベクターを選択した宿主細胞に導入する段階、および請求項1または2記載の核酸配列によって活性のあるグリフォセート耐性5-エノールピルビルシキメート-3-ホスフェートシンターゼ(EPSPS)を発現させる段階を含む、請求項8記載の宿主細胞を調製する方法。

【請求項10】

(i) 配列番号:3に示すアミノ酸配列、または
(ii) (i)のアミノ酸配列の1つもしくは複数のアミノ酸の置換、欠失、および/または付加によって改変されたアミノ酸配列を含む、グリフォセート耐性5-エノールピルビルシキメート-3-ホスフェートシンターゼ(EPSPS)。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

技術分野

10

20

30

40

50

本発明は、新規グリフォセート耐性5-エノールピルビルシキメート-3-ホスフェートシンターゼ(5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: EPSPS)、シンターゼをコードする単離された核酸配列、前述の配列またはコード領域を含む核酸構築物、前述の配列もしくはコード領域または前述の核酸構築物を含むベクター、および前述の構築物またはベクターで形質転換された宿主細胞に関する。

【背景技術】

【0002】

背景

5-エノールピルビルシキメート-3-ホスフェートシンターゼ(EPSPS)は、植物および細菌の芳香族アミノ酸合成系路に關与する重要な酵素である。グリフォセートはN-ホスフィルメチル(N-phosphylmethyl)グリシンとも称されるが、広域性の高効率出芽後除草剤である。グリフォセートは、EPSPSの基質の1つであるホスホエノールピルビン酸(PEP)の競合阻害剤である。グリフォセートはEPSPSによって触媒されるPEPおよび3-ホスフェート-シキメートから5-エノールピルル3-ホスフェート-シキメートへの変換を遮断し、これにより芳香族アミノ酸の合成の前駆体であるシキミ酸の合成系路が遮断され、植物および細菌が死滅する。

【0003】

植物のグリフォセート耐性は、グリフォセート耐性EPSPSをコードする遺伝子を植物ゲノムに安定に導入することによって達成され得る。既知グリフォセート耐性EPSPS遺伝子には主に2つのクラスが存在する：クラスI(例えば、米国特許第4,971,908号；第5,310,667号；第5,866,775号を参照のこと)およびクラスII(例えば、米国特許第5,627,061号；第5,633,435号を参照のこと)。これらの遺伝子の植物ゲノムへの導入は成功しており、グリフォセート耐性植物細胞および植物が得られている。

【0004】

本発明は、グリフォセートに耐性である天然配列の新規EPSPSを見出すことを目的とする。

【発明の開示】

【0005】

概要

本発明の目的は、グリフォセート耐性EPSPSタンパク質をコードする新たに単離された核酸配列を提供することにある。

【0006】

本発明のさらなる目的は、新規グリフォセート耐性EPSPSタンパク質を提供することにある。

【0007】

本発明のさらなる目的は、前述の核酸配列を、選択した宿主細胞において前述の核酸配列を発現させるために必須である調節配列に機能的に連結することによって形成した核酸構築物を提供することにある。具体的には、調節配列には、状況に応じてプロモーター、エンハンサー、リーダー配列、ポリアデニル化シグナル、ならびに転写および翻訳のための開始および終結配列が含まれる。

【0008】

本発明のさらなる目的は、前述の核酸配列または核酸構築物を含むベクターを提供することにある。

【0009】

本発明のさらなる目的は、前述の構築物またはベクターで形質転換された宿主細胞を提供することにある。宿主細胞は適切な条件下で前述の核酸配列によってコードされるタンパク質を発現することができ、タンパク質が酵素的EPSPS活性およびグリフォセート耐性を示すことを可能にし、それによって宿主細胞がグリフォセート耐性を獲得する。

【0010】

本発明のさらなる目的は、前述の宿主細胞およびその子孫細胞を提供することにある。

10

20

30

40

50

この細胞は前記の核酸配列もしくはコード領域、または核酸構築物もしくはベクターを含み、グリフォセート耐性である。

【0011】

本発明の他の目的を、以下の説明および実施例において説明する。

【0012】

発明の説明

本発明は、天然配列を有する新規グリフォセート耐性5-エノールピルビルシキメート-3-ホスフェートシターゼ(EPSPS)を提供する。「天然配列」という用語は、突然変異誘発によって、または遺伝子操作等の生物学的もしくは化学的修飾によって改変されていない配列を表す。本発明は、上記EPSPSの単離されたアミノ酸配列(配列番号:3)を提供する。配列番号:3の1つもしくは複数のアミノ酸残基の欠失、付加、および/または置換により改変された任意のアミノ酸配列も、改変された配列がEPSPS活性およびグリフォセート耐性のタンパク質をコードするという条件で、本発明の範囲に含まれる。

10

【0013】

本発明はさらに、上記EPSPSをコードする単離された核酸配列(配列番号:2、特にコード領域)を提供する。配列番号:2の1つもしくは複数のヌクレオチドの欠失、付加、および/または置換により改変された任意の核酸配列も、改変された配列がEPSPS活性およびグリフォセート耐性のタンパク質をコードするという条件で、本発明の範囲に含まれる。

【0014】

本発明の核酸構築物は、本発明のEPSPSコード核酸配列を他の同種または異種の配列に機能的に連結することにより構築される。

20

【0015】

本発明の方法により、本発明の核酸構築物または単離された核酸配列をベクターに組み入れ、選択した宿主細胞をこのベクターで形質転換する。本発明のEPSPS酵素が発現される。このようにして、組換え宿主細胞にグリフォセート耐性が付与される。または、ベクターで形質転換する代わりに、本発明の単離された核酸配列または核酸構築物を、エレクトロポレーション法等の従来法により宿主細胞内に直接導入する。本発明のEPSPS酵素が発現され、宿主細胞にグリフォセート耐性が付与される。このようにして得られたベクターおよび組換え宿主細胞、ならびに細胞を得るための方法も、本発明の範囲内に含まれる。

30

【0016】

定義

本明細書で用いる「パーセント(%)配列相同性」という用語は、配列を整列させ必要であればギャップを導入して最大パーセント配列相同性を達成した後の、標的配列におけるアミノ酸残基と同一である候補配列におけるアミノ酸残基の割合を指し、保存的置換を配列相同性の一部と見なさない。本明細書での配列には、アミノ酸配列およびヌクレオチド配列が含まれる。パーセント(%)配列相同性の決定は、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2、またはMegalign(DNASTAR)等の公的に利用可能なコンピューターソフトウェアを用いて、当技術分野の技術の範囲内にある様々な方法で達成することができる。当業者は、比較する配列の全長にわたって最大アライメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含めて、アライメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。

40

【0017】

本明細書で用いる「核酸構築物」という用語は、天然遺伝子から単離された、または核酸断片を天然に存在しない形で結合して改変した、一本鎖または二本鎖の核酸分子を指す。核酸構築物が本発明のEPSPSの発現に必要な調節配列を全て含む場合、「核酸構築物」という用語は「発現カセット」という用語と同義である。

【0018】

本明細書で用いる「調節配列」という用語には、本発明のポリペプチドの発現に必要なまたは有利な成分がすべて含まれる。調節配列はそれぞれ、ポリペプチドをコードする核

50

酸配列に対して固有であってもまたは外来性であってもよい。そのような調節配列には、リーダー配列、ポリアデニル化配列、プロベプチド配列、プロモーター、および転写ターミネーターが含まれるが、これらに限定されない。調節配列には、少なくともプロモーターならびに転写および翻訳の終結シグナルが含まれる。調節配列と、異種性ポリペプチドをコードする核酸配列のコード領域との連結を容易にする特定の制限酵素部位を導入するために、調節配列がリンカーと共に提供される場合もある。

【0019】

「機能的に連結する」という用語は、本発明の単離された核酸配列の、その配列と同種または異種の任意の他の配列への、それらが総合して産物をコードできるような連結を表す。必要に応じて、制限酵素切断等の方法によりそのような配列を分離することができる。本明細書に開示する同種または異種性配列は、選択した宿主において本発明の単離された核酸配列の発現を指示する任意の調節配列、または本発明の単離された核酸配列と共に融合タンパク質をコードする配列等の任意の配列であってよい。

10

【0020】

本明細書で用いる「宿主細胞」という用語は、本発明の単離された核酸配列を受け取り、またはそのような配列を含む構築物もしくはベクターを受け取り、細胞内にそれらを安定に保持し得る任意の細胞を指す。宿主細胞は、本発明の単離された核酸配列を含む場合、この配列によって決まる特性を獲得すると考えられる。

【0021】

詳細な説明

本発明者は、驚くべきことに新規グリフォセート耐性EPSPSコード遺伝子を発見し単離する。上記遺伝子のコード配列（配列番号:2）およびコード領域（CDS、ヌクレオチド574～1803）を本明細書に開示する。上記CDSによってコードされるアミノ酸配列（配列番号:3）もまた、本明細書に開示する。DNAMANバージョン4.0をCLUSTAL型式と併用し、配列番号:3に示すアミノ酸をEPSPSクラスIおよびIIの既知配列と整列させる。本発明の配列が先行特許によって請求される配列を少しも含まないことが認められる（図2を参照のこと）。GenBankタンパク質配列バンクのBLAST検索から、本発明の配列番号:3は、クロストリジウム・アセトブチリカム（*Clostridium acetobutylicum*）由来のEPSPSアミノ酸配列と37%相同であり、大腸菌由来のEPSPSアミノ酸配列と20%相同であることが示される（図2を参照のこと）。NCBI-BLAST検索により、配列番号:2のヌクレオチド574～1803に示す配列が

20

30

【0022】

したがって本発明の1つの局面は、配列番号:2に示す核酸配列を含みかつグリフォセート耐性EPSPSをコードする、単離された核酸配列に関する。

【0023】

本発明はまた、グリフォセート耐性EPSPSをコードする、配列番号:2のヌクレオチド574～1803に示す単離された核酸配列に関する。

【0024】

本発明はまた、配列番号:2または配列番号:2のヌクレオチド574～1803の配列において1つもしくは複数のヌクレオチドを変更することにより、または3つもしくは3の倍数のヌクレオチドを欠失および/または付加することにより得られ、5-エノールピルピルシキメート-3-ホスフェートシンターゼ(EPSPS)の活性およびグリフォセート耐性を有するタンパク質をコードし得る核酸配列に関する。ヌクレオチドの変更、欠失、および付加は、当技術分野の技術の範囲内であって従来通りである。

40

【0025】

本発明はまた、配列番号:2または配列番号:2のヌクレオチド574～1803によって規定される配列と、少なくとも約65%、好ましくは少なくとも約66%、好ましくは少なくとも約67%、好ましくは少なくとも約68%、好ましくは少なくとも約69%、好ましくは少なくとも約70%、好ましくは少なくとも約71%、好ましくは少なくとも約72%、好ましくは少なくとも約

50

73%、好ましくは少なくとも約74%、好ましくは少なくとも約75%、好ましくは少なくとも約76%、好ましくは少なくとも約77%、好ましくは少なくとも約78%、好ましくは少なくとも約79%、より好ましくは少なくとも約80%、より好ましくは少なくとも約81%、より好ましくは少なくとも約82%、より好ましくは少なくとも約83%、より好ましくは少なくとも約84%、より好ましくは少なくとも約85%、より好ましくは少なくとも約86%、より好ましくは少なくとも約87%、より好ましくは少なくとも約88%、より好ましくは少なくとも約89%、より好ましくは少なくとも約90%、より好ましくは少なくとも約91%、より好ましくは少なくとも約92%、より好ましくは少なくとも約93%、より好ましくは少なくとも約94%、より好ましくは少なくとも約95%、より好ましくは少なくとも約96%、より好ましくは少なくとも約97%、より好ましくは少なくとも約98%、最も好ましくは少なくとも約99%相同であるような、相同的な核酸配列に関する。そのような配列は、それがグリフォセート耐性EPSPS活性を有するタンパク質をコードするという条件で、本発明の範囲内である。

10

【0026】

本発明の単離された核酸配列を、本発明の実施例に記載する方法により天然からクローニングすることができる。クローニング法は、関心対照のタンパク質をコードする核酸配列を含む核酸断片を単離して制限酵素で切断する段階、その断片をベクターに導入する段階、およびベクターを宿主細胞内に取り込む段階を含んでもよく、それによって核酸配列のコピーまたはクローンが宿主細胞内で複製される。しかし、本発明に開示するヌクレオチド配列に従って自動化ヌクレオチド合成機（Applied BiosystemsのABI394 DNA合成機等）を用いて配列を合成する、または2000年10月4日に開示された中国特許出願第99103472.4号の方法を用いて、核酸配列の断片を別々に合成し、従来のリガーゼおよびベクターを使用し断片を連結して全長配列にする方が、より容易であるかもしれない。

20

【0027】

本発明の核酸配列は、ゲノム、cDNA、RNA、半合成、完全合成配列、またはそれらの任意の混合物であってよい。

【0028】

本発明の別の局面は、配列番号:3に示すアミノ酸配列を含む、EPSPS活性およびグリフォセート耐性を有するタンパク質をコードする単離された核酸配列に関する。

【0029】

本発明はさらに、タンパク質のアミノ酸配列が配列番号:3のアミノ酸配列において1つもしくは複数のアミノ酸残基の置換、欠失、および/または付加を含むが、EPSPS活性およびグリフォセート耐性は残存する、EPSPS活性およびグリフォセート耐性を有するタンパク質をコードする単離された核酸配列に関する。上記の、1つもしくは複数のアミノ酸残基の置換、欠失、および/または付加は、当技術分野の従来技法の範囲内である。そのようなアミノ酸の変化は、タンパク質の折りたたみおよび/または活性に顕著な影響のない保存的アミノ酸置換である、特徴の軽微な変化であることが好ましい；一般に約1~30アミノ酸の軽微な欠失；アミノ末端におけるメチオニン残基1個の伸長等の、アミノ末端またはカルボキシル末端における軽微な伸長；例えば約20~25残基長の軽微なリンカーペプチド。

30

【0030】

保存的置換の例は、以下のアミノ酸群内に起こる置換である：塩基性アミノ酸（例えば、Arg、Lys、およびHis）、酸性アミノ酸（例えば、GluおよびAsp）、極性アミノ酸（例えば、GlnおよびAsn）、疎水性アミノ酸（例えば、Leu、Ile、およびVal）、芳香族アミノ酸（例えば、Phe、Try、およびTyr）、および小分子アミノ酸（例えば、Gly、Ala、Ser、Thr、およびMet）。通常特定の活性を変更しないアミノ酸の置換は当技術分野で周知であり、1979年にNew York Academic Pressより出版されたN. NeurathおよびR.L. Hill、Proteinによって記載されている。最も一般的な置換は、Ala/Ser、Val/Ile、Asp/Glu、Thr/Ser、Ala/Gly、Ala/Thr、Ser/Asn、Ala/Val、Ser/Gly、Tyr/Phe、Ala/Pro、Lys/Arg、Asp/Asn、Leu/Ile、Leu/Val、Ala/Glu、およびAsp/Gly、ならびにこれらの逆の置換である。

40

【0031】

50

当業者にとって、そのような置換は機能に重要な領域以外の領域で起こり、活性のあるポリペプチドが生じ得ることは明白である。本発明の単離された核酸によってコードされるポリペプチドに対して、機能にとって重要でありしたがって置換しないように選択されるアミノ酸残基は、例えば部位特異的突然変異誘発またはアラニンスキャン突然変異誘発法等の当技術分野で周知の方法によって同定され得る（例えば、CunninghamおよびWells、1989、*Science* 244: 1081-1085を参照のこと）。後者の技法は、分子内の正に荷電した残基それぞれに変異を導入する段階、および変異した分子のグリフォセート耐性EPSPS活性を測定し、それによって活性に重要なアミノ酸残基を決定する段階を含む。基質-酵素が相互作用する部位は3D構造の解析によっても決定することができ、3D構造は、核磁気共鳴、結晶学、または光親和標識等の技法により決定することが可能である（例えば、de Vosら、1992、*Science* 255: 306-312；Smithら、1992、*J. Mol. Biol.* 224: 899-904；Wlodaverら、1992、*FEBS Letters* 309: 59-64を参照のこと）

10

20

30

40

50

【0032】

本発明はまた、配列番号:3に示すアミノ酸配列と、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、好ましくは少なくとも約66%、好ましくは少なくとも約67%、好ましくは少なくとも約68%、好ましくは少なくとも約69%、好ましくは少なくとも約70%、好ましくは少なくとも約71%、好ましくは少なくとも約72%、好ましくは少なくとも約73%、好ましくは少なくとも約74%、好ましくは少なくとも約75%、好ましくは少なくとも約76%、好ましくは少なくとも約77%、好ましくは少なくとも約78%、好ましくは少なくとも約79%、より好ましくは少なくとも約80%、より好ましくは少なくとも約81%、より好ましくは少なくとも約82%、より好ましくは少なくとも約83%、より好ましくは少なくとも約84%、より好ましくは少なくとも約85%、より好ましくは少なくとも約86%、より好ましくは少なくとも約87%、より好ましくは少なくとも約88%、より好ましくは少なくとも約89%、より好ましくは少なくとも約90%、より好ましくは少なくとも約91%、より好ましくは少なくとも約92%、より好ましくは少なくとも約93%、より好ましくは少なくとも約94%、より好ましくは少なくとも約95%、より好ましくは少なくとも約96%、より好ましくは少なくとも約97%、より好ましくは少なくとも約98%、最も好ましくは少なくとも約99%相同であるような、相同的なアミノ酸配列に関する。そのような配列は、この相同的配列を含むタンパク質がグリフォセート耐性EPSPS活性を有するという条件で、本発明の範囲内である。

【0033】

本発明の単離された核酸配列によってコードされるタンパク質は、配列番号:3に示すアミノ酸配列のEPSPS活性の少なくとも20%、好ましくは少なくとも40%、より好ましくは少なくとも60%、さらにより好ましくは少なくとも80%、さらにより好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも100%を有する。

【0034】

本発明はまた、前述の核酸配列またはそのコード配列（例えば、配列番号:2のヌクレオチド574~1803）を含む核酸構築物に関する。

【0035】

本発明の核酸構築物は、選択した宿主細胞における上記配列の発現に必須の調節配列をさらに含む。核酸構築物において、調節配列は上記の単離された核酸配列に機能的に連結してある。

【0036】

調節配列はプロモーターであってよく、これにはポリペプチドの発現を指示する転写調節配列が含まれる。プロモーターは、変異プロモーター、切断型プロモーター、または異種接合性プロモーター等の、選択した細胞において転写活性を有する任意の核酸配列であってよい。そのようなプロモーターは、細胞外または細胞内ペプチドをコードする遺伝子から得ることができる。そのようなポリペプチドは、細胞にとって同種であってもなくてもよい。原核細胞において使用される様々なプロモーターが当技術分野において周知である。

【0037】

調節配列はまた、転写を終結するために選択した宿主細胞によって認識される適切な転写ターミネーター配列であってもよい。ターミネーター配列は、ポリペプチドをコードする核酸配列の3'末端に機能的に連結する。選択した宿主細胞において機能的である任意のターミネーターを、本発明に用いることができる。

【0038】

調節配列はまた、細胞での翻訳に重要なmRNAの非翻訳領域である適切なリーダー配列であってもよい。リーダー配列は、ポリペプチドをコードする核酸配列の5'末端に機能的に連結する。選択した宿主細胞において機能的である任意のリーダー配列を、本発明に用いることができる。

【0039】

調節配列はまた、ポリアデニル化配列であってもよい。この配列を核酸配列の3'末端に機能的に連結すると、転写の際に、この配列が転写されたmRNAにポリアデノシン残基を付加するシグナルとして細胞によって認識される。選択した宿主細胞において機能的である任意のポリアデニル化配列を、本発明に用いることができる。

【0040】

核酸構築物は、転写活性化因子(例えば、トランス作用性因子)、パートナータンパク質、およびプロセシングタンパク質等の、外来ポリペプチドの発現を指示するのに有用な1つまたは複数の因子をコードする1つまたは複数の核酸配列をさらに含んでもよい。宿主細胞、特に細菌細胞および植物細胞において効果的な任意の因子を本発明に用いることができる。1つまたは複数のそのような因子をコードする核酸は、必ずしも外来ポリペプチドをコードする核酸と直列に連結するとは限らない。

【0041】

当業者に周知の方法を用いて、プラスミドまたはウイルス等の従来のベクターにおいて上記の核酸および調節配列を結合し、本発明の「組換え発現ベクター」を作製することができる(J. Sambrook, E.F. Fritsch, およびT. Maniatus, 1989, Molecular Cloning, laboratory manual, 第2版, Cold Spring, NYを参照のこと)。ベクターは、1つまたは複数の都合のよい制限酵素部位を含んでよい。ベクターの選択は一般に、用いるベクターと宿主細胞の適合性に依存する。ベクターは線状または閉環状であってよく、例えばプラスミド(染色体外成分)、ミニ染色体、または人工染色体等のように、染色体外物質として染色体の複製から独立して自立的に複製可能であってよい。ベクターは、自己複製を確実にする任意の手段を含み得る。または、ベクターはゲノム内に組み込まれ、細胞内に導入された後には染色体と共に複製する。ベクター系は単一のベクターもしくはプラスミドであっても、または2つもしくはそれ以上のベクターもしくはプラスミド(全体で関心対象の核酸配列を含む)であっても、またはトランスポゾンであってもよい。

【0042】

宿主細胞のゲノムに組み込むには、ベクターは相同的組換えによるベクターのゲノム内への組み込みを指示するさらなる核酸配列を含み得る。さらなる核酸配列により、ベクターのゲノムへの正確な位置での組み込みが可能になる。正確な位置への組み込みの可能性を増すため、組み込みエレメントは好ましくは、相同的組み込みの可能性を増すために相当する標的配列に極めて相同的な十分なヌクレオチド数、例えば100~1500塩基対、好ましくは400~1500塩基対、最も好ましくは800~1500塩基対を含むべきである。組み込みエレメントは、細胞のゲノム内の標的配列に相同的な任意の配列であってよい。さらに、組み込みエレメントは非コード核酸配列であってもコード核酸配列であってもよい。または、ベクターは非相同的組み込みにより細胞のゲノム内に導入されてもよい。

【0043】

自律的複製をする状況では、ベクターはさらに、細菌細胞および植物細胞においてベクターの自律的な複製を可能にする複製開始点を含み得る。

【0044】

本発明はまた、本発明の核酸配列を含む組換え「宿主細胞」に関する。本発明の核酸配列を含む核酸構築物またはベクターを宿主細胞内に導入することが可能であり、その結果

10

20

30

40

50

本発明の核酸配列が染色体に組み込まれるかまたはベクターが自律的に複製し、それにより本発明の核酸配列が宿主細胞によって安定に発現されて、宿主細胞がグリフォセート耐性になる。

【0045】

宿主細胞は細菌細胞等の原核細胞であってよいが、より好ましくは植物細胞等の真核細胞であってよい。

【0046】

一般的な細菌細胞には、バシラス属等のグラム陽性菌、またはエシェリキア族もしくはシュードモナス属等のグラム陰性細菌が含まれる。好ましい態様において、細菌宿主細胞は大腸菌の細胞である。

10

【0047】

細菌宿主細胞への発現ベクターの導入は、プロトプラスト形質転換法 (ChangおよびCohen, 1979, General Molecular Genetics 168: 111-115を参照のこと)、コンピテント細胞の使用 (YoungおよびSpizizin, 1961, J Bacteriol. 81 : 823-829、またはDubnauおよびDavidoff-Abelson, 1971, J. Mol. Biol. 56 : 209-221を参照のこと)、エレクトロポレーション法 (ShigekawaおよびDower, 1988, Biotech. 6 : 742-751を参照のこと)、または接合 (KoehlerおよびThorne, 1987, J. Bacteriol. 169 : 5771-5278を参照のこと)によって達成することができる。

【0048】

実施例

20

実施例1 グリフォセート耐性株の単離

中国、河北省のグリフォセート生産工場の近隣から試料を採取し、希釈してグリフォセートを含む培地に塗布した。グリフォセートに対する高い耐性およびグリフォセート分解能を有する全部で48株を単離する。そのうちの1株、4G-1は400 mMグリフォセートを含む培地上で増殖可能であり、100 mg/Lアンピシリンに耐性である。さらなる研究のためにこの菌株を選択する。

【0049】

実施例2 グリフォセート耐性株の同定

a) 菌株4G-1の全DNAの少量調製

菌株4G-1を100 mg/Lアンピシリンを含むLB液体培地3 mlに播種し、振盪しながら28 で一晩培養する。培養物を12000 rpmで遠心分離し、ペレットを0.5 mlの溶液I (10 mM NaCl、20 mM Tris-HCl pH 8.0、1 mM EDTA) に再懸濁する。プロテアーゼK (Merck、ドイツ) およびSDSを、それぞれ最終濃度10 µg/mlおよび0.5%になるように添加する。次に、慎重に反転させながら懸濁液を混合し、6時間を超える期間50 に置く。等量のフェノールを添加する。混合液を慎重に反転し、室温に10分間置く。混合物を、室温にて12000 rpmで5分間遠心分離する。チップ (AxyGen、米国) を用いて上清の水層を回収し、等量のフェノール/クロロホルムでペレットを再抽出する。沈殿させるため、上清に10% 3M NaACおよび2.3倍量のエタノールを添加する。混合物を、12000 rpmで-10 で25分間遠心分離する。上清を除去した後、70%エタノール500 µlで沈殿を洗浄し、12000 rpmで1分間遠心分離する。上清を完全に除去した後、沈殿をサーバント (Savant) 内で20分間、または37 のインキュベーター内で1時間乾燥させる。溶解させるため、沈殿に100 µlのTE溶液 (10 mM Tris-Cl、1 mM EDTA、pH 8.0) を添加し、さらなる研究のために-20 で凍結する。

30

40

【0050】

b) 菌株4G-1の16S rRNAのクローニング

16S rRNAの一对のユニバーサルプライマー (プライマー1: 5' AGA GTT TGA TCA TGG CT C AG 3'、およびプライマー2: 5' TAC GGT TAC CTT GTT ACG ACT T 3') を合成する。このプライマーを用いて、ロボサイクラー (Robocycler) 40 (Stratagene) でPCR増幅を行う。反応系は、鋳型としての菌株4G-1の全DNA 1 µl、緩衝液5 µl、10 µmol dNTP 4 µl、20 pmol/µlプライマー1 1 µl、20 pmol/µlプライマー2 1 µl、および脱イオン水37 µlである。反応条件は以下の通りである: 5U Pyrobest Taq DNAポリメラーゼ1 µlを添加して9

50

4 で10分間、次に94 で1分間、50 で1分間、72 で2分間の30サイクル、および72 でさらに10分間最終的に伸長させる。約1.5 kbの断片が得られる。PCR産物精製キットの製造業者、Boehringerの提供する方法に従って、PCR産物を精製する。

【0051】

精製したPCR産物をポリA(デオキシアデノシン)反応に供する。反応系は以下の通りである：精製PCR産物20 μ l(2 μ g)、緩衝液5 μ l、Taq DNAポリメラーゼ(DinGuo Ltd、北京)1 μ l(5U)、5 μ mol dATP 4 μ l、および脱イオン水20 μ l。

【0052】

得られた産物をPCR産物の精製法により精製し、製造業者Takaraの説明に従ってTベクター(Takara、大連)に連結し、プラスミドpKU2000を得る。配列決定の結果を配列番号：1に示す。米国国立バイオテクノロジー情報センター(NCBI)の配列アラインメント用BLASTソフトウェアおよびBLASTP 2.2.2[2001年12月14日]データベースを用いて、上記の配列がシュードモナス・プチダ(*Pseudomonas putida*)の16S rRNAのヌクレオチド配列と99%相同であることが見出される。したがって、菌株4G-1はP. プチダであると考えられ、P. プチダ4G-1(P. P4G-1と略す)と命名する。上記の株は、2002年4月30日に中国普通微生物保存管理中心(Chinese General Microbiological Culture Centre: CGMCC)(中国、北京、中関村)にアクセッション番号CGMCC 0739として寄託した。

【0053】

実施例3 菌株4G-1のゲノムライブラリーの作製

a) 菌株4G-1の全DNAの大量調製

菌株P.P4G-1を250 mlフラスコ中のLB培地100 ml(100 mg/Lアンピシリンを添加)に播種し、200 rpmで振盪しながら28 で一晩培養する。培養物を8000 rpmで5分間遠心分離した後、ペレットを溶液I 14 mlに再懸濁する。プロテアーゼK(Merck、ドイツ)およびSDSを、それぞれ最終濃度10 μ g/mlおよび0.5%になるように添加する。慎重に反転させて懸濁液を混合し、6時間を超える期間50 に置く。等量のフェノールを添加する。混合液を慎重に反転して混合し、室温に10分間置く。混合液を、室温で4000 rpmにて20分間遠心分離する。末端の幅が広いチップを用いて上清の水層を回収し、等量のフェノール/クロロホルムで再抽出する。沈殿させるため、上清に10% 3M NaAC(pH 5.5)および2.3倍量のエタノールを添加する。ガラス棒を用いてDNAを慎重に抽出し、70%エタノールで洗浄する。エタノールを除去した後、DNAを乾燥させる。溶解させるために4 のTE溶液(pH 8.0) 2 mlを添加して24時間置き、約1 mgの全DNAが得られる。0.3%アガロースゲル電気泳動により、DNA断片は80 Kbを超えることが同定される。

【0054】

b) 全DNAの切断産物の回収

全DNA200 μ l(100 μ g)を、5Uの制限エンドヌクレアーゼSau3AIを用いて室温でそれぞれ20分間、30分間、および45分間切断する。産物を混同し、最終濃度0.25 mMになるようにEDTAを添加し、等量のフェノール/クロロホルムで抽出する。沈殿させるため、上清に10% 3M NaACおよび2.3倍量のエタノールを添加する。沈殿を70%エタノールで洗浄し、上記のように乾燥させる。次に沈殿をTE 200 μ lに溶解し、Beckman sw28超遠心チューブ中の10~40%ショ糖密度勾配12 mlに重層する。試料を20 のBeckman sw28ローターに設置し、120000gで18時間遠心分離する。上層から各画分(0.5 ml)を回収し、15 μ l量を0.3%アガロースゲル電気泳動で解析する。30~40 kbのDNAを含むバンドを混同し、2倍量の脱イオン水および7倍量のエタノールを添加して-20 で一晩沈殿させ、70%エタノールで洗浄し、乾燥させ、TE 50 μ lに溶解する。

【0055】

c) 4G-1のゲノムライブラリーの作製

Stratageneの方法を用いて、SuperCos1コスミドベクターをXba I、アルカリホスファターゼ、およびBamHIで切断した後、これを上記の単離した全DNA断片と連結する。

【0056】

Gigapack III Goldのパッケージング抽出物を用いて、連結産物をインビトロでパッケ

ージングする。Stratageneの方法により、Stratageneキットを用いて大腸菌XL1-Blue MR (Stratagene) でライブラリーの力価を測定する。次に、同製造業者の説明に従い、得られたライブラリーを増幅して保存する。

【0057】

実施例4 グリフォセート耐性EPSPS遺伝子の単離、スクリーニング、配列決定、および解析

a) グリフォセート耐性遺伝子ライブラリーのスクリーニング

上記のライブラリーの1 ml保存溶液を遠心分離し、上清を除去し、ペレットを無菌の生理食塩水1 mlに再懸濁する。遠心分離を再度繰り返す、上清を除去し、ペレットを無菌の生理食塩水1 mlに再懸濁する。約 10^3 細菌/プレートの密度で、懸濁液を10 mMグリフォセート-50 mg/Lアンピシリンプレート(20 mM硫酸アンモニウム; 0.4%グルコース; 10 mMグリフォセート; 0.5 mMリン酸水素ナトリウム; 0.1mg/L硫酸第二鉄; 0.5g/L硫酸マグネシウム; 0.5g/L塩化カルシウム; 2.1 g/L塩化ナトリウム; 50 mM Tris (pH 7.2); 5 mg/LビタミンB1; 15g/Lアガロース)に塗布する。プレートを37 °Cで一晩培養する。1つの株が得られ、これをBDSと命名する。この菌株の保有するコスミドをpKU2001と命名する。

10

【0058】

b) グリフォセート耐性遺伝子の単離

菌株BDSを50 mlフラスコ中のLB 20 ml(50 mg/Lアンピシリンを添加)に播種し、300 rpmで振盪しながら37 °Cで一晩培養する。遠心分離して菌株を回収する。Molecular cloning, laboratory manual、前記のアルカリ法により、プラスミドpKU2001を抽出する。次に、このプラスミドをコスミドベクターと同様に大腸菌XL1-Blue MR(Stratagene)に形質転換する。菌株を10 mMグリフォセートプレートに画線する。空のコスミドベクターのみを保有する菌株はグリフォセート培地上で増殖できないが、pKU2001を保有する菌株は十分に増殖し、このことからpKU2001がグリフォセート耐性遺伝子を有することが示唆される。

20

【0059】

pKU2001をSau3AIで切断する。0.7%アガロースゲル電気泳動により2~4 kbのDNA断片を回収し、BamH Iで切断し脱リン酸したpUC18ベクターに連結する(Yanisch-Perron, C., Viera, J., およびMessing, J. 1985, Gene 33:103-119)。連結産物を大腸菌XL1-Blue MR(Stratagene)に形質転換し、菌株を50 mg/Lアンピシリンを添加した10 mMグリフォセートプレートに画線する。プレートを37 °Cで一晩培養すると、多数のクローンが得られる。クローンを拾い上げ、プラスミドを抽出する。約2 kbの外因性断片を有するプラスミドを選別し、これをpKU2002と命名する。プラスミドpKU2002および空のベクターpUC18を、それぞれ大腸菌XL1-Blue MR(Stratagene)に形質転換する。菌株を50 μg/Lアンピシリンを添加した10 mMグリフォセートプレートに画線する。空のpUC18ベクターを保有する菌株はグリフォセートプレート上で増殖できないのに対し、pKU2002プラスミドを保有する菌株は十分に増殖し、このことからpKU2002がグリフォセート耐性遺伝子を有することが示唆される。

30

【0060】

c) pKU2002を配列決定し、配列番号:2に示す1914 bpの全長配列が得られる。

40

【0061】

d) pKU2002を、DNASISソフトウェアを用いる配列解析に供する。ユニークなオープンリーディングフレーム(ORF、配列番号:2のヌクレオチド574~1803)と考えられる配列が決定される。コードされるアミノ酸配列を配列番号:3に示す。

【0062】

e) タンパク質配列を、米国国立バイオテクノロジー情報センター(American National Center for Biotechnology Information: NCBI)のGenBankタンパク質配列データベースのBLAST検索にかける。このタンパク質の配列がクロストリジウム・アセトブチリカムのEPSPSのアミノ酸配列と37%相同であり、大腸菌のEPSPSのアミノ酸配列と20%相同であることが見出される。1230 bpの配列がEPSPシンターゼをコードすると考えられ、この遺伝子をppa

50

roAと命名する。解析から、上記の遺伝子はどのクラスのEPSPSにも属さず、新規EPSPS遺伝子(クラスIII)であることが示される。大腸菌、クロストリジウム・アセトブチリカム、およびP. P4G-1のEPSPSアミノ酸配列アラインメントを図2に示す。

【0063】

f) 下線で示したBamH I部位を含む一对のプライマーを設計する：

プライマー-3：5' -CGG GAT CCT AAG TAA GTG AAA GTA ACA ATA CAG C-3'

プライマー-4：5' -CGG GAT CCC TTC TTC GGA CAA TGA CAG AC-3'

pKU2001を鋳型として用いてPCR増幅を行う。増幅された断片をBamH Iで切断し、pUC18に挿入してpKU2003を得る。配列決定により、ミスマッチ塩基が導入されていないことが示される。pKU2003をBamH Iで切断し、pACYC184のBamH I部位にフォワード方向に挿入して(Chang, A.C.Y.およびCohen, S.N., 1978, J. Bacteriol. 134: 1141-1156)プラスミドpLU2004を得るが、このマップを図1に示す。このプラスミド内のpparoA遺伝子の転写は、pACYC184由来のプロモーターTc^rによって、開始される。

10

【0064】

実施例5 大腸菌aroA遺伝子のクローニングおよびそのグリフォセート耐性の部位特異的突然変異誘発(対照試験)

15 mlチューブ中のLB液体培地3 mlに大腸菌ET8000(MacNeil, T., MacNeil D., およびTyler, B. 1982 J. Bacteriol. 150: 1302-1313)を播種し、37℃で振盪しながら一晚培養する。菌株を遠心分離し、上記の方法に従って全DNAを抽出する。

【0065】

下線で示したBamH I部位を含む一对のプライマーを設計する：

プライマー-5：5' -CGG GAT CCG TTA ATG CCG AAA TTT TGC TTA ATC-3'

プライマー-6：5' -CGG GAT CCA GGT CCG AAA AAA AAC GCC GAC-3'

【0066】

大腸菌の全DNAを鋳型として用いて増幅することにより、大腸菌においてEPSPSタンパク質をコードする大腸菌aroA遺伝子を得る。この遺伝子をBamH Iで切断し、pUC18に挿入してpKU2005を得る。プラスミドの配列を解析し、配列番号:10を得る。NCBIのGenBankデータの大腸菌の既知のEPSPS遺伝子配列とのアラインメントから、この配列が正しいことがわかる。プラスミドpKU2005をBamH Iで切断した後、小さい断片を回収してpACYC184のBamH I部位のフォワード方向に挿入してプラスミドpKU2006を得る。

30

【0067】

大腸菌のaroA遺伝子に部位突然変異を起こす。287位のグアニンをシトシンに変異させる。次に、大腸菌EPSPSタンパク質の96位のグアニンをアラニンに変異させる。同様に、この遺伝子断片をpACYC184のBamH I部位に挿入してプラスミドpKU2007を得る。

【0068】

実施例6 大腸菌aroA⁻株のEPSPS機能相補実験

pACYC184、pKU2004、pKU2006、およびpKU2007を、それぞれ大腸菌AB2889(大腸菌aroA⁻株、エール大学による)に形質転換する。これらを、最終濃度25 mg/Lのクロラムフェニコールを含むM63培地(13.6 g/L KH₂PO₄、0.5 mg/L FeSO₄·7H₂O、20 mM (NH₄)₂SO₄、0.4% グルコース、1 mM硫酸マグネシウム、0.5 mg/LビタミンB1)に画線して培養する。結果を表1に示す。

40

【0069】

以下のようにaAAS成分を添加する：

100 mg/L フェニルアラニン

100 mg/L チロシン

100 mg/L トリプトファン

5 mg/L p-アミノ安息香酸

5 mg/L 2, 3-ジヒドロキシ安息香酸

5 mg/L ヒドロキシ安息香酸。

【0070】

50

(表1) aroA欠損大腸菌株のEPSPS機能相補およびグリフォセート耐性実験

AB2889の保有する プラスミド	EPSPS 機能相補およびグリフォセート耐性		
	M63 培地	M63 培地 (aAAS 添加)	10mMグリフォセート耐性
pACYC184	—	+	—
PKU2006	+	+	—
pKU2007	+	+	+
pKU2004	+	+	+

【0071】

10

同時に、液体培養条件で菌株の増殖曲線を測定する。結果から、大腸菌の対照aroA遺伝子(pKU2006)と同様に、pKU2004の有する遺伝子もaroA欠損大腸菌AB2899のEPSPS機能を完全に相補し得ることから、このプラスミドの有する1230 bp核酸配列がEPSPSコード遺伝子であり、この遺伝子によってコードされるEPSPSがグリフォセート耐性を有することが示される。

【0072】

実施例7 新規EPSPS遺伝子のグリフォセート耐性

プラスミドpKU2004、pKU2006、およびpKU2007を、それぞれ大腸菌XL1-Blue MRに形質転換する。菌株をM63培地に別々に播種して一晚培養し、その後様々な濃度のグリフォセートを添加したM63培地に移す。増殖曲線を測定する。結果から、pKU2006で形質転換された大腸菌は5 mMグリフォセート培地で培養すると有意に阻害され、40 mMグリフォセート培地では増殖しないことが示される。これとは対照的に、pKU2004およびpKU2006で形質転換された大腸菌は、40 mMグリフォセート培地で培養する場合に明らかに阻害されず、pKU2004で形質転換された大腸菌は120 mMグリフォセート培地で十分に増殖する(図3: 増殖曲線)。

20

国際出願番号	PCT/CN02/00539	出願人又は代理人の書類番号	I02CN024/PY
--------	----------------	---------------	-------------

寄託された微生物またはその他の生物学的材料
に関する表示

(PCT規則13の2)

A. 以下に示される表示は、明細書中に言及されている微生物またはその他の生物学的材料に関するものである。 <div style="text-align: center;">10 頁、18～22 行</div>		
B. 寄託の表示 他の寄託が別紙に記載されている <input type="checkbox"/>		10
寄託機関の名称		
China General Microbiological Culture Collection Center		
寄託機関のあて名（郵便番号及び国名を含む）		
P.O.BOX 2714, Zhongguancun, Haidian District, Beijing, 100080 China		
寄託の日付	30.04.2002	受託番号
		0739
C. 追加の表示（該当しない場合には記載しない） この情報は別紙に続いている <input type="checkbox"/>		20
D. この表示を行うための指定国（全ての指定国のために行わない場合）		
E. 追加事項の表示の届出（該当しない場合には記載しない）		
下記の表示は後に国際事務局に届ける予定である。（例えば「受託番号」のように表示事項を明記する）		
受理官庁記入欄	国際事務局記入欄	
<input checked="" type="checkbox"/> この用紙は国際出願とともに受理した	<input type="checkbox"/> この用紙が国際事務局に受理された日	
権限のある職員	権限のある職員	

様式 PCT/RO/134(1998年7月)

【図面の簡単な説明】

【0073】

10

20

30

40

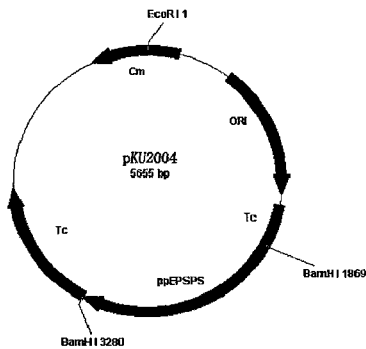
50

【図1】プラスミドpKU2004のマップを示す。

【図2】シュドモナス・プチダ P. P4G-1のEPSPSと様々な既知EPSPSとのアミノ酸配列アラインメントを示す。四角内および陰影部分に示す配列は、先行特許で特許請求されている。

【図3】様々なグリフォセート濃度での大腸菌XL1-BLUE MRの増殖曲線を示す。大腸菌XL1-BLUE MRは異なるEPSPS遺伝子を保有する。

【図1】



プラスミドpKU2004のマップ

【図2】

起源		
P. P4G-1 MQRACAA	7
C. フォトゾチリカム MNCVKINPCCLKGDIKIPPSKSLGHRATICAAL	33
PG2982	MSHSASPKPATARRSEALTGEIRIP QDKS ISHRSFMPGGL	40
LBAA	MSHSASPKPATARRSEALTGEIRIP QDKS ISHRSFMPGGL	40
アグロバクテリウムCP4	MSHGASSRPATARRKSSGLSGTVRIP QDKS ISHRSFMPGGL	40
枯草菌 MKRDKVQTLHGEIHIP QDKS ISHRSVMPGAL	31
黄色ゾウ球菌 MVSBQI IDISGPLKGEIEV EDKS MTHRATMLASL	35
D. ノドサス (D. NODOSUS) MMTNIWHITAPVYSALSGEITIC QDKS MSHRALLAAL	36
大腸菌 MESLTLQPIARVDGTINLPGSKSVSNRALLAAL	34
A. サルモネラ (A. SALMONICIDA) MNSLRLEPTSRVAGEVNLPGSKSVNGALLAAL	34
シロイヌナズナ KASEIVLQPIREISGLIKLPGSKLSNRILLAAL	35
タバコ KPNEIVLQPIKDISGTVKLPKSKLSNRILLAAL	35
ハチマニア KPSEIVLQPIKEISGTVKLPKSKLSNRILLAAL	35
トウモロコシ AGAEEIVLQPIKEISGTVKLPKSKLSNRILLAAL	36
百日咳菌	... MSGLAYLDLPAARLARGEVALPGSKSISNRVLLAAL	37
P. P4G-1	ALVAKGISELINPGHSNDDKAARDIVSRLGARLEDQPDGS	47
C. フォトゾチリカム	SEEBSTIENTISYKDIKATCIGMSKLGALIIDAKDNSTL	73
PG2982	ASGETRITGLLEGEDVINTGRAMQAMGAKIRKEGDVWIIN	80
LBAA	ASGETRITGLLEGEDVINTGRAMQAMGAKIRKEGDVWIIN	80
アグロバクテリウムCP4	ASGETRITGLLEGEDVINTGRAMQAMGAKIRKEGDVWIIN	80
枯草菌	AAGTTVKNPLPGADCLSTIDCFRKMVGHIEQSSSDVVIH	71
黄色ゾウ球菌	ABGTSNIYKPLLEDCCRITMDFRLLGVDIKEDEKLVVN	75
D. ノドサス	ABGQTEIRGFLACADCLATRALRALGVDIQREKEIVTIR	76
大腸菌	AHGKTVLNLDSDDVRIMLNALALGVSYTLSADRTRCE	74
A. サルモネラ	ARGTTRLNLDSDDIRMLAALTLQGVKYKLSADKTECT	74
シロイヌナズナ	SEGTTVVDNLLSSDDIHYMLDALKRLGLNVETDSENRAV	75
タバコ	SKGRTVVDNLLSSDDIHYMLGALKRTLGLHVEDDNENQRAI	75
ハチマニア	SEGTTVVDNLLSSDDIHYMLGALKRTLGLHVEDSANQRAV	75
トウモロコシ	SEGTTVVDNLLSDDVHYMLGALKRTLGLSVYADKAAKRAV	76
百日咳菌	ABGSTEITGLDSDDTRVMLAALRQLGVSVGEVADGCVTI	77
P. P4G-1	LQITSEGKVPVAPFIDCGESGLSRMFTPIVALSKBEVTI	87
C. フォトゾチリカム	KIKKQKLVSKKVVYIDCGESGTVRFLIPISLIEERNVVF	113

シュドモナス・プチダ P. P4G-1 の EPSPS と様々な既知 EPSPS とのアミノ酸配列アラインメント

【 図 2 a 】

Table with 3 columns: Species/Strain, Sequence, and Position. Includes entries for PC2982, LBAA, and P. P4G-1 across various bacterial species like Bacillus and Streptococcus.

シエラネオナス・フチダダRP4G-1のEPSPSと様々な菌種EPSPSとのアミノ酸配列アラインメント

【 図 2 b 】

Table with 3 columns: Species/Strain, Sequence, and Position. Includes entries for 枯草菌, 黄色ブドウ球菌, and P. P4G-1 across various bacterial species like Bacillus, Staphylococcus, and Streptococcus.

シエラネオナス・フチダダRP4G-1のEPSPSと様々な菌種EPSPSとのアミノ酸配列アラインメント

【 図 2 c 】

Table with 3 columns: Species/Strain, Sequence, and Position. Includes entries for 大腸菌, A. サルモネラ, and P. P4G-1 across various bacterial species like Escherichia coli, Salmonella, and Bacillus.

シエラネオナス・フチダダRP4G-1のEPSPSと様々な菌種EPSPSとのアミノ酸配列アラインメント

【 図 2 d 】

Table with 3 columns: Species/Strain, Sequence, and Position. Includes entries for タバコ, ヘチマ, and P. P4G-1 across various bacterial species like Bacillus, Streptococcus, and other strains.

シエラネオナス・フチダダRP4G-1のEPSPSと様々な菌種EPSPSとのアミノ酸配列アラインメント

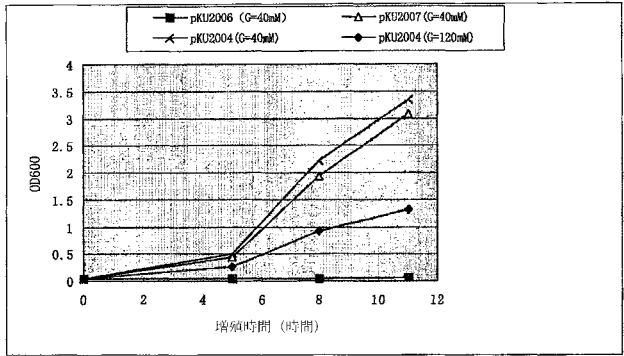
【 図 2 e 】

P. P4G-1	HDHRIAMACAVAAALKAVGETTIEHAEAVNKSYPDFVSDLK	394
C. アゼトゾチリカム	NDHRIAMALGIAALRCEESVTINGSECVSKSYPPQFWSDLK	415
PG2982	VATHLDHRTIAMSFLVGLAAEKPVTVDDSNMIATSFPEFM	434
LBAA	VATHLDHRTIAMSFLVGLAAEKPVTVDDSNMIATSFPEFM	434
アグロバクテリウムCP4	VATHLDHRTIAMSFLVGLVSENPVTVDATMIATSFPEFM	437
枯草菌	VSSH.GDHRICMMLGIASCITTEPPIEIEHTDAIHVSYPTF	417
黄色ブドウ球菌	DSL.T.DHRIGMMLAVASLLSSEPVKTKQFDVAVNSPPGF	421
D. ノドサス	RVNSPGDHRIAMSLAVAGVRAAGELLDDGAVAAVMPQF	422
大腸菌	N.DHRMAMCPSLVALSDTPVTIILDPKCTAKTFPDYFPEQL	420
A. サルモネラ	Q.ASRIAMCPSLVALSDIATVINDPGCTSKTTPDYFDKL	420
シロイヌナズナ	DDHRMAMAFSLAACADVPVITINDSGCTRKTFPDYFQVLER	440
タバコ	DDHRMAMAFSLAACADVPVITIKDPGCTRKTFPNYPVQLQ	440
ハチマユア	DDHRMAMAFSLAACADVPVITINDPGCTRKTFPNYPVQLQ	440
トウモロコシ	DDHRMAMAFSLAACAEVPTIIRDPGCTRKTFPDYFVLSL	440
百日咳菌	TWDDHRMAMCFLLAAFPAAVRILDPGCVCSTFPDYFDVY	434

P. P4G-1	QLGGVSLNHQFNFS	409
C. アゼトゾチリカム	QLGGDVHEWVSLGE	428
PG2982	DMMPGLGAKTELSIL	449
LBAA	DMMPGLGAKTELSIL	449
アグロバクテリウムCP4	DLMAGLGAKELESDTKAA	455
枯草菌	FEHLNKLKSKKS	428
黄色ブドウ球菌	LPKLLKLENEG	432
D. ノドサス	RDFAAAIQMNVGEKDAKNCHD	443
大腸菌	ARISQAA	427
A. サルモネラ	ASVSQAV	427
シロイヌナズナ	ITKH	444
タバコ	YSKH	444
ハチマユア	YSKH	444
トウモロコシ	FVKV	444
百日咳菌	AGLLAARD	442

シロイヌナズナ中のP4G-1のEPSPSと様々な既知EPSPSとのアミノ酸配列アラインメント

【 図 3 】



様々なグリセロール濃度における、異なるEPSPS遺伝子を保有する大腸菌 XL1 - BLUE MR の増殖曲線

【 配列表 】

2005530497000001.app

【 國際調查報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN02/00539
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC ⁷ : C12N15/52, C12N15/63, C07K14/21		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC ⁷ : C12N15/52, C12N15/63, C07K14/21		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Chinese Patents, Chinese Scientific and Technical Journals		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
WPI, PAJ, BA		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US5633435 (MONSANTO CO), 1997, see abstract	1-10
A	US5627061 (MONSANTO CO), 1997, see abstract	1-10
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 23. April. 2003(23. 04. 03)		Date of mailing of the international search report 12 JUN 2003 (12.06.03)
Name and mailing address of the ISA/CN 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, 100088 Beijing, China Facsimile No. 86-10-62019451		Authorized officer SUN, Guangxiu Telephone No. 86-10-62093884

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN02/00539
A. 主题的分类		
IPC ⁷ : C12N15/52, C12N15/63, C07K14/21		
按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类		
B. 检索领域		
检索的最低限度文献(标明分类体系和分类号)		
IPC ⁷ : C12N15/52, C12N15/63, C07K14/21		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
中国专利数据库, 中文科技期刊数据库		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称和, 如果实际可行的, 使用的检索词)		
WPI, PAJ, BA		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求编号
A	US5633435 (MONSANTO CO), 1997年5月27日, 见摘要	1-10
A	US5627061 (MONSANTO CO), 1997年5月6日, 见摘要	1-10
<input type="checkbox"/> 其余文件在 C 栏的续页中列出。 <input type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的专用类型: "A" 明确叙述了被认为不是特别相关的一般现有技术文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先的申请或专利 "L" 可能引起对优先权要求的怀疑的文件, 为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布的在后文件, 它与申请不相抵触, 但是引用它是为了理解构成发明基础的理论或原理 "X" 特别相关的文件, 仅仅考虑该文件, 权利要求所记载的发明就不能认为是新颖的或不能认为是有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 权利要求记载的发明不具有创造性 "&" 同族专利成员的文件		
国际检索实际完成的日期 23.4月 2003(23.04.03)		国际检索报告邮寄日期 12.6月 2003 (12.06.03)
国际检索单位名称和邮寄地址 ISA/CN 中国北京市海淀区西土城路6号(100088) 传真号: 86-10-62019451		受权官员 孙广秀 电话号码: 86-10-62093884 

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷ F I テーマコード(参考)
 C 1 2 N 9/10 C 1 2 N 5/00 A

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW, ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES, FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 チェン ヤンチェン
 中華人民共和国 ペキン ハイディアン ディストリクト イェユアン ロード ナンバー 5
 (72)発明者 リー フェンメイ
 中華人民共和国 ペキン ハイディアン ディストリクト イェユアン ロード ナンバー 5
 (72)発明者 ティエン チェシヤン
 中華人民共和国 ペキン ハイディアン ディストリクト イェユアン ロード ナンバー 5
 (72)発明者 リン ミン
 中華人民共和国 ペキン ハイディアン ディストリクト イェユアン ロード ナンバー 5
 (72)発明者 ワン イーピン
 中華人民共和国 ペキン ハイディアン ディストリクト イェユアン ロード ナンバー 5

Fターム(参考) 4B024 AA08 BA10 BA79 CA03 DA01 DA06 EA04 GA11 HA14
 4B050 CC01 CC03 DD02 LL10
 4B065 AA26X AA44Y AA89X AB01 AC14 BA02 CA29 CA53