

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6334169号
(P6334169)

(45) 発行日 平成30年5月30日 (2018.5.30)

(24) 登録日 平成30年5月11日 (2018.5.11)

(51) Int. Cl.		F I	
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N 5/10
A O 1 H	5/00	(2018.01)	A O 1 H 5/00 A
A O 1 H	1/00	(2006.01)	A O 1 H 1/00 A
C 1 2 Q	1/68	(2018.01)	C 1 2 Q 1/68 A

請求項の数 21 (全 76 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-543954 (P2013-543954)	(73) 特許権者	515012583
(86) (22) 出願日	平成23年12月15日 (2011.12.15)		ビーエーエスエフ アグロ ベー. ブイ.
(65) 公表番号	特表2014-504855 (P2014-504855A)		オランダ国 6835 アーンヘム, フロ
(43) 公表日	平成26年2月27日 (2014.2.27)		ーニンゲンシングル 1
(86) 国際出願番号	PCT/IB2011/055701	(74) 代理人	100091096
(87) 国際公開番号	W02012/080975		弁理士 平木 祐輔
(87) 国際公開日	平成24年6月21日 (2012.6.21)	(74) 代理人	100118773
審査請求日	平成26年12月11日 (2014.12.11)		弁理士 藤田 節
(31) 優先権主張番号	61/423, 604	(74) 代理人	100122389
(32) 優先日	平成22年12月16日 (2010.12.16)		弁理士 新井 栄一
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100111741
			弁理士 田中 夏夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 除草剤耐性の増大した植物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

植物栽培地で望ましくない植物生育を防除するための方法であって、以下のステップ、
a) 前記栽培地において、「ベンゾオキサジノン誘導体除草剤」に対して抵抗性もしくは耐性を持つ、変異したプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (mut-PP0) をコードするヌクレオチド配列を含む、少なくとも1つの核酸を含有する植物を提供するステップ、および

b) 有効量の前記除草剤を前記栽培地に施用するステップ、
を含む、前記方法、

ここで該コードされるmut-PP0は、配列番号2のアミノ酸配列を有するポリペプチドのバリエーションであり、該バリエーションは1個又は複数個のアミノ酸の欠失、付加、若しくは置換を有してもよく、該バリエーションはさらに、配列番号2における、128位のアミノ酸がアラニンであり、かつ420位のアミノ酸がメチオニン、イソロイシンもしくはロイシンである、アミノ酸置換を含み、前記バリエーションは配列番号2の128位のアミノ酸がアラニンであり、420位のアミノ酸がメチオニン、イソロイシンもしくはロイシンであるアミノ酸置換されたペプチドと同等の活性を有する、前記方法。

【請求項 2】

植物栽培地で望ましくない植物生育を防除するための方法であって、以下のステップ、
a) 前記栽培地において、「ベンゾオキサジノン誘導体除草剤」に対して抵抗性もしくは耐性を持つ、変異したプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (mut-PP0) をコードするヌ

クレオチド配列を含む、少なくとも1つの核酸を含有する植物を提供するステップ、ここで前記変異したプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (mut-PPO) をコードするヌクレオチド配列が配列番号1の配列と少なくとも90%の配列同一性を有し、および

b)有効量の前記除草剤を前記栽培地に施用するステップ、
を含む、前記方法、

ここで該コードされるmut-PPOは、配列番号2における、128位のアミノ酸がアラニンであり、かつ420位のアミノ酸がメチオニン、イソロイシンもしくはロイシンである、アミノ酸置換を含み、前記ヌクレオチド配列によりコードされるmut-PPOは配列番号2の128位のアミノ酸がアラニンであり、420位のアミノ酸がメチオニン、イソロイシンもしくはロイシンであるアミノ酸置換されたペプチドと同等の活性を有する、前記方法。

10

【請求項3】

a)のヌクレオチド配列が、配列番号1の配列と少なくとも90%の配列同一性を有する、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

植物が、除草剤耐性酵素をコードするヌクレオチド配列を含む、少なくとも1つの追加の異種核酸を含有する、請求項1、2または3に記載の方法。

【請求項5】

ベンゾオキサジノン誘導体除草剤が1つもしくは複数の他の除草剤と併せて施用される、請求項1～4のいずれか1つに記載の方法。

【請求項6】

配列番号1のヌクレオチド配列又は配列番号1の配列と少なくとも90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む核酸によってコードされるmut-PPOを使用することによって、ベンゾオキサジノン誘導体除草剤を同定するための方法、

20

ここで該コードされるmut-PPOは、配列番号2のアミノ酸配列を有するポリペプチドのバリエーションであり、該バリエーションは1個又は複数個のアミノ酸の欠失、付加、若しくは置換を有してもよく、該バリエーションはさらに、128位のアミノ酸がアラニンである、および420位のアミノ酸がメチオニン、イソロイシンもしくはロイシンである、アミノ酸置換を含み、かつ前記バリエーションは、配列番号2の128位のアミノ酸がアラニンであり、420位のアミノ酸がメチオニン、イソロイシンもしくはロイシンであるアミノ酸置換されたペプチドと同等の活性を有する、前記方法。

30

【請求項7】

配列番号1のヌクレオチド配列又は配列番号1の配列と少なくとも90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む核酸によってコードされるmut-PPOを使用することによって、ベンゾオキサジノン誘導体除草剤を同定するための方法、

ここで該コードされるmut-PPOは、128位のアミノ酸がアラニンである、および420位のアミノ酸がメチオニン、イソロイシンもしくはロイシンである、アミノ酸置換を含み、前記コードされるmut-PPOは、配列番号2の128位のアミノ酸がアラニンであり、420位のアミノ酸がメチオニン、イソロイシンもしくはロイシンであるアミノ酸置換されたペプチドと同等の活性を有する、前記方法。

【請求項8】

40

a) mut-PPOをコードする核酸を含有し、そのmut-PPOを発現する、トランスジェニック細胞もしくは植物を作製するステップ；

b) a)のトランスジェニック細胞もしくは植物、および同一品種の対照細胞もしくは植物に対して、ベンゾオキサジノン誘導体を施用するステップ；

c) 前記テスト化合物の施用後に、トランスジェニック細胞もしくは植物、および対照細胞もしくは植物の生長または生存能力を測定するステップ、ならびに

d) トランスジェニック細胞もしくは植物の生長に比べて、対照細胞もしくは植物に対して生長の低下をもたらすテスト化合物を選択するステップ、
を含む、請求項6または7に記載の方法。

【請求項9】

50

mut-PP0をコードする単離された核酸であって、それによってコードされるmut-PP0は配列番号2のアミノ酸配列を有するポリペプチドのバリエーションであり、前記バリエーションは1個又は複数個のアミノ酸の欠失、付加、若しくは置換を有してもよく、さらに前記バリエーションは次のアミノ酸置換を含んでおり、すなわち：128位のアミノ酸はアラニンである、および420位のアミノ酸はメチオニン、イソロイシンもしくはロイシンであり、かつ、前記バリエーションは配列番号2の128位のアミノ酸がアラニンであり、420位のアミノ酸がメチオニン、イソロイシンもしくはロイシンであるアミノ酸置換されたペプチドと同等の活性を有する、前記核酸。

【請求項10】

mut-PP0をコードする単離された核酸であって、それによってコードされるmut-PP0は次のアミノ酸置換を含んでおり、すなわち：128位のアミノ酸はアラニンである、および420位のアミノ酸はメチオニン、イソロイシンもしくはロイシンであり、前記mut-PP0をコードする前記単離された核酸は配列番号1の配列と少なくとも90%の配列同一性を有し、前記核酸によりコードされる前記mut-PP0は、配列番号2の128位のアミノ酸がアラニンであり、420位のアミノ酸がメチオニン、イソロイシンもしくはロイシンであるアミノ酸置換されたペプチドと同等の活性を有する、前記核酸。

【請求項11】

mut-PP0核酸で形質転換されたトランスジェニック植物細胞であって、その植物細胞における前記核酸の発現が、野生型品種の植物細胞と比べて、ベンゾオキサジノン誘導体除草剤に対する抵抗性もしくは耐性の増加をもたらす、前記トランスジェニック植物細胞、ここで該mut-PP0核酸は、

a) 配列番号1に示す塩基配列と少なくとも90%の配列同一性を有するポリヌクレオチドであって、前記ポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドは、配列番号2における、128位のアミノ酸がアラニンであり、かつ420位のアミノ酸がメチオニン、イソロイシンもしくはロイシンである、アミノ酸置換を含み、かつ、前記ヌクレオチド配列によりコードされるmut-PP0は配列番号2の128位のアミノ酸がアラニンであり、420位のアミノ酸がメチオニン、イソロイシンもしくはロイシンであるアミノ酸置換されたペプチドと同等の活性を有する；

b) 配列番号2に示すアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはそのバリエーションをコードするポリヌクレオチド、ここで前記バリエーションは1個又は複数個のアミノ酸の欠失、付加、若しくは置換を有してもよい；ならびに

c) a)からb)までのいずれかのポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド、からなる1群から選択されるポリヌクレオチド配列を含んでなり、かつ前記b)の配列番号2のアミノ酸配列を有するポリペプチド若しくはそのバリエーションまたは前記a)のポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドが、さらに次のアミノ酸置換を含んでおり、すなわち128位のアミノ酸はアラニンである、および420位のアミノ酸はメチオニン、イソロイシンもしくはロイシンであり、かつ、前記バリエーションは配列番号2の128位のアミノ酸がアラニンであり、420位のアミノ酸がメチオニン、イソロイシンもしくはロイシンであるアミノ酸置換されたペプチドと同等の活性を有する、

前記トランスジェニック植物細胞。

【請求項12】

請求項11に記載の植物細胞を含んでなるトランスジェニック植物であって、その植物における核酸の発現が結果として、野生型品種の植物と比較して、ベンゾオキサジノン誘導体除草剤に対する植物の抵抗性の増加をもたらす、前記トランスジェニック植物。

【請求項13】

配列番号2に示すアミノ酸配列を含んでなる突然変異もしくは組換えmut-PP0を発現する植物であって、そのアミノ酸配列は、対応する野生型植物の野生型PP0のアミノ酸配列と、1つもしくは複数のアミノ酸位置で異なっており、さらにその128位のアミノ酸はアラニンであり、および420位のアミノ酸はメチオニン、イソロイシンもしくはロイシンであり、前記突然変異もしくは組換えmut-PP0は、配列番号2の128位のアミノ酸がアラニンであ

10

20

30

40

50

り、420位のアミノ酸がメチオニン、イソロイシンもしくはロイシンであるアミノ酸置換されたペプチドと同等の活性を有し、さらに前記PPOが、植物で発現されたとき、対応する野生型品種の植物と比べて高い除草剤耐性をその植物に与える、前記植物。

【請求項14】

請求項11に記載の植物細胞を含んでなるトランスジェニック植物によって、または請求項12に記載の植物によって生産される種子であって、その種子が、野生型品種の種子と比べて増大した、ベンゾオキサジノン誘導体除草剤への抵抗性について、何世代にもわたって同じ特徴を示す、前記種子。

【請求項15】

mut-PPO核酸を含有する発現カセットで植物細胞を形質転換することを含む、野生型品種の植物細胞より高いベンゾオキサジノン誘導体除草剤への抵抗性を示すトランスジェニック植物細胞を作製する方法、

ここで該コードされるmut-PPOは、配列番号2のアミノ酸配列を有するポリペプチドのバリエーションであり、前記バリエーションは1個又は複数個のアミノ酸の欠失、付加、若しくは置換を有してもよく、前記バリエーションはさらに128位のアミノ酸がアラニンである、および420位のアミノ酸がメチオニン、イソロイシンもしくはロイシンである、アミノ酸置換を含み、かつ前記バリエーションは配列番号2の128位のアミノ酸がアラニンであり、420位のアミノ酸がメチオニン、イソロイシンもしくはロイシンであるアミノ酸置換されたペプチドと同等の活性を有する、前記方法。

【請求項16】

mut-PPO核酸を含有する発現カセットで植物細胞を形質転換することを含む、野生型品種の植物細胞より高いベンゾオキサジノン誘導体除草剤への抵抗性を示すトランスジェニック植物細胞を作製する方法、

ここで該mut-PPO核酸は配列番号1の配列と少なくとも90%の配列同一性を有し、該mut-PPO核酸によりコードされるmut-PPOは、128位のアミノ酸がアラニンである、および420位のアミノ酸がメチオニン、イソロイシンもしくはロイシンである、アミノ酸置換を含み、かつ配列番号2の128位のアミノ酸がアラニンであり、420位のアミノ酸がメチオニン、イソロイシンもしくはロイシンであるアミノ酸置換されたペプチドと同等の活性を有する、前記方法。

【請求項17】

(a) mut-PPO核酸を含有する発現カセットで植物細胞を形質転換すること、ならびに
(b) その植物細胞から、ベンゾオキサジノン誘導体除草剤への抵抗性の高まった植物体を生成させること

を含む、トランスジェニック植物を作製する方法、

ここで該コードされるmut-PPOは、配列番号2のアミノ酸配列を有するポリペプチドのバリエーションであり、前記バリエーションは1個又は複数個のアミノ酸の欠失、付加、若しくは置換を有してもよく、前記バリエーションはさらに128位のアミノ酸がアラニンである、および420位のアミノ酸がメチオニン、イソロイシンもしくはロイシンである、アミノ酸置換を含み、かつ前記バリエーションは配列番号2の128位のアミノ酸がアラニンであり、420位のアミノ酸がメチオニン、イソロイシンもしくはロイシンであるアミノ酸置換されたペプチドと同等の活性を有する、前記方法。

【請求項18】

(a) mut-PPO核酸を含有する発現カセットで植物細胞を形質転換すること、ならびに
(b) その植物細胞から、ベンゾオキサジノン誘導体除草剤への抵抗性の高まった植物体を生成させること

を含む、トランスジェニック植物を作製する方法、

ここで該mut-PPO核酸は配列番号1の配列と少なくとも90%の配列同一性を有し、さらに該mut-PPO核酸によりコードされるmut-PPOは、128位のアミノ酸がアラニンである、および420位のアミノ酸がメチオニン、イソロイシンもしくはロイシンである、アミノ酸置換を含み、さらに配列番号2の128位のアミノ酸がアラニンであり、420位のアミノ酸がメ

10

20

30

40

50

チオニン、イソロイシンもしくはロイシンであるアミノ酸置換されたペプチドと同等の活性を有する、前記方法。

【請求項 19】

mut-PP0核酸が、

a) 配列番号1に示す配列と少なくとも90%の配列同一性を有するポリヌクレオチド、ここで前記ポリヌクレオチドによりコードされるmut-PP0は128位のアミノ酸がアラニンである、および420位のアミノ酸がメチオニン、イソロイシンもしくはロイシンである、アミノ酸置換を含み、さらに配列番号2の128位のアミノ酸がアラニンであり、420位のアミノ酸がメチオニン、イソロイシンもしくはロイシンであるアミノ酸置換されたペプチドと同等の活性を有する；

10

b) 配列番号2に示すアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはそのバリエーションをコードするポリヌクレオチド、ここで前記ポリペプチドは128位のアミノ酸がアラニンである、および420位のアミノ酸がメチオニン、イソロイシンもしくはロイシンである、アミノ酸置換を含み、前記バリエーションは1個又は複数個のアミノ酸の欠失、付加、若しくは置換を有してもよく、さらに前記バリエーションは128位のアミノ酸がアラニンである、および420位のアミノ酸がメチオニン、イソロイシンもしくはロイシンである、アミノ酸置換を含み、かつ前記バリエーションは、配列番号2の128位のアミノ酸がアラニンであり、420位のアミノ酸がメチオニン、イソロイシンもしくはロイシンであるアミノ酸置換されたペプチドと同等の活性を有する； ならびに

c) a)からb)までのいずれかのポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド、
からなる1群から選択されるポリヌクレオチド配列を含んでなる、
請求項16～18のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項 20】

発現カセットが、植物体内で機能する転写開始制御領域、および翻訳開始制御領域を追加して含んでなる、請求項16～19のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 21】

形質転換された植物細胞、植物組織、植物体、またはその一部を同定し、または選択する方法であって、

i) 形質転換された植物細胞、植物組織、植物体、またはその一部を提供するが、その形質転換植物細胞、植物組織、植物体、またはその一部は、配列番号1に示すポリヌクレオチド、または配列番号1の配列と少なくとも90%の配列同一性を有するポリヌクレオチドを含んでなるものであって、そのポリヌクレオチドは、選択マーカーとして使用されるmut-PP0ポリペプチドをコードしており、さらに前記形質転換植物細胞、植物組織、植物体、またはその一部は、他の単離されたポリヌクレオチドをさらに含有していてもよい、前記の形質転換された植物細胞、植物組織、植物体、またはその一部を提供すること；

30

ii) 形質転換された植物細胞、植物組織、植物体、またはその一部を、少なくとも1つのベンゾオキサジノン誘導体化合物と接触させること；

iii) 植物細胞、植物組織、植物体、またはその一部がその阻害化合物によって影響を受けるかどうかを判定すること； ならびに

iv) 形質転換された植物細胞、植物組織、植物体、またはその一部を同定し、または選択すること、

40

を含む、前記方法、

ここで該コードされるmut-PP0は、128位のアミノ酸がアラニンである、および420位のアミノ酸がメチオニン、イソロイシンもしくはロイシンである、アミノ酸置換を含み、かつ該コードされるmut-PP0は、配列番号2の128位のアミノ酸がアラニンであり、420位のアミノ酸がメチオニン、イソロイシンもしくはロイシンであるアミノ酸置換されたペプチドと同等の活性を有する、前記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

50

本発明は、概して、除草剤に対する農業レベルの耐性を植物にもたらず方法に関する。特に本発明は、「ベンゾオキサジノン誘導体」系除草剤に対する耐性が増加した植物に言及する。より具体的には、本発明は、突然変異誘発及び交雑育種及び形質転換により得られた、「ベンゾオキサジノン誘導体」系除草剤に対する耐性が増加した方法及び植物に関する。

【背景技術】

【0002】

プロトポルフィリンIXの生合成において重要な酵素である、プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ（以下ProtoxまたはPPOと称する；EC:1.3.3.4）を阻害する除草剤は、1960年代から選択的雑草防除のために使用されている。PPOは、クロロフィルおよびヘム合成の最後の共通ステップである、プロトポルフィリノーゲンIXからプロトポルフィリンIXへの酸化を触媒する。（Matringe et al. 1989. *Biochem. J.* 260: 231）。PPOを阻害する除草剤には、多くのさまざまな構造的分類群の分子が含まれる（Duke et al. 1991. *Weed Sci.* 39: 465; Nandihalli et al. 1992. *Pesticide Biochem. Physiol.* 43: 193; Matringe et al. 1989. *FEBS Lett.* 245: 35; Yanase and Andoh. 1989. *Pesticide Biochem. Physiol.* 35: 70）。こうした除草性化合物には、ジフェニルエーテル系（たとえば、ラクトフェン、5-{2-クロロ-4-(トリフルオロメチル)フェノキシ}-2-ニトロ安息香酸 (+)-2-エトキシ-1-メチル-2-オキソエチル；アシフルオルフェン、5-{2-クロロ-4-(トリフルオロメチル)フェノキシ}-2-ニトロ安息香酸；そのメチルエステル；もしくはオキシフルオルフェン、2-クロロ-1-(3-エトキシ-4-ニトロフェノキシ)-4-(トリフルオロメチル)ベンゼン）、オキシジアゾール系（たとえば、オキシジアゾン、3-{2,4-ジクロロ-5-(1-メチルエトキシ)フェニル}-5-(1,1-ジメチルエチル)-1,3,4-オキサジアゾール-2-(3H)-オン）、環状イミド系（たとえば、S-23142、N-(4-クロロ-2-フルオロ-5-プロパルギルオキシフェニル)-3,4,5,6-テトラヒドロフタルイミド；クロルフタリム、N-(4-クロロフェニル)-3,4,5,6-テトラヒドロフタルイミド）、フェニルピラゾール系（たとえば、TNPP-エチル、2-{1-(2,3,4-トリクロロフェニル)-4-ニトロピラゾリル-5-オキシ}プロピオン酸エチル；M&B 39279）、ピリジン誘導体（たとえばLS 82-556）、ならびにフェノピレートおよびその0-フェニルピロリジノ-およびピペリジノカーバメートアナログがある。これらの化合物の多くは、見かけ上基質アナログとして作用して、酵素により触媒される正常な反応を競合的に阻害する。

【0003】

PPOを阻害する除草剤を施用すると、葉緑体およびミトコンドリア内にプロトポルフィリノーゲンIXが蓄積するが、それがサイトゾルに漏出し、そこでペルオキシダーゼにより酸化されると考えられる。光にさらされると、プロトポルフィリンIXはサイトゾル中で一重項酸素の形成、および他の活性酸素種の形成を引き起こすが、それが脂質の過酸化および膜の破壊を引き起こして急速な細胞死をもたらす可能性がある（Lee et al. 1993. *Plant Physiol.* 102: 881）。

【0004】

必ずしもすべてのPPO酵素が、植物PPO酵素を阻害する除草剤に対して感受性であるわけではない。大腸菌（*Escherichia coli*）および枯草菌（*Bacillus subtilis*）PPO酵素（Sarmen et al. 1993. *Can. J. Microbiol.* 39: 1155; Dailey et al. 1994. *J. Biol. Chem.* 269: 813）はいずれも、上記の除草性阻害剤に対して抵抗性である。フェニルイミド系除草剤に対して抵抗性の単細胞藻類、コナミドリムシ（*Chlamydomonas reinhardtii*）の変異体が報告されている（Kataoka et al. 1990. *J. Pesticide Sci.* 15: 449; Shibata et al. 1992. In *Research in Photosynthesis*, Vol. III, N. Murata, ed. Kluwer: Netherlands, pp. 567-70）。これらの変異体のうち少なくとも1つは、その変異体を選択する元になった除草性阻害剤に対してのみならず、他種のProtox阻害剤に対しても抵抗性となる、PPO活性の変化を有すると思われる（Oshio et al. 1993. *Z. Naturforsch.* 48c: 339; Sato et al. 1994. In *ACS Symposium on Porphyrin Pesticides*, S. Duke, ed. ACS Press: Washington, D.C.）。変異型タバコ細胞株も、阻害剤S-21432に対して抵抗性で

あることが報告されている (Che et al. 1993. Z. Naturforsch. 48c: 350)。クローン植物PPOの除草剤抵抗性を確認するために、栄養要求性大腸菌 (E. coli) 変異株が使用された。

【 0 0 0 5 】

除草剤に対して耐性の植物を作るために三つの主要な戦略が利用可能であり、すなわち、(1)除草剤又はその活性代謝産物を非毒性産物に変換する酵素、例えば、プロモキシニル(bromoxynil)に対する耐性又はバスタ(basta)に対する耐性のための酵素(EP242236、EP 337899)などにより除草剤を解毒する、(2)標的酵素を、除草剤又はその活性代謝産物に対する感受性が低い機能酵素、例えばグリホセート(glyphosate)に対する耐性のための酵素(EP293356、Padgett S. R.ら、J.Biol. Chem.、266、33、1991年)などに突然変異を起こさせる、又は(3)植物において除草剤に関して十分な量の標的酵素を産生させるように、この酵素の反応速度定数を考慮して、その阻害剤の存在にもかかわらず利用可能な十分な機能酵素を有するように感受性酵素を過剰発現させる。第三の戦略は、PPO阻害剤に対して耐性である植物を成功裏に得たことが記載されていた(例えばUS5,767,373またはUS5,939,602、及びそのパテントファミリーを参照されたい)。さらにUS 2010/0100988およびWO 2007/024739は、アミノ酸配列がPPO阻害剤の除草性化学的物質に対して抵抗性であるような酵素活性を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列、具体的には3-フェニルウラシル阻害剤特異的PPO突然変異体を開示している。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

20

【 0 0 0 6 】

【特許文献 1】EP242236

【特許文献 2】EP337899

【特許文献 3】EP293356

【特許文献 4】US5,767,373

【特許文献 5】US5,939,602

【特許文献 6】US 2010/0100988

【特許文献 7】WO 2007/024739

【非特許文献】

【 0 0 0 7 】

30

【非特許文献 1】Matringe et al. 1989. Biochem. 1. 260: 231

【非特許文献 2】Duke et al. 1991. Weed Sci. 39: 465;

【非特許文献 3】Nandihalli et al. 1992. Pesticide Biochem. Physiol. 43: 193;

【非特許文献 4】Matringe et al. 1989. FEBS Lett. 245: 35;

【非特許文献 5】Yanase and Andoh. 1989. Pesticide Biochem. Physiol. 35: 70

【非特許文献 6】Lee et al. 1993. Plant Physiol. 102: 881

【非特許文献 7】Sasarmen et al. 1993. Can. J. Microbiol. 39: 1155;

【非特許文献 8】Dailey et al. 1994. J. Biol. Chem. 269: 813

【非特許文献 9】Kataoka et al. 1990. J. Pesticide Sci. 15: 449;

【非特許文献 10】Shibata et al. 1992. In Research in Photosynthesis, Vol. III, N. Murata, ed. Kluwer:Netherlands. pp. 567-70

40

【非特許文献 11】Oshio et al. 1993. Z. Naturforsch. 48c: 339;

【非特許文献 12】Sato et al. 1994. In ACS Symposium on Porphyrin Pesticides, S. Duke, ed. ACS Press: Washington, D.C.

【非特許文献 13】Che et al. 1993. Z. Naturforsch. 48c: 350

【非特許文献 14】Padgett S. R.ら、J.Biol. Chem.、266、33、1991年

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 8 】

現在までに、先行技術は、少なくとも一種の野生型又は突然変異PPO核酸を含有する、

50

ベンゾオキサジノン誘導体系除草剤耐性植物を記載してはいない。先行技術は、PPO遺伝子が由来するゲノム以外のゲノムにおいて突然変異を含有する、ベンゾオキサジノン誘導体系除草剤耐性作物もまた記載していない。したがって、当分野において必要とされるものは、追加のゲノム及び種に由来するベンゾオキサジノン誘導体系除草剤耐性遺伝子の同定である。当分野においてさらに必要とされるものは作物であり、作物はベンゾオキサジノン誘導体系除草剤などの除草剤に対する耐性が増加し、少なくとも一種の野生型及び/又は突然変異PPO核酸を含有する。さらに、このような作物の近傍及び作物における雑草の成長を防除する方法が必要である。除草剤を作物を含有する範囲又は作物に適用する場合、これらの組成物及び方法は、散布技術の使用が可能である。

【課題を解決するための手段】

10

【0009】

上記問題は、本発明により解決され、本発明は、植物栽培地域における望ましくない植生を防除（抑制）する方法であって、

a)前記地域において、ベンゾオキサジノン誘導体系除草剤に対して抵抗性若しくは耐性である、野生型プロトポルフィリノゲンオキシダーゼ(PPO)若しくは突然変異プロトポルフィリノゲンオキシダーゼ(mut-PPO)をコードするヌクレオチド配列、を含む少なくとも一種の核酸を含む植物を提供するステップ、

b)前記地域に、有効量の前記除草剤を適用するステップを含む方法に言及する。

【0010】

20

加えて、本発明は、配列番号1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, または45のヌクレオチド配列又はそれらの変異体を含む核酸によりコードされる野生型又はmut-PPOを使用することによってベンゾオキサジノン誘導体系除草剤を同定する方法に言及する。

【0011】

前記方法は、

a)mut-PPOをコードする核酸を含み、mut-PPOが発現されるトランスジェニック細胞又は植物を作製するステップ、

b)ベンゾオキサジノン誘導体系除草剤を、a)のトランスジェニック細胞又は植物及び同じ変種の対照細胞又は植物に適用するステップ、

30

c)前記試験化合物の適用後、トランスジェニック細胞又は植物及び対照細胞又は植物の成長又は生存能力を決定するステップ、並びに

d)トランスジェニック細胞又は植物の成長と比較して、対照細胞又は植物の成長を減少させる試験化合物を選択するステップを含む。

【0012】

別の目的は、ベンゾオキサジノン誘導体系除草剤に対して抵抗性又は耐性であるmut-PPOをコードするヌクレオチド配列を同定する方法であって、

a)mut-PPOコード核酸のライブラリーを作製するステップ、

b)細胞又は植物において個々の前記核酸を発現させ、ベンゾオキサジノン誘導体系除草剤を用いて前記細胞又は植物を処理するステップにより、得られたmut-PPOコード核酸の集団をスクリーニングするステップ、

40

c)mut-PPOコード核酸の前記集団により提供されるベンゾオキサジノン誘導体系除草剤耐性レベルと、対照PPO-コード核酸により提供されるベンゾオキサジノン誘導体系除草剤耐性レベルとを比較するステップ、

d)対照PPOコード核酸により提供されるベンゾオキサジノン誘導体系除草剤に対する耐性のレベルと比較して、ベンゾオキサジノン誘導体系除草剤に対する有意に増加したレベルの耐性を提供する、少なくとも一種のmut-PPOコード核酸を選択するステップを含む方法に言及する。

【0013】

50

好ましい実施形態において、ステップd)において選択されたmut-PPOコード核酸は、対照PPOコード核酸により提供されるベンゾオキサジノン誘導体系除草剤に対する耐性と比較して、少なくとも二倍（2フォールド）高いベンゾオキサジノン誘導体系除草剤に対する耐性を提供する。

【0014】

抵抗性又は耐性は、ステップa)のライブラリーの核酸配列を含むトランスジェニック植物を作製し、前記トランスジェニック植物と対照植物とを比較することによって決定することができる。

【0015】

別の目的は、ベンゾオキサジノン誘導体系除草剤に対して抵抗性又は耐性であるmut-PP0をコードする核酸を含有する植物又は藻類を同定する方法であって、

a)植物細胞又は緑藻類の培養液において有効量のベンゾオキサジノン誘導体系除草剤を同定するステップ、

b)前記植物細胞又は緑藻類を、突然変異誘発剤を用いて処理するステップ、

c)前記突然変異誘発細胞の集団と、a)において同定された有効量のベンゾオキサジノン誘導体系除草剤とを接触させるステップ

d)これらの試験条件で生存する少なくとも一つの細胞を選択するステップ、

e)ステップd)において選択された細胞由来のPPO遺伝子をPCR増幅及び配列決定し、このような配列と野生型のPPO遺伝子配列とをそれぞれ比較するステップ

を含むに言及する。

【0016】

好ましい実施形態において、突然変異誘発剤は、エチルメタンスルホン酸である。

【0017】

別の目的は、mut-PPOをコードする単離された核酸であって、上記の方法によって同定可能である核酸に言及する。

【0018】

別の実施形態において、本発明は、野生型若しくはmut-PPOの核酸により形質転換された植物細胞、又は野生型若しくはmut-PPOの核酸を発現する、好ましくは過剰発現する植物を得るような突然変異を起こした植物であって、植物細胞における核酸の発現が、野生型変種の植物細胞と比較して、ベンゾオキサジノン誘導体系除草剤に対する抵抗性又は耐性の増加をもたらす植物に言及する。

【0019】

別の実施形態において、本発明は、本発明による植物細胞を含む植物であって、植物における核酸の発現が、野生型変種の植物と比較して、ベンゾオキサジノン誘導体系除草剤に対する植物の抵抗性の増加をもたらすトランスジェニック植物に言及する。

【0020】

本発明の植物は、トランスジェニック植物であっても、又は非トランスジェニック植物であってもよい。

【0021】

好ましくは、植物における核酸の発現が、野生型変種の植物と比較して、ベンゾオキサジノン誘導体系除草剤に対する植物の増加した抵抗性をもたらす。

【0022】

別の実施形態において、本発明は、本発明の植物細胞を含むトランスジェニック植物により産生された種子であって、野生型変種の種子と比較してベンゾオキサジノン誘導体系除草剤に対する抵抗性の増加のための純粋育種である種子に言及する。

【0023】

別の実施形態において、本発明は、野生型変種の植物細胞と比較してベンゾオキサジノン誘導体系除草剤に対する抵抗性が増加したトランスジェニック植物細胞を作製する方法であって、野生型又はmut-PPO核酸を含む発現カセットにより植物細胞を形質転換するステップを含む方法に言及する。

10

20

30

40

50

【0024】

別の実施形態において、本発明は、(a)野生型又はmut-PPO核酸を含む発現カセットを用いて植物細胞を形質転換するステップ、及び(b)植物細胞から、ベンゾオキサジノン誘導体系除草剤に対する抵抗性が増加した植物を作製するステップを含む方法に言及する。

【0025】

好ましくは、発現カセットは、植物において機能性である転写開始制御領域及び翻訳開始制御領域をさらに含む。

【0026】

別の実施形態において、本発明は、選択可能なマーカーとして本発明のmut-PPOを使用することに関する。本発明は、形質転換された植物細胞、植物組織、植物又はこれらの一部を同定又は選択するための方法であって、a)形質転換された植物細胞、植物組織、植物又はこれらの一部を提供するステップであって、前記形質転換された植物細胞、植物組織、植物又はこれらの一部が以下に記載の本発明のmut-PPOポリペプチドをコードする単離された核酸を含み、このポリペプチドが選択マーカーとして使用され、前記形質転換された植物細胞、植物組織、植物又はこれらの一部が対象となる単離された核酸を場合によりさらに含み得るステップ、b)形質転換された植物細胞、植物組織、植物又はこれらの一部と、少なくとも一種のベンゾオキサジノン誘導体阻害化合物とを接触させるステップ、c)植物細胞、植物組織、植物又はこれらの一部が、阻害剤又は阻害化合物により影響を受けたかどうか決定するステップ、及びd)形質転換された植物細胞、植物組織、植物又はこれらの一部を同定又は選択するステップを含む方法を提供する。

【0027】

本発明は、また、本明細書に記載の突然変異を含有する、精製されたmut-PPOタンパク質において実施され、これらは除草剤耐性に対するさらなる改良を設計するための分子モデリング研究において有用である。タンパク質精製の方法は周知であり、市販の製品又は例えば、Protein Biotechnology、Walsh及びHeadon (Wiley、1994年)に説明されているような、特別に設計された方法を使用して容易に達成できる。

【図面の簡単な説明】

【0028】

【図1 - 1】図1は、ヒユモドキ (*Amaranthus tuberculatus* (A.tuberculatus))、耐性ヒユモドキ (*Amaranthus tuberculatus resistant* (A.tuberculatus_R))、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) long (A.thaliana_2)、ホウレンソウ (*Spinacia oleracea*) short (S.oleracea_2)、タバコ (*Nicotiana tabacum*) short (N.tabacum_2)、ダイズ (*Glycine max* (Glycine_max))、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) short (A.thaliana_1)、タバコ (*Nicotiana tabacum*) long (N.tabacum_1)、コナミドリムシ (*Chlamydomonas reinhardtii*) long (C.reinhardtii_1)、トウモロコシ (*Zea mays* (Z.mays))、イネ (*Oryza sativa* (O.sativa_1))、ジャガイモ (*Solanum tuberosum* (S.tuberosum))、キュウリ (*Cucumis sativus* (C.sativus))、チコリー (*Cichorium intybus* (C.intybus_1))、ホウレンソウ (*Spinacia oleracea*) long (S.oleracea_1)、ポリトメラ属の一種 (*Polytomella* sp.) Pringsheim 198.80 (*Polytomella*)のPPO配列のアミノ酸配列アラインメントを示す。保存された領域は、薄い灰色、灰色および黒で示す。

【図1 - 2】図1は、ヒユモドキ (*Amaranthus tuberculatus* (A.tuberculatus))、耐性ヒユモドキ (*Amaranthus tuberculatus resistant* (A.tuberculatus_R))、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) long (A.thaliana_2)、ホウレンソウ (*Spinacia oleracea*) short (S.oleracea_2)、タバコ (*Nicotiana tabacum*) short (N.tabacum_2)、ダイズ (*Glycine max* (Glycine_max))、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) short (A.thaliana_1)、タバコ (*Nicotiana tabacum*) long (N.tabacum_1)、コナミドリムシ (*Chlamydomonas reinhardtii*) long (C.reinhardtii_1)、トウモロコシ (*Zea mays* (Z.mays))、イネ (*Oryza sativa* (O.sativa_1))、ジャガイモ (*Solanum tuberosum* (S.tuberosum))、キュウリ (*Cucumis sativus* (C.sativus))、チコリー (*Cichorium intybus* (C.intybus_1))、ホウレンソウ (*Spinacia oleracea*) long (S.oleracea_1)、ポリトメラ属の

一種 (Polytomella sp.) Pringsheim 198.80 (Polytomella) の PPO 配列のアミノ酸配列アラインメントを示す。保存された領域は、薄い灰色、灰色および黒で示す。

【図 2】図 2 は、ベンゾオキサジノン誘導体 I.a.35 除草剤に抵抗性のコナミドリムシ (*Chlamydomonas reinhardtii*) 株の選択を示す。(A) 選択薬剤を含まない固体培地上に蒔いた変異誘発細胞。(B) 1×10^{-7} M ベンゾオキサジノン誘導体 I.a.35 を含有する固体培地上に蒔いた変異誘発細胞。ベンゾオキサジノン誘導体除草剤に抵抗性を持つ細胞は、コロニーを形成する (丸で囲んで番号 33、34、35 および 36 を付した) が、感受性の細胞は生育しない。プレート B より A の方がコロニー数が多いのは、プレート B 上のコロニーがベンゾオキサジノン誘導体 I.a.35 に対して抵抗性であることを示す。

【図 3】図 3 は、図 2 で見られるようにベンゾオキサジノン誘導体 I.a.35 除草剤に対して抵抗性を有する、選択されたコナミドリムシ (*Chlamydomonas reinhardtii*) 株の再増殖を示す。(A) 選択薬剤を含有しない液体培地中の野生型細胞。(B) ベンゾオキサジノン誘導体 I.a.35 を増加させて含有する (1×10^{-9} - 5×10^{-6} M) 液体培地中の野生型細胞。(C) 選択薬剤を含まない液体培地中の変異誘発細胞。(D1、D2、E1、E2) ベンゾオキサジノン誘導体 I.a.35 を、濃度を上げて含有する (1×10^{-9} - 5×10^{-6} M) 液体培地中の、変異誘発選択細胞。ベンゾオキサジノン誘導体 I.a.35 除草剤に抵抗性の株は生育し、増殖を示す濃い色となる。感受性株は生育せず、薄い色のままである。増殖細胞を含む液体培地中では、細胞密度が高いほど、濃い色をもたらす。培養物の密度が低いほど、色が薄く、または完全に透明に見える。

【発明を実施するための形態】

【0029】

配列リスト

10

20

【表1】

配列番号	内容	生物	遺伝子	登録番号:
1	PPO 核酸	ヒユ属 (Amaranthus)	PPX2L_WC	DQ386114
2	PPO アミノ酸	ヒユ属 (Amaranthus)		ABD52326
3	PPO 核酸	ヒユ属 (Amaranthus)	PPX2L_AC	DQ386117
4	PPO アミノ酸	ヒユ属 (Amaranthus)		ABD52329
5	PPO 核酸	ヒユ属 (Amaranthus)	PPX2L_CC_R	DQ386118
6	PPO アミノ酸	ヒユ属 (Amaranthus)		ABD52330
7	PPO 核酸	ヒユ属 (Amaranthus)	PPX2L_AC_R	DQ386116
8	PPO アミノ酸	ヒユ属 (Amaranthus)		ABD52328
9	PPO 核酸	シロイヌナズナ属 (Arabidopsis)	PPX	AB007650
10	PPO アミノ酸	シロイヌナズナ属 (Arabidopsis)		BAB08301
11	PPO 核酸	タバコ属 (Nicotiana)	ppxI	AF044128
12	PPO アミノ酸	タバコ属 (Nicotiana)		AAD02290
13	PPO 核酸	キクニガナ属 (Cichorium)	PPX1	AF160961
14	PPO アミノ酸	キクニガナ属 (Cichorium)		AF160961_1
15	PPO 核酸	ハウレンソウ属 (Spinacia)	SO-POX1	AB029492
16	PPO アミノ酸	ハウレンソウ属 (Spinacia)		BAA96808
17	PPO 核酸	ハウレンソウ属 (Spinacia)	SO-POX2	AB046993
18	PPO アミノ酸	ハウレンソウ属 (Spinacia)		BAB60710
19	PPO 核酸	ナス属 (Solanum)	PPOX	AJ225107
20	PPO アミノ酸	ナス属 (Solanum)		CAA12400
21	PPO 核酸	トウモロコシ属 (Zea)	ZM_BFc0091B03	BT063659
22	PPO アミノ酸	トウモロコシ属 (Zea)		ACN28356
23	PPO 核酸	トウモロコシ属 (Zea)	prpo2	NM_001111534
24	PPO アミノ酸	トウモロコシ属 (Zea)		NP_001105004
25	PPO 核酸	クラミドモナス属 (Chlamydomonas)	Ppx1	AF068635
26	PPO アミノ酸	クラミドモナス属 (Chlamydomonas)		AAC79685
27	PPO 核酸	ポリトメラ属 (Polytomella)	PPO	AF332964
28	PPO アミノ酸	ポリトメラ属 (Polytomella)		AF332964_1
29	PPO 核酸	モロコシ属 (Sorghum)	Hyp. Protein	XM_002446665
30	PPO アミノ酸	モロコシ属 (Sorghum)		XP_002446710
31	PPO 核酸	クロレラ属 (Chlorella)		
32	PPO アミノ酸	クロレラ属 (Chlorella)		51538
33	PPO 核酸	イネ属 (Oryza)	PPOX1	AB057771
34	PPO アミノ酸	イネ属 (Oryza)		BAB39760
35	PPO 核酸	ヒユ属 (Amaranthus)	PPX2	DQ386113

10

20

30

40

36	PP0 アミノ酸	ヒユ属 (Amaranthus)		ABD52325
37	PP0 核酸	シロイヌナズナ属 (Arabidopsis)	PPOX	NM_178952
38	PP0 アミノ酸	シロイヌナズナ属 (Arabidopsis)		NP_849283
39	PP0 核酸	タバコ属 (Nicotiana)	ppxII	AF044129
40	PP0 アミノ酸	タバコ属 (Nicotiana)		AAD02291
41	PP0 核酸	ダイズ属 (Glycine)	hemG	AB025102
42	PP0 アミノ酸	ダイズ属 (Glycine)		BAA76348
43	PP0 核酸	キュウリ属 (Cucumis)	CsPPO	AB512426
44	PP0 アミノ酸	キュウリ属 (Cucumis)		BAH84864.1
45	PP0 核酸	イネ属 (Oryza)	Hyp. Protein	AL606613
46	PP0 アミノ酸	イネ属 (Oryza)		CAE01661

10

【0030】

詳細な説明

本明細書において使用される冠詞「a」及び「an」は、冠詞の文法的目的語の一つ又は複数(すなわち、少なくとも一つ)を指す。例としては、「ある要素(an element)」は一つ又は複数の要素を意味する。

20

【0031】

本明細書において使用する場合、「含む(comprising)」という単語又は「含む(comprises)」若しくは「含む(comprising)」などの変形は、述べられた要素、整数若しくはステップ、又は要素、整数若しくはステップの群を組み入れるが、任意の他の要素、整数若しくはステップ、又は要素、整数若しくはステップの群の除外を意味するものではないことは理解されるであろう。

【0032】

本発明は、植物栽培地域における望ましくない植生を防除する方法であって、
 a)前記地域において、ベンゾオキサジノン誘導体系除草剤に対して抵抗性若しくは耐性である、野生型プロトポルフィリノゲンオキシダーゼ(PP0)若しくは突然変異プロトポルフィリノゲンオキシダーゼ(mut-PP0)をコードするヌクレオチド配列、及び/又はを含む少なくとも一種の核酸を含む植物を提供するステップ、
 b)前記地域に、有効量の前記除草剤を適用するステップを含む方法に言及する。

30

【0033】

「望ましくない植生の防除(抑制)」という用語は、雑草の死滅及び/又は、さもなければ雑草の正常な成長の遅延若しくは阻害の意味として理解されるべきである。最も広い意味において、雑草は、その植物が望ましくない場所において成長する、すべての植物を意味すると理解される。本発明の雑草は、例えば、双子葉植物及び単子葉植物の雑草を含む。双子葉植物の雑草は、限定するものではないが、下記の属の雑草を含む:シロガラシ属(Sinapis)、マメグンバイナズナ属(Lepidium)、ヤエムグラ属(Galium)、ハコベ属(Stellaria)、シカギク属(Matricaria)、ローマカツミレ属(Anthemis)、コゴメギク属(Galinisga)、アカザ属(Chenopodium)、イラクサ属(Urtica)、キオン属(Senecio)、ヒユ属(Amaranthus)、スベリヒユ属(Portulaca)、オモナミ属(Xanthium)、セイヨウヒルガオ属(Convulvulus)、サツマイモ属(Ipomoea)、タデ属(Polygonum)、ツノクサネム属(Sesbania)、ブタクサ属(Ambrosia)、アザミ属(Cirsium)、ヒレアザミ属(Carduus)、ノゲシ属(Sonchus)、ナス属(Solanum)、イヌガラシ属(Rorippa)、キカシグサ属(Rotala)、アゼナ属(Lindernia)、オドリコソウ属(Lamium)、クワガタソウ属(Veronica)、イチビ属(Abutilon)、エメクス属(Emex)、チョウセンアサガオ属(Datura)、スミレ属(Viola)、チシマオドリコ属(Galeopsis)、ケシ属(Papaver)、ヤグルマギク属(Centaurea)、シャジクソウ属(Trifolium)、

40

50

キンポウゲ属(*Ranunculus*)及びタンポポ属(*Taraxacum*)。単子葉植物の雑草は、限定するものではないが、下記の属の雑草を含む:ヒエ属(*Echinochloa*)、エノコログサ属(*Setaria*)、キビ属(*Panicum*)、メシヒバ属(*Digitaria*)、アワガエリ属(*Phleum*)、イチゴツナギ属(*Poa*)、ウシノケグサ属(*Festuca*)、オシヒバ属(*Eleusine*)、ビロソキ属(*Brachiaria*)、ソクムギ属(*Lolium*)、スズメノチャヒキ属(*Bromus*)、カラスムギ属(*Avena*)、カヤツリグサ属(*Cyperus*)、モロコシ属(*Sorghum*)、カモジグサ属(*Agropyron*)、ギョウギシバ属(*Cynodon*)、ミズアオイ属(*Monochoria*)、テンツキ属(*Fimbristylis*)、オモダカ属(*Sagittaria*)、ハリイ属(*Eleocharis*)、ホタルイ属(*Scirpus*)、スズメノヒエ属(*Paspalum*)、カモノハシ属(*Ischaemum*)、ナガボノウルシ属(*Sphenoclea*)、タツノツメガヤ属(*Dactyloctenium*)、コヌカグサ属(*Agrostis*)、スズメノテッポウ属(*Alopecurus*)及びアペラ属(*Apera*)。加えて、本発明の雑草は、例えば、望ましくない場所において成長する作物を含み得る。例えば、大豆植物の畑においてトウモロコシ植物が望ましくない場合、大豆植物を優勢に含む畑に存在する自生のトウモロコシ植物は、雑草と考えることができる。

【0034】

「植物」という用語は、最も広い意味において、有機材料に属し、植物界のメンバーである真核生物を包含することが意図され、これらの例は、限定するものではないが、維管束植物、野菜、穀物、花、樹木、ハーブ、灌木、牧草、蔓植物、シダ、コケ、菌類及び藻など並びに分枝系、側枝、並びに無性繁殖に使用される植物の一部(例えば、挿し穂、パイピング(*pipings*)、シュート、根茎、地下茎、木立、樹冠、球根、鱗茎、塊茎、根茎、組織培養において作製された植物/組織など)を含む。「植物」という用語は、全植物、植物の祖先及び子孫並びに種子、シュート、茎、葉、根(塊茎を含む)、花、小花、果実、小花柄、花柄、雄ずい、葯、柱頭、花柱、子房、花弁、萼片、心皮、根端、根冠、根毛、葉毛、種子毛、花粉粒、小孢子、子葉、胚軸、上胚軸、木部、師部、柔組織、内胚乳、伴細胞、孔辺細胞を含む植物の一部並びに植物の任意の他の公知の器官、組織及び細胞並びに組織及び器官をさらに包含し、前述のそれぞれが対象となる遺伝子/核酸を含むものとして使用される。「植物」という用語はまた、植物細胞、懸濁培養液、カルス組織、胚、成長点領域、配偶体、孢子体、花粉及び小孢子を包含し、これらもまた前述のそれぞれが対象となる遺伝子/核酸を含む。

【0035】

本発明の方法において特に有用な植物は、カエデ属の種(*Acer* spp.)、マタタビ属の種(*Actinidia* spp.)、トロロアオイ属の種(*Abelmoschus* spp.)、サイザルアサ(*Agave sisalana*)、カモジグサ属の種(*Agropyron* spp.)、ハイコヌカグサ(*Agrostis stolonifera*)、アリウム属の種(*Allium* spp.)、ヒユ属の種(*Amaranthus* spp.)、アンモフィラ・アレナリア(*Ammophila arenaria*)、パイナップル(*Ananas comosus*)バンレイシ属の種(*Annona* spp.)、セロリ(*Apium graveolens*)、ラッカセイ属の種(*Arachis* spp.)、パンノキ属の種(*Artocarpus* spp.)、アスパラガス(*Asparagus officinalis*)、カラスムギ属の種(*Avena* spp.) (例えば、エンバク(*Avena sativa*)、カラスムギ(*Avena fatua*)、レッドオート(*Avena byzantina*)、アベナ・ファツア var. サチバ(*Avena fatua* var. *sativa*)、アベナ・ヒブリダ(*Avena hybrida*)、スターフルーツ(*Averrhoa carambola*)、ホウライチク属の種(*Bambusa* sp.)、トウガン(*Benincasa hispida*)、ブラジルナッツ(*Bertholletia excelsa*)、サトウダイコン(*Beta vulgaris*)、アブラナ属の種(*Brassica* spp.) (例えば、セイヨウアブラナ(*Brassica napus*)、カブ属の種(*Brassica rapa* ssp.) [キャノーラ、アブラナ、ナバナ(*turnip rape*)]、カダバ・ファリノーサ(*Cadaba farinosa*)、チャノキ(*Camellia sinensis*)、カンナ・インディカ(*Canna indica*)、アサ(*Cannabis sativa*)、トウガラシ属の種(*Capsicum* spp.)、カレックス・エラータ(*Carex elata*)、パパイヤ(*Carica papaya*)、カリッサ・マクロカルパ(*Carissa macrocarpa*)、ペカン属の種(*Carya* spp.)、ベニバナ(*Carthamus tinctorius*)、クリ属の種(*Castanea* spp.)、パンヤノキ(*Ceiba pentandra*)、エンダイブ(*Cichorium endivia*)、ニッケイ属の種(*Cinnamomum* spp.)、スイカ(*Citrullus lanatus*)、シトラス属の種(*Citrus* spp.)、ココス属の種(*Cocos* spp.)、コーヒーノキ属の種(*Coffea* spp.)、サトイモ(*Colocasia esculenta*)、コラノキ属の種(*Cola* spp.)、シナノキツナソ属

の種(*Corchorus* sp.)、コリアンダー(*Coriandrum sativum*)、ハシバミ属の種(*Corylus* sp.
 p.)、サンザシ属の種(*Crataegus* spp.)、サフラン(*Crocus sativus*)、カボチャ属の種(*Cu
 curbita* spp.)、キュウリ属の種(*Cucumis* spp.)、チョウセンアザミ属の種(*Cynara* spp.)
 、ニンジン(*Daucus carota*)、ヌスビトハギ属の種(*Desmodium* spp.)、リュウガン(*Dimoca
 rpus longan*)、ヤマノイモ属の種(*Dioscorea* spp.)、カキノキ属の種(*Diospyros* spp.)、
 ヒエ属の種(*Echinochloa* spp.)、アブラヤシ属(*Elaeis*) (例えば、ギニアアブラヤシ(*Elae
 is guineensis*)、アメリカアブラヤシ(*Elaeis oleifera*))、エレウシン・コラカナ(*Eleus
 ine coracana*)、エラグロスティス・テフ(*Eragrostis tef*)、エリアンサス属の種(*Eriant
 hus* sp.)、ピワ(*Eriobotrya japonica*)、ユーカリ属の種(*Eucalyptus* sp.)、ピタンガ(*Eu
 genia uniflora*)、ソバ属の種(*Fagopyrum* spp.)、ブナ属の種(*Fagus* spp.)、オニウシノ
 ケグサ(*Festuca arundinacea*)、イチジク(*Ficus carica*)、キンカン属の種(*Fortunella s
 pp.*)、フラガリア属の種(*Fragaria* spp.)、ギンコ・ビローバ(*Ginkgo biloba*)、グリシン
 属の種(*Glycine* spp.) (例えば、ダイズ、ソヤ・ヒスピダ又はソヤ・マックス)、ワタ(*Gos
 sypium hirsutum*)、ヒマワリ属の種(*Helianthus* spp.) (例えば、ヒマワリ(*Helianthus an
 nuus*)、ノカンゾウ(*Hemerocallis fulva*)、ハイビスカス属の種(*Hibiscus* spp.)、オオム
 ギ属の種(*Hordeum* spp.) (例えば、オオムギ(*Hordeum vulgare*)、サツマイモ(*Ipomoea bat
 atas*)、クルミ属の種(*Juglans* spp.)、レタス(*Lactuca sativa*)、ラチルス属の種(*Lathyr
 us* spp.)、レンズマメ(*Lens culinaris*)、アマ(*Linum usitatissimum*)、レイシ(*Litchi c
 hinensis*)、ハス属の種(*Lotus* spp.)、トカドヘチマ(*Luffa acutangula*)、ルピナス属の
 種(*Lupinus* spp.)、ルズラ・シルバチカ(*Luzula sylvatica*)、トマト属の種(*Lycopersico
 n* spp.) (例えば、リコベルシコン・エスクレントム(*Lycopersicon esculentum*)、リコベ
 ルシコン・リコベルシカム(*Lycopersicon lycopersicum*)、リコベルシコン・ピリフォル
 メ(*Lycopersicon pyriforme*)、マクロチローマ属の種(*Macrotyloma* spp.)、リンゴ属の種
 (*Malus* spp.)、アセロラ(*Malpighia emarginata*)、マミーアップル(*Mammea americana*)、
 マンゴー(*Mangifera indica*)、キャッサバ属の種(*Manihot* spp.)サボジラ(*Manilkara zap
 ota*)、ムラサキウマゴヤシ(*Medicago sativa*)、シナガワハギ属の種(*Melilotus* spp.)、
 ハッカ属の種(*Mentha* spp.)、ススキ(*Miscanthus sinensis*)、ツルレイシ属の種(*Momordi
 caspp.*)、クロミグワ(*Morus nigra*)、パショウ種(*Musa* spp.)、タバコ種(*Nicotiana* spp.
)、オリーブ属種(*Olea* spp.)、オープンティア属の種(*Opuntia* spp.)、オルニトプス属の種
 (*Ornithopus* spp.)、オリザ属の種(*Oryza* spp.) (例えば、イネ、オリザ・ラティフォリア
 (*Oryza latifolia*))、キビ(*Panicum miliaceum*)、スイッチグラス(*Panicum virgatum*)、
 パッションフルーツ(*Passiflora edulis*)、パースニップ(*Pastinaca sativa*)、チカラシ
 バ属の種(*Pennisetum* sp.)、ワニナシ属の種(*Persea* spp.)、イタリアンパセリ(*Petrosel
 inum crispum*)、クサヨシ(*Phalaris arundinacea*)、インゲンマメ属の種(*Phaseolus* spp.
)、オオアワガエリ(*Phleum pratense*)、ナツメヤシ属の種(*Phoenix* spp.)、ヨシ(*Phragmi
 tes australis*)、ホオズキ属の種(*Physalis* spp.)、マツ属の種(*Pinus* spp.)、ピスタチ
 オ(*Pistacia vera*)、エンドウ属の種(*Pisum* spp.)、イチゴツナギ属の種(*Poa* spp.)、ハ
 コヤナギ属の種(*Populus* spp.)、プロソピス属の種(*Prosopis* spp.)、サクラ属の種(*Prun
 us* spp.)、パンジロウ属の種(*Psidium* spp.)、ザクロ(*Punica granatum*)、セイヨウナシ(
Pyrus communis)、コナラ属の種(*Quercus* spp.)、ラディッシュ(*Raphanus sativus*)、シ
 ョクヨウダイオウ(*Rheum rhabarbarum*)、スグリ属の種(*Ribes* spp.)、トウゴマ(*Ricinus
 communis*)、キイチゴ属の種(*Rubus* spp.)、サトウキビ属の種(*Saccharum* spp.)、ヤナギ
 属の種(*Salix* sp.)、ニワトコ属の種(*Sambucus* spp.)、ライムギ(*Secale cereale*)、ゴマ
 属の種(*Sesamum* spp.)、シナピス属の種(*Sinapis* sp.)、ナス属の種(*Solanum* spp.) (例え
 ば、ジャガイモ(*Solanum tuberosum*)、ヒラナス(*Solanum integrifolium*)又はトマト(*Sol
 anum lycopersicum*))、モロコシ(*Sorghum bicolor*)、ホウレンソウ属の種(*Spinacia* spp.
)、シジジウム属の種(*Syzygium* spp.)、マンジュギク属の種(*Tagetes* spp.)、タマリンデ
 ィス・インディカ(*Tamarindus indica*)、テオブロマ・カカオ(*Theobroma cacao*)、トリフ
 オリウム属の種(*Trifolium* spp.)、トリプサカム・ダクチロイデス(*Tripsacum dactyloides*)、
 トリチコセケル・リンパウイ(*Triticosecale rimpai*)、コムギ属の種(*Triticum* sp

10

20

30

40

50

p.) (例えば、コムギ、デュラムコムギ(*Triticum durum*)、リベットコムギ(*Triticum turgidum*)、トリチカム・ヒベルナム(*Triticum hybernum*)、トリチカム・マチャ(*Triticum macha*)、トリチカム・サチバム(*Triticum sativum*)、マカロニコムギ(*Triticum monococcum*)又はトリチカム・バルガレ(*Triticum vulgare*))、トロパエオルム・ミヌス(*Tropaeolum minus*)、トロパエオルム・マジヤス(*Tropaeolum majus*)、スノキ属の種(*Vaccinium* spp.)、ソラマメ属の種(*Vicia* spp.)、ササゲ属の種(*Vigna* spp.)、ニオイスマレ(*Viola odorata*)、ブドウ属の種(*Vitis* spp.)、トウモロコシ、ワイルドライス(*Zizania palustris*)、ナツメ属の種(*Zizphus* spp.)、アマランス、アーティチョーク、アスパラガス、ブロッコリ、芽キャベツ、キャベツ、キャノーラ、ニンジン、カリフラワー、セロリ、コラードグリーン、アマ、ケール、レンズマメ、アブラナ、オクラ、タマネギ、ジャガイモ、イネ、大豆、イチゴ、テンサイ、サトウキビ、ヒマワリ、トマト、カボチャ、茶及び藻などを含むリストから選択される、上科の緑色植物亜界に属するすべての植物、特に、飼葉若しくはマメ科牧草を含む単子葉植物及び双子葉植物、観賞植物、食用作物、樹木若しくは低木を含む。本発明の好ましい実施形態に従って、植物は作物である。作物の例は、特に、大豆、ヒマワリ、キャノーラ、アルファルファ、ナタネ、ワタ、トマト、ジャガイモ又はタバコを含む。さらに好ましくは、植物は、サトウキビなどの単子葉植物である。さらに好ましくは、植物は、イネ、トウモロコシ、小麦、大麦、雑穀、ライ麦、モロコシ又はオート麦などの穀類である。

10

【0036】

好ましい実施形態において、植物は、これ以下により詳細に記載のように、野生型若しくはmut-PP0の導入遺伝子を導入又は過剰発現させることにより植物を組換えによって調製するステップを含む方法によってあらかじめ作製されている。

20

【0037】

別の好ましい実施形態において、植物は、in situで植物細胞を突然変異誘発させ、mut-PP0を発現する植物細胞を得るステップを含む方法によってあらかじめ作製されている。

【0038】

本明細書に開示するように、本発明の核酸は、それらのゲノム中に除草剤-耐性の野生型若しくはmut-PP0のタンパク質をコードする遺伝子を含む植物の、除草剤耐性の強化への使用が見出される。これ以下に記載のように、このような遺伝子は、内因性遺伝子であっても、又は導入遺伝子であってもよい。さらに、特定の実施形態において本発明の核酸は、所望の表現型を有する植物を創造するために、対象となるポリヌクレオチド配列の任意の組み合わせで積み重ねられてもよい。例えば、本発明の核酸は、殺有害生物性及び/又は殺虫性の活性を有するポリペプチド、例えば、バチルス・チューリングエンシス(*Bacillus thuringiensis*)毒タンパク質などをコードする任意の他のポリヌクレオチドを積み重ねてもよい(米国特許第5,366,892号、第5,747,450号、第5,737,514号、第5,723,756号、第5,593,881号及びGeiserら(1986年) Gene 48: 109に記載)。作製された組み合わせは、対象となるポリヌクレオチドの任意の一つの複数のコピーをさらに含んでいてよい。

30

【0039】

特に好ましい実施形態において、植物は、例えば5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素(EPSPS)、グリホセートアセチルトランスフェラーゼ(GAT)、チトクロームP450、ホスフィノトリシン(phosphinothricin)アセチルトランスフェラーゼ(PAT)、アセトヒドロキシ酸合成酵素(AHAS; EC4.1.3.18、アセト乳酸合成酵素若しくはALSとしても公知)、ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ(HPPD)、フィトエンデサチユラーゼ(PD)及びWO 02/068607に開示のジカンバ(dicamba)分解酵素またはWO 2008141154若しくはWO 2005107437に開示されているフェノキシ酢酸およびフェノキシプロピオン酸誘導体分解酵素からなる群から選択される除草剤耐性酵素をコードするヌクレオチド配列を含む少なくとも一種の追加の異種核酸を含む。

40

【0040】

概して、「除草剤」という用語は、死滅、防除又はさもなければ植物の成長を不利に修正する有効成分を意味するために本明細書において使用される。除草剤の好ましい量又は

50

濃度は、「有効量」又は「有効濃度」である。「有効量」及び「有効濃度」は、それぞれ同様の野生型、植物、植物組織、植物細胞又は宿主細胞の成長を死滅又は阻害するために十分であるが、前記量が本発明の除草剤抵抗性の植物、植物組織、植物細胞及び宿主細胞の成長を死滅又は激しく阻害しない量及び濃度を意図する。通常、有効量の除草剤は、対象となる雑草を死滅させるために農業生産系において日常的に使用される量である。このような量は、当業者には公知である。成長の任意の段階又は植え付け若しくは出芽前に植物又は植物遺伝子座に直接用いた場合、除草剤の活性は、本発明のベンゾオキサジノン誘導体系除草剤により示される。観察される効果は、防除される植物種、植物の成長段階、希釈及びスプレー液滴サイズの適用パラメーター、固体成分の粒径、使用時の環境条件、用いる具体的な化合物、用いる具体的なアジュバント及び担体、土壌の型など、並びに用いる化学物質に依存する。これら及び他の因子は、当分野において公知のように調整可能であり、非選択性又は選択性除草剤の作用を促進する。概して、ベンゾオキサジノン誘導体系除草剤を出芽後に、比較的未熟な望ましくない植生に適用し、雑草の最大防除を達成することが好ましい。

10

【0041】

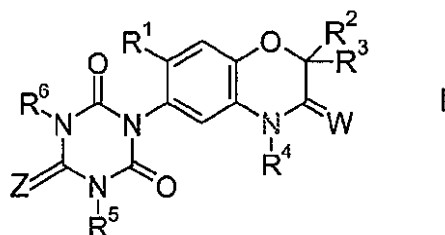
「除草剤耐性」又は「除草剤抵抗性」の植物は、正常な又は野生型の植物の成長を正常に死滅又は阻害すると思われるレベルで、少なくとも一種の除草剤に耐性又は抵抗性である植物を意図する。PPO活性に干渉されることが公知である少なくとも一種の除草剤の存在下、及び野生型mut-PPOタンパク質のPPO活性を阻害することが公知である除草剤の濃度又はレベルの場合、「除草剤耐性mut-PPOタンパク質」又は「除草剤抵抗性mut-PPOタンパク質」は、このようなmut-PPOタンパク質が、野生型mut-PPOタンパク質のPPO活性と比較して、より高いPPO活性を示すことを意図する。さらに、このような除草剤耐性又は除草剤抵抗性のmut-PPOタンパク質のPPO活性は、本明細書において「除草剤耐性」又は「除草剤抵抗性」のPPO活性と称することができる。

20

【0042】

本発明の「ベンゾオキサジノン誘導体系除草剤」は、下記に示すような式Iのベンゾオキサジノンを含む：

【化1】



30

【0043】

式中

R¹は水素もしくはハロゲンである；

R²はハロゲンである；

R³は水素もしくはハロゲンである；

R⁴は水素、C₁-C₆-アルキル、C₁-C₆-ハロアルキル、C₃-C₆-シクロアルキル、C₃-C₆-アルケニル、C₃-C₆-ハロアルケニル、C₃-C₆-アルキニル、C₃-C₆-ハロアルキニル、C₁-C₆-アルコキシ、もしくはC₃-C₆-シクロアルキル-C₁-C₆-アルキルである；

40

R⁵は水素、NH₂、C₁-C₆-アルキル、もしくはC₃-C₆-アルキニルである；

R⁶は水素もしくはC₁-C₆-アルキルである；ならびに

WはOもしくはSである；

ZはOもしくはSである。

【0044】

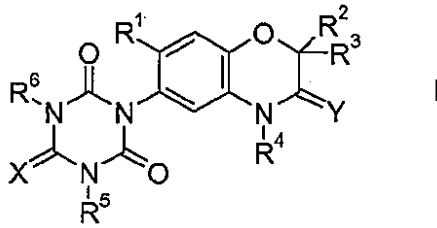
別の好ましい実施形態において、本発明の「ベンゾオキサジノン誘導体系除草剤」は、下記のA)に示すような式Iのベンゾオキサジノン、およびB)から選択される少なくとも1つの

50

他の活性化化合物、およびC)毒性緩和剤を含む：

A) 式Iの少なくとも1つのベンゾオキサジノン

【化2】



10

【0045】

式中

R¹は水素もしくはハロゲンである；

R²はハロゲンである；

R³は水素もしくはハロゲンである；

R⁴は水素、C₁-C₆-アルキル、C₁-C₆-ハロアルキル、C₃-C₆-シクロアルキル、C₃-C₆-アルケニル、C₃-C₆-ハロアルケニル、C₃-C₆-アルキニル、C₃-C₆-ハロアルキニル、C₁-C₆-アルコキシ、もしくはC₃-C₆-シクロアルキル-C₁-C₆-アルキルである；

R⁵は水素、NH₂、C₁-C₆-アルキル、もしくはC₃-C₆-アルキニルである；

R⁶は水素もしくはC₁-C₆-アルキルである：ならびに

20

XはOもしくはSである；

YはOもしくはSである；

B) 分類群b1)からb15)までの除草剤：

b1) 脂質生合成阻害剤；

b2) アセト乳酸合成酵素阻害剤（ALS阻害剤）；

b3) 光合成阻害剤；

b4) プロトポルフィリノーゲンIXオキシダーゼ阻害剤；

b5) 白化除草剤；

b6) エノールピルビルシキミ酸3-リン酸合成酵素阻害剤（EPSP阻害剤）；

b7) グルタミン合成酵素阻害剤；

30

b8) 7,8-ジヒドロプテロイン酸合成酵素阻害剤（DHP阻害剤）；

b9) 有糸分裂阻害剤；

b10) 超長鎖脂肪酸合成阻害剤（VLCFA阻害剤）；

b11) セルロース生合成阻害剤；

b12) 脱共役剤除草剤；

b13) オーキシシン除草剤；

b14) オーキシシン移動阻害剤；ならびに

b15) 下記からなる一群から選択される他の除草剤：プロモブチド、クロルフルレノール、クロルフルレノール-メチル、シンメチリン、クミルロン、ダラボン、ダゾメット、ジフェンゾコート、ジフェンゾコートメチルスルファート（difenzoquat-metilsulfate）、ジメチピン、DSMA、ダイムロン、エンドタールおよびその塩、エトベンザニド、フラムプロップ、フラムプロップ-イソプロピル、フラムプロップ-メチル、フラムプロップ-M-イソプロピル、フラムプロップ-M-メチル、フルレノール、フルレノール-ブチル、フルルプリミドール、ホサミン、ホサミン-アンモニウム、インダノファン、インダジフラム、マレイン酸ヒドラジド、メフルイジド、メタム、アジ化メチル、臭化メチル、メチル-ダイムロン、ヨウ化メチル、MSMA、オレイン酸、オキサジクロメホン、ペラルゴン酸、ピリプチカルブ、キノクラミン、トリアジフラム、トリジファン、ならびに6-クロロ-3-(2-シクロプロピル-6-メチルフェノキシ)-4-ピリダジノール(CAS 499223-49-3) およびその塩およびエステル。

40

【0046】

50

本発明に有用なベンゾオキサジノン誘導体除草剤は、除草作用のある作物保護組成物の形をとる組成物とすることができるが、これは除草剤として有効な量の活性化合物配合剤を含むものであって、それは少なくとも1つの式Iのベンゾオキサジノン、および除草剤Bから選択される少なくとも1つの他の化合物、および毒性緩和剤Cを上記のように含有し、さらにまた少なくとも1つの液体および/または固体担体、および/または1つもしくは複数の界面活性剤、ならびに、必要ならば、作物保護組成物に通常使用される1つもしくは複数の追加の補助剤も含有するものである。

【0047】

さらに、本発明に有用なベンゾオキサジノン誘導体除草剤は、1成分組成物として調剤された、作物保護組成物の形をとる組成物とすることもできるが、これは活性化合物配合剤を含むものであって、それは少なくとも1つの式Iのベンゾオキサジノン、および除草剤Bから選択される少なくとも1つの他の活性化合物、および毒性緩和剤Cを含有し、さらに少なくとも1つの固体および/または液体担体、および/または1つもしくは複数の界面活性剤、ならびに、必要ならば、作物保護組成物のために通常使用される1つもしくは複数の追加の補助剤を含有するものである。

【0048】

さらに、本発明に有用なベンゾオキサジノン誘導体除草剤は、2成分組成物として調剤された、作物保護組成物の形をとる組成物とすることもできるが、これは、少なくとも1つの式Iのベンゾオキサジノン、固体もしくは液体担体、および/または1つもしくは複数の界面活性剤を含有する第1成分、ならびに除草剤Bから選択される少なくとも1つの他の活性化合物、および毒性緩和剤C、および固体もしくは液体担体、および/または1つもしくは複数の界面活性剤を含有する第2成分を含有するものであって、この2つの成分はいずれも、作物保護組成物のために通常使用される追加の補助剤をさらに含有していてもよい。

【0049】

本明細書に記載の式Iのベンゾオキサジノンが、幾何異性体、たとえばE/Z異性体を形成しうるならば、純粋な異性体およびそれらの混合物をいずれも、本発明の組成物に使用することができる。

【0050】

本明細書に記載の式Iのベンゾオキサジノンが、1つもしくは複数の不斉中心を有しており、その結果、鏡像異性体またはジアステレオマーとして存在するならば、純粋な鏡像異性体およびジアステレオマー、ならびにそれらの混合物はいずれも、本発明の組成物に使用することができる。

【0051】

変更可能な基、 R^1 から R^6 の定義で言及される有機部分は、ハロゲンという用語のように、それぞれの基を構成するものを個別に列挙したものに対する総称である。ハロゲンという用語は、いずれの場合も、フッ素、塩素、臭素、またはヨウ素を表す。すべての炭化水素鎖、すなわちすべてのアルキルは、直鎖もしくは分岐とすることができ、 C_n-C_m の添え字は、いずれの場合も、その基の、可能性のある炭素原子数を示す。

【0052】

そうした意味の例は下記の通りである：

- C_1-C_4 -アルキル、および C_3-C_6 -シクロアルキル- C_1-C_4 -アルキルの C_1-C_4 -アルキル部分：たとえば CH_3 、 C_2H_5 、 n -プロピルおよび $CH(CH_3)_2$ 、 n -ブチル、 $CH(CH_3)-C_2H_5$ 、 $CH_2-CH(CH_3)_2$ および $C(CH_3)_3$ ；

- C_1-C_6 -アルキル、および C_1-C_6 -アルコキシ- C_1-C_6 -アルキルの C_1-C_6 -アルキル部分：上記の C_1-C_4 -アルキル、ならびに、たとえば n -ペンチル、1-メチルブチル、2-メチルブチル、3-メチルブチル、2,2-ジメチルプロピル、1-エチルプロピル、 n -ヘキシル、1,1-ジメチルプロピル、1,2-ジメチルプロピル、1-メチルペンチル、2-メチルペンチル、3-メチルペンチル、4-メチルペンチル、1,1-ジメチルブチル、1,2-ジメチルブチル、1,3-ジメチルブチル、2,2-ジメチルブチル、2,3-ジメチルブチル、3,3-ジメチルブチル、1-エチルブチ

10

20

30

40

50

ル、2-エチルブチル、1,1,2-トリメチルプロピル、1,2,2-トリメチルプロピル、1-エチル-1-メチルプロピルもしくは1-エチル-2-メチルプロピル、好ましくはメチル、エチル、n-プロピル、1-メチルエチル、n-ブチル、1,1-ジメチルエチル、n-ペンチル、もしくはn-ヘキシル；

- C₁-C₄-ハロアルキル：フッ素、塩素、臭素、および/またはヨウ素により、部分的もしくは完全に置換された、上記のC₁-C₄-アルキル基、たとえば、クロロメチル、ジクロロメチル、トリクロロメチル、フルオロメチル、ジフルオロメチル、トリフルオロメチル、クロロフルオロメチル、ジクロロフルオロメチル、クロロジフルオロメチル、プロモメチル、ヨードメチル、2-フルオロエチル、2-クロロエチル、2-プロモエチル、2-ヨードエチル、2,2-ジフルオロエチル、2,2,2-トリフルオロエチル、2-クロロ-2-フルオロエチル、2-クロロ-2,2-ジフルオロエチル、2,2-ジクロロ-2-フルオロエチル、2,2,2-トリクロロエチル、ペンタフルオロエチル、2-フルオロプロピル、3-フルオロプロピル、2,2-ジフルオロプロピル、2,3-ジフルオロプロピル、2-クロロプロピル、3-クロロプロピル、2,3-ジクロロプロピル、2-プロモプロピル、3-プロモプロピル、3,3,3-トリフルオロプロピル、3,3,3-トリクロロプロピル、2,2,3,3,3-ペンタフルオロプロピル、ヘプタフルオロプロピル、上記のC₁-C₃-ハロアルキル基、ならびに、さらに、たとえば1-(フルオロメチル)-2-フルオロエチル、1-(クロロメチル)-2-クロロエチル、1-(プロモメチル)-2-プロモエチル、4-フルオロブチル、4-クロロブチル、4-プロモブチル、ノナフルオロブチル、1,1,2,2,-テトラフルオロエチル、および1-トリフルオロメチル-1,2,2,2-テトラフルオロエチル；

- C₁-C₆-ハロアルキル：上記のようなC₁-C₄-ハロアルキル、ならびに、さらに、たとえば5-フルオロペンチル、5-クロロペンチル、5-プロモペンチル、5-ヨードペンチル、ウンデカフルオロペンチル、6-フルオロヘキシル、6-クロロヘキシル、6-プロモヘキシル、6-ヨードヘキシル、およびドデカフルオロヘキシル；

- C₃-C₆-シクロアルキル、およびC₃-C₆-シクロアルキル-C₁-C₄-アルキルのシクロアルキル部分：3~6環員を有する単環式飽和炭化水素、たとえばシクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、およびシクロヘキシル；

- C₃-C₆-アルケニル：たとえば、1-プロペニル、2-プロペニル、1-メチルエテニル、1-ブテニル、2-ブテニル、3-ブテニル、1-メチル-1-プロペニル、2-メチル-1-プロペニル、1-メチル-2-プロペニル、2-メチル-2-プロペニル、1-ペンテニル、2-ペンテニル、3-ペンテニル、4-ペンテニル、1-メチル-1-ブテニル、2-メチル-1-ブテニル、3-メチル-1-ブテニル、1-メチル-2-ブテニル、2-メチル-2-ブテニル、3-メチル-2-ブテニル、1-メチル-3-ブテニル、2-メチル-3-ブテニル、3-メチル-3-ブテニル、1,1-ジメチル-2-プロペニル、1,2-ジメチル-1-プロペニル、1,2-ジメチル-2-プロペニル、1-エチル-1-プロペニル、1-エチル-2-プロペニル、1-ヘキセニル、2-ヘキセニル、3-ヘキセニル、4-ヘキセニル、5-ヘキセニル、1-メチル-1-ペンテニル、2-メチル-1-ペンテニル、3-メチル-1-ペンテニル、4-メチル-1-ペンテニル、1-メチル-2-ペンテニル、2-メチル-2-ペンテニル、3-メチル-2-ペンテニル、4-メチル-2-ペンテニル、1-メチル-3-ペンテニル、2-メチル-3-ペンテニル、3-メチル-3-ペンテニル、4-メチル-3-ペンテニル、1-メチル-4-ペンテニル、2-メチル-4-ペンテニル、3-メチル-4-ペンテニル、4-メチル-4-ペンテニル、1,1-ジメチル-2-ブテニル、1,1-ジメチル-3-ブテニル、1,2-ジメチル-1-ブテニル、1,2-ジメチル-2-ブテニル、1,2-ジメチル-3-ブテニル、1,3-ジメチル-1-ブテニル、1,3-ジメチル-2-ブテニル、1,3-ジメチル-3-ブテニル、2,2-ジメチル-3-ブテニル、2,3-ジメチル-1-ブテニル、2,3-ジメチル-2-ブテニル、2,3-ジメチル-3-ブテニル、3,3-ジメチル-1-ブテニル、3,3-ジメチル-2-ブテニル、1-エチル-1-ブテニル、1-エチル-2-ブテニル、1-エチル-3-ブテニル、2-エチル-1-ブテニル、2-エチル-2-ブテニル、2-エチル-3-ブテニル、1,1,2-トリメチル-2-プロペニル、1-エチル-1-メチル-2-プロペニル、1-エチル-2-メチル-1-プロペニル、および1-エチル-2-メチル-2-プロペニル；

- C₃-C₆-ハロアルケニル：フッ素、塩素、臭素、および/またはヨウ素により、部分的もしくは完全に置換された、上記のC₃-C₆-アルケニル基、たとえば、2-クロロ-プロパ-2-エン-1-イル、3-クロロプロパ-2-エン-1-イル、2,3-ジクロロプロパ-2-エン-1-イル、3,3

10

20

30

40

50

-ジクロロプロパ-2-エン-1-イル、2,3,3-トリクロロプロパ-2-エン-1-イル、2,3-ジクロロ
 ロブタ-2-エン-1-イル、2-ブロモプロパ-2-エン-1-イル、3-ブロモプロパ-2-エン-1-イル
 、2,3-ジブロモプロパ-2-エン-1-イル、3,3-ジブロモプロパ-2-エン-1-イル、2,3,3-トリ
 ブロモプロパ-2-エン-1-イル、または2,3-ジブロモブタ-2-エン-1-イル；

- C₃-C₆-アルキニル：たとえば、1-プロピニル、2-プロピニル、1-ブチニル、2-ブチ
 ニル、3-ブチニル、1-メチル-2-プロピニル、1-ペンチニル、2-ペンチニル、3-ペンチニ
 ル、4-ペンチニル、1-メチル-2-ブチニル、1-メチル-3-ブチニル、2-メチル-3-ブチニ
 ル、3-メチル-1-ブチニル、1,1-ジメチル-2-プロピニル、1-エチル-2-プロピニル、1-ヘキ
 シニル、2-ヘキシニル、3-ヘキシニル、4-ヘキシニル、5-ヘキシニル、1-メチル-2-ペン
 チニル、1-メチル-3-ペンチニル、1-メチル-4-ペンチニル、2-メチル-3-ペンチニル、2-
 メチル-4-ペンチニル、3-メチル-1-ペンチニル、3-メチル-4-ペンチニル、4-メチル-1-ペ
 ンチニル、4-メチル-2-ペンチニル、1,1-ジメチル-2-ブチニル、1,1-ジメチル-3-ブチニ
 ル、1,2-ジメチル-3-ブチニル、2,2-ジメチル-3-ブチニル、3,3-ジメチル-1-ブチニル、1
 -エチル-2-ブチニル、1-エチル-3-ブチニル、2-エチル-3-ブチニル、および1-エチル-1-
 メチル-2-プロピニル；

- C₃-C₆-ハロアルキニル：フッ素、塩素、臭素、および/またはヨウ素により、部分的
 もしくは完全に置換された、上記のC₃-C₆-アルキニル基、たとえば、1,1-ジフルオロプロ
 パ-2-イン-1-イル、3-クロロプロパ-2-イン-1-イル、3-ブロモプロパ-2-イン-1-イル、3-
 ヨードプロパ-2-イン-1-イル、4-フルオロブタ-2-イン-1-イル、4-クロロブタ-2-イン-1-
 イル、1,1-ジフルオロブタ-2-イン-1-イル、4-ヨードブタ-3-イン-1-イル、5-フルオロペ
 ンタ-3-イン-1-イル、5-ヨードペンタ-4-イン-1-イル、6-フルオロヘキサ-4-イン-1-イル
 、または6-ヨードヘキサ-5-イン-1-イル；

- C₁-C₄-アルコキシ、およびヒドロキシカルボニル-C₁-C₄-アルコキシ、C₁-C₆-アルコ
 キシカルボニル-C₁-C₄-アルコキシのC₁-C₄-アルコキシ部分：たとえば、メトキシ、エト
 キシ、プロポキシ、1-メチルエトキシ、ブトキシ、1-メチルプロポキシ、2-メチルプロポ
 キシ、および1,1-ジメチルエトキシ；

- C₁-C₆-アルコキシ、およびC₁-C₆-アルコキシカルボニル-C₁-C₄-アルコキシのC₁-C₆-
 アルコキシ部分：上記のC₁-C₄-アルコキシ、ならびに、たとえば、ペントキシ、1-メチル
 ブトキシ、2-メチルブトキシ、3-メチルブトキシ、1,1-ジメチルプロポキシ、1,2-ジメチ
 ルプロポキシ、2,2-ジメチルプロポキシ、1-エチルプロポキシ、ヘキソキシ、1-メチルペ
 ントキシ、2-メチルペントキシ、3-メチルペントキシ、4-メチルペントキシ、1,1-ジメチ
 ルブトキシ、1,2-ジメチルブトキシ、1,3-ジメチルブトキシ、2,2-ジメチルブトキシ、2,
 3-ジメチルブトキシ、3,3-ジメチルブトキシ、1-エチルブトキシ、2-エチルブトキシ、1,
 1,2-トリメチルプロポキシ、1,2,2-トリメチルプロポキシ、1-エチル-1-メチルプロポキ
 シ、および1-エチル-2-メチルプロポキシ。

【0053】

本発明の好ましい実施形態によれば、変更可能な基が、相互に無関係に、または互いに
 組み合わせて、下記の意味を有する、式Iのベンゾオキサジノン誘導体も好ましい：

R¹ は水素であるが；

ハロゲンも好ましく、具体的にはFもしくはCl、特にFが好ましい；

R² はFである；

R³ は水素もしくはFであって、好ましくは水素であるが；

Fも好ましい；

R⁴ はC₃-C₆-アルキニルもしくはC₃-C₆-ハロアルキニルであるが、好ましくはC₃-アルキニ
 ルもしくはC₃-ハロアルキニルであって、

具体的にはCH₂C(CH₃)、CH₂C(CCl₃)、もしくはCH₂C(CBr)が好ましく；

また、C₃-C₆-アルキニル、もしくはC₃-C₆-シクロアルキル-C₁-C₆-アルキル、特にプロパ
 ギルもしくはシクロプロピルメチルも好ましく；

また、C₃-C₆-アルキニル、好ましくはC₃-アルキニル；特にCH₂C(CH₃)も好ましく；

また、C₃-C₆-ハロアルキニル、好ましくはC₃-ハロアルキニル、特にCH₂C(CCl₃)もしくはCH

10

20

30

40

50

$_2\text{C}$ CBrも好ましい；

R^5 は NH_2 、 C_1 - C_6 -アルキル、もしくは C_3 - C_6 -アルキニルであるが；好ましくは C_1 - C_6 -アルキルであり； C_1 - C_4 -アルキルがさらに好ましく； CH_3 がもっとも好ましい；

R^6 は C_1 - C_6 -アルキル；好ましくは C_1 - C_4 -アルキルであり、もっとも好ましいのは CH_3 である；

Wは0であるが、

Sも好ましい；

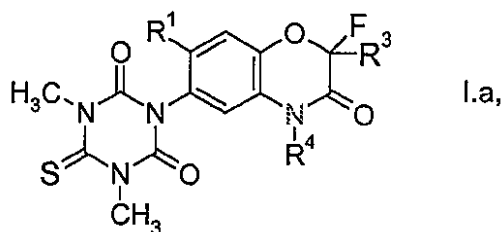
Zは 0であるが；

Sも好ましい。

【 0 0 5 4 】

特に好ましいのは、式I.a (R^2 がFであり、 R^5 および R^6 が CH_3 であって、Wが0、ZがSである、式Iに相当する)のベンゾオキサジノンであって、

【化3】



【 0 0 5 5 】

式中、変更可能な基 R^1 、 R^3 、および R^4 は上記の意味、特に好ましい意味を有する。

【 0 0 5 6 】

もっとも好ましいのは、下記の表Aの式I.a.1からI.a.48までのベンゾオキサジノン誘導体であって、この変更可能な基 R^1 、 R^3 、および R^4 はともに、表A(ベンゾオキサジノンI.a.1からI.a.54)の一行で与えられる意味を有するが；変更可能な基 R^1 、 R^2 、 R^3 、および R^4 は、相互の組み合わせだけでなく、いずれの場合も単独でも、本発明の化合物にとって特に重要である。

【 0 0 5 7 】

表A

10

20

30

No.	R ¹	R ³	R ⁴
I.a.1.	H	H	H
I.a.2.	H	H	CH ₃
I.a.3.	H	H	C ₂ H ₅
I.a.4.	H	H	CH ₂ -C ₂ H ₅
I.a.5.	H	H	CH(CH ₃) ₂
I.a.6.	H	H	CH ₂ -CH ₂ -(CH ₃) ₂
I.a.7.	H	H	CH ₂ -CH=CH ₂
I.a.8.	H	H	CH ₂ C≡CH
I.a.9.	H	H	CH ₂ C≡C-Br
I.a.10.	H	F	H
I.a.11.	H	F	CH ₃
I.a.12.	H	F	C ₂ H ₅
I.a.13.	H	F	CH ₂ -C ₂ H ₅
I.a.14.	H	F	CH(CH ₃) ₂
I.a.15.	H	F	CH ₂ -CH ₂ -(CH ₃) ₂
I.a.16.	H	F	CH ₂ -CH=CH ₂
I.a.17.	H	F	CH ₂ C≡CH
I.a.18.	H	F	CH ₂ C≡C-Br
I.a.19.	F	H	H
I.a.20.	F	H	CH ₃
I.a.21.	F	H	C ₂ H ₅
I.a.22.	F	H	CH ₂ -C ₂ H ₅

10

20

l.a.23.	F	H	CH(CH ₃) ₂
l.a.24.	F	H	CH ₂ -CH ₂ -(CH ₃) ₂
l.a.25.	F	H	CH ₂ -CH=CH ₂
l.a.26.	F	H	CH ₂ C≡CH
l.a.27.	F	H	CH ₂ C≡C-Br
l.a.28.	F	F	H
l.a.29.	F	F	CH ₃
l.a.30.	F	F	C ₂ H ₅
l.a.31.	F	F	CH ₂ -C ₂ H ₅
l.a.32.	F	F	CH(CH ₃) ₂
l.a.33.	F	F	CH ₂ -CH ₂ -(CH ₃) ₂
l.a.34.	F	F	CH ₂ -CH=CH ₂
l.a.35.	F	F	CH ₂ C≡CH
l.a.36.	F	F	CH ₂ C≡C-Br
l.a.37.	Cl	H	H
l.a.38.	Cl	H	CH ₃
l.a.39.	Cl	H	C ₂ H ₅
l.a.40.	Cl	H	CH ₂ -C ₂ H ₅
l.a.41.	Cl	H	CH(CH ₃) ₂
l.a.42.	Cl	H	CH ₂ -CH ₂ -(CH ₃) ₂
l.a.43.	Cl	H	CH ₂ -CH=CH ₂
l.a.44.	Cl	H	CH ₂ C≡CH
l.a.45.	Cl	H	CH ₂ C≡C-Br
l.a.46.	Cl	F	H
l.a.47.	Cl	F	CH ₃
l.a.48.	Cl	F	C ₂ H ₅
l.a.49.	Cl	F	CH ₂ -C ₂ H ₅
l.a.50.	Cl	F	CH(CH ₃) ₂
l.a.51.	Cl	F	CH ₂ -CH ₂ -(CH ₃) ₂
l.a.52.	Cl	F	CH ₂ -CH=CH ₂
l.a.53.	Cl	F	CH ₂ C≡CH
l.a.54.	Cl	F	CH ₂ C≡C-Br

10

20

30

【 0 0 5 8 】

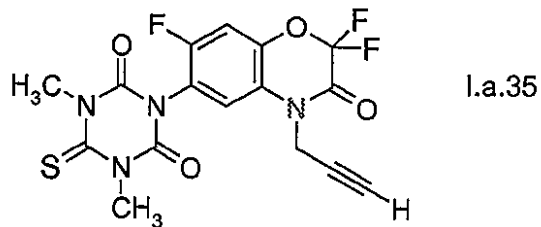
成分Aとして本発明の組成物の一部をなす、特に好ましい式Iのベンゾオキサジノン、下記の式I.a.35のベンゾオキサジノンである。

40

【 0 0 5 9 】

本発明の特に好ましい実施形態によれば、本発明の方法に有用な組成物は、成分Aとして式I.a.35のベンゾオキサジノンを含む。

【化4】



【0060】

上記のベンゾオキサジノン誘導体および組成物は、ヨーロッパ特許出願09163242.2、特にベンゾオキサジノン誘導体に言及している1から7ページの明細に、詳細に記載されており、それらの可能性のある置換基は、参考としてその全体を組み入れるものとする。

10

【0061】

本発明のベンゾオキサジノン誘導体は、より広範囲の望ましくない植生の防除を得るために、一種又は複数種の他の除草剤と併せて適用することが多くの場合最も良い。他の除草剤と併せて使用する場合、現在特許請求されている化合物は、他の除草剤又は除草剤(複数種)と一緒に製剤化でき、他の除草剤又は除草剤(複数種)と一緒にタンクで混合でき又は他の除草剤又は除草剤(複数種)と一緒に連続して適用できる。

【0062】

本発明の除草剤化合物は、さらに、作物が天然に耐性である追加の除草剤又は上述の一種又は複数種の追加の導入遺伝子の発現を介して抵抗性である追加の除草剤と併せて使用できる。本発明の化合物を併せて用いることができる除草剤の一部は、メトスラム(metosulam)、フルメツラム(flumetsulam)、クロランスラム-メチル(cloransulam-methyl)、ジクロスラム(diclosulam)、ペンキススラム(penoxsulam)及びフロラスラム(florasulam)などのスルホンアミド類、クロリムロン(chlorimuron)、トリベヌロン(tribenuron)、スルホメチュロン(sulfometuron)、ニコスルフロン(nicosulfuron)、クロルスルフロン(chlorosulfuron)、アミドスルフロン(amidosulfuron)、トリアスルフロン(triasulfuron)、プロスルフロン(prosulfuron)、トリトスルフロン(tritosulfuron)、チフェンスルフロン(thifensulfuron)、スルホスルフロン(sulfosulfuron)及びメトスルフロン(metsulfuron)などのスルホニルウレア類、イマザキン(imazaquin)、イマザピック(imazapic)、イマゼタピル(ima-zethapyr)、イマザピル(imzapyr)、イマザメタベンズ(imazamethabenz)及びイマザモックス(imazamox)などのイミダゾリノン類、2,4-D、MCPA、ジクロロプロップ(dichloroprop)及びメコプロップ(mecoprop)などのフェノキシアルカン酸類、トリクロピル(triclopyr)及びフルロキシピル(fluroxypyr)などのピリジニルオキシ酢酸類、クロピラリド(clorpyralid)、ピクロラム(picloram)、アミノピラリド(aminopyralid)及びジカンバなどのカルボン酸類、トリフルラリン(trifluralin)、ベネフィン(benefin)、ベンフルラリン(benfluralin)及びペンジメタリン(pendimethalin)などのジニトロアニリン類、アラクロール(alachlor)、アセトクロル(acetochlor)及びメトラクロル(metolachlor)などのクロロアセトアニリド類、クロルフルレノール(chlorflurenol)及びジフルフェンゾピル(diflufenzopyr)などのセミカルバゾン類(オーキシン輸送阻害剤類)、フレアジホップ(fluzifop)、ハロキシホップ(haloxyfop)、ジクロホップ(diclofop)、クロジナホップ(clodinafop)及びフェノキサプロップ(fenoxaprop)などのアリールオキシフェノキシプロピオネート類並びにグリホセート、グルホシネート(glufosinate)、アシフルオルフェン(acifluorfen)、ペンタゾン(bentazon)、クロマゾン(clomazone)、フミコロラック(fumiclorac)、フルオメチュロン(flumeturon)、ホメサフェン(fomesafen)、ラクトフェン(lactofen)、リニユロン(linuron)、イソプロチュロン(isoproturon)、シマジン(simazine)、ノルフルラゾン(norflurazon)、パラコート(paraquat)、ジウロン(diuron)、ジフルフェニカン(diflufenican)、ピコリナフェン(picolinafen)、シニドン(cinidon)、セトキシジム(sethoxydim)、トラルコキシジム(tralkoxydim)、キンメラック(quinmerac)、イソキサベン(isoxaben)、プロモキシニル、メトリブジン(metribuzin)及びメソトリオンを含む他の一般的除草

20

30

40

50

剤を含む。

【0063】

例えば本発明を実施するために有用なベンゾオキサジノン誘導体系除草剤は、グリホセート及びグルホシネートと併せて、グリホセート耐性又はグルホシネート耐性の作物に使用できる。

【0064】

上記明細書にまだ含まれていなければ、本発明を実施するのに有用なベンゾオキサジノン誘導体系除草剤は、さらに、次の化合物と併せて使用することができる：

b1) 脂質生合成阻害剤の一群から：

ACC除草剤、たとえば、アロキシジム、アロキシジムナトリウム、ブトロキシジム、クレ
トジム、クロジナホップ、クロジナホップ-プロパルギル、シクロキシジム、シハロホッ
10 プ、シハロホップ-ブチル、ジクロホップ、ジクロホップ-メチル、フェノキサプロップ、
フェノキサプロップ-エチル、フェノキサプロップ-P、フェノキサプロップ-P-エチル、フル
アジホップ、フルアジホップ-ブチル、フルアジホップ-P、フルアジホップ-P-ブチル、
ハロキシホップ、ハロキシホップ-メチル、ハロキシホップ-P、ハロキシホップ-P-メチル
、メタミホップ、ピノキサデン、プロホキシジム、プロパキサホップ、キサロホップ、キサ
ロホップ-エチル、キサロホップ-テフリル、キサロホップ-P、キサロホップ-P-エチル
、キサロホップ-P-テフリル、セトキシジム、テブラロキシジムおよびトラルコキシジム
、ならびに非ACC除草剤、たとえばベンフレセート、ブチレート、シクロエート、ダラボ
20 ン、ジメピレート、EPTC、エスプロカルブ、エトフメセート、フルプロパネート、モリ
ネート、オルベンカルブ、ペブレート、プロスルホカルブ、TCA、チオベンカルブ、チオ
カルバジル、トリアレート、およびベルノレート；

b2) ALS阻害剤の一群から：

スルホニルウレア系、たとえばアミドスルフロニル、アジムスルフロニル、ベンスルフロニル、
ベンスルフロニル-メチル、クロリムロン、クロリムロン-エチル、クロルスルフロニル、シ
30 スルフロニル、シクロスルファミロン、エタメトスルフロニル、エタメトスルフロニル-メチル
、エトキシスルフロニル、フラザスルフロニル、フルセトスルフロニル、フルピルスルフロ
ニル、フルピルスルフロニル-メチル-ナトリウム、ホラムスルフロニル、ハロスルフロニル、ハ
ロスルフロニル-メチル、イマゾスルフロニル、ヨードスルフロニル、ヨードスルフロニル-メチル-ナ
トリウム、メソスルフロニル、メタゾスルフロニル、メトスルフロニル、メトスルフロニル-メチル
、ニコスルフロニル、オルソスルファミロン、オキサスルフロニル、プリミスルフロニル、プリ
35 ミスルフロニル-メチル、プロピリスルフロニル、プロスルフロニル、ピラゾスルフロニル、ピ
ラゾスルフロニル-エチル、リムスルフロニル、スルホメツロン、スルホメツロン-メチル、ス
ルホスルフロニル、チフェンスルフロニル、チフェンスルフロニル-メチル、トリアスルフロ
ニル、トリベヌロン、トリベヌロン-メチル、トリフロキシスルフロニル、トリフルスルフロ
ニル、トリフルスルフロニル-メチル、およびトリトスルフロニル；イミダゾリノン系、た
とえば、イマザメタベンズ、イマザメタベンズ-メチル、イマザモックス、イマザピック、イ
マザピル、イマザキン、およびイマゼタピル、トリアゾロピリミジン除草剤およびスルホ
40 ニルアミノカルボニル-トリアゾリノン除草剤、たとえばフルカルバゾン、フルカルバ
ゾン-ナトリウム、プロポキシカルバゾン、プロポキシカルバゾン-ナトリウム、チエンカ
ルバゾン、およびチエンカルバゾン-メチル。これらのうち、本発明の好ましい実施形態

10

20

30

40

50

は、少なくとも1つのイミダゾリノン除草剤を含有する組成物に関する；

b3) 光合成阻害剤の一群から：

アミカルバゾン、光化学系IIの阻害剤、例を挙げると、トリアジン除草剤（クロロトリアジン、トリアジノン、トリアジノンジオン、メチルチオトリアジン、およびピリダジノンなど）、たとえば、アメトリン、アトラジン、クロリダゾン、シアナジン、デスメトリン、ジメタメトリン、ヘキサジノン、メトリブジン、プロメトン、プロメトリン、プロバジン、シマジン、シメトリン、テルブメトン、テルブチラジン、テルプトリン、およびトリエタジン、アリアル尿素系、たとえばクロルブロムロン、クロロトルロン、クロロクスロン、ジメフロム、ジウロン、フルオメツロン、イソプロツロン、イソウロン、リヌロン、メタミトロン、メタベンズチアズロン、メトベンズロン、メトクスロン、モノリニュロン、ネブロン、シデュロン、テブチオウロン、およびチアジアズロン、フェニルカーバメート系、たとえば、デスメディファム、カルブチレート、フェンメディファム、フェンメディファム-エチル、ニトリル系除草剤、たとえば、プロモフェノキシム、プロモキシニルおよびその塩およびエステル、イオキシニルおよびその塩およびエステル、ウラシル系、たとえば、プロマシル、レナシルおよびターバシル、およびペンタゾンおよびペンタゾン-ナトリウム、ピリデート、ピリダフォル、ペンタノクロル、およびプロパニル、ならびに光化学系I阻害剤、たとえば、ジクワット、ジクワット-ジプロミド、パラコート、パラコート-ジクロリドおよびパラコート-ジメチルスルフェート。これらの中で、本発明の好ましい実施形態は、少なくとも1つのアリアル尿素系除草剤を含有する組成物に関する。同様に、上記のうちで、本発明の好ましい実施形態は、少なくとも1つのトリアジン系除草剤を含有する組成物に関する。さらに上記のうちで、本発明の好ましい実施形態は、少なくとも1つのニトリル系除草剤を含有する組成物に関する。

【0065】

b4) プロトボルフィリノーゲンIXオキシダーゼ阻害剤の一群から：

アシフルオルフェン、アシフルオルフェン-ナトリウム、アザフェニジン、ベンカルバゾン、ベンズフェンジゾン、ピフェノックス、ブタフェナシル、カルフェントラゾン、カルフェントラゾン-エチル、クロメトキシフェン、シニドン-エチル、フルアゾレート、フルフェンピル、フルフェンピル-エチル、フルミクロラック、フルミクロラック-ペンチル、フルミオキサジン、フルオログリコフェン、フルオログリコフェン-エチル、フルチアセット、フルチアセット-メチル、ホメサフェン、ハロサフェン、ラクトフェン、オキサジアギル、オキサジアゾン、オキシフルオルフェン、ペントキサゾン、プロフルアゾール、ピラクロニル、ピラフルフェン、ピラフルフェン-エチル、サフルフェナシル、スルフェントラゾン、チジアジミン、[3-[2-クロロ-4-フルオロ-5-(1-メチル-6-トリフルオロメチル-2,4-ジオキソ-1,2,3,4-テトラヒドロピリミジン-3-イル)フェノキシ]-2-ピリジルオキシ]酢酸エチル(CAS 353292-31-6; S-3100)、N-エチル-3-(2,6-ジクロロ-4-トリフルオロメチルフェノキシ)-5-メチル-1H-ピラゾール-1-カルボキサミド(CAS 452098-92-9)、N-テトラヒドロフルフリル-3-(2,6-ジクロロ-4-トリフルオロメチルフェノキシ)-5-メチル-1H-ピラゾール-1-カルボキサミド(CAS 915396-43-9)、N-エチル-3-(2-クロロ-6-フルオロ-4-トリフルオロメチル-フェノキシ)-5-メチル-1H-ピラゾール-1-カルボキサミド(CAS 452099-05-7)、N-テトラヒドロフルフリル-3-(2-クロロ-6-フルオロ-4-トリフルオロ-メチルフェノキシ)-5-メチル-1H-ピラゾール-1-カルボキサミド(CAS 45100-03-7)、および3-[7-フルオロ-3-オキソ-4-(プロパ-2-イニル)-3,4-ジヒドロ-2H-ベンゾ[1,4]オキサジン-6-イル]-1,5-ジメチル-6-チオキソ-[1,3,5]トリアジナン-2,4-ジオン；

b5) 白化除草剤の一群から：

PDS阻害剤：ペフルブタミド、ジフルフェニカン、フルリドン、フルロクロリドン、フルルタモン、ノルフルラゾン、ピコリナフェン、および4-(3-トリフルオロメチル-フェノキシ)-2-(4-トリフルオロメチルフェニル)ピリミジン(CAS 180608-33-7)、HPPD阻害剤：ベンゾピシクロン、ベンゾフェナップ、イソキサフルトール、メソトリオン、ピラスルホトール、ピラゾリネート、ピラゾキシフェン、スルコトリオン、テフリルトリオン、テンボトリオン、トブラメゾン、およびピシクロピロン、白化剤、未確認の対象：アクロニフェ

10

20

30

40

50

ン、アミトロール、クロマゾン、およびフルメツロン；

b6) EPSP合成酵素阻害剤の一群から：

グリホサート、グリホサート-イソプロピルアンモニウム、およびグリホサート-トリメシウム（スルホサート）；

b7) グルタミン合成酵素阻害剤の一群から：

ピラナホス（ピアラホス）、ピラナホス-ナトリウム、グルホシネート、グルホシネート-P、およびグルホシネート-アンモニウム；

b8) DHP合成酵素阻害剤の一群から：

アシュラム；

b9) 有糸分裂阻害剤の一群から：

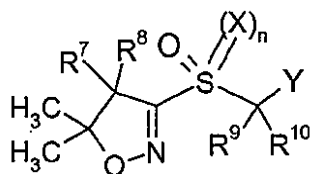
K1グループの化合物：ジニトロアニリン系、たとえば、ベンフルラリン、ブトルアリン、ジニトラミン、エタルフルラリン、フルクロラリン、オリザリン、ペンディメタリン、プロジアミン、およびトリフルラリン、ホスホロアミデート系、たとえば、アミプロホス、アミプロホス-メチル、およびブタミホス、安息香酸系除草剤、たとえば、クロルタル、クロルタル-ジメチル、ピリジン系、たとえば、ジチオピル、およびチアゾピル、ペンズアミド系、たとえば、プロピザミド、およびテブタム；K2グループの化合物：クロルプロファム、プロファム、およびカルベタミド、これらのうち、K1グループ、特にジニトロアニリン系が好ましい；

b10) VLCFA阻害剤の一群から：

クロロアセトアミド系、たとえば、アセトクロール、アラクロール、ブタクロール、ジメタクロール、ジメテナミド、ジメテナミド-P、メタザクロール、メトラクロール、メトラクロール-S、ペトキサミド、プレチラクロール、プロパクロール、プロピソクロール、およびテニルクロール、オキシアセトアニリド系、たとえば、フルフェナセット、およびメフェナセット、アセトアニリド系、たとえば、ジフェナミド、ナプロアニリド、およびナプロパミド、テトラゾリノン系、たとえば、フェントラザミド、ならびに他の除草剤、たとえば、アニロホス、カフェンストロール、フェノキサスルホン、イブフェンカルバゾン、ピペロホス、ピロキサスルホン、および

式IIのイソキサゾリン化合物、

【化5】



(II)

【0066】

式中、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、W、Z、およびnは以下の意味を有する：

R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} は互いに無関係に、水素、ハロゲン、もしくは C_1 - C_4 -アルキルである；

Xは酸素もしくはNHである；

Yはフェニル、または単環式5-、6-、7-、8-、9-もしくは10-員環ヘテロシクリルであるが、これは環員炭素原子に加えて、1、2、もしくは3個の、同一の、もしくは異なるヘテロ原子を含有するものであって、ヘテロ原子は環員として酸素、窒素、および硫黄から選択される；このフェニルおよびヘテロシクリルは、未置換であるか、または1、2、もしくは3個の置換基 R^{yy} を有しており、これはハロゲン、 C_1 - C_4 -アルキル、 C_1 - C_4 -アルコキシ、 C_1 - C_4 -ハロアルキル、および C_1 - C_4 -ハロアルコキシから選択される；

好ましいのは、フェニル、または5-もしくは6-員環芳香族ヘテロシクリル（ヘタリール）であって、これは環員炭素原子に加えて、1、2、もしくは3個の窒素原子を環員として含有するが、このフェニルおよびヘタリールは未置換であるか、または1、2、もしくは3個の置換基 R^{yy} を有し；さらに

nは0もしくは1である；

式IIのイソキサゾリン化合物の中で、好ましいのは、次のような式IIのイソキサゾリン化

合物である、すなわち

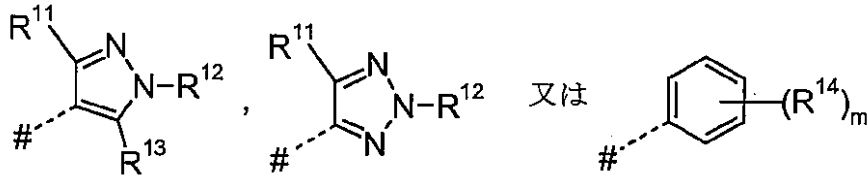
R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} は互いに無関係に、H、F、Cl、もしくはメチルである；

Xは酸素である；

nは0もしくは1である；さらに

Yは、フェニル、ピラゾリル、もしくは1,2,3-トリアゾリルであって、最後に述べた3つの基は、未置換であるか、または1、2、もしくは3個の置換基 $R^{y'}$ 、特に以下の基のうち1つを有する；

【化6】



10

【0067】

式中

R^{11} は、ハロゲン、 C_1 - C_4 -アルキル、もしくは C_1 - C_4 -ハロアルキルである；

R^{12} は、 C_1 - C_4 -アルキルである；

R^{13} は、ハロゲン、 C_1 - C_4 -アルコキシ、もしくは C_1 - C_4 -ハロアルコキシである；

R^{14} は、ハロゲン、 C_1 - C_4 -アルキル、 C_1 - C_4 -ハロアルキル、もしくは C_1 - C_4 -ハロアルコキシである；

20

mは、0、1、2、もしくは3である；さらに

#は、 $CR^{13}R^{14}$ 基への結合ポイントを示す；

式IIのイソキサゾリン化合物の中で、特に好ましいのは、次のような式IIのイソキサゾリン化合物である、すなわち

R^7 は、水素である；

R^8 は、フッ素である；

R^9 は、水素もしくはフッ素である；

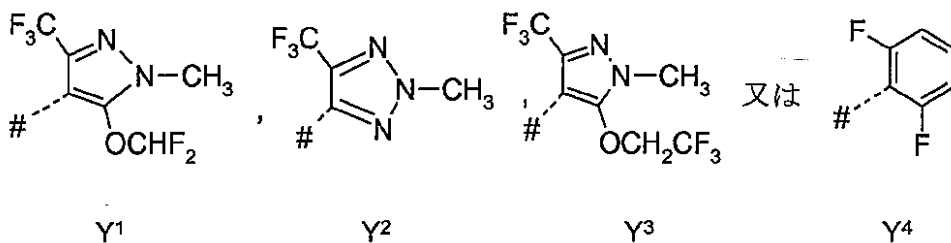
R^{10} は、水素もしくはフッ素である；

Xは、酸素である；

30

Yは、式Y¹、Y²、Y³、もしくはY⁴の基の1つであって、

【化7】



【0068】

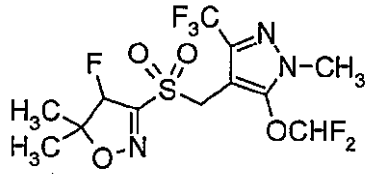
40

式中、#は、 CR^9R^{10} 基への結合ポイントを示し；

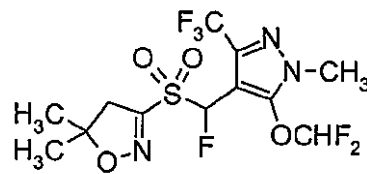
nは、0もしくは1、なかでも1である；さらに

これらのうちで、特に好ましいのは、式II.1、II.2、II.3、II.4、II.5、II.6、II.7、II.8、およびII.9のイソキサゾリン化合物である；

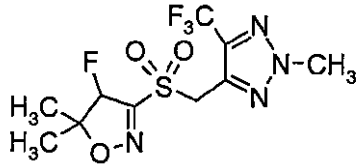
【化8】



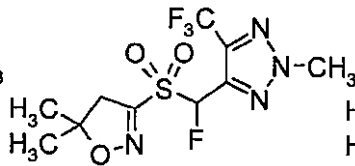
II.1



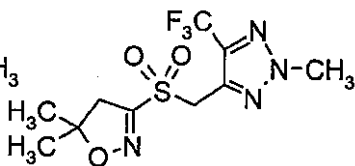
II.2



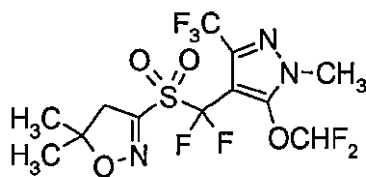
II.3



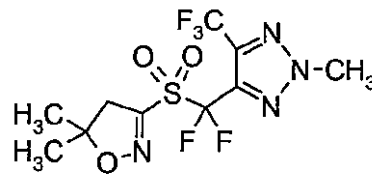
II.4



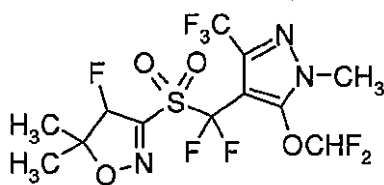
II.5



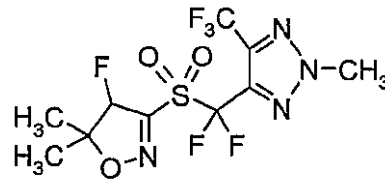
II.6



II.7



II.8



II.9

【0069】

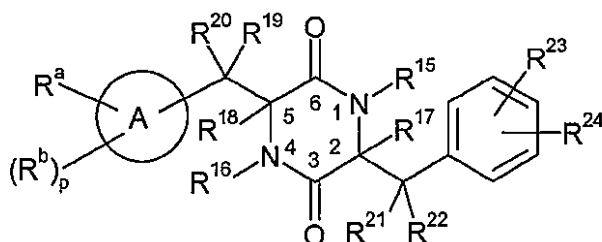
式IIのイソキサゾリン化合物は、たとえばWO 2006/024820、WO 2006/037945、WO 2007/071900、およびWO 2007/096576で、当技術分野に知られているが；

VLCFA阻害剤の中で、好ましいのはクロロアセトアミド系およびオキシアセトアミド系、特にピロキサスルホンである；

b11) セルロース生合成阻害剤の一群から：

クロルチアミド、ジクロベニル、フルポキサム、イソキサベン、1-シクロヘキシル-5-ペンタフルオロフェニルオキシ-1⁴-[1,2,4,6]チアトリアジン-3-イルアミン、および式IIIのピペラジン化合物、

【化9】



III,

【0070】

式中

Aは、フェニルもしくはピリジルであって、R^aはAの結合ポイントにオルト位で炭素原子に

10

20

30

40

50

結合している；

R^a はCN、 NO_2 、 $\text{C}_1\text{-C}_4$ -アルキル、 $\text{D-C}_3\text{-C}_6$ -シクロアルキル、 $\text{C}_1\text{-C}_4$ -ハロアルキル、 $\text{C}_1\text{-C}_4$ -アルコキシ、 $\text{C}_1\text{-C}_4$ -ハロアルコキシ、 $\text{O-D-C}_3\text{-C}_6$ -シクロアルキル、 $\text{S(O)}_q\text{R}^y$ 、 $\text{C}_2\text{-C}_6$ -アルケニル、 $\text{D-C}_3\text{-C}_6$ -シクロアルケニル、 $\text{C}_3\text{-C}_6$ -アルケニルオキシ、 $\text{C}_2\text{-C}_6$ -アルキニル、 $\text{C}_3\text{-C}_6$ -アルキニルオキシ、 NR^AR^B 、トリ- $\text{C}_1\text{-C}_4$ -アルキルシリル、 D-C(=O)-R^{a1} 、 $\text{D-P(=O)(R}^{a1})_2$ 、フェニル、ナフチル、3員から7員の単環式もしくは9員から10員の二環式の、飽和、不飽和、もしくは芳香族ヘテロ環であって、これは、炭素もしくは窒素を介して結合しており、O、N、およびSからなる1群から選択される1、2、3、もしくは4個のヘテロ原子を含有するが、一部もしくは全部が、 R^{aa} および/または R^{a1} で置換されていてもよく、 R^a が炭素原子に結合しているならば、ハロゲンで置換されていてもよい；

10

R^y は、 $\text{C}_1\text{-C}_6$ -アルキル、 $\text{C}_3\text{-C}_4$ -アルケニル、 $\text{C}_3\text{-C}_4$ -アルキニル、 NR^AR^B もしくは $\text{C}_1\text{-C}_4$ -ハロアルキルであり、 q は0、1、もしくは2である；

R^A 、 R^B は、互いに無関係に、水素、 $\text{C}_1\text{-C}_6$ -アルキル、 $\text{C}_3\text{-C}_6$ -アルケニル、および $\text{C}_3\text{-C}_6$ -アルキニルである； R^A 、 R^B は、それらが結合している窒素原子とともに、飽和、部分不飽和、もしくは完全不飽和の5員環もしくは6員環を形成していてもよく、こうした環は炭素原子に加えて、O、N、およびSからなる一群から選択される1、2、もしくは3個のヘテロ原子を含有してもよく、1から3個の R^{aa} 基で置換されていてもよい；

D は、共有結合、 $\text{C}_1\text{-C}_4$ -アルキレン、 $\text{C}_2\text{-C}_6$ -アルケニル、もしくは $\text{C}_2\text{-C}_6$ -アルキニルである；

R^{a1} は、水素、OH、 $\text{C}_1\text{-C}_8$ -アルキル、 $\text{C}_1\text{-C}_4$ -ハロアルキル、 $\text{C}_3\text{-C}_6$ -シクロアルキル、 $\text{C}_2\text{-C}_8$ -アルケニル、 $\text{C}_5\text{-C}_6$ -シクロアルケニル、 $\text{C}_2\text{-C}_8$ -アルキニル、 $\text{C}_1\text{-C}_6$ -アルコキシ、 $\text{C}_1\text{-C}_4$ -ハロアルコキシ、 $\text{C}_3\text{-C}_8$ -アルケニルオキシ、 $\text{C}_3\text{-C}_8$ -アルキニルオキシ、 NR^AR^B 、 $\text{C}_1\text{-C}_6$ -アルコキシアミノ、 $\text{C}_1\text{-C}_6$ -アルキルスルホニルアミノ、 $\text{C}_1\text{-C}_6$ -アルキルアミノスルホニルアミノ、[ジ-($\text{C}_1\text{-C}_6$)アルキルアミノ]スルホニルアミノ、 $\text{C}_3\text{-C}_6$ -アルケニルアミノ、 $\text{C}_3\text{-C}_6$ -アルキニルアミノ、 $\text{N-(C}_2\text{-C}_6\text{-アルケニル)-N-(C}_1\text{-C}_6\text{-アルキル)アミノ}$ 、 $\text{N-(C}_2\text{-C}_6\text{-アルキニル)-N-(C}_1\text{-C}_6\text{-アルキル)アミノ}$ 、 $\text{N-(C}_1\text{-C}_6\text{-アルコキシ)-N-(C}_1\text{-C}_6\text{-アルキル)アミノ}$ 、 $\text{N-(C}_2\text{-C}_6\text{-アルケニル)-N-(C}_1\text{-C}_6\text{-アルコキシ)アミノ}$ 、 $\text{N-(C}_2\text{-C}_6\text{-アルキニル)-N-(C}_1\text{-C}_6\text{-アルコキシ)-アミノ}$ 、 $\text{C}_1\text{-C}_6$ -アルキルスルホニル、トリ- $\text{C}_1\text{-C}_4$ -アルキルシリル、フェニル、フェノキシ、フェニルアミノ、あるいは5員もしくは6員の単環式、または9員もしくは10員の二環式ヘテロ環であって、これはO、N、およびSからなる1群から選択される1、2、3、もしくは4個のヘテロ原子を含み、この環状基は未置換であるか、または1、2、3、もしくは4個の R^{aa} 基で置換されている；

20

30

R^{aa} はハロゲン、OH、CN、 NO_2 、 $\text{C}_1\text{-C}_4$ -アルキル、 $\text{C}_1\text{-C}_4$ -ハロアルキル、 $\text{C}_1\text{-C}_4$ -アルコキシ、 $\text{C}_1\text{-C}_4$ -ハロアルコキシ、 $\text{S(O)}_q\text{R}^y$ 、 D-C(=O)-R^{a1} およびトリ- $\text{C}_1\text{-C}_4$ -アルキルシリルである；

R^b は、相互に無関係に、水素、CN、 NO_2 、ハロゲン、 $\text{C}_1\text{-C}_4$ -アルキル、 $\text{C}_1\text{-C}_4$ -ハロアルキル、 $\text{C}_2\text{-C}_4$ -アルケニル、 $\text{C}_3\text{-C}_6$ -アルキニル、 $\text{C}_1\text{-C}_4$ -アルコキシ、 $\text{C}_1\text{-C}_4$ -ハロアルコキシ、ベンジル、もしくは $\text{S(O)}_q\text{R}^y$ であり、

R^b は、隣接する環原子に結合した R^a もしくは R^b 基とともに、飽和、もしくは部分不飽和、もしくは完全不飽和の5員環もしくは6員環を形成していてもよいが、これは炭素原子の他にO、N、およびSからなる1群から選択される1、2、もしくは3個のヘテロ原子を含んでいてもよく、その環は R^{aa} で部分的もしくは完全に置換されていてもよい；

40

p は0、1、2、または3である；

R^{15} は、水素、OH、CN、 $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ -アルキル、 $\text{C}_3\text{-C}_{12}$ -アルケニル、 $\text{C}_3\text{-C}_{12}$ -アルキニル、 $\text{C}_1\text{-C}_4$ -アルコキシ、 $\text{C}_3\text{-C}_6$ -シクロアルキル、 $\text{C}_5\text{-C}_6$ -シクロアルケニル、 NR^AR^B 、 $\text{S(O)}_n\text{R}^y$ 、 $\text{S(O)}_n\text{NR}^A\text{R}^B$ 、 C(=O)R^{25} 、 CONR^AR^B 、フェニル、または5員もしくは6員の単環式、または9員もしくは10員の二環式芳香族ヘテロ環であって、これはO、N、およびSからなる1群から選択される1、2、3、もしくは4個のヘテロ原子を含有するが、この環状基は D^1 を介して結合しており、未置換であるか、または1、2、3、もしくは4個の R^{aa} 基によって、ならびに部分的もしくは完全に R^{aa} で置換された以下の基： $\text{C}_1\text{-C}_4$ -アルキル、 $\text{C}_3\text{-C}_4$ -アルケニル、 $\text{C}_3\text{-C}_4$ -

50

アルキニル、 C_1-C_4 -アルコキシ、 C_3-C_6 -シクロアルキル、 C_5-C_6 -シクロアルケニル、 $NR^A R^B$ 、 $S(O)_n R^Y$ 、 $S(O)_n NR^A R^B$ 、 $C(=O)R^{25}$ 、 $CONR^A R^B$ によっても、置換されている；

R^{15} は好ましくは、水素、OH、CN、 C_1-C_{12} -アルキル、 C_3-C_{12} -アルケニル、 C_3-C_{12} -アルキニル、 C_1-C_4 -アルコキシ、 C_3-C_6 -シクロアルキル、 C_5-C_6 -シクロアルケニル、 $NR^A R^B$ 、 $S(O)_n R^Y$ 、 $S(O)_n NR^A R^B$ 、 $C(=O)R^{25}$ 、 $CONR^A R^B$ 、フェニル、または5員もしくは6員の単環式、または9員もしくは10員の二環式芳香族ヘテロ環であって、これはO、N、およびSからなる1群から選択される1、2、3、もしくは4個のヘテロ原子を含有するが、この環状基は D^1 を介して結合しており、未置換であるか、または1、2、3、もしくは4個の R^{aa} 基によって、ならびに部分的もしくは完全に R^{aa} で置換された以下の基： C_1-C_4 -アルキル、 C_3-C_4 -アルケニル、および C_3-C_4 -アルキニルによっても、置換されている；

10

R^{25} は、水素、 C_1-C_4 -アルキル、 C_1-C_4 -ハロアルキル、 C_1-C_4 -アルコキシ、もしくは C_1-C_4 -ハロアルコキシである；

D^1 は、カルボニル、もしくはD基である；

この R^{15} 基、 R^a 基およびそれらのサブ置換基において、炭素鎖および/または環状基は、1、2、3、もしくは4個の置換基 R^{aa} および/または R^{a1} を有していてもよい；

R^{16} は、 C_1-C_4 -アルキル、 C_3-C_4 -アルケニル、もしくは C_3-C_4 -アルキニルである；

R^{17} は、OH、 NH_2 、 C_1-C_4 -アルキル、 C_3-C_6 -シクロアルキル、 C_3-C_6 -アルケニル、 C_3-C_6 -アルキニル、 C_1-C_4 -ヒドロキシアルキル、 C_1-C_4 -シアノアルキル、 C_1-C_4 -ハロアルキル、 C_1-C_4 -アルコキシ- C_1-C_4 -アルキル、もしくは $C(=O)R^{25}$ である；

R^{18} は、水素、ハロゲン、 C_1-C_4 -アルキル、もしくは C_1-C_4 -ハロアルキルであり、または R^{18} は R^{19} とともに1つの共有結合となる；

20

R^{19} 、 R^{20} 、 R^{21} 、 R^{21} は互いに無関係に、水素、ハロゲン、OH、CN、 NO_2 、 C_1-C_4 -アルキル、 C_1-C_4 -ハロアルキル、 C_2-C_6 -アルケニル、 C_2-C_6 -アルキニル、 C_1-C_4 -アルコキシ、 C_1-C_4 -ハロアルコキシ、 C_3-C_6 -シクロアルキル、 C_3-C_6 -シクロアルケニル、および C_3-C_6 -シクロアルキニルである；

R^{23} 、 R^{24} は互いに無関係に、水素、ハロゲン、OH、ハロアルキル、 $NR^A R^B$ 、 $NR^A C(O)R^{26}$ 、CN、 NO_2 、 C_1-C_4 -アルキル、 C_1-C_4 -ハロアルキル、 C_2-C_4 -アルケニル、 C_3-C_6 -アルキニル、 C_1-C_4 -アルコキシ、 C_1-C_4 -ハロアルコキシ、 $O-C(O)R^{26}$ 、フェニル、もしくはベンジルオキシであるが、この R^{23} および R^{24} 基において、炭素鎖および/または環状基は、1、2、3、もしくは4個の置換基 R^{aa} を有していてもよい；

30

R^{26} は C_1-C_4 -アルキル、もしくは $NR^A R^B$ である；

式IIIのピペラジン化合物のうち、好ましいのは次のような式IIIのピペラジン化合物である、すなわち

Aは、フェニルもしくはピリジルであって、 R^a はAの結合ポイントにオルト位で炭素原子に結合している；

R^a はCN、 NO_2 、 C_1-C_4 -アルキル、 C_1-C_4 -ハロアルキル、 C_1-C_4 -アルコキシ、 C_1-C_4 -ハロアルコキシ、もしくは $D-C(=O)-R^{a1}$ である；

R^Y は、 C_1-C_6 -アルキル、 C_3-C_4 -アルケニル、 C_3-C_4 -アルキニル、 $NR^A R^B$ もしくは C_1-C_4 -ハロアルキルであり、qは0、1、もしくは2である；

R^A 、 R^B は、互いに無関係に、水素、 C_1-C_6 -アルキル、 C_3-C_6 -アルケニル、および C_3-C_6 -アルキニルである； R^A 、 R^B は、それらが結合している窒素原子とともに、飽和、部分不飽和、もしくは完全不飽和の5員環もしくは6員環を形成していてもよく、こうした環は炭素原子に加えて、O、N、およびSからなる一群から選択される1、2、もしくは3個のヘテロ原子を含有してもよく、1から3個の R^{aa} 基で置換されていてもよい；

40

Dは、共有結合、もしくは C_1-C_4 -アルキレンである；

R^{a1} は、水素、OH、 C_1-C_8 -アルキル、 C_1-C_4 -ハロアルキル、 C_3-C_6 -シクロアルキルである；

R^{aa} は、ハロゲン、OH、CN、 NO_2 、 C_1-C_4 -アルキル、 C_1-C_4 -ハロアルキル、 C_1-C_4 -アルコキシ、 C_1-C_4 -ハロアルコキシ、 $S(O)_q R^Y$ 、 $D-C(=O)-R^{a1}$ およびトリ- C_1-C_4 -アルキルシリルである；

50

R^bは、相互に無関係に、CN、NO₂、ハロゲン、C₁-C₄-アルキル、C₁-C₄-ハロアルキル、C₂-C₄-アルケニル、C₃-C₆-アルキニル、C₁-C₄-アルコキシ、C₁-C₄-ハロアルコキシ、ベンジル、もしくはS(O)_qR^yであり、

R^bは、隣接する環原子に結合したR^aもしくはR^b基とともに、飽和、もしくは部分不飽和、もしくは完全不飽和の5員環もしくは6員環を形成していてもよいが、これは炭素原子の他にO、N、およびSからなる1群から選択される1、2、もしくは3個のヘテロ原子を含んでいてもよく、その環はR^{aa}で部分的もしくは完全に置換されていてもよい；

pは0、もしくは1である；

R¹⁵は、水素、C₁-C₁₂-アルキル、C₃-C₁₂-アルケニル、C₃-C₁₂-アルキニル、C₁-C₄-アルコキシ、もしくはC(=O)R²⁵であるが、これはR^{aa}基によって、部分的もしくは完全に置換されていてもよい；

10

R¹⁵は好ましくは、水素、C₁-C₁₂-アルキル、C₃-C₁₂-アルケニル、C₃-C₁₂-アルキニル、C₁-C₄-アルコキシ、もしくはC(=O)R²⁵である；

R²⁵は、水素、C₁-C₄-アルキル、C₁-C₄-ハロアルキル、C₁-C₄-アルコキシ、もしくはC₁-C₄-ハロアルコキシである；

このR¹⁵基、R^a基およびそれらのサブ置換基において、炭素鎖および/または環状基は、1、2、3、もしくは4個の置換基R^{aa}および/またはR^{a1}を有していてもよい；

R¹⁶は、C₁-C₄-アルキルである；

R¹⁷は、OH、NH₂、C₁-C₄-アルキル、C₃-C₆-シクロアルキル、C₁-C₄-ハロアルキル、もしくはC(=O)R²⁵である；

20

R¹⁸は、水素であり、またはR¹⁸はR¹⁹とともに1つの共有結合となる；

R¹⁹、R²⁰、R²¹、R²¹は互いに無関係に、水素である；

R²³、R²⁴は互いに無関係に、水素、ハロゲン、もしくはOHである；

b12) 脱共役剤除草剤の一群から：

ジノセブ、ジノテルブ、ならびにDNOCおよびその塩；

b13) オーキシシン除草剤の一群から：

2,4-Dおよびその塩およびエステル、2,4-DBおよびその塩およびエステル、アミノピラリドおよびその塩、たとえばアミノピラリド-トリス(2-ヒドロキシプロピル)アンモニウムおよびそのエステル、ベナゾリン、ベナゾリン-エチル、クロランベンおよびその塩およびエステル、クロメプロップ、クロピラリドおよびその塩およびエステル、ジカンバおよびその塩およびエステル、ジクロルプロップおよびその塩およびエステル、ジクロルプロップ-Pおよびその塩およびエステル、フルロキシピル、フルロキシピル-ブトメチル (but ometyl)、フルロキシピル-メプチル (meptyl)、MCPAおよびその塩およびエステル、MCPA-チオエチル、MCPBおよびその塩およびエステル、メコプロップおよびその塩およびエステル、メコプロップ-Pおよびその塩およびエステル、ピクロラムおよびその塩およびエステル、キンクロラック、キンメラック、TBA (2,3,6)およびその塩およびエステル、トリクロピルおよびその塩およびエステル、ならびにアミノシクロピラクロールおよびその塩およびエステル；

30

b14) オーキシシン移動阻害剤の一群から：

ジフルフェンゾピル、ジフルフェンゾピル-ナトリウム、ナプタラム、およびナプタラム-ナトリウム；

40

b15) 他の除草剤群から：

プロモブチド、クロルフルレノール、クロルフルレノール-メチル、シンメチリン、クミルロン、ダラポン、ダゾメット、ジフェンゾコート、ジフェンゾコート-メチル硫酸、ジメチピン、DSMA、ダイムロン、エンドタールおよびその塩、エトベンザニド、フラムプロップ、フラムプロップ-イソプロピル、フラムプロップ-メチル、フラムプロップ-M-イソプロピル、フラムプロップ-M-メチル、フルレノール、フルレノール-ブチル、フルルプリミドール、ホサミン、ホサミン-アンモニウム、インダノファン、インダジフラム、マレイン酸ヒドラジド、メフルイジド、メタム、アジ化メチル、臭化メチル、メチルダイムロン、ヨウ化メチル、MSMA、オレイン酸、オキサジクロメホン、ペラルゴン酸、ピリブチカ

50

ルブ、キノクラミン、トリアジフラム、トリジファン、ならびに6-クロロ-3-(2-シクロプロピル-6-メチルフェノキシ)-4-ピリダジノール(CAS 499223-49-3)およびその塩およびエステル。

【0071】

さらに、式Iのベンゾオキサジノンを毒性緩和剤と併せて施用することは有用であると考えられる。毒性緩和剤は、好ましからざる植物に対する、式Iのベンゾオキサジノンの除草作用に大きな影響を及ぼすことなく、有用植物へのダメージを防ぎ、または少なくする化合物である。毒性緩和剤は、有用植物の播種前(たとえば種子処理、シュート、または実生)にも、発芽前散布でも、発芽後散布でも施用することができる。

【0072】

さらに、毒性緩和剤C、ベンゾオキサジノンIおよび/または除草剤Bは、同時に施用することができるが、順次連続して施用してもよい。

【0073】

適当な毒性緩和剤は、たとえば、(キノリン-8-オキシ)酢酸、1-フェニル-5-ハロアルキル-1H-1,2,4-トリアゾール-3-カルボン酸、1-フェニル-4,5-ジヒドロ-5-アルキル-1H-ピラゾール-3,5-ジカルボン酸、4,5-ジヒドロ-5,5-ジアリール-3-イソキサゾールカルボン酸、ジクロロアセトアミド、-オキシイミノフェニルアセトニトリル、アセトフェノンオキシム、4,6-ジハロ-2-フェニルピリミジン、N-[[4-(アミノカルボニル)フェニル]スルホニル]-2-安息香酸、1,8-ナフタル酸無水物、2-ハロ-4-(ハロアルキル)-5-チアゾールカルボン酸、ホスホルチオレート、およびN-アルキル-0-フェニルカルバミン酸、ならびにそれらの農業上許容される塩、および農業上許容される誘導体、たとえばアミド、エステル、およびチオエステル(ただし、それらが酸基を有するならば)である。

【0074】

好ましい毒性緩和剤Cの例は、ベノキサコール、クロキントセット、シオメトリニル、シプロスルファミド(cyprosulfamide)、ジクロルミド、ジシクロノン(dicyclonon)、ジエトレート(dietholate)、フェンクロラゾール、フェンクロリム、フルラゾール、フルキソフェニム、フリラゾール、イソキサジフェン、メフェンピル、メフェネート(meph enate)、ナフタル酸無水物、オキサベトリニル、4-(ジクロロアセチル)-1-オキサ-4-アザスピロ [4.5]デカン(MON4660, CAS 71526-07-3) および2,2,5-トリメチル-3-(ジクロロアセチル)-1,3-オキサゾリジン(R-29148, CAS 52836-31-4)、およびN-(2-メトキシベンゾイル)-4-[(メチルアミノカルボニル)アミノ]ベンゼンスルホンアミド (CAS 129531-12-0) である。

【0075】

特に好ましい毒性緩和剤Cは、ベノキサコール、クロキントセット、シプロスルファミド(cyprosulfamide)、ジクロルミド、フェンクロラゾール、フェンクロリム、フルラゾール、フルキソフェニム、フリラゾール、イソキサジフェン、メフェンピル、ナフタル酸無水物、オキサベトリニル、4-(ジクロロアセチル)-1-オキサ-4-アザスピロ [4.5]デカン(MON4660, CAS 71526-07-3)、および2,2,5-トリメチル-3-(ジクロロアセチル)-1,3-オキサゾリジン(R-29148, CAS 52836-31-4)、およびN-(2-メトキシベンゾイル)-4-[(メチルアミノカルボニル)アミノ]ベンゼンスルホンアミド (CAS 129531-12-0) である。

【0076】

なかでも好ましい毒性緩和剤Cは、ベノキサコール、クロキントセット、シプロスルファミド(cyprosulfamide)、ジクロルミド、フェンクロラゾール、フェンクロリム、フリラゾール、イソキサジフェン、メフェンピル、4-(ジクロロアセチル)-1-オキサ-4-アザスピロ [4.5]デカン(MON4660, CAS 71526-07-3)、および2,2,5-トリメチル-3-(ジクロロアセチル)-1,3-オキサゾリジン(R-29148, CAS 52836-31-4)、およびN-(2-メトキシベンゾイル)-4-[(メチルアミノカルボニル)アミノ]ベンゼンスルホンアミド (CAS 129531-12-0) である。

【0077】

成分Cとして本発明の組成物の構成成分となる、特に好ましい毒性緩和剤Cは、上記のよ

10

20

30

40

50

うな毒性緩和剤Cである；具体的には下記の表Cに記載の毒性緩和剤C.1 - C.13である；
表 C

毒性緩和剤 C	
C.1	ベノキサコール
C.2	クロキントセット
C.3	シプロスルファミド
C.4	ジクロロミド
C.5	フェンクロラゾール
C.6	フェンクロリム
C.7	フリラゾール
C.8	イソキサジフェン
C.9	メフェンピル
C.10	ナフタル酸無水物
C.11	4-(ジクロロアセチル)-1-オキサ-4-アザスピロ [4.5] デカン (MON4660, CAS 71526-07-3)
C.12	2,2,5-トリメチル-3-(ジクロロアセチル)-1,3-オキサゾリジン (R-29148, CAS 52836-31-4)
C.13	N-(2-メトキシベンゾイル)-4-[(メチルアミノカルボニル)アミノ]ベンゼンスルホンアミド (CAS 129531-12-0)

10

20

【 0 0 7 8 】

グループb1)からb15)までの活性化化合物b、および活性化化合物Cは既知の除草剤および毒性緩和剤であって、たとえば、The Compendium of Pesticide Common Names (<http://www.alanwood.net/pesticides/>); Farm Chemicals Handbook 2000 volume 86, Meister Publishing Company, 2000; B. Hock, C. Fedtke, R. R. Schmidt, Herbicide [Herbicides], Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1995; W. H. Ahrens, Herbicide Handbook, 7th edition, Weed Science Society of America, 1994; およびK. K. Hatzios, Herbicide Handbook, Supplement for the 7th edition, Weed Science Society of America, 1998を参照されたい。2,2,5-トリメチル-3-(ジクロロアセチル)-1,3-オキサゾリジン[CAS 52836-31-4]は、R-29148とも称される。4-(ジクロロアセチル)-1-オキサ-4-アザスピロ [4.5] デカン[CAS 71526-07-3]は、AD-67およびMON4660とも称される。さらに他の除草活性化化合物が、WO 96/26202、WO 97/41116、WO 97/41117、WO 97/41118、およびWO 01/83459から知られており、さらに W. Kramer et al. (ed.) "Modern Crop Protection Compounds", Vol. 1, Wiley VCH, 2007およびそこに引用された文献からも、知られている。

30

【 0 0 7 9 】

概して、本発明の化合物は、処理される作物に選択的であり、これらの化合物を施用量で用いて防除される雑草の範囲を補う除草剤と組み合わせて使用することが好ましい。概して、本発明の化合物及び他の補足的な除草剤を、配合剤又はタンク混合物のいずれかとして、同時に適用することが、さらに好ましい。

40

【 0 0 8 0 】

「mut-PPO核酸」という用語は、野生型PPO核酸から突然変異を起こした配列を有し、それが発現した植物に「ベンゾオキサジノン誘導体系除草剤」耐性の増加をもたらすPPO核酸を指す。さらに、「突然変異プロトポルフィリノゲンオキシダーゼ(mut-PPO)」は、野生型の一次配列の配列番号2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, または46のアミノ酸、それらの変異体、誘導体、ホモログ、オルソログ又はパラログと、別のアミノ酸との交換を指す。「突然変異アミノ酸」という表現は、別のアミノ酸により交換されたアミノ酸を示し、それによってタンパク質の一次配列中の突然変異部位を示すために、以下に使用するものとする。

50

【0081】

好ましい実施形態において、該PPOヌクレオチド配列は、配列番号1, 25, 37若しくは39の配列又はそれらの変異体若しくは誘導体を含む。

【0082】

さらに、該PPOヌクレオチド配列は、それぞれ、これ以降定義される配列番号1, 25, 37又は39のホモログ、パラログ及びオルソログを包含することは、当業者に理解されると思われる。

【0083】

配列(例えば、本発明の転写制御ヌクレオチド配列などのポリペプチド又は核酸配列)に関する「変異体(バリエーション)」という用語は、実質的に同様の配列を意味することを意図する。オープンリーディングフレームを含むヌクレオチド配列に関しては、変異体(バリエーション)は、遺伝子コードの縮重のために、天然タンパク質と同一のアミノ酸配列をコードする配列を含む。これらのような天然の対立遺伝子変異体(バリエーション)は、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)及びハイブリダイゼーション技術を用いた周知の分子生物学技術の使用により同定可能である。変異体(バリエーション)ヌクレオチド配列は、例えば、オープンリーディングフレームに関する部位特異的突然変異誘発法の使用により作製された、天然タンパク質をコードするヌクレオチド配列並びに天然タンパク質と比べてアミノ酸置換を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列などの、合成的に誘導されたヌクレオチド配列をさらに含む。概して、本発明のヌクレオチド配列変異体(バリエーション)は、配列番号1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 又は45のヌクレオチド配列と、少なくとも30、40、50、60から70%、例えば、好ましくは、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%から79%、概して、少なくとも80%、例えば、81%-84%、少なくとも85%、例えば、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%から98%及び99%のヌクレオチド「配列同一性」を有すると思われる。「変異体(バリエーション)」ポリペプチドは、天然タンパク質のN末端及び/又はC末端への一個又は複数個のアミノ酸の欠失(いわゆる短縮)若しくは付加、天然タンパク質の一つ又は複数の部位における一個又は複数個のアミノ酸の欠失若しくは付加、又は天然タンパク質の一つ又は複数の部位における一個又は複数個のアミノ酸の置換により、配列番号2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 又は46のタンパク質から生じたポリペプチドを意図する。このような変異体(バリエーション)は、例えば、遺伝的多型又はヒトの操作による結果であり得る。このような操作の方法は、当分野において周知である。

【0084】

本発明のポリヌクレオチド分子及びポリペプチドは、配列番号1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 若しくは45で表されるヌクレオチド配列又は配列番号2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 若しくは46で表されるアミノ酸配列と十分に同一であるヌクレオチド又はアミノ酸配列を含むポリヌクレオチド分子及びポリペプチドを包含することが認識される。「十分に同一」という用語は、第1及び第2のアミノ酸又はヌクレオチド配列が共通の構造ドメイン及び/又は共通の機能活性を有するような、十分又は最小数の、第2のアミノ酸又はヌクレオチド配列と同一又は等価の(例えば同様の側鎖を有する)アミノ酸残基又はヌクレオチドを含有する第1のアミノ酸又はヌクレオチド配列を指すように、本明細において使用する。

【0085】

「配列同一性」は、二つの最適にアライメントされたDNA又はアミノ酸配列が、成分、例えばヌクレオチド又はアミノ酸のアライメントのウインドウを通して不変である程度を指す。試験配列及び参照配列のアライメントされたセグメントに関する「同一性割合」は、参照配列セグメント中、すなわち、全参照配列又は参照配列のより小さい定義された部

10

20

30

40

50

分の成分の合計数で割った、二つのアライメントされた配列により共有される同一成分の数である。「同一性パーセント」は、同一性割合×100である。比較ウィンドウをアライメントするための配列の最適アライメントは当業者に周知であり、Smith及びWatermanの局所相同性アルゴリズム、Needleman及びWunschの相同性アライメントアルゴリズム、Pearson及びLipmanの類似性方法に関する検索などのツールにより、並びに好ましくは、GAP、BESTFIT、FASTA及びGCG Wisconsin Package(Accelrys Inc. Burlington, Mass.)の一部として利用可能なTFASTAなどのこれらのアルゴリズムのコンピュータ化された実行により実施できる。

【0086】

「ポリヌクレオチド(複数可)」、「核酸配列(複数可)」、「ヌクレオチド配列(複数可)」、「核酸(複数可)」、「核酸分子」という用語は、本明細書において交換可能に使用され、任意の長さの非分枝型ポリマー形態の、リボヌクレオチド若しくはデオキシリボヌクレオチドのいずれか、又は両方の組み合わせのヌクレオチドを指す。

10

【0087】

タンパク質の「誘導体」は、問題となる未修飾のタンパク質と比べてアミノ酸の置換、欠失及び/又は挿入を有し、それらが由来する未修飾のタンパク質と同様の生物学活性及び機能活性を有するペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチド、タンパク質及び酵素を包含する。

【0088】

タンパク質の「ホモログ」は、問題となる未修飾のタンパク質と比べてアミノ酸の置換、欠失及び/又は挿入を有し、それらが由来する未修飾のタンパク質と同様の生物学活性及び機能活性を有するペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチド、タンパク質及び酵素を包含する。

20

【0089】

欠失は、タンパク質からの一個又は複数個のアミノ酸の除去を指す。

【0090】

挿入は、一個又は複数個のアミノ酸残基がタンパク質の所定の部位へ導入されることを指す。挿入は、N末端及び/又はC末端の融合並びに単一若しくは複数のアミノ酸の配列内挿入を含み得る。概して、アミノ酸配列内の挿入は、N-末端若しくはC末端の融合より小さい、約一個から十個の残基の大きさである。N末端又はC末端融合のタンパク質又はペプチドの例は、酵母ツーハイブリッド系に使用される転写活性化因子の結合ドメイン若しくは活性化ドメイン、ファージコートタンパク質、(ヒスチジン)-6-タグ、グルタチオンS-トランスフェラーゼ-タグ、プロテインA、マルトース-結合タンパク質、ジヒドロ葉酸レダクターゼ、Tag・100エピトープ、c-mycエピトープ、FLAG(登録商標)エピトープ、lacZ、CMP(カルモジュリン-結合ペプチド)、HAエピトープ、プロテインCエピトープ及びVSVエピトープを含む。

30

【0091】

置換は、タンパク質のアミノ酸と、同様の特性(同様の疎水性、親水性、抗原性、ヘリックス構造又はシート構造の形成又は破壊の傾向など)を有する他のアミノ酸との交換を指す。アミノ酸置換は、通常、単一の残基であるが、ポリペプチドに配置された機能的制約によりクラスター化されてもよく、一個から十個のアミノ酸範囲であってもよく、挿入は、普通、約一個から十個のアミノ酸残基の大きさである。アミノ酸置換は、好ましくは保存的アミノ酸置換である。保存的置換の表は、当分野において周知である(例えば、Creighton (1984年) Proteins. W.H. Freeman及びCompany (編)を参照されたい)。

40

【表 2】

表 2： 保存的アミノ酸置換の例

残基	保存的置換	残基	保存的置換
Ala	Ser	Leu	Ile; Val
Arg	Lys	Lys	Arg; Gln
Asn	Gln; His	Met	Leu; Ile
Asp	Glu	Phe	Met; Leu; Tyr
Gln	Asn	Ser	Thr; Gly
Cys	Ser	Thr	Ser; Val
Glu	Asp	Trp	Tyr
Gly	Pro	Tyr	Trp; Phe
His	Asn; Gln	Val	Ile; Leu
Ile	Leu, Val		

10

20

【 0 0 9 2 】

アミノ酸の置換、欠失及び/又は挿入は、固相ペプチド合成法などの当分野において周知のペプチド合成技術を使用して、又は組換えDNA操作により容易に作ることができる。タンパク質の置換、挿入又は欠失変異体を作るためにDNA配列を操作する方法は、当分野において周知である。例えば、DNAの所定の部位における置換突然変異を作る技術は、当業者に周知であり、M13突然変異誘発、T7-Gen in vitro mutagenesis (USB, Cleveland, OH)、QuickChange Site Directed mutagenesis (Stratagene, San Diego, CA)、PCR媒介部位特異的突然変異誘発又は他の部位特異的突然変異誘発プロトコルを含む。

30

【 0 0 9 3 】

「誘導体」は、対象となるタンパク質などのタンパク質の天然型のアミノ酸配列と比較して、アミノ酸と非天然のアミノ酸残基との置換又は非天然アミノ酸残基の付加を含み得るペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドをさらに含む。タンパク質の「誘導体」は、ポリペプチドの天然型のアミノ酸配列と比較して、天然に改変された(グリコシル化、アシル化、プレニル化、リン酸化、ミリストイル化、硫酸化など)又は非天然に改変されたアミノ酸残基を含むペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドもまた包含する。誘導体は、それが由来したアミノ酸配列と比較して、一個又は複数個の非アミノ酸置換基又は付加、例えば、その検出を容易にするために結合させたりポーター分子などの、アミノ酸配列に共有結合若しくは非共有結合したりポーター分子若しくは他のリガンド及び天然タンパク質のアミノ酸配列と比べて非天然のアミノ酸残基を含んでよい。さらに、「誘導体」は、FLAG、HIS6又はチオレドキシシンなどのペプチドのタグ付を有する天然型のタンパク質の融合もまた含む(ペプチドのタグ付の総説に関しては、Terpe, Appl. Microbiol. Biotechnol. 60, 523-533, 2003年を参照されたい)。

40

【 0 0 9 4 】

「オルソログ」及び「パラログ」は、遺伝子の組先の間関係を記載するために使用される

50

進化的概念を包含する。パラログは、祖先の遺伝子の複製を介して起こった同じ種内の遺伝子であり、オルソログは、種分化を介して起こり、さらに共通の祖先の遺伝子に由来する異なる生物由来の遺伝子である。このようなオルソログの例の、限定されない一覧表を、表1に示す。

【0095】

パラログ及びオルソログが、特定の基質のための結合ポケット又は他のタンパク質との相互作用のための結合モチーフなどの所与の部位に、適切なアミノ酸残基を有する異なるドメインを共有できることは、当分野において周知である。

【0096】

「ドメイン」という用語は、進化的に関連のあるタンパク質の配列のアライメントに沿った特定の位置において保存されたアミノ酸のセットを指す。一方、他の位置にあるアミノ酸はホモログの間で変化してもよく、特定の位置において高度に保存されたアミノ酸は、タンパク質の構造、安定性又は機能において必須であると思われるアミノ酸を示す。タンパク質ホモログのファミリーのアライメントされた配列において、それらの高度な保存が同定されると、問題となる任意のポリペプチドがすでに同定されたポリペプチドファミリーに属する場合、それらは、決定の識別子として使用できる。

【0097】

「モチーフ」又は「コンセンサス配列」という用語は、進化的に関連のあるタンパク質の配列中の短い保存領域を指す。モチーフは、ドメインの高い頻度で高度に保存された部分であるが、ドメインのほんの一部を含んでもよく、又は保存されたドメインの外側に位置してもよい(モチーフのアミノ酸のすべてが、既定のドメインの外側に収まる場合)。

【0098】

専門的なデータベースがドメインの同定のために存在する、例えば、SMART(Schultzら、(1998年) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95、5857-5864; Letunicら、(2002年) Nucleic Acids Res 30、242-244)、InterPro (Mulderら、(2003年) Nucl. Acids. Res. 31、315-318)、Prosite (Bucher及びBairoch (1994年)、A generalized profile syntax for biomolecular sequences motifs and its function in automatic sequence interpretation. ISMB-94; Proceedings 2nd International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology. Altman R., Brutlag D., Karp P., Lathrop R., Searls D. 編、53-61頁、AAAI Press, Menlo Park; Huloら、Nucl. Acids. Res. 32:D134-D137 (2004年))又は Pfam (Batemanら、Nucleic Acids Research 30(1): 276-280 (2002年))。タンパク質配列の*in silico*分析のためのツールのセットが、ExpASY proteomics server (Swiss Institute of Bioinformatics (Gasteigerら、ExpASY: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis, Nucleic Acids Res. 31:3784-3788(2003年))において利用可能である。ドメイン又はモチーフは、配列アライメントなどの日常の技術を使用しても同定できる。

【0099】

比較のための配列アライメント方法は当分野において周知であり、このような方法は、GAP、BESTFIT、BLAST、FASTA及びTFASTAを含む。GAPは、Needleman及びWunschのアルゴリズム((1970年) J Mol Biol 48: 443-453)を使用し、包括的な(すなわち、完全配列に及ぶ)一致数を最大にし、ギャップ数を最小にする、二つの配列のアライメントを見出す。BLASTのアルゴリズム(Altschulら(1990年) J Mol Biol 215: 403-10)は、配列同一性パーセントを計算し、二つの配列の間の類似性の統計分析を実施する。BLAST分析を実施するためのソフトウェアは、National Centre for Biotechnology Information (NCBI)を介して公的に利用可能である。ホモログは、例えば、ClustalW多重配列アライメントアルゴリズム(バージョン1.83)及びデフォルトペアワイズアライメントのパラメーター並びに百分率でのスコア付け方法を使用して容易に同定できる。類似性及び同一性の包括的百分率もまた、MatGATソフトウェアパッケージ(Campanellaら、BMC Bioinformatics. 2003年7月10日; 4:29. MatGAT: an application that generates similarity/identity matrices using protein or DNA sequences.)において利用可能な方法の一つを使用して決定できる。小さ

10

20

30

40

50

な手作業の編集が、保存モチーフ間のアライメントを最適化するために実施でき、このことは当業者には明らかである。さらに、ホモログの同定のために完全長配列を使用する代わりに、特異的ドメインを使用することもできる。配列同一性の値は、全核酸若しくはアミノ酸配列にわたって、又は選択されたドメイン若しくは保存モチーフ(複数可)にわたって、上述のプログラムを使用して、デフォルトパラメーターを使用して決定できる。局所アライメントに関しては、Smith-Watermanのアルゴリズムが特に有用である(Smith TF、Waterman MS (1981年) J. Mol. Biol 147(1);195-7)。

【0100】

本発明の発明者らは、驚くべきことに、一個又は複数個の鍵となるアミノ酸残基を置換することによって、配列番号2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 又は46の野生型PPO酵素の活性と比較して除草剤耐性又は除草剤抵抗性を著しく増加させ得ることを見出した。mut-PPOの好ましい置換は、植物の除草剤耐性を増加するが、オキシダーゼ活性の生物学的活性はそのまま、実質的に影響を受けないものである。

10

【0101】

したがって、本発明の別の目的において、PPO酵素、それらの変異体、誘導体、オルソログ、パラログ又はホモログの鍵となるアミノ酸残基は、任意の他のアミノ酸により置換される。

【0102】

好ましい実施形態において、PPO酵素、それらの変異体、誘導体、オルソログ、パラログ又はホモログの鍵となるアミノ酸残基は、上記の表2に表された保存アミノ酸により置換される。

20

【0103】

以下に述べるアミノ酸の位置に密接して位置するアミノ酸もまた置換できることは、当業者に理解されるものと思われる。したがって、別の実施形態において、配列番号2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 又は46の変異体、それらの変異体、誘導体、オルソログ、パラログ又はホモログは、mut-PPOを含み、鍵となるアミノ酸からアミノ酸からアミノ酸 ± 3 、 ± 2 又は ± 1 個のアミノ酸位が、任意の他のアミノ酸により置換される。

【0104】

当分野において周知の技術に基づいて、高度に特徴的な配列パターンが開発でき、これを用いて、所望の活性を有するさらなるmut-PPO候補を調査できる。

30

【0105】

適切な配列パターンの適用によるさらなるmut-PPO候補の調査もまた、本発明に包含される。本配列パターンは、前記パターンの二つの隣接するアミノ酸残基の間の正確な距離を制限するものではないことは当業者には理解されるであろう。上記のパターンにおける二つの隣接アミノ酸の間のそれぞれの距離は、所望の活性に実質的に影響することなく、例えば、互いに独立して ± 10 、 ± 5 、 ± 3 、 ± 2 又は ± 1 個のアミノ酸位置まで変動してよい。

【0106】

本発明に従って得られた結晶学的データに基づく個別のアミノ酸残基の、上記機能的及び空間的分析に沿って、本発明の潜在的に有用なmut-PPO候補の特徴的な固有の部分的アミノ酸配列を同定できる。

40

【0107】

特に好ましい実施形態において、配列番号2のmut-PPOの変異体又は誘導体は下記の表3aから選択され、配列番号2のmut-PPOの組み合わせられたアミノ酸置換は表3bから選択される。

【0108】

表3 a: (配列番号:2, 26, 38, 40): 単一アミノ酸置換

【表 3 a】

配列番号	キーマミノ酸	好ましい置換	一般的置換
2	Arg128	Leu, Ala, Val	Leu, Ala, Val, Ile, Phe, Trp, Asp, Asn
2	Gly175	欠失, Ala, Val, Pro	欠失, Ala, Val, Pro, Leu, Ile, Met, Ser, Thr
2	Gly209	欠失, Ala, Val, Pro	欠失, Ala, Val, Pro, Leu, Ile, Met, Ser, Thr
2	Gly210	欠失, Ala, Val, Pro	欠失, Ala, Val, Pro, Leu, Ile, Met, Ser, Thr
2	Leu295	Ser, Met, Ala	Ser, Met, Ala, Val, Asp, Asn Thr
2	Ser296	Leu, Met, Gly	Leu, Met, Gly, Val, Asp, Asn Thr
2	Leu334	Val, Ile, Phe	Val, Ile, Phe, Tyr, Asn, Asp, Thr
2	Phe353	Tyr, Leu	Tyr, Leu, Val, Ile, Asn
2	Gly382	Ala, Ser, Thr	Ala, Ser, Thr, Cys, Val, Asp
2	Leu384	Ala, Val, Ile	Ala, Val, Ile, Asn, Asp, Thr
2	Leu397	Ala, Val, Ile	Ala, Val, Ile, Asn, Asp, Thr
2	Gly398	Ala, Ser, Thr	Ala, Ser, Thr, Cys, Val, Asp
2	Thr399	Ser, Cys	Ser, Cys, Met, Ala, Asn
2	Leu400	Ala, Val, Ile, Phe	Ala, Val, Ile, Phe, Asn, Asp, Thr
2	Ser402	Gly, Ala, Cys	Gly, Ala, Cys, Asp, His
2	Ser403	Gly, Ala, Cys	Gly, Ala, Cys, Asp, His
2	Met404	Ser, Cys, Thr	Ser, Cys, Thr, Gly, Ala
2	Met405	Leu, Ala, Val	Leu, Ala, Val, Gly, Cys, Ser
2	Phe420	Met, Cys, Ile, Tyr, Trp	Met, Cys, Ile, Tyr, Trp, Leu, Thr
2	Phe439	Tyr, Trp	Tyr, Trp, Ala, Val, Ile
26	Val389	Met, Ala, Cys	Met, Ala, Cys, His
38	Ala220	欠失, Val, Thr, Leu, Cys, Ile	欠失, Val, Thr, Leu, Cys, Ile, Met
38	S305	Leu, Ala, Val	Leu, Ala, Val
38	Tyr426	Met, Cys, Ile,	Met, Cys, Ile, Leu, Thr
40	Gly178	欠失, Ala, Val, Pro	欠失, Ala, Val, Pro, Leu, Ile, Met, Ser, Thr
40	Gly179	欠失, Ala, Val, Pro	欠失, Ala, Val, Pro, Leu, Ile, Met, Ser, Thr
40	Phe372	Met, Cys, Ile, Tyr, Trp, Phe	Met, Cys, Ile, Tyr, Trp, Phe, Leu, Thr
40	Phe392	Met, Cys, Ile, Tyr, Trp	Met, Cys, Ile, Tyr, Trp, Leu Thr

表 3 b : 配列番号:2 (組合せたアミノ酸置換)

【表 3 b】

組合せ番号	キーアミノ酸位置	好ましい	一般的
		置換	
1	Gly209 or Gly210	欠失, Ala, Val, Pro	欠失, Ala, Val, Pro, Leu, Ile, Met, Ser, Thr
	Arg128	Leu, Ala, Val	Leu, Ala, Val, Ile, Phe, Trp, Asp, Asn
2	Phe420	Met, Cys, Ile,	Met, Cys, Ile, Leu, Thr
	Leu295	Ser, Met, Ala	Ser, Met, Ala, Val, Asp, Asn Thr
3	Phe420	Met, Cys, Ile,	Met, Cys, Ile, Leu, Thr
	Ser296	Leu, Met, Gly	Leu, Met, Gly, Val, Asp, Asn Thr
4	Arg128	Leu, Ala, Val	Leu, Ala, Val, Ile, Phe, Trp, Asp, Asn
	Phe420	Met, Cys, Ile,	Met, Cys, Ile, Leu, Thr
5	Gly209 or Gly210	欠失, Ala, Val, Pro	欠失, Ala, Val, Pro, Leu, Ile, Met, Ser, Thr
	Phe420	Met, Cys, Ile,	Met, Cys, Ile, Leu, Thr

10

20

【0110】

上記の表に述べられたアミノ酸のそばの任意のアミノ酸は、置換基として使用できることは理解されるべきである。このような変異体の機能性を試験するアッセイは、当分野において容易に利用可能であり、それぞれ、本発明の実施例の項に記載している。

30

【0111】

好ましい実施形態において、アミノ酸配列は、配列番号2のPPOのアミノ酸配列とは、次の位置のうち1箇所または複数箇所では異なっている：128、175、209、210、295、296、334、353、382、384、397、398、399、400、402、403、404、405、420、439。

【0112】

これらのアミノ酸位置での相違の例は、次のうち1つもしくは複数を含むが、それに限定されない：128位のアミノ酸はアルギニン以外である；175位のアミノ酸はグリシン以外である；209位のアミノ酸はグリシン以外である；210位のアミノ酸はグリシン以外である；295位のアミノ酸はロイシン以外である；296位のアミノ酸はセリン以外である；334位のアミノ酸はロイシン以外である；353位のアミノ酸はフェニルアラニン以外である；382位のアミノ酸はグリシン以外である；384位のアミノ酸はロイシン以外である；397位のアミノ酸はロイシン以外である；398位のアミノ酸はグリシン以外である；399位のアミノ酸はスレオニン以外である；400位のアミノ酸はロイシン以外である；402位のアミノ酸はセリン以外である；403位のアミノ酸はセリン以外である；404位のアミノ酸はメチオニン以外である；405位のアミノ酸はメチオニン以外である；420位のアミノ酸はフェニルアラニン以外である；439位のアミノ酸はフェニルアラニン以外である。

40

【0113】

ある実施形態において、配列番号2のPPO酵素は、下記のうち1つもしくは複数を含む：128位のアミノ酸は、Leu、Ala、Val、Ile、Phe、Trp、Asp、もしくはAsnである；175位

50

のアミノ酸は、欠失、Ala、Val、Pro、Leu、Ile、Met、Ser、もしくはThrである； 209位のアミノ酸は、欠失、Ala、Val、Pro、Leu、Ile、Met、Ser、もしくはThrである； 210位のアミノ酸は、欠失、Ala、Val、Pro、Leu、Ile、Met、SerもしくはThrである； 295位のアミノ酸は、Ser、Met、Ala、Val、Asp、Asn、もしくはThrである； 296位のアミノ酸は、Leu、Met、Gly、Val、Asp、Asn、もしくはThrである； 334位のアミノ酸は、Val、Ile、Phe、Tyr、Asn、Asp、もしくはThrである； 353位のアミノ酸は、Tyr、Leu、Val、Ile、もしくはAsnである； 382位のアミノ酸は、Ala、Ser、Thr、Cys、Val、もしくはAspである； 384位のアミノ酸は、Ala、Val、Ile、Asn、Asp、もしくはThrである； 397位のアミノ酸は、Ala、Val、Ile、Asn、Asp、もしくはThrである； 398位のアミノ酸は、Ala、Ser、Thr、Cys、Val、もしくはAspである； 399位のアミノ酸は、Ser、Cys、Met、Ala、もしくはAsnである； 400位のアミノ酸は、Ala、Val、Ile、Phe、Asn、Asp、もしくはThrである； 402位のアミノ酸は、Gly、Ala、Cys、Asp、もしくはHisである； 403位のアミノ酸は、Gly、Ala、Cys、Asp、もしくはHisである； 404位のアミノ酸は、Ser、Cys、Thr、Gly、もしくはAlaである； 405位のアミノ酸は、Leu、Ala、Val、Gly、Cys、もしくはSerである； 420位のアミノ酸は、Met、Cys、Ile、Tyr、Trp、Leu、もしくはThrである； 439位のアミノ酸は、Tyr、Trp、Ala、Val、もしくはIleである。

【0114】

さらに好ましい実施形態において、アミノ酸配列は、389位で、配列番号26のPPOのアミノ酸配列と異なる。好ましくは389位のアミノ酸は、バリン以外である。より好ましくは、389位のアミノ酸はMet、Ala、Cys、もしくはHisである。

【0115】

他に好ましい実施形態において、アミノ酸配列は、配列番号38のPPOのアミノ酸配列とは、次の位置のうち1箇所もしくは複数箇所では異なっている：220、305、426。好ましくは220位のアミノ酸はアラニン以外であり、305位のアミノ酸はセリン以外であり、426位のアミノ酸はチロシン以外である。

【0116】

より好ましくは、220位のアミノ酸は、欠失、Val、Thr、Leu、Cys、Ile、もしくはMetである； 305位のアミノ酸は、Leu、Ala、Valである； 426位のアミノ酸は、Met、Cys、Ile、Leu、もしくはThrである。

【0117】

他に好ましい実施形態において、アミノ酸配列は、次の位置のうち1箇所もしくは複数箇所、配列番号40のPPOのアミノ酸配列と異なる：178、179、372、392。好ましくは、178位のアミノ酸はグリシン以外であり、179位のアミノ酸はグリシン以外であり、372位のアミノ酸はフェニルアラニン以外であり、392位のアミノ酸はフェニルアラニン以外である。

【0118】

より好ましくは、178位のアミノ酸は、欠失、Ala、Val、Pro、Leu、Ile、Met、Ser、もしくはThrである； 179位のアミノ酸は、欠失、Ala、Val、Pro、Leu、Ile、Met、Ser、もしくはThrである； 372位のアミノ酸は、Met、Cys、Ile、Tyr、Trp、Phe、Leu、もしくはThrである； 392位のアミノ酸は、Met、Cys、Ile、Tyr、Trp、もしくはLeuである。

【0119】

表1に表されるような、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、又は45のホモログ、オルソログ及びパラログ並びにそれぞれ配列番号7又は9に共有される保存された領域及びモチーフの同定は、当業者の見識の範囲内であると思われる。適切な結合モチーフを提示できるこのような保存領域を同定すると、表3a及び3bに記載したアミノ酸に対応するアミノ酸は任意の他のアミノ酸、好ましくは表2に示す保存アミノ酸、より好ましくは表3a及び3bのアミノ酸による置換のために選択され得る。

【0120】

加えて、本発明は、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、2

10

20

30

40

50

9, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 又は45のヌクレオチド配列又はそれらの変異体若しくは誘導体を含む核酸によりコードされるmut-PP0を使用することによって、ベンゾオキサジノン誘導体系除草剤を同定する方法に言及する。

【0121】

前記方法は、

- a) mut-PP0コード核酸を含み、mut-PP0が発現されるトランスジェニック細胞又は植物を作製するステップ、
- b) ベンゾオキサジノン誘導体系除草剤を、a)のトランスジェニック細胞又は植物及び同じ変種の対照細胞又は植物に適用するステップ、
- c) 前記ベンゾオキサジノン誘導体系除草剤の適用後、トランスジェニック細胞又は植物及び対照細胞又は植物の成長又は生存能力を決定するステップ、並びに
- d) トランスジェニック細胞又は植物の成長と比較して、対照細胞又は植物に成長の減少をもたらす「ベンゾオキサジノン誘導体系除草剤」を選択するステップを含む。

10

【0122】

「対照細胞」又は「同様の野生型の、植物、植物組織、植物細胞又は宿主細胞」は、除草剤抵抗性特徴及び/又は本明細書に開示の本発明の特定のポリヌクレオチドを欠いた、それぞれ、植物、植物組織、植物細胞又は宿主細胞を意図する。したがって、「野生型」という用語の使用は、そのゲノム中に組換えDNAを欠いた、及び/又は本明細書に開示のものとは異なる除草剤抵抗性特徴を保有しない植物、植物組織、植物細胞又は他の宿主細胞を意味することを意図しない。

20

【0123】

別の目的は、ベンゾオキサジノン誘導体系除草剤に対して抵抗性又は耐性であるmut-PP0をコードするヌクレオチド配列を同定する方法であって、

- a) mut-PP0コード核酸のライブラリーを作製するステップ、
- b) 細胞又は植物において個々の前記核酸を発現させ、ベンゾオキサジノン誘導体系除草剤を用いて前記細胞又は植物を処理することによって、得られたmut-PP0コード核酸の集団をスクリーニングするステップ、
- c) mut-PP0コード核酸の前記集団により提供されるベンゾオキサジノン誘導体系除草剤耐性レベルと、対照PP0コード核酸により提供されるベンゾオキサジノン誘導体系除草剤-耐性レベルとを比較するステップ、
- d) 対照PP0-コード核酸により提供されるものと比較して、ベンゾオキサジノン誘導体系除草剤に対する耐性レベルの有意な増加を提供する、少なくとも一種のmut-PP0コード核酸を選択するステップを含む方法に言及する。

30

【0124】

好ましい実施形態において、ステップd)において選択されたmut-PP0コード核酸は、対照PP0-コード核酸により提供されるものと比較して、ベンゾオキサジノン誘導体系除草剤に対する少なくとも2倍高い細胞又は植物の抵抗性又は耐性を提供する。

【0125】

さらに好ましい実施形態において、ステップd)において選択されたmut-PP0コード核酸は、対照PP0-コード核酸により提供されるものと比較して、少なくとも2倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、少なくとも500倍高いベンゾオキサジノン誘導体系除草剤に対する細胞又は植物の抵抗性又は耐性を提供する。

40

【0126】

抵抗性又は耐性は、ステップa)のライブラリーの核酸配列を含むトランスジェニックな植物又は宿主細胞、好ましくは植物細胞を作製し、前記トランスジェニック植物と、対照の植物又は宿主細胞、好ましくは植物細胞とを比較することによって決定することができる。

50

【 0 1 2 7 】

別の目的は、ベンゾオキサジノン誘導体系除草剤に対して抵抗性又は耐性である野生型又はmut-PPOをコードするヌクレオチド配列を含む核酸を含有する植物又は藻を同定する方法であって、

- a) 植物細胞又は緑藻類の培養液における、前記細胞の死につながる有効量のベンゾオキサジノン誘導体系除草剤を同定するステップ、
 - b) 前記植物細胞又は緑藻類を、突然変異誘発剤を用いて処理するステップ、
 - c) 前記突然変異誘発細胞の集団と、a)で同定された有効量のベンゾオキサジノン誘導体系除草剤とを接触させるステップ、
 - d) これらの試験条件で生存する少なくとも一種の細胞を選択するステップ、
 - e) d)において選択された細胞からPPO遺伝子のPCR増幅及び配列決定をし、このような配列と野生型のPPO遺伝子配列とをそれぞれ比較するステップ、
- を含む方法に言及する。

10

【 0 1 2 8 】

好ましい実施形態において、前記突然変異誘発剤はエチルメタンスルホン酸(EMS)である。

【 0 1 2 9 】

技術者に周知の多くの方法が、微生物、植物、菌類、藻、混合培養液などを含むさまざまな異なる潜在的供給源生物並びに土壌などのDNAの環境的供給源由来のmut-PPOをコードするヌクレオチド配列を同定するための、適切な候補核酸を得るために利用可能である。これらの方法は、特に、cDNA又はゲノムDNAライブラリーの調製、適切に縮重されたオリゴヌクレオチドプライマーの使用、公知の配列又は相補性アッセイに基づくプローブの使用(例えば、チロシンにおける成長)並びに組換えられた、又はシャッフルされたmut-PPO-コード配列を提供するための、突然変異誘発及びシャッフリングの使用を含む。

20

【 0 1 3 0 】

候補及び対照のPPOコード配列を含む核酸は、酵母、細菌宿主株、藻類又はタバコ又はシロイヌナズナなどの高等植物において発現可能であり、スクリーニングされたPPOコード配列の先天性耐性の相対的レベルは、選択されたベンゾオキサジノン誘導体系除草剤のさまざまな濃度の存在下で、形質転換された菌株又は植物の目に見える指標となる表現型に一致する。これらの指標となる表現型(褐色形成、成長阻害、除草効果など)に伴う用量応答及び用量応答における相対的移行、例えば、GR50(成長が50%減少する濃度)又は値の増加が発現されたPPOの先天性耐性の増加と一致するMIC(最小阻害濃度)値の用量応答及び用量応答における相対的移行は、都合の良いことに、明確に発現される。例えば、大腸菌(*E. coli*)などの細菌の形質転換に基づく比較的高速なアッセイ系において、個々のmut-PPOコード配列は、例えば、*lacZ*プロモーターなどの調節可能なプロモーターの発現調節下のDNA配列として、例えば合成DNAの使用により、異なるPPO配列のレベルと可能な限り同等のレベルの発現を得るためのコドンの使用などの問題を適切に考慮して発現できる。別の候補PPO配列を含む核酸を発現するような菌株は、場合によりチロシンを添加した培地中のさまざまな濃度の選択されたベンゾオキサジノン誘導体系除草剤にプレーティングでき、発現されたPPO酵素の先天性耐性の相対的レベルを、茶色の、組織褐変性色素の形成の阻害に関する程度及びMICに基づいて推定した。

30

40

【 0 1 3 1 】

別の実施形態において、候補核酸を植物材料内に形質転換し、トランスジェニック植物を作製し、選択されたベンゾオキサジノン誘導体系除草剤に対する差次的耐性がその後測定され、形態的に正常な繁殖性植物が再生される。カナマイシンなどの適切な選択マーカー、アグロバクテリウム属(*Agrobacterium*)由来などのバイナリーベクター及び例えば、タバコのリーフディスク法などの植物再生を使用する、形質転換のための多くの適切な方法が、当分野において周知である。場合により、植物の対照集団は、対照PPOを発現する核酸を用いて同様に形質転換される。代替的に、非形質転換のシロイヌナズナ又はタバコ(*Tobacco*)などの双子葉植物を、これはどんな場合にもその自分の内因性PPOを発現するの

50

で、対照として使用できる。上記に記載されたベンゾオキサジノン誘導体に対する、さまざまな一次植物形質転換事象又はそれらの子孫の除草剤耐性レベルの平均及び分布は、さまざまな異なる濃度の除草剤における、植物の損傷、成長点漂白化症状などに基づく正常な様式で評価される。これらのデータは、例えば、「用量」をx軸にプロットし、「死滅百分率」、「除草剤効果」、「新生緑色植物の数」などをy軸にプロットした用量/応答曲線に由来するGR50値に関して表すことができ、GR50値の増加は、発現されたPPOの先天的耐性レベルの増加に一致する。除草剤は、出芽前又は出芽後に適切に適用される。

【0132】

別の目的は、mut-PPOをコードする単離された核酸であって、上記の方法により同定可能である核酸に言及する。

10

【0133】

別の実施形態において、本発明は、野生型若しくはmut-PPO核酸により形質転換された植物細胞又は野生型若しくはmut-PPO核酸を発現する植物を得るために突然変異を起こした植物細胞であって、植物細胞における核酸の発現は、野生型変種の植物細胞と比較して、ベンゾオキサジノン誘導体系除草剤に対する抵抗性若しくは耐性の増加をもたらす植物細胞に言及する。

【0134】

「発現(expression)/発現する(expressing)」又は「遺伝子発現」という用語は、特定の遺伝子若しくは特定の遺伝子(複数)又は特定の遺伝子構築体の転写を意味する。「発現」又は「遺伝子発現」という用語は、具体的には、遺伝子若しくは遺伝子(複数)又は遺伝子構築体の、構造RNA(rRNA、tRNA)又はmRNAへの、後者のタンパク質へのその後の翻訳を伴う又は伴わない転写を意味する。この過程は、DNAの転写及び得られたmRNA産物のプロセッシングを含む。

20

【0135】

所望の効果、すなわち、本発明のベンゾオキサジノン誘導体系除草剤に対して耐性又は抵抗性である植物を得ることは、少なくとも一種の核酸が、当業者に公知の方法及び手段により「過剰発現」されることは理解されるであろう。

【0136】

本明細書において使用する場合、「発現の増加」又は「過剰発現」という用語は、もとの野生型の発現レベルに追加される、任意の形態の発現を意味する。遺伝子又は遺伝子産物の発現を増加させる方法は、当分野において十分文書化されており、例えば、適切なプロモーターにより駆動される過剰発現、転写エンハンサー又は翻訳エンハンサーの使用を含む。プロモーター又はエンハンサー要素として機能する単離核酸は、対象となるポリペプチドをコードする核酸の発現を上方制御するように、ポリヌクレオチドの非異種形態の適切な位置(通常上流)に導入できる。例えば、内因性プロモーターは、突然変異、欠失、及び/又は置換によりin vivoで改変でき(Kmiec、米国特許第5,565,350号、Zarlingら、WO9322443を参照されたい)又は単離プロモーターは、遺伝子の発現が調節されるように、固有の配向及び本発明の遺伝子から離れて植物細胞に導入できる。

30

【0137】

ポリペプチドの発現が望ましい場合、概して、ポリヌクレオチドコード領域の3'末端にポリアデニル化領域を含むことが望ましい。ポリアデニル化領域は、天然の遺伝子、さまざまな他の植物遺伝子又はT-DNAに由来してよい。加えられる3'末端配列は、例えば、ノパリン合成酵素若しくはオクトピン合成酵素の遺伝子又は代替的には、別の植物遺伝子又はあまり好ましくはないが任意の他の真核性遺伝子に由来してよい。

40

【0138】

イントロン配列もまた、サイトゾル中に蓄積した成熟メッセージの量を増加するために、5'非翻訳領域(UTR)又は部分的コード配列のコード配列に加えることができる。植物及び動物の両方の発現構築体の転写ユニット中にスプライシング可能なイントロンを含むことで、mRNA及びタンパク質の両方の遺伝子発現レベルが、1000倍まで増加することが示されている(Buchman及びBerg(1988年)Mol. Cell Biol. 8: 4395-4405; Callisら(1987年) G

50

enes Dev 1:1183-1200)。転写ユニットの5'末端近くに配置された場合、遺伝子発現のこのようなイントロン強化が通常最も高い。トウモロコシのイントロンである、Adh1-Sイントロン1、2及び6、Bronze-1イントロンの使用が、当分野において公知である。概説に関しては、The Maize Handbook, Chapter 116, Freeling及びWalbot編、Springer、N.Y. (1994年)を参照されたい。

【0139】

本明細書において言及される「導入」又は「形質転換」という用語は、移入に使用する方法にかかわらず、外因性のポリヌクレオチドの宿主細胞への移入を包含する。器官形成によってであろうと胚形成によってであろうと、その後クローン増殖可能な植物組織は、本発明の遺伝子構築体を用いて形質転換でき、それから植物全体を再生できる。選択された特定の組織は、形質転換される特定の種に利用可能で、最も適したクローン増殖系に依存して変更される。例示的組織標的は、リーフディスク、花粉、胚、子葉、胚軸、大配偶体、カルス組織、既存の分裂組織(例えば、頂端分裂組織、腋芽及び根の分裂組織)及び誘導性分裂組織(例えば、子葉分裂組織及び胚軸分裂組織)を含む。ポリヌクレオチドは、一時的に、又は安定して宿主細胞に導入でき、非統合的に、例えば、プラスミドとして維持され得る。代替的には、ポリヌクレオチドは宿主ゲノムに統合され得る。得られた形質転換された植物細胞は、その後、当業者に公知の様式で形質転換された植物を再生するために使用できる。

【0140】

外来遺伝子の植物ゲノムへの移入を、形質転換と呼ぶ。植物種の形質転換は、現在きわめて日常の技術である。有利なことに、任意のいくつかの形質転換方法は、対象となる遺伝子を適切な祖先細胞に導入するために使用できる。植物組織又は植物細胞から植物の形質転換及び再生に関して記載された方法は、一時的な、又は安定した形質転換に利用できる。形質転換方法は、リポソーム、エレクトロポレーション、遊離のDNAの取り込みを増加する化学物質的、植物へのDNAの直接注入、微粒子銃、ウイルス又は花粉を使用する形質転換及び顕微鏡投影の使用を含む。方法は、プロトプラストのためのカルシウム/ポリエチレングリコール法(Krens, F.A.ら、(1982年) Nature 296、72-74; Negrutiu Iら(1987年) Plant Mol Biol 8: 363-373);プロトプラストのエレクトロポレーション(Shillito R.D.ら(1985年) Bio/Technol 3、1099-1102);植物材料へのマイクロインジェクション(Crossway Aら、(1986年)Mol. Gen Genet 202: 179-185); DNA又はRNAによりコーティングされた粒子衝撃(Klein TMら、(1987年) Nature 327: 70)(非統合的)ウイルスによる感染などから選択できる。トランスジェニック作物を含むトランスジェニック植物は、好ましくは、アグロバクテリウム属媒介形質転換を介して作製される。有利な形質転換方法は、植物体における形質転換である。この目的のために、例えば、アグロバクテリアを植物種子に作用させる、又は植物分裂組織にアグロバクテリアを接種することが可能である。形質転換されたアグロバクテリアの懸濁液を無傷の植物若しくは少なくとも花原基に作用させることは、本発明に従って特に好都合に証明されている。植物は、処理した植物の種子が得られるまで続けて成長させる。(Clough及びBent、Plant J. (1998年) 16、735-743)。コメのアグロバクテリウム属媒介形質転換の方法は、下記のいずれかに記載の方法などの、コメの形質転換の周知の方法を含む:欧州特許出願EP 1198985 A1、Aldemita及びHodges (Planta 199: 612-617、1996年); Chanら、(Plant Mol Biol 22 (3): 491-506、1993年)、Hieiら、(Plant J 6 (2): 271-282、1994年)、これらの開示は、完全に説明されたかのように、参照により本明細書に組み込まれる。コーンの形質転換の場合、好ましい方法は、Ishidaら(Nat. Biotechnol 14(6): 745-50、1996年)又はFrameら(Plant Physiol 129(1): 13-22、2002年)のいずれかに記載の方法であり、これらの開示は、完全に説明されたかのように、参照により本明細書に組み込まれる。前記方法は、B. Jenesら、Techniques for Gene Transfer、Transgenic Plants、1巻、Engineering and Utilization、S.D. King及びR. Wu編、Academic Press (1993年) 128-143及びPotrykus Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991年) 205-225)に例としてさらに記載されている。発現される核酸又は構築体は、好ましくは、アグロバクテリウム・ツメファシエンシス(Agrob

10

20

30

40

50

acterium tumefaciens)の形質転換に適切なベクター、例えば、pBin19 (Bevanら、Nucl. Acids Res. 12 (1984年) 8711)内にクローニングされる。このようなベクターにより形質転換されたアグロバクテリアは、その後、シロイヌナズナ(シロイヌナズナは本発明の範囲内であり、作物とはみなさない)のようなモデルとして使用される植物などの植物、例としてタバコ植物などの作物などの作物の形質転換のための公知の様式に、例えば、傷ついた葉又は刻んだ葉をアグロバクテリアの溶液に浸し、その後それらを適切な培地において培養することによって使用できる。アグロバクテリウム・ツメファシエンシスを用いた植物の形質転換が、例えば、Hoefgen及びWillmitzerによるNucl. Acid Res. (1988年) 16、9877により記載され、又は特に、F.F. White、Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in Transgenic Plants、1巻、Engineering and Utilization、S.D. Kung及びR. Wu編、Academic Press、1993年、15-38頁により公知である。

10

【 0 1 4 1 】

その後、無傷の植物に再生されなければならない体細胞の形質転換に加えて、植物分裂組織の細胞、特に配偶子に生育するそれらの細胞もまた形質転換できる。この場合、形質転換された配偶子は天然の植物の生育をたどり、トランスジェニック植物を生じる。したがって、例えば、シロイヌナズナの種子をアグロバクテリアを用いて処理し、種子が、特定の部分が形質転換された、したがってトランスジェニックな生育中の植物から得られる[Feldman, KA及びMarks MD (1987年)。Mol Gen Genet 208:274-289; Feldmann K (1992年) C Koncz、N-H Chua及びJ Shell編、Methods in Arabidopsis Research. World Scientific、Singapore、274-289頁]。代替の方法は、花序の反復除去及びロゼットの中心の切除部位と形質転換されたアグロバクテリアとのインキュベーションに基づき、それによって、形質転換された種子を同様にのちの時点で得ることができる(Chang (1994年)。Plant J. 5: 551-558; Katavic (1994年)。Mol Gen Genet、245: 363-370)。しかし、特に有効な方法は、減圧浸潤法及び「フローラルディップ」法などのその変形である。シロイヌナズナの減圧浸潤の場合、減圧下で無傷の植物をアグロバクテリアの懸濁液を用いて処理し[Bechthold, N (1993年)。C R Acad Sci Paris Life Sci、316: 1194-1199]、一方、「フローラルディップ」法の場合、生育中の花の組織を、界面活性剤により処理されたアグロバクテリアの懸濁液と一緒に少しの間インキュベートする[Clough, SJ及びBent AF (1998年) The Plant J. 16、735-743]。両方の場合に、トランスジェニック種子特定の集団を収穫し、これらの種子は、上記の選択的条件下で成長した非トランスジェニック種子とは識別可能である。加えて、母方から遺伝する色素体は、大部分の作物において導入遺伝子が花粉に流入する危険性を減少又は排除するので、色素体の安定した形質転換が有利である。葉緑体ゲノムの形質転換は、概して、Klausら、2004年[Nature Biotechnology 22 (2)、225-229]に概略的に表示されている方法によって達成される。簡潔に言うと、形質転換された配列を、葉緑体ゲノムに相同な隣接配列の間に、選択可能なマーカー遺伝子と一緒に、クローニングする。これらの相同な隣接配列は、プラストーム内に部位特異的統合に向かう。色素体の形質転換は、多数のさまざまな植物種に関して記載されており、概要は、Bock (2001年) Transgenic plastids in basic research and plant biotechnology. J Mol Biol. 2001年9月21日; 312 (3):425-38又はMaliga, P (2003年) Progress towards commercialization of plastid transformation technology. Trends Biotechnol. 21、20-28に示されている。さらなるバイオテクノロジーの進歩が、無マーカー色素体形質転換体の形態で近年報告されており、これらは一次的に共組込みされたマーカー遺伝子により作製できる(Klausら、2004年、Nature Biotechnology 22(2)、225-229)。遺伝子組換え植物細胞は、技術者によく知られたすべての方法を介して再生できる。適切な方法は、S.D. Kung及びR. Wu、Potrykus又はHoefgen及びWillmitzerによる上記の刊行物に見出すことができる。

20

30

40

【 0 1 4 2 】

概して形質転換後、植物細胞又は細胞のグループは、対象となる遺伝子とともに同時移入される、植物の発現可能な遺伝子によりコードされる、一種又は複数種のマーカーの存在に関して選択され、その後、形質転換された材料を植物全体に再構成する。形質転換植

50

物の選択のために、形質転換により得られた植物材料は一般に、形質転換された植物が、非形質転換植物と識別できるような選択条件に供される。例えば、上記の様式において得られた種子を植え付け、初期成長後、スプレーによる適切な選択に供することができる。さらなる可能性は、滅菌後適切な場合、形質転換された種子だけが植物に成長できるように、適切な選択剤を使用して寒天プレート上で種子を成長させることにある。代替的には、形質転換された植物を、上記の一種などの選択可能なマーカーの存在に関してスクリーニングする。

【0143】

DNAの移入及び再生後、推定上形質転換された植物を、例えば、サザン分析を使用して、対象となる遺伝子、コピー数及び/又はゲノムの組織化の存在に関してさらに評価することができる。代替的には又は追加的に、新しく導入されたDNAの発現レベルはノーザン分析及び/またウエスタン分析を使用してモニターすることができ、双方とも当業者に周知の技術である。

10

【0144】

作製された形質転換植物は、クローン増殖又は伝統的な育種技術などのさまざまな手段により繁殖させることができる。例えば、第1世代(又はT1)形質転換植物は自家受粉でき、ホモ接合性の第2世代(又はT2)形質転換体を選択し、T2植物は、その後伝統的な育種技術を介してさらに繁殖させることができる。作製された形質転換生物は、さまざまな形態をとり得る。例えば、それらは、形質転換細胞及び非形質転換細胞のキメラ、クローン性形質転換体(例えば、発現カセットを含有するように形質転換されたすべての細胞)、形質転換組織及び非形質転換組織のグラフト(例えば、植物において、非形質転換の接ぎ穂にグラフトされた形質転換された根茎)であってよい。

20

【0145】

好ましくは、野生型若しくはmut-PP0の核酸は、a)配列番号1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 又は45で示されるポリヌクレオチド又はそれらの変異体若しくは誘導体、b)配列番号2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 若しくは46で示されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド又はそれらの変異体若しくは誘導体、c) a)またはb)からの任意の少なくとも60個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチド、並びにd) a)からc)の任意のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドからなる群から選択されるポリヌクレオチド配列を含む。

30

【0146】

好ましくは、植物における核酸の発現は、野生型変種の植物と比較して、ベンゾオキサジノン誘導体系除草剤に対する植物の抵抗性の増加をもたらす。

【0147】

別の実施形態において、本発明は、本発明による植物細胞を含む植物、好ましくはトランスジェニック植物であって、植物における核酸の発現が、野生型変種の植物と比較して、ベンゾオキサジノン誘導体系除草剤に対する植物の抵抗性の増加をもたらす植物に言及する。

【0148】

本明細書に記載の植物は、トランスジェニック作物又は非トランスジェニック植物のいずれであってもよい。

40

【0149】

本発明の目的に関して、「トランスジェニック」、「導入遺伝子」又は「組換え体」は、例えば、核酸配列、発現カセット、遺伝子構築体又は核酸配列を含むベクター若しくは本発明に従った核酸配列、発現カセット若しくはベクターを用いて形質転換された生物に関して意味し、それらすべての構築は組換え法により引き起こされ、

(a)本発明の方法に有用なタンパク質をコードする核酸配列、又は

(b)本発明に従った核酸配列と動作可能に連結された遺伝子調節配列(複数可)、例えばプロモーター、又は

50

(c)a)及びb)

のいずれかが、それらの天然の遺伝子環境に配置されていない、又は組換え法により修飾されており、例えば、一個又は複数個のヌクレオチド残基の置換、付加、欠失、反転又は挿入の形態をとる修飾が可能である。天然の遺伝子環境は、もともとの植物の天然のゲノム若しくは染色体の遺伝子座又はゲノムライブラリー中の存在の意味と理解される。ゲノムライブラリーの場合、核酸配列の天然の遺伝子環境は、少なくとも一部保有されることが好ましい。核酸配列に隣接する環境は、少なくとも片側であり、少なくとも50bp、好ましくは少なくとも500bp、特に好ましくは少なくとも1000bp、最も好ましくは少なくとも5000bpの配列長を有する。天然の発現カセット、例えば、上記のような、核酸配列の天然プロモーターと、本発明の方法に有用なポリペプチドをコードする、対応する核酸配列との天然の組み合わせは、この発現カセットが、例えば、変異原性処理などの非天然の、合成(「人工の」)方法により修飾された場合、トランスジェニック発現カセットとなる。適切な方法は、例えば、米国特許第5,565,350号又はWO 00/15815に記載されている。

10

【0150】

本発明の目的のためのトランスジェニック植物は、したがって上記のように、本発明の方法に使用する核酸が前記植物のゲノム中のそれらの天然の遺伝子座にはないという意味であり、核酸が相同又は非相同に発現される可能性があることが理解されるべきである。しかし、上述のように、トランスジェニックは、本発明に従った核酸又は本発明の方法に使用する核酸は、植物のゲノムのそれらの天然の位置にあるが、この配列が天然配列に関して修飾されている、及び/又は天然配列の制御配列が修飾されているということも意味する。トランスジェニックは、好ましくは、ゲノム中の非天然遺伝子座における、本発明に従った核酸の発現、すなわち、核酸の相同又は好ましくは非相同の発現が起こるという意味に理解されるべきである。好ましいトランスジェニック植物を、本明細書において述べる。さらに「トランスジェニック」という用語は、少なくとも一種の組換えポリヌクレオチドのすべて又は一部を含有する任意の植物、植物細胞、カルス、植物組織又は植物部分を指す。多くの場合、組換えポリヌクレオチドのすべて又は一部は、後続世代に伝わるように染色体又は安定した染色体外の要素に安定に統合される。本発明の目的のために、「組換えポリヌクレオチド」という用語は、遺伝子操作により改変、再構成又は修飾されたポリヌクレオチドを指す。例は、任意のクローニングされたポリヌクレオチド、又は非相同配列に連結又は結合されたポリヌクレオチドを含む。「組換え」という用語は、自発的突然変異などの天然事象によりもたらされるポリヌクレオチドの改変又は非自発的突然変異誘発に続く選択的育種によりもたらされるポリヌクレオチドの改変を指すものではない。

20

30

【0151】

本明細書において非自発的突然変異誘発及び選択的育種のために起こる突然変異を含有する植物は、本明細書において非トランスジェニック植物と称され、本発明に含まれる。植物がトランスジェニックであり、複数種のmut-PP0核酸を含む実施形態において、核酸は異なるゲノムに由来しても、又は同じゲノムに由来してもよい。代替的には、植物が非トランスジェニックであり、複数種のmut-PP0核酸を含む実施形態において、核酸は異なるゲノム上に配置されても、又は同じゲノム上に配置されてもよい。

40

【0152】

特定の実施形態において、本発明は、突然変異育種により作製された除草剤抵抗性植物を含む。このような植物は、mut-PP0をコードするポリヌクレオチドを含み、一種又は複数種の「ベンゾオキサジノン誘導体系除草剤」に対して耐性である。このような方法は、例えば、植物又は種子を、突然変異原、特に、例えば、エチルメタンスルホン酸(EMS)などの化学的突然変異原に曝露するステップ及び少なくとも一種又は複数種のベンゾオキサジノン誘導体系除草剤に対する耐性が強化された植物を選択するステップを含む。

【0153】

しかし、本発明は、化学的突然変異原EMSを含む突然変異誘発方法により作製された除草剤-耐性植物に限定するものではない。当分野において公知の任意の突然変異誘発方法

50

が、本発明の除草剤抵抗性植物の作製に使用できる。このような突然変異誘発方法は、例えば、任意の一種又は複数種の下記の突然変異原の使用を含み得る：X線、ガンマ線(例えばコバルト60又はセシウム137)、中性子線(例えば、原子炉におけるウラン235による核分裂の産物)、ベータ照射(例えば、リン32又は炭素14などの放射性同位元素からの放射)及び紫外線照射(好ましくは、2500から2900nm)などの照射並びに塩基類似体(例えば、5-ブプロモウラシル)、関連化合物(例えば、8-エトキシカフェイン)、抗生物質(例えば、ストレプトニグリン)、アルキル化剤(例えば、スルファマスタード、ナイトロジェンマスタード、エポキシド、エチレンアミン、硫酸塩、スルホン酸塩、スルホン、ラクトン)、アジ化物、ヒドロキシルアミン、亜硝酸又はアクリジンなどの化学的突然変異原。除草剤抵抗性植物は、組織培養法を使用して除草剤抵抗性突然変異を含む植物細胞を選択し、その後、それらから除草剤抵抗性植物を再生することによって作製してもよい。例えば、米国特許第5,773,702号及び第5,859,348号を参照されたく、これらは両方とも、その全体を参照により本明細書に組み込む。突然変異育種のさらなる詳細は、「Principals of Cultivar Development」Fehr、1993年Macmillan Publishing Companyに見出すことができ、この開示は参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0154】

上の定義に加えて、「植物」という用語は、文脈において明示されていない限り、成熟又は生育の任意の段階の作物並びにこのような植物からとられた又はこのような植物に由来する任意の組織又は器官(植物部分)を包含することを意図する。植物部分は、限定するものではないが、茎、根、花、胚珠、雄ずい、葉、胚、成長点領域、カルス組織、薬培養、配偶体、孢子体、花粉、小孢子、プロトプラストなどを含む。

20

【0155】

本発明の植物は、少なくとも一種のmut-PPO核酸又は過剰発現された野生型PPO核酸を含み、野生型変種の植物と比較してベンゾオキサジノン誘導体系除草剤に対する耐性が増加している。これらの植物は複数のゲノムを含有できるので、本発明の植物は、異なるゲノムに由来する複数の野生型又はmut-PPO核酸を有することが可能である。例えば、植物は二種のゲノムを含有し、普通はAゲノム及びBゲノムと称される。PPOは代謝に必要な酵素であるので、各ゲノムはPPO酵素をコードする少なくとも一種の遺伝子(すなわち、少なくとも一種のPPO遺伝子)を有すると想定される。本明細書において使用する場合、「PPO遺伝子の遺伝子座」という用語は、ゲノム上のPPO遺伝子の位置を指し、「PPO遺伝子」及び「PPO核酸」という用語は、PPO酵素をコードする核酸を指す。各ゲノム上のPPO核酸は、別のゲノム上のPPO核酸とはそのヌクレオチド配列が異なる。当業者は、遺伝子交雑及び/又は当業者に公知の配列決定法又はエクソヌクレアーゼ消化法のいずれかを介して各PPO核酸の起源のゲノムを決定できる。

30

【0156】

本発明は、一、二、三種以上のmut-PPO対立遺伝子を含む植物を含み、植物は、野生型変種の植物と比較してベンゾオキサジノン誘導体系除草剤に対する耐性が増加している。mut-PPOの対立遺伝子は配列番号1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 若しくは45で定義されるポリヌクレオチド又はそれらの変異体若しくは誘導體、配列番号2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 若しくは46で定義されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド又はそれらの変異体若しくは誘導體、ホモログ、オルソログ、パラログ、任意の前述のポリヌクレオチドの少なくとも60個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチド及び任意の前述のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドからなる群から選択されるヌクレオチド配列を含むことができる。

40

【0157】

「対立遺伝子」又は「対立遺伝子変異体」は、同じ染色体位置に配置された所与の遺伝子の代替の形態である。対立遺伝子変異体は、一塩基多型(Single Nucleotide Polymorphisms)(SNP)並びに小規模挿入/欠失多型(Small Insertion/Deletion Polymorphism)(INDEL)を包含する。INDELのサイズは、普通100bp未満である。SNP及びINDELは、大部分の生物

50

の天然の多型系統中の最も大きなセットの配列変異体を形成する。

【0158】

「変種」という用語は、一つの栽培品種又は変種と、別の栽培品種又は変種とを識別するために十分な、当業者に認められた特徴又は形質の共通セットの共有により定義される、種内の植物の群を指す。いずれの用語においても、任意の所与の栽培品種又は変種のすべての植物が、全遺伝子若しくは分子レベルのいずれかで遺伝的に同一であると思われる、又は任意の所与の植物が、すべての遺伝子座においてホモ接合性であると思われるという意味ではない。栽培品種又は変種は、特定の形質の「純粋育種」と考えられ、純粋育種の栽培品種又は変種が自家受粉である場合、すべての子孫がその形質を含有する。「育種系統」又は「系統」という用語は、一つの育種系統又は系統と、別の育種系統又は系統とを識別するために十分な、当業者に認められた特徴又は形質の共通セットの共有により定義される栽培品種内の植物の群を指す。いずれの用語においても、任意の所与の育種系統又は系統のすべての植物が、全遺伝子若しくは分子レベルのいずれかで遺伝的に同一であると思われる、又は任意の所与の植物が、すべての遺伝子座においてホモ接合性であると思われるという意味ではない。育種系統又は系統は、特定の形質の「純粋育種」と考えられ、純粋育種系統又は育種系統が自家受粉である場合、すべての子孫がその形質を含有する。本発明において、形質は植物又は種子のPPO遺伝子における突然変異により起こる。

【0159】

mut-PPOポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む本発明の除草剤抵抗性植物は、有性生殖を伴う従来の植物育種を介して植物の除草剤抵抗性を増加する方法における使用もまた見出されている。本方法は、本発明の除草剤抵抗性植物である第一の植物と、同じ除草剤又は除草剤(複数種)に対して抵抗性であっても抵抗性でなくてもよく、又は第一の植物とは異なる除草剤若しくは除草剤(複数種)に対して抵抗性であってもよい第二の植物とを交雑するステップを含む。第二の植物は、第一の植物と交雑する場合、生存能力のある子孫植物(すなわち種子)を産生できる任意の植物であってよい。通常、必ずしも必要ではないが、第一及び第二の植物は同じ種の植物である。本方法は、場合により、第一の植物のmut-PPOポリペプチド及び第二の植物の除草剤抵抗性特徴を含む子孫植物を選択するステップを含む。本発明のこの方法により作製された子孫植物は、第一の植物若しくは第二の植物のいずれか又は両方と比較した場合、除草剤に対する抵抗性が増加している。第一の植物及び第二の植物が、異なる除草剤に対して抵抗性である場合、子孫植物は、第一の植物及び第二の植物の組み合わせられた除草剤耐性特徴を有すると思われる。本発明の方法は、初回交雑の子孫植物と第一の植物又は第二の植物のいずれかと同じ系統又は遺伝子型の植物との戻し交雑の、一つ又は複数の世代をさらに含むことができる。代替的には、初回交雑又は任意のその後の交雑の子孫を、第一の植物又は第二の植物のいずれかと異なる系統又は遺伝子型の第三の植物と交雑できる。本発明は、本発明の少なくとも一種のポリヌクレオチド分子、発現カセット又は形質転換ベクターを用いて形質転換された植物、植物器官、植物組織、植物細胞、種子及び非ヒト宿主細胞をさらに提供する。このような形質転換された植物、植物器官、植物組織、植物細胞、種子及び非ヒト宿主細胞は、それぞれ、非形質転換の植物、植物組織、植物細胞又は非ヒト宿主細胞の成長を死滅させる、又は阻害する除草剤レベルにおいて、少なくとも一種の除草剤に対する耐性又は抵抗性が強化している。好ましくは、本発明の形質転換された植物、植物組織、植物細胞、種子はシロイヌナズナ及び作物である。

【0160】

本発明の植物が、mut-PPO核酸に加えて野生型PPO核酸を含み得ることは理解されるであろう。ベンゾオキサジノン誘導体系除草剤耐性系統は、複数のPPOアイソザイムの一種のみに突然変異を含有できることが企図される。したがって、本発明は、一種又は複数種の野生型PPO核酸に加えて一種又は複数種のmut-PPO核酸を含む植物を含む。

【0161】

別の実施形態において、本発明は、本発明の植物細胞を含むトランスジェニック植物により産生された種子に言及し、この種子は、野生型変種の種子と比較してベンゾオキサジ

10

20

30

40

50

ノン誘導体系除草剤に対する抵抗性の増加に関して純粋育種である。

【0162】

別の実施形態において、本発明は、野生型変種の植物細胞と比較して、ベンゾオキサジノン誘導体系除草剤に対する抵抗性が増加したトランスジェニック植物細胞を作製する方法であって、mut-PPO核酸を含む発現カセットにより植物細胞を形質転換するステップを含む方法に言及する。

【0163】

別の実施形態において、本発明は、(a)mut-PPO核酸を含む発現カセットにより植物細胞を形質転換するステップ、及び(b)植物細胞からベンゾオキサジノン誘導体系除草剤に対する抵抗性が増加した植物を作製するステップを含む、トランスジェニック植物を作製する方法に言及する。

10

【0164】

結果として、本発明のmut-PPO核酸は、対象となる植物における発現のための発現カセット中に提供される。このカセットは、本発明のmut-PPO核酸配列に動作可能に連結された制御配列を含むものとする。「制御要素」という用語は、本明細書において使用する場合、動作可能に連結されたポリヌクレオチドの転写を制御できるポリヌクレオチドを指す。制御要素は、限定するものではないが、プロモーター、エンハンサー、イントロン、5' UTR及び3' UTRを含む。「動作可能に連結された」は、プロモーターと第二の配列の間の機能的連結を意図し、プロモーター配列は第二の配列に対応するDNA配列の転写を開始し、媒介する。概して、動作可能に連結するは、連結されている核酸配列が隣接しており、二つのタンパク質コード領域を接合する必要がある場合、同じリーディングフレームにおいて隣接していることを意味する。カセットは、さらに、生物に同時形質転換するための、少なくとも一種の追加の遺伝子を含むことができる。代替的には、追加の遺伝子(複数可)は、複数の発現カセットに提供することができる。

20

【0165】

このような発現カセットは、制御領域の転写制御下にある、mut-PPO核酸配列の挿入のための複数の制限部位を備えている。この発現カセットは、選択可能なマーカー遺伝子をさらに、含有することができる。

【0166】

発現カセットは、転写の5'-3'方向に、転写開始領域及び翻訳開始領域(すなわち、プロモーター)、本発明のmut-PPO核酸配列及び植物において機能的な転写終止領域及び翻訳終止領域(すなわち、終止領域)を含むものとする。プロモーターは、植物宿主に対して、及び/又は本発明のmut-PPO核酸配列に対して、天然若しくはアナログ又は外来性若しくは異種であってもよい。さらに、プロモーターは、天然配列又は代替的には合成配列であってもよい。プロモーターが、植物宿主に対して「外来性」又は「異種」である場合、プロモーターは、プロモーターが導入される天然植物において見出されないことが意図される。プロモーターが、本発明のmut-PPO核酸配列に対して「外来性」又は「異種」である場合、動作可能に連結された本発明のmut-PPO核酸配列に対して天然又は天然に発生したプロモーターではないことが意図される。本明細書において使用する場合、キメラ遺伝子は、コード配列に対して異種である転写開始領域に動作可能に連結されたコード配列を含む。

30

40

【0167】

異種プロモーターを使用して本発明のmut-PPO核酸を発現させることが好ましいと思われるが、天然プロモーター配列も使用できる。このような構築体は、植物又は植物細胞においてmut-PPOタンパク質の発現レベルを変化させる。したがって、植物又は植物細胞の表現型は改変される。

【0168】

終止領域は、転写開始領域に天然であってもよく、動作可能に連結された対象となるmut-PPO配列に天然であってもよく、植物宿主に天然であってもよく、又は別の供給源に由来してもよい(すなわち、プロモーター、対象となるmut-PPO核酸配列、植物宿主又はそれらの任意の組み合わせに対して外来性又は異種)。都合の良い終止領域は、オクトピン合

50

成酵素及びナポリン合成酵素の終止領域などの、*A. tumefaciens* のTi-プラスミドから利用可能である。Guerineauら(1991年) *Mol. Gen. Genet.* 262: 141-144; Proudfoot (1991年) *Cell* 64:671-674; Sanfaconら(1991年) *Genes Dev.* 5: 141-149; Mogen(1990年) *Plant Cell* 2: 1261-1272; Munroeら(1990年) *Gene* 91: 151-158; Ballasら(1989年) *Nucleic Acids Res.* 17:7891-7903;及びJoshi α /. (1987年) *Nucleic Acid Res.* 15:9627-9639もまた参照されたい。必要に応じて、遺伝子(複数可)は、形質転換された植物における発現の増加のために最適化され得る。すなわち、遺伝子は、発現の改良のための植物優先型コドンを使用して合成できる。例えば、宿主優先型コドンの使用の考察に関してはCampbell及びGowri (1990年) *Plant Physiol.* 92: 1-11を参照されたい。植物優先型遺伝子を合成するための方法が、当分野において利用可能である。例えば、米国特許第5,380,831号及び第5,436,391号並びにMurrayら(1989年) *Nucleic Acids Res.* 17:477-498を参照されたく、これらは参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0169】

追加の配列修飾は、細胞宿主における遺伝子発現を強化することが公知である。これらは、疑似ポリアデニル化シグナルをコードする配列、エクソン-イントロンスプライシング部位のシグナル、トランスポゾン様反復及び遺伝子発現に有害であり得る、十分特徴付けられた他の配列の除去を含む。配列のG-C含有量は、宿主細胞において発現された公知の遺伝子に対する参照により計算された、所与の細胞宿主にとって平均的なレベルに調整できる。可能であれば、配列を、予測されるヘアピン二次mRNA構造を避けるように修正する。遺伝子発現を強化するためのヌクレオチド配列は、植物の発現ベクターにおいても使用することができる。これらは、トウモロコシのAdh1のイントロン、intron1遺伝子(Callisら、*Genes and Development* 1: 1183-1200、1987年)及びタバコモザイクウイルス(Tobacco Mosaic virus)(TMV)、トウロコシ緑斑病ウイルス(Maize Chlorotic Mottle Virus)及びアルファルファモザイクウイルス(Alfalfa Mosaic Virus)由来のリーダー配列、(W-配列)(Gallieら、*Nucleic Acid Res.* 15:8693-8711、1987年及びSkuzeskiら、*Plant Mol. Biol.* 15:65-79、1990年)を含む。トウモロコシのshrunken-1遺伝子座から最初のイントロンは、キメラ遺伝子構築体中の遺伝子の発現を増加させることが示されている。米国特許第5,424,412号及び第5,593,874号は、遺伝子発現構築体における特定のイントロンの使用を開示しており、Gallieら(*Plant Physiol.* 106:929-939、1994年)もまた、イントロンが、組織特異的基準において遺伝子発現を制御するために有用であることを示している。mut-PPO遺伝子の発現をさらに強化するため、又は最適化するために、本発明の植物発現ベクターは、マトリックス結合領域(MAR)を含有するDNA配列をさらに含有することができる。このような修飾された発現系を用いて形質転換された植物細胞は、その後、本発明のヌクレオチド配列の過剰発現又は構成的発現を示し得る。

20

30

【0170】

発現カセットは、発現カセット構築体中に5'リーダー配列をさらに含有することができる。このようなリーダー配列は、翻訳を強化するために作用できる。翻訳リーダーは当分野において公知であり、ピコルナウイルスリーダー、例えば、EMCVリーダー(脳心筋炎5'非コード領域)(Elroy-Steinら、(1989年) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:6126-6130);ポチウイルスリーダー、例えば、TEVリーダー(タバコエッチ病ウイルス(tobacco Etch Virus))(Gallieら、(1995年) *Gene* 165(2):233-238)、MDMVリーダー(トウモロコシ萎縮モザイクウイルス(Maize Dwarf Mosaic Virus))(Virology 154:9-20)及びヒト免疫グロブリン重鎖結合タンパク質(BiP)(Macejakら、(1991年) *Nature* 353:90-94);アルファルファモザイクウイルスのコートタンパク質mRNA(AMV RNA 4)由来の非翻訳リーダー(Joblingら、(1987年) *Nature* 325:622-625);タバコモザイクウイルスリーダー(TMV)(Gallieら、(1989年) *Molecular Biology of RNA*, Cech (Liss, New York)編、237-256頁);並びにトウモロコシ緑斑病ウイルスリーダー(MCMV)(Lommelら、(1991年) *Virology* 81:382-385)を含む。Della-Cioppaら、(1987年) *Plant Physiol.* 84:965-968もまた参照されたい。翻訳を強化することが公知の他の方法、例えば、イントロンなどもまた利用できる。

40

【0171】

50

発現カセットの調製において、さまざまなDNA断片を、適切な配向で、必要に応じて、適切なリーディングフレーム中にDNA配列を提供するように操作することができる。このような目的で、アダプター又はリンカーを用いてDNA断片をつなぐことができ、又は他の操作により、都合の良い制限部位の提供、無関係なDNAの除去、制限部位の除去などを伴うことができる。この目的のために、*in vitro*の突然変異誘発、プライマー修復、制限、アニーリング、再置換、例えば、転位及び転換を伴うことができる。

【0172】

多数のプロモーターを本発明の実践に使用することができる。プロモーターは、所望の成果に基づいて選択できる。核酸は、構成的プロモーター、組織優先型プロモーター又は植物における発現のための他のプロモーターと組み合わせることができる。このような構成的プロモーターは、例えば、Rsyn7プロモーターのコアプロモーター及びWO 99/43838及び米国特許第6,072,050号に隠された他の構成的プロモーター;コアCaMV 35Sプロモーター(Odellら、(1985年) *Nature* 313:810-812);コメアクチン(McElroyら、(1990年) *Plant Cell* 2: 163-171);ユビキチン(Christensenら、(1989年) *Plant Mol. Biol.* 12:619-632及びChristensenら、(1992年) *Plant Mol. Biol.* 18:675-689);pEMU(Lastら、(1991年) *Theor. Appl. Genet.* 81:581-588);MAS(Veltenら、(1984年) *EMBO J.* 3:2723-2730);ALSプロモーター(米国特許第5,659,026号)などを含む。他の構成的プロモーターは、例えば、米国特許第5,608,149号、第5,608,144号、第5,604,121号、第5,569,597号、第5,466,785号、第5,399,680号、第5,268,463号、第5,608,142号及び第6,177,611号を含む。

【0173】

組織優先型プロモーターは、特定の植物組織内でmut-PP0発現の強化を標的とするために利用できる。このような組織優先型プロモーターは、限定するものではないが、葉優先型プロモーター、根優先型プロモーター、種子優先型プロモーター及び茎優先型プロモーターを含む。組織優先型プロモーターは、Yamamotoら、(1997年) *Plant J.* 12(2):255-265; Kawamataら、(1997年) *Plant Cell Physiol.* 38(7):792-803; Hansenら、(1997年) *Mol. Gen. Genet.* 254(3):337-343; Russellら、(1997年) *Transgenic Res.* 6(2): 157-168; Rinehartら、(1996年) *Plant Physiol.* 112(3): 1331-1341; Van Campら、(1996年) *Plant Physiol.* 112(2):525-535; Canevasciniら、(1996年) *Plant Physiol.* 112(2):513-524; Yamamotoら、(1994年) *Plant Cell Physiol.* 35(5):773-778; Lam (1994年) *Results Probl. Cell Differ.* 20: 181-196; Orozcoら、(1993年) *Plant Mol Biol.* 23(6): 1129-1138; Matsuoka e/ [alpha]/. (1993年) *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 90(20):9586-9590; 及びGuevara-Garciaら、(1993年) *Plant J.* 4(3):495-505を含む。このようなプロモーターは、必要であれば、弱い発現のために修飾できる。一実施形態において、対象となる核酸は、発現に関して葉緑体を標的化する。この様式において、対象となる核酸が、葉緑体に直接挿入されない場合、発現カセットは、対象となる遺伝子産物を葉緑体に向ける葉緑体輸送ペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、葉緑体標的化配列をさらに含有する。このような輸送ペプチドは当分野において公知である。葉緑体標的化配列に関しては、「動作可能に連結された」は、輸送ペプチドをコードする核酸配列(すなわち、葉緑体標的化配列)が、本発明のmut-PP0核酸と、二つの配列が隣接し、同じリーディングフレーム内にあるように連結されることを意味する。例えば、Von Heijneら、(1991年) *Plant Mol. Biol. Rep.* 9: 104-126; Clarkら、(1989年) *J. Biol. Chem.* 264:17544-17550; Della-Cioppaら、(1987年) *Plant Physiol.* 84:965-968; Romerら、(1993年) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196:1414-1421;及びShahら、(1986年) *Science* 233:478-481を参照されたい。本発明のmut-PP0タンパク質にはネイティブの葉緑体輸送ペプチドが含まれる一方で、当分野において公知の任意の葉緑体輸送ペプチドは、葉緑体標的化配列を、本発明の成熟mut-PP0タンパク質をコードするヌクレオチド配列の5'-末端に、動作可能に連結することによって、本発明の成熟mut-PP0タンパク質のアミノ酸配列と融合できる。葉緑体標的化配列は当分野において公知であり、リブローズ-1,5-二リン酸カルボキシラーゼ(Rubisco)の葉緑体小サブユニット(de Castro Silva Filhoら、(1996年) *Plant Mol. Biol.* 30:769-780; Schnellら、(1991年) *J. Biol. Chem.* 266(5):3335-3342); 5-(エノールピ

10

20

30

40

50

ルビル)シキミ酸-3-リン酸合成酵素(EPSPS) (Archerら、(1990年) J. Bioenerg. Biomemb. 22(6):789-810);トリプトファン合成酵素(Zhaoら、(1995年) J. Biol. Chem. 270(11):6081-6087);プラストシアニン(Lawrenceら、(1997年) J. Biol. Chem. 272(33):20357-20363);コリスミ酸合成酵素(Schmidtら、(1993年) J. Biol. Chem. 268(36):27447-27457);及び集光性葉緑素a/b結合タンパク質(LHBP)(Lamppaら、(1988年) J. Biol. Chem. 263: 14996-14999)を含む。Von Heijneら、(1991年) Plant Mol. Biol. Rep. 9: 104-126; Clarkら、(1989年) J. Biol. Chem. 264:17544-17550; Della-Cioppaら、(1987年) Plant Physiol. 84:965-968; Romerら、(1993年) Biochem. Biophys. Res. Commun. 196: 1414-1421;及びShahら、(1986年) Science 233:478-481もまた参照されたい。

【 0 1 7 4 】

葉緑体の形質転換の方法は、当分野において公知である。例えば、Svabら(1990年) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:8526-8530; Svab及びMaliga (1993年) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:913-917; Svab及びMaliga (1993年) EMBO J. 12:601-606を参照されたい。この方法は、選択可能なマーカーを含有するDNAの粒子銃送達及び相同組換えを介した色素体ゲノムへのDNAの標的化に頼っている。さらに、色素体の形質転換は、核によりコードされた、色素体指向性RNAポリメラーゼの組織優先型発現によるサイレントな色素体担持導入遺伝子のトランス活性化により達成できる。このような系は、McBrideら(1994年) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:7301-7305に報告されている。葉緑体を標的とする対象となる核酸は、葉緑体において発現が最適化され、植物の核とこの細胞小器官との間のコドン使用頻度の差を説明できる。この様式において、対象となる核酸は葉緑体優先型コドンを使用して、合成され得る。例えば、米国特許第5,380,831号を参照されたく、これは参照により本明細書に組み込まれる。

【 0 1 7 5 】

好ましい実施形態において、mut-PP0核酸は、a)配列番号1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 若しくは45で示されるポリヌクレオチド又はそれらの変異体若しくは誘導体;b)配列番号2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 若しくは46で示されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド又はそれらの変異体若しくは誘導体;c) a) または b) からの任意の少なくとも60の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチド;並びにd) a)からc)の任意のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドからなる群から選択されるポリヌクレオチド配列を含む。

【 0 1 7 6 】

好ましくは、発現カセットは、植物において機能性である転写開始制御領域及び翻訳開始制御領域をさらに含む。

【 0 1 7 7 】

本発明のポリヌクレオチドは、植物形質転換のための選択可能なマーカー遺伝子としての使用を見出したが、本発明の発現カセットは、形質転換された細胞の選択のための別の選択可能なマーカー遺伝子を含むことができる。本発明のものを含む選択可能なマーカー遺伝子は、形質転換された細胞又は組織の選択に利用される。マーカー遺伝子は、限定するものではないが、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼII(NEO)及びヒグロマイシンホスホトランスフェラーゼ(HPT)をコードする遺伝子などの抗生物質抵抗性をコードする遺伝子並びにグルホシネートアンモニウム(glufosinate-ammonium)、プロモキシニル、イミダゾリノン及び2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)などの除草剤化合物に対する抵抗性をもたらす遺伝子を含む。一般には、Yarranton (1992年) Curr. Opin. Biotech. 3 :506-511 ; Christophersonら(1992年) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6314-6318; Yaoら(1992年) Cell 71:63-72; Reznikoff (1992年) Mol Microbiol 6:2419-2422; Barkleyら(1980年) The Operon, 177-220頁; Huら(1987年) Cell 48:555-566; Brownら(1987年) Cell 49:603-612; Figgeら(1988年) Cell 52:713-722; Deuschleら(1989年) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5400-5404; Fuerst et al (1989年) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2549-2553; Deuschle et al (1990年) Science 248:480-483; Gossen (1993年) Ph.D. Thesis

10

20

30

40

50

、University of Heidelberg; Reinesら(1993年) Proc. Natl Acad. Sci USA 90: 1917-1921; Labowら(1990年) Mol Cell Biol 10:3343-3356; Zambrettiら(1992年) Proc. Natl Acad. Sci USA 89:3952-3956; Bairnら(1991年) Proc. Natl Acad. Sci USA 88:5072-5076; Wyborskiら(1991年) Nucleic Acids Res. 19:4647-4653; Hillenand-Wissman(1989年) Topics Mol Struct. Biol 10: 143-162; Degenkolbら(1991年) Antimicrob. Agents Chemother. 35: 1591-1595; Kleinschmidtら(1988年) Biochemistry 27: 1094-1104; Bonin(1993年) Ph.D. Thesis, University of Heidelberg; Gossenら(1992年) Proc. Natl Acad. Sci USA 89:5547- 5551; Olivaら(1992年) Antimicrob. Agents Chemother. 36:913-919; Hlavkaら(1985年) Handbook of Experimental Pharmacology、78巻(Springer-Verlag、Berlin); Gillら(1988年)Nature 334:721-724を参照されたい。このような開示は、参照により本明細書に組み込む。選択可能なマーカー遺伝子の上記の一覧表は、限定する意味ではない。任意の選択可能なマーカー遺伝子が、本発明において使用できる。

【0178】

本発明は、上記のmut-PPO核酸を含有する発現カセットを含む単離された組換え発現ベクターをさらに提供し、宿主細胞においてベクターの発現は、野生型変種の宿主細胞と比較してベンゾオキサジノン誘導体系除草剤に対する耐性の増加をもたらす。本明細書において使用する場合、「ベクター」という用語は、連結されている別の核酸を輸送できる核酸分子を指す。ベクターの一種は「プラスミド」であり、追加のDNAセグメントをライゲーションできる環状二本鎖DNAループを指す。別の型のベクターは、ウイルスベクターであり、追加のDNAセグメントをウイルスゲノム内にライゲーションできる。あるベクターは、それらが導入された宿主細胞において自律的複製できる(例えば、複製の細菌起源を有する細菌ベクター及びエピソーム性哺乳動物ベクター)。他のベクター(例えば、非エピソーム性哺乳動物ベクター)は、宿主細胞内への導入において、宿主細胞のゲノムに統合され、それによって、宿主ゲノムにとともに複製される。さらに、あるベクターは、動作可能に連結された遺伝子の発現を指示できる。このようなベクターは「発現ベクター」と称される。概して、組換えDNA技術において有用な発現ベクターは、多くの場合プラスミドの形態である。プラスミドは最も一般的に使用されるベクターの形態なので、本明細書において、「プラスミド」及び「ベクター」は交換可能に使用できる。しかし、本発明は、他の形態の発現ベクター、例えば、同等の機能を果たすウイルスベクター(例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス及びアデノ随伴ウイルス)を含むことを意図する。

【0179】

本発明の組換え発現ベクターは、宿主細胞における核酸の発現に適切な形態で本発明の核酸を含み、これは、組換え発現ベクターが、発現に使用される宿主細胞に基づいて選択され、発現される核酸配列に動作可能に連結される一種又は複数種の制御配列を含むことを意味する。制御配列は、多くの型の宿主細胞においてヌクレオチド配列の構成的発現を指示する配列及び特定の宿主細胞において、又は特定の条件下でだけヌクレオチド配列の発現を指示する配列を含む。発現ベクターの設計が、形質転換される宿主細胞の選択、所望のポリペプチドの発現レベルなどの因子に依存し得ることは当業者により理解されるものと思われる。本発明の発現ベクターは、宿主細胞に導入され、それによって、本明細書に記載の核酸(例えば、mut-PPOポリペプチド、融合ポリペプチドなど)によりコードされる、融合ポリペプチド又は融合ペプチドを含むポリペプチド又はペプチドを産生できる。

【0180】

本発明の好ましい実施形態において、mut-PPOポリペプチドは、単細胞植物細胞(藻類など)(Falciatoreら、1999年、Marine Biotechnology 1(3):239-251及びその中の参考文献を参照されたい)及び高等植物由来の植物細胞(例えば、作物などの種子植物)などの植物及び植物細胞において発現される。mut-PPOポリヌクレオチドはトランスフェクション、形質転換又はトランスダクション、エレクトロポレーション、粒子衝撃、アグロインフエクション、微粒子銃などを含む任意の手段により植物細胞に「導入」され得る。

【0181】

植物細胞を含む宿主細胞を形質転換又はトランスフェクトする適切な方法は、Sambrookら (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 第二版、Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、NY、1989年) 及び Methods in Molecular Biology、1995年、44巻、Agrobacterium protocols、Gartland及びDavey編、Humana Press、Totowa、New Jerseyなどの他の実験マニュアルにおいて見出すことができる。ベンゾオキサジノン誘導体系除草剤に対する耐性の増加は、トウモロコシ、小麦、ライ麦、オート麦、ライコムギ、コメ、大麦、大豆、落花生、ワタ、ナタネ及びキャノーラ、キャッサバ、コショウ、ヒマワリ及びマンジュギクのような広範囲の植物、ジャガイモ、タバコ、ナス及びトマトのようなナス科植物、ソラマメ属の種 (*Vicia species*)、エンドウ、アルファルファ、灌木植物(コーヒー、カカオ、茶)、シダレヤナギ属の種 (*Salix species*)、樹木(アブラヤシ、ココナッツ)、多年生牧草並びに飼料作物に遺伝されることが望まれる一般的形質であるので、これらの作物また、本発明の一つのさらなる実施形態として、遺伝子操作のための好ましい標的植物である。好ましい実施形態において、この植物は作物である。飼料作物は、限定するものではないが、小麦の草 (Wheatgrass)、カナリアクサヨシ (Canarygrass)、ブロムグラス (Bromegrass)、ワイルドライグラス (Wild rye Grass)、イナゴツナギ (Bluegrass)、カモガヤ (Orchardgrass)、アルファルファ、サルホイン (Salfoin)、ミヤコグサ (Birdsfoot Trefoil)、タチクローバー (Alsike Clover)、アカツメクサ (Red Clover) 及びスイートクローバー (Sweet Clover) を含む。

【0182】

本発明の一実施形態において、mut-PP0ポリヌクレオチドの植物へのトランスフェクションは、アグロバクテリウム属媒介の遺伝子移入により達成される。当業者に公知の一形質転換方法は、開花植物のアグロバクテリア (*Agrobacteria*) 溶液への浸漬であり、アグロバクテリアは、mut-PP0核酸を含有し、次いで形質転換された配偶子の育種である。アグロバクテリウム属媒介の植物形質転換は、例えば、GV3101 (pMP90) (Koncz及びSchell、1986年、Mol. Gen. Genet. 204:383-396) 又はLBA4404 (Clontech) アグロバクテリウム・ツメファシエンス株を使用して実施できる。形質転換は、標準的な形質転換及び再生の技術により実施できる (Deblaereら、1994年、Nucl. Acids. Res. 13:4777-4788; Gelvin, Stanton B. 及びSchilperoort, Robert A. Plant Molecular Biology Manual、第二版 - Dordrecht: Kluwer Academic Publ.、1995年 Sect., Ringbuc Zentrale Signatur: BT11-P ISBN 0-7923-2731-4; Glick, Bernard R. 及びThompson, John E.、Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology、Boca Raton: CRC Press、1993年 360 S.、ISBN 0-8493-5164-2)。例えば、ナタネは、子葉又は胚軸の形質転換を介して形質転換され得る (Moloneyら、1989年、Plant Cell Report 8:238-242; De Blockら、1989年、Plant Physiol. 91:694-701)。アグロバクテリウム属に対する抗生物質の使用及び植物の選択は、形質転換のために使用するバイナリーベクター及びアグロバクテリウム属株に依存する。ナタネの選択は、選択可能な植物マーカーとしてカナマイシンを使用して正常に実施される。亜麻へのアグロバクテリウム属媒介性遺伝子移入は、例えば、Mlynarovaら、1994年、Plant Cell Report 13:282-285に記載の技術を使用して実施できる。さらに、大豆の形質転換は、例えば、欧州特許第0424 047号、米国特許第5,322,783号、欧州特許第0397 687号、米国特許第5,376,543号又は米国特許第5,169,770号に記載の技術を使用して実施できる。トウモロコシの形質転換は、粒子衝撃、ポリエチレングリコール媒介のDNAの取り込みにより、又は炭化ケイ素線維技術を介して達成できる。(例えば、Freeling及びWalbot「The maize handbook」Springer Verlag: New York (1993年) ISBN 3-540-97826-7を参照されたい)。トウモロコシの形質転換の具体的な例は、米国特許第5,990,387号に見出され、小麦の形質転換の具体例は、PCT出願WO 93/07256に見出される。

【0183】

本発明に従って、導入されたmut-PP0ポリヌクレオチドは、それが非染色体の自律的レプリコンに組み込まれた場合、又は植物染色体に統合された場合、植物細胞において安定に維持され得る。代替的には、導入されたmut-PP0ポリヌクレオチドは、染色体外の非複製ベクターに存在でき、一時的に発現され得る、又は一時的に活性であり得る。一実施形

態において、相同組換え微生物を作り出すことができ、その際に、mut-PP0ポリヌクレオチドが染色体に統合され、その結果として内因性PP0遺伝子が改変、例えば機能的に破壊され、mut-PP0遺伝子が作り出されるように、欠失、付加又は置換が導入されているPP0遺伝子の少なくとも一部を含有するベクターが調製される。相同組換えを介して点突然変異を作り出すために、DNA-RNAハイブリッドを、キメラ形成法として公知の技術に使用することができる(Cole-Straussら、1999年、Nucleic Acids Research 27(5):1323-1330及びKmiec、1999年、Gene therapy American Scientist 87(3):240-247)。コムギ属の種における他の相同組換え手順もまた、当分野において周知であり、本発明における使用が企図される。

【0184】

相同組換えベクターにおいてmut-PP0遺伝子は、その5'末端及び3'末端において追加のPP0遺伝子の核酸分子に隣接され、微生物又は植物において、ベクターにより運ばれる外因性mut-PP0遺伝子及び内因性PP0遺伝子の間に起こる相同組換えを可能にさせる。追加の隣接PP0核酸分子は、内因性遺伝子との相同組換えが成功するために十分な長さである。通常、隣接DNAの、最大キロベースの数百塩基対(5'末端及び3'末端の両方において)がベクターに含まれる(例えば、相同組換えベクターの記載に関しては、Thomas, K. R. 及びCapecci, M. R.、1987年、Cell 51:503又はヒメツリガネゴケにおけるcDNAに基づく組換えに関しては、Streppら、1998年、PNAS、95(8):4368-4373を参照されたい)。しかし、普通はmut-PP0遺伝子はPP0遺伝子と異なるアミノ酸がほとんどないので、隣接配列は必ずしも必要ではない。相同組換えベクターは、微生物又は植物細胞に導入され(例えば、ポリエチレングリコール媒介DNAを介して)、mut-PP0遺伝子が導入された細胞は、当分野において公知の技術を使用して選択された内因性PP0遺伝子を用いて相同的に組換えられている。

【0185】

別の実施形態において、導入された遺伝子の発現の制御が可能な、選択された系を含有する組換え微生物が作製できる。例えば、mut-PP0遺伝子をlacオペロンの調節下に配置してベクターに組み入れることで、IPTGの存在下でmut-PP0遺伝子のみの発現が可能である。このような制御系は当分野において周知である。

【0186】

本発明の別の態様は、本発明の組換え発現ベクターが導入されている宿主細胞に関する。「宿主細胞」及び「組換え宿主細胞」という用語は、本明細書において交換可能に使用される。このような用語が、特定の対象細胞だけを指すものではなく、このような細胞の子孫又は潜在的子孫にも適用されることは理解されるであろう。特定の修飾が、突然変異又は環境的影響のいずれかのためにその後の世代に起こり得るので、このような子孫は、実際、親細胞とは同一ではないと思われるが、本明細書において使用する場合、それでもやはりこの用語の範囲内に含まれる。宿主細胞は、任意の原核細胞又は真核細胞であってよい。例えば、mut-PP0ポリヌクレオチドは、コリネバクテリウム・グルタミカム(C. glutamicum)などの細菌細胞、昆虫細胞、菌類細胞又は哺乳動物細胞(チャイニーズハムスターの卵巣細胞(CHO)又はCOS細胞など)、藻類、絨毛虫、植物細胞、菌類又はコリネバクテリウム・グルタミカムのような他の微生物において発現可能である。他の適切な宿主細胞は、当業者に公知である。

【0187】

培養液中の原核宿主細胞又は真核宿主細胞などの本発明の宿主細胞は、mut-PP0ポリヌクレオチドの作製(すなわち発現)のために使用できる。したがって、本発明は、本発明の宿主細胞を使用してmut-PP0ポリペプチドを作製する方法を、さらに提供する。一実施形態において、本方法は、(mut-PP0ポリペプチドをコードする組換え発現ベクターが導入された、又はゲノムが野生型又はmut-PP0ポリペプチドをコードする遺伝子に導入されている)発明の宿主細胞を、適切な培地においてmut-PP0ポリペプチドが産生されるまで培養するステップを含む。別の実施形態において、本方法は、培地又は宿主細胞からmut-PP0ポリペプチドを単離するステップをさらに含む。本発明の別の態様は、単離されたmut-PP0ポリペプチド及びそれらの生物学的に活性な部分に関する。「単離された」又は「精製さ

10

20

30

40

50

れた」ポリペプチド又はそれらの生物学的に活性な部分は、組換えDNA技術より作製された場合、細胞材料の一部を含まず、又は化学的に合成された場合、化学的前駆物質若しくは他の化学物質を含まない。「細胞材料を実質的に含まない」という専門用語は、ポリペプチドが、天然に又は組換え的に作製された細胞の細胞成分の一部から分離された、mut-PP0ポリペプチドの調製を含む。一実施形態において、「細胞材料を実質的に含まない」という専門用語は、約30%未満(乾燥重量で)の非mut-PP0材料(本明細書において「混入したポリペプチド」とも称される)、より好ましくは約20%未満の非mut-PP0材料、さらにより好ましくは約10%未満の非mut-PP0材料及び最も好ましくは約5%未満の非mut-PP0材料を有するmut-PP0ポリペプチドの調製を含む。

【0188】

mut-PP0ポリペプチド又はそれらの生物学的に活性な部分が組換え的に作製された場合、mut-PP0ポリペプチド又はそれらの生物学的に活性な部分はまた、好ましくは、培養培地を実質的に含まない、すなわち、培養培地が、約20%未満、より好ましくは約10%未満及び最も好ましくは約5%未満の体積のポリペプチドの調製を表す。「化学的前駆物質又は他の化学物質を実質的に含まない」という専門用語は、ポリペプチドが、ポリペプチドの合成に伴われる化学的前駆物質又は他の化学物質から分離されたmut-PP0ポリペプチドの調製を含む。一実施形態において、「化学的前駆物質又は他の化学物質を実質的に含まない」という専門用語は、約30%未満(乾燥重量で)の化学的前駆物質又は非mut-PP0化学物質、より好ましくは約20%未満の化学的前駆物質又は非mut-PP0化学物質、さらにより好ましくは約10%未満の化学的前駆物質又は非mut-PP0化学物質、及び最も好ましくは約5%未満の化学的前駆物質又は非mut-PP0化学物質を有するmut-PP0ポリペプチドの調製を含む。好ましい実施形態において、単離されたポリペプチド又はそれらの生物学的に活性な部分は、mut-PP0ポリペプチドが由来する同じ生物からの混入ポリペプチドを欠いている。通常、このようなポリペプチドは、植物において、又はそれ以外にはコリネバクテリウム・グルタミクムなどの微生物、絨毛虫、藻類又は菌類において、例えば、mut-PP0ポリペプチドの組換え発現により作製される。

【0189】

上記のように、本発明は、野生型変種の植物又は種子と比較して、作物又は種子のベンゾオキサジノン誘導体耐性を増加させるための組成物及び方法を教示する。好ましい実施形態において、作物又は種子のベンゾオキサジノン誘導体耐性は、植物又は種子が、好ましくはおよそ1-1000 g ai ha⁻¹、より好ましくは20-160 g ai ha⁻¹、及び最も好ましくは、40-80 g ai ha⁻¹のベンゾオキサジノン誘導体系除草剤の適用に耐え得るように増加される。本明細書において使用する場合、ベンゾオキサジノン誘導体系除草剤の適用に「耐える」ことは、植物が、このような適用により死滅、又は損傷のいずれもされないことを意味する。

【0190】

さらに、本発明は、上記に記載した少なくとも一種のベンゾオキサジノン誘導体系除草剤の使用を伴う方法を提供する。

【0191】

これらの方法において、ベンゾオキサジノン誘導体系除草剤は、限定するものではないが、種子処理、土壌処理及び茎葉処理を含む、当分野において公知の任意の方法により適用され得る。適用前に、ベンゾオキサジノン誘導体系除草剤は、慣例の製剤、例えば、溶液、エマルジョン、懸濁液、細粉、散剤、ペースト及び顆粒に変換できる。使用形態は、特定の意図される目的に依存し、各々の事例において、本発明に従った化合物の細かく均等な分配を確実にすべきである。

【0192】

ベンゾオキサジノン誘導体系除草剤に対する耐性が増加した植物を提供することで、広範囲の製剤を、植物の成長を強化し、栄養に対する競合を減少させるように、雑草から植物を保護するために用いることができる。ベンゾオキサジノン誘導体系除草剤は、本明細書に記載の作物の周囲の地域において、出芽前、出芽後、植え付け前及び植え付け時の雑

10

20

30

40

50

草の防除に、単独で使用でき、又は他の添加剤を含有するベンゾオキサジノン誘導体系除草剤製剤も使用できる。ベンゾオキサジノン誘導体系除草剤は、種子処理としても使用できる。ベンゾオキサジノン誘導体系除草剤製剤中に見出される添加剤は、他の除草剤、界面活性剤、アジュバント、展着剤、固着剤、分解防止剤などを含む。ベンゾオキサジノン誘導体系除草剤製剤は、湿潤調製品であっても、又は乾燥調製品であってもよく、限定するものではないが、流動性散剤、乳化可能濃縮物及び液体濃縮物を含み得る。ベンゾオキサジノン誘導体系除草剤及び除草剤製剤は、従来の方法に従って、例えば、スプレー噴霧、灌水、散粉などにより適用できる。

【0193】

適切な製剤は、PCT/EP2009/063387及びPCT/EP2009/063386に詳細に記載され、これらは参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0194】

前述は、本発明の好ましい実施形態に関し、多数の変形が本発明の範囲を逸脱することなくその中で作ることができることもまた、理解すべきである。本発明を、下記の実施例によりさらに例示するが、これらは、本発明の範囲に限定を課すものとは、決して解釈すべきではない。対照的に、本明細書の記載の読後、本発明の精神及び/又は添付の特許請求の範囲から逸脱することなく、それら自体を当業者に示唆することができる、さまざまな他の実施形態、それらの変形及び等価物に対する報告ができることは明らかに理解されるべきである。

【0195】

(実施例)

【実施例1】

【0196】

ヒユ属 (Amaranthus) PPOの部位特異的変異誘発

ヒユ属PPOのクローニング

ヒユモドキ (Amaranthus tuberculatus) のPPO感受性、および耐性アイソフォームのコード配列 (配列番号1、3、5、7) を合成し、Geneart (Geneart AG, Regensburg, Germany) によりクローニングした。

【0197】

プラスミドミニプレップを行って、プラスミドを大腸菌TOP10から分離し、DNA配列決定により確認した。

30

【0198】

野生型および変異型PPO組換え体の発現および精製

(Franck E. Dayan, Pankaj R. Daga, Stephen O. Duke, Ryan M. Lee, Patrick J. Tranel, Robert J. Doerksen. Biochemical and structural consequences of a glycine deletion in the -8 helix of protoporphyrinogen oxidase. Biochimica et Biophysica Acta 1804 (2010), 1548-56より引用)

pRSETベクター中のクローンを大腸菌 (E. coli) BL21(DE3)-pLysS株に形質転換した。細胞は、100 µg/mLカルベニシリンを含有する250 mL LB中で、37 °Cにて一晩振盪しながら増殖させた。培養物を、抗生物質含有LB 1 L中に希釈し、37 °Cにて2時間振盪しながら培養し、1 mM IPTGで誘導して、25 °Cにてさらに5時間振盪培養した。細胞を1600 × gの遠心により収集し、0.09% NaClで洗浄し、-80 °Cで保存した。

40

【0199】

細胞は50 mMリン酸ナトリウムpH 7.5、1 M NaCl、5 mMイミダゾール、5%グリセロール、および1 µg/mLロイペプチン中で140 MPaにてフレンチプレスを用いて溶解した。溶解後、0.5 Uのベンゾナーゼ (Novagen, EMD Chemicals, Inc., Gibbstown, NJ) およびPMSF (最終濃度1 mM) を添加した。細胞片を3000 × gの遠心により除去した。20 mMリン酸ナトリウムpH 8.0、50 mM NaCl、5 mMイミダゾール、5 mM MgCl₂、0.1mM EDTA、および17% グリセロールで平衡化した、ニッケル活性化Hitrap Chelating HPカラム (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, NJ) で、HISタグ付きPPOタンパク質を精製した。

50

【 0 2 0 0 】

PPOは250 mMイミダゾールで溶出した。20 mMリン酸ナトリウムバッファー、pH 7.5、5 mM MgCl₂、1 mM EDTA、および17%グリセロールで平衡化した PD-10カラム (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, NJ) で、活性タンパク質を脱塩した。培養物1リットルあたり約10 mgの高純度PPOが与えられ、これをアッセイに使用するまで-20 で保存した。

【 0 2 0 1 】

PPO活性アッセイ

PPO酵素アッセイ (非組換え型)。PPOタンパク質 (EC 1.3.3.4) は、暗所生育トウモロコシ、イヌホオズキ、アサガオ、およびベルベトリーフ苗の子葉鞘もしくは芽 (生重量 150 g) から、既述 (Grossmann et al. 2010) のように抽出した。苗は、低クロロフィル濃度のチラコイド画分で最高の酵素比活性を達成するために、収穫前に2時間、明所において緑化した。高クロロフィル濃度では、蛍光の有意なクエンチングが生じるので、テストに使用することができる緑色のチラコイドの量が制限される。植物材料を、寒冷下でブラウン (Braun) ブレンダーを用いて生重量対体積比、1:4でホモジナイズした。ホモジナイズバッファーは、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン (Tris)-HCl (50 mM; pH 7.3)、スクロース (0.5 M)、塩化マグネシウム (1 mM)、エチレンジアミンテトラ酢酸 (EDTA) (1 mM)、およびウシ血清アルブミン (2 g/L) で構成されるものとした。4枚重ねたミラクロス (Miracloth) を通して濾過した後、10 000 x gで5分間遠心し、ホモジナイズバッファー中に再懸濁してから、150 x gで2分間遠心して粗細胞残渣を除去した後、プラスミドの粗標品が得られた。上清を4000 x gで15分間遠心し、ペレット部分を、Tris-HCl (50 mM; pH 7.3)、EDTA (2 mM)、ロイペプチン (2 μM)、ペプスタチン (2 μM) およびグリセロール (200 ml/L) を含有するバッファー1 mL中に再懸濁して、使用するまで-80 で保存した。ウシ血清アルブミンを標準として、酵素抽出物中のタンパク質を測定した。PPO活性は、蛍光分析により、初速条件下で、化学的に還元されたプロトポルフィリノーゲンIXからのProto生成速度をモニターすることによって、アッセイした。アッセイ混合物は、総容量200 μL中、Tris-HCl (100 mM; pH 7.3)、EDTA (1 mM)、ジチオスレイトール (5 mM)、Tween 80 (0.085%)、プロトポルフィリノーゲンIX (2 μM)、および40 μg抽出タンパク質からなるものとした。反応は、22 にて基質プロトポルフィリノーゲンIXの添加により開始した。ジメチルスルホキシド (DMSO) 溶液中でサフルフェナシル、フルミオキサジン、およびブタフェナシルを調製し (アッセイでDMSOについて0.1 mMの濃度)、インキュベーター前に、アッセイ混合物に、0.005 pMから5 μMの濃度で添加した。POLARstar Optima / Galaxy (BMG) を用いて、アッセイ混合物から蛍光を直接モニターしたが、405 nmで励起し、630 nmで発光をモニターした。熱失活抽出物の存在下での非酵素的活性は、無視することが可能であった。除草剤によって引き起こされる酵素活性の阻害は、未処理対照に対する阻害パーセントとして表された。50%酵素阻害のために必要な化合物のモル濃度 (IC₅₀ 値) は、非線形回帰分析で、用量反応式に対して値をフィッティングすることによって算出した。

【 0 2 0 2 】

PPO酵素アッセイ (組換え型)。ProtoはSigma-Aldrich (Milwaukee, WI) から購入した。Protogenは、Jacobs and Jacobs (N.J. Jacobs, J.M. Jacobs, Assay for enzymatic protoporphyrinogen oxidation, a late step in heme synthesis, Enzyme 28 (1982) 206-219) にしたがって調製した。アッセイは、0.1 mM EDTA、0.1% Tween 20、5 μM FAD、および500mMイミダゾールを含有する100 mMリン酸ナトリウム、pH 7.4中で実施した。PPO阻害剤、アシフルオルフェン、ラクトフェン、ベンゾオキサジノン I.a.35、または好ましいベンゾオキサジノン誘導体 (このXはOもしくはSであり、R⁴は水素、C₁-C₆-アルキル、C₁-C₆-ハロアルキル、C₃-C₆-シクロアルキル、C₃-C₆-アルケニル、C₃-C₆-ハロアルケニル、C₃-C₆-アルキニル、C₃-C₆-ハロアルキニル、C₁-C₆-アルコキシ、もしくはC₃-C₆-シクロアルキル-C₁-C₆-アルキルであり、R⁵は水素、NH₂、C₁-C₆-アルキル、もしくはC₃-C₆-アルキニルであり、R⁶は水素、もしくはC₁-C₆-アルキルであり、またはそれらの組み合わせである

)を用いた用量反応曲線を、150 μ M Protogenの存在下で測定した。励起および発光の帯域幅はそれぞれ1.5および30 nmに設定した。アッセイはすべて、二連または三連で行い、POLARstar Optima / Galaxy (BMG)を用いて、405 nmで励起し、630 nmで発光をモニターして測定した。

【0203】

置換PPO酵素の用量反応 (IC_{50}) 値は、野生型 (未置換) PPO酵素の IC_{50} 値より大きい (表4aおよび4b)。これは、これらの置換PPO酵素がベンゾオキサジノン、およびテストしたベンゾオキサジノン誘導体の一部に対して、自然耐性を有することを示す。置換PPO酵素dG210およびR128Lは、ヒユモドキ (*Amaranthus tuberculatus*) 中に存在する既知の置換PPO酵素であって、さまざまなPPO除草剤に対する *in planta* PPO耐性の原因となることが判明している (Dayan et al., 2010, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804:1548)。このことは、dG210またはR128Lより高い IC_{50} 値を有する、記載された他の置換PPO酵素も、ベンゾオキサジノン1.a.35 (表4a) および記載のベンゾオキサジノン誘導体 (表4b) を含めて、さまざまなPPO除草剤に対する *in planta* 耐性の原因となる置換PPO酵素であることを示す。置換PPO酵素はすべて、野生型PPO酵素と同等の酵素活性、蛍光ユニット変化/分 (FU/min) を示す (表4a)。さらに、置換PPO酵素の活性の値はすべて、置換PPO酵素dG210より大きい。置換PPO酵素dG210は、*in planta* 機能に十分な活性がある。このことは、記載の他の置換PPO酵素もすべて、*in planta* 機能に十分な活性があることを示す。

【0204】

表4a：野生型およびアミノ酸置換PPO酵素の、阻害剤ベンゾオキサジノン1.a.35に関する IC_{50} 値 (M)

【表4a】

置換	IC_{50} (M) ベンゾ オキサジノン	活性 (FU/分)
野生型	1,20E-10	800
R128A	1,40E-10	731
R128L	7,73E-10	750
dG210	2,12E-09	80
L397D	2,72E-10	250
L397N	2,35E-10	165
F420M	2,75E-10	353
F420I	4,95E-10	179
F420L	9,93E-10	203
F420V	2,45E-09	200
R128A, F420M	6,24E-09	378
R128A, F420I	1,98E-08	330
R128A, F420L	2,38E-08	281

【0205】

表4b：野生型およびアミノ酸置換PPO酵素の、記載されたベンゾオキサジノン誘導体に関する IC_{50} 値 (M)

【表 4 b】

置換	IC ₅₀ (M) ベンゾオキサジノンアナログ							活性 (FU/分)
	X が 0 である	R ⁴ が水素である	X が 0 で、R ⁴ が水素である	R ⁵ が水素である	R ⁶ が水素である	X が 0 で、R ⁵ が水素である	X が 0 で、R ⁶ が水素である	
野生型	2, 20E-10	2, 99E-10	2, 04E-08	1, 78E-09	1, 78E-09	2, 27E-08	2, 27E-08	800
R128L	3, 82E-08	2, 02E-07	3, 57E-06					750
dG210	3, 33E-08	1, 10E-07	1, 64E-06					80
L397D				4, 41E-07	4, 41E-07	2, 43E-06	2, 43E-06	250
F420I				6, 17E-07	6, 17E-07	1, 00E-05	1, 00E-05	179
R128A, F420I				1, 00E-05	1, 00E-05	1, 00E-05	1, 00E-05	330

【実施例 2】

【0206】

除草剤耐性クローンを同定しPPO遺伝子中の原因変異を特定するための、変異誘発藻類細胞のスクリーニング

PPO遺伝子中で、ベンゾオキサジノン誘導体除草剤耐性を与える変異を生じさせるために、化学的もしくはUV突然変異誘発を用いることができる。特にコナミドリムシ (*Chlamydomonas reinhardtii*) または *Scenedesmus obliquus* のような単細胞生物は、除草剤耐性の主要な突然変異を同定するために有用である。

【0207】

コナミドリムシ (*Chlamydomonas reinhardtii*) 株CC-503およびCC-1691 (Duke University, Durham, USA) の藻類細胞は、TAP培地 (Gorman and Levine (1965) PNAS 54: 1665-1669) 中で、22 °Cにて100 rpmで、30 μmol Phot * m⁻² * s⁻² で光照射して、定期的に振盪することにより増殖させる。 *Scenedesmus obliquus* (University of Gottingen, Germany) は、下記 (Boger and Sandmann, (1993) In: Target assays for modern herbicides and 15 related phytotoxic compounds, Lewis Publishers) のような藻類培地中で、クラミドモナス (*Chlamydomonas*) に関する記載と同じ培養条件で増殖させた。化合物スクリーニングは450 μmol Phot * m⁻² * s⁻² 照射で行った。

【0208】

コナミドリムシ (*Chlamydomonas reinhardtii*) または *Scenedesmus obliquus* の感受性株を、Loppes (1969, 20 Mol Gen Genet 104: 172-177) に記載のように14 M メタンシルホン酸エチル(EMS)で1時間、変異させる。個別の藻類細胞株における化合物活性に応じて、低濃度から致死濃度までの濃度の当該ベンゾオキサジノン誘導体除草剤を含有する固体栄養溶液プレート上で、変異誘発した細胞をスクリーニングすることによって、耐性株を同定する。

【0209】

野生型および耐性コナミドリムシ (*Chlamydomonas reinhardtii*) 由来のPPO遺伝子の、鋳型としてゲノムDNAもしくはコピーDNAからの増幅は、標準的なPCR技術により、DNAオリゴヌクレオチドを用いて実施される。変異は、配列アラインメントツールAlign X (Vector NTI Advance Software Version 10.3, Invitrogene, Carlsbad, CA, USA)を用いて、野生型と変異型のPPO配列を比較することによって特定される。

【0210】

10

20

30

40

50

図2は、ベンゾオキサジノン誘導体I.a.35除草剤に耐性を持つコナミドリムシ (*Chlamydomonas reinhardtii*) 株の選択を示す。(A) 選択薬剤を含有しない固体培地上にプレATINGした変異誘発細胞。(B) 1×10^{-7} M ベンゾオキサジノン誘導体I.a.35含有固体培地上にプレATINGした変異誘発細胞。ベンゾオキサジノン誘導体除草剤に耐性を持つ細胞はコロニーを形成する(丸で囲んで番号33、34、35、および36を付した)が、感受性細胞は生育しない。プレートBよりA上でコロニー数が多いことは、プレートB上のコロニーがベンゾオキサジノン誘導体I.a.35に耐性であることを示す。

【0211】

図3は、ベンゾオキサジノン誘導体I.a.35除草剤に耐性を持つ、選択されたコナミドリムシ (*Chlamydomonas reinhardtii*) 株の再増殖を示す。(A) 選択薬剤を含有しない液体培地中の野生型細胞。(B) ベンゾオキサジノン誘導体I.a.35を含有し、その濃度を増加させた (1×10^{-9} から 5×10^{-6} Mまで) 液体培地中の野生型細胞。(C) 選択薬剤を含有しない液体培地中の変異誘発細胞。(D1、D2、E1、E2) ベンゾオキサジノン誘導体I.a.35を含有し、その濃度を増加させた (1×10^{-9} から 5×10^{-6} Mまで) 液体培地中の、変異誘発され選択された細胞。ベンゾオキサジノン誘導体I.a.35除草剤に耐性を持つ株は、色が濃くなるまで培養で増殖し、これは生育を示す。感受性株は増殖せず、色は淡いままである。生育細胞を含む液体培地では、細胞密度が高いほど、濃い色をもたらす原因となる。培養物の密度が低いほど、色は淡く、あるいは完全に透明に見える。

【実施例3】

【0212】

除草剤耐性植物を同定するためのEMS変異誘発シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 群のスクリーニングおよびPPO遺伝子内の原因変異の特定

EMS処理したシロイヌナズナ植物のM2集団がLehle Seeds (Round Rock, TX, USA)から得られる。スクリーニングは、0.5%ゲル化剤Gelrite (登録商標) およびベンゾオキサジノン誘導体除草剤 ($0.1 \sim 500 \mu\text{M}$) を化合物の活性に応じて含有するムラシゲ・スクーグ栄養溶液上に、シロイヌナズナ種子をプレATINGすることによって行われる。植物は栽培室内で、16:8時間の明暗サイクルで22 にて最長で3週間インキュベートする。白化という表現型の強さの低下を示す耐性植物を土壌に移植し、温室条件下で成熟するまで栽培する。ロゼット植物の段階で、DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)を用いてゲノムDNAを分離するために、またはRNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)を用いて全mRNAを分離するために、ベンゾオキサジノン誘導体除草剤耐性植物からリーフディスクを採取する。

【0213】

標準的なPCR技術により、ゲノムDNAから、それぞれのオリゴヌクレオチドを用いて、PPO配列を増幅する。mRNAからPPOを増幅するためには、Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogene, Carlsbad, CA, USA)を用いてin vitroでコピーDNAを合成する。標準的なシーケンシングプラスミドでPCR産物をクローニングした後、変異したPPO遺伝子のDNA配列を、標準的な配列決定法により確定する。配列アラインメントツールAlign X (Vector NTI Advance Software Version 10.3, Invitrogene, Carlsbad, CA, USA)を使用することによって、野生型と変異型のPPO配列を比較することにより変異を特定する。

【実施例4】

【0214】

野生型および変異したPPO配列を有するベンゾオキサジノン誘導体除草剤耐性植物の作製

ベンゾオキサジノン誘導体除草剤耐性ダイズ (*Glycine max*) 植物を、Olhoft et al. (米国特許US 2009/0049567)に記載の方法により作製する。ユビキチンプロモーター (PcUbi) とノパリンシンターゼターミネーター (NOS) 配列の間に、耐性マーカー遺伝子カセット (AHAS) および変異したPPO配列 (GOIと記す) を含有するバイナリーベクターにおいて、Sambrook et al. (Molecular cloning (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press)に記載の標準的なクローニング法を用いて、変異したPPO配列をクローニングする。植物形質転換のためにバイナリープラスミドをAgrobacterium tumefaciensに導入する。アグ

ロバクテリウム (*Agrobacterium*) を介した形質転換によって、実生外植片の第1節で、プラスミド構築物をダイズの腋芽分裂組織細胞に導入する。アグロバクテリウム (*Agrobacteria*) を接種して共培養した後、外植片を、1週間、選択なしでシュート誘導培地に移す。その外植片を次に、形質転換細胞を選択するために、3週間、1-3 μM イマザピル (*Arsenal*) を含有するシュート誘導培地に移す。第1節に健全なカルス/シュートの盛り上がり有する外植片を次に、シュートが伸びるまで、または外植片が死滅するまで、1-3 μM イマザピル (*Arsenal*) を含有するシュート伸長培地に移す。トランスジェニック小植物を発根させ、導入遺伝子の存在についてTaqMan分析に供し、土壌に移して、温室内で成熟するまで生長させる。トウモロコシ植物の形質転換は、McElver and Singh (WO 2008/124495) に記載の方法によって行う。変異したPPO配列を含有する植物形質転換ベクター構築物は、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) を介した形質転換により、トウモロコシ未熟胚に導入される。

10

【0215】

形質転換された細胞は、3-4週間、0.5-1.5 μM イマザピルを添加した選択培地中で選択される。トランスジェニック小植物を植物再生培地上で再生させ、その後、発根させる。トランスジェニック小植物を、導入遺伝子の存在についてTaqMan分析に供した後、鉢植え培養土に移して温室内で成熟するまで生育させる。変異したPPO配列を用いて、McElver and Singh (WO 2008/124495) に記載のように、Floral dip法によってシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) を形質転換する。イネ (*Oryza sativa*) の形質転換は、Peng et al. (US 6653529) に記載のプロトプラスト形質転換により行われる。変異したPPO配列を有するダイズ、トウモロコシ、イネ、およびシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) のT0もしくはT1トランスジェニック植物は、PPO関連除草剤に対するPPO耐性の向上についてテストした。

20

【実施例5】

【0216】

機能的相補性およびスクリーニングアッセイ

(下記も参照されたい: William L. Patzoldt, Aaron G. Hager, Joel S. McCormick, and Patrick J. Tranel. A codon deletion confers resistance to herbicides inhibiting protoporphyrinogen oxidase. PNAS 103 (33), 12329-34)

PPOライブラリー作製:

30

PPO遺伝子ライブラリーは、PPO遺伝子 (Geneart AG, Regensburg, Germany) のランダム突然変異誘発 (エラープロードPCR) または飽和突然変異誘発によって作製し、*in vivo* スクリーニングのために発現ベクター (pBAD-TOPO) にクローニングする。さらに、短縮型の野生型および変異型PPO遺伝子を、翻訳が第2のATG開始コドンから始まるように、pBAD-TOPO発現ベクター (Invitrogen) にクローニングする。リボソーム結合部位 (AGGA) およびATG開始コドンをともに含有するフォワードプライマー5-CAGGAATAAGTAATGGCAACATTTCTGAG-3、ならびに終止コドンを含むリバースプライマー5-GAAGAATTACGCGGTCTTCTCATC-3を使用することによって、PPO cDNAをPCR増幅する。感受性PPOおよび推定耐性PPOプラスミドを用いて、Harry Dailey (University of Georgia, Athens, GA) により分譲された大腸菌 (*E. coli*, SASX38) hemG変異株を形質転換する。SASX38大腸菌株は、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ヘマチン添加LB培地で維持する。SASX38の形質転換コロニー、および未形質転換対照は、LB培地単独、または20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ヘマチンを添加、もしくはPPO阻害剤ラクトフェンおよび0.1から500 μM までのベンゾオキサジノン誘導體除草剤を添加したLB培地上での増殖能力を調べ、37 °Cにて14時間インキュベートする。

40

【0217】

相補性およびスクリーニングアッセイは、PPO除草剤への反応に対するPPO変異の効果を評価するために、大腸菌SASX38のhemG (PPO) 変異株 (Sasarman, A., Chartrand, P., La voie, M., Tardif, D., Proschek, R. & Lapointe, C. (1979) J. Gen. Microbiol. 113, 297-303.) を使用する。SASX38株は外部からヘムを補うか、またはPPOの代替源で救済しない限り、ごくゆっくりしか増殖しない。その上、野生型大腸菌は本来、PPO阻害剤に耐

50

性を有するので、SASX38株の使用は、ヒコモドキ (*A. tuberculatus*) 由来の野生型および変異型PPOの除草剤感受性について、比較して直接分析することを可能にする。野生型および変異型PPOをコードするプラスミド構築物で大腸菌SASX38株を形質転換する。構築物は、大腸菌SASX38株の増殖を助けることができるので、これはPPO遺伝子が機能的タンパク質をコードすることを示す。しかしながら、増殖培地にベンゾオキサジノン誘導体除草剤を添加すると、野生型PPOで形質転換された大腸菌の増殖は劇的に阻害されたが、変異型PPOで形質転換された大腸菌はそうではなかった。

【実施例6】

【0218】

組織培養条件

プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼを阻害する除草剤（たとえば、サフルフェナシル、ピフェノックス、ジウロン、ラクトフェン、ブタフェナシル）に耐性を有する植物組織（たとえば、トウモロコシ、イネ組織）を分離して特性を明らかにするために、*in vitro*組織培養変異誘発アッセイが開発された。このアッセイは、*in vitro*組織培養で見いだされるソマトクローナルバリエーションを利用する。ソマトクローナルバリエーションから生じる自然突然変異は、化学的突然変異誘発およびその後の段階的な選択によって、除草剤濃度の増加に対して増強することができる。

【0219】

本発明は、トウモロコシもしくはイネの、再生可能な、脆弱な胚発生カルスの増殖を促進するための組織培養条件を与える。カルスは、それぞれトウモロコシ (*Zea mays*) およびジャポニカ (Taipei 309、日本晴、コシヒカリ) およびインディカ (*Indica 1*) 品種をそれぞれ含む、4つの異なるトウモロコシもしくはイネ栽培品種から開始する。種子は70%エタノール中で約1分間、続いて市販の20% Clorox漂白剤で20分間、表面殺菌する。種子を滅菌水ですすぎ、カルス誘導培地上に蒔く。さまざまなカルス誘導培地をテストする。テストした培地の成分一覧を表5に示す。

10

20

【表5】

成分	メーカー	R001M	R025M	R026M	R327M	R008M	MS711R
B5 ビタミン	Sigma					1.0 X	
MS 塩類	Sigma			1.0 X	1.0 X	1.0 X	1.0 X
MS ビタミン	Sigma			1.0 X	1.0 X		
N6 塩類	Phytotech	4.0 g/L	4.0g/L				
N6 ビタミン	Phytotech	1.0 X	1.0 X				
L-プロリン	Sigma	2.9 g/L	0.5 g/L				1.2 g/L
カザミノ酸	BD	0.3 g/L	0.3 g/L	2 g/L			
カゼイン加水分解物	Sigma						1.0 g/L
L-Asp 一水和物	Phytotech						150 mg/L
ニコチン酸	Sigma						0.5 mg/L
ピリドキシン HCl	Sigma						0.5 mg/L
チアミン HCl	Sigma						1.0 mg/L
ミオイノシトール	Sigma						100 mg/L
MES	Sigma	500 mg/L	500 mg/L	500 mg/L	500 mg/L	500 mg/L	500 mg/L
マルトース	VWR	30 g/L	30 g/L	30 g/L	30 g/L		
ソルビトール	Duchefa			30 g/L			
スクロース	VWR					10 g/L	30 g/L
NAA	Duchefa					50 µg/L	
2,4-D	Sigma	2.0 mg/L					1.0 mg/L
MgCl ₂ ·6H ₂ O	VWR					750 mg/L	
→pH		5.8	5.8	5.8	5.8	5.8	5.7
ゲルライト (Gelrite)	Duchefa	4.0 g/L				2.5 g/L	
アガロース・タイプ1	Sigma		7.0 g/L	10 g/L	10 g/L		
→オートクレーブ		15分	15分	15分	15分	15分	20分
カイネチン	Sigma		2.0 mg/L	2.0 mg/L			
NAA	Duchefa		1.0 mg/L	1.0 mg/L			
ABA	Sigma		5.0 mg/L				
セフトキシム	Duchefa		0.1 g/L	0.1 g/L	0.1 g/L		
バンコマイシン	Duchefa		0.1 g/L	0.1 g/L	0.1 g/L		
G418 二硫酸塩	Sigma		20 mg/L	20 mg/L	20 mg/L		

10

20

30

【0220】

数多くのバリエーションをテストした後、R001Mカルス誘導培地を選択する。培養は暗下で30 に保たれる。胚発生カルスは10-14日後、新鮮培地に継代する。

【実施例7】

40

【0221】

除草剤耐性カルスの選択

組織培養条件を決定したら、さらに、サルフエナシル、ピフェノックス、ジウロン、ラクトフェン、ブタフェナシル、アシフルオルフェン、ベンゾオキサジノン誘導體除草剤による死滅曲線で組織の生存を分析することによって、選択条件を確立する。組織における除草剤の蓄積、ならびに細胞内および培地中のその存在および安定性について、慎重に検討する。こうした実験を通じて、変異した材料の最初の選択のために、致死量以下の用量が確立された。

【0222】

選択培地中の、サルフエナシル、ピフェノックス、ジウロン、ラクトフェン、ブタフ

50

エナシル、アシフルオルフェン、およびベンゾオキサジノン誘導体除草剤の開始用量を定めた後、毒性を示す用量の存在下で旺盛に生育する細胞が回収されるまで、段階的に、移植ごとにPPO阻害剤の濃度を増加させることによって、組織を選択する。その結果得られたカルスをさらに3-4週間ごとに、選択薬剤を含有するR001Mに継代する。選択圧が、死滅曲線および継続培養観察により決定された毒性量を超えるまで、26,000を越えるカルスを、4-5代の継代培養の間、選択に供する。

【0223】

あるいはまた、MS711R中でゆっくり振盪しながらカルスから液体培養を開始し、毎週継代する。液体培養が確立されたら、継代ごとにフラスコに直接、選択薬剤を添加する。液体選択を2-4回繰り返した後、培養物をさらに生育させるためにR001M固体培地上のフィルターに移す。

【実施例8】

【0224】

植物の再生

耐性組織を再生させて、PPO遺伝子配列の変異に関する分子的特性、および/または選択薬剤存在下でのPPO活性の変化に関する生化学的特性を明らかにする。それに加えて、直接および/または間接にテトラピロール生合成および/または代謝経路に関与する遺伝子も配列決定し、変異の特徴を明らかにする。最終的に、運命（たとえば、代謝、トランスロケーション、輸送）を変える酵素も配列決定し、変異の特徴を明らかにする。

【0225】

除草剤選択後、R025M培地で10-14日間、R026M培地で約2週間、形の整ったシュートが発生するまでR327M培地、そしてシュートが温室への移植のために十分発根するまでR008S培地、という培養計画で、カルスを再生させる。再生は明下で行う。再生中は、選択薬剤は含まない。

【0226】

強い根が成立したら、M0再生個体を、四角い、または丸い鉢に入れて温室に移植する。移植個体は、温室の環境に適應するまで、透明のプラスチックカップで覆って維持する。温室は、14時間の日長を維持するために600W 高圧ナトリウムライトで光を補って、27 / 21 (80 °F/70 °F) の昼夜サイクルに設定する。植物は、天候に合わせて、必要に応じて水をやり、毎日施肥する。

【実施例9】

【0227】

配列分析

移植するために分離されたクローン植物から、葉の組織を収集し、個別に分析する。Wizard (登録商標) 96 Magnetic DNA Plant Systemキット (Promega、米国特許第6,027,945号および第6,368,800号) を使用し、メーカーの説明書に従って、ゲノムDNAを抽出する。単離したDNAは、適当なフォワードおよびリバース・プライマーを用いてPCR増幅する。

【0228】

PCR増幅は、HotStar Taq DNA Polymerase (Qiagen)を用いて、次のようなタッチダウンサーマルサイクリングプログラムにより実施する：96 で15分、続いて35サイクル(96、30秒；58 からサイクルごとに0.2 下げた温度、30秒；72、3分30秒)、72 で10分。

【0229】

アガロースゲル電気泳動により、PCR産物の濃度およびフラグメントサイズを検証する。脱リン酸化したPCR産物を、PCRプライマーを用いたダイレクトシーケンスによって分析する(DNA Landmarks、またはEntelechon)。Vector NTI Advance 10(商標名)(Invitrogen)を用いて、変異について野生型遺伝子と比較してクマトグラムトレースファイル(.scf)を分析する。配列情報に基づいて、複数の個体で変異を特定する。配列分析は、代表的なクマトグラムおよび対応するAlignXアラインメントに基づいてデフォルト設定で行われ、二次ピークを呼び出すように編集される。

10

20

30

40

50

【実施例10】

【0230】

除草剤耐性の立証

選択された変異体、および逸出植物を小ポットに移す。野生型栽培品種は種子から発芽させ、対照としての役割を果たす。

【0231】

移植後約3週間ののち、M0再生個体に、track噴霧器を用いて、0.1%メチル化種油を添加したサルフエナシル (BAS 800H) またはベンゾオキサジノン誘導体 I.a.35 を噴霧する。植物が温室条件に順応した後、その一部に、追加のサルフエナシル (BAS 800H) またはベンゾオキサジノン誘導体 I.a.35 を噴霧する。噴霧したら植物を24時間湯水状態に保ち、それから再び水をやり肥料を施す。噴霧された植物は、写真に撮り、処理の1週間後および2週間後に除草剤損傷について評価する。

10

【実施例11】

【0232】

組織培養を用いた除草剤選択

使用するための培地を選択し、上記のように死滅曲線を作製する。選択のためにさまざまな技法を使用する。段階的選択を適用するか、または即時致死レベルの除草剤を使用する。いずれの場合も、すべてのカルスは、それぞれ新たな選択ラウンドのために移植される。選択は、各サイクル3-5週間で4-5サイクルの培養とする。カルスは移植を容易にするためにナイロン膜上に置く (200ミクロン細孔シート、Biodesign, Saco, Maine)。膜は、100 x 20 mmペトリ皿に合うようにカットし、使用前にオートクレーブ滅菌する。どのプレートにも、25-35個のカルス (カルス当たりの平均重量は22 mg) を使用する。さらに、一組のカルスは、液体培地での選択に供し、毎週継代した後、半固体培地上でさらに選択する。

20

【0233】

サルフエナシル (BAS 800H) またはベンゾオキサジノン誘導体 I.a.35 を用いて、変異体系統を選択する。変異体が見られる効率は、再生可能な変異体系統を生じさせるカルスのパーセンテージ、または、使用される組織のグラム数から確定される系統の数、のいずれに基づいても高い。全体として、変異率は、芝 (seashore paspalum) と比較して5倍であり、トウモロコシと比較して2倍である。

30

[1] 植物栽培地で望ましくない植物生育を防除するための方法であって、以下のステップ、

a) 前記栽培地において、「ベンゾオキサジノン誘導体除草剤」に対して抵抗性もしくは耐性を持つ、野生型プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ、もしくは変異したプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (mut-PP0) をコードするヌクレオチド配列を含む、少なくとも1つの核酸を含有する植物を提供するステップ、および/または

b) 有効量の前記除草剤を前記栽培地に施用するステップ、を含む、前記方法。

[2] a) のヌクレオチド配列が、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、もしくは45の配列、またはそれらのバリエーションもしくは誘導体を含む、1に記載の方法。

40

[3] 植物が、除草剤耐性酵素をコードするヌクレオチド配列を含む、少なくとも1つの追加の異種核酸を含有する、1または2に記載の方法。

[4] ベンゾオキサジノン誘導体除草剤が1つもしくは複数の他のPP0を標的とする除草剤と併せて施用される、1~3のいずれか1つに記載の方法。

[5] 配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、もしくは45のヌクレオチド配列を含む核酸によってコードされるmut-PP0、またはそれらのバリエーションもしくは誘導体を使用することによって、ベンゾオキサジノン誘導体除草剤を同定するための方法。

[6] a) mut-PP0をコードする核酸を含有し、そのmut-PP0を発現する、トランスジェニ

50

ック細胞もしくは植物を作製するステップ；

b) a)のトランスジェニック細胞もしくは植物、および同一品種の対照細胞もしくは植物に対して、ベンゾオキサジノン誘導体を施用するステップ；

c) 前記テスト化合物の施用後に、トランスジェニック細胞もしくは植物、および対照細胞もしくは植物の生長または生存能力を測定するステップ、ならびに

d) トランスジェニック細胞もしくは植物の生長に比べて、対照細胞もしくは植物に対して生長の低下をもたらすテスト化合物を選択するステップ、を含む、5に記載の方法。

[7] ベンゾオキサジノン誘導体除草剤に対して抵抗性もしくは耐性を持つ、mut-PP0をコードするヌクレオチド配列を同定する方法であって、

a) mut-PP0をコードする核酸のライブラリーを作製すること、

b) その結果得られたmut-PP0をコードする核酸の集団を、細胞もしくは植物においてそれぞれの前記核酸を発現させ、前記細胞もしくは植物をベンゾオキサジノン誘導体で処理することによって、スクリーニングすること、

c) 前記のmut-PP0をコードする核酸集団により与えられるベンゾオキサジノン誘導体耐性レベルを、対照PP0をコードする核酸により与えられるベンゾオキサジノン誘導体耐性レベルと比較すること、

d) 対照PP0をコードする核酸によってもたらされる耐性レベルと比較して、ベンゾオキサジノン誘導体に対する耐性レベルの有意な増加をもたらす、少なくとも1つのmut-PP0をコードする核酸を選択すること、

を含む、前記方法。

[8] ステップd)で選択されるmut-PP0コード核酸が、ベンゾオキサジノン誘導体除草剤に対して、対照PP0コード核酸により与えられる耐性と比較して、少なくとも2倍の耐性をもたらす、7に記載の方法。

[9] ステップa)のライブラリーの核酸配列を含有するトランスジェニック植物を作製すること、ならびにこのトランスジェニック植物を対照植物と比較することによって、抵抗性もしくは耐性が判定される、7または8に記載の方法。

[10] mut-PP0をコードする単離された核酸であって、その核酸が7～9のいずれか1つに記載の方法によって同定可能である、前記核酸。

[11] 10に記載の核酸であって、それによってコードされるmut-PP0は配列番号2のバリエーションであるが、それは次のうち1つもしくは複数を含んでおり、すなわち：128位のアミノ酸はアルギニン以外である；175位のアミノ酸はグリシン以外である；209位のアミノ酸はグリシン以外である；210位のアミノ酸はグリシン以外である；295位のアミノ酸はロイシン以外である；296位のアミノ酸はセリン以外である；334位のアミノ酸はロイシン以外である；353位のアミノ酸はフェニルアラニン以外である；382位のアミノ酸はグリシン以外である；384位のアミノ酸はロイシン以外である；397位のアミノ酸はロイシン以外である；398位のアミノ酸はグリシン以外である；399位のアミノ酸はスレオニン以外である；400位のアミノ酸はロイシン以外である；402位のアミノ酸はセリン以外である；403位のアミノ酸はセリン以外である；404位のアミノ酸はメチオニン以外である；405位のアミノ酸はメチオニン以外である；420位のアミノ酸はフェニルアラニン以外である；439位のアミノ酸はフェニルアラニン以外である、前記核酸。

[12] 野生型もしくはmut-PP0核酸で形質転換されたトランスジェニック植物細胞であって、その植物細胞における前記核酸の発現が、野生型品種の植物細胞と比べて、ベンゾオキサジノン誘導体除草剤に対する抵抗性もしくは耐性の増加をもたらす、前記トランスジェニック植物細胞。

[13] 12に記載のトランスジェニック植物細胞であって、その野生型もしくはmut-PP0核酸が、

a) 配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、もしくは45に示すポリヌクレオチド、またはそれらのバリエーションもしくは誘導体；

10

20

30

40

50

b) 配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、もしくは46に示すポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、またはそれらのバリエーションもしくは誘導体；

c) a)もしくはb)のいずれかの少なくとも60個の連続したヌクレオチドを含んでなるポリヌクレオチド；ならびに

d) a)からc)までのいずれかのポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド、からなる1群から選択されるポリヌクレオチド配列を含んでなる、前記トランスジェニック植物細胞。

[14] 13に記載のトランスジェニック植物細胞であって、b)の配列番号2のポリペプチドのバリエーションが、次のうち1つもしくは複数を含んでおり、すなわち：175位のアミノ酸はグリシン以外である；209位のアミノ酸はグリシン以外である；210位のアミノ酸はグリシン以外である；295位のアミノ酸はロイシン以外である；296位のアミノ酸はセリン以外である；334位のアミノ酸はロイシン以外である；353位のアミノ酸はフェニルアラニン以外である；382位のアミノ酸はグリシン以外である；384位のアミノ酸はロイシン以外である；397位のアミノ酸はロイシン以外である；398位のアミノ酸はグリシン以外である；399位のアミノ酸はスレオニン以外である；400位のアミノ酸はロイシン以外である；402位のアミノ酸はセリン以外である；403位のアミノ酸はセリン以外である；404位のアミノ酸はメチオニン以外である；405位のアミノ酸はメチオニン以外である；420位のアミノ酸はフェニルアラニン以外である；439位のアミノ酸はフェニルアラニン以外である、前記トランスジェニック植物細胞。

10

20

[15] 12～14に記載の植物細胞を含んでなるトランスジェニック植物であって、その植物における核酸の発現が結果として、野生型品種の植物と比較して、ベンゾオキサジノン誘導体除草剤に対する植物の抵抗性の増加をもたらす、前記トランスジェニック植物。

[16] 配列番号2を含んでなる突然変異もしくは組換えmut-PP0を発現する植物であって、そのアミノ酸配列は、対応する野生型植物の野生型PP0のアミノ酸配列と、1つもしくは複数のアミノ酸位置で異なっており、その175位のアミノ酸はグリシン以外である；209位のアミノ酸はグリシン以外である；210位のアミノ酸はグリシン以外である；295位のアミノ酸はロイシン以外である；296位のアミノ酸はセリン以外である；334位のアミノ酸はロイシン以外である；353位のアミノ酸はフェニルアラニン以外である；382位のアミノ酸はグリシン以外である；384位のアミノ酸はロイシン以外である；397位のアミノ酸はロイシン以外である；398位のアミノ酸はグリシン以外である；399位のアミノ酸はスレオニン以外である；400位のアミノ酸はロイシン以外である；402位のアミノ酸はセリン以外である；403位のアミノ酸はセリン以外である；404位のアミノ酸はメチオニン以外である；405位のアミノ酸はメチオニン以外である；420位のアミノ酸はフェニルアラニン以外である；439位のアミノ酸はフェニルアラニン以外である、さらに前記PP0が、植物で発現されたとき、対応する野生型品種の植物と比べて高い除草剤耐性をその植物に与える、前記植物。

30

[17] 12～14に記載の植物細胞を含んでなるトランスジェニック植物によって、または15もしくは16に記載の植物によって生産される種子であって、その種子が、野生型品種の種子と比べて増大した、ベンゾオキサジノン誘導体除草剤への抵抗性について、何世代にもわたって同じ特徴を示す、前記種子。

40

[18] mut-PP0核酸を含有する発現カセットで植物細胞を形質転換することを含む、野生型品種の植物細胞より高いベンゾオキサジノン誘導体除草剤への抵抗性を示すトランスジェニック植物細胞を作製する方法。

[19] (a) mut-PP0核酸を含有する発現カセットで植物細胞を形質転換すること、ならびに

(b) その植物細胞から、ベンゾオキサジノン誘導体除草剤への抵抗性の高まった植物体を生成させること

を含む、トランスジェニック植物を作製する方法。

50

[2 0] mut-PP0核酸が、

a) 配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、もしくは45に示すポリヌクレオチド、またはそれらのバリエーションもしくは誘導体；

b) 配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、もしくは46に示すポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、またはそれらのバリエーションもしくは誘導体；

c) a)もしくはb)のいずれかの少なくとも60個の連続したヌクレオチドを含んでなるポリヌクレオチド；ならびに

d) a)からc)までのいずれかのポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド、
からなる1群から選択されるポリヌクレオチド配列を含んでなる、
18または19に記載の方法。

10

[2 1] 発現カセットが、植物体内で機能する転写開始制御領域、および翻訳開始制御領域を追加して含んでなる、18～20のいずれか1つに記載の方法。

[2 2] 形質転換された植物細胞、植物組織、植物体、またはその一部を同定し、または選択する方法であって、

i) 形質転換された植物細胞、植物組織、植物体、またはその一部を提供するが、その形質転換植物細胞、植物組織、植物体、またはその一部は、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、もしくは45に示すポリヌクレオチド、またはそれらのバリエーションもしくは誘導体を含んでなるものであって、そのポリヌクレオチドは、選択マーカーとして使用されるmut-PP0ポリペプチドをコードしており、さらに前記形質転換植物細胞、植物組織、植物体、またはその一部は、他の単離されたポリヌクレオチドをさらに含有していてもよい、前記の形質転換された植物細胞、植物組織、植物体、またはその一部を提供すること；

20

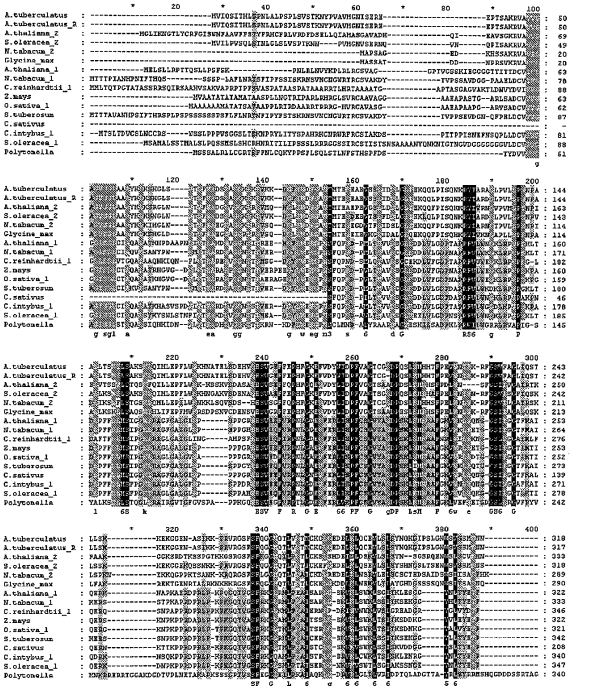
ii) 形質転換された植物細胞、植物組織、植物体、またはその一部を、少なくとも1つのベンゾオキサジノン誘導体化合物と接触させること；

iii) 植物細胞、植物組織、植物体、またはその一部がその阻害化合物によって影響を受けるかどうかを判定すること；ならびに

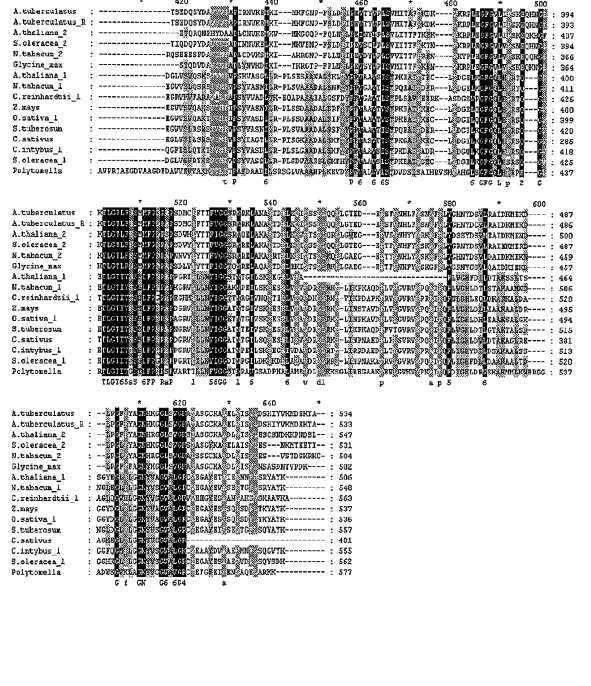
iv) 形質転換された植物細胞、植物組織、植物体、またはその一部を同定し、または選択すること、
を含む、前記方法。

30

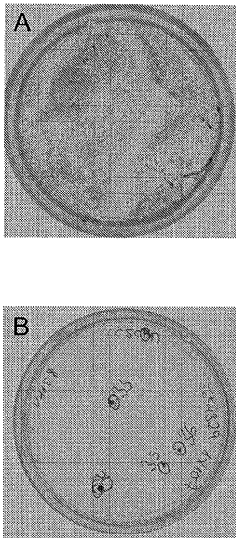
【図 1 - 1】



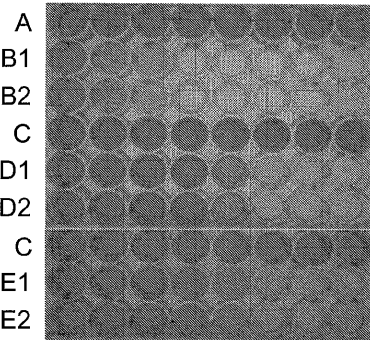
【図 1 - 2】



【図 2】



【図 3】



【配列表】

0006334169000001.app

フロントページの続き

- (51)Int.Cl. F I
 A 6 1 P 13/00 (2006.01) A 6 1 P 13/00
- (72)発明者 ハツラー, ヨハネス
 ドイツ連邦共和国 6 7 1 6 5 ヴァルトゼー, カール - ボッシュ - シュトラーセ 9
- (72)発明者 アボンテ, ラファエル
 ドイツ連邦共和国 6 8 1 5 9 マンハイム, ゲー 7 1 8
- (72)発明者 ミーツナー, トーマス
 ドイツ連邦共和国 7 6 8 5 5 アンヴァイラー, レーベルクシュトラーセ 6 2
- (72)発明者 ヴィチェル, マティアス
 ドイツ連邦共和国 6 7 0 9 8 パート デュルクハイム, ヘーエンヴェーク 1 2 ベー
- (72)発明者 サイモン, アニャ
 ドイツ連邦共和国 6 9 4 6 9 ヴァインハイム, クリンゲンヴェーク 1 0
- (72)発明者 レルヒル, イェンス
 ドイツ連邦共和国 1 4 4 7 6 ゴルム, ゴルマー フィヒテン 5
- (72)発明者 トレシュ, シュテファン
 ドイツ連邦共和国 6 7 2 8 1 キルヒハイム, リースリングヴェーク 1 8
- (72)発明者 マンキン, エス. ルーク
 アメリカ合衆国 2 7 6 1 2, ローリー, ディアウッド ドライブ 4 8 0 0

審査官 川口 裕美子

- (56)参考文献 特開平02 - 235873 (JP, A)
 特開昭64 - 075486 (JP, A)
 米国特許出願公開第2007/0050863 (US, A1)
 特表2000 - 506724 (JP, A)
 特表2002 - 528036 (JP, A)
 国際公開第01/068826 (WO, A1)
 Patzoldt et al, PNAS, 2006年 8月15日, Vol. 103, No. 33, p. 12329-12334

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0

C 1 2 N 5 / 1 0

A 0 1 H 1 / 0 0

A 0 1 H 5 / 0 0

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

U n i P r o t / G e n e S e q