

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4821038号  
(P4821038)

(45) 発行日 平成23年11月24日(2011.11.24)

(24) 登録日 平成23年9月16日(2011.9.16)

(51) Int.Cl.	F I				
AO1H 5/00 (2006.01)	AO1H	5/00	A		
C12N 5/10 (2006.01)	C12N	5/00	103		
C12N 9/00 (2006.01)	C12N	9/00			
C12N 9/02 (2006.01)	C12N	9/02			
C12N 9/10 (2006.01)	C12N	9/10			

請求項の数 8 (全 78 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2000-328811 (P2000-328811)	(73) 特許権者	000002093
(22) 出願日	平成12年10月27日(2000.10.27)		住友化学株式会社
(65) 公開番号	特開2001-190168 (P2001-190168A)		東京都中央区新川二丁目27番1号
(43) 公開日	平成13年7月17日(2001.7.17)	(74) 代理人	100113000
審査請求日	平成19年9月3日(2007.9.3)		弁理士 中山 亨
(31) 優先権主張番号	特願平11-310244	(74) 代理人	100151909
(32) 優先日	平成11年10月29日(1999.10.29)		弁理士 坂元 徹
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(72) 発明者	中島 寛樹
前置審査			兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化学工業株式会社内
		(72) 発明者	長澤 秋都
			兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化学工業株式会社内
		審査官	水落 登希子
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 除草剤耐性植物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

葉緑体移行シグナルと連結されてなる配列番号3で示される塩基配列でコードされるアミノ酸配列にて特定される5-エノールピルピルシキミ酸-3-リン酸合成酵素の酵素活性を有し、該酵素活性によって、植物の天然の5-エノールピルピルシキミ酸-3-リン酸合成酵素活性を阻害する量の除草剤に対して耐性を示す植物であって、かつ、葉緑体移行シグナルを欠失した植物由来のマグネシウムケラターゼのプロトポルフィリンIX結合サブユニットタンパク質をコードする遺伝子が導入されてなり該遺伝子を発現する植物。

【請求項2】

遺伝子が、植物細胞で機能可能なプロモーターおよび植物細胞で機能可能なターミネーターと機能可能な形で結合されてなる遺伝子である請求項1記載の植物。

【請求項3】

葉緑体移行シグナルを欠失したマグネシウムケラターゼのプロトポルフィリンIX結合サブユニットタンパク質が、タバコ由来である請求項1または2記載の植物。

【請求項4】

請求項1～3のいずれかに記載の植物を増殖させることを特徴とする除草剤耐性植物の製造方法。

【請求項5】

請求項1～3のいずれかに記載の植物の栽培域に除草剤を散布する雑草防除方法。

## 【請求項 6】

請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の植物の栽培域に除草剤を散布する除草剤耐性植物の選抜方法。

## 【請求項 7】

請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の植物の細胞の培養域に除草剤を添加する除草剤耐性植物細胞の選抜方法。

## 【請求項 8】

葉緑体移行シグナルと連結されてなる配列番号 3 で示される塩基配列でコードされるアミノ酸配列にて特定される5-エノールピルピルシキミ酸-3-リン酸合成酵素の酵素活性を有し、該酵素活性によって、植物の天然の5-エノールピルピルシキミ酸-3-リン酸合成酵素活性を阻害する量の除草剤に対して耐性を示す植物の細胞に、  
葉緑体移行シグナルを欠失した植物由来のマグネシウムケラターゼのプロトポルフィリン IX 結合サブユニットタンパク質をコードする遺伝子を導入し発現させる工程を含むことを特徴とする除草剤耐性植物の作製方法。

10

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 【発明が属する技術分野】

本発明は、除草剤耐性植物に関する。

## 【0002】

## 【従来の技術】

雑草防除は作物の収量向上や高品質化を図るうえで重要な作業であり、雑草防除作業の効率化の為に主として除草剤が使用されている。防除の対象となる雑草は種類も多く、発生も長期間にわたるため、必要に応じて、異なる除草作用機構で作用する複数の化合物が雑草防除に用いられることがある。

20

## 【0003】

## 【発明が解決しようとする課題】

このような除草剤の使用場面において、作物と近縁の雑草とを明確に区別して、雑草のみを選択的に防除することは困難な場合があることから、異なる除草作用機構で作用する複数の化合物に対して耐性を示す作物の開発が切望されている。

## 【0004】

## 【課題を解決するための手段】

このような状況下、本発明者らは鋭意検討を行った結果、ある種のタンパク質を植物の細胞で産生させることにより、グリフォセートおよびその塩に対する耐性とプロトポルフィリノーゲン IX オキシダーゼ阻害型除草剤に対する耐性とを有する植物を作出することが可能であることを見出し本発明に至った。

30

即ち、本発明は、

1) 下記(1)および(2)のうちから選ばれる 1 以上の酵素活性を有し、該酵素活性によって、植物の天然の5-エノールピルピルシキミ酸-3-リン酸合成酵素活性を阻害する量の除草剤に対して耐性を示す植物であって、

(1) 植物の天然の5-エノールピルピルシキミ酸-3-リン酸合成酵素活性とは実質的に異なる5-エノールピルピルシキミ酸-3-リン酸合成酵素活性。

40

(2) 植物の天然のグリフォセートオキシドリダクターゼ活性とは実質的に異なるグリフォセートオキシドリダクターゼ活性。

かつ、下記(3)、(4)および(5)の性質を有するタンパク質をコードする遺伝子が導入されてなり該遺伝子を発現する植物（以下、本発明植物 1 と記す。）、

(3) プロトポルフィリノーゲン IX オキシダーゼ阻害型除草剤の殺草活性に関わる物質に特異的に結合する。

(4) 当該タンパク質が特異的に結合する物質に対する変性能を実質的に持たない。

(5) 免疫グロブリンの可変領域のフレームワーク領域を実質的に含まない。

2) タンパク質が、プロトポルフィリノーゲン IX オキシダーゼ阻害型除草剤に有効成分と

50

して含まれる物質に特異的に結合する性質を有するタンパク質である前項 1 ) 記載の植物

、  
3 ) タンパク質が、植物細胞内でプロトポルフィリノーゲンIXオキシダーゼ阻害型除草剤の雑草防除活性発現に関わる植物細胞内因性物質に特異的に結合する性質を有するタンパク質である前項 1 ) 記載の植物、

4 ) タンパク質が、プロトポルフィリンIXに特異的に結合する性質を有するタンパク質である前項 1 ) または 3 ) 記載の植物、

5 ) タンパク質が、マグネシウムケラターゼのプロトポルフィリンIX結合サブユニットタンパク質であるか、または該タンパク質の改変タンパク質であってプロトポルフィリンIXに特異的に結合する性質を有するタンパク質である前項 1 ) 、 3 ) または 4 ) 記載の植物

10

、  
6 ) タンパク質が、プロトポルフィリノーゲンIXに特異的に結合する性質を有するタンパク質である前項 1 ) または 3 ) 記載の植物、

7 ) タンパク質が、プロトポルフィリノーゲンIXオキシダーゼの改変タンパク質であって、プロトポルフィリノーゲンIXに対する酸化能を持たずプロトポルフィリノーゲンIXに特異的に結合する性質を有するタンパク質である前項 1 ) 、 3 ) または 6 ) 記載の植物、

8 ) タンパク質が、プロトポルフィリノーゲンIXオキシダーゼの改変タンパク質であって、プロトポルフィリノーゲンIXに対する酸化能を持たずプロトポルフィリノーゲンIXオキシダーゼ阻害型除草剤に有効成分として含まれる物質に特異的に結合する性質を有するタンパク質である前項 1 ) 、 2 ) または 6 ) 記載の植物、

20

9 ) 下記(1)および(2)のうちから選ばれる 1 以上の酵素活性を有し、該酵素活性によって、植物の天然の5-エノールピルピルシキミ酸-3-リン酸合成酵素活性を阻害する量の除草剤に対して耐性を示す植物であって、

(1)植物の天然の5-エノールピルピルシキミ酸-3-リン酸合成酵素活性とは実質的に異なる5-エノールピルピルシキミ酸-3-リン酸合成酵素活性。

(2)植物の天然のグリフォセートオキシドリダクターゼ活性とは実質的に異なるグリフォセートオキシドリダクターゼ活性。

かつ、下記(3)、(4)および(5)の性質を有するタンパク質をコードする遺伝子が導入されてなり該遺伝子を発現する植物(以下、本発明植物 2 と記す。)、

(3)プロトポルフィリンIXに特異的に結合する。

30

(4)プロトポルフィリノーゲンIXに対する変性能を持たない。

(5)免疫グロブリンの可変領域のフレームワーク領域を実質的に含まない。

10 ) タンパク質がフェロケラターゼであるか、または該タンパク質の改変タンパク質であってプロトポルフィリンIXに特異的に結合する性質を有するタンパク質である前項 9 ) 記載の植物、

11 ) 下記(1)および(2)のうちから選ばれる 1 以上の酵素活性を有し、該酵素活性によって、植物の天然の5-エノールピルピルシキミ酸-3-リン酸合成酵素活性を阻害する量の除草剤に対して耐性を示す植物であって、

(1)植物の天然の5-エノールピルピルシキミ酸-3-リン酸合成酵素活性とは実質的に異なる5-エノールピルピルシキミ酸-3-リン酸合成酵素活性。

40

(2)植物の天然のグリフォセートオキシドリダクターゼ活性とは実質的に異なるグリフォセートオキシドリダクターゼ活性。

かつ、下記(3)、(4)および(5)の性質を有するタンパク質をコードする遺伝子が導入されてなり該遺伝子を発現する植物(以下、本発明植物 3 と記す。)、

(3)プロトポルフィリノーゲンIXに特異的に結合する。

(4)コプロポルフィリノーゲンIIIに対する変性能を持つ。

(5)免疫グロブリンの可変領域のフレームワーク領域を実質的に含まない。

12 ) タンパク質がコプロポルフィリノーゲンIIIオキシダーゼであるか、または該タンパク質の改変タンパク質であってプロトポルフィリノーゲンIXに特異的に結合する性質を有するタンパク質である前項 11 ) 記載の植物、

50

13) 前項1)～12)のいずれかに記載の植物を増殖させることを特徴とする除草剤耐性植物の製造方法、

14) 前項1)～12)のいずれかに記載の植物の栽培域に除草剤を散布する雑草防除方法、

15) 前項1)～12)のいずれかに記載の植物の栽培域に除草剤を散布する除草剤耐性植物の選抜方法、

16) 前項1)～12)のいずれかに記載の植物の細胞の培養域に除草剤を添加する除草剤耐性植物細胞の選抜方法、

17) 下記(1)および(2)のうちから選ばれる1以上のタンパク質をコードする遺伝子を植物細胞に導入し発現させる工程と、

(1)5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素活性を実質的に有するタンパク質。

(2)グリフォセートオキシドリダクターゼ活性を実質的に有するタンパク質。

下記(3)、(4)および(5)の性質を有するタンパク質をコードする遺伝子を植物細胞に導入し発現させる工程とを含むことを特徴とする除草剤耐性植物の作製方法、

(3)プロトポルフィリノーゲンIXオキシダーゼ阻害型除草剤の殺草活性に関わる物質に特異的に結合する。

(4)当該タンパク質が特異的に結合する物質に対する変性能を実質的に持たない。

(5)免疫グロブリンの可変領域のフレームワーク領域を実質的に含まない。

18) 下記(1)および(2)のうちから選ばれる1以上の酵素活性を有し、該酵素活性によって、植物の天然の5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素活性を阻害する量の除草剤に対して耐性を示す植物の細胞に、

(1)植物の天然の5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素活性とは実質的に異なる5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素活性。

(2)植物の天然のグリフォセートオキシドリダクターゼ活性とは実質的に異なるグリフォセートオキシドリダクターゼ活性。

下記(3)、(4)および(5)の性質を有するタンパク質をコードする遺伝子を植物細胞に導入し発現させる工程を含むことを特徴とする除草剤耐性植物の作製方法、

(3)プロトポルフィリノーゲンIXオキシダーゼ阻害型除草剤の殺草活性に関わる物質に特異的に結合する。

(4)当該タンパク質が特異的に結合する物質に対する変性能を実質的に持たない。

(5)免疫グロブリンの可変領域のフレームワーク領域を実質的に含まない。

19) 下記(1)、(2)および(3)の性質を有するタンパク質をコードする遺伝子が導入されてなり該遺伝子を発現する植物細胞に、

(1)プロトポルフィリノーゲンIXオキシダーゼ阻害型除草剤の殺草活性に関わる物質に特異的に結合する。

(2)当該タンパク質が特異的に結合する物質に対する変性能を実質的に持たない。

(3)免疫グロブリンの可変領域のフレームワーク領域を実質的に含まない。

下記(4)および(5)のうちから選ばれる1以上のタンパク質をコードする遺伝子を導入し発現させる工程を含むことを特徴とする除草剤耐性植物の作製方法、

(4)5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素活性を実質的に有するタンパク質。

(5)グリフォセートオキシドリダクターゼ活性を実質的に有するタンパク質。

20) 下記(1)および(2)のうちから選ばれる1以上のタンパク質をコードする遺伝子を植物細胞に導入し発現させる工程と、

(1)5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素活性を実質的に有するタンパク質。

(2)グリフォセートオキシドリダクターゼ活性を実質的に有するタンパク質。

下記(3)、(4)および(5)の性質を有するタンパク質をコードする遺伝子を植物細胞に導入し発現させる工程とを含むことを特徴とする除草剤耐性植物の作製方法、

(3)プロトポルフィリンIXに特異的に結合する。

(4)プロトポルフィリノーゲンIXに対する変性能を持たない。

(5)免疫グロブリンの可変領域のフレームワーク領域を実質的に含まない。

10

20

30

40

50

2 1 ) 下記(1)および(2)のうちから選ばれる 1 以上の酵素活性を有し、該酵素活性によって、植物の天然の5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素活性を阻害する量の除草剤に対して耐性を示す植物の細胞に、

(1)植物の天然の5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素活性とは実質的に異なる5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素活性。

(2)植物の天然のグリフォセートオキシドリダクターゼ活性とは実質的に異なるグリフォセートオキシドリダクターゼ活性。

下記(3)、(4)および(5)の性質を有するタンパク質をコードする遺伝子を植物細胞に導入し発現させる工程を含むことを特徴とする除草剤耐性植物の作製方法、

(3)プロトボルフィリンIXに特異的に結合する。

10

(4)プロトボルフィリノーゲンIXに対する変性能を持たない。

(5)免疫グロブリンの可変領域のフレームワーク領域を実質的に含まない。

2 2 ) 下記(1)、(2)および(3)の性質を有するタンパク質をコードする遺伝子が導入されてなり該遺伝子を発現する植物細胞に、

(1)プロトボルフィリンIXに特異的に結合する。

(2)プロトボルフィリノーゲンIXに対する変性能を持たない。

(3)免疫グロブリンの可変領域のフレームワーク領域を実質的に含まない。

下記(4)および(5)のうちから選ばれる 1 以上のタンパク質をコードする遺伝子を導入し発現させる工程を含むことを特徴とする除草剤耐性植物の作製方法、

(4)5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素活性を実質的に有するタンパク質。

20

(5)グリフォセートオキシドリダクターゼ活性を実質的に有するタンパク質。

2 3 ) 下記(1)および(2)のうちから選ばれる 1 以上のタンパク質をコードする遺伝子を植物細胞に導入し発現させる工程と、

(1)5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素活性を実質的に有するタンパク質。

(2)グリフォセートオキシドリダクターゼ活性を実質的に有するタンパク質。

下記(3)、(4)および(5)の性質を有するタンパク質をコードする遺伝子を植物細胞に導入し発現させる工程とを含むことを特徴とする除草剤耐性植物の作製方法、

(3)プロトボルフィリノーゲンIXに特異的に結合する。

(4)コプロボルフィリノーゲンIIIに対する変性能を持つ。

(5)免疫グロブリンの可変領域のフレームワーク領域を実質的に含まない。

30

2 4 ) 下記(1)および(2)のうちから選ばれる 1 以上の酵素活性を有し、該酵素活性によって、植物の天然の5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素活性を阻害する量の除草剤に対して耐性を示す植物の細胞に、

(1)植物の天然の5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素活性とは実質的に異なる5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素活性。

(2)植物の天然のグリフォセートオキシドリダクターゼ活性とは実質的に異なるグリフォセートオキシドリダクターゼ活性。

下記(3)、(4)および(5)の性質を有するタンパク質をコードする遺伝子を植物細胞に導入し発現させる工程を含むことを特徴とする除草剤耐性植物の作製方法、

(3)プロトボルフィリノーゲンIXに特異的に結合する。

40

(4)コプロボルフィリノーゲンIIIに対する変性能を持つ。

(5)免疫グロブリンの可変領域のフレームワーク領域を実質的に含まない。

2 5 ) 下記(1)、(2)および(3)の性質を有するタンパク質をコードする遺伝子が導入されてなり該遺伝子を発現する植物細胞に、

(1)プロトボルフィリノーゲンIXに特異的に結合する。

(2)コプロボルフィリノーゲンIIIに対する変性能を持つ。

(3)免疫グロブリンの可変領域のフレームワーク領域を実質的に含まない。

下記(4)および(5)のうちから選ばれる 1 以上のタンパク質をコードする遺伝子を導入し発現させる工程を含むことを特徴とする除草剤耐性植物の作製方法、

(4)5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素活性を実質的に有するタンパク質。

50

(5)グリフォセートオキシドリダクターゼ活性を実質的に有するタンパク質。  
を提供するものである。

【 0 0 0 5 】

【発明の実施の形態】

以下、さらに詳細に本発明を説明する。

プロトポルフィリノーゲンIXオキシダーゼ阻害型除草剤とは、プロトポルフィリノーゲンIXオキシダーゼ(protoporphyrinogen IX oxidase; EC 1.3.3.4。以下、PPOと記す。)の活性を阻害する化合物(以下、PPO阻害型除草性化合物と記す。)を有効成分として含む除草剤を意味する。

【 0 0 0 6 】

本発明において、PPO阻害型除草剤の殺草活性に関わる物質(以下、本物質と記す。)とは、PPO阻害型除草性化合物、および、PPO阻害型除草剤が植物に施用された際に植物細胞内で該除草剤の殺草活性発現に関わる植物細胞内因性物質を意味する。

PPO阻害型除草剤に有効成分として含まれる化合物としては、Duke, S.O., Rebeiz, C.A. ACS Symposium Series 559, Porphyrin Pesticides, Chemistry, Toxicology, and Pharmaceutical Applications. American Chemical Society, Washington DC (1994)等に記載の化合物等があげられる。

PPO阻害型除草性化合物は多くの異なる構造の分子種を包含し[Duke et al., Weed Sci. 39: p465(1991); Nandihalli et al., Pesticide Biochem. Physiol. 43: p193(1992); Matringe et al., FEBS Lett. 245: p35(1989); Yanase, Andoh, Pesticide Biochem. Physiol. 35: p70(1989)], 具体的には、ジフェニルエーテル〔例えばクロルメトキシニル、ピフェノックス、クロルニトロフェン(CNP)、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}、アシフルオルフェンのエチルエステル、アシフルオルフェン-ソディウム、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]、オキサジアゾール〔例えばオキサジアゾン{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〔例えばS-23142[N-(4-クロロ-2-フルオロ-5-プロパ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]、クロロフタリム[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〔例えばTNPP-エチル{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]プロピオネート}〕、ピリジン誘導体〔例えばLS82-556[N3-(1-フェニルエチル)-2,6-ジメチル-5-プロピオニルニコチンアミド]〕、フェノピレート、フェノピレートの0-フェニルピロリジノカルバメート類似体、フェノピレートのピペリジノカルバメート類似体等である。

【 0 0 0 7 】

特に重要なジフェニルエーテルとしては、下記 化1記載の構造式1~7で示される化合物等があげられる[構造式4: Maigrot et al., Brighton Crop Protection Conference-Weeds:47-51(1989) 参照; 構造式5: Hayashi et al., Brighton Crop Protection Conference-Weeds: 53-58(1989) 参照; 構造式6: ピフェノックス、Dest et al., Proc. Northeast Weed Sci. Conf. 27:31(1973) 参照]。

【化1】

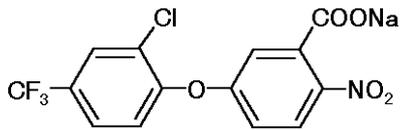
10

20

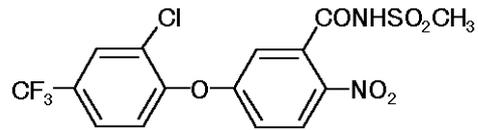
30

40

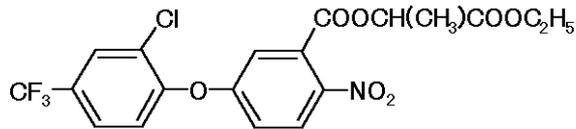
構造式1



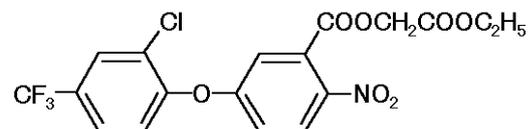
構造式2



構造式3

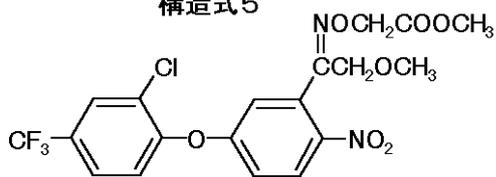


構造式4

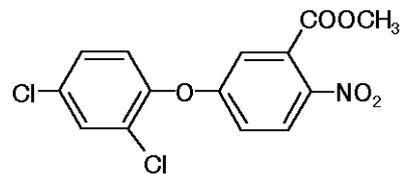


10

構造式5

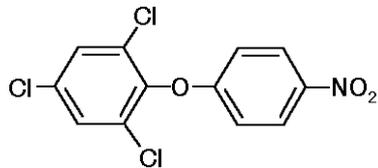


構造式6



20

構造式7



## 【0008】

さらに、その他の特に重要なPPO阻害型除草性化合物として、下記 化2記載の一般式で示される化合物等をあげることができ、より具体的には、下記 化7～化10記載の構造式8～37で示される化合物などがあげられる。

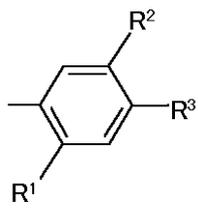
30

## 【化2】

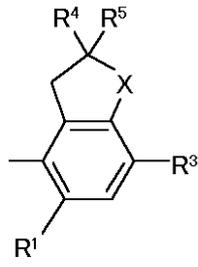
J - G

ここで、Gとしては下記 化3記載のG-1～9で示される基があげられ、Jとしては下記 化4～6記載のJ-1～30で示される基があげられる。

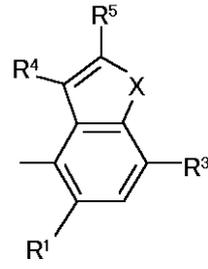
## 【化3】



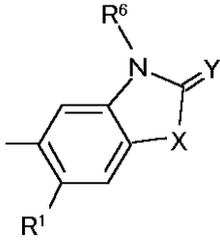
G-1



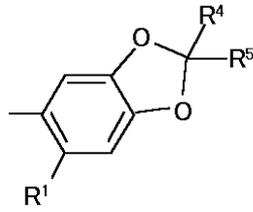
G-2



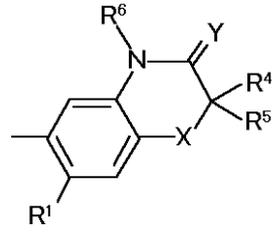
G-3



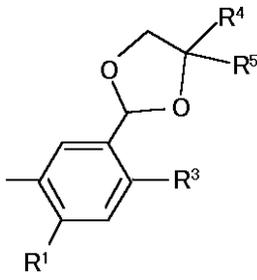
G-4



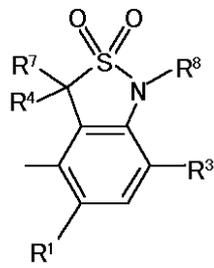
G-5



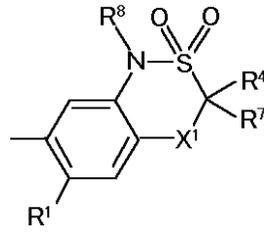
G-6



G-7



G-8



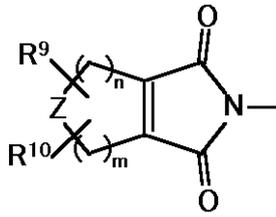
G-9

【化4】

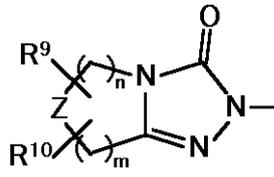
10

20

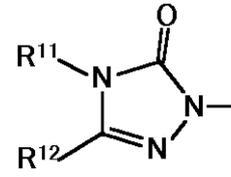
30



J-1

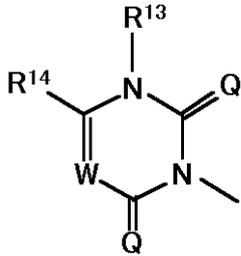


J-2

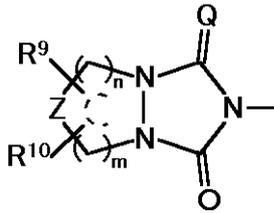


J-3

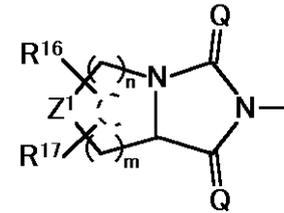
10



J-4

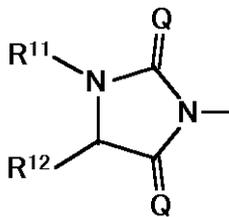


J-5

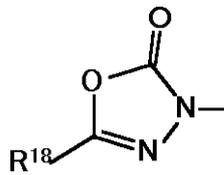


J-6

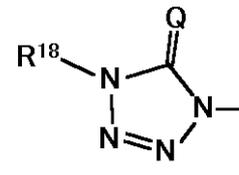
20



J-7

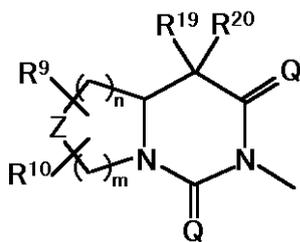


J-8

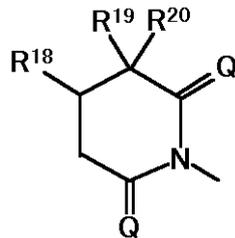


J-9

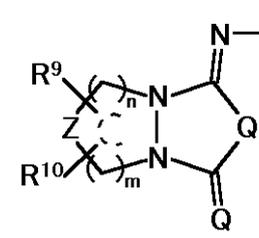
30



J-10



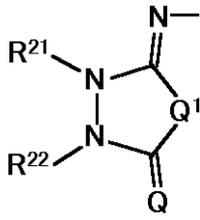
J-11



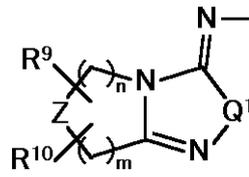
J-12

40

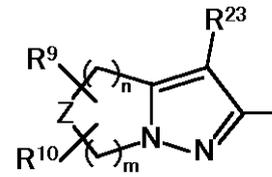
【化5】



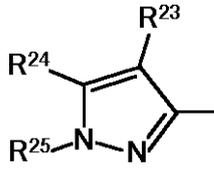
J-13



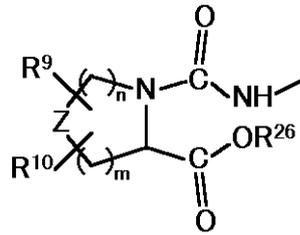
J-14



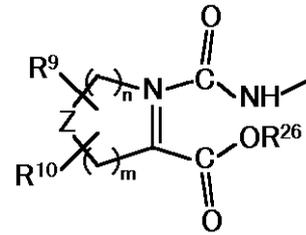
J-15



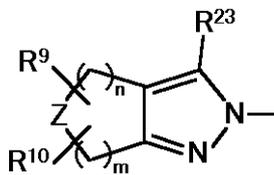
J-16



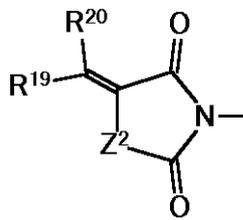
J-17



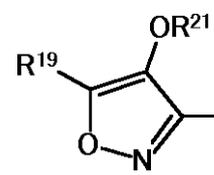
J-18



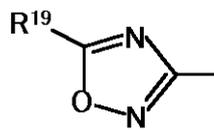
J-19



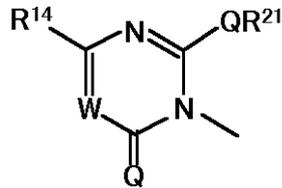
J-20



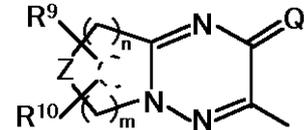
J-21



J-22



J-23



J-24

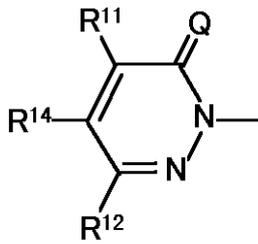
【化 6】

10

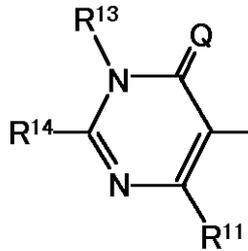
20

30

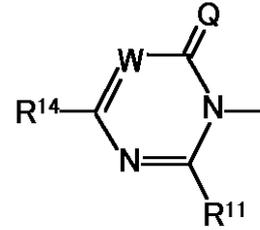
40



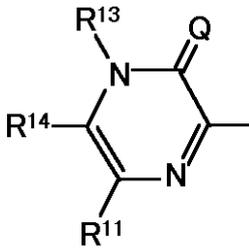
J-25



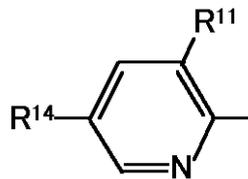
J-26



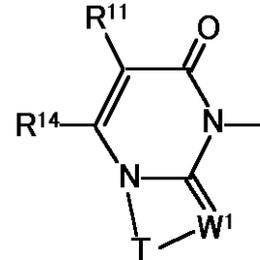
J-27



J-28



J-29



J-30

## 【 0 0 0 9 】

ここで、式 J-5、J-6、J-12 および J-24 における破線は、左側の環が一重結合のみを含むことまたは環内のひとつの結合が炭素原子間の二重結合であることを表し、

X は酸素原子または硫黄原子を表し、

Y は酸素原子または硫黄原子を表し、

R<sup>1</sup> は水素原子またはハロゲン原子を表し、

R<sup>2</sup> は水素原子、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> アルキル基、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> ハロアルキル基、ハロゲン原子、水酸基、-OR<sup>27</sup> 基、-SH 基、-S(O)<sub>p</sub>R<sup>27</sup> 基、-COR<sup>27</sup> 基、-CO<sub>2</sub>R<sup>27</sup> 基、-C(O)SR<sup>27</sup> 基、-C(O)NR<sup>29</sup>R<sup>30</sup> 基、-CHO 基、-CR<sup>27</sup>=NOR<sup>36</sup> 基、-CH=CR<sup>37</sup>CO<sub>2</sub>R<sup>27</sup> 基、-CH<sub>2</sub>CHR<sup>37</sup>CO<sub>2</sub>R<sup>27</sup> 基、-CO<sub>2</sub>N=CR<sup>31</sup>R<sup>32</sup> 基、ニトロ基、シアノ基、-NHSO<sub>2</sub>R<sup>33</sup> 基、-NHSO<sub>2</sub>NHR<sup>33</sup> 基、-NR<sup>27</sup>R<sup>38</sup> 基、-NH<sub>2</sub> 基、または、1つ以上の同種もしくは異種の C1-C4アルキル基で置換されていてもよいフェニル基を表し、

p は 0、1 または 2 を表し、

R<sup>3</sup> は C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> アルキル基、C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> ハロアルキル基、-OCH<sub>3</sub> 基、-SCH<sub>3</sub> 基、-OCHF<sub>2</sub> 基、ハロゲン原子、シアノ基、またはニトロ基を表し、

R<sup>4</sup> は水素原子、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> アルキル基、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> ハロアルキル基、またはハロゲン原子を表し、

R<sup>5</sup> は水素原子、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> アルキル基、ハロゲン原子、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> ハロアルキル基、シクロプロピル基、ビニル基、C<sub>2</sub> アルキニル基、シアノ基、-C(O)R<sup>38</sup> 基、-CO<sub>2</sub>R<sup>38</sup> 基、-C(O)NR<sup>38</sup>R<sup>39</sup> 基、-CR<sup>34</sup>R<sup>35</sup>CN 基、-CR<sup>34</sup>R<sup>35</sup>C(O)R<sup>38</sup> 基、-CR<sup>34</sup>R<sup>35</sup>CO<sub>2</sub>R<sup>38</sup> 基、-CR<sup>34</sup>R<sup>35</sup>C(O)NR<sup>38</sup>R<sup>39</sup> 基、-CHR<sup>34</sup>OH 基、-CHR<sup>34</sup>OC(O)R<sup>38</sup> 基、または -OCHR<sup>34</sup>OC(O)NR<sup>38</sup>R<sup>39</sup> 基を表すか、あるいは、G が G-2 もしくは G-6 の場合に R<sup>4</sup> と R<sup>5</sup> とはこれらが結合している炭素原子とで C=O 基を表していてもよく、

R<sup>6</sup> は C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> アルキル基、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> ハロアルキル基、C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> アルコキシアルキル基、C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> アルケニル基、または C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> アルキニル基を表し、

X<sup>1</sup> は直接結合、酸素原子、硫黄原子、-NH 基、-N(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> アルキル) 基、-N(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> ハロアルキル) 基、または -N(アリル) 基を表し、

R<sup>7</sup> は水素原子、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> アルキル基、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> ハロアルキル基、ハロゲン原子、-S(O)<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C

10

20

40

50

$_6$ アルキル)基、または  $-C(=O)R^{40}$  基を表し、

$R^8$  は水素原子、 $C_1-C_8$  アルキル基、 $C_3-C_8$  シクロアルキル基、 $C_3-C_8$  アルケニル基、 $C_3-C_8$  アルキニル基、 $C_1-C_8$  ハロアルキル基、 $C_2-C_8$  アルコキシアルキル基、 $C_3-C_8$  アルコキシアルコキシアルキル基、 $C_3-C_8$  ハロアルキニル基、 $C_3-C_8$  ハロアルケニル基、 $C_1-C_8$  アルキルスルホニル基、 $C_1-C_8$  ハロアルキルスルホニル基、 $C_3-C_8$  アルコキシカルボニルアルキル基、 $-S(O)_2NH(C_1-C_8$  アルキル)基、 $-C(O)R^{41}$  基、またはフェニル環上で  $R^{42}$  で置換されていてもよいベンジル基を表し、

$n$  および  $m$  はそれぞれ独立して 0、1、2 または 3 であり、かつ  $m+n$  が 2 または 3 を表し、

$Z$  は  $-CR^9R^{10}$  基、酸素原子、硫黄原子、 $-S(O)$  基、 $-S(O)_2$  基、または  $-N(C_1-C_4$  アルキル)基を表し、

10

それぞれの  $R^9$  は独立して水素原子、 $C_1-C_3$  アルキル基、ハロゲン原子、ヒドロキシ基、 $C_1-C_6$  アルコキシ基、 $C_1-C_6$  ハロアルキル基、 $C_1-C_6$  ハロアルコキシ基、 $C_2-C_6$  アルキルカルボニルオキシ基、または  $C_2-C_6$  ハロアルキルカルボニルオキシ基を表し、

それぞれの  $R^{10}$  は独立して水素原子、 $C_1-C_3$  アルキル基、ヒドロキシ基、またはハロゲン原子を表し、

$R^{11}$  および  $R^{12}$  はそれぞれ独立して水素原子、ハロゲン原子、 $C_1-C_6$  アルキル基、 $C_3-C_6$  アルケニル基、または  $C_1-C_6$  ハロアルキル基を表し、

$R^{13}$  は水素原子、 $C_1-C_6$  アルキル基、 $C_1-C_6$  ハロアルキル基、 $C_3-C_6$  アルケニル基、 $C_3-C_6$  ハロアルケニル基、 $C_3-C_6$  アルキニル基、 $C_3-C_6$  ハロアルキニル基、 $HC(=O)$ 基、 $(C_1-C_4$  アルキル) $C(=O)$  基、または  $-NH_2$  基を表し、

20

$R^{14}$  は  $C_1-C_6$  アルキル基、 $C_1-C_6$  アルキルチオ基、 $C_1-C_6$  ハロアルキル基、または  $-N(C_1-C_4$  アルキル) $_2$  基を表し、

$W$  は窒素原子または  $-CR^{15}$  基を表し、

$R^{15}$  は水素原子、 $C_1-C_6$  アルキル基、ハロゲン原子、または、 $C_1-C_6$  アルキル基、1 ないし 2 個のハロゲン原子、 $C_1-C_6$  アルコキシ基もしくは  $-CF_3$  基で置換されていてもよいフェニル基を表し、

それぞれの  $Q$  は独立して酸素原子または硫黄原子を表し、

$Q^1$  は酸素原子または硫黄原子を表し、

$Z^1$  は  $-CR^{16}R^{17}$  基、酸素原子、硫黄原子、 $-S(O)$  基、 $-S(O)_2$  基、または  $-N(C_1-C_4$  アルキル)基を表し、

30

それぞれの  $R^{16}$  は独立して水素原子、ハロゲン原子、ヒドロキシ基、 $C_1-C_6$  アルコキシ基、 $C_1-C_6$  ハロアルキル基、 $C_1-C_6$  ハロアルコキシ基、 $C_2-C_6$  アルキルカルボニルオキシ基、または  $C_2-C_6$  ハロアルキルカルボニルオキシ基を表し、

それぞれの  $R^{17}$  は独立して水素原子、ヒドロキシ基、または ハロゲン原子を表し、

$R^{18}$  は  $C_1-C_6$  アルキル基、ハロゲン原子、または  $C_1-C_6$  ハロアルキル基を表し、

$R^{19}$  および  $R^{20}$  はそれぞれ独立して水素原子、 $C_1-C_6$  アルキル基、または  $C_1-C_6$  ハロアルキル基を表し、

$Z^2$  は酸素原子、硫黄原子、 $-NR^9$  基、または  $-CR^9R^{10}$  基を表し、

$R^{21}$  および  $R^{22}$  はそれぞれ独立して  $C_1-C_6$  アルキル基、 $C_1-C_6$  ハロアルキル基、 $C_3-C_6$  アルケニル基、 $C_3-C_6$  ハロアルケニル基、 $C_3-C_6$  アルキニル基、または  $C_3-C_6$  ハロアルキニル基を表し、

40

$R^{23}$  は水素原子、ハロゲン原子、またはシアノ基を表し、

$R^{24}$  は  $C_1-C_6$  アルキルスルホニル基、 $C_1-C_6$  アルキル基、 $C_1-C_6$  ハロアルキル基、 $C_3-C_6$  アルケニル基、 $C_3-C_6$  アルキニル基、 $C_1-C_6$  アルコキシ基、 $C_1-C_6$  ハロアルコキシ基、またはハロゲン原子を表し、

$R^{25}$  は  $C_1-C_6$  アルキル基、 $C_1-C_6$  ハロアルキル基、 $C_3-C_6$  アルケニル基、または  $C_3-C_6$  アルキニル基を表し、

$R^{26}$  は  $C_1-C_6$  アルキル基、 $C_1-C_6$  ハロアルキル基、または、環上で  $C_1-C_6$  アルキル基、1 ないし 2 個のハロゲン原子、1 ないし 2 個のニトロ基、 $C_1-C_6$  アルコキシ基、および

50



もよく、

$R^{33}$  は  $C_1-C_4$  アルキル基、 $C_1-C_4$  ハロアルキル基、または  $C_3-C_6$  アルケニル基を表し、

$R^{34}$  および  $R^{35}$  は独立して水素原子または  $C_1-C_4$  アルキル基を表し、

$R^{36}$  は水素原子、 $C_1-C_6$  アルキル基、 $C_3-C_6$  アルケニル基、または  $C_3-C_6$  アルキニル基を表し、

$R^{37}$  は水素原子、 $C_1-C_4$  アルキル基、またはハロゲン原子を表し、

$R^{38}$  は水素原子、 $C_1-C_6$  アルキル基、 $C_3-C_6$  シクロアルキル基、 $C_3-C_6$  アルケニル基、 $C_3-C_6$  アルキニル基、 $C_2-C_6$  アルコキシアルキル基、 $C_1-C_6$  ハロアルキル基、環上でハロゲン原子、 $C_1-C_4$  アルキル基および  $C_1-C_4$  アルコキシ基からなるグループの中から選択される少なくともひとつの置換基で置換されていてもよいフェニル基、 $-CH_2CO_2(C_1-C_4$  アルキル)基、または  $-CH(CH_3)CO_2(C_1-C_4$  アルキル)基を表し、

$R^{39}$  は水素原子、 $C_1-C_2$  アルキル基、または  $C(O)O(C_1-C_4$  アルキル)基を表し、 $R^{40}$  は水素原子、 $C_1-C_6$  アルキル基、 $C_1-C_6$  アルコキシ基、または  $NH(C_1-C_6$  アルキル)基を表し

、  
 $R^{41}$  は  $C_1-C_6$  アルキル基、 $C_1-C_6$  ハロアルキル基、 $C_1-C_6$  アルコキシ基、 $NH(C_1-C_6$  アルキル)基、 $R^{42}$  基で置換されていてもよいフェニル基、ベンジル基、または  $C_2-C_8$  ジアルキルアミノ基を表し、

$R^{42}$  は  $C_1-C_6$  アルキル基、1 ないし 2 個のハロゲン原子、 $C_1-C_6$  アルコキシ基、または  $CF_3$  基を表す。

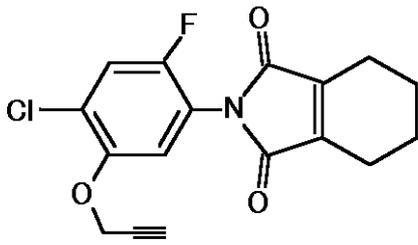
【 0 0 1 0 】

【 化 7 】

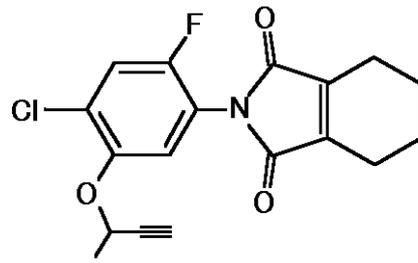
10

20

構造式8

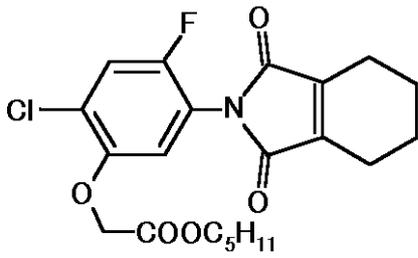


構造式9

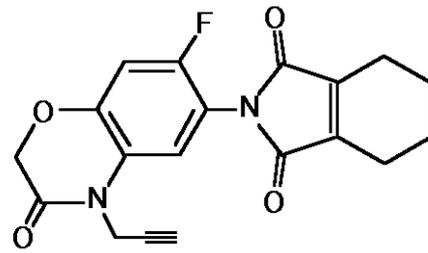


10

構造式10

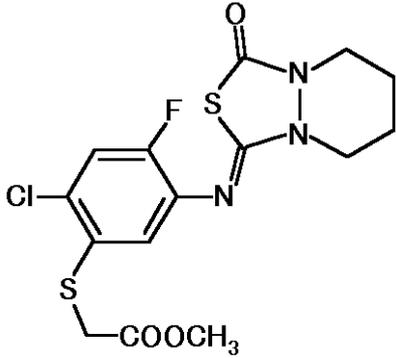


構造式11

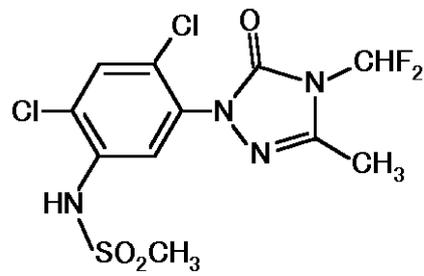


20

構造式12

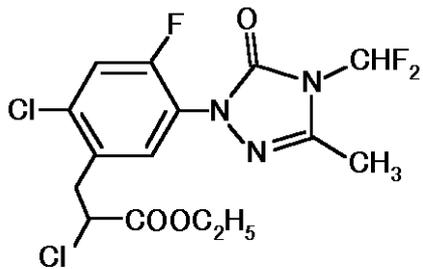


構造式13

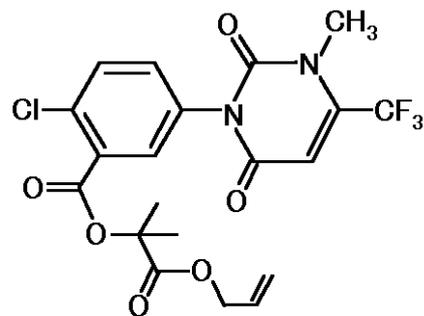


30

構造式14

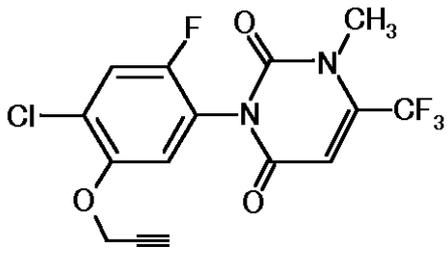


構造式15

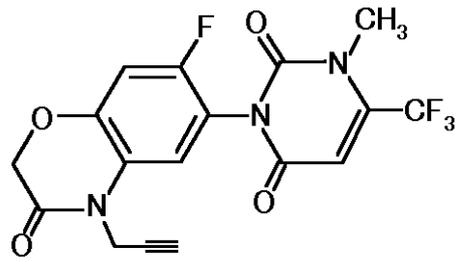


40

構造式16

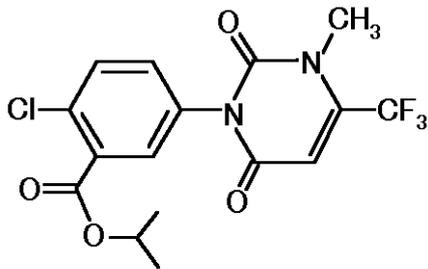


構造式17

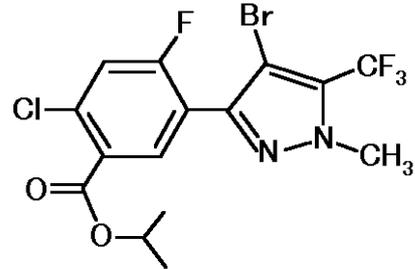


10

構造式18

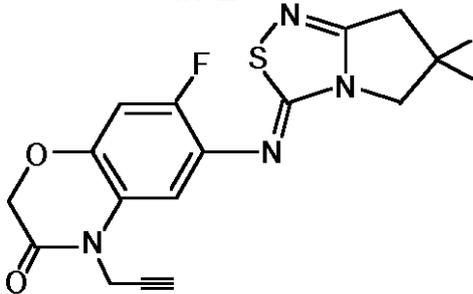


構造式19

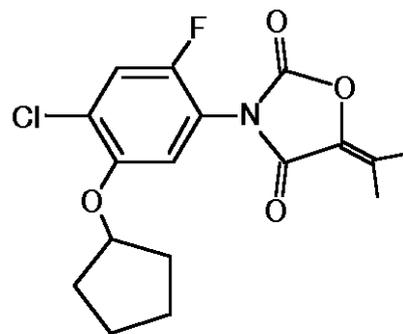


20

構造式20

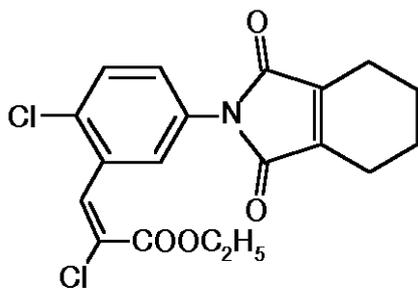


構造式21

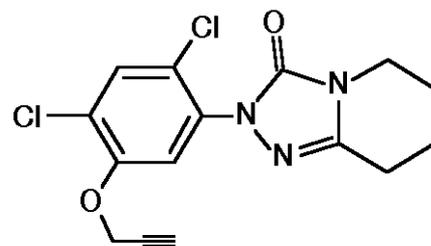


30

構造式22

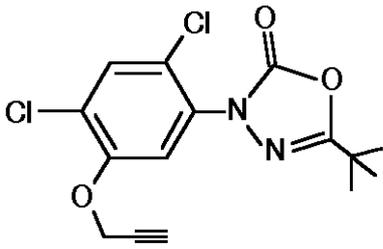


構造式23

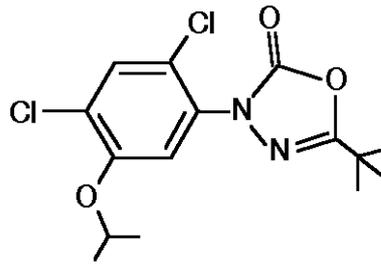


40

構造式24

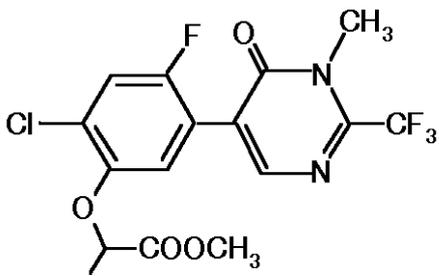


構造式25

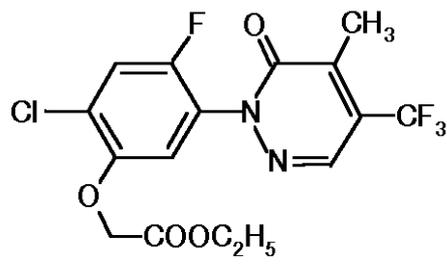


10

構造式26

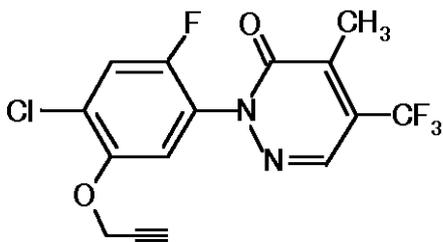


構造式27

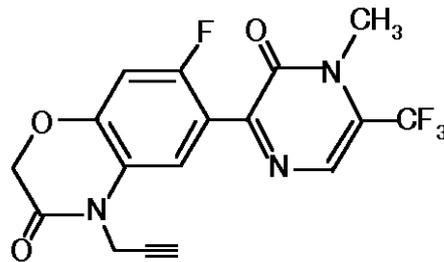


20

構造式28

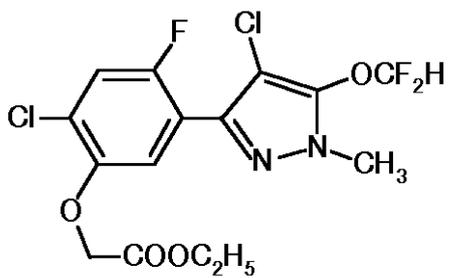


構造式29

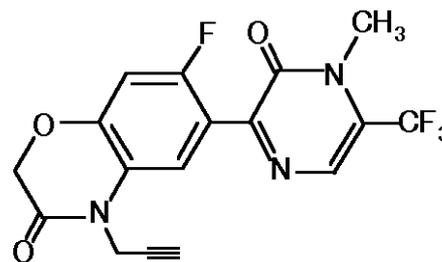


30

構造式30



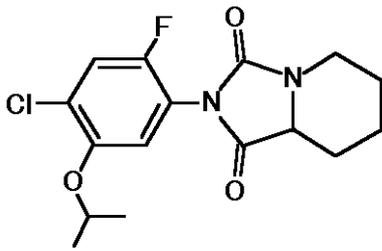
構造式31



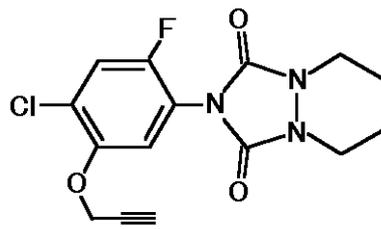
40

【化10】

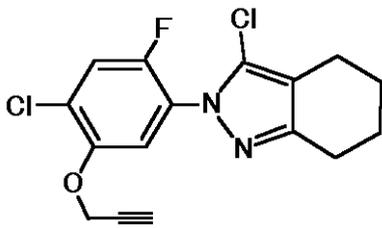
構造式32



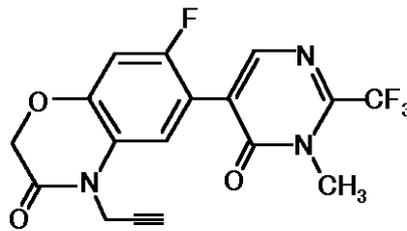
構造式33



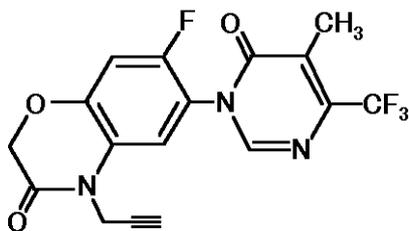
構造式34



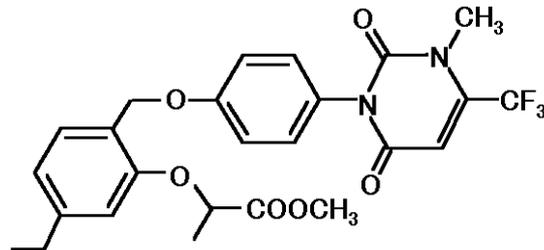
構造式35



構造式36



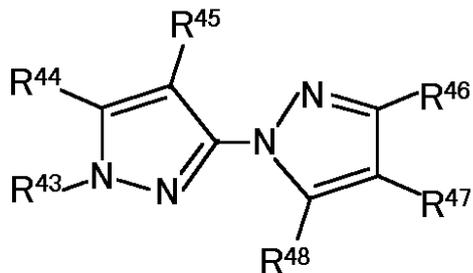
構造式37



## 【0011】

さらに、PPO阻害型除草性化合物として、下記 化11記載の一般式で示される N-置換ピラゾール（国際特許公開 WO 94/08999、WO 93/10100 および Schering に対する米国特許第5405829参照）等があげられる。

## 【化11】



ここで、 $R^{43}$  は  $C_1$ - $C_4$  アルキル基を表し、  
 $R^{44}$  は  $C_1$ - $C_4$  アルキル基、 $C_1$ - $C_4$  アルキルチオ基、 $C_1$ - $C_4$  アルコキシ基、 $C_1$ - $C_4$  ハロアルキル基、 $C_1$ - $C_4$  ハロアルキルチオ基、または  $C_1$ - $C_4$  ハロアルコキシ基を表し、  
 あるいは、  
 $R^{43}$  と  $R^{44}$  とで  $-(CH_2)_3-$  または  $-(CH_2)_4-$  を表していてもよく、  
 $R^{45}$  は水素原子またはハロゲン原子を表し、

10

20

30

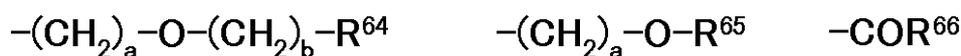
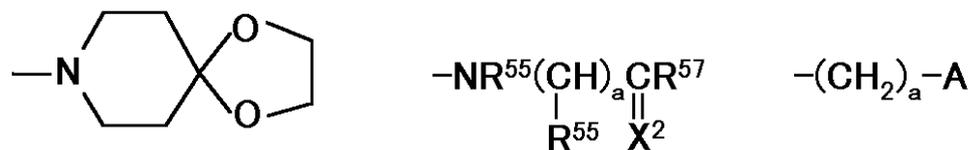
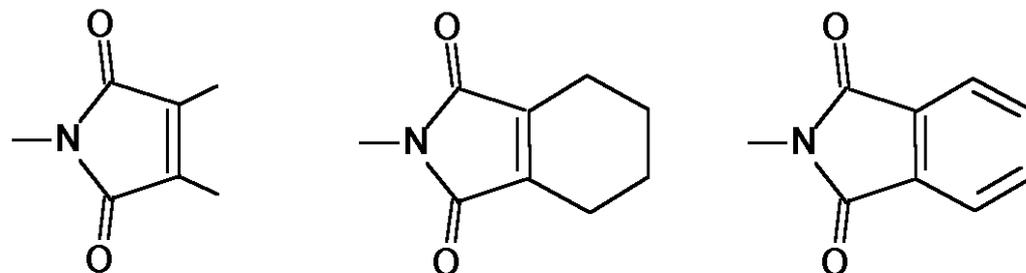
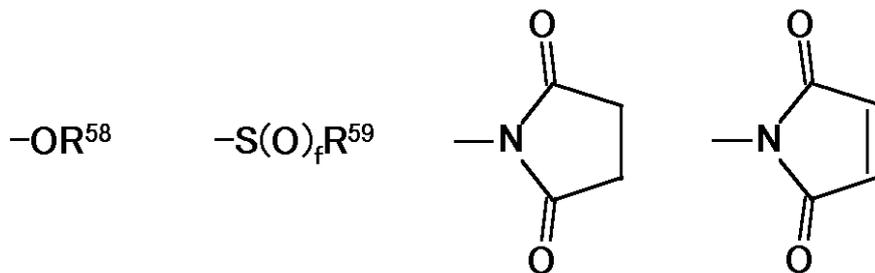
40

50

R<sup>46</sup> は水素原子または C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> アルキル基を表し、

R<sup>47</sup> は水素原子、ニトロ基、シアノ基、-COOR<sup>49</sup> 基、-C(=X)NR<sup>50</sup>R<sup>51</sup> 基、または -C(=X<sup>2</sup>)R<sup>52</sup> 基を表し、

R<sup>48</sup> は水素原子、ハロゲン原子、シアノ基、ハロゲン原子および水酸基からなるグループの中から選択される少なくともひとつの置換基で置換されていてもよい C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> アルキル基、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> アルコキシ基、環上でハロゲン原子、ニトロ基、シアノ基、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> アルキル基、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> アルコキシ基およびハロ-C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> アルキル基からなるグループの中から選択される少なくともひとつの置換基で置換されていてもよいフェニル基、ピローリル基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> アルキル基、C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> アルケニル基、C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> アルキニル基、C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> アルコキシ基、(該C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> アルキル基、該C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> アルケニル基、該C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> アルキニル基および該C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> アルコキシ基には少なくともひとつ以上の酸素原子が挿入されていてもよい)、または以下に示す基を表し、



R<sup>49</sup> R<sup>50</sup> およびR<sup>51</sup> は同じであっても異なってもよく、水素原子または C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> アルキル基を表し、

あるいは、

R<sup>50</sup> とR<sup>51</sup>とはこれらが結合する窒素原子とで5員もしくは6員の飽和した環を形成していてもよい、

R<sup>52</sup> は水素原子、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> アルキル基、または少なくとも1つ以上のハロゲン原子で置換された C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> アルキル基を表し、

R<sup>53</sup> は水素原子、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> アルキル基、C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> アルケニル基、C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> アルキニル基、フェニル基(該C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> アルキル基、該C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> アルケニル基、該C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> アルキニル基、およ

10

20

30

40

50

び該フェニル基はハロゲン原子で置換されていてもよい)、 $C_3-C_8$  シクロアルキル基、シアノメチル基、または  $R^{63}CO$ -基を表し、

$R^{54}$  は水素原子、ハロゲン原子で置換されていてもよい  $C_1-C_6$  アルキル基、ハロゲン原子で置換されていてもよい  $C_2-C_6$  アルケニル基、ハロゲン原子で置換されていてもよい  $C_3-C_6$  アルキニル基、ハロゲン原子で置換されていてもよいフェニル基、 $C_3-C_8$  シクロアルキル基、シアノメチル基、 $C_1-C_4$  アルコキシ  $C_1-C_6$  アルキル基、ジ  $C_1-C_4$  アルキルアミノ  $C_1-C_4$  アルキル基、テトラヒドロフルフリルメチル基、 $C_3-C_6$  アルキニルオキシ  $C_1-C_4$  アルキル基、ベンジル基、環上でハロゲン原子、ニトロ基、シアノ基、 $C_1-C_4$  アルキル基、 $C_1-C_4$  アルコキシ基およびハロ  $C_1-C_4$  アルキル基からなるグループの中から選択される置換基で置換されていてもよいベンジル基、 $-C(=X^2)R^{63}$ 基、 $-(CH_2)_a-(O)_d-R^{70}$ 基、 $-(CH_2)_a-O-(CH_2)_b-R^{70}$ 基、または $-(CH_2)_a-X^2-R^{76}$ 基を表し、

あるいは、

$R^{53}$  と  $R^{54}$ とはこれらが結合している窒素原子とで、3員、5員もしくは6員の飽和した環または5員もしくは6員の芳香環(該飽和した環および該芳香環においては1つの炭素原子が1つの酸素原子で置換されていてもよい)を形成していてもよい、

$R^{55}$  は水素原子、 $C_1-C_4$  アルキル基、 $C_2-C_6$  アルケニル基、または  $C_3-C_6$  アルキニル基を表し、あるいは  $R^{55}$  と  $R^{56}$  とで  $-(CH_2)_e$ -基を形成していてもよい、

$R^{56}$  と  $R^{57}$  はそれぞれ  $C_1-C_4$  アルキル基、 $C_2-C_6$  アルケニル基、 $C_3-C_6$  アルキニル基もしくはフェニル基(該  $C_1-C_4$  アルキル基、該  $C_2-C_6$  アルケニル基、該  $C_3-C_6$  アルキニル基および該フェニル基はハロゲン原子で置換されていてもよい)、水素原子、 $C_3-C_6$  シクロアルキル基、 $-X^2R^{60}$ 基、または  $-NR^{61}R^{62}$ 基を表し、

$R^{58}$  は水素原子、 $C_1-C_6$  アルキル基、 $C_2-C_6$  アルケニル基、 $C_3-C_6$  アルキニル基、 $C_1-C_4$  アルキルカルボニル基、シアノ  $C_1-C_3$  アルキル基、 $C_1-C_4$  アルコキシカルボニル  $C_1-C_4$  アルキル基、ジ  $C_1-C_4$  アルコキシカルボニル  $C_1-C_4$  アルキル基、ベンジル基、 $C_1-C_4$  アルコキシ- $C_1-C_4$  アルキニル基、 $-(CH_2)_a-R^{75}$ 基、 $-(CH_2)_a-X^2-R^{72}$ 基、 $-(CH_2)_a-X^2-(CH_2)_b-R^{72}$ 基、または  $-(CH_2)_a-X^2-(CH_2)_b-X^2-(CH_2)_c-R^{72}$ 基を表し、

$R^{59}$  は水素原子、 $C_1-C_4$  アルキル基、 $C_2-C_6$  アルケニル基、 $C_3-C_6$  アルキニル基、シアノ  $C_1-C_3$  アルキル基、 $C_1-C_4$  アルキルカルボニル  $C_1-C_3$  アルキル基、またはフェニル基を表し、

$R^{60}$  は少なくとも1つのハロゲン原子で置換されていてもよい  $C_1-C_4$  アルキル基を表し、 $R^{61}$  と  $R^{62}$  は同じであっても異なってもよく、水素原子、または  $C_1-C_4$  アルキル基を表し、

$R^{63}$  は少なくとも1つ以上のハロゲン原子で置換されていてもよい  $C_1-C_4$  アルキル基、 $C_1-C_4$  アルコキシ  $C_1-C_4$  アルキル基、 $C_1-C_4$  アルキルチオ  $C_1-C_4$  アルキル基、 $C_3-C_6$  シクロアルキル基、環上でハロゲン原子、ニトロ基、シアノ基、 $C_1-C_4$  アルキル基、 $C_1-C_4$  アルコキシ基およびハロ  $C_1-C_4$  アルキル基からなるグループの中から選択されるひとつの置換基で置換されていてもよいフェニル基、 $-NR^{73}R^{74}$ 基、または  $-(CH_2)_a-(O)_d-R^{75}$ 基を表し、

$R^{64}$  は  $C_1-C_4$  アルコキシカルボニル基、またはカルボキシル基を表し、

$R^{65}$  はクロロメチル基、シアノメチル基、少なくとも1つ以上の酸素原子が挿入されていてもよい  $C_3-C_6$  シクロアルキル基、または  $C_1-C_4$  アルコキシカルボニル  $C_1-C_4$  アルキル基を表し、

$R^{66}$  は水酸基、または  $-NR^{67}R^{68}$ を表し、

A は  $-NR^{67}R^{68}$ 、または  $-S(O)_f-R^{69}$ 基を表し、

$R^{67}$  と  $R^{68}$  は同じであっても異なってもよく、水素原子、または  $C_1-C_4$  アルキル基を表し、

$R^{69}$  は  $C_1-C_4$  アルキル基、または  $C_1-C_4$  ハロアルキル基を表し、

$R^{70}$  は水素原子、水酸基、ハロゲン原子、少なくとも1つ以上の  $C_1-C_4$  アルコキシ基で置換されていてもよい  $C_1-C_4$  アルキル基、少なくとも1つ以上の酸素原子が挿入されていてもよい  $C_3-C_6$  シクロアルキル基、1もしくは2個のメチル基で置換されていてもよい  $C_3-C_6$

10

20

30

40

50

シクロアルキル基、フリル基、チエニル基、または  $-C(=O)R^{71}$  基を表し、  
 $R^{71}$  と  $R^{72}$  は同じであっても異なってもよく、 $C_1-C_4$  アルキル基、または  $C_1-C_4$  アルコキシ基を表し、  
 $R^{73}$  と  $R^{74}$  は同じであっても異なってもよく、 $C_1-C_4$  アルキル基、またはフェニル基を表し、  
 $R^{75}$  は少なくとも1つ以上の酸素原子が挿入されていてもよい  $C_3-C_6$  シクロアルキル基、1または2個のメチル基で置換されていてもよい  $C_3-C_6$  シクロアルキル基、フリル基、チエニル基、または  $-C(=O)R^{71}$  基を表し、  
 $R^{76}$  は  $C_1-C_4$  アルキル基を表し、  
 a、b、およびc はそれぞれ独立して1、2、または3を表し、  
 d は0または1を表し、  
 e は2または3を表し、  
 f は1または2を表し、  
 $X^2$  は酸素原子または硫黄原子を表す。

10

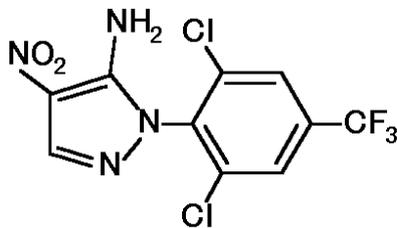
【0012】

その他の N-置換ピラゾールとして、下記 化 1 2 記載の構造式 3 8 で示されるニピラクロフェン{"The Pesticide Manual", 9th ed., C. R. Worthing 編、British Crop Protection Council, Surrey (1991) の 621 頁参照}、および 3-置換-2-アリアル-4,5,6,7-テトラヒドロインダゾール{Lyga et al., Pesticide Sci. 42: p29(1994)}をあげられる。

【化 1 2】

20

### 構造式 38



【0013】

30

PPO 阻害型除草剤が植物に施用された際に植物細胞内で該除草剤の殺草活性発現に関わる植物細胞内因性物質としては、例えば、PPO阻害型除草剤の有効成分が作用する標的酵素の基質または該基質の前駆体もしくは代謝物であって、植物細胞内で蓄積すると細胞の機能傷害を惹起する物質、あるいは、このような物質により植物細胞内で生成する物質であって細胞の機能傷害を惹起する物質等があげられる。より具体的には、PPO 阻害型除草性化合物で植物を処理すると、該植物の細胞内に PPO の基質であるプロトポルフィリノーゲンIXが蓄積し、これが細胞内で代謝されてプロトポルフィリンIXを生じ、さらに、プロトポルフィリンIXと光の存在下に細胞内で活性酸素が生成し、その結果、細胞機能が傷害を受けることが知られており(宮本純之編、1993年、新しい農薬の科学 第3章 3.3節、p106、広川書店 東京)、この系におけるプロトポルフィリノーゲンIX、プロトポルフィリンIXおよび活性酸素をあげることができる。

40

【0014】

一方、グリフォセートとは、N-(ホスホノメチル)グリシンの一般名である。グリフォセートは、一般に、アンモニウム塩、ナトリウム塩、イソプロピルアミン塩、トリメシウム塩、カリウム塩等の各種塩類の形で除草剤の有効成分として利用されている。かかるグリフォセートおよびその塩(以下、一括してグリフォセート化合物という。)はアミノ酸合成を阻害する活性を有し、具体的には、5-エノールピルピルシキミ酸-3-リン酸合成酵素(5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase。以下、EPSPSと記す。)の活性を阻害する。本発明において、グリフォセート耐性とは、上記のようなグリフォセート化合物に対する耐性を意味する。

50

## 【 0 0 1 5 】

本発明植物 1 は、下記(1)および(2)のうちから選ばれる 1 以上の酵素活性を有し、該酵素活性によって、植物の天然のEPSPS活性を阻害する量の除草剤に対して耐性を示す。

(1)植物の天然のEPSPS活性とは実質的に異なるEPSPS活性。

(2)植物の天然のグリフォセートオキシドリダクターゼ(glyphosate oxidoreductase ; 以下、GOXと記す。)活性とは実質的に異なるGOX活性。

本発明において、「植物の天然のEPSPS活性」とは、直接、間接を問わず人為的操作を受けていない状態の植物が天然に有するEPSPS活性を意味する。また、「GOX活性」とは、グリフォセートをアミノメチルフォスフォネート(aminomethyl phosphonate)とグリオキシレート(glyoxylate)とに変換する活性を意味する。そして、「植物の天然のGOX活性」とは、直接、間接を問わず人為的操作を受けていない状態の天然の植物が示すGOX活性を意味する。本発明植物 1 は、上記(1)および(2)のうちから選ばれる 1 以上の酵素活性、即ち、(1)の活性もしくは(2)の活性、または(1)および(2)の活性を有することにより、植物の天然のEPSPS活性を阻害する量の除草剤に対して耐性を示す。ここで、「植物の天然のEPSPS活性を阻害する量の除草剤に対する耐性を示す。」とは、天然のEPSPS活性を阻害することにより通常植物の生育に影響を及ぼし除草剤としての機能を果たしうる量の除草剤によって受ける生育阻害が、天然の同種の植物よりも小さいことを意味し、例えば、前記の量の除草剤によっても生育が実質的に影響されない状態をあげることができる。また、上記(1)および(2)における「実質的に異なる」とは、天然のEPSPS活性を阻害する量の除草剤に対する植物の耐性に何らかの寄与をし得る程度に異なることを意味する。

上記の(1)および(2)のうちから選ばれる 1 以上の酵素活性を植物に付与する方法としては、例えば、天然の野生型EPSPSをコードする遺伝子を植物の細胞において高発現させる方法、野生型EPSPSよりもグリフォセート耐性の高い変異型EPSPSをコードする遺伝子を植物の細胞で発現させる方法、植物のEPSPSよりもグリフォセート耐性の高いバクテリア由来のEPSPSをコードする遺伝子を植物の細胞で発現させる方法、葉緑体移行シグナル配列と連結されてなるEPSPSをコードする遺伝子を植物の細胞で発現させる方法、葉緑体移行シグナル配列と連結されてなるGOXをコードする遺伝子を植物の細胞で発現させる方法、または、EPSPSをコードする遺伝子とGOXをコードする遺伝子とを植物の細胞で発現させる方法等をあげることができる。

より具体的には例えば、EPSPS本来のプロモーターに比して植物体内でのプロモーター活性が強いカリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーター(以下、CaMV35Sと記す。)の下流にペチュニア(Mitchell diploid petunia)のEPSPSをコードする遺伝子が連結されてなるキメラ遺伝子を栽培植物に導入する方法[EP218571]や、アミノ酸置換によってグリフォセート耐性が高められたEPSPSをコードする遺伝子を栽培植物に導入する方法[Hinchee, M.A.W. et al., BIO/TECHNOLOGY, 6: p915 (1988)、EP389066、EP409815、WO9206201、US 5312910など]や、植物のEPSPSよりもグリフォセート耐性が高いアグロバクテリウム(Agrobacterium tumefaciens sp.strain CP4)のEPSPS(class II)をコードする遺伝子が、ペチュニア(Petunia hybrida)のEPSPSの葉緑体移行シグナル配列をコードする塩基配列の下流に連結されてなるキメラ遺伝子を、CaMV35Sの下流に連結して栽培植物に導入する方法[WO 9204449、US5633435など]や、2連のCaMV35S配列の下流に、ヒマワリのリブローズ-1,5-ビスフォスフェートカルボキシダーゼ(以下、ルビスコと記す。)小サブユニットの葉緑体移行シグナル配列をコードする塩基配列、トウモロコシのルビスコ小サブユニットのN末端側22アミノ酸をコードする塩基配列、トウモロコシのルビスコ小サブユニットの葉緑体移行シグナル配列をコードする塩基配列、およびサルモネラ菌(Salmonella typhimurium)のEPSPSをコードする遺伝子が連結されてなるキメラ遺伝子を栽培植物に導入する方法[EP508909]や、シロイヌナズナのルビスコの葉緑体移行シグナル配列をコードする塩基配列に、グリフォセート分解酵素であるGOXをコードする遺伝子が連結されてなるキメラ遺伝子を、アルコールによって発現誘導がかかる真菌類(Aspergillus nidulans)由来のアルコールデヒドロゲナーゼAのプロモーターの下流に連結して栽培植物に導入する方法[WO 9706269]や、アグロバクテリウム(Agrobacterium tumefaciens sp.strain CP4)のEPSPS(

10

20

30

40

50

class II)をコードする遺伝子が、ペチュニア(*Petunia hybrida*)のEPSPSの葉緑体移行シグナル配列をコードする塩基配列の下流に連結されてなるキメラ遺伝子を、タバコモザイクウイルスのオメガ配列によってプロモーター活性が高められたCaMV35Sの下流に連結して、前記GOXとともに栽培植物に導入する方法[W09706269]などをあげることができる。

【0016】

上記(1)および(2)のうちから選ばれる1以上の酵素活性を植物に付与する上述のような方法に使用され得る遺伝子は、いずれも「EPSPS活性を実質的に有するタンパク質」または「GOX活性を実質的に有するタンパク質」をコードする遺伝子である。「EPSPS活性を実質的に有するタンパク質」をコードする遺伝子としては、例えば、ペチュニア *Petunia x hybrida*(Genebank accession M37029)、トマト *Tomato* (strain VF36) *pistil*(Genebank accession M21071)、シロイヌナズナ *Arabidopsis thaliana*(Genebank accession X06613)、ダイズ、トウモロコシ *Zea mays.*(Genebank accession X63374)、大腸菌(Genebank accession X00557)、アグロバクテリウム等由来のEPSPS遺伝子をあげることができる。このような塩基配列既知の遺伝子は、目的の遺伝子を持つ生物のゲノムDNAまたはcDNAを鋳型にして、その遺伝子にコードされるタンパク質のアミノ末端付近に相当する塩基配列およびカルボキシ末端付近に相当する塩基配列をもとに作製したプライマーを用いてPCRを行うことにより増幅しこれを単離することができる。また、上記以外の生物から、EPSPSをコードする遺伝子を取得することもできる。まず、目的とする生物からmRNAを調製し、該mRNAを鋳型として逆転写酵素を用いてcDNAを合成し、これをZAPIIなどのファージベクターまたはpUCなどのプラスミドベクターに組み込んでcDNAライブラリーを作製する。このcDNAライブラリーを鋳型にして、上記のような塩基配列既知の遺伝子間で良好に保存された塩基配列に基づき設計し合成されたプライマーを用いてPCRを行うことにより、EPSPS遺伝子の少なくとも一部を含むDNA断片を増幅することができる。このDNA断片をプローブにしてcDNAライブラリーをスクリーニングし、陽性クローンを選抜する。選抜したクローンの有するDNAの塩基配列を決定することによって、目的とするEPSPSの遺伝子であることを確認することができる。

変異によりグリフォセート耐性が高まったEPSPSをコードする遺伝子を取得するには、例えば、EPSPSをコードする遺伝子に塩基の置換変異を導入し、得られた改変遺伝子を、芳香族アミノ酸を含まないMOPS最小栄養培地で増殖が阻害されるEPSPS遺伝子(*aroA*遺伝子座)欠損突然変異系統大腸菌に導入する。改変遺伝子の導入された該大腸菌を、変異の無いEPSPS遺伝子を導入した前記大腸菌の生育を阻害する程度の濃度のグリフォセート存在下に培養し、生育可能なクローンを選抜することにより、変異によりグリフォセート耐性が高まったEPSPSをコードする遺伝子を得ることができる。さらに、このようにして得られた改変遺伝子を大腸菌等の宿主細胞で発現させて該遺伝子のコードするタンパク質を調製し、得られたタンパク質の5-エノールピルピルシキミ酸-3-リン酸合成能を、例えば、EP409815等に記載の方法に準じて測定することにより、グリフォセート耐性が高く、かつ5-エノールピルピルシキミ酸-3-リン酸合成能の高いタンパク質の遺伝子を選抜することもできる。

【0017】

「GOX活性を実質的に有するタンパク質」をコードする遺伝子としては、例えば、*Pseudomonas sp.* strains LBAA、*Pseudomonas sp.* strains LBr、アグロバクテリウム *Agrobacterium sp.* strain T10等由来の遺伝子をあげることができる。このような塩基配列既知の遺伝子は、目的の遺伝子を持つ生物のゲノムDNAまたはcDNAを鋳型にして、その遺伝子にコードされるタンパク質のアミノ末端付近に相当する塩基配列およびカルボキシ末端付近に相当する塩基配列をもとに作製したプライマーを用いてPCRを行うことにより増幅しこれを単離することができる。また、上記以外の生物から、GOXをコードする遺伝子を取得することもできる。まず、目的とする生物からmRNAを調製し、該mRNAを鋳型として逆転写酵素を用いてcDNAを合成し、これをZAPIIなどのファージベクターまたはpUCなどのプラスミドベクターに組み込んでcDNAライブラリーを作製する。このcDNAライブラリーを鋳型にして、上記のような塩基配列既知の遺伝子間で良好に保存された塩基配列に基づき設計し合

10

20

30

40

50

成されたプライマーを用いてPCRを行うことによって、GOXをコードする遺伝子の少なくとも一部を含むDNA断片を増幅することができる。このDNA断片をプローブにしてcDNAライブラリーをスクリーニングし、陽性クローンを選抜する。選抜したクローンの有するDNAの塩基配列を決定することによって、目的とするGOXの遺伝子であることを確認することができる。

GOXをコードする遺伝子を取得するか、または該遺伝子がコードするGOXのグリフォセート分解能を確認するには、例えば、*Pseudomonas* sp. strains LBAAのコスミドベクターcDNAライブラリーまたはGOXをコードする遺伝子を、りん酸化合物を唯一の窒素源とするMOPS最小栄養培地で増殖することが出来る突然変異系統大腸菌(*E. coli* SR2000 Mpu+)に導入する。遺伝子導入された該大腸菌を、GOXをコードする遺伝子を導入していない前記大腸菌の生育を阻害する程度の濃度のグリフォセートを唯一の窒素源とする条件下に培養して、生育可能なクローンを選抜することにより、GOXをコードする遺伝子を得ることができる。また、このようにして生育可能な大腸菌においては、該大腸菌に導入された遺伝子のコードするタンパク質が、グリフォセートをアミノメチルフォスフェートに分解し、このりん酸化合物を唯一の窒素源として該大腸菌が生育していると考えられる。実際に、該大腸菌を、放射性 $3\text{-}^{14}\text{C}$ で標識したグリフォセートを添加した培地で培養し、培養後の大腸菌および培地の成分をHPLCで解析することにより、放射性 $3\text{-}^{14}\text{C}$ で標識されたグリフォセートが大腸菌に取り込まれ分解されていることを確認することができる。

#### 【 0 0 1 8 】

本発明植物 1 は、また、下記の(1-3)、(1-4)および(1-5)の性質を有するタンパク質をコードする遺伝子が導入されてなり該遺伝子を発現する。

(1-3)本物質に特異的に結合する。

(1-4)当該タンパク質が特異的に結合する物質に対する変性能を実質的に持たない。

(1-5)免疫グロブリンの可変領域のフレームワーク領域を実質的に含まない。

本発明において、タンパク質が物質に「特異的に結合する」とは、例えば、酵素と基質、または、酵素と阻害剤もしくは活性調節因子との間の酵素化学的結合、受容体とリガンドとの間の受容体化学的結合等において示されるような親和性と特異性に基いて、タンパク質が物質に結合することを意味する。

「当該タンパク質が特異的に結合する物質に対する変性能を実質的に持たない」とは、該物質との酵素化学的な反応性が不活性である{但し、上記の性質(1)でいう本物質との特異的結合性を除く}ことを意味し、例えば、該物質を、該物質を示す化学構造式とは異なる化学構造式で示される物質に変換する酵素化学的反応を触媒する能力を実質的に持たない場合をあげることができる。「変性能を実質的に持たない」タンパク質は、例えば、該タンパク質をコードする遺伝子を、当該変性能を有するタンパク質をコードする遺伝子が欠失し通常の条件では生育できなくなった微生物に、発現可能な状態で導入した場合に、該微生物の生育が相補されないことを指標に選択してもよい。

本発明において、「免疫グロブリンの可変領域のフレームワーク領域を実質的に含まない」とは、免疫グロブリンの可変領域に特有の立体構造を形成しないことを意味する。ここで、「免疫グロブリンの可変領域のフレームワーク領域」とは、免疫グロブリン分子を構成するH鎖およびL鎖の可変領域のうち、超可変領域(hypervariable region)を除いた残りの領域であって、アミノ酸配列の保存性が比較的高く、可変領域の高度に保存された立体構造の保持に働く領域である。可変領域が前記の立体構造をとることにより、H鎖およびL鎖のそれぞれ3ヶ所に散在する超可変領域が該立体構造上の1か所にまとまり、抗原結合部位が形成される[Alberts, B., et al. ed. (1983) *Molecular Biology of the Cell* p979, Garland Publishing, Inc. New York]。「免疫グロブリンの可変領域のフレームワーク領域を実質的に含まない」タンパク質は、例えば、該タンパク質のアミノ酸配列に基づいて選び出すことができ、このようなタンパク質として具体的には例えば、免疫グロブリンの可変領域のフレームワーク領域の既知のアミノ酸配列と約60%以上の相同性を示す約30アミノ酸以上からなるアミノ酸配列を含まないタンパク質をあげることができる。また、上記のフレームワーク領域を含むか否かは、例えば、該タンパク質をコードす

る遺伝子を鋳型にして、免疫グロブリンのH鎖もしくはL鎖由来の変領域をコードする塩基配列を有するDNAを増幅可能なプライマー、具体的には例えば、Clackson, T. et al., Nature 352; p624(1991)に記載されるプライマーVH1BACKとVH1FOR-2、もしくは、VK2BACKとVK4FOR、または、組換え抗体遺伝子のクローニングのための市販のキット、例えばRecombinant Phage Antibody System(Pharmacia Biotech社製)に含まれるプライマーHeavy primers mixもしくはLight primer mixなどを用いてPCRを行い、特定の長さのDNAの増幅の有無を分析することによって確認することもできる。

#### 【0019】

本発明植物1においてその遺伝子が発現することにより産生される上記(1-3)、(1-4)および(1-5)の性質を有するタンパク質としては、天然に存在するタンパク質であってもよく、天然のタンパク質にアミノ酸置換、付加、欠失等が導入されてなるタンパク質であってもよく、ランダムなアミノ酸配列を有する人為的に作出されたタンパク質の中から本物質との結合性を指標に選抜されたタンパク質であってもよい。尚、本発明において、「タンパク質」とは、2個以上のアミノ酸がペプチド結合によって結合した物質をいい、例えば、4~100個程度のアミノ酸がペプチド結合によって結合してなる物質も含まれる。上記の性質(1-3)、(1-4)および(1-5)を有するタンパク質の具体例として、下記のようなタンパク質をあげることができる。

プロトポルフィリンIXに特異的に結合するタンパク質として、例えば、マグネシウムケラターゼ(magnesium protoporphyrin IX chelatase)のプロトポルフィリンIX結合サブユニットタンパク質、または該タンパク質の改変タンパク質であってプロトポルフィリンIXに特異的に結合するタンパク質をあげることができ、より具体的には、該サブユニットタンパク質からオルガネラ移行シグナル配列が除去されたタンパク質等があげられる。

また、フェロケラターゼ(protoheme ferrolyase; EC 4.9.9.1)の改変タンパク質であって、プロトポルフィリンIXに対する変性能を持たずプロトポルフィリンIXに特異的に結合するタンパク質をあげることができ、より具体的には、フェロケラターゼにおいて鉄イオンとの結合部位と推定される領域が改変されてなりプロトポルフィリンIXに対する変性能を持たないタンパク質等をあげることができる。

さらに、コバルトケラターゼ(cobaltochelatase)の基質結合サブユニットタンパク質、または該タンパク質の改変タンパク質であってプロトポルフィリンIXに特異的に結合するタンパク質をあげることができる。

プロトポルフィリノーゲンIXに特異的に結合するタンパク質としては、PPOの改変タンパク質であって、プロトポルフィリノーゲンIXを酸化する能力を持たずプロトポルフィリノーゲンIXに特異的に結合するタンパク質をあげることができ、より具体的には、PPOにおいてFAD結合部位と推定される領域(アミノ酸配列GXGXXGを有する領域であって、ここでXは任意のアミノ酸を示す。例えば、シロイヌナズナ葉緑体局在型PPOのアミノ末端から63~68番目のアミノ酸からなり、アミノ酸配列GGGISGを有する領域)が欠失したタンパク質等をあげることができる。

また、プロトポルフィリノーゲンIXに結合するタンパク質としては、コプロポルフィリノーゲンIIIオキシダーゼ(coproporphyrinogen III oxidase; EC 1.3.3.3)の改変タンパク質であって、プロトポルフィリノーゲンIXおよびコプロポルフィリノーゲンIIIを酸化する能力を持たずプロトポルフィリノーゲンIXに特異的に結合するタンパク質をあげることができ、

上記のようなタンパク質が、細胞内で本物質と結合することにより、該物質によって惹起される細胞機能傷害が防がれ、除草剤耐性が発現され得る。かかるタンパク質をコードする遺伝子は、例えば次のようにして得ることができる。

#### 【0020】

マグネシウムケラターゼのプロトポルフィリンIX結合サブユニットタンパク質をコードする遺伝子としては、光合成細菌Rhodobacter capsulatus (Genebank accession M74001)、シロイヌナズナ(Genebank accession Z68495)、オオムギ(Genebank accession U96216)、キンギョソウ(Genebank accession X73144)、Synechocystis P.C.C.6803(Genebank acces

10

20

30

40

50

sion U29131)等由来の遺伝子の塩基配列が知られている。このような塩基配列既知の遺伝子は、目的の遺伝子を持つ生物のゲノムDNAまたはcDNAを鋳型にして、その遺伝子にコードされるタンパク質のアミノ末端付近に相当する塩基配列およびカルボキシ末端付近に相当する塩基配列をもとに作製したプライマーを用いてPCRを行うことにより増幅しこれを単離することができる。また、上記以外の光合成生物から、マグネシウムケラターゼのプロトポルフィリンIX結合サブユニットタンパク質をコードする遺伝子を取得することもできる。まず、目的とする光合成生物からmRNAを調製し、該mRNAを鋳型として逆転写酵素を用いてcDNAを合成し、これをZAPIIなどのファージベクターまたはpUCなどのプラスミドベクターに組み込んでcDNAライブラリーを作製する。このcDNAライブラリーを鋳型にして、上記のような塩基配列既知の遺伝子間で良好に保存された塩基配列に基づき設計し合成されたプライマーを用いてPCRを行うことにより、マグネシウムケラターゼのプロトポルフィリンIX結合サブユニットタンパク質遺伝子の少なくとも一部を含むDNA断片を増幅することができる。このDNA断片をプローブにしてcDNAライブラリーをスクリーニングし、陽性クローンを選抜する。選抜したクローンの有するDNAの塩基配列を決定することによって、目的とするマグネシウムケラターゼのプロトポルフィリンIX結合サブユニットタンパク質の遺伝子であることを確認することができる。

マグネシウムケラターゼのプロトポルフィリンIX結合サブユニットタンパク質の改変タンパク質であってプロトポルフィリンIXに特異的に結合するタンパク質をコードする遺伝子を取得するには、例えば、該サブユニットタンパク質の遺伝子に塩基の置換、欠失、付加等の変異を導入し、該遺伝子をGibson, L.C.D. et al., Proc. Acad. Sci. USA, 92; p19 41(1995)に記載の方法に準じて大腸菌BL21(DE3)株に導入して形質転換株を取得し、導入した遺伝子が高発現する条件で該形質転換株を培養する。培養菌体が赤色化し、プロトポルフィリンIXの蓄積を示す蛍光吸収(励起波長405nm、蛍光波長630nm)が観察される株を選抜することにより、該サブユニットタンパク質の改変タンパク質であってプロトポルフィリンIXに特異的に結合するタンパク質をコードする遺伝子を得ることができる。

#### 【0021】

フェロケラターゼをコードする遺伝子としては、これまでに大腸菌*Escherichia coli* (Genbank accession D90259)、枯草菌*Bacillus subtilis* (Genbank accession M97208)、*Bradyrhizobium japonicum* (Genbank accession M92427)、酵母*Saccharomyces cerevisiae* (Genbank accession J05395)、マウス(Genbank accession J05697)、ヒト(Genbank accession D00726)、オオムギ(Genbank accession D26105)、キュウリ(Genbank accession D26106)等由来の遺伝子の塩基配列が知られている。このような塩基配列既知の遺伝子は、目的の遺伝子を持つ生物のゲノムDNAもしくはcDNAを鋳型にして、その遺伝子にコードされるタンパク質のアミノ末端付近に相当する塩基配列およびカルボキシ末端付近に相当する塩基配列をもとに作製したプライマーを用いてPCRを行うことにより、増幅し単離することができる。また、塩基配列の知られていないフェロケラターゼ遺伝子を取得するには、まず、目的とする生物からmRNAを調製し、該mRNAを鋳型として逆転写酵素を用いてcDNAを合成し、これをZAPIIなどのファージベクターまたはpUCなどのプラスミドベクターに組み込んでcDNAライブラリーを作製する。このcDNAライブラリーを、Miyamoto, K., et al. Plant Physiol., 105; p769 (1994)に記載の大腸菌のフェロケラターゼ欠失変異株VS200に導入し相補試験を行うことにより、該cDNAライブラリーから目的の生物由来のフェロケラターゼ遺伝子を有するクローンを選抜することができる。また、前記cDNAライブラリーを鋳型にして、上記のような塩基配列既知の遺伝子間で良好に保存された塩基配列に基づき作製されたプライマーを用いてPCRを行うことによりDNA断片を増幅し、該DNA断片をプローブにして前記cDNAライブラリーをスクリーニングし、陽性クローンを選抜してもよい。このようにして選抜されたクローンの有するDNAの塩基配列を決定することによって、目的とするフェロケラターゼ遺伝子であることを確認することができる。

フェロケラターゼの改変タンパク質であってプロトポルフィリンIXに対する変性能を持たずプロトポルフィリンIXに特異的に結合するタンパク質、例えば、フェロケラターゼにおいて鉄イオンとの結合部位と推定される領域が改変されてなりプロトポルフィリンIXに対

10

20

30

40

50

する変性能を持たないタンパク質をコードする遺伝子を取得するには、該領域付近のアミノ酸配列をコードする塩基配列に基づき、該領域に変異を導入するためのプライマーを作製し、この変異導入プライマーを用いて、市販の部位特異的変異導入キット(Mutan-Super Express Km、宝酒造製)を用いたPCRを行うことにより、上記領域の変異体をコードする遺伝子を調製することができる。具体的には、野生型のフェロケラターゼ遺伝子をプラスミドベクター-pKF19kのクローニング部位に挿入し、得られたプラスミドのDNAを鋳型に、前述の変異導入プライマーとpKF19kのカナマイシン耐性遺伝子上にあるアンバー変異を復帰させるための選抜プライマーとを用いてPCRを行う。該PCRで増幅された遺伝子を大腸菌MV1184株(サブレッサーフリー)に導入し、遺伝子導入株をカナマイシン耐性で選抜することにより、目的の領域を構成するアミノ酸に相当する塩基配列が改変されたフェロケラターゼ遺伝子を持つ大腸菌を単離することができる。該大腸菌の有するプラスミドDNAの塩基配列を解析することによって、単離した遺伝子が目的とする改変タンパク質をコードする遺伝子であることを確認することができる。

#### 【0022】

PPO遺伝子は、これまでに大腸菌*Escherichia coli* (Genebank accession X68660)、枯草菌*Bacillus subtilis* (Genebank accession M97208)、*Haemophilus influenzae* (Genebank accession L42023)、マウス(Genebank accession D45185)、ヒト(Genebank accession D38537)、シロイヌナズナ(Genebank accession D83139)、タバコ(Genebank accession Y13465, Y13466)等由来の遺伝子の塩基配列が知られている。このような塩基配列既知の遺伝子は、目的の遺伝子を持つ生物のゲノムDNAもしくはcDNAを鋳型にして、その遺伝子にコードされるタンパク質のアミノ末端付近に相当する塩基配列およびカルボキシ末端付近に相当する塩基配列をもとに作製したプライマーを用いてPCRを行うことにより増幅し、これを単離することができる。また、塩基配列の知られていないPPO遺伝子を取得するには、まず、目的の遺伝子を持つ生物から前述の方法でcDNAライブラリーを作製する。このcDNAライブラリーを、Narita, S., et al., *Gene*, 182; p169 (1996)等に記載の大腸菌のPPO欠失変異株VSR800に導入し相補試験を行うことにより、該cDNAライブラリーから目的の生物由来のPPO遺伝子を有するクローンを選抜することができる。また、前記cDNAライブラリーを鋳型にして、上記のような塩基配列既知の遺伝子間で良好に保存された塩基配列に基づき作製されたプライマーを用いてPCRを行うことによりDNA断片を増幅し、該DNA断片をプローブにして前記cDNAライブラリーをスクリーニングし、陽性クローンを選抜してもよい。選抜されたクローンの有する塩基配列を決定することにより、目的とするPPO遺伝子であることを確認することができる。

PPOの改変タンパク質であって、プロトポルフィリノーゲンIXを酸化する能力を持たずプロトポルフィリノーゲンIXに特異的に結合するタンパク質の遺伝子を取得するには、例えば、PPO遺伝子に塩基の置換、欠失、付加等の変異を導入し、該改変遺伝子をPPO阻害型除草剤処理によって光依存的に増殖が阻害される上述の大腸菌に導入する。該大腸菌をヘミン、アミノレブリン酸およびPPO阻害型除草剤存在下に培養して明所でも生育可能なクローンを選抜することにより、プロトポルフィリノーゲンIX結合能を有するタンパク質をコードする遺伝子を選抜することができる。このようにして選抜された改変遺伝子が大腸菌等の宿主細胞で発現させて該遺伝子のコードするタンパク質を調製し、得られたタンパク質のプロトポルフィリノーゲンIXに対する酸化能を、例えば、Jacob, N. J. and Jacobs, J. M. (1982) *Enzyme*, 28, 206-219等に記載の方法に準じて測定することにより、プロトポルフィリノーゲンIXに対する酸化能を持たないタンパク質の遺伝子を選抜することができる。より具体的には、上記改変遺伝子が大腸菌用の発現ベクターに挿入して、Yamamoto, F. et al., *Japanese J. Genet.*, 63; p237 (1988)等に記載されている大腸菌BT3株のような、PPO遺伝子(hemG遺伝子座)欠損突然変異系統大腸菌に導入し、該大腸菌に導入したベクター上の選抜マーカーに対応する細胞生育阻害剤に加えヘミンおよびアミノレブリン酸を含む培地で該大腸菌を培養して形質転換株を取得し、該形質転換株から上記改変遺伝子のコードするタンパク質を調製してもよい。また、該形質転換株をヘミンおよびアミノレブリン酸を実質的に含まない培地で培養し、生育しない株を確認することにより

10

20

30

40

50

、該形質転換株からその宿主細胞のPPO遺伝子欠損を相補しない遺伝子を得ることができ、かかる方法をプロトポルフィリノーゲンIXに対する酸化能を持たないタンパク質をコードする遺伝子の選抜に利用してもよい。

また、PPOにおいてFADとの結合部位と推定される領域(アミノ酸配列GXGXGを有する領域であって、ここでXは任意のアミノ酸を示す。)を欠失したタンパク質をコードする遺伝子を取得するには、まず、該領域付近のアミノ酸配列をコードする塩基配列に基づき、該領域の欠失変異を導入するためのプライマーを作製する。この変異導入プライマーを用いて、前述のように市販の部位特異的変異導入キット(Mutan-Super Express Km、宝酒造製)を用いてPCRを行い該領域の欠失変異体をコードする遺伝子を調製することができる。

### 【0023】

コプロポルフィリノーゲンIIIオキシダーゼをコードする遺伝子としては、これまでに大腸菌*Esherichia coli* (Genebank accession X75413)、*Salmonella typhimurium* (Genebank accession L19503)、酵母*Saccharomyces cerevisiae* (Genebank accession J03873)、マウス(Genebank accession D16333)、ヒト(Genebank accession D16611)、ダイズ(Genebank accession X71083)、オオムギ(Genebank accession X82830)、タバコ(Genebank accession X82831)等由来の遺伝子の塩基配列が知られている。このような塩基配列既知の遺伝子は、目的の遺伝子を持つ生物のゲノムDNAもしくはcDNAを鋳型にして、その遺伝子にコードされるタンパク質のアミノ末端付近に相当する塩基配列およびカルボキシ末端付近に相当する塩基配列をもとに作製したプライマーを用いてPCRを行うことにより、増幅し単離することができる。また、塩基配列の知られていないコプロポルフィリノーゲンIIIオキシダーゼ遺伝子を取得するには、まず、目的とする生物からmRNAを調製し、該mRNAを鋳型として逆転写酵素を用いてcDNAを合成し、これをSikorski, R.S. et al. Genetics, 122; p19 (1989)に記載のpRS313などのプラスミドベクターに組み込んでcDNAライブラリーを作製する。このcDNAライブラリーを、Troup, B. et al. J. Bacteriol., 176; p673 (1994)に記載の酵母コプロポルフィリノーゲンIIIオキシダーゼ欠失変異株HEM13に導入して相補試験を行い、生育可能なクローンを選抜することによって、該cDNAライブラリーから目的の生物由来のコプロポルフィリノーゲンIIIオキシダーゼ遺伝子を有するクローンを選抜することができる。また、前記cDNAライブラリーを鋳型にして、上記のような塩基配列既知の遺伝子間で良好に保存された塩基配列に基づき作製されたプライマーを用いてPCRを行うことによってDNA断片を増幅し、該DNA断片をプローブにして前記cDNAライブラリーをスクリーニングし、陽性クローンを選抜してもよい。このようにして選抜されたクローンの有するDNAの塩基配列を決定することによって、目的とするコプロポルフィリノーゲンIIIオキシダーゼ遺伝子であることを確認することができる。

コプロポルフィリノーゲンIIIオキシダーゼの改変タンパク質であって、プロトポルフィリノーゲンIXおよびコプロポルフィリノーゲンIIIに対する酸化能を持たずプロトポルフィリノーゲンIXに特異的に結合するタンパク質の遺伝子を取得するには、例えば、コプロポルフィリノーゲンIIIオキシダーゼ遺伝子に塩基の置換、欠失、付加等の変異を導入し、該改変遺伝子をPPO阻害型除草剤処理によって光依存的に増殖が阻害される上述の大腸菌に導入する。該大腸菌をヘミン、アミノレブリン酸およびPPO阻害型除草剤存在下に培養して明所でも生育可能なクローンを選抜することにより、プロトポルフィリノーゲンIX結合能を有するタンパク質をコードする遺伝子を選抜することができる。このようにして選抜された改変遺伝子を、例えば、大腸菌等の宿主細胞で発現させて該遺伝子のコードするタンパク質を調製し、得られたタンパク質のプロトポルフィリノーゲンIXに対する酸化能を、例えば、Jacob, N.J. and Jacobs, J.M. (1982) Enzyme, 28, 206-219等に記載の方法に準じて測定することにより、プロトポルフィリノーゲンIXに対する酸化能を持たないタンパク質の遺伝子を選抜することができる。さらに、前記のようにして大腸菌から調製されたタンパク質について、コプロポルフィリノーゲンIIIをプロトポルフィリノーゲンIXに変換する能力(コプロポルフィリノーゲンIIIオキシダーゼ活性)を、例えば、Yoshinaga, T., Sano, S., J. Biol. Chem., 255; p4722 (1980)等に記載の方法に準じて測定することにより、コプロポルフィリノーゲンIIIに対する酸化能を持たないタンパク質の遺伝

10

20

30

40

50

子を選抜することができる。

【0024】

本物質に特異的に結合可能なタンパク質の遺伝子は、例えば、Sugimoto, N., Nakano, S., Chem. Lett., p939(1997)等に記載のように、コンビナトリアルケミストリー法を用いて合成されたペプチドライブラリーから本物質に対して結合性を示すペプチドを選抜し、選抜されたペプチドのアミノ酸配列をペプチドシーケンサーで解析し、該アミノ酸配列をコードする塩基配列を含む遺伝子を設計してこれをDNA合成装置等で合成することによっても、取得することができる。

また、ファージディスプレイ法を用いて、本物質に対して結合性を有するタンパク質を提示するファージクローンをファージライブラリーから選抜し取得することもできる。具体的には、例えば、M13ファージ遺伝子のコートタンパク質pIIIをコードする領域の上流側に、ランダムなアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする塩基配列を挿入することによって、M13ファージ粒子表面にランダムなアミノ酸配列を有するタンパク質が提示されたファージライブラリーを構築する。一方、ビオチン標識化した本物質を、アビジンもしくはストレプトアビジンでコートしたプレートに結合させることにより、本物質でコートされた支持体を作製する。前述のファージライブラリーをこの本物質でコートされたプレート上でスクリーニングすると、本物質に結合性のある目的のタンパク質を提示したファージを単離することができ、単離されたファージから目的のタンパク質の遺伝子を取得することができる。

【0025】

本発明植物1は、例えば、上記ような「EPSPS活性を実質的に有するタンパク質」および「GOX活性を実質的に有するタンパク質」のうちから選ばれる1以上のタンパク質をコードする遺伝子を植物細胞に導入し発現させる工程と、上述の(1-3)、(1-4)および(1-5)の性質を有するタンパク質をコードする遺伝子を植物細胞に導入し発現させる工程とを含む方法により作製することができる。具体的には例えば、「EPSPS活性を実質的に有するタンパク質」をコードする遺伝子および/または「GOX活性を実質的に有するタンパク質」をコードする遺伝子と、(1-3)、(1-4)および(1-5)の性質を有するタンパク質をコードする遺伝子とを同時に植物細胞へ導入し、得られた細胞からこれらの遺伝子を発現する本発明植物1を作出してもよい。「EPSPS活性を実質的に有するタンパク質」をコードする遺伝子および/または「GOX活性を実質的に有するタンパク質」をコードする遺伝子を導入した植物細胞に、(1-3)、(1-4)および(1-5)の性質を有するタンパク質をコードする遺伝子を導入し、得られた細胞からこれらの遺伝子を発現する本発明植物1を作出してもよい。(1-3)、(1-4)および(1-5)の性質を有するタンパク質をコードする遺伝子を導入した植物細胞に、「EPSPS活性を実質的に有するタンパク質」をコードする遺伝子および/または「GOX活性を実質的に有するタンパク質」をコードする遺伝子を導入し、得られた細胞からこれらの遺伝子を発現する本発明植物1を作出してもよい。また、「EPSPS活性を実質的に有するタンパク質」をコードする遺伝子および/または「GOX活性を実質的に有するタンパク質」をコードする遺伝子、ならびに、(1-3)、(1-4)および(1-5)の性質を有するタンパク質をコードする遺伝子を、それぞれ植物細胞に導入して各々の遺伝子を発現する植物を作出し、得られた植物を交配することにより、これらの遺伝子を発現する本発明植物1を作製してもよい。さらに、上述の(1)および(2)のうちから選ばれる1以上の酵素活性を有し、該酵素活性によって、植物の天然の5-エノールピルピルシキミ酸-3-リン酸合成酵素活性を阻害する量の除草剤に対して耐性を示す植物の細胞に、(1-3)、(1-4)および(1-5)の性質を有するタンパク質をコードする遺伝子を導入し、得られた細胞から該遺伝子を発現する本発明植物1を作出してもよく、また、(1-3)、(1-4)および(1-5)の性質を有するタンパク質をコードする遺伝子が導入され該遺伝子を発現する植物細胞に、「EPSPS活性を実質的に有するタンパク質」をコードする遺伝子および/または「GOX活性を実質的に有するタンパク質」をコードする遺伝子を導入し、得られた細胞からこれらの遺伝子を発現する本発明植物1を作出してもよい。尚、いずれの場合も、「EPSPS活性を実質的に有するタンパク質」をコードする遺伝子、「GOX活性を実質的に有するタンパク質」

10

20

30

40

50

」をコードする遺伝子、(1-3)、(1-4)および(1-5)の性質を有するタンパク質をコードする遺伝子のうちの任意の遺伝子について、2種類以上の遺伝子を植物細胞に導入してもよい。

【0026】

本発明植物2は、本発明植物1と同様に上記(1)および(2)のうちから選ばれる1以上の酵素活性を有し、該酵素活性によって、植物の天然のEPSPS活性を阻害する量の除草剤に対して耐性を示す植物であって、かつ、下記の(2-3)、(2-4)および(2-5)の性質を有するタンパク質をコードする遺伝子が導入されてなり該遺伝子を発現する植物である。

(2-3)プロトポルフィリンIXに特異的に結合する。

(2-4)プロトポルフィリノーゲンIXに対する変性能を持たない。

(2-5)免疫グロブリンの可変領域のフレームワーク領域を実質的に含まない。

ここで、「プロトポルフィリンIXに特異的に結合する」とは、前述のごとく、例えば、酵素と基質、または、酵素と阻害剤もしくは活性調節因子との間の酵素化学的結合、受容体とリガンドとの間の受容体化学的結合等において示されるような親和性と特異性に基いて、当該タンパク質がプロトポルフィリンIXに結合することを意味する。

また、「プロトポルフィリノーゲンIXに対する変性能を持たない」とは、プロトポルフィリノーゲンIXとの酵素化学的な反応性が不活性であることを意味し、例えば、プロトポルフィリノーゲンIXを、その化学構造式とは異なる化学構造式で示される物質に変換する酵素化学的反応を触媒する能力を実質的に持たない場合をあげることができる。

「免疫グロブリンの可変領域のフレームワーク領域を実質的に含まない」とは、前述のとおり、免疫グロブリンの可変領域に特有の立体構造を形成しないことを意味する。

本発明植物2において、その遺伝子が発現することにより産生される上記(2-3)、(2-4)および(2-5)の性質を有するタンパク質としては、天然に存在するタンパク質であってもよく、天然のタンパク質にアミノ酸置換、付加、欠失等が導入されてなるタンパク質であってもよく、ランダムなアミノ酸配列を有する人為的に作出されたタンパク質の中から本物質との結合性を指標に選抜されたタンパク質であってもよい。

このようなタンパク質の具体例としては、例えば、マグネシウムケラターゼ、および、マグネシウムケラターゼの改変タンパク質であってプロトポルフィリンIXに特異的に結合しプロトポルフィリノーゲンIXを変性する能力を持たないタンパク質をあげることができる。

また、フェロケラターゼ、および、フェロケラターゼの改変タンパク質であって、プロトポルフィリンIXに特異的に結合しプロトポルフィリノーゲンIXを変性する能力を持たないタンパク質をあげることができる。

【0027】

上記のタンパク質をコードする遺伝子は、例えば、以下のようにして取得することができる。

マグネシウムケラターゼは、プロトポルフィリンIXにマグネシウムイオンを配位しマグネシウムポルフィリンIXを生成する能力を有し、プロトポルフィリンIX結合サブユニットタンパク質、Iサブユニットタンパク質およびDサブユニットタンパク質で構成される。マグネシウムケラターゼを植物で発現させるには、これらの3つのサブユニットタンパク質をコードする遺伝子を取得する。

マグネシウムケラターゼのプロトポルフィリンIX結合サブユニットタンパク質をコードする遺伝子は、前記の方法で取得することができる。

マグネシウムケラターゼのIサブユニットタンパク質をコードする遺伝子として、光合成細菌*Rhodobacter sphaerides* (Genebank accession AF017642)、光合成細菌*Rhodobacter capsulatus* (Genebank accession Z11165)、シロイヌナズナ (Genebank accession D49426)、オオムギ (Genebank accession U26545)、ダイズ (Genebank accession D45857)、タバコ (Genebank accession AF14053)、*Synechocystis P.C.C.6803* (Genebank accession U35144) 等由来の遺伝子が知られている。このような公知の遺伝子(塩基配列が公知)は、目的の遺伝子を持つ生物のゲノムDNAまたはcDNAを鋳型にして、その遺伝子にコードされるタ

10

20

30

40

50

ンパク質のアミノ末端付近に相当する塩基配列およびカルボキシ末端付近に相当する塩基配列をもとに作製したプライマーを用いてPCRを行うことにより増幅しこれを単離することができる。また、上記以外の光合成生物から、マグネシウムケラターゼIサブユニットタンパク質をコードする遺伝子を取得することもできる。まず、目的とする光合成生物からmRNAを調製し、該mRNAを鋳型として逆転写酵素を用いてcDNAを合成し、これをZAPIIなどのファージベクターまたはpUCなどのプラスミドベクターに組み込んでcDNAライブラリーを作製する。このcDNAライブラリーを鋳型にして、上記のような公知の遺伝子との間で良好に保存された塩基配列に基づき設計し合成されたプライマーを用いてPCRを行うことによって、マグネシウムケラターゼのIサブユニットタンパク質の遺伝子の少なくとも一部を含むDNAを増幅することができる。このDNAをプローブにしてcDNAライブラリーをスクリーニングし、陽性クローンを選抜する。選抜したクローンの有するDNAの塩基配列を決定することによって、目的とするマグネシウムケラターゼのIサブユニットタンパク質の遺伝子であることを確認することができる。

また、マグネシウムケラターゼのDサブユニットタンパク質をコードする遺伝子として、光合成細菌*Rhodobacter sphaeroides* (Genebank accession AJ001690)、光合成細菌*Rhodobacter capsulatus* (Genebank accession Z11165)、エンドウ (Genebank accession AF014399)、タバコ (Genebank accession Y10022)、*Synechocystis* P.C.C.6803 (Genebank accession X96599) 等由来の遺伝子が知られている。マグネシウムケラターゼDサブユニットタンパク質をコードする遺伝子は、前記のマグネシウムケラターゼIサブユニットタンパク質をコードする遺伝子を取得する方法と同様の方法で取得することができる。

これらの3つのサブユニットタンパク質からなるマグネシウムケラターゼの活性の検出は、例えば、Gibson, L.C.D. et al., Proc. Acad. Sci. USA, 92; p1941(1995)等に記載の方法に準じて実施することができる。

フェロケラターゼをコードする遺伝子は前述の方法で取得することができる。フェロケラターゼの活性の検出は、例えば、Porra, R.J., Anal. Biochem., 68; p289(1975)等に記載の方法に準じて実施することができる。

#### 【 0 0 2 8 】

本発明植物2は、例えば、上記ような「EPSPS活性を実質的に有するタンパク質」および「GOX活性を実質的に有するタンパク質」のうちから選ばれる1以上のタンパク質をコードする遺伝子を植物細胞に導入し発現させる工程と、上述の(2-3)、(2-4)および(2-5)の性質を有するタンパク質をコードする遺伝子を植物細胞に導入し発現させる工程とを含む方法により作製することができる。具体的には例えば、「EPSPS活性を実質的に有するタンパク質」をコードする遺伝子および/または「GOX活性を実質的に有するタンパク質」をコードする遺伝子と、(2-3)、(2-4)および(2-5)の性質を有するタンパク質をコードする遺伝子とを同時に植物細胞へ導入し、得られた細胞からこれらの遺伝子を発現する本発明植物2を作出してもよい。「EPSPS活性を実質的に有するタンパク質」をコードする遺伝子および/または「GOX活性を実質的に有するタンパク質」をコードする遺伝子を導入した植物細胞に、(2-3)、(2-4)および(2-5)の性質を有するタンパク質をコードする遺伝子を導入し、得られた細胞からこれらの遺伝子を発現する本発明植物2を作出してもよい。(2-3)、(2-4)および(2-5)の性質を有するタンパク質をコードする遺伝子を導入した植物細胞に、「EPSPS活性を実質的に有するタンパク質」をコードする遺伝子および/または「GOX活性を実質的に有するタンパク質」をコードする遺伝子を導入し、得られた細胞からこれらの遺伝子を発現する本発明植物2を作出してもよい。また、「EPSPS活性を実質的に有するタンパク質」をコードする遺伝子および/または「GOX活性を実質的に有するタンパク質」をコードする遺伝子、ならびに、(2-3)、(2-4)および(2-5)の性質を有するタンパク質をコードする遺伝子を、それぞれ植物細胞に導入して各々の遺伝子を発現する植物を作出し、得られた植物を交配することにより、これらの遺伝子を発現する本発明植物2を作製してもよい。さらに、上述の(1)および(2)のうちから選ばれる1以上の酵素活性を有し、該酵素活性によって、植物の天然の5-エノールピルピルシキミ酸-3-リン酸合成酵素活性を阻害する量の除草剤に対して耐性を示す植物の細胞に、(2-3)、(2-4)およ

10

20

30

40

50

び(2-5)の性質を有するタンパク質をコードする遺伝子を導入し、得られた細胞から該遺伝子を発現する本発明植物2を作出してもよく、また、(2-3)、(2-4)および(2-5)の性質を有するタンパク質をコードする遺伝子が導入され該遺伝子を発現する植物細胞に、「EPSPS活性を実質的に有するタンパク質」をコードする遺伝子および/または「GOX活性を実質的に有するタンパク質」をコードする遺伝子を導入し、得られた細胞からこれらの遺伝子を発現する本発明植物2を作出してもよい。尚、いずれの場合も、「EPSPS活性を実質的に有するタンパク質」をコードする遺伝子、「GOX活性を実質的に有するタンパク質」をコードする遺伝子、(2-3)、(2-4)および(2-5)の性質を有するタンパク質をコードする遺伝子のうちの任意の遺伝子について、2種類以上の遺伝子を植物細胞に導入してもよい。

10

## 【0029】

本発明植物3は、本発明植物1と同様に上記(1)および(2)のうちから選ばれる1以上の酵素活性を有し、該酵素活性によって、植物の天然のEPSPS活性を阻害する量の除草剤に対して耐性を示す植物であって、かつ、下記の(3-3)、(3-4)および(3-5)の性質を有するタンパク質をコードする遺伝子が導入されてなり該遺伝子を発現する植物である。

(3-3)プロトポルフィリノーゲンIXに特異的に結合する。

(3-4)コプロポルフィリノーゲンIIIに対する変性能を持つ。

(3-5)免疫グロブリンの可変領域のフレームワーク領域を実質的に含まない。

「プロトポルフィリノーゲンIXに特異的に結合する」とは、前述のごとく、例えば、酵素と基質、または、酵素と阻害剤もしくは活性調節因子との間の酵素化学的結合、受容体とリガンドとの間の受容体化学的結合等において示されるような親和性と特異性に基いて、当該タンパク質がプロトポルフィリノーゲンIXに結合することを意味する。

20

「コプロポルフィリノーゲンIIIに対する変性能を持つ」とは、コプロポルフィリノーゲンIIIに対して酵素化学的な反応性があることを意味し、例えば、コプロポルフィリノーゲンIIIを、その化学構造式とは異なる化学構造式で示される物質に変換する酵素化学的反応を触媒する能力を実質的に持つ場合をあげることができる。具体的には例えば、コプロポルフィリノーゲンIIIをプロトポルフィリノーゲンIXに変換する能力(コプロポルフィリノーゲンIIIオキシダーゼ活性)をあげることができ、該変換能力は、例えば、Yoshinaga, T., Sano, S., J. Biol. Chem., 255; p4722(1980)等に記載の方法に準じて測定することができる。

30

「免疫グロブリンの可変領域のフレームワーク領域を実質的に含まない」とは、前述のとおり、免疫グロブリンの可変領域に特有の立体構造を形成しないことを意味する。

本発明植物3において、その遺伝子が発現することにより産生される上記(3-3)、(3-4)および(3-5)の性質を有するタンパク質としては、天然に存在するタンパク質であってもよく、天然のタンパク質にアミノ酸置換、付加、欠失等が導入されてなるタンパク質であってもよく、ランダムなアミノ酸配列を有する人為的に作出されたタンパク質の中から本物質との結合性を指標に選抜されたタンパク質であってもよい。

このようなタンパク質としては、具体的には、コプロポルフィリノーゲンIIIオキシダーゼ、および、コプロポルフィリノーゲンIIIオキシダーゼの改変タンパク質であってコプロポルフィリノーゲンIIIを酸化してプロトポルフィリノーゲンIXを生成する能力を持つタンパク質などがあげられる。コプロポルフィリノーゲンIIIオキシダーゼをコードする遺伝子は、例えば、前述の方法で取得することができる。

40

## 【0030】

本発明植物3は、例えば、上記のような「EPSPS活性を実質的に有するタンパク質」および「GOX活性を実質的に有するタンパク質」のうちから選ばれる1以上のタンパク質をコードする遺伝子を植物細胞に導入し発現させる工程と、上述の(3-3)、(3-4)および(3-5)の性質を有するタンパク質をコードする遺伝子を植物細胞に導入し発現させる工程とを含む方法により作製することができる。具体的には例えば、「EPSPS活性を実質的に有するタンパク質」をコードする遺伝子および/または「GOX活性を実質的に有するタンパク質」をコードする遺伝子と、(3-3)、(3-4)および(3-5)の性質を有するタンパク質をコードす

50

る遺伝子とを同時に植物細胞へ導入し、得られた細胞からこれらの遺伝子を発現する本発明植物3を作出してもよい。「EPSPS活性を実質的に有するタンパク質」をコードする遺伝子および/または「GOX活性を実質的に有するタンパク質」をコードする遺伝子を導入した植物細胞に、(3-3)、(3-4)および(3-5)の性質を有するタンパク質をコードする遺伝子を導入し、得られた細胞からこれらの遺伝子を発現する本発明植物3を作出してもよい。(3-3)、(3-4)および(3-5)の性質を有するタンパク質をコードする遺伝子を導入した植物細胞に、「EPSPS活性を実質的に有するタンパク質」をコードする遺伝子および/または「GOX活性を実質的に有するタンパク質」をコードする遺伝子を導入し、得られた細胞からこれらの遺伝子を発現する本発明植物3を作出してもよい。また、「EPSPS活性を実質的に有するタンパク質」をコードする遺伝子および/または「GOX活性を実質的に有するタンパク質」をコードする遺伝子、ならびに、(3-3)、(3-4)および(3-5)の性質を有するタンパク質をコードする遺伝子を、それぞれ植物細胞に導入して各々の遺伝子を発現する植物を作出し、得られた植物を交配することにより、これらの遺伝子を発現する本発明植物3を作製してもよい。さらに、上述の(1)および(2)のうちから選ばれる1以上の酵素活性を有し、該酵素活性によって、植物の天然の5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素活性を阻害する量の除草剤に対して耐性を示す植物の細胞に、(3-3)、(3-4)および(3-5)の性質を有するタンパク質をコードする遺伝子を導入し、得られた細胞から該遺伝子を発現する本発明植物3を作出してもよく、また、(3-3)、(3-4)および(3-5)の性質を有するタンパク質をコードする遺伝子が導入され該遺伝子を発現する植物細胞に、「EPSPS活性を実質的に有するタンパク質」をコードする遺伝子および/または「GOX活性を実質的に有するタンパク質」をコードする遺伝子を導入し、得られた細胞からこれらの遺伝子を発現する本発明植物3を作出してもよい。尚、いずれの場合も、「EPSPS活性を実質的に有するタンパク質」をコードする遺伝子、「GOX活性を実質的に有するタンパク質」をコードする遺伝子、(3-3)、(3-4)および(3-5)の性質を有するタンパク質をコードする遺伝子のうちの任意の遺伝子について、2種類以上の遺伝子を植物細胞に導入してもよい。

#### 【0031】

本発明植物1~3を作製するに際し、遺伝子を植物の細胞に導入する方法としては、アグロバクテリウム感染方法(特公平2-58917および特開昭60-70080)、プロトプラストへのエレクトロポレーション方法(特開昭60-251887および特開平5-68575)、またはパーティクルガン方法(特表平5-508316および特開昭63-258525)などの公知の手段を用いることができる。細胞に導入する遺伝子は、細胞生育阻害剤耐性を該細胞に付与し得る遺伝子などの選抜マーカー遺伝子を有するベクターに組み込んでおくことよい。

目的とする遺伝子を植物の細胞で発現させるには、相同組換え[Fraley, R.T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80; p4803 (1983)]によって該遺伝子を植物の染色体に導入し該遺伝子を発現する細胞を選抜してもよいし、該遺伝子をあらかじめ、植物細胞で機能可能なプロモーターおよび植物細胞で機能可能なターミネーターと機能可能な形で結合させて、これを細胞に導入してもよい。ここで、「機能可能な形で」とは、本タンパク質をコードする遺伝子が、導入される植物の細胞において前記プロモーターおよびターミネーターの制御下に発現するように、これらのプロモーターおよびターミネーターと結合された状態にあることを意味する。

植物細胞で機能可能なプロモーターとしては、例えば、ノパリン合成酵素遺伝子プロモーター、オクトピン合成酵素遺伝子プロモーター等のT-DNA由来の構成型プロモーター、カリフラワーモザイクウイルス由来の19Sプロモーターもしくは35Sプロモーター等の植物ウイルス由来のプロモーター、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ遺伝子プロモーター、カルコンシンターゼ遺伝子プロモーター、Pathogenesis-related protein遺伝子プロモーター等の誘導型プロモーターなどを挙げることができる。さらに、これらに限定されない他の植物プロモーターを用いてもよい。

また、植物細胞で機能可能なターミネーターとしては、例えば、ノパリン合成酵素遺伝子ターミネーターなどT-DNA由来のターミネーター、ニンニクウイルスGV1, GV2のターミネー

10

20

30

40

50

ターなどの植物ウィルス由来のターミネーターなどを挙げることができる。さらに、これらに限定されない他の植物ターミネーターを用いてもよい。

【0032】

かかる遺伝子を導入する細胞としては、植物組織、植物個体、培養細胞、種子などを用いることができる。また、かかる遺伝子を導入する植物種としては、例えば、タバコ、ワタ、ナタネ、テンサイ、シロイヌナズナ、カノーラ、アマ、ヒマワリ、バレイショ、アルファルファ、レタス、バナナ、ダイズ、エンドウ、その他のマメ類、マツ、ポプラ、リンゴ、ブドウ、オレンジ、レモン、その他の柑橘類、アーモンド、クルミ、その他のナッツ類等の双子葉植物、トウモロコシ、イネ、コムギ、オオムギ、ライムギ、エンバク、ソルガム、オートムギ、サトウキビ、芝類等の単子葉植物をあげることができる。

10

導入された遺伝子を発現する形質転換植物細胞は、該遺伝子が導入された細胞を、該遺伝子に座上・連結させた選抜マーカー遺伝子に対応する選抜用培地、例えば細胞生育阻害剤を含む培地等で培養し、該培地において増殖可能なクローンを単離することによって取得することができる。また、前記形質転換植物細胞は、遺伝子が導入された細胞を、耐性付与対象の除草剤またはその有効成分を含む培地で培養し増殖可能なクローンを単離することによっても選抜することができる。このようにして得られた形質転換植物細胞から、例えば、植物遺伝子操作マニュアル：トランスジェニック植物の作り方（内宮著、講談社サイエンティフィック1990年）、27-55頁などに記載されている植物細胞培養方法により植物体を再生させることによって、導入された遺伝子を発現する植物を得ることができる。より具体的には、例えば、モデル植物の実験プロトコールイネ・シロイヌナズナ編（島本功、岡田清孝監修、秀潤社1996年）、第4章に記載の方法によって、導入された遺伝子を発現するイネやシロイヌナズナを得ることができる。また、特開平3-291501に記載されている方法で、パーティクルガンを用いて遺伝子をダイズ不定胚に導入し、導入された遺伝子を発現するダイズを得ることができる。同様に、Fromm, M.E., et al. Bio/Technology, 8; p838 (1990)に記載されている方法に準じて、パーティクルガンを用いて遺伝子をトウモロコシ不定胚に導入し、導入された遺伝子を発現するトウモロコシを得ることができ、宅見ら著、育種学会雑誌、1995年、第44巻、別冊1号、57頁に記載されている通常の方法に準じて、パーティクルガンを用いて無菌培養したコムギ未熟胚盤に遺伝子を導入し、導入された遺伝子を発現するコムギを得ることができる。同様に、萩尾ら著、育種学会雑誌、1995年、第44巻、別冊1号、67頁に記載されている通常の方法に準じて、パーティクルガンを用いて無菌培養したオオムギ未熟胚盤に遺伝子を導入し、導入された遺伝子を発現するオオムギを得ることができる。

20

30

【0033】

導入された遺伝子を発現する植物の除草剤耐性を確認するには、例えば、該植物の栽培域に評価の対象とする除草剤を散布し、該植物の生育度を測定するとよい。より定量的に確認するには、例えば、PPO阻害型除草剤に対する耐性を確認する場合には、該植物の葉片を様々な濃度のPPO阻害型除草剤を含む水溶液中に浸すか、または、該植物の葉片に除草剤水溶液を噴霧し寒天培地上で明所室温で放置し、数日後、該葉片からMackney, G., J. Bol. Chem., 140; p315(1941)に記載の方法に準じてクロロフィルを抽出してクロロフィル含量を測定するとよい。

40

【0034】

本発明植物1～3は、グリフォセート化合物およびPPO阻害型除草性化合物の両方に対して耐性を示すため、これらの化合物を有効成分として含む除草剤が散布された場合にも良好に生育することができる。従って、本発明の方法によって目的の栽培植物にグリフォセート化合物に対する耐性およびPPO阻害型除草性化合物に対する耐性を付与し、該植物を栽培してその栽培域に前記のグリフォセート化合物およびPPO阻害型除草性化合物を有効成分として含む除草剤を散布することにより、効率よく雑草を取り除くことができ、雑草防除作業の省力化、該栽培植物の収量の向上、高品質化などが可能となる。

【0035】

【実施例】

50

以下、実施例および参考例により本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

#### 参考例1 グリフォセート耐性遺伝子の単離

グリフォセート耐性ダイズ(*Glycine max*)を播種後、27℃で30日間栽培し、発芽個体の第一葉を採取した。採取した緑葉を液体窒素で凍結させ、これを乳鉢と乳棒で磨砕し、該磨砕物から、ゲノムDNA抽出試薬ISOPLANT(ニッポンジーン社製)を用いて付属のマニュアルに従ってゲノムDNAを抽出した。得られたゲノムDNAを鋳型にして、配列番号1で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドおよび配列番号2で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドをプライマーに使うPCRを行い、ペチュニア(*Petunia hybrida*)のEPSPSの葉緑体トランジットベプチド(以下、CTPと記す。)配列をコードする塩基配列とアグロバクテリウム(*Agrobacterium sp. Strain CP4*)のEPSPS遺伝子とを含むDNA断片(以下、本CTP-CP4 EPSPS遺伝子と記す。)を増幅した。なお、該オリゴヌクレオチドはDNA合成装置(PEアプライドバイオシステムズ社: Model 394 DNA/RNA Synthesizer)を用いて合成し、オリゴヌクレオチド精製用カートリッジ(PEアプライドバイオシステムズ社: OPCカートリッジ)で精製した。また、PCRは、94℃にて5分間次いで55℃にて2分間さらに72℃にて3分間の保温を1回行った後、94℃にて1分間次いで55℃にて2分間さらに72℃にて3分間の保温1サイクルとしてこれを38回実施し、最後に94℃にて1分間次いで55℃にて2分間さらに72℃にて10分間の保温を1回行った。増幅されたDNA断片をプラスミドpCR2.1(Invitrogen社製)のPCR産物クローニング部位に連結することにより、プラスミドpCREPS(図1)を得た。次いで、該プラスミドを大腸菌JM109株のコンピテントセル(宝酒造社製)に導入し、アンピシリン耐性株を選抜した。さらに、選抜されたアンピシリン耐性株に含まれるプラスミドの塩基配列をThermo Sequence II Dye Terminator kit(アマシャムファルマシアバイオテク社製)およびDNAシーケンサー373S(PEアプライドバイオシステムズ社製)を用いて決定した。その結果、配列番号3で示される塩基配列が明らかとなり、プラスミドpCREPSは本CTP-CP4 EPSPS遺伝子を含むことが確認された。

#### 【0036】

参考例2 タバコマグネシウムケラターゼのプロトポルフィリンIX結合サブユニットの改変タンパク質をコードする遺伝子の取得

タバコ(*Nicotiana tabacum cv. SR1*)の葉部組織から、RNeasy Plant Kit(QIAGEN社製)を用いて付属のマニュアルにしたがって操作を行ない、全RNAを調製した。さらに、RNA LA PCR Kit (AMV) Ver 1.1(宝酒造社製)を用いて付属のマニュアルに従って操作を行ない、葉緑体移行シグナルを欠失したタバコマグネシウムケラターゼのプロトポルフィリンIX結合サブユニットタンパク質(以下、本改変タバコケラターゼサブユニットと記す。)をコードする遺伝子を含むDNA断片を取得した。まず、プライマーとして前記キットに含まれるOligo dT-Adaptor Primerを用い、タバコ全RNAを鋳型として使用し、前記キットに含まれる逆転写酵素を添加して1st strand cDNAを合成した。続いて、該1st strand cDNAを鋳型として、前記キットに含まれるLA Taq polymeraseを用いてPCRを行い、本改変タバコケラターゼサブユニットをコードする遺伝子を含むDNA断片を増幅した。ここでPCRのプライマーとしては、配列番号4で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドプライマー、および配列番号5で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドプライマーを用いた。該オリゴヌクレオチドはDNA合成装置(PEアプライドバイオシステムズ社: Model 394 DNA/RNA Synthesizer)を用いて合成し、オリゴヌクレオチド精製用カートリッジ(PEアプライドバイオシステムズ社: OPCカートリッジ)で精製した。また、PCRは、94℃にて2分間の保温を1回行い、続いて、94℃にて30秒間次いで50℃にて30秒間さらに72℃にて7分間の保温を1サイクルとしてこれを30サイクル実施した。前記PCR反応で増幅されたDNA断片についてTA Cloning Kit(Invitrogen社製)を用いて付属のマニュアルに従って操作を行ない、該DNA断片をpCR2.1プラスミドのPCR産物クローニング部位にクローニングした。得られたプラスミドのDNAを制限酵素KpnIで消化した後、アガロースゲル電気泳動で分析し、8.0kbのDNA断片が検出されたプラスミドをpTCHLHと名付けた。該プラスミドは、本改変タバコケラターゼサブユニットをコードする遺伝子がlacプロモ

ーターの制御下でセンスの方向に発現可能な形で挿入された構造を有する。さらに、このプラスミドpTCHLHを制限酵素KpnIで消化した後、自己環化させ、約60塩基からなるDNA断片がプラスミドpTCHLHから除去された構造を有するプラスミドpTCHLH1(図2)を得た。

【0037】

参考例3 本CTP-CP4 EPSPS遺伝子のタバコへの導入

本CTP-CP4 EPSPS遺伝子をアグロバクテリウム法で植物へ導入するためのプラスミドを構築した。まず、pNG01[Shiota et al.(1994)Plant Physiol 106:17-23](図3)を制限酵素HindIIIで消化した後、DNA Polymerase Iを用いて2本鎖DNAのギャップにヌクレオチドを付加してDNAの末端を平滑化した後、T4 DNA ligaseを用いて自己環化させてpNG04(図4)を得た。pNG04をXbaIで消化し、ノパリン合成酵素遺伝子のターミネーターとその下流に位置するカリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーターとを含むDNA断片を得て、これをプラスミドpUC19(宝酒造社製)のXbaI切断部位に挿入することでpNT35S(図5)を得た。次に参考例1において調製されたプラスミドpCRESPSをHindIIIとSalIで消化して、得られた本CTP-CP4 EPSPS遺伝子を含むDNA断片をpNT35SのHindIII切断部位とSalI切断部位との間に挿入することにより、プラスミドpCENS(図6)を得た。このプラスミドpCENSを制限酵素HindIIIで消化した後、DNA Polymerase Iを用いて2本鎖DNAのギャップにヌクレオチドを付加しDNA末端を平滑化し、仔牛小腸由来のAlkaline phosphataseで処理して該DNAの5'末端を脱りん酸化し、りん酸化KpnIリンカー(宝酒造製4668A)を挿入して環化させ、プラスミドpCENSK(図7)を得た。一方、バイナリーベクターpBI121(Clontech社製)を制限酵素SmaIで消化し、そこへKpnIリンカー(宝酒造製)を挿入することにより、pBI121のSmaI認識部位が除去されKpnI認識部位が付加されたプラスミドpBI121Kを作製した。該プラスミドpBI121KのDNAを制限酵素SacIで消化した後、DNA polymerase Iを用いて2本鎖DNAの3'突出末端を消化して該DNAの末端を平滑化した。次に仔牛小腸由来のAlkaline phosphataseで該DNAの5'末端を脱りん酸化し、りん酸化SalIリンカー(宝酒造製4680P)を挿入して環化させ、プラスミドpBI121KSを構築した。該バイナリーベクターpBI121KSを制限酵素KpnIとSalIとで消化することにより -glucuronidase遺伝子を除去し、これに換えて前記のプラスミドpCENSKを制限酵素KpnIとSalIで消化して得られる本CTP-CP4 EPSPS遺伝子を含むDNA断片を挿入し、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターの下流に本CTP-CP4 EPSPS遺伝子が結合されてなるプラスミドpBICE(図8)を作製した。また、バイナリーベクターpBI121(Clontech社製)を制限酵素BamHIとSacIで消化することにより -glucuronidase遺伝子を除去し、得られたDNA断片の末端をT4 DNA polymeraseを用いて平滑化した後、T4 DNA ligaseを用いて自己環化させプラスミドpNO(図9)を構築した。該プラスミドは本CTP-CP4 EPSPS遺伝子発現プラスミドpBICEのベクターコントロールとして用いた。該プラスミドpBICEおよびpNOをそれぞれ、Agrobacterium tumefaciens LBA4404(Clontech社製)に導入し、これを300 µg/mlストレプトマイシン、100 µg/mlリファンピシン、25 µg/mlカナマイシンを含むLB培地(0.5% Yeast extract, 1.0% Bacto tryptone, 0.5% NaCl)で培養して形質転換体を選抜することによって、pBICEを持つアグロバクテリウム株およびpNOを持つアグロバクテリウム株を単離した。

次いで、植物遺伝子操作マニュアル(内宮博文著、講談社サイエンティフィック、1992年)に記載されている方法に準じて、タバコへの遺伝子導入を行った。プラスミドpBICEを持つアグロバクテリウム株をLB培地(0.5% Yeast extract, 1.0% Bacto tryptone, 0.5% NaCl)中で28 にて終夜培養し、該培養液に無菌培養したタバコ(Nicotiana tabacum cv. SR1)の葉片を浸漬した。該タバコ葉片を、Murashige-Skoog培地[Murashige T. and Skoog F., Physiol. Plant. (1962) 15, p473に記載。以下、MS培地と記す。]に0.8%寒天、0.1mg/lナフタレン酢酸および1.0mg/lベンジルアミノプリンを添加した培地上で室温にて2日間培養した。次に、該タバコ葉片を滅菌水で洗浄した後、0.8%寒天、0.1mg/lナフタレン酢酸、1.0mg/lベンジルアミノプリン、および、500 µg/mlセフォタキシムを添加したMS培地上で7日間培養した。次いで、該タバコ葉片を0.8%寒天、0.1mg/lナフタレン酢酸、1.0mg/lベンジルアミノプリン、500 µg/mlセフォタキシム、および、100 µg/mlカナマイシンを添加したMS培地(以下、選抜用MS培地と記す。)上に移植し培養した。該培養は、前記タバ

10

20

30

40

50

コ葉片を1ヶ月後毎に新鮮な選抜用MS培地に移植しながら継続的に4ヶ月間実施した。この間に、該タバコ葉片から出現した茎葉分化したシュートを、0.8%寒天、300 µg/mlセフトキシム、および、50 µg/mlカナマイシンを添加したMS培地に移植して発根させ再生個体を得た。該再生個体を0.8%寒天、および、50 µg/mlカナマイシンを添加したMS培地に移植して培養し、本CTP-CP4 EPSPS遺伝子が導入されたタバコ個体を取得した。また、同様にして、pN0を持つアグロバクテリウム株をタバコの葉片に感染させ、該タバコ葉片から再生個体を得て、タバコ個体（以下、コントロール組換えタバコと記す。）を取得した。

#### 【0038】

実施例1 本CTP-CP4 EPSPS遺伝子および本改変タバコケラターゼサブユニットをコードする遺伝子のタバコへの導入

本CTP-CP4 EPSPS遺伝子および本改変タバコケラターゼサブユニットをコードする遺伝子をアグロバクテリウム法で植物へ導入するためのプラスミドを構築した。まず、参考例2で作製されたプラスミドpTCHLH1を制限酵素KpnIとSalIとで消化することにより、本改変タバコケラターゼサブユニットをコードする遺伝子を含むDNA断片を調製した。一方、参考例3で作製されたバイナリーベクター-pBI121KSを制限酵素KpnIとSalIとで消化することにより -glucuronidase遺伝子を除去し、これに替えて、前記の本改変タバコケラターゼサブユニットをコードする遺伝子を含むDNA断片を挿入し、該遺伝子が35Sプロモーターの下流に結合されてなるプラスミドpBITCHLH（図10）を作製した。次に、参考例3において調製されたプラスミドpCENSKを制限酵素KpnIで消化し、本CTP-CP4 EPSPS遺伝子と、該遺伝子の下流に位置するノパリン合成酵素をコードする遺伝子のターミネーターと、さらにその下流に位置するカリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーターとを含むDNA断片を得て、これを前記のプラスミドpBITCHLHのKpnI切断部位に挿入することで、本CTP-CP4 EPSPS遺伝子および本改変タバコケラターゼサブユニットをコードする遺伝子がそれぞれカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターの下流に結合されてなるプラスミドpBICETCH（図11）を作製した。

該プラスミドpBICETCHを、*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404に導入し、これを300 µg/mlストレプトマイシン、100 µg/mlリファンピシン、25 µg/mlカナマイシンを含むLB培地で培養して形質転換体を選抜することによって、pBICETCHを持つアグロバクテリウム株を単離した。

該アグロバクテリウム株を無菌培養したタバコの葉片に感染させ、参考例3記載の方法と同様の操作で、本CTP-CP4 EPSPS遺伝子および本改変タバコケラターゼサブユニットをコードする遺伝子が導入されたタバコを取得した。

#### 【0039】

試験例1 本CTP-CP4 EPSPS遺伝子が導入されたタバコ、ならびに本CTP-CP4 EPSPS遺伝子および本改変タバコケラターゼサブユニットをコードする遺伝子が導入されたタバコの除草剤耐性試験

参考例3で得られた本CTP-CP4 EPSPS遺伝子が導入されたタバコ2個体（個体名；CE-1、CE-2）の葉およびコントロール組換えタバコの葉、ならびに実施例1で得られた本CTP-CP4 EPSPS遺伝子と本改変タバコケラターゼサブユニットをコードする遺伝子とが導入されたタバコ2個体（個体名；CETCH-1、CETCH-2）の葉を採取して、これらをそれぞれ主葉脈に沿って左右均等に2分割し、一方の葉片に前記構造式8で示されるPPO阻害型除草性化合物を0.3ppmの濃度で含む水溶液を全面に塗布した。尚、他方の葉片には前記の除草性化合物の塗布を行なわなかった。これらの葉片を、0.8%寒天を含むMS培地上に置き、明所、室温にて7日間放置した。次いで、各葉片を、それぞれ乳鉢と乳棒とを用いて5mlの80%アセトン水溶液中で磨砕してクロロフィルを抽出した。抽出液を80%アセトン水溶液で10倍に希釈した後、750nm、663nm、645nmにおける吸光度を測定し、Macknney G., J. Biol. Chem. (1941) 140, p315記載の方法によって総クロロフィル含量を算出した。結果を表1に示す。表中、PPO阻害型除草性化合物に対する耐性度は、PPO阻害型除草性化合物処理した葉片の総クロロフィル含量の、未処理の葉片の総クロロフィル含量に対する百分率で表した。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 4 0 】

【表 1】

タバコ個体	総クロロフィル含量 (mg/g-新鮮重量)		PPO阻害型除草性化合物に対する 耐性度(%)
	未処理葉	処理葉	
コントロール	1.74	0.35	20.1
CE-1	1.76	0.46	26.1
CE-2	2.09	0.43	20.6
CETCH-1	2.26	1.94	85.8
CETCH-2	1.91	1.73	90.6

10

また、本CTP-CP4 EPSPS遺伝子が導入されたタバコ2個体（個体名；CE-1、CE-2）、本CTP-CP4 EPSPS遺伝子と本改変タバコケラターゼサブユニットをコードする遺伝子とが導入されたタバコ2個体（個体名；CETCH-1、CETCH-2）、およびコントロール組換えタバコを、グリホサート（イソプロピルアンモニウム N-（ホスホノメチル）グリシナート）を100ppmの濃度で含む水溶液で同様に処理し、当該グリフォセート化合物に対する耐性度を測定した。結果を表2に示す。表中、グリフォセート化合物に対する耐性度は、グリフォセート化合物で処理した葉片の総クロロフィル含量の、未処理の葉片の総クロロフィル含量に対する百分率で表した。

20

## 【 0 0 4 1 】

【表 2】

タバコ個体	総クロロフィル含量 (mg/g-新鮮重量)		グリフォセート 化合物に対する 耐性度(%)
	未処理葉	処理葉	
コントロール	2.79	1.63	58.4
CE-1	1.17	1.13	96.6
CE-2	1.54	1.38	89.6
CETCH-1	1.57	1.44	91.7
CETCH-2	2.99	2.85	95.3

30

## 【 0 0 4 2 】

参考例 4 hemG遺伝子欠失大腸菌におけるダイズ由来 PPO 遺伝子の発現  
ダイズ(Glycine max var. Williams82)を播種後、25℃で20日間栽培し、緑葉を採取した。採取した緑葉5gを液体窒素で凍結させ、これを乳鉢と乳棒で磨砕し、該磨砕物から、RNA抽出試薬 ISOGEN(ニッポンジーン社製)を用いて付属のマニュアルにしたがってRNAを抽出した。得られたRNA抽出液からエタノール沈殿で全RNAを回収し、これをpoly(A)RNA分画キットBIOMAG mRNA Purification Kit(パーセプティブバイオシステム社製)を用いて付属のマニュアルに準じて分画し、poly(A)RNA画分を回収した。このpoly(A)RNA画分1μgを鋳型に用いてMarathon cDNA amplification kit(Clontech社製)に含まれるcDNA合成試薬を用い付属のマニュアルに従ってcDNAを合成した。得られたcDNAを鋳型にして、配列番号6で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドおよび配列番号7で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドをプライマーに使うPCRを行い、葉緑体型 PPO 遺伝子を含むDNA断片を増幅した。なお、該オリゴヌクレオチドはDNA合成装置(PEアプライドバイオシステムズ社: Model 394 DNA/RNA Synthesizer)を用いて合成し、オリゴヌクレオチド精

40

50

製用カートリッジ (PEアプライドバイオシステムズ社: OPC カートリッジ) で精製した。また、PCRは、94 にて1分間次いで65 にて5分間の保温を1回行った後、94 にて15秒間次いで65 にて5分間の保温を1サイクルとしてこれを29回実施した。PCR反応後、反応液をMicroSpin S-400HR(ファルマシアバイオテク社製)で濾過することによって、増幅されたDNA断片を精製し、該DNA断片を、制限酵素SalIで切断されたプラスミドpCR2.1(Invitrogen社製)と連結することにより、プラスミドpSPP0-Pを得た。次いで、該プラスミドを大腸菌INV F'株のコンピテントセル(Invitrogen社製)に導入し、アンピシリン耐性株を選抜した。さらに、選抜されたアンピシリン耐性株に含まれるプラスミドの塩基配列をDye terminator cycle sequencing kit(PEアプライドバイオシステムズ社製)およびDNAシーケンサー373S(PEアプライドバイオシステムズ社製)を用いて決定した。その結果、配列番号8で示される塩基配列が明らかとなり、プラスミドpSPP0-Pはダイズの葉緑体型 P P O 遺伝子を含むことが確認された。

10

このプラスミドpSPP0-Pを制限酵素PshBIで消化し、得られたDNA断片の末端をT4 DNA polymeraseを用いて平滑化した後、さらにSphIで消化し、ダイズの葉緑体型 P P O 遺伝子とlacプロモーターとを含むDNA断片を単離した。次に、プラスミドpACYC184(ニッポンジーン社製)を制限酵素NruIとSphIで消化し、410bpの断片を除去してこれに替えて前記DNA断片を挿入することにより、プラスミドpACYCSP(図12)を得た。次いで、該プラスミドpACYCSPを、Yamamoto, F. et al., Japanese J. Genet., 63; p237(1988)等に記載されている P P O 遺伝子(hemG遺伝子座)欠損突然変異系統大腸菌BT3株にHanahan, D. J., Mol. Biol., 166; p557(1983)に記載の方法に従って導入し、これを15 µg/mlクロランフェニコール、10 µg/mlカナマイシンを含むYPT培地(5g/l酵母エキス, 5g/lトリプトン, 5g/lペプトン, 10g/l NaCl, pH7.0)で培養することにより、クロランフェニコールおよびカナマイシンに耐性であり、hemG遺伝子欠失がダイズ由来の P P O 遺伝子で相補された大腸菌BT3/pACYCSP株を選抜した。

20

#### 【0043】

参考例5 ダイズ P P O の改変タンパク質であってプロトポルフィリノーゲンIXに対する酸化能を持たずプロトポルフィリノーゲンIXに特異的に結合するタンパク質をコードする遺伝子の取得

配列番号9で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドおよび配列番号10で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドをプライマーに用い、参考例4で作製されたプラスミドpSPP0-Pを鋳型にしてPCRを行い、葉緑体移行シグナルとFAD結合配列を欠失したダイズ P P O (以下、本改変ダイズ P P O と記す。)をコードするDNA断片を増幅した。なお、前記オリゴヌクレオチドはDNA合成装置(PEアプライドバイオシステムズ社: Model 394 DNA/RNA Synthesizer)を用いて合成し、オリゴヌクレオチド精製用カートリッジ(PEアプライドバイオシステムズ社: OPC カートリッジ)で精製した。また、PCRは、94 にて1分間次いで55 にて2分間さらに72 にて3分間の保温を1サイクルとしてこれを30回実施した。増幅したDNA断片を、制限酵素NcoIとSalIで消化し、プラスミドpTV118N(宝酒造社製)のNcoI切断部位とSalI切断部位の間に挿入することにより、プラスミドpTVGMP(図13)を構築した。

30

該プラスミドpTVGMPを P P O 遺伝子欠失突然変異系統大腸菌BT3株にHanahan, D. J., Mol. Biol., 166; p557(1983)に記載の方法に従って導入し、これを100 µg/mlアンピシリン、10 µg/mlカナマイシンを含むYPT培地(5g/l酵母エキス, 5g/lトリプトン, 5g/lペプトン, 10g/l NaCl, pH7.0)で培養したところ、生育相補されたクローンは全く得られなかった。

40

#### 【0044】

実施例2 本CTP-CP4 EPSPS遺伝子および本改変ダイズ P P O をコードする遺伝子のタバコへの導入

本CTP-CP4 EPSPS遺伝子および本改変ダイズ P P O をコードする遺伝子をアグロバクテリウム法で植物へ導入するためのプラスミドを構築した。参考例5記載の方法と同様に、配列番号11で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドプライマーおよび配列番号12で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、参考例4で作製

50

されたプラスミドpSPPO-Pを鋳型にしてPCRを実施することにより、本改変サイズPPOをコードする遺伝子を含むDNA断片を増幅した。次いで、参考例3で作製されたプラスミドpBI121Kを制限酵素KpnIとSacIとで消化することにより -glucuronidase遺伝子を除去し、これに替えて、前記の本改変サイズPPOをコードする遺伝子を含むDNA断片を制限酵素KpnIとSacIとで消化して得られるDNA断片を挿入し、該遺伝子が35Sプロモーターの下流に結合されてなるプラスミドpBIGMP(図14)を作製した。

次に、参考例3において調製されたプラスミドpCENSKを制限酵素KpnIで消化し、本CTP-CP4 EPSPS遺伝子、その下流に位置するノパリン合成酵素をコードする遺伝子のターミナー、およびさらにその下流に位置するカリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーターを含むDNA断片を得て、これを前記のプラスミドpBIGMPのKpnI切断部位に挿入することで、本CTP-CP4 EPSPS遺伝子および本改変サイズPPOをコードする遺伝子がそれぞれカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターの下流に結合されてなるプラスミドpBICEGMP(図15)を作製する。

該プラスミドpBICEGMPを、*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404に導入し、これを300 µg/mlストレプトマイシン、100 µg/mlリファンピシン、25 µg/mlカナマイシンを含むLB培地で培養して形質転換体を選抜することによって、pBICEGMPを持つアグロバクテリウム株を単離する。

該アグロバクテリウム株を無菌培養したタバコの葉片に感染させ、参考例3記載の方法と同様の操作で、本CTP-CP4 EPSPS遺伝子および本改変サイズPPOをコードする遺伝子が導入されたタバコを取得する。

#### 【0045】

試験例2 本CTP-CP4 EPSPS遺伝子および本改変サイズPPOをコードする遺伝子の導入されたタバコの除草剤耐性試験

実施例2で得られる本CTP-CP4 EPSPS遺伝子と本改変サイズPPOをコードする遺伝子とが導入されたタバコ、およびコントロール組換えタバコについて、試験例1と同様の操作で試験することにより、前記構造式8で示されるPPO阻害型除草性化合物に対する耐性を定量的に確認する。

また、本CTP-CP4 EPSPS遺伝子と本改変サイズPPOをコードする遺伝子とが導入されたタバコおよびコントロール組換えタバコを、試験例1と同様の操作で試験することにより、グリフォセート化合物に対する耐性を定量的に確認する。

#### 【0046】

参考例6 コナミドリムシPPO遺伝子の取得

コナミドリムシ(*Chlamydomonas reinhardtii*) CC407株を、Chlamydomonas Genetics Center (address: DCMB Group, Department of Botany, Box 91000, Duke University, Durham, NC 27708-1000, USA)より入手し、200 µE/m<sup>2</sup>/秒の光合成活性照明下、7mM NH<sub>4</sub>Cl、0.4mM MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O、0.34mM CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O、25mM リン酸カリウム、0.5mM トリス(pH 7.5)、1ml/L ハトナー微量元素、および1ml/L 氷酢酸からなるTAP液体培地(E. H. Harris, The Chlamydomonas Sourcebook, Academic Press, San Diego, 1989年、576-577頁)中で5日間培養し、初期定常増殖期の細胞を含む培養液200ml(1.0x10<sup>6</sup> cells/ml)を得た。

この細胞から、ISOGEN(日本ジーン社製)を用いて付属のマニュアルにしたがって操作を行ない、全RNAを調製した。さらに、BioMag mRNA Purification Kit(パーセプティブバイオシステム社)を用いて付属のマニュアルに従って操作を行ない、poly(A)RNAを分画した。得られたpoly(A)RNAから、Marathon cDNA Amplification Kit(Clontech社製)を用いて付属のマニュアルに従って操作を行ないcDNAを合成し、PCRの鋳型とした。

PCRのプライマーとして、配列番号13で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドおよび配列番号14で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを調製した。これらのオリゴヌクレオチドはDNA合成装置(PEアプライドバイオシステムズ社: Model 394 DNA/RNA Synthesizer)を用いて合成し、オリゴヌクレオチド精製用カートリッジ(PEアプ

10

20

30

40

50

ライドバイオシステムズ社：OPC カートリッジ)で精製した。

PCRは、Advantage cDNA PCR Kit (Clontech 社製)を用いて付属のマニュアルに従って反応液を調製し、94 にて1分間次いで65 にて5分間の保温を1回行った後、94 にて15秒間次いで65 にて5分間の保温を1サイクルとしてこれを29回実施した。PCR反応後、反応液をMicroSpin S-400HR(ファルマシアバイオテク社製)で濾過することによって、増幅されたDNA断片を精製した。TA Cloning Kit (Invitrogen社製)を用いて付属のマニュアルに従って操作を行ない、該増幅DNA断片をpCR2.1プラスミドのPCR産物クローニング部位にクローニングし、プラスミドpCPP0を構築した。

得られた組換えプラスミドpCPP0が有するDNA断片の塩基配列をDye terminator cycle sequencing kit (PEアプライドバイオシステムズ社製)およびDNAシーケンサー373S (PEアプライドバイオシステムズ社製)を用い決定した。その結果、配列番号15で示される塩基配列が明らかとなり、pCPP0はコナミドリムシのPPOの完全長cDNAを含むプラスミドであることが判明した。

#### 【0047】

参考例7 コナミドリムシPPOの改変タンパク質であってプロトポルフィリノーゲンIXに対する酸化能を持たずプロトポルフィリノーゲンIXに特異的に結合するタンパク質をコードする遺伝子の取得

配列番号16で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドおよび配列番号17で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドをプライマーに用い、参考例6で作製されたプラスミドpCPP0を鋳型にしてPCRを行い、葉緑体移行シグナルとFAD結合配列を欠失したコナミドリムシのPPO(以下、本改変コナミドリムシPPOと記す。)をコードするDNA断片を増幅した。なお、オリゴヌクレオチドはDNA合成装置(PEアプライドバイオシステムズ社：Model 394 DNA/RNA Synthesizer)を用いて合成し、オリゴヌクレオチド精製用カートリッジ(PEアプライドバイオシステムズ社：OPC カートリッジ)で精製した。また、PCRは、94 にて1分間次いで55 にて2分間さらに72 にて3分間の保温を1サイクルとしてこれを30回実施した。増幅したDNA断片を、制限酵素BamHIとSacIで消化し、これをプラスミドpTV119N(宝酒造社製)のBamHI切断部位とSacI切断部位の間に挿入することにより、プラスミドpTVCRP(図16)を構築した。

該プラスミドpTVCRPをPPO遺伝子欠失突然変異系統大腸菌BT3株にHanahan, D.J., Mol. Biol., 166; p557(1983)に記載の方法に従って導入し、これを100 µg/mlアンピシリン、10 µg/mlカナマイシンを含むYPT培地(5g/l酵母エキス, 5g/lトリプトン, 5g/lペプトン, 10g/l NaCl, pH7.0)で培養したところ、生育相補されたクローンは全く得られなかった。

#### 【0048】

実施例3 本CTP-CP4 EPSPS遺伝子および本改変コナミドリムシPPOをコードする遺伝子のタバコへの導入

本CTP-CP4 EPSPS遺伝子と本改変コナミドリムシPPOをコードする遺伝子とをアグロバクテリウム法で植物へ導入するためのプラスミドを構築した。参考例7で作製されたプラスミドpTVCRPを制限酵素BamHIとSacIとで消化することにより、本改変コナミドリムシPPOをコードする遺伝子を含むDNA断片を調製した。バイナリーベクターpBI121(Clontech社製)を制限酵素BamHIとSacIとで消化することにより -glucuronidase遺伝子を除去し、これに替えて、前記の本改変コナミドリムシPPOをコードする遺伝子を含むDNA断片を挿入し、該遺伝子が35Sプロモーターの下流に結合されてなるプラスミドpBICRP(図17)を作製した。

次いで、該プラスミドpBICRPを制限酵素BamHIで消化した後、DNA Polymerase Iを用いて2本鎖DNAのギャップにヌクレオチドを付加しDNA末端を平滑化し、仔牛小腸由来のAlkaline phosphataseで処理して該DNAの5'末端を脱りん酸化し、りん酸化KpnIリンカー(宝酒造製4668A)を挿入して環化させ、プラスミドpBICRPKを得る。次に、参考例3において調製されたプラスミドpCENSKを制限酵素KpnIで消化し、本CTP-CP4 EPSPS遺伝子、その下流に位置するノパリン合成酵素をコードする遺伝子のターミネーター、およびさらにその下流に位置するカリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーターを含むDNA断片を得て、これを

10

20

30

40

50

前記のプラスミドpBICRPKのKpnI切断部位に挿入することで、本CTP-CP4 EPSPS遺伝子および本改変ダイズP P Oをコードする遺伝子がそれぞれカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターの下流に結合されてなるプラスミドpBICECRP(図18)を作製する。

該プラスミドpBICECRPを、*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404に導入し、これを300 µg/mlストレプトマイシン、100 µg/mlリファンピシン、25 µg/mlカナマイシンを含むLB培地で培養して形質転換体を選抜することによって、pBICECRPを持つアグロバクテリウム株を単離する。

該アグロバクテリウム株を無菌培養したタバコの葉片に感染させ、参考例3記載の方法と同様の操作で、本CTP-CP4 EPSPS遺伝子および本改変コナミドリムシP P Oをコードする遺伝子が導入されたタバコを取得する。

【0049】

試験例3 本CTP-CP4 EPSPS遺伝子および本改変コナミドリムシP P Oをコードする遺伝子の導入されたタバコの除草剤耐性試験

実施例3で得られる本CTP-CP4 EPSPS遺伝子と本改変コナミドリムシP P Oをコードする遺伝子とが導入されたタバコ、およびコントロール組換えタバコについて、試験例1と同様の操作で試験することにより、前記構造式8で示されるP P O阻害型除草性化合物に対する耐性度を定量的に確認する。

また、本CTP-CP4 EPSPS遺伝子と本改変コナミドリムシP P Oをコードする遺伝子とが導入されたタバコおよびコントロール組換えタバコを、試験例1と同様の操作で試験することにより、グリフォセート化合物に対する耐性度を定量的に確認する。

【0050】

参考例8 シロイヌナズナの葉緑体局在型フェロケラターゼをコードする遺伝子の取得  
シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* WS) の葉部組織から、RNeasy Plant Kit(QIAGEN社製)を用いて付属のマニュアルに従って操作を行ない、全RNAを調製した。さらに、RNA LA PCR Kit (AMV) Ver 1.1 (宝酒造社製)を用いて付属のマニュアルに従って操作を行ない、葉緑体局在型フェロケラターゼ(以下、本シロイヌナズナフェロケラターゼと記す)をコードする遺伝子を含むDNA断片を取得した。まず、プライマーとして前記キットに含まれるOligo dT-Adaptor Primerを用い、シロイヌナズナ全RNAを鋳型として用いて、前記キットに含まれる逆転写酵素を添加して1st strand cDNAを合成した。続いて、該1st strand cDNAを鋳型として、前記キットに含まれるLA Taq polymeraseを用いてPCRを行い、

本シロイヌナズナフェロケラターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片を増幅した。ここでPCRのプライマーとしては、配列番号18で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドプライマー、および配列番号19で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドプライマーを用いた。該オリゴヌクレオチドはDNA合成装置(PEアプライドバイオシステムズ社: Model 394 DNA/RNA Synthesizer)を用いて合成し、オリゴヌクレオチド精製用カートリッジ(PEアプライドバイオシステムズ社: OPC カートリッジ)で精製した。また、PCRは、94℃にて2分間の保温を1回行い、続いて、94℃にて30秒間次いで55℃にて30秒間さらに72℃にて3分間の保温を1サイクルとしてこれを30サイクル実施した。前記のPCR反応後、該PCR反応で増幅されたDNA断片についてTA Cloning Kit (Invitrogen社製)を用いて付属のマニュアルに従って操作を行ない、該DNA断片をpCR2.1プラスミドのPCR産物クローニング部位にクローニングしてプラスミドpCRATF(図19)と名付けた。該プラスミドは、本シロイヌナズナフェロケラターゼをコードする遺伝子がlacプロモーターの制御下でセンス方向に発現可能な形で挿入された構造を有する。次いで、該プラスミドを大腸菌JM109株のコンピテントセル(宝酒造社製)に導入し、アンピシリン耐性株を選抜した。さらに、選抜されたアンピシリン耐性株に含まれるプラスミドの塩基配列をThermo Sequence II Dye Terminator kit(アマシャムファルマシアバイオテク社製)およびDNAシーケンサー373S(PEアプライドバイオシステムズ社製)を用いて決定した。その結果、配列番号20で示される塩基配列が明らかとなり、プラスミドpCRATFは本シロイヌナズナフェロケラターゼをコードする遺伝子を含むことが確認された。

【0051】

10

20

30

40

50

実施例 4 本CTP-CP4 EPSPS遺伝子および本シロイヌナズナフェロケラターゼをコードする遺伝子のタバコへの導入

本CTP-CP4 EPSPS遺伝子と本シロイヌナズナフェロケラターゼをコードする遺伝子とをアグロバクテリウム法で植物へ導入するためのプラスミドを構築した。まず、参考例 8 で作製されたプラスミドpCRATFを制限酵素SacIで消化することにより、本シロイヌナズナフェロケラターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片を調製した。このDNA断片をバイナリーベクター-pBI121(Clontech社製)の制限酵素SacI切断部位に挿入することでプラスミドpBIATFGUSを得た。このプラスミドを制限酵素BamHIで消化することにより -glucuronidase遺伝子を除去し、自己環化させることで、該遺伝子が35Sプロモーターの下流に結合されてなるプラスミドpBIATF(図20)を作製した。

10

次いで、該プラスミドpBIATFを制限酵素BamHIで消化した後、DNA Polymerase Iを用いて2本鎖DNAのギャップにヌクレオチドを付加しDNA末端を平滑化し、仔牛小腸由来のAlkaline phosphataseで処理して該DNAの5'末端を脱りん酸化し、りん酸化KpnIリンカー(宝酒造製4668A)を挿入して環化させ、プラスミドpBIATFKを得る。次に、参考例 3 において調製されたプラスミドpCENSKを制限酵素KpnIで消化し、本CTP-CP4 EPSPS遺伝子、その下流に位置するノパリン合成酵素をコードする遺伝子のターミネーター、およびさらにその下流に位置するカリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーターを含むDNA断片を得て、これを前記のプラスミドpBIATFKのKpnI切断部位に挿入することで、本CTP-CP4 EPSPS遺伝子および本シロイヌナズナフェロケラターゼをコードする遺伝子がそれぞれカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターの下流に結合されてなるプラスミドpBICEATF(図21)を作製する。

20

該プラスミドpBICEATFを、Agrobacterium tumefaciens LBA4404に導入し、これを300 µg/mlストレプトマイシン、100 µg/mlリファンピシン、25 µg/mlカナマイシンを含むLB培地で培養して形質転換体を選抜することによって、pBICEATFを持つアグロバクテリウム株を単離する。

該アグロバクテリウム株を無菌培養したタバコの葉片に感染させ、参考例 3 記載の方法と同様の操作で、本CTP-CP4 EPSPS遺伝子および本シロイヌナズナフェロケラターゼをコードする遺伝子が導入されたタバコを取得する。

【0052】

試験例 4 本CTP-CP4 EPSPS遺伝子および本シロイヌナズナフェロケラターゼをコードする遺伝子の導入されたタバコの除草剤耐性試験

30

実施例 4 で得られる本CTP-CP4 EPSPS遺伝子と本シロイヌナズナフェロケラターゼをコードする遺伝子とが導入されたタバコ、およびコントロール組換えタバコについて、試験例 1 と同様の操作で試験することにより、前記 構造式 8 で示される PPO 阻害型除草性化合物に対する耐性を定量的に確認する。

また、本CTP-CP4 EPSPS遺伝子と本シロイヌナズナフェロケラターゼをコードする遺伝子とが導入されたタバコおよびコントロール組換えタバコを、試験例 1 と同様の操作で試験することにより、グリフォセート化合物に対する耐性を定量的に確認する。

【0053】

参考例 9 ダイズのコプロポルフィリノーゲンIIIオキシダーゼをコードする遺伝子の単離

40

ダイズ(Glycine max cv. Jack)を播種後、25 °Cで20日間栽培し、緑葉を採取した。採取した緑葉5gを液体窒素で凍結させ、これを乳鉢と乳棒で磨砕し、該磨砕物から、RNA抽出試薬ISOGEN(ニッポンジーン社製)を用いて付属のマニュアルにしたがって全RNAを調製した。さらに、RNA LA PCR Kit (AMV) Ver 1.1(宝酒造社製)を用いて付属のマニュアルに従って操作を行ない、コプロポルフィリノーゲンIIIオキシダーゼ(以下、本ダイズCPOXと記す。)をコードする遺伝子を含むDNA断片を取得した。まず、プライマーとして前記キットに含まれるOligo dT-Adaptor Primerを用い、ダイズ全RNAを鋳型として使用して、前記キットに含まれる逆転写酵素を添加して1st strand cDNAを合成した。続いて、該1st strand cDNAを鋳型として、前記キットに含まれるLA Taq polymeraseを用いてPCRを行い、本

50

ダイズCPOXをコードする遺伝子を含むDNA断片を増幅した。ここでPCRのプライマーとしては、配列番号21で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドプライマー、および配列番号22で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドプライマーを用いた。該オリゴヌクレオチドはDNA合成装置(PEアプライドバイオシステムズ社: Model 394 DNA/RNA Synthesizer)を用いて合成し、オリゴヌクレオチド精製用カートリッジ(PEアプライドバイオシステムズ社: OPC カートリッジ)で精製した。また、PCRは、94にて2分間の保温を1回行い、続いて、94にて30秒間次いで55にて30秒間さらに72にて3分間の保温を1サイクルとしてこれを30サイクル実施した。前記のPCR反応後、該PCR反応で増幅されたDNA断片についてTA Cloning Kit(Invitrogen社製)を用いて付属のマニュアルに従って操作を行ない、該DNA断片をpCR2.1プラスミドのPCR産物クローニング部位にクローニングしてプラスミドpCRSCPOX(図22)と名付けた。該プラスミドは、本ダイズCPOXをコードする遺伝子がlacプロモーターの下流にアンチセンス方向に挿入された構造を有する。次いで、該プラスミドを大腸菌JM109株のコンピテントセル(宝酒造社製)に導入し、アンピシリン耐性株を選抜した。さらに、選抜されたアンピシリン耐性株に含まれるプラスミドの塩基配列をThermo Sequence II Dye Terminator kit(アマシャムファルマシアバイオテク社製)およびDNAシーケンサー373S(PEアプライドバイオシステムズ社製)を用いて決定した。その結果、配列番号23で示される塩基配列が明らかとなり、プラスミドpCRSCPOXは本ダイズCPOX遺伝子を含むことが確認された。

10

## 【0054】

実施例5 本CTP-CP4 EPSPS遺伝子および本ダイズCPOXをコードする遺伝子のタバコへの導入

20

本CTP-CP4 EPSPS遺伝子および本ダイズCPOXをコードする遺伝子をアグロバクテリウム法で植物へ導入するためのプラスミドを構築した。まず、参考例9で作製されたプラスミドpCRSCPOXを制限酵素BamHIで消化することにより、本ダイズCPOXをコードする遺伝子を含むDNA断片を調製した。このDNA断片を参考例3で作製されたバイナリーベクターpBI121KSの制限酵素BamHI切断部位に挿入することでプラスミドpBISCPOXGUSを得た。このプラスミドを制限酵素SalIで消化することにより -glucuronidase遺伝子を除去し、自己環化させることで、該遺伝子が35Sプロモーターの下流に結合されてなるプラスミドpBISCPOX(図23)を作製した。

次いで、該プラスミドpBISCPOXを制限酵素BamHIで消化した後、DNA Polymerase Iを用いて2本鎖DNAのギャップにヌクレオチドを付加しDNA末端を平滑化し、仔牛小腸由来のAlkaline phosphataseで処理して該DNAの5'末端を脱りん酸化し、りん酸化KpnIリンカー(宝酒造製4668A)を挿入して環化させ、プラスミドpBISCPOXKを得る。次に、参考例3において調製されたプラスミドpCENSKを制限酵素KpnIで消化し、本CTP-CP4 EPSPS遺伝子、その下流に位置するノパリン合成酵素をコードする遺伝子のターミネーター、およびさらにその下流に位置するカリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーターを含むDNA断片を得て、これを前記のプラスミドpBISCPOXKのKpnI切断部位に挿入することで、本CTP-CP4 EPSPS遺伝子および本ダイズCPOXをコードする遺伝子がそれぞれカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターの下流に結合されてなるプラスミドpBICESCPOX(図24)を作製する。

30

該プラスミドpBICESCPOXを、Agrobacterium tumefaciens LBA4404に導入し、これを300 μg/mlストレプトマイシン、100 μg/mlリファンピシン、25 μg/mlカナマイシンを含むLB培地で培養して形質転換体を選抜することによって、pBICESCPOXを持つアグロバクテリウム株を単離する。

40

該アグロバクテリウム株を無菌培養したタバコの葉片に感染させ、参考例3記載の方法と同様の操作で、本CTP-CP4 EPSPS遺伝子と本ダイズCPOXをコードする遺伝子とが導入されたタバコを取得する。

## 【0055】

試験例5 本CTP-CP4 EPSPS遺伝子および本ダイズCPOXをコードする遺伝子の導入されたタバコの除草剤耐性試験

実施例5で得られる本CTP-CP4 EPSPS遺伝子と本ダイズCPOXをコードする遺伝子とが導入

50

されたタバコ、およびコントロール組換えタバコについて、試験例 1 と同様の操作で試験することにより、前記 構造式 8 で示される P P O 阻害型除草性化合物に対する耐性を定量的に確認する。

また、本CTP-CP4 EPSPS遺伝子と本ダイズCPOXをコードする遺伝子とが導入されたタバコおよびコントロール組換えタバコを、試験例 1 と同様の操作で試験することにより、グリフォセート化合物に対する耐性を定量的に確認する。

【 0 0 5 6 】

【発明の効果】

本発明により、グリフォセート化合物に対する耐性および P P O 阻害型除草性化合物に対する耐性が付与された植物が提供可能となる。

【 0 0 5 7 】

[配列表フリーテキスト]

配列番号 1

ペチュニア由来のEPSPS遺伝子の葉緑体トランジットペプチドをコードする塩基配列の下流にアグロバクテリウム由来のEPSPS遺伝子が結合されたキメラ遺伝子を有する D N A 断片を増幅するために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 2

ペチュニア由来のEPSPS遺伝子の葉緑体トランジットペプチドをコードする塩基配列の下流にアグロバクテリウム由来のEPSPS遺伝子が結合されたキメラ遺伝子を有する D N A 断片を増幅するために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 4

タバコ由来のchIH遺伝子の部分塩基配列を有する D N A 断片を増幅するために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 5

タバコ由来のchIH遺伝子の部分塩基配列を有する D N A 断片を増幅するために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 6

ダイズ由来のPPO遺伝子を増幅するために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 7

ダイズ由来のPPO遺伝子を増幅するために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 9

ダイズ由来のPPO遺伝子の部分塩基配列を有する D N A 断片を増幅するために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 1 0

ダイズ由来のPPO遺伝子の部分塩基配列を有する D N A 断片を増幅するために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 1 1

ダイズ由来のPPO遺伝子の部分塩基配列を有する D N A 断片を増幅するために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 1 2

ダイズ由来のPPO遺伝子の部分塩基配列を有する D N A 断片を増幅するために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 1 3

コナミドリムシ由来のPPO遺伝子を増幅するために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 1 4

コナミドリムシ由来のPPO遺伝子を増幅するために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 1 6

コナミドリムシ由来のPPO遺伝子の部分塩基配列を有する D N A 断片を増幅するために設

10

20

30

40

50

計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 17

コナミドリムシ由来のPPO遺伝子の部分塩基配列を有するDNA断片を増幅するために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 18

シロイヌナズナ由来の葉緑体局在型フェロケラターゼ遺伝子を増幅するために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 19

シロイヌナズナ由来の葉緑体局在型フェロケラターゼ遺伝子を増幅するために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 21

ダイズ由来のコプロポルフィリノーゲンIIIオキシダーゼ遺伝子を増幅するために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 22

ダイズ由来のコプロポルフィリノーゲンIIIオキシダーゼ遺伝子を増幅するために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

【0058】

【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Sumitomo Chemical Company Limited

<120> Herbicide resistant plants

<130> P152117

10

<150> JP 11/310244

<151> 1999-10-29

<160> 23

<210> 1

20

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA fragment having nucleotide sequence encoding the *Petunia hybrida* EPSPS chloroplast transit peptide and the *Agrobacterium* sp. strain CP4 EPSPS gene

30

<400> 1

ggaagcttca agaatggcac aaattaacaa catggc 36

<210> 2

<211> 32

40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA fragment having nucleotide sequence encoding the *Petunia hybrida* EPSPS chloroplast transit peptide and the *Agrobacterium* sp. strain CP4 EPSPS gene

10

<400> 2

gagtcgacgg tcatcaggca gccttcgtat cg 32

<210> 3

<211> 1587

<212> DNA

<213> *Petunia hybrida* EPSPS chloroplast transit peptide and *Agrobacterium* sp. strain CP4 EPSPS

20

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (1584)

<400> 3

30

atg gca caa att aac aac atg gct caa ggg ata caa acc ctt aat ccc 48

Met Ala Gln Ile Asn Asn Met Ala Gln Gly Ile Gln Thr Leu Asn Pro

1 5 10 15

aat tcc aat ttc cat aaa ccc caa gtt cct aaa tct tca agt ttt ctt 96

Asn Ser Asn Phe His Lys Pro Gln Val Pro Lys Ser Ser Ser Phe Leu

20 25 30

gtt ttt gga tct aaa aaa ctg aaa aat tca gca aat tct atg ttg gtt 144

40

Val Phe Gly Ser Lys Lys Leu Lys Asn Ser Ala Asn Ser Met Leu Val

35	40	45		
ttg aaa aaa gat tca att ttt atg caa aag ttt tgt tcc ttt agg att	192			
Leu Lys Lys Asp Ser Ile Phe Met Gln Lys Phe Cys Ser Phe Arg Ile				
50	55	60		
tca gca tca gtg gct aca gcc tgc atg ctt cac ggt gca agc agc cgg	240			
Ser Ala Ser Val Ala Thr Ala Cys Met Leu His Gly Ala Ser Ser Arg				
65	70	75		10
ccc gca acc gcc cgc aaa tcc tct ggc ctt tcc gga acc gtc cgc att	288			
Pro Ala Thr Ala Arg Lys Ser Ser Gly Leu Ser Gly Thr Val Arg Ile				
80	85	90	95	
ccc ggc gac aag tcg atc tcc cac cgg tcc ttc atg ttc ggc ggt ctc	336			
Pro Gly Asp Lys Ser Ile Ser His Arg Ser Phe Met Phe Gly Gly Leu				
100	105	110		
gcg agc ggt gaa acg cgc atc acc ggc ctt ctg gaa ggc gag gac gtc	384			20
Ala Ser Gly Glu Thr Arg Ile Thr Gly Leu Leu Glu Gly Glu Asp Val				
115	120	125		
atc aat acg ggc aag gcc atg cag gcc atg ggc gcc agg atc cgt aag	432			
Ile Asn Thr Gly Lys Ala Met Gln Ala Met Gly Ala Arg Ile Arg Lys				
130	135	140		
gaa ggc gac acc tgg atc atc gat ggc gtc ggc aat ggc ggc ctc ctg	480			30
Glu Gly Asp Thr Trp Ile Ile Asp Gly Val Gly Asn Gly Gly Leu Leu				
145	150	155		
gcg cct gag gcg ccg ctc gat ttc ggc aat gcc gcc acg ggc tgc cgc	528			
Ala Pro Glu Ala Pro Leu Asp Phe Gly Asn Ala Ala Thr Gly Cys Arg				
160	165	170	175	
ctg acc atg ggc ctc gtc ggg gtc tac gat ttc gac agc acc ttc atc	576			
Leu Thr Met Gly Leu Val Gly Val Tyr Asp Phe Asp Ser Thr Phe Ile				
180	185	190		40
ggc gac gcc tcg ctc aca aag cgc ccg atg ggc cgc gtg ttg aac ccg	624			

Gly sp Ala Ser Leu Thr Lys Arg Pro Met Gly Arg Val Leu Asn Pro		
195	200	205
ctg cgc gaa atg ggc gtg cag gtg aaa tcg gaa gac ggt gac cgt ctt		672
Leu Arg Glu Met Gly Val Gln Val Lys Ser Glu Asp Gly Asp Arg Leu		
210	215	220
ccc gtt acc ttg cgc ggg ccg aag acg ccg acg ccg atc acc tac cgc		720
Pro Val Thr Leu Arg Gly Pro Lys Thr Pro Thr Pro Ile Thr Tyr Arg		
225	230	235
gtg ccg atg gcc tcc gca cag gtg aag tcc gcc gtg ctg ctc gcc ggc		768
Val Pro Met Ala Ser Ala Gln Val Lys Ser Ala Val Leu Leu Ala Gly		
240	245	250
ctc aac acg ccc ggc atc acg acg gtc atc gag ccg atc atg acg cgc		816
Leu Asn Thr Pro Gly Ile Thr Thr Val Ile Glu Pro Ile Met Thr Arg		
260	265	270
gat cat acg gaa aag atg ctg cag ggc ttt ggc gcc aac ctt acc gtc		864
Asp His Thr Glu Lys Met Leu Gln Gly Phe Gly Ala Asn Leu Thr Val		
275	280	285
gag acg gat gcg gac ggc gtg cgc acc atc cgc ctg gaa ggc cgc ggc		912
Glu Thr Asp Ala Asp Gly Val Arg Thr Ile Arg Leu Glu Gly Arg Gly		
290	295	300
aag ctc acc ggc caa gtc atc gac gtg ccg ggc gac ccg tcc tcg acg		960
Lys Leu Thr Gly Gln Val Ile Asp Val Pro Gly Asp Pro Ser Ser Thr		
305	310	315
gcc ttc ccg ctg gtt gcg gcc ctg ctt gtt ccg ggc tcc gac gtc acc		1008
Ala Phe Pro Leu Val Ala Ala Leu Leu Val Pro Gly Ser Asp Val Thr		
320	325	330
atc ctc aac gtg ctg atg aac ccc acc cgc acc ggc ctc atc ctg acg		1056
Ile Leu Asn Val Leu Met Asn Pro Thr Arg Thr Gly Leu Ile Leu Thr		
340	345	350

10

20

30

40

ctg cag gaa atg ggc gcc gac atc gaa gtc atc aac ccg cgc ctt gcc	1104	
Leu Gln Glu Met Gly Ala Asp Ile Glu Val Ile Asn Pro Arg Leu Ala		
355 360 365		
ggc ggc gaa gac gtg gcg gac ctg cgc gtt cgc tcc tcc acg ctg aag	1152	
Gly Gly Glu Asp Val Ala Asp Leu Arg Val Arg Ser Ser Thr Leu Lys		
370 375 380		
ggc gtc acg gtg ccg gaa gac cgc gcg cct tcg atg atc gac gaa tat	1200	10
Gly Val Thr Val Pro Glu Asp Arg Ala Pro Ser Met Ile Asp Glu Tyr		
385 390 395		
ccg att ctc gct gtc gcc gcc gcc ttc gcg gaa ggg gcg acc gtg atg	1248	
Pro Ile Leu Ala Val Ala Ala Ala Phe Ala Glu Gly Ala Thr Val Met		
400 405 410 415		
aac ggt ctg gaa gaa ctc cgc gtc aag gaa agc gac cgc ctc tcg gcc	1296	
Asn Gly Leu Glu Glu Leu Arg Val Lys Glu Ser Asp Arg Leu Ser Ala		20
420 425 430		
gtc gcc aat ggc ctc aag ctc aat ggc gtg gat tgc gat gag ggc gag	1344	
Val Ala Asn Gly Leu Lys Leu Asn Gly Val Asp Cys Asp Glu Gly Glu		
435 440 445		
acg tcg ctc gtc gtg cgc ggc cgc cct gac ggc aag ggg ctc ggc aac	1392	
Thr Ser Leu Val Val Arg Gly Arg Pro Asp Gly Lys Gly Leu Gly Asn		30
450 455 460		
gcc tcg ggc gcc gcc gtc gcc acc cat ctc gat cac cgc atc gcc atg	1440	
Ala Ser Gly Ala Ala Val Ala Thr His Leu Asp His Arg Ile Ala Met		
465 470 475		
agc ttc ctc gtc atg ggc ctc gtg tcg gaa aac cct gtc acg gtg gac	1488	
Ser Phe Leu Val Met Gly Leu Val Ser Glu Asn Pro Val Thr Val Asp		
480 485 490 495		
gat gcc acg atg atc gcc acg agc ttc ccg gag ttc atg gac ctg atg	1536	40
Asp Ala Thr Met Ile Ala Thr Ser Phe Pro Glu Phe Met Asp Leu Met		

	500	505	510	
gcc ggg ctg ggc gcg aag atc gaa ctc tcc gat acg aag gct gcc tga				1584
Ala Gly Leu Gly Ala Lys Ile Glu Leu Ser Asp Thr Lys Ala Ala				
	515	520	525	
tga				1587

<210> 4 10

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA fragment having partial sequence of tobacco chlH gene 20

<400> 4

ccaatgtaat gctatggtac ctatgttatt cactc 35

<210> 5

<211> 34

<212> DNA 30

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA fragment having partial sequence of tobacco chlH gene

<400> 5 40

gagatcattc tttttgctgt cgacttatcg atcg 34

- <210> 6  
<211> 39  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence
- <220> 10  
<223> Designed oligonucleotide primer to amplify soybean PPO gene
- <400> 6  
tcgagctcca tggtttccgt ctccaacgag atcctattc 39
- <210> 7  
<211> 39 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence
- <220>  
<223> Designed oligonucleotide primer to amplify soybean PPO gene
- <400> 7 30  
ttgtcgaaa ctgctactat ttgtacactc tatttg 36
- <210> 8  
<211> 1632  
<212> DNA  
<213> Glycine max var. Williams82 40
- <220>

<221> CDS

<222> (1)... (1632)

<400> 8

atg gtt tcc gtc ttc aac gag atc cta ttc ccg ccg aac caa acc ctt	48	
Met Val Ser Val Phe Asn Glu Ile Leu Phe Pro Pro Asn Gln Thr Leu		
1 5 10 15		10
ctt cgc ccc tcc ctc cat tcc cca acc tct ttc ttc acc tct ccc act	96	
Leu Arg Pro Ser Leu His Ser Pro Thr Ser Phe Phe Thr Ser Pro Thr		
20 25 30		
cga aaa ttc cct cgc tct cgc cct aac cct att cta cgc tgc tcc att	144	
Arg Lys Phe Pro Arg Ser Arg Pro Asn Pro Ile Leu Arg Cys Ser Ile		
35 40 45		
gcg gag gaa tcc acc gcg tct ccg ccc aaa acc aga gac tcc gcc ccc	192	20
Ala Glu Glu Ser Thr Ala Ser Pro Pro Lys Thr Arg Asp Ser Ala Pro		
50 55 60		
gtg gac tgc gtc gtc gtc ggc gga ggc gtc agc ggc ctc tgc atc gcc	240	
Val Asp Cys Val Val Val Gly Gly Gly Val Ser Gly Leu Cys Ile Ala		
65 70 75 80		
cag gcc ctc gcc acc aaa cac gcc aat gcc aac gtc gtc gtc acg gag	288	
Gln Ala Leu Ala Thr Lys His Ala Asn Ala Asn Val Val Val Thr Glu		30
85 90 95		
gcc cga gac cgc gtc ggc ggc aac atc acc acg atg gag agg gac gga	336	
Ala Arg Asp Arg Val Gly Gly Asn Ile Thr Thr Met Glu Arg Asp Gly		
100 105 110		
tac ctc tgg gaa gaa ggc ccc aac agc ttc cag cct tct gat cca atg	384	
Tyr Leu Trp Glu Glu Gly Pro Asn Ser Phe Gln Pro Ser Asp Pro Met		
115 120 125		40
ctc acc atg gtg gtg gac agt ggt tta aag gat gag ctt gtt ttg ggg	432	

Leu Thr Met Val Val Asp Ser Gly Leu Lys Asp Glu Leu Val Leu Gly		
130	135	140
gat cct gat gca cct cgg ttt gtg ttg tgg aac agg aag ttg agg ccg	480	
Asp Pro Asp Ala Pro Arg Phe Val Leu Trp Asn Arg Lys Leu Arg Pro		
145	150	155
gtg ccc ggg aag ctg act gat ttg cct ttc ttt gac ttg atg agc att	528	
Val Pro Gly Lys Leu Thr Asp Leu Pro Phe Phe Asp Leu Met Ser Ile		10
165	170	175
ggt ggc aaa atc agg gct ggc ttt ggt gcg ctt gga att cgg cct cct	576	
Gly Gly Lys Ile Arg Ala Gly Phe Gly Ala Leu Gly Ile Arg Pro Pro		
180	185	190
cct cca ggt cat gag gaa tcg gtt gaa gag ttt gtt cgt cgg aac ctt	624	
Pro Pro Gly His Glu Glu Ser Val Glu Glu Phe Val Arg Arg Asn Leu		
195	200	205
ggt gat gag gtt ttt gaa cgg ttg ata gag cct ttt tgt tca ggg gtc	672	
Gly Asp Glu Val Phe Glu Arg Leu Ile Glu Pro Phe Cys Ser Gly Val		
210	215	220
tat gca ggc gat cct tca aaa tta agt atg aaa gca gca ttc ggg aaa	720	
Tyr Ala Gly Asp Pro Ser Lys Leu Ser Met Lys Ala Ala Phe Gly Lys		
225	230	235
gtt tgg aag ctg gaa aaa aat ggt ggt agc att att ggt gga act ttc	768	
Val Trp Lys Leu Glu Lys Asn Gly Gly Ser Ile Ile Gly Gly Thr Phe		30
245	250	255
aaa gca ata caa gag aga aat gga gct tca aaa cca cct cga gat ccg	816	
Lys Ala Ile Gln Glu Arg Asn Gly Ala Ser Lys Pro Pro Arg Asp Pro		
260	265	270
cgt ctg cca aaa cca aaa ggt cag act gtt gga tct ttc cgg aag gga	864	
Arg Leu Pro Lys Pro Lys Gly Gln Thr Val Gly Ser Phe Arg Lys Gly		40
275	280	285

ctt acc atg ttg cct gat gca att tct gcc aga cta ggc aac aaa gta	912	
Leu Thr Met Leu Pro Asp Ala Ile Ser Ala Arg Leu Gly Asn Lys Val		
290 295 300		
aag tta tct tgg aag ctt tca agt att agt aaa ctg gat agt gga gag	960	
Lys Leu Ser Trp Lys Leu Ser Ser Ile Ser Lys Leu Asp Ser Gly Glu		
305 310 315 320		
tac agt ttg aca tat gaa aca cca gaa gga gtg gtt tct ttg cag tgc	1008	10
Tyr Ser Leu Thr Tyr Glu Thr Pro Glu Gly Val Val Ser Leu Gln Cys		
325 330 335		
aaa act gtt gtc ctg acc att cct tcc tat gtt gct agt aca ttg ctg	1056	
Lys Thr Val Val Leu Thr Ile Pro Ser Tyr Val Ala Ser Thr Leu Leu		
340 345 350		
cgt cct ctg tct gct gct gct gca gat gca ctt tca aag ttt tat tac	1104	20
Arg Pro Leu Ser Ala Ala Ala Ala Asp Ala Leu Ser Lys Phe Tyr Tyr		
355 360 365		
cct cca gtt gct gca gtt tcc ata tcc tat cca aaa gaa gct att aga	1152	
Pro Pro Val Ala Ala Val Ser Ile Ser Tyr Pro Lys Glu Ala Ile Arg		
370 375 380		
tca gaa tgc ttg ata gat ggt gag ttg aag ggg ttt ggt caa ttg cat	1200	
Ser Glu Cys Leu Ile Asp Gly Glu Leu Lys Gly Phe Gly Gln Leu His		30
385 390 395 400		
cca cgt agc caa gga gtg gaa aca tta gga act ata tac agc tca tca	1248	
Pro Arg Ser Gln Gly Val Glu Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Ser Ser Ser		
405 410 415		
cta ttc ccc aac cga gca cca cct gga agg gtt cta ctc ttg aat tac	1296	
Leu Phe Pro Asn Arg Ala Pro Pro Gly Arg Val Leu Leu Leu Asn Tyr		
420 425 430		
att gga gga gca act aat act gga att tta tcg aag acg gac agt gaa	1344	40
Ile Gly Gly Ala Thr Asn Thr Gly Ile Leu Ser Lys Thr Asp Ser Glu		

435	440	445		
ctt gtg gaa aca gtt gat cga gat ttg agg aaa atc ctt ata aac cca	1392			
Leu Val Glu Thr Val Asp Arg Asp Leu Arg Lys Ile Leu Ile Asn Pro				
450	455	460		
aat gcc cag gat cca ttt gta gtg ggg gtg aga ctg tgg cct caa gct	1440			
Asn Ala Gln Asp Pro Phe Val Val Gly Val Arg Leu Trp Pro Gln Ala				
465	470	475	480	10
att cca cag ttc tta gtt ggc cat ctt gat ctt cta gat gtt gct aaa	1488			
Ile Pro Gln Phe Leu Val Gly His Leu Asp Leu Leu Asp Val Ala Lys				
485	490	495		
gct tct atc aga aat act ggg ttt gaa ggg ctc ttc ctt ggg ggt aat	1536			
Ala Ser Ile Arg Asn Thr Gly Phe Glu Gly Leu Phe Leu Gly Gly Asn				
500	505	510		
tat gtg tct ggt gtt gcc ttg gga cga tgc gtt gag gga gcc tat gag	1584			20
Tyr Val Ser Gly Val Ala Leu Gly Arg Cys Val Glu Gly Ala Tyr Glu				
515	520	525		
gta gca gct gaa gta aac gat ttt ctc aca aat aga gtg tac aaa tag	1632			
Val Ala Ala Glu Val Asn Asp Phe Leu Thr Asn Arg Val Tyr Lys				
530	535	540	543	
<210> 9				30
<211> 39				
<212> DNA				
<213> Artificial Sequence				
<220>				
<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA fragment having partial sequence of soybean PPO gene				40

<400> 9

ggcggaggcg tcaccatggt ctgcatcgcc caggcc 36

<210> 10

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA fragment having partial sequence of soybean PPO gene

<400> 10

gcctgcaggc cgacaactgc tactatttgt acactc 36

20

<210> 11

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA fragment having partial sequence of soybean PPO gene

30

<400> 11

cacaggaaag gtaccatggt ctgcatcgcc cag 33

<210> 12

<211> 33

40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA fragment having partial sequence of soybean PPO gene

10

<400> 12

cctgcagctc gagagctcct actatttgta cac 33

<210> 13

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify Chlamydomonas PPO gene

<400> 13

aatgatgttg acccagactc ctgggacc 28

30

<210> 14

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify Chlamydomonas PPO gene

40

<400> 14

tactacacat cccagcaagc gccaatg 27

<210> 15

<211> 1838

<212> DNA

<213> Chlamydomonas reinhardtii CC407

10

<220>

<221> CDS

<222> (2)... (1693)

<400> 15

a atg atg ttg acc cag act cct ggg acc gcc acg gct tct agc cgg 46 20

Met Met Leu Thr Gln Thr Pro Gly Thr Ala Thr Ala Ser Ser Arg

1 5 10 15

cgg tcg cag atc cgc tcg gct gcg cac gtc tcc gcc aag gtc gcg cct 94

Arg Ser Gln Ile Arg Ser Ala Ala His Val Ser Ala Lys Val Ala Pro

20 25 30

cgg ccc acg cca ttc tcg gtc gcg agc ccc gcg acc gct gcg agc ccc 142

Arg Pro Thr Pro Phe Ser Val Ala Ser Pro Ala Thr Ala Ala Ser Pro

35 40 45

gcg acc gcg gcg gcc cgc cgc aca ctc cac cgc act gct gcg gcg gcc 190

Ala Thr Ala Ala Ala Arg Arg Thr Leu His Arg Thr Ala Ala Ala Ala

50 55 60

act ggt gct ccc acg gcg tcc gga gcc ggc gtc gcc aag acg ctc gac 238

Thr Gly Ala Pro Thr Ala Ser Gly Ala Gly Val Ala Lys Thr Leu Asp

65 70 75

aat gtg tat gac gtg atc gtg gtc ggt gga ggt ctc tcg ggc ctg gtg 286

40

Asn Val Tyr Asp Val Ile Val Val Gly Gly Gly Leu Ser Gly Leu Val		
80	85	90 95
acc ggc cag gcc ctg gcg gct cag cac aaa att cag aac ttc ctt gtt		334
Thr Gly Gln Ala Leu Ala Ala Gln His Lys Ile Gln Asn Phe Leu Val		
	100	105 110
acg gag gct cgc gag cgc gtc ggc ggc aac att acg tcc atg tcg ggc		382
Thr Glu Ala Arg Glu Arg Val Gly Gly Asn Ile Thr Ser Met Ser Gly		
	115	120 125
gat ggc tac gtg tgg gag gag ggc ccg aac agc ttc cag ccc aac gat		430
Asp Gly Tyr Val Trp Glu Glu Gly Pro Asn Ser Phe Gln Pro Asn Asp		
	130	135 140
agc atg ctg cag att gcg gtg gac tct ggc tgc gag aag gac ctt gtg		478
Ser Met Leu Gln Ile Ala Val Asp Ser Gly Cys Glu Lys Asp Leu Val		
	145	150 155
ttc ggt gac ccc acg gct ccc cgc ttc gtg tgg tgg gag ggc aag ctg		526
Phe Gly Asp Pro Thr Ala Pro Arg Phe Val Trp Trp Glu Gly Lys Leu		
	160	165 170 175
cgc ccc gtg ccc tcg ggc ctg gac gcc ttc acc ttc gac ctc atg tcc		574
Arg Pro Val Pro Ser Gly Leu Asp Ala Phe Thr Phe Asp Leu Met Ser		
	180	185 190
atc ccc ggc aag atc cgc gcc ggg ctg ggc gcc atc ggc ctc atc aac		622
Ile Pro Gly Lys Ile Arg Ala Gly Leu Gly Ala Ile Gly Leu Ile Asn		
	195	200 205
gga gcc atg ccc tcc ttc gag gag agt gtg gag cag ttc atc cgc cgc		670
Gly Ala Met Pro Ser Phe Glu Glu Ser Val Glu Gln Phe Ile Arg Arg		
	210	215 220
aac ctg ggc gat gag gtg ttc ttc cgc ctg atc gag ccc ttc tgc tcc		718
Asn Leu Gly Asp Glu Val Phe Phe Arg Leu Ile Glu Pro Phe Cys Ser		
	225	230 235

10

20

30

40

ggc gtg tac gcg ggc gac ccc tcc aag ctg tcc atg aag gcg gcc ttc	766	
Gly Val Tyr Ala Gly Asp Pro Ser Lys Leu Ser Met Lys Ala Ala Phe		
240	245	250
aac agg atc tgg att ctg gag aag aac ggc ggc agc ctg gtg gga ggt	814	
Asn Arg Ile Trp Ile Leu Glu Lys Asn Gly Gly Ser Leu Val Gly Gly		
	260	265
gcc atc aag ctg ttc cag gaa cgc cag tcc aac ccg gcc ccg ccg cgg	862	10
Ala Ile Lys Leu Phe Gln Glu Arg Gln Ser Asn Pro Ala Pro Pro Arg		
	275	280
gac ccg cgc ctg ccg ccc aag ccc aag ggc cag acg gtg ggc tcg ttc	910	
Asp Pro Arg Leu Pro Pro Lys Pro Lys Gly Gln Thr Val Gly Ser Phe		
	290	300
cgc aag ggc ctg aag atg ctg ccg gac gcc att gag cgc aac atc ccc	958	
Arg Lys Gly Leu Lys Met Leu Pro Asp Ala Ile Glu Arg Asn Ile Pro		20
	305	310
gac aag atc cgc gtg aac tgg aag ctg gtg tct ctg ggc cgc gag gcg	1006	
Asp Lys Ile Arg Val Asn Trp Lys Leu Val Ser Leu Gly Arg Glu Ala		
	320	325
gac ggg cgg tac ggg ctg gtg tac gac acg ccc gag ggc cgt gtc aag	1054	
Asp Gly Arg Tyr Gly Leu Val Tyr Asp Thr Pro Glu Gly Arg Val Lys		
	340	345
gtg ttt gcc cgc gcc gtg gct ctg acc gcg ccc agc tac gtg gtg gcg	1102	
Val Phe Ala Arg Ala Val Ala Leu Thr Ala Pro Ser Tyr Val Val Ala		
	355	360
gac ctg gtc aag gag cag gcg ccc gcc gcc gcc gag gcc ctg ggc tcc	1150	
Asp Leu Val Lys Glu Gln Ala Pro Ala Ala Ala Glu Ala Leu Gly Ser		
	370	375
ttc gac tac ccg ccg gtg ggc gcc gtg acg ctg tcg tac ccg ctg agc	1198	40
Phe Asp Tyr Pro Pro Val Gly Ala Val Thr Leu Ser Tyr Pro Leu Ser		

385	390	395		
gcc gtg cgg gag gag cgc aag gcc tcg gac ggg tcc gtg ccg ggc ttc			1246	
Ala Val Arg Glu Glu Arg Lys Ala Ser Asp Gly Ser Val Pro Gly Phe				
400	405	410	415	
ggt cag ctg cac ccg cgc acg cag ggc atc acc act ctg ggc acc atc			1294	
Gly Gln Leu His Pro Arg Thr Gln Gly Ile Thr Thr Leu Gly Thr Ile				
	420	425	430	10
tac agc tcc agc ctg ttc ccc ggc cgc gcg ccc gag ggc cac atg ctg			1342	
Tyr Ser Ser Ser Leu Phe Pro Gly Arg Ala Pro Glu Gly His Met Leu				
	435	440	445	
ctg ctc aac tac atc ggc ggc acc acc aac cgc ggc atc gtc aac cag			1390	
Leu Leu Asn Tyr Ile Gly Gly Thr Thr Asn Arg Gly Ile Val Asn Gln				
	450	455	460	
acc acc gag cag ctg gtg gag cag gtg gac aag gac ctg cgc aac atg			1438	20
Thr Thr Glu Gln Leu Val Glu Gln Val Asp Lys Asp Leu Arg Asn Met				
	465	470	475	
gtc atc aag ccc gac gcg ccc aag ccc cgt gtg gtg ggc gtg cgc gtg			1486	
Val Ile Lys Pro Asp Ala Pro Lys Pro Arg Val Val Gly Val Arg Val				
480	485	490	495	
tgg ccg cgc gcc atc ccg cag ttc aac ctg ggc cac ctg gag cag ctg			1534	
Trp Pro Arg Ala Ile Pro Gln Phe Asn Leu Gly His Leu Glu Gln Leu				30
	500	505	510	
gac aag gcg cgc aag gcg ctg gac gcg gcg ggg ctg cag ggc gtg cac			1582	
Asp Lys Ala Arg Lys Ala Leu Asp Ala Ala Gly Leu Gln Gly Val His				
	515	520	525	
ctg ggg ggc aac tac gtc agc ggt gtg gcc ctg ggc aag gtg gtg gag			1630	
Leu Gly Gly Asn Tyr Val Ser Gly Val Ala Leu Gly Lys Val Val Glu				
	530	535	540	40
cac ggc tac gag tcc gca gcc aac ctg gcc aag agc gtg tcc aag gcc			1678	

His Gly Tyr Glu Ser Ala Ala Asn Leu Ala Lys Ser Val Ser Lys Ala

545

550

555

gca gtc aag gcc taa gggctgcag cagtagcagc agcagcatcg ggctgtagct 1733

Ala Val Lys Ala

560

563

ggtaaatgcc gcagtggcac cggcagcagc aattggcaag cacttggggc aagcggagtg 1793

gaggcgaggg gggggctacc attggcgctt gctgggatgt gtagt 1838

10

<210> 16

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

20

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA fragment having partial sequence of Chlamydomonas PPO gene

<400> 16

ggtcggtgga ggggatccga tgctggtagc cg 32

<210> 17

30

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA fragment having partial sequence of Chlamydomonas PPO gene

40

<400> 17

gctactgctg cgagctctta ggccttgact gc 32

<210> 18

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify Arabidopsis ferrochelata  
ase gene

<400> 18

gatcggttct gaaatttggga tccatgcagg c 31

20

<210> 19

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify Arabidopsis ferrochelata  
ase gene

30

<400> 19

cacaaaacca acgagctcct ataggttccg g 31

<210> 20

<211> 1401

40

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana WS

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(1401)

<400> 20

atg cag gca acg gct tta tca tct ggg ttc aat cct cta acg aaa cgt	48	
Met Gln Ala Thr Ala Leu Ser Ser Gly Phe Asn Pro Leu Thr Lys Arg		
1 5 10 15		
aaa gat cac aga ttt ccc agg tca tgc tct cag aga aat tct ctg tct	96	
Lys Asp His Arg Phe Pro Arg Ser Cys Ser Gln Arg Asn Ser Leu Ser		
20 25 30		20
ttg att caa tgc gat ata aaa gag aga tct ttc gga gag tct atg acg	144	
Leu Ile Gln Cys Asp Ile Lys Glu Arg Ser Phe Gly Glu Ser Met Thr		
35 40 45		
atc acg aat cgt gga ttg agt ttt aag acg aat gtg ttt gag caa gct	192	
Ile Thr Asn Arg Gly Leu Ser Phe Lys Thr Asn Val Phe Glu Gln Ala		
50 55 60		
cgt tct gtg act gga gac tgt tct tat gat gaa act tca gca aaa gca	240	30
Arg Ser Val Thr Gly Asp Cys Ser Tyr Asp Glu Thr Ser Ala Lys Ala		
65 70 75 80		
cgt tct cat gtt gtt gca gaa gat aag att ggt gtc ttg ctt ttg aat	288	
Arg Ser His Val Val Ala Glu Asp Lys Ile Gly Val Leu Leu Leu Asn		
85 90 95		
tta ggt ggt cct gaa act ctt aac gat gtt caa cct ttc ttg tat aat	336	
Leu Gly Gly Pro Glu Thr Leu Asn Asp Val Gln Pro Phe Leu Tyr Asn		40
100 105 110		

ctc ttt gct gat cgc gat att ata agg ctt cct aga cca ttt cag ttt	384	
Leu Phe Ala Asp Pro Asp Ile Ile Arg Leu Pro Arg Pro Phe Gln Phe		
115 120 125		
ctt caa ggg act ata gct aag ttt ata tct gtt gtt cgt gct ccg aaa	432	
Leu Gln Gly Thr Ile Ala Lys Phe Ile Ser Val Val Arg Ala Pro Lys		
130 135 140		
tct aaa gaa ggg tat gct gct att ggt ggt ggc tct cct ttg cgt aaa	480	10
Ser Lys Glu Gly Tyr Ala Ala Ile Gly Gly Gly Ser Pro Leu Arg Lys		
145 150 155 160		
ata act gat gag caa gcg gat gct att aag atg tct ttg caa gcg aag	528	
Ile Thr Asp Glu Gln Ala Asp Ala Ile Lys Met Ser Leu Gln Ala Lys		
165 170 175		
aac att gct gct aat gtc tat gtt ggt atg cgg tat tgg tat ccg ttc	576	
Asn Ile Ala Ala Asn Val Tyr Val Gly Met Arg Tyr Trp Tyr Pro Phe		20
180 185 190		
act gag gag gct gtt cag cag ata aag aag gac aaa att act aga ctt	624	
Thr Glu Glu Ala Val Gln Gln Ile Lys Lys Asp Lys Ile Thr Arg Leu		
195 200 205		
gtt gta ctg cca ttg tat cct cag tat tct atc tct aca acg ggt tca	672	
Val Val Leu Pro Leu Tyr Pro Gln Tyr Ser Ile Ser Thr Thr Gly Ser		30
210 215 220		
agc ata cgc gtt ctc caa gat tta ttc agg aaa gat ccg tac cta gct	720	
Ser Ile Arg Val Leu Gln Asp Leu Phe Arg Lys Asp Pro Tyr Leu Ala		
225 230 235 240		
gga gtg ccg gta gct att ata aag tcc tgg tac caa agg cga ggc tat	768	
Gly Val Pro Val Ala Ile Ile Lys Ser Trp Tyr Gln Arg Arg Gly Tyr		
245 250 255		
gtc aat tct atg gct gac ctc att gag aag gag ctt caa act ttc tct	816	40
Val Asn Ser Met Ala Asp Leu Ile Glu Lys Glu Leu Gln Thr Phe Ser		

260	265	270		
gat cct aag gag gtt atg ata ttc ttc agt gcc cat ggt gtt ccg gtc			864	
Asp Pro Lys Glu Val Met Ile Phe Phe Ser Ala His Gly Val Pro Val				
275	280	285		
agc tac gta gag aat gct gga gat ccg tac cag aag cag atg gaa gag			912	
Ser Tyr Val Glu Asn Ala Gly Asp Pro Tyr Gln Lys Gln Met Glu Glu				
290	295	300		10
tgt att gac ttg ata atg gaa gag cta aaa gcc aga ggg gtt ctt aac			960	
Cys Ile Asp Leu Ile Met Glu Glu Leu Lys Ala Arg Gly Val Leu Asn				
305	310	315	320	
gac cat aaa ttg gca tac cag agt cgt gtt ggc cct gtt caa tgg ctg			1008	
Asp His Lys Leu Ala Tyr Gln Ser Arg Val Gly Pro Val Gln Trp Leu				
325	330	335		
aag cca tac acc gat gag gtt ctt gtc gac ctt ggt aag agt ggt gtt			1056	20
Lys Pro Tyr Thr Asp Glu Val Leu Val Asp Leu Gly Lys Ser Gly Val				
340	345	350		
aag agt cta cta gcc gtt cca gtc agt ttc gtg agt gag cac att gag			1104	
Lys Ser Leu Leu Ala Val Pro Val Ser Phe Val Ser Glu His Ile Glu				
355	360	365		
aca ctt gag gag ata gac atg gag tat agg gaa tta gct ctt gag tca			1152	
Thr Leu Glu Glu Ile Asp Met Glu Tyr Arg Glu Leu Ala Leu Glu Ser				30
370	375	380		
ggg gta gag aac tgg gga cgg gta ccc gcg cta ggt ctc aca cca tcc			1200	
Gly Val Glu Asn Trp Gly Arg Val Pro Ala Leu Gly Leu Thr Pro Ser				
385	390	395	400	
ttc atc acc gac tta gct gat gca gtg ata gaa tca ctt cct tca gca			1248	
Phe Ile Thr Asp Leu Ala Asp Ala Val Ile Glu Ser Leu Pro Ser Ala				
405	410	415		40
gaa gca atg tca aac cca aat gca gig gtt gac tca gaa gat agc gag			1296	

Glu Ala Met Ser Asn Pro Asn Ala Val Val Asp Ser Glu Asp Ser Glu  
                   420                                  425                                  430  
 tcg tca gat gct ttc agt tac att gtc aag atg ttc ttc ggt tcg att 1344  
 Ser Ser Asp Ala Phe Ser Tyr Ile Val Lys Met Phe Phe Gly Ser Ile  
                   435                                  440                                  445  
 ctg gct ttc gtc cta ctt ctc tcc cca aag atg ttc cat gcg ttc cgg 1392  
 Leu Ala Phe Val Leu Leu Leu Ser Pro Lys Met Phe His Ala Phe Arg 10  
                   450                                  455                                  460  
 aac cta tag 1401  
 Asn Leu  
 465  
  
 <210> 21  
 <211> 30 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Designed oligonucleotide primer to amplify Soybean coproporphyrino  
 gen III oxidase gene 30  
  
 <400> 21  
 gaatcggatc cgaagcatga tgcattgtgc 30  
  
 <210> 22  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence 40

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify Soybean coproporphyrino gen III oxidase gene

<400> 22

gggggctcgac tgatgaatta gatccattcc 30

10

<210> 23

<211> 1158

<212> DNA

<213> Glycine max cv. Jack

<220>

<221> CDS

20

<222> (1)... (1158)

<400> 23

atg atg cat tgt gcg agc att gtc tcg gct ccg tcc tac gcg ttc cct	48
Met Met His Cys Ala Ser Ile Val Ser Ala Pro Ser Tyr Ala Phe Pro	
1 5 10 15	

ttt ctc tct ggc tcc gct tcc act act cca act gcg atc tcg ctc act	96	30
Phe Arg Ser Gly Ser Ala Ser Thr Thr Pro Thr Ala Ile Ser Leu Thr		
20 25 30		

aag cgc agt tgg aag cca cct ccg agc atg gca aaa ggc cca gtc aga	144
Lys Arg Ser Trp Lys Pro Pro Pro Ser Met Ala Lys Gly Pro Val Arg	
35 40 45	

gcc acc gtt tct ata gag aaa gag acc ccg gag gcc aat cgt ccc gaa	192	40
Ala Thr Val Ser Ile Glu Lys Glu Thr Pro Glu Ala Asn Arg Pro Glu		
50 55 60		

acg ttt ctc aga gga gtg gac gag gcc cag tct tcc act tcg gtt cgg	240	
Thr Phe Leu Arg Gly Val Asp Glu Ala Gln Ser Ser Thr Ser Val Arg		
65 70 75 80		
gcc cgc ttc gag aag atg ata agg gag gcc cag gac acc gtg tgc agt	288	
Ala Arg Phe Glu Lys Met Ile Arg Glu Ala Gln Asp Thr Val Cys Ser		
85 90 95		
gcc ctc gag gcc gct gat ggt ggg gcc cag ttc aag gag gac gtt tgg	336	10
Ala Leu Glu Ala Ala Asp Gly Gly Ala Gln Phe Lys Glu Asp Val Trp		
100 105 110		
tcc agg ccc ggt ggc ggc ggt ggc att agc agg gtc ctt caa gac ggt	384	
Ser Arg Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ile Ser Arg Val Leu Gln Asp Gly		
115 120 125		
gcc gtt tgg gag aag gct ggg gtt aat gtc tct gtt gtt tac ggt gtc	432	20
Ala Val Trp Glu Lys Ala Gly Val Asn Val Ser Val Val Tyr Gly Val		
130 135 140		
atg cca cct gac gca tat cgt gct gcc aag ggt gtt cct acc gat caa	480	
Met Pro Pro Asp Ala Tyr Arg Ala Ala Lys Gly Val Pro Thr Asp Gln		
145 150 155 160		
aaa cct ggt cct gtg cct ttc ttc gct gct gga atc agc tcc gtt tta	528	
Lys Pro Gly Pro Val Pro Phe Phe Ala Ala Gly Ile Ser Ser Val Leu		
165 170 175		30
cac cca aag aac ccg ttt gcc cct acc cta cat ttc aac tat cgc tat	576	
His Pro Lys Asn Pro Phe Ala Pro Thr Leu His Phe Asn Tyr Arg Tyr		
180 185 190		
ttt gaa acc gat gct cct aaa ggt gct cct gga gca cct aga caa tgg	624	
Phe Glu Thr Asp Ala Pro Lys Gly Ala Pro Gly Ala Pro Arg Gln Trp		
195 200 205		
tgg ttt ggt ggg gga act gac ttg aca cca gct tac att ttt gag gag	672	40
Trp Phe Gly Gly Gly Thr Asp Leu Thr Pro Ala Tyr Ile Phe Glu Glu		

210	215	220		
gat gtt aag cac ttc cat tca att caa aaa caa gcc tgt gac aag ttt			720	
Asp Val Lys His Phe His Ser Ile Gln Lys Gln Ala Cys Asp Lys Phe				
225	230	235	240	
gaa cct act ttt tac ccc cga ttc aag aaa tgg tgt gat gat tac ttt			768	
Glu Pro Thr Phe Tyr Pro Arg Phe Lys Lys Trp Cys Asp Asp Tyr Phe				
	245	250	255	10
tat atc aag cat cga ggt gaa agg aga ggg ctt gga gga ata ttt ttt			816	
Tyr Ile Lys His Arg Gly Glu Arg Arg Gly Leu Gly Gly Ile Phe Phe				
	260	265	270	
gat gat ctt aat gac tat gat cag gag atg ctc ctt tcc ttt gct act			864	
Asp Asp Leu Asn Asp Tyr Asp Gln Glu Met Leu Leu Ser Phe Ala Thr				
	275	280	285	
ggt tgt gca aat tct gtt att cct gct tat tta cct atc ata gag aaa			912	20
Gly Cys Ala Asn Ser Val Ile Pro Ala Tyr Leu Pro Ile Ile Glu Lys				
	290	295	300	
agg aag gat ttg ccc ttc aat gat cat cag aaa gca tgg caa caa ttg			960	
Arg Lys Asp Leu Pro Phe Asn Asp His Gln Lys Ala Trp Gln Gln Leu				
305	310	315	320	
cga agg gga cga tat gtt gaa ttc aat ttg gta tat gat agg ggt aca			1008	
Arg Arg Gly Arg Tyr Val Glu Phe Asn Leu Val Tyr Asp Arg Gly Thr				30
	325	330	335	
aca ttt gga ctg aaa act gga ggg aga ata gag agt ata ctt gtt tct			1056	
Thr Phe Gly Leu Lys Thr Gly Gly Arg Ile Glu Ser Ile Leu Val Ser				
	340	345	350	
ctc cca ctg act gct cgg tgg gaa tac gat cat aaa ccg gaa gaa gga			1104	
Leu Pro Leu Thr Ala Arg Trp Glu Tyr Asp His Lys Pro Glu Glu Gly				
	355	360	365	40
agc gaa gaa tgg aaa ctc ttg gac gca tgc atc aac ccc aag gaa tgg			1152	

Ser Glu Glu Trp Lys Leu Leu Asp Ala Cys Ile Asn Pro Lys Glu Trp

370

375

380

atc taa

1158

Ile

385

【図面の簡単な説明】

10

【図 1】プラスミドpCREPSの制限酵素地図を示す。CTP-EPSPSはペチュニア由来のEPSPSの葉緑体トランジットペプチドをコードする塩基配列の下流にアグロバクテリウム由来のEPSPS遺伝子が結合されたキメラ遺伝子であり、lac proはラクトースオペロンのプロモーター配列を意味する。また、Amp<sup>r</sup>はアンピシリン耐性遺伝子、Km<sup>r</sup>はカナマイシン耐性遺伝子、oriは複製開始点を表す。

【図 2】プラスミドpTCHLH1の制限酵素地図を示す。TCHLHは葉緑体移行シグナルを欠失したタバコマグネシウムケラターゼのプロトポルフィリンIX結合サブユニット遺伝子であり、lac proはラクトースオペロンのプロモーター配列を意味する。また、Amp<sup>r</sup>はアンピシリン耐性遺伝子、Km<sup>r</sup>はカナマイシン耐性遺伝子、oriは複製開始点を表す。

【図 3】プラスミドpNG01の制限酵素地図を示す。NPはノパリン合成酵素遺伝子のプロモーター配列を、NTはノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター配列を、35Sはカリフラワーモザイクウィルスの35Sプロモーターを意味する。また、NPTIIはカナマイシン耐性遺伝子、GUSは -glucuronidase遺伝子、RB及びLBはT-DNAの左右境界配列を表す。

20

【図 4】プラスミドpNG04の制限酵素地図を示す。NPはノパリン合成酵素遺伝子のプロモーター配列を、NTはノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター配列を、35Sはカリフラワーモザイクウィルスの35Sプロモーターを意味する。また、NPTIIはカナマイシン耐性遺伝子、GUSは -glucuronidase遺伝子、RB及びLBはT-DNAの左右境界配列を表す。

【図 5】プラスミドpNT35Sの制限酵素地図を示す。NTはノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター配列を、35Sはカリフラワーモザイクウィルスの35Sプロモーターを、lac proはラクトースオペロンのプロモーター配列を意味する。また、Amp<sup>r</sup>はアンピシリン耐性遺伝子、oriは複製開始点を表す。

30

【図 6】プラスミドpCENSの制限酵素地図を示す。CTP-EPSPSはペチュニア由来のEPSPSの葉緑体トランジットペプチドをコードする塩基配列の下流にアグロバクテリウム由来のEPSPS遺伝子が結合されたキメラ遺伝子であり、NTはノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター配列を、35Sはカリフラワーモザイクウィルスの35Sプロモーターを、lac proはラクトースオペロンのプロモーター配列を意味する。また、Amp<sup>r</sup>はアンピシリン耐性遺伝子、oriは複製開始点を表す。

【図 7】プラスミドpCENSKの制限酵素地図を示す。CTP-EPSPSはペチュニア由来のEPSPSの葉緑体トランジットペプチドをコードする塩基配列の下流にアグロバクテリウム由来のEPSPS遺伝子が結合されたキメラ遺伝子であり、NTはノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター配列を、35Sはカリフラワーモザイクウィルスの35Sプロモーターを、lac proはラクトースオペロンのプロモーター配列を意味する。また、Amp<sup>r</sup>はアンピシリン耐性遺伝子、oriは複製開始点を表す。

40

【図 8】プラスミドpBICEの制限酵素地図を示す。CTP-EPSPSはペチュニア由来のEPSPSの葉緑体トランジットペプチドをコードする塩基配列の下流にアグロバクテリウム由来のEPSPS遺伝子が結合されたキメラ遺伝子であり、NPはノパリン合成酵素遺伝子のプロモーター配列を、NTはノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター配列を、35Sはカリフラワーモザイクウィルスの35Sプロモーターを意味する。また、NPTIIはカナマイシン耐性遺伝子、RB及びLBはT-DNAの左右境界配列を表す。

【図 9】プラスミドpNOの制限酵素地図を示す。NPはノパリン合成酵素遺伝子のプロモ

50

ター配列を、NTはノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター配列を、35Sはカリフラワーモザイクウィルスの35Sプロモーターを意味する。また、NPTIIはカナマイシン耐性遺伝子、RB及びLBはT-DNAの左右境界配列を表す。

【図10】プラスミドpBITCHLHの制限酵素地図を示す。TCHLHは葉緑体移行シグナルを欠失したタバコマグネシウムケラターゼのプロトポルフィリンIX結合サブユニット遺伝子であり、NPはノパリン合成酵素遺伝子のプロモーター配列を、NTはノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター配列を、35Sはカリフラワーモザイクウィルスの35Sプロモーターを意味する。また、NPTIIはカナマイシン耐性遺伝子、RB及びLBはT-DNAの左右境界配列を表す。

【図11】プラスミドpBICETCHの制限酵素地図を示す。CTP-EPSPSはペチュニア由来のEPSPSの葉緑体トランジットペプチドをコードする塩基配列の下流にアグロバクテリウム由来のEPSPS遺伝子が結合されたキメラ遺伝子であり、TCHLHは葉緑体移行シグナルを欠失したタバコマグネシウムケラターゼのプロトポルフィリンIX結合サブユニット遺伝子である。NPはノパリン合成酵素遺伝子のプロモーター配列を、NTはノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター配列を、35Sはカリフラワーモザイクウィルスの35Sプロモーターを意味する。また、NPTIIはカナマイシン耐性遺伝子、RB及びLBはT-DNAの左右境界配列を表す。

【図12】プラスミドpACYCSPの制限酵素地図を示す。PPOはダイズのプロトポルフィリンIXオキシダーゼ遺伝子であり、lac proラクトースオペロンのプロモーター配列を意味する。また、Cm<sup>r</sup>はクロランフェニコール耐性遺伝子、oriは複製開始点を表す。

【図13】プラスミドpTVGMPの制限酵素地図を示す。GMPは葉緑体移行シグナルとFAD結合配列を欠失したダイズPPO遺伝子であり、lac proはラクトースオペロンのプロモーター配列を意味する。また、Amp<sup>r</sup>はアンピシリン耐性遺伝子、oriは複製開始点を表す。

【図14】プラスミドpBIGMPの制限酵素地図を示す。GMPは葉緑体移行シグナルとFAD結合配列とを欠失したダイズPPO遺伝子であり、NPはノパリン合成酵素遺伝子のプロモーター配列を、NTはノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター配列を、35Sはカリフラワーモザイクウィルスの35Sプロモーターを意味する。また、NPTIIはカナマイシン耐性遺伝子、RB及びLBはT-DNAの左右境界配列を表す。

【図15】プラスミドpBICEGMPの制限酵素地図を示す。CTP-EPSPSはペチュニア由来のEPSPSの葉緑体トランジットペプチドをコードする塩基配列の下流にアグロバクテリウム由来のEPSPS遺伝子が結合されたキメラ遺伝子であり、GMPは葉緑体移行シグナルとFAD結合配列とを欠失したダイズPPO遺伝子である。NPはノパリン合成酵素遺伝子のプロモーター配列を、NTはノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター配列を、35Sはカリフラワーモザイクウィルスの35Sプロモーターを意味する。また、NPTIIはカナマイシン耐性遺伝子、RB及びLBはT-DNAの左右境界配列を表す。

【図16】プラスミドpTVCRPの制限酵素地図を示す。CRPは葉緑体移行シグナルとFAD結合配列とを欠失したコナミドリムシPPO遺伝子であり、lac proはラクトースオペロンのプロモーター配列を意味する。また、Amp<sup>r</sup>はアンピシリン耐性遺伝子、oriは複製開始点を表す。

【図17】プラスミドpBICRPの制限酵素地図を示す。CRPは葉緑体移行シグナルとFAD結合配列とを欠失したコナミドリムシPPO遺伝子であり、NPはノパリン合成酵素遺伝子のプロモーター配列を、NTはノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター配列を、35Sはカリフラワーモザイクウィルスの35Sプロモーターを意味する。また、NPTIIはカナマイシン耐性遺伝子、RB及びLBはT-DNAの左右境界配列を表す。

【図18】プラスミドpBICECRPの制限酵素地図を示す。CTP-EPSPSはペチュニア由来のEPSPSの葉緑体トランジットペプチドをコードする塩基配列の下流にアグロバクテリウム由来のEPSPS遺伝子が結合されたキメラ遺伝子であり、CRPは葉緑体移行シグナルとFAD結合配列とを欠失したコナミドリムシPPO遺伝子である。NPはノパリン合成酵素遺伝子のプロモーター配列を、NTはノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター配列を、35Sはカリフラワーモザイクウィルスの35Sプロモーターを意味する。また、NPTIIはカナマイシン耐性遺伝子、RB及びLBはT-DNAの左右境界配列を表す。

10

20

30

40

50

【図19】プラスミドpCRATFの制限酵素地図を示す。ATFは葉緑体局在型のシロイヌナズナフェロケラターゼ遺伝子であり、lac proはラクトースオペロンのプロモーター配列を意味する。また、Amp<sup>r</sup>はアンピシリン耐性遺伝子、Km<sup>r</sup>はカナマイシン耐性遺伝子、oriは複製開始点を表す。

【図20】プラスミドpBIATFの制限酵素地図を示す。ATFは葉緑体局在型のシロイヌナズナフェロケラターゼ遺伝子であり、NPはノパリン合成酵素遺伝子のプロモーター配列を、NTはノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター配列を、35Sはカリフラワーモザイクウィルスの35Sプロモーターを意味する。また、NPTIIはカナマイシン耐性遺伝子、RB及びLBはT-DNAの左右境界配列を表す。

【図21】プラスミドpBICEATFの制限酵素地図を示す。CTP-EPSPSはペチュニア由来のEPSPSの葉緑体トランジットペプチドをコードする塩基配列の下流にアグロバクテリウム由来のEPSPS遺伝子が結合されたキメラ遺伝子であり、ATFは葉緑体局在型のシロイヌナズナフェロケラターゼ遺伝子である。NPはノパリン合成酵素遺伝子のプロモーター配列を、NTはノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター配列を、35Sはカリフラワーモザイクウィルスの35Sプロモーターを意味する。また、NPTIIはカナマイシン耐性遺伝子、RB及びLBはT-DNAの左右境界配列を表す。

10

【図22】プラスミドpCRSCPOXの制限酵素地図を示す。SCPOXはダイズのコプロポルフィリノーゲンIIIオキシダーゼ遺伝子であり、lac proはラクトースオペロンのプロモーター配列を意味する。また、Amp<sup>r</sup>はアンピシリン耐性遺伝子、Km<sup>r</sup>はカナマイシン耐性遺伝子、oriは複製開始点を表す。

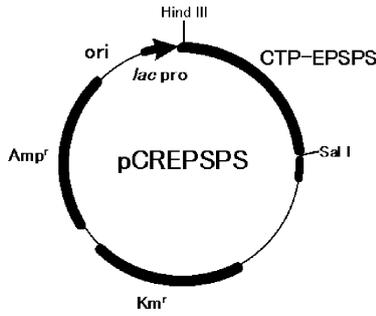
20

【図23】プラスミドpBISCPOXの制限酵素地図を示す。SCPOXはダイズのコプロポルフィリノーゲンIIIオキシダーゼ遺伝子であり、NPはノパリン合成酵素遺伝子のプロモーター配列を、NTはノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター配列を、35Sはカリフラワーモザイクウィルスの35Sプロモーターを意味する。また、NPTIIはカナマイシン耐性遺伝子、RB及びLBはT-DNAの左右境界配列を表す。

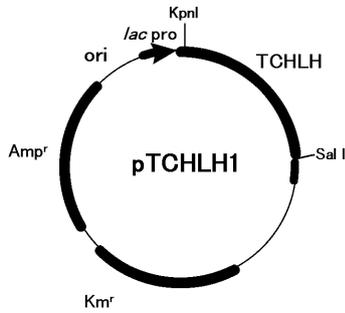
【図24】プラスミドpBICESCPOXの制限酵素地図を示す。CTP-EPSPSはペチュニア由来のEPSPSの葉緑体トランジットペプチドをコードする部分塩基配列の下流にアグロバクテリウム由来のEPSPS遺伝子が結合されたキメラ遺伝子であり、SCPOXはダイズのコプロポルフィリノーゲンIIIオキシダーゼ遺伝子である。NPはノパリン合成酵素遺伝子のプロモーター配列を、NTはノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター配列を、35Sはカリフラワーモザイクウィルスの35Sプロモーターを意味する。また、NPTIIはカナマイシン耐性遺伝子、RB及びLBはT-DNAの左右境界配列を表す。

30

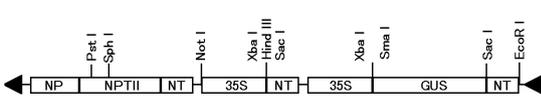
【 1 】



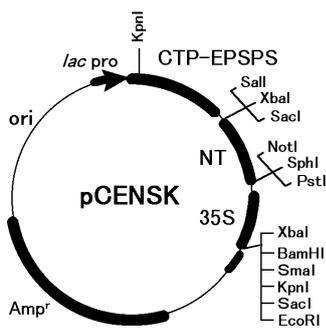
【 2 】



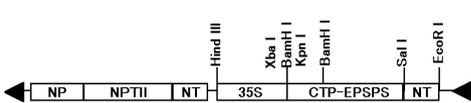
【 3 】



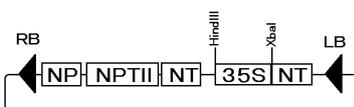
【 7 】



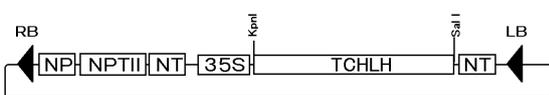
【 8 】



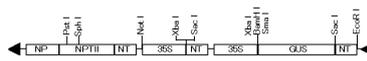
【 9 】



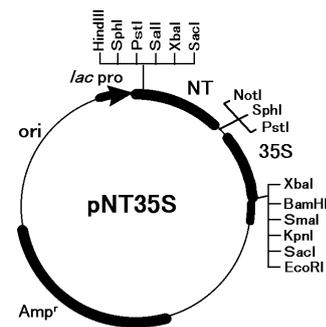
【 10 】



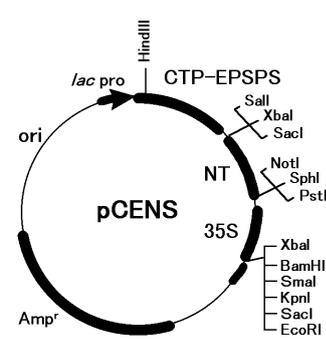
【 4 】



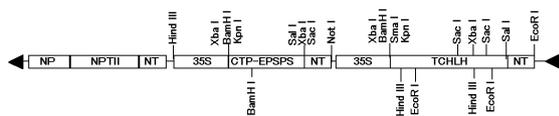
【 5 】



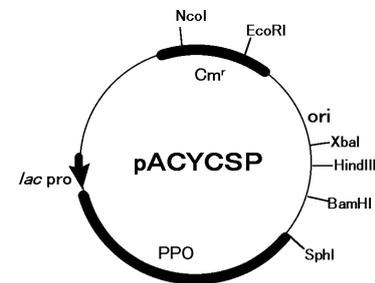
【 6 】



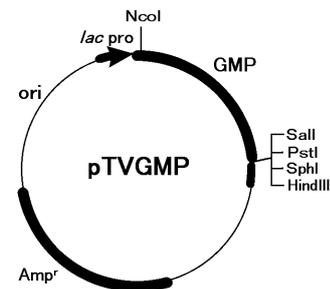
【 11 】



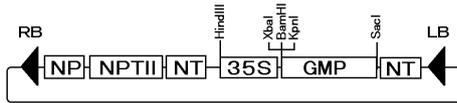
【 12 】



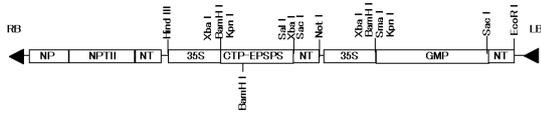
【 13 】



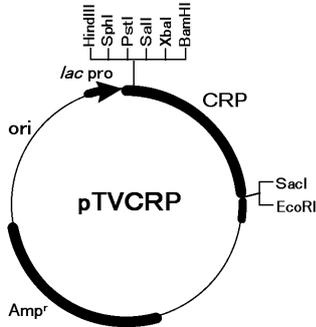
【 14 】



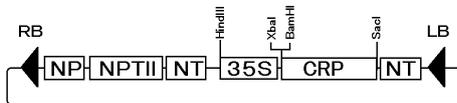
【 15 】



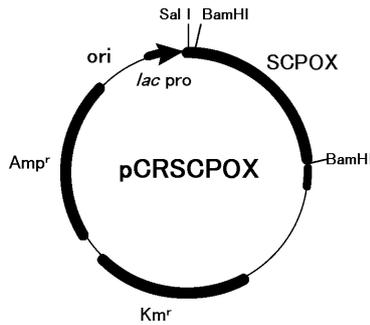
【 16 】



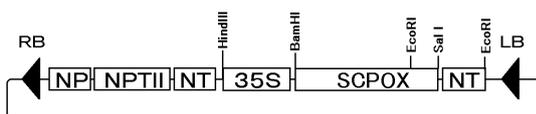
【 17 】



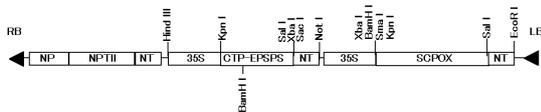
【 22 】



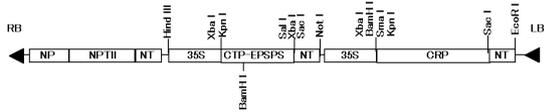
【 23 】



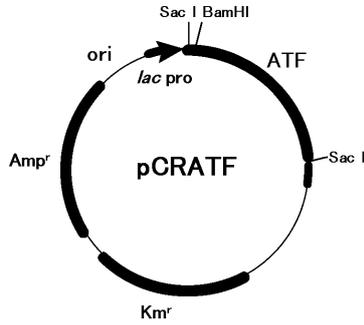
【 24 】



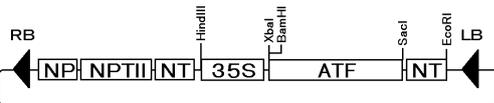
【 18 】



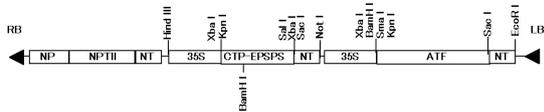
【 19 】



【 20 】



【 21 】



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		
<b>C 1 2 N 15/09</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00	Z N A A	
A 0 1 N 57/20	(2006.01)	A 0 1 N 57/20	G	

(56)参考文献 国際公開第98/002562(WO, A1)  
 特表平10-502524(JP, A)  
 J.Plant Biochem.Biotechnol., 1998年, Vol.7, p.65-72  
 植物の化学調節, 1994年, Vol.29, No.1, p.79-87  
 Plant Physiol., 1994年, Vol.104, p.639-648  
 Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1995年, Vol.92, p.1941-1944  
 Plant J., 1997年, Vol.12, No.5, p.981-990  
 J.Biol.Chem., 1994年, Vol.269, No.18, p.13405-13413

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A01H 5/00  
 C12N 1/00-15/90  
 A01N 57/20  
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)  
 GenBank/GeneSeq  
 BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)