

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-527081

(P2015-527081A)

(43) 公表日 平成27年9月17日(2015.9.17)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 B O 3 0
C 1 2 N 1/13 (2006.01)	C 1 2 N 1/13	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 5 0
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 B O 6 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 3	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 118 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-531197 (P2015-531197)
 (86) (22) 出願日 平成25年9月5日 (2013.9.5)
 (85) 翻訳文提出日 平成27年4月16日 (2015.4.16)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2013/058267
 (87) 国際公開番号 W02014/039684
 (87) 国際公開日 平成26年3月13日 (2014.3.13)
 (31) 優先権主張番号 61/697, 854
 (32) 優先日 平成24年9月7日 (2012.9.7)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/820, 260
 (32) 優先日 平成25年5月7日 (2013.5.7)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 501035309
 ダウ アグロサイエンシズ エルエルシー
 アメリカ合衆国 インディアナ州 46268,
 インディアナポリス, ジオンスヴィレ
 ロード, 9330
 (71) 出願人 508241200
 サンガモ バイオサイエンシズ, イン
 コーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 リッ
 チモンド カナル プールバード 501
 ポイント リッチモンド テク センタ
 ー スト エー100
 (74) 代理人 100092783
 弁理士 小林 浩

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 FAD3性能座および標的化切断を誘導可能である対応する標的的部位特異的結合タンパク質

(57) 【要約】

部位特異的様式で細胞中のFAD3遺伝子中の位置を切断して、FAD3遺伝子中の切れ目を生成し、次いで対象となる1つまたはそれ以上の形質に関連する核酸分子を切れ目に連結することによる、FAD3座中の遺伝子編集または遺伝子スタッキングの方法が開示される。

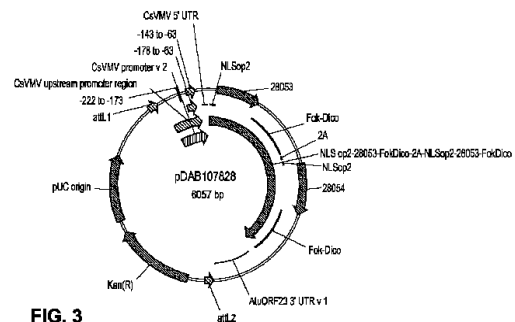


FIG. 3

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞のゲノムを改変する方法であって

細胞中の F A D 3 遺伝子中の標的部位を部位特異的様式で切断して、それによって前記 F A D 3 遺伝子中の切れ目を生成する工程を含み、

前記 F A D 3 遺伝子は切断後に改変される、方法。

【請求項 2】

対象となる核酸配列を前記切れ目に組み込む工程をさらに含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記 F A D 3 遺伝子は、F A D 3 A 遺伝子、F A D 3 A ' 遺伝子、F A D 3 A ' ' 遺伝子、F A D 3 C 遺伝子、F A D 3 C ' ' 遺伝子および / または F A D 3 C ' 遺伝子である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

10

【請求項 4】

前記部位特異的様式で切断することが、D N A 結合ドメインおよび切断ドメイン若しくは切断ハーフドメインを含む融合タンパク質、又は前記融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを前記細胞に導入する工程を含み、

前記融合タンパク質は、前記標的部位に対する特異性によって結合し、前記標的部位またはその近くを切断して、それによって前記切れ目を生成する、請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

前記 D N A 結合ドメインは、メガヌクレアーゼ D N A 結合ドメイン、ロイシンジッパー D N A 結合ドメイン、転写活性化物質様 (T A L) D N A 結合ドメイン、R N A ガイド化 C R I S P R - C a s 9、リコンビナーゼ、ジンクフィンガータンパク質 D N A 結合ドメイン、およびこれらのいずれかのキメラ組み合わせからなる群から選択される、請求項 4 に記載の方法。

20

【請求項 6】

前記切断ドメインまたは切断ハーフドメインは、I I S 型制限エンドヌクレアーゼからの切断ハーフドメイン、F o k I エンドヌクレアーゼからの切断ハーフドメイン、S t s I エンドヌクレアーゼからの切断ハーフドメイン、およびホーミングエンドヌクレアーゼからなる群から選択される、請求項 4 または請求項 5 に記載の方法。

30

【請求項 7】

前記融合タンパク質はジンクフィンガーヌクレアーゼである、請求項 4 から 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

前記ジンクフィンガーヌクレアーゼは 3 ~ 6 個のジンクフィンガードメインを含み、各ジンクフィンガードメインがヘリックス認識領域を含み、前記ジンクフィンガータンパク質は表 3 の一列中に整列され示される前記ヘリックス認識領域を含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記部位特異的様式で切断することは、F A D 3 A、F A D 3 A '、F A D 3 A ' '、F A D 3 C、F A D 3 C ' ' および / または F A D 3 C ' のいくつかであるが全てではないコピーに特異的である、請求項 1 から 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 10】

前記標的部位は、配列番号 20 ~ 23、配列番号 25 ~ 38、配列番号 40 ~ 45、配列番号 47 および配列番号 49 からなる群から選択される、請求項 1 から 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

前記細胞は植物、真菌、細菌または藻類細胞である、請求項 1 から 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

50

前記植物細胞は単子葉植物細胞または双子葉植物細胞である、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記植物細胞は、アブラナ属の種、セイヨウアブラナ；ブラシカ・ラパ；カラシナ（*Brassica juencea*）；ブラシカ・オレセア（*Brassica oleracea*）；クロガラシ（*Brassica nigra*）；トウモロコシ属の種；トウモロコシ；ダイズ属の種；ダイズ（*Glycine max*）；コムギ属の種；コムギ（*Triticum aestivum*）；イネ属の種；イネ（*Oryza sativa*）；トリティカエ属（*Triticae*）の種；トリティカエ・トリティクム（*Triticae triticum*）；ヘリアンテアエ属（*Heliantheae*）の種；ヘリアンテアエ・ヘリアンサス（*Heliantheae helianthus*）；ワタ属の種；ワタ（*Gossypium hirsutum*）；およびオオムギ（*Hordeum vulgare*）からなる群から選択される、請求項 1 2 に記載の方法。

10

【請求項 1 4】

前記対象となる核酸配列は、標的部に結合する DNA 結合ドメインを含む配列、1 つまたはそれ以上の殺虫剤耐性遺伝子、1 つまたはそれ以上の除草剤耐性遺伝子、1 つまたはそれ以上の窒素利用効率遺伝子、1 つまたはそれ以上の水利用効率遺伝子、1 つまたはそれ以上の栄養価遺伝子、1 つまたはそれ以上の DNA 結合遺伝子、1 つまたはそれ以上の選択可能なマーカー遺伝子、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 2 から 1 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 5】

請求項 1 から 1 4 のいずれか 1 項に記載の方法によって改変された細胞を含む細胞、種子または植物。

20

【請求項 1 6】

FAD3A 遺伝子、FAD3A' 遺伝子、FAD3A'' 遺伝子、FAD3C 遺伝子、FAD3C'' 遺伝子および/または FAD3C' 遺伝子の 1 つ以上のコピーに組み込まれた対象となるヌクレオチド配列を含むトランスジェニック細胞、種子または植物である請求項 1 5 に記載の細胞、種子または植物。

【請求項 1 7】

前記ヌクレオチド配列は前記細胞と異種性または相同性である、請求項 1 6 に記載の細胞、種子または植物。

【請求項 1 8】

前記相同性配列は少なくとも 1 つの一塩基多型を含む、請求項 1 4 に記載の細胞、種子または植物。

30

【請求項 1 9】

前記核酸配列は、配列番号 20 ~ 23、配列番号 25 ~ 38、配列番号 40 ~ 45、配列番号 47 および配列番号 49 からなる群から選択される標的部またはその近くで組み込まれた、請求項 1 6 から 1 8 のいずれか 1 項に記載の細胞、種子または植物。

【請求項 2 0】

配列番号 20 ~ 23、配列番号 25 ~ 38、配列番号 40 ~ 45、配列番号 47 および配列番号 49 からなる群から選択される核酸標的部またはその近くを切断する部位特異的ジंकフィンガーヌクレアーゼ。

40

【請求項 2 1】

前記ジंकフィンガーヌクレアーゼは 3 ~ 6 個のジंकフィンガードメインを含み、各ジंकフィンガードメインがヘリックス認識領域を含み、前記ジंकフィンガータンパク質は表 3 の一列に整列され示される前記ヘリックス認識領域を含む、請求項 2 0 に記載のジंकフィンガーヌクレアーゼ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、これによりその開示の全体が参照により組み込まれる、2012年9月7日

50

出願の米国仮特許出願第 6 1 / 6 9 7 , 8 5 4 号の利益、およびこれによりその開示の全体が参照により組み込まれる、2 0 1 3 年 5 月 7 日出願の米国仮特許出願第 6 1 / 8 2 0 , 2 6 0 号に対する優先権を主張するものである。

【 0 0 0 2 】

本開示は、概して組換え植物技術に使用するため（例えば、トランスジェニック植物を産生するため）の組成物および方法に関する。より具体的には、本開示は、対象となる任意の核酸の部位特異的導入に使用され得るゲノム中の座を含む植物細胞および植物に関する。

【 背景技術 】

【 0 0 0 3 】

多くの植物が、例えば、農業的価値を改善するために、望ましい形質を導入するために外因性核酸（例えば、導入遺伝子）で遺伝的に形質転換されている。遺伝子形質転換を通して達成され得る農業的価値の改善の例は、改善した栄養価、増加した収量、有害生物または病気耐性、乾燥およびストレス耐性、改善した園芸品質（例えば、改善した色素沈着および/または成長）、除草剤耐性、植物からの産業上有用な化合物および/または材料の製造、ならびに/あるいは医薬品の製造を含む。クローニング遺伝子の植物細胞への導入および安定な繁殖可能なトランスジェニック植物の回収が、植物の遺伝子改変を複数世代を通して安定にし、それによって作物植物の遺伝子操作を可能にするために使用され得る。

【 0 0 0 4 】

遺伝子形質転換およびトランスジェニック植物産生のための方法では、外因性 DNA が真核植物細胞の核またはプラスミド DNA に典型的にはランダムに導入され、引き続いて組み込まれた外因性 DNA を含む細胞が単離され、その後安定に形質転換した植物が再生される。トランスジェニック植物は、典型的にはアグロバクテリウム媒介形質転換技術によって産生された。これらの技術での成功が、対象となる核酸分子を植物のゲノムに導入するための他の方法、例えば、プロトプラストへの PEG 媒介 DNA 取り込み、微粒子銃およびケイ素ウイスキー媒介形質転換の開発を刺激した。

【 0 0 0 5 】

しかしながら、これらの植物形質転換法の全てにおいて、植物ゲノムに組み込まれる外因性核酸は、植物細胞のゲノムにランダムに、かつ予測不可能なコピー数で組み込まれる。Terada et al.(2002) Nat Biotechnol 20(10):1030 ; Terada et al.(2007) Plant Physiol 144(2):846 ; D'Halluin et al.(2008) Plant Biotechnology J.6(1):93。例えば、導入遺伝子はしばしば、導入遺伝子全体またはその一部の配列反復の形態で組み込まれる。このような複雑な組込みパターンは、一般的に（例えば、転写後遺伝子サイレンシング機構を通じた転写 RNA の破壊により、または組み込まれた DNA のメチル化の誘導により）組み込まれた核酸の発現レベルに悪影響を及ぼす。また、組込み部位の位置が一般的に組み込まれた核酸の発現レベルに影響を及ぼす。さらに、外因性 DNA の組込みは、組込みが起こるゲノムの領域に破壊性効果をもたらし、それによって標的領域の正常な機能に影響を及ぼすまたはこれを妨害して望ましくない副作用をもたらし得る。前記を含む因子の組み合わせは、同じ方法によって作成されたものでさえ、異なるトランスジェニック植物細胞と植物系統との間で導入遺伝子または外因性 DNA の発現レベル（および農学的品質全体）における広い変動をもたらす。組込みがランダムであるために、これらの効果は専門家によって制御され得ないが、専門家は望ましい特性を有する新規な植物を産生しようと試みている。

【 0 0 0 6 】

前記の考慮は、特定の外因性核酸を植物に導入することの効果は調査される場合であっても、有意な結果を得るために、多数のトランスジェニック植物系統が産生および分析されなければならないことを要する。同様に、所望の表現型を有するトランスジェニック植物を提供するための特定の組み込まれた核酸を含むトランスジェニック植物の産生においては、核酸の最適な発現を有する、ならびにトランスジェニック植物の表現型および性能

10

20

30

40

50

全体への副作用が最小であるまたは無い植物系統の選択を可能にするために、大集団の独立に作成されたトランスジェニック植物系統が作成されなければならない。これらの実際的な考慮は、複数の外因性核酸を挿入することによって（例えば、遺伝子スタッキング）作成されるトランスジェニック植物においてさらなる重要性を帯びる。このような植物では、現象、例えば、転写後遺伝子サイレンシングが増幅され得る。

【0007】

植物への導入遺伝子挿入を制御しようとしていくつかの方法が開発されてきた。例えば、Kumar and Fladung (2001) Trends Plant Sci.6:155-9を参照されたい。これらの方法は、原核生物と下等真核生物の両方でうまく適用されてきた相同組換えに基づく導入遺伝子組込みに頼るものである。Paszkowski et al.(1988) EMBO J.7:4021-6。しかしながら、植物では近年まで、導入遺伝子組込みのための支配的機構は、組換えDNA鎖間の相同性をほとんど伴わない非正統的組換えに基づいてきた。そのため、この分野での主な課題は、非正統的組換えを介したずっと効率的な組込みイベントによって隠されている、まれな相同組換えイベントの検出および選択的産生である。さらに、標的化された相同組換えイベントの選択的産生および検出が達成されたとしても、この戦略の最大の利益を実現するために、このイベントが宿主ゲノム中の望ましい位置に標的化されなければならない。

10

【0008】

例えば、標的化された遺伝子形質転換の想定される利益は、ランダムな組込みから得られる形質転換イベントと比べた、導入遺伝子発現のイベント間変動性の減少である。さらなる想定される利益は、導入された核酸をスクリーニングし、形質転換構築物をソートし、得られたトランスジェニック植物の望ましい特徴全体に寄与するイベントをもたらすために要求されるイベントの数の有意な減少である。これらの利益を実現するために要求される重要な因子は、導入遺伝子性能が一貫しており、可能であれば宿主植物に対する有害効果が排除または最小化されるゲノム中の特異的位置の同定である。

20

【0009】

近年、ゲノムDNAの標的化切断のための方法および組成物が記載されている。例えば、標的化突然変異誘発を誘導し、細胞DNA配列の標的化欠失を誘導し、かつ所定の染色体座において標的化組換えおよび組込みを促進するために、このような標的化切断イベントが使用され得る。例えば、全ての目的のためにその開示の全体が参照により組み込まれる、Urnov et al.(2010) Nature 435(7042):646-51；米国特許出願公開第20030232410号明細書；第20050208489号明細書；第20050026157号明細書；第20050064474号明細書；第20060188987号明細書；第20090263900号明細書；第20090117617号明細書；第20100047805号明細書；第20110207221号明細書；第20110301073号明細書；第2011089775号明細書；第20110239315号明細書；第20110145940号明細書；および国際公開第2007/014275号パンフレットを参照されたい。切断は、特異的ヌクレアーゼ、例えば、操作されたジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、転写活性化物質様作動因子ヌクレアーゼ(transcription-activator like effector nuclease)(TALEN)の使用、または特異的切断を導くために操作されたcrRNA/tracrRNA(「単一ガイドRNA」)を用いるCRISPR/Casシステムの使用を通して起こり得る。米国特許出願公開第20080182332号明細書は、植物ゲノムの標的化改変のための非標準ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)の使用を記載しており；米国特許出願公開第20090205083号明細書は、植物EPPS座のZFN媒介標的化改変を記載しており；米国特許出願公開第20100199389号明細書は、植物Zp15座の標的化改変を記載しており、米国特許出願公開第20110167521号明細書は、脂肪酸生合成に關与する植物遺伝子の標的化改変を記載している。さらに、Moehle et al.(2007) Proc.Natl.Acad. Sci.USA 104(9):3055-3060は、特定の座における標的化遺伝子付加のための設計されたZFNの使用を記載している。米国特許出願公開第20110041195号明細書は、ホモ接合型二倍体生物を作成する方法を記載している。

30

40

50

【 0 0 1 0 】

しかしながら、FAD3座において所望の導入遺伝子が標的化挿入された植物の産生を含む、植物のFAD3遺伝子の発現を改変および/または調節するための組成物および方法が依然として必要とされている。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 1 1 】

【 特許文献 1 】 米国特許出願公開第 2 0 0 3 0 2 3 2 4 1 0 号明細書

【 特許文献 2 】 米国特許出願公開第 2 0 0 5 0 2 0 8 4 8 9 号明細書

【 特許文献 3 】 米国特許出願公開第 2 0 0 5 0 0 2 6 1 5 7 号明細書

10

【 特許文献 4 】 米国特許出願公開第 2 0 0 5 0 0 6 4 4 7 4 号明細書

【 特許文献 5 】 米国特許出願公開第 2 0 0 6 0 1 8 8 9 8 7 号明細書

【 特許文献 6 】 米国特許出願公開第 2 0 0 9 0 2 6 3 9 0 0 号明細書

【 特許文献 7 】 米国特許出願公開第 2 0 0 9 0 1 1 7 6 1 7 号明細書

【 特許文献 8 】 米国特許出願公開第 2 0 1 0 0 0 4 7 8 0 5 号明細書

【 特許文献 9 】 米国特許出願公開第 2 0 1 1 0 2 0 7 2 2 1 号明細書

【 特許文献 1 0 】 米国特許出願公開第 2 0 1 1 0 3 0 1 0 7 3 号明細書

【 特許文献 1 1 】 米国特許出願公開第 2 0 1 1 0 8 9 7 7 5 号明細書

【 特許文献 1 2 】 米国特許出願公開第 2 0 1 1 0 2 3 9 3 1 5 号明細書

【 特許文献 1 3 】 米国特許出願公開第 2 0 1 1 0 1 4 5 9 4 0 号明細書

20

【 特許文献 1 4 】 国際公開第 2 0 0 7 / 0 1 4 2 7 5 号パンフレット

【 特許文献 1 5 】 米国特許出願公開第 2 0 0 8 0 1 8 2 3 3 2 号明細書

【 特許文献 1 6 】 米国特許出願公開第 2 0 0 9 0 2 0 5 0 8 3 号明細書

【 特許文献 1 7 】 米国特許出願公開第 2 0 1 0 0 1 9 9 3 8 9 号明細書

【 特許文献 1 8 】 米国特許出願公開第 2 0 1 1 0 1 6 7 5 2 1 号明細書

【 特許文献 1 9 】 米国特許出願公開第 2 0 1 1 0 0 4 1 1 9 5 号明細書

【 非特許文献 】

【 0 0 1 2 】

【 非特許文献 1 】 Terada et al. (2002) Nat Biotechnol 20(10):1030

【 非特許文献 2 】 Terada et al. (2007) Plant Physiol 144(2):846

30

【 非特許文献 3 】 D'Halluin et al. (2008) Plant Biotechnology J.6(1):93

【 非特許文献 4 】 Kumar and Fladung (2001) Trends Plant Sci.6:155-9

【 非特許文献 5 】 Paszkowski et al. (1988) EMBO J.7:4021-6

【 非特許文献 6 】 Urnov et al. (2010) Nature 435(7042):646-51

【 非特許文献 7 】 Moehle et al.(2007) Proc. Natl. Acad, Sci. USA 104(9): 3055-3060

【 発明の概要 】

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 3 】

本開示は、(例えば、植物、藻類および真菌類において)FAD3遺伝子の発現を調節するための組成物および方法、ならびに対象となる核酸配列(例えば、外因性核酸配列)の宿主細胞への標的化組込みのための部位としてのこれらの座の使用を記載する。いくつかの実施形態では、宿主細胞が、そのいずれかまたは全てが選択的に改変および/または破壊され得る1つまたはそれ以上のFAD3配列(例えば、ホモログ(homeologue)および/またはパラログ)を含む1つまたはそれ以上のゲノムを含み得る。具体的な例では、本開示が、セイヨウアブラナ(Brassica napus)(すなわち、セイヨウアブラナ系統、DH12075)のFAD3A、FAD3A'、FAD3C'および/またはFAD3C遺伝子、ならびに対応するホモログまたはパラログ、ならびに対象となる核酸配列の標的化組込みのための座としてのその使用を記載する。本明細書に記載されるように、FAD3遺伝子は宿主の脂肪酸生合成に関与しているが、(例えば、FAD3コード配列への外因性核酸の組込みによる)改変または破壊は、結果として生じる宿主生物に予想外に全く有

40

50

害効果をもたらさないまたは最小の有害効果しかもたらさない。

【0014】

また、本明細書においては、FAD3座において特異的核酸配列の切断および/または組込みを行うことができるポリペプチドと協力した1つまたはそれ以上の特定のFAD3座の使用も記載される。FAD3座の切断および/または組込みを行うことができるポリペプチドと協力したFAD3座の使用の例は、ジンクフィンガータンパク質、メガヌクレアーゼ、TALドメイン、TALEN、RNAガイド化CRISPR-Cas9、リコンビナーゼ、ロイシンジッパー、CRISPR/Casおよび当業者に公知のその他のものからなる群から選択されるポリペプチドを含む。特定の例は、部位特異的DNA結合ドメインポリペプチドおよび切断ドメインポリペプチド(例えば、ヌクレアーゼ)を含むキメラ(「融合」)タンパク質、例えば、ジンクフィンガーポリペプチドおよびFokIヌクレアーゼポリペプチドを含むZFNタンパク質を含む。例えば、本明細書においては、対応するホモログまたはパラログを切断することなく、FAD3A、FAD3A'、FAD3A''、FAD3C、FAD3C'、FAD3C''およびこれらの組み合わせにおける二本鎖切断を結合および誘導するよう設計された特定のZFNのインビトロおよびインビボでの有効性および特異性の証明が記載される。いくつかの実施形態では、宿主の農学的性能に及ぼす有害な影響が最小限でありながら、その後宿主中で発現される対象となる核酸の部位特異的組込みを行うために、特定のFAD3座が前記ポリペプチドのいずれかと共に使用され得る。

10

【0015】

特定の態様では、本明細書において、FAD3遺伝子に特異的に結合するDNA結合ドメインを含むポリペプチドが記載される。いくつかの実施形態では、このようなポリペプチドが、標的化二本鎖切断を誘導し得る、および/または切断部位での対象となる核酸の組換えを促進し得るよう、ヌクレアーゼ(切断)ドメインまたはハーフトドメイン(例えば、ZFN、リコンビナーゼ、トランスポサナーゼ、または改変DNA結合ドメイン、TALドメイン、TALEN、RNAガイド化CRISPR-Cas9を含むホーミングエンドヌクレアーゼ(homing endonuclease)を含むホーミングエンドヌクレアーゼ)、ならびに/あるいはリガーゼドメインを含んでもよい。特定の実施形態では、FAD3座を標的化するDNA結合ドメインがDNA切断機能ドメインであってもよい。いくつかの実施形態では、外因性核酸を、1つまたはそれ以上のFAD3座(例えば、植物または動物種)で相同組換えを示す宿主生物(例えば、植物または動物種)のゲノムに導入するために前記ポリペプチドが使用され得る。特定の実施形態では、DNA結合ドメインが、1つまたはそれ以上のジンクフィンガー(例えば、2、3、4、5、6、7、8、9もしくはそれ以上のジンクフィンガー)を含み、FAD3遺伝子中の任意の配列に結合するよう操作され得る(自然には起こらない)ジンクフィンガータンパク質を含む。本明細書に記載されるジンクフィンガータンパク質のいずれも、標的遺伝子のコード配列中または隣接配列(例えば、プロモーターもしくは他の発現要素)中の標的部位に結合し得る。特定の実施形態では、ジンクフィンガータンパク質が、例えば、表4に示されるように、FAD3遺伝子中の標的部位に結合する。代表的なFAD3結合ジンクフィンガーのヘリックス認識領域が表3に示される。ジンクフィンガータンパク質の構成ジンクフィンガー結合ドメインの1つまたはそれ以上は、標準(C2H2)ジンクフィンガーまたは非標準(例えば、C3H)ジンクフィンガー(例えば、N末端および/またはC末端ジンクフィンガーが非標準フィンガーであり得る)であり得る。

20

30

40

【0016】

また、本明細書においては、FAD3遺伝子を破壊または編集する方法も記載される。さらに、本明細書においては、本発明の実施形態による方法によって産生された遺伝子組換え宿主生物(例えば、トランスジェニック植物)が記載される。特定の例では、本発明の実施形態による方法によって産生されたトランスジェニック生物が、限定されないが、藻類、真菌類、単子葉植物、双子葉植物等であり得る。

【0017】

50

前記および他の特徴は、添付の図面を参照して進むいくつかの実施形態の以下の詳細な説明からより明らかになるだろう。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1A1】パネルA～TはAlignX（登録商標）を用いて作成されたFAD3遺伝子配列（配列番号(SEQ ID NO:) 7～12）の配列アラインメントを示す。

【図1A2】（図1A1の続き）

【図1B1】パネルA～TはAlignX（登録商標）を用いて作成されたFAD3遺伝子配列（配列番号7～12）の配列アラインメントを示す。

【図1B2】（図1B1の続き）

【図1C1】パネルA～TはAlignX（登録商標）を用いて作成されたFAD3遺伝子配列（配列番号7～12）の配列アラインメントを示す。

【図1C2】（図1C1の続き）

【図1D1】パネルA～TはAlignX（登録商標）を用いて作成されたFAD3遺伝子配列（配列番号7～12）の配列アラインメントを示す。

【図1D2】（図1D1の続き）

【図1E1】パネルA～TはAlignX（登録商標）を用いて作成されたFAD3遺伝子配列（配列番号7～12）の配列アラインメントを示す。

【図1E2】（図1E1の続き）

【図1F1】パネルA～TはAlignX（登録商標）を用いて作成されたFAD3遺伝子配列（配列番号7～12）の配列アラインメントを示す。

【図1F2】（図1F1の続き）

【図1F3】（図1F2の続き）

【図1G1】パネルA～TはAlignX（登録商標）を用いて作成されたFAD3遺伝子配列（配列番号7～12）の配列アラインメントを示す。

【図1G2】（図1G1の続き）

【図1H1】パネルA～TはAlignX（登録商標）を用いて作成されたFAD3遺伝子配列（配列番号7～12）の配列アラインメントを示す。

【図1H2】（図1H1の続き）

【図1I1】パネルA～TはAlignX（登録商標）を用いて作成されたFAD3遺伝子配列（配列番号7～12）の配列アラインメントを示す。

【図1I2】（図1I1の続き）

【図1J1】パネルA～TはAlignX（登録商標）を用いて作成されたFAD3遺伝子配列（配列番号7～12）の配列アラインメントを示す。

【図1J2】（図1J1の続き）

【図1K1】パネルA～TはAlignX（登録商標）を用いて作成されたFAD3遺伝子配列（配列番号7～12）の配列アラインメントを示す。

【図1K2】（図1K1の続き）

【図1L1】パネルA～TはAlignX（登録商標）を用いて作成されたFAD3遺伝子配列（配列番号7～12）の配列アラインメントを示す。

【図1L2】（図1L1の続き）

【図1M1】パネルA～TはAlignX（登録商標）を用いて作成されたFAD3遺伝子配列（配列番号7～12）の配列アラインメントを示す。

【図1M2】（図1M1の続き）

【図1N1】パネルA～TはAlignX（登録商標）を用いて作成されたFAD3遺伝子配列（配列番号7～12）の配列アラインメントを示す。

【図1N2】（図1N1の続き）

【図1O1】パネルA～TはAlignX（登録商標）を用いて作成されたFAD3遺伝子配列（配列番号7～12）の配列アラインメントを示す。

【図1O2】（図1O1の続き）

10

20

30

40

50

【図1P1】パネルA～TはAlignX（登録商標）を用いて作成されたFAD3遺伝子配列（配列番号7～12）の配列アラインメントを示す。

【図1P2】（図1P1の続き）

【図1Q1】パネルA～TはAlignX（登録商標）を用いて作成されたFAD3遺伝子配列（配列番号7～12）の配列アラインメントを示す。

【図1Q2】（図1Q1の続き）

【図1Q3】（図1Q2の続き）

【図1R1】パネルA～TはAlignX（登録商標）を用いて作成されたFAD3遺伝子配列（配列番号7～12）の配列アラインメントを示す。

【図1R2】（図1R1の続き）

【図1S1】パネルA～TはAlignX（登録商標）を用いて作成されたFAD3遺伝子配列（配列番号7～12）の配列アラインメントを示す。

【図1S2】（図1S1の続き）

【図1T】パネルA～TはAlignX（登録商標）を用いて作成されたFAD3遺伝子配列（配列番号7～12）の配列アラインメントを示す。

【図2】隣接結合距離に基づいてJalview v2.3を用いて作成されたFAD3遺伝子配列の系統樹を示す。標識化配列は以下のように対応する：FAD3A' / A'' は本出願の全体にわたってFAD3A'として記載される；ハプロタイプ2は本出願の全体にわたってFAD3C'として記載される；ハプロタイプ1は本出願の全体にわたってFAD3C''として記載される；またハプロタイプ3は本出願の全体にわたってFAD3A''として記載される。

【図3】pDAB107828のプラスミドマップを示す。

【図4】pDAB107829のプラスミドマップを示す。

【図5】pDAS000271のプラスミドマップを示す。

【図6】pDAS000272のプラスミドマップを示す。

【図7】pDAS000273のプラスミドマップを示す。

【図8】pDAS000274のプラスミドマップを示す。

【図9】pDAS000275のプラスミドマップを示す。

【図10】pDAS000031のプラスミドマップを示す。

【図11】pDAS000036のプラスミドマップを示す。

【図12】pDAS000037のプラスミドマップを示す。

【図13】pDAB107827のプラスミドマップを示す。

【図14】pDAB107828のプラスミドマップを示す。

【図15】pDAS000340のプラスミドマップを示す。

【図16】pDAS000341のプラスミドマップを示す。

【図17】pDAS000342のプラスミドマップを示す。

【図18】pDAS000343のプラスミドマップを示す。

【図19-1】プライマーの位置ならびにFad3Cの開始および終止コドンに対するその位置を示す概略図である。パネルAは野生型Fad3C座についてのプライマー部位の位置を示す。パネルBはドナー組込みを確認するためのプライマー部位の位置、およびドナーがFad3C座に組み込まれ得る可能な配向を示す。

【図19-2】プライマーの位置ならびにFad3Cの開始および終止コドンに対するその位置を示す概略図である。パネルAは野生型Fad3C座についてのプライマー部位の位置を示す。パネルBはドナー組込みを確認するためのプライマー部位の位置、およびドナーがFad3C座に組み込まれ得る可能な配向を示す。

【図20A】パネルAおよびBは、指示されるZFNおよびドナープラスミドを用いた改変後の配列アラインメントを示す。図20AはZFN28051-2A-28052によって認識される二本鎖切断におけるpDAS000341のtGFPカセットとFad3Cのジャンクションから増幅された配列アラインメントを示す。「:」は切断部位に位置する欠失を示している。配列番号300～配列番号313がアラインメントに示されてい

10

20

30

40

50

る。

【図20B】ZFN28051-2A-28052およびZFN28053-2A-28054によって認識される二本鎖切断におけるpDAS000343のtGFPカセットとFAD3Cのジャンクションから増幅された配列アラインメントを示す。「:」は切断部位に位置する欠失を示している。配列番号314~配列番号327がアラインメントに示されている。

【図21】パネルAおよびBはZFN28051-2A-28052によって認識される二本鎖切断におけるpDAS000340のhphカセットとFAD3Cのジャンクションから増幅された配列の配列アラインメントを示す。「サンプル」はアッセイされた各植物に固有の識別子である。「:」は切断部位に位置する欠失を示している。図21Aに示される配列は5'ジャンクションについてのものであり、図21Bに示される配列は3'ジャンクションについてのものである。配列番号368~配列番号375が図21Aのアラインメントに示されている。配列番号376~配列番号377が図21Bのアラインメントに示されている。

10

【図22】ZFN28053-2A-28054によって認識される二本鎖切断におけるpDAS000342のhphカセットとFAD3Cのジャンクションから増幅された配列の配列アラインメントを示す。「サンプル」はアッセイされた各植物に固有の識別子である。「:」は切断部位に位置する欠失を示している。図22に示される配列は3'ジャンクションについてのものである。配列番号378~配列番号379がアラインメントに示されている。

20

【図23】パネルAおよびBはZFN28051-2A-28052によって認識される二本鎖切断におけるpDAS000340のhphカセットとFAD3Cのジャンクションから増幅された配列の配列アラインメントを示す。「:」は切断部位に位置する欠失を示している。図23Aに示される配列は5'ジャンクションについてのものであり、ボックス(B)に示される配列は3'ジャンクションについてのものである。配列番号328~配列番号334が図23Aのアラインメントに示されている。配列番号335~配列番号342が図23Bのアラインメントに示されている。

【図24】パネルAおよびBはZFN28053-2A-28054によって認識される二本鎖切断におけるpDAS000342のhphカセットとFAD3Cのジャンクションから増幅された配列の配列アラインメントを示す。「:」は切断部位に位置する欠失を示している。図24Aに示される配列は5'ジャンクションについてのものであり、図24Bに示される配列は3'ジャンクションについてのものである。配列番号343~配列番号346が図24Aのアラインメントに示されている。配列番号347~配列番号351が図24Bのアラインメントに示されている。

30

【発明を実施するための形態】

【0019】

配列表

核酸配列は、米国特許法施行規則第1.822条に定義されるヌクレオチド塩基についての標準的な文字略語を用いて示される。1本鎖のみの各核酸配列が示されるが、示される鎖への任意の言及により、相補鎖が含まれると理解される。

40

【0020】

I. いくつかの実施形態の概要

本発明の実施形態は、組み込まれた核酸によって影響を及ぼされるものを超えて宿主の他の表現型に大いに悪影響を及ぼすことのない、外因性核酸(例えば、導入遺伝子)の宿主ゲノムへの標的化組込みのための手法を確立する。単一の宿主ゲノム中の複数の核酸を「スタッキングする」ために、いくつかの実施形態が使用され得る。このような手法は、4つの相互接続技術の開発および配置を使用する:特異的ゲノムDNA位置への二本鎖切断の導入を可能にする標的化技術(例えば、Puchta et al.(1993) Nucleic Acids Res.21:5034-40; Siebert and Puchta (2002) Plant Cell 14:1121-31; D'Halluin et al.(2008) Plant Biotechnol.J.6(1):93-102; Cai et al.(2009) Plant Mol.Biol.69(6):699-709

50

; Shukla et al.(2009) Nature 459(7245):437-41); Shan et al.(2103) Nature Biotechnol.31:686-680; Le et al.(2013) Nature Biotechnol 31: 688-691; Nekrasov et al.(2013) Nature Biotechnol.31:691-693、Ainely et al.(2013) Plant Biotechnol.J.(On Line 19 Aug)参照); 最適化外因性(ドナー)核酸の送達を可能にする送達技術(Bibikova et al.(2003) Science 300(5620):764); 標的化ドナーDNA組込みのためにHDRまたはNHEJ頻度を増加させるための、(相同組換えまたはNHEJ経路のいずれかに位置する)宿主遺伝子の改変を伴う組込み技術; 標的化組込みイベントを富化し特徴付けるための分析ツール; および遺伝的に十分定義されかつ形質転換された宿主生物に大いに悪影響を及ぼすことなく世代にわたる安定な遺伝子発現を支持する特異的な所望の宿主ゲノム位置(「性能座(performance loci)」)。また、米国特許出願公開第20030232410号明細書; 第20050208489号明細書; 第20050026157号明細書; 第20050064474号明細書; 第20060188987号明細書; 第20090263900号明細書; 第20090117617号明細書; 第20100047805号明細書; 第20110207221号明細書; 第20110301073号明細書; 第2011089775号明細書; 第20110239315号明細書; 第20110145940号明細書; 第20080182332号明細書; 第20090205083号明細書; 第20100199389号明細書; 第20110167521号明細書も参照されたい。例えば、植物では、性能座は、座で導入遺伝子が挿入されたトランスジェニック植物の農学的または品質特性に対する負の影響が無視できるまたは存在しない座である。

10

20

【0021】

本明細書に記載される実施形態は、植物FAD3遺伝子が外因性核酸(例えば、遺伝子; 非コードDNA配列、例えば、操作されたランディングパッド(Engineered Landing Pad)(ELP)(米国特許出願第12/011,735号明細書)および操作された導入遺伝子挿入プラットフォーム(ETIP)(係属中の米国特許出願第61/697882号明細書); および植物形質転換ユニット)の標的化挿入のための性能座であるという予期しない知見を利用する。植物におけるFAD3座の遍在性の性質、ならびにアブラナ、トウモロコシ、ヒマワリ、コムギ、ワタおよびダイズにおけるFAD3の変化またはノックアウトが農学的または品質の不利益を有さないという証拠は、FAD3座を商業的に関連する植物種にわたる広範なクラスの性能座と証明する。

30

【0022】

いくつかの実施形態は、例えば、標的部位特異的DNA認識および切断タンパク質の送達および発現から生じる、FAD3座における部位特異的二本鎖DNA切断を利用する。具体的な例では、このようなFAD3特異的DNA認識および切断タンパク質が、例えば、限定されないが、ZFN; TALEN; RNAガイド化CRISPR-Cas9システム、リコンビナーゼ(例えば、Cre、Hin、RecA、TreおよびFLPリコンビナーゼ); メガヌクレアーゼ、および前記のいずれかまたはその同等物に由来する操作タンパク質であり得る。切断は、特異的切断を導くよう操作されたcrRNA/tracrRNA(RNA(「単一ガイドRNA」))を用いるCRISPR/Casシステムを用いても行われ得る。いくつかの実施形態では、このような二本鎖切断が、例えば、相同組換え修復(Homology Directed Repair)(HDR)または非相同末端結合(Non-Homologous End Joining)(NHEJ)によって、FAD3性能座中の切断部位でのドナー核酸の組込みを介して修復され得る。

40

【0023】

本開示は、例えば、アブラナ(セイヨウアブラナ)のFAD3Aまたは3C座、およびFAD3Aまたは3C座において外因性核酸を組み込むために利用され得る対応するFAD3特異的ZFNを記載することによって、性能座としてのFAD3座の有用性を示す。

【0024】

本発明の実施形態は、当分野における多くの未解決の課題に対処する。例えば、本明細書に記載される標的化組込み手法の選択性は、不必要な遺伝子導入イベントの排除に要求

50

される度重なる野外試験の必要性を低減または排除することができる（この試験は関与する資源およびこの区域における負担となる規制要求のために高価である）。さらに、本明細書に記載される標的化DNA挿入手法は、導入遺伝子スタッキングのプロセスにおいて特に有益となり得る。

【0025】

いくつかの実施形態では、対象となる核酸を直接標的化するために内因性FAD3座における野生のヌクレオチド配列が使用され得るが、対象となるさらなる核酸分子の宿主への組込みが促進されるように、核酸が最初に宿主の少なくとも1つのFAD3座に標的化され得る。他の例では、DNA認識部位（例えば、ジンクフィンガー認識部位）に隣接する宿主生物の野生の配列（例えば、本質的にランダムに産生された核酸配列）と相同でないヌクレオチド配列が利用され得る。

10

【0026】

II. 用語

特許請求の範囲を含む本出願で使用される場合、例えば、「a」、「an」および「the」という単数および単数形用語は、別段の明確な指示がない限り、複数指示対象を含む。したがって、例えば、「植物（plant）」、「植物（the plant）」または「植物（a plant）」への言及は、複数の植物も指す。さらに、文脈に応じて、「植物（plant）」という用語の使用は、その植物の遺伝的に類似または同一の子孫も指し得る。同様に、「核酸」という用語は、核酸分子の多くのコピーを指し得る。同様に、「プローブ」という用語は、多くの類似または同一のプローブ分子を指し得る。

20

【0027】

数値範囲は、その範囲を定義する数を含み、定義される範囲内の各整数および非整数分数を明示的に含む。別段の定義がない限り、本明細書で使用される全ての技術用語および科学用語は、当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。

【0028】

本開示に記載される種々の実施形態の概観を容易にするために、具体的な用語の以下の説明が提供される：

【0029】

単離された：「単離された」生物学的成分（例えば、核酸またはタンパク質）は、該成分の化学的または機能的変化をもたらしながら（例えば、核酸は、染色体で核酸と残りのDNAを結合している化学結合を破断することによって染色体から単離され得る）、該成分が自然に生じる生物の細胞中の他の生物学的成分（例えば、他の染色体および染色体外DNAおよびRNA、およびタンパク質）から実質的に分離されている、別に産生されている、または精製されている。「単離された」核酸分子およびタンパク質は、標準的精製法によって精製された核酸分子およびタンパク質を含む。この用語はまた、宿主細胞での組換え発現によって調製された核酸およびタンパク質、ならびに化学的に合成された核酸分子、タンパク質およびペプチドも包含する。

30

【0030】

交雑：植物に関して本明細書で使用される場合、「交雑する」または「交雑した」という用語は、子孫（例えば、細胞、種子および植物）を産生するための受粉を介した配偶子の融合を指す。この用語は、性的交雑（すなわち、ある植物の別の植物による受粉）と自殖（すなわち、例えば、同じ植物からの花粉および胚珠を用いた自家受粉）の両方を包含する。

40

【0031】

戻し交雑：核酸配列を植物に導入するために戻し交雑法が使用され得る。この技術は、新しい形質を植物に導入するために数十年間広く使用されてきた。Jensen, N., Ed. Plant Breeding Methodology, John Wiley & Sons, Inc., 1988。典型的な戻し交雑プロトコルでは、対象となる元の品種（反復親）が、移植するための対象となる核酸配列を保有する第2の品種（非反復親）と交雑される。次いで、この交雑から得られた子孫が反復親と再度交雑され、非反復親から移植された核酸配列に加えて、反復植物の所望の形態学のおよ

50

び生理学的特性の本質的に全てが変換植物で取り戻された植物が得られるまでこのプロセスが繰り返される。

【0032】

遺伝子移入：本明細書で使用される場合、「遺伝子移入」という用語は、特定の座における対立遺伝子（または外因性核酸を含む改変対立遺伝子）の遺伝的背景への伝達を指す。いくつかの実施形態では、座における特異的対立遺伝子の遺伝子移入が、同じ種の2つの親（親の少なくとも一方はそのゲノム中に特異的対立遺伝子型を有する）の間での性的交雑を介して対立遺伝子を少なくとも1つの子孫に伝達することによって起こり得る。特異的対立遺伝子を含む子孫が、所望の遺伝的背景を有する系統と繰り返し戻し交雑され得る。特異的対立遺伝子型が遺伝的背景で固定された新しい品種を産生するために、戻し交雑子孫が特異的対立遺伝子型について選択され得る。いくつかの実施形態では、特異的対立遺伝子の遺伝子移入が、2つのドナーゲノム（例えば、融合プロトプラスト）（ドナーゲノムの少なくとも一方はそのゲノム中に特異的対立遺伝子型を有する）の間での組換えによって起こり得る。遺伝子移入は、例えば、限定されないが、破壊または改変された対立遺伝子；導入遺伝子；PTU；およびELPであり得る特異的対立遺伝子型の伝達を伴い得る。

10

【0033】

生殖質：本明細書で使用される場合、「生殖質」という用語は、個々の植物、植物のグループ（例えば、植物系統、品種および科）、および植物または植物のグループに由来するクローンのまたはこれらから得られる遺伝物質を指す。生殖質は生物もしくは細胞の一部であり得る、またはこれは生物もしくは細胞とは別（例えば、単離されている）であり得る。一般に、生殖質は、植物の遺伝的質の基礎である特定の分子構造を有する遺伝物質を提供する。本明細書で使用される場合、「生殖質」は、特定の植物の細胞；種子；特定の植物の組織（例えば、そこから新しい植物が栽培され得る組織）；および特定の植物の種子以外の部分（例えば、葉、茎、花粉および細胞）を指す。本明細書で使用される場合、「生殖質」という用語は「遺伝物質」と同義であり、そこから植物が繁殖され得る種子（または他の植物材料）を指すために使用され得る。「生殖質バンク」は、そこから公知の栽培品種が栽培され得る、およびそこから新しい栽培品種が産生され得る、異なる種子または他の遺伝物質（各遺伝子型が独自に同定されている）の組織的収集物を指し得る。

20

【0034】

遺伝子：本明細書で使用される場合、「遺伝子」（または「遺伝要素」）という用語は、機能的な重要性を有する遺伝的ゲノムDNA配列を指し得る。遺伝子は野生の核酸であっても、ゲノムに組み込まれた核酸であってもよい。「遺伝子」という用語は、例えば、限定されないが、遺伝的ゲノムDNA配列によってコードされているcDNAおよび/またはmRNAを指すためにも使用され得る。

30

【0035】

核酸分子：本明細書で使用される場合、「核酸分子」という用語は、ヌクレオチド（すなわち、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチドおよび/または前記のいずれかの改変型）のポリマー型を指し得る。本明細書で使用される「核酸分子」は、「核酸」および「ポリヌクレオチド」と同義である。この用語は、RNA、cDNA、ゲノムDNAならびにこれらの合成型および混合ポリマーのセンス鎖とアンチセンス鎖の両方を含む。この用語は、一本鎖、二本鎖、部分的二重鎖、三重鎖、ヘアピン、円形および南京錠構造を含む任意の形態的構造を含む。核酸分子は、天然ヌクレオチドおよび改変ヌクレオチドのいずれかまたは両方を含むことができる。このようなヌクレオチドは、天然および/または非天然ヌクレオチド結合によって結合され得る。

40

【0036】

核酸分子は、当業者によって容易に認識されるように、化学的もしくは生化学的に改変されていてもよく、または誘導体化ヌクレオチド塩基を含んでいてもよい。このような改変は、例えば、限定されないが、ラベル；メチル化；類似体による天然ヌクレオチドの1つまたはそれ以上の置換；およびヌクレオチド間改変（例えば、無電荷結合、例えば、メ

50

チルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホロアミデートおよびカルバメート；荷電結合、例えば、ホスホロチオエートおよびホスホロジチオエート；ペンダント部分、例えば、ペプチド；インターカレーター、例えば、アクリジンおよびソラレン；キレート剤；アルキル化剤；および改変結合、例えば、アノマー核酸）を含む。

【0037】

外因性：「外因性」分子は、ポリヌクレオチドについてはヌクレオチド配列および／またはゲノム位置（すなわち、座）に関して（およびポリペプチドについてはアミノ酸配列および／または細胞局在に関して）、特定の系（例えば、生殖質、品種、エリート品種および／または植物）に生まれつき備わっていない分子である。実施形態では、外因性または異種性のポリヌクレオチドまたはポリペプチドが、生物系（例えば、植物細胞、植物遺伝子、特定の植物種もしくは品種、および／または植物染色体）に人工的に供給されており、かつ特定の生物系に生まれつき備わっていない分子であり得る。したがって、「外因性」としての核酸の指定は、その核酸が天然源以外の源に由来することを示す、またはその核酸が非天然構造、遺伝子位置もしくは要素の配列を有することを示し得る。

10

【0038】

対照的に、例えば、「野生の」または「内因性」核酸は、染色体またはその核酸が天然で通常見られる他の遺伝物質中に通常存在するもの以外の核酸要素を含まない核酸（例えば、遺伝子）である。内因性遺伝子転写産物は、その天然の染色体座でヌクレオチド配列によってコードされ、細胞に人工的に供給されていない。

20

【0039】

作動可能に連結された（operably linked）：第1の核酸配列が第2の核酸配列と機能的関係にある場合、第1の核酸配列は第2の核酸配列と作動可能に連結されている。例えば、プロモーターがコード配列の転写または発現に影響を及ぼす場合、プロモーターはコード配列と作動可能に連結されている。組換え的に産生されると、作動可能に連結された核酸配列は一般的に隣接しており、必要な場合には同じリーディングフレーム中の2つのタンパク質コード領域を連結する。しかしながら、要素は作動可能に連結されるために隣接している必要はない。

【0040】

プロモーター：プロモーターは、一般的に核酸の転写を増強する核酸の（5'領域に向かって）上流に位置するDNAの領域である。プロモーターは、作動可能に連結されている核酸の適当な活性化または抑制を可能にする。プロモーターは、転写因子によって認識される特異的配列を含む。これらの因子がプロモーターDNA配列に結合し、RNAポリメラーゼ、すなわち核酸のコード領域からRNAを合成する酵素の動員をもたらす。形質転換された：ベクターが核酸分子を細胞中に移す場合、ベクターは細胞を「形質転換する」または「形質導入する」。核酸分子が、核酸分子の細胞ゲノムへの組込みまたはエピソーム複製によって、細胞により安定的に複製されるようになると、細胞は核酸分子により「形質転換されている」。本明細書で使用される場合、「形質転換」という用語は、核酸分子が細胞に導入され得る全ての技術を包含する。例は、限定されないが、ウイルスベクターを用いたトランスフェクション；プラスミドベクターを用いた形質転換；エレクトロポレーション（Fromm et al.(1986) Nature 319:791-3）；リポフェクション（Felgner et al.(1987) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84:7413-7）；マイクロインジェクション（Muelle r et al.(1978) Cell 15:579-85）；アグロパクテリウム媒介移入（Fraley et al.(1983) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 80:4803-7）；直接DNA取り込み；および微粒子銃（Klein et al.(1987) Nature 327:70）を含む。

30

40

【0041】

導入された：本明細書で使用される場合、「導入された」という用語は、外因性核酸の細胞への転位に言及する場合には、当分野で利用可能な任意の方法論を用いた核酸の細胞への組込みを指す。この用語は、例えば、限定されないが、トランスフェクション；形質転換；および形質導入を含む核酸導入法を包含する。

【0042】

50

導入遺伝子：本明細書で使用される場合、「導入遺伝子」という用語は、対象となる外因性核酸コード配列を指す。例えば、導入遺伝子は産業的もしくは薬学的に有用な化合物、または望ましい農業的形質（例えば、除草剤耐性もしくは有害生物耐性）に寄与する発現産物をコードし得る。さらなる例では、導入遺伝子がアンチセンス核酸であってもよく、アンチセンス核酸の発現は標的核酸配列の発現を阻害する。導入遺伝子は、導入遺伝子と作動可能に連結された調節配列（例えば、プロモーター）を含み得る。いくつかの実施形態では、FAD3座において部位特異的標的化によって導入される対象となる核酸分子が導入遺伝子である。しかしながら、他の実施形態では、対象となる核酸分子がPTU、ELP、ETIPまたは内因性核酸配列（例えば、内因性核酸配列の追加の外因性ゲノムコピーが望まれる場合）であり得る。

10

【0043】

要素は、構造RNA、例えばshRNAをコードするDNAも含むことができる。このようなRNAは、限定されないが、ポスティング（posting）に影響を及ぼすまたは除草剤耐性を与えることを含む外因性または内因性遺伝子を改変することができる。

【0044】

組換え：本明細書で使用される場合、「組換え」という用語は、ヒトの介入によって変えられた材料（例えば、核酸、遺伝子、ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド）を指す。例えば、組換え分子の一部または要素の配列は野生の配列でなくてもよく、および/または組換え分子の一次配列は、例えば、その発現および/または活性を最適化するためにその野生の配列から変更されていてもよい。自然の環境または状態で組換え材料を産生するまたはそこから取り出すために材料が変化され得る。一例として、オープンリーディングフレームのヌクレオチド配列がその自然の状況から取り出され、人工核酸分子（例えば、ベクター）にクローニングされた場合、核酸のオープンリーディングフレームは組換えである。組換え分子（例えば、組換え核酸）を産生するためのプロトコルおよび試薬は、当分野で一般的であり、その使用は日常的である。「組換え」という用語はまた、本明細書において、組換え材料を含む細胞または生物（例えば、組換え核酸を含む植物および/または植物細胞）も指し得る。いくつかの例では、組換え生物がトランスジェニック生物である。

20

【0045】

ベクター：本明細書で使用される場合、「ベクター」という用語は、少なくとも1つの核酸セグメントを細胞に移入することができるポリヌクレオチドまたは他の分子を指す。ベクターは場合により、ベクター維持を媒介するおよび/またはその意図した使用を可能にする成分/要素（例えば、複製に必要な配列、薬剤もしくは抗生物質耐性を与える遺伝子、マルチクローニングサイト、および/またはクローニングされた遺伝子の発現を可能にする作動可能に連結されたプロモーター/エンハンサー要素）を含んでもよい。ベクターは、例えば、プラスミド、バクテリオファージ、または植物もしくは動物ウイルスに由来し得る。「クローニングベクター」、「シャトルベクター」または「サブクローニングベクター」は、一般的にクローニングまたはサブクローニング工程を促進するための作動可能に連結された要素を含む（例えば、マルチクローニングサイトは複数の制限エンドヌクレアーゼ部位を含む）。

30

40

【0046】

発現ベクター：本明細書で使用される「発現ベクター」という用語は、特定の宿主生物においてコード配列の発現を促進することができる作動可能に連結されたポリヌクレオチド配列を含むベクターを指す。例えば、細菌発現ベクターは、細菌においてコード配列の発現を促進することができる。同様に、植物発現ベクターは、植物細胞においてコード配列の発現を促進することができる。原核生物において発現を促進するポリヌクレオチド配列は、例えば、限定されないが、プロモーター；オペレーター；およびリボソーム結合部位を含み得る。真核生物発現ベクター（例えば、植物発現ベクター）は、例えば、原核生物発現ベクターで使用されるものとは一般的に異なるプロモーター；エンハンサー；終止シグナル；およびポリアデニル化シグナル（および他の配列）を含み得る。

50

【0047】

配列同一性：2つの核酸またはポリペプチド配列の文脈において本明細書で使用される「配列同一性」または「同一性」という用語は、指定された比較窓にわたって最大の対応で整列された場合に、同じである2つの配列中の残基を指す。配列同一性の値は、比較窓にわたって2つの最適整列配列（例えば、核酸配列およびアミノ酸配列）を比較することによって決定され得、比較窓中の配列の一部は2つの配列の最適整列のための（付加も欠失も含まない）基準配列と比べて付加または欠失（すなわち、ギャップ）を含んでもよい。配列同一性は、同一ヌクレオチドまたはアミノ酸残基が両配列中で生じる位置の数を決定して一致した位置の数を得て、一致した位置の数を比較窓中の位置の総数で割り、その結果に100を掛けて配列同一性の百分率を得ることによって百分率として計算される。

10

【0048】

比較のために配列を整列させる方法は当分野で周知である。種々のプログラムおよびアラインメントアルゴリズムが、例えば、Smith and Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482; Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443; Pearson and Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:2444; Higgins and Sharp (1988) Gene 73:237-44; Higgins and Sharp (1989) CABIOS 5:151-3; Corpet et al. (1988) Nucleic Acids Res. 16:10881-90; Huang et al. (1992) Comp. Appl. Biosci. 8:155-65; Pearson et al. (1994) Methods Mol. Biol. 24:307-31; Tatiana et al. (1999) FEMS Microbiol. Lett. 174:247-50に記載されている。配列アラインメント法および相同性計算の詳細な検討は、Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10に見出され得る。

20

【0049】

国立生物工学情報センター (NCBI) Basic Local Alignment Search Tool (BLAST (商標); Altschul et al. (1990)) が配列を整列させるために使用され得、これはいくつかの配列解析プログラムに関連して使用するために、国立生物工学情報センター (Bethesda, MD) を含むいくつかの供給源から、およびインターネット上で入手可能である。どのようにこのプログラムを用いて配列同一性を決定するかについての説明は、BLAST (商標) についての「ヘルプ」の項目でインターネット上で入手可能である。核酸配列を比較するために、デフォルトパラメータを用いて、BLAST (商標) (blastn) プログラムの「blast2配列」機能が使用され得る。基準配列との類似性が大きい核酸配列は、この方法で評価されると、同一性百分率の増加を示すだろう。

30

【0050】

本明細書で使用される場合、「実質的に同一の」という用語は、80%超同一であるヌクレオチド配列を指し得る。例えば、実質的に同一のヌクレオチド配列は、基準配列と少なくとも85%; 少なくとも86%; 少なくとも87%; 少なくとも88%; 少なくとも89%; 少なくとも90%; 少なくとも91%; 少なくとも92%; 少なくとも93%; 少なくとも94%; 少なくとも95%; 少なくとも96%; 少なくとも97%; 少なくとも98%; 少なくとも99%; または少なくとも99.5%同一であり得る。

【0051】

座：本明細書で使用される場合、「座」という用語は、測定可能な特性（例えば、形質）に対応するゲノム上の位置を指す。いくつかの実施形態では、特に対象となる座がFAD3遺伝子のゲノム位置であり、この遺伝子の破壊は野生型遺伝子から転写されたmRNAの発現を減少させるまたは排除する。座は、サザンハイブリダイゼーションまたはPCR中に座中に含まれる特有のヌクレオチド配列にハイブリダイズするプローブによって定義され得る。

40

【0052】

マーカー：本明細書で使用される場合、「マーカー」は特定の対立遺伝子を有するおよび/または特定の形質もしくは表現型を示すと見られる植物を同定するために使用され得る遺伝子またはヌクレオチド配列を指す。マーカーは、所与のゲノム座で変異として記載され得る。遺伝子マーカーは、短DNA配列、例えば、単一塩基対変化（一塩基多型、す

50

なわち「SNP」)を囲む配列、または長配列、例えば、ミニサテライト/単純反復配列(「SSR」)であり得る。「マーカー対立遺伝子」は、特定の植物中に存在するマーカーのバージョンを指す。本明細書で使用されるマーカーという用語は、植物染色体DNAのクローン化セグメント(例えば、FAD3座、あるいは改変および/または破壊FAD3座を含むセグメント)を指し得、同様にまたはあるいは、植物染色体DNAのクローン化セグメントに相補的なDNA分子を指し得る。当業者によって認識されるように、マーカーに包含するための追加の隣接ヌクレオチド配列を得る工程がほとんど無限に反復され(染色体の長さによってのみ限定される)、それによって染色体に沿って追加のマーカーが同定され得る。上記の多様なマーカーのいずれかおよび全てが本発明のいくつかの実施形態で使用され得る。

10

【0053】

いくつかの実施形態では、生殖質中の(「標的」配列によって特徴付けられる)導入遺伝子またはマーカーの存在は、核酸プローブ、例えば、オリゴヌクレオチドの使用を通して検出され得る。プローブはDNA分子またはRNA分子であり得る。オリゴヌクレオチドプローブは、合成的にまたはクローニングによって調製され得る。適当なクローニングベクターは当業者に周知である。RNAプローブは当分野で公知の手段によって、例えば、DNA分子テンプレートを用いて合成され得る。

【0054】

オリゴヌクレオチドプローブは標識されていても非標識であってもよい。例えば、限定されないが、ニックトランスレーションによる放射標識;ランダムプライミング;および末端デオキシトランスフェラーゼによるテーリング(使用されるヌクレオチドが、例えば、放射性³²Pで標識される)を含む、核酸分子を標識するための多種多様な技術が存在する。使用され得る他の標識は、例えば、限定されないが、発蛍光団;酵素;酵素基質;酵素補因子;および酵素阻害剤を含む。あるいは、単独でまたは他の反応性薬剤と併せて、検出可能なシグナルを提供する標識の使用は、受容体が結合するリガンドによって置き換えられ得、ここでは受容体が(例えば、上に示される標識によって)標識されて、単独でまたは他の試薬と併せて、検出可能なシグナルを提供する。例えば、Leary et al.(1983) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 80:4045-9を参照されたい。

20

【0055】

プローブは、検出される導入遺伝子またはマーカーの正確なコピーであり得る。プローブはまた、検出される導入遺伝子またはマーカーを含む染色体DNAのクローン化セグメントと実質的に同一のヌクレオチド配列を含む、またはこれからなる核酸分子であり得る。プローブは、追加の核酸配列、例えば、プロモーター;転写シグナル;および/またはベクター配列をさらに含んでもよい。

30

【0056】

プローブは、ゲノムからの標的ヌクレオチド配列および追加の隣接ヌクレオチド配列の全部または一部を含んでもよい。これは本明細書において「隣接プローブ」と呼ばれる。追加の隣接ヌクレオチド配列は、染色体からの隣接ヌクレオチド配列が慣用的に理解されるように元のマーカーの5'または3'側にあるかどうかに応じて、元の標的の「上流」または「下流」と呼ばれる。プローブは元の標的のヌクレオチド配列と隣接しないヌクレオチド配列を含んでもよく、このプローブは本明細書において「非隣接プローブ」と呼ばれる。非隣接プローブの配列は、非隣接プローブが元のマーカーまたは導入遺伝子と連結するように、染色体上の元の標的の配列の十分近くに位置し得る。

40

【0057】

いくつかの実施形態では、プローブが、検出される標的の正確なコピーに「特異的にハイブリダイズ可能」または「特異的に相補的」である核酸分子である。「特異的にハイブリダイズ可能」および「特異的に相補的」は、核酸分子と標的との間で安定かつ特異的な結合が起こるのに十分な程度の相補性を示す用語である。核酸分子は、特異的にハイブリダイズ可能となるためにその標的配列と100%相補的である必要はない。特異的な結合が望まれる条件下、例えば、ストリンジентなハイブリダイゼーション条件下で核酸と非

50

標的配列の非特異的結合を回避するのに十分な程度の相補性がある場合に、核酸分子は特異的にハイブリダイズ可能である。

【0058】

特定の程度のストリンジェンシーをもたらすハイブリダイゼーション条件は、選択するハイブリダイゼーション法の性質ならびにハイブリダイズしている核酸配列の組成および長さに応じて変化するだろう。一般的に、洗浄時間もストリンジェンシーに影響を及ぼすが、ハイブリダイゼーションの温度およびハイブリダイゼーションバッファのイオン強度（特に、 Na^+ および / または Mg^{++} 濃度）がハイブリダイゼーションのストリンジェンシーを決定するだろう。特定の程度のストリンジェンシーを達成するために要求されるハイブリダイゼーション条件に関する計算は、当業者に公知であり、例えば、Sambrook et al. (ed.) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., vol.1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, chapters 9 and 11; および Hames and Higgins (eds.) *Nucleic Acid Hybridization*, IRL Press, Oxford, 1985 に論じられている。核酸のハイブリダイゼーションに関するさらなる詳細な指示および手引きは、例えば、Tijssen, 「Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays」 in *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology- Hybridization with Nucleic Acid Probes*, Part 1, Chapter 2, Elsevier, NY, 1993; および Ausubel et al., Eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, Chapter 2, Greene Publishing and Wiley-Interscience, NY, 1995 に見出され得る。

10

20

【0059】

本明細書で使用される場合、「ストリンジェントな条件」は、ハイブリダイゼーション分子と DNA 標的との間のミスマッチが 25% 未満である場合にのみハイブリダイゼーションが起こる条件を包含する。「ストリンジェントな条件」はさらなる特定のレベルのストリンジェンシーを含む。したがって、本明細書で使用される場合、「中等度ストリンジェンシー」条件は、25% 超の配列ミスマッチを有する分子がハイブリダイズしない条件であり；「中程度ストリンジェンシー」の条件は、15% 超のミスマッチを有する分子がハイブリダイズしない条件であり；また「高ストリンジェンシー」の条件は、10% 超のミスマッチを有する配列がハイブリダイズしない条件である。「極めて高ストリンジェンシー」の条件は、6% 超のミスマッチを有する配列がハイブリダイズしない条件である。

30

【0060】

特定の実施形態では、ストリンジェントな条件が、6x 生理食塩水 - クエン酸ナトリウム (SSC) バッファ、5x デンハルト液、0.5% SDS および 100 μg 断片化サケ精巢 DNA 中 65 でのハイブリダイゼーション、引き続いて 2x SSC バッファおよび 0.5% SDS、引き続いて 1x SSC バッファおよび 0.5% SDS、そして最後に 0.2x SSC バッファおよび 0.5% SDS 中 65 での 15 ~ 30 分の連続的洗浄である。

【0061】

連鎖 (不) 平衡：本明細書で使用される場合、「連鎖平衡」という用語は、マーカーおよび第 2 の核酸 (例えば、導入遺伝子、PTU および第 2 のマーカー) が独立に分離する、すなわち、マーカーおよび第 2 の核酸が子孫間でランダムにソートする状態を指す。連鎖平衡を示す核酸は (それらが同じ染色体上にあるとなかろうと) 連結していないとみなされる。本明細書で使用される場合、「連鎖不平衡」は、マーカーおよび第 2 の核酸がランダムでない様式で分離する；すなわち、核酸が 50% 未満の組換え頻度を有する (したがって、定義によると、同じ連鎖群上で 50 cM 未満離れている) 状態を指す。いくつかの例では、連鎖不平衡を示す核酸は連結しているとみなされる。

40

【0062】

連結した、密に連結した、および極めて密に連結した：本明細書で使用される場合、マーカーと第 2 の核酸 (例えば、導入遺伝子、PTU および第 2 のマーカー) との間の連鎖は、染色体上の核酸が次の世代の個体に一緒に伝えられる測定可能な確率を示す現象を指

50

し得る。したがって、あるマーカーと第2の核酸の連鎖は、組換え頻度として測定および/または表現され得る。2つの核酸が互いに近いほど、この確率が「1」に近くなる。したがって、「連結した」という用語は、0.5より大きい確率(マーカー/遺伝子が異なる染色体上に位置する場合、独立組み合わせから予測される)で、第2の核酸と一緒に伝えられる1つまたはそれ以上の遺伝子またはマーカーを指し得る。遺伝子(例えば、導入遺伝子)の存在が個体の表現型に寄与する場合、遺伝子に連結したマーカーは表現型に連結していると言われ得る。したがって、「連結している」という用語は、マーカーと遺伝子との間、またはマーカーと表現型との間の関係を指し得る。

【0063】

相対的遺伝的距離(交差度数によって決定され、センチモルガン(cM)で測定される)は、一般的に2つの連結したマーカーまたは遺伝子が染色体上で互いに離れている物理的距離(塩基対で測定される)に比例する。1センチモルガンは、1%組換え頻度を示す(すなわち、2つのマーカーの間で交差イベントが100回の細胞分裂毎に1回起こる)2つの遺伝子マーカーの間の距離として定義される。一般に、あるマーカーが別のマーカーまたは遺伝子と近いほど(これらの間の距離が遺伝的距離に関して測定されようと、物理的距離に関して測定されようと)、これらがより密に連結している。染色体距離は形質間の組換えイベントの頻度にほぼ比例するので、組換え頻度と相関するおおよその物理的距離が存在する。この相関は、主要な作物植物(Helentjaris and Burr (eds.) (1989) *Development and Application of Molecular Markers to Problems in Plant Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY; Gresshoff (ed.) (1994) *Plant Genome Analysis*. CRC Press, Boca Raton, FL; Lander et al. (1987) *Genomics* 1:174-81; Tanksley et al. (1988) 「Molecular mapping of plant chromosomes」 In *Chromosome Structure and Function*. Gustafson and Appels (eds.) Plenum Press, NY, pp.157-73) および多くの他の生物にわたって一般的に知られているまたは容易に決定可能である。例えば、1cMは酵母では約2.5~3.0kb、シロイヌナズナでは約140kb、ヒマワリでは約400kbおよびユウカリでは約350kbに相当する。

【0064】

「連結している」という用語は、本明細書においては50%未満(すなわち、50cM未満)の組換え頻度を示す1つまたはそれ以上の核酸を指し得る。例えば、「連結している」核酸は、約45%以下、約40%以下、約35%以下、約30%以下、約25%以下、約20%以下、約15%以下、および約10%以下の頻度で再結合し得る。前記組換え頻度に対応する同じ染色体上の(異なる染色体上の核酸は連鎖平衡であると予想される)このような核酸間の物理的距離は宿主ゲノムに依存し、上に示されているように容易に計算され得る。

【0065】

本明細書で使用される場合、「密に連結している」という用語は、約20%以下(すなわち、約20cM以下)の組換え頻度を示す1つまたはそれ以上の核酸を指し得る。例えば、「密に連結している」核酸は、22%以下、約18%以下、約16%以下、約14%以下、約12%以下、約10%以下、約8%以下、約6%以下、約4%以下、および約2%以下の頻度で再結合し得る。

【0066】

本明細書で使用される場合、「極めて密に連結している」という用語は、約10%以下(すなわち、約10cM以下)の組換え頻度を示す1つまたはそれ以上の核酸を指し得る。例えば、「極めて密に連結している」核酸は、11%以下、約9%以下、約8%以下、約7%以下、約6%以下、約5%以下、約4%以下、約3%以下、約2%以下、および約1%以下の頻度で再結合し得る。

【0067】

特定の核酸が特定の表現型に寄与するポリペプチドをコードする遺伝子に近いほど(遺伝的距離に関して測定されようと、物理的距離に関して測定されようと)、特定の核酸は表現型とより密に連結している。前記を考慮して、特定の遺伝子または表現型と連結して

10

20

30

40

50

いる核酸は、遺伝子または表現型と密に連結している核酸、および極めて密に連結している核酸を含むと認識されるだろう。いくつかの実施形態では、特定の核酸がFAD3座（例えば、改変または破壊されたFAD3座）に近いほど（遺伝的距離に関して測定されようと、物理的距離に関して測定されようと）、特定の核酸はFAD3座において組み込まれている外因性核酸によって与えられる任意の形質/表現型と（または非改変座の場合、野生型FAD3表現型と）より密に連結している。したがって、組み込まれた外因性核酸を含むFAD3座と連結している、密に連結しているおよび/または極めて密に連結している遺伝子マーカーは、組み込まれた核酸を含む生物（例えば、植物および植物品種）を同定する、組み込まれた核酸によって与えられる表現型を含む生物を同定する、ならびにこのような組み込まれた核酸および/または組み込まれた核酸によって与えられる表現型を他の適合性生物中で繁殖させるためのMASプログラムで有用となり得る。

10

【0068】

マーカー利用育種：本明細書で使用される場合、「マーカー利用育種」という用語は、1つまたはそれ以上の形質（例えば、ポリジーン形質）のために直接植物を育種する手法を指し得る。現在の実際問題として、植物育種家は、容易に検出可能な形質、例えば、花の色、種皮の外観、または農業経済学的に望ましい形質に関連するアイソザイム変異形を同定しようと試みている。その結果、植物育種家は、容易に検出可能な形質の分離に従うことによって、分離している育種集団の農学的形質に従う。しかしながら、対象となる形質と、植物育種に使用するために利用可能な容易に検出可能な形質との間のこれらの連鎖関係はほとんど存在しない。本発明のいくつかの実施形態では、マーカー利用育種が、対象となる形質に寄与する外因性核酸が組み込まれたFAD3座に連結した1つまたはそれ以上の遺伝子マーカー（例えば、SNP、アイソザイムおよび/またはSSRマーカー）を同定する工程と、1つまたはそれ以上の遺伝子マーカーの分離に従うことによって分離している育種集団の対象となる形質に従う工程とを含む。いくつかの例では、1つまたはそれ以上の遺伝子マーカーの分離が、1つまたはそれ以上の遺伝子マーカーの存在について子孫植物からの遺伝子サンプルをアッセイすることによって、1つまたはそれ以上の遺伝子マーカーのためのプローブを利用して決定され得る。マーカー利用育種は、植物品種の改善のための時間および費用効率的なプロセスを提供する。

20

【0069】

形質または表現型：「形質」および「表現型」という用語は本明細書において互換的に使用される。本開示の目的のために、特に対象となる形質は、例えば、作物植物において発現され得るような農業経済学的に重要な形質、および標的化組込みイベントからの導入遺伝子発現産物の産生を含む。「分子表現型」という用語は、（1つまたはそれ以上の）分子の集団のレベルで検出可能な表現型を指し得る。いくつかの例では、分子表現型は、分子レベルでのみ検出可能であり得る。表現型の検出可能な分子は核酸（例えば、ゲノムDNAもしくはRNA）；タンパク質；および/または代謝産物であり得る。例えば、分子表現型は、（例えば、植物発育の特定の段階における、または環境条件もしくはストレスに応じた）1つまたはそれ以上の遺伝子産物についての発現プロファイルであり得る。

30

【0070】

量的形質座位：遺伝子（相加、優先および上位）および環境の影響により絶えず変化する形質は一般的に「量的形質」と呼ばれる。量的形質は、表現型の連続分布をもたらす遺伝子発現への環境的影響、および多遺伝子遺伝によってもたらされる複雑な分離パターンの2つの因子に基づいて「質的」または「離散」形質から識別され得る。量的形質の発現に関連するゲノムの1つまたはそれ以上の領域の同定が、このような領域を「量的形質座位（「QTL」）」と定義する。

40

【0071】

植物：本明細書で使用される場合、「植物」という用語は、全植物、植物に由来する細胞もしくは組織培養物、および/または前記のいずれかの任意の部分の部分を指し得る。したがって、「植物」という用語は、例えば、限定されないが、全植物；植物成分および/または器官（例えば、葉、茎および根）；植物組織；種子；ならびに植物細胞を包含する。植

50

物細胞は、例えば、限定されないが、植物中および/または植物の細胞、植物から単離された細胞、ならびに植物から単離された細胞の培養を通して得られた細胞であり得る。

【0072】

「トランスジェニック植物」は、その細胞の少なくとも1つの中に外因性ポリヌクレオチドを含む植物である。「トランスジェニック」という用語は、本明細書において、その遺伝子型が外因性核酸の存在によって変えられた任意の細胞、細胞系、カルス、組織、植物部位、または植物を指すために使用される。したがって、この用語は、外因性ポリヌクレオチドを含むように最初に変えられたトランスジェニック生物および細胞、ならびに最初のトランスジェニック生物または細胞の交雑または無性繁殖によって作成された生物および細胞を包含する。本明細書で使用される「トランスジェニック」という用語は、従来の植物育種法（例えば、非トランスジェニック生物のみの交雑）または天然のイベント（例えば、ランダム他家受粉、非組換えウイルス感染、非組換え細菌形質転換、非組換え転位および自然突然変異）によって導入されたゲノム（染色体または染色体外）変化を包含しない。

10

【0073】

植物「系統」、「品種」または「株」は、同じ血統を有する個々の植物の群である。ある系統の植物は、一般的にある程度近交系であり、一般的にほとんどの遺伝子座（例えば、FAD3座）でホモ接合性および同種である。「亜系統」は、同じ祖先に由来する他の類似の近交系サブセットとは遺伝的に異なる共通の祖先からの子孫の近交系サブセットを指し得る。いくつかの実施形態では、「亜系統」は、残りの分離座がほとんどまたは全ての座にわたってホモ接合性となるまで、F₃ ~ F₅ 世代で選択される個々のトランスジェニック植物からの種子を近親交配することによって産生され得る。

20

【0074】

「結合タンパク質」は、別の分子に結合することができるタンパク質である。結合タンパク質は、例えば、DNA分子（DNA結合タンパク質）、RNA分子（RNA結合タンパク質）および/またはタンパク質分子（タンパク質結合タンパク質）に結合することができる。タンパク質結合タンパク質の場合、これは（ホモダイマー、ホモトリマー等を形成するために）自身に結合することができる、および/または異なるタンパク質の1つまたはそれ以上の分子に結合することができる。結合タンパク質は、2つ以上の型の結合活性を有することができる。例えば、ジンクフィンガータンパク質は、DNA結合、RNA結合およびタンパク質結合活性を有する。

30

【0075】

「ジンクフィンガーDNA結合タンパク質」（または結合ドメイン）は、1つまたはそれ以上のジンクフィンガーを通して配列特異的様式でDNAに結合するタンパク質または大型タンパク質中のドメインであり、ジンクフィンガーはその構造が亜鉛イオンの配位を通して安定化される結合ドメイン中のアミノ酸配列の領域である。ジンクフィンガーDNA結合タンパク質という用語は通常、ジンクフィンガータンパク質またはZFPと略される。

【0076】

「TALE DNA結合ドメイン」または「TALE」は、1つまたはそれ以上のTALE反復ドメイン/単位を含むポリペプチドである。反復ドメインは、TALEとその同族の標的DNA配列の結合に参与する。単一「反復単位」（「反復」とも呼ばれる）は、典型的には長さ33 ~ 35個のアミノ酸であり、天然のTALEタンパク質中の他のTALE反復配列と少なくともいくつかの配列相同性を示す。

40

【0077】

ジンクフィンガーおよびTALE結合ドメインは、例えば、天然のジンクフィンガーまたはTALEタンパク質のヘリックス認識領域の操作（1つまたはそれ以上のアミノ酸を変化させる）を通して、所定のヌクレオチド配列に結合するよう「操作」され得る。そのため、操作DNA結合タンパク質（ジンクフィンガーまたはTALE）は、非天然タンパク質である。DNA結合タンパク質を操作する方法の非限定的例は、設計および選択である

50

。設計DNA結合タンパク質は、その設計/組成が原則として合理的な基準から生じる、天然で生じないタンパク質である。設計のための合理的な基準は、置換ルールならびに既存のZFPおよび/またはTALE設計の情報を記憶するデータベース中の情報を処理するための計算機化アルゴリズムの適用、ならびにデータの結合を含む。例えば、米国特許第6,140,081号明細書；第6,453,242号明細書；および第6,534,261号明細書；を参照されたい；また国際公開第98/53058号パンフレット；国際公開第98/53059号パンフレット；国際公開第98/53060号パンフレット；国際公開第02/016536号パンフレットおよび国際公開第03/016496号パンフレットならびに米国特許出願公開第20110301073号明細書を参照されたい。

10

【0078】

「選択された」ジンクフィンガータンパク質またはTALEは、その産生が経験的プロセス、例えば、ファージディスプレイ、相互作用トラップまたはハイブリッド選択から主に生じる、天然で見られないタンパク質である。例えば、米国特許第5,789,538号明細書；米国特許第5,925,523号明細書；米国特許第6,007,988号明細書；米国特許第6,013,453号明細書；米国特許第6,200,759号明細書；国際公開第95/19431号パンフレット；国際公開第96/06166号パンフレット；国際公開第98/53057号パンフレット；国際公開第98/54311号パンフレット；国際公開第00/27878号パンフレット；国際公開第01/60970号パンフレット；国際公開第01/88197号パンフレット；国際公開第02/099084号パンフレットおよび米国特許出願公開第20110301073号明細書を参照されたい。

20

【0079】

「切断」は、DNA分子の共有結合骨格の破損を指す。切断は、それだけに限らないが、ホスホジエステル結合の酵素的または化学的加水分解を含む種々の方法によって開始され得る。一本鎖切断と二本鎖切断の両方が可能であり、二本鎖切断は2つの異なる一本鎖切断イベントの結果として起こり得る。DNA切断は、平滑末端または付着末端のいずれかの産生をもたらす得る。特定の実施形態では、融合ポリペプチドが標的化二本鎖DNA切断に使用される。

【0080】

「切断ハーフドメイン (cleavage half-domain)」は、第2のポリペプチド (同一または異なる) と併せて、切断活性 (好ましくは、二本鎖切断活性) を有する複合体を形成するポリペプチド配列である。「第1および第2の切断ハーフドメイン」、「+および-切断ハーフドメイン」ならびに「右および左切断ハーフドメイン」という用語は、二量体化する対の切断ハーフドメインを指すために互換的に使用される。

30

【0081】

「操作切断ハーフドメイン」は、別の切断ハーフドメイン (例えば、別の操作切断ハーフドメイン) と共に絶対ヘテロダイマーを形成するように改変された切断ハーフドメインである。全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第2005/0064474号明細書、第20070218528号明細書、第2008/0131962号明細書および第2011/0201055号明細書も参照されたい。

40

【0082】

二本鎖DNA切断をもたらす手段：本明細書で使用される場合、「二本鎖DNA切断をもたらす手段」という用語は、米国特許法第112条第6パラグラフによって認可される特別請求規定を援用することが意図されている。具体的には、「二本鎖DNA切断をもたらす手段」は、二本鎖DNA分子の両鎖を切断することができる分子構造を指す。このような構造は、多くの公知のヌクレアーゼタンパク質、例えば、FokIヌクレアーゼドメインに含まれるポリペプチドドメインを含み、触媒ドメインはタンパク質MmeI、コリシンE7 (CEA7_ECOLX)、コリシンE9、APFL、EndA、エンドI (END1_ECOLI)、ヒトエンドG (NUCG_HUMAN)、ウシエンドG (NUC

50

G__BOVIN)、R.HinP11、l-Bas1、l-Bmol、l-Hmul、l-Tev1、l-Tev11、l-Tev111、l-Twol、R.Mspl、R.Mval、NucA、NucM、Vvn、Vvn__CLS、ブドウ球菌ヌクレアーゼ(NUC__STAAU)、ブドウ球菌ヌクレアーゼ(NUC__STAHY)、小球菌ヌクレアーゼ(NUC__SHIFL)、エンドヌクレアーゼyncB、エンドデオキシリボヌクレアーゼI(ENRN__BPT7)、Metnase、Nb.BsrDI、BsrDI A、Nt.BspD61(R.BspD61大型サブユニット)、ss.BspD61(R.BspD61小型サブユニット)、R.PIe1、Mly1、Alw1、Mval2691、Bsr1、Bsm1、Nb.BtsCI、Nt.BtsCI、Rl.Bts1、R2.Bts1、BbvCIサブユニット1、BbvCIサブユニット2、BpulOI サブユニット、BpulOI サブユニット、Bmr1、Bfil、l-Crel、hExo1(EX01JHUMAN)、酵母Exo1(EX01__YEAST)、大腸菌Exo1、ヒトTREX2、マウスTREX1、ヒトTREX1、ウシTREX1、ラットTREX1、ヒトDNA2、酵母DNA2(DNA2__YEAST)からなる群から選択される。

10

【0083】

二本鎖DNA切断を修復する手段：本明細書で使用される場合、「二本鎖DNA切断を修復する手段」という用語も、米国特許法第112条第6パラグラフによって認可される特別請求規定を援用することが意図されている。具体的には、「二本鎖DNA切断を修復する手段」は、例えば、単一の二本鎖DNA分子を切断することによって産生される末端を連結する、または単一の二本鎖DNAを切断することによって産生される一端と外因性二本鎖DNA分子の末端を連結することによって、二本鎖DNA分子の末端の連結を促進/触媒することができる分子構造を指す。このような構造は、多くの公知のリガーゼタンパク質、例えば、Crelリコンビナーゼに含まれるポリペプチドドメインを含む。いくつかの例では、同じ分子構造が、二本鎖DNA切断をもたらす手段と、二本鎖DNA切断を修復する手段の両方として作用することができ、ここでは同じ構造が二本鎖DNA分子の切断と修復の両方を促進する(例えば、Hinリコンビナーゼ)。

20

【0084】

ゲノム中の部位特異的二本鎖切断の誘導は、相同組換え修復(HDR)または非相同末端結合(NHEJ)修復を通して二本鎖切断を回復させる宿主植物細胞DNA修復経路を誘導する。植物では、科学文献が、野生のゲノムまたは予備操作位置への正確な遺伝子またはドナーDNA組込みが、標的化二本鎖切断に隣接する配列との種々の量の配列同含有を含む入来ドナーDNA構築物を伴っていることを報告している。このようなドナーの特定の標的座への組込みは、おそらくHDR経路に頼っている。植物における遺伝子標的化のためにHDRアプローチにもっぱら頼ることは、HDR修復経路が、NHEJと比べると支配的DNA修復経路ではないという報告のために、制限を有し得る。標的特異的DNA切断(ZFN、TALENsまたは操作メガヌクレアーゼ等)を利用する公開されている植物科学文献では、NHEJ経路が特異的突然変異(挿入または欠失)をゲノムに導入する方法として報告されている。ここでは、本発明者らは、0~10bp未満の相同性領域を有する種々のドナーDNA設計の存在下で、(ZFN、TALENs等によって誘導される)部位特異的二本鎖切断が、植物におけるNHEJ修復経路を介して標的化切断において特異的に挿入され得ることを報告する。線状から環状の一本鎖から二本鎖に及ぶ小型の1~10bpとの相同性が0の種々の異なるDNAドナー設計が、NHEJ経路を用いて特異的位置に標的化され得る。NHEJベースのドナーDNA植物ゲノム標的化は、「付着末端捕捉」に基づくことができ、ここではFok1(または他のII型エンドヌクレアーゼドメイン)によって産生されたゲノム中の標的化二本鎖切断および対応する付着末端がNHEJドナーDNA設計となる。付着末端ドナーDNAは、予め定義されたオーバーハングを有する線状ドナーDNAとして細胞に直接送達され得る。代替手法は、宿主標的ZFNおよび標的認識部位と同一の少なくとも1つのZFN認識部位を含む環状DNAドナー分子を同時送達することによってインビボでドナーDNA付着末端を産生

30

40

50

することである。少なくとも1つのZFNの発現が、宿主ゲノムDNA（野生のまたは予備操作された）および環状ドナーDNAを切断して、宿主NHEJ修復経路を用いて回復される付着末端を産生する。

【0085】

ドナー分子上に1つまたはそれ以上のZFN切断部位を有することが可能である（ドナー分子全体を直線化するための単一ZFN切断部位、小型ドナーDNA断片を放出するための2つの同じZFN部位、またはドナーから断片および宿主ゲノムDNAから対応する断片（DNA置換）を放出するための2つの異なるZFN部位）。

【0086】

したがって、ドナーポリヌクレオチドは一本鎖および/または二本鎖のDNAまたはRNAであり得、線状または環状型で細胞に導入され得る。例えば、米国特許出願公開第20100047805号明細書および第20110207221号明細書を参照されたい。ある場合、本発明の実施形態は、線状外因性（ドナー）核酸、これらの核酸を含む組成物、ならびにこれらの線状ドナー分子を製造および使用方法も含み得る。特定の実施形態では、線状ドナー分子が、導入される細胞中に安定的に持続する。他の実施形態では、線状ドナー分子が、例えば、ドナー分子の端部に1つまたはそれ以上の塩基対間の1つまたはそれ以上のホスホロチオエートホスホジエステル結合を配置することによって、エキソヌクレアーゼ切断に耐えるよう改変される。線状外因性核酸は、一本鎖特異的DNAを含んでもよい。

10

【0087】

IV. FAD3 性能座

FAD3（脂肪酸デサチュラーゼ3）と命名される座は、植物中の脂肪酸含量の複雑な多遺伝子形質の遺伝に関与するQTLに含まれる。FAD3は、リノール酸（18:2）のリノレン酸（C18:3）への不飽和化を担う酵素をコードしている。Tanhuanpaa et al.(1998) Mol. Breed. 4:543-50; Schierholt et al.(2001) Crop Sci. 41:1444-9。

20

【0088】

植物油生合成経路において、脂肪酸デサチュラーゼ（FAD）は植物脂質生合成において重要な役割を果たしており、その活性は脂肪酸組成に有意に影響を及ぼす。FADは植物中に豊富にあり、発現解析が、FAD mRNAが過剰に産生されていることを示唆した。さらに、FAD遺伝子は、種々の組織および細胞型、ならびにプラスチドおよび小胞体を含む細胞内区画で発現している。

30

【0089】

植物の脂肪酸組成、および多くの用途におけるそこから産生される油の性能は、主要な脂肪酸構成成分であるオレイン酸、リノール酸およびリノレン酸（C18:3）の相対濃度によって決定される。これらの脂肪酸の濃度は、酵素FAD2およびFAD3の機能によって主に調節される。オレイン酸は以下のスキームにしたがって、植物中でリノール酸およびリノレン酸に変換される：

【数1】



40

【0090】

FAD3遺伝子は、それだけに限らないが、トウモロコシ、ダイズ、ワタ、シロイヌナズナ、コムギ、イネ科牧草、イネ、ヒマワリおよびアブラナ属を含む主要な植物および藻類の種で同定されており、FAD3発現の改変は、このような生物における脂肪酸プロファイルの変化をもたらす。さらに、改変FAD3遺伝子を含む植物が商品化されており、FAD3遺伝子の破壊は、宿主植物への農学的不利益なしに宿主植物によって産生される油の栄養的および機能的特性を改善することができることが示されている。例えば、Nexera（登録商標）ブランド（Dow AgroSciences, LLC）で商品化されているアブラナおよびヒマワリ品種は、野生型アブラナおよびヒマワリのプロファイ

50

ルと比べると、高いオレイン酸、低いリノール酸および低いリノレン酸（および低い飽和脂肪酸）組成によって特徴付けられる。欧州、北米およびオーストラリアで栽培されている主なアブラナの種は、セイヨウアブラナ、ブラッシカ・オレラセア (*B. oleracea*)（二倍体 C ゲノムを有する）およびブラッシカ・ラパ (*B. rapa*)（二倍体 A ゲノムを有する）のハイブリダイゼーションから生じたと考えられる倍数体アブラナ属の種である。細胞遺伝学研究は、A A および C C ゲノムが互いに部分的に相同性であるとして一定程度の近縁性を示すことを明らかにした。A ゲノムと C ゲノムの両方が高い割合の相同遺伝子および / またはパラログス遺伝子を含んでいる。したがって、A A および C C ゲノムが共通の祖先ゲノムに由来すると考えられる。Prakash and Hinata (1980) *Opera Botanica* 55: 1-57。両祖先種のゲノムは技術的に二倍体として分類されるが、これらのゲノムは高い割合の互いに重複性である領域を含む。Song et al. (1991) *Theor. Appl. Genet.* 82:296-304。詳細な小器官および核 RFLP 分析は、ブラッシカ・ラパの A A ゲノムがセイヨウアブラナに 10 個の染色体を与える一方で、ブラッシカ・オレラセアが母系ドナーとしてのその C C ゲノムから 9 個の染色体を与えることを明らかにした。Song et al. (1992) *Genome* 35:992-1001。両祖先ゲノム中のゲノム重複の数ならびに A、B および C ゲノム間での高い類似性の割合を通して、FAD2 および FAD3 遺伝子のいくつかのコピーが生じた。実際問題として、この事実は、特定の脂肪酸プロファイルをもたらすために、これらの遺伝子の改変および / または破壊されたコピーを有するアブラナを育種することを困難にする。

10

【0091】

20

アブラナの FAD3 の公知の機能遺伝子コピーの全てが A ゲノムの N4 連鎖群に位置している。Scheffler et al. (1997) *TAG* 94(5):583-91; Schierholt et al. (2000) *TAG* 101(5-6):897-901。より最近では、アブラナにおける高いオレイン形質が、A ゲノムに位置する改変および破壊された FAD3 遺伝子に関連付けられている。米国特許出願公開第 2006/0248611 A 1 号明細書; Hu et al. (2006) 「Identification and Mapping of FAD2 and FAD3 Mutations and Development of Allele-specific Markers for High Oleic and Low Linolenic Acid Contents in Canola (*Brassica napus* L.)」、Plant & Animal Genomes XIV Conference, January 14-18, 2006, San Diego, CA。FAD3 対立遺伝子の不活性化は、リノール酸のリノレン酸への不飽和化を低減することによってオレイン酸含量の制御に寄与する。この高いオレイン酸および FAD3 形質は、約 77% の特徴的なオレイン酸含量を有するセイヨウアブラナ品種 (DMS100) で同定された。米国特許出願公開第 20060248611 号明細書を参照されたい。さらに、Fad3 および高いオレイン酸形質のアブラナへの遺伝子移入を助けるために遺伝子マーカーが開発されている。

30

【0092】

FAD3 座は、植物の価値に悪影響を及ぼすことなく、かつ多くの目的のために、FAD3 発現の変化、油含量 / 比の変化ならびに / あるいは所望の導入遺伝子の組み込みおよび発現を含むその価値を実際に増加させて、植物中で改変および / または破壊され得る。さらに、植物における FAD 座の遍在的性質により、FAD3 座は、例えば、限定されないが、アブラナ; ダイズ; トウモロコシ; コムギ; イネ科牧草; アブラナ属の種; イネ; トマト; オオムギ; エンパク; ソルガム; ワタ; およびヒマワリ、ならびに真菌類および藻類を含む多くの種で少なくともいくつかの目的を損なうことなく改変および / または破壊され得る。本発明の実施形態は、FAD3 座、および外因性核酸の組み込みのための性能座としてのその使用を含む。例では、FAD3 座が、例えば、限定されないが、宿主生物の生活環中にほぼ一貫したレベルの発現があること; および驚くべきことに、FAD3 座におけるドナー DNA の挿入が宿主に質または適合性の不利益を誘導しないことを含む、性能座としてのその使用の状況の中で望ましいことが分かっているいくつかの特徴の少なくとも 1 つを示す。

40

【0093】

本発明のいくつかの実施形態では、少なくとも 1 つの FAD3 座 (例えば、FAD3 A

50

および/またはFAD3C座)が、外因性核酸(例えば、対象となるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸)の部位特異的組込みのための標的部位として使用される。特定の実施形態では、外因性核酸の組込みが改変された座をもたらす。例えば、外因性核酸の組込みは、破壊された(すなわち、不活性化された)FAD3遺伝子を産生するように座を改変し得る。

【0094】

いくつかの実施形態では、FAD3座が配列番号20~23、配列番号25~38、配列番号40~45、配列番号47および配列番号49からなる群から選択されるヌクレオチド配列の相補鎖に特異的にハイブリダイズ可能なヌクレオチド配列を含み得る。例えば、FAD3座は、配列番号20~23、配列番号25~38、配列番号40~45、配列番号47および配列番号49からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含み得る。いくつかの実施形態では、FAD3座が配列番号20~23、配列番号25~38、配列番号40~45、配列番号47および配列番号49からなる群から選択されるヌクレオチド配列と実質的に同一のヌクレオチド配列を含み得る。例えば、いくつかの実施形態では、FAD3座が配列番号20~23、配列番号25~38、配列番号40~45、配列番号47および配列番号49からなる群から選択されるヌクレオチド配列と少なくとも約85%同一のヌクレオチド配列を含むFAD3ホモログ(例えば、オルソログまたはパラログ)である。FAD3ホモログは、例えば、限定されないが、配列番号20~23、配列番号25~38、配列番号40~45、配列番号47および配列番号49からなる群から選択されるヌクレオチド配列と少なくとも80%;少なくとも85%;少なくとも約90%;少なくとも約91%;少なくとも約92%;少なくとも約93%;少なくとも約94%;少なくとも約95%;少なくとも約96%;少なくとも約97%;少なくとも約98%;少なくとも約99%;少なくとも約99.5%;99.6%、99.7%、99.8%および/または少なくとも約99.9%同一であるヌクレオチド配列を含み得る。このようなFAD3ホモログは、種々の生物について当業者に容易に利用可能な任意の完全または部分的ゲノムから容易に同定および単離され得る。

10

20

【0095】

IV. FAD3座における核酸の標的化組込み

FAD3座における外因性核酸の部位特異的組込みは、当業者に公知の任意の技術によって達成され得る。いくつかの実施形態では、FAD3座における外因性核酸の組込みが細胞(例えば、単離細胞または組織もしくは生物中の細胞)を外因性核酸を含む核酸分子と接触させることを含む。例では、このような核酸分子が、核酸分子と少なくとも1つのFAD3座との間の相同組換えを促進する外因性核酸に隣接するヌクレオチド配列を含み得る。特定の例では、相同組換えを促進する外因性核酸に隣接するヌクレオチド配列が、FAD3座の外因性ヌクレオチドと相補的であり得る。特定の例では、相同組換えを促進する外因性核酸に隣接するヌクレオチド配列が、予め組み込まれた外因性ヌクレオチドと相補的であり得る。いくつかの実施形態では、複数の外因性核酸が、1つのFAD3座において、例えば、遺伝子スタッキングで組み込まれ得る。

30

【0096】

FAD3座における核酸の組込みは、いくつかの実施形態では、宿主細胞の内因性細胞機構、例えば、限定されないが、内因性DNAおよび内因性リコンビナーゼ酵素によって促進(例えば、触媒)され得る。いくつかの実施形態では、FAD3座における核酸の組込みが、宿主細胞に提供される1つまたはそれ以上の因子(例えば、ポリペプチド)によって促進され得る。例えば、ヌクレアーゼ、リコンビナーゼおよび/またはリガーゼポリペプチドは、ポリペプチドを宿主細胞と接触させることによって、またはポリペプチドを宿主細胞中で発現させることによって、(独立にまたはキメラポリペプチドの一部として)提供され得る。したがって、いくつかの例では、少なくとも1つのヌクレアーゼ、リコンビナーゼおよび/またはリガーゼポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸が、FAD3座において部位特異的に組み込まれる核酸と同時にまたは順次、宿主細胞に導入され得、少なくとも1つのヌクレアーゼ、リコンビナーゼおよび/またはリガーゼ

40

50

ポリペプチドが宿主細胞中のヌクレオチド配列から発現される。

【0097】

A. DNA結合ポリペプチド

いくつかの実施形態では、部位特異的組込みが、例えば、宿主生物のゲノム中の特定のヌクレオチド配列を認識し、これに結合することができる因子を利用することによって達成され得る。例えば、多くのタンパク質が、部位特異的様式でDNAを認識し、これに結合することができるポリペプチドドメインを含む。DNA結合ポリペプチドによって認識されるDNA配列は、「標的」配列と呼ばれ得る。部位特異的様式でDNAを認識し、これに結合することができるポリペプチドドメインは、一般的にドメインが元々単離されたタンパク質以外のポリペプチド中で発現する場合でさえ、正確に折り畳み、独立に機能して部位特異的様式でDNAに結合する。同様に、DNA結合ポリペプチドによる認識および結合のための標的配列は、一般的に大型DNA構造（例えば、染色体）中に存在する場合でさえ、特に標的配列が位置する部位が可溶性細胞タンパク質にアクセス可能であることが知られているもの（例えば、遺伝子）である場合に、このようなポリペプチドによって認識され、結合され得る。

10

【0098】

天然に存在するタンパク質から同定されたDNA結合ポリペプチドは、典型的には離散的ヌクレオチド配列またはモチーフ（例えば、コンセンサス認識配列）に結合するが、異なるヌクレオチド配列またはモチーフを認識するように多くのこのようなDNA結合ポリペプチドを改変する方法が当分野で公知である。DNA結合ポリペプチドは、例えば、限定されないが、ジンクフィンガーDNA結合ドメイン；ロイシンジッパー；UPA DNA結合ドメイン；GAL4；TAL；LexA；Tetリプレッサー；LacR；およびステロイドホルモン受容体を含む。

20

【0099】

いくつかの例では、DNA結合ポリペプチドがジンクフィンガーである。個々のジンクフィンガーモチーフは、大きい範囲のDNA部位のいずれかに特異的に標的化および結合するよう設計され得る。標準Cys₂His₂（および非標準Cys₃His）ジンクフィンガーポリペプチドは、ヘリックスを標的DNA二重螺旋の主溝に挿入することによって、DNAに結合する。ジンクフィンガーによるDNAの認識はモジュール式であり；各フィンガーが主に標的中の3つの連続した塩基対に接触し、ポリペプチド中の数個の重要な残基が認識を媒介する。標的化エンドヌクレアーゼに複数のジンクフィンガーDNA結合ドメインを包含させることによって、標的化エンドヌクレアーゼのDNA結合特異性がさらに増加され得る（したがって、それによって与えられる任意の遺伝子調節効果の特異性も増加され得る）。例えば、Urnov et al.(2005) Nature 435:646-51を参照されたい。したがって、1つまたはそれ以上のジンクフィンガーDNA結合ポリペプチドは、宿主細胞に導入された標的化エンドヌクレアーゼが宿主細胞のゲノム中で特有のDNA配列と相互作用するように操作および利用され得る。

30

【0100】

好ましくは、ジンクフィンガータンパク質は、選択された標的部位に結合するよう操作されているという点で非天然である。例えば、全て全体が参照により本明細書に組み込まれる、Beerli et al.(2002) Nature Biotechnol.20:135-141；Pabo et al.(2001) Ann.Rev.Biochem.70:313-340；Isalan et al.(2001) Nature Biotechnol.19:656-660；Segal et al.(2001) Curr.Opin.Biotechnol.12:632-637；Choo et al.(2000) Curr.Opin.Struct.Biol.10:411-416；米国特許第6,453,242号明細書；第6,534,261号明細書；第6,599,692号明細書；第6,503,717号明細書；第6,689,558号明細書；第7,030,215号明細書；第6,794,136号明細書；第7,067,317号明細書；第7,262,054号明細書；第7,070,934号明細書；第7,361,635号明細書；第7,253,273号明細書；および米国特許出願公開第2005/0064474号明細書；第2007/0218528号明細書；第2005/0267061号明細書を参照されたい。

40

50

【0101】

操作ジンクフィンガー結合ドメインは、天然ジンクフィンガータンパク質と比べて新規な結合特異性を有することができる。操作法は、それだけに限らないが、合理的な設計および種々の型の選択を含む。合理的な設計は、例えば、トリプレット（またはクアドラプレット）ヌクレオチド配列および個々のジンクフィンガーアミノ酸配列を含むデータベースを用いることを含み、ここでは各トリプレットまたはクアドラプレットヌクレオチド配列が、特定のトリプレットまたはクアドラプレット配列に結合するジンクフィンガーの1つまたはそれ以上のアミノ酸配列と関連する。例えば、全体が参照により本明細書に組み込まれる、共有されている米国特許第6,453,242号明細書および第6,534,261号明細書を参照されたい。

10

【0102】

ファージディスプレイおよびツーハイブリッドシステムを含む代表的な選択法は、米国特許第5,789,538号明細書；第5,925,523号明細書；第6,007,988号明細書；第6,013,453号明細書；第6,410,248号明細書；第6,140,466号明細書；第6,200,759号明細書；および第6,242,568号明細書ならびに国際公開第98/37186号パンフレット；国際公開第98/53057号パンフレット；国際公開第00/27878号パンフレット；国際公開第01/88197号パンフレットおよび英国特許第2,338,237号明細書に開示されている。さらに、ジンクフィンガー結合ドメインに対する結合特異性の強化が、例えば、共有されている国際公開第02/077227号パンフレットに記載されている。

20

【0103】

さらに、これらおよび他の文献に開示されているように、ジンクフィンガードメインおよび/またはマルチフィンガー型ジンクフィンガータンパク質は、例えば、長さが5個以上のアミノ酸のリンカーを含む、任意の適当なリンカー配列を用いて連結され得る。代表的なリンカー配列の長さ6個以上のアミノ酸については、米国特許第6,479,626号明細書；第6,903,185号明細書；および第7,153,949号明細書も参照されたい。本明細書に記載されるタンパク質は、タンパク質の個々のジンクフィンガー間に適当なリンカーの任意の組み合わせを含み得る。

【0104】

標的部位の選択；ZFPならびに融合タンパク質（および同タンパク質をコードするポリヌクレオチド）の設計および構築法は当業者に公知であり、米国特許第6,140,0815号明細書；第789,538号明細書；第6,453,242号明細書；第6,534,261号明細書；第5,925,523号明細書；第6,007,988号明細書；第6,013,453号明細書；第6,200,759号明細書；国際公開第95/19431号パンフレット；国際公開第96/06166号パンフレット；国際公開第98/53057号パンフレット；国際公開第98/54311号パンフレット；国際公開第00/27878号パンフレット；国際公開第01/60970号パンフレット；国際公開第01/88197号パンフレット；国際公開第02/099084号パンフレット；国際公開第98/53058号パンフレット；国際公開第98/53059号パンフレット；国際公開第98/53060号パンフレット；国際公開第02/016536号パンフレットおよび国際公開第03/016496号パンフレットに詳細に記載されている。

30

40

【0105】

さらに、これらおよび他の文献に開示されているように、ジンクフィンガードメインおよび/またはマルチフィンガー型ジンクフィンガータンパク質は、例えば、長さが5個以上のアミノ酸のリンカーを含む、任意の適当なリンカー配列を用いて連結され得る。代表的なリンカー配列の長さ6個以上のアミノ酸については、米国特許第6,479,626号明細書；第6,903,185号明細書；および第7,153,949号明細書も参照されたい。本明細書に記載されるタンパク質は、タンパク質の個々のジンクフィンガー間に適当なリンカーの任意の組み合わせを含み得る。

【0106】

50

いくつかの例では、DNA結合ポリペプチドがGAL4からのDNA結合ドメインである。GAL4は出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) のモジュラートランス活性化因子であるが、多くの他の生物のトランス活性化因子としても作用する。例えば、Sadowski et al.(1988) *Nature* 335:563-4を参照されたい。この調節システムでは、出芽酵母のガラクトース代謝経路の酵素をコードする遺伝子の発現が利用可能な炭素源によってストリンジントに調節される。Johnston (1987) *Microbiol.Rev.*51:458-76。これらの代謝酵素の転写制御は、正の調節タンパク質、GAL4とGAL4が特異的に結合する17bpの対称DNA配列(UAS)との間の相互作用によって媒介される。

【0107】

野生のGAL4は881個のアミノ酸残基を含み、99kDaの分子量を有する。GAL4は、その組み合わせられた活性がインピボでGAL4の活性の原因となる機能的自律ドメインを含む。Ma and Ptashne (1987) *Cell* 48:847-53); Brent and Ptashne (1985) *Cell* 43(3 Pt 2):729-36。GAL4のN末端の65個のアミノ酸は、GAL4 DNA結合ドメインを含む。Keegan et al.(1986) *Science* 231:699-704; Johnston (1987) *Nature* 328:353-5。配列特異的結合は、DNA結合ドメイン中に存在する6個のCys残基によって配位された二価カチオンの存在を要する。配位カチオン含有ドメインは、DNAヘリックスの主溝との直接接触を介して17bpのUASの各端で保存されたCCGトリプレットと相互作用し、これを認識する。Marmorstein et al.(1992) *Nature* 356:408-14。タンパク質のDNA結合機能は、活性化ドメインが転写を指示することができるように、C末端転写活性化ドメインをプロモーターの近くに配置する。

【0108】

特定の実施形態で利用され得るさらなるDNA結合ポリペプチドは、例えば、限定されないが、AVRBS3誘発性遺伝子からの結合配列; AVRBS3誘発性遺伝子からのコンセンサス結合配列またはそこから操作された合成結合配列(例えば、UPA DNA結合ドメイン); TAL; LexA(例えば、Brent & Ptashne (1985)、上記参照); LacR(例えば、Labow et al.(1990) *Mol.Cell.Biol.*10:3343-56; Baim et al.(1991) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 88(12):5072-6参照); ステロイドホルモン受容体(Elliston et al.(1990) *J.Biol.Chem.*265:11517-121); Tetリプレッサー(米国特許第6,271,341号明細書)およびテトラサイクリン(Tc)の存在下ではtetオペレーター配列に結合するが、不在下では結合しない突然変異Tetリプレッサー; NF-BのDNA結合ドメイン; ならびにGAL4、ホルモン受容体およびVP16の融合を利用する、Wang et al.(1994) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 91(17):8180-4に記載されている調節システムの成分を含む。

【0109】

特定の実施形態では、本明細書に記載される方法および組成物に使用されるヌクレアーゼの1つまたはそれ以上のDNA結合ドメインが天然のまたは操作された(非天然の)TALエフェクターDNA結合ドメインを含む。例えば、全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第20110301073号明細書を参照されたい。キサントモナス(*Xanthomonas*)属の植物病原性細菌は、重要な作物植物において多くの病気を引き起こすことが知られている。キサントモナスの病原性は、25種超の異なるエフェクタータンパク質を植物細胞に注入する保存されたIII型分泌(T3S)系に依存する。これらの注入されるタンパク質の中には、植物転写活性化物質を模倣し、植物トランスクリプトームを操作する転写活性化物質様(TAL)エフェクターがある(Kay et al (2007) *Science* 318:648-651参照)。これらのタンパク質は、DNA結合ドメインおよび転写活性化ドメインを含んでいる。最もよく特徴付けられているTALエフェクターの1つがキサントモナス・カムペストリス病原型ベスカトリア(*Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria*)のAVRBS3である(Bonas et al (1989) *Mol Gen Genet* 218: 127-136および国際公開第2010079430号パンフレット参照)。TALエフェクターは、タンデム反復の集中ドメインを含んでおり、各反復は、これらのタンパク質のDNA結合特異性の鍵となる約34個のアミノ酸を含んでいる。さらに、TALエフェクターは、核局

10

20

30

40

50

在化配列および酸性転写活性化ドメインを含んでいる（概要については、Schornack S, et al (2006) J Plant Physiol 163(3): 256-272参照）。さらに、植物病原性細菌である青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*) では、青枯病菌次亜種 1 菌株 G M I 1 0 0 0 および次亜種 4 菌株 R S 1 0 0 0 においてキサントモナスの A v r B s 3 ファミリーと相同性の b r g 1 1 および h p x 1 7 と命名された 2 つの遺伝子が発見された (Heuer et al (2007) Appl and Envir Micro 73(13): 4379-4384参照)。これらの遺伝子は互いにヌクレオチド配列が 98.9% 同一であるが、h p x 1 7 の反復ドメインにおける 1575 bp の欠失が異なる。しかしながら、両遺伝子産物は、キサントモナスの A v r B s 3 ファミリータンパク質と 40% 未満の配列同一性を有する。例えば、米国特許第 8,420,782 号明細書および第 8,440,431 号明細書ならびに米国特許出願公開第 20110301073 号明細書を参照されたい。

10

【0110】

他の実施形態では、ヌクレアーゼが C R I S P R / C a s 系を含む。系の R N A 成分をコードする C R I S P R (クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)) 座、およびタンパク質をコードする c a s (C R I S P R 関連) 座 (Jansen et al., 2002.Mol.Microbiol.43: 1565-1575; Makarova et al., 2002.Nucleic Acids Res.30: 482-496; Makarova et al., 2006.Biol.Direct 1: 7; Haft et al., 2005.PLoS Comput.Biol.1: e60) が C R I S P R / C a s ヌクレアーゼ系の遺伝子配列を構成する。微生物宿主の C R I S P R 座は、C R I S P R 関連 (C a s) 遺伝子および C R I S P R 媒介核酸切断の特異性をプログラミングすることができる非コード R N A 要素の組み合わせを含む。

20

【0111】

I I 型 C R I S P R は、最も良く特徴付けられた系の 1 つであり、4 つの連続工程で標的化 D N A 二本鎖切断を行う。最初に、2 つの非コード R N A である プレ c r R N A アレイおよび t r a c r R N A が C R I S P R 座から転写される。第 2 に、t r a c r R N A が プレ c r R N A の反復領域にハイブリダイズし、プレ c r R N A の、個々のスペーサー配列を含む成熟 c r R N A へのプロセッシングを媒介する。第 3 に、成熟 c r R N A : t r a c r R N A 複合体が、標的認識のためのさらなる要件である c r R N A 上のスペーサーと、プロトスペーサー隣接モチーフ (protospacer adjacent motif) (P A M) に隣接する標的 D N A 上のプロトスペーサーとの間のワトソン - クリック塩基対形成を介して、C a s 9 を標的 D N A に向ける。最後に、C a s 9 が標的 D N A の切断を媒介してプロトスペーサー中に二本鎖切断を作り出す。C R I S P R / C a s 系の活動は 3 つの工程を含む：(i) 「適応」と呼ばれる工程で、外来 D N A 配列を C R I S P R アレイに挿入して将来の攻撃を防ぐ、(i i) 関連するタンパク質の発現、ならびにアレイの発現およびプロセッシング、引き続いて (i i i) 外来核酸による R N A 媒介干渉。したがって、細菌細胞では、いわゆる「C a s」タンパク質のいくつかが C R I S P R / C a s 系の自然な機能と関係し、外来 D N A の挿入等の機能において役割を果たす。

30

【0112】

特定の実施形態では、C a s タンパク質が天然 C a s タンパク質の「機能的誘導体」であり得る。野生の配列のポリペプチドの「機能的誘導体」は、野生の配列のポリペプチドと共通の質的な生物学的特性を有する化合物である。「機能的誘導体」は、それだけに限らないが、対応する野生の配列のポリペプチドと共通の生物学的活性を有する限り、野生の配列の断片、ならびに野生の配列のポリペプチドおよびその断片の誘導体を含む。本明細書において考えられる生物学的活性は、機能的誘導体が D N A 基質を断片に加水分解する能力である。「誘導体」という用語は、ポリペプチドのアミノ酸配列変異形、その共有結合改変、および融合体のいずれも包含する。C a s ポリペプチドまたはその断片の適当な誘導体は、それだけに限らないが、C a s タンパク質またはその断片の突然変異体、融合体、共有結合改変を含む。C a s タンパク質またはその断片を含む C a s タンパク質、ならびに C a s タンパク質またはその断片の誘導体は、細胞から得られても、化学的に合成されても、これらの 2 つの手順の組み合わせによってもよい。細胞は C a s タンパク質

40

50

を天然に産生する細胞、またはCasタンパク質を天然に産生し、より高い発現レベルで内因性Casタンパク質を産生するもしくは外因的に導入された核酸（この核酸は内因性Casと同じまたは異なるCasをコードする）からCasタンパク質を産生するように遺伝的に操作された細胞であり得る。いくつかの場合、細胞はCasタンパク質を天然には産生せず、Casタンパク質を産生するように遺伝的に操作される。

【0113】

特定の実施形態では、DNA結合ポリペプチドが、宿主生物のゲノム核酸に含まれる標的ヌクレオチド配列を特異的に認識し、これに結合する。いくつかの例では、任意の数の個別の例の標的ヌクレオチド配列が宿主ゲノム中に見出され得る。標的ヌクレオチド配列は、生物のゲノム中でまれであり得る（例えば、約10、約9、約8、約7、約6、約5、約4、約3、約2または約1未満のコピーの標的配列がゲノム中に存在し得る）。例えば、標的ヌクレオチド配列は、生物のゲノム中の特有の部位に位置し得る。標的ヌクレオチド配列は、例えば、限定されないが、互いに関してゲノムの全体にわたってランダムに分布していてもよいし；ゲノム中の異なる連鎖群に位置していてもよいし；同じ連鎖群に位置していてもよいし；異なる染色体上に位置していてもよいし；同じ染色体上に位置していてもよいし；生物において類似の条件下で（例えば、同じ、または実質的に機能的に同一の調節因子の制御下で）発現する部位においてゲノム中に位置していてもよいし；ゲノム中に互いに接近して位置していてもよい（例えば、標的配列がゲノム座においてコンカテマーとして組み込まれた核酸中に含まれていてもよい）。

10

【0114】

B. 標的化エンドヌクレアーゼ

特定の実施形態では、キメラポリペプチドに標的配列との特異的結合を与えるために、標的ヌクレオチド配列を特異的に認識し、これに結合するDNA結合ポリペプチドが、キメラポリペプチドに含まれ得る。例では、これらのポリペプチドは上に記載されているので、このようなキメラポリペプチドは、例えば、限定されないが、ヌクレアーゼ、リコンビナーゼおよび/またはリガーゼポリペプチドを含み得る。DNA結合ポリペプチド、ならびにヌクレアーゼ、リコンビナーゼおよび/またはリガーゼポリペプチドを含むキメラポリペプチドは、他の機能的ポリペプチドモチーフおよび/またはドメイン、例えば、限定されないが、キメラタンパク質中の機能的ポリペプチド間に位置するスペーサー配列；リーダーペプチド；融合タンパク質を小器官（例えば、核）に標的化するペプチド；細胞酵素によって切断されるポリペプチド；ペプチドタグ（例えば、Myc、His等）；およびキメラポリペプチドの機能に干渉しない他のアミノ酸配列を含んでもよい。

20

30

【0115】

キメラポリペプチド中の機能的ポリペプチド（例えば、DNA結合ポリペプチドおよびヌクレアーゼポリペプチド）は作動可能に連結され得る。いくつかの実施形態では、キメラポリペプチドの機能的ポリペプチドが、キメラタンパク質をコードするキメラ遺伝子を作成するために、少なくともインフレームの互いに連結した機能的ポリペプチドをコードする単一ポリヌクレオチドからの発現によって作動可能に連結され得る。代替実施形態では、キメラポリペプチドの機能的ポリペプチドが、他の手段、例えば、独立に発現するポリペプチドの架橋によって作動可能に連結され得る。

40

【0116】

いくつかの実施形態では、標的ヌクレオチド配列を特異的に認識し、これに結合するDNA結合ポリペプチドが、天然の単離タンパク質（またはその突然変異体）に含まれ、天然の単離タンパク質またはその突然変異体がヌクレアーゼポリペプチドも含む（また、リコンビナーゼおよび/またはリガーゼポリペプチドを含んでもよい）。このような単離タンパク質の例は、TALEN、リコンビナーゼ（例えば、Cre、Hin、TreおよびFLPリコンビナーゼ）、RNAガイド化CRISPR-Cas9、およびメガヌクレアーゼを含む。

【0117】

本明細書で使用される場合、「標的化エンドヌクレアーゼ」という用語は、DNA結合

50

ポリペプチドおよびヌクレアーゼポリペプチドを含む天然のまたは操作された単離タンパク質およびその突然変異体、ならびにDNA結合ポリペプチドおよびヌクレアーゼを含むキメラポリペプチドを指す。(例えば、標的配列は座において野生の配列に含まれるので、または標的配列は、例えば、組換えによって座に導入されているので)FAD3座に含まれる標的ヌクレオチド配列を特異的に認識し、これに結合するDNA結合ポリペプチドを含む任意の標的化エンドヌクレアーゼが特定の実施形態で利用され得る。

【0118】

本発明の特定の実施形態で有用となり得るキメラポリペプチドのいくつかの例は、限定されないが、以下のポリペプチドの組み合わせを含む：ジンクフィンガーDNA結合ポリペプチド；FokIヌクレアーゼポリペプチド；TALEドメイン；ロイシンジッパー；転写因子DNA結合モチーフ；ならびに例えば、限定されないが、TALEN、リコンビナーゼ(例えば、Cre、Hin、RecA、TreおよびFLPリコンビナーゼ)、RNAガイド化CRISPR-Cas9、メガヌクレアーゼから単離されたDNA認識および/または切断ドメイン；ならびに当業者に公知のその他。特定の例は、部位特異的DNA結合ポリペプチドおよびヌクレアーゼポリペプチドを含むキメラタンパク質を含む。キメラポリペプチドは、キメラポリペプチドを対象となる特定のヌクレオチド配列に標的化するために、キメラポリペプチドに含まれるDNA結合ポリペプチドの認識配列を変えるよう当業者に公知の方法によって操作され得る。

10

【0119】

特定の実施形態では、キメラポリペプチドがDNA結合ドメイン(例えば、ジンクフィンガー、TALEドメイン等)およびヌクレアーゼ(切断)ドメインを含む。切断ドメインは、DNA結合ドメイン、例えば、ジンクフィンガーDNA結合ドメインおよびヌクレアーゼからの切断ドメイン、またはTALEN DNA結合ドメインおよび切断ドメイン、またはメガヌクレアーゼDNA結合ドメインおよび異なるヌクレアーゼからの切断ドメインおよびと異種性であり得る。異種性切断ドメインは任意のエンドヌクレアーゼまたはエキソヌクレアーゼから得られ得る。切断ドメインが得られ得る代表的なエンドヌクレアーゼは、それだけに限らないが、制限エンドヌクレアーゼおよびホーミングエンドヌクレアーゼを含む。例えば、2002-2003 Catalogue, New England Biolabs, Beverly, MA; and Belfort et al.(1997) Nucleic Acids Res.25:3379-3388を参照されたい。DNAを切断するさらなる酵素が公知である(例えば、S1ヌクレアーゼ；マングベーンヌクレアーゼ；隣DNAアーゼI；小球菌ヌクレアーゼ；酵母HOエンドヌクレアーゼ；Linn et al.(eds.) Nucleases, Cold Spring Harbor Laboratory Press,1993も参照)。これらの酵素(またはその機能的断片)の1つまたはそれ以上が切断ドメインおよび切断ハーフドメインの供給源として使用され得る。

20

30

【0120】

同様に、切断ハーフドメインは、切断活性のために二量体化を要する、上に示される任意のヌクレアーゼまたはその一部に由来し得る。一般に、融合タンパク質が切断ハーフドメインを含む場合、切断に2つの融合タンパク質が要求される。あるいは、2つの切断ハーフドメインを含む単一のタンパク質が使用され得る。2つの切断ハーフドメインが同じエンドヌクレアーゼ(またはその機能的断片)に由来してもよいし、または各切断ハーフドメインが異なるエンドヌクレアーゼ(またはその機能的断片)に由来してもよい。さらに、2つの融合タンパク質のための標的部位は、好ましくは、互いに対して、2つの融合タンパク質とそれぞれの標的部位の結合が、切断ハーフドメインを、切断ハーフドメインが例えば、二量体化によって機能的切断ドメインを形成することを可能にする、互いに対する空間的配向に配置するように配置される。したがって、特定の実施形態では、標的部位の接近端が5~8個のヌクレオチドまたは15~18個のヌクレオチドによって分離されている。しかしながら、任意の整数のヌクレオチドまたはヌクレオチド対が2つの標的部位の間に介在することができる(例えば、2~50個のヌクレオチド対またはそれ以上)。一般に、切断の部位は標的部位の間にある。

40

【0121】

50

制限エンドヌクレアーゼ（制限酵素）は多くの種に存在し、例えば、1つまたはそれ以上の外因性配列（ドナー／導入遺伝子）が結合（標的）部位でまたはその近くに組み込まれるように、（認識部位で）DNAに配列特異的に結合し、結合の部位でまたはその近くでDNAを切断することができる。特定の制限酵素（例えば、IIS型）は、認識部位から離れた部位でDNAを切断し、分離可能な結合ドメインおよび切断ドメインを有する。例えば、IIS型酵素FokIは、一方の鎖上の認識部位からの9個のヌクレオチドおよび他方の鎖上の認識部位からの13個のヌクレオチドで、DNAの二本鎖切断を触媒する。例えば、米国特許第5,356,802号明細書；第5,436,150号明細書および第5,487,994号明細書；ならびにLi et al.(1992) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:4275-4279；Li et al.(1993) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:2764-2768；Kim et al.(1994a) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91:883-887；Kim et al.(1994b) J.Biol.Chem.269:31,978-31,982を参照されたい。したがって、一実施形態では、融合タンパク質が、少なくとも1つのIIS型制限酵素からの切断ドメイン（または切断ハーフドメイン）と、1つまたはそれ以上の操作されていてもされていなくてもよいジンクフィンガー結合ドメインとを含む。

10

【0122】

その切断ドメインが結合ドメインから分離可能な代表的なIIS型制限酵素はFokIである。この特定の酵素は二量体として活性である。Bitinaite et al.(1998) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95: 10,570-10,575。したがって、本開示の目的のために、開示の融合タンパク質に使用されるFokI酵素の一部が切断ハーフドメインとみなされる。したがって、ジンクフィンガー-FokI融合体を用いた細胞配列の標的化二本鎖切断および／または標的化置換のために、触媒活性切断ドメインを再構成するためにそれぞれがFokI切断ハーフドメインを含む2つの融合タンパク質が使用され得る。あるいは、DNA結合ドメインと2つのFokI切断ハーフドメインとを含む単一のポリペプチド分子も使用され得る。

20

【0123】

切断ドメインまたは切断ハーフドメインは、切断活性を保持する、または多量体化（例えば、二量体化）して機能的切断ドメインを形成する能力を保持するタンパク質の任意の部分であり得る。

【0124】

代表的なIIS型制限酵素は、全体が本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第20070134796号明細書に記載されている。さらなる制限酵素も分離可能な結合ドメインと切断ドメインとを含み、これらも本開示によって考慮される。例えば、Roberts et al.(2003) Nucleic Acids Res.31:418-420を参照されたい。

30

【0125】

特定の実施形態では、切断ドメインが、例えば、その全ての開示の全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第20050064474号明細書；第20060188987号明細書および第20080131962号明細書に記載されているように、1つまたはそれ以上のホモ二量体化を最小化するまたは防ぐ操作切断ハーフドメイン（二量体化ドメイン突然変異体とも呼ばれる）を含む。FokIの446、447、479、483、484、486、487、490、491、496、498、499、500、531、534、537および538位のアミノ酸残基は全てFokI切断ハーフドメインの二量体化に影響を及ぼすための標的である。

40

【0126】

絶対ヘテロ二量体を形成するFokIの代表的な操作切断ハーフドメインは、第1の切断ハーフドメインがFokIの490および538位のアミノ酸残基に突然変異を含み、かつ第2の切断ハーフドメインがアミノ酸残基486および499に突然変異を含む対を含む。

【0127】

したがって、一実施形態では、490の突然変異が、Glu(E)をLys(K)に置

50

換し；538の突然変異がI s o (I)をL y s (K)に置換し；486の突然変異がG l n (Q)をG l u (E)に置換し；499の突然変異がI s o (I)をL y s (K)に置換する。具体的には、本明細書に記載される操作切断ハーフドメインは、一方の切断ハーフドメイン中の490位(E K)および538位(I K)を突然変異させて「E 490 K : I 538 K」と示される操作切断ハーフドメインを製造し、かつ別の切断ハーフドメイン中の486位(Q E)および499位(I L)を突然変異させて「Q 486 E : I 499 L」と示される操作切断ハーフドメインを製造することによって調製された。本明細書に記載される操作切断ハーフドメインは、異常な切断が最小化されたまたは消滅した絶対ヘテロ二量体突然変異体である。例えば、全ての目的のためにその開示の全体が参照により組み込まれる、米国特許出願公開第2008/0131962号明細書を参照されたい。

10

【0128】

特定の実施形態では、操作切断ハーフドメインが、486、499および496位(野生型F o k Iに対して番号付け)の突然変異、例えば、486位の野生型G l n (Q)残基をG l u (E)残基に置換する突然変異、499位の野生型I s o (I)残基をL e u (L)残基に置換する突然変異および496位の野生型A s n (N)残基をA s p (D)またはG l u (E)残基に置換する突然変異(それぞれ、「E L D」および「E L E」ドメインとも呼ばれる)を含む。他の実施形態では、操作切断ハーフドメインが、490、538および537位(野生型F o k Iに対して番号付け)の突然変異、例えば、490位の野生型G l u (E)残基をL y s (K)残基に置換する突然変異、538位の野生型I s o (I)残基をL y s (K)残基に置換する突然変異および537位の野生型H i s (H)残基をL y s (K)残基またはA r g (R)残基に置換する突然変異(それぞれ、「K K K」および「K K R」ドメインとも呼ばれる)を含む。他の実施形態では、操作切断ハーフドメインが、490および537位(野生型F o k Iに対して番号付け)の突然変異、例えば、490位の野生型G l u (E)残基をL y s (K)残基に置換する突然変異、および537位の野生型H i s (H)残基をL y s (K)残基またはA r g (R)残基に置換する突然変異(それぞれ、「K I K」および「K I R」ドメインとも呼ばれる)を含む。(米国特許出願公開第20110201055号明細書を参照されたい)。本明細書に記載される操作切断ハーフドメインは、任意の適当な方法を用いて、例えば、米国特許出願公開第20050064474号明細書；第20080131962号明細書；および第20110201055号明細書に記載されているような野生型切断ハーフドメイン(F o k I)の部位特異的突然変異誘発によって調製され得る。

20

30

【0129】

あるいは、ヌクレアーゼは、いわゆる「スプリット酵素」技術を用いて核酸標的部位においてインピボで組み立てられ得る(例えば、米国特許出願公開第20090068164号明細書参照)。このようなスプリット酵素の成分は別々の発現構築物で発現してもよいし、または個々の成分が例えば、自己切断2AペプチドもしくはI R E S配列によって分離されている1つのオープンリーディングフレームで連結されていてもよい。成分は個々のジंकフィンガー結合ドメインまたはメガヌクレアーゼ核酸結合ドメインのドメインであり得る。

40

【0130】

C. ジंकフィンガーヌクレアーゼ

具体的な実施形態では、キメラポリペプチドが、外因性核酸またはドナーDNAが組み込まれ得る標的化部位特異的二本鎖DNA切断に送達されるよう設計され得るカスタム設計のジंकフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)である(参照により本明細書に組み込まれる、共有されている米国特許出願公開第20100257638号明細書参照)。ZFNは、制限エンドヌクレアーゼ(例えば、F o k I)からの非特異的切断ドメインと、ジंकフィンガーDNA結合ドメインポリペプチドとを含むキメラポリペプチドである。例えば、Huang et al.(1996) J.Protein Chem.15:481-9; Kim et al.(1997a) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 94:3616-20; Kim et al.(1996) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93:1156-60; Kim et

50

al.(1994) Proc Natl.Acad.Sci.USA 91:883-7 ; Kim et al.(1997b) Proc.Natl.Acad.Sci. USA 94:12875-9 ; Kim et al.(1997c) Gene 203:43-9 ; Kim et al.(1998) Biol.Chem.379: 489-95 ; Nahon and Raveh (1998) Nucleic Acids Res.26:1233-9 ; Smith et al.(1999) Nucleic Acids Res.27:674-81を参照されたい。いくつかの実施形態では、ZFNが非標準ジンクフィンガーDNA結合ドメインを含む(参照により本明細書に組み込まれる、共有されている米国特許出願公開第20080182332号明細書参照)。FokI制限エンドヌクラーゼは、DNAを切断し、二本鎖切断を導入するために、ヌクラーゼドメインを介して二量体化しなければならない。結果として、このようなエンドヌクラーゼからのヌクラーゼドメインを含むZFNも、標的DNAを切断するためにヌクラーゼドメインの二量体化を要する。Mani et al.(2005) Biochem.Biophys.Res.Commun.334:119 1-7; Smith et al.(2000) Nucleic Acids Res.28:3361-9。ZFNの二量体化は、2つの隣接する正反対に配向したDNA結合部位によって促進され得る。前記。

10

【0131】

ZFN系の柔軟性および特異性は、公知のリコンビナーゼ媒介遺伝子編集戦略によって以前は達成することができなかった一定レベルの制御をもたらす。一例として、ZFNは、例えば、特異的核酸配列を認識するように容易に操作され得る。Wu et al.(2007) Cell.Mol.Life Sci.64:2933-44(全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第20090205083号明細書、第20110189775号明細書、第20110167521号明細書および第20100199389号明細書参照)。ジンクフィンガー認識残基に関するコドンのランダム化は、恣意的に選択されたDNA配列に対して高い親和性を有する新しいフィンガーの選択を可能にする。さらに、ジンクフィンガーは天然のDNA結合分子であり、操作されたジンクフィンガーは生細胞でその設計された標的に作用することが示されている。したがって、ジンクフィンガーに基づくヌクラーゼは、特異的であるが、恣意的な認識部位を標的化可能である。

20

【0132】

特定の例では、外因性核酸を宿主の少なくとも1つのFAD3性能座に部位特異的に組み込む方法が、ZFNを宿主の細胞に導入する工程を含み、ZFNが標的ヌクレオチド配列を認識し、これに結合し、標的ヌクレオチド配列が宿主の少なくとも1つのFAD3座に含まれる。特定の例では、標的ヌクレオチド配列が、少なくとも1つのFAD3座以外の位置において宿主のゲノムに含まれない。例えば、ZFNのDNA結合ポリペプチドは、(例えば、FAD3座をシーケンシングすることによって)少なくとも1つのFAD3座中の同定された標的ヌクレオチド配列を認識し、これに結合するよう操作され得る。ZFNを宿主の細胞に導入する工程を含む、外因性核酸を宿主の少なくとも1つのFAD3性能座に部位特異的に組み込む方法は、外因性核酸を細胞に導入する工程を含んでもよく、外因性核酸の少なくとも1つのFAD3座を含む宿主の核酸への組換えは、ZFNの部位特異的認識および標的配列との結合(およびその後のFAD3座を含む核酸の切断)によって促進される。

30

【0133】

VI. FAD3座における組込みのための外因性核酸

本発明の実施形態は、少なくとも1つのFAD3座への部位特異的組込みのための外因性核酸、例えば、限定されないが、PTU、ELP、ETIPまたはORF; 標的化エンドヌクラーゼをコードするヌクレオチド配列を含む核酸; および前記のいずれかまたは両方の少なくとも1つを含むベクターからなる群から選択される1つまたはそれ以上の核酸を含んでもよい。したがって、いくつかの実施形態で使用するための特定の核酸は、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、構造ヌクレオチド配列および/またはDNA結合ポリペプチド認識および結合部位を含む。

40

【0134】

A. 部位特異的組込みのための外因性核酸分子

上記のように、例えば、ポリペプチドの発現、突然変異遺伝子の修正または野生型遺伝子の発現増加のために、外因性配列(「ドナー配列」または「ドナー」または「導入遺伝

50

子」とも呼ばれる)が挿入される。ドナー配列が典型的には配置されるゲノム配列と同一ではないことが容易に明らかであるだろう。ドナー配列は、対象となる位置での効率的なHDRを可能にするための相同性の2つの領域が隣接した非相同性配列を含むことができる。さらに、ドナー配列は、細胞クロマチン中の対象となる領域と相同性でない配列を含むベクター分子を含むことができる。ドナー分子は、細胞クロマチンと相同性のいくつかの不連続領域を含むことができる。例えば、対象となる領域中に通常は存在しない配列の標的化挿入のために、前記配列がドナー核酸分子中に存在し、対象となる領域中の配列と相同性の領域が隣接していてもよい。

【0135】

ドナーポリヌクレオチドは一本鎖または二本鎖のDNAまたはRNAであり得、線状または環状型で細胞に導入され得る。例えば、米国特許出願公開第20100047805号明細書、第20110281361号明細書、第20110207221号明細書および米国特許出願第13/889,162号明細書を参照されたい。線状型で導入される場合、ドナー配列の末端は当業者に公知の方法によって(例えば、エキソヌクレアーゼ分解から)保護され得る。例えば、1つまたはそれ以上のジデオキシヌクレオチド残基が線状分子の3'末端に付加される、および/または自己相補性オリゴヌクレオチドが一方または両方の末端に連結される。例えば、Chang et al.(1987) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84:4959-4963; Nehls et al.(1996) Science 272:886-889を参照されたい。外因性ポリヌクレオチドを分解から保護するさらなる方法は、限定されないが、末端アミノ基の付加および改変ヌクレオチド間結合、例えば、ホスホロチオエート、ホスホロアミデートおよびO-メチルリボースまたはデオキシリボース残基の使用を含む。

10

20

【0136】

ポリヌクレオチドは、さらなる配列、例えば、複製起点、プロモーターおよび抗生物質耐性をコードする遺伝子を有するベクター分子の一部として細胞に導入され得る。さらに、ドナーポリヌクレオチドは、裸の核酸として、薬剤、例えば、リボソームもしくはポロキサマーと複合体化した核酸として導入され得る、またはウイルス(例えば、アデノウイルス、AAV、ヘルペスウイルス、レトロウイルス、レンチウイルスおよびインテグラーゼ欠損レンチウイルス(IDLV))によって送達され得る。

【0137】

ドナーは一般的に、その発現が組み込み部位の内因性プロモーター、すなわち、ドナーが組み込まれる内因性遺伝子(例えば、FAD3)の発現を駆動するプロモーターによって駆動されるように組み込まれる。しかしながら、ドナーがプロモーターおよび/またはエンハンサー、例えば、構成型プロモーターまたは誘導性もしくは組織特異的プロモーターを含んでもよいことが明らかであるだろう。

30

【0138】

さらに、発現に要求されないが、外因性配列は、転写または翻訳調節配列、例えば、プロモーター、エンハンサー、インスレーター、配列内リボソーム進入部位、2Aペプチドをコードする配列および/またはポリアデニル化シグナルを含んでもよい。

【0139】

実施形態において、FAD3座を改変するために、少なくとも1つのFAD3座に部位特異的様式で組み込まれ得る外因性核酸は、例えば、限定されないが、対象となるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸; 農学的遺伝子を含む核酸; RNA分子をコードするヌクレオチド配列を含む核酸; またはFAD3遺伝子を破壊する核酸を含む。

40

【0140】

いくつかの実施形態では、FAD3座を改変するために、外因性核酸がFAD3座において組み込まれ、農学的遺伝子またはヌクレオチド配列がFAD3座から宿主中で発現するように、核酸が農学的遺伝子または対象となるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。いくつかの例では、対象となるポリペプチド(例えば、外来タンパク質)が、商業的な量で対象となるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列から発現する。こ

50

のような例では、対象となるポリペプチドが、宿主細胞、組織またはバイオマスから抽出され得る。いくつかの実施形態では、宿主が植物であり、対象となるポリペプチドの商業的製造のために用意される植物材料が植物、植物部位、植物組織または植物細胞である。いくつかの例では、植物部位が植物種子であり得る。植物バイオマスからのタンパク質抽出は、例えば、Heney and Orr (1981) Anal. Biochem. 114:92-6で論じられている公知の方法によって達成され得る。

【0141】

同様に、農学的遺伝子は、形質転換植物細胞、植物および/またはその子孫で発現され得る。例えば、植物は、少なくとも1つのFAD3座から農学的対象となる種々の表現型を発現するように特定の実施形態の方法を介して遺伝的に操作され得る。

10

【0142】

いくつかの実施形態では、対象となるポリペプチドをコードする農学的遺伝子またはヌクレオチド配列を含む核酸が、例えば、限定されないが、有害生物または病気に対する耐性を与える遺伝子（例えば、Jones et al. (1994) Science 266:789 (クラドスポリウム・フルバム (*Cladosporium fulvum*) に対する耐性のためのトマト Cf - 9 遺伝子のクローニング) ; Martin et al. (1993) Science 262:1432; Mindrinis et al. (1994) Cell 78:1089 (シュードモナス・シリング (*Pseudomonas syringae*) に対する耐性のための R S P 2 遺伝子) ; P C T 国際特許出願公開第 9 6 / 3 0 5 1 7 号パンフレット (ダイズシストセンチュウに対する耐性) ; P C T 国際特許出願公開第 9 3 / 1 9 1 8 1 号パンフレット) ; パチルス・チューリングエンシス (*Bacillus thuringiensis*) タンパク質、その誘導体、またはその上にモデル化される合成ポリペプチドをコードする遺伝子（例えば、Geiser et al. (1986) Gene 48:109 (Bt - エンドトキシン遺伝子のクローニングおよびヌクレオチド配列) ; さらに、 - エンドトキシン遺伝子をコードする DNA 分子は、例えば、A T C C 寄託番号 4 0 0 9 8 ; 6 7 1 3 6 ; 3 1 9 9 5 ; および 3 1 9 9 8 で、アメリカ培養細胞系統保存機関 (M a n a s s a s , V A) から購入され得る) ; レクチンをコードする遺伝子（例えば、Van Damme et al. (1994) Plant Molec. Biol. 24:25 (いくつかのクンシラン (*Clivia miniata*) マンノース結合レクチン遺伝子のヌクレオチド配列) 参照) ; ビタミン結合タンパク質、例えば、アビジンをコードする遺伝子 (P C T 国際特許出願公開第 U S 9 3 / 0 6 4 8 7 号パンフレット (害虫に対する殺幼虫剤としてのアビジンおよびアビジンホモログの使用) 参照) ; 酵素阻害剤、例えば、プロテアーゼ、プロテイナーゼ阻害剤またはアミラーゼ阻害剤をコードする遺伝子（例えば、Abe et al. (1987) J. Biol. Chem. 262:16793 (イネシステインプロテイナーゼ阻害剤のヌクレオチド配列) ; Huub et al. (1993) Plant Molec. Biol. 21:985 (タバコプロテイナーゼ阻害剤 I をコードする c D N A のヌクレオチド配列) ; Sumitani et al. (1993) Biosci. Biotech. Biochem. 5 7:1243 (ストレプトマイセス・ニトロスポレウス (*Streptomyces nitrosporeus*) アミラーゼ阻害剤のヌクレオチド配列) および米国特許第 5 , 4 9 4 , 8 1 3 号明細書参照) ; 昆虫特異的ホルモンまたはフェロモン、例えば、エクジステロイドもしくは幼若ホルモン、その変異形、それに基づく模倣体、またはそのアンタゴニストもしくはアゴニストをコードする遺伝子（例えば、Hammock et al. (1990) Nature 344:458 (クローニング幼若ホルモンエステラーゼのバキュロウイルス発現、幼若ホルモンの不活性化因子) 参照) ; 発現すると、冒された有害生物の生理機能を破壊する昆虫特異的ペプチドまたは神経ペプチドをコードする遺伝子（例えば、Regan (1994) J. Biol. Chem. 269:9 (発現クローニングが昆虫利尿ホルモン受容体をコードする DNA をもたらす) ; Pratt et al. (1989) Biochem. Biophys. Res. Comm. 163:1243 (ディプロプテラ・パンタタ (*Diploptera puntata*) のアロスタチン) ; および米国特許第 5 , 2 6 6 , 3 1 7 号明細書 (昆虫特異的麻痺性神経毒をコードする遺伝子) 参照) ; ヘビ、スズメバチまたは他の生物によって天然に産生される昆虫特異的毒液をコードする遺伝子（例えば、Pang et al. (1992) Gene 116:165 (ソリ昆虫毒性 (insectotoxic) ペプチドをコードする遺伝子の植物における異種発現) 参照) ; モノテルペン、セスキテルペン、ステロイド、ヒドロキサム酸、フェニルプロパノイド誘導体または殺虫活性を有する他の分子の高度蓄積を担う酵素をコードする遺伝子 ; 生

20

30

40

50

物学的活性分子の転写後改変を含む改変に關与する酵素、例えば、解糖酵素、タンパク質分解酵素、脂質分解酵素、ヌクレアーゼ、シクラーゼ、トランスアミナーゼ、エステラーゼ、ヒドロラーゼ、ホスファターゼ、キナーゼ、ホスホリラーゼ、ポリメラーゼ、エラスターゼ、キチナーゼまたはグルカナナーゼ（天然または合成のいずれも）をコードする遺伝子（例えば、PCT国際特許出願公開第93/02197号パンフレット（カラーゼ（callase）遺伝子のヌクレオチド配列）；さらに、キチナーゼコード配列を含むDNA分子は、例えば、寄託番号39637および67152で、ATCCから得られ得る；Kramer et al.(1993) *Insect Biochem.Molec.Biol.*23:691（タバコスズメガキチナーゼをコードするcDNAのヌクレオチド配列）；およびKawalleck et al.(1993) *Plant Molec.Biol.*21:673（パセリu b i 4 - 2ポリユビキチン遺伝子のヌクレオチド配列）参照）；シグナル伝達を刺激する分子をコードする遺伝子（例えば、Botella et al.(1994) *Plant Molec.Biol.*24:757（リョクトウカルモジュリンcDNAクローンについてのヌクレオチド配列）；およびGriess et al.(1994) *Plant Physiol.*104:1467（トウモロコシカルモジュリンcDNAクローンのヌクレオチド配列）参照）；疎水性モーメントペプチドをコードする遺伝子（例えば、PCT国際特許出願公開第95/16776号パンフレット（真菌植物病原体を阻害するタキプレシンのペプチド誘導体）；およびPCT国際特許出願公開第95/18855号パンフレット（耐病性を与える合成抗微生物ペプチド）参照）；膜パーミアーズ、チャネルフォーマーまたはチャネルブロッカーをコードする遺伝子（例えば、Jaynes et al.(1993) *Plant Sci* 89:43（トランスジェニックタバコ植物をシールドモナス・ソラナセアラム（*Pseudomonas solanacearum*）に対して耐性にするためのセクロピン - 溶解ペプチド類似体の異種発現）参照）；ウイルス侵入タンパク質またはこれに由来する複合毒素をコードする遺伝子（例えば、Beachy et al.(1990) *Ann.rev.Phytopathol.*28:451参照）；昆虫特異抗体またはこれに由来する免疫毒素をコードする遺伝子（例えば、Taylor et al., Abstract #497, Seventh Int'l Symposium on Molecular Plant-Microbe Interactions (Edinburgh, Scotland) (1994)（単鎖抗体断片の産生を介したトランスジェニックタバコにおける酵素不活性化）参照）；ウイルス特異抗体をコードする遺伝子（例えば、Tavladoraki et al.(1993) *Nature* 366:469（組換え抗体遺伝子を発現しているトランスジェニック植物はウイルス攻撃から保護される）参照）；病原体または寄生物によって天然に産生される発育遅滞タンパク質をコードする遺伝子（例えば、Lamb et al.(1992) *Bio/Technology* 10:1436（真菌エンド - 1, 4 - D - ポリガラクトツロナーゼは、植物細胞壁ホモ - 1, 4 - D - ガラクトツロナーゼを可溶化することによって真菌定着および植物栄養放出を促進する）；Toubart et al.(1992) *Plant J.*2:367（マメエンドポリガラクトツロナーゼ阻害タンパク質をコードする遺伝子のクローニングおよび特徴付け）参照）；植物によって天然に産生される発育遅滞タンパク質をコードする遺伝子（例えば、Logemann et al.(1992) *Bio/Technology* 10:305（オオムギリボソーム不活性化遺伝子を発現しているトランスジェニック植物は真菌病に対する増加した耐性を有する）参照）を含んでもよい。

【0143】

いくつかの実施形態では、対象となるポリペプチドをコードする農学的遺伝子またはヌクレオチドを含む核酸が同様におよび/または代わりに、例えば、限定されないが、除草剤、例えば、成長点または分裂組織を阻害する除草剤、例えば、イミダゾリノンまたはスルホニル尿素に対する耐性を与える遺伝子（このカテゴリーの代表的な遺伝子は、例えば、それぞれLee et al.(1988) *EMBO J.*7:1241およびMiki et al.(1990) *Theor.Appl.Genet.*80:449に記載されているように突然変異ALSおよびAHAS酵素をコードする；例えば、（組換え核酸の導入および/または野生型EPSP遺伝子（それだけに限らないが、CP4、DMMGおよびDGT - 28を含む）の種々の形態のインビボ突然変異誘発を介して）突然変異5 - エノイルピルピルシキミ酸 - 3 - リン酸シンターゼ（EPSP）遺伝子；aroA遺伝子およびグリホサートアセチルトランスフェラーゼ（GAT）遺伝子によってそれぞれ与えられるグリホサート耐性）；他のホスホノ化合物、例えば、ストレプトマイセス・ハイグロスコピクス（*Streptomyces hygroscopicus*）およびストレプトマイ

セス・ピリドクロモゲネス (*Streptomyces viridichromogenes*) を含むストレプトマイセス属の種からのグルホシネートホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ (P A T) 遺伝子; ならびにピリジノキシまたはフェノキシプロピオン酸およびシクロヘキソン (A C C a s e 阻害剤コード遺伝子) を含んでもよい。例えば、米国特許第 4, 940, 835号明細書および第 6, 248, 876号明細書 (植物にグリホサート耐性を与えることができる E P S P の形態のヌクレオチド配列) を参照されたい。突然変異 a r o A 遺伝子をコードする D N A 分子は、A T C C 寄託番号 39256 で得られ得る。米国特許第 4, 769, 061号明細書 (突然変異 a r o A 遺伝子のヌクレオチド配列) も参照されたい。欧州特許出願第 0333033号明細書および米国特許第 4, 975, 374号明細書は、除草剤、例えば、L - ホスフィノトリシンに対する耐性を与えることができる、グルタミンシンターゼ遺伝子のヌクレオチド配列を開示している。代表的な P A T 遺伝子のヌクレオチド配列は、欧州特許出願第 0242246号明細書および DeGreef et al. (1989) *Bio/Technology* 7:61 (P A T 活性をコードするキメラ b a r 遺伝子を発現するトランスジェニック植物の製造) に提供されている。フェノキシプロピオン酸およびシクロヘキソン、例えば、セトキシジムおよびハロキシホップに対する耐性を与える遺伝子の例は、Marshall et al. (1992) *Theor. Appl. Genet.* 83:435に記載されている A c c 1 - S 1、A c c 1 - S 2 および A c c 1 - S 3 遺伝子を含む。グリホサート耐性を与えることができる G A T 遺伝子は、例えば、国際公開第 2005012515号パンフレットに記載されている。2, 4 - D - フェノキシプロピオン酸およびピリジルオキシオーキシン除草剤に対する耐性を与える遺伝子は、例えば、国際公開第 2005107437号パンフレットおよび国際公開第 2007053482号パンフレットに記載されている。

【0144】

対象となるポリペプチドをコードする農学的遺伝子またはヌクレオチド配列を含む核酸は、例えば、限定されないが、光合成を阻害する除草剤、例えば、トリアジン (p s b A および g s + 遺伝子) またはベンゾニトリル (ニトリラーゼ遺伝子) に対する耐性を与える遺伝子を含んでもよい。例えば、Przibila et al. (1991) *Plant Cell* 3:169 (突然変異 p s b A 遺伝子をコードするプラスミドによるクラミドモナス属の形質転換) を参照されたい。ニトリラーゼ遺伝子に関するヌクレオチド配列は米国特許第 4, 810, 648号明細書に開示されており、これらの遺伝子を含む D N A 分子は A T C C 寄託番号 53435; 67441; および 67442 で入手可能である。Hayes et al. (1992) *Biochem. J.* 285:173 (グルタチオン S - トランスフェラーゼをコードする D N A のクローニングおよび発現) も参照されたい。

【0145】

いくつかの実施形態では、対象となるポリペプチドをコードする農学的遺伝子またはヌクレオチド配列を含む核酸が同様におよび/または代わりに、例えば、限定されないが、付加価値形質、例えば、限定されないが、例えば、植物のステアリン酸含量を増加させるためにステアリン A C P デサチラーゼのアンチセンス遺伝子を用いて植物を形質転換することによって改変された脂肪酸代謝 (例えば、Knultzon et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:2624参照); 例えば、フィターゼコード遺伝子の導入がフィターゼの衰弱を強化し、より多くの遊離ホスフェートを形質転換植物に付与する (例えば、Van Hartingsveldt et al. (1993) *Gene* 127:87 (クロコウジカビ (*Aspergillus niger*) フィターゼ遺伝子のヌクレオチド配列; トウモロコシ中のフィターゼ含量を低下させるための遺伝子が導入されてもよく、例えば、これは低レベルのフィチン酸によって特徴付けられるトウモロコシ突然変異体の原因となり得る単一对立遺伝子に関連する D N A をクローニングし、次いで再導入することによって達成され得る (Raboy et al. (1990) *Maydica* 35:383参照) 参照); および例えば、デンブンの分岐パターンを変える酵素をコードする遺伝子を用いて植物を形質転換することによってもたらされる改変された炭水化物組成 (例えば、Shiroza et al. (1988) *J. Bacteriol.* 170:810 (ストレプトコッカス属突然変異体フルクトシルトランスフェラーゼ遺伝子のヌクレオチド配列); Steinmetz et al. (1985) *Mol. Gen. Genet.* 20:220 (レバンスクララーゼ遺伝子); Pen et al. (1992) *Bio/Technology* 10:292 (

- アミラーゼ) ; Elliot et al.(1993) Plant Molec.Biol.21:515 (トマトインベルターゼ遺伝子のヌクレオチド配列) ; Sogaard et al.(1993) J.Biol.Chem.268:22480 (オオムギ - アミラーゼ遺伝子) ; および Fisher et al.(1993) Plant Physiol.102:1045 (トウモロコシ胚乳デンプン分岐酵素 I I) 参照) を与えるまたはこれに寄与する遺伝子を含んでもよい。

【0146】

いくつかの実施形態では、FAD3座を改変するために、外因性核酸がFAD3座において組み込まれ、例えば、その後のPTUまたはELPの部位における第2の外因性核酸の部位特異的組込みが促進されるように、核酸がPTUまたはELPを含む。米国特許出願第13/889,162号明細書も参照されたい。

【0147】

標的化組込みを介した対象となる核酸分子の植物ゲノムへの標的化エンドヌクレアーゼ媒介組込みは、標的化エンドヌクレアーゼまたは標的化エンドヌクレアーゼコード核酸分子の送達、引き続いて宿主中での機能的標的化エンドヌクレアーゼタンパク質の発現を要する。機能的標的化エンドヌクレアーゼタンパク質が少なくとも1つのFAD3座の標的部位において二本鎖切断を誘導し、次いでこれが例えば、外因性核酸の座への相同性駆動組込みを介して修復されるように、標的化エンドヌクレアーゼが宿主細胞に送達されるまたはそこで発現すると同時に外因性核酸も好ましくは宿主細胞中に存在する。当業者であれば、機能的標的化エンドヌクレアーゼタンパク質の発現が、それだけに限らないが、標的化エンドヌクレアーゼコード構築物の遺伝子組換え、および標的化エンドヌクレアーゼコード構築物の一過性発現を含むいくつかの方法によって達成され得ることを認識し得る。これらの両ケースで、FAD3座における標的化組込みを駆動するために、機能的標的化エンドヌクレアーゼタンパク質の発現および外因性核酸の宿主細胞への送達が同時に達成され得る。

【0148】

標的化エンドヌクレアーゼとしてZFNを利用する実施形態で得られる特定の利点は、キメラジンクフィンガーヌクレアーゼの切断ドメインの二量体化の必要条件が高レベルの配列、したがって切断特異性を与えることである。3つのフィンガーの各セットが9個の連続塩基対に結合するので、各ジンクフィンガードメインが完全な特異性を有する場合、2つのキメラヌクレアーゼが18bpの標的を有効に要求する。この長さの任意の所与の配列は、単一ゲノム中で特有であると予想される(約 10^9 bpと仮定)。上記Bibikova et al.(2001) Mol.Cell.Biol.21(1):289-97; Wu et al.(2007)。さらに、さらなるフィンガーが強化された特異性を提供することができる(Beerli et al.(1998) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95:14628-33; Kim and Pabo (1998) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95:2812-7; Liu et al.(1997) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 94:5525-30)ので、さらなる特異性を提供するために各DNA結合ドメイン中のジンクフィンガーの数が増加され得る。例えば、24bp配列を認識する4-、5-、6-またはそれ以上のフィンガーZFN対を用いることによって、特異性がさらに増加され得る。Urnov et al.(2005) Nature 435:646-51。したがって、宿主植物ゲノムに導入された認識配列がゲノム中で特有となるように、ZFNが使用され得る。

【0149】

B. 標的化エンドヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子

いくつかの実施形態では、標的化エンドヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列が、標的化エンドヌクレアーゼ中に含まれるポリペプチドをコードする野生のヌクレオチド配列の操作(例えば、ライゲーション)によって操作され得る。例えば、DNA結合ポリペプチドに対応する遺伝子のヌクレオチド配列を同定するために、DNA結合ポリペプチドを含むタンパク質をコードする遺伝子のヌクレオチド配列が調査され得、このヌクレオチド配列がDNA結合ポリペプチドを含む標的化エンドヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列の要素として使用され得る。あるいは、例えば、遺伝暗号の縮重にしたがって、標的化エンドヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列を推定するために、標的化工

10

20

30

40

50

ンドヌクレアーゼのアミノ酸配列が使用され得る。

【0150】

標的化エンドヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列を含む代表的な核酸分子では、ヌクレアーゼポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチド配列の最後のコドン、およびDNA結合ポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチド配列の最初のコドンが、例えば、イントロンまたは「STOP」をコードすることなく、任意の数のヌクレオチドトリプレットによって分離され得る。同様に、DNA結合ポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチド配列をコードするヌクレオチド配列の最後のコドン、およびヌクレアーゼポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチド配列の最初のコドンが、任意の数のヌクレオチドトリプレットによって分離され得る。これらのおよびさらなる実施形態では、ヌクレアーゼポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチド配列およびDNA結合ポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチド配列の最後の（すなわち、核酸配列のほぼ3'）の最後のコドンが、そこに直接隣接する、または短ペプチド配列、例えば、合成ヌクレオチドリンカー（例えば、融合を達成するために使用されたかもしれないヌクレオチドリンカー）によってコードされるもの以下によってそこから分離されたさらなるポリヌクレオチドコード配列の最初のコドンと相レジスター（phase-register）で融合され得る。このようなさらなるポリヌクレオチド配列の例は、例えば、限定されないが、タグ、標的化ペプチド、および酵素切断部位を含む。同様に、第1および第2のポリヌクレオチド配列のほぼ5'（核酸配列中）の最初のコドンが、そこに直接隣接する、または短ペプチド配列以下によってそこから分離されたさらなるポリヌクレオチドコード配列の最後のコドンと相レジスターで融合され得る。

10

20

【0151】

標的化エンドヌクレアーゼ中の機能的ポリペプチド（例えば、DNA結合ポリペプチドおよびヌクレアーゼポリペプチド）をコードするポリヌクレオチド配列を分離する配列は、例えば、コードされるアミノ酸配列が標的化エンドヌクレアーゼの翻訳を有意に変えにくいような任意の配列からなることができる。公知のヌクレアーゼポリペプチドおよび公知のDNA結合ポリペプチドの自律的性質のために、例では介在配列はこれらの構造のそれぞれの機能に干渉しないだろう。

【0152】

C. ベクターおよび発現構築物

いくつかの実施形態では、対象となるポリペプチドおよび/または標的化エンドヌクレアーゼをコードする少なくとも1つの外因性ポリヌクレオチド配列を含む少なくとも1つの核酸分子が、発現のために細胞、組織または生物に導入され得る。例えば、少なくとも1つのFAD3座中に含まれるヌクレオチド配列を特異的に認識する標的化エンドヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチド配列を含む核酸分子が、標的化エンドヌクレアーゼの発現のために細胞に導入され得、また対象となるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む核酸分子が、例えば、発現した標的エンドヌクレアーゼによる座における二本鎖切断の導入後の相同組換えによって少なくとも1つのFAD3座に組み込まれ、対象となるポリペプチドが組み込まれたポリヌクレオチド配列から発現するように、細胞に導入され得る。

30

40

【0153】

いくつかの実施形態では、核酸分子、例えば、前記の1つが、例えば、限定されないが、直線状プラスミドまたは閉環状プラスミドを含むベクター系であってもよい。特定の例では、ベクターが発現ベクターであってもよい。特定の実施形態による核酸配列は、例えば、核酸配列が1つまたはそれ以上の調節配列と作動可能に連結されるように、ベクターに組み込まれ得る。多くのベクターがこの目的のために利用可能であり、特定のベクターの選択は、例えば、ベクターに挿入される核酸のサイズ、ベクターを用いて形質転換される特定の宿主細胞、および/または発現することが望まれる任意のコードされたポリペプチドの量に依存し得る。ベクターは、典型的には種々の成分を含み、その素性はベクターの機能（例えば、DNAの増幅またはDNAの発現）、およびベクターが適合性である特

50

定の宿主細胞に依存する。

【0154】

いくつかの実施形態では、1つまたはそれ以上のコード配列と作動可能に連結された調節配列が、核酸分子が増幅または発現される宿主細胞、例えば、細菌細胞、藻類細胞、真菌細胞または植物細胞中で機能するプロモーター配列であってもよい。いくつかの実施形態は、対象となるポリペプチドまたは標的化エンドヌクレアーゼをコードする1つまたはそれ以上のヌクレオチド配列と作動可能に連結された少なくとも1つの調節配列を含むヌクレオチド配列を含む植物形質転換ベクターを含むことができ、1つまたはそれ以上のヌクレオチド配列は、対象となるポリペプチドまたは標的化エンドヌクレアーゼを産生するために、植物細胞、組織または生物中で調節配列の制御下で発現され得る。

10

【0155】

いくつかの実施形態による核酸分子に使用するのに適したプロモーターは、その全てが当分野で周知である、誘導性、組織特異的、ウイルス、合成または構成型であるものを含む。本発明の実施形態に有用となり得るプロモーターの非限定的例は、米国特許第6,437,217号明細書(トウモロコシRS81プロモーター);第5,641,876号明細書(イネアクチンプロモーター);第6,426,446号明細書(トウモロコシRS324プロモーター);第6,429,362号明細書(トウモロコシPR-1プロモーター);第6,232,526号明細書(トウモロコシA3プロモーター);第6,177,611号明細書(構成型トウモロコシプロモーター);第5,322,938号明細書、第5,352,605号明細書、第5,359,142号明細書および第5,530,196号明細書(35Sプロモーター);第6,433,252号明細書(トウモロコシL3オレオシンプロモーター);第6,429,357号明細書(イネアクチン2プロモーターおよびイネアクチン2イントロン);第6,294,714号明細書(光誘導性プロモーター);第6,140,078号明細書(塩誘導性プロモーター);第6,252,138号明細書(病原体誘導性プロモーター);第6,175,060号明細書(リン欠乏誘導性プロモーター);第6,388,170号明細書(双方向性プロモーター);第6,635,806号明細書(-コイキシン(coixin)プロモーター);第5,447,858号明細書(ダイズヒートショックプロモーター);ならびに米国特許出願第09/757,089号明細書(トウモロコシクロロプラスタアルドラーゼプロモーター)によって提供される。

20

30

【0156】

さらなる代表的なプロモーターは、ノパリンシンターゼ(NOS)プロモーター(Ebert et al.(1987) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84(16):5745-9);オクトピンシンターゼ(OCs)プロモーター(アグロバクテリウム・ツメファシエンス(Agrobacterium tumefaciens)の腫瘍誘発プラスミドに維持される);カリモウイルスプロモーター、例えば、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)19Sプロモーター(Lawton et al.(1987) Plant Mol.Biol.9:315-24);CaMV 35Sプロモーター(Odell et al.(1985) Nature 313:810-2);ゴマノハグサモザイクウイルス35Sプロモーター(Walker et al.(1987) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84(19):6624-8);スクロースシンターゼプロモーター(Yang and Russell (1990) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:4144-8);R遺伝子複合体プロモーター(Chandler et al.(1989) Plant Cell 1:1175-83);クロロフィルa/b結合タンパク質遺伝子プロモーター;CaMV 35S(米国特許第5,322,938号明細書、第5,352,605号明細書、第5,359,142号明細書および第5,530,196号明細書);FMV 35S(米国特許第6,051,753号明細書および第5,378,619号明細書);PC1SVプロモーター(米国特許第5,850,019号明細書);SCP1プロモーター(米国特許第6,677,503号明細書);ならびにAGRTunosプロモーター(GenBank 寄託番号V00087;Depicker et al.(1982) J.Mol.Appl.Genet.1:561-73;Bevan et al.(1983) Nature 304:184-7)を含む。

40

【0157】

特定の実施形態では、核酸分子が組織特異的プロモーターを含んでもよい。組織特異的

50

プロモーターは、生物の他の組織に対してプロモーターが特異的である組織中の作動可能に連結されたヌクレオチド配列の高レベルの転写を指示するヌクレオチド配列である。組織特異的プロモーターの例は、限定されないが、タバタム特異的プロモーター；薬特異的プロモーター；花粉特異的プロモーター（例えば、米国特許第7,141,424号明細書および国際PCT公開第99/042587号パンフレット参照）；胚珠特異的プロモーター（例えば、米国特許出願公開第2001/047525 A1号明細書参照）；果実特異的プロモーター（例えば、米国特許第4,943,674号明細書および第5,753,475号明細書参照）；および種子特異的プロモーター（例えば、米国特許第5,420,034号明細書および第5,608,152号明細書参照）を含む。いくつかの実施形態では、発育段階特異的プロモーター（例えば、発育の後期で活性のプロモーター）が使用され得る。

10

【0158】

いくつかの実施形態で、核酸分子と作動可能に連結され得るさらなる調節配列は、翻訳リーダー配列として機能する、プロモーター配列とコード配列との間に位置する5'UTRを含む。翻訳リーダー配列は、完全にプロセッシングを受けたmRNA中に存在し、一次転写産物のプロセッシングおよび/またはRNA安定性に影響を及ぼし得る。翻訳リーダー配列の例は、トウモロコシおよびペチュニアヒートショックタンパク質リーダー（米国特許第5,362,865号明細書）、植物ウイルスコートタンパク質リーダー、植物リブローソム-1,5-ニリン酸カルボキシラーゼ・オキシゲナーゼリーダーなどを含む。例えば、Turner and Foster (1995) *Molecular Biotech.*3(3):225-36を参照されたい。5'UTRの非限定的例は、GmHsp（米国特許第5,659,122号明細書）；PhDnaK（米国特許第5,362,865号明細書）；AtAnt1；TEV（Carrington and Freed (1990) *J.Virol.*64:1590-7）；およびAGRtunos（GenBank寄託番号V00087；およびBevan et al.(1983)、上記）によって提供される。

20

【0159】

いくつかの実施形態で、核酸分子と作動可能に連結され得るさらなる調節配列は、3'非翻訳配列、3'転写終結領域またはポリアデニル化領域も含む。これらはヌクレオチド配列の下流に位置する遺伝要素であり、ポリアデニル化シグナルおよび/または転写もしくはmRNAプロセッシングに影響を及ぼすことができる他の調節シグナルを提供するポリヌクレオチドを含む。ポリアデニル化シグナルは、植物において、ポリアデニル酸ヌクレオチドのmRNA前駆体の3'末端への付加を生じるように機能する。ポリアデニル化配列は、種々の植物遺伝子、またはT-DNA遺伝子に由来し得る。3'転写終結領域の非限定的例は、ノパリンシンターゼ3'領域である（nos3'；Fraley et al.(1983) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 80:4803-7）。異なる3'非翻訳領域の使用の例は、Ingelbrecht et al.(1989) *Plant Cell* 1:671-80で提供される。ポリアデニル化シグナルの非限定的例は、エンドウ（*Pisum sativum*）RbcS2遺伝子（Ps.RbcS2-E9；Coruzzi et al.(1984) *EMBO J.*3:1671-9）およびAGRtunos（GenBank寄託番号E01312）からのものを含む。

30

【0160】

特定の実施形態で有用となり得る調節配列に関するさらなる情報は、例えば、Goeddel (1990)「Gene Expression Technology」, *Methods Enzymol.*185, Academic Press, San Diego, CAに記載されている。

40

【0161】

組換え核酸分子またはベクターは、形質転換細胞、例えば、植物細胞に選択可能な表現型を与える選択可能なマーカーを含んでもよい。選択可能なマーカーは、選択可能なマーカーを含む核酸分子を含む細胞または生物を選び出すためにも使用され得る。マーカーは、殺生物剤耐性、抗生物質耐性（例えば、カナマイシン、ジェネテシン（G418）、ブレオマイシンおよびハイグロマイシン）または除草剤耐性（例えば、グリホサート）をコードし得る。選択可能なマーカーの例は、それだけに限らないが、カナマイシン耐性を与え、例えば、カナマイシンおよびG418を使用して選び出され得るneo遺伝子；ピ

50

アラホス耐性を与える *bar* 遺伝子；グリホサート耐性を与える突然変異 *EPSP* シンターゼ遺伝子；プロモキシニルに対する耐性を与えるニトリラーゼ遺伝子；イミダゾリノンまたはスルホニル尿素耐性を与える突然変異アセトラクテートシンターゼ遺伝子 (*ALS*)；およびメトトレキサート耐性 *DHFR* 遺伝子を含む。例えば、限定されないが、アンピシリン；プレオマイシン；クロラムフェニコール；ゲンタマイシン；ハイグロマイシン；カナマイシン；リンコマイシン；メトトレキサート；ホスフィノトリシン；プロマイシン；スペクチノマイシン；リファンピシン；ストレプトマイシン；およびテトラサイクリンを含む化学薬剤に対する耐性を与える複数の選択可能なマーカーが利用可能である。このような選択可能なマーカーの例は、例えば、米国特許第 5,550,318 号明細書；第 5,633,435 号明細書；第 5,780,708 号明細書および第 6,118,047 号明細書に示されている。

10

【0162】

核酸分子またはベクターが、同様にまたは代わりにスクリーニング可能なマーカーを含んでもよい。発現を監視するためにスクリーニング可能なマーカーが使用され得る。代表的なスクリーニング可能なマーカーは、種々の発色基質が知られている酵素をコードする - グルクロニダーゼまたは *uidA* 遺伝子 (*GUS*) (Jefferson et al.(1987) *Plant Mol.Biol.Rep.*5:387-405)；植物組織においてアントシアニン色素 (赤色) の産生を調節する産物をコードする *R* 座遺伝子 (Dellaporta et al.(1988) 「Molecular cloning of the maize *R-nj* allele by transposon tagging with *Ac*.」 In 18th Stadler Genetics Symposium, P.Gustafson and R.Appels, eds., Plenum, NY (pp.263-82))； - ラクタマーゼ遺伝子 (Sutcliffe et al.(1978) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 75:3737-41)；種々の発色基質が知られている酵素をコードする遺伝子 (例えば、*PADAC*、発色性セファロスポリン)；ルシフェラーゼ遺伝子 (Ow et al.(1986) *Science* 234:856-9)；発色性カテコールを変換するカテコールジオキシゲナーゼをコードする *xy1E* 遺伝子 (Zukowski et al.(1983) *Gene* 46(2-3):247-55)；アミラーゼ遺伝子 (Ikatu et al.(1990) *Bio/Technol.*8:241-2)；チロシンを、*DOPA* および縮合してメラニンになるドーパキノンに酸化することができる酵素をコードするチロシナーゼ遺伝子 (Katz et al.(1983) *J.Gen.Microbiol.*129:2703-14)；および - ガラクトシダーゼを含む。

20

【0163】

例えば、対象となる特定のポリペプチドまたは特定の標的化エンドヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列の全ては、当業者によって直ちに認識可能であるだろう。遺伝暗号の縮重が、特定のアミノ酸配列に有限数のコード配列を提供する。本発明の実施形態によるポリペプチドをコードする特定の配列の選択は専門家の裁量の範囲内にある。異なるコード配列は異なる用途に望ましくなり得る。

30

【0164】

いくつかの実施形態では、例えば、特定の宿主の核酸中に含まれるポリヌクレオチド配列の発現を強化するために、核酸のヌクレオチドを改変することが望ましくなり得る。遺伝暗号は 64 個の可能なコドンで冗長であるが、ほとんどの生物はこれらのコドンのサブセットを優先的に使用する。種において最も一般的に利用されているコドンは最適コドンと呼ばれ、あまり一般的に利用されていないものはレアまたは低使用頻度コドン (*low-usage codon*) として分類される。Zhang et al.(1991) *Gene* 105:61-72。コドンは、時々「コドン最適化」と呼ばれるプロセスで、特定の宿主の好ましいコドン使用を反映するよう置換され得る。特定の原核生物または真核生物宿主によって好まれるコドンを含む最適化コード配列が、例えば、翻訳速度を増加させるまたは望ましい特性 (例えば、非最適化配列から産生される転写産物と比べて長い半減期) を有する組換え *RNA* 転写産物を産生するために調製され得る。

40

【0165】

核酸は、本発明の実施形態において、例えば、限定されないが、プロトプラストの形質転換 (例えば、米国特許第 5,508,184 号明細書参照)；乾燥/阻害-媒介 *DNA* 取り込み (例えば、Potrykus et al.(1985) *Mol.Gen.Genet.*199:183-8参照)；電気穿孔

50

(例えば、米国特許第5,384,253号明細書参照)；炭化ケイ素繊維を用いた攪拌(例えば、米国特許第5,302,523号明細書および第5,464,765号明細書参照)；アグロバクテリウム媒介形質転換(例えば、米国特許第5,563,055号明細書、第5,591,616号明細書、第5,693,512号明細書、第5,824,877号明細書、第5,981,840号明細書および第6,384,301号明細書参照)；ならびにDNAコーティング粒子の加速(例えば、米国特許第5,015,580号明細書、第5,550,318号明細書、第5,538,880号明細書、第6,160,208号明細書、第6,399,861号明細書および第6,403,865号明細書参照)を含む当業者に公知の任意の方法によって宿主細胞に導入され得る。これらのような技術の適用を通して、事実上いずれの種の細胞も安定的に形質転換され得る。いくつかの実施形態では、形質転換DNAが宿主細胞のゲノムに組み込まれる。多細胞種の場合、トランスジェニック細胞がトランスジェニック生物に再生され得る。例えば、トランスジェニック植物のゲノム中に本発明の1つまたはそれ以上の核酸配列を含むトランスジェニック植物を産生するために、これらの技術のいずれかが使用され得る。

10

20

30

40

50

【0166】

発現ベクターを植物に導入するための最も広く利用されている方法は、アグロバクテリウムの自然形質転換システムに基づくものである。アグロバクテリウム・ツメファシエンスおよびアグロバクテリウム・リゾゲネス(*A. rhizogenes*)は、植物細胞を遺伝的に形質転換する植物病原性土壌細菌である。アグロバクテリウム・ツメファシエンスならびにアグロバクテリウム・リゾゲネスのT_iおよびR_iプラスミドがそれぞれ植物の遺伝子形質転換を担う遺伝子を導入する。T_i(腫瘍誘発) - プラスミドは、形質転換植物に運ばれる、T-DNAとして知られる大型セグメントを含む。T_iプラスミドの別のセグメントであるvir領域はT-DNA導入を担う。T-DNA領域は、それぞれ末端反復ヌクレオチド配列で構成された左手および右手境界に縁どられている。いくつかの改変バイナリーベクターでは、腫瘍誘発性遺伝子が欠失しており、T-DNAボーダー配列に縁どられている外来DNAを導入するためにvir領域の機能が利用される。T-領域はまた、例えば、トランスジェニック植物および細胞を効率的に回収するための選択可能なマーカー、ならびに導入するための挿入配列、例えば、本発明の融合タンパク質をコードする核酸のための複数のクローニングサイトを含んでもよい。

【0167】

したがって、いくつかの実施形態では、植物形質転換ベクターが、アグロバクテリウム・ツメファシエンスのT_iプラスミド(例えば、米国特許第4,536,475号明細書、第4,693,977号明細書、第4,886,937号明細書および第5,501,967号明細書；ならびに欧州特許第0122791号明細書)またはアグロバクテリウム・リゾゲネスのR_iプラスミドに由来する。さらなる植物形質転換ベクターは、例えば、限定されないが、Herrera-Estrella et al.(1983) Nature 303:209-13；Bevan et al.(1983), 上記；Klee et al.(1985) Bio/Technol. 3:637-42；および欧州特許第0120516号明細書に記載されているもの、ならびに前記のいずれかに由来するものを含む。いくつかの多様な植物への遺伝子導入を媒介するために、植物と自然に相互作用する他の細菌、例えば、シノリゾビウム属、リゾビウム属およびメソリゾビウム属が改変され得る。これらの植物関連共生細菌は、非武装T_iプラスミドと適当なバイナリーベクターの両方の獲得によって遺伝子導入に適格性にされ得る。

【0168】

外因性DNAをレシピエント細胞に供給した後、形質転換細胞は、一般的にさらなる培養および植物再生のために同定される。形質転換細胞を同定する能力を改善するために、形質転換体を産生するために使用されるベクターと共に、前記の選択可能なまたはスクリーニング可能なマーカー遺伝子を使用することが望まれ得る。選択可能なマーカーが使用される場合、形質転換細胞は、これらの細胞を1つまたはそれ以上の選択剤に暴露することによって、潜在的に形質転換された細胞中で同定される。スクリーニング可能なマーカーが使用される場合、細胞は所望のマーカー遺伝子形質についてスクリーニングされ得る

。

【0169】

選択剤への暴露を生き延びた細胞、またはスクリーニングアッセイで陽性とスコア化された細胞が、植物の再生を支持する培地中で培養され得る。いくつかの実施形態では、任意の適当な植物組織培養培地（例えば、MSおよびN6培地）が、さらなる物質、例えば、成長調節物質を含めることによって改変され得る。植物再生運動を開始するのに十分な組織が利用可能になるまで、または反復ラウンドの手動選択後、組織の形態が再生に適したものになるまで（例えば、少なくとも2週間）、組織が成長調節物質を含む基本培地に維持され、次いで、シュート形成を促す培地に移され得る。十分なシュート形成が起こるまで、培養物が定期的に移される。いったんシュートが形成されたら、これらは根形成を促す培地に移される。いったん十分な根が形成されたら、植物はさらなる成長および成熟のために土壌に移され得る。

10

【0170】

再生植物中の対象となる核酸分子（例えば、本発明の少なくとも1つの融合タンパク質を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列）の存在を確認するために、種々のアッセイが行われ得る。このようなアッセイは、例えば、分子生物学的アッセイ、例えば、サザンブロット法およびノーザンブロット法、PCR、ならびに核酸シーケンシング；生化学的アッセイ、例えば、免疫学的手段（ELISAおよび/またはウエスタンブロット法）または酵素機能によるタンパク質産物の存在の検出；植物部位アッセイ、例えば、葉または根アッセイ；および全再生植物の表現型の分析を含む。

20

【0171】

組込みイベントは、例えば、対象となるヌクレオチド配列に特異的なオリゴヌクレオチドプライマーを用いたPCR増幅によって分析され得る。PCRジェノタイピングは、それだけに限らないが、ゲノムに組み込まれた対象となる核酸分子を含むと予想される単離宿主植物組織に由来するゲノムDNAのポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅、引き続いてPCR増幅産物の標準的クローニングおよび配列解析を含むと理解される。PCRジェノタイピングの方法は十分に記載されており（例えば、Rios, G. et al. (2002) Plant J. 32:243-53参照）、細胞培養物を含む任意の植物種または組織型に由来するゲノムDNAに適用され得る。

【0172】

アグロバクテリウム依存型形質転換法を用いて形成されたトランスジェニック植物は、典型的には単一から複数コピーの組換えDNAを含む。単一組換えDNA配列は「トランスジェニックイベント」または「組込みイベント」と呼ばれる。このようなトランスジェニック植物は挿入されたDNA配列がヘテロ接合性である。いくつかの実施形態では、導入遺伝子に関してホモ接合性のトランスジェニック植物が、単一外因性遺伝子配列を含む独立分離トランスジェニック植物を自身、例えばF₀植物と有性交配（自殖）してF₁種子を産生することによって得られ得る。産生されたF₁種子の4分の1が導入遺伝子に関してホモ接合性となる。F₁種子の出芽が、典型的にはSNPアッセイまたはヘテロ接合体とホモ接合体との間の差異を認める熱増幅アッセイ（すなわち、接合生殖性アッセイ）を用いて、ヘテロ接合性について試験され得る植物をもたらす。

30

40

【0173】

いくつかの実施形態における植物または植物細胞の核酸分子を用いた直接形質転換に加えて、特定の実施形態では、少なくとも1つのトランスジェニックイベントを有する第1の植物をこのようなイベントを欠く第2の植物と交雑することによって、トランスジェニック植物が調製され得る。例えば、外因性核酸が部位特異的様式で組み込まれた少なくとも1つの改変FAD3座を含む核酸が、形質転換に修正可能な第1の植物系統に導入されてトランスジェニック植物を産生し、このトランスジェニック植物が第2の植物系統と交雑されて少なくとも1つの改変FAD3座（およびそれゆえに外因性核酸）を第2の植物系統に遺伝子移入することができる。

【0174】

50

再生植物中の対象となる核酸分子の存在を確認するために、種々のアッセイが行われ得る。このようなアッセイは、例えば、分子生物学的アッセイ、例えば、サザンブロット法およびノーザンブロット法、ならびにPCR；生化学的アッセイ、例えば、免疫学的手段（ELISAおよび/またはウエスタンブロット法）または酵素機能によるタンパク質産物の存在の検出；植物部位アッセイ、例えば、葉または根アッセイ；ならびに全再生植物の表現型の分析を含む。

【0175】

標的化組込みイベントは、例えば、対象となる核酸分子に特異的なオリゴヌクレオチドプライマーを用いたPCR増幅によってスクリーニングされ得る。PCRジェノタイピングは、それだけに限らないが、ゲノムに組み込まれた対象となる核酸分子を含むと予想される単離宿主植物カルス組織に由来するゲノムDNAのポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅、引き続いてPCR増幅産物の標準的クローニングおよび配列解析を含むと理解される。PCRジェノタイピングの方法は十分に記載されており（例えば、Rios, G. et al. (2002) Plant J. 32:243-53参照）、細胞培養物を含む任意の植物種または組織型に由来するゲノムDNAに適用され得る。標的化配列と導入配列の両方に結合するオリゴヌクレオチドプライマーの組み合わせがPCR増幅反応で連続的に使用され得るまたは多重化され得る。標的部位にアニールするよう設計されたオリゴヌクレオチドプライマー、導入された核酸配列、および/または2つの組み合わせが実行可能である。したがって、PCRジェノタイピング戦略は、（それだけに限らないが）植物ゲノム中の特異的配列の増幅、植物ゲノム中の複数の特異的配列の増幅、植物ゲノム中の非特異的配列の増幅、またはこれらの組み合わせを含み得る。当業者であれば、ゲノムを調べるためのプライマーと増幅反応のさらなる組み合わせを考案することができる。例えば、順方向および逆方向オリゴヌクレオチドプライマーのセットが、導入された核酸配列の境界の外側の標的に特異的な核酸配列にアニールするよう設計され得る。

10

20

【0176】

順方向および逆方向オリゴヌクレオチドプライマーは、例えば、対象となる核酸分子中のコード領域に相当する配列、または対象となる核酸分子の他の部分で、対象となる導入された核酸分子に特異的にアニールするよう設計され得る。これらのプライマーは、上記プライマーと併せて使用され得る。オリゴヌクレオチドプライマーは所望の配列にしたがって合成され得、（例えば、Integrated DNA Technologies, Inc、Coralville, IAから）商業的に入手可能である。増幅に、クローニングおよびシーケンシング、または増幅産物の直接配列解析が続き得る。当業者であれば、PCRジェノタイピング中に産生した増幅産物の解析のための代替法を認識するだろう。一実施形態では、遺伝子標的に特異的なオリゴヌクレオチドプライマーがPCR増幅に使用される。

30

【0177】

VI.FAD3性能座において組み込まれた核酸を含むトランスジェニック植物および植物材料

いくつかの実施形態では、少なくとも1つの改変された（例えば、FAD3座、外因性配列の破壊および/または標的化組込み）FAD3座を含む植物細胞を含むトランスジェニック植物が提供される。特定の実施形態では、このような植物が、植物組織または植物細胞の形質転換、および全植物の再生によって産生され得る。さらなる実施形態では、このような植物が、部位特異的様式での少なくとも1つのFAD3座における外因性核酸の導入、または改変FAD3座の生殖質への遺伝子移入を通して得られ得る。このような植物細胞を含む植物材料も提供される。このような植物材料は、植物細胞を含む植物から得られ得る。

40

【0178】

少なくとも1つの改変FAD3座を含む植物細胞を含むトランスジェニック植物または植物材料は、いくつかの実施形態では、以下の特性の1つまたはそれ以上を示し得る：植物の細胞中の標的化エンドヌクレアーゼの発現；植物の細胞中（またはその中のプラスチ

50

ド中)の対象となるポリペプチドの発現；植物の細胞の核中の標的化エンドヌクレアーゼの発現；植物の細胞中の標的化エンドヌクレアーゼの局在化；植物の細胞のゲノム中のFAD3座における組み込み；植物の細胞のゲノム中のFAD3座における対象となるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列または農学的遺伝子の組み込み；ならびに/あるいは植物の細胞のゲノム中のFAD3座において組み込まれたコード配列に対応するRNA転写産物の存在。このような植物は、例えば、限定されないが、植物の細胞のゲノム中のFAD3座において組み込まれた対象となるポリペプチドまたは農学的遺伝子によってその発現が調節される、内因性または導入遺伝子ヌクレオチド配列の発現から生じるもの；昆虫、他の有害生物および病原性因子に対する耐性；除草剤に対する耐性；強化された安定性、収量または貯蔵寿命；環境耐性；医薬製造；工業製品製造；および栄養強化を含む1つまたはそれ以上の望ましい形質をさらに有することができる。

10

【0179】

本発明によるトランスジェニック植物は、その後本明細書に記載される方法によって少なくとも1つのFAD3座に組み込まれる核酸を用いて形質転換され得る任意の植物であり得る。したがって、植物は双子葉植物であっても単子葉植物であってもよい。本方法に使用可能な双子葉植物の非限定的例は、シロイヌナズナ、アルファルファ、マメ、ブロッコリー、キャベツ、アブラナ、ニンジン、カリフラワー、セロリ、ハクサイ、ワタ、キュウリ、ナス、レタス、メロン、エンドウマメ、コショウ、ラッカセイ、ジャガイモ、カボチャ、ラディッシュ、ナタネ、ハウレンソウ、ダイズ、スカッシュ、サトウダイコン、ヒマワリ、タバコ、トマトおよびスイカを含む。本方法に使用可能な単子葉植物の非限定的例は、トウモロコシ、オオムギ、タマネギ、イネ、ソルガム、コムギ、ライムギ、アワ、サトウキビ、オートムギ、ライコムギ、スイッチグラスおよび芝草を含む。本発明によるトランスジェニック植物は任意の様式で使用または栽培され得る。

20

【0180】

いくつかの実施形態は、本発明のトランスジェニック植物から製造された商品産物も提供する。商品産物は、例えば、限定されないが、少なくとも1つのFAD3座に組み込まれた1つまたはそれ以上のヌクレオチド配列を含む植物の食品、粗粉、油または粉碎穀物もしくは全粒粉または種子を含む。1つまたはそれ以上の商品または商品産物中の1つまたはそれ以上のこのようなヌクレオチド配列の検出は、商品または商品産物が少なくとも一部は本発明の実施形態により産生されたトランスジェニック植物から製造されたという事実上の証拠である。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの改変FAD3座を含む植物細胞を含むトランスジェニック植物または種子が、限定されないが、RNAi分子が転写されるトランスジェニックイベント；殺虫タンパク質（例えば、バチルス・チューリゲンシス (*Bacillus thuringiensis*) 殺虫タンパク質) をコードする遺伝子；除草剤耐性遺伝子（例えば、グリホサートに対する耐性を提供する遺伝子）；およびトランスジェニック植物における望ましい表現型に寄与する遺伝子（例えば、増加した収量、変化した脂肪酸代謝または細胞質雄性不稔の修復）を含む、ゲノム中の少なくとも1つの他のトランスジェニックイベントを含んでもよい。

30

【0181】

少なくとも1つの改変FAD3座を含む植物細胞を含むトランスジェニック植物は、1つまたはそれ以上の望ましい形質を有することができる。このような形質は、例えば、昆虫、他の有害生物および病原性因子に対する耐性；除草剤に対する耐性；強化された安定性、収量または貯蔵寿命；環境耐性；医薬製造；工業製品製造；および栄養強化を含むことができる。望ましい形質は、望ましい形質を示す植物中で発現されるFAD3座における標的化組換えによって組み込まれた1つまたはそれ以上の核酸分子によって与えられ得る。したがって、いくつかの実施形態では、所望の形質が、少なくとも1つの改変FAD3座の部位において植物のゲノム中に導入された、植物中の導入遺伝子の存在により得る。さらなる実施形態では、望ましい形質が、従来の育種を通して得られ、この形質は少なくとも1つの改変FAD3座における標的化組換えによって組み込まれた1つまたはそれ以上の核酸分子によって与えられ得る。

40

50

【0182】

本発明によるトランスジェニック植物は、少なくとも1つの改変FAD3座の存在が望ましい任意の様式で使用または栽培され得る。したがって、植物は、特に、その後本発明による少なくとも1つのFAD3座に部位特異の様式で組み込まれる核酸分子を用いて形質転換されることによって、1つまたはそれ以上の所望の形質を有するように操作され、当業者に公知の任意の方法によって収穫および栽培され得る。

【0183】

VII. FAD3性能座において組み込まれた核酸を含むトランスジェニック植物のマーカ利用育種

アブラナ属の種においてFad2およびFad3と連結した(例えば、密に連結した)分子マーカーが提供される。例えば、HO形質(FAD3)に關与する配列を含むDNAセグメントが同定される。これらのセグメントは、ゲノム連鎖群中の突然変異対立遺伝子と連結した(例えば、密に連結した)マーカーの周りおよびその間に位置している。したがって、不活性化突然変異を有する突然変異FAD3遺伝子を含む核酸分子も提供される。同定されるセグメント、およびそのマーカーは、一部はセイヨウアブラナゲノムの連鎖群中の位置によって、本主題に含まれる。

10

【0184】

本明細書において引用される刊行物、特許および特許出願を含む全ての参考文献は、これにより、それらが本開示の明示的詳細と矛盾しない程度に参照により組み込まれ、あたかも各参考文献が参照により組み込まれることが個別的かつ具体的に示されており、かつ全体が本明細書に示されているのと同程度に組み込まれる。本明細書において論じられる参考文献は、本出願の出願日より前の開示についてのみ提供される。本発明者らが先行発明によってこのような開示に先立つ権利がないことの承認として解釈されるべきものは本明細書中にない。以下の実施例は、ある特定の特徴および/または実施形態を示すために提供される。これらの実施例は、本開示を例示される特定の特徴または実施形態に限定するものと解釈されるべきではない。

20

【実施例】

【0185】

実施例1：細菌人工染色体ライブラリーからのFAD3標的配列の同定

BACライブラリー構築

細菌人工染色体(BAC)ライブラリーを商業的販売業者(AmpliCon Express、Pullman、WA)から調達した。BACライブラリーは、セイヨウアブラナL. var. DH10275から単離された高分子量ゲノムDNA(gDNA)断片を含む110,592個のBACクローンを含んでいた。gDNAをBamHIまたはHindIII制限酵素のいずれかを用いて消化した。約135Kbpの単離gDNA断片をpCC1BACベクター(Epicentre、Madison、WI)に連結し、大腸菌菌株DH10B(Invitrogen)に形質転換した。BACライブラリーを、2つの異なる制限酵素を用いて構築した偶数のBACクローンで構成した。よって、HindIII構築BACライブラリーを144個の個々の384ウェルプレートに含ませた。同様に、BamHI構築BACライブラリーを144個の個々の384ウェルプレートに含ませた。合計110,592個のBACクローンを単離し、288個の個々の384ウェルプレートに配列した。288個の個々の384ウェルプレートの各々は、急速PCRに基づくスクリーニングのための単一DNA抽出として販売業者から供給された。得られたBACライブラリーは約15GbpのgDNAを網羅し、これはセイヨウアブラナL. var. DH10275ゲノム(セイヨウアブラナL.のゲノムの推定値は、Johnston et al.(2005) Annals of Botany 95:229-235に記載されているように約1.132Gbpである)の1.2倍のゲノム被覆率(genome coverage)に相当する。

30

40

【0186】

BACライブラリーから単離されたFAD3コード配列の配列解析

構築したBACライブラリーを使用してFAD3遺伝子コード配列を単離した。シーケ

50

ンシング実験を行ってセイヨウアブラナ L. var. DH10275 から6つのFAD3 遺伝子ホモログおよびパラログの特異的遺伝子配列を同定した。

【0187】

FAD3 遺伝子配列を、モデル種シロイヌナズナ中で最初に同定した。遺伝子配列は、Locus Tag: At2g29980としてGenbankに列挙されている。モデル植物種シロイヌナズナと二倍体ブラシカ・ラパ、四倍体セイヨウアブラナの祖先の1つとの間の比較ゲノム関係は以前に記載されている。(Schranz et al.(2006) Trends in Plant Science 11(11):535-542)。特にFAD3 遺伝子に関して、比較解析は3~4コピーの遺伝子が二倍体ブラシカゲノム中に生じ得ると予測した。さらなる遺伝子マッピング研究がScheffler et al.(1997) Theoretical and Applied Genetics 94; 583-591によ

10

【0188】

以前のシーケンシングの努力は、同定されたセイヨウアブラナからのFAD3 遺伝子に焦点を当て、Aゲノム特異的コピーとCゲノム特異的コピーの両方を遺伝的にマッピングした(Hu et al., (2006) Theoretical and Applied Genetics, 113(3): 497-507)。Andrew Sharpe of Agriculture and Agri-food Canada, 107 Science Place, Saskatoon, Saskatchewanによって、種子特異的cDNAライブラリーからのEST配列の収集が以前に構築され、植物系統DH12075から配列決定された。倍加半数体アブラナ植物DH12075全長遺伝子配列からのEST収集は入手可能でなかったため、さらに正確にヌクレオチドと呼ばれる配列品質および信頼度の指標も入手可能でなかった。結果として、異なるFAD3 遺伝子配列解読間の配列変動は、FAD3 遺伝子ファミリーの種々のホモログおよびパラログの異なる遺伝子コピーに明解に帰せられず、ゲノム配列も入手可能でなかった。しかしながら、組み合わせ配列解析がESTならびにHu et al., (2006)に記載されている2つのFAD3 AおよびFAD3 C全長遺伝子配列を用いて行われると、これらの遺伝子の両方に一致するESTがさらなる4つのハプロタイプと一緒に同定された。結果として、FAD3の合計6つの特有のハプロタイプが同定された。種々のFAD3ハプロタイプに入手可能な全てのデータのアセンブリ後、エクソン1中の高レベルのエクソン配列分散が同定された。エクソン1中のFAD3配列の分散は、遺伝子/対立遺伝子特異的PCRプライマーの設計に利用され得る機会として同定された。さらに、ハプロタイプ間で最小限に区別される(例えば、エクソン5、6、7および8はFAD3 AとFAD3 Cとの間で異なる1~3bpを有した)または配列変動のない(例えば、エクソン2および3)エクソンが同定された。

20

30

【0189】

セイヨウアブラナ L. var. DH12075から構築されたBACライブラリーのシーケンシング解析は、6つのBAC配列(配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5および配列番号6)の単離をもたらし、そこからFAD3 A(配列番号7)、FAD3 A'(配列番号8)、FAD3 A''(配列番号9)、FAD3 C(配列番号10)、FAD3 C''(配列番号11)およびFAD3 C'(配列番号12)遺伝子のコード配列を決定した。FAD3 A、FAD3 A'、FAD3 A''、FAD3 C、FAD3 C''およびFAD3 C' 遺伝子配列を同定し、遺伝的にマッピングした。

40

【0190】

配列アラインメントプログラムおよび同一性割合を用いた近隣結合系統樹を用いて6つのFAD3 遺伝子の配列解析を行った。配列アラインメントを、Vector NTI Advance 11.0コンピュータプログラムのAlignX(登録商標)プログラム(Life Technologies, Carlsbad, CA)を介して行い、図1に示す。AlignX(登録商標)は、類似性比較およびアノテーションのためにタンパク質または核酸配列の複数の配列アラインメントを作成するために修正Clustal Wアルゴリズムを使用する。近隣結合系統樹を、Jalview v2.3(登録商標

50

ソフトウェアを用いて作成し、図2に示す。(Waterhouse et al.(2009) *Bioinformatics* 25 (9) 1189-1191)。FAD3遺伝子を含むものとして同定されたコンティグを、シロイヌナズナ遺伝子のデータベースに対するBLASTnクエリとして使用した。FAD3遺伝子を含む6つのコンティグの各々の領域を、シロイヌナズナFAD3遺伝子(Genbank 寄託番号 At2g29980)との比較を通して同定した。次いで、FAD3コンティグを、全てのFAD3遺伝子が5' → 3'配向になるように配向した。FAD3コンティグを、可能な限り多くの2つの上流(5')および1つの下流(3')シロイヌナズナ遺伝子を含むようにトリミングした。いったん配向したら、FAD3遺伝子の完全なコード領域を各コンティグから抽出し、これを使用して異なるFAD3遺伝子ファミリー間関係を示す近隣結合系統樹を作成した。6つのFAD3ファミリーメンバーを3対のFAD3遺伝子にアラインメントした(図2)。

10

【0191】

PCRに基づくスクリーニング

上記BACライブラリーをスクリーニングするようにPCRプライマーのコホートを設計した。プライマーを遺伝子ファミリーの全てのメンバーを増幅するユニバーサルプライマー、または標的化対立遺伝子増幅用の遺伝子特異的プライマーとして設計した。PCRプライマーを、20bp長(+/-1bp)となり、かつ50%(+/-8%)のG/C含量を含むように設計した。表1は設計および合成したプライマーを列挙している。BACライブラリーのクローンをポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を介してプールおよびスクリーニングした。

20

【表1】

表1: FAD3配列のPCR増幅のために使用したプライマー配列

プライマー名:	配列番号:	配列:
D_uni_F3_F1	配列番号 13	GAATAAGCCATCGGACACAC
D_spec_F3_F2	配列番号 14	ATGCGAACGGAGACGAAAGG
D_spec_F3_F3	配列番号 15	TGTTAACGGAGATTCGGGTG
D_spec_F3_F4	配列番号 16	GTAGCAATGTGAACGGAGAT
D_uni_F3_R1	配列番号 17	CAGTGTATCTGAGCATCCG
D_spec_F3_R2	配列番号 18	GTGGCCGAGTACGAAGATAG
D_spec_F3_R3	配列番号 19	CAGTAGAGTGGCCAGAGGA

30

【0192】

2つの異なる条件セットをポリメラーゼ連鎖反応(PCR)に使用した。第1のシリーズのPCR反応は、1XPCRバッファ(dNTPを含む); 1.5mMのMgCl₂; 200μMの0.25U Immolase(登録商標)DNAポリメラーゼ(Bioline、ロンドン、英国); 250nMの各プライマー; および約5~10ngのプレートDNAを含んでいた。第2のシリーズのPCR反応は、ゲノムDNAの増幅用に開発したものであり、5~10ngのゲノムDNA、1XPCRバッファ、2mMのdNTP、0.4μMの順方向および逆方向プライマー、ならびに0.25U Immolase(登録商標)DNAポリメラーゼ(Bioline、ロンドン、英国)を含んでいた。試薬を13μLの最終体積にプールし、MJPTC200(登録商標)サーモサイクラー(BioRad、Hercules、CA)またはABI 9700 GeneAmp System(登録商標)(Life Technologies、Carlsbad、CA)を用いて増幅した。上記PCR条件で、Bryanら(Scottish Crops Research Institute annual report: 2001-2002)により記載されているスクリーニングシステムに基づく4次元スクリーニングアプローチを用いて、特異的プレートのPCRに基づくス

40

50

クリーニングを行った。プールのBACライブラリーのPCRに基づくスクリーニング後に、直接Sangerシーケンシング法を用いて増幅PCR産物をシーケンシングした。増幅産物を、BigDye(登録商標)v3.1プロトコル(Applied Biosystems)にしたがってエタノール、酢酸ナトリウムおよびEDTAを用いて精製し、ABI3730x1(登録商標)自動化毛細管電気泳動プラットフォームで電気泳動を行った。

【0193】

PCRに基づくスクリーニングおよび確認Sangerシーケンシングの後、種々の異なるFAD3遺伝子ファミリーメンバーを含むプレートの収集を同定した。合計6つの特有のFAD3ホモログおよびパラログ遺伝子配列を同定した(表2)。プレートスクリーニングを受けるための各FAD3遺伝子配列当たり合計2つのプレートを選択してFAD3遺伝子を含むプレート中の特異的ウェルおよびクローンを同定した(表2)。特異的ウェルをプレートの両方について同定し、個々のクローンをFAD3遺伝子ファミリーメンバーの各々について選択した(表2)。

【表2】

表2：プレート中のクローン同定のために順方向にとられた2つのプレート同一性と合わせた、詳細なPCRプライマー組み合わせでポジティブ反応を提供したBACクローンプレートの同定

遺伝子名	プライマーセット	ポジティブプレートプール	選択したプレート
FAD3A (FAD3A-1)	F2+R2	16, 231	プレート16 プレート231
FAD3C	F4+R2	18, 27, 136, 178, 211, 232	プレート18 プレート27
FAD3C' (ハプロタイプ1)	F4+R2, F4+R3, F3+R3	23, 44, 53, 56, 77, 116, 158, 199, 209, 278, 280, 282, 283, 284, 286	プレート44 プレート199
FAD3A' (FAD3A' /FAD3A'')	F4+R2	52, 121, 139	プレート121 プレート139
FAD3C' (ハプロタイプ2)	F4+R2	144, 188, 235	プレート144 プレート188
FAD3A' (ハプロタイプ3)	F4+R3 および F3+R3	69, 105, 106, 229, 242, 247, 248	プレート69 プレート106

【0194】

各々の同定されたFAD遺伝子ファミリーメンバーに対して単一のBACクローンを、シーケンシングを介してさらに解析した。製造業者の指示にしたがうLarge Constructキット(登録商標)(Qiagen, Valencia, CA)を用いたシーケンシングのために、DNAをBACクローンについて単離し、調製した。製造業者の指示にしたがうGS-FLX Titanium Technology(登録商標)(Roche, Indianapolis, IN)を用いたシーケンシングのために、抽出BAC DNAを調製した。最適データ出力のために対でプールのBACを含む物理的にセクタ分割したGS-FLX TI Pico-タイタープレート(登録商標)を用いてシーケンシング反応を行った。BACを対に合わせ、ここでFAD2遺伝子をFAD3

遺伝子と対形成した。全ての作成した配列データを Newbler v2.0.01.14 (登録商標) (454 Life Sciences, Branford, CT) によってアセンブルした。アセンブルしたコンティグを、Sequencher v3.7 (登録商標) (GeneCodes, Ann Arbor, MI) を用いて対応する FAD 遺伝子の存在について手動で評価した。

【0195】

全6つの FAD3 遺伝子の全ゲノム配列を同定し、完全に特徴付けた後、ジンクフィンガーヌクレアーゼを、各特異的遺伝子ファミリーメンバーについての配列に結合するよう設計した。

【0196】

実施例2：FAD3 遺伝子に特異的なジンクフィンガー結合ドメインの設計

FAD3 遺伝子座の種々の機能配列をコードする DNA 配列に向けられたジンクフィンガータンパク質を前記のように設計した。例えば、Urnov et al. (2005) Nature 435:646-651 を参照されたい。代表的な標的配列および認識ヘリックスを表3 (ヘリックス認識領域設計) および表4 (標的部位) に示す。表4では、ZFP 認識ヘリックスが接触する標的部位のヌクレオチドが大文字で示されており、非接触ヌクレオチドが小文字で示されている。ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) 標的部位を、FAD3 の7つの標的部位に結合するよう設計した。FAD3 ジンクフィンガー設計を、CCHC 構造の少なくとも1つのフィンガーを有するタンパク質をコードするジンクフィンガー発現ベクターに組み込んだ。米国特許出願公開第2008/0182332号明細書を参照されたい。特に、各タンパク質の最後のフィンガーは、ヘリックス認識のためのCCHC骨格を有していた。非標準ジンクフィンガーコード配列を、4つのアミノ酸ZCリンカーおよびトウモロコシ (Zea mays) に由来するオペク-2核移行シグナルを介してIIS型制限酵素FokIのヌクレアーゼドメイン (Wah et al., (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:10564-10569) のアミノ酸384~579) に融合してFAD3 ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) を形成した。融合タンパク質の発現を、比較的強い構成型プロモーター、例えば、キャッサバ葉脈モザイクウイルス (CsVMV) プロモーターに由来し、アグロバクテリウム・ツメファシエンスのORF23 3'未翻訳領域 (AtuORF23 3'UTR v1) が隣接するプロモーターによって駆動した。ゾセア・アシグナ (Thosea asigna) ウイルスからの自己加水分解2Aコードヌクレオチド配列 (Szymczak et al., 2004) を、構築物にクローニングした2つのZFNの間に付加した。代表的なベクターを以下に記載する。

【0197】

活性ヌクレアーゼを同定することが以前示された出芽酵母に基づく系を用いて、最適ジンクフィンガーを切断活性について検証した。例えば、米国特許出願公開第2009011119号明細書; Doyon et al. (2008) Nat Biotechnol 26:702-708; Geurts et al. (2009) Science 325:433を参照されたい。種々の機能性ドメインに関するジンクフィンガーをインビボでの使用のために選択した。推定FADゲノムポリヌクレオチド標的部位に結合するよう設計、作成および試験された多数のZFNのうち、15個のZFNを高レベルのインビボ活性を有するものとして同定し、さらなる実験のために選択した。これらのZFNを、植物体中に特有のFAD3ゲノムポリヌクレオチド標的部位に効率的に結合し、これを切断することができるものとして特徴付けた。

10

20

30

40

【表 3 - 1】

表 3 : F A D 3 ジンクフィンガー設計

ZFP	sF1	F2	F3	F4	F5	F6
27961	RSDNLAR (配 列番号 116)	QKKDRSY (配列番号 117)	RSDNLAR (配 列番号 116)	QRGNRNT (配 列番号 119)	RSDHLSR (配 列番号 120)	RNQDRTN (配 列番号 121)
27962	DRSNLSR (配列番号 122)	RQDSRSQ (配 列番号 123)	QSSDLSR (配 列番号 124)	DRSALAR (配 列番号 125)	TSGSLTR (配 列番号 126)	N/A
27973	QSSDLSR (配 列番号 124)	AASNRSK (配 列番号 128)	TSGSLSR (配 列番号 129)	RSDALAR (配 列番号 130)	RSDVLST (配 列番号 131)	WGRLRKL (配 列番号 132)
27974	ERGLLAR (配 列番号 133)	RSDDLTR (配 列番号 134)	RSDHLSA (配 列番号 135)	QHGLQQT (配 列番号 136)	TSGNLTR (配 列番号 137)	QSGHLSR (配 列番号 138)
27987	TSGSLTR (配 列番号 126)	RSDHLSQ (配 列番号 140)	CTNRWR (配 列番号 141)	RSDNLSE (配 列番号 142)	ASKTRKN (配 列番号 143)	N/A
27990	TSGSLSR (配 列番号 129)	TSSNRAV (配 列番号 145)	TSGNLTR (配 列番号 137)	DRSALAR (配 列番号 125)	RSDVLSE (配 列番号 148)	RNFSLTM (配 列番号 149)
27991	QSGDLTR (配 列番号 150)	TSGSLSR (配 列番号 129)	QSGNLAR (配 列番号 152)	TSGSLSR (配 列番号 129)	QSGSLTR (配 列番号 154)	N/A
27992	DRSHLAR (配 列番号 155)	TSGSLSR (配 列番号 129)	TSSNRAV (配 列番号 145)	TSGNLTR (配 列番号 137)	DRSALAR (配 列番号 125)	N/A
28004	QSGNLAR (配 列番号 152)	HLGNLKT (配 列番号 161)	RSDHLSQ (配 列番号 140)	TARLLKL (配 列番号 163)	QSGNLAR (配 列番号 152)	QTSHLPQ (配 列番号 165)
28005	RSDNLSV (配 列番号 166)	TSGHLSR (配 列番号 167)	TSGSLTR (配 列番号 126)	RSDALST (配 列番号 169)	DRSTRTK (配 列番号 170)	N/A
28021	QNAHRKT (配 列番号 171)	TSGNLTR (配 列番号 137)	LKQMLAV (配 列番号 173)	RSDNLSR (配 列番号 174)	DNSNRKT (配 列番号 175)	N/A
28022	RSDNLSV (配 列番号 166)	QANRIT (配 列番号 177)	TSGSLSR (配 列番号 129)	QSSVRNS (配 列番号 179)	DRSALAR (配 列番号 125)	N/A
28023	RSDNLSR (配 列番号 174)	DNSNRKT (配 列番号 175)	DRSNLTR (配 列番号 183)	RSDVLSE (配 列番号 148)	TRNGLKY (配 列番号 185)	N/A
28024	RSDALAR (配 列番号 130)	RSDVLSE (配 列番号 148)	RSSDRTK (配 列番号 188)	RSDNLSV (配 列番号 166)	QANRIT (配 列番号 177)	N/A
28025	QSSDLSR (配 列番号 124)	QSTHRNA (配 列番号 192)	RSDNLAR (配 列番号 116)	QRGNRNT (配 列番号 119)	RSDHLSR (配 列番号 120)	RNQDRTN (配 列番号 121)

10

20

30

40

【表 3 - 2】

28026	DRSNLSR (配 列番号 122)	RQDSRSQ (配 列番号 123)	QSSDLSR (配 列番号 124)	DRSALAR (配 列番号 125)	TSGSLTR (配 列番号 126)	N/A
28035	QSSDLSR (配 列番号 124)	AASNRSK (配 列番号 128)	TSGLSR (配 列番号 129)	RSDALAR (配 列番号 130)	RSDTLSQ (配 列番号 206)	QRDHRİK (配 列番号 207)
28036	RSDDLTR (配 列番号 134)	QSSDLRR (配 列番号 209)	RSDHLSA (配 列番号 135)	QH GALQT (配 列番号 136)	TSGNLTR (配 列番号 137)	QSGHLSR (配 列番号 138)
28039	TSGLSR (配 列番号 129)	RSDALAR (配 列番号 130)	RSDTLSQ (配 列番号 206)	QRDHRİK (配 列番号 207)	TSGNLTR (配 列番号 137)	DRGDLRK (配 列番号 219)
28040	DSSDRKK (配 列番号 220)	TSGNLTR (配 列番号 137)	DNYNRAK (配 列番号 222)	DRSHLTR (配 列番号 223)	RSDNLTT (配 列番号 224)	N/A
28051	RSDNLSN (配 列番号 225)	TSSSRIN (配 列番号 226)	RSDNLSE (配 列番号 142)	ASKTRKN (配 列番号 143)	RSDALTQ (配 列番号 229)	N/A
28052	RSDTLST (配 列番号 230)	DRSSRIK (配 列番号 231)	RSDDL SK (配 列番号 232)	DNSNRIK (配 列番号 233)	N/A	N/A
28053	QSSDLSR (配 列番号 124)	QAGNLSK (配 列番号 235)	QSGDLTR (配 列番号 150)	TSGLSR (配 列番号 129)	QSGNLAR (配 列番号 152)	N/A
28054	TSGLSR (配 列番号 129)	LRQTLRD (配 列番号 240)	TSGNLTR (配 列番号 137)	DRSALAR (配 列番号 125)	RSDVLSE (配 列番号 148)	RNFSLTM (配 列番号 149)
28055	QSGDLTR (配 列番号 150)	TSGLSR (配 列番号 129)	QSGNLAR (配 列番号 152)	TSGLSR (配 列番号 129)	QSGSLTR (配 列番号 154)	N/A
28056	DRSHLAR (配 列番号 155)	TSGLSR (配 列番号 129)	LRQTLRD (配 列番号 240)	TSGNLTR (配 列番号 137)	DRSALAR (配 列番号 125)	N/A

10

20

30

【表 4】

表 4 : F A D 3 ジンクフィンガーの標的部位

ZFP	標的部位 (5' →3')	配列番号 :
27961	cgCCGGAGAAAGAGAGAGAGcctttgagg	配列番号 20
27962	tgGTTGTGCGTATGGACcagcgtagcaa	配列番号 21
27969	tcTCCGTTcGCATTGcTACGCTggtcca	配列番号 22
27970	gaAAGGTTtGATCCGAGCGCAcaaccac	配列番号 23
27973	tcTCCGTTcGCATTGcTACGCTggtcca	配列番号 22
27974	tcGGAGATATAAGGGCGGCCattcctaa	配列番号 25
27987	taGCCAGAACAGGGTTccttggcggc	配列番号 26
27988	ctTCGTA CT CGGCCACGactggttaattt	配列番号 27
27989	ttGAAGTTGCAaTAAGCTttctctcgct	配列番号 28
27990	acTTGCTGGTCGATCATGTTggcactc	配列番号 29
27991	aaGTAGTTGAAGTTGCAataagctttct	配列番号 30
27992	tgGTCGATCATGTTGGCcactcttgttt	配列番号 31
28004	aaCGAGAATGAAGGAATGAaagatatga	配列番号 32
28005	atACCATGGTTGGTAAGtcatttatattt	配列番号 33
28021	ccAACGAGgAATGATAGataaacaagag	配列番号 34
28022	caGTCACAGTTcTAAAAGtctatggtgt	配列番号 35
28023	tgTGACTGGACcAACGAGgaatgataga	配列番号 36
28024	tcTAAAAGTCTATGGTgttccttacatt	配列番号 37
28025	cgCCGGAGAAAGAGAGAGCTttgaggga	配列番号 38
28026	tgGTTGTGCGTATGGACcagcgtagcaa	配列番号 21
28035	ctTAAACGGTGGTTgTGCCTcggatca	配列番号 40
28036	tcGGAGATATAAGGGCTGCGattcctaa	配列番号 41
28039	tcTCCGATctTAAACGGTGGTTgtgcgc	配列番号 42
28040	atAAGGGCTGCGATTCCtaagcattggt	配列番号 43
28051	agATGGCCAGAAAAGggttccttgggc	配列番号 44
28052	cgTACTCGGCCACGactggttaatttaat	配列番号 45
28053	ttGAAGTTGCAaTAAGCTttctctcgct	配列番号 28
28054	acTTGCTGGTCGATCGTGTggcactc	配列番号 47
28055	aaGTAGTTGAAGTTGCAataagctttct	配列番号 30
28056	tgGTCGATCGTGTGGCcactcttgttt	配列番号 49

10

20

30

40

50

【 0 1 9 8 】

実施例 3 : F A D 3 遺伝子のジンクフィンガーヌクレアーゼ切断の評価
構築物アセンブリ

実施例 2 に記載されるように、酵母アッセイを用いて同定された、代表的なジンクフィンガーヌクレアーゼの Z F N 発現構築物を含むプラスミドベクターを、当分野で一般的に公知の技能および技術を用いて設計し、完成させた。各ジンクフィンガーコード配列を、

ジンクフィンガーヌクレアーゼの上流に位置するオペク - 2 核移行シグナル (Maddalon i et al.(1989) Nuc.Acids Res.17(18):7532) をコードする配列に融合した。

【0199】

次に、オペク - 2 核移行シグナル：：ジンクフィンガーヌクレアーゼ融合配列を、相補的オペク - 2 核移行シグナル：：ジンクフィンガーヌクレアーゼ融合配列と対形成した。よって、各構築物は、ゾセア・アシグナウイルスからの 2 A 配列によって分離された 2 つのオペク - 2 核移行シグナル：：ジンクフィンガーヌクレアーゼ融合配列で構成された単一のオープンリーディングフレームを含んでいた (Mattion et al.(1996) J.Virol .70:8124-8127)。融合タンパク質の発現を、比較的強い構成型プロモーター、例えば、キャッサバ葉脈モザイクウイルス (CsVMV) プロモーターに由来し、アグロバクテリウム・ツメファシエンスの ORF 23 3' 未翻訳領域 (AtuORF 23 3' UTR) が隣接するプロモーターによって駆動した。

10

【0200】

In-Fusion (商標) Advantage Technology (Clontech、Mountain View、CA) を用いてベクターをアSEMBLした。制限エンドヌクレアーゼを New England Biolabs (NEB; Ipswich、MA) から得て、T4 DNA Ligase (Invitrogen) を DNA ライゲーションに使用した。供給業者の指示にしたがって NucleoSpin (登録商標) Plasmid Kit (Macherey - Nagel Inc.、Bethlehem、PA) または Plasmid Midi Kit (Qiagen) を用いてプラスミド調製を行った。アガローストリス酢酸ゲル電気泳動後に QIAquick Gel Extraction Kit (商標) (Qiagen) を用いて DNA 断片を単離した。全てのアSEMBLしたプラスミドのコロニーを最初にミニプレップ DNA の制限消化によってスクリーニングした。選択されたクローンのプラスミド DNA を、商業的シーケンシング販売業者 (Eurofins MWG Operon、Huntsville、AL) によってシーケンシングした。配列データを、Sequencher (商標) ソフトウェア (Gene Codes Corp.、Ann Arbor、MI) を用いてアSEMBLおよび分析した。セイヨウアブラナプロトプラストに送達する前に、プラスミド DNA を、供給業者の指示にしたがって Pure Yield Plasmid Maxiprep System (登録商標) (Promega Corporation、Madison、WI) または Plasmid Maxi Kit (登録商標) (Qiagen、Valencia、CA) を用いて大腸菌の培養物から調製した。

20

30

【0201】

得られた 11 個のプラスミド構築物； pDAB107824 (ZFNs 28025 - 2A - 28026)、pDAB107815 (ZFNs 27961 - 2A - 27962)、pDAB107816 (ZFNs 27969 - 2A - 27970)、pDAB107817 (ZFNs 27973 - 2A - 27974)、pDAB107825 (ZFNs 28035 - 2A - 28036)、pDAB107826 (ZFNs 28039 - 2A - 28040)、pDAB107818 (ZFNs 27987 - 2A - 27988)、pDAB107827 (ZFNs 28051 - 2A - 28052)、pDAB107821 (ZFNs 28004 - 2A - 28005)、pDAB107819 (ZFNs 27989 - 2A - 27990)、pDAB107828 (ZFNs 28053 - 2A - 28054) (図 3)、pDAB107829 (ZFNs 28055 - 2A - 28056) (図 4)、pDAB107820 (ZFNs 27991 - 2A - 27992)、pDAB107822 (ZFNs 28021 - 2A - 28022) および pDAB107823 (ZFNs 28023 - 2A - 28024) を、制限酵素消化および DNA シーケンシングを介して確認した。

40

【0202】

トランスフェクション用の DNA の調製

上記ベクターのプラスミド DNA を沈殿により滅菌し、100% (v/v) エタノール

50

で洗浄し、ラミナーフード中で乾燥させた。DNAペレットを、下記のプロトプラスト細胞へのトランスフェクションのために $0.7 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ の最終濃度で滅菌再蒸留水 $30 \mu\text{L}$ に懸濁した。プラスミドDNAの調製を行って、一過性トランスフェクション用のスーパーコイルプラスミドDNAおよび安定性トランスフェクション用の線状プラスミドDNAを得た。キャリアDNA（例えば、魚類精子DNA）の形質転換プラスミドへの付加はプロトプラスト細胞の一過性トランスフェクションに要求されない。一過性試験のために、1回の形質転換当たり、 10^6 個のプロトプラスト当たり約 $30 \mu\text{g}$ のプラスミドを使用した。

【0203】

トランスフェクション

セイヨウアブラナ L. var. DH10275 のトランスフェクションを Spangenberg et al., (1986) Plant Physiology 66: 1-8 に記載されているように完了し、培地処方物は Spangenberg G. and Protrykus I. (1995) Polyethylene Glycol-Mediated Direct Gene Transfer in Tobacco Protoplasts. In: Gene Transfer to Plants. (Protrykus I. and Spangenberg G. Eds.) Springer-Verlag, Berlin に記載されている。セイヨウアブラナ種子を70%エタノールで表面消毒した。種子を70%エタノール溶液12 mLに浸漬し、カクテルを10分間穏やかに揺動することによって混合した。70%エタノール溶液を、デカントすることによって取り出し、1% w/v 自亜塩素酸カルシウムおよび0.1% v/v Tween-20の種子消毒液と交換した。種子を種子消毒液に浸漬し、カクテルを25分間穏やかに揺動することによって混合した。種子消毒液をデカントし、消毒した種子を滅菌水50 mLで3回すすいだ。最後に、種子を、ペトリ皿中に置かれた滅菌80 mmのWhatman濾紙ディスク（登録商標）（Fisher-Scientific, St. Louis, MO）に移し、種子を滅菌水で軽く飽和させた。ペトリ皿をParafilm（登録商標）（Fisher-Scientific, St. Louis, MO）で密閉し、プレートを完全暗所下25℃で1~2日間インキュベートした。種子から実生出芽の兆候が観察された後、実生を固化GEM培地を含むペトリ皿に移してさらなる種子の発芽を促した。実生をGEM培地において25℃で4~5日間インキュベートした。

10

20

30

40

50

【0204】

一定体積の液体PS培地（約10 mL）を滅菌ペトリ皿にデカントした。滅菌鉗子およびメスを用いて、発育の4葉期にある4~5日齢の実生の気生部分を除去し、捨てた。長さ20~40 mmの胚軸セグメントを、小型の細胞質に富むプロトプラストの最高集団を産生するように決定した。胚軸セグメントを無菌的に切除し、液体PS培地に移した。切除した胚軸セグメントを一緒にグループ化し、5~10 mmのセグメントに横方向に切り分けた。次に、胚軸セグメントを新鮮なPS培地に移し、室温で1時間インキュベートした。原形質分離した胚軸を、酵素溶液を含むペトリ皿に移した。胚軸セグメントの全てを溶液に浸漬するよう注意した。ペトリ皿をParafilm（登録商標）で密閉し、穏やかに揺動しながら20~22℃で16~18時間一晩インキュベートした。

【0205】

プロトプラスト細胞を胚軸セグメントから放出した。一晩の胚軸消化物を穏やかに攪拌してプロトプラストを酵素溶液に放出した。ペトリ皿をわずかに傾けて、酵素溶液および植物破片の消化懸濁液の移動を助けた。10 mLピペットを用いて、消化懸濁液を滅菌プロトプラスト濾過（100ミクロンメッシュのフィルタ）装置に移してプロトプラストを植物破片からさらに分離した。濾過装置を穏やかに叩いて、ふるいに引っかかった過剰な液体を放出した。約8~9 mLのプロトプラスト懸濁液を穏やかに混合し、14 mL滅菌プラスチック丸底遠心管に分配した。各懸濁液をW5溶液1.5 mLで覆った。W5溶液を一定角度でプロトプラスト懸濁液上に慎重に分配し、最小限攪拌しながら1滴ずつ分配した。W5溶液のプロトプラスト懸濁液への添加は、プロトプラストに富む界面の生成をもたらした。この界面を、ピペットを用いて回収した。次に、回収したプロトプラストを新しい14 mL遠心管に移し、穏やかに混合した。血球計算器を用いて1ミリリットル当たりのプロトプラストの数を測定して、収率または得られたプロトプラストを決定した。

葉組織を消化して葉肉プロトプラストを産生する方法を繰り返した。

【0206】

次に、W5溶液を10mL体積に添加し、W5溶液を除去する前にプロトプラストを70gでペレット化した。残っているプロトプラスト懸濁液を、穏やかに振盪することによって再懸濁した。プロトプラスト懸濁液を含む各管にW5溶液5mLを充填し、室温で1~4時間インキュベートした。プロトプラスト懸濁液を70gでペレット化し、W5溶液の全てを除去した。次に、形質転換バッファ300 μ Lを、単離プロトプラストを含むペレット化したプロトプラスト懸濁液の各々に添加した。管の各々について、プラスミドDNA10 μ gをプロトプラスト懸濁液に添加した。プラスミドDNAは、上記ジンクフィンガーヌクレアーゼ構築物を含んでいた。次に、予備加温PEG4000溶液300 μ Lをプロトプラスト懸濁液に添加し、管を穏やかに叩いた。プロトプラスト懸濁液および形質転換混合物を攪拌することなく室温で15分間インキュベートさせた。W5溶液さらに10mLを、W5溶液の各添加の間に管を穏やかに反転させながら、1mL、1mL、1mL、2mL、2mLおよび3mLの連続アリコートで各管に添加した。70gで遠心分離機中で回転させることによって、プロトプラストをペレット化した。W5溶液の全てを除去して、純粋なプロトプラスト懸濁液を残した。

10

【0207】

次に、K3培地0.5mLをペレット化したプロトプラスト細胞に添加し、細胞を再懸濁した。再懸濁したプロトプラスト細胞をペトリ皿ならびに5mLのK3および0.6mLのSea Plaque (商標) アガロース (Cambrex、East Rutherford、NJ) の中心に1:1濃度で入れた。ペトリ皿を一回の穏やかな旋回動作で振盪し、室温で20~30分間インキュベートさせた。ペトリ皿をParafilm (登録商標) で密閉し、プロトプラストを完全な暗所中で24時間培養した。暗所中でのインキュベーション後、ペトリ皿を薄明かり (5 μ Mol $m^{-2}s^{-1}$ のOsram L36W/21 Lumilux白色管) の下で6日間培養した。培養工程後、滅菌スパーテルを用いてプロトプラストを含むアガロースを4分割した。分離した4分の1区を、20mLのA培地を含む250mLプラスチック培養容器に入れ、連続薄明かり下24で14日間、80rpmおよび1.25cm行程の回転振盪機でインキュベートし、次いで、分析して各ZFN構築物の活性のレベルを測定した。

20

【0208】

アブラナプロトプラストからのゲノムDNA単離

トランスフェクトプロトプラストを、個々の1.5または2.0mLマイクロチューブに供給した。細胞をバッファ溶液中チューブの底部でペレット化した。細胞を液体窒素中で瞬間凍結し、引き続いて、細胞を-40 および約133 $\times 10^{-3}$ mBar圧力でLabconco Freezone 4.5 (登録商標) (Labconco、Kansas City、MO) において約48時間凍結乾燥することによって、DNA抽出を行った。凍結乾燥細胞を、組織破壊を要さず、プロトプラスト細胞を溶解バッファに直接添加したことを除いて、製造業者の指示にしたがってDNeasy (登録商標) (QIAGEN、Carlsbad、CA) 植物キットを用いたDNA抽出に供した。

30

【0209】

アブラナプロトプラストにおけるゲノムDNA配列切断についてのFAD3AおよびFAD3C ZFNの試験

FAD3AおよびFAD3C遺伝子座中のZFN標的部位の設計を、複数対のZFNが重複標的部位への設計となるようにクラスター化した。ZFN標的部位のクラスター化は、PCRプライマーが、重複ZFN標的部位の全てを包含するように100bpウィンドウ内の全てのFAD3AおよびFAD3C遺伝子ファミリーメンバーから隣接ゲノム配列を増幅するよう設計されることを可能にした。よって、Illumina短読配列技術を用いて、トランスフェクトプロトプラストの標的ZFN部位の完全性を評価することができた。さらに、設計されたPCRプライマーは、配列解読をFAD3AおよびFAD3C遺伝子ファミリーの特異的遺伝子メンバーに帰する特異的ヌクレオチド塩基を含むこと

40

50

を必要とした。そのため、非相同末端結合（NHEJ）活性がプライミング部位を除去して増幅を阻害し、それゆえにNHEJ活性の評価を歪め得る小さな欠失を引き起こすことが知られているので、PCRプライマーの全てが、いずれかのZFN標的切断部位から5～10ヌクレオチド離れて結合することが要求されるだろう。

【0210】

プライマーを、FAD3AおよびFAD3C遺伝子ファミリーについてのZFN標的座（表5）の全てに結合するよう設計し、PCR増幅産物のSangerシーケンシングを通して全ての遺伝子ファミリーメンバーの増幅について経験的に試験した。いくつかの例では、全ての遺伝子ファミリーメンバーを識別するプライマーを開発することができなかったが（表6）、全ての例で、FAD3AまたはFAD3Cの標的遺伝子配列を識別することができた。PCRプライマー設計後に、カスタムDNAバーコード配列をPCRプライマーに組み込み、これを使用して異なるZFN標的座を識別し、トランスフェクションおよびZFNに対する特異的配列解読を同定した（表5および6）。

表5：FAD3遺伝子ファミリーにおける設計PCRプライマーの増幅性能。「X」は遺伝子コピー検出特異性を示し、灰色陰付けの「+」は当の特異的座において、2つのプライマーによって設計された配列解読を識別することができなかったことを示しており、「N/A」は、座をこれらの特異的遺伝子コピーから増幅することができなかったことを示している。

【表5】

ZFN 座	FAD 遺伝子 コピー					
	FAD3A	FAD3C	FAD3A'	FAD3C'	FAD3A' '	FAD3C' '
1 座	X	X	X	X	X	X
2 座	X	X	X	X	N/A	X
3 座	X	X	+	+	X	X
4 座	X	X	X	X	+	+
5 座	X	X	N/A	N/A	N/A	N/A
6 座	X	X	X	X	X	X
7 座	X	X	X	X	X	X

10

20

30

【表 6 - 1】

表 6 : 活性の FAD3 ZFN 評価のために設計したプライマー配列プライマーは、合成によるシーケンシング (sequencing-by-synthesis) 解析のための *Illumina* ライブラリーの構築のための両必須 *Illumina* アダプター配列と共にカスタムバーコードを含む。購入したプライマーは提示する全 3 つの列の和であった

座 ID	配列番号 :	Illumina アダプタープライマー配列バーコード座プライマー	
FAD3_ZFN_Locus1A_F3	50	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT <i>ACGTA</i> <u>CCTTTCTTCACCACATTYCA</u>	10
FAD3_ZFN_Locus1B_F3	50	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT <i>CGTAC</i> <u>CCTTTCTTCACCACATTYCA</u>	
FAD3_ZFN_Locus2C_F1	50	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT <i>CTGAC</i> <u>GATGGTTGTCGCT</u> <u>ATGGACC</u>	
FAD3_ZFN_Locus3D_F1	50	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT <i>TGACT</i> <u>CGAAAGGTTTGAT</u> <u>CCRAGCG</u>	
FAD3_ZFN_Locus3E_F1	50	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT <i>GACT</i> <u>CGAAAGGTTTGAT</u> <u>CCRAGCG</u>	20
FAD3_ZFN_Locus3F_F1	50	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT <i>ACTGAC</i> <u>CGAAAGGTTTGAT</u> <u>CCRAGCG</u>	
FAD3_ZFN_Locus4G_F1	50	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT <i>GCTAG</i> <u>CCGTGTATTTTGA</u> <u>TAGCTGGTTC</u>	
FAD3_ZFN_Locus4H_F1	50	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT <i>CTAG</i> <u>CCGTGTATTTTGA</u> <u>TAGCTGGTTC</u>	
FAD3_ZFN_Locus5J_F1	50	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT <i>TAGCT</i> <u>GGAGCTTCTCAGA</u> <u>CATTCTCT</u>	30
FAD3_ZFN_Locus6K_F1	50	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT <i>TCAGT</i> <u>GTTTATTTGCCCC</u> <u>AAGCGAGAG</u>	
FAD3_ZFN_Locus6L_F1	50	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT <i>CAGT</i> <u>GTTTATTTGCCCC</u> <u>AAGCGAGAG</u>	
FAD3_ZFN_Locus6M_F1	50	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT <i>AGTCA</i> <u>GTTTATTTGCCCC</u> <u>AAGCGAGAG</u>	
FAD3_ZFN_Locus6N_F1	50	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT <i>GTCAG</i> <u>GTTTATTTGCCCC</u> <u>AAGCGAGAG</u>	40
FAD3_ZFN_Locus7P_F3	50	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT <i>GTAC</i> <u>CACTTCACTACTT</u> <u>GCTGGTCSAT</u>	
FAD3_ZFN_Locus7Q_F3	50	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT <i>TACGT</i> <u>ACTTCACTACTT</u> <u>GCTGGTCSAT</u>	

【表 6 - 2】

FAD3_ZFN_Locus1A_ R1	65	CGGTCTCGGCATTCTGCTGAACCGCTCTTCCGATCT <u>ACGTACGTTACAT</u> <u>TGSTRCGYTGG</u>	
FAD3_ZFN_Locus1B_ R1	65	CGGTCTCGGCATTCTGCTGAACCGCTCTTCCGATCT <u>CGTACCGTTACAT</u> <u>TGSTRCGYTGG</u>	
FAD3_ZFN_Locus2C_ R1	65	CGGTCTCGGCATTCTGCTGAACCGCTCTTCCGATCT <u>CTGACCGGATCTTA</u> <u>AACGGYGGTTGT</u>	
FAD3_ZFN_Locus3D_ R1	65	CGGTCTCGGCATTCTGCTGAACCGCTCTTCCGATCT <u>TGACTTAGCTCATG</u> <u>GATCTCAAAGGACT</u>	10
FAD3_ZFN_Locus3E_ R1	65	CGGTCTCGGCATTCTGCTGAACCGCTCTTCCGATCT <u>GACTGTAGCTCATG</u> <u>GATCTCAAAGGACT</u>	
FAD3_ZFN_Locus3F_ R1	65	CGGTCTCGGCATTCTGCTGAACCGCTCTTCCGATCT <u>ACTGTAGCTCATG</u> <u>GATCTCAAAGGACT</u>	
FAD3_ZFN_Locus4G_ R_uni	65	CGGTCTCGGCATTCTGCTGAACCGCTCTTCCGATCT <u>GCTAGTAAATTAC</u> <u>CAGTCGTGGCC</u>	
FAD3_ZFN_Locus4H_ R_uni	65	CGGTCTCGGCATTCTGCTGAACCGCTCTTCCGATCT <u>CTAGCTAAATTAC</u> <u>CAGTCGTGGCC</u>	20
FAD3_ZFN_Locus5J_ R2	65	CGGTCTCGGCATTCTGCTGAACCGCTCTTCCGATCT <u>TAGCTCTTTTTTCT</u> <u>TCGATKCTAAAGATT</u>	
FAD3_ZFN_Locus6K_ R1	65	CGGTCTCGGCATTCTGCTGAACCGCTCTTCCGATCT <u>TCAGTCTGTGACTG</u> <u>GACCAACGAGG</u>	
FAD3_ZFN_Locus6L_ R1	65	CGGTCTCGGCATTCTGCTGAACCGCTCTTCCGATCT <u>CAGTCTGTGACTG</u> <u>GACCAACGAGG</u>	
FAD3_ZFN_Locus6M_ R1	65	CGGTCTCGGCATTCTGCTGAACCGCTCTTCCGATCT <u>AGTCACTGTGACTG</u> <u>GACCAACGAGG</u>	30
FAD3_ZFN_Locus6N_ R1	65	CGGTCTCGGCATTCTGCTGAACCGCTCTTCCGATCT <u>GTCACTGTGACTG</u> <u>GACCAACGAGG</u>	
FAD3_ZFN_Locus7P_ R1	65	CGGTCTCGGCATTCTGCTGAACCGCTCTTCCGATCT <u>GTACGACTTACAAT</u> <u>GTAAGGAACRCRTA</u>	
FAD3_ZFN_Locus7Q_ R1	65	CGGTCTCGGCATTCTGCTGAACCGCTCTTCCGATCT <u>TACGT</u> <u>ACTTACAATGTAAGGAACRCRTA</u>	40

【 0 2 1 1 】

ZFNを用いてトランスフェクトされたアブラナプロトプラストのDNA抽出後に、標的ZFN座のPCR増幅を行って、illuminaの合成によるシーケンシング技術のための正しいフォーマットで必須の座特異的DNA分子を産生した。各アッセイを25ngの出発DNA（セイヨウアブラナゲノムの約12,500個細胞当量）に行うように最適化した。適当なレベルでNHET効率性および特異性を評価するために要求される被覆率を提供するために、1サンプル当たり複数の反応、すなわち個々のプロトプラストから採取したセイヨウアブラナゲノムの200,000コピーに相当する約16回のPCR反応を行った。同じアッセイで試験する全てのサンプルについてPCR増幅マスターミックスを作成し、三連で行う1つの反応を、標的組織に行う最適サイクル数を決定し、PCR

増幅が試薬制限的になっておらず、まだ指数増幅段階にあることを保証するために使用される定量的PCR法を用いてアッセイした。必要なネガティブコントロール反応による実験を、MX3000Pサーモサイクラー（登録商標）（Stratagene、LaJolla、CA）を用いて96ウェルフォーマットで行った。

【0212】

定量的PCRプラットフォームから集められた出力から、蛍光の相対的増加をサイクル毎にプロットし、過剰サイクリングならびに共通の転写産物または分子の増幅を減少させようとして、十分な増幅をもたらすが、反応が試薬制限的になるのを許さない、1アッセイ当たりのサイクル数を決定した。未使用のマスターミックスは、定量的PCR分析が完了し、サイクル数が決定されるまで氷上に残っており、その後、所望の数の反応管（1ZFNアッセイ当たり約16本）に等分し、PCR反応を行った。

10

【0213】

増幅後、単一ZFN座についてのサンプルと一緒にプールし、1ZFN当たり200μLのプールされた産物を、製造業者の指示にしたがって、MinElute PCR精製キット（登録商標）（Qiagen）を用いて洗浄した。Illumina短読技術を用いてサンプルをシーケンシングすることを可能にするために、さらなる対のエンドプライマーを、産生した断片上に増幅によって付着させることが必要とされた。これは、一部は第1ラウンドの増幅で付加された配列と相補的であるが、必要とされる対の末端配列も含むプライマーを用いたPCR増幅によって達成された。テンプレートに共通の断片を過剰に増幅することなく対の末端配列を付加する、行うのに最適なPCRサイクル数を、前記の定量的PCRサイクル分析を通過するサンプルパスを用いて再度決定した。

20

【0214】

PCR増幅後、産生産物を、製造業者の指示にしたがってMinEluteカラム（登録商標）（Qiagen）を用いて洗浄し、2.5%アガロースゲル上で分離した。正しいサイズのバンドとしてSyber（登録商標）Safe（Life Technologies、Carlsbad、CA）を用いて可視化したDNA断片をゲル抽出して、任意の残留PCR産生プライマー-二量体または他の偽性断片を除去し、DNAを、製造業者の指示にしたがってMinEluteゲル抽出キット（登録商標）（Qiagen）を用いてゲル切片から抽出した。ゲル抽出の完了後、1:1.7のDNA対ビーズ比でAMPure磁気ビーズ（登録商標）（Beckman-Coulter、Brea、CA）を用いて、DNAのさらなる浄化を行った。次いで、1/40,000および1/80,000希釈で、かつ反応を三連で行って、Illuminaシーケンシング用定量的PCRライブラリー定量化キット（KAPA）を用いて、DNAの濃度を評価した。定量的PCR結果に基づいて、DNAを2nMの標準濃度に希釈し、DNAシーケンシングのために全てのライブラリーを組み合わせた。cBotクラスター産生キット（登録商標）（Illumina、サンディエゴ、CA）を用いてシーケンシング用のサンプルを調製し、製造業者の指示にしたがって100bpの対形成末端シーケンシング解読によりIllumina GA2x（登録商標）でシーケンシングした。

30

【0215】

標的ジंकフィンガー部位における非相同末端結合の検出のためのデータ解析法

40

シーケンシング反応および塩基呼び出し（base calling）のためにIllumina生物情報学パイプラインを用いて行われる一次データ呼び出しの完了後、各例において完全な解析を行って標的ZFN部位における欠失塩基を同定した。入力配列のリストに計算的にしたがってカスタムPERLスクリプトを、DNA配列からバーコードを抽出およびソートするように設計した。バーコードは、誤帰属配列解読を減少させるために、許容される30超のPhredスコアで基準配列に一致しなければならなかった。配列解読を使用した異なるバーコード群にビンニングした後、品質フィルタを全ての配列に通過させた。品質フィルタは、第2のカスタム開発PERLスクリプトであった。「N」と呼ばれる塩基が4つ以上存在する場合、または中央Phredスコアが20未満である場合、または20未満のPhredスコアの連続塩基が3つ存在する場合、または配列解読の長さが4

50

0より短い場合、配列解読を除外した。残りの配列を併合し、ここでは対の配列解読の両方がNextGene（登録商標）（SoftGenetics、State College、PA）パッケージを用いて入手可能であった。次いで、残りの合併配列解読を、残りの配列識別子の終わりに記録された同定された冗長配列の数のカウントと共に第3のカスタムPERLスクリプトを用いて、特有の配列解読の集合に減少させた。次いで、特有の配列解読を、ギャップFASTAアラインメントファイルを作成するNextGene（登録商標）ソフトウェアを用いてFAD3基準配列にアラインメントした。

【0216】

ギャップFASTAファイルを用いて、ギャップのある塩基位置数の入力基準への変換を第4のカスタムPERLスクリプトを用いて行った。これは、異なる遺伝子ファミリーメンバー（異なる遺伝子ファミリーメンバー間のホモログまたはパラログ配列変動）を識別する塩基をアセンブルされたデータで同定することを可能にした。いったん塩基番号付けの変換を行ったら、各特有の配列解読についてのハプロタイプ報告を作成し、解読を特異的遺伝子ファミリーメンバーに割り当てることが可能となった。いったん解読を遺伝子によってグループ化したら、ZFN標的部点を囲む10bpウィンドウを同定し、評価した。1遺伝子当たりの欠失を含む配列の数を、欠損している塩基の数と共に記録した。

10

【0217】

次いで、10,000配列解読当たりの、標的ZFN部位において1~10個の塩基が欠失した配列の数をを用いて複数折れ線グラフとして、データを図表で示した。この解析をコントロールトランスフェクションと一緒に全てのZFNトランスフェクションについて行った。いくつかの例では、野生のDNA配列中の反復が、標的ZFN部位中のシーケンシング誤差の増加をもたらし、このような誤差は、ZFNを用いてトランスフェクトしたもののまたはコントロールの両者の全てのサンプルで報告された単一塩基欠失の流行の増加として一般的に見ることができる。

20

【0218】

これらの結果から、NHEJのより大きな活性によって決定されるように、FAD3AおよびFAD3C標的部位における最高レベルのZFN活性が観察された。プラスミドpDAB107828（すなわち、ZFN28053および28054）ならびにpDAB107829（すなわち、ZFN28055および28056）にコードされたZFNを、有意なゲノムDNA切断活性および最小の非標的活性の特徴を与えられた操作された導入遺伝子組込みプラットフォーム（ETIP）の植物体標的化のために選択した。

30

【0219】

実施例4：操作された導入遺伝子組込みプラットフォーム（ETIP）アブラナ植物系統のためのDNA構築物

当業者に一般的に公知の方法および技術を用いて、下記のプラスミドベクター構築物を構築した。この段落中に記載される特定の試薬および技術の適用は当業者に容易に公知となり、プラスミドベクター構築物を構築する所望の目的を達成するために、他の試薬および技術と容易に交換され得るだろう。制限エンドヌクレアーゼは、New England Biolabs（NEB；Ipswich、MA）から得た。T4 DNAリガーゼ（Invitrogen、Carlsbad、CA）を用いてライゲーションを完了した。1つのエンターベクターを単一デスティネーションベクターに組み立てるために、Gateway（登録商標）LR Clonase（登録商標）酵素ミックス（Invitrogen）を用いてGateway反応を行った。1つのエンターベクターを単一デスティネーションベクターに組み立てるために、In-Fusion（商標）Advantage Technology（Clontech、Mountain View、CA）を用いてIn-Fusion（商標）反応を行った。供給業者の指示にしたがってNucleoSpin（登録商標）Plasmid Kit（Macherey-Nagel Inc.、Bethlehem、PA）またはPlasmid Midi Kit（登録商標）（Qiagen）を用いてプラスミド調製を行った。アガローストリス酢酸ゲル電気泳動後にQIAquick Gel Extraction Kit（商標）（Q

40

50

iagen)を用いてDNA断片を単離した。全てのアセンブルしたプラスミドのコロニーを最初にミニプレップDNAの制限消化によってスクリーニングした。選択されたクローンのプラスミドDNAを、商業的シーケンシング販売業者(Eurofins MWG Operon、Huntsville、AL)によってシーケンシングした。配列データを、Sequencher(商標)ソフトウェア(Gene Codes Corp.、Ann Arbor、MI)を用いてアセンブルおよび分析した。

【0220】

コントロールベクター

コントロールベクターを使用して蛍光活性化セルソーティング(FACS)細胞系ソーティング法を展開した。標準的なクローニング法を、2つの遺伝子発現カセットを含むコントロールベクター、pDAS000031(図10:配列番号85としてのT鎖インサート)の構築に使用した。第1の遺伝子発現カセットは、カリフラワーモザイクウイルス19sプロモーター(CaMV19Sプロモーター;Shillito, et al., (1985) Bio/Technology 3; 1099-1103):ハイグロマイシン耐性遺伝子(hph(HygR);米国特許第4,727,028号明細書):およびアグロバクテリウム・ツメファシエンスオープンリーディングフレーム1-3'未翻訳領域(AtORF1ターミネーター;Huang et al., (1990) J.Bacteriol.1990 172:1814-1822)を含んでいた。第2の遺伝子発現カセットは、トランス配向(例えば、頭部-頭部配向)のインフレーム融合体として、シロイヌナズナユビキチン10プロモーター(AtUbi10プロモーター;Callis, et al., (1990) J.Biol.Chem., 265: 12486-12493):dsRED(dsRED(D);米国特許第6,852,849号明細書)およびアラビドプシスのイントロン(イントロン番号1;GenBank:AB025639.1):アグロバクテリウム・ツメファシエンスオープンリーディングフレーム2-3'未翻訳領域(AtORF23ターミネーター;米国特許第5,428,147号明細書)を含んでいた。In-Fusion(商標)Advantage Technology(Clontech、Mountain View、CA)を用いてプラスミドベクターをアセンブルした。

10

20

【0221】

実施例5:ETIPアブラナ植物システムの作成

セイヨウアブラナの形質転換

FAD3AおよびFAD3C部位特異的構築物(pDAS000271~pDAS000275)ならびに付随的ZFN(pDAB107828および107829)についてのETIP構築物ならびにコントロールDS-Redコントロール構築物(pDAS000031)は実施例4で前に記載されている。これらのバイナリーベクターを、アグロバクテリウム・ツメファシエンス菌株GV3101:PM90に形質転換した。いくつかの修正をした実施例3に記載のトランスフェクションプロトコルを用いて、セイヨウアブラナプロトプラスト細胞の形質転換を完了する。

30

【0222】

プロトコルの修正は、Sea Plaque(商標)アガロースの代わりにアルギン酸ナトリウムを使用することを含む。ZFN構築物とETIP構築物の両方をセイヨウアブラナプロトプラスト細胞に同時送達するトランスフェクション実験を、5:1のモル比のプラスミドDNAを含むDNA濃度で完了する。他のETIPおよびコントロールプラスミド構築物を、30μgのプラスミドDNAの濃度で形質転換する。

40

【0223】

プロトコルのさらなる修正は、1.5mg/mLのハイグロマイシンを含む培地中での形質転換プロトプラスト細胞からの全植物の繁殖を含む。全植物の繁殖は、A培地を2週間毎に交換し、プロトプラスト由来コロニーの増殖を監視することを要する。プロトプラスト由来コロニーが直径約2~3mmまで増殖した後、このコロニーを、固化MSモルフオ培地(morpho medium)を含む12ウェルCostar(登録商標)プレート(Fisher Scientific、St.Louis、MO)の個々のウェルに移す。カルスが直径8~10mmのサイズまで増殖するまで、プレートを連続薄明かり下24で1

50

～2週間インキュベートする。プロトプラスト細胞が直径1～2cmに達した後、プロトプラスト細胞を、MSモルフォ培地を含む個々の250mL培養容器に移す。容器を16時間光(20μmol m⁻² s⁻¹のOsram L36W/21 Lumilux白色管)および8時間暗所条件下24でインキュベートする。1～2週間以内に、複数のシュートが目に見えるようになる。シュートが長さ3～4cmに達した後、これをMS培地を含む250mL培養容器に移す。250mL培養容器を16時間光(20μmol m⁻² s⁻¹のOsram L36W/21 Lumilux白色管)および8時間暗所条件下24でインキュベートする。シュートが小植物に発達するまで培養容器中に維持し、発達したらこれを温室に移して成熟まで成長させる。

【0224】

実施例6：アブラナにおけるETIPを含むT-DNAの組み込みの分子確認

DNeasy 96 Plant DNA抽出キット(商標)またはDNeasy Plant Miniキット(商標)(Qiagen)を用いて、ゲノムDNAを全ての推定トランスジェニック植物の葉組織から抽出する。アグロバクテリウム・ツメファシエンズの持続性について試験するためのpTiC58順方向(配列番号88 CGAGAACCTTGCAATTCC)およびpTiC58逆方向(配列番号89 TGGCGATTCCTGAGATTCC)からvirCを増幅するよう設計されたプライマー、ゲノムDNAの品質をチェックするためのセイウアブラナからアクチンを増幅するよう設計されたプライマー;アクチン順方向(配列番号90 GACTCATCGTACTCTCCCTTCG)およびアクチン逆方向(配列番号91 GACTCATCGTACTCTCCCTTTCG)を用いたPCRによって各植物からのゲノムDNAを解析する。プライマーを、ETIPによってコードされるhph遺伝子;HPH順方向(配列番号92 TGTGGGTGGAAGAGGATACG)およびHPH逆方向(配列番号93 ATCAGCAGCAGCGATAGC)を増幅するように設計する。アクチンおよびhphに対するプライマーを用いて増幅した場合に、virCプライマーからの産物を与えない植物および正しいサイズのアンプリコンを産生する植物をトランスジェニックと確認する。

【0225】

各トランスジェニック植物からのgDNAを、T-DNA領域の外側のバイナリーベクターを増幅するよう設計された5セットのプライマー[(1F配列番号94 ATGTC CACTGGGTTCGTGCC; 1R配列番号95 GAAGGGA ACTTATCCGGTCC)(2F配列番号96 TGC GCTGCCATTCTCCA AAT; 2R配列番号97 ACCGAGCTCGAATTCAATTCC)(3F配列番号98 CCTGCATTCTGGTTAAACACC; 3R配列番号99 CCATCTGGCTTCTGCCTTGC)(4F配列番号100 ATTC CGATCC CAGGGCAGT; 4R配列番号101 GCCAACGTTG CAGCCTTGC T)(5F配列番号102 GCCCTGGGATGTTGTTAAGT; 5R配列番号103 GTA ACTTAGGACTTGTGCGA)]を用いたPCRによって解析する第2のスクリーニングを完了する。正しいサイズおよび予想されるサイズのPCR産物がプライマーセット3および4を用いて増幅される植物を、骨格組み込みを有するとみなす。

【0226】

骨格組み込みを有さない植物のDNAを、修正したCTAB法(Maguire et al., (1994) Plant Molecular Biology Reporter, 12(2): 106-109)を用いて、葉組織20gから精製する。単離したgDNAをいくつかの制限酵素を用いて消化し、gDNA10μgをアガロースゲル上での電気泳動によって分離し、標準的サザンブロット法プロトコルを用いて膜に移動させる。製造業者の指示にしたがってDIG Easy Hyb System(商標)(Roche, South San Francisco, CA)を用いて、膜をプローブする。以下のプライマー:(IPT-F配列番号104 TCTCTACCTTGATGATCGG; IPT-R配列番号105 AACATCTGCTTAAC TCTGGC; dsRED-F配列番号106 ATGGCTTCACTGAGAACG; dsRED-R配列番号107 TTC CGTATTGGAATTGAGG; PAT

10

20

30

40

50

- F配列番号108 TTGCTTAAGTCTATGGAGGCG; PAT-R配列番号109 TGGGTAACTGGCCTAACTGG; ELP-F配列番号110 ATGATATGTAGACATAGTGGG; ELP-R配列番号111 AGGGTGTAAAGGTACTAGCC; Hph-F配列番号112 TGTGTGGTGGAAAGAGGATACG; Hph-R配列番号113 ATCAGCAGCAGCGATAGC; アクチン-F配列番号114 GTGGAGAAGA ACTACGAGCTACCC; アクチン-R配列番号115 GACTCATCTGTA CTCTCCCTTCG)を用いて、ELPおよび内因性コントロール遺伝子、アクチンに対する各発現カセットに対するプロンプをETIP構築物から増幅する。

【0227】

単一コピーのETIPのみを含む全植物から、ETIP配列を増幅および配列決定する。ABI3730xI(商標)(Applied Biosystems、Life Technologies)を用いたPCR配列の直接シーケンシングによって、各T-DNAインサートの配列を解析する。Phusion Hot Start II Polymerase(商標)(Finnzymes、Thermo Fisher Scientific)を用いて、T-DNAインサートをゲノムDNAから増幅した。長さ約2Kbpの重複配列を増幅するために複数のプライマー対を用いて、T-DNAの増幅反応を完了する。各PCR産物を複数のプライマーを用いてシーケンシングして完全な被覆率を確保する。PCR反応を、エピアルカリホスファターゼおよびエンドヌクラーゼI(Applied Biosystems、Life Technologies)で処理して、シーケンシングPCR反応の前に過剰のプライマーを不活性化する。各々の単一コピーETIP系のT-DNAインサートに隣接する配列を、別々に8つの制限エンドヌクラーゼを用いた精製ゲノムDNAの消化、引き続いて、制限エンドヌクラーゼによって作成されたオーバーハングに特異的な二本鎖アダプターのライゲーションによって同定する。このライゲーション工程後、ETIPの3'または5'末端のいずれかに対するビオチン化プライマー、および各アダプターに対するプライマーを用いてPCRを行う。PCR産物をAmpure Solid Phase Reversible Immobilization(SPRI)ビーズ(商標)(Agencourt Bioscience Corporation、Beckman Coulter Company)上に捕捉し、洗浄する。ネステッドPCRを行い、ABI Sanger SequencingおよびBig Terminator v3.1サイクル(商標)シーケンシングプロトコル(Applied Biosystems、Life Technologies)を用いて全ての産物をシーケンシングする。配列データを、Sequencher(商標)ソフトウェア(Gene Codes Corp.、Ann Arbor、MI)を用いてアSEMBLおよび分析する。

【0228】

ジンクフィンガーヌクラーゼおよびpDAS000271~pDAS000275 ETIP構築物を用いて形質転換したETIPトランスジェニックアブラナの結果

ETIPおよびZFN構築物の形質転換を介して産生したトランスジェニックセイヨウアブラナイベントは、単一コピーの組込み、FAD3A座へのpDAS000273またはpDAS275からの、およびFAD3C座へのpDAS000271、pDAS000272またはpDAS000274からのETIPポリヌクレオチド配列の全長T鎖挿入をもたらす。3~4つのイベントを完全に特徴付け、組込みETIPを含むことを確認する。確認を、イン-アウトPCR増幅法を用いて完了し、サザンプロット法を介してさらに検証する。選択されたT₀イベントをT₁発達段階に成長させる。T₁植物をスクリーニングして組み込まれたT鎖の接合状態を決定する。スクリーニングイベントをホモ接合性、ヘミ接合性または無として分類する。

【0229】

ホモ接合性イベントを使用して、前記の方法を介してプロトプラストを産生する。その後、プロトプラストを、ETIP配列内に組み込まれたジンクフィンガー結合部位および

10

20

30

40

50

ETIPの特異的領域と相同性を共有するドナープラスミドを標的化するように設計されたZFNと同時形質転換する。ZFNがETIP座を切断し、ドナープラスミドを相同組換え修復を介してセイヨウアブラナ細胞のゲノムに組み込む。ドナープラスミドの組み込みの結果として、部分的DS-red導入遺伝子が全長DS-red導入遺伝子に修復される。ここで完全に作動性のDS-red導入遺伝子の発現を使用して、FACS法によってプロトプラスト細胞をソーティングする。推定トランスジェニック植物を、実施例7に記載されるFACS法を用いてソーティングし、単離プロトプラストを成熟植物に再生する。分子確認法を用いて、ドナープラスミドのETIP標的化植物への組み込みを確認する。よって、ETIP座は、ドナーポリヌクレオチド配列の遺伝子標的化組み込みのための部位特異的座として働く。

10

【0230】

実施例7：プロトプラスト細胞のFACSに基づくソーティング

DS-Redコントロール構築物、pDAS000031を用いてトランスフェクトされたセイヨウアブラナプロトプラストを、BD Biosciences Influx-Cellソーター(商標)(San Jose, CA)を用いてFACS媒介細胞ソーティングを介してソートした。実施例3に記載されるように、プロトプラスト細胞を単離およびトランスフェクトした。細胞をpDAS000031を用いてトランスフェクトした後、表7に記載される条件でFACSソーターを用いて細胞をソートした。

【表7】

表7：pDAS000031を用いてトランスフェクトされたプロトプラスト細胞をソーティングするために使用される条件

20

パラメータ	
ドロップ周波数	6.1 KHz
ノズル直径	200 μ m
シース圧力	4 psi
回復培地	W5 培地
培養条件	sea-plaque アガロースおよびアルギン酸ナトリウムを用いたビーズ型培養
ソート基準	クロロフィル自己蛍光、レポーター遺伝子発現(Ds-Red)に基づくソーティング
ソートリカバリー(%)	50~75
ソーティング後の生存率(%)	> 95

30

40

【0231】

DS-red導入遺伝子を発現したプロトプラストをソートおよび単離した。ソーターを用いて、FACS単離プロトプラストをカウントした。FACS単離後1日目に、約 $1 \times 10^5 \sim 1.8 \times 10^5$ 個の細胞を24ウェルマイクロタイタープレートのウェルに入れた。細胞を5~20日間ビーズ培養に移した。FACS単離後2日目に、約 1×10^4 個の細胞を2または4ウェルマイクロタイタープレートのウェルに入れた類似の条件を試

50

験した。試験した種々の条件が、生存している細胞の回収または全単離プロトプラスト細胞の95～98%をもたらした。FACSソーティングプロトプラスト細胞を3～20日間ビーズ培養に移した。FACSソーティングプロトプラスト細胞を、上記プロトコルを用いて、1.5mg/mLのハイグロマイシンを含む培地上で植物に再生した。分子確認プロトコルを介して、推定トランスジェニック植物がpDAS000031からの無傷T鎖インサートを含むことを確認した。

【0232】

FACSソーティング法は、いずれの蛍光導入遺伝子配列をスクリーニングするためにも直接適用可能であり、これを用いてゲノム座中のETIP領域の特異的部位中の相同性媒介修復を介して蛍光導入遺伝子により標的化される一定割合のセイヨウアブラナプロトプラスト細胞を単離する。

10

【0233】

実施例8：NHEJを介したセイヨウアブラナ 3脂肪酸デサチュラーゼ(Fad3)への標的化組込みおよびその破壊

Fad3CおよびFad3Aに特異的なジンクフィンガー結合ドメインの選択

同祖Fad3遺伝子についての転写領域を同定し、特徴付け、ジンクフィンガーヌクレアーゼを、ドナー配列のNHEJ媒介標的化のためにこれらの部位に結合し、これを切断するように設計した。Fad3配列のホモログからのDNA配列に向けられたジンクフィンガータンパク質(ZFP)を、上記のように設計および試験した。オンターゲット活性を示すZFNから、高効率でFad3標的を切断した2つのジンクフィンガータンパク質を選択した：ZFP28051-2A-28052は配列番号255 5'-gcccc aaggaaac CCTTTCTGGGCCATcttcgTACTCGGCCACGac tgggt aattta at-3'を認識し、これはFad3Cゲノム座に特異的に結合し、これを切断することが示された。同様に、ジンクフィンガータンパク質28053-2A-28054は、配列番号256 5'-agcga g a g a a AGCTTA tTG CA ACTTC a a c t a c T T G C T G G T C G A T C G T G T T g g c c a c t c - 3'を認識し、これはFad3AおよびFad3Cゲノム座に特異的に結合し、これを切断することが示された。表8では、代表的な標的部位が示されており；ZFP認識ヘリックスが接触する標的部位のヌクレオチドが大文字で示されており、非接触ヌクレオチドが小文字で示されている。Fad3Cとは異なるFad3のコピーのヌクレオチドを下線によって識別する。ZFP認識ヘリックスが接触する標的部位のヌクレオチドを表8に示す。

20

30

【表 8】

表 8 : F a d 3 C (2 8 0 5 1 - 2 A - 2 8 0 5 2) または F a d 3 A および F a d 3 C (2 8 0 5 3 - 2 A - 2 8 0 5 4) に特異的なジンクフィンガータンパク質結合部位

28051-2A -28052	配列番号: 257	<i>gccaaaggaacCCTTTTCTGGGCCATct</i> <i>cgTACTCGGCCACGactggttaatttaat</i>
Fad3C	259	GCCCAAGGAACCCTTTTCTGGGCCATCTTCGTA <u>CTCGGCCACGACTGGTAATTTAAT</u>
Fad3A	260	GCCCAAGGAACCCT <u>GTTCTGGGCATCTTCGTA</u> CTCGGCCACGACTGGTAATTTAAT
Fad3C'	261	GCCCAAGGAACCCTTTTCTGGGCCATCTTCGT <u>CCTCGGCCACGACTGGTAAAGTTTC</u>
Fad3A'	261	GCCCAAGGAACCCTTTTCTGGGCCATCTTCGT <u>CCTCGGCCACGACTGGTAAAGTTTC</u>
Fad3A''	263	GCCCAAGGAACCCTTTTCTGGGCCATCTTCGT <u>TCTGGCCACGACTGGTAAATTTAA</u>
Fad3C''	263	GCCCAAGGAACCCTTTTCTGGGCCATCTTCGT <u>TCTGGCCACGACTGGTAAATTTAA</u>

10

28053-2A -28054	配列番号: 265	<i>agcgagagaaaAGCTTAtTGCAACTTCaa</i> <i>acTTGCTGGTCGATCGTGTggccactc</i>
Fad3C	256	AGCGAGAGAAAGCTTATTGCAACTTCAACTACTTGCTGGT <u>CGATCGTGTGGCCACTC</u>
Fad3A	268	AGCGAGAGAAAGCTTATTGCAACTTCAACTACTTGCTGGT <u>CGATCATGTTGGCCACTC</u>
Fad3C'	269	AGCGAGAGAAAGCTTATTGCAACTTCAACTACTTGCTGGT <u>CCATAATGTTGGCCATTC</u>
Fad3A'	270	AGCGAGAGAAAGCTTATTGCAACTTCAACTACTTGCTGGT <u>CCATAATGTTGGCAATTC</u>
Fad3A''	271	AGCGAGAGAAAGCTTATTGCAACTTCAACA <u>ACTTGCTGGTCCATAATGTTGGCCACTC</u>
Fad3C''	272	AGCGAGAGAAAGCTTATTGCAACTTCAACTACTTGCTGGT <u>CCATAATGTTGGCCACTC</u>

20

【 0 2 3 4 】

F A D 3 C および F A D 3 A に特異的なジンクフィンガーヌクレアーゼをコードする発現ベクターの設計および構築

F a d 3 ジンクフィンガー設計を、C C H C 構造の少なくとも1つのフィンガーを有するタンパク質をコードするジンクフィンガー発現ベクターに組み込んだ(米国特許出願公開第2008/0182332号明細書)。特に、各タンパク質の最後のフィンガーは、ヘリックス認識のためのC C H C 骨格を有していた。非標準ジンクフィンガーコード配列を、4つのアミノ酸Z C リンカーおよびs o p 2 核移行シグナルを介してI I S 型制限酵素F o k I のヌクレアーゼドメイン(Wah et al., (1998) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95:10564-10569のアミノ酸384~579)に融合した。ゾセア・アシグナウイルスからの自己加水分解2 A コードヌクレオチド配列(Szymczak et al., 2004)を、2つのZ F N 融合タンパク質の間に付加した。Z F N の発現を、強い構成型プロモーターおよびキャッサバ葉脈モザイクウイルスに由来し(Verdaguer et al, Plant Molecular Biology 1996, 31(6); 1129-1139)、アグロバクテリウム・ツメファシエンズp T i 1 5 9 5 5 のオープンリーディングフレーム2 3 (O R F 2 3) (Barker et al., Plant Molecular Biology 1983, 2(6); 335-50)からの3' U T R (転写ターミネーターおよびポリアデニル化部位を含む)に隣接する5' 未翻訳領域(U T R)によって駆動させた。

30

40

【 0 2 3 5 】

I N - F U S I O N (商標) A d v a n t a g e T e c h n o l o g y (C l o n t e c h, M o u n t a i n V i e w, C A) を用いてベクターをアSEMBLした。制限エンドヌクレアーゼをN e w E n g l a n d B i o L a b s (N E B; I p s w i c h, M A) から得て、T 4 D N A L i g a s e (I n v i t r o g e n) をD N A ライゲーションに使用した。供給業者の指示にしたがってN U C L E O S P I N (登録商標) P l a s m i d K i t (M a c h e r e y - N a g e l I n c., B e t h l e h

50

em、PA)またはPlasmid Midi Kit(登録商標)(Qiagen)を用いてプラスミド調製を行った。アガローストリス酢酸ゲル電気泳動後にQIAquick Gel Extraction Kit(商標)(Qiagen)を用いてDNA断片を単離した。アセンブルしたプラスミドのコロニーを最初にミニプレップDNAの制限消化によってスクリーニングした。選択されたクローンのプラスミドDNAを、商業的シーケンシング販売業者(Eurofins MWG Operon、Huntsville、AL)によってシーケンシングした。配列データを、SEQUENCHER(商標)ソフトウェア(Gene Codes、Ann Arbor、MI)を用いてアセンブルおよび分析した。得られたプラスミド構築物:pDAB107827(ZFN28051-2A-28052、図13、配列番号273)およびpDAB107828(ZFN28053-2A-28054、図14、配列番号274)を、制限酵素消化およびDNAシーケンシングを介して確認した。

10

【0236】

NHEJ指向DNA修復のための「ドナー」ベクターの設計および構築

遺伝子スプライシング(発現カセットを単一ZFN誘導二本鎖の切れ目に組み込んだ)および遺伝子編集(遺伝子の一部を、2つのZFN誘導二本鎖の切れ目の使用によって除去し、発現カセットを挿入してギャップを修復した)の、DNAのFad3への組み込みの2つの戦略を試みた。

【0237】

遺伝子スプライシングまたは遺伝子編集の各組み込み法のために、2つのベクターを構築した。第1のものはターボGFP(tGFP)遺伝子発現カセットをコードし、第2のものは抗生物質ハイグロマイシンに対する耐性を与える遺伝子発現カセットをコードした。tGFP発現カセットは、シロイヌナズナポリユビキチン10(UBQ10)遺伝子のプロモーター、5'未翻訳領域およびイントロン(Norris et al, Plant Molecular Biology 1993, 21(5), 895-906)、続いてtGFPコード配列(Evrogen, Moscow, Russia)を含んでいた。tGFPコード配列は、双子葉植物における発現のためにコドン最適化されており、アグロバクテリウム・ツメファシエンスpTi15955のオープンリーディングフレーム23(ORF23)の転写ターミネーターおよびポリアデニル化部位を含む3'未翻訳領域(UTR)であった(Barker et al, Plant Molecular Biology 1983, 2(6), 335-50)。ハイグロマイシン耐性遺伝子発現カセットは、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)からの5'UTR(Cook and Penon Plant Molecular Biology 1990 14(3), 391-405)、続いてハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ(hph)遺伝子(Kaster et al Nucleic Acids Research 1983 11(19), 6895-6911)を含む19Sプロモーターを含んでいた。hph遺伝子は、双子葉植物における発現のためにコドン最適化されており、アグロバクテリウム・ツメファシエンスpTi15955のオープンリーディングフレーム1(ORF1)の転写ターミネーターおよびポリアデニル化部位を含む3'UTRが隣接していた(Barker et al, Plant Molecular Biology 1983, 2(6), 335-50)。両カセットは、商業的遺伝子合成販売業者(Gene Art、Life Technologies、Regensberg、ドイツ)によって合成された。

20

30

【0238】

ベクターpDAB10782にコードされているZFNによって標的化されるZFN認識配列の2つのタンデムコピーをクローニングすることによって、遺伝子スプライシング実験用のベクターを構築した。ベクターpDAB107827およびpDAB107828にコードされているZFNによって標的化されるZFN認識配列の各々の1コピーをクローニングすることによって、遺伝子編集実験用のベクターを構築した。両方の場合で、2つのZFN認識配列を、BamHIおよびNotI制限エンドヌクレアーゼのための認識配列によって分離した。tGFPおよびHPHカセットを各ベクターのBamHIおよびNotI部位にクローニングして、4つの「ドナー」ベクター:pDAS000340(ハイグロマイシン耐性遺伝子スプライシングドナー:配列番号275、図15)、pDAS000341(tGFPレポーター遺伝子スプライシングドナー:配列番号276、

40

50

図16)、pDAS00342(ハイグロマイシン耐性遺伝子編集ドナー:配列番号277、図17)およびpDAS000343(tGFプレポーター遺伝子編集ドナー:配列番号278、図18)を得た。

【0239】

アセンブルしたプラスミドのコロニーを、大腸菌の一晚培養物から精製したDNAの制限エンドヌクレアーゼ消化によって最初にスクリーニングした。制限エンドヌクレアーゼは、New England BioLabs(商標)(NEB; Ipswich, MA)およびPromega(商標)(Promega Corporation, WI)から得た。供給業者の指示にしたがってQIAprep Spin Miniprep Kit(商標)(Qiagen, Hilden, ドイツ)またはPure Yield Plasmid Maxiprep System(商標)(Promega Corporation, WI)を用いて、プラスミド調製を行った。制限断片を得られた断片のアガロースゲル電気泳動によって確認した後、選択したクローンのプラスミドDNAを、ABI Sanger SequencingおよびBig Dye Terminator v3.1(商標)サイクルシーケンシングプロトコル(Applied Biosystems, Life Technologies)を用いてシーケンシングした。配列データを、Sequencher(商標)ソフトウェア(Gene Codes, Ann Arbor, MI)を用いてアセンブルおよび分析した。

10

【0240】

プロトプラスト単離用植物材料の維持

20

葉肉由来プロトプラストを、セイヨウアブラナ(DH10275)の3週齢滅菌シュート培養物から単離した。対応する種子を、本明細書に記載される方法にしたがって発芽させた。種子を、70%エタノールを用いて1分間表面消毒し、穏やかに振盪し、引き続いて滅菌再蒸留水で3~4回すすいだ。その後、20%漂白剤および10 μ lのTween 20を用いて種子を消毒した。種子を、約100RPMで15分間卓上型振盪機で漂白剤によりさらに処理し、引き続いて滅菌再蒸留水で3~4回すすぎ、種子を滅菌濾紙に慎重に移して過剰な水分を除去し、種子発芽培地(1/2濃度のMS/B5ビタミン+1%スクロース+0.8%寒天;pH5.8)に蒔いた。

【0241】

30

約50~60mLの培地を各Petri(商標)皿(15X100mm)に注ぎ入れ、プレートを、支持体を用いてわずかな角度をつけて置いた。約50個の種子を各プレートに入れた。プレートを16時間/日の光(20 μ molm⁻²s⁻¹)下22 $^{\circ}$ Cで6日間直立でインキュベートした。0.5cmサイズの胚軸セグメントを、6日齢実生から切り裂き、シュート誘導培地(MS/B5ビタミン+3%スクロース+500mg/L MES+BAP(13 μ m)+ゼアチン(5 μ m)+硝酸銀(5mg/L)+0.8%寒天(pH5.8))上で培養した。培地を100x20mm滅菌PETRI(商標)皿に注ぎ入れ、1プレート当たり約20個の外植片を培地上に配置した。3~4週間後に現れたシュート成長点をシュート伸長培地(MS/B5ビタミン+2%スクロース+500mg/L MES+BAP(2 μ m)+GA-3(0.1 μ m)+0.8%寒天(pH5.8))、および250mL培養容器に注ぎ込んだ)に移し、培養物を間に1ラウンドの継代培養を含む4週間、この培地に維持した。次いで、2~3cm高さのシュートを、根の発育のために根発生培地(1/2濃度のMS/B5ビタミン+1%スクロース+500mg/L MES+IBA(2.5 μ m)+0.6%寒天(pH5.8))、および700mL培養容器に注ぎ込んだ)に移した。根づいたシュートを、使用前に2~3ラウンドの間、茎挿しとして3~4週間の間隔で、新鮮な根発生培地中で継代培養した。培養物を16時間/日の光(30 μ molm⁻²s⁻¹)下22 $^{\circ}$ Cで終始維持した。

40

【0242】

葉肉プロトプラストの単離および精製

インビトロで成長させたDH12075セイヨウアブラナ植物を、葉肉プロトプラストを単離するための外植片源として使用した。プロトプラストを単離するために、3~4週

50

齢の小植物からの第3～第4の上完全展開葉を、鋭利なメスを用いてプロトプラスト単離用の小片(0.5～1mm)に切断した。葉材料250～500mgを消化バッファ(K4培地に溶解した1.2%(w/v)セルラーゼ「Onozuka(商標)」R10および0.2%(w/v)Macerzyme(登録商標)R10(Spangenberg et al., 1998))25mLで処理することによって、酵素消化を行った。葉材料および消化バッファを含むPETRI(商標)皿をParafilm(商標)で密閉し、暗所中室温で12～15時間インキュベートした。一晚のインキュベーション後、消化物を、BD(登録商標)セルストレーナー(メッシュサイズ70 μ m)を通して濾過した。14mL丸底チューブに回収したプロトプラスト懸濁液(5～6mL)に、W5洗浄バッファ(154mM NaCl、125mM CaCl₂、5mM KClおよび5mMグルコース; pH5.8 Menzel et al.(1981))1mMを重ねた。

10

【0243】

プロトプラスト懸濁液を400RPMで10分間さらに遠心分離した。遠心分離後、界面相に浮遊したプロトプラストを引き込み、W5バッファ10mLを用いて400RPMで10分間の遠心分離によって洗浄した。最後の洗浄後、単離プロトプラストを、W5バッファ1mL当たり1X106個のプロトプラストの密度で再懸濁し、トランスフェクション前に1時間インキュベートした。

【0244】

プロトプラスト収率および生存率の評価

Sambrook and Russell, (2006)の方法にしたがって、血球計算器を用いてプロトプラスト収率を評価した。プロトコルにわずかな小さい修正をしてHuang et al.(1996)によって記載されているように、0.5Mのマニトールに溶解した400mg/Lのエバンスブルー染色剤を用いて細胞生存率を試験した。

20

【0245】

PEG4000媒介DNA送達

セイヨウアブラナプロトプラストに送達する前に、各ドナーおよびZFN構築物のプラスミドDNAを、供給業者の指示にしたがってPure Yield Plasmid Maxiprep System(登録商標)(Promega Corporation、Madison、WI)を用いて大腸菌の培養物から調製した。ドナーおよびZFNプラスミドDNAのアリコートをもつ3つのモル比で調製した：1：1(各プラスミド30 μ g)、5：1(プラスミドDNA計30 μ gに対するドナープラスミド：ZFNプラスミド)および10：1(プラスミドDNA計30 μ gに対するドナープラスミド：ZFNプラスミド)。さらに、ドナーのみおよびZFNのみのアリコート(30 μ g)をコントロールとして調製した。PEG4000媒介形質転換を介してセイヨウアブラナプロトプラストに送達されたDNAの量を表9に要約する。

30

【表 9】

表 9 : プロトプラストに送達された ZFN およびドナー DNA の量

	プラスミド DNA のモル比	100 万個のプロトプラストに送達された DNA の総量 (μg)
スプライシング	ドナープラスミドのみ	30
	ZFN プラスミドのみ (pDAB107827)	30
	1:1 ドナー:ZFN	60
	5:1 ドナー:ZFN	30
	10:1 ドナー:ZFN	30
編集	ドナープラスミドのみ	30
	1:1:ZFN プラスミド (pDAB107827 および pDAB107828)	30
	1:1:1 ドナー:ZFN:ZFN	90
	5:1:1 ドナー:ZFN:ZFN	30
	10:1:1 ドナー:ZFN:ZFN	30

10

20

【 0 2 4 6 】

プラスミド DNA の各アリコート、形質転換バッファ (15 mM MgCl₂、0.1% (w/v) モルホリノエタンスルホン酸 (MES) および 0.5 M マンニトール; pH 5.8) 100 μL 、引き続いて PEG 溶液 (0.4 M マンニトールおよび 0.1 M Ca(NO₃)₂ 中 40% (w/v) PEG 4000 (pH 6~7) Spangenberg and Potrykus (1995)) 150 μL に懸濁した 100 万個のプロトプラスト (生存率 95) に適用した。室温で 10~15 分のインキュベーション後、W5 バッファ 5 mL を滴加し、プロトプラストを穏やかに混合した。W5 バッファさらに 5 mL を緩流としてプロトプラスト懸濁液に添加した。プロトプラストを穏やかに混合し、400 RPM で 10 分間遠心分離し、W5 上清を慎重に除去してペレットの形態のプロトプラストを残した。次いで、トランスフェクトプロトプラストを、ビーズ型培養物に包埋するまで室温で W5 バッファ 1 mL 中でインキュベートした。トランスフェクトプロトプラストは、以下に記載されるアルギン酸ナトリウム法にしたがって包埋した。

30

【 0 2 4 7 】

生存可能なマイクロカルス (microcalli) を回収するための葉肉由来プロトプラストの培養

培地中に包埋する前に、トランスフェクトプロトプラストを 400 RPM で 10 分間遠心分離し、W5 バッファを慎重に除去した。次いで、プロトプラストを 0.5 M マンニトール 1.0 mL に再懸濁し、氷上でインキュベートした。プロトプラスト溶液に、等体積の 1.0% アルギン酸ナトリウムを添加し、穏やかに混合した。プロトプラスト懸濁液を、包埋するまで氷中でインキュベートした。ビーズ形成溶液 (0.4 M マンニトール + 50 mM CaCl₂ (pH 5.8)) を、血清ピペットを用いて滅菌 6 ウェルプレートに移した (1 ウェル当たり 3~4 mL)。正確に 1.0 mL のプロトプラスト懸濁液を、1 mL ピペットを用いてビーズ形成溶液に滴加し、各トランスフェクトサンプル (約 5 x 10⁵ 個のプロトプラスト) を 1 ウェル当たり包埋させた。プロトプラスト懸濁液を室温で 1~2 時間インキュベートしてアルギン酸ナトリウムビーズを形成した。インキュベーション期間後、ビーズ形成溶液を慎重に取り出し、1.5 mg/L のハイグロマイシンを補充した K3 + H : A の 1 : 2 混合物培地 (Spangenberg et al 1998) 4~5 mL と交換した。プロトプラストを振盪機 (50 RPM) において暗所中 22 °C で 3~4 週間培養した。3~4 週間後、脱重合バッファ (0.3 M マンニトール + 20 mM クエン酸ナトリ

40

50

ウム (pH 5.8) で処理することによって、耐性マイクロカルス (0.5 ~ 1.0 mm) を放出した。液体培地を除去した後、脱重合バッファ 3 ~ 4 mL を、ビーズ型培養物を含む各ウェルに添加し、室温で 2 時間インキュベートした。滅菌鉗子を用いて、ビーズを穏やかに混合してマイクロカルスの効率的な放出を強化した。次に、滅菌 1.0 mL ピペットを使用して、ゲル化剤を穏やかに混合し、これを脱重合バッファに放出させ、その後除去した。マイクロカルス、液体 A 培地 5 mL を用いて 2 回洗浄し、マイクロカルスを十分な量の液体 A (液体 A 50 mL を設定された細胞体積 (SCV: これは全ての放出されたマイクロカルスを滅菌 50 または 15 mL ファルコンチューブに移し、5 分間沈降させた後に測定した) 1 mL に使用した) に再懸濁した。マイクロカルスを均一に混合した後、液体 A 培地中に懸濁したマイクロカルス 0.5 mL を B1 培地 (MS/MS ビタミン + 3.5 % スクロース + 500 mg/L MES + BAP (5 μm) + NAA (5 μm) + 2, 4-D (5 μm) + 1.5 mg/L ハイグロマイシン + 0.7 % アガロース I 型 (pH 6.0) および 100 x 20 mm 滅菌 PETRI (商標) 皿に注ぎ込んだ) に移し、さらなる液体 A 培地 1 ~ 2 mL を用いて、マイクロカルスを B1 培地に均一に分配し、過剰の液体 A 培地を各プレートから慎重に除去した。微小孔テープを用いてプレートを密閉し、胚成熟を強化した。培養物を 16 時間/日の光 (30 μmol m⁻² s⁻¹) 下 22 で維持した。

10

【0248】

葉肉由来プロトプラストからのシュートの増殖および再生

ハイグロマイシン耐性コロニーを、2 ~ 3 週間のインキュベーション後に B1 培地 (SA 法と SP 法の両方に由来するマイクロカルス) から選抜し、B2 培地 (MS/MS ビタミン + 3.0 % スクロース + 500 mg/L MES + 500 mg/L PVP + 5 mg/L 硝酸銀 + 5 mg/L 2iP + NAA (0.5 μm) + GA-3 (0.3 μm) + 1.5 mg/L ハイグロマイシン + 0.7 % アガロース I 型 (pH 5.8) および 100 x 20 mm 滅菌 PETRI (商標) 皿に注ぎ込んだ) に移した。1 プレート当たり約 25 ~ 30 個のカルスを配置し、Parafilm (商標) を用いてプレートを密閉し、16 時間/日の光 (30 μmol m⁻² s⁻¹) 下 22 でインキュベートした。その後、5 ~ 6 ラウンドの B2 培地中 2 週間間隔での継代培養後に、ハイグロマイシン耐性コロニーを回収した。第 3 ラウンドの継代培養後に、1 プレート当たりのカルスの数を 12 ~ 15 に減少させた。10 ~ 12 週間後に現れるシュート原基を残りのカルスと一緒に慎重に回収し、シュート伸長培地 (MS/B5 ビタミン + 2 % スクロース + 500 mg/L MES + BAP (2 μm) + GA-3 (0.1 μm) + 300 mg/L チメンチン + 1.5 mg/L ハイグロマイシン + 0.8 % 寒天 (pH 5.8) および 250 mL 培養容器に注ぎ込んだ) に移した。2 ~ 3 ラウンドのハイグロマイシン選択後に生存しているシュートを、発根培地 (1/2 濃度の MS/B5 ビタミン + 1 % スクロース + 500 mg/L MES + IBA (2.5 μm) + 1.5 mg/L ハイグロマイシン + 0.6 % 寒天 (pH 5.8) および 700 mL 培養容器に注ぎ込んだ) に移した。

20

30

【0249】

葉肉プロトプラストからのゲノム DNA の単離

トランスフェクトプロトプラストを 3 cm PETRI (商標) 皿から 2 mL マイクロチューブに移した。70 g での遠心分離によって細胞をペレット化し、上清を除去した。トランスフェクトプロトプラストの回収を最大化するために、PETRI (商標) 皿を洗浄バッファ 1 mL で 3 回すすいだ。各すすぎは、PETRI (商標) 皿中の洗浄バッファを 1 分間回転し、引き続いて、液体を同じ 2 mL のマイクロチューブに移すことによって行った。各すすぎの最後に、70 g での遠心分離によって細胞をペレット化し、上清を除去した。ペレット化プロトプラストを、-40 °C および 133 x 10⁻³ mBar 圧力で Labconco Freezone 4.5 (登録商標) (Labconco, Kansas City, MO) 中 24 時間凍結乾燥する前に、液体窒素中で瞬間凍結した。凍結乾燥細胞を、組織破壊を要さず、プロトプラスト細胞を溶解バッファに直接添加したことを除いて、製造業者の指示にしたがって DNeasy (登録商標) Plant DNA

40

50

Extraction Miniキット (Qiagen) を用いた DNA 抽出に供した。

【0250】

カルス組織からのゲノム DNA の単離

個々のカルスを、-40 および 133 x 10⁻³ mBar 圧力で Labconco Freezone 4.5 (登録商標) (Labconco, Kansas City, MO) 中 24 時間凍結乾燥する前に、液体窒素中で瞬間凍結した。凍結乾燥カルスを、製造業者の指示にしたがって DNeasy (登録商標) Plant DNA Extraction Maxiキット (Qiagen, Hilden, ドイツ) を用いた DNA 抽出に供した。

【0251】

葉組織からのゲノム DNA の単離

再生植物からの若葉組織 30 mg を、-40 および 133 x 10⁻³ mBar 圧力で Labconco Freezone 4.5 (登録商標) (Labconco, Kansas City, MO) 中 24 時間凍結乾燥する前に、液体窒素中で瞬間凍結した。凍結乾燥カルスを、製造業者の指示にしたがって DNeasy (登録商標) Plant DNA Extraction Maxiキット (Qiagen, Hilden, ドイツ) を用いた DNA 抽出に供した。

【0252】

FAD3C の NHEJ 媒介スプライシングおよび編集のためのゲノム DNA の PCR アッセイ

セイヨウアブラナの Fad3C 遺伝子へのドナー DNA の組み込みの検出を一連の PCR で行い、ここでは少なくとも 1 つのプライマーが Fad3C 座と特異的であり (表 10)、第 2 のプライマーが gfp カセットのプロモーターまたはターミネーターのいずれかと特異的であった (表 10 および 図 19 (A))。最後の塩基対が、Fad3C ゲノム配列を Fad3 遺伝子の他のコピーと区別し、アスタリスク [*] によって示されるこの塩基対の前にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む SNP に整列したオリゴヌクレオチドを設計することによって、特異性を得た。この設計は、ブルーフリーティング活性を有するポリメラーゼと組み合わせて使用すると、各 Fad3C または Fad3A 対立遺伝子の特異的増幅を指示し、注記される他の Fad3 コピーを除外した。各プライマーセットを、野生型セイヨウアブラナから得られた PCR 増幅産物の Sanger シーケンシングを通した正しい遺伝子コピーの増幅について経験的に試験した。

10

20

30

【表 10 - 1】

表 10 : DNA の ZFN 誘導二本鎖切断への組込みを検出するために使用されるオリゴヌクレオチド配列

	プライマー名	プライマー配列	配列番号 :	特異性
1	FAD3CNHEJ-L 4-F2	gattcctaagcattgttgggt* c	279	Fad3C のみ
2	FAD3CNHEJ-L 4-R2	gaaaatctcatatcgaacgtgc g*t	280	Fad3C のみ
3	FAD3CNHEJ-L 6-F1	cgcttaccctctctatctggta *a	281	Fad3C' も Fad3C' ' も増幅しない
4	FAD3CNHEJ-L 6-R2	ccttgccctctgtaccaaggca* g	282	Fad3C のみ
5	19SPNHEJ-R2	gtgtgtgggaatcttatcttcg g	283	n/a
6	AtORF1NHEJ-F1	caagtcaggtattatagtccaa gca	284	n/a
7	AtUbinHEJ-R1	caagaatatcctgatccgttga c	285	n/a

10

20

【表 10 - 2】

8	AtORF23tNHEJ-F1	tggcagttgaaataactcaaacc	286	n/a
9	FAD3aCNHEJ-L4-F1	gtcctttgagatccatgagcta *t	287	Fad3Aのみ
10	FAD3aCNHEJ-L4-F2	gattcctaagcattgttggt* a	288	Fad3Aのみ
11	FAD3aNHEJ-L4-R1	tgcgttcaagaaatcaaagac* a	289	Fad3Aのみ
12	FAD3aNHEJ-L4-R2	gaaaatctcatatcgaacgtgc g*g	290	Fad3Aのみ
13	FAD3aNHEJ-L6-F1	tctggtaaatacctaattcct*c	291	Fad3Aのみ
14	FAD3aNHEJ-L6-R2	ccttgctctgtaccaaggca* a	292	Fad3Aのみ
15	FAD3aNHEJ-L6-R1	cttgctctgtaccaaggcaac tt*c	293	Fad3Cを除く

10

20

*は注記されるFad3の他のコピーを除外した、Fad3CまたはFad3Aの特異的増幅（プルーフリーディングポリメラーゼによる）を指示するホスホロチオエートヌクレオチド間結合を示す。各プライマーセットを、野生型セイヨウアブラナから得られたPCR増幅産物のSangerシーケンシングによる正しい遺伝子コピーの増幅について経験的に試験した。

【0253】

プロトプラストにおける非相同末端結合によるFAD3Cへの遺伝子付加の検出
機能的tGFPレポーターカセットをコードするドナーDNA（pDAS000341またはpDAS000343）、ZFN DNA（pDAB107827またはpDAB107828）またはドナーとZFN DNAの混合物が24時間前に送達されたプロトプラストプール（1プール当たり100万個のプロトプラスト）からゲノムDNAを抽出した。形質転換のために送達されたDNAの量は上に記載される。PCR産物をプラスミドベクターにクローニングした。プラスミドベクターにクローニングすることによって、ゲノム編集が各細胞で独立に起こり、種々の異なる挿入イベントをもたらし、各ゲノム編集を曖昧さなしにシーケンシングすることができる。いくつかのクローンをABI3730XL（登録商標）自動化キャピラリー電気泳動プラットフォームでシーケンシングした。Sequencher SOFTWARE v5.0（商標）（GeneCodes、Ann Arbor、MI）を用いて遺伝子配列の解析を行った。

30

40

【0254】

編集またはスプライシングによるFad3C座への遺伝子付加の証拠は、表10に記載されるプライマーを用いた、プロトプラストから抽出したゲノムDNAからの5'と3'の両方のFad3Cカセットジャンクションの増幅によって提供された。プライマー「FAD3CNHEJ-L4-F2」および「AtUb1NHEJ-R1」を用いたPCR増幅の産物を完成させてtGFPカセットおよびFad3Cの5'ジャンクションを増幅した。プライマー「FAD3CNHEJ-L4-R2」および「AtORFt23NHEJ-F1」を用いたPCR増幅を完成させてtGFPカセットおよびFad3Cの3'ジャンクションを増幅した。プライマー「FAD3CNHEJ-L4-F2」および「FAD

50

3CNHEJ-L4-R2」を用いたPCR増幅を完成させてZFN28051-2A-28052によって誘導される二本鎖切断を増幅した。ZFNプラスミドまたはドナープラスミドのみ送達されたプロトプラストからは増幅が観察されなかった。全てのジャンクション配列は、NHEJ媒介修復経路を介したFad3C座におけるtGFPカセットの挿入を示した。ゲノムおよびカセットのいずれかまたは両方からの種々の長さの欠失、ならびにゲノムとカセットとの間に挿入されているベクター骨格に由来する配列（ドナーまたはZFNからのいずれか）の付加が観察された（図20Aおよび図20B）。

【0255】

プロトプラストから再生したカルス組織中の非相同末端結合によるFAD3Cへの遺伝子付加の検出

Fad3C座のスプライシングおよび編集のさらなる証拠を、hphカセットをコードするドナーDNA（pDAS000340またはpDAS000342）、ZFN DNAのみ（pDAB107827またはpDAB107828）、またはドナーとZFN DNAが送達された（送達されたDNAの量は表9に示されている）選択した（上記のように1.5mg/Lハイグロマイシン）プロトプラストから再生されたカルス組織から得た。1:1:1の編集を除いて（これについてはプロトプラストトランスフェクション4週間後に生存したカルスがなかった）、各比について約80個のカルスからDNAを抽出した。

【0256】

hphカセットのセイヨウアブラナゲノムへの組込み（fwat Fad3Cまたはランダム）を、hph遺伝子に特異的なプライマー（配列番号294；F-5'CTTACATGCTTAGGATCGGACTTG3'、配列番号295；R-5'AGTTCCAGCACCAAGATCTAACG3'）およびプローブ（配列番号296；5'CCCTGAGCCCAAGCAGCATCATCG3'）を用いたTaqman（商標）qPCRによって確認した。これらのプライマー-プローブ対を、Aゲノム上に単一コピーとして存在する（Weng et al., 2004, Plant Molecular Biology Reporter）、セイヨウアブラナ高移動群タンパク質I/I（HMG I/Y）に特異的なプライマー（配列番号297；F-5'CGGAGAGGGCGTGGAAAGG3'、配列番号298；R-5'TTCGATTTGCTACAGCGTCAAC3'）およびプローブ（配列番号299；5'AGGCACCAATCGCAGGCTTCGCT3'）との二重反応に使用した。CFX96またはCF384リアルタイムPCR検出システム（商標）（BioRad、Hercules、CA）によりC1000サーマルサイクラーで増幅を行った。CFX Manager（商標）（BioRad）ソフトウェアパッケージを用いて結果を解析した。ゲノムに挿入されたhphカセットのコピー数の推定を提供する2-Ct法（Livak and Schmittgen, 2001）にしたがって、相対的定量化を計算した。

【0257】

Fad3CのNHEJ媒介スプライシングおよび編集の証拠を、Fad3Cに特異的な1プライマー、およびhphカセットのプロモーターまたはターミネーターのいずれかに特異的な第2のプライマーを用いてPCRアッセイを行うことによって得た（表9および図19（B））。カルス組織から得られたDNAの量が限定されているために、センス配向の組込みのみをアッセイした。PCR産物を、QiaQuick MiniElute PCR Purificationキット（商標）（Qiagen）を用いてゲル精製し、直接Sangerシーケンシング法を用いてシーケンシングした。シーケンシング産物を、BigDye（登録商標）v3.1プロトコル（Applied Biosystems）にしたがってエタノール、酢酸ナトリウムおよびEDTAを用いて精製し、上記のようにシーケンシングおよび解析した。

【0258】

各実験においてドナーカセットを含むカルスの数を表11に示す。編集および/またはスプライシングによるFad3C座へのドナー遺伝子付加の証拠は、ZFN切断部位および5'と3'の両方のFad3C-hphカセットジャンクションにわたるPCR増幅（

10

20

30

40

50

表 10 に示されるプライマーを用いる) によって提供された。h p h プラスミドのみ (p D A S 0 0 0 3 4 0 および p D A S 0 0 0 3 4 2) または Z F N プラスミドのみ (p D A B 1 0 7 8 2 7 および p D A B 1 0 7 8 2 8) を用いて形質転換されたコントロールプロトプラストから回収したカルス組織から単離したゲノム DNA の P C R 増幅は、P C R 増幅産物の産生をもたらさなかった。

【 0 2 5 9 】

5 ' および 3 ' F a d 3 C - h p h カセットジャンクションの増幅から産生された P C R アンプリコンを、アガロースゲルから精製し、シーケンシングして F a d 3 C ゲノム座への組み込みの特異性を確認した。P C R 産物のシーケンシング解析の結果は、個々の形質転換されたプロトプラストから産生された各単離カルスが単一 P C R 増幅産物のみを産生し、混合遺伝子型の細胞を含まないことを示した。

10

【 0 2 6 0 】

F a d 3 C ゲノム座へのドナー配列の N H E J 媒介組み込み実験では、(標的座から増幅されているドナー DNA ベクターのいずれかの部分によって定義される) 標的座への付加の頻度は、1 : 1、5 : 1 および 10 : 1 (ドナー DNA : Z F N DNA) の DNA 濃度についてそれぞれ 4 2 %、4 6 % および 3 2 % であった。表 1 2 を参照されたい。両カセットジャンクションが増幅可能であるかどうかアッセイすることによって、また P C R 産物のシーケンシングからオンターゲットプライミングの頻度を決定した。これらの結果は、カセットが正しい配向で標的部位において挿入されていることを証明した。組み込みの頻度は、1 : 1、5 : 1 および 10 : 1 のドナープラスミド DNA : Z F N プラスミド DNA 濃度についてそれぞれ 4 %、3 % および 3 % と計算された。遺伝子編集実験では、標的座から増幅されているドナー DNA ベクターのいずれかの部分によって定義される標的座への付加の頻度は、5 : 1 : 1 および 10 : 1 : 1 のドナープラスミド DNA : Z F N プラスミド DNA 濃度についてそれぞれ 6 6 % および 6 5 % であった。表 1 3 を参照されたい。増幅可能である両カセットジャンクションおよび P C R 産物の配列を産生することによってオンターゲット編集の頻度を決定した。これらの結果は、カセットが、5 : 1 : 1 および 10 : 1 : 1 のドナープラスミド DNA : Z F N プラスミド DNA 濃度についてそれぞれ 3 % および 6 % の頻度で、正しい配向で標的座において挿入されていることを証明した。プロトプラストアッセイで観察されるように、Z F N によるゲノム座の切断の結果として、ゲノムとカセットとの間で塩基対が欠失した、または追加の塩基が挿入された (図 2 1 ~ 2 2) 。

20

30

【 0 2 6 1 】

特定の例では、P C R 産物が、標的座へのヌクレオチド配列の付加、無 P C R 産物、または野生型サンプルで観察されるより大きな P C R 産物をもたらした。切断部位に隣接するプライマーを用いた P C R 増幅から産生されたこれらの結果は、染色体の両対で座が破壊されたことを示した (図 2 1 ~ 2 2) 。例のいくつかでは、2 つ以上のバンドがスプライスジャンクションで増幅され (図 2 1 ~ 2 2) 、ゲノムの各コピーで独立して異なる挿入が起こったことを示している。

【 表 1 1 】

表 1 1 : 選択 4 週間後の h p h の存在についてポジティブのカルスの数

40

送達されたベクター	ドナー DNA : ZFN DNA のモル比	採取したカルスの数	選択 4 週間後の hph についてポジティブのカルスの数
pDAS000340 DAB107827	1:1	88	76
	5:1	88	35
	10:1	87	37
pDAS000342 DAB107827 DAB107828	1:1:1	-	-
	5:1:1	80	38
	10:1:1	79	52

50

【表 1 2】

表 1 2 : ZFN28051-2A-28052 によって誘導された DSB において F a d C 座でのスプライシングによって h p h が挿入されたカルスの数

送達されたベクター	ドナー DNA:ZFN DNA のモル比	選択 4 週間後の hph についてポジティブのカルスの数	少なくとも 1 つのスプライシング境界が増幅されたカルスの数	少なくとも 1 つの完全な*境界が増幅されたカルスの数	両スプライシング境界が増幅されたカルスの数
pDAS000340	1:1	76	32	0	3
+	5:1	35	16	0	1
DAB107827	10:1	37	12	0	1

10

*切断部位において塩基対が欠失したまたは追加の塩基対が挿入された数

【表 1 3】

表 1 3 : ZFN28051-2A-28052 および ZFN28053-2A-28054 によって誘導された切断部位において F a d C 座での編集によって h p h が挿入されたカルスの数

20

送達されたベクター	ドナー DNA:ZFN DNA のモル比	選択 4 週間後の hph についてポジティブのカルスの数	少なくとも 1 つのスプライシング境界が増幅されたカルスの数	少なくとも 1 つの完全な*境界が増幅されたカルスの数	両編集境界が増幅されたカルスの数
pDAS000342	5:1:1	38	25	2	1
+					
DAB107827					
+					
DAB107828	10:1:1	52	34	2	3

30

*切断部位において塩基対が欠失したまたは追加の塩基対が挿入された数

植物における非相同末端結合による F A D 3 C への遺伝子付加の検出

【0 2 6 2】

プロトプラストから再生し、ポッティング培地（上記）に移した植物から DNA を抽出した。回収した植物の大多数が、ドナー DNA にコードされている h p h カセットの 1 ~ 2 コピーしか含まないと推定された。植物を、カルス組織について記載したのと同じ組のアッセイおよびカセットが F a d 3 A 座においてアンチセンス配向でまたはドナー組込みで挿入されたかどうかを決定するためのアッセイによって分析した。

40

【表 1 4】

表 1 4 : プロトプラストから再生された植物の推定コピー数各比について、100万個のプロトプラストの3回のトランスフェクションを行った

送達されたベクター	ドナーDNA:ZFN DNA のモル比	1~2 コピーの hph を含む植物の数	3~4 コピーの hph を含む植物の数	5 またはそれ以上のコピーの hph を含む植物の数
pDAS000340 DAB107827	1:1	37	16	34
	5:1	18	14	30
	10:1	16	13	18
pDAS000342 DAB107827 DAB107828	1:1:1	0	1	1
	5:1:1	22	14	18
	10:1:1	23	11	27
合計	---	116	69	128

10

【0 2 6 3】

h p h カセットがいずれかの方向で F a d 3 C に挿入された線状ドナー設計構築物についてのオンターゲットスプライシングの頻度は、1 : 1、5 : 1 および 1 0 : 1 のドナー DNA : Z F N DNA についてそれぞれ 5 1 %、3 2 % および 5 6 % であった (表 1 5)。これらの結果うち、3 5 %、3 2 % および 5 0 % (1 : 1、5 : 1 および 1 0 : 1) が順方向配向に挿入された (表 1 5)。

20

【0 2 6 4】

4 座から 6 座に領域を置換する、h p h カセットがいずれかの方向で F a d 3 C に挿入されたオンターゲット編集の頻度は、5 : 1 : 1 および 1 0 : 1 : 1 のドナー DNA : Z F N DNA : Z F N DNA についてそれぞれ 2 % および 0 % であった (表 1 6)。さらに、両 Z F N を 5 : 1 : 1 で送達した場合、2 % が 4 座にスプライシングされ、1 0 % が 6 座にスプライシングされ、また両 Z F N を 1 0 : 1 : 1 で送達した場合、1 0 % が 4 座にスプライシングされ、1 5 % が 6 座にスプライシングされた。P C R アンプリコンを得て、シーケンシングしてインサートジャンクション配列を決定した。特異的に標識された植物について得られた配列を表 1 7 に記載する。

30

【表 1 5】

表 1 5 : Z F N 2 8 0 5 1 - 2 A - 2 8 0 5 2 によって誘導された D S B において F a d C 座でのスプライシングによって h p h が挿入された植物の数

比	順方向配向			逆方向配向			両配向 (順方向 & 逆方向)		合計		HPH についてポジティブと試験されたイベント
	1つの境界 5' インアウト	1つの境界 3' インアウト	両境界 5' & 3'	1つの境界 5' インアウト	1つの境界 3' インアウト	両境界 5' & 3'	いずれか1つの境界 5' または 3'	両境界 5' & 3'	オンターゲット	オフターゲット	
1:1	3	2	2	5	3	4	17	4	40	47	87
5:1	8	2	1	-	-	-	3	-	14	48	62
10:1	8	2	1	2	-	2	9	2	26	21	47

40

【表 16】

表 16 : ZFN28051-2A-28052 および ZFN28053-2A-28054 によって誘導された切断部位において FadC 座での編集によって hph が挿入された植物の数

比	順方向配向			逆方向配向			両配向 (順方向 & 逆方向)		合計		HPH について ポジティブと 試験されたイ ベント
	1つの 境界 5' イン アウト	1つの境 界 3' イ ンアウト	両境界 5' & 3'	1つ の境 界 5' イ ンア ウト	1つ の境 界 3' イ ンア ウト	両境界 5' & 3'	いづれ か1つ の境界 5' ま たは 3'	両境界 5' & 3'	オン ター ゲッ ト	オフ ター ゲッ ト	
1:1	3	2	2	5	3	4	17	4	40	47	87
5:1	8	2	1	-	-	-	3	-	14	48	62
10:1	8	2	1	2	-	2	9	2	26	21	47

10

【表 17】

表 17 : ZFN28051-2A-28052 および ZFN28053-2A-28054 によって誘導された切断部位における Fad3C 座で単一コピー hph、標的が挿入された植物の詳細

植物バーコード	PCR/配列情報	配列番号
349711	4 座上流	353
349685	4 座上流	354
346258	4 座上流	355
348918	4 座上流	356
359900	4 座上流	357
346125	4 座上流	358
348919	4 座上流	359
349215c	4 座上流	360
349216c	4 座上流	361
346102	4 座下流	362
346175	4 座下流	363
345888	6 座下流	364
356731	6 座下流	365
349711	4 座下流アンチセンス配向	366
349685	6 座上流アンチセンス配向	367

30

40

【0265】

hph カセットが環状ドナーについていずれかの方向で Fad3C に挿入されたオンターゲットプライシングの頻度は、1:1、5:1 および 10:1 についてそれぞれ 51%、32% および 56% であった (表 18 ; 図 23)。これらのうち、35%、32% および 50% (1:1、5:1 および 10:1) が順方向配向に挿入された (表 18)。

【0266】

4 座から 6 座に領域を置換する、hph カセットがいずれかの方向で Fad3C に挿入

50

されたオンターゲット編集の頻度は、5 : 1 : および 10 : 1 : 1 についてそれぞれ 2 % および 0 % であった (表 19 ; 図 24)。さらに、両 ZFN を 5 : 1 : 1 で送達した場合、2 % が 4 座にスプライシングされ、10 % が 6 座にスプライシングされ、また両 ZFN を 10 : 1 : 1 で送達した場合、10 % が 4 座にスプライシングされ、15 % が 6 座にスプライシングされた。

【表 18】

表 18 : ZFN28051-2A-28052 によって誘導された DSB において F a d C 座でのスプライシングによって h p h が挿入された植物の数

送達されたベクター	ドナーDNA:ZFN DNA のモル比	分析した植物の数 (hph についてポジティブ)	少なくとも1つのスプライシング境界が増幅された植物の数 (順方向/逆方向/いずれか)	両スプライシング境界が増幅された植物の数 (順方向/逆方向/いずれか)
pDAS000340	1:1	60	21/23/31	4/7/8
+	5:1	37	12/4/12	3/1/3
DAB107827	10:1	46	23/12/26	4/4/7

10

*切断部位において欠失した塩基対がないまたは追加の塩基対が挿入された

20

【表 19】

表 19 : ZFN28051-2A-28052 および ZFN28053-2A-28054 によって誘導された切断部位において F a d C 座での編集によって h p h が挿入された植物の数

送達されたベクター	ドナーDNA:ZFN DNA のモル比	分析した植物の数 (hph についてポジティブ)	少なくとも1つのスプライシング境界が増幅された植物の数 (順方向/逆方向/いずれか)	両編集境界が増幅された植物の数 (順方向/逆方向/いずれか)
pDAS000342	5:1:1	39	17/11/24	0/1/1
+				
DAB107827	10:1:1	63	27/27/34	0/0/0
+				
DAB107828				

30

*切断部位において欠失した塩基対がないまたは追加の塩基対が挿入された

40

HDR を介したセイヨウアブラナ ω 3 脂肪酸デサチュラーゼの標的化組み込み

【0267】

t G F P および H P H カセットを含むドナーベクターを、1 k b の F A D 3 上流および下流ドナー配列を含むように改変する。F A D 3 上流および下流ドナー配列は野生の F A D 3 配列配列と 100 % 同一であり、F A D 3 ジンクフィンガー結合部位から得られる ; G c c c a a g g a a c C C T T T T C T G G G C C A T c t t c g T A C T C G G C C A C G a c t g g t a a t t t a a t (配列番号 255) または a g c g a g a g a a A G C T T A t T G C A A C T T C a a c t a c T T G C T G G T C G A T C G T G T T g g c c a c t c (配列番号 256)。得られた 4 つの「ドナー」ベクターは、p D A S 0 0 0 3 4 0 (ハイグロマイシン耐性遺伝子スプライシングドナー)、p D A S 0 0 0 3 4 1 (t G F P レポーター遺伝子スプライシングドナー)、p D A S 0 0 3 4 2 (ハイグロ

50

マイシン耐性遺伝子編集ドナー)およびpDAS000343(tGFPレポーター遺伝子編集ドナー)に類似であり、わずかな改変は、1KbのFAD3ゲノム上流および下流配列の包含である。NHEJ媒介組込みについて前記のジンクフィンガーヌクレアーゼプラスミド(pDAB107827およびpDAB107828)をHDR媒介組込みに使用する。

【0268】

セイヨウアブラナの形質転換

葉肉由来プロトプラストを上記のようにセイヨウアブラナ(DH10275)植物から単離および調製する。プロトプラストを、精製プラスミドDNAを用いて形質転換する。ドナーおよびZFNプラスミドDNAのアリコートをもつ3つのモル比で調製する: 1:1(各プラスミド30 μ g)、5:1(プラスミドDNA計30 μ gに対するドナープラスミド:ZFNプラスミド)および10:1(プラスミドDNA計30 μ gに対するドナープラスミド:ZFNプラスミド)。さらに、ドナーのみおよびZFNのみのアリコート(30 μ g)をコントロールとして調製する。PEG4000媒介形質転換を介してセイヨウアブラナプロトプラストに送達されたDNAの量を表20に要約する。形質転換プロトプラスト細胞を前記のように培養し、ここでは選択培地はグルホシネート選択培地とし、推定形質転換体を導入遺伝子挿入についてqPCR解析を介してアッセイする。

【表20】

表20:プロトプラストに送達されたZFNおよびドナーDNAの量

	プラスミドDNAのモル比	100万個のプロトプラストに送達されたDNAの総量(μ g)
スプライシング	ドナープラスミドのみ	30
	ZFNプラスミドのみ	30
	1:1 ドナー:ZFN	60
	5:1 ドナー:ZFN	30
	10:1 ドナー:ZFN	30
編集	ドナープラスミドのみ	30
	1:1:ZFNプラスミド	30
	1:1:1 ドナー:ZFN:ZFN	90
	5:1:1 ドナー:ZFN:ZFN	30
	10:1:1 ドナー:ZFN:ZFN	30

【0269】

プロトプラストにおけるHDRによるFAD3への遺伝子付加の検出

機能的レポーターカセットもしくは選択可能なマーカーカセットをコードするドナーDNA、ZFN DNAまたはドナーとZFN DNAの混合物が24時間前に送達されたプロトプラストプール(1プール当たり100万個のプロトプラスト)からゲノムDNAを抽出する。形質転換のために送達されたDNAの量は上に記載される。PCR産物をプラスミドベクターにクローニングする。プラスミドベクターにクローニングすることによって、ゲノム編集が各細胞で独立に起こり、種々の異なる挿入イベントをもたらし、各ゲノム編集を曖昧さなしにシーケンシングすることができる。いくつかのクローンをABI3730XL(登録商標)自動化キャピラリー電気泳動プラットフォームでシーケンシングする。Sequencher SOFTWARE v5.0(商標)(GeneCodes、Ann Arbor、MI)を用いて遺伝子配列の解析を行う。

【0270】

編集またはスプライシングによるFAD3座への遺伝子付加の証拠は、プロトプラストから抽出したゲノムDNAからの5'と3'の両方のFAD3カセットジャンクションの増幅によって提供される。ZFNプラスミドまたはドナープラスミドのみ送達されたプロトプラストからは増幅が観察されない。全てのジャンクション配列は、HDR媒介修復経路を介したFAD3座におけるカセットの挿入を示している。ゲノムおよびカセットのいずれかまたは両方からの種々の長さの欠失、ならびにゲノムとカセットとの間に挿入されているベクター骨格に由来する配列（ドナーまたはZFNからのいずれか）の付加が観察される。

【0271】

プロトプラストから再生したカルス組織中のHDRによるFAD3への遺伝子付加の検出

FAD3座のスプライシングおよび編集のさらなる証拠を、カセットをコードするドナーDNA、ZFN DNAのみ、またはドナーとZFN DNAが送達されたプロトプラストから再生されたカルス組織から得た。各比について約80個のカルスからDNAを抽出する。

【0272】

セイヨウアブラナゲノムへのカセットの組み込みを、ドナーインサートおよびゲノム隣接配列に特異的なプライマーおよびプローブを用いたTaqman（商標）qPCRによって確認する。ゲノムに挿入されたカセットのコピー数の推定を提供する2^{-Ct}法（Livak and Schmittgen, 2001）にしたがって、相対的定量化を計算する。FAD3のNH₂媒介スプライシングおよび編集の証拠を、FAD3に特異的な1プライマー、およびカセットのプロモーターまたはターミネーターのいずれかに特異的な第2のプライマーを用いてPCRアッセイを行うことによって得る。PCR産物を、QiaQuick MiniElute PCR Purificationキット（商標）（Qiagen）を用いてゲル精製し、直接Sangerシーケンシング法を用いて配列決定する。シーケンシング産物を、BigDye（登録商標）v3.1プロトコル（Applied Biosystems）にしたがってエタノール、酢酸ナトリウムおよびEDTAを用いて精製し、上記のように配列決定および解析する。

【0273】

各実験においてドナーカセットを含むカルスの数を決定する。編集および/またはスプライシングによるFAD3座へのドナー遺伝子付加の証拠は、ZFN切断部位および5'と3'の両方のFAD3-カセットジャンクションにわたるPCR増幅によって提供される。プラスミドのみまたはZFNプラスミドのみを用いて形質転換されたコントロールプロトプラストから回収したカルス組織から単離したゲノムDNAのPCR増幅は、PCR増幅産物の産生をもたらさない。

【0274】

5'および3' FAD3-カセットジャンクションの増幅から産生されたPCRアンプリコンを、アガロースゲルから精製し、シーケンシングしてFAD3ゲノム座への組み込みの特異性を確認する。PCR産物のシーケンシング解析の結果は、個々の形質転換されたプロトプラストから産生される各単離カルスが単一PCR増幅産物のみを産生し、混合遺伝子型の細胞を含まないことを示す。

【0275】

植物におけるHDRによるFAD3への遺伝子付加の検出

プロトプラストから再生し、ポッティング培地に移した植物からDNAを抽出する。回収した植物の大多数が、ドナーDNAにコードされているカセットの1~2コピーしか含まないと推定される。植物を、カルス組織について記載したのと同じ組のアッセイおよびカセットがFAD3座に挿入されたかどうかを決定するためのアッセイによって分析する。

【0276】

カセットが F A D 3 座に挿入されているオンターゲットスプライシングの頻度を、上記 P C R アッセイを用いて決定する。得られたアンプリコンバンドをシーケンシングして隣接配列を決定する。さらに、植物をオフターゲット挿入についてスクリーニングして、F A D 3 以外の部位におけるカセットの組み込みの頻度を決定する。

【 0 2 7 7 】

実施例 9：農学的に重要な遺伝子を用いたセイヨウアブラナ 3 脂肪酸デサチュラーゼ (F A D 3) の標的化組み込み

除草剤グリホサートに対する耐性を与える D G T - 2 8 導入遺伝子 (参照により本明細書に組み込まれる、国際特許出願公開第 2 0 1 3 / 1 1 6 7 0 0 号パンフレット) を含む構築物を、セイヨウアブラナの F A D 3 ゲノム座への組み込みのために設計および構築する。構築物および関連するジンクフィンガーヌクレアーゼ構築物 (例えば、(p D A B 1 0 7 8 2 7 および p D A B 1 0 7 8 2 8)) を、前記のようにセイヨウアブラナ細胞に形質転換する。形質転換体を、前記のように分子確認アッセイを介して同定および確認する。組み込み d g t - 2 8 導入遺伝子を含む F A D 3 染色体組み込み体を単離する。d g t - 2 8 導入遺伝子の F A D 3 座への組み込みは、N H E J 媒介組み込みおよび H D R 媒介組み込みを介して示される。F A D 3 座への組み込みは、F A D 3 内因性配列または F A D 3 座に安定的に組み込まれる前記 E T I P (p D A S 0 0 0 2 7 1 ~ p D A S 0 0 0 2 7 5) に向けられ得る。N H E J 媒介機構を介した F A D 3 座への組み込みは、線状ドナーまたは環状ドナー D N A 設計を用いて行われ得る。形質転換 D G T - 2 8 セイヨウアブラナイベントを得て、D G T - 2 8 の堅牢な発現およびその後の除草剤グリホサートに対する耐性について試験する。

10

20

【 0 2 7 8 】

特定の代表的な実施形態が本明細書において記載されてきたが、当業者であれば、代表的な実施形態への多くの付加、欠失および修正が以下の請求項の範囲から逸脱することなく行われ得ることを認知および認識するだろう。さらに、一実施形態からの特徴が別の実施形態の特徴と組み合わせられてもよい。

【 図 1 F 2 】

FAD3A (SEQ ID NO:7) (1304) AATAT-----AATAITTA--A
 FAD3A' (SEQ ID NO:8) (1344) AGACCAATATTAAAGGTTAGATATTTTAAAGAAATTAATCA
 FAD3C' (SEQ ID NO:12) (1344) AAACCAATATTAAAGGTTAGATATTTGAAAGAAATTAATCA
 FAD3A'' (SEQ ID NO:9) (1481) CAGATATCTCCGAAA-----AAGCAITTAAC--A
 FAD3C'' (SEQ ID NO:11) (1461) CAACATCTCCGAAA-----AAGCAITTAAC--A
 FAD3C (SEQ ID NO:10) (1350) AAT-----AATAITTA--A
 1641 1680
 FAD3A (SEQ ID NO:7) (1319) TATATTTGTTT-----TAATGGCTTAT---TTTA-T
 FAD3A' (SEQ ID NO:8) (1384) TGACTTTGTTTATGGAA-----CTCCCTTITATCTTTTAA
 FAD3C' (SEQ ID NO:12) (1384) TGACTTTGTTTATGGGAAATTAACCTTTITATCTTTTAT
 FAD3A'' (SEQ ID NO:9) (1506) TGCATGAATTTTCAATGAGGATTTATAGTTTCTCT--TTTACT
 FAD3C'' (SEQ ID NO:11) (1486) TGCATGAATTTTCCCTGAGGATTTATAGTTTCT--TTTACT
 FAD3C (SEQ ID NO:10) (1363) TATTTTGTGTTT-----TAATGGCTTAT---TTTA-T
 1681 1720
 FAD3A (SEQ ID NO:7) (1346) TGTTA-----AATGGATAC----ATCAGCTGAAATA
 FAD3A' (SEQ ID NO:8) (1419) TCTTTT---CTATTCTCCATTTTAAATAGAGAACTG
 FAD3C' (SEQ ID NO:12) (1424) TCTTTT---CTATTCTCTATTTTAAATAGAGAACTG
 FAD3A'' (SEQ ID NO:9) (1545) TATTTCCGACCAATGTTTAGTAGTAAAGCAATTAATG
 FAD3C'' (SEQ ID NO:11) (1523) TATTTCTG-CACAATGTTTAGTAGTAAAGCAATTAATG
 FAD3C (SEQ ID NO:10) (1390) TGTTA-----AATGGATAC----ATCAGCTGAAATG
 1721 1760
 FAD3A (SEQ ID NO:7) (1374) TCT-----ACGAACAT-GCATCAITTTCCATAGAT
 FAD3A' (SEQ ID NO:8) (1456) ACTTCAAACTCCCAATAAAGATGGTCTTATGTAGTACAG
 FAD3C' (SEQ ID NO:12) (1461) ACTTCAAACTCCCAATAAAGATGGTCTTATGTAGTACAT
 FAD3A'' (SEQ ID NO:9) (1585) TTTTITG-CCTCAAAAAAAA-GAATGGGATGTTAGAG
 FAD3C'' (SEQ ID NO:11) (1562) TTTTITG-CCTCAAAAAAAA-GAATGGGATGTTAGAG
 FAD3C (SEQ ID NO:10) (1418) TCT-----ACGAACAT-GCATCAITTTCCATAGAT
 1761 1800
 FAD3A (SEQ ID NO:7) (1402) A---CAITTTGTTTCTTGGCTCAAAAAATGAATAAOCCTAGTT
 FAD3A' (SEQ ID NO:8) (1496) TA-TAATTTTGTGTTGGTAAAGTAAACATCATCTTCAAAA
 FAD3C' (SEQ ID NO:12) (1501) CA-TAATTTTGTGTTGGTAAAGTAAACATCATCTTCAAAA
 FAD3A'' (SEQ ID NO:9) (1623) CACTCTATTGTTACTGTTCAATAAATATACCACTAAAA
 FAD3C'' (SEQ ID NO:11) (1598) CACTCTATTGTTACTGTTCAATAAATATACCACTAAAA
 FAD3C (SEQ ID NO:10) (1446) A---CAITTTGTTTCTTGGCTCAAAAA-IGAAATCACTAGTT
 1801 1840
 FAD3A (SEQ ID NO:7) (1439) AAC-----GAGTCAG-----
 FAD3A' (SEQ ID NO:8) (1535) TATCTTTGAAAATAGACTTACATGCATTAITTTGCTGCGA
 FAD3C' (SEQ ID NO:12) (1540) TATCTTTGAAAATAGACTTACATGCATTAITTTGCTGCGA
 FAD3A'' (SEQ ID NO:9) (1663) AACCAAAATAAATATA---AAATGAGTCAGATTGTTAAAT
 FAD3C'' (SEQ ID NO:11) (1638) AACCAAAATAAATATA---AAATGAGTCAGATTGTTAAAT
 FAD3C (SEQ ID NO:10) (1482) AAC-----GAGTCAGCATGTTCTAT

図 1F (続き)

【 図 1 F 3 】

FAD3A (SEQ ID NO:7) (1451) -----TTCTTAG-----1841 1880
 FAD3A' (SEQ ID NO:8) (1575) CATTATTGCACTTATTCCTGGCAATAAAT-TAGTTTATT
 FAD3C' (SEQ ID NO:12) (1580) CATTATTGCACTTATTCCTGGCAATAAATAAATTTATT
 FAD3A'' (SEQ ID NO:9) (1700) CATTATAGAGACAATTTCAATTTCCACAAAAATAAATAAT
 FAD3C'' (SEQ ID NO:11) (1675) CATTATAGAGACAATTTCAATTTCCACAAAAATAAATAAT
 FAD3C (SEQ ID NO:10) (1503) GGG-----TTCTTAGAGCATGATTATT
 1881 1920

図 1F (続き)

【 図 1 G 1 】

FAD3A (SEQ ID NO:7) (1458) -----
 FAD3A' (SEQ ID NO:8) (1614) ACTG-AACTTTTTTGGTCAATTTAATFACTAGTAACITTT
 FAD3C' (SEQ ID NO:12) (1620) ACTGGAAACTATTTTTGGTCAATTTAATFACTAGTAACITTT
 FAD3A'' (SEQ ID NO:9) (1740) ACAT--AACTTTTTATAAATGGGGTTGACAGGAGATAAG
 FAD3C'' (SEQ ID NO:11) (1715) ACAT--AACTTTTTG-TAAATGGGGTTGACAGGAGATAAG
 FAD3C (SEQ ID NO:10) (1527) GAGA--AGTTCCTA-GAGTGAGGTTCTTACCGGAATAA
 1921 1960
 FAD3A (SEQ ID NO:7) (1458) -----
 FAD3A' (SEQ ID NO:8) (1653) ABACTTAAAGAGGTGAGATTGTTGATCAAAAAAAT---
 FAD3C' (SEQ ID NO:12) (1660) ABACTTAAAGAGGTGAGATTGTTGATCAAAAAAAT---
 FAD3A'' (SEQ ID NO:9) (1778) CCATCGGACACACCACCAAGCAACATGGCCATGTTGAAAAC
 FAD3C'' (SEQ ID NO:11) (1752) CCATCGGACACACCACCAAGCAACATGGCCATGTTGAAAAC
 FAD3C (SEQ ID NO:10) (1564) CAATCTATCTCTTAACCTTTAACTTAAATAAATTAAGAAC
 1961 2000
 FAD3A (SEQ ID NO:7) (1458) -----
 FAD3A' (SEQ ID NO:8) (1690) ---AABAATAGAGTGAGATGTTAGAAATCTGCCATGAAG
 FAD3C' (SEQ ID NO:12) (1700) ABAAAAAATAGAGTGAGATGTTAGAAATCTGCCATGAAG
 FAD3A'' (SEQ ID NO:9) (1818) GACGAGCTTTGGGTTCCGGTAACTTTTCTACTCTCGTAG
 FAD3C'' (SEQ ID NO:11) (1792) GACGAGCTTTGGGTTCCGGTAACTTTTCTACTCTCAATG
 FAD3C (SEQ ID NO:10) (1604) GCCTTTTAAAACTCTGATTTAAGAACCGTTTATGATTT
 2001 2040
 FAD3A (SEQ ID NO:7) (1458) -----
 FAD3A' (SEQ ID NO:8) (1727) CAACACTATATAG-----
 FAD3C' (SEQ ID NO:12) (1740) CAACACTATATAGAGTATGTTGTTGACGTGCGCCGTA
 FAD3A'' (SEQ ID NO:9) (1858) TTTCTCTGTCTTTTATTTATTTGTTGTTTTCGGAAAT
 FAD3C'' (SEQ ID NO:11) (1832) TTTCTCTGTCTTTTATTTATTTGTTGTTTTCGGAAAT
 FAD3C (SEQ ID NO:10) (1644) TTAGTAAABAATCAAGAGACGAGTTCTATAATCCGCTA
 2041 2080
 FAD3A (SEQ ID NO:7) (1458) -----
 FAD3A' (SEQ ID NO:8) (1740) -----
 FAD3C' (SEQ ID NO:12) (1780) GAAITTTAGCTGTAGATAAATTTGTTGTAGTTGTAAGTT
 FAD3A'' (SEQ ID NO:9) (1898) TATCTTA--TGTC--TATGTTCTAGGATCTCTATGTT
 FAD3C'' (SEQ ID NO:11) (1872) CATCTTA--TGTC--TAAGTTCTATGATTAATGAAGTT

図 1G

【 図 1 G 2 】

FAD3C (SEQ ID NO:10) (1684) AGAACTCC--ACCC--TGAGAACTTCTCAATAATCATGCT
 2081 2120
 FAD3A (SEQ ID NO:7) (1458) -----
 FAD3A' (SEQ ID NO:8) (1740) -----
 FAD3C' (SEQ ID NO:12) (1820) GTTACTGTT-GATTAATTTTGCAGAGACTTTTGTCTGAT
 FAD3A'' (SEQ ID NO:9) (1934) TATTTTATAGTATATGTTTTCAGTCTGAGGTCA-GACCG
 FAD3C'' (SEQ ID NO:11) (1908) CTTAAGGTGGGTTCTAAGCGAATATGAGAACCTGTCTC
 FAD3C (SEQ ID NO:10) (1720) CTTAGTCTCTAAGAGGGTCTTAAACAAAAT
 2121 2160
 FAD3A (SEQ ID NO:7) (1458) -----
 FAD3A' (SEQ ID NO:8) (1740) -----
 FAD3C' (SEQ ID NO:12) (1859) TAAATTTGTTGAGCTGTAAGCTATAGGCTGCGATATT
 FAD3A'' (SEQ ID NO:9) (1973) ACCACTGTCAG-----ATCTGTTTCTAGCTG--AG
 FAD3C'' (SEQ ID NO:11) (1948) TTAACTTTAACTAAA--AAGCTAAGAACCGACTTTAAA
 FAD3C (SEQ ID NO:10) (1754) --TAAATAAAG-----ATAAGTGTGGGCCAA-----
 2161 2200
 FAD3A (SEQ ID NO:7) (1458) -----
 FAD3A' (SEQ ID NO:8) (1740) -----
 FAD3C' (SEQ ID NO:12) (1899) TAAAAATAAATATGTAATAATGATGATGATGATATA
 FAD3A'' (SEQ ID NO:9) (2004) TAAAA-----AACAA--TTTCAAGGTAAATAGTTGAG
 FAD3C'' (SEQ ID NO:11) (1987) TAAAGACTTTTATGAACCGTCTCTAATTTTTTATGTTAA
 FAD3C (SEQ ID NO:10) (1781) -AAA-----AACAAAAACCGGTTACAAAAGTCGCG
 2201 2240

図 1G (続き)

【 図 1 H 1 】

FAD3A (SEQ ID NO:7) (1458) -----
 FAD3A' (SEQ ID NO:8) (1740) -----
 FAD3C' (SEQ ID NO:12) (1939) AATAAATTAATTTTTTATCACTTAAAT--AATTTAATTT
 FAD3A'' (SEQ ID NO:9) (2035) CATAAATGATCTGTT-----AGAGAT--TT
 FAD3C'' (SEQ ID NO:11) (2027) AGTTAAGAAAAGGGTTCTATATATCCGCTAAGAACCTCTT
 FAD3C (SEQ ID NO:10) (1812) AAGAAGGATCGATT-----TGCTCTTTA
 2241 2280
 FAD3A (SEQ ID NO:7) (1458) -----
 FAD3A' (SEQ ID NO:8) (1740) -----
 FAD3C' (SEQ ID NO:12) (1978) AATTTTTTAAATATCAAGTTTACTGTTATTTAAA
 FAD3A'' (SEQ ID NO:9) (2060) CAAAA-----CAA
 FAD3C'' (SEQ ID NO:11) (2067) CCTAAAAACCCCAATAATCACTACT--CTAGGATCTTATA
 FAD3C (SEQ ID NO:10) (1838) CTCTGA-----
 2281 2320
 FAD3A (SEQ ID NO:7) (1458) -----
 FAD3A' (SEQ ID NO:8) (1740) -----

図 1H

【 図 1 H 2 】

FAD3C' (SEQ ID NO:12)	(2018)	TGTGATATGTAATAATCTATATTATTTAAATATTTCAA	
FAD3A'' (SEQ ID NO:9)	(2109)	-----ACTTTATAATTTAAATATACAGT-TT-----	
FAD3C'' (SEQ ID NO:11)	(2065)	TGTT-TATTTTATAGTTTATGTTTTTCAGTCTGAGGTCAG	
FAD3C (SEQ ID NO:10)	(1844)	-----CTGTTTGTGGATCCAC TGGTGGT-----	2321 2360
FAD3A (SEQ ID NO:7)	(1458)	-----	
FAD3A' (SEQ ID NO:8)	(1740)	-----	
FAD3C' (SEQ ID NO:12)	(2058)	TAAATTTAAAGCACCCAAAAT TAGAGTAAAATATTTATAG	
FAD3A'' (SEQ ID NO:9)	(2095)	-----TT-----TGTTCTCT-----AAAA	
FAD3C'' (SEQ ID NO:11)	(2144)	ACCGGCCACTTGTGCAGATCTGTTTCTAGCTGTAGTAAAA	
FAD3C (SEQ ID NO:10)	(1868)	-----GGTCCGG-----ATTG	2361 2400
FAD3A (SEQ ID NO:7)	(1458)	-----	
FAD3A' (SEQ ID NO:8)	(1740)	-----	
FAD3C' (SEQ ID NO:12)	(2098)	ATGTTTTTTTATATGAT TATCTTATT--TATTTAATA TT	
FAD3A'' (SEQ ID NO:9)	(2109)	AAGAAATTT-----AAAAAT-----TTAAAGTT	
FAD3C'' (SEQ ID NO:11)	(2184)	AACAATTTGCAAGTGTAA TGTCTCAGCGGTAA TTAATGTT	
FAD3C (SEQ ID NO:10)	(1880)	GTTTCTTT-----TTTAAAT-----TAAATTTATTT	2401 2440
FAD3A (SEQ ID NO:7)	(1458)	-----	
FAD3A' (SEQ ID NO:8)	(1740)	-----	
FAD3C' (SEQ ID NO:12)	(2136)	A TAGATATTTTTTGTCTTACAGTTTCTACAGCTTATAAA	
FAD3A'' (SEQ ID NO:9)	(2132)	TGAGGACGCA-----AACTTCAAAAT	
FAD3C'' (SEQ ID NO:11)	(2224)	CTCGGATCTATCTCAAAAAAAATTTTATAACTTCAAAAT	
FAD3C (SEQ ID NO:10)	(1906)	TTTAAATCCGGA-----GAAAAAAATTA	2441 2480
FAD3A (SEQ ID NO:7)	(1458)	-----	
FAD3A' (SEQ ID NO:8)	(1740)	-----	
FAD3C' (SEQ ID NO:12)	(2176)	TGAAAGATGTAAGTTGTTTAACTAAAATACATAAGAA	
FAD3A'' (SEQ ID NO:9)	(2153)	TGAAC-----TTTCACTACTCAACTTC-AAATTT	
FAD3C'' (SEQ ID NO:11)	(2264)	TAAAGATTTTTTGTTTTCAAAAAATGAACCTCGAAACTT	
FAD3C (SEQ ID NO:10)	(1927)	AGAAA-----C-----CAAAAACAGT TTT-----AA	2481 2520
FAD3A (SEQ ID NO:7)	(1458)	-----	
FAD3A' (SEQ ID NO:8)	(1740)	-----	
FAD3C' (SEQ ID NO:12)	(2213)	-AAATGTTTGGTTTTTTTTTTTGGCTGTAGCTTTAFTTTTAA	
FAD3A'' (SEQ ID NO:9)	(2181)	GAAATTCMCTTTTTTATTTACATTTTGTACTTATTAAT	
FAD3C'' (SEQ ID NO:11)	(2304)	CAAAATTTGAAGTTTTTTTTTTCGCAATTTTGA TCAITTAAT	
FAD3C (SEQ ID NO:10)	(1949)	TCATGGCCCTCATGTTGGGGTTGAGTTTTTATATTC TGATAA	2521 2560

図1H (続き)

【 図 1 I 1 】

FAD3A (SEQ ID NO:7)	(1458)	-----	CA
FAD3A' (SEQ ID NO:8)	(1740)	-----	
FAD3C' (SEQ ID NO:12)	(2252)	-AGTTAAAGCAGTG-ATGGTAAAAAATTAATGAAAATTTGA	
FAD3A'' (SEQ ID NO:9)	(2221)	TAATPATACATACATTTATGATCTTAAAGTATTTCTTCA	
FAD3C'' (SEQ ID NO:11)	(2344)	TAATYACAGCTTACATTTAATCTTAAAGTATTTCTTCA	
FAD3C (SEQ ID NO:10)	(1989)	GAATCCCATCTTAAAAAACCCCGTTAAACATGCTTTTACA	2561 2600
FAD3A (SEQ ID NO:7)	(1460)	TC TGCC-----TCGAAAACG-----ATATGTTATTGAC	
FAD3A' (SEQ ID NO:8)	(1740)	-----	
FAD3C' (SEQ ID NO:12)	(2290)	TGTAGAC TTTAAT TTTGAAAAGT-----ARACGTAAGCAT	
FAD3A'' (SEQ ID NO:9)	(2261)	TTTATTGTTTTAATTTCTTAAATTTTTTATACATCAATAAT	
FAD3C'' (SEQ ID NO:11)	(2384)	TTTATCGTTTTAA TCTTAAATTTTTTATATATATAAAT	
FAD3C (SEQ ID NO:10)	(2029)	TC TGCT-----TCGAAAATG-----ATATGTTATTGAC	2601 2640
FAD3A (SEQ ID NO:7)	(1488)	AAITCCAA---TTTCAT---TTT-----	
FAD3A' (SEQ ID NO:8)	(1740)	-----	
FAD3C' (SEQ ID NO:12)	(2326)	GATGGTAAAGTTTAAATGATTTAGAAA-AAAAATAAGCT	
FAD3A'' (SEQ ID NO:9)	(2301)	ATTTCCAA---TTTGT---TTTATAAATCAAATTTTACA	
FAD3C'' (SEQ ID NO:11)	(2424)	ATTTCCAA---TTTGT---TTTATAAATCAAATTTTATA	
FAD3C (SEQ ID NO:10)	(2057)	AAITCCAA---TTTCAT---TTT-----	2641 2680
FAD3A (SEQ ID NO:7)	(1505)	-----TATGAAA---TAA---AAT-----	AA
FAD3A' (SEQ ID NO:8)	(1740)	-----	AC
FAD3C' (SEQ ID NO:12)	(2364)	AAAGTAGGTAGATAAAACCAACCAATCACCTCCATGGAC	
FAD3A'' (SEQ ID NO:9)	(2336)	CAAAAAGTAAATAAAATTTA---AAT-----	AA
FAD3C'' (SEQ ID NO:11)	(2459)	CATAAAGTAAATAAAATGTTA---AAT-----	AA
FAD3C (SEQ ID NO:10)	(2074)	-----TATGAAA---TAA---AAT-----	AA
FAD3A (SEQ ID NO:7)	(1521)	TAGTT---TATTT-----TATAATTCGGGGTGG-----	2720
FAD3A' (SEQ ID NO:8)	(1742)	AAITTAATTTTATGAAAAACAT--TTAAITATTGTAG-	
FAD3C' (SEQ ID NO:12)	(2404)	AAITTAATTTTATGTAACACACATATTTAATTAATTGTAG-	
FAD3A'' (SEQ ID NO:9)	(2363)	GAITTAATATTTTAAAAC-TATAATTAGCCAAAAAAA	
FAD3C'' (SEQ ID NO:11)	(2486)	GAITTAATATATTT-AAGAC-TATAATTAGTCAACAAA-	
FAD3C (SEQ ID NO:10)	(2090)	TAGTT---TATTT-----TATAACTGAGGGTGG-----	2721 2760
FAD3A (SEQ ID NO:7)	(1546)	--TGCAGGA-----GAATAAG-----CCATCGG	
FAD3A' (SEQ ID NO:8)	(1779)	-GCTCAGGA-----GAATAAG-----CCATCGG	
FAD3C' (SEQ ID NO:12)	(2443)	-GCTCAGGA-----GAATAAG-----CCATCGG	
FAD3A'' (SEQ ID NO:9)	(2402)	TAITCAAAA-AAATGTAATAA---AAACTTTAAATAAG	
FAD3C'' (SEQ ID NO:11)	(2523)	TAITCAAAAAGAAATGTAATAAATAAAATTTAAATAAG	
FAD3C (SEQ ID NO:10)	(2115)	--TGCAGGA-----GAATAAG-----CCATCGG	2761 2800

図1I

【 図 1 I 2 】

FAD3A (SEQ ID NO:7)	(1568)	ACACACCAC--CAGAACCATGGCCATGTTGAAA---ACG	
FAD3A' (SEQ ID NO:8)	(1802)	ACACACCAC--CAGAACCATGGCCATGTTGAAA---ACG	
FAD3C' (SEQ ID NO:12)	(2466)	ACACACCAC--CAGAACCATGGCCATGTTGAAA---ACG	
FAD3A'' (SEQ ID NO:9)	(2438)	ATATATCAAGACATAAATTTATAGAAATTTAAATATTATA	
FAD3C'' (SEQ ID NO:11)	(2563)	ATACATCAAGACATAAATTTATAGAAATTTAAATATTATA	
FAD3C (SEQ ID NO:10)	(2137)	ACACACCAC--CAGAACCATGGCCATGTTGAAA---ACG	2801 2840
FAD3A (SEQ ID NO:7)	(1602)	ACGAGTCTTGGGTTCGGTAA-----TC-----CCTCTC	
FAD3A' (SEQ ID NO:8)	(1836)	ACGAGTCTTGGGTTCGGTAAACATT--TC-----CCJCTT	
FAD3C' (SEQ ID NO:12)	(2500)	ACGAGTCTTGGGTTCGGTAAACATT--TC-----CCJCTT	
FAD3A'' (SEQ ID NO:9)	(2478)	ACAATATTAATAATCTCGTAAATTTGCTCCAAAACCTCAA	
FAD3C'' (SEQ ID NO:11)	(2603)	ACAATACTAATAATCTGGTAAATTTGCTCGGAACCTCAA	
FAD3C (SEQ ID NO:10)	(2171)	ACGAGTCTTGGGTTCGGTAA-----TCITTC-CCTCTC	2841 2880

図1I (続き)

【 図 1 J 1 】

FAD3A (SEQ ID NO:7)	(1631)	TCATTT-----ATTTTTTT-----	
FAD3A' (SEQ ID NO:8)	(1869)	TAATA-----ATT-----TCTATTTTCTT-----	
FAD3C' (SEQ ID NO:12)	(2533)	TAATA-----ATT-----TCTATTTTCTT-----T--	
FAD3A'' (SEQ ID NO:9)	(2518)	AAATTTCTAATTTATGTCCAAACAAATTT-GTTTAAACCG	
FAD3C'' (SEQ ID NO:11)	(2643)	AAATTT-----ATGTCCAAACAAATTTGTTGTTAAACCG	
FAD3C (SEQ ID NO:10)	(2204)	TCATTT-----ATTTTTTT-----	2881 2920
FAD3A (SEQ ID NO:7)	(1645)	-----TCITTTTTCGAAAC-----	
FAD3A' (SEQ ID NO:8)	(1888)	-----GTCAAATAATTAATTTTTCGAAATTTGAGG	
FAD3C' (SEQ ID NO:12)	(2554)	-----GTCAAATAATTAATTTTTCGAAATTTGAGG	
FAD3A'' (SEQ ID NO:9)	(2557)	AATATGGAGCATTACAAAATAAATTTTTCGAAATGATGTG	
FAD3C'' (SEQ ID NO:11)	(2675)	AAGATGGAGCATTACAAAATAAATTTTTCGAAATTAATATG	
FAD3C (SEQ ID NO:10)	(2217)	-----CTITTTTTCGAAAT-----	2921 2960
FAD3A (SEQ ID NO:7)	(1659)	-----T--CITTCATTTTAAATTTTCT-	
FAD3A' (SEQ ID NO:8)	(1919)	CCAGAACCACCATTGTCAA-ATTTGATT-TT TAGCTGTA	
FAD3C' (SEQ ID NO:12)	(2585)	CCAGAACCACCATTGTCAG-ATTTGATT-TC TAGCTGTA	
FAD3A'' (SEQ ID NO:9)	(2597)	GTATTTTCTGTTAGT-T-ATAATTTAATATGATTTCTA	
FAD3C'' (SEQ ID NO:11)	(2715)	GTATTTTCTGTTAGT TTAATATTTAATATGATTTCTA	
FAD3C (SEQ ID NO:10)	(2231)	-----T--CITTCATTTTAAATTTTCT-	2961 3000
FAD3A (SEQ ID NO:7)	(1678)	--TAGAATTCATGTAITTA-----TTTAAATCA	
FAD3A' (SEQ ID NO:8)	(1957)	GTAATAACAGTTTCTGATGTCACAGTAAACCGGTAATG	
FAD3C' (SEQ ID NO:12)	(2623)	GTAATAACAGTTTCTGATGTCACAGTAAACCGGTAATG	
FAD3A'' (SEQ ID NO:9)	(2636)	TTTAAATTTTATAATTTAATGTAAGATTTTAAATTA	

図1J

【 図 1 J 2 】

FAD3C'' (SEQ ID NO:11)	(2755)	TTTTATAATTTATATATTTAATGTAATTTTATTAATTA	
FAD3C (SEQ ID NO:10)	(2250)	--TAGGATTCATGATTTTA-----TTTTAATCA	3001 3040
FAD3A (SEQ ID NO:7)	(1705)	ATCCT-----	
FAD3A' (SEQ ID NO:8)	(1997)	ATTCITTTTAAACGATTTATAGAGTAACTTTTGTAAAA	
FAD3C' (SEQ ID NO:12)	(2663)	ATTCITTTTAAACGATTTATAGAGTAACTTTTGTAAAA	
FAD3A'' (SEQ ID NO:9)	(2676)	ATATACGTAAATTTTATATATAATGATGATTTTAT	
FAD3C'' (SEQ ID NO:11)	(2795)	ATATACGTAAATTTTATATATAATGATGATTTTAT	
FAD3C (SEQ ID NO:10)	(2277)	ATCCT-----TTTT-----	3041 3080
FAD3A (SEQ ID NO:7)	(1710)	-----TTTT-----	
FAD3A' (SEQ ID NO:8)	(2037)	TAAATATACATTTATGTTATGACAAACCGACCGCTTA	
FAD3C' (SEQ ID NO:12)	(2703)	TAAATATACATTAATGTTATGACAAACCGACCGCCTA	
FAD3A'' (SEQ ID NO:9)	(2716)	AAAAGTTT--ATGATTTGTTAGTTTAAACAAAATAA	
FAD3C'' (SEQ ID NO:11)	(2835)	AATTTTITATGATTTTATAATGTTAG-----ACCATGATTA	
FAD3C (SEQ ID NO:10)	(2282)	-----TTTT-----	3081 3120
FAD3A (SEQ ID NO:7)	(1714)	-----	CAGTG
FAD3A' (SEQ ID NO:8)	(2077)	TTTGTATGGTGAATCTTTTAAATAC-TC--CCT-CAAT	
FAD3C' (SEQ ID NO:12)	(2743)	TTTGTATGGTGAATCTTCTAAATAC-IT--CCT-CCGAT	
FAD3A'' (SEQ ID NO:9)	(2755)	GGATCATTTGTTAAATACAAATTAATTTGAAATACGTT	
FAD3C'' (SEQ ID NO:11)	(2871)	CCCGGATTCATGAGTG-----GAGTTTTATGTT	
FAD3C (SEQ ID NO:10)	(2286)	-----	CAGTT
FAD3A (SEQ ID NO:7)	(1720)	TCAGGCTTG-----	3121 3160
FAD3A' (SEQ ID NO:8)	(2113)	TTATTTAGTTGAGATTTAGATTTATGACATAGATTAAT	
FAD3C' (SEQ ID NO:12)	(2779)	TTATTTAGTTGAGATTTTAGATTTATGACATAGATTAAT	
FAD3A'' (SEQ ID NO:9)	(2795)	TAAAGTTTGGTTATGAAAATAATCTTTGAAACTTTAA	
FAD3C'' (SEQ ID NO:11)	(2900)	AACGTT-----AAGAACAGTTTCTTAACTCCG	
FAD3C (SEQ ID NO:10)	(2292)	TGAGGCTAG-----	

図1J (続き)

【 図 1 K 1 】

FAD3A (SEQ ID NO:7)	(1729)	-----G---ACGACCAC	TTGTCAGATTGGTCG--	3161	3200
FAD3A' (SEQ ID NO:8)	(2153)	TAAAAATA----	TTTTGCACATTTTCAAAATAAAACAC		
FAD3C' (SEQ ID NO:12)	(2819)	AAAAATAAAAAATTTT	TGCCATTTTAAATAAAACAT		
FAD3A'' (SEQ ID NO:9)	(2835)	TTTAGAGTTTGCAAACT	TTAAATGTTAGATAGATAGTT		
FAD3C'' (SEQ ID NO:11)	(2930)	GTAAGAACCC--CA	AGTCCAAATCCAGGTTAAATG--		
FAD3C (SEQ ID NO:10)	(2301)	-----G---ACGACCAC	TTGTCAGATTGGTCG--		
FAD3A (SEQ ID NO:7)	(1753)	-----T-----	TTAGCTGTAG-----	3201	3240
FAD3A' (SEQ ID NO:8)	(2188)	CATTAC--TTAT	CAACTAACCATATTTCAACCAATAAAAA		
FAD3C' (SEQ ID NO:12)	(2859)	CACATA--TTAT	CACCAATATTTAACCATAAAAA		
FAD3A'' (SEQ ID NO:9)	(2875)	TTTTGGAGATGCAT	TTAGTGGTTATGGTAGTAACACAGA		
FAD3C'' (SEQ ID NO:11)	(2964)	-----ATGCTC	TTAGTATATA-----CAAA		
FAD3C (SEQ ID NO:10)	(2325)	-----T-----	TTAGCTGTAG-----		
FAD3A (SEQ ID NO:7)	(1764)	-----	-----	3241	3280
FAD3A' (SEQ ID NO:8)	(2227)	--TAAATT	AGAAAATATATATATATAAATTTTCTATTGGAAA		
FAD3C' (SEQ ID NO:12)	(2898)	A--TAAACT	AGAAAATATATATATATAAATTTTCTATTGGAAA		
FAD3A'' (SEQ ID NO:9)	(2915)	AAATGAAA	AATCTATATCTTTATACCTCCCTCCGTTTTTTA		
FAD3C'' (SEQ ID NO:11)	(2984)	TAAGGATC	ATTCTGTATA-----A		
FAD3C (SEQ ID NO:10)	(2336)	-----	-----		
FAD3A (SEQ ID NO:7)	(1764)	-----	-----	3281	3320
FAD3A' (SEQ ID NO:8)	(2265)	TTATAAAA	TAACTACTTATTTTAAAACGAAATTT-----AA		
FAD3C' (SEQ ID NO:12)	(2937)	TTATAAAA	ACGATCTTATTTTAAAACGAAATTTT-----AA		
FAD3A'' (SEQ ID NO:9)	(2955)	ATATAAG	TCTTTTACAGTTATACACGTAGATTAAAGAAAA		
FAD3C'' (SEQ ID NO:11)	(3002)	ATACAAA	TAAATTTTGAAGTTATGTTTGAAGTTTG-----		
FAD3C (SEQ ID NO:10)	(2336)	-----	-----		
FAD3A (SEQ ID NO:7)	(1764)	-----T-----	-----AAACAACG--	3321	3360
FAD3A' (SEQ ID NO:8)	(2299)	TTTACAC	ACGCAATTAACCTGAACCGGAAGAAATTTATA		
FAD3C' (SEQ ID NO:12)	(2973)	TTTACAC	ACGCAATTAACCTGAACCGGAAGAAATTTATA		
FAD3A'' (SEQ ID NO:9)	(2995)	CCATTA	ATTTTCTTATTTTCTAGACAAAGACCTCATTA		
FAD3C'' (SEQ ID NO:11)	(3036)	-----TTTTC--	GAAGAAACCACTTGA		
FAD3C (SEQ ID NO:10)	(2336)	-----T-----	-----AAACAACG--		
FAD3A (SEQ ID NO:7)	(1774)	--ATTTA	-----	3361	3400
FAD3A' (SEQ ID NO:8)	(2339)	ATACTTA	ATTAAGAGTTT-----AGAAAAATTGAA		
FAD3C' (SEQ ID NO:12)	(3013)	TTACTTA	ATTAAGAGTTT-----AGAAAAATTGAA		
FAD3A'' (SEQ ID NO:9)	(3035)	TTATTTAC	CTAACCAATTTCAACCAATATATAAATAGAA		
FAD3C'' (SEQ ID NO:11)	(3058)	AACTTA	-----AATTAGAGT---AA		

図1K

【 図 1 L 2 】

FAD3C' (SEQ ID NO:12)	(3229)	TACTTT	TATACATATATTATTTCTTCTAATTTGGTG		
FAD3A'' (SEQ ID NO:9)	(3272)	TACTTT	CTCT--CATTAAT--TTTCCCTTTTCAGTTTTGGGG		
FAD3C'' (SEQ ID NO:11)	(3217)	TACTTT	CTCT--CGTTAAT--TTTCCCTTTTCAGTTTTGGGG		
FAD3C (SEQ ID NO:10)	(2438)	TACTTT	CTCT--TAGTATT--TTT-----CAATTTGGAG	3641	3680
FAD3A (SEQ ID NO:7)	(1896)	TTTAC	GTAAGTAAAT-----AA-----AAAG-----		
FAD3A' (SEQ ID NO:8)	(2588)	TTT--CGTA	AAGTACTTTG--TCGTATTTTGAAGAACTA----		
FAD3C' (SEQ ID NO:12)	(3269)	TTT--CGTA	AAGTACTTTG--CCGTGTTTGAAGAACTA----		
FAD3A'' (SEQ ID NO:9)	(3309)	TTT--CGTA	AAGTACTTTGCTCTCAACTTTGAAAGCTATTAG		
FAD3C'' (SEQ ID NO:11)	(3254)	TTT--CGTA	AAGTACTTTGCTCTCAACTTTGAAAGCTATTAG		
FAD3C (SEQ ID NO:10)	(2468)	TTT--CGTA	AAGTACTTTG-----AA-----AAAG-----	3681	3720
FAD3A (SEQ ID NO:7)	(1918)	-AA	AAACTTATAAACACACC-----		
FAD3A' (SEQ ID NO:8)	(2621)	-AC	AAAAATATAAAACACAAA-----AGCTTATAA		
FAD3C' (SEQ ID NO:12)	(3303)	-AC	AAAAATATAAAACACAAA-----AGCTTATAA		
FAD3A'' (SEQ ID NO:9)	(3349)	TATA	AAACTTATAAACACATCCATGCAATGATTTATA		
FAD3C'' (SEQ ID NO:11)	(3294)	TATA	AA--CTTATAAACACAT-----GAAATATAA		
FAD3C (SEQ ID NO:10)	(2490)	-AA	AA--ACTTATAAACACACC-----	3721	3760
FAD3A (SEQ ID NO:7)	(1939)	-----	-----ACATCCAATGAAT--		
FAD3A' (SEQ ID NO:8)	(2651)	---AC	ACAT-----A--GCATCCAATGAATATG--		
FAD3C' (SEQ ID NO:12)	(3333)	---AC	ACAT-----A--GCATCCAATGAATATG--		
FAD3A'' (SEQ ID NO:9)	(3389)	CGA	ATACATACACGAAATGACAAATTTTCAATGAATATTT		
FAD3C'' (SEQ ID NO:11)	(3323)	CGA	ATACATACACGAAATGACAAATTTTCAATGAATATTT		
FAD3C (SEQ ID NO:10)	(2509)	-----	-----ACATCCAATGAAT--	3761	3800
FAD3A (SEQ ID NO:7)	(1953)	AA	TTCCAATATAA-----CCATACGTTAA-----		
FAD3A' (SEQ ID NO:8)	(2674)	TAC	GAATATAATACCAATACATA--TCATAGTACTATTT		
FAD3C' (SEQ ID NO:12)	(3353)	-----	-----ATAATATCAATACATA--TCATAGTACTATTT		
FAD3A'' (SEQ ID NO:9)	(3429)	AA	TCCACTAAGTACTACCTCCGTAATAGTAAATAG		
FAD3C'' (SEQ ID NO:11)	(3363)	AA	TCTACTAAGTACTACCTCCGTAATAGTAAAT--TAG		
FAD3C (SEQ ID NO:10)	(2523)	AA	TTCCAATATAA-----CCATACGTTAA-----		

図1L (続き)

【 図 1 K 2 】

FAD3C (SEQ ID NO:10)	(2346)	--ATTTA	-----	3401	3440
FAD3A (SEQ ID NO:7)	(1779)	-----	-----AATGTTTATGG		
FAD3A' (SEQ ID NO:8)	(2372)	AGACAT	GTTTATGCCAAACCTCATGTGAAGCTCTTTGAAAT		
FAD3C' (SEQ ID NO:12)	(3048)	AGACAT	GTTTATGCCAAACCTCATGTGAAGCTCTTTGAAAT		
FAD3A'' (SEQ ID NO:9)	(3075)	GATATAT	TACCATTGGTCAACACACATTAATTTATAATA		
FAD3C'' (SEQ ID NO:11)	(3077)	ACTCTAT	T-----TAGAG-----AATGTTTATGG		
FAD3C (SEQ ID NO:10)	(2351)	-----	-----AATGTTTATGG	3441	3480
FAD3A (SEQ ID NO:7)	(1791)	-----	-----TACT-----		
FAD3A' (SEQ ID NO:8)	(2412)	AATAGAT	TTTGGTATAAATATTTCAATTTCTTT-----		
FAD3C' (SEQ ID NO:12)	(3088)	AAAAAT	TTTGGTATAAATATTTTCAATTTCTA-----		
FAD3A'' (SEQ ID NO:9)	(3115)	ATTTT	TACATAG--AAACCGAAACGACATAAATTTGGAA		
FAD3C'' (SEQ ID NO:11)	(3102)	AGGT	TACGCACTAAGTACAGAAATGA-----		
FAD3C (SEQ ID NO:10)	(2363)	-----	-----TACT-----	3481	3520
FAD3A (SEQ ID NO:7)	(1795)	-----	-----	3521	3560
FAD3A' (SEQ ID NO:8)	(2446)	-----	-----AAAAATAAATATATATATAATAAT--		
FAD3C' (SEQ ID NO:12)	(3121)	-----	-----AAAAATAAATATATAAATAATAATAAT--		
FAD3A'' (SEQ ID NO:9)	(3154)	C	AAAAAATTTCTTAAACAGCATTAATATAAAACGGA		
FAD3C'' (SEQ ID NO:11)	(3128)	-----	-----AAAATCTAT--ACTTTAT--		
FAD3C (SEQ ID NO:10)	(2367)	-----	-----		
FAD3A (SEQ ID NO:7)	(1795)	-----G---	TAGTAACTTTAACACACGGGCACTTATATTC		
FAD3A' (SEQ ID NO:8)	(2473)	-----T	TGATATAAATCTCGCTAAACACTCCTATGTCAA		
FAD3C' (SEQ ID NO:12)	(3153)	-----T	TGATATAAATCTCGCTAAACACTCCTATGTCAA		
FAD3A'' (SEQ ID NO:9)	(3194)	GGGAG	TAGTACCCTTTAACCTGGGCACTTATATTC		
FAD3C'' (SEQ ID NO:11)	(3145)	-----AG	TACCCTTTAACCTGGGCACTTATATTC		
FAD3C (SEQ ID NO:10)	(2367)	-----G---	TAGTAACTTTAACACACGGGCACTTATATTC		
FAD3A (SEQ ID NO:7)	(1828)	GAG	CCATTGG--CATAAATGATT--CTCTCGAAATCTGTT		
FAD3A' (SEQ ID NO:8)	(2509)	ATG	CTTTTAT--TTGAAATTTCTTACTCTCTAAATGCAT		
FAD3C' (SEQ ID NO:12)	(3189)	ATG	CTTTTAT--TTGAAATTTCTTACTCTCTAAATGCAT		
FAD3A'' (SEQ ID NO:9)	(3234)	CGT	CTCTTAG--CATAAATGATT--CTCTCGAAATCTGTT		
FAD3C'' (SEQ ID NO:11)	(3179)	GAG	CTTAG--CATAAATGATT--CTCTCGAAATCTGTT		
FAD3C (SEQ ID NO:10)	(2400)	GAG	CCATTGG--CATAAATGATT--CTCTCGAAATCTGTT	3601	3640
FAD3A (SEQ ID NO:7)	(1866)	TACT	TTTCT--TAGTATT--TTT-----CA@TTTTGTAG		
FAD3A' (SEQ ID NO:8)	(2548)	TACT	TTTATACATATATATTTTCTTCTCTAATTTGGG		

図1K (続き)

【 図 1 L 1 】

FAD3A (SEQ ID NO:7)	(1795)	-----	-----	3801	3840
FAD3A' (SEQ ID NO:8)	(2446)	-----	-----		
FAD3C' (SEQ ID NO:12)	(3121)	-----	-----		
FAD3A'' (SEQ ID NO:9)	(3154)	C	AAAAAATTTCTTAAACAGCATTAATATAAAACGGA		
FAD3C'' (SEQ ID NO:11)	(3128)	-----	-----AAAATCTAT--ACTTTAT--		
FAD3C (SEQ ID NO:10)	(2367)	-----	-----		
FAD3A (SEQ ID NO:7)	(1795)	-----G---	TAGTAACTTTAACACACGGGCACTTATATTC		
FAD3A' (SEQ ID NO:8)	(2473)	-----T	TGATATAAATCTCGCTAAACACTCCTATGTCAA		
FAD3C' (SEQ ID NO:12)	(3153)	-----T	TGATATAAATCTCGCTAAACACTCCTATGTCAA		
FAD3A'' (SEQ ID NO:9)	(3194)	GGGAG	TAGTACCCTTTAACCTGGGCACTTATATTC		
FAD3C'' (SEQ ID NO:11)	(3145)	-----AG	TACCCTTTAACCTGGGCACTTATATTC		
FAD3C (SEQ ID NO:10)	(2367)	-----G---	TAGTAACTTTAACACACGGGCACTTATATTC		
FAD3A (SEQ ID NO:7)	(1828)	GAG	CCATTGG--CATAAATGATT--CTCTCGAAATCTGTT		
FAD3A' (SEQ ID NO:8)	(2509)	ATG	CTTTTAT--TTGAAATTTCTTACTCTCTAAATGCAT		
FAD3C' (SEQ ID NO:12)	(3189)	ATG	CTTTTAT--TTGAAATTTCTTACTCTCTAAATGCAT		
FAD3A'' (SEQ ID NO:9)	(3234)	CGT	CTCTTAG--CATAAATGATT--CTCTCGAAATCTGTT		
FAD3C'' (SEQ ID NO:11)	(3179)	GAG	CTTAG--CATAAATGATT--CTCTCGAAATCTGTT		
FAD3C (SEQ ID NO:10)	(2400)	GAG	CCATTGG--CATAAATGATT--CTCTCGAAATCTGTT	3641	3680
FAD3A (SEQ ID NO:7)	(1866)	TACT	TTTCT--TAGTATT--TTT-----CA@TTTTGTAG		
FAD3A' (SEQ ID NO:8)	(2548)	TACT	TTTATACATATATATTTTCTTCTCTAATTTGGG		

図1L

【 図 1 M 1 】

FAD3A (SEQ ID NO:7)	(1981)	---T	ATAAT-----T-----AA---	3801	3840
FAD3A' (SEQ ID NO:8)	(2713)	TCCA	AGTACT--T-----AATCTTGATATC		
FAD3C' (SEQ ID NO:12)	(3385)	TGCA	AGTACT--T-----AATCTTGATATC		
FAD3A'' (SEQ ID NO:9)	(3469)	TCAT	ATAATTTTITTTTGTCTCAACCAACACGTAATAG		
FAD3C'' (SEQ ID NO:11)	(3398)	TA	TAGTAAT-----AGTAAATAG		
FAD3C (SEQ ID NO:10)	(2551)	---T	ATAAT-----T-----TA---	3841	3880
FAD3A (SEQ ID NO:7)	(1991)	-CA	TTTTAATCTTAATTTTGCATTCAGTTCCAGAAAAG		
FAD3A' (SEQ ID NO:8)	(2736)	TAA	ATTTCTTTAATTTTGTCTTCTTACCTTACCGAAAAG		
FAD3C' (SEQ ID NO:12)	(3408)	TAA	ATTTCTTTAATTTTGTCTTCTTACCTTACCGAAAAG		
FAD3A'' (SEQ ID NO:9)	(3509)	TAA	TATTAATATAATTAATGATTTTCAGTTCCAGAAAAG		
FAD3C'' (SEQ ID NO:11)	(3416)	TCAT	TATTAATATAATTAATGATTTTCAGTTCCAGAAAAG		
FAD3C (SEQ ID NO:10)	(2561)	-CA	TTTTAATCTTAATTTTGCATTCAGTTCCAGAAAAG	3881	3920
FAD3A (SEQ ID NO:7)	(2030)	TT	TACAGAATTTGCCCCAGTACACGGAGCTCAGAT		
FAD3A' (SEQ ID NO:8)	(2776)	TT	TACAGAATTTGCCCAAGTACCTGGAGCTCAGAT		
FAD3C' (SEQ ID NO:12)	(3448)	TT	TACAGAATTTGCCCAAGTACCTGGAGCTCAGAT		
FAD3A'' (SEQ ID NO:9)	(3549)	TTG	TACAGAACCTGCCCAAGTACCTGGAGCTCAGAT		
FAD3C'' (SEQ ID NO:11)	(3456)	TTG	TACAGAACCTGCCCAAGTACCTGGAGCTCAGAT		
FAD3C (SEQ ID NO:10)	(2600)	TT	TACAGAATTTGCCCCAGTACACGGAGCTCAGAT	3921	3960
FAD3A (SEQ ID NO:7)	(2070)	AC	ACTGTCTCCCTCTCCCAAGCTCGCTTACCCTCTCTATCT		
FAD3A' (SEQ ID NO:8)	(2816)	AC	ACTGTCTCCCTCTCCCAAGCTCGCTTACCCTCTCTATCT		
FAD3C' (SEQ ID NO:12)	(3488)	AC	ACTGTCTCCCTCTCCCAAGCTCGCTTACCCTCTCTATCT		
FAD3A'' (SEQ ID NO:9)	(3589)	AC	ACTGTCTCCCTCTCCCAAGCTCGCTTACCCTCTCTATCT		
FAD3C'' (SEQ ID NO:11)	(3496)	AC	ACTGTCTCCCTCTCCCAAGCTCGCTTACCCTCTCTATCT		
FAD3C (SEQ ID NO:10)	(2640)	AC	ACTGTCTCCCTCTCCCAAGCTCGCTTACCCTCTCTATCT	3961	4000
FAD3A (SEQ ID NO:7)	(2110)	GG	TAATCCTAATCTCTCATTTTCTTCTCGATTAAT		
FAD3A' (SEQ ID NO:8)	(2856)	GG	TAT-----TTTAAATCCTAATAATTTACT		
FAD3C' (SEQ ID NO:12)	(3528)	GG	TAT-----TTTAAATCCTAATAATTTACT		
FAD3A'' (SEQ ID NO:9)	(3629)	GG	TAAAAAATA--TACAAITTCATTTTCTTTAAAT		
FAD3C'' (SEQ ID NO:11)	(3536)	GG	TAAAAAATA--TACAAITTCATTTTCTTTAAAT		
FAD3C (SEQ ID NO:10)	(2680)	GG	TAATCCTAATCTCTCATTTTCTTCTCGATTAAT	4001	4040
FAD3A (SEQ ID NO:7)	(2150)	ACA	ATTTGAAATTTTAGATTTGAGTATTA--CTAAT		
FAD3A' (SEQ ID NO:8)	(2883)	ACA	AGT-----CATTTTAGAC--TGIGTTTAA--ACAAT		
FAD3C' (SEQ ID NO:12)	(3555)	ACA	ATTT-----CATTTTAGAC--TGIGTTTAA--ACAAT		
FAD3A'' (SEQ ID NO:9)	(3668)	ACA	ATTT-----GGTTTATAITTTGAGTTTAAAGCAATAT		
FAD3C'' (SEQ ID NO:11)	(3573)	ACA	ATTT-----GATTTTATAITTTGAGTTTAAAGCAATAT		

図1M

【 図 1 M 2 】

FAD3C (SEQ ID NO:10) (2720) ACAAATTTGAATTTTATGATTGAGTATTAA--CTAAAT
4041 4080

FAD3A (SEQ ID NO:7) (2188) ATAAATTAATTTGTTGGGGATGA-CTACAGTGGTACAG
FAD3A' (SEQ ID NO:8) (2915) ATAA-TTATTTTTG-TTGGTTTAA-CTGAGTGGTACAG
FAD3C' (SEQ ID NO:12) (3587) ATAAATTAATTTTCTTTGGTTTAA-CTGAGTGGTACAG
FAD3A'' (SEQ ID NO:9) (3704) ATAAATTAATTTGATTGATTTAACTACAGTGGTACAG
FAD3C'' (SEQ ID NO:11) (3609) ATAAATTAATTTGATTGATTTAACTACAGTGGTACAG
FAD3C (SEQ ID NO:10) (2758) ATAAATTAATTTGTTGGGGATGA-CTACAGTGGTACAG
4081 4120

FAD3A (SEQ ID NO:7) (2227) AAGTCTGGTAAAGAAGGGTCACATTAAACCCATACAGT
FAD3A' (SEQ ID NO:8) (2952) AAGTCTGGTAAAGAAGGGTCACATTAAACCCATACAGT
FAD3C' (SEQ ID NO:12) (3626) AAGTCTGGTAAAGAAGGGTCACATTAAACCCATACAGT
FAD3A'' (SEQ ID NO:9) (3744) AAGTCTGGTAAAGAAGGGTCACATTAAACCCATACAGT
FAD3C'' (SEQ ID NO:11) (3649) AAGTCTGGTAAAGAAGGGTCACATTAAACCCATACAGT
FAD3C (SEQ ID NO:10) (2797) AAGTCTGGTAAAGAAGGGTCACATTAAACCCATACAGT
4121 4160

図1M (続き)

【 図 1 N 1 】

FAD3A (SEQ ID NO:7) (2267) AGTTTATTTGCCCCAAGCGAGAGAAAGCTTATTGGCAACTT
FAD3A' (SEQ ID NO:8) (2992) GGTTTATTTGCTCCAAGCGAGAGAAAGCTTATTGGCAACTT
FAD3C' (SEQ ID NO:12) (3666) GGTTTATTTGCTCCAAGCGAGAGAAAGCTTATTGGCAACTT
FAD3A'' (SEQ ID NO:9) (3784) AGTTTATTTGCTCCAAGCGAGAGAAAGCTTATTGGCAACTT
FAD3C'' (SEQ ID NO:11) (3689) AGTTTATTTGCTCCAAGCGAGAGAAAGCTTATTGGCAACTT
FAD3C (SEQ ID NO:10) (2837) AGTTTATTTGCCCCAAGCGAGAGAAAGCTTATTGGCAACTT
4161 4200

FAD3A (SEQ ID NO:7) (2307) CAACJACTTGTCTGGTCCATATGTTGGCCACTCTTGTITTA
FAD3A' (SEQ ID NO:8) (3032) CGACJACTTGTCTGGTCCATATGTTGGCCAATCTTATCTGTG
FAD3C' (SEQ ID NO:12) (3706) CAACJACTTGTCTGGTCCATATGTTGGCCAATCTTATCTGTG
FAD3A'' (SEQ ID NO:9) (3824) CAACJACTTGTCTGGTCCATATGTTGGCCACTCTTGTITTA
FAD3C'' (SEQ ID NO:11) (3729) CAACJACTTGTCTGGTCCATATGTTGGCCACTCTTGTITTA
FAD3C (SEQ ID NO:10) (2877) CAACJACTTGTCTGGTCCATATGTTGGCCACTCTTGTITTA
4201 4240

FAD3A (SEQ ID NO:7) (2347) TCTATCATCTCCTCGTTGCTCCAGTCACAGTCTCAAAAGTC
FAD3A' (SEQ ID NO:8) (3072) TCTITCCTTCCTCGTTGCTCCAGTCACAGTCTCAAAAGTC
FAD3C' (SEQ ID NO:12) (3746) TCTITCCTTCCTCGTTGCTCCAGTCACAGTCTCAAAAGTC
FAD3A'' (SEQ ID NO:9) (3864) TCTATCGTTCCTCGTTGCTCCAGTCACAGTCTCAAAAGTC
FAD3C'' (SEQ ID NO:11) (3769) TCTATCGTTCCTCGTTGCTCCAGTCACAGTCTCAAAAGTC
FAD3C (SEQ ID NO:10) (2917) TCTATCATCTCCTCGTTGCTCCAGTCACAGTCTCAAAAGTC
4241 4280

FAD3A (SEQ ID NO:7) (2387) TAAGG/TGTTCTTACAT/GTAAGTTTCATA-TAT TTC--
FAD3A' (SEQ ID NO:8) (3112) TAAGG/TGTTCTTACAT/GTAAGTTTCTTAGTATA TCATA
FAD3C' (SEQ ID NO:12) (3786) TAAGG/TGTTCTTACAT/GTAAGTTTCTTAGTATA TCATA
FAD3A'' (SEQ ID NO:9) (3904) TAAGG/TGTTCTTACAT/GTAAGTTTCATA-TAT TATTAC
FAD3C'' (SEQ ID NO:11) (3809) TAAGG/TGTTCTTACAT/GTAAGTTTCATA-TAT TATTAC
FAD3C (SEQ ID NO:10) (2957) TAAGG/TGTTCTTACAT/GTAAGTTTCATA-TAT TTC--
4281 4320

FAD3A (SEQ ID NO:7) (2423) -----AT TAT TATATCATTGCTAATA TA-----AT
FAD3A' (SEQ ID NO:8) (3152) AAGGTATA TAT TAT TATTC AATATA TACTACTATGAT
FAD3C' (SEQ ID NO:12) (3826) AAGGTATA TAT TAT TATTC AATATA TACTACTATGAT
FAD3A'' (SEQ ID NO:9) (3943) AAGAG-AT TAT TATAT TATTAATAATAA-----TT
FAD3C'' (SEQ ID NO:11) (3848) AAGAA-AT TAT TATAT TATTAATAATAA-----TT
FAD3C (SEQ ID NO:10) (2993) -----TT TAT TATATCATGCTAATA TA-----AT
4321 4360

FAD3A (SEQ ID NO:7) (2448) TTGTTTTTGACATAAA-GTTTGGAAAAATTTCAGATCTT
FAD3A' (SEQ ID NO:8) (3192) TTGTTTTTGACATAA-TTTTG--AAA TATTCAGATCTT
FAD3C' (SEQ ID NO:12) (3866) TTGTTTTTGACATAAA-CITTTG--AAA T--TCAGATCTT
FAD3A'' (SEQ ID NO:9) (3973) TTGTTTTTGACATAAA-GTTTGGAAAAATTTCAGATCTT
FAD3C'' (SEQ ID NO:11) (3878) TTGTTTTTGACATAAG-GTTTGGAAAAATTTCAGATCTT

図1N

【 図 1 N 2 】

FAD3C (SEQ ID NO:10) (3018) TGTCTTTTGACATAAAGTTTGGAAAAATTTCAGATCTT
4361 4400

FAD3A (SEQ ID NO:7) (2487) TGTATGTGGTTGGACGCTGTCCACTTACTTGCATCAICAT
FAD3A' (SEQ ID NO:8) (3229) TGTATGTGGTTGGACGCTGTCCACTTACTTGCATCAICAT
FAD3C' (SEQ ID NO:12) (3901) TGTATGTGGTTGGACGCTGTCCACTTACTTGCATCAICAT
FAD3A'' (SEQ ID NO:9) (4012) TGTATGTGGTTGGACGCTGTCCACTTACTTGCATCAICAT
FAD3C'' (SEQ ID NO:11) (3917) TGTATGTGGTTGGACGCTGTCCACTTACTTGCATCAICAT
FAD3C (SEQ ID NO:10) (3058) TGTATGTGGTTGGACGCTGTCCACTTACTTGCATCAICAT
4401 4440

FAD3A (SEQ ID NO:7) (2527) GGTCAIGATGATAAG/TGCCTTGGTACAGAGGCAAGGTAA
FAD3A' (SEQ ID NO:8) (3269) GGTCAIGATGATAAG/TGCCTTGGTACAGAGGCAAGGTAA
FAD3C' (SEQ ID NO:12) (3941) GGTCAIGATGATAAG/TGCCTTGGTACAGAGGCAAGGTAA
FAD3A'' (SEQ ID NO:9) (4052) GGTCAIGATGATAAG/TGCCTTGGTACAGAGGCAAGGTAA
FAD3C'' (SEQ ID NO:11) (3957) GGTCAIGATGATAAG/TGCCTTGGTACAGAGGCAAGGTAA
FAD3C (SEQ ID NO:10) (3098) GGTCAIGATGATAAG/TGCCTTGGTACAGAGGCAAGGTAA

図1N (続き)

【 図 1 O 1 】

4441 4480

FAD3A (SEQ ID NO:7) (2567) CTAGATCAACATT-----AATTTATA-----G
FAD3A' (SEQ ID NO:8) (3309) TTAATTAACATAATACAA--GATTTTAC-----A
FAD3C' (SEQ ID NO:12) (3981) TTAATTAACATCCATAGT--GATTTTCCCGTCTCATGTA
FAD3A'' (SEQ ID NO:9) (4092) ATAAATCAATTTTTAAAGAAGTGTACAG-----A
FAD3C'' (SEQ ID NO:11) (3997) TTAATCAATTTTTAAAGAAGTGTACAG-----A
FAD3C (SEQ ID NO:10) (3138) CTAGATCAACATT-----A-TTATAA-----G
4481 4520

FAD3A (SEQ ID NO:7) (2590) AAGCAACAATGATTACTAT-ITGATTAATCTA-AAITATT
FAD3A' (SEQ ID NO:8) (3337) AAAAACTAATGATTAGTATAITGATTAATCTAATCTT
FAD3C' (SEQ ID NO:12) (4019) CGGATAAATATTTCTAAAGTAAATATACTATAAATATT
FAD3A'' (SEQ ID NO:9) (4123) AAGCAATAATGTTAGTA--ITGATTAATCT--AAITTTT
FAD3C'' (SEQ ID NO:11) (4028) AAGCAATAATGTTAGTA--ITGATTAATCT--AAITTTT
FAD3C (SEQ ID NO:10) (3160) AAGCAATAATGATTAGTAG-ITGATTAATCTG-AAITTTT
4521 4560

FAD3A (SEQ ID NO:7) (2628) GATGTTTTGTGACATAAATAGGAATGGAGTTATTACCT
FAD3A' (SEQ ID NO:8) (3377) GATGTTTTGTGATTAATAATAGGAATGGAGTTACTACCT
FAD3C' (SEQ ID NO:12) (4059) AATTTGTTATTTATTTTAAATTTTAAATAGTTTATAATTT
FAD3A'' (SEQ ID NO:9) (4160) GATGTTTTGCAATCAATAAATAGGAATGGAGTTATTACCT
FAD3C'' (SEQ ID NO:11) (4065) GATGTTTTGCAATCAATAAATAGGAATGGAGTTATTACCT
FAD3C (SEQ ID NO:10) (3198) GATGTTTT--GTGACATAAATAGGAATGGAGTTATTACCT
4561 4600

FAD3A (SEQ ID NO:7) (2668) GGAGGATTAACAACACTATTGATAGG----ATTACGG-GA
FAD3A' (SEQ ID NO:8) (3417) GGAGGATTAACAACACTATTGATAGG----ATTACGG-AA
FAD3C' (SEQ ID NO:12) (4099) GTAIGCATGATTTATATTAATAAAATTTATATTACTTTAA
FAD3A'' (SEQ ID NO:9) (4200) GGAGGATTAACAACACTATTGATAGG----ATTACGG-AA
FAD3C'' (SEQ ID NO:11) (4105) GGAGGATTAACAACACTATTGATAGG----ATTACGG-AA
FAD3C (SEQ ID NO:10) (3237) GGAGGATTAACAACACTATTGATAGG----ATTACGG-GA
4601 4640

FAD3A (SEQ ID NO:7) (2702) TCTTCAACAACATTCATCAGCALATTGGAACCTCAGGTGAT
FAD3A' (SEQ ID NO:8) (3451) TTTTCAACAACATTCATCAGCALATTGGAACCTCAGGTGAT
FAD3C' (SEQ ID NO:12) (4139) TTTAATAATATGATTT-TATATAIGTTTATCTTAAICGGTT
FAD3A'' (SEQ ID NO:9) (4234) TCTTCAACAACATTCATCAGCALATTGGAACCTCAGGTGAT
FAD3C'' (SEQ ID NO:11) (4139) TCTTCAACAACATTCATCAGCALATTGGAACCTCAGGTGAT
FAD3C (SEQ ID NO:10) (3271) TCTTCAACAACATTCATCAGCALATTGGAACCTCAGGTGAT
4641 4680

FAD3A (SEQ ID NO:7) (2742) CCATCATTTTTCCCAACAATCCCTCACTATCACTTTGGTT
FAD3A' (SEQ ID NO:8) (3491) CCATCATTTTTCCCAACAATCCCTCACTATCACTTTGGTT
FAD3C' (SEQ ID NO:12) (4178) TTGTTGTTTTTACAGTGCATTTAGT--TATCATTTGGGT
FAD3A'' (SEQ ID NO:9) (4274) CCATCATTTTTCCCAACAATCCCTCACTATCACTTTGGTT
FAD3C'' (SEQ ID NO:11) (4179) CCATCATTTTTCCCAACAATCCCTCACTATCACTTTGGTT

図1O

【 図 1 O 2 】

FAD3C (SEQ ID NO:10) (3311) GCATCATCTTTTCCCAAAATCCCTCACTATCACTGGTC
4681 4720
FAD3A (SEQ ID NO:7) (2782) GATGGCGTGAGTGATCTCGCT----CTCTCTC---TAGCTT
FAD3A' (SEQ ID NO:8) (3531) GATGGCGTGAGTGATCTCACTCTCGGCTAC-----TTT
FAD3C' (SEQ ID NO:12) (4215) -AAATGGATTGCATCTCAGAAATCAACTGTAATATTTT
FAD3A'' (SEQ ID NO:9) (4314) GATGGCGTGAGTGATCTAGCTTTCTCTCTCTC---TAGCTT
FAD3C'' (SEQ ID NO:11) (4219) GATGGCGTGAGTGATCTAGCTTTCTCTCTCTC---TAGCTT
FAD3C (SEQ ID NO:10) (3351) GATGGCGTGAGTGATCTCGCT----CTCTCTC---TAGCTT
4721 4760
FAD3A (SEQ ID NO:7) (2815) TCATTTGATTAATA--TTAAAGGCTGATTAATTAAT
FAD3A' (SEQ ID NO:8) (3565) CATCAAAACCAITTTGATTAAGGCTGATTAATTAATTAAT
FAD3C' (SEQ ID NO:12) (4254) TATTTTAACTAAT--TAAATTTTGATTAATTTCTTAT
FAD3A'' (SEQ ID NO:9) (4351) TCATTTGATTAATA-----TG-GTGATTAATTAATTAAT
FAD3C'' (SEQ ID NO:11) (4256) TCATTTGATTAATA-----TG-GTGATTAATTAATTAAT
FAD3C (SEQ ID NO:10) (3384) TCATTTGATTAATA--TTAAAGGCTGATTAATTAATTAAT
4761 4800

図1O (続き)

【 図 1 P 1 】

FAD3A (SEQ ID NO:7) (2853) TAGTGATCTTAAATTAATGATATGCG-ACAGACGAATCAG
FAD3A' (SEQ ID NO:8) (3605) TAGTGATTTA-ACAATGGAATGTGACAGACGAAGCAG
FAD3C' (SEQ ID NO:12) (4292) T--TCATTT----AGGTGGTGTGTCTTAGACTT---
FAD3A'' (SEQ ID NO:9) (4383) TA-----A-TTAAATGAAITGTGGACAGACGAGCAG
FAD3C'' (SEQ ID NO:11) (4288) TA-----A-TTAAATGAAITGTGGACAGACGAGCAG
FAD3C (SEQ ID NO:10) (3421) TAGTGATCTTAAATTAATGATATGCG-ACAGACGAAGCAG
4801 4840
FAD3A (SEQ ID NO:7) (2892) CTAACATGTGTTGGGAAGTACTACAGAGAACCACAC
FAD3A' (SEQ ID NO:8) (3644) CTAACATGTGTTGGGAAGTACTACAGAGAACCACAC
FAD3C' (SEQ ID NO:12) (4322) -TAAATATATTTTATAAGATTAATGATAACTTAATATAT
FAD3A'' (SEQ ID NO:9) (4414) CTAACATGTGTTAGGAAGTACTACAGAGACGCGAACAC
FAD3C'' (SEQ ID NO:11) (4319) CTAACATGTGTTAGGAAGTACTACAGAGACGCGAACAC
FAD3C (SEQ ID NO:10) (3460) CTAACATGTGTTGGGAAGTACTACAGAGAACCACAC
4841 4880
FAD3A (SEQ ID NO:7) (2932) GTCAGGAGC---AAT--ACCGATCCACTTGTGGAAAGT
FAD3A' (SEQ ID NO:8) (3684) GTCAGGAGC---AAT--ACCGATCCACTTGTGGAAAGT
FAD3C' (SEQ ID NO:12) (4361) ATATTGTCITAAATGAATTAATAATAATAATAATGTT
FAD3A'' (SEQ ID NO:9) (4454) GTCAGGAGC---AAT--ACCGATCCACTTGTGGAAAGT
FAD3C'' (SEQ ID NO:11) (4359) GTCAGGAGC---AAT--ACCGATCCACTTGTGGAAAGT
FAD3C (SEQ ID NO:10) (3500) GTCAGGAGC---AAT--ACCGATCCACTTGTGGAAAGT
4881 4920
FAD3A (SEQ ID NO:7) (2966) TTGCTGGCACTATTAAAGAAAGATCATACGCTACATGACA
FAD3A' (SEQ ID NO:8) (3718) TTGCTGGCACTATTAAAGAAAGATCATACGCTACATGACA

図1P

【 図 1 Q 2 】

FAD3A' (SEQ ID NO:8) (3946) TATTCCATT-----TACA--CTGAAAAATACAAATTTT
FAD3C' (SEQ ID NO:12) (4634) GGTTCATTAAGTTCTACAAACATAAAACATAACATTTA
FAD3A'' (SEQ ID NO:9) (4704) ATTTACGTT-----ACAATAAGTGGAAAGTTT--GTTAT
FAD3C'' (SEQ ID NO:11) (4611) ATTTACGTT-----ACAATAAGTGGAAAGTTT--GTTAT
FAD3C (SEQ ID NO:10) (3755) ATTTACATT-----ACAATAAGTGGAAAGTTT--GTTCTG
5161 5200
FAD3A (SEQ ID NO:7) (3215) TTTTCTTTATGTTTTAGTTTACAA--TA--ATAAAG--
FAD3A' (SEQ ID NO:8) (3978) AAAGGT-TGAAAAGAAAGACAAATTTCT--AGAAATGA
FAD3C' (SEQ ID NO:12) (4674) AAAACTGTGATTAATTTGTAACATTTGATCAACAATGA
FAD3A'' (SEQ ID NO:9) (4736) CTTTTCTCTAGTTGCAATCAAAAGG-----
FAD3C'' (SEQ ID NO:11) (4643) CTTTTCTCTGGTTGCAATCAAAAGG-----
FAD3C (SEQ ID NO:10) (3788) TTTTTCTATGTTTTAGTTTACAAACTTAC--AATCAAAA
5201 5240
FAD3A (SEQ ID NO:7) (3248) -----
FAD3A' (SEQ ID NO:8) (4014) C-----
FAD3C' (SEQ ID NO:12) (4714) TTTATTTTAAATTTTAAATTTTAACTTTA
FAD3A'' (SEQ ID NO:9) (4762) -----
FAD3C'' (SEQ ID NO:11) (4669) -----
FAD3C (SEQ ID NO:10) (3826) AG-----
5241 5280
FAD3A (SEQ ID NO:7) (3248) -----
FAD3A' (SEQ ID NO:8) (4015) -----
FAD3C' (SEQ ID NO:12) (4754) AAAATAAGCAGTGAACAAAAGTGAATTTGTAAT
FAD3A'' (SEQ ID NO:9) (4762) -----
FAD3C'' (SEQ ID NO:11) (4669) -----
FAD3C (SEQ ID NO:10) (3828) -----
5281 5320
FAD3A (SEQ ID NO:7) (3248) -----
FAD3A' (SEQ ID NO:8) (4015) -----
FAD3C' (SEQ ID NO:12) (4794) AATATATACAAGTAAATATAATTTTAAAGTTTATAAA
FAD3A'' (SEQ ID NO:9) (4762) -----
FAD3C'' (SEQ ID NO:11) (4669) -----
FAD3C (SEQ ID NO:10) (3828) -----
5321 5360
FAD3A (SEQ ID NO:7) (3248) -----
FAD3A' (SEQ ID NO:8) (4015) -----
FAD3C' (SEQ ID NO:12) (4834) AAAATTCCTTTTAAATATATGATATGTTTTTTGGAAAA
FAD3A'' (SEQ ID NO:9) (4762) -----
FAD3C'' (SEQ ID NO:11) (4669) -----
FAD3C (SEQ ID NO:10) (3828) -----
5361 5400

図1Q (続き)

【 図 1 P 2 】

FAD3C' (SEQ ID NO:12) (4401) CTGATTCATAATACATAAATTAATATACGATAAT-ATT
FAD3A'' (SEQ ID NO:9) (4488) TTGCTCGCAAGTATTAAAAAAGATCATACGCTCAGTGACA
FAD3C'' (SEQ ID NO:11) (4393) TTGCTCGCAAGTATTAAAAAAGATCATACGCTCAGTGACA
FAD3C (SEQ ID NO:10) (3534) TTGCTCGCAAGTATTAAAAAAGATCATACGCTCAGTGACA
4921 4960
FAD3A (SEQ ID NO:7) (3006) CTG--GTGATATGTCTTCTACG--AGACAGATCCAGAT
FAD3A' (SEQ ID NO:8) (3758) CTG--GTGATATGTCTTCTACG--AGACATGATCCAGAT
FAD3C' (SEQ ID NO:12) (4440) CTGAGTCTCATGCATATATATATATAAATTTTCAAAAG
FAD3A'' (SEQ ID NO:9) (4528) CTG--GTGATATGTCTTCTACG--AGACAGATCCAGAT
FAD3C'' (SEQ ID NO:11) (4433) CTG--GTGATATGTCTTCTACG--AGACAGATCCAGAT
FAD3C (SEQ ID NO:10) (3574) CTG--GTGATATGTCTTCTACG--AGACAGATCCAGAT
4961 5000
FAD3A (SEQ ID NO:7) (3041) CTCTACGTT-TAGTCTTCGACAA-ATCCAAAATCAACTA
FAD3A' (SEQ ID NO:8) (3793) CTCTACGTT-TAGTCTTCGTCAA-ATCCAAAATCAACTA
FAD3C' (SEQ ID NO:12) (4480) AACAAAATGTAACATTTGGTAAATATITACAGTAAATTA
FAD3A'' (SEQ ID NO:9) (4563) CTCTACGTT-TAGTCTTCGACAA-ATCTAAAATCAATTA
FAD3C'' (SEQ ID NO:11) (4468) CTCTACGTT-TAGTCTTCGACAA-ATCTAAAATCAATTA
FAD3C (SEQ ID NO:10) (3609) CTCTACGTT-TAGTCTTCGACAA-ATCCAAAATCAATTA
5001 5040
FAD3A (SEQ ID NO:7) (3079) ACCTTCTCTCCTAGCTCTATTTAG-----GAATAA
FAD3A' (SEQ ID NO:8) (3831) ACCTTCTCTCCCCCTTTTGTTTAGCACTATTATGAATA
FAD3C' (SEQ ID NO:12) (4520) AAATATTTTATAAATTTCTAAATA--ACT--TTATGATTT
FAD3A'' (SEQ ID NO:9) (4601) ACTTCTCTCCTAGCTCTATT-AG-----GAATAA
FAD3C'' (SEQ ID NO:11) (4506) ACTTCTCTCCTAGCTCTATT-AG-----GAATAA
FAD3C (SEQ ID NO:10) (3647) ACTTCTCTCCTAGCTCTATTTAG-----GAATAA
5041 5080
FAD3A (SEQ ID NO:7) (3109) AACAGTCTTTTGGTTTTACTTATTTCTGGTGGTTTTAA
FAD3A' (SEQ ID NO:8) (3871) A--CCAGTTTTTTTT--ACTTATATATGTTGTTTTAA
FAD3C' (SEQ ID NO:12) (4556) A--ATTTATGAAATGGAACTGAATTTTATTTAAATPAT
FAD3A'' (SEQ ID NO:9) (4630) A-CACCTCTCTCTTT-ACTTATTTGTTCTGCTTT-AA
FAD3C'' (SEQ ID NO:11) (4535) A-CACCTCTCTCTTT-ACTTATTTGTTCTGCTTT-AA
FAD3C (SEQ ID NO:10) (3677) AACACTCTTTTGGTTTT-ACTTATTTCTGGTGGTTTTAA
5081 5120

図1P (続き)

【 図 1 Q 1 】

FAD3A (SEQ ID NO:7) (3149) GTTAAA-TGACTCCTGAAACITTTTTTA-ATTAATCT
FAD3A' (SEQ ID NO:8) (3906) GTTAAAATGTAAGTCTGAAACITTTTAAATTTAGATAT
FAD3C' (SEQ ID NO:12) (4594) GTTAAAATGTAAGACATTTGCTGGTATTTGCTTAT
FAD3A'' (SEQ ID NO:9) (4667) GTTAAAATGTAAGTCTGAAACITTTTT-ATTAATCT
FAD3C'' (SEQ ID NO:11) (4572) GTTAAAATGTAAGTCTGAAACITTTTT-ATTAATCT
FAD3C (SEQ ID NO:10) (3716) GTTAAAATGTAAGTCTGAAACITTTTT-ATTAATCT
5121 5160
FAD3A (SEQ ID NO:7) (3186) ATTTACATT-----ACAATC---AAGTTTTTGTCTG

図1Q

【 図 1 Q 3 】

FAD3A (SEQ ID NO:7) (3248) -----
FAD3A' (SEQ ID NO:8) (4015) -----
FAD3C' (SEQ ID NO:12) (4874) TTTTAAAAGGAACTAAATAAAAAATAAATAACTAT
FAD3A'' (SEQ ID NO:9) (4762) -----
FAD3C'' (SEQ ID NO:11) (4669) -----
FAD3C (SEQ ID NO:10) (3828) -----
5401 5440

図1Q (続き)

【 図 1 R 1 】

FAD3A (SEQ ID NO:7) (3248) -----
FAD3A' (SEQ ID NO:8) (4015) -----
FAD3C' (SEQ ID NO:12) (4914) TTTAAATGTAATATTTTAAATTAAGTATTAGTGT
FAD3A'' (SEQ ID NO:9) (4762) -----
FAD3C'' (SEQ ID NO:11) (4669) -----
FAD3C (SEQ ID NO:10) (3828) -----
5441 5480
FAD3A (SEQ ID NO:7) (3248) -----
FAD3A' (SEQ ID NO:8) (4015) -----
FAD3C' (SEQ ID NO:12) (4954) AATCAACTATCGTGAAGTAACTGAGAGCAGATACATAG
FAD3A'' (SEQ ID NO:9) (4762) -----
FAD3C'' (SEQ ID NO:11) (4669) -----
FAD3C (SEQ ID NO:10) (3828) -----
5481 5520
FAD3A (SEQ ID NO:7) (3248) -----
FAD3A' (SEQ ID NO:8) (4015) -----
FAD3C' (SEQ ID NO:12) (4994) AAAACCGACTTCTCAATAATATTTTATAGAGATTACGAT
FAD3A'' (SEQ ID NO:9) (4762) -----
FAD3C'' (SEQ ID NO:11) (4669) -----
FAD3C (SEQ ID NO:10) (3828) -----
5521 5560
FAD3A (SEQ ID NO:7) (3248) -----
FAD3A' (SEQ ID NO:8) (4015) -----
FAD3C' (SEQ ID NO:12) (5034) GTTTCACAAAAAAATATATAGTATTTGATTAATCTTAA
FAD3A'' (SEQ ID NO:9) (4762) -----
FAD3C'' (SEQ ID NO:11) (4669) -----
FAD3C (SEQ ID NO:10) (3828) -----
5561 5600
FAD3A (SEQ ID NO:7) (3248) -----
FAD3A' (SEQ ID NO:8) (4015) -----
FAD3C' (SEQ ID NO:12) (5074) TTTTGAAGTTTTGATTAATAATAGGAATGAGGTTACT
FAD3A'' (SEQ ID NO:9) (4762) -----

図1R

【 図 1 R 2 】

Table with 3 columns: SEQ ID NO, position, and sequence. Rows include FAD3C, FAD3A, and FAD3C' sequences with their respective IDs and positions.

図1R (続き)

【 図 1 S 1 】

Table with 3 columns: SEQ ID NO, position, and sequence. Rows include FAD3A, FAD3A', FAD3C, and FAD3C' sequences with their respective IDs and positions.

図1S

【 図 1 1 】

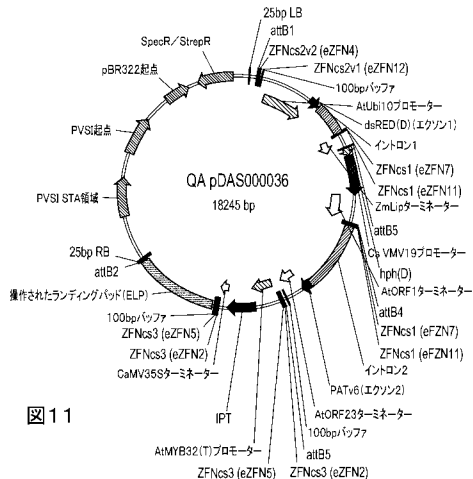


図 11

【 図 1 S 2 】

Table with 3 columns: SEQ ID NO, position, and sequence. Rows include FAD3A, FAD3A', FAD3C, and FAD3C' sequences with their respective IDs and positions.

図1S (続き)

【 図 2 0 B 】

(B) ZFN 28051-2A-28052および28053-2A-28054におけるDBIにおける増幅された配列。1は切断部位における欠乏を示す

Table showing ZFN recognition sites (28052, 28053, 28054) with their recognition sequences and cleavage sites. Includes columns for ZFN ID, recognition sequence, and cleavage site.

Table showing ZFN recognition sites (28054) with their recognition sequences and cleavage sites. Includes columns for ZFN ID, recognition sequence, and cleavage site.

図 20B

【 図 1 T 】

```

FAD3A (SEQ ID NO:7) (3248) -----
FAD3A' (SEQ ID NO:8) (4015) -----
FAD3C' (SEQ ID NO:12) (5554) TTAGCCCTATTATGAATAAACCCAGTCTTTTTTCACTTATT
FAD3A'' (SEQ ID NO:9) (4762) -----
FAD3C'' (SEQ ID NO:11) (4669) -----
FAD3C (SEQ ID NO:10) (3828) -----
                                     6081                               6120

FAD3A (SEQ ID NO:7) (3248) -----
FAD3A' (SEQ ID NO:8) (4015) -----
FAD3C' (SEQ ID NO:12) (5594) TATTGGTGTTTTTAAGTTAAAAATGTACTIONGAAACTCT
FAD3A'' (SEQ ID NO:9) (4762) -----
FAD3C'' (SEQ ID NO:11) (4669) -----
FAD3C (SEQ ID NO:10) (3828) -----
                                     6121                               6160

FAD3A (SEQ ID NO:7) (3248) -----
FAD3A' (SEQ ID NO:8) (4015) -----
FAD3C' (SEQ ID NO:12) (5634) TCTTTTATTATTAATCCATTTATACACTGAAAAACATACA
FAD3A'' (SEQ ID NO:9) (4762) -----
FAD3C'' (SEQ ID NO:11) (4669) -----
FAD3C (SEQ ID NO:10) (3828) -----
                                     6161                               6200

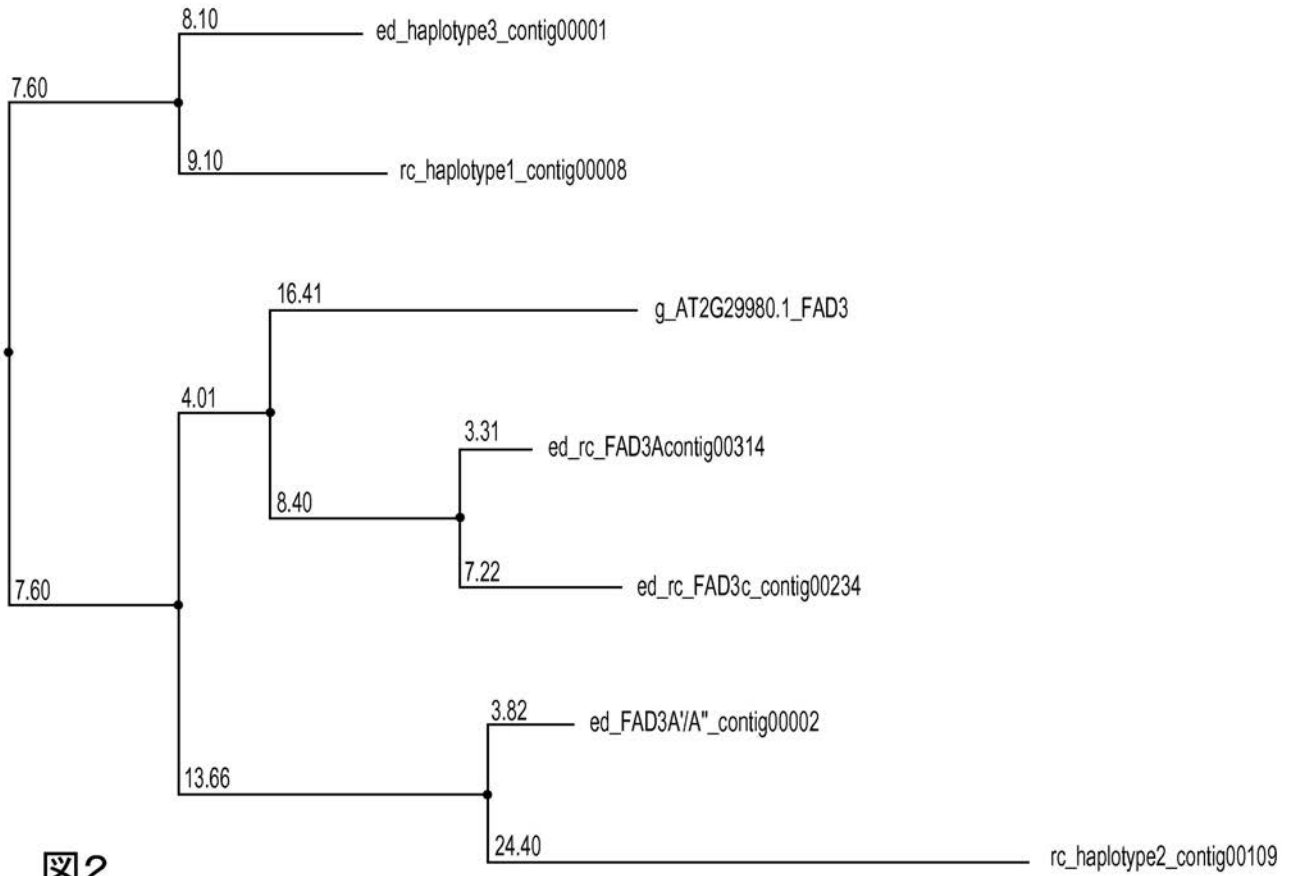
FAD3A (SEQ ID NO:7) (3248) -----
FAD3A' (SEQ ID NO:8) (4015) -----
FAD3C' (SEQ ID NO:12) (5674) ATTTCAAAGGTTAAAAAGAAAAATAAATTTTCTAGACTGA
FAD3A'' (SEQ ID NO:9) (4762) -----
FAD3C'' (SEQ ID NO:11) (4669) -----
FAD3C (SEQ ID NO:10) (3828) -----
                                     6201

FAD3A (SEQ ID NO:7) (3248) -
FAD3A' (SEQ ID NO:8) (4015) -
FAD3C' (SEQ ID NO:12) (5714) C
FAD3A'' (SEQ ID NO:9) (4762) -
FAD3C'' (SEQ ID NO:11) (4669) -
FAD3C (SEQ ID NO:10) (3828) -

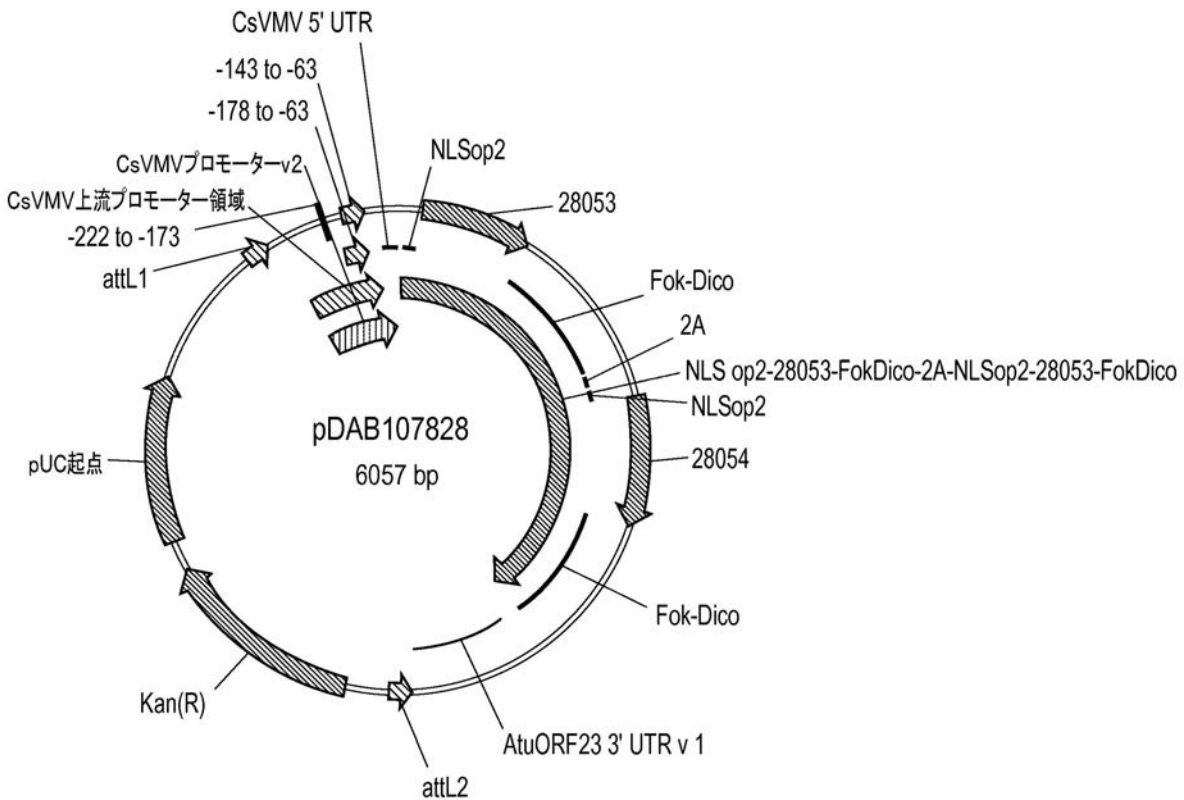
```

図 1 T (続き)

【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 3 】

【 図 4 】

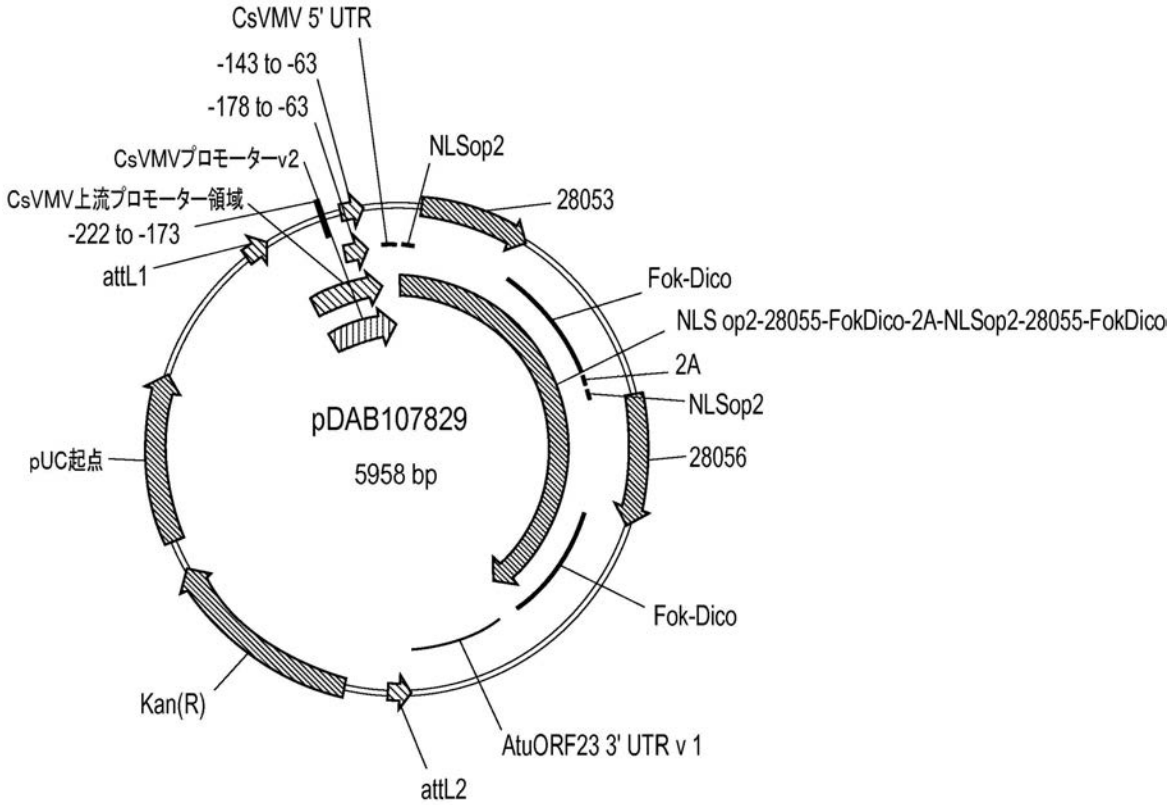


図 4

【 図 5 】

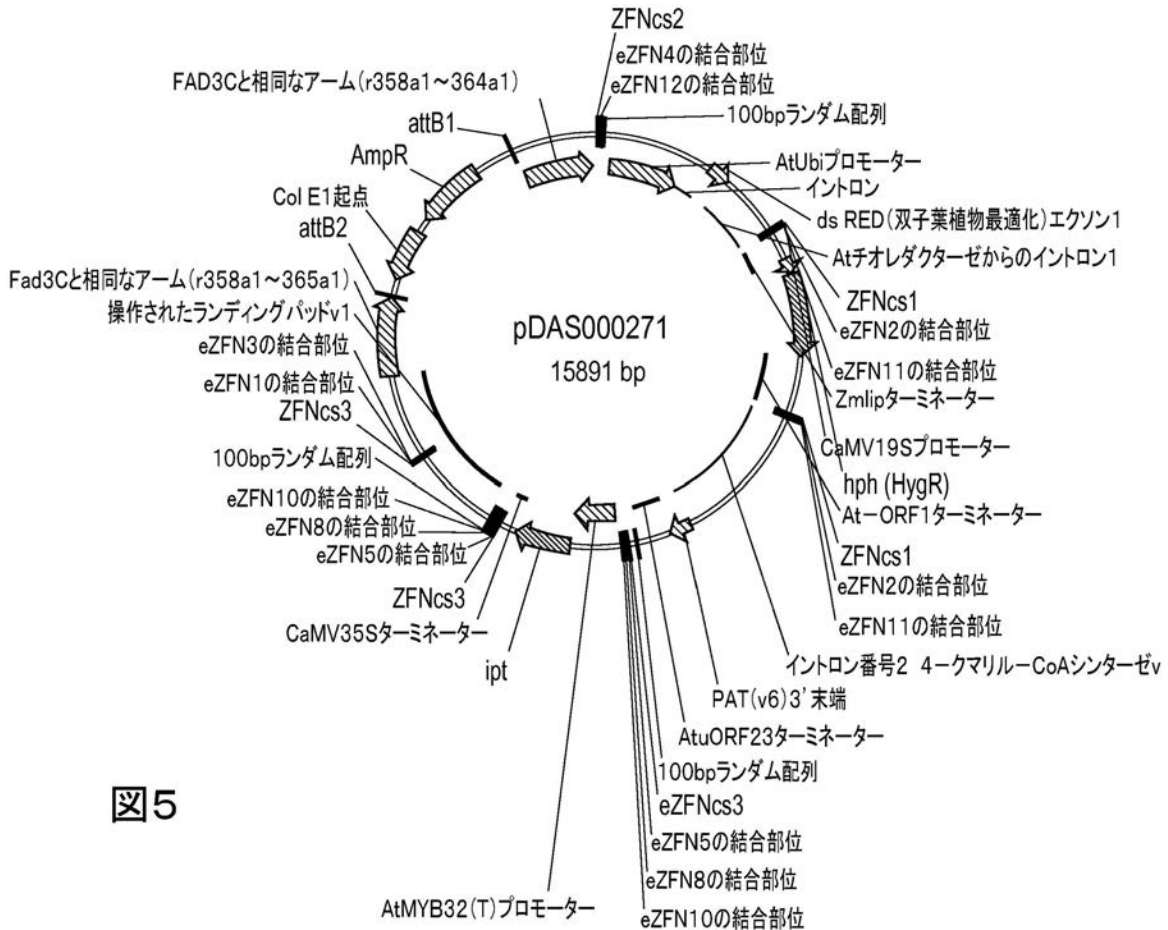


図 5

【 図 6 】

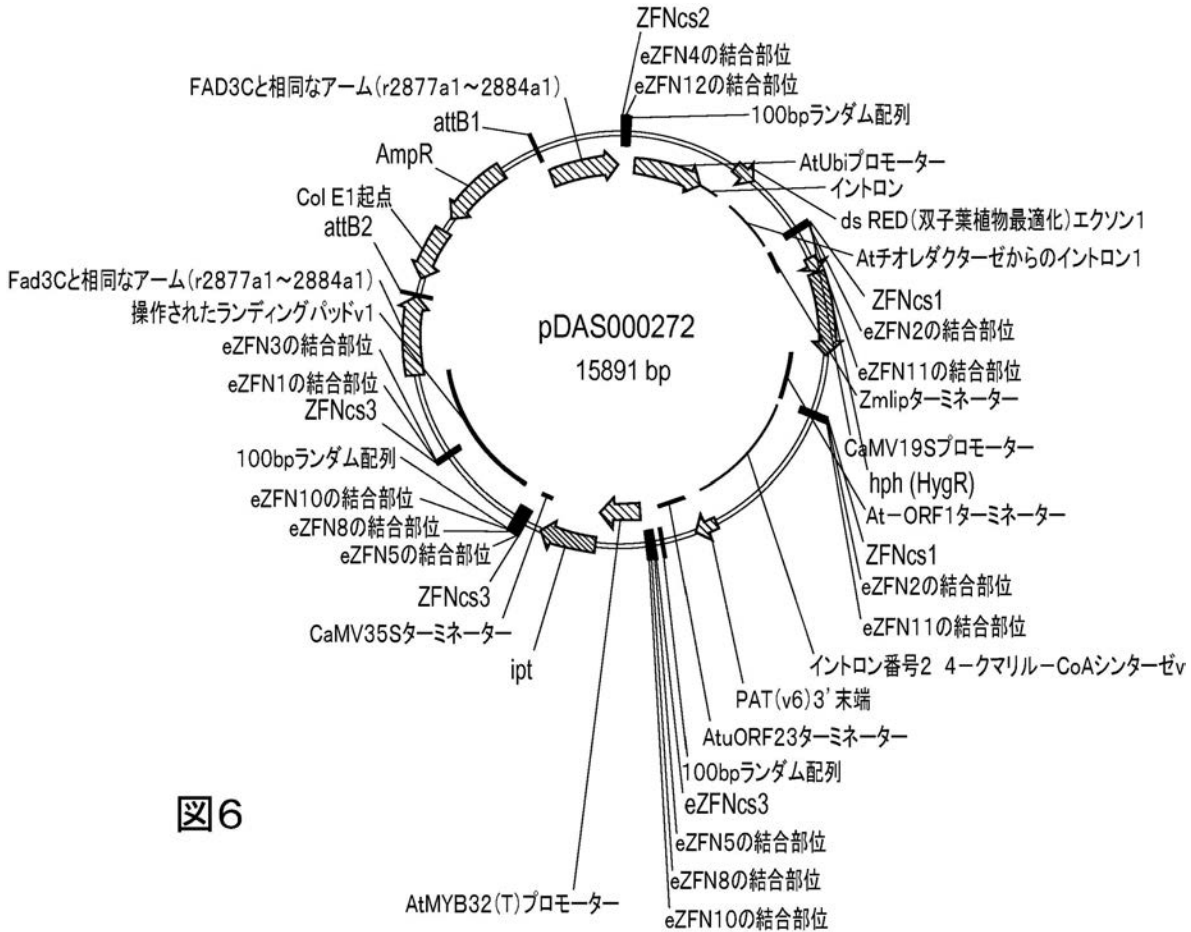


図 6

【 図 7 】

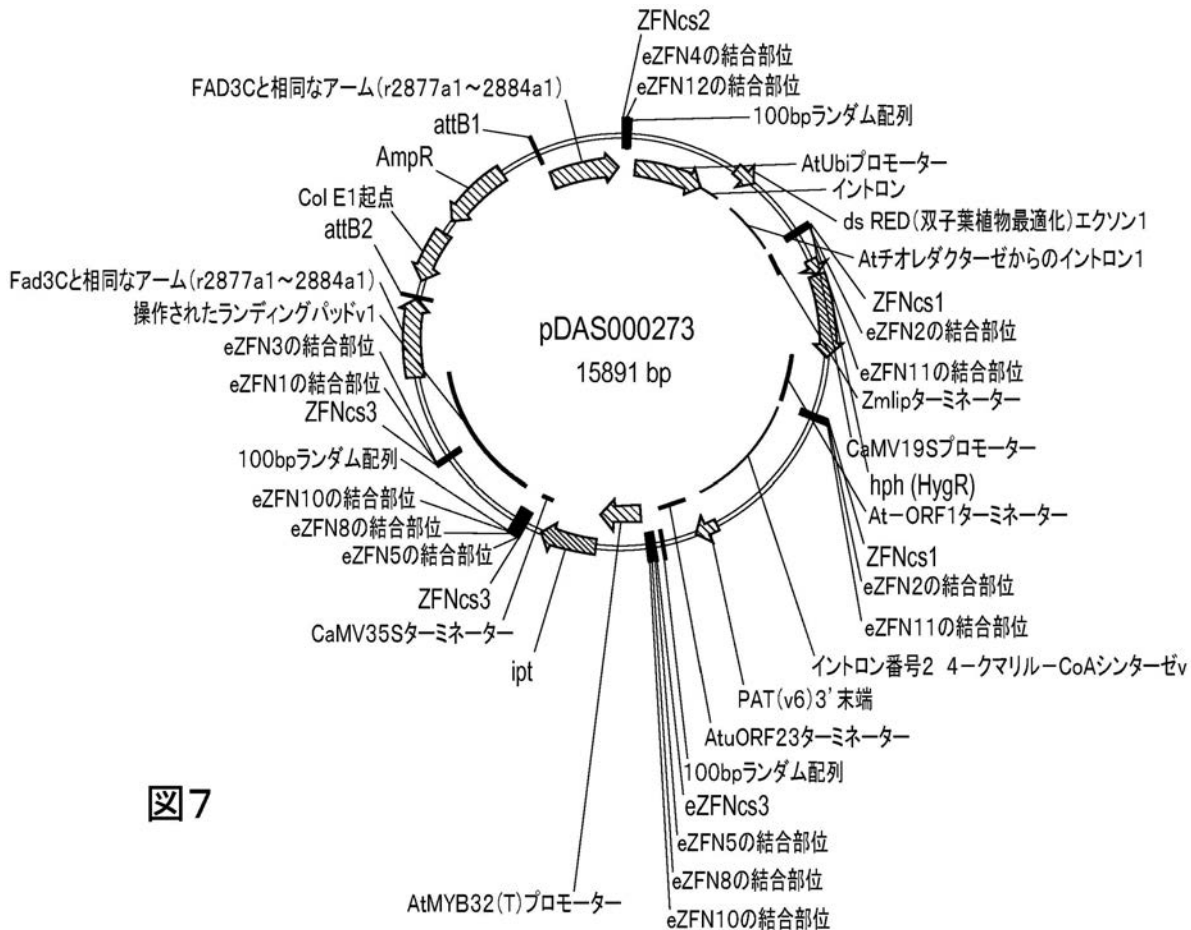


図 7

【 図 8 】

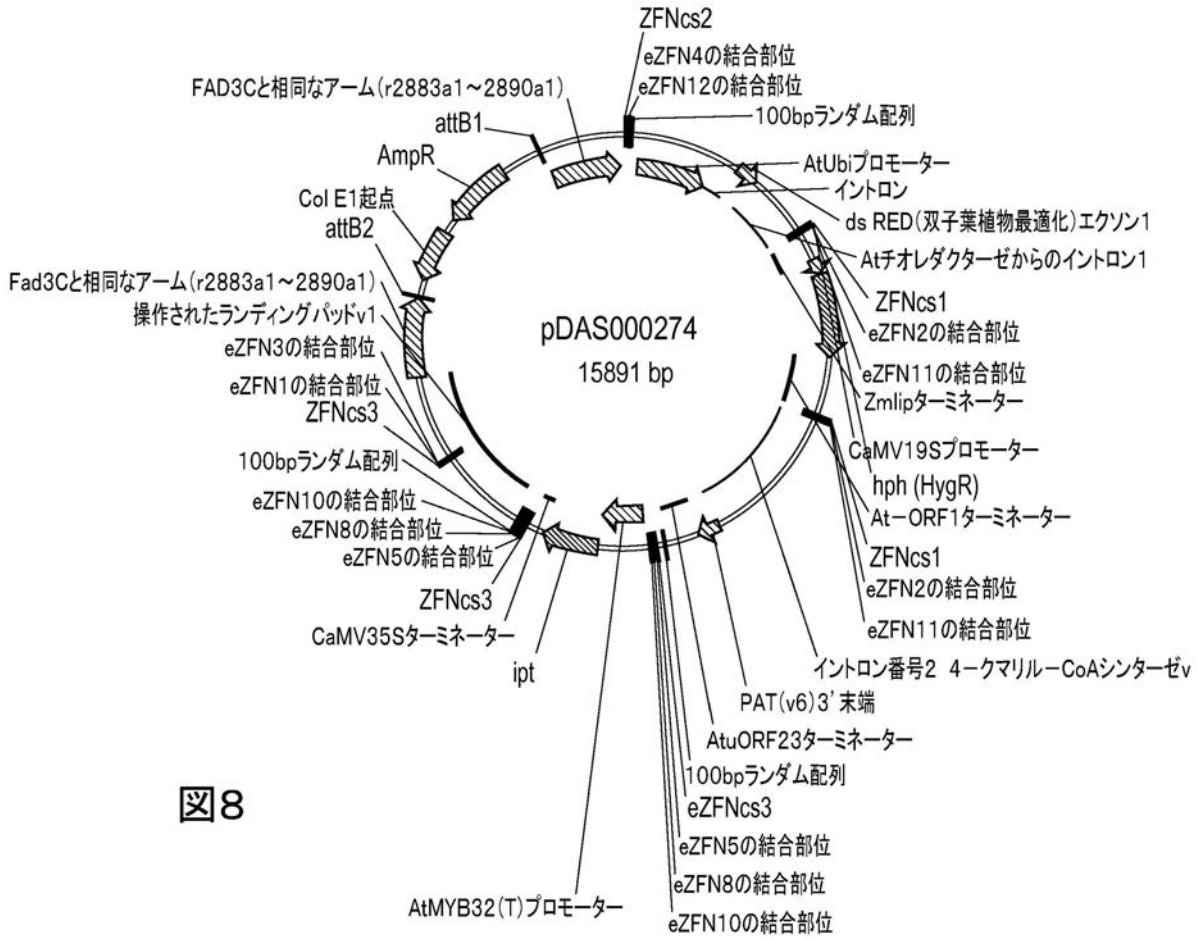


図8

【 図 1 2 】

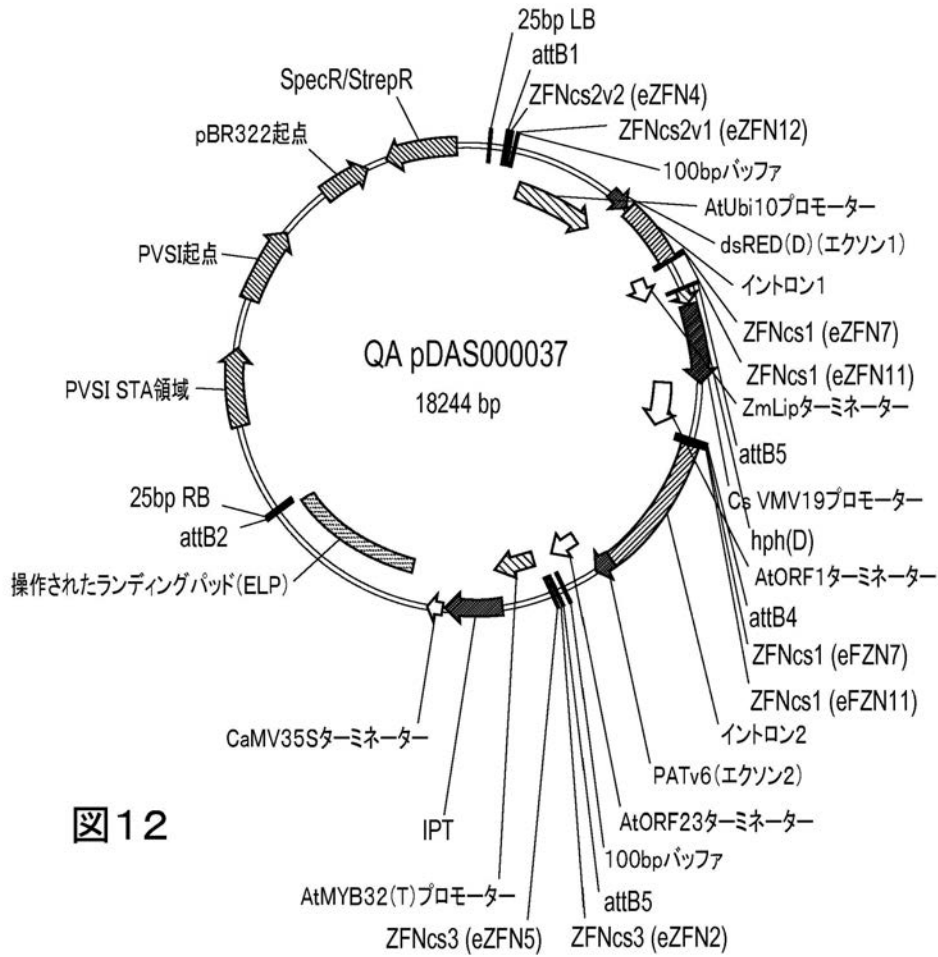


図 12

【 図 1 3 】

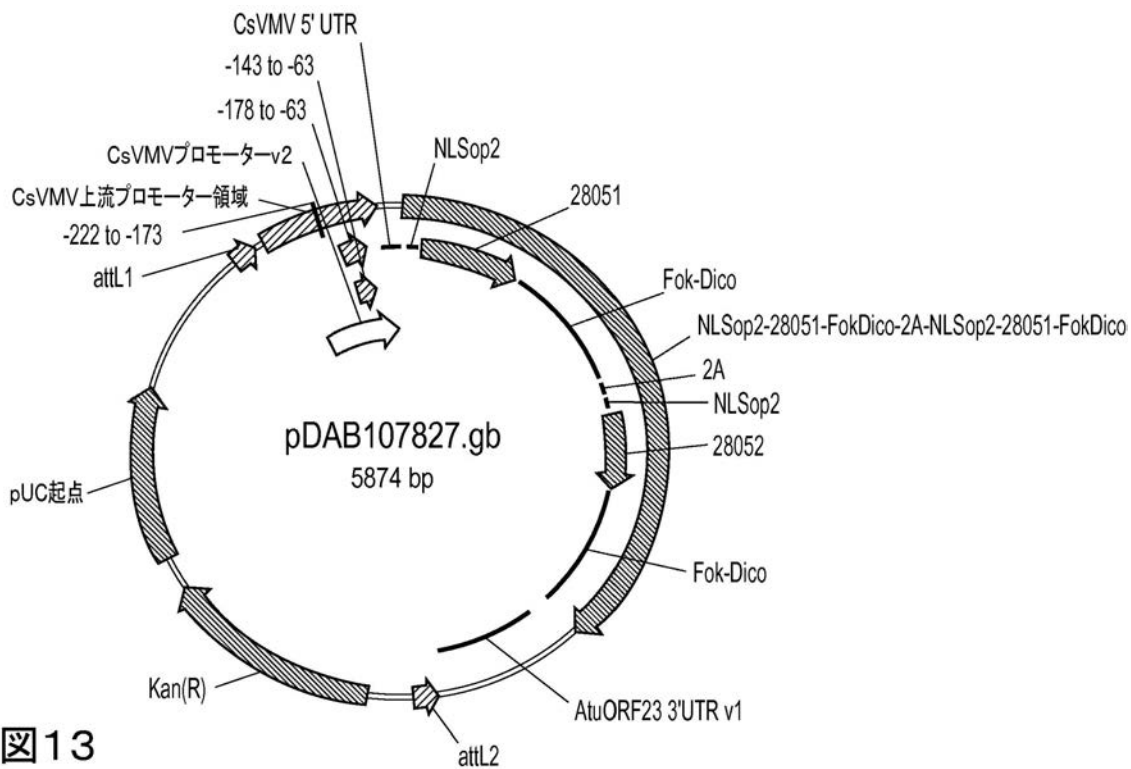


図 13

【 図 1 4 】

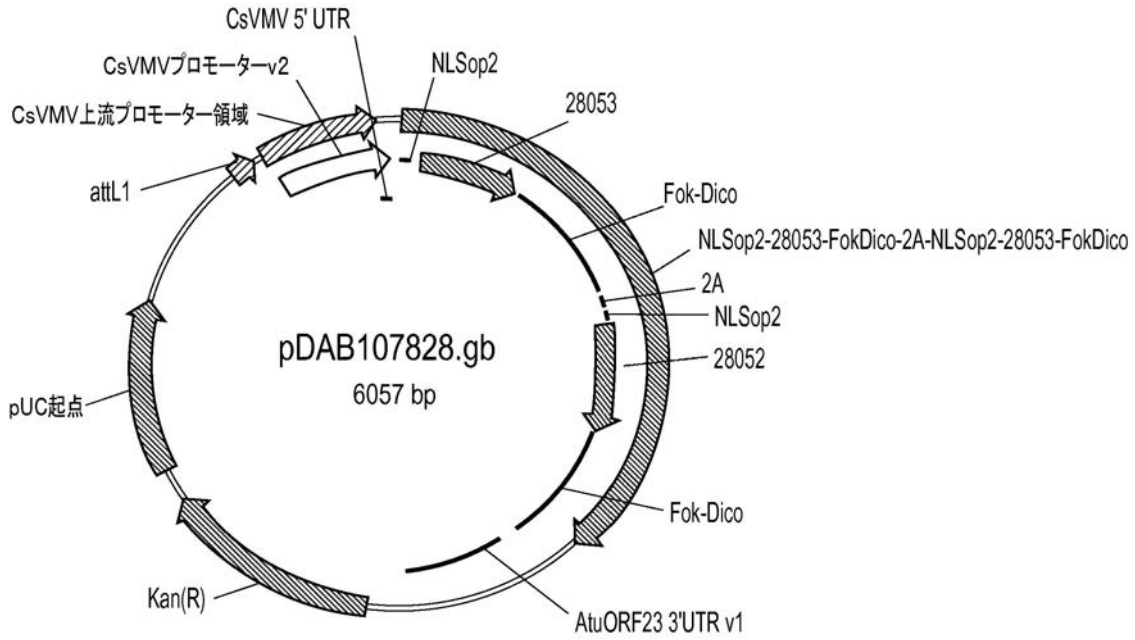


図14

【 図 1 5 】

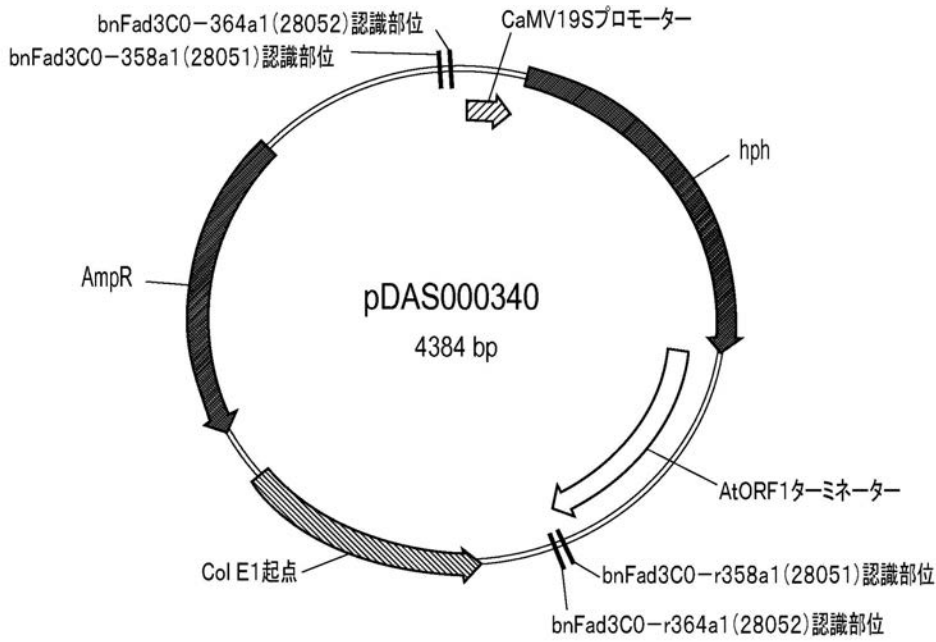


図15

【 図 1 6 】

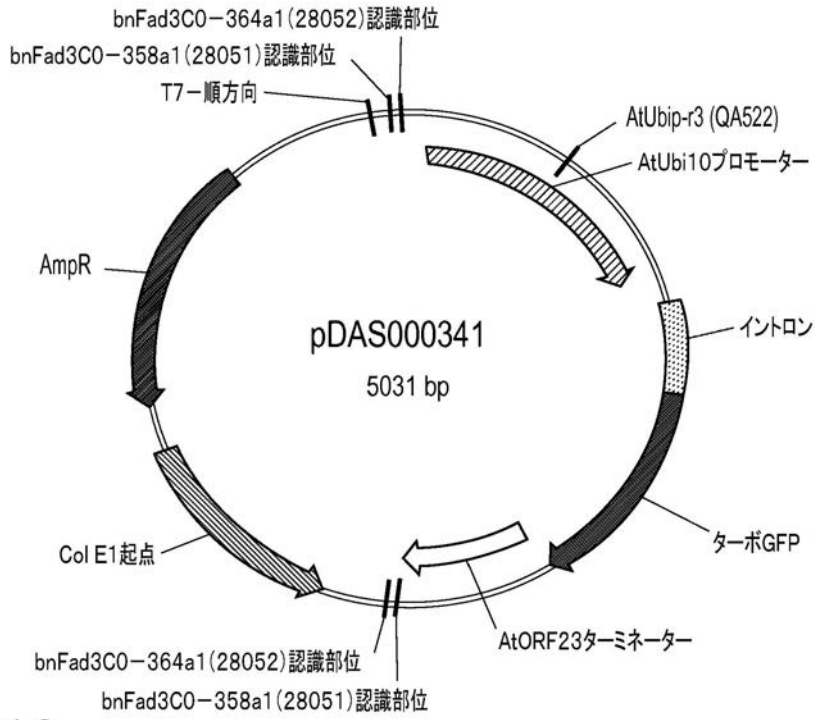


図16

【 図 1 7 】

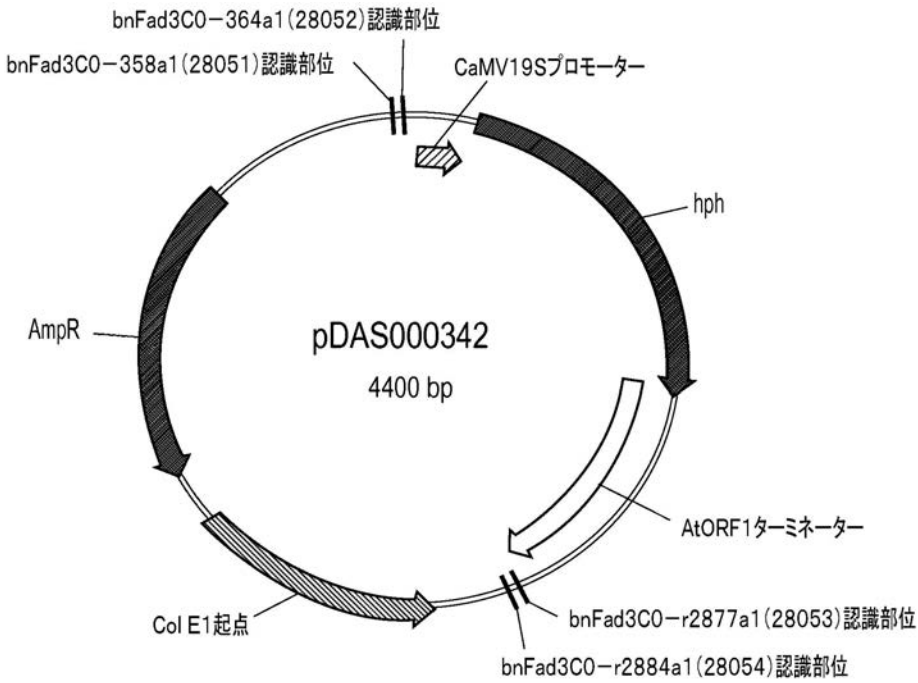


図17

【 図 1 8 】

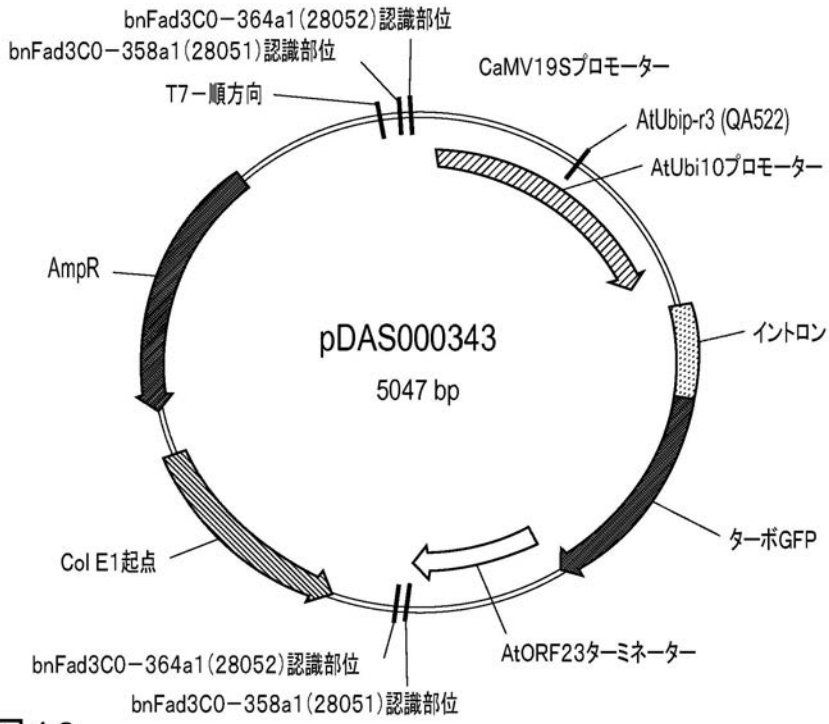


図 18

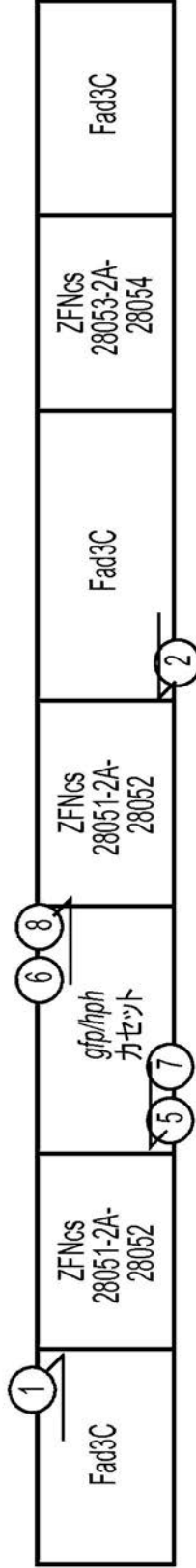
【 図 19 - 1 】

図19

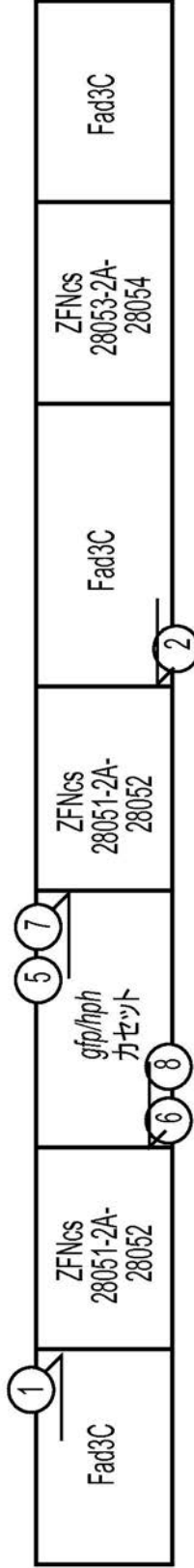


(B) スプライシングまたは編集FAD3C座上のプライマー(表2の1~8)の位置

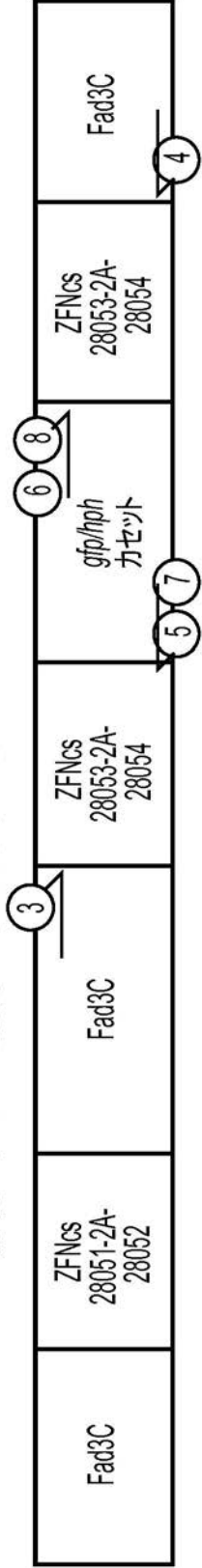
ZFN 28051-2A-28052によって誘導されるDSBへの遺伝子スプライシング(センス)



ZFN 28051-2A-28052によって誘導されるDSBへの遺伝子スプライシング(アンチセンス)



ZFN 28053-2A-28054によって誘導されるDSBへの遺伝子スプライシング(センス)

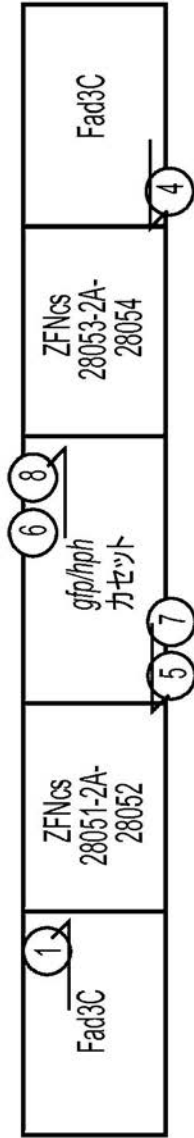


【 図 19 - 2 】

ZFN 28053-2A-28054によって誘導されるDSBへの遺伝子スプライシング(アンチセンス)



ZFN 28051-2A-28052および28053-2A-28054によって誘導されるDSBへの遺伝子スプライシング(センス)



ZFN 28051-2A-28052および28053-2A-28054によって誘導されるDSBへの遺伝子スプライシング(アンチセンス)

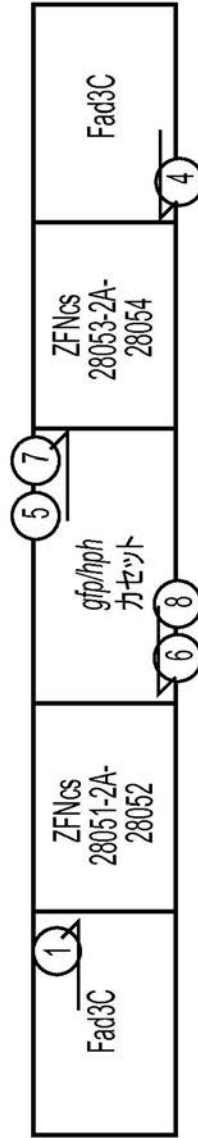


図19 (続き)

【 図 2 1 】

(A)

サンプル	Fad3	ZFN認識部位28051	挿入された余分な塩基の数	ZFN認識部位28052	CaMV19sp
349711	TTCTGGCCCTCTTTATTTGGGCCCGCCCAAGGAACCCCTTTTCTGGGCCCATCT			TCGTTACTCGGCCACGACTGGTAAATTTAATGGATCCCAACCCGACAACCACCTT	
349215c	TTCTGGCCCTCTTTATTTGGGCCCGCCCAAGGAACCCCTTTTCTGGGCCCAT::		442	:::TACTCGGCCACGACTGGTAAATTTAATGGATCCCAACCCGACAACCACCTT	
349216c	TTCTGGCCCTCTTTATTTGGGCCCGCCCAAGGAACCCCTTTTCTGGGCCCATC:		406	TCGTTACTCGGCCACGACTGGTAAATTTAATGGATCCCAACCCGACAACCACCTT	
349685	TTCTGGCCCTCTTTATTTGGGCCCGCCCAAGGAACCCCTTTTCTGGGCCCATC:		406	TCGTTACTCGGCCACGACTGGTAAATTTAATGGATCCCAACCCGACAACCACCTT	
346258	TTCTGGCCCTCTTTATTTGGGCCCGCCCAAGGAACCCCTTTTCTGGGCCCAT::		435	:::TACTCGGCCACGACTGGTAAATTTAATGGATCCCAACCCGACAACCACCTT	
348918	TTCTGGCCCTCTTTATTTGGGCCCGCCCAAGGAACCCCTTTTCTGGGCCCATC:		378	:::TACTCGGCCACGACTGGTAAATTTAATGGATCCCAACCCGACAACCACCTT	
359900	TTCTGGCCCTCTTTATTTGGGCCCGCCCAAGGAACCCCTTTTCTGGGCCCATCT			:::TACTCGGCCACGACTGGTAAATTTAATGGATCCCAACCCGACAACCACCTT	
346125	TTCTGGCCCTCTTTATTTGGGCCCGCCCAAGGAACCCCTTTTCTGGGCCCA::T		62	:::TACTCGGCCACGACTGGTAAATTTAATGGATCCCAACCCGACAACCACCTT	
348919	TTCTGGCCCTCTTTATTTGGGCCCGCCCAAGGAACCCCTTTTCTGGGCCCA:::		378	:::TACTCGGCCACGACTGGTAAATTTAATGGATCCCAACCCGACAACCACCTT	

(B)

サンプル	AtuORF1-t-	ZFN認識部位28051	挿入された余分な塩基の数	ZFN認識部位28052	Fad3C
346175	GTAATACATAGCGGCCCGCCCAAGGAACCCCTTTTCTGGGCCCATCT			TCGTTACTCGGCCACGACTGGTAAATTTAATGGATCCCAACCCGACAACCACCTT	
346102	GTAATACATAGCGGCCCGCCCAAGGAACCCCTTTTCTGGGCCCATCT			:::GACACGACTGGTAAATTTAATGGATCCCAACCCGACAACCACCTT	
				TCGTTACTCGGCCACGACTGGTAAATTTAATGGATCCCAACCCGACAACCACCTT	

図 21

【 図 2 2 】

(B)

サンプル	AtuORF1-t	ZFN認識部位28053	挿入された余分な塩基の数	ZFN認識部位28054	Fad3C
345888	GTAATACATAGCGCCGGCAGGAGAGAAAAGCTTATTGCAACTTCAAC		137	TACTTGCTGGTTCGATCGTGTGGCCACTCTGTTTATCTATCATTCCTCGTTGGTC	
356731	GTAATACATAGCGCCGGCAGGAGAGAAAAGCTTATTGCAACTTCAAC			::CTTGCTGGTTCGATCGTGTGGCCACTCTGTTTATCTATCATTCCTCGTTGGTC	
				TACTTGCTGGTTCGATCGTGTGGCCACTCGGTACTGGAGCACAAGACTGGCCCTCA	

図22

【 図 2 3 】

(A)

サンプル	Fad3	ZFN認識部位28051	挿入された余分な塩基の数	ZFN認識部位28052	CaMV19sp
1:1 #5	TTCCTGGCCCTCTTTATTGGGGCCGCCCAAGAACCCCTTTCTGGGCCATCT	TTCTGGCCCTCTTTATTGGGGCCGCCCAAGAACCCCTTTCTGGGCCATCT	3	TCGTACTCGGCCACGACTGGTAAATTTAATGGATCCAACCCGACAACCCACTTT	
1:1 #39	TTCCTGGCCCTCTTTATTGGGGCCGCCCAAGAACCCCTTTCTGGGCCATCT	TTCTGGCCCTCTTTATTGGGGCCGCCCAAGAACCCCTTTCTGGGCCATCT	153	TCGTACTCGGCCACGACTGGTAAATTTAATGGATCCAACCCGACAACCCACTTT	
1:1 #46	TTCCTGGCCCTCTTTATTGGGGCCGCCCAAGAACCCCTTTCTGGGCCATCT	TTCTGGCCCTCTTTATTGGGGCCGCCCAAGAACCCCTTTCTGGGCCATCT	370	TCGTACTCGGCCACGACTGGTAAATTTAATGGATCCAACCCGACAACCCACTTT	
5:1 #63	TTCCTGGCCCTCTTTATTGGGGCCGCCCAAGAACCCCTTTCTGGGCCATCT	TTCTGGCCCTCTTTATTGGGGCCGCCCAAGAACCCCTTTCTGGGCCATCT	36	TCGTACTCGGCCACGACTGGTAAATTTAATGGATCCAACCCGACAACCCACTTT	
10:1 #16	TTCCTGGCCCTCTTTATTGGGGCCGCCCAAGAACCCCTTTCTGGGCCATCT	TTCTGGCCCTCTTTATTGGGGCCGCCCAAGAACCCCTTTCTGGGCCATCT	78	TCGTACTCGGCCACGACTGGTAAATTTAATGGATCCAACCCGACAACCCACTTT	
10:1 #64	TTCCTGGCCCTCTTTATTGGGGCCGCCCAAGAACCCCTTTCTGGGCCATCT	TTCTGGCCCTCTTTATTGGGGCCGCCCAAGAACCCCTTTCTGGGCCATCT		TCGTACTCGGCCACGACTGGTAAATTTAATGGATCCAACCCGACAACCCACTTT	
10:1 #66: 51bp なし: 51bp なし		TCGTACTCGGCCACGACTGGTAAATTTAATGGATCCAACCCGACAACCCACTTT	
: 51bp なし: 51bp なし		TCGTACTCGGCCACGACTGGTAAATTTAATGGATCCAACCCGACAACCCACTTT	

(B)

サンプル	AtuORF1-I-	ZFN認識部位28051	挿入された余分な塩基の数	ZFN認識部位28052	Fad3C
1:1 #5	GTAATACATAGCGGGCCGCCCAAGAACCCCTTTCTGGGCCATCT	TTCTGGCCCTCTTTATTGGGGCCGCCCAAGAACCCCTTTCTGGGCCATCT	4	TCGTACTCGGCCACGACTGGTAAATTTAATGGATCCAACCCGACAACCCACTTTA	
1:1 #39	GTAATACATAGCGGGCCGCCCAAGAACCCCTTTCTGGGCCATCT	TTCTGGCCCTCTTTATTGGGGCCGCCCAAGAACCCCTTTCTGGGCCATCT	112	TCGTACTCGGCCACGACTGGTAAATTTAATGGATCCAACCCGACAACCCACTTTA	
1:1 #46	GTAATACATAGCGGGCCGCCCAAGAACCCCTTTCTGGGCCATCT	TTCTGGCCCTCTTTATTGGGGCCGCCCAAGAACCCCTTTCTGGGCCATCT	112	TCGTACTCGGCCACGACTGGTAAATTTAATGGATCCAACCCGACAACCCACTTTA	
5:1 #63	GTAATACATAGCGGGCCGCCCAAGAACCCCTTTCTGGGCCATCT	TTCTGGCCCTCTTTATTGGGGCCGCCCAAGAACCCCTTTCTGGGCCATCT	234	TCGTACTCGGCCACGACTGGTAAATTTAATGGATCCAACCCGACAACCCACTTTA	
10:1 #16	: 1655bp なし (二重挿入の可能性あり): 1655bp なし		TCGTACTCGGCCACGACTGGTAAATTTAATGGATCCAACCCGACAACCCACTTTA	
10:1 #64	GTAATACATAGCGGGCCGCCCAAGAACCCCTTTCTGGGCCATCT	TTCTGGCCCTCTTTATTGGGGCCGCCCAAGAACCCCTTTCTGGGCCATCT	9	TCGTACTCGGCCACGACTGGTAAATTTAATGGATCCAACCCGACAACCCACTTTA	
10:1 #66	TGTAATACATAGCGGGCCGCCCAAGAACCCCTTTCTGGGCCATCT	TTCTGGCCCTCTTTATTGGGGCCGCCCAAGAACCCCTTTCTGGGCCATCT	7	TCGTACTCGGCCACGACTGGTAAATTTAATGGATCCAACCCGACAACCCACTTTA	

図 23

【 図 2 4 】

(A)

サンプル	Fad3	ZFN認識部位28051	挿入された余分な塩基の数	ZFN認識部位28052	CaMV19sp
5:1:1 #8	TTCTGGCCCTCTTTATTGGGGCCGCCCCAAGGAACCCCTTTCTGGGCCATCT			TCGTACTCGGCCACGACTGGTAATTTAATGGATCCAACCCGACAAACCACCTT	
10:1:1 #9	TTCTGGCCCTCTTTATTGGGGCCGCCCCAAGGAACCCCTTTCTGGGCCATCT		206	TCGTACTCGGCCACGACTGGTAATTTAATGGATCCAACCCGACAAACCACCTT	
10:1:1 #21	TTCTGGCCCTCTTTATTGGGGCCGCCCCAAGGAACCCCTTTCTGGGCCATCT		273	:::::CGGCCACGACTGGTAATTTAATGGATCCAACCCGACAAACCACCTT	
10:1:1 #37	TTCTGGCCCTCTTTATTGGGGCCGCCCCAAGGAACCCCTTTCTGGGCC:>:::		5	:::::TCGGCCACGACTGGTAATTTAATGGATCCAACCCGACAAACCACCTT	

(B)

	AtuORF1-t	ZFN認識部位28053	挿入された余分な塩基の数	ZFN認識部位28054	Fad3C
5:1:1 #8	GTAATACATAGCGGCCGCGAGAGAGAAAAGCTTATTGCAACTTCAAC			TACTTGCTGCTCGATCGTGTGGCCACTCTTGTTTATCTATCATTCCTCGTTGGTC	
10:1:1 #9	GTAATACATAGCGGCCGCGAGAGAGAAAAGCTTATTGCAACTTCAAC		229	:::CTTGCTGCTCGATCGTGTGGCCACTCTTGTTTATCTATCATTCCTCGTTGGTC	
10:1:1 #21	GTAATACATAGCGGCCGCGAGAGAGAAAAGCTTATTGCAACTTCAAC		26	TACTTGCTGCTCGATCGTGTGGCCACTCTTGTTTATCTATCATTCCTCGTTGGTC	
10:1:1 #37	GTAATACATAGCGGCCGCGAGAGAGAAAAGCTTATTGCAACTTCAAC		33	:ACTTGCTGCTCGATCGTGTGGCCACTCTTGTTTATCTATCATTCCTCGTTGGTC	
10:1:1 #37	GTAATACATAGCGGCCGCGAGAGAGAAAAGCTTATTGCAACTTCAAC		17	:::CTTGCTGCTCGATCGTGTGGCCACTCTTGTTTATCTATCATTCCTCGTTGGTC	

図24

【 配列表 】

2015527081000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2013/058267
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12N 5/10 (2013.01) USPC - 435/69.7 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - C12N 5/10, 5/12, 5/14, 15/62 (2013.01) USPC - 435/ 69.7, 134, 419; 530/350; 538/23.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC - C12N 9/0083, 15/8234, 15/8247(2013.01) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Patbase, Google Patents, Google, Pubmed		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	WO 2011/049827 A1 (DEKELVER et al) 28 April 2011 (28.04.2011) entire document	1, 2 3
Y	US 2009/0055973 A1 (VRINTEN et al) 26 February 2009 (26.02.2009) entire document	3
Y	WO 2005/100393 A1 (ZHANG) 27 October 2005 (27.10.2005) entire document	20, 21
Y	US 7,081,564 B2 (SOMERS et al) 25 July 2006 (25.07.2006) entire document	20, 21
Y	WO 2007/014275 A2 (HOLMES et al) 01 February 2007 (01.02.2007) entire document	21
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 20 December 2013		Date of mailing of the international search report 09 JAN 2014
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2013/058267

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

a. (means)

on paper

in electronic form

b. (time)

in the international application as filed

together with the international application in electronic form

subsequently to this Authority for the purposes of search

2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

SEQ ID NOs: 20-23, 25-35, 40-45, 47, 49, 116, 117, 119-126, and 230-233 were searched.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2013/058267

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: 4-19
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51) Int. Cl.			F I			テーマコード (参考)
A 0 1 H	5/00	(2006.01)	A 0 1 H	5/00	A	
C 1 2 N	9/22	(2006.01)	C 1 2 N	9/22		

(81) 指定国 AP (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, T M), EP (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, R S, SE, SI, SK, SM, TR), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, H R, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI , NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ

(74) 代理人 100120134

弁理士 大森 規雄

(74) 代理人 100126354

弁理士 藤田 尚

(74) 代理人 100190779

弁理士 神谷 昌男

(74) 代理人 100104282

弁理士 鈴木 康仁

(72) 発明者 コガン, ノエル

アメリカ合衆国 4 6 2 6 8 - 1 0 5 4 インディアナ州, インディアナポリス, ジオンスヴィレ
ロード 9 3 3 0, ダウ アグロサイエンシズ エルエルシー内

(72) 発明者 フォースター, ジョン

アメリカ合衆国 4 6 2 6 8 - 1 0 5 4 インディアナ州, インディアナポリス, ジオンスヴィレ
ロード 9 3 3 0, ダウ アグロサイエンシズ エルエルシー内

(72) 発明者 ヘイデン, マシュー

アメリカ合衆国 4 6 2 6 8 - 1 0 5 4 インディアナ州, インディアナポリス, ジオンスヴィレ
ロード 9 3 3 0, ダウ アグロサイエンシズ エルエルシー内

(72) 発明者 ソウブリッジ, ティム

アメリカ合衆国 4 6 2 6 8 - 1 0 5 4 インディアナ州, インディアナポリス, ジオンスヴィレ
ロード 9 3 3 0, ダウ アグロサイエンシズ エルエルシー内

(72) 発明者 スパンゲンベルグ, ジャーマン

アメリカ合衆国 4 6 2 6 8 - 1 0 5 4 インディアナ州, インディアナポリス, ジオンスヴィレ
ロード 9 3 3 0, ダウ アグロサイエンシズ エルエルシー内

(72) 発明者 ウェブ, スティーブン アール.

アメリカ合衆国 4 6 2 6 8 - 1 0 5 4 インディアナ州, インディアナポリス, ジオンスヴィレ
ロード 9 3 3 0, ダウ アグロサイエンシズ エルエルシー内

(72) 発明者 グプタ, マンジュ

アメリカ合衆国 4 6 2 6 8 - 1 0 5 4 インディアナ州, インディアナポリス, ジオンスヴィレ
ロード 9 3 3 0, ダウ アグロサイエンシズ エルエルシー内

(72) 発明者 エインリー, ウィリアム マイケル

アメリカ合衆国 4 6 2 6 8 - 1 0 5 4 インディアナ州, インディアナポリス, ジオンスヴィレ
ロード 9 3 3 0, ダウ アグロサイエンシズ エルエルシー内

(72) 発明者 ヘンリー, マシュー ジェー.

アメリカ合衆国 4 6 2 6 8 - 1 0 5 4 インディアナ州, インディアナポリス, ジオンスヴィレ
ロード 9 3 3 0, ダウ アグロサイエンシズ エルエルシー内

(72) 発明者 ミラー, ジェフリー シー.

アメリカ合衆国 94804 カリフォルニア州, リッチモンド, カナル ブールバード 501
 , ポイント リッチモンド テク センター, スート エー100, サンガモ バイオサイエンシ
ーズ, インコーポレイテッド内

(72)発明者 ガスチン, デイミトリー ワイ.

アメリカ合衆国 94804 カリフォルニア州, リッチモンド, カナル ブールバード 501
 , ポイント リッチモンド テク センター, スート エー100, サンガモ バイオサイエンシ
ーズ, インコーポレイテッド内

Fターム(参考) 2B030 AA02 AD04 AD06 CA11 CA17 CB03
4B024 AA08 CA04 CA20 DA01 EA04 GA11
4B050 CC03 LL10
4B065 AA88X AB01 AC14 AC20