

(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2004-524015

(P2004-524015A)

(43) 公表日 平成16年8月12日(2004.8.12)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A 2 B O 3 O
A O 1 H 1/00	A O 1 H 1/00	A 2 G O 4 5
A O 1 H 5/00	A O 1 H 5/00	A 4 B O 2 4
C O 7 K 14/415	C O 7 K 14/415	4 B O 6 3
C O 7 K 16/16	C O 7 K 16/16	4 B O 6 4
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 165 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2002-553492 (P2002-553492)	(71) 出願人	501050069
(86) (22) 出願日	平成13年12月20日 (2001.12.20)		クロップデザイン・エヌ・ヴェー
(85) 翻訳文提出日	平成15年6月18日 (2003.6.18)		C r o p D e s i g n N . V .
(86) 国際出願番号	PCT/EP2001/015093		ベルギー国、ペー—9052 ズウェイナ
(87) 国際公開番号	W02002/052012		ールデ、テヒノロヒーパルク 3
(87) 国際公開日	平成14年7月4日 (2002.7.4)	(74) 代理人	100078282
(31) 優先権主張番号	00870319.1		弁理士 山本 秀策
(32) 優先日	平成12年12月22日 (2000.12.22)	(74) 代理人	100062409
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 安村 高明
(31) 優先権主張番号	60/271,656	(74) 代理人	100113413
(32) 優先日	平成13年2月26日 (2001.2.26)		弁理士 森下 夏樹
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	カンホノウ, ラドルフ アーサー
			スペイン国 エ—46020 バレンシア
			, アルボカーサー, 7, 16
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ストレス耐性に関連するテンサイ遺伝子

(57) 【要約】

本発明は、Beta vulgaris、テンサイ起源の単離された遺伝子に関し、この単離された遺伝子は、ストレス状態に対する応答に関連する。この遺伝子は、高塩濃度を有する選択培地中で増殖し得る形質転換された酵母細胞を用いる、機能的選抜手順においてスクリーニングされたテンサイcDNAライブラリーから単離された。遺伝子の1つは、テンサイカゼインキナーゼの - サブユニットであり、1つは、テンサイジヒドロオロターゼであり、1つは、テンサイ翻訳開始因子1Aであり、そして他の2つは、未知のタンパク質タイプの遺伝子である。単離された植物遺伝子の全ては、酵母細胞にストレス耐性エンハンサーとして機能的であり、従って、トランスフェクトされた場合、生物に対してストレス耐性を付与し得る。これらの遺伝子は、塩、乾燥、寒さまたは霜による浸透圧性ストレスのようなストレス状態に耐性の作物を提供するために使用され得る。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

植物におけるストレス耐性を増強させるための *Beta vulgaris* 核酸の使用法であって、酵母細胞に対してストレス耐性を付与することの特徴とする該 *Beta vulgaris* 核酸の発現を包含する、*Beta vulgaris* 核酸の使用法。

【請求項 2】

前記酵母細胞が Na^+ 感受性酵母株 JM26 に由来する、請求項 1 に記載の *Beta vulgaris* 核酸の使用法。

【請求項 3】

前記 *Beta vulgaris* 核酸が前記酵母細胞に対して浸透圧性ストレス耐性または酸化ストレス耐性を付与する、植物に対して浸透圧性ストレス耐性または酸化ストレス耐性を増強させるための、請求項 1 または 2 に記載の *Beta vulgaris* 核酸の使用法。 10

【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の植物において浸透圧性ストレス耐性または酸化ストレス耐性を増強させるための *Beta vulgaris* 核酸の使用法であって、ここで、該 *Beta vulgaris* 核酸は、以下の核酸：

(a) 配列番号 1 ~ 5 のいずれか、またはその相補物として与えられる DNA 配列を含有する核酸、

(b) 配列番号 1 ~ 5 のいずれか、またはその相補物に対応する RNA 配列を含有する核酸、 20

(c) 高ストリンジェンシー条件下で、核酸 (a) または核酸 (b) に対して特異的にハイブリダイズする核酸、

(d) 配列番号 6 として与えられるアミノ酸配列に対して少なくとも 93% 同一であるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする核酸、

(e) 配列番号 7 として与えられるアミノ酸配列に対して少なくとも 80% 同一であるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする核酸、

(f) 配列番号 8 として与えられるアミノ酸配列に対して少なくとも 89% 同一であるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする核酸、

(g) 配列番号 9 として与えられるアミノ酸配列に対して少なくとも 75% 同一であるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする核酸、 30

(h) 配列番号 10 として与えられるアミノ酸配列に対して少なくとも 65% 同一であるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする核酸、

(i) 配列番号 6 ~ 10 のいずれかとして与えられるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードする核酸、

(j) 配列番号 1 ~ 5 のいずれかとして与えられる DNA 配列によってコードされるタンパク質の、免疫学的に活性なフラグメントおよび / または免疫学的に機能的なフラグメントをコードする核酸、

(k) 遺伝コードの結果として配列番号 1 ~ 5 のいずれかとして与えられる核酸に対して縮重している核酸か、または (a) ~ (j) のいずれかにおいて規定される核酸に対して縮重している核酸、 40

(l) 生物の間でのコドン使用頻度の相違の結果として配列番号 6 ~ 10 のいずれかとして与えられるタンパク質をコードする核酸から多様化している核酸か、または (a) ~ (j) のいずれかにおいて規定される核酸から多様化している核酸、

(m) 対立遺伝子の間での相違の結果として配列番号 6 ~ 10 のいずれかとして与えられるタンパク質をコードする核酸から多様化している核酸か、または (a) ~ (j) のいずれかにおいて規定される核酸から多様化している核酸、ならびに

(n) 該核酸が、DNA、cDNA、ゲノム DNA または合成 DNA であることを特徴とする、(a) ~ (m) いずれか 1 つにおいて規定される核酸、

から選択される、*Beta vulgaris* 核酸の使用法。 50

【請求項 5】

植物におけるストレス耐性を増強させるための方法であって、該植物の細胞、組織または一部における、請求項 4 に記載されるいずれかの核酸の発現または発現の変更を包含する、方法。

【請求項 6】

植物におけるストレス耐性を増強させるための方法であって、該植物の細胞、組織または一部における、カゼインキナーゼ サブユニットをコードする核酸の発現または発現の変更を包含する、方法。

【請求項 7】

請求項 6 に記載の方法であって、ここで、前記核酸が、請求項 4 に記載されるカゼインキナーゼ サブユニット、またはそのホモログ、オーソログもしくはパラログをコードする、方法。 10

【請求項 8】

植物におけるストレス耐性を増強させるための方法であって、該植物の細胞、組織または一部における、ジヒドロオロターゼをコードする核酸の発現または発現の変更を包含する、方法。

【請求項 9】

請求項 8 に記載の方法であって、ここで、前記核酸が、請求項 4 に記載されるジヒドロオロターゼ、またはそのホモログ、オーソログもしくはパラログをコードする、方法。

【請求項 10】

植物におけるストレス耐性を増強させるための方法であって、該植物の細胞、組織または一部における、翻訳開始因子 1 A をコードする核酸の発現または発現の変更を包含する、方法。 20

【請求項 11】

請求項 10 に記載の方法であって、ここで、前記核酸が、請求項 4 に記載される翻訳開始因子 1 A、またはそのホモログ、オーソログもしくはパラログをコードする、方法。

【請求項 12】

植物におけるストレス耐性を増強させるための方法であって、配列番号 4 もしくは配列番号 5 によって示される核酸またはそれらのホモログ、オーソログもしくはパラログの発現または発現の変更を包含する、方法。 30

【請求項 13】

請求項 5 ～ 12 のいずれか 1 項に記載の方法であって、ここで、前記核酸の前記発現が、プロモーターの制御下で生じる、方法。

【請求項 14】

請求項 5 ～ 13 のいずれか 1 項に記載の方法であって、ここで、前記ストレスが、浸透圧性ストレスである、方法。

【請求項 15】

請求項 14 に記載の方法であって、ここで、前記浸透圧性ストレスが、塩によって引き起こされる、方法。

【請求項 16】

請求項 14 に記載の方法であって、ここで、前記浸透圧性ストレスが、乾燥によって引き起こされる、方法。 40

【請求項 17】

請求項 14 に記載の方法であって、ここで、前記浸透圧性ストレスが、霜によって引き起こされる、方法。

【請求項 18】

請求項 14 に記載の方法であって、ここで、前記浸透圧性ストレスが、寒さによって引き起こされる、方法。

【請求項 19】

請求項 5 ～ 18 のいずれか 1 項に記載の方法であって、ここで、前記方法が、収量の増加 50

をもたらす、方法。

【請求項 20】

単離された核酸であって、植物に対して浸透圧性ストレス耐性もしくは酸化ストレス耐性を増強するためのタンパク質か、あるいはそのようなタンパク質の免疫学的に活性なフラグメントおよび/または免疫学的に機能的なフラグメントをコードし、以下の核酸：

(a) 配列番号 1 ~ 5 のいずれか、またはその相補物として与えられる DNA 配列を含有する核酸、

(b) 配列番号 1 ~ 5 のいずれか、またはその相補物に対応する RNA 配列を含有する核酸、

(c) 高ストリンジェンシー条件下で核酸 (a) または核酸 (b) に対して特異的にハイブリダイズする核酸、 10

(d) 配列番号 6 として与えられるアミノ酸配列に対して少なくとも 93 % 同一であるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする核酸、

(e) 配列番号 7 として与えられるアミノ酸配列に対して少なくとも 80 % 同一であるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする核酸、

(f) 配列番号 8 として与えられるアミノ酸配列に対して少なくとも 89 % 同一であるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする核酸、

(g) 配列番号 9 として与えられるアミノ酸配列に対して少なくとも 75 % 同一であるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする核酸、

(h) 配列番号 10 として与えられるアミノ酸配列に対して少なくとも 65 % 同一であるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする核酸、 20

(i) 配列番号 6 ~ 10 のいずれかとして与えられるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードする核酸、

(j) 配列番号 1 ~ 5 のいずれかとして与えられる DNA 配列によってコードされるタンパク質の、免疫学的に活性なフラグメントおよび/または免疫学的に機能的なフラグメントをコードする核酸、

(k) 遺伝コードの結果として配列番号 1 ~ 5 のいずれかとして与えられる核酸に対して縮重している核酸か、または (a) ~ (j) のいずれかにおいて規定される核酸に対して縮重している核酸、

(l) 生物の間でのコドン使用頻度の相違の結果として配列番号 6 ~ 10 のいずれかとして与えられるタンパク質をコードする核酸から多様化している核酸か、または (a) ~ (j) のいずれかにおいて規定される核酸から多様化している核酸、 30

(m) 対立遺伝子の間での相違の結果として配列番号 6 ~ 10 のいずれかとして与えられるタンパク質をコードする核酸から多様化している核酸か、または (a) ~ (j) のいずれかにおいて規定される核酸から多様化している核酸、ならびに

(n) 該核酸が、DNA、cDNA、ゲノムDNAまたは合成DNAであることを特徴とする、(a) ~ (m) いずれか 1 つにおいて規定される核酸、

の 1 つから選択される、核酸。

【請求項 21】

請求項 20 に記載の核酸と特異的にハイブリダイズする、少なくとも 15 個連続するヌクレオチド長の核酸分子。 40

【請求項 22】

請求項 20 に記載の核酸を特異的に増幅する、少なくとも 15 個連続するヌクレオチド長の核酸分子。

【請求項 23】

請求項 20 に記載の核酸配列を含有する、ベクター。

【請求項 24】

請求項 23 に記載のベクターであって、前記核酸配列が原核生物宿主細胞および/または真核生物宿主細胞において該配列の発現を可能にする 1 以上の制御配列に作動可能に連結されている発現ベクターである、ベクター。

【請求項 25】

請求項 20 に記載の核酸分子または請求項 23 もしくは 24 に記載のベクターを含有する、宿主細胞。

【請求項 26】

請求項 25 に記載の宿主細胞であって、ここで、該宿主細胞は、細菌細胞、昆虫細胞、真菌細胞、酵母細胞、植物細胞または動物細胞である、宿主細胞。

【請求項 27】

請求項 20 に記載の核酸、あるいはそのホモログまたは誘導体、あるいはその免疫学的に活性なフラグメントおよび / または免疫学的に機能的なフラグメントによってコード可能され得る、単離されたポリペプチド。

10

【請求項 28】

請求項 27 に記載のポリペプチドであって、配列番号 6 ~ 10 のいずれかとして与えられるアミノ酸配列、あるいはそれらのホモログまたは誘導体、あるいはそれらの免疫学的に活性なフラグメントおよび / または免疫学的に機能的なフラグメントを有する、ポリペプチド。

【請求項 29】

請求項 27 または 28 に記載のポリペプチドを産生するための方法であって、該ポリペプチドの発現を可能にする条件で請求項 25 または 26 に記載の宿主細胞を培養する工程、および該培養物から産生されたポリペプチドを回収する工程を包含する、方法。

【請求項 30】

請求項 27 もしくは 28 または該ポリペプチドの特異的なエピトープに記載のポリペプチドを特異的に認識する抗体。

20

【請求項 31】

改変された植物細胞、植物組織もしくは植物を産生するための方法であって、該植物細胞内もしくは該植物組織内に、または該植物の器官内に、請求項 27 もしくは 28 に記載のポリペプチドを直接的に導入する工程を包含する、方法。

【請求項 32】

請求項 27 もしくは 28 に記載のポリペプチドの発現をもたらすための方法であって、1 以上の制御配列に作動可能に連結された請求項 20 に記載の核酸分子または請求項 23 もしくは 24 に記載のベクターを、植物細胞のゲノム内へ安定に導入する工程を包含する、方法。

30

【請求項 33】

トランスジェニック植物細胞、植物組織または植物を産生するための方法であって、該植物細胞、植物組織または植物において、発現可能な形式で請求項 20 に記載の核酸を導入する工程、または請求項 23 もしくは 24 に記載のベクターを導入する工程を包含する、方法。

【請求項 34】

植物細胞、組織または植物において、浸透圧性ストレス耐性または酸化ストレス耐性を増強させるための方法であって、該植物の細胞、組織または器官内へ請求項 5 ~ 13 のいずれか 1 項に記載されるいずれかの核酸を導入する工程を包含する、方法。

40

【請求項 35】

請求項 32 ~ 34 のいずれか 1 項に記載の方法であって、前記植物細胞から植物を再生させる工程をさらに包含する、方法。

【請求項 36】

請求項 20 に記載の核酸を含有するトランスジェニック植物細胞であって該核酸が、植物細胞または請求項 33 に記載の方法によって入手可能なトランスジェニック植物細胞における該核酸の転写および / または発現を可能にする調節エレメントに作動可能に連結されている、トランスジェニック植物細胞。

【請求項 37】

請求項 36 に記載のトランスジェニック植物細胞であって、ここで、請求項 20 に記載の

50

前記核酸が該植物細胞のゲノム内へ安定に組み込まれている、トランスジェニック植物細胞。

【請求項 38】

請求項 36 もしくは 37 に記載の植物細胞、または請求項 35 に記載の方法によって入手可能なトランスジェニック植物を含有する、トランスジェニック植物またはトランスジェニック植物組織。

【請求項 39】

対応する野生型植物と比較して、ストレス（好ましくは、浸透圧性ストレスまたは酸化ストレス）に対する増強した耐性を示す、請求項 38 に記載のトランスジェニック植物。

【請求項 40】

請求項 38 または 39 に記載の植物の収穫可能な部分。

【請求項 41】

種子、葉、果実、幹培養物、根茎および鱗茎からなる群から選択される、請求項 40 に記載の植物の収穫可能な部分。

【請求項 42】

請求項 38 ～ 41 のいずれか 1 項に記載の植物または植物の部分のいずれかに由来する、子孫。

【請求項 43】

請求項 27 または 28 に記載のポリペプチドと相互作用するタンパク質を同定および入手するための方法であって、請求項 27 または 28 に記載のポリペプチドが使用されるスクリーニングアッセイを包含する、方法。

【請求項 44】

請求項 43 に記載の方法であって、ベイトとして請求項 27 または 28 に記載のポリペプチドを、そしてプレイとして cDNA ライブラリーが使用されるツーハイブリッドスクリーニングアッセイを包含する、方法。

【請求項 45】

請求項 27 または 28 に記載のポリペプチドと、請求項 43 または 44 に記載の方法によって入手可能な相互作用するタンパク質パートナーとの間の相互作用を調節するための方法。

【請求項 46】

請求項 27 または 28 に記載のポリペプチドと相互作用する化合物を同定および入手するための方法であって、以下の工程：

（a）ツーハイブリッド系を提供する工程であって、ここで、請求項 27 または 28 に記載のポリペプチド、および請求項 43 または 44 に記載の方法によって入手可能な相互作用するタンパク質パートナーが発現される、工程、

（b）該化合物を、（a）において規定される発現されたポリペプチドによって形成される複合体と相互作用させる工程、ならびに、

（c）該化合物と、該ポリペプチドまたは（a）において規定される発現されたポリペプチドによって形成される複合体との相互作用の測定を実施する工程、を包含する、方法。

【請求項 47】

請求項 27 または 28 に記載のポリペプチドに特異的に結合する化合物または化合物の混合物を同定するための方法であって、以下の工程：

（a）複合体形成を可能にするために適切な条件下で、請求項 27 または 28 に記載のポリペプチドを該化合物または化合物の混合物と混合する工程、および、

（b）複合体形成を検出する工程であって、ここで、複合体の存在が、該ポリペプチドに特異的に結合する化合物または化合物の混合物を同定する、工程、を包含する、方法。

【請求項 48】

植物においてストレス耐性を増強させる因子としての、請求項 46 または 47 に記載の方法を使用して同定された化合物または化合物の混合物の使用法。

10

20

30

40

50

【請求項 49】

収量を増加させるための、請求項 20 に記載の核酸、請求項 23 または 24 に記載のベクター、請求項 27 または 28 に記載のポリペプチドの使用法。

【請求項 50】

根、葉または種子のような植物のいずれかの部分であり得る植物の成長を刺激するための、請求項 20 に記載の核酸分子、請求項 23 または 24 に記載のベクター、請求項 27 または 28 に記載のポリペプチドの使用法。

【請求項 51】

少なくとも、請求項 20 に記載の核酸、請求項 23 もしくは 24 に記載のベクター、請求項 27 もしくは 28 に記載のポリペプチドまたは請求項 30 に記載の抗体を含有する、診断組成物。 10

【請求項 52】

1 mM の塩イオンより高い塩含量を有する土壤上で栽培するための、請求項 31 もしくは 32 に記載の方法によって入手可能な植物または請求項 38 もしくは 39 に記載の植物の使用法。

【請求項 53】

植物の開花の過程を制御するための方法であって、該植物の細胞、組織または部分において配列番号 6 によって示されるカゼインキナーゼ サブユニットをコードする核酸を発現させるかまたは該核酸の発現を変更する工程を包含する、方法。

【請求項 54】

植物の開花の過程を制御するための、配列番号 6 によって示されるカゼインキナーゼ サブユニットをコードする核酸の使用法。 20

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、植物分子生物学の分野、より詳細には、例えば、 Na^+ または Li^+ のようなイオンによって引き起こされる無機塩毒性のようなストレス状況に対する耐性の表現型を、真核生物細胞または生物に付与し得る、テンサイ遺伝子およびテンサイタンパク質の使用に関連する。

【0002】

(発明の背景)

土壤塩分は、植物農業について最も重要な非生物ストレスの 1 つであり、従って、作物の塩耐性を遺伝的に改良する実用的な目的のために、ストレス耐性遺伝子を同定および単離することは有用とされる。

【0003】

他の 2 つの主要な非生物ストレス（乾燥および寒さ）は、塩のストレスと密接に関連する。塩のストレスによって調節される多くの遺伝子はまた、乾燥のストレスまたは寒さのストレスに応答性であり（Zhu、1997）、従って、これらの遺伝子は、ストレス耐性の遺伝的な改良について特に興味深い。

【0004】

植物が塩のストレスに対して応答することによる分子機構は、解明され始めている（Hasegawa ら、2000a）。液胞および形質膜でのナトリウムトランスポーターは、それぞれ *Arabidopsis* の *NHX1* 遺伝子（Gaxiola ら、1992、Apse ら、1999）および *SOS1* 遺伝子（Shi ら、2000）の産物として同定され、塩耐性の重要な決定因子として記載されてきた。

【0005】

植物におけるストレス耐性を遺伝的に改良する目的のために、導入された場合に、ストレス耐性を速やかに付与し得るストレス耐性遺伝子を使用することは重要である。これらの遺伝子の作用は、ストレス耐性の分子機構のために必要である、他の経路に関連した事象または他の成分に依存し得ない。ストレスを加えられた生物において重要なストレス因子 30

を同定し得るが、これらの遺伝子がまた、異種の宿主において単離およびトランスフェクトされた場合、その異種の宿主においてストレス耐性の増強に寄与するかどうかの疑問は残る。

【0006】

(テンサイ(遺伝子)およびストレス)

Beta vulgaris L. (*Chenopodaceae*、テンサイ)は、他の植物(例えば、*Arabidopsis thaliana*)と比較した場合、いくぶんストレス耐性の植物であることが知られている。テンサイは、いくぶん塩および乾燥に対して比較的ストレス耐性といわれる。より困難な条件において成長するためのテンサイの能力の原因である遺伝子は、解明され始めている。研究中の遺伝子が耐性の誘導に関わり得る最初の徴候は、ストレス条件下でのその発現の増加である。例として、Matthiasら(1996)は、塩のストレスが、成熟したテンサイの葉においてV型H+ATPaseの発現の増加を誘導することを示した。ベタイン(浸透圧保護剤(osmoprotectant))もまた、塩分および乾燥に应答して多くのビート植物によって蓄積される。さらに、テンサイにおいて、テンサイのグリシンベタインの合成においてコミッティング(committing)段階を触媒するコリンモノオキシゲナーゼの発現もまた、*Chenopodaceae*における浸透圧性ストレスにより誘導される。葉におけるmRNAレベルは、400mMの塩で3~7倍に増加し、そして非誘導性のレベルまで戻った(Russell、1998)。上述のように、ストレス状況に应答するためのいくつかの代替的な経路が存在し、従って、おそらく多くの異なる遺伝子がストレス応答に関連する。

10

20

【0007】

(本発明の要旨)

本発明において、5つの新規な遺伝子が*Beta vulgaris*から単離され、そして酵母細胞に形質転換された。全てのこれらの遺伝子は、酵母細胞においてストレス耐性を誘導し、そしてカゼインキナーゼサブユニット(BvCK2Aという)、ジヒドロオロターゼ(BvDHOという)、翻訳開始因子1A(BveIF-1Aという)、および2つの他の未知のタンパク質(さらにBv120およびBv20Liという)をコードする。

【0008】

予想に反して、本発明者らは、酵母中に形質転換した場合、これらのテンサイ遺伝子が、この異種の生物にストレス(特にNa+ストレス)に対する耐性を与え得ることを示した。これらの酵母クローンのいくつかの驚くほど強力な表現型、ならびにこれらの遺伝子が、単離された位置および異種のバックグラウンドにおいてストレス耐性のエンハンサーとして作用するという事実は、これらの遺伝子を、補助的な化合物を必要とせずに、目的の任意の生物においてストレス耐性を誘導するための非常に魅力的な手段にさせる。単離および酵母細胞にトランスフェクトされた場合、酵母細胞中の浸透圧性ストレス耐性を増強させるこれらの遺伝子の能力は、これらを(他の)ストレス応答の作用を担うことが知られるが、単離された形態において使用されなかった他のテンサイ遺伝子と明らかに区別される。本発明のこれらの新規なテンサイ遺伝子の1つは、カゼインキナーゼのサブユニットをコードする。植物カゼインキナーゼサブユニットについて初めて開示することは、驚くべきことであり、そしてカゼインキナーゼの触媒性サブドメインが塩のストレス応答において機能を発揮することは、さらに驚くべきことであった。本明細書中には、テンサイプロテインキナーゼCK2(以前は、カゼインキナーゼII)の触媒性サブユニットの1つをコードするcDNAクローン(BvCKA2)が記載される。BvCKA2は、酵母のNaClに対する耐性を増大させる。さらに、テンサイにおけるBvCKA2の発現が、塩のストレスによって誘導されることが、本明細書中に示される。

30

40

【0009】

さらに、それぞれテンサイのジヒドロオロターゼおよび翻訳開始因子1Aとしての他の2つの遺伝子の同定は、非常に驚くべきことであった。なぜなら、植物ストレス分野の現在

50

の技術水準において、ストレス耐性誘導因子のようなこのようなタンパク質の機能についての証拠が存在しないからである。

【0010】

さらに、単離された遺伝子の2つが、ホモログが見い出され得なかったポリペプチドをコードしたことは驚くべきことであった。従って、これらの遺伝子は、異種の生物にストレスに対する耐性を付与するタンパク質の新規なタイプをコードする新規なタイプの遺伝子と考えられ得る。

【0011】

本発明の全てのこれらの遺伝子は、発現可能なベクターの形式においてクローニングされ、そして植物においてトランスフェクトされた場合、そのトランスジェニック植物に対して、農学的に興味深い特徴を与え得る。 10

【0012】

NaClストレスに関する新規な植物遺伝子を同定するために、本発明者らは、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いる、既に利用されているストラテジー (Serrano、1996) を採用した。本発明者らは、塩のストレス下のテンサイから cDNA ライブラリーを構築し、そしてこれを塩感受性酵母株中でスクリーニングした。酵母細胞中で発現される植物遺伝子のこのスクリーニングについての合理性は、酵母の塩耐性の分子機構のいくつかは、植物細胞の分子機構と同様であると考えられることである (Serrano、1996、Hasegawa ら、2000b)。テンサイは、比較的塩性の作物であり (Marschner、1995)、テンサイは、モデル植物 *Arabidopsis* よりも耐塩性遺伝子のよりよい供給源であり得る。 20

【0013】

従って、本発明は、配列番号 6 ~ 10 において与えられるようなアミノ酸配列を有する異なる 5 つのポリペプチドをコードする、配列番号 1 ~ 5 において与えられるようなヌクレオチド配列を有する新規な 5 つの *Beta vulgaris* 遺伝子を具体化する。

【0014】

本発明はさらに、配列番号 1 ~ 5 における上述のような配列の少なくとも一部を含有する、ベクターまたは宿主細胞もしくは生物に関する。

【0015】

さらに本発明の別の好ましい実施形態において、目的の生物 (好ましくは、植物、酵母または細菌) に対してストレス耐性を付与する方法が提供され、その方法は、その生物において 5 つのテンサイ遺伝子の少なくとも 1 つの導入を包含する。 30

【0016】

(発明の詳細な説明)

本発明の基礎となる問題の 1 つは、塩もしくは乾燥および / またはストレス条件 (例えば、寒さ、冷却および凍結のストレスまたは酸化ストレス) によって引き起こされる、浸透圧性ストレスのようなストレス条件を被る生物のストレス耐性を増強させるために使用され得る遺伝子を提供することである。

【0017】

本発明は、上記記載の問題に対する解決法を提供し、そして特許請求の範囲において特性付けられた以下の実施形態において開示される。 40

【0018】

解決法は、*Beta vulgaris* (ストレス耐性作物) が起源である遺伝子のセットを提供することによって達成され、この遺伝子のセットは、単離され、そしてこれは、*Saccharomyces cerevisiae* にストレス条件に対する耐性を付与する (例えば、Na⁺ 感受性酵母株 JM26 にストレス耐性を付与する遺伝子である)。これらの遺伝子が、全て同一の植物に由来するという事実に加えて、これらは、塩感受性酵母変異体に別々に形質転換された場合、全て塩耐性の表現型を示した。このようにすることによって、これら遺伝子の全ては、ストレス耐性の単独のエンハンサーとして作用した。予想に反して、これらの遺伝子は、カゼインキナーゼ サブユニット、ジヒドロオロ 50

ターゼ、翻訳開始因子 1 A のような非常に異なる推定上の機能を有するタンパク質をコードし、そしてこれらのいくつかは、未知のタイプの機能でさえある。これらの遺伝子のいくつかは酵母中で示した非常に強力な塩耐性の表現型のような他の特徴、およびこれらの遺伝子のいくつかは酵母中の選択的なスクリーニング手順においてしばしば単離されるという事実は、ストレス耐性エンハンサーとしてのこれらの遺伝子の有効性および効率に寄与する。この遺伝子のセットは、当業者に目的の生物をストレス状況に対して耐性にさせるためにその生物を遺伝的に変えることを可能にする。例えば、作物の栽培について、作物の多くが、塩、乾燥または寒さのようなストレス条件に対して感受性であり、開示された遺伝子は、収穫量の減少および経済的利益の減少の問題を解決させるための可能性を提供する。この遺伝子のセットの各遺伝子は、細胞中にこれらの遺伝子の少なくとも 1 つを 10
導入することによって、当業者に、細胞の運命ならびに / または植物の発育ならびに / または、植物の形態学および / もしくは生化学および / もしくは生理学を変更することを可能にする。

【0019】

カゼインキナーゼ CK2 (以前は、CKII) は、セリン - トレオニンプロテインキナーゼであり、遍在しそして真核生物の間で高く保存される (Glover、1998)。それは、2 つの触媒性のサブユニット (または ') および 2 つの調節性のサブユニット () から構成され、₂ ₂ 構造を採用するために四量体化する。プロテインキナーゼ CK2 は、核内および細胞質の画分内の両方に局在化し、ここで、それが異なる細胞性機能に関わる種々の基質をリン酸化する。酵母において、CK2 は、必須であり、そして以下 20
の少なくとも 4 つの生物学的なプロセスのために必要である：凝集、細胞周期の進行、細胞極性およびイオンの恒常性。植物において、CK2 が、細胞周期の調節 (Espuny a ら、1999)、植物成長の光調節 (Lee ら、1999) および概日時計機能 (Sugano ら、1998、Sugano ら、1999) に関与することが提案されている。植物カゼインキナーゼ サブユニットの異所性の発現とストレスとの間の関連は、全般にこれまでに証明されていない。

【0020】

従って、本発明は、配列番号 1 として示され、さらにカゼインキナーゼ 触媒性サブユニットをコードするクローン 154 として言及され、さらに BVCKA2 として言及され、そして塩感受性酵母細胞において塩耐性を増強し得る、新規のテンサイの核酸に関連する 30
ヌクレオチド位置 202 で開始し、そして 1203 で停止する、オープンリーディングフレームは、配列番号 6 において示される BVCKA2 アミノ酸配列をコードする。

【0021】

さらに、テンサイジヒドロオロターゼのような遺伝子の 1 つの同定は、非常に驚くべきことであった。なぜなら、植物ストレス分野の現在の技術水準において、ストレス耐性誘導因子としてのこのような酵素の機能についての証拠が存在しないからである。

【0022】

従って、本発明は、配列番号 2 において示され、さらに、ジヒドロオロターゼをコードするクローン 35 として言及され、さらに BV DHO として言及され、そして塩感受性酵母細胞において塩耐性を増強し得る、新規のテンサイの核酸に関連する。ヌクレオチド位置 40
199 で開始し、そして 1236 で停止する、オープンリーディングフレームは、配列番号 7 において示される BV DHO アミノ酸配列をコードする。

【0023】

さらに、単独でストレス耐性エンハンサーとして機能する、テンサイの翻訳開始因子 1 A の単離は、非常に驚くべきことであった。細胞が、翻訳能力を変えるために転写因子のリン酸化を変化させることによってストレスに対して応答することは、公知であるが、生物においてトランスフェクトされた場合、翻訳因子が、それ自身で、その生物内でストレス耐性を増強することに寄与し得ることを、初めて示すことができた。

【0024】

従って、本発明は、配列番号 3 として示され、さらに翻訳開始因子 1 A をコードするクロ 50

ーン 76 として言及され、さらに塩感受性酵母細胞において塩耐性を増強し得る B v e I F - 1 A として言及される、新規のテンサイの核酸に関連する。ヌクレオチド位置 88 で開始し、そして 521 で停止する、オープンリーディングフレームは、配列番号 8 において示される B v e I F - 1 A アミノ酸配列をコードする。

【0025】

未知の機能を有するポリペプチドをコードされる 2 つの他の核酸は、酵母中でストレス耐性を付与することが見い出された。

【0026】

従って、本発明は、配列番号 4 として示され、さらに未知のタンパク質をコードするクローン 120 として言及され、さらに塩感受性酵母細胞において塩耐性を増強し得る B v 120 として言及される、新規のテンサイの核酸に関連する。ヌクレオチド位置 29 で開始し、そして 499 で停止する、オープンリーディングフレームは、配列番号 9 に示される B v 120 アミノ酸配列をコードする。

10

【0027】

さらに、本発明は、配列番号 5 として示され、さらに未知のタンパク質をコードするクローン 20 L i として言及され、さらに塩感受性酵母細胞において塩耐性を増強し得る B v 20 L i として言及される、新規のテンサイの核酸に関連する。ヌクレオチド位置 1 で開始し、そして 879 で停止する、オープンリーディングフレームは、配列番号 10 において示される B v 20 L i アミノ酸配列をコードする。

【0028】

20

本発明の第 1 の局面は、上述のように、NaCl 誘導性のテンサイの葉に由来する cDNA ライブラリーのスクリーニング、そして引き続く 5 つのテンサイ遺伝子の単離の手順である。塩のストレスに対する植物の応答に関連されるテンサイタンパク質の同定のための機能的なアプローチが続く。この目的のために、NaCl 誘導性の cDNA 発現ライブラリーは、実施例 1 および実施例 3 において記載されるようにテンサイの葉から構築され、そして Na⁺ 感受性酵母変異株 JM26 (実施例 2 を参照のこと) を、過剰発現の際に酵母塩耐性が増強するテンサイ cDNA についてスクリーニングするために使用した。この酵母変異体の増殖は、通常、大部分の作物種の成長を害する濃度と同様の NaCl 濃度 (150 mM) で阻害される。このスクリーニング手順は、実施例 4 において記載される。cDNA 挿入物を含むプラスミド pYPGE15 を用いて 100,000 の個々の細胞を形質転換した後、コロニーをプールして、150 mM の NaCl の存在下で増殖するそれらの能力について選択した (実施例 4 を参照のこと)。ポジティブなクローンの内の 4 つを、クローン 154、クローン 35、クローン 76 およびクローン 120 と命名した。

30

【0029】

酵母のクローン 154、クローン 35、クローン 76 およびクローン 120 は、明らかな塩耐性の表現型を有し、そして表現型は、再現性が高かった: 150 mM の NaCl 下でのコントロール酵母細胞は、少しも増殖せず、そして挿入物 154、35、76 または 120 を過剰発現する酵母細胞は、増殖した。塩耐性酵母クローンの選択の間、クローン 35 および 76 は、それぞれ 2 回および 3 回ずつ選択され、このことは塩のストレスを加えられたテンサイの葉におけるこれらのクローンの大量の存在を示唆する。

40

【0030】

同一の選択的なスクリーニングの手順をまた、Li⁺ に耐性の酵母細胞を選択するために実施した。テンサイ cDNA ライブラリーの形質転換の後、コロニーをプールして、実施例 4 中に記載されるようにメチオニンを用いない 20 mM の LiCl の存在下で増殖するそれらの能力について選択した。ポジティブなクローンの 1 つを、20 L i と命名した。クローン 20 L i は、強力な Li⁺ 耐性の表現型を示した。

【0031】

強力な表現型の定義は、滴下試験 (drop test) の実験に基づく。飽和した培養物のいくつかの希釈溶液 (1:10、1:100、1:1000) を、作製し、そしてこれらを、選択培地 (150 mM の NaCl + メチオニン、またはメチオニンを含まない 2

50

0 mMのLiCl)上で増殖させた。強力な表現型は、アッセイされた希釈溶液の全てにおいて十分に増殖したそれらのクローンである(例えば、NaClに対してクローン35、76、120およびLiClに対してクローン20Li)。クローン154は、酵母中でこのような非常に強力な表現型を有さなかった。なぜなら、第1希釈溶液(1:10)のみが、選択培地中で増殖し得たからである。空のプラスミドを発現するコントロール細胞は、選択培地内で全く増殖しなかった。

【0032】

従って、本発明の第1の実施形態は、酵母細胞に対してストレス耐性を付与するBeta vulgaris遺伝子の少なくとも1つの発現を包含する、生物におけるストレス耐性の誘導のための方法に関連する。

10

【0033】

別の実施形態において、本発明は、植物においてストレス耐性を増強するためのBeta vulgaris核酸の使用に関連し、この使用は、その核酸が酵母細胞(例えば、Na⁺感受性酵母株JM26に由来する酵母細胞)に対してストレス耐性を付与するとして特性付けられる、該Beta vulgaris核酸の発現を包含する。

【0034】

さらなる実施形態において、本発明は、生物における浸透圧性ストレスの耐性の誘導のための方法であり、この方法は、酵母細胞に対して、塩のストレス耐性または乾燥のストレス耐性または霜のストレス耐性のような、浸透圧性ストレス耐性または酸化ストレス耐性を付与する、Beta vulgaris遺伝子の少なくとも1つの発現を包含する。

20

【0035】

本明細書で使用される場合、語句「ストレス耐性の誘導」とは、「ストレス耐性の強化」と同じ意味を有し、したがってこれらの語句は互いに交換可能に用いられる。

【0036】

選択されたクローンの全ては、以下により詳細に記載される。可能な相同物を発見するため、(推定上の)ORFのアミノ酸配列を、BlastP 2.0.10プログラム(Altschulら、1997)を用いて行う、相同性検索に供した。

【0037】

クローン154中に存在するプラスミドのcDNA挿入物は、39.4 kDの予測分子量を有する、333アミノ酸のポリペプチド(配列番号6)をコードする999塩基対のオープンリーディングフレームを有する1527塩基対のcDNA(配列番号1)を含む。BvCKA2と名付けられたこのポリペプチドは、Zeamays由来プロテインキナーゼCK2(ZMCKA2)の触媒サブユニットの1つ(鎖2)と91.6%の同一性を有する。BvCKA2は、真核生物プロテインキナーゼの11の典型的なサブドメイン(Hanksら、1995)およびCK2触媒サブユニットの特徴である保存的アミノ酸残基の全てを含む(図1)。触媒部位に存在する170-DWG-172は、CK2サブユニットにとって不変のフィンガープリントパターンである(Niefindら、1998)。また、BvCKA2の中には、必須の触媒リシン(63-K)および高度な塩基性領域(69-KKKKIKR-75)がある。クローン35中に存在するプラスミドのcDNA挿入物は、40.8 kDの予測分子量を有する345アミノ酸のポリペプチド(配列番号7)をコードする1035塩基対のオープンリーディングフレームを有する1743塩基対のcDNA(配列番号2)を含む。BvDHOと名付けられたこのポリペプチドは、Arabidopsis thaliana由来プロテインジヒドロオロターゼの前駆体と79%の同一性を有し、そしてジャガイモのジヒドロオロターゼと81%の同一性を有する(WO0118190、WO0114569)。クローン76中に存在するプラスミドのcDNA挿入物は、17 kDと予測分子量を有する144アミノ酸のポリペプチド(配列番号8)をコードする432塩基対のオープンリーディングフレームを有する643塩基対のcDNA(配列番号3)を含む。BveIF-1Aと名付けられたこのポリペプチドは、Onobrychis viciifolia(普通のイガマメ)由来の真核生物翻訳開始因子1A(eIF-1Aまたは、以前はeIF-4Cとして知られてい

30

40

50

たもの)の前駆体と88%の同一性を有する。クローン120中に存在するプラスミドのcDNA挿入物は、18.5kDの予測分子量を有する、Bv120と名付けられた156アミノ酸のポリペプチド(配列番号9)をコードする468塩基対のオープンリーディングフレームを有する845塩基対のcDNA(配列番号4)を含む。クローン20Li中に存在するプラスミドのcDNA挿入物は、34.5kDの予測分子量を有する292アミノ酸のポリペプチド(配列番号10)をコードする876塩基対の推定オープンリーディングフレームを有する879塩基対のcDNA(配列番号5)を含む。Bv20Liと名付けられたこのポリペプチドは、機能が記載されていないArabidopsis thalianaのゲノムクローンから予測されるタンパク質と59%の同一性を有する。

10

【0038】

従って、さらなる実施形態において、本発明は、植物において浸透圧ストレス耐性または酸化ストレス耐性を強化するためのBeta vulgaris核酸の使用に関し、ここで上記のBeta vulgaris核酸は、以下の内の一つから選択される：

(a) 配列番号1～5のいずれかとして与えられるDNA配列またはその相補体を含む核酸、

(b) 配列番号1～5のいずれかに対応するRNA配列またはその相補体を含む核酸、

(c) 高いストリンジェンシー条件下で(a)または(b)に記載の核酸に対し特異的にハイブリダイズする核酸、

(d) 配列番号6に与えられるアミノ酸配列に対し、少なくとも93%、好ましくは少なくとも95%、96%、97%、98%または99%同一であるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする核酸、

20

(e) 配列番号7に与えられるアミノ酸配列に対し、少なくとも80%、好ましくは少なくとも82%、85%、または90%、より好ましくは少なくとも95%、98%または99%同一であるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする核酸、

(f) 配列番号8に与えられるアミノ酸配列に対し、少なくとも89%、好ましくは90%、92%、95%または96%、より好ましくは97%、98%または99%同一であるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする核酸、

(g) 配列番号9に与えられるアミノ酸配列に対し、少なくとも75%、好ましくは80%、85%または90%、より好ましくは95%、96%、97%、98%または99%同一であるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする核酸、

30

(h) 配列番号10に与えられるアミノ酸配列に対し、少なくとも65%、好ましくは70%、75%、80%、85%または90%、より好ましくは95%、96%、98%または99%同一であるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする核酸、

(i) 配列番号6～10のいずれかとして与えられるアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする核酸、

(j) 配列番号1～5のいずれかとして与えられるDNA配列によってコードされる免疫学的に活性なタンパク質および/またはこのタンパク質の機能的フラグメントをコードする核酸、

(k) 遺伝コードの結果として、配列番号1～5のいずれかとして与えられる核酸に縮重される核酸、または(a)～(j)のいずれかに規定される核酸に縮重される核酸、

40

(l) 生物体の間のコドン利用における差異の結果として、配列番号6～10のいずれかとして与えられるタンパク質をコードする核酸から分岐する核酸、または(a)～(j)のいずれかとして規定される核酸から分岐する核酸、

(m) 対立遺伝子の間の差異の結果として、配列番号6～10のいずれかとして与えられるタンパク質をコードする核酸から分岐する核酸、または(a)～(j)のいずれかに規定される核酸から分岐する核酸、および

(n) 上記の核酸が、DNA、cDNA、ゲノムDNAまたは合成DNAであることで特徴付けられる(a)～(m)のいずれか1つとして規定される核酸

さらに、本発明の一つの実施形態は、植物または植物群においてストレス耐性を強化する

50

ための方法であって、この方法は、上記の植物または植物群の細胞、組織または部分において上記に記載された核酸の少なくとも一つの発現を包含する。

【0039】

また、既に本発明に従って核酸を既に発現した植物について、本発明の別の実施形態は、上記の植物におけるストレス耐性を変更するための方法であって、この方法は上記の植物中の細胞、組織または部分における本発明の核酸の発現の変更を包含する。

【0040】

興味深い実施形態において、本発明は、生物体（例えば植物）におけるストレス耐性の誘導のための方法に関し、この方法はカゼインキナーゼ サブユニット（例えば、上記の生物体の細胞、組織または一部における植物カゼインキナーゼ サブユニット）をコードする核酸の発現または発現の変更を包含する。より好ましくは、本発明は、生物体（例えば、植物、酵母、または細菌）への、浸透圧、塩、 Na^+ または Li^+ に対するストレス耐性の誘導のための方法に関し、この方法は植物カゼインキナーゼ サブユニット（例えば、砂糖大根のカゼインキナーゼ サブユニットまたはその相同体もしくはオルソログ）の発現を包含する。好ましい実施形態において、本発明は、植物（例えば、コメ）における Na^+ 耐性の誘導のための方法に関し、この方法は砂糖大根のカゼインキナーゼ サブユニットの発現を包含する。

10

【0041】

本発明の興味深い実施形態において、上記の植物カゼインキナーゼ サブユニットは、配列番号1および6で表される。

20

【0042】

別の実施形態に従って、本発明は、植物の開花過程の制御するためのカゼインキナーゼの使用に関する。本発明者らは、驚くべきことに、カゼインキナーゼ サブユニット（例えば、本発明によって同定された砂糖大根カゼインキナーゼ サブユニット）の過剰発現が日光とは独立に、開花過程への影響を有することを発見した。

【0043】

本発明は従って、植物の開花過程を制御するための方法に関し、この方法は植物の細胞、組織または上記の一部においてカゼイン サブユニット（例えば、配列番号6で表される）をコードする核酸の発現または発現の変更を包含する。

【0044】

従って、本発明はまた植物の開花過程を制御するためのカゼイン サブユニット（例えば、配列番号6で表される）をコードする核酸の使用に関する。

30

【0045】

さらに、本発明の好ましい実施形態は、生物体（例えば、植物）においてストレス耐性を強化するための方法に関し、この方法は上記の生物体もしくは植物の細胞、組織または一部においてジヒドロオロターゼをコードする核酸の発現または発現の変更を包含する。

【0046】

より好ましくは、本発明は、生物体（例えば、植物、酵母、または細菌）における、浸透圧、塩、 Na^+ または Li^+ に対するストレス耐性の誘導のための方法に関し、この方法は植物ジヒドロオロターゼ（例えば、砂糖大根の、またはそれらの相同体もしくはオルソログまたはパラログ（*paralogue*）ジヒドロオロターゼ）の発現を包含する。好ましい実施形態において、本発明は、植物（例えば、コメ）に対する Na^+ 耐性の誘導のための方法に関し、この方法は、砂糖大根のジヒドロオロターゼの発現を包含する。本発明の興味深い実施形態において、上記のジヒドロオロターゼは、配列番号2および7によって表わされる。別の実施形態において本発明は、生物体（例えば植物）においてストレス耐性の誘導のための方法に関し、この方法は上記の生物体の細胞、組織または一部における翻訳開始因子1Aをコードする核酸の発現または発現の変更の方法を包含する。より好ましくは、本発明は、生物体（例えば、植物、酵母、または細菌）における、浸透圧、塩、 Na^+ または Li^+ に対するストレス耐性の誘導のための方法に関し、この方法は植物転写開始因子1A（例えば、砂糖大根、またはそれらの相同体、オルソログもしくはパ

40

50

ラログの転写開始因子 1 A) の発現を包含する。本発明の好ましい実施形態は、植物 (例えばコメ) における Na⁺ 耐性の誘導のための方法に関し、この方法は砂糖大根の転写開始因子 1 A の発現を包含する。本発明の興味深い実施形態において、上記の転写開始因子 1 A は、配列番号 3 および 8 で表わされる。

【 0 0 4 7 】

別の実施形態において、本発明は、植物におけるストレス耐性を強化するための方法に関し、この方法は配列番号 4 もしくは 5 によって表わされる核酸、またはその相同体、オルソログもしくはパラログの核酸の発現または発現の変更を包含する。

【 0 0 4 8 】

本発明はまた、以下の群から選択される免疫学的に活性なタンパク質および / またはこの
10 ようなタンパク質の機能的フラグメントをコードする単離された核酸に関し :

(a) 配列番号 1 ~ 5 のいずれかとして与えられる DNA 配列またはその相補体を含む核酸、

(b) 配列番号 1 ~ 5 のいずれかに対応する RNA 配列またはその相補体を含む核酸、

(c) 高いストリンジェンシー条件下で (a) または (b) に規定されるヌクレオチド配列に対し、特異的にハイブリダイズする核酸、

(d) 配列番号 6 に与えられるアミノ酸配列に対し、少なくとも 93 %、好ましくは少なくとも 95 %、96 %、97 %、98 % または 99 % 同一であるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする核酸、

(e) 配列番号 7 に与えられるアミノ酸配列に対し、少なくとも 80 %、好ましくは少なくとも 82 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 % または 99 % 同一であるアミノ酸配列を
20 有するタンパク質をコードする核酸、

(f) 配列番号 8 に与えられるアミノ酸配列に対し、少なくとも 89 %、好ましくは少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 % また
は 99 % 同一であるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする核酸、

(g) 配列番号 9 に与えられるアミノ酸配列に対し、少なくとも 75 %、好ましくは少なくとも 78 %、80 %、85 %、87 %、89 %、91 %、93 %、96 %、95 %、97 %、98 % または 99 % 同一であるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする核酸
30 、

(h) 配列番号 10 に与えられるアミノ酸配列に対し、少なくとも 65 %、好ましくは少なくとも 70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 % また
は 99 % 同一であるアミノ酸配列を有するタンパク質の少なくとも一部をコードする核酸、

(i) 配列番号 6 ~ 10 のいずれかとして与えられるアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする核酸、

(j) 配列番号 1 ~ 5 のいずれかとして与えられる DNA 配列によってコードされる免疫学的に活性なタンパク質および / またはこのタンパク質の機能的フラグメントをコードする核酸、

(k) 遺伝コードの結果として、配列番号 1 ~ 5 のいずれかとして与えられる核酸に縮重
40 される核酸、または (a) ~ (j) のいずれかとして規定される核酸に縮重される核酸、

(l) 生物体の間のコドン利用における差異の結果として、配列番号 6 ~ 10 のいずれかとして与えられるタンパク質をコードする核酸から分岐する核酸、または (a) ~ (j) の
いづれかとして規定される核酸から分岐する核酸、

(m) 対立遺伝子の間の差異の結果として、配列番号 6 ~ 10 のいずれかとして与えられるタンパク質をコードする核酸から分岐する核酸、または (a) ~ (j) のいずれかに規定
される核酸から分岐する核酸、および

(n) 上記の核酸が、DNA、cDNA、ゲノム DNA または合成の DNA であることで
特徴付けられる (a) ~ (m) のいずれか 1 つとして規定される核酸

酵母における相同体を有するため、クローン 154 (配列番号 1) を、さらなる特性付け
50

のために選んだ。多くの情報は、酵母およびその他の生物体（例えば、酵母 C K 2 サブユニットの変異体）における C K 2 について、利用できる。

【 0 0 4 9 】

砂糖大根ゲノム中の B v C K A 2 の存在を確認し、そしてこの植物種における C K 2 触媒サブユニットをコードする遺伝子の数を評価するために、本発明者らは、サザンブロット分析を行った。実施例 8 に記載されるように、本発明者らは、B v C K A 2 の O R F を含むフラグメントを用いてゲノムの砂糖大根ゲノム D N A を初めにハイブリダイズした（図 2 A）。ゲノム D N A を消化するために使用される制限エンドヌクレアーゼに影響されないすべてのレーンにおけるいくつかのハイブリダイゼーションフラグメントの存在は、C K A 2 が砂糖大根における多コピー型（m u l t i c o p y）遺伝子ファミリーのメンバーであることを示唆する。本発明者らが用いたハイブリダイゼーションプローブは、触媒サブユニットの異なるアイソフォームをコードする遺伝子を含む、C K 2 ファミリーのすべてのメンバーを認識し得る。より特異的なプローブが、ハイブリダイゼーションに使用された場合、B a m H I および H i n d I I I 消化による 2 つのバンド、および E c o R I 消化による 1 つのバンドのみが、検知され得る（図 2 B）。このことは、砂糖大根における C K 2 触媒サブユニットをコードする 2 つの非常に密接に関連した遺伝子の存在を示唆し得る。

10

【 0 0 5 0 】

酵母にストレス耐性を賦与する B v C K A 2 遺伝子の機能性を確認するために、酵母 C K 2 変異体の相補性を、実証した（実施例 6）。

20

【 0 0 5 1 】

酵母 *S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e* において、C K 2 は、増殖のために必須であり、関連する 2 つの触媒サブユニットをコードする、2 つの重複遺伝子、C K A 1 および C K A 2 が存在する（P a d m a n a b h a ら、1 9 9 0）。Y D H 8 は、熱感受性 c k a 2 サブユニット（p D H 8）を有するプラスミドを保有する、c k a 1 / c k a 2 二重変異酵母株である。B v C K A 2 が、Y D H 8 株の熱感受性表現型を抑圧し得るか否かを決定するために、本発明者らは、プラスミド p Y P G E 1 5 + B v C K A 2 を用いて Y D H 8 細胞を形質転換した。Y D H 8 株は、許容温度の 2 5 °C でのみ増殖し得るが、B v C K A 2 を過剰発現する Y D H 8 は、2 5 °C および 3 7 °C で増殖し得た（図 3）。B v C K A 2 はまた、c k a 1, 2 変異株の表現型の他の特質（凝集など）を補完し得た（データは示さない）。最後に、p D H 8 プラスミドが取り出され、そして細胞が、B v C K A 2 のみを発現した場合、この植物酵素は、2 5 °C および 3 7 °C における酵母の増殖を支持し得た（データは示さない）。これらの結果は、B v C K A 2 が C K 2 の酵母触媒サブユニットを機能的に置換し得ることを、明瞭に示唆し、そしてこれは、C K 2 が、両方の生物体において関連する過程を調節していることを示唆し得る。

30

【 0 0 5 2 】

B v C K A 2 遺伝子のクローニングを例示する、本発明のこれらの局面に従って、本発明は、本発明の核酸と特異的にハイブリダイズする少なくとも 1 5 ヌクレオチド長の核酸分子を言及する。

【 0 0 5 3 】

関連する好ましい実施形態において、本発明はまた、本発明の核酸を特異的に増幅する少なくとも 1 5 ヌクレオチド長の核酸分子に言及する。

40

【 0 0 5 4 】

本発明の別の好ましい実施形態は、上記に規定された核酸の配列を含むベクター（例えば、発現ベクター）であり、ここで、核酸配列は、原核生物および/または真核生物の宿主細胞において上記の配列の発現を可能にする 1 つ以上の制御配列に対し作動可能的に連結される。

【 0 0 5 5 】

本発明のさらなる関連する実施形態は、上記に規定される核酸分子または上記に規定されるベクターを含む宿主細胞であり、このような宿主細胞は、例えば、細菌細胞、昆虫細胞

50

、真菌細胞、植物細胞または動物細胞が挙げられる。

【0056】

BvCKA2 遺伝子の機能性はまた、実施例7に記載されるNaClを有する培地におけるNa⁺感受性酵母株JM26（実施例2）の増殖の実証によって確認された。

【0057】

CK2の非必須制御サブユニットの欠損体（defective）である、この酵母変異株は、Na⁺およびLi⁺に対する過敏症の表現形を示す（Bidwaiら、1995、Nadalarら、1999b）。砂糖大根触媒2サブユニット（BvCKA2）および、実施例5において記載されたようにクローン化された酵母触媒サブユニット（ScCKA2）の1つの、両方の過剰発現は、JM26酵母細胞のNa⁺耐性を高めた（図4）。これは、Na⁺耐性におけるCK2の特異的な効果を示す。BvCKA2を過剰発現する酵母細胞の高められたNa⁺耐性はまた、液体培養において実証され得る。

10

【0058】

上記で言及される砂糖大根遺伝子の過剰発現の機能的効果はまた、恐らく、これらの遺伝子によって産生されるまたは合成的方法によって生成される単離されるポリペプチドの適用によっても獲得され得る。

【0059】

従って、本発明はまた、上記に記載されるような本発明の核酸によってコードされ得る、単離されたポリペプチド、もしくはその相同体またはその誘導体、あるいはその免疫学的に活性なフラグメントおよび/またはその機能的フラグメントに関し、このポリペプチドは、好ましくは配列番号6-10のいずれかとして与えられるアミノ酸配列、もしくはその相同体またはその誘導体、あるいはその免疫学的に活性なフラグメントおよび/またはその機能的フラグメントとして与えられるアミノ酸配列を有する。

20

【0060】

本発明の関連する好ましい実施形態はまた、上記で言及されるようなポリペプチドを生成するための方法であり、この方法は、ポリペプチドの発現を許容する条件下での、上記で言及されるような宿主細胞の培養すること、および培養液からの産生されたポリペプチドの回収することを包含する。

【0061】

砂糖大根遺伝子の発現において見られる機能的効果はまた、これらの遺伝子によって生成されるポリペプチドに結合するタンパク質によって影響され得る。従って、さらに別の好ましい実施形態において、本発明は、上記で言及されるようなポリペプチドまたは上記のポリペプチドの特定のエピトープを特異的に認識する抗体に関する。

30

【0062】

BvCKA2により賦与される塩耐性の機構が、イオンホメオスタシスの調節に起因するかどうかを調査するために、Na⁺およびK⁺の存在下で増殖中の細胞におけるこれらのイオンの細胞内レベル（表1）を、実施例7に記載されるように決定した。BvCKA2の発現は酵母細胞におけるNa⁺およびK⁺含有量を有意に変化しなかったことを、決定した。

【0063】

【表1】

表1：CKA2を過剰発現するJM26細胞のカリウムおよびナトリウム濃度(mM)。細胞を、75mM NaClの存在下で一晩培養した。結果を、3回の独立した実験の平均値±SDとして示す。

40

	[K]	[Na]
PYPGE15	57±11	136±9
PYPGE15+BvCKA2	56±3	146±9

酵母において、CK2（CKB1）の調節サブユニットにおける変異体は、Na⁺およびLi⁺に対し非常に感受性であることが示されてきた（Bidwaiら、1995、N

50

a d a l ら、1999 a)。本発明の1つの局面は、酵母のみならず、植物 C K 2 触媒サブユニットの過剰発現もまた、酵母の Na^+ に対する耐性を高めることである。C K 2 活性の減少が、 NaCl に対する感受性を増大する (c k b 1 酵母変異体) のみならず、塩耐性を改良する C K 2 活性もまた増大するので、C K 2 は、酵母における塩耐性の重要な決定因子となることが可能である。しかしながら、C K 2 が酵母の塩耐性を制御し得る機構は知られていない。最近、発表されたデータは、C K 2 が酵母における Na^+ 流出についての主要な決定因子である E N A 1 A T P a s e の転写を制御したことを示唆する (T e n e y および G l o v e r、1999)。本発明の局面の1つは、B v C K A 2 によって賦与される塩耐性が、これらの細胞における Na^+ ホメオスタシスの調節と関係ないことが実証されたので、これとは反対の教示をする。さらに、B v C K A 2 の過剰発現は、 Na^+ 流出に関与する主要な2つの輸送システム (E N A 1 - 4 A T P アーゼおよび Na^+ / H^+ 対向輸送機構 N H A 1) を欠損する J M 2 6 酵母変異体の塩耐性を改良することが、示された。さらに、細胞内 Na^+ および K^+ の測定は、コントロールと C K A 2 過剰発現細胞との間に有意な差異を示さなかった (表 1)。空胞 Na^+ / H^+ 対向輸送機構 N H X を欠損する酵母細胞はまた、C K A 2 を過剰発現した場合、 NaCl を有する培地において増殖の改善を示し、このことは C K 2 が空胞の隔離を通して Na^+ の細胞質レベルを変えらるという可能性を除外する (データは示さない)。これに従って、N a d a l ら (1999 b) は、酵母 c k b 1 変異体の塩感受性がナトリウムの流れの欠損に起因しないことを示した。これらの著者らは、C K 2 が、リン酸化によって塩感受性である細胞機構の重要な構成要素の Na^+ 感受性を減少し得ると仮定した。多くの基質 (転写因子、タンパク質キナーゼおよびトポイソメラーゼを含む) が推定上の C K 2 リン酸化部位を有することが見出されているので (G r e i n ら、1999)、このような塩毒性の推定上の標的を見つけることは難しい。

10

20

30

40

【0064】

B v C K A 2 が、塩ストレスに対する砂糖大根植物の応答に関与することを確かめるために、 NaCl への種々の曝露時間に対する B v C K A 2 m R N A の蓄積を分析した。C K A 2 特異的プローブを使用する R N A ゲルプロットは、B v C K A 2 c D N A のサイズに対応する唯一のバンド (1.5 kb) を示した。図 5 に示されるように、B v C K A 2 m R N A は、 NaCl 処理の時間に伴い蓄積され、そして 24 時間目に最大量に達した。増加量は、コントロール植物と比較して約 3 倍であった。ストレス耐性に関与する遺伝子の検索に使用される砂糖大根 c D N A ライブラリーはまた、 NaCl を用いて 24 時間処理された植物から得られたことに注目することは興味深い。

【0065】

B v e I F - 1 A が塩ストレスに対する酵母細胞の応答に関与することを確かめるために、タンパク質へのフェニルアラニンの取り込みを測定した。本発明者らは、塩ストレス条件下において B v e I F - 1 A をコードする c D N A を用いて形質転換した酵母細胞におけるフェニルアラニンの取り込みが、空のベクターによって形質転換された細胞より高いことを、観察した (実施例 12)。これらの結果は、e l F - 1 a が、ストレス耐性に対し直接的に関与することを実証する。さらに、これらの結果は、この c D N A (配列番号 N r . 3 に従う) の過剰発現が、塩ストレス条件下における翻訳を改善し得ることを示す。

【0066】

これらの新しい知見は、翻訳開始因子がストレス耐性を改善することを示す初めての証拠であるため、非常に興味深い。

【0067】

本発明の砂糖大根遺伝子は、相同な酵母中にトランスフェクトされる場合、これにストレス耐性を賦与することが示された。

【0068】

さらに、本発明の砂糖大根遺伝子は、植物に、トランスフェクトされる場合、これにストレス耐性を賦与することが示された (実施例 10)。

50

【0069】

これらの遺伝子のさらなる作物学的な興味深い適用は、好ましくない(unfunate)成長条件に対するさらなる耐性を作物植物に与えるために、これらの遺伝子を作物植物にトランスフェクトすることである。イネ植物は、イネ植物に対し塩耐性を賦与し得る、本発明の少なくとも1つの砂糖大根遺伝子(実施例9)を用いてトランスフェクトされ得る。この適用は、土壤中の灌漑用水に由来する塩の堆積および蓄積によって引き起こされる、ひどく灌漑された土地でのコメの産出高の減少に対する解決を与える。

【0070】

本発明の上記で言及された局面に従って、植物内(in planta)のストレス状況に対する生理的な応答における砂糖大根遺伝子の記載される効果について、本発明はまた、トランスジェニック植物、植物細胞または植物組織の産生のための方法に関し、この方法は、上記で規定されたような発現可能な形態またはベクターとして、上記で規定されたような核酸分子の上記の植物、植物細胞または植物組織への導入を包含する。

10

【0071】

さらに、変更された植物、植物細胞または植物組織の産生のための方法は、本発明の範囲内であり、この方法は、本発明のポリペプチドを上記の植物の細胞、組織または器官への直接的な導入を包含する。

【0072】

さらなる実施形態において、本発明は、植物細胞、組織または植物におけるストレス耐性を強めるための方法に関し、この方法は、上記で言及された任意の核酸の上記の植物の上記の植物細胞、組織または器官への導入を包含する。

20

【0073】

さらに、本発明は、好ましい実施形態において上記で言及されたポリペプチドの発現を達成するための方法を提供し、この方法は、上記で規定されるような1つ以上の制御配列またはベクターと必要に応じて作動可能的に連結され、植物細胞のゲノム中に安定する、本発明の核酸の導入を包含する。さらに関連する実施形態は、本発明は、上記の方法を提供し、この方法は、上記植物細胞から植物を再生することをさらに包含する。

【0074】

さらなる実施形態において、本明細書に開示される本発明は、トランスジェニック植物細胞に関し、上記に記載される方法によって入手できる、植物細胞またはトランスジェニック植物細胞中の上記の核酸の転写および/または発現を許可する調節要素と作動可能的に連結される本発明の核酸配列を含有する。さらに、このトランスジェニック植物細胞は、そのゲノムに安定に統合された本発明の格さんを有し得る。また、トランスジェニック植物または植物細胞は、本発明の範囲内であり、上記に記載されるような植物細胞を含有し、そして、さらに、このトランスジェニック植物は、ストレス、好ましくは浸透圧ストレス(例えば、塩)、Na⁺ストレス、Li⁺ストレス、干ばつストレス、低温ストレスまたは凍結ストレスあるいは酸化ストレスに対し、対応する野生型植物と比較して増大した耐性を示し得る。本発明の関連する実施形態は、このような植物の収穫できる部分であり、これは、種、葉、果実、花茎節培養(stem culture)、根茎および鱗茎あるいは上記に記載された任意の植物または植物の一部に由来する子孫(progeny)からなる群より選択され得る。

30

40

【0075】

本発明の砂糖大根遺伝子はそれらの相同的な生育環境に機能的に制限されないことが実証されたので、本発明の範囲はまた、生物体におけるストレス耐性を変更するための方法に関し、この方法は、上記の生物体の細胞、組織または一部における本発明の核酸の発現または発現の変更を包含する。

【0076】

当業者により公知ように、塩ストレスに関与する多くの遺伝子はまた、他のストレス状況に対する応答に関与する。従って、本発明はまた、トランスジェニック細胞、トランスジェニック植物、または他のトランスジェニック生物体を生成するための上記で言及された

50

方法に関し、ここで、上記のストレスは、浸透圧ストレス、塩ストレス、干ばつストレス、凍結ストレスもしくは低温ストレス、または酸化ストレスであり得る。

【0077】

本発明の最も実用的な適用として、新規の技術が、形質転換された生物体に対する有益な効果をもたらすために使用され得る。従って、最も好ましい実施形態において、本発明は、上記で言及された任意の方法に従う方法に関し、収穫の増加を導く上記の方法、およびさらに、上記の核酸の発現が、プロモーターの制御下において生じる方法に関する。上記のプロモーターは、構成プロモーターまたは誘導性プロモーターであり得る。この場合、遺伝子の細胞特異的発現、組織特異的発現または器官特異的発現が求められるとき、細胞特異的プロモーター、組織特異的プロモーターまたは器官特異的なプロモーターが、使用される。本発明の方法において使用され得るプロモーターの実施例の網羅的な、しかし非制限的なリストが、表4に提供される。酵母に関しては、概日時計の調節に關与するCCA1 (Suganoら、1999)のような転写因子、または光誘導性遺伝子の発現を調節するGBF1 (DonaldおよびCashmore 1990)を含む、植物CK2に対する多くの相互作用パートナーが、推論されてきた。興味深いことに、塩ストレスによって誘導される2つのタンパク質キナーゼ、ATPK19およびATPK6、もまた推定CK2リン酸化部位を含む (Mizoguchiら、1995)。

10

【0078】

従って、本発明の好ましい実施形態は、スクリーニングアッセイを含む本発明のポリペプチドに相互作用するタンパク質の同定および獲得のための方法であり、ここで本発明のポリペプチドが使用される。この方法は、例えばツーハイブリッドスクリーニングアッセイを包含し得、ここで本発明のポリペプチドはおとり (bait) として、およびcDNAライブラリーはえさ (prey) として使用され得る。

20

【0079】

また、本発明のポリペプチドと上記に記載される方法により得られる相互作用タンパク質パートナーとの間の相互作用の調節のための方法は、本発明の範囲内である。さらに、本発明は、本発明のポリペプチドと相互作用する化合物を同定し、獲得するための方法を具体化し、この方法は以下の工程を包含する：

(a) ツーハイブリッド系を提供する工程であって、ここで本発明のポリペプチドおよび上記に記載される方法により得られる相互作用タンパク質パートナーが、発現される工程

30

(b) 上記の化合物を、(a)において規定される発現ポリペプチドによって形成される複合体と相互作用させる工程、

(c) 上記の化合物の上記のポリペプチドまたは(a)に規定される発現ポリペプチドによって形成される複合体との相互作用の測定を行う工程。

【0080】

さらに、本発明は、本発明のポリペプチドに特異的に結合する化合物または化合物の混合物を同定するための方法を具体化し、この方法は、以下を包含する：

(a) 複合体の形成を許容する適当な条件下で、本発明のポリペプチドを、上記の化合物または化合物の混合物と合わせる工程、および、

40

(b) 複合体形成を検知する工程であって、ここで複合体の存在は、上記のポリペプチドに特異的に結合する化合物または化合物の混合物を同定する工程。

【0081】

本発明のポリペプチドのこれらの相互作用パートナーが、これらのポリペプチドの機能性において協調し得るので、本発明はまた、この方法によって同定された化合物または化合物の混合物の、生物におけるストレス耐性を増強する因子としての使用を具体化する。

【0082】

従って、本発明は、このに規定されるような本発明の核酸分子の使用、本発明のベクターの使用、収量を増加させるかまたは植物増殖を刺激するための本発明のポリペプチドの使用を具体化する。詳細には、本発明は、植物の収穫し得るいかなる部分 (例えば、根、葉

50

、種子など)の収量を増加させる機会を提供する。

【0083】

作物の農業的成功にとって、ストレス環境に対抗し得ることは重要である。それゆえ、重要な作物をストレス耐性遺伝子の存在に関してスクリーニングするために本発明の遺伝子またはポリペプチドを使用することは有用であり得る。従って、本発明は、少なくとも本発明の核酸、本発明のベクター、本発明のポリペプチドまたは本発明の抗体を含む、診断組成物に関する。

【0084】

正常植物増殖条件において、典型的には1 mMより低濃度のNa⁺が存在することが記載されている。それゆえ、本発明は、このに規定されるような方法によって得られる植物を使用するための可能性または1 mMイオンを上回る塩含有量を有する土壌で栽培するための本発明の植物を提供する。多くの実験において、塩耐性植物が約40 mMから約400 mMのNa⁺を有する条件において増殖し得ることが示された。

10

(定義および実施形態の詳細)

当業者は、本明細書中に記載される発明が、特に記載されるもの以外の他の発明の改変物および変異物に供されることを認識している。本明細書中に記載される本発明は、このような改変体および変異物の全てを含むことが、理解される。本発明はまた、本明細書において(個々にまたは集団で)言及されるかもしくは示されるこのような工程、特徴、組成物、および化合物の全て、ならびにこの工程およびこの特徴のいずれかもしくはそれより多くの、任意のまたはすべての組み合わせを含む。

20

【0085】

本明細書を通じ、他に必要としない限り、用語「含む(comprise)」、および改変(例えば、「含む(comprises)」および「含む(comprising)」)は、示された整数もしくは工程、または整数もしくは工程の群を包括するが、任意の他の整数もしくは工程、または整数もしくは工程の群を除かないことを含むことが理解される。

【0086】

本明細書中に使用される場合、用語「由来する」は、特定の整数または整数の群が特定の種にもともとは由来するが、特定の供給源から直接に得られる必要はないことを示すと理解される。

30

【0087】

用語「タンパク質」、「ペプチド」または「オリゴペプチド」とは、本明細書中において使用される場合、任意の長さのポリマー形態にあるアミノ酸をいう。この用語としてはまた、公知のアミノ酸修飾(例えば、ジスルフィド結合形成、システイニル化、酸化、グルタチオン化、メチル化、アセチル化、ファルネシル化、ピオチン化、ステアロイル化(stearoylation)、ホルミル化、脂肪酸付加、リン酸化、硫酸化、ユビキチン化、ミリスチル化、パルミトイル化、ゲラニルゲラニル化、環状化(例えば、ピログルタミン酸形成)、酸化、脱アミノ化、脱水素化、脱アミノ化、脱水、グリコシル化(例えば、ペント-ス、ヘキソースアミン、N-アセチルヘキソースアミン、デオキシヘキソース、ヘキソース、シアル酸など)、アシル化および放射標識(例えば、¹²⁵I、¹³¹I、³⁵S、¹⁴C、³²P、³³P、³H)ならびに天然には存在しないアミノ酸残基、L-アミノ酸残基およびD-アミノ酸残基が挙げられる。

40

【0088】

本発明のタンパク質の「ホモログ(homologue)」または「ホモログ(homolog)」は、このタンパク質に関して1つ以上のその機能的特性を変化させることなく(特に、生成産物の活性を減少させることなく)同族である、このタンパク質に対するアミノ酸の置換、欠失、および/または付加を含む、これらのペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチド、タンパク質および酵素である。例えば、このタンパク質のホモログは、このタンパク質の生物活性アミノ酸配列改変体からなる。このようなホモログを生成するために、このタンパク質中に存在するアミノ酸は、同様の特性(例えば、疎水性、親水性、

50

疎水性モーメント、抗原性、 α -ヘリックス構造または β -シート構造を形成するかあるいは壊す傾向など)を有するアミノ酸によって置換され得る。アミノ酸の物理的特性および化学的特性の総説は、表2に示される。

【0089】

【表2】

表2: 天然に存在するアミノ酸の特性

電荷特性 / 疎水性	側鎖	アミノ酸
無極性 疎水性	脂肪族 脂肪族, S-含有 芳香族 イミノ	ala, ile, leu, val met phe, trp pro
極性 非電荷	脂肪族 アミド 芳香族 ヒドロキシル スルフヒドリル	gly asn, gln tyr ser, thr cys
正電荷	塩基性	arg, his, lys
負電荷	酸性	asp, glu

10

20

相同性の2つの特定形態である、オーソログス(orthologous)およびパラログス(paralogous)は、遺伝子の先祖関係を記述するために使用される進化的な概念である。用語「パラログス」は、パラログスな遺伝子を導く、種のゲノム内での遺伝子複製に関係する。用語「オーソログス」は、先祖関係に起因する、異なる生物における相同な遺伝子に関係する。よって、本発明はまた、本発明の遺伝子およびタンパク質の、ホモログ(homologues)、パラログ(paralogues)、およびオーソログ(orthologues)に関係する。本発明の遺伝子およびタンパク質の、パラログまたはオーソログは、本発明の配列またはタンパク質と、先に規定されたように厳密に企図される「ホモログ」よりも低いパーセントの配列同一性を有し得る。

30

【0090】

本発明のタンパク質の置換改変体は、このタンパク質アミノ酸配列において少なくとも1つの残基が取り除かれ、そして異なる残基がその位置に挿入されるタンパク質である。アミノ酸置換は、代表的には、単一残基の置換であるが、ポリペプチド上に位置する機能的束縛に依存してクラスター化され得る；挿入は、通常は、約1~10アミノ酸残基のオーダーであり、そして欠失は、約1~20残基の範囲である。好ましくは、アミノ酸置換は、前出に記載されるような保存的アミノ酸置換を含む。

【0091】

本発明のタンパク質の挿入的アミノ酸配列改変体は、1つ以上のアミノ酸残基がこのタンパク質内の予め決定された位置に導入されるタンパク質である。

【0092】

挿入は、アミノ末端の融合および/またはカルボキシ末端の融合、ならびに単一または複数のアミノ酸の、配列内挿入を含み得る。一般的に、アミノ酸配列内の挿入は、アミノ末端融合物またはカルボキシ末端融合物より少なく、約1~10残基のオーダーである。アミノ末端融合またはカルボキシ末端融合のタンパク質もしくはペプチドの例としては、以下が挙げられる；酵母ツーハイブリッド系において使用される転写アクチベーターの結合ドメインまたは活性化ドメイン、ファージのコートタンパク質、(ヒスチジン)-タグ、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、プロテインA、マルトース結合タンパク質、ジヒドロ葉酸還元酵素、Tag-100エピトープ(EETARFQPGYRS)、c-mycエピトープ(EQKLISEEDL)、FLAG(登録商標)-エピトープ(DYKDDDK)、lacZ、CMP(カルモジュリン結合ペプチド)、HAエピトープ(YP

40

50

Y D V P D Y A)、プロテインCエピトープ(E D Q V D P R L I D G K)およびV S V
エピトープ(Y T D I E M N R L G K)。

【0093】

本発明のタンパク質の欠失改変体は、このタンパク質のアミノ酸配列からの1つ以上のア
ミノ酸の除去によって特徴付けられる。

【0094】

本発明のタンパク質のアミノ酸改変体は、当該分野において周知の、ペプチド合成技術(例
えば、固相ペプチド合成技術など)を用いて、または組換えDNA操作によって、容易
に作成され得る。置換改変体、挿入改変体、または欠失改変体として明白な、改変体タン
パク質を生成するためのDNA配列の操作は、当該分野において周知である。例えば、既
知配列を有するDNA内の予め決定された位置に、(例えば、M13変異誘発、T7-G
enインビトロ変異誘発キット(USB、Cleveland、OH)、QuickCh
ange Site Directed変異誘発キット(Stratagene、San
Diego、CA)、PCRを介する部位指向性変異誘発プロトコル、または他の部
位指向性変異誘発プロトコルによる)置換変異を作成する技術は、当業者にとって周知
である。置換改変体、挿入改変体、または欠失改変体として明白な、改変体タンパク質を
生成するためのDNA配列の操作の別の代替は、例えば、(Palmgren 1997
; Yoonら 1996)によって記載されるような、キメラRNA/DNAオリゴヌク
レオチドによって達成され得る標的化インビボ遺伝子改変を含む。

10

【0095】

本発明のタンパク質の「誘導体」は、そのペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチド、タン
パク質、および酵素であり、このポリペプチドの天然に存在する形態のアミノ酸配列と
比較し、さらに天然に存在するアミノ酸残基、グリコシル化によって変化されたアミノ酸
残基、アシル化されたアミノ酸残基、または天然には存在しないアミノ酸残基を含み得る
。あるいは、またはさらに、誘導体は、このポリペプチドの天然に存在する形態のアミノ
酸配列と比較して、1つ以上の非アミノ酸置換(例えば、共有結合または非共有結合によ
ってアミノ酸配列に結合したレポーター分子または他のリガンド(例えば、その検出を促
進するためにそこに結合されるレポーター分子))を含み得る。タンパク質の誘導体は、
由来するタンパク質の生物学的活性または酵素学的活性を保持する。

20

【0096】

「免疫学的に活性」に関しては、分子またはその特定フラグメント(例えば、エピトープ
またはハプテン)が、抗体によって認識される(すなわち抗体に結合する)ことが意味さ
れる。

30

【0097】

本発明の文脈においては、前出の規定のように、本発明のテンサイ(sugar bee
t)ポリペプチドまたはそのホモログ、誘導体、もしくはフラグメントのいずれの、ホモ
ログ、誘導体、および/または免疫学的に活性なフラグメントがまた、含まれる。

【0098】

「抗体」としては、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、合成抗体、または重鎖ラ
クダ抗体、ならびに抗体のフラグメント(例えば、Fabフラグメント、Fvフラグメン
トまたはscFvフラグメント)が挙げられる。モノクローナル抗体は、以前に記載される
ような技術(例えば、LiddellおよびCryer(1991))によって調製され、
これは、免疫された動物に由来するマウス骨髄腫細胞の脾臓細胞への融合を含む。さらに
、分子またはそのフラグメントに対する、抗体またはそのフラグメントは、例えば、H
arlowおよびLane(1988)に記載されるような方法を使用することによって得
られ得る。小ペプチド(例えば、本発明のタンパク質のフラグメント)に対して指向され
る抗体の場合、このペプチドは、一般的に、動物への免疫の前に、キャリアタンパク質と
連結される。このようなタンパク質キャリアとしては、キーホールリンペットヘモシアニ
ン(KLH)、ウシ血清アルブミン(BSA)、オボアルブミンおよび破傷風毒素が挙げ
られる。キャリアタンパク質は、動物の免疫応答を増強し、そしてT細胞レセプター結合

40

50

部位に対するエピトープを提供する。用語「抗体」はさらに、その誘導体（例えば、標識された抗体）を含む。抗体標識としては、アルカリホスファターゼ、PKH2、PKH26、PKH67、フルオレセイン（FITC）、Hoechst33258、R-フィコエリトリン（phycoerythrin）（PE）、ローダミン（TRITC）、Quantum Red、Texas Red、Cy3、ビオチン、アガロース、ペルオキシダーゼ、金粒子（gold spheres）および放射標識（例えば、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^3H ）が挙げられる。タンパク質に対する抗体に依存する分子生物学におけるツールとしては、タンパク質のゲルブロット分析、遺伝子の同定を可能にする発現ライブラリーのスクリーニング、ELISAおよびRIAを含むタンパク質定量方法、タンパク質の免疫アフィニティ精製、タンパク質の免疫沈降（例えば、Magyarら、（1997））、免疫学的局在決定が挙げられる。抗体および特にペプチド抗体の他の用途としては、タンパク質プロセシングの研究（Löfflerら（1994）；Woulfeら（1994））、タンパク質活性部位の決定（Lerner（1982））、前駆体および翻訳後プロセシングの研究（BaronおよびBaltimore（1982）；Lernerら（1981）；Semlerら（1982））、タンパク質-タンパク質相互作用に関与するタンパク質ドメインの同定（Murakamiら（1992））および遺伝子発現におけるエキソン使用頻度の研究（Tamuraら（1991））が挙げられる。

10

【0099】

前出に規定されるように本発明のテンサイポリペプチド、またはその誘導体もしくはフラグメントを認識する抗体はまた、本発明の範囲である。

20

【0100】

用語「遺伝子」、「ポリヌクレオチド」、「核酸配列」、「ヌクレオチド配列」、「DNA配列」、または「核酸分子」とは、本明細書中において使用される場合、ヌクレオチドをいい、任意の長さのポリマー形態にあるリボヌクレオチドもしくはデオキシヌクレオチドまたはその両方の組み合わせのいずれかをいう。この用語は、二本鎖および一本鎖のDNAおよびRNAを含む。この用語としてはまた、公知のヌクレオチド改変（例えば、メチル化、環状化、および'キャップ（cap）'）および1つ以上の天然に存在するヌクレオチドの、アナログ（例えば、イノシン）との置換が挙げられる。ヌクレオチドの改変としては、アクリジン、アミン、ビオチン、カスケードブルー（cascade blue）、コレステロール、Cy3（登録商標）、Cy5（登録商標）、Cy5.5（登録商標）、Dabcyl、ジゴキシゲニン、ジニトロフェニル、Edans、6-FAM、フルオレセイン、3'-グリセロール、HEX、IRD-700、IRD-800、JOE、リン酸ソラレン、ローダミン、ROX、チオール（SH）、スパーサー、TAMRA、TET、AMCA-S（登録商標）、SE、BODIPY（登録商標）、Marina Blue（登録商標）、Pacific Blue（登録商標）、Oregon Green（登録商標）、Rhodamine Green（登録商標）、Rhodamine Red（登録商標）、Rhodol Green（登録商標）、およびTexas Red（登録商標）が挙げられる。ポリヌクレオチドバックボーンの改変としては、メチルホスホネート、2'-OMe-メチルホスホネートRNA、ホスホロチオエート（phosphorothiorate）、RNA、2'-OMeRNAが挙げられる。塩基改変としては、2'-アミノ-dA、2'-アミノプリン、3'-(ddA)、3'dA（コルジセピン）、7-deaza-dA、8-Br-dA、8-オキソ-dA、 N^6 -Me-dA、塩基部位（abasic site）（dSpacer）、ビオチンdT、2'-OMe-5Me-C、2'-OMe-プロピニル-C、3'-(5-Me-dC)、3'-(ddC)、5-Br-dC、5-I-dC、5-Me-dC、5-F-dC、カルボキシ-dT、変換可能なdA、変換可能なdC、変換可能なdG、変換可能なdT、変換可能なdU、7-デアザ-dG、8-Br-dG、8-オキソ-dG、 O^6 -Me-dG、S6-DNP-dG、4-メチル-インドール、5-ニトロインドール、2'-OMe-イノシン、2'-dI、 O^6 -フェニル-dI、4-メチル-インドール、2'-デオキ

30

40

50

シネブラリン (deoxynebularine)、5 - ニトロインドール、2 - アミノプリン、dP (プリンアナログ)、dK (ピリミジンアナログ)、3 - ニトロピロール、2 - チオ - dT、4 - チオ - dT、ピオチン - dT、カルボキシ - dT、O⁴ - Me - dT、O⁴ - チアゾール dT、2' - OMe - プロピニル - U、5 - Br - dU、2' - dU、5 - F - dU、5 - I - dU、O⁴ - トリアゾール dU および放射標識 (例えば、¹₂⁵ I、¹₃¹ I、³₅ S、¹₄ C、³₂ P、³₃ P、³ H) が挙げられる。この用語はまた、バックボーンが、糖以外の N - (2 - アミノエチル) - グリシン単位からなる偽ペプチドである、ペプチド核酸 (PNA)、DNA アナログを包含する。PNA は、DNA の様態を模倣し、そして相補的な核酸鎖を結合する。PNA の中性的なバックボーンは、正常に達成されるより強い結合および高い特異性を生じる。さらに、PNA の独特な化学的、物理的、および生物学的特性が利用され、強力な生物分子ツール、アンチセンスおよび抗遺伝子因子、分子プローブおよび生物センサーを産生した。「組換え DNA 分子」または「キメラ遺伝子」に関しては、異なる供給源に由来する DNA の小片を連結することによって産生されるハイブリッド DNA を意味する。「異種核酸配列」に関しては、プロモーター配列を有する天然には存在しない配列が意図される。この核酸配列は、プロモーター配列に対して異種であるが、植物宿主に対しては、同種であるか、もしくはネイティブであるか、または異種であるか、もしくは外来である。「センス鎖」とは、その mRNA 転写物と同種である二本鎖 DNA 分子の鎖をいう。「アンチ - センス鎖」は、「センス鎖」の配列に相補的な逆転した配列を含む。

10

【0101】

20

「コード配列」または「オープンリーディングフレーム」もしくは「ORF」は、適切な調節配列の制御下に置かれた場合、すなわち、このコード配列または ORF が発現可能な形式にある場合、mRNA に転写され得るヌクレオチド配列および/またはポリペプチドに翻訳され得るヌクレオチド配列として定義される。ORF のこのコード配列は、5' 翻訳開始コドンおよび 3' 翻訳終止コドンによって結合される。コード配列または ORF としては、RNA、mRNA、cDNA、組換えヌクレオチド配列、合成的に製造されたヌクレオチド配列またはゲノム DNA が挙げられ得るが、これらに限定されない。このコード配列または ORF は、核酸配列を干渉することによって中断され得る。本質的には同じタンパク質をコードするが、異なる供給源から単離された遺伝子およびコード配列は、実質的に多様な核酸配列からなり得る。相互的に、実質的に多様な核酸配列は、本質的に同じタンパク質の発現に影響を与えるように設計され得る。この核酸配列は、例えば、所定の遺伝子の異なる対立遺伝子の存在の結果であり、または遺伝子コードの縮重もしくはコドン使用頻度における差異の結果である。よって、表 3 に示されるように、アミノ酸 (例えば、メチオニンおよびトリプトファン) は、単一コドンによってコードされ、一方、他のアミノ酸 (例えば、アルギニン、ロイシン、およびセリン) はそれぞれ、6 つまでの異なるコドンから翻訳され得る。好ましいコドン使用頻度における差異は、以下に図示される; *Agrobacterium tumefaciens* (細菌)、*Arabidopsis thaliana*、*M. sativa* (2 つの双子葉植物) および *Oryza sativa* (単子葉植物)。これらの例は、(<http://www.kazusa.or.jp/codon>) から展開された。1 つの例を挙げれば、コドン GGC (グリシンに対して) は、*Agrobacterium tumefaciens* においては最も頻繁に使用されるコドンであり (36.2%)、*Oryza sativa* においては二番目に頻繁に使用されるコドンであるが、*Arabidopsis thaliana* および *M. sativa* のにおいてはかなり低い頻度で使用される (それぞれ、9% および 8.4%)。グリシンをコードする 4 つの可能なコドン (表 3 を参照) のうち、この GGC コドンは、*Agrobacterium tumefaciens* および *Oryza sativa* において最も好ましく使用される。しかし、*Arabidopsis thaliana* において、これは、GGA (および GGU) コドンであるが、*M. sativa* のにおいては、これは、GGU (および GGA) コドンである。対立遺伝子改変体はさらに、単一ヌクレオチド多型 (SNP) ならびに小さな挿入/欠失の多型 (INDEL; I

30

40

50

N D E Lのサイズは、しばしば100bp未満である)を含むとして定義される。S N PおよびI N D E Lは、ほとんどの生物の天然に存在する多型系統において、最も大きなセットの配列改変体を形成する。それらは、遺伝子のマッピング、ならびに遺伝子および遺伝子機能の発見の際に手助けとなる。それらはさらに、増殖速度、植物サイズおよび植物収量、植物成長力、疾患耐性、ストレス耐性などのプロセスの決定に關与する遺伝子座(例えば、植物遺伝子)の同定する際に手助けとなる。

【0102】

【表3】

表 3. 遺伝コードの縮重

アミノ酸	3文字コード	1文字コード	可能性のあるコドン					
アラニン	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCU		
アルギニン	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU
アスパラギン	Asn	N	AAC	AAU				
アルパラギン酸	Asp	D	GAC	GAU				
システイン	Cys	C	UGC	UGU				
グルタミン酸	Glu	E	GAA	GAG				
グルタミン	Gln	Q	CAA	CAG				
グリシン	Gly	G	GGA	GGC	GGG	GGU		
ヒスチジン	His	H	CAC	CAU				
イソロイシン	Ile	I	AUA	AUC	AUU			
ロイシン	Leu	L	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU
リジン	Lys	K	AAA	AAG				
メチオニン	Met	M	AUG					
フェニルアラニン	Phe	F	UUC	UUU				
プロリン	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCU		
セリン	Ser	S	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU
トレオニン	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACU		
トリプトファン	Trp	W	UGG					
チロシン	Tyr	Y	UAC	UAU				
バリン	Val	V	GUA	GUC	GUG	GUU		
			可能性のある「終止」コドン					
			UAA	UAG	UGA			

多数の技術は、現在、S N Pおよび/またはI N D E Lを同定するために利用可能であり、(i) P C Rに続く変性高性能液体クロマトグラフィー(D H P L C; 例えば、C h o r a 1999); (ii) 高忠実度P C Rと組み合わせた定常的変性剤キャピラリー電気泳動(C D C E) (例えば、L i - S u c h o l e i k i r a 1999); (iii) 変性グラジエントゲル電気泳動(例えば、F i s c h e rおよびL e r m a n 1983); (iv) マトリクス支援レーザー脱離/イオン化飛行時間質量分析(M A L D I - T O F M S; 例えば、R o s s r a 2000); (v) リアルタイム蛍光モニタリングP C Rアッセイ(例えば、T a p p r a 2000); (vi) A c r y d i t e T Mゲル技術(例えば、K e n n e y r a 1998); (vii) サイクルジデオキシフィンガープリンティング(C d d F; 例えば、L a n g e m e i e r r a 1994); (viii) 一本鎖コンフォメーション多型(S S C P)分析(例えば、V i d a l - P u i gおよびM o l l e r 1994)および(ix) 小配列決定(mini-sequencing)プライマー伸長反応(例えば、S y v a n e n 1999)が挙げられる。前出の(i)の改変である「T a r g e t i n g I n d u c e d L o c a l L e s i o n s i n G e n o m e s」(T I L L I N G; M c C a l l u m r a 2000a, b)の技術

はまた、例えば、興味深い表現型を示す化学的に変異誘発された植物個体において変更された遺伝子を迅速に同定するために適用され得る。

【0103】

「ハイブリダイゼーション」は、実質的に相同性の相補的なヌクレオチド配列を互いにアニールする工程である。ハイブリダイゼーション工程は、完全に溶液中で生じ得、すなわち、両方の相補的な核酸が溶液中にある。このような工程に基づく分子生物学におけるツールとしては、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR；およびそれに基づく全ての方法）、差し引きハイブリダイゼーション、ランダムプライマー伸長、ヌクレアーゼS1マッピング、プライマー伸長、逆転写、cDNA合成、RNAのディファレンシャルディスプレイ、およびDNA配列決定が挙げられる。ハイブリダイゼーション工程はまた、マトリクス（例えば、磁性ビーズ、Sepharoseビーズまたは任意の他の樹脂）に固定化された相補的な核酸の1つを用いて生じ得る。このような工程に基づく分子生物学におけるツールとしては、ポリ（A+）mRNAの単離を含む。ハイブリダイゼーション工程は、さらに、固体支持体（例えば、ニトロセルロース膜もしくはナイロン膜）に固定化されるか、または例えば、ケイ質ガラス支持体に、例えば、写真平版によって固定化された相補的な核酸の1つを用いて生じ得る（後者は、核酸アレイもしくはマイクロアレイとしてか、または核酸チップとして知られる）。このような工程に基づく分子生物学のツールとしては、RNAおよびDNAのゲルブロット分析、コロニーハイブリダイゼーション、プラークハイブリダイゼーション、インサイチュハイブリダイゼーションおよびマイクロアレイハイブリダイゼーションを包含する。ハイブリダイゼーションを生じさせるために、核酸分子を、一般的に、熱的もしくは化学的に変性して、二本鎖を2本の一本鎖に融解し、および/または一本鎖の核酸由来のヘアピンもしくは他の二次構造を除去する。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは、条件（例えば、温度、塩濃度およびハイブリダイゼーション緩衝液の組成）によって影響される。ハイブリダイゼーションのための高度にストリンジェントな条件は、高温および/または低塩濃度（NaClおよびNa₃-シトレートを含む塩）および/またはハイブリダイゼーション緩衝液中のホルムアミドの含有および/またはハイブリダイゼーション緩衝液中の化合物（例えば、SDS（界面活性剤））の濃度の低減および/またはハイブリダイゼーション緩衝液からの化合物（例えば、硫酸デキストランもしくはポリエチレングリコール（分子の凝集を促進する））の排除を包含する。慣用的なハイブリダイゼーション条件は、例えば、（Sambrookら 1989）に記載されるが、当業者は、多数の異なるハイブリダイゼーション条件が、既知の相同性もしくは予想される相同性の機能および/または核酸配列の長さにおいて設計され得ることを理解する。特異的にハイブリダイズするとは、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることを意図する。十分に低いストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、前出に規定される本発明のDNA配列に対して異種である核酸を単離するために特に好ましい。この異種性に寄与する要素は、対立性、遺伝コードの縮重および上述に議論されるように好ましいコドンの使用頻度における差異を含む。

【0104】

従って、本発明はまた、任意のハイブリダイゼーションの方法において既に規定したように、本発明のテンサイのポリペプチド、それらのホモログ、誘導体および/または免疫学的なフラグメントをコードする、本発明のDNA配列の使用に関する。本発明はさらにまた、本発明のDNA配列にハイブリダイズするDNA配列に関する。

【0105】

本発明中に規定されるようなDNA配列は、介在配列によって中断され得る。「介在配列」とは、本発明のDNA配列を包含するコード配列を中断するか、または本発明のDNA配列を包含するDNA配列の表現可能な形式を中断する、任意の核酸配列を意味する。介在配列の除去は、このコード配列またはこの表現可能な形式を回復させる。介在配列の例としては、イントロン、移動可能なDNA配列（例えば、トランスポゾン）およびDNAタグ（例えば、T-DNA）が挙げられる。「移動可能なDNA配列」とは、組換え現象の結果として移動され得る任意のDNA配列を意味する。

【0106】

好ましくは、植物起源の、細胞、組織または器官においてタンパク質の発現をもたらすために、タンパク質が、例えば、マイクロインジェクションもしくは衝撃の手段によってこの細胞に直接的に導入され得るか、または代替的に、このタンパク質をコードする単離される核酸分子が、発現可能な形式で、この細胞、組織もしくは器官内に導入され得る。

【0107】

好ましくは、本発明のDNA配列は、本発明のテンサイのポリペプチドまたはそのホモログもしくは誘導体あるいは前出に規定されるようにその免疫学的に活性なポリペプチド、またはそのホモログもしくは誘導体をコードする、コード配列またはオープンリーディングフレーム(ORF)を含有する。

10

【0108】

「ベクター」または「ベクター配列」とは、DNA配列を意味し、これらは、形質転換によって生物中に導入され得、そしてこの生物内で安定に維持され得る。ベクターの維持は、例えば、*Escherichia coli*、*Agrobacterium tumefaciens*、*Saccharomyces cerevisiae*または*Schizosaccharomyces pombe*の培養物中で可能である。他のベクター(例えば、ファージミドおよびコスミドベクター)は、細菌および/またはウイルス中で維持および増殖され得る。ベクター配列は、一般に、制限酵素によって認識される独特な部位のセットであるマルチブルクローニングサイト(MCS)(ここで、1つ以上の非ベクター配列が挿入され得る)を包含する。

20

【0109】

従って、「非ベクター配列」とは、ベクター内に含まれるMCSの1つ以上の部位中に組込まれるDNA配列を意味する。

【0110】

挿入される非ベクター配列のための発現可能な形式の生成を可能にする適切な調節配列を包含するという観点において、「発現ベクター」は、ベクターのサブセットを形成し、従って、この非ベクター配列によってコードされるタンパク質の発現を可能にする。発現ベクターは、当該分野において公知であり、細菌(例えば、*Escherichia coli*)、真菌(例えば、*Saccharomyces cerevisiae*、*Schizosaccharomyces pombe*、*Pichia pastoris*)、昆虫細胞(例えば、バキュロウイルス発現ベクター)、動物細胞(例えば、COS細胞またはCHO細胞)および植物細胞(例えば、ジャガイモウイルスのXベースの発現ベクター(例えば、Vanceら 1998 - WO 98 44097を参照のこと))を含む、生物におけるタンパク質の発現(遺伝子の発現)を可能にする。本発明は、明らかに、前出で規定されるように、本発明のテンサイのポリペプチド、それらのホモログ、誘導体および/または免疫学的に活性なフラグメントをコードする、非ベクターDNA配列を含有する、任意のベクターまたは発現ベクターを包含する。

30

【0111】

生物学的な系における(発現)ベクター媒介性タンパク質産生に対する代替として、化学的なタンパク質合成が、適用され得る。合成ペプチドは、液相または固相において作製され得る。しかし、固相ペプチド合成(Merrifield、1963)は、最も一般的な方法であり、そして直鎖状のペプチド鎖を生成するための連続的なアミノ酸の付加に関する。固相ペプチド合成は、3工程から構成されるサイクルを含む:(i)成長するペプチド鎖のカルボキシル末端のアミノ酸の、固体支持体または樹脂への固定化;(ii)成長するペプチド鎖に付加されるべきアミノ酸の活性化、カップリングおよび脱保護から構成される工程である鎖のアセンブリ;ならびに(iii)樹脂からの完全なペプチド鎖の回収およびアミノ酸側鎖からの保護基の除去に関わる切断。固相ペプチド合成における一般的なアプローチは、アミノ酸のアミノ末端保護基として、Fmoc/tBu(9-フルオレニルメチルオキシカルボニル/t-ブチル)およびBoc(t-ブチルオキシカルボニル)を含む。アミノ酸側鎖の保護基は、メチル(Me)、ホルミル(CHO)、エチル

40

50

(E t)、アセチル(A c)、t - ブチル(t - B u)、アニシル、ベンジル(B z l)、トリフルオロアセチル(T f a)、N - ヒドロキシスクシンイミド(O N S u、O S u)、ベンゾイル(B z)、4 - メチルベンジル(M e b)、チオアニジル(t h i o a n i z y l)、チオクレシル(t h i o c r e s y l)、ベンジルオキシメチル(B o m)、4 - ニトロフェニル(O N p)、ベンジルオキシカルボニル(Z)、2 - ニトロベンゾイル(N B z)、2 - ニトロフェニルスルフェニル(n i t r o p h e n y l s u l p h e n y l)(N p s)、4 - トルエンシルホニル(T o s y l、T o s)、ペンタフルオロフェニル(P f p)、ジフェニルメチル(D p m)、2 - クロロベンジルオキシカルボニル(C l - Z)、2, 4, 5 - トリクロロフェニル、2 - ブロモベンジルオキシカルボニル(B r - Z)、トリフェニルメチル(T r i t y l、T r t)、および2, 5, 7, 8 - ペンタメチル - クロマン(c h r o m a n) - 6 - スルホニル(P m c)を含む。鎖のアセンブリの間、F m o cまたはB o cは、除去されて、成長する鎖に結合したアミノ酸残基の活性化したアミノ末端を生じる。次のアミノ酸のカルボキシル末端は、高い反応性のエステルへの変換によって(例えば、H B T Uによって)活性化される。現在の技術(例えば、P e r S e p t i v e B i o s y s t e m s 9 0 5 0 s y n t h e s i z e r、A p p l i e d B i o s y s t e m s M o d e l 4 3 1 A P e p t i d e S y n t h e s i z e r)を用いて、50残基までの直鎖状ペプチドが、作製され得る。多数の指針が、生物学的な系における使用のために適切なペプチドを作製するために入手可能であり、(i)困難なアミノ酸(例えば、c y s、m e t、t r p(ペプチド合成中に容易に酸化されるおよび/または分解される))またはa r gの使用の制限;(i i)疎水性のアミノ酸(ペプチドの可溶性を損ない得る)の最小化;ならびに(i i i)アミノ末端のグルタミン酸(ピログルタミン酸へと環化し得る)の防護を含む。

10

20

【0112】

「発現可能な形式」とは、単離された核酸分子が、構成的にか、あるいは、細胞内または細胞外のシグナル(例えば、環境の刺激もしくはストレス(分裂促進剤、酸素欠乏、低酸素、温度、塩、光、脱水、など))または化学的な化合物(例えば、I P T G(イソプロピル - D - チオガラクトピラノシド)または例えば、抗生物質(テトラサイクリン、アンピシリン、リファンピシン、カナマイシン)、ホルモン(例えば、ジベレリン、オーキシシン、サイトカイニン、グルココルチコイド、ブラシノステロイド、エチレン、アブシジン酸など)、ホルモンアナログ(ヨード酢酸(I A A)、2, 4 - D、など)、金属(亜鉛、銅、鉄など)、またはデキサメタゾンなどによる誘導に従うかのいずれかによって、m R N Aへと転写されるおよび/またはタンパク質を産生するように翻訳されるために適切な形態であることを意味する。当業者に公知であるように、機能的なタンパク質の発現はまた、1つ以上の翻訳後修飾(例えば、糖化、リン酸化、脱リン酸化)、または1つ以上のタンパク質 - タンパク質相互作用などを必要とし得る。全てのこのような過程は、用語「発現可能な形式」の範囲内に含まれる。

30

【0113】

好ましくは、植物起源の、特定の細胞、組織、または器官における、好ましいタンパク質の発現は、このタンパク質をコードする単離された核酸分子(例えば、c D N A分子、ゲノム遺伝子、合成オリゴヌクレオチド分子、m R N A分子またはオープンリーディングフレーム)をこの細胞、組織または器官に誘導および発現させることによってもたらされる。ここで、この核酸分子は、プロモーター、好ましくは、植物で発現可能なプロモーター、および終止配列を含有する、適切な調節配列と作動可能に関連して配置される。

40

【0114】

「調節配列」は制御D N A配列をいい、このD N A配列は、それらが連結されるコード配列の発現に影響を与える必要がある。このような制御配列の性質は、宿主生物体に依存して異なる。原核生物では、制御配列は一般的に、プロモーター、リボソーム結合部位およびターミネーターを含む。真核生物では一般的に、制御配列は、プロモーター、ターミネーター、およびエンハンサーまたはサイレンサーを含む。用語「制御配列」は、最少で、その存在が発現のために必要なすべての成分を含むことを意図し、そしてまた特異的な遺

50

伝子がいつ、どのくらい、そしてどこで発現するかを決定するさらなる有利な成分もまた含み得る。

【0115】

「プロモーター」に対する本明細書中の参照は、その広範な前後関係で理解され、そして古典的な真核生物のゲノム遺伝子由来の転写調節配列を含む。転写調節配列には、正確な転写開始に必要とされるTATAボックスが挙げられ、これは、CCAATボックス配列および発生刺激および/または外部刺激に応答する遺伝子発現または、組織特異的様式で遺伝子発現を変更する、さらなる調節エレメント(すなわち、上流の活性化配列、エンハンサーおよびサイレンサー)を含むかまたは含まない。

【0116】

本明細書中の調節配列はまた、プロモーター、エンハンサー、サイレンサー、イントロン配列、3'UTRおよび/または5'UTR領域、タンパク質および/またはRNA安定化エレメントを含む任意の群のいずれかをいう。

【0117】

用語「プロモーター」はまた、古典的な原核生物遺伝子の転写調節配列を含み、この場合、プロモーターが-35ボックス配列および/または-10ボックス転写調節配列を含み得る。

【0118】

用語「プロモーター」はまた、細胞、組織または器官内で核酸分子の発現を与えるか、活性化するかまたは増強する、合成分子または融合分子または誘導体を説明するために使用される。

【0119】

プロモーターは、プロモーターが作動可能に接続される核酸分子の発現をさらに増強するためならびに/または空間的な発現および/もしくは時間的な発現を変更するための一つ以上の特異的調節エレメントのさらなるコピーを含み得る。このような調節エレメントは、例えば、銅、グルココルチコイド、デキサメタゾン、テトラサイクリン、ジベレリン、cAMP、アブシジン酸、オーキシン、創傷、エチレン、ジャスモン酸またはサリチル酸に応答して核酸分子の発現を駆動するための異種プロモーター配列、あるいは特定の細胞、組織もしくは器官(例えば、成長点、葉、根、胚、花、種子または果実)に核酸分子の発現を与えるための異種プロモーター配列に隣接するように配置され得る。本発明に関して、プロモーターは、好ましくは、植物発現可能プロモーター配列である。しかし、非植物細胞(例えば、細菌、酵母細胞、昆虫細胞、および動物細胞)内でも機能するか、または単独で機能するプロモーターは、本発明から除外されない。「植物発現可能」が意味することは、プロモーター配列に付加されるかまたはその中に含まれている任意のさらなる調節エレメントを含むプロモーター配列が、植物細胞、組織または器官、好ましくは単子葉植物または双子葉植物の細胞、組織または器官内での発現を少なくとも誘導するか、与えるか、活性化するかまたは増強し得ることである。

【0120】

プロモーター配列に関して、本明細書中で使用される場合、用語「植物作動可能」および「植物において作動可能」は、植物発現可能プロモーター配列と等価であるとして理解されるべきである。

【0121】

本発明の文脈において、「調節されるプロモーター」または「調節可能なプロモーター配列」は、必要に応じて特定の条件下で、特定の細胞、組織、または細胞の器官、あるいは植物の細胞、組織または器官の群において構造遺伝子に発現を与え得るプロモーターであるが、一般的には全ての条件下で植物全体に渡って発現を与えるわけではない。したがって、調節可能なプロモーター配列は、例えば、化学的化合物または他の誘発剤による遺伝子発現の誘導に続いて、特定の条件セット下で、植物内あるいは植物全体に渡って、特定の位置で作動可能に接続される遺伝子に対して発現を与えるプロモーター配列であり得る。

10

20

30

40

50

【0122】

好ましくは、本発明の実行において使用される調節可能なプロモーターは、植物内での特定の位置で、構成的にかまたは誘導後かのいずれかで発現を与えるが、任意の環境の下で植物全体に発現を与えるというわけではない。このようなプロモーターの範囲内に含まれるものは、細胞特異的プロモーター配列、組織特異的プロモーター配列、器官特異的プロモーター配列、細胞周期特異的遺伝子プロモーター配列、誘導性プロモーター配列、およびいずれの時点でも植物の特定の部分において発現を与えるように（例えば、転移遺伝因子（Ac、Ds、Spm、Enまたは他のトランスポゾン）内への上記の構成的プロモーターの組み込みにより）改変された構成的プロモーター配列である。当業者は、「誘導性プロモーター」が、発生刺激、化学的な刺激、環境的な刺激、または物理的な刺激に応答して、その転写活性を増加または誘導するプロモーターであることを知っている。同様に、当業者は、「構成的プロモーター」は、生物体（好ましくは植物）のほとんど（すべての部分である必要はない）を通じて、成長および発生のほとんど（すべての段階である必要はない）の間の、転写的に活性なプロモーターであることを理解している。

10

【0123】

「弱いプロモーター」によって、一般的に、低いレベルでのコード配列の発現を駆動するプロモーターを意図している。「低いレベル」によって、約1/10,000の転写物～約1/100,000の転写物、～約1/500,000の転写物のレベルを意図している。逆に、「強いプロモーター」は、高いレベル、または約1/10の転写物～約1/100の転写物～約1/1,000の転写物で、コード配列の発現を駆動する。

20

【0124】

用語「細胞特異的」は、発現が、特定の細胞または細胞型（好ましくは植物起源）において優勢であるにもかかわらず、前記の細胞または細胞型において必ずしも排他的ではないことを示すと理解されるべきである。

【0125】

同様に、用語「組織特異的」は、発現が、特定の組織または組織型（好ましくは植物起源）において優勢であるにもかかわらず、前記の組織または組織型において必ずしも排他的ではないことを示すと理解されるべきである。

【0126】

同様に、用語「器官特異的」は、発現が、特定の器官（好ましくは植物起源）において優勢であるにもかかわらず、前記の器官において必ずしも排他的ではないことを示すと理解されるべきである。「根特異的」は、プロモーターが植物の根だけで発現し、他の組織では発現しないことを意味する。

30

【0127】

「根優先的」によって、異種ヌクレオチド配列の発現が、根において最も大量であるが、植物内の他の場所でも低い発現レベルを有し得ることを意図する。異種ヌクレオチド配列の発現のいくつかのレベルが、他の植物組織型で生じるが、主根、側根および不定根を含む根において最も大量に発現が生じる。

【0128】

「根」によって、根冠、頂端分裂組織、原表皮、基本分裂組織、前形成層、内皮、皮質、維管束皮質、表皮などを含む、根の構造の任意の部分在意図する。

40

【0129】

用語「細胞周期特異的」は、発現が、優勢に周期的であり、一つ以上の細胞周期において生じるが、連続的な段階を必要としないにもかかわらず、細胞周期（好ましくは植物起源）において必ずしも排他的でないことを意図すると理解されるべきである。

【0130】

プロモーター配列の調節制御下、またはプロモーター配列に作動可能に接続された核酸分子の配置は、発現がプロモーター配列によって制御されるような、前記核酸分子の位置決めを意味する。プロモーターは通常、必須ではないが、プロモーターが調節する核酸分子の転写の開始部位の上流、または5'末端、および2kb以内に位置付けられる。異種プ

50

ロモーター / 構造遺伝子の組み合わせ構築物において、一般的には、これはプロモーターと天然の設定（すなわち、プロモーターが由来する遺伝子）においてこのプロモーターが制御する遺伝子との間の距離とほぼ同じ遺伝子転写開始部位からの距離でプロモーターを位置付けすることが好ましい。当該分野で公知であるように、この距離のいくつかのバリエーションは、プロモーター機能の損失なく適応され得る。同様に、その制御下に配置される異種遺伝子に対する調節配列エレメントの好ましい位置付けは、天然の設定（すなわち、これが由来する遺伝子）においてのエレメントの位置付けによって規定される。さらに、当該分野で公知であるように、この距離のいくつかのバリエーションもまた、生じ得る。

【 0 1 3 1 】

「発現」は、細胞自体または無細胞系におけるタンパク質配列またはヌクレオチド配列の産生を意味する。これは、産物をコードする DNA からの、RNA 産物への転写、転写後の修飾および / またはタンパク質産物またはポリペプチドへの翻訳、ならびに可能な翻訳後修飾を含む。

【 0 1 3 2 】

「作動可能に連結された」は、近位をいい、このように記載される成分は、意図された様式でそれらが機能することを可能にする関係にある。コード配列の発現が制御配列に適合する条件下で達成されるように、コード配列に「作動可能に連結された」制御配列が、連結される。制御配列がプロモーターである場合、二本鎖核酸が好ましくは使用されるということが、当業者には明らかである。

【 0 1 3 3 】

本発明の遺伝子構築物での使用に適したプロモーターの例としては、とりわけ、表 4 に列挙されたものが挙げられる。表 4 で列挙されたプロモーターは、例示のみの目的で提供され、本発明は、本明細書において提供される表によって限定されない。

【 0 1 3 4 】

構成的プロモーターまたは植物全体での発現を誘導するプロモーターの場合、このような配列が、表 4 に列挙した一つ以上の組織特異的プロモーターに由来するヌクレオチド配列、あるいは、組織特異性を与える一つ以上の上述の組織特異的誘導性プロモーター由来のヌクレオチド配列の付加によって改変されることが好ましい。例えば、CaMV 35S プロモーターは、以前に記載されたように (Ellis ら、1987)、嫌氣的に調節される根特異的発現を与えるトウモロコシの Adh1 プロモーター配列の付加によって改変され得る。別の実施例は、CaMV 35S プロモーターをトウモロコシのグリシンリッチタンパク質 GPR3 遺伝子 (Feix および Wulff 2000 - WO 00 15662) のエレメントに融合させることによって、根特異的遺伝子発現または根での大量な遺伝子発現発現を与えることを記載する。このような改変は、当業者による慣用的な実験によって達成され得る。

【 0 1 3 5 】

用語「ターミネーター」は、転写の終結を合図する転写単位の末端の DNA 配列をいう。ターミネーターは、ポリアデニル化シグナルを含む 3' 非翻訳 DNA 配列であり、このポリアデニル化シグナルは、一次転写物の 3' 末端へのポリアデニル化配列の付加を促進する。ウイルス、酵母、カビ、細菌、昆虫、鳥、哺乳動物および植物由来の細胞におけるターミネーター活性は公知であり、そして文献に記載されている。これらは、細菌、真菌、ウイルス、動物および / または植物から単離され得る。

【 0 1 3 6 】

本発明の遺伝子構築物での使用に特に適したターミネーターの例としては、とりわけ、Agrobacterium tumefaciens のノパリン合成 (NOS) 遺伝子のターミネーター、Agrobacterium tumefaciens のオクトピン合成 (OCS) 遺伝子のターミネーター配列、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35S 遺伝子のターミネーター配列、Oryza sativa の ADP グルコースピロホスホリラーゼのターミネーター配列 (t3' Bt2)、Zea mays のゼイン遺伝

10

20

30

40

50

子のターミネーター配列、*rbcs-1A* 遺伝子のターミネーターおよび *rbcs-3A* 遺伝子のターミネーター配列が挙げられる。

【0137】

当業者は、本発明を実施するのに有用なさらなるプロモーターおよびターミネーターを容易に提供することができる。

【0138】

【表4】

表4. 本発明の実施において使用するための例示的な植物発現可能なプロモーター

I: 細胞特異的, 組織特異的, および器官特異的なプロモーター		
遺伝子供給源	発現パターン	参考文献
α アミラーゼ(<i>Amy32b</i>)	アリューロン	Lanahan <i>et al</i> , Plant Cell 4:203-211, 1992; Skriver <i>et al</i> , Proc Natl Acad Sci USA 88:7266-7270, 1991
カテプシン β 様 遺伝子	アリューロン	Cejudo <i>et al</i> , Plant Mol Biol 20:849-856, 1992
<i>Agrobacterium</i> <i>rhizogenes</i> <i>rolB</i>	形成層	Nilsson <i>et al</i> , Physiol Plant 100:456-462, 1997
AtPRP4	花	http://salus.mediam.edu/mmg/tierney/html
カルコンシンターゼ (<i>chsA</i>)	花	Van der Meer <i>et al</i> , Plant Mol Biol 15:95- 109, 1990
LAT52	蒴	Twell <i>et al</i> , Mol Gen Genet 217:240-245, 1989
<i>apetala-3</i>	花	
キチナーゼ	果実(ベリー、ブドウ など)	Thomas <i>et al</i> . CSIRO Plant Industry, Urrbrae, South Australia, Australia; http://winetitles.com.au/gwrdc/csh95-1.html
<i>rbcs-3A</i>	緑色組織(例えば葉)	Lam <i>et al</i> , Plant Cell 2:857-866, 1990; Tucker <i>et al</i> , Plant Physiol 113:1303-1308, 1992
葉特異的遺伝子	葉	Baszczynski <i>et al</i> , Nucl Acid Res 16:4732, 1988
AtPRP4	葉	http://salus.mediam.edu/mmg/tierney/html
クロレラウイルス アデニン メチルトランスフェラーゼ 遺伝子プロモーター	葉	Mitra and Higgins, Plant Mol Biol 26:85-93, 1994
イネ由来の <i>aldP</i> 遺伝子プロモーター	葉	Kagaya <i>et al</i> , Mol Gen Genet 248:668-674, 1995
イネまたはトマト 由来の <i>rbcs</i> プロモーター	葉	Kyozuka <i>et al</i> , Plant Physiol 102:991-1000, 1993
<i>Pinus cab-6</i>	葉	Yamamoto <i>et al</i> , Plant Cell Physiol 35:773-

10

20

30

40

(表4の続き)

		778, 1994
rubisco プロモーター	葉	
cab (クロロフィル a/b) 結合タンパク質	葉	
エンドウマメ Blec4 遺伝子	栄養組織 および 花の 表皮組織	Mandaci and Dobres, Plant Mol Biol 34:961-965
SAM22	老化した葉	Crowell <i>et al</i> , Plant Mol Biol 18:459-466, 1992
<i>lip</i> 遺伝子 (脂質 転移遺伝子)		Fleming <i>et al</i> , Plant J 2:855-862, 1992
<i>R. japonicum nif</i> 遺伝子	根粒	United States Patent No 4 803165
<i>B. japonicum nifH</i> 遺伝子	根粒	United States Patent No 5008194
GmENOD40	根粒	Yang <i>et al</i> , Plant J 3:573-585, 1993
PEPカルボキシラーゼ (PEPC)	根粒	Pathirana <i>et al</i> , Plant Mol Biol 20:437-450, 1992
レグヘモグロビン(Lb)	根粒	Gordon <i>et al</i> , J Exp Bot 44:1453-1465, 1993
<i>Tungro bacilliform</i> ウイルス遺伝子	師部	Bhattacharyya-Pakrasi <i>et al</i> , Plant J 4:71- 79, 1992
花粉特異的遺伝子	花粉；小胞子	Albani <i>et al</i> , Plant Mol Biol 15:605, 1990; Albani <i>et al</i> , Plant Mol Biol 16:501, 1991
Zm13	花粉	Guerrero <i>et al</i> , Mol Gen Genet 224:161- 168, 1993
ap9 遺伝子	小胞子	Twell <i>et al</i> , Sex Plant Reprod 6:217-224, 1993
トウモロコシ 花粉特異的遺伝子	花粉	Hamilton <i>et al</i> , Plant Mol Biol 18:211-218, 1992
ヒマワリ 花粉発現遺伝子	花粉	Baltz <i>et al</i> , Plant J 2:713-721, 1992
<i>B. napus</i> 花粉特異的遺伝子	花粉； 葯；絨氈組織	Arnoldo <i>et al</i> , J Cell Biochem, Abstract No. Y101, 204, 1992
根発現可能遺伝子	根	Tingey <i>et al</i> , EMBO J 6:1, 1987
タバコ オーキシン 誘導性遺伝子	根端	Van der Zaal <i>et al</i> , Plant Mol Biol 16:983, 1991
β -チューブリン	根	Oppenheimer <i>et al</i> , Gene 63:87, 1988
タバコ根特異的	根	Conkling <i>et al</i> , Plant Physiol 93:1203, 1990

10

20

30

40

(表4の続き)

遺伝子		
<i>B. napus</i> G1-3b 遺伝子	根	United States Patent No 5401836
SbPRP1	根	Suzuki <i>et al</i> , Plant Mol Biol 21:109-119, 1993
AtPRP1; AtPRP3	根 ; 根毛	http://salus.medium.edu/mmg/tierney/html
RD2 遺伝子	根皮質	http://www2.cnsu.edu/ncsu/research
TobRB7 遺伝子	根の維管束	http://www2.cnsu.edu/ncsu/research
AtPRP4	葉 ; 花 ; 側根原基	http://salus.medium.edu/mmg/tierney/html
種子特異的遺伝子	種子	Simon <i>et al</i> , Plant Mol Biol 5:191, 1985; Scofield <i>et al</i> , J Biol Chem 262:12202, 1987; Baszczynski <i>et al</i> , Plant Mol Biol 14:633, 1990
ブラジルナッツ アルブミン	種子	Pearson <i>et al</i> , Plant Mol Biol 18:235-245, 1992
レグミン	種子	Ellis <i>et al</i> , Plant Mol Biol 10:203-214, 1988
グルテリン (イネ)	種子	Takaiwa <i>et al</i> , Mol Gen Genet 208:15-22, 1986; Takaiwa <i>et al</i> , FEBS Lett 221:43-47, 1987
ゼイン	種子	Matzke <i>et al</i> , Plant Mol Biol 14:323-32 1990
napA	種子	Stalberg <i>et al</i> , Planta 199:515-519, 1996
コムギ LMW および HMW グルテニン-1	胚乳	Mol Gen Genet 216:81-90, 1989; Nucl Acids Res 17:461-462, 1989
コムギ SPA	種子	Albani <i>et al</i> , Plant Cell 9:171-184, 1997
cZ19B1, トウモロコシ 19 kDa ゼイン	種子	WO0011177
mi1ps, トウモロコシ ミオイノシトール-1-Pi シンターゼ	種子	WO0011177
コムギ α , β , γ グリアジン	胚乳	EMBO J 3:1409-1415, 1984
オオムギ <i>htr1</i> プロモーター	胚乳	
オオムギ B1, C, D, ホルデイン	胚乳	Theor Appl Gen 98:1253-1262, 1999; Plant J 4:343-355, 1993; Mol Gen Genet 250:750-60, 1996
オオムギ DOF	胚乳	Mena <i>et al</i> , Plant J 116:53-62, 1998
<i>blz2</i>	胚乳	EP99106056.7
合成プロモーター	胚乳	Vicente-Carbajosa <i>et al</i> , Plant J 13:629-640, 1998

10

20

30

(表4の続き)

イネプロラミン NRP33	胚乳	Wu <i>et al</i> , Plant Cell Physiol 39: 885-889, 1998
イネ α -グロブリン Glb-1	胚乳	Wu <i>et al</i> , Plant Cell Physiol 39:885-889, 1998
トウモロコシEND遺伝子	胚乳	WO0012733
オオムギ END1	胚乳	WO9808961
オオムギ NUC1	珠心	WO9808961
イネ OSH1	胚	Sato <i>et al</i> , Proc Natl Acad Sci USA 93:8117-8122, 1996
イネ α -グロブリン REB/OHP-1	胚乳	Nakase <i>et al</i> , Plant Mol Biol 33:513-522, 1997
イネADP-グルコースPP	胚乳	Trans Res 6:157-168, 1997
トウモロコシ ESR 遺伝子ファミリー	胚乳	Plant J 12:235-246, 1997
モロコシ (sorghum) γ -kafirin	胚乳	Plant Mol Biol 32:1029-1035, 1996
KNOX	胚	Postma-Haarsma <i>et al</i> , Plant Mol Biol 39:257-271, 1999
イネ オレオシン	胚およびアリュuron	Wu <i>et al</i> , J Biochem 123:386, 1998
ヒマワリ オレオシン	種子(胚および 乾燥種子)	Cummins <i>et al</i> , Plant Mol Biol 19:873-876, 1992
LEAFY	苗条成長点	Weigel <i>et al</i> , Cell 69:843-859, 1992
<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>knot1</i>	苗条成長点	Accession number AJ131822
	苗条成長点	Accession number Z71981
CLAVATA1	苗条成長点	Accession number AF049870
柱頭特異的遺伝子	柱頭	Nasrallah <i>et al</i> , Proc Natl Acad Sci USA 85:5551, 1988; Trick <i>et al</i> , Plant Mol Biol 15:203, 1990
クラスⅠパタチン遺伝子	根茎	Liu <i>et al</i> , Plant Mol Biol 153:386-395, 1991
PCNA イネ	成長点	Kosugi <i>et al</i> , Nucl Acids Res 19:1571-1576, 1991; Kosugi and Ohashi, Plant Cell 9:1607-1619, 1997

エンドウマメ TubA1 チューブリン	分裂細胞	Stotz and Long, Plant Mol Biol 41:601-614, 1999
<i>Arabidopsis cdc2a</i>	周期細胞	Chung and Parish, FEBS Lett 362:215-219, 1995
<i>Arabidopsis Rop1A</i>	葯; 成熟花粉 + 花粉管	Li <i>et al</i> , Plant Physiol 118:407-417, 1998

10

20

30

40

(表 4 の続き)

<i>Arabidopsis</i> AtDMC1	減数分裂関連	Klimyuk and Jones, Plant J 11:1-14, 1997
エンドウマメ PS-IAA4/5 および PS-IAA6	オーキシン誘導性	Wong <i>et al</i> , Plant J 9:587-599, 1996
エンドウマメ ファルネシルトランス フェラーゼ	分裂組織 ; 師部近傍増殖組織 ; 光抑制および 糖抑制	Zhou <i>et al</i> , Plant J 12:921-930, 1997
タバコ (<i>N.</i> <i>sylvestris</i>) サイクリン B1;1	分裂細胞 / 分裂組織	Trehin <i>et al</i> , Plant Mol. Biol. 35:667-672, 1997
<i>Catharanthus roseus</i> 有糸分裂サイクリン CYS (A-型) および CYM (B-型)	分裂細胞 / 分裂組織	Ito <i>et al</i> , Plant J 11:983-992, 1997
<i>Arabidopsis</i> cyc1At (=cyc B1;1) および cyc3aAt (A-type)	分裂細胞 / 分裂組織	Shaul <i>et al</i> , Proc Natl Acad Sci USA 93:4868-4872, 1996
<i>Arabidopsis</i> tef1 プロモーターボックス	分裂細胞 / 分裂組織	Regad <i>et al</i> , Mol Gen Genet 248:703-711, 1995
<i>Catharanthus roseus</i> cyc07	分裂細胞 / 分裂組織	Ito <i>et al</i> , Plant Mol Biol 24:863-878, 1994
II: 例示的な構成的プロモーター		
遺伝子供給源	発現パターン	参考文献
アクチン	構成的	McElroy <i>et al</i> , Plant Cell 2:163-171, 1990
CAMV 35S	構成的	Odell <i>et al</i> , Nature 313:810-812, 1985
CaMV 19S	構成的	Nilsson <i>et al</i> , Physiol Plant 100:456-462, 1997
GOS2	構成的	de Paer <i>et al</i> , Plant J 2:837-844, 1992
ユビキチン	構成的	Christensen <i>et al</i> , Plant Mol Biol 18:675- 689, 1992
イネサイクロフィリン	構成的	Buchholz <i>et al</i> , Plant Mol Biol 25:837-843, 1994
トウモロコシ ヒストン H3	構成的	Lepetit <i>et al</i> , Mol Gen Genet 231:276- 285, 1992
アルファルファ ヒストン H3	構成的	Wu <i>et al</i> , Nucleic Acids Res 17:3057- 3063, 1989; Wu <i>et al</i> , Plant Mol Biol 11:641-649, 1988

10

20

30

(表4の続き)

アクチン2	構成的	An <i>et al</i> , Plant J 10:107-121, 1996
III: 例示的なストレス誘導性プロモーター		
名前	ストレス	参考文献
P5CS (δ (1)-ピロリン-5-カルボン酸塩シンターゼ)	塩, 水	Zhang <i>et al</i> , Plant Sci 129:81-89, 1997
cor15a	低温	Hajela <i>et al</i> , Plant Physiol 93:1246-1252, 1990
cor15b	低温	Wilhelm <i>et al</i> , Plant Mol Biol 23:1073-1077, 1993
cor15a (-305 to +78 nt)	低温, 乾燥	Baker <i>et al</i> , Plant Mol Biol 24: 01-713, 1994
rd29	塩, 乾燥, 低温	Kasuga <i>et al</i> , Nature Biotechnol 18:287-291, 1999
熱ショックエレメント (HSE) を含む人工的なプロモーターを誘導する熱ショックタンパク質	熱	Barros <i>et al</i> , Plant Mol Biol 19 665-75, 1992. Marrs <i>et al</i> , Dev Genet 14:27-41, 1993. Schoffl <i>et al</i> , Mol Gen Genet 217:246-53, 1989.
smHSP (小熱ショックタンパク質)	熱	Waters <i>et al</i> , J Exp Bot 47:325-338, 1996
wcs120	低温	Ouellete <i>et al</i> , FEBS Lett 423:324-328, 1998
ci7	低温	Kirch <i>et al</i> , Plant Mol Biol 33:897-909, 1997
Adh	低温, 乾燥, 低酸素	Dolferus <i>et al</i> , Plant Physiol 105:1075-87, 1994
pws118	塩および乾燥	Joshee <i>et al</i> , Plant Cell Physiol 39:64-72, 1998
ci21A	低温	Schneider <i>et al</i> , Plant Physiol 113:335-45, 1997
Trg-31	乾燥	Chaudhary <i>et al</i> , Plant Mol Biol 30:1247-57, 1996
オスモチン	浸透圧	Raghothama <i>et al</i> , Plant Mol Biol 23:1117-28, 1993
lapA	創傷, 環境	WO99/03977 University of California/INRA

10

20

30

40

IV: 例示的な病原体誘導プロモーター		
名前	病原体	参考文献
RB7	Root-knot nematodes (<i>Meloidogyne</i> spp.)	US5760386 - North Carolina State University; Opperman <i>et al</i> , Science 263:221-23, 1994
PR-1, 2, 3, 4, 5, 8, 11	真菌、ウイルス、細菌	Ward <i>et al</i> , Plant Cell 3:1085-1094, 1991; Reiss <i>et al</i> 1996; Lebel <i>et al</i> , Plant J 16:223-233, 1998; Melchers <i>et al</i> , Plant J 5:469-480, 1994; Lawton <i>et al</i> , Plant Mol Biol, 19:735-743, 1992
HMG2	線虫	WO9503690 - Virginia Tech Intellectual Properties Inc.
Abi3	Cyst nematodes (<i>Heterodera</i> spp.)	未公開
ARM1	線虫	Barthels <i>et al</i> , Plant Cell 9:2119-2134, 1997 WO 98/31822 - Plant Genetic Systems
Att0728	線虫	Barthels <i>et al</i> , Plant Cell 9: 2119-2134, 1997 PCT/EP98/07761
Att1712	線虫	Barthels <i>et al</i> , Plant Cell 9, 2119-2134, 1997 PCT/EP98/07761
Gst1	異なる型の 病原体	Strittmatter <i>et al</i> , Mol Plant-Microbe Interact 9:68-73, 1996
LEMMI	線虫	WO 92/21757 - Plant Genetic Systems
CLE	ジェミニ ウイルス (geminivirus)	PCT/EP99/03445 - CINESTAV
PDF1.2	<i>Alternaria brassicicola</i> および <i>Botrytis cinerea</i> を含む	Manners <i>et al</i> , Plant Mol Biol, 38:1071-1080, 1998
Thi2.1	真菌 - <i>Fusarium oxysporum</i> f sp. <i>mattholae</i>	Vignutelli <i>et al</i> , Plant J 14:285-295, 1998
DB#226	線虫	Bird and Wilson, Mol Plant-Microbe Interact 7:419-442, 1994 WO 95.322888
DB#280	線虫	Bird and Wilson, Mol Plant-Microbe Interact 7:419-442, 1994 WO 95.322888
Cat2	線虫	Niebel <i>et al</i> , Mol Plant-Microbe Interact 8:371-

10

20

30

40

		378, 1995
OTub	線虫	Aristizabal <i>et al</i> (1996), 8 th International Congress on Plant-Microbe Interaction, Knoxville US B-29
shSP	線虫	Fenoll <i>et al</i> (1997) In: Cellular and molecular aspects of plant-nematode interactions. Kluwer Academic, C. Fenoll, F.M.W. Grundler and S.A. Ohi (Eds.),
Tsw12	線虫	Fenoll <i>et al</i> (1997) In: Cellular and molecular aspects of plant-nematode interactions. Kluwer Academic, C. Fenoll, F.M.W. Grundler and S.A. Ohi (Eds.)
Hs1(pro1)	線虫	WO 98/122335 – Jung
nsLTP	ウイルス、真菌、細菌	Molina and Garcia-Olmedo FEBS Lett, 316:119-122, 1993
RIP	ウイルス、真菌	Turner <i>et al</i> , Proc Natl Acad Sci USA 94:3866-3871, 1997

10

本発明の文脈において、遺伝子またはタンパク質の「異所性発現」または「異所性過剰発現」は、天然の条件下では通常存在しない、この遺伝子またはタンパク質の発現パターンおよび/または発現レベルを与える。異所発現が、キメラ遺伝子を産生するために単離した相同プロモーターもしくは異種プロモーターにこのタンパク質をコードするコード配列を作動可能に連結する工程、および/または組換え遺伝子複製もしくは遺伝子増殖効果を産生するためにそのタンパク質自体の単離したプロモーター（すなわち、この天然でこのタンパク質の発現を推進する単離されていないプロモーター）にそのコード配列を作動可能に連結する工程を包含する多くの方法によって達成され得る。

20

【0139】

「異所性発現」は、遺伝子の過剰発現を生じ得るだけでなく、「発現のダウンレギュレーション」も生じ得る（例えば、発現がもたらされた場合の植物における相同遺伝子の発現のダウンレギュレーション）。

【0140】

「異種性同時発現」とは、2つ以上の遺伝子またはタンパク質の異種性発現または異種性過剰発現を意味する。同じかまたは（より好ましくは）異なるプロモーターが、この遺伝子またはタンパク質の発現を与えるために用いられる。

30

【0141】

好ましくは、本発明の文脈中に用いられるプロモーター配列が、前に規定されるように、本発明のテンサイポリペプチドまたはそれらのホモログ、誘導体、および/もしくは免疫学的に活性なフラグメントのうちの1つをコードする、コード配列またはオープンリーディングフレーム（ORF）に作動可能に連結されている。

【0142】

本明細書中に使用される場合、「発現のダウンレギュレーション」とは、遺伝子発現のレベルおよび/または活性遺伝子産物のレベルおよび/または遺伝子産物活性のレベルを低下することを意味する。発現の減少は、例えば、プロモーター配列に対してそのセンス配向（同時抑制を生じる場合）もしくはアンチセンス配向での、コード配列またはそれらの部分の付加によって、またさらに、例えば挿入変異誘発（例えば、T-DNA挿入もしくはトランスポゾン挿入）または以下：例えば、AngelilおよびBaulcombe 1998（WO9836083）、Loweら、1989（WO9853083）、Ledererら 1999（WO9915682）もしくはWangら、1999（WO9953050）によって記載された遺伝子サイレンシング戦略によって達成され得る。遺伝子発現をサイレンシングしようとする遺伝的構築物は、プロモーター配列に対してセンス配向および/またはアンチセンス配向で、その中にこの遺伝子のヌクレオチド配列（ま

40

50

たはそれらの１つ以上の部分）を有し得る。遺伝子発現をダウンレギュレートするための別の方法は、例えば A t k i n s ら、１９９４（W O ９４０００１２）、L e n e e ら、１９９５（W O ９５０３４０４）、L u t z i g e r ら、２０００（W O ００００６１９）、P r i n s e n ら、１９９７（W O ９７１３８６５）および S c o t t ら、１９９７（W O ９７３８１１６）に記載されたりボソームの使用を包含する。

【０１４３】

調節（活性遺伝子産物のレベルまたは遺伝子産物活性のレベルを低下することを含む）は、この遺伝子産物、そのホモログ、アナログ、誘導体、および／または免疫学的に活性なフラグメントに、細胞、組織、または生物を投与することによってかまたは曝すことによって達成され得る。免疫調節は、活性遺伝子産物および／または遺伝子産物活性のレベルをダウンレギュレーションし得る技術の別の例であり、かつ細胞、組織、器官、または生物に対してかまたはその中に、その遺伝子産物に対する抗体を投与するか、または曝露するか、または発現させる工程を包含する（ここでこの遺伝子産物および／または遺伝子産物活性のレベルが、調節される）。そのような抗体は、「植物体」、単鎖抗体、I g G 抗体、および重鎖ラクダ抗体ならびにそれらのフラグメントを含む。

10

【０１４４】

調節（活性遺伝子産物のレベルまたは遺伝子産物活性のレベルを低下することを含む）は、さらにまた、この遺伝子産物またはその活性のインヒビターまたはアクチベーターに、細胞、組織、器官、または生物を投与する工程または曝す工程によって達成され得る。そのようなインヒビターまたはアクチベーターとしては、タンパク質（例えば、プロテイナーゼおよびキナーゼを含む）および上記の本発明に従って同定される化合物が挙げられる。

20

【０１４５】

本発明の文脈において、用語「アゴニスト」とは、プロタゴニストまたはアンタゴニスト（すなわち、正および負の効果のいずれかを有し得、エンハンサーまたはインヒビターまたはモジュレーターでも有り得る）のいずれかであり得る物質をいう。

【０１４６】

本発明の文脈において、上部に定義された本発明のテンサイ遺伝子の発現のダウンレギュレーションが、考えられる。本発明はさらに、本発明のテンサイポリペプチドの活性のレベルのダウンレギュレーションを含む（それによって本発明のテンサイポリペプチドが前出のように定義された）。

30

【０１４７】

「細胞の運命および／または植物発生および／または植物形態学および／または生化学および／または生理学」とは、植物の１つ以上の発生学的特徴および／または形態学的特徴および／または生化学的特徴および／または生理学的特徴が、本明細書中に記載された発明に関する１つ以上の工程の実施によって変化されることを意味する。

【０１４８】

「細胞の運命」とは、植物発生または細胞プロセスの間に（従って、特に、細胞周期の間または細胞周期プロセスの結果として）産生される特定の細胞の細胞型または細胞性特徴をいう。

40

【０１４９】

「植物発生」または用語「植物発生特徴」または類似の用語は、本明細書中に使用される場合、植物細胞（特に、その中で先祖細胞が発生するような特定の組織型または器官型）の発生運命の決定に関与する、植物の任意の細胞性プロセスを意味すると解釈されるべきである。植物発生に関連する細胞性プロセスは、当業者に公知である。そのようなプロセスとしては、例えば、形態発生、光形態発生（p h o t o m o r p h o g e n e s i s）、苗条の発生、根の発生、栄養発生、生殖発生、幹の伸長、開花および細胞運命の決定に関与する調節機構（特に細胞周期を含むプロセスまたは調節プロセス）が挙げられる。

【０１５０】

「植物形態学」または用語「植物形態学的特徴」または類意の用語が、本明細書中に使用

50

される場合、当業者によって、任意の1つ以上の構造的特徴またはそれらの構造的特徴の組み合わせを含む、植物の外観を示すと理解される。そのような構造的特徴は、任意の細胞、細胞の組織もしくは細胞の器官もしくは細胞の群、または植物の組織もしくは器官（数多くの中の、根、幹、葉、苗条、葉柄、トリコーム、花、花弁、柱頭、花柱、雄ずい、花粉、胚珠、種子、胚、内乳、種皮、アリューロン、繊維、果実、形成層、木部、心材、柔組織、通気組織、篩エレメント、篩部、または維管束組織、）の形、大きさ、数、位置、色、質感（*texture*）、配置、および模様（*patternation*）を含む。

【0151】

「植物生化学」または用語「植物生化学的特徴」または類似の用語は、本明細書中に使用される場合、当業者によって、一次代謝および二次代謝ならびにそれらの産物（例えば、植物によって産生されるデンプン、糖、タンパク質、ペプチド、酵素、ホルモン、増殖因子、核酸分子、セルロース、ヘミセルロース、カロース、レクチン、繊維、色素（例えば、アントシアニン）、ビタミン、ミネラル、微量養分、または多量要素（ただしこれらに限定されない）のような、任意の低分子、高分子、または化合物を含む）を含む、植物の代謝的プロセスおよび触媒的プロセスを示すと理解される。

10

【0152】

「植物生理学」または用語「植物生理学的特徴」または類似の用語は、本明細書中に使用される場合、発生的プロセス（数ある中で、例えば、成長、伸長および分化、有性発生、有性生殖、種子の設置、種子発生、穀類の充実、無性生殖、細胞分裂、休眠、発芽、明順応、光合成、葉伸長、繊維産生、二次成長、または木部産生）；外部より適用された因子（例えば、金属、化学物質、ホルモン、増殖因子、環境および環境ストレス因子（数ある中で、例えば、無酸素、低酸素、高温、低温、脱水、明かり、昼の長さ、洪水、塩、重金属））に対する植物の応答（この外的に適用された因子に対する植物の付加的な応答を含む）を含む、植物の機能的プロセスを示すと理解される。

20

【0153】

「ストレス」または「環境的ストレス」とは、干魃、塩、脱水、高温、低温、凍結、浸水、創傷、機械的ストレス、酸化的ストレス、オゾン、高照射重金属、栄養不足、毒性化学物質、病原体（ウイルス、細菌、真菌、昆虫、および線虫を含む）およびそれらの組み合わせを含み得るが、これらに限定されない、環境中に存在するエレメントによって引きお

30

【0154】

「浸透性ストレス」とは、細胞中の浸透性ポテンシャル（*osmotic potential*）を変化させる任意の種類のストレスである。例えば、浸透性ストレスが、干魃または塩または霜によって引き起こされ得る。

【0155】

「非環境的ストレス」とは、生物由来のエレメントまたは因子によって引き起こされる状況（例えば、遺伝子欠損）である。

【0156】

本明細書中に使用される場合、「ストレス耐性」とは、ストレスの中で成長しかつバイオマスを生産する能力、ストレスの後、成長を再開しかつバイオマスを生産する能力、およびストレスの中で生存する能力を示す。用語「ストレス耐性」はまた、ストレスの中で、ストレスのない状況下と類似した発生のプログラムを、実行する植物の能力を含む（例えば、ストレス状況下で、ストレスの与えられていない状況下に類似するように、休眠から発芽への変化および栄養期から生殖期への変化をさせる）。さらにまた、浸透性ストレス（トレハロースなど）に対して保護をする遺伝子はまた、酸化的ストレスに対しても保護する（Benaroudjら、2001）ことが示された。従って、当業者は、単離された遺伝子が、本明細書中でトランスフェクトされた際に、宿主生物に塩耐性を与える場合、それがまた、酸化的ストレス耐性も与え得ると推定できる。酸化的ストレスは、高光照射と組み合わせられた低温ストレスの状態、またはオゾンストレスの状態、病原体感染も

40

50

しくは創傷の結果としての壊死の場合、シネセンス (s c e n e s c e n c e) の場合、または、特定の除草剤 (アトラジンまたはパラコート) の適用によって生じる。多くの浸透保護材の機能が、実際に知られておらず、かつ例えば、マンニトールもまた酸素ラジカルのスカベンジャーとして機能することが示されているので、酸化的ストレスもまた浸透ストレスの場合に生じることが推定され得る。

【0157】

植物組織または細胞へと組換えDNAを導入する手段としては、 CaCl_2 を用いた形質転換およびそのバリエーション (特に以前に記載された方法 (H a n a h a n、1983))、プロトプラストへのDNAの直接の取り込み (K r e n s ら、1982; P a s z k o w s k i ら、1984)、プロトプラストへのPEG媒介取り込み (A r m s t r o n g ら、1990)、微小粒子の衝撃 (m i c r o p a r t i c l e b o m b a r d m e n t)、エレクトロポレーション (F r o m m ら、1985)、DNAのマイクロインジェクション (C r o s s w a y ら、1986; F r o m m ら、1985)、組織外植片または細胞の微小粒子衝撃 (C h r i s t o u ら、1988)、核酸を用いた組織の吸引過、また植物の場合には、本質的に記載された、A g r o b a c t e r i u m から植物組織へのT-DNA媒介移入 (A n ら、1985; D o d d s 1985; H e r r e r a - E s t r e l l a ら、1983a; H e r r e r a - E s t r e l l a ら、1983b) が挙げられるが、これらに限定されない。単子葉植物の形質転換のための方法が、当該分野において周知であり、そしてA g r o b a c t e r i u m 媒介形質転換 (C h e n g ら、1997 - W O 9 7 4 8 8 1 4; H a n s e n 1998 - W O 9 8 5 4 9 6 1、H i e i ら、1994 - W O 9 4 0 0 9 7 7; H i e i ら、1998 - W O 9 8 1 7 8 1 3; R i k i i s h i ら、1999 - W O 9 9 0 4 6 1 8; S a i t o ら、1995 - W O 9 5 6 7 2 2)、微小発射体衝撃 (m i c r o p r o j e c t i l e b o m b a r d m e n t) (A d a m s ら、1999 - U S 5 9 6 9 2 1 3; B o w e n ら、1998 - U S 5 7 3 6 3 6 9; C h a n g ら、1994 - W O 9 4 1 3 8 2 2; L u n d q u i s t ら、1999 - U S 5 8 7 4 2 6 5 / U S 5 9 9 0 3 9 0; V a s i l および V a s i l 1995 - U S 5 4 0 5 7 6 5; W a l k e r ら、1999 - U S 5 9 5 5 3 6 2)、DNA取り込み (E y a l ら、1993 - W O 9 3 1 8 1 6 8)、A g r o b a c t e r i u m 細胞のマイクロインジェクション (v o n H o l t 1994 - D E 4 3 0 9 2 0 3) および超音波処理 (F i n e r ら、1997 - U S 5 6 9 3 5 1 2) が挙げられる。

【0158】

細胞の微小粒子衝撃では、微小粒子が、形質転換細胞を産生するために細胞へと推進される。任意の適切な弾道性細胞形質転換法および装置が、本発明の実施において用いられ得る。例示的装置および手順が、S t o m p ら (米国特許第5122466号) ならびにS a n f o r d および W o l f (同第4945050号) によって開示されている。弾道性形質転換手順を用いる場合、遺伝子構築物は、形質転換される細胞中で複製し得るプラスミドを組み込み得る。

【0159】

そのような系における使用に適する微小粒子の例としては、1 ~ 5 μm 金球体が挙げられる。そのDNA構築物は、任意の適切な技術 (例えば、沈殿) によって微小粒子上に沈着され得る。

【0160】

植物全体が、当該分野において周知の手順に従って、形質転換またはインフェクトされた細胞から再生され得る。器官形成または胚形成のいずれかによって続くクローンの増殖を可能とする植物組織は、本発明の遺伝子構築物で形質転換され得、そして植物全体は、そこから再生される。選択される特定の組織は、形質転換される特定の種について利用可能であり、それに最も適する、クローンの増殖系に依存して変化する。例示的標的組織としては、葉のディスク (l e a f d i s k)、花粉、胚、子葉、胚軸、大配偶体、カルス組織、現在の分裂組織 (すなわち、頂端分裂組織、腋芽、および根の分裂組織) および誘

導された分裂組織（例えば、子葉分裂組織および胚軸分裂組織）が挙げられる。

【0161】

本明細書中に使用される場合、用語「器官形成」とは、苗条および根が、分裂組織の中心から連続的に成長するプロセスを意味する。

【0162】

本明細書中に使用される場合、用語「胚形成」とは、苗条および根が、体細胞または配偶子のいずれかから、協調した様式で（連続的とは異なる）一緒になって成長するプロセスを意味する。

【0163】

好ましくは、本発明の方法に従って産生される植物は、遺伝子配列によってトランスフェクトまたは形質転換されるか、あるいはあらゆる分野で認識される手段（数ある中で、例えば、微小発射体衝撃、マイクロインジェクション、*Agrobacterium*媒介形質転換（「花浸漬」形質転換法を含む；（*Bechtold*および*Pelletier* 1998；*Trieu*ら、2000））、プロトプラスト融合、またはエレクトロポレーション）によるタンパク質の導入を受けやすい。最も好ましくは、この植物は、*Agrobacterium*媒介形質転換によって産生される。

10

【0164】

「実生（*seedling*）」とは、種子発芽の後に成熟胚から生じる若い植物である。

【0165】

「細胞の分化」とは、細胞が、特定の機能に関連する特徴的な特徴を発生することだと理解される。ほとんどの分化は非可逆的である。

20

【0166】

植物、酵母、糸状菌、または糸状真菌の *Agrobacterium* 媒介形質転換またはアグロリスティック形質転換（*agrolistic transformation*）は、核への形質転換ベクター配列（*T-DNA*と呼ばれる）の一部の移入およびこの真核生物のゲノム中でのこの *T-DNA* の組み込みに基づく。

【0167】

「*Agrobacterium*」とは、*Agrobacteriaceae* のメンバー、より好ましくは、*Agrobacterium* または *Rhizobacterium* および最も好ましくは、*Agrobacterium tumefaciens* を意味する。

30

【0168】

「*T-DNA*」、または移植された *DNA* とは、*T-DNA* 境界に隣接した形質転換ベクターの一部を意味し、これは、*Agrobacterium vir* 遺伝子の活性化の後、*T-DNA* 境界にニックを入れられ、そして一本鎖 *DNA* として原核生物細胞の核に移入される。

【0169】

本明細書中に使用される場合、「*T-DNA* 境界」、「*T-DNA* 境界領域」、または「境界領域」とは、右の *T-DNA* 境界（*RB*）または左の *T-DNA* 境界（*LB*）のいずれかを意味する。そのような境界は、境界の側面に位置する *T-DNA* の一部としての境界内部領域および／または境界の側面に位置するベクター骨格の一部としての境界外部領域の側面に配置されたコア配列を備える。このコア配列は、オクトピン型ベクターの場合で 22 bp およびノパリン型ベクターの場合で 25 bp を含む。右の境界領域および左の境界領域におけるコア配列は、不完全な繰り返しを形成する。境界コア配列は、少なくとも *VirD1* および *VirD2* からなる *Agrobacterium* ニック複合体（*nick complex*）による認識およびプロセシングのために必要不可欠である。*T-DNA* の側面に配置するコア配列は、この *T-DNA* の移入を促進するのに十分である。しかし、このコア配列の側面に単独で配置されたこの *T-DNA* を含む形質転換ベクターを用いる形質転換の効率は、低い。境界内部および外部領域は、*T-DNA* 移入の効率を調節することが知られている（*Wang*ら、1987）。*T-DNA* 移入を増強する1つのエレメントは、特徴づけられかつ右の境界外部領域中に存在し、そしてオーバー

40

50

ドライブ (overdrive) と呼ばれる (Peralta ら、1986; van Haaren ら、1987)。

【0170】

「T-DNA 形質転換ベクター」または「T-DNA ベクター」とは、各々、少なくとも右および左の境界コア配列からなる右および左の T-DNA 境界の側面に配置された T-DNA 配列を包含し、そして任意の真核生物細胞の形質転換に用いられる任意のベクターを意味する。

【0171】

「T-DNA ベクター骨格配列」または「T-DNA 骨格配列」とは、T-DNA 境界の外側、より詳細には、境界コアの不完全な繰り返しのニック部位の外側に存在する、T-DNA 含有ベクターの全ての DNA を意味する。

10

【0172】

本発明は、真核生物細胞のゲノム中のベクター骨格組み込み部が最小化されるかまたは非存在となるような、最適化された T-DNA ベクターを含む。「最適化された T-DNA ベクター」とは、真核生物細胞のゲノムへのベクター骨格配列の移入を減少させるかまたは全くなくすかのいずれかのために設計された T-DNA ベクターを意味する。そのような T-DNA ベクターは、当業者に公知であり、そして以前に記載されたそれらを含む (Hanson ら、1999、Stuiver ら、1999-WO9901563)。

【0173】

本発明は、明白に、バイナリー形質転換ベクター、スーパーバイナリー (super-binary) 形質転換ベクター、同時組み込み形質転換ベクター、Ri 由来形質転換ベクターを含む任意の T-DNA ベクター、およびアグロリスティック形質転換に用いられる T-DNA を保有するベクターにおいて、前に定義された DRE 結合因子 DBF1 をコードする本発明の DNA 配列、そのホモログ、誘導体、または免疫学的に活性なフラグメントの包含を考慮する。

20

【0174】

「バイナリー形質転換ベクター」とは、以下を含む T-DNA 形質転換ベクターを意味する：少なくとも 1 つの目的の遺伝子および / または形質転換される真核生物細胞中で活性な少なくとも 1 つの選択マーカーを含む T-DNA 領域；ならびに *Escherichia coli* および *Agrobacterium* 中で活性な複製起点ならびに *Escherichia coli* および *Agrobacterium* 中での選択のためのマーカーを少なくとも含むベクター骨格領域。あるいは、*Agrobacterium* 中でのバイナリー形質転換ベクターの複製は、別々のヘルパープラスミドの存在に依存する。バイナリーベクター pGreen およびヘルパープラスミド pSoup は、例えば Hellen ら、2000 に記載されるような系またはインターネットサイト <http://www.pgreen.ac.uk> で利用可能な系の例を形成する。

30

【0175】

バイナリー形質転換ベクターの T-DNA 境界は、オクトピン型もしくはノパリン型 Ti プラスミドまたはそれらの両方から誘導され得る。バイナリーベクターの T-DNA は単に、ヘルパープラスミドと組み合わせて真核生物細胞に移入される。また、植物の同時形質転換に効率的な複数のバイナリーベクター *Agrobacterium* 株も、当該分野において公知である (Bidney および Scelonge 2000-WO0018939)。

40

【0176】

「ヘルパープラスミド」とは、*Agrobacterium* 中に安定して維持されるプラスミドを意味し、そして少なくとも、T-DNA の移入を可能にするために必要な vir 遺伝子のセットを保有している。この vir 遺伝子のセットは、オクトピン型もしくはノパリン型 Ti プラスミドのいずれか、またはそれらの両方から誘導され得る。

【0177】

「スーパーバイナリー形質転換ベクター」を有するとは、ベクター骨格領域中に超有毒の

50

Agrobacterium tumefaciens 株 A281 の Ti プラスミド pTiBo542 の *vir* 領域をさらに保有するバイナリー形質転換ベクターを意味する (Hiei ら、1994 - EP0604662、Hiei ら、1995 - EP0687730)。スーパーバイナリー形質転換ベクターは、ヘルパープラスミドと組み合わせて用いられる。

【0178】

「同時組み込み形質転換ベクター」とは、少なくとも以下を含む T-DNA ベクターを意味する：

少なくとも 1 つの目的の遺伝子および / または植物中で活性な少なくとも 1 つの選択マーカを含む T-DNA 領域；ならびに *Escherichia coli* および *Agrobacterium* 中で活性な複製起点および *Escherichia coli* および *Agrobacterium* 中での選択のためのマーカ、および T-DNA の移入を可能とするために必要な *vir* 遺伝子のセットを少なくとも含むベクター骨格領域。

10

【0179】

T-DNA 境界およびこの T-DNA ベクターのこの *vir* 遺伝子のセットは、オクトピン型もしくはノナピン型 Ti プラスミドのいずれかまたはその両方から誘導され得る。

【0180】

「Ri 誘導植物形質転換ベクター」とは、T-DNA 境界が Ti プラスミドから誘導されるバイナリー形質転換ベクターを意味し、このバイナリー形質転換ベクターは、必要な *vir* 遺伝子のセットを保有する「ヘルパー」Ri プラスミドと組みあわせて用いられる。

20

【0181】

本明細書中に使用される場合、用語「選択マーカ遺伝子」または「選択マーカ」または「選択のためのマーカ」は、それが発現する細胞に、ある表現型を与えて、本発明の遺伝子構築物またはその誘導体でトランスフェクトまたは形質転換された細胞の同定および / または選択を容易にする任意の遺伝子を含む。本明細書中に意図される適切な選択マーカ遺伝子としては、数ある中で、アンピシリン耐性遺伝子 (Amp^r)、テトラサイクリン耐性遺伝子 (Tc^r)、細菌性カナマイシン耐性遺伝子 (Kan^r)、ホスフィノスリシン耐性遺伝子、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子 (nptII)、ハイグロマイシン耐性遺伝子、 β -グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) 遺伝子、緑色蛍光タンパク質 (gfp) 遺伝子 (Haseloff ら、1997) およびルシフェラーゼ遺伝子が挙げられる。

30

【0182】

「アグロリスティック」、「アグロリスティック形質転換」、または「アグロリスティック移入」とは、本明細書中において、*Agrobacterium* 媒介形質転換およびバイオリスティック (biolistic) DNA 送達の特徴を組み合わせた形質転換方法を意味する。このように、T-DNA を含む標的プラスミドは、VirE2 を伴うかまたは伴わない VirD1 および VirD2 の植物的産生を可能とする DNA/RNA と同時送達される (Hansen および Chilton 1996; Hansen ら、1997、Hansen および Chilton 1997 - WO9712046)。

40

【0183】

「外来性 DNA」とは、組換え技術によって宿主のゲノム中に導入される任意の DNA 配列を意味する。この外来性 DNA は、例えば、発現可能なフォーマットで選択マーカを含む T-DNA 配列のような、T-DNA 配列またはその一部を含む。外来性 DNA はさらに、上に規定したような介在 DNA 配列も含む。

【0184】

「植物細胞」は、任意の植物由来であり、かつ培養物中に単一の細胞、細胞群、またはカルスとして存在する任意の細胞を含む。植物細胞はまた、培養物中にあるかまたは天然で生育中の、発達中の植物または成熟した植物中の任意の細胞でもあり得る。

【0185】

「植物 (plant)」または「植物 (plants)」は、スーパーファミリー Vir

50

i d i p l a n t a e に属する全ての植物種を含む。本発明は、任意の植物に適用可能であり、数ある中で、特に、以下：

【 0 1 8 6 】

【 化 1 】

Acacia spp., Acer spp., Actinidia
spp., Aesculus spp., Agathis australis, Albizia amara, Alsophila tricolor, Andropogon spp.,
Arachis spp., Areca catechu, Astelia fragrans, Astragalus cicer, Baikiaea plurijuga, Betula
spp., Brassica spp., Bruguiera gymnorhiza, Burkea africana, Butea frondosa, Cadaba
farinosa, Calliandra spp., Camellia sinensis, Canna indica, Capsicum spp., Cassia spp.,
Centroema pubescens, Chaenomeles spp., Cinnamomum cassia, Coffea arabica,
Colophospermum mopane, Coronilla varia, Cotoneaster serotina, Crataegus spp.,
Cucumis spp., Cupressus spp., Cyathea dealbata, Cydonia oblonga, Cryptomeria
japonica, Cymbopogon spp., Cynthea dealbata, Cydonia oblonga, Dalbergia monetaria,
Davallia divaricata, Desmodium spp., Dicksonia squarosa, Diheteropogon amplexans,
Dioclea spp., Dolichos spp., Dorycnium rectum, Echinochloa pyramidalis, Ehrartia spp.,
Eleusine coracana, Eragrostis spp., Erythrina spp., Eucalyptus spp., Euclea schimperi,
Eulalia villosa, Fagopyrum spp., Fajoa sellowiana, Fragaria spp., Flemingia spp.,
Freycinetia banksii, Geranium thunbergii, Ginkgo biloba, Glycine javanica, Gliricidia spp.,
Gossypium hirsutum, Grevillea spp., Guibourtia coleosperma, Hedysarum spp., Hemarthria
altissima, Heteropogon contortus, Hordeum vulgare, Hyparrhenia rufa, Hypericum
erectum, Hyperthelia dissoluta, Indigo incarnata, Iris spp., Leptarrhena pyrolifolia,
Lespedeza spp., Lettuce spp., Leucaena leucocephala, Loudetia simplex, Lotonus bainesii,
Lotus spp., Macrotyloma axillare, Malus spp., Manihot esculenta, Medicago sativa,
Metasequoia glyptostroboides, Musa sapientum, Nicotianum spp., Onobrychis spp.,
Ornithopus spp., Oryza spp., Peltophorum africanum, Pennisetum spp., Persea
gratissima, Petunia spp., Phaseolus spp., Phoenix canariensis, Phormium cookianum,
Photinia spp., Picea glauca, Pinus spp., Pisum sativum, Podocarpus totara, Pogonarthria
fleckii, Pogonarthria squarrosa, Populus spp., Prosopis cineraria, Pseudotsuga menziesii,
Pterolobium stellatum, Pyrus communis, Quercus spp., Rhamphiolepis umbellata,
Rhopalostylis sapida, Rhus natalensis, Ribes grossularia, Ribes spp., Robinia
pseudoacacia, Rosa spp., Rubus spp., Salix spp., Schyzachyrium sanguineum,
Sciadopitys verticillata, Sequoia sempervirens, Sequoiadendron giganteum, Sorghum
bicolor, Spinacia spp., Sporobolus fimbriatus, Stiburus alopecuroides, Stylosanthos
humilis, Tadehagi spp., Taxodium distichum, Themeda triandra, Trifolium spp., Triticum
spp., Tsuga heterophylla, Vaccinium spp., Vicia spp., Vitis vinifera, Watsonia pyramidata,
Zantedeschia aethiopica, Zea mays,

10

20

30

40

ヒユ、アーティチョーク、アスパラガス、ブロッコリー、メキャベツ、キャベツ、キャノ
ーラ、人参、カリフラワー、セロリ、コラードの若葉 (collard green)、
アマ、ケール、レンズマメ、脂肪種子のナタネ、オクラ、玉ねぎ、ジャガイモ、米、ダイ
ズ、ワラ、テンサイ、蔗糖、ヒマワリ、トマト、カボチャ、および茶を含むリストより選
択される、飼料 (fodder) 豆類もしくは飼草豆類、観賞植物、食用穀類、樹木、ま
たは灌木を含む単子葉植物および双子葉植物、あるいは上に詳述された任意の植物の種ま
たは上記の種のいずれかの、組織、細胞、もしくは器官培養物に適用可能である。

【 0 1 8 7 】

「穀類」は、食用穀物 (例えば、オートムギ、大麦、ライ麦、小麦、米、および、コーン
等の栄養豊富な穀物のため栽培されるイネ科に属する植物) を有する穀物植物を包含する

50

。

【0188】

「酵母ツーハイブリッドアッセイ (yeast two hybrid assay)」とは、多くの真核生物転写因子が、2つのドメイン (DNA結合ドメイン (DB) および活性化ドメイン (AD)) を備え、この2つのドメインが、物理的に分離された場合 (すなわち、共有結合の破壊) 標的遺伝子の発現を実現しないという観察に基づくアッセイを意味する。2つのタンパク質 (DBに融合されたその一方のタンパク質およびADに融合されたその他方のタンパク質が物理的に相互作用し得る) は、転写因子のDBドメインおよびADドメインが再結合して、標的遺伝子の発現を生じる。酵母ツーハイブリッドアッセイにおける標的遺伝子は、通常、
- ガラクトシダーゼ遺伝子のようなレポーター遺伝子である。従って、酵母ツーハイブリッドアッセイにおけるタンパク質パートナーの間の相互作用は、レポーター遺伝子産物の活性を測定することによって定量され得る (Bartel および Fields 1997)。あるいは、哺乳動物のツーハイブリッドシステム (例えば、キメラ緑色蛍光タンパク質をコードするレポーター遺伝子 (Shioda ら、2000) を含む) が、用いられ得る。なお別の代替物は、例えばレポーター遺伝子としてHISを用いる細菌性ツーハイブリッドシステムからなる (Joung ら、2000)。

10

【0189】

用語「配列のフラグメント」または「配列の一部」とは、示された元の配列の短縮された配列を意味する。この短縮された配列 (核酸配列またはタンパク質配列) は、長さが広範に変化し得；最小のサイズは、ある配列に、示された元の配列と少なくとも1つの同等の機能および/または活性を提供するのに十分なサイズの配列であるが、その最大のサイズは、必要不可欠ではない。いくつかの適用において、最大のサイズは、通常、元の配列の所望の活性および/または機能を提供するために必要とされるサイズより実質的に大きくない。代表的には、その短縮されたアミノ酸は、約5～約333アミノ酸長 (nucleotide length) の範囲にある。しかし、より代表的には、その配列は、約333アミノ酸長の最大値であり、好ましくは、約330アミノ酸の最大値である。少なくとも約10、12、もしくは15のアミノ酸、または25、50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、最大値である約300もしくは325までのアミノ酸の配列を選択することが、通常、所望される。例えば、この短縮された核酸は、それがコードするアミノ酸フラグメントと長さが一致する。

20

30

【0190】

この化合物 (単数または複数) は、例えば、サンプル (例えば、細胞抽出物 (例えば、植物、動物、または微生物由来)) 中に含まれ得る。さらに、これらの化合物は、当該分野において公知であり得るが、従来、細胞周期を相互作用するタンパク質を抑制または活性化し得ることは、知られていない。この反応混合物は、細胞を含まない抽出物でも、細胞培養物もしくは組織培養物を含んでもよい。本発明のための適切な設定は、当業者に公知であり、そしてそれらは、一般的に、例えば、以前に記載されている (Alberts ら、1994 (特に、17章))。多くの化合物は、例えば、反応混合物、培養培地に添加され得るか、または細胞中に注入され得る。

40

【0191】

化合物 (単数または複数) を含むサンプルが、本発明の方法で同定される場合、アゴニストとして作用し得る化合物を含むとして同定されている元のサンプルから、それらのいずれかの化合物を単離することが可能であるか、または例えばそのサンプルが多くの異なる化合物からなる場合、実施者は、サンプル当たりの異なる化合物の数を減少させるために、元のサンプルをさらに細分化し得、そして元のサンプルの細分化を伴うその方法を繰り返し得ることが可能である。サンプルの複雑さに起因して、上記の工程は、好ましくは本発明の方法に従い同定されるサンプルが、限定された数または1つの物質のみを含むまで、複数回、実施され得る。好ましくは、このサンプルは、物質または類似の化学的特性および/もしくは物理的特性を含み、そして最も好ましくは、この物質は、同一である。好

50

ましくは、上記の方法またはその改変に従い同定された化合物は、さらに、植物栽培または植物細胞および組織の培養における適用に適する形態に処方される。

【0192】

本発明は、さらに、以下の限定をしない図および例を参照して記載される。

【0193】

(実施例)

(実施例1：植物材料)

テンサイの種子 (*Beta vulgaris* var. *DITTA*) を、砂とバーミキュライトの混合物 (1:1 重量/重量) を含むポットに蒔いた。その植物を、温室条件 (最低限の12時間光周期を刺激するための補助照明を用いて、20℃で8時間、25℃で16時間) 下で育てた。その植物を、栄養液 (2.4 g/l $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、1 g/l KNO_3 、1 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.3 g/l KH_2PO_4 、5.6 mg/l Fe-quelate (Kelantren, Bayer)、1.1 mg/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、3.3 mg/l $\text{MnO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、0.3 mg/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、3.8 mg/l H_3BO_3 、0.18 mg/l $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ を含む) で定期的に灌水した。cDNAライブラリーの作製のため、3週間齢の植物を、収穫前の24時間にわたって、200 mM NaCl で灌水した。ノーザンブロット分析のため、植物を250 mM NaCl で灌水し、そして葉を図5の説明に示すように、異なる時間において収穫した。コントロールを同様に処理したが、 NaCl 溶液の代わりに、 H_2O を培養物に供給した。

【0194】

(実施例2：酵母株および培養条件)

Saccharomyces cerevisiae 株 JM26 (MATa leu2-3, 112 ura3-1 trp1-1, ade2-1 his3-11, 15 can1-100, ena1-4::HIS3, nha1::TRP1) (J. M. Mulet (Universidad Politecnica de Valencia, Instituto de Biologia Molecular y Celular de Plantas) によって提供された) を、テンサイ cDNA ライブラリーのスクリーニングおよび CKA2 cDNA クローンの特徴付けに使用した。JM26 株は、 Na^+ ポンプ ATP アーゼおよび Na^+/H^+ 対向輸送体をそれぞれコードする、遺伝子 ENA1-4 および NHA1 のヌル変異を含む W303.1A (Wallis ら 1989) の誘導体であり、 Na^+ ポンプ ATP アーゼおよび Na^+/H^+ 対向輸送体は、酵母のナトリウム突出のほとんどの原因である (Garcia de Blas ら 1993, Banuelos ら 1998)。CK2 温度感受性変異体株 YDH8 (MATa cka1-1::HIS3 cka2-1::TRP1 ade2-101^{oc} his3-200 leu2-1 lys2-801^{amber} trp1-1 ura3-52 [pDH8:LEU2 cka2-8]) は、C. V. C. Glover 博士 (University of Georgia) の親切な贈り物であった (Hanna ら 1995)。

【0195】

酵母を、最小合成グルコース培地 (SD) かまたは栄養分のある培地 (YPD) のいずれかにおいて増殖させた。SD 培地は、2% のグルコース、アミノ酸を含まない 0.7% の酵母窒素ベース、および 50 mM コハク酸を含み、その培地を、示したような、Tris で pH 5 に調整し、必要なアミノ酸 [100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ロイシン、30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ アデニン、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ メチオニン] をプラスした。YPD 培地は、1% の酵母抽出物、2% の Bacto ペプトン、および 2% のグルコースを含んだ。培地に、示したように、 NaCl を補充した。固体培地は、2% の細菌学グレードの寒天を含んだ。

【0196】

(実施例3：塩ストレスによって誘導されたテンサイ cDNA ライブラリーの構築)

方向性 cDNA を、塩処理したテンサイ植物の葉から調製された、ポリ(A)⁺ RNA を

使用して合成した (cDNA 合成キット、Stratagene)。cDNA をファージ PG15 ベクター中に連結させ、Gigapack III gold packaging extract (Stratagene) を使用してパッケージ化した。このファージは、切除可能な発現プラスミド pYPGE15 (選択マーカーとして URA3) を挿入されており、この発現プラスミドは、Escherichia coli と酵母との両方の相補のために直接的に有効である (Brunelli および Pall, 1993)。プラスミド cDNA ライブラリーを、cre-lox リコンビナーゼ系 (Brunelli および Pall, 1993) によって、PG15 から回収した。

【0197】

(実施例 4：酵母に対して耐塩性を付与する cDNA クローンのスクリーニングおよび単離)

酵母における耐塩性を上昇させるテンサイ cDNA についてスクリーニングするために、pYPGE15 中に構築された cDNA ライブラリーを使用して、LiCl 方法 (Gietz ら 1992) によって酵母変異株 JM26 を形質転換した。ロイシンおよびアデニンを含む SD プレート上でウラシル原栄養性によって選択された形質転換体をプールし、そして 1 プレート (12 × 12 cm) あたり 2×10^5 細胞の密度でスクリーニング培地 (0.15 M NaCl を補充した、ロイシン、アデニンおよびメチオニンを含む SD) に再度プレATINGした。メチオニンを選択培地に添加し、Arabidopsis 中にすでに見出された HAL2 様ホモログ (Quintero ら 1996、Gil-Mascarell ら 1999) の選択を回避した。あるいは、Li⁺ 耐性酵母細胞の選択のために、形質転換体をスクリーニング培地 (20 mM LiCl を補充した、ロイシンおよびアデニンを含む SD) 上に再度プレATINGした。推定上のポジティブクローンを、同じ NaCl 培地または LiCl 培地上で再スクリーニングした。

【0198】

確認された NaCl 耐性クローンのうちの 1 つであるクローン 154 をさらなる特徴付けのためにについて選択した。プラスミド DNA を、154 酵母細胞 (pYPGE15 + 154) から単離し、そして JM26 に再導入し、このプラスミド DNA が耐塩性を付与することを確認した。フッ素を含む酸 (fluorotic acid) を用いた、URA3 をマークしたプラスミドを除くような選択は、酵母細胞の塩感受性を回復した。pYPGE15 + 154 の挿入片を、DNA 配列決定機 (Model ABI 377、PE Biosystems) を用いて、ダイ-プライマーサイクル配列決定法によって直接配列決定した。CK2 のサブユニット (以下を参照のこと) としての挿入片を同定した後、それを pYPGE15 + BvCKA2 と改名した。

【0199】

(実施例 5：酵母 CKA2 遺伝子のクローニング)

Saccharomyces cerevisiae CKA2 遺伝子を、ゲノム DNA から PCR で単離した。増幅を Pwo DNA ポリメラーゼ (Roche Molecular Biochemicals) を用いて行い、そしてプライマーをゲノムクローン (GenBank 登録番号: M33759) の配列に従って設計した。プライマーの配列 (Eco RI - Xho I 部位は下線を引いた) は以下の通りである：順方向プライマー 5' - ATGGGATTAG GAAATTC TCATAGAGTTGTAAAGGTCCTCAGGG - 3' (配列番号 11) および逆方向プライマー 5' - CCTCAGTTT CTCGA GTTTATATAAATGGAAATCAGTGGTG - 3' (配列番号 12)。

【0200】

1.1 kb の PCR 増幅産物を、Eco RI - Xho I 消化し、そして酵母発現ベクター pYPGE15 中に方向性をもってクローン化した。pYPGE15 + ScCKA2 と名付けたこの構築物を使用して、酵母株 JM26 (Gietz ら 1992) を形質転換した。pYPGE15 プラスミドに含まれる挿入片が、酵母遺伝子 CKA2 であることが、配列分析によって、確認された。

【0201】

(実施例6: CKA2酵母変異体の相補性研究)

カゼインキナーゼ2触媒サブユニット遺伝子(CKA1およびCKA2)は、酵母生存に必須であるので、ck2変異体株YDH8(cka1 cka2)は、触媒サブユニットの温度感受性対立遺伝子(cka2~8)をコードする動原体プラスミドpDH8(LEU2マーカー)を保有する。この構築物は、細胞が37の制限温度では増殖しないが、25で増殖することを可能にする(Hannaら 1995)。プラスミドpYPGE15+BvCKA2を形質転換によってYDH8株に導入した。その後、プラスミドを失わせるためリッチ培地で細胞を増殖させ、そしてロイシン要求性について選択することによって、プラスミドpDH8をYDH8から取り除いた。25および37における酵母細胞の増殖について研究した。

10

【0202】

(実施例7: 耐塩性試験および細胞内イオン濃度の測定)

酵母培養物を、ロイシンおよびアデニンを含むSD液体培地で予備増殖させた。飽和培養物のアリコート希釈(1:10)、そして表示された濃度の塩を含むプレート上に、8x6のステンレス鋼レプリカプレート(SIGMA St. Louis, Mo.)で、スポット状に配置した。

【0203】

細胞内イオン濃度を測定するために、ロイシン、アデニン、メチオニンおよび75mM NaClを加えたSD中で指数関数期まで増殖させた10mlの酵母培養物(Spectronic 20D(Milton Roy, Rochester N.Y.))で測定して、660nmで0.7の吸光度)を遠心分離し、氷冷の10mM MgCl₂中での再懸濁によって3回洗浄し、1mlの10mM MgCl₂中に最後に再懸濁した。細胞濃度を、660nmの吸光度によって決定し、そして細胞内イオンを、濃縮したHClを0.1Mの最終濃度になるように添加することによって、抽出した。遠心分離による細胞片の除去後、上清中のK⁺およびNa⁺の濃度を、蛍光発光モードにおいて原子吸光分光計(Varian)によって決定した。細胞内水を、以前(Gaxiolaら 1992)に記載される通りに見積った。

20

【0204】

(実施例8: サザンブロット分析およびノーザンブロット分析)

ゲノムDNAをRogersおよびBendich(1994)に従って3週齢のテンサイの葉から調製した。DNAの5μgを、適切な制限酵素で消化し、0.8%のアガロースゲルで電気泳動し、そしてナイロン膜フィルター(Hybond N+, Amersham Life Science)にブロットした。膜フィルターを2つの異なった³²P標識DNAプローブでハイブリダイズした。それらのうちの1つは、BvCKA2 cDNAのコード領域を含む887bpのPCR増幅したフラグメント(順方向プライマー、5'-CGAAGCTCTCTCACTGTTC AATGG-3'(配列番号13)および逆方向プライマー、5'-GGATGTG CCA TTG CTTCTTTTGC-3'(配列番号14))に対応した。2つ目の323bpのより特異的なフラグメント(順方向プライマー、5'-CTCTCAAGTTAGAGCTGCAGA-3'(配列番号15)および逆方向プライマー、5'-GCTATTAGCAAACTATA TTAAGTG-3'(配列番号16))は、BvCKA2 cDNAの3'非コード領域を含む。ハイブリダイゼーションおよび洗浄を、ChurchおよびGilbert(1984)に従ってハイストリンジェンシー条件下(65)で行った。

30

40

【0205】

ノーザンブロット分析のために、全RNAを、コントロールのテンサイの葉またはNa⁺処理(Davisら(1998)によって記載された通り)したテンサイの葉から単離した。30μgの全RNAを、2.2%のホルムアルデヒドを含む1%アガロースゲルで分離し、そしてナイロン膜フィルター(Hybond N, Amersham Life Science)上にブロットした。ハイブリダイゼーションを、323bpの3'UTR特異性プローブ(サザンブロットティングについて上記に記載した)を用いて行った。フ

50

フィルターを、SSC 4x、0.1% SDSで5分間、2回およびSSC 0.4x、0.1 SDSで5分間、2回、65 で洗浄した。同じフィルターを、Arabidopsisの₃チューブリン遺伝子(Ludwigら 1987)を含む1.9 EcoRIフラグメントでリハイブリダイズした。ハイブリダイゼーションおよび洗浄の温度を、この異種プローブについて55 に下げた。

【0206】

(実施例9: テンサイ遺伝子でのイネ形質転換)

(酵母における耐塩性に関与するテンサイ遺伝子のイネ中での発現は、イネにおけるストレス耐性を媒介する)

単子葉植物中のテンサイのストレス耐性遺伝子のストレス耐性活性化を研究するために、プロモーターに作動可能に連結した上述の遺伝子(配列番号1~5)を、当業者に周知の、そして以下の段落で概要を説明した標準的な形質転換手順を使用してイネにそれぞれ形質転換する。1日~1週間以上の範囲にわたるいくつかの期間の後、芽生えを、形質転換遺伝子の発現についてチェックする。これを、器官形成培地中で芽生えを増殖させ、そしてPCRまたは逆PCRによってDNAまたはmRNAの存在をチェックすることによって行う。遺伝子発現の確認の後、形質転換したイネ植物を、塩、干ばつ、および低温を含むストレス状況での耐性の増強についてチェックする(WO97/13843を参照のこと)。これは、増加した量のNaClまたはLiClを含む培地中での、形質転換したイネ植物の増殖によって行う。低温または干ばつに対する耐性の増大をまた、それぞれ、最適未満の増殖温度および最適未満の湿度のレベルで、形質転換した植物の増殖によって試験する(WO97/13843)。

【0207】

(Agrobacterium媒介イネ形質転換)

本発明のテンサイ遺伝子を、ベクター中にクローン化されたプロモーターに作動可能に連結し得る。これらのベクターを、エレクトロポレーションによって、Agrobacterium tumefaciens LBA4404株またはC58株に形質転換し得、そして引き続いて、形質転換された細菌細胞を適切な抗生物質を含む固体寒天培地で選択し得る。

【0208】

イネにおける本発明の遺伝子の発現の実証のために、イネのジャポニカ品種日本晴または台北の309個の成熟した乾燥種子を、皮を取り除き、滅菌し、そして2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)を含む培地で発芽させる。暗所で4週間インキュベートした後、胚形成性の、胚盤由来カルスを切り出し、そして同じ培地で増殖させる。次いで、選択した胚形成カルスを、Agrobacteriumと一緒に共存培養(cocultivated)する。共存培養したカルスを、2,4-Dを含む培地で4~5週間暗所で、適切な濃度の適切な選択剤の存在下で増殖させる。この期間の間、急速に増殖する耐性カルス島が、発達する。減少した濃度の2,4-Dを含む培地へのこの材料の移植、および明所でのインキュベーション後、胚形成の可能性はなくなり、そして次の4~5週間でシュートが発生する。シュートを、カルスから切り出し、そしてオーキシンを含む培地で1週間インキュベートする(シュートを培地から土壤に移植し得る)。硬化したシュートを、高い湿度、および短日で、ファイトトロン中で増殖させる。種子は、移植後、3~5ヶ月で収穫され得る。この方法によって、単一遺伝子座形質転換体が50%を越える割合で得られる(Chanら 1993, Hieiら 1994)。

【0209】

(実施例10: Beta vulgaris CKA2遺伝子でのArabidopsisの形質転換)

154cDNA(BvCKA2)を発現するトランスジェニック植物のNaCl耐性を研究した。

【0210】

Arabidopsis thaliana植物(生態型コロンビア)を、空のプラスミ

ド p B I 1 2 1 (C L O N T E C H) またはテンサイ C K 2 プロテインキナーゼアリスティックサブドメイン (配列番号 6) を発現する p B I 1 2 1 B v C K A 2 のどちらかで形質転換した。B v C K A 2 c D N A を、p B I 1 2 1 の B a m H I 部位と S a c I 部位との間の部位に挿入した。構築物を、A g r o b a c t e r i u m t u m e f a c i e n s C 5 8 R i f^R R i f 株 (V a n L a r e b e k e ら 1 9 7 4) に導入した。この株を使用して、A r a b i d o p s i s 植物を花浸漬法によって形質転換した。

【 0 2 1 1 】

植物生存に対する N a C l の効果を、インビトロ実験および温室実験で決定した。

【 0 2 1 2 】

(インビトロ実験)

種子を 1 0 0 m M または 1 2 5 m M の N a C l を含む M S 培地を有するプレートで増殖させた。生存を、子葉および / または本葉を展開した芽生えの数として決定した。結果を図 7 および図 8 に示す。これらの結果は、配列番号 1 で表される核酸配列を有する c D N A (本発明の配列番号 6 で表されるアミノ酸配列を有する B e t a v u l g a r i s カゼインキナーゼ サブユニットをコードする) でトランスフェクトした A r a b i d o p s i s 植物が、野生型植物と比較したとき、塩ストレス条件下で生存率が明らかに増加した、ということを示す。

【 0 2 1 3 】

(温室実験)

植物を、土壌およびパーミキュライトの混合物 (2 : 1) が入った鉢に植えた。植物を、以前に (K a n h o n o u ら 2 0 0 1) 記載のように生育させた。5 0 m M N a C l に対して耐性のコントロール植物 (野生型植物および空のプラスミドで形質転換した植物) および B v C K A 2 を過剰発現する植物を、成熟した植物 / 植えた植物のパーセンテージとして決定した (表 5)。乾燥重量もまた、決定した (表 5)。データは、平均値 ± 標準偏差である。

【 0 2 1 4 】

【 表 5 】

表 5.

植物	コントロール培地		50 mM NaCl	
	成熟植物 / 植えた植物の %	シュートの乾燥重量 (m g / 植物)	成熟植物 / 植えた植物の %	シュートの乾燥重量 (m g / 植物)
コントロール W T	93±3	103±8	46±5	32±7
トランスジェニック コントロール	89±6	84±27	48±4	33±10
T B v C K A 2, 1	90±3	96±11	52±1.5	33±10
T B v C K A 2, 2	93±11	115±11	58±2	47±3
T B v C K A 2, 3	90±6	110±10	62±4	45±3

(実施例 1 1 : 光周期と関係なく開花を制御するための B v C K A 2 遺伝子の使用)

C K 2 は、開花時期を制御することに関する量的形質遺伝子座 (Q u a n t i t a t i v e t r a i t l o c i) (Q T L) として最近記載された (T a k a h a s h i ら 2 0 0 1)。特に C K 2 は、光周期感受性を制御することに関与するようである。

【 0 2 1 5 】

本発明者らは、実施例 1 0 に記載のトランスジェニック A r a b i d o p s i s 植物の開花時期が遅れることを観察した。栽培者は、光周期に関係なく開花プロセスを制御することに関心を持っているので、この表現型は、実用的用途を有する。開花時期の遅れまたは

早まりを、CK2の発現のレベルを制御することによって、または植物細胞中のCK2タンパク質の活性を調節することによって、またはこのタンパク質の変異体を用いることによって、調製する。

【0216】

(実施例12: BveIF-1Aの機能的特徴付け)

Saccharomyces cerevisiae 酵母JM26株(Kanthonouら2001)を空のプラスミドpYPGE15(BrunelliおよびPall1993)または76pYPGE15のどちらかで形質転換した。プラスミド76pYPGE15は、翻訳開始因子e-IF1Aをコードする*Beta vulgaris* cDNAを保有する。放射性フェニルアラニン(*phenylalanine*)の酵母タンパク質への取り込みを、記載された(Pascual Ahuirら2001)とおり液体培養において決定した。実験を、300mMのNaClの存在下(pYPGE15-300mM NaCl、76pYPGE15-300mM NaCl)または非存在下(pYPGE15、76pYPGE15)で行った。結果を、図9に示す。これらの結果は、NaClの非存在下では、BveIF-1Aを保有するトランスジェニック酵母が空のベクターで形質転換した細胞と比較して、少ないフェニルアラニンを取り込むことを明らかに示す。これに反して、酵母細胞は過酷な塩ストレス条件下に置かれたとき、BveIF-1Aで形質転換した酵母細胞中でより良好なタンパク質合成が起こることが明らかである。

10

【0217】

【表6】

20

表 6. 参考文献

- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., & Watson J.D. (1994) *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing Inc..
- Allschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389-3402.
- An G., Watson B.D., Stachel S., Gordon M.P., & Nester E.W. (1985) New cloning vehicles for transformation of higher plants. *EMBO J.* **4**, 277-284.
- Apse M.P. et al. (1999) Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in *Arabidopsis*. *Science* **285**, 1256-1258.
- Armstrong C.L., Petersen W.P., Buchholz W.G., Bowen B.A., & Sulo S.L. (1990) Factors affecting PEG-mediated stable transformation of maize protoplasts. *Plant Cell Reports* **9**, 335-339.
- Bañuelos et al. (1993) *Microbiology* **144**, 2749-2758.
- Baron M.H. & Baltimore D. (1982) Antibodies against the chemically synthesized genome-linked protein of poliovirus react with native virus-specific proteins. *Cell* **28**, 395-404.
- Bartel P.L. & Fields S. (1997) *The Yeast Two-Hybrid System*. Oxford University Press.
- Bechtold N. & Pelletier G. (1998) In planta *Agrobacterium*-mediated transformation of adult *Arabidopsis thaliana* plants by vacuum infiltration. *Methods Mol.Biol.* **82**, 259-268.
- Benaroudj et al. (2001) Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals. *J. Biol. Chem.* **276**(26), 924261-24267.
- Bidwal et al. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 10395-10404.
- Brunelli & Pall (1995) *Yeast* **9**, 1309-1318.
- Chen et al. (1993) *Plant Mol. Biol.* **22**, 491-506.
- Cho R.J., Mindrinos M., Richards D.R., Sapolsky R.J., Anderson M., Drankard E., Dewdney J., Reuber T.L., Stammers M., Federspiel N., Theologis A., Yang W.H., Hubbell E., Au M., Chung E.Y., Lashkari D., Lemieux B., Dean C., Lipshutz R.J., Ausubel F.M., Davis R.W., & Oefner P.J. (1999) Genome-wide mapping with biallelic markers in *Arabidopsis thaliana*. *Nat.Genet.* **23**, 203-207.
- Church & Gilbert (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 1991-1918.
- Christou P., McCabe D.E., & Swain W.F. (1988) Stable transformation of soybean callus by DNA-coated gold particles. *Plant Physiol.* **67**, 671-674.

10

20

30

表 6 の続き

- Crossway A., Oakes J.V., Irvine J.M., Ward B., Knauf V.C., & Shewmaker C.K. (1986) Integration of foreign DNA following microinjection of tobacco mesophyll protoplasts. *Mol.Gen.Genet.* **202**, 179-185.
- Davis et al. (1998) Basic methods in molecular biology. *Elsevier* p143.
- Dodds J.H. (1985) Plant genetic engineering. Cambridge University Press.
- Donald & Cashmore (1990) *EMBO J.* **9**, 1717-1726.
- Ellis J.G., Llewellyn D.J., Dennis E.S., & Peacock W.J. (1987) Maize Adh-1 promoter sequences control anaerobic regulation: addition of upstream promoter elements from constitutive genes is necessary for expression in tobacco. *EMBO J.* **6**, 11-16.
- Espunya et al. (1999) *Plant J.* **19**, 655-666.
- Fromm M., Taylor L.P., & Walbot V. (1985) Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **82**, 5824-5828.
- Garciadeblas et al. (1993) *Mol. Gen. Genet.* **236**, 363-368.
- Gaxiola R. et al. (1992) A novel and conserved salt-induced protein is an important determinant of salt tolerance in yeast. *EMBO J.* **11**, 3157-3164.
- Gietz et al. (1992) *Nucleic Acids Res.* **20**, 1425.
- Gil-Mascarell et al. (1999) *Plant J.* **17(4)**, 373-383.
- Glover C.V. (1998) *Prog. Nucleic acid research* **59**, 96-133.
- Grein et al. (1999) *Mol. Cell. Biochem.* **191**, 105-109.
- Hanahan D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J.Mol.Biol* **166**, 557-580.
- Hanks et al. (1995) *FASEB J.* **9**, 576-596.
- Hanna et al. (1995) *J. Biol. Chem.* **270(43)**, 25905-25914.
- Hansen G. & Chilton M.D. (1996) "Agrolistic" transformation of plant cells: integration of T-strands generated in planta. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**, 14978-14983.
- Hansen G., Shillito R.D., & Chilton M.D. (1997) T-strand integration in maize protoplasts after codelivery of a T-DNA substrate and virulence genes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**, 11726-11730.
- Hanson B., Engler D., Moy Y., Newman B., Ralston E., & Gutterson N. (1999) A simple method to enrich an *Agrobacterium*-transformed population for plants containing only T-DNA sequences. *Plant J.* **19**, 727-734.
- Harlow E. & Lane D. (1988) Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

10

20

30

表 6 の続き

- Hasegawa, P.M. et al. (2000a). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **51**, 463-499.
- Hasegawa et al. (2000b) *Trends Plant Sci.* **5**(8), 317-9.
- Haseloff J., Siemering K.R., Prasher D.C., & Hodge S. (1997) Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic Arabidopsis plants brightly. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**, 2122-2127.
- Hellens R.P., Edwards E.A., Leyland N.R., Bean S., & Mullineaux P.M. (2000) pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Plant Mol.Biol.* **42**, 819-832.
- Herrera-Estrella L., De Block M., Messens E.H.J.P., Van Montagu M., & Schell J. (1983a) Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells. *EMBO J.* **2**, 987-995.
- Herrera-Estrella L., Depicker A., Van Montagu M., & Schell J. (1983b) Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *Nature* **303**, 209-213.
- Hiei Y., Ohta S., Komari T., & Kumashiro T. (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by Agrobacterium and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J.* **6**, 271-282.
- Joung J.K., Ramm E.I., & Pabo C.O. (2000) A bacterial two-hybrid selection system for studying protein-DNA and protein-protein interactions. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**, 7382-7387.
- Kanhonou et al. (2001) *Plant Mol. Biol* **47**, 571-579.
- Kenney, M. S. Ray, and T. C. Boles. Mutation typing using electrophoresis and gel-immobilized Acrydite probes. *Biotechniques* **25** (3): 516-521, 1998.
- Krens F.A., Molendijk L., Willems G.J., & Schilperoort R.A. (1982) *In vitro* transformation of plant protoplasts with Ti-plasmid DNA. *Nature* **296**, 72-74.
- Langemeier J.L., Cook R.F., Issel C.J., & Montelaro R.C. (1994) Application of cycle dideoxy fingerprinting to screening heterogeneous populations of the equine infectious anemia virus. *Biotechniques* **17**, 484-6, 488, 490.
- Lee et al. (1999) *Plant Physiol.* **119**, 989-1000.
- Lerner R.A. (1982) Tapping the immunological repertoire to produce antibodies of predetermined specificity. *Nature* **299**, 593-596.
- Lerner R.A., Green N., Alexander H., Liu F.T., Sutcliffe J.G., & Shinnick T.M. (1981) Chemically synthesized peptides predicted from the nucleotide sequence of the

10

20

30

表 6 の続き

- hepatitis B virus genome elicit antibodies reactive with the native envelope protein of Dane particles. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **78**, 3403-3407.
- Liddle J.E. & Cryer A. (1991) A Practical Guide to Monoclonal Antibodies. Wiley New York.
- Li-Sucholeiki X.C., Khrapko K., Andre P.C., Marcellino L.A., Karger B.L., & Thilly W.G. (1999) Applications of constant denaturant capillary electrophoresis/high- fidelity polymerase chain reaction to human genetic analysis. *Electrophoresis* **20**, 1224-1232.
- Löffler J., Langui D., Probst A., & Huber G. (1994) Accumulation of a 50 kDa N-terminal fragment of beta-APP695 in Alzheimer's disease hippocampus and neocortex. *Neurochem.Int.* **24**, 281-288.
- Ludwig et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 5833-5837.
- Magyar Z., Meszaros T., Miskolci P., Deak M., Feher A., Brown S., Kondorosi E., Athanasiadis A., Pongor S., Bilgin M., Bako L., Koncz C., & Dudits D. (1997) Cell cycle phase specificity of putative cyclin-dependent kinase variants in synchronized alfalfa cells. *Plant Cell* **9**, 223-235.
- Marschner (1995) Mineral nutrition of higher plants. Springer, Berlin.
- Matthias K. et al. (1996) Salt stress induces an increased expression of V-type H+ATP-ase in mature sugar beet leaves. *Plant Mol. Biol.* **32**(3), 543-547.
- McCallum C.M., Comai L., Greene E.A., & Henikoff S. (2000a) Targeting induced local lesions IN genomes (TILLING) for plant functional genomics. *Plant Physiol* **123**, 439-442.
- McCallum C.M., Comai L., Greene E.A., & Henikoff S. (2000b) Targeted screening for induced mutations. *Nat.Biotechnol.* **18**, 455-457.
- Merrifield R.B. (1963) Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J.Amer.Chem.Soc.* **85**, 2149-2154.
- Mizoguchi et al. (1995) *FEBS Lett.* **358**, 199-204.
- Murakami T., Simonds W.F., & Spiegel A.M. (1992) Site-specific antibodies directed against G protein beta and gamma subunits: effects on alpha and beta gamma subunit interaction. *Biochemistry* **31**, 2905-2911.
- Nadal et al. (1999a) *Eur. J. Biochem* **189**, 251-257.
- Nadal et al. (1999b) *J. Bacteriol.* **181**, 6456-6462.
- Nieffind et al. (1998) *EMBO J.* **17**, 2451-2462.
- Padmanabha et al. (1990) *Mol. Cell. Biol.* **10**, 4089-4099.

10

20

30

表 6 の続き

- Palmgren G. (1997) Transgenic plants: environmentally safe factories of the future. *Trends Genet.* **13**, 348.
- Pascual Ahuir et al. (2001) *Mol. Cell. Biol.* **21**, 16-25.
- Paszkowski J., Shillito R.D., Saul M., Mandak V., & Hohn T.H.B.P.I. (1984) Direct gene transfer to plants. *EMBO J.* **3**, 2717-2722.
- Peralta E.G., Hellmiss R., & Ream W. (1986) Overdrive, a T-DNA transmission enhancer on the *A. tumefaciens* tumour-inducing plasmid. *EMBO J.* **5**, 1137-1142.
- Quintero et al. (1996) *Plant Cell* **8**, 529-537.
- Rogers and Bendich (1994) *Plant Mol. Biol. Manual* D1: 1-8.
- Ross P., Hall L., & Haff L.A. (2000) Quantitative approach to single-nucleotide polymorphism analysis using MALDI-TOF mass spectrometry [In Process Citation]. *Biotechniques* **29**, 620-629.
- Russel B. L. (1998) Osmotic stress induces expression of choline monooxygenase in sugar beet and amaranth. *Plant Physiology* **116** (2), 859-865.
- Sambrook J., Fritsch E.F., & Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Semler B.L., Anderson C.W., Hanecak R., Dorner L.F., & Wimmer E. (1982) A membrane-associated precursor to poliovirus VPg identified by immunoprecipitation with antibodies directed against a synthetic heptapeptide. *Cell* **28**, 405-412.
- Serrano (1996) The isolation of genes which upon overexpression increase salt tolerance. *Int. Rev. Cytol.* **165**, 1-52.
- Shi H. et al. (2000) The *Arabidopsis thaliana* gene *SOS1* encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. *Proc. Natl Acad Sci USA* **97**, 6896-68901.
- Shioda T., Andriole S., Yahata T., & Isselbacher K.J. (2000) A green fluorescent protein-reporter mammalian two-hybrid system with extrachromosomal maintenance of a prey expression plasmid: Application to interaction screening. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 5220-5224.
- Sugano et al. (1998) *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 12362-12366.
- Sugano et al. (1999) *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 11020-11025.
- Syvanen A. C. From gels to chips: "minisequencing" primer extension for analysis of point mutations and single nucleotide polymorphisms. *Hum. Mutat.* **13** (1):1-10, 1999.
- Tamura R.N., Cooper H.M., Collo G., & Quaranta V. (1991) Cell type-specific Integrin variants with alternative alpha chain cytoplasmic domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **88**, 10183-10187.

10

20

30

表 6 の続き

- Tapp, I. L. Malmberg, E. Rennel, M. Wik, and A. C. Syvanen. Homogeneous scoring of single-nucleotide polymorphisms: comparison of the 5'-nuclease TaqMan assay and Molecular Beacon probes. *Biotechniques* 28 (4):732-738, 2000.
- Takahashi et al. (2001) Hd6, a rice quantitative trait locus involved in photoperiod sensitivity, encodes the alpha subunit of protein kinase CK2. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 7922-7.
- Teney & Glover (1999) *Mol. Cell. Biochem.* 191, 161-167.
- Trleu A.T., Burleigh S.H., Kardalsky I.V., Maldonado-Mendoza I.E., Versaw W.K., Blaylock L.A., Shin H., Chiou T.J., Katagi H., Dewbre G.R., Weigel D., & Harrison M.J. (2000) Technical Advance: Transformation of *Medicago truncatula* via infiltration of seedlings or flowering plants with *Agrobacterium*. *Plant J.* 22, 531-541.
- van Haaren M.J., Sedee N.J., Schilperoort R.A., & Hooykaas P.J. (1987) Overdrive is a T-region transfer enhancer which stimulates T-strand production in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nucleic Acids Res.* 15, 8963-8997.
- Van Larebeke et al. (1974) *Nature* 252, 169-170.
- Vidal-Puig A. & Molier D.E. (1994) Comparative sensitivity of alternative single-strand conformation polymorphism (SSCP) methods. *Biotechniques* 17, 490-2, 494, 496.
- Wallis et al. (1989) *Cell* 58, 409-419.
- Wang K., Genetello C., Van Montagu M., & Zambryski P.C. (1987) Sequence context of the T-DNA border repeat element determines its relative activity during T-DNA transfer to plant cells. *Mol. Gen. Genet.* 210, 338-346.
- Woulfe J., Lafortune L., de Nadal F., Kitabgi P., & Beaudet A. (1994) Post-translational processing of the neurotensin/neuromedin N precursor in the central nervous system of the rat-II. Immunohistochemical localization of maturation products. *Neuroscience* 60, 167-181.
- Yoon K., Cole-Strauss A., & Kmiec E.B. (1996) Targeted gene correction of episomal DNA in mammalian cells mediated by a chimeric RNA/DNA oligonucleotide. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 93, 2071-2076.
- Zhu J.K., (1997) Molecular aspects of osmotic stress in plants. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 16, 253-277.

10

20

30

【図面の簡単な説明】

40

【図 1】

図 1 は、他の CK 2 の触媒サブユニットを有する、BvCKA2 のアミノ酸アライメントである。各々の CK 2 の登録番号および供給源は、以下の通りである：AtCKA2 (Arabidopsis thaliana, 登録番号 Q08466)、ZmCKA2 (Zea mays, 登録番号 P28523)、RnCKA1 (Rattus norvegicus 登録 P19139)、XICKA2 (Xenopus laevis, 登録 P28020) および ScCKA2 (Saccharomyces cerevisiae 登録番号 P19454)。同一であるアミノ酸に、影を付けている。囲まれた領域は、CKII において重要な保存された残基を示す。これらは、触媒部位、を形成するモチーフ 71 - DWG - 73 必須である 63 K、および高い塩基性である 69 - KKKKIKR

50

- 75 ドメインを含む。

【図 2】

図 2 は、B v C K A 2 遺伝子のサザンブロット分析を示す。ゲノム DNA を、B a m H I (B)、H i n d I I I (H) および E c o R I (E) で消化し、0.8% アガロースゲル上で分離した。次いで、その DNA を、ナイロン膜上に移し、UV 架橋した。ハイブリダイゼーションを、高ストリンジェンシー条件下で、2 つの放射標識されたプローブ (B v C K A 2 c D N A のコード領域に含まれる 887 b p のフラグメント (左のパネル)、および B v C K A 2 c D N A の 3' 非翻訳領域に相当する 323 b p のフラグメント (右のパネル)) を用いて行った (実施例 8 参照)。

【図 3】

図 3 は、B v C K A 2 が、酵母の二重変異体 c k a 1 c k a 2 を補完することを示す。カゼインキナーゼ温度感受性酵母株 Y D H 8 (c k a 1 c k a 2) を、プラスミド p Y P G E 1 5 - B v C K A 2 (4, 5, 6, 7) かまたは空のプラスミド (1, 2, 3) のいずれかで形質転換し、許容温度である 25 (左) でかまたは温度感受性温度である 37 (右) において増殖させた。

【図 4】

図 4 は、S c C K A 2 および B v C K A 2 の過剰発現によって、酵母における N a C l ストレスに対する耐性が増加されたことを示す。酵母変異株 J M 2 6 を、空のプラスミド (p Y P G E 1 5)、あるいは S c C K A 2 または B v C K A 2 をコードするインサートを含むプラスミドのいずれかで形質転換した。形質転換された細胞を、実施例 7 に記載されるように、塩耐性について試験した。示された時、プレートは、ロイシン、アデニンおよび 150 m M の N a C l を含む S D 培地を含んでいた。

【図 5】

図 5 は、B v C K A 2 遺伝子発現が、N a C l ストレスによって上方制御されることを示す。ノーザン分析を、実施例 8 に記載されるように行った。RNA を、3 週間齢テンサイの葉から、250 m M の N a C l を加えて (+) かまたは加えないで (-) 成長をした、0 時間後、3 時間後、6 時間後、8 時間後、および 24 時間後において、単離した。同じ RNA ブロットを、B v C K A 2 の 3' U T R フラグメントとハイブリダイズさせ、そしてフィルタートランスファーのコントロールとして使用した A r a b i d o p s i s 由来の 3 チュープリンプローブ (A t T U B A, 登録番号 M 1 7 1 8 9) でハイブリダイズした。ゲルローディングのコントロールは、臭化エチジウム染色を用いて行った。これは、r RNA の 3.5 K b のバンドで示される。

【図 6】

図 6 は、以下の配列を示す；配列番号 1 ~ 5：本発明の核酸の DNA 配列であり、開始コドンおよびおよび終止コドンには下線を付している。配列番号 6 ~ 10：本発明のポリペプチドのアミノ酸配列。

【図 7】

図 7 は、クローン 154 c D N A (B c C K A 2) を発現するトランスジェニック A r a b i d o p s i s の N a C l に対する耐性のインビトロ評価を示す。

培養培地：M S、N a C l 濃度：0 m M、100 m M、および 125 m M N a C l、調査された可変要素：本葉を持つ植物の % (A) および子葉を持つ植物の % (B)、本実験の繰り返しの数：6 ~ 8、濃度ごとの植物の数：150 ~ 200、統計分析：A N O V A、信頼度：99%。

【図 8】

図 8 は、100 m M N a C l を補充した M S 培地において成長した、A r a b i d o p s i s の実生の写真を示す。その実生は、形質転換されなかったか、または空のベクター p B I 121 で形質転換されたか、または B v C K A 2 をコードする 145 c D N A で形質転換されたものである。

【図 9】

図 9 は、B v e I F - 1 A でトランスフェクトされた植物のタンパク質中への、放射性フ

10

20

30

40

50

エニルアラニンの組み込みの定量化を示す。

【 図 4 】

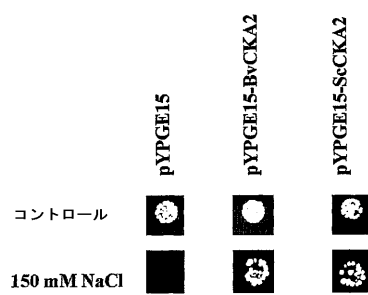


FIGURE 4

【 図 5 】

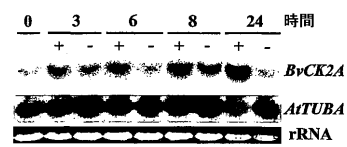


FIGURE 5

【 図 8 】

1 2 日間培養後の MS+100 mM NaCl

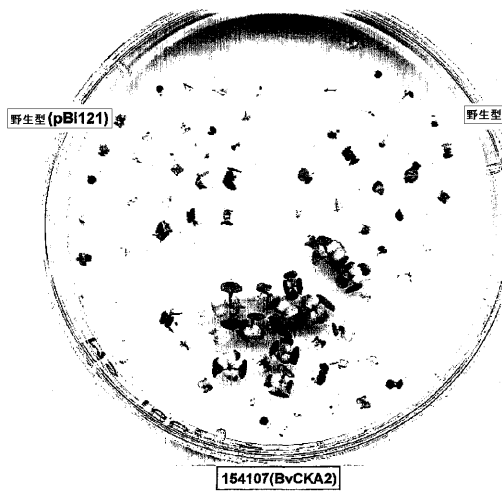


FIGURE 8

【 図 9 】

タンパク質中への放射性フェニルアラニンの組み込みの定量化

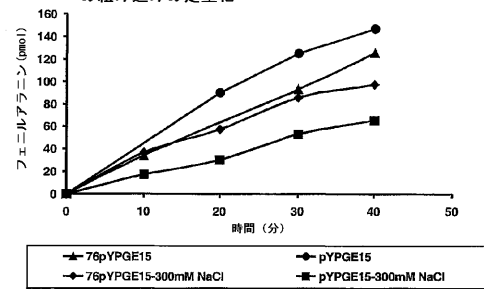


FIGURE 9

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
4 July 2002 (04.07.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/052012 A2

- (51) International Patent Classification: C12N 15/18
- (21) International Application Number: PCT/EP01/15093
- (22) International Filing Date:
20 December 2001 (20.12.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
00870319.1 22 December 2000 (22.12.2000) EP
60/271,656 26 February 2001 (26.02.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US):
CROPODESIGN N.V. [BE/BE]; Technologiepark 3,
B-9052 Zwijnaarde (BE).
- (72) Inventors: and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): KANHONOU,
Rodolphe, Arthur [BE/ES]; Albocacer, 16, 7, E-46020
Valencia (ES), SERRANO SALOM, Ramon [ES/ES];
Asturias, 22, 2, E-46023 Valencia (US), ROS PALAU,
Roque [US/US]; Sornells, 20, 13, E-46006 Valencia (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LZ, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, NZ, PH, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU,
ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MY, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent
(BI, BJ, CI, CG, CL, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NI, SN, TD, TG).
- Published:
— without international search report and to be republished
upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/052012 A2

(54) Title: SUGAR BEET GENES INVOLVED IN STRESS TOLERANCE

(57) Abstract: The present invention relates to isolated genes originating from *Beta vulgaris*, sugar beet, that are involved in responses to stress situations. The genes were isolated from a sugar beet cDNA library screened in a functional selection procedure with transformed yeast cells that were able to grow in selection medium with high salt concentrations. Subsequently these genes were sequenced and further characterized. One of the genes is a sugar beet casein kinase A β -subunit, one is a sugar beet dihydroorotase, one is a sugar beet translation initiation factor 1A and two others are of a unknown protein type. All of these isolated plant genes were functional as stress tolerance enhancers in yeast cells and are therefore useful to confer stress tolerance to an organism when transfected herein. More particularly, these genes can be used to render crops resistant to stress situations like osmotic stress caused by salt, drought, cold or frost.

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

1

SUGAR BEET GENES INVOLVED IN STRESS TOLERANCE**FIELD OF INVENTION**

- 5 The present invention relates to the field of plant molecular biology, more particularly to the use of sugar beet genes and proteins, able to confer a phenotype in eukaryotic cells or organisms of tolerance to stress situations for example mineral salt toxicity caused by ions such as Na⁺ or Li⁺.

BACKGROUND

- 10 Soil salinity is one of the most significant abiotic stresses for plant agriculture and therefore it would be useful to identify and isolate stress tolerance genes for the practical goal of genetically improving the salt tolerance of crop plants.
- Two other major abiotic stresses, drought and cold, are intimately linked with salt stress. Many genes that are regulated by salt stress are also responsive to drought or cold stress
- 15 (Zhu, 1997), therefore these genes are particularly interesting for genetically improving of stress tolerance.
- The molecular mechanisms by which plants respond to salt stress are starting to be elucidated (Hasegawa *et al.* 2000a). The sodium transporters at the vacuole and plasma membrane, identified as the products of the *Arabidopsis* *NHX1* (Gaxiola *et al.* 1992, Apse
- 20 *et al.* 1999) and *SOS1* (Shi *et al.* 2000) genes respectively, have been described as important determinants of salt tolerance.
- For the goal of genetically improving stress tolerance in plants it is important to use stress tolerance genes that when introduced can immediately confer stress tolerance. The action of these genes cannot be dependent on other pathway-related events or other
- 25 components that are necessary for the molecular mechanism of stress tolerance. One can identify important stress factors in the stressed organism, but the question remains whether these genes will also contribute in enhancing stress tolerance in a heterologous host when isolated and transfected herein.

30

Sugar beet (genes) and stress

- It is known that *Beta vulgaris* L. (*Chenopodaceae*, sugar beet), is rather a stress resistant plant when compared to other plants e. g. *Arabidopsis thaliana*. Sugar beets are relatively
- 35 spoken rather stress resistant to salt- and drought. The genes that are responsible for the ability of sugar beet to grow in more difficult conditions are started to be elucidated. A first indication that a gene under investigation might be involved in the induction of resistance, is the increase of its expression under stress conditions. As an example, Matthias *et al.*

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

2

(1996) showed that salt stress induces the increased expression of V-type H⁺ATPase in mature sugar beet leaves. Also betaine, an osmoprotectant, is accumulated by many beet plants in response to salinity and drought. Furthermore in sugar beet, the expression of Choline monooxygenase, which catalyzes the committing step in the synthesis of glycine betaine of sugar beet, is also induced by osmotic stress in *Chenopodaceae*. The mRNA levels in leaves increased 3- to 7- fold at 400mM salt and returned to uninduced levels (Russel, 1998). As mentioned above there are several alternative pathways to respond to stress situations and therefore many different genes are probably involved in stress responses.

10 SUMMARY OF THE INVENTION

In the present invention five novel genes were isolated from *Beta vulgaris* and were transformed to yeast cells. These genes all induced stress tolerance in the yeast cells, and encode for a casein kinase α subunit, referred to as BvCK2A, a dihydroorotase, referred to as BvDHO, a translation initiation factor 1A, referred to as Bvelf-1A, and for two other unknown proteins, further referred to as Bv120 and Bv20Li.

Unexpectedly, the inventors demonstrated that these sugar beet genes when transformed in yeast could render this heterologous organism tolerant to stress, Na⁺ stress in particular. The surprisingly strong phenotype of some of these yeast clones and the fact that these genes in an isolated position and in a heterologous background acted as stress tolerance enhancers, makes these genes very attractive tools to induce stress tolerance in any organism of interest, without the need for accessory compounds. The ability of these genes to enhance osmotic stress tolerance in yeast cells when isolated and transfected herein, clearly distinct them from other sugar beet genes that are known to play a role in (other) stress responses, but that were not used in an isolated form. One of these novel sugar beet genes of the present invention encodes a subunit of casein kinase. It was surprising to disclose for the first time a plant casein kinase subunit and more surprisingly an α catalytic subdomain of casein kinase exerting a function in salt stress response. Herein is described a cDNA clone (*BvCKA2*) encoding one of the catalytic α subunits of sugar beet protein kinase CK2 (formerly casein kinase II). *BvCKA2* increases the tolerance to NaCl of yeast. In addition, it is herein shown that expression of *BvCKA2* in sugar beet is induced by salt stress.

Also the identification of two other genes as a sugar beet dihydroorotase and a translation initiation factor 1A, respectively, was very surprising since, in the present state of the art of the plant-stress field, there is no evidence for the function of such proteins as stress tolerance inducers.

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

3

Furthermore it was surprising that two of the isolated genes encoded polypeptides for which no homologues could be found. Therefore these genes can be considered as a novel type of genes encoding a novel type of protein that confer to a heterologous organism tolerance to stress.

5 All these genes of the present invention are cloned in an expressible vector format and are able to contribute agronomically interesting features to a transgenic plant when transfected herein.

To identify novel plant genes involved in NaCl stress, the inventors adopted a strategy previously utilized with the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (Serrano, 1996). The

10 inventors constructed a cDNA library from salt-stressed sugar beet and screened it in a salt-sensitive yeast strain. The rationale for this screening of plant genes expressed in yeast cells is that some of the molecular mechanisms of yeast salt tolerance are thought to be similar to those of plant cells (Serrano, 1996, Hasegawa *et al.* 2000b). Sugar beet is a relatively halophytic crop plant (Marschner, 1995) which could be a better source of halotolerance genes than the model plant *Arabidopsis*.

15 Accordingly, the invention embodies five novel *Beta vulgaris* genes with nucleotide sequences as given in SEQ ID NOs 1 to 5, encoding five different polypeptides with amino acid sequences as given in SEQ ID NOs 6 to 10.

20 The present invention further relates to vectors, or host cells or organisms comprising at least part of the sequences as set forth in SEQ ID NOs 1 to 5.

Furthermore in another preferred embodiment of the invention, a method is provided for conferring stress tolerance to an organism of interest, preferably plants, yeast or bacteria, comprising the introduction of at least one of the five sugar beet genes in that organism.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

25 One of the problems underlying the present invention is to provide genes that can be used to enhance stress tolerance of organisms that suffer from stress conditions like osmotic stress, caused by salt or drought and/or stress conditions like cold, chilling and freezing stress or oxidative stress.

30 This invention offers solutions to the above-described problem and is disclosed in the following embodiments characterized in the claims.

A solution is achieved by providing a set of genes that are originating from *Beta vulgaris*, a stress tolerant crop plant, that were isolated and that confer to *Saccharomyces cerevisiae* tolerance to stress conditions, for instance genes that confer stress tolerance to the Na⁺-

35 sensitive yeast strain JM26. Additional to the fact that these genes are all from the same plant, they all showed a salt resistance phenotype when separately transformed to a salt sensitive yeast mutant. By doing so they all acted as a sole enhancer of stress tolerance.

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

4

Unexpectedly these genes encode proteins with very different putative functions like casein kinase α subunit, dihydroorotase, translation initiation factor 1A and some of them are even of an unknown type. Other features such as the very strong salt resistance phenotype that some of these genes showed in yeast and the fact that some of these

5 genes are frequently isolated in the selective screening procedure in yeast, contribute to the effectiveness and efficiency of these genes as stress tolerance enhancers. This set of genes enables the person skilled in the art to genetically alter the organism of interest in order to make it tolerant to stress situations. For the cultivation of crop plants for example, of which many are sensitive to stress conditions like salt, drought or cold, the disclosed

10 genes offer the possibility to solve the problem of reduced yield and reduced economic profit. Each gene of this set of genes enables the person skilled in the art to modify cell fate and/or plant development and/or plant morphology and/or biochemistry and/or physiology by introducing at least one of these genes into the cell.

Casein kinase, CK2 (formerly CKII), is a serine-threonine protein kinase, ubiquitous and highly conserved among eukaryotic organisms (Glover, 1998). It is composed of two

15 catalytic subunits (α or α') and of two regulatory subunits (β), which tetramerize to adopt an $\alpha_2\beta_2$ structure. Protein kinase CK2 localizes both in the nucleus and in the cytoplasmic compartment where it phosphorylates a variety of substrates involved in different cellular functions. In yeast, CK2 is essential and required for at least four biological processes:

20 flocculation, cell cycle progression, cell polarity and ion homeostasis. In plants, CK2 is proposed to be involved in the regulation of cell cycle (Espunya *et al.* 1999), in the light regulation of plant development (Lee *et al.* 1999) and in the circadian clock function (Sugano *et al.* 1998, Suggano *et al.* 1999). A link between the ectopic expression of plant casein kinase α subunit and stress in general has not been demonstrated previously.

25 Accordingly, the invention relates to a novel nucleic acid of sugar beet as set forth in SEQ ID No. 1, further referred to as clone 154, encoding a casein kinase α catalytic subunit, further referred to as BvCKA2 and capable of enhancing salt tolerance in salt sensitive yeast cells. The open reading frame, starting at nucleotide position 202 and ending at 1203 encodes the BvCKA2 amino acid sequences set forth in SEQ ID NO. 6.

30 Also the identification of one of the genes as a sugar beet dihydroorotase was very surprising since, in the present state of the art of the plant-stress field, there is no evidence for the function of such an enzyme as a stress tolerance inducer.

Accordingly, the invention relates to a novel nucleic acid of sugar beet as set forth in SEQ ID No. 2, further referred to as clone 35, encoding a dihydroorotase, further referred to as

35 BvDHO and capable of enhancing salt tolerance in salt sensitive yeast cells. The open

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

5

reading frame, starting at nucleotide position 199 and ending at 1236 encodes the BvDHO amino acid sequences set forth in SEQ ID NO.7.

Furthermore the isolation of a translation initiation factor 1A of sugar beet, that acts as a sole stress tolerance enhancer, was very surprising. Although it is known that cells
5 respond to stress by altering the phosphorylation of transcription factors in order to alter the translational capacity, this is the first time that one could demonstrate that a translation factor on its own could contribute in enhancing stress tolerance in an organism when transfected herein.

Accordingly, the invention relates to a novel nucleic acid of sugar beet as set forth in SEQ
10 ID No. 3, further referred to as clone 76, encoding a translation initiation factor 1A, further referred to as BvelF-1A capable of enhancing salt tolerance in salt sensitive yeast cells. The open reading frame, starting at nucleotide position 88 and ending at 521 encodes the BvelF-1A amino acid sequences set forth in SEQ ID NO. 8.

Two other nucleic acids encoded polypeptides with unknown function were found to confer stress tolerance in yeast.
15

Accordingly, the invention relates to a novel nucleic acid of sugar beet as set forth in SEQ ID No. 4, further referred to as clone 120, encoding a unknown protein, further referred to as Bv120, capable of enhancing salt tolerance in salt sensitive yeast cells. The open
20 reading frame, starting at nucleotide position 29 and ending at 499 encodes the Bv120 amino acid sequences set forth in SEQ ID NO. 9.

Furthermore, the invention relates to a novel nucleic acid of sugar beet as set forth in SEQ ID No. 5, further referred to as clone 20Li, encoding an unknown protein, further referred to as Bv20Li, capable of enhancing salt tolerance in salt sensitive yeast cells. The open
25 reading frame, starting at nucleotide position 1 and ending at 879 encodes the Bv20Li amino acid sequences set forth in SEQ ID NO. 10.

A first aspect of the present invention is the procedure of screening a cDNA library from NaCl-induced sugar beet leaves and subsequent isolation of the five sugar beet genes as mentioned above. A functional approach to identify sugar beet proteins that are involved in the response of plants to salt stress was followed. For this purpose a NaCl-induced cDNA
30 expression library was constructed from sugar beet leaves as described in example 1 and example 3 and the Na⁺-sensitive yeast mutant strain JM26 (see example 2) was used to screen for sugar beet cDNAs that increased the yeast salt tolerance upon overexpression. The growth of this yeast mutant is normally inhibited at NaCl concentrations (150 mM) similar to those impairing growth of most crop species. This screening procedure is
35 described in example 4. After transforming 100.000 individual cells with the plasmids pYPGE15 containing the cDNA inserts, colonies were pooled and selected for their ability

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

6

to grow in the presence of 150 mM NaCl (see example 4). Four of the positive clones, were named clone 154, clone 35, clone 76 and clone 120.

The yeast clones 154, clone 35, clone 76 and 120 had a clear salt tolerance phenotype and the phenotype was very reproducible: under 150 mM NaCl control yeast cells did not grow at all, and yeast cells overexpressing the insert 154, 35, 76 or 120 grew. Clones 35 and 76 were selected twice and three times respectively during the selection of salt tolerant yeast clones, suggesting the abundant presence of those clones in the salt stressed sugar beet leaves.

The same selective screening procedure was also performed to select Li⁺ tolerant yeast cells. After transformation of the sugar beet cDNA library, colonies were pooled and selected for their ability to grow in the presence of 20 mM LiCl without methionine as described in example 4. One of the positive clones was named 20Li. Clone 20Li showed a strong Li⁺ tolerance phenotype.

The definition of a strong phenotype is based on drop test experiments. Several dilutions of saturated cultures (1:10, 1:100, 1:1000) were made and these were grown on selective media (150 mM NaCl plus methionine or 20 mM LiCl without methionine). Strong phenotypes are those clones that grew well in all the dilutions assayed (e.g. clone 35, 76, 120 for NaCl and clone 20Li for LiCl). Clone 154 had not such a very strong phenotype in yeast because only the first dilution (1:10) was able to grow in selective medium. The control cells expressing the empty plasmid did not grow at all in the selective media.

Accordingly, a first embodiment of the present invention relates to a method for induction of stress tolerance in an organism comprising expression of at least one *Beta vulgaris* gene which confers stress tolerance to yeast cells.

In another embodiment, the invention relates to the use of a *Beta vulgaris* nucleic acid for enhancing stress tolerance in a plant comprising expression of said *Beta vulgaris* nucleic acid characterized in that it confers stress tolerance to yeast cells, for instance yeast cells derived from the Na⁺ sensitive yeast strain JM26.

In a further embodiment, the present invention is a method for induction of osmotic stress tolerance in an organism comprising expression of at least one *Beta vulgaris* gene which confers osmotic or oxidative stress tolerance, such as salt stress or drought stress or frost stress tolerance, to yeast cells.

The expression "induction of stress tolerance" as used herein has the same meaning as "enhancing stress tolerance" and therefore can be used interchangeable.

All the selected clones are hereunder described in more detail. To find possible homologues, the amino acid sequence of the (putative) ORFs were subjected to a homology search, performed with the BlastP 2.0.10 program (Altschul *et al.* 1997).

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

7

The cDNA insert of the plasmid present in clone 154 contains a 1527 base pair cDNA (SEQ ID No. 1) with an open reading frame of 999 base pairs encoding a polypeptide of 333 amino acids (SEQ ID NO. 6) with a predicted molecular weight of 39.4 kD. This polypeptide, named BvCKA2, has 91,6 % identity with one of the catalytic subunits (alpha chain 2) of the protein kinase CK2 from *Zea mays* (ZMCKA2). BvCKA2 contains the 11 typical subdomains of the eukaryotic protein kinases (Hanks *et al.* 1995) and all the conserved amino acid residues characteristic of CK2 catalytic subunits (Figure 1). The 170-DWG-172 present in the catalytic site is an invariant finger-printing pattern for CK2 alpha subunits (Niefind *et al.* 1998). Also present in BvCKA2 are the essential catalytic lysine 63-K and the highly basic region 69-KKKKIKR-75. The cDNA insert of the plasmid present in clone 35 contains a 1743 base pair cDNA (SEQ ID No. 2) with an open reading frame of 1035 base pairs encoding a polypeptide of 345 amino acids (SEQ ID NO. 7) with a predicted molecular weight of 40.8 kD. This polypeptide, named BvDHO, has 79 % identity with the precursor of the protein dihydroorotase from *Arabidopsis thaliana* and has 81% identity with the Dihydroorotase of potato (WO0118190, WO0114569). The cDNA insert of the plasmid present in clone 76 contains a 643 base pair cDNA (SEQ ID No. 3) with an open reading frame of 432 base pairs encoding a polypeptide of 144 amino acids (SEQ ID NO. 8) with a predicted molecular weight of 17 kD. This polypeptide, named BvelF-1A, has 88% identity with the precursor of the eukaryotic translation initiation factor 1A (eIF-1A or formerly known as eIF-4C) from *Onobrychis viciifolia* (common sainfoin). The cDNA insert of the plasmid present in clone 120 contains a 845 base pair cDNA (SEQ ID No. 4) with an open reading frame of 468 base pairs encoding a polypeptide of 156 amino acids (SEQ ID NO. 9), named Bv120, with a predicted molecular weight of 18.5 kD. The cDNA insert of the plasmid present in clone 20Li contains a 879 base pair cDNA (SEQ ID No. 5) with a putative open reading frame of 876 base pairs encoding a polypeptide of 292 amino acids (SEQ ID NO. 10) with a predicted molecular weight of 34.5 kD. This polypeptide, named Bv20Li, has 59% identity with a predicted protein from a genomic clone of *Arabidopsis thaliana*, for which no function has been described.

In a further embodiment the invention thus relates to the use of a *Beta vulgaris* nucleic acid for enhancing osmotic or oxidative stress tolerance in a plant wherein said *Beta vulgaris* nucleic acid is selected from one of the following:

- (a) a nucleic acid comprising a DNA sequence as given in any of SEQ ID NOs 1 to 5 or the complement thereof,
- (b) a nucleic acid comprising the RNA sequence corresponding to any of SEQ ID NOs 1 to 5 or the complement thereof,
- (c) a nucleic acid specifically hybridizing to the nucleic acid of (a) or (b) under high stringency conditions,

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

8

- (d) a nucleic acid encoding a protein with an amino acid sequence which is at least 93%, preferably at least 95%, 96%, 97%, 98% or 99% identical to the amino acid sequence as given in SEQ ID NO 6,
- 5 (e) a nucleic acid encoding a protein with an amino acid sequence which is at least 80%, preferably at least 82%, 85% or 90%, more preferably at least 95%, 98% or 99% identical to the amino acid sequence as given in SEQ ID NO 7,
- (f) a nucleic acid encoding a protein with an amino acid sequence which is at least 89%, preferably 90%, 92%, 95% or 96%, more preferably 97%, 98% or 99% identical to the amino acid sequence as given in SEQ ID NO 8,
- 10 (g) a nucleic acid encoding a protein with an amino acid sequence which is at least 75%, preferably 80%, 85% or 90%, more preferably 95%, 96%, 97%, 98% or 99% identical to the amino acid sequence as given in SEQ ID NO 9,
- (h) a nucleic acid encoding a protein with an amino acid sequence which is at least 65%, preferably 70%, 75%, 80%, 85% or 90%, more preferably 95%, 96%, 97%, 98% or 99% identical to the amino acid sequence as given in SEQ ID NO 10,
- 15 (i) a nucleic acid encoding a protein comprising the amino acid sequence as given in any of SEQ ID NOs 6 to 10,
- (j) a nucleic acid encoding an immunologically active and/or functional fragment of a protein encoded by a DNA sequence as given in any of SEQ ID NOs 1 to 5,
- 20 (k) a nucleic acid which is degenerated to a nucleic acid as given in any of SEQ ID NOs 1 to 5, or which is degenerated to a nucleic acid as defined in any of (a) to (j) as a result of the genetic code,
- (l) a nucleic acid which is diverging from a nucleic acid encoding a protein as given in any of SEQ ID NOs 6 to 10, or which is diverging from a nucleic acid as defined in any of (a) to (j) as a result of differences in codon usage between organisms,
- 25 (m) a nucleic acid which is diverging from a nucleic acid encoding a protein as given in any of SEQ ID NOs 6 to 10, or which is diverging from a nucleic acid as defined in any of (a) to (j) as a result of differences between alleles, and
- (n) a nucleic acid as defined in any one of (a) to (m) characterized in that said nucleic acid is DNA, cDNA, genomic DNA or synthetic DNA.
- 30

Furthermore, one of the embodiments of this invention is a method for enhancing stress tolerance in a plant or in plants comprising expression of at least one of the nucleic acids as described above in cells, tissues or parts of said plant or plants. Also for those plants that already express a nucleic acid according to the invention, another embodiment of the present invention is a method for altering stress tolerance in said plants comprising

35

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

9

altering the expression of a nucleic acid of the invention in cells, tissues or parts of said plants.

In an interesting embodiment the present invention relates to a method for induction of stress tolerance in an organism, for instance a plant, comprising the expression or altering
5 the expression of a nucleic acid encoding a casein kinase alpha subunit, for instance a plant casein kinase alpha subunit in cells, tissues or parts of said organism. More preferably the present invention relates to a method for induction of osmotic, salt, Na⁺ or Li⁺ stress tolerance to an organism, e.g. a plant, yeast or bacteria, comprising the expression of a plant casein kinase α subunit, such as a casein kinase α subunit of sugar
10 beet or a homologue or an orthologue thereof. In a preferred embodiment the present invention relates to a method for the induction of Na⁺ tolerance in a plant, such as rice, comprising the expression of a casein kinase α subunit of sugar beet.

In an interesting embodiment of the invention, said plant casein kinase α subunit is represented by SEQ ID Nos 1 and 6.

15 According to another embodiment the invention relates to the use of a casein kinase to control the flowering process of plants. The present inventors surprisingly found that overexpression of a casein kinase α subunit, such as the sugar beet casein kinase α subunit identified in the present invention has an effect on the flowering process, independent from the light.

20 The invention thus relates to a method for controlling the process of flowering of a plant comprising the expression or altering the expression of a nucleic acid encoding a casein kinase alpha subunit, such as represented by SEQ ID NO 6 in cells, tissues or parts of said plant.

The invention thus also relates to the use of a nucleic acid encoding a casein kinase alpha subunit, such as represented by SEQ ID NO 6 for controlling the process of flowering of a
25 plant.

Even so a preferred embodiment of the present invention relates to a method for enhancing stress tolerance in an organism, for instance in a plant, comprising the expression or altering the expression of a nucleic acid encoding a dihydroorotase in cells,
30 tissues or parts of said organism or said plant.

More preferably the present invention relates to a method for induction of osmotic, salt, Na⁺ or Li⁺ stress tolerance in an organism, e.g. a plant, yeast or bacteria, comprising the expression of a plant dihydroorotase, such as dihydroorotase of sugar beet or a homologue or an orthologue or a paralogue thereof. In a preferred embodiment, the
35 present invention relates to a method for the induction of Na⁺ tolerance to a plant, such as rice, comprising the expression of the dihydroorotase of sugar beet. In an interesting

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

10

embodiment of the invention, said dihydroorotase is represented by SEQ ID Nos 2 and 7. In another embodiment the present invention relates to a method for induction of stress tolerance in an organism, for instance in a plant, comprising the expression or altering the expression of a nucleic acid encoding a translation initiation factor 1A in cells, tissues or parts of said organism. More preferably the present invention relates to a method for induction of osmotic, salt, Na⁺ or Li⁺ stress tolerance in an organism, e.g. a plant, yeast or bacteria, comprising the expression of a plant translation initiation factor 1A, such as a translation initiation factor 1A of sugar beet or a homologue, an orthologue or a paralogue thereof. In a preferred embodiment of the present invention relates to a method for the induction of Na⁺ tolerance in a plant, such as rice, comprising the expression of a translation initiation factor 1A of sugar beet. In an interesting embodiment of the invention, said translation initiation factor 1A is represented by SEQ ID Nos 3 and 8.

In another embodiment the present invention relates to a method for enhancing stress tolerance in a plant comprising the expression of or altering the expression of a nucleic acid as represented by SEQ ID NO 4 or 5, or a homologue, an orthologue or a paralogue thereof.

The present invention also relates to an isolated nucleic acid encoding a protein or an immunologically active and/or functional fragment of such a protein selected from the group consisting of:

- (a) a nucleic acid comprising a DNA sequence as given in any of SEQ ID NOs 1 to 5 or the complement thereof,
- (b) a nucleic acid comprising the RNA sequences corresponding to any of SEQ ID NOs 1 to 5 or the complement thereof,
- (c) a nucleic acid specifically hybridizing to the nucleotide sequence as defined in (a) or (b) under high stringency conditions,
- (d) a nucleic acid encoding a protein with an amino acid sequence which is at least 93%, preferably at least 95%, 96%, 97%, 98% or 99% identical to the amino acid sequence as given in SEQ ID NO 6,
- (e) a nucleic acid encoding a protein with an amino acid sequence which is at least 80% preferably at least 82%, 85% 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% identical to the amino acid sequence as given in SEQ ID NO 7,
- (f) a nucleic acid encoding a protein with an amino acid sequence which is at least 89%, preferably at least 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% identical to the amino acid sequence as given in SEQ ID NO 8,

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

11

- (g) a nucleic acid encoding a protein with an amino acid sequence which is at least 75% preferably at least 78%, 80%, 85%, 87%, 89%, 91%, 93%, 96%, 95%, 97%, 98% or 99% identical to the amino acid sequence as given in SEQ ID NO 9,
- (h) a nucleic acid encoding at least part of a protein with an amino acid sequence which is at least 65 % preferably at least 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% identical to the amino acid sequence as given in SEQ ID NO 10,
- (i) a nucleic acid encoding a protein comprising the amino acid sequence as given in any of SEQ ID NOs 6-10,
- (j) a nucleic acid encoding an immunologically active and/or functional fragment of a protein encoded by a DNA sequence as given in any of SEQ ID NOs 1 to 5,
- (k) a nucleic acid which is degenerated to a nucleic acid as given in any of SEQ ID NOs 1 to 5, or which is degenerated to a nucleic acid as defined in any of (a) to (j) as a result of the genetic code,
- (l) a nucleic acid which is diverging from a nucleic acid encoding a protein as given in any of SEQ ID NOs 6 to 10, or which is diverging from a nucleic acid as defined in any of (a) to (j) as a result of differences in codon usage between organisms,
- (m) a nucleic acid which is diverging from a nucleic acid encoding a protein as given in any of SEQ ID NOs 6 to 10, or which is diverging from a nucleic acid as defined in any of (a) to (j) as a result of differences between alleles, and
- (n) a nucleic acid as defined in any one of (a) to (m) characterized in that said nucleic acid is DNA, cDNA, genomic DNA or synthetic DNA.

The clone 154 (SEQ ID NO 1) was chosen for further characterization because it has homologues in yeast. Many information is available about CK2 in yeast and other organisms e.g. mutants of the yeast CK2 subunits.

- In order to confirm the presence of *BvCKA2* in the sugar beet genome and to estimate the number of genes encoding the CK2 catalytic subunits in this plant species, the inventors performed a Southern blot analysis. As described in example 8 we first hybridized the genomic sugar beet genomic DNA using a fragment including the ORF of *BvCKA2* (Figure 2A). The presence of several hybridization fragments in all lanes independent of the restriction endonucleases used to digest the genomic DNA, suggest that *CKA2* is a member of a multicopy gene family in sugar beet. The hybridization probe we used may recognize all the members of the *CK2* family, including genes coding for different isoforms of the catalytic subunit. When a more specific probe was used for hybridization, only two bands in the *Bam* HI and *Hind* III digest, and one band in the *Eco* RI digest could be detected (Figure 2B). This may indicate the presence of two very closely related genes coding for CK2 catalytic subunits in sugar beet.

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

12

To confirm the functionality of the *BvCKA2* gene to confer stress tolerance to yeast, the complementation of the yeast *CK2* mutation was demonstrated (example 6).

In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *CK2* is essential for growth and there are two redundant genes, *CKA1* and *CKA2*, encoding two related catalytic subunits (Padmanabha *et al.* 1990). YDH8 is a *cka1/cka2* double mutant yeast strain that carries a plasmid with a thermosensitive *cka2* subunit (pDH8). To determine whether *BvCKA2* could suppress the thermosensitive phenotype of YDH8 strain, we transformed YDH8 cells with the plasmid pYPGE15+*BvCKA2*. While the YDH8 strain could only grow at the permissive temperature of 25°C, YDH8 overexpressing *BvCKA2* was able to grow at 25° and at 37°C (Figure 3).

10 *BvCKA2* could also complement other phenotypic characteristics of the *cka1,2* mutant strain such as flocculation (data not shown). Finally, when the pDH8 plasmid was removed and the cells only expressed *BvCKA2*, the plant enzyme could support yeast growth at 25° and 37°C (data not shown). These results clearly suggest that *BvCKA2* can functionally replace the yeast catalytic subunit of *CK2* and this may suggest that *CK2* is regulating related processes in both organisms

15 According to these aspects of the invention, that illustrate the cloning of the *BvCKA2* gene, the present invention refers to a nucleic acid molecule of at least 15 nucleotides in length specifically hybridizing with a nucleic acid of the invention.

20 In an a related preferred embodiment, the present invention also refers to nucleic acid molecule of at least 15 nucleotides in length specifically amplifying a nucleic acid of the invention.

Another preferred embodiment of the present invention is a vector comprising a nucleic acid sequence as defined above, such as an expression vector wherein the nucleic acid sequence is operably linked to one or more control sequences allowing the expression of said sequence in prokaryotic and/or eukaryotic host cells.

25 A further related embodiment of the present invention is a host cell containing a nucleic acid molecule as defined above or a vector as described above, such host cell for example being a bacterial, insect, fungal, plant or animal cell.

30 The functionality of the *BvCKA2* gene was also confirmed by the demonstration of growth of a Na⁺ sensitive yeast strain JM26 (example 2) in media with NaCl as described in example 7.

35 This yeast mutant, defective in the non-essential β regulatory subunit of *CK2*, displays a phenotype of hypersensitivity to Na⁺ and Li⁺ (Bidwai *et al.* 1995, Nadal *et al.* 1999b). Overexpression of both the sugar beet catalytic alpha 2 subunit (*BvCKA2*) as well as one of the yeast catalytic subunits (*ScCKA2*), that was cloned as described in example 5, increased the Na⁺ tolerance of the JM26 yeast cells (Figure 4). This indicates a specific

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

13

effect of CK2 on Na⁺ tolerance. The increased Na⁺ tolerance of yeast cells overexpressing *BvCKA2* could also be demonstrated in liquid cultures.

The above mentioned functional effects of overexpression of the sugar beet genes can possibly also be obtained by applying the isolated polypeptides produced by those genes or produced in a synthetic way.

Therefore, the present invention also relates to an isolated polypeptide encodable by a nucleic acid of the present invention as described above, or a homologue or a derivative thereof, or an immunologically active and/or functional fragment thereof, this polypeptide preferably having an amino acid sequence as given in any of SEQ ID NO 6-10, or a homologue or a derivative thereof, or an immunologically active and/or functional fragment thereof.

Also a related preferred embodiment of the present invention is a method for producing a polypeptide as mentioned above comprising culturing a host cell as mentioned above, under conditions allowing the expression of the polypeptide and recovering the produced polypeptide from the culture.

Also the functional effects that were seen upon expression of the sugar beet genes could be influenced by proteins that bind to the polypeptides produced by those genes. Therefore, in yet another preferred embodiment, the present invention relates to an antibody specifically recognizing a polypeptide as mentioned above or a specific epitope of said polypeptide.

In order to investigate whether the mechanism of salt tolerance conferred by *BvCKA2* was due to the regulation of ion homeostasis, the intracellular levels of Na⁺ and K⁺ in cells growing in the presence of these ions (Table 1) was determined as described in example 7. It was determined that expression of *BvCKA2* did not significantly change the Na⁺ and K⁺ content in yeast cells.

Table 1: Potassium and sodium content (mM) of JM26 cells overexpressing CKA2. Cells were grown overnight in the presence of 75 mM NaCl. Results are the mean of three independent experiments \pm SD.

	[K]	[Na]
PYPGE15	57 \pm 11	136 \pm 9
PYPGE15+BvCKA2	56 \pm 3	146 \pm 9

In yeast, it has been shown that mutants in the β regulatory subunit of the CK2 (*CKB1*) are highly sensitive to Na⁺ and Li⁺ (Bidwai *et al.* 1995, Nadal *et al.* 1999a). An aspect of the present invention is that overexpression of not only the yeast but also the plant CK2 α

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

14

catalytic subunit increases yeast tolerance to Na⁺. Since not only reduction of CK2 activity increases sensitivity to NaCl (*ckb1* yeast mutants) but also increase in CK2 activity improves salt tolerance, it is possible that CK2 is an important determinant of salt tolerance in yeast. However, the mechanism by which CK2 may regulate yeast salt tolerance is not known. Recently published data suggest that CK2 regulated the transcription of the ENA1 ATPase (Teney and Glover, 1999), the main determinant for Na⁺ efflux in yeast. One of the aspects of the invention teaches away from this, since it was demonstrated that the salt tolerance conferred by BvCKA2 is not related to the regulation of the Na⁺ homeostasis within the cells. Furthermore it was shown that overexpression of BvCKA2 improved the salt tolerance of the JM26 yeast mutant lacking the two major transport systems involved in the Na⁺ efflux (the ENA1-4 ATPase and the Na⁺/H⁺ antiporter NHA1). In addition, measurements of intracellular Na⁺ and K⁺ did not show any significant difference between controls and cells overexpressing CKA2 (Table 1). Yeast cells lacking the vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter NHX also showed improved growth in media with NaCl when they overexpressed CKA2 (data not shown) ruling out the possibility that CK2 alters the cytoplasmic levels of Na⁺ through vacuolar sequestration. According to this, Nadal *et al.* (1999b) showed that the salt sensitivity of the yeast *ckb1* mutant was not due to defects in the fluxes of sodium. These authors postulated that CK2 might reduce, by phosphorylation, the Na⁺ sensitivity of an important component of the cellular machinery that is salt sensitive. It is difficult to find such putative targets of salt toxicity since many substrates including transcription factors, protein kinases and topoisomerases have been found to possess putative CK2 phosphorylation sites (Grein *et al.* 1999).

In order to confirm that BvCKA2 participates in the response of sugar beet plants to salt stress the accumulation of BvCKA2 mRNA in response to various exposure times to NaCl was analyzed. RNA gel blot using a CKA2 specific probe showed only one band that corresponded to the size of the BvCKA2 cDNA (1.5 Kb). As shown in figure 5 the BvCKA2 mRNA accumulated with time upon NaCl treatment, and reached a maximum at 24 hours. The increase was about 3-fold as compared to control plants. It is interesting to note that the sugar beet cDNA library used to search for genes that are involved in stress tolerance was also obtained from plants treated for 24 hours with NaCl.

In order to confirm that Bvelf-1A participates in the response of yeast cells to salt stress the incorporation of phenylalanin in proteins was measured. The inventors observed that under salt stress conditions the incorporation of phenylalanin in yeast cells transformed with the cDNA encoding Bvelf-1A was much higher than in cells transformed with the empty vector (example 12). These results demonstrate that eIF-1a is directly involved in the response to stress tolerance. Furthermore these results show that overexpression of this cDNA (according to SEQ ID Nr. 3) can improve translation under salt stress condition.

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

15

These new findings are very interesting since this is the first evidence showing that a translation initiation factor improves stress tolerance.

The sugar beet genes of the present invention were shown to confer stress tolerance to a heterologous yeast when transfected herein.

5 Furthermore, the sugar beet genes of the present invention were shown to confer stress tolerance to a plant when transfected herein (see example 10).

A further and agronomically interesting application of these genes, is to transfect them into a crop plant in order to render this crop more tolerant to unfavourable growth conditions. Rice plants can be transfected with at least one of the sugar beet genes of the present invention (example 9), which can confer salt tolerance to the rice plants. This application offers a solution to the reduced yield of rice in heavily irrigated lands, caused by the deposition and accumulation of salts from the irrigation water in the soil.

10 According to the above mentioned aspects of the invention, documenting the effect of the sugar beet gene in a physiologic response to a stress situation *in planta*, the present invention also relates to a method for the production of transgenic plants, plant cells or plant tissues comprising the introduction of a nucleic acid molecule as defined above in an expressible format or a vector as defined above in said plant, plant cell or plant tissue.

15 Also within the scope of the present invention is a method for the production of altered plants, plant cells or plant tissues comprising the introduction of a polypeptide of the present invention directly into a cell, a tissue or an organ of said plant.

20 In a further embodiment the present invention relates to a method for enhancing stress tolerance in a plant cell, tissue or plant comprising the introduction of any nucleic acid as mentioned above into said plant cell, tissue or organ of said plant.

Furthermore, the present invention provides in a preferred embodiment for a method to effect the expression of a polypeptide as mentioned above comprising the introduction of a nucleic acid molecule of the present invention, optionally operably linked to one or more control sequences or a vector as defined above stably into the genome of a plant cell. Even so in a related embodiment, the invention provides for a method as described here above, further comprising regenerating a plant from said plant cell.

25 In a further embodiment, the invention here disclosed, relates to a transgenic plant cell comprising a nucleic acid sequence of the invention which is operably linked to regulatory elements allowing transcription and/or expression of said nucleic acid in plant cells or a transgenic plant cell obtainable by a method as described above. Furthermore, this transgenic plant cell can have said nucleic acid of the invention stably integrated into its genome. Also in the scope of the present invention is a transgenic plant or plant tissue comprising plant cells as described above, and furthermore this transgenic plant can display increased tolerance to stress, preferably osmotic stress such as salt, Na⁺, Li⁺,

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

16

drought, cold or freezing stress or oxidative stress, compared to the corresponding wild type plant. A related embodiment of the present invention is a harvestable part of such a plant which can be selected from the group consisting of seeds, leaves, fruits, stem cultures, rhizomes and bulbs or the progeny derived from any of the plants or plant parts as described above.

Because it was demonstrated that the sugar beet genes of the present invention are not functionally restricted to their homologous background, the scope of the present invention also refers to a method for altering stress tolerance in (a) organism(s) comprising the expression or altering the expression of a nucleic acid of the invention in cells, tissues or parts of said organism(s).

As known by the person skilled in the art, many genes involved in salt stress are also involved in responses to other stress situations. Accordingly, the present invention also relates to above mentioned methods for producing transgenic cells, plants or other organisms, wherein said stress can be osmotic stress, salt stress, drought stress, freezing stress or cold stress or oxidative stress.

In most practical applications of the present invention, the novel technology will be used to create a beneficial effect for the transformed organism. Therefore in a most preferred embodiment, the present invention relates to a method according to any of the methods as mentioned above, said method leading to an increase in yield and even so to a method wherein said expression of said nucleic acid occurs under the control of a promoter. Said promoter can be a constitutive or inducible promoter. In cases where cell-specific, tissue-specific or organ-specific expression of genes is envisaged, a cell-specific, tissue-specific or organ-specific promoter is used. An exhaustive but non-limiting list of examples of promoters that can be used in the methods of the invention is provided in Table 4.

As for yeast, many interacting partners for the plant CK2 have been postulated, including transcription factors, such as CCA1 involved in regulation of the circadian clock (Sugano *et al.* 1999), or GBF1 that regulates the expression of light inducible genes (Donald and Cashmore 1990). Interestingly, two protein kinases induced by salt stress, ATPK19 and ATPK6, also contain putative CK2 phosphorylation sites (Mizoguchi *et al.* 1995).

Accordingly, a preferred embodiment of the present invention is a method for identifying and obtaining proteins interacting with a polypeptide of the present invention comprising a screening assay wherein a polypeptide of the present invention is used. This method could for example comprise a two-hybrid screening assay wherein a polypeptide of the present invention as a bait and a cDNA library as prey are used.

Also a method for modulating the interaction between a polypeptide of the present invention and interacting protein partners obtainable by a method as described above is in the scope of the present invention. Furthermore, the present invention embodies a method

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

17

for identifying and obtaining compounds interacting with a polypeptide of the present invention comprising the steps of:

- (a) providing a two-hybrid system wherein a polypeptide of the present invention and an interacting protein partner obtainable by a method as described above are expressed,
- (b) interacting said compound with the complex formed by the expressed polypeptides as defined in a), and,
- (c) performing measurement of interaction of said compound with said polypeptide or the complex formed by the expressed polypeptides as defined in (a).

Even so, the present invention embodies a method for identifying compounds or mixtures of compounds which specifically bind to a polypeptide of the present invention, comprising:

- (a) combining a polypeptide of the present invention with said compound or mixtures of compounds under conditions suitable to allow complex formation, and,
- (b) detecting complex formation, wherein the presence of a complex identifies a compound or mixture of compounds which specifically binds said polypeptide.

Because these interaction partners of the polypeptide of the present invention can cooperate in the functionality of these polypeptides, the present invention also embodies the use of a compound or mixture of compounds identified by means of a method as described above as a factor that enhances stress tolerance in (a) organism(s).

Accordingly, the present invention embodies the use of a nucleic acid molecule of the invention as defined above, a vector of the invention, a polypeptide of the invention for increasing yield or for stimulating plant growth. In particular the present invention offers the opportunity to increase the yield of any harvestable part of a plant, such as root, leaf, seeds etc.

It is important for the agronomic success of a crop to be able to cope with stress situations. Therefore it could be useful to use the genes or the polypeptides of the present invention to screen important crops for the presence of stress tolerance genes. Accordingly the present invention relates to a diagnostic composition comprising at least a nucleic acid of the invention, a vector of the invention, a polypeptide of the invention or an antibody of the invention.

It is described that in normal plant growing conditions there is a typically low concentration of less than 1 mM Na⁺. Therefore the present invention offers the possibility to use a plant obtainable by the method as defined above or the plant of the invention for culturing on soil with a salt content of more than 1 mM ions. In most experiments it was shown that salt tolerant plants were able to grow on in conditions with about 40 mM to about 400 mM Na⁺.

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

18

DEFINITIONS AND ELABORATIONS TO THE EMBODIMENTS

- Those skilled in the art will be aware that the invention described herein is subject to variations and modifications other than those specifically described. It is to be understood that the invention described herein includes all such variations and modifications. The invention also includes all such steps, features, compositions and compounds referred to or indicated in this specification, individually or collectively, and any and all combinations of any or more of said steps or features.
- Throughout this specification, unless the context requires otherwise the word "comprise", and variations such as "comprises" and "comprising", will be understood to imply the inclusion of a stated integer or step or group of integers or steps but not the exclusion of any other integer or step or group of integers or steps.
- As used herein, the term "derived from" shall be taken to indicate that a particular integer or group of integers has originated from the species specified, but has not necessarily been obtained directly from the specified source.
- The terms "protein(s)", "peptide(s)" or "oligopeptide(s)", when used herein refer to amino acids in a polymeric form of any length. Said terms also include known amino acid modifications such as disulphide bond formation, cysteinylolation, oxidation, glutathionylation, methylation, acetylation, farnesylation, biotinylation, stearylation, formylation, lipic acid addition, phosphorylation, sulphation, ubiquitination, myristoylation, palmitoylation, geranylgeranylation, cyclization (e.g. pyroglutamic acid formation), oxidation, deamidation, dehydration, glycosylation (e.g. pentoses, hexosamines, N-acetylhexosamines, deoxyhexoses, hexoses, sialic acid etc.), acylation and radiolabels (e.g. ¹²⁵I, ¹³¹I, ³⁵S, ¹⁴C, ³²P, ³³P, ³H) as well as non-naturally occurring amino acid residues, L-amino acid residues and D-amino acid residues.
- "Homologues" or "Homologs" of a protein of the invention are those peptides, oligopeptides, polypeptides, proteins and enzymes which contain amino acid substitutions, deletions and/or additions relative to the said protein with respect to which they are a homologue without altering one or more of its functional properties, in particular without reducing the activity of the resulting product. For example, a homologue of said protein will consist of a bioactive amino acid sequence variant of said protein. To produce such homologues, amino acids present in the said protein can be replaced by other amino acids having similar properties, for example hydrophobicity, hydrophilicity, hydrophobic moment, antigenicity, propensity to form or break α -helical structures or β -sheet structures, and so on. An overview of physical and chemical properties of amino acids is given in Table 2.

Table 2: Properties of naturally occurring amino acids.

Charge properties / hydrophobicity	Side group	Amino Acid
nonpolar hydrophobic	aliphatic aliphatic, S-containing aromatic imino	ala, ile, leu, val met phe, trp pro
polar uncharged	aliphatic amide aromatic hydroxyl sulfhydryl	gly asn, gln tyr ser, thr cys
positively charged	basic	arg, his, lys
negatively charged	acidic	asp, gly

Two special forms of homology, orthologous and paralogous, are evolutionary concepts used to describe ancestral relationships of genes. The term "paralogous" relates to gene-duplications within the genome of a species leading to paralogous genes. The term "orthologous" relates to homologous genes in different organisms due to ancestral relationship. The present invention thus also relates to homologues, paralogues and orthologues of the genes and proteins of the invention. The paralogues or orthologues of the genes and proteins of the invention may have a lesser percentage of sequence identity with the sequences or proteins of the invention than the strictly interpreted "homologues" as defined earlier.

Substitutional variants of a protein of the invention are those in which at least one residue in said protein amino acid sequence has been removed and a different residue inserted in its place. Amino acid substitutions are typically of single residues, but may be clustered depending upon functional constraints placed upon the polypeptide; Insertions will usually be of the order of about 1-10 amino acid residues and deletions will range from about 1-20 residues. Preferably, amino acid substitutions will comprise conservative amino acid substitutions, such as those described *supra*.

Insertional amino acid sequence variants of a protein of the invention are those in which one or more amino acid residues are introduced into a predetermined site in said protein. Insertions can comprise amino-terminal and/or carboxy-terminal fusions as well as intra-sequence insertions of single or multiple amino acids. Generally, insertions within the amino acid sequence will be smaller than amino or carboxyl terminal fusions, of the order of about 1 to 10 residues. Examples of amino- or carboxy-terminal fusion proteins or peptides include the binding domain or activation domain of a transcriptional activator as used in the yeast two-hybrid system, phage coat proteins, (histidine)₆-tag, glutathione S-

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

20

transferase, protein A, maltose-binding protein, dihydrofolate reductase, Tag*100 epitope (EETARFQPGYRS), c-myc epitope (EQKLISEEDL), FLAG®-epitope (DYKDDDK), lacZ, CMP (calmodulin-binding peptide), HA epitope (YPYDVPDYA), protein C epitope (EDQVDPRLIDGK) and VSV epitope (YTDIEMNRLGK).

- 5 Deletional variants of a protein of the invention are characterised by the removal of one or more amino acids from the amino acid sequence of said protein.

Amino acid variants of a protein of the invention may readily be made using peptide synthetic techniques well known in the art, such as solid phase peptide synthesis and the like, or by recombinant DNA manipulations. The manipulation of DNA sequences to produce variant proteins, which manifest as substitutional, insertional or deletional variants are well known in the art. For example, techniques for making substitution mutations at predetermined sites in DNA having known sequence are well known to those skilled in the art, such as by M13 mutagenesis, T7-Gen in vitro mutagenesis kit (USB, Cleveland, OH), QuickChange Site Directed mutagenesis kit (Stratagene, San Diego, CA), PCR-mediated site-directed mutagenesis or other site-directed mutagenesis protocols. Another alternative to manipulate DNA sequences to produce variant proteins, which manifest as substitutional, insertional or deletional variants comprises targeted *in vivo* gene modification which can be achieved by chimeric RNA/DNA oligonucleotides as described by e.g. (Palmgren 1997; Yoon *et al.* 1996).

20 "Derivatives" of a protein of the invention are those peptides, oligopeptides, polypeptides, proteins and enzymes which may comprise additional naturally-occurring, altered glycosylated, acylated or non-naturally occurring amino acid residues compared to the amino acid sequence of a naturally-occurring form of said polypeptide. Alternatively or in addition, a derivative may comprise one or more non-amino acid substituents compared to the amino acid sequence of a naturally-occurring form of said polypeptide, for example a reporter molecule or other ligand, covalently or non-covalently bound to the amino acid sequence such as, for example, a reporter molecule which is bound thereto to facilitate its detection. A derivative of a protein retains the biological or enzymatic activity of the protein where it is derived from.

30 With "immunologically active" is meant that a molecule or specific fragments thereof such as epitopes or haptens are recognised by, i.e. bind to antibodies.

In the context of the current invention are also included homologous, derivatives and/or immunologically active fragments of any of the inventive sugar beet polypeptides or homologue, derivative or fragment thereof as defined *supra*.

35 "Antibodies" include monoclonal, polyclonal, synthetic or heavy chain camel antibodies as well as fragments of antibodies such as Fab, Fv or scFv fragments. Monoclonal antibodies can be prepared by the techniques as described previously e.g. (Liddle & Cryer 1991)

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

21

which comprise the fusion of mouse myeloma cells to spleen cells derived from immunised animals. Furthermore, antibodies or fragments thereof to a molecule or fragments thereof can be obtained by using methods as described in e.g. (Harlow & Lane 1988). In the case of antibodies directed against small peptides such as fragments of a protein of the invention, said peptides are generally coupled to a carrier protein before immunisation of animals. Such protein carriers include keyhole limpet hemocyanin (KLH), bovine serum albumin (BSA), ovalbumin and Tetanus toxoid. The carrier protein enhances the immune response of the animal and provides epitopes for T-cell receptor binding sites. The term "antibodies" furthermore includes derivatives thereof such as labelled antibodies.

Antibody labels include alkaline phosphatase, PKH2, PKH26, PKH67, fluorescein (FITC), Hoechst 33258, R-phycoerythrin (PE), rhodamine (TRITC), Quantum Red, Texas Red, Cy3, biotin, agarose, peroxidase, gold spheres and radiolabels (e.g. ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S , ^{14}C , ^{32}P , ^3H). Tools in molecular biology relying on antibodies against a protein include protein gel blot analysis, screening of expression libraries allowing gene identification, protein quantitative methods including ELISA and RIA, immunoaffinity purification of proteins, immunoprecipitation of proteins e.g. (Magyar *et al.* 1997) and immunolocalization. Other uses of antibodies and especially of peptide antibodies include the study of proteolytic processing (Löffler *et al.* 1994; Woulfe *et al.* 1994), determination of protein active sites (Lerner 1982), the study of precursor and post-translational processing (Baron & Baltimore 1982; Lerner *et al.* 1981; Semler *et al.* 1982), identification of protein domains involved in protein-protein interactions (Murakami *et al.* 1992) and the study of exon usage in gene expression (Tamura *et al.* 1991).

In the scope of the current invention are also antibodies recognising the inventive sugar beet polypeptides, derivative or fragment thereof as defined *supra*.

The terms "gene(s)", "polynucleotide(s)", "nucleic acid sequence(s)", "nucleotide sequence(s)", "DNA sequence(s)" or "nucleic acid molecule(s)", when used herein refer to nucleotides, either ribonucleotides or deoxyribonucleotides or a combination of both, in a polymeric form of any length. Said terms furthermore include double-stranded and single-stranded DNA and RNA. Said terms also include known nucleotide modifications such as methylation, cyclization and 'caps' and substitution of one or more of the naturally occurring nucleotides with an analogue such as inosine. Modifications of nucleotides include the addition of acridine, amine, biotin, cascade blue, cholesterol, Cy3[®], Cy5[®], Cy5.5[®] Dabcyl, digoxigenin, dinitrophenyl, Edans, 6-FAM, fluorescein, 3'-glyceryl, HEX, IRD-700, IRD-800, JOE, phosphate psoralen, rhodamine, ROX, thiol (SH), spacers, TAMRA, TET, AMCA-S[®], SE, BODIPY[®], Marina Blue[®], Pacific Blue[®], Oregon Green[®], Rhodamine Green[®], Rhodamine Red[®], Rhodol Green[®] and Texas Red[®]. Polynucleotide backbone modifications include methylphosphonate, 2'-OMe-methylphosphonate RNA,

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

22

phosphorothiorate, RNA, 2'-OMeRNA. Base modifications include 2-amino-dA, 2-aminopurine, 3'-(ddA), 3'dA(cordycepin), 7-deaza-dA, 8-Br-dA, 8-oxo-dA, N⁶-Me-dA, abasic site (dSpacer), biotin dT, 2'-OMe-5Me-C, 2'-OMe-propynyl-C, 3'-(5-Me-dC), 3'-(ddC), 5-Br-dC, 5-I-dC, 5-Me-dC, 5-F-dC, carboxy-dT, convertible dA, convertible dC, convertible dG, convertible dT, convertible dU, 7-deaza-dG, 8-Br-dG, 8-oxo-dG, O⁶-Me-dG, S⁶-DNP-dG, 4-methyl-indole, 5-nitroindole, 2'-OMe-inosine, 2'-dl, O⁶-phenyl-dl, 4-methyl-indole, 2'-deoxynebularine, 5-nitroindole, 2-aminopurine, dP(purine analogue), dK(pyrimidine analogue), 3-nitropyrrole, 2-thio-dT, 4-thio-dT, biotin-dT, carboxy-dT, O⁴-Me-dT, O⁴-triazol dT, 2'-OMe-propynyl-U, 5-Br-dU, 2'-dU, 5-F-dU, 5-I-dU, O⁴-triazol dU and radiolabels (e.g. ¹²⁵I, ¹³¹I, ³⁵S, ¹⁴C, ³²P, ³³P, ³H). Said terms also encompass peptide nucleic acids (PNAs), a DNA analogue in which the backbone is a pseudopeptide consisting of N-(2-aminoethyl)-glycine units rather than a sugar. PNAs mimic the behaviour of DNA and bind complementary nucleic acid strands. The neutral backbone of PNA results in stronger binding and greater specificity than normally achieved. In addition, the unique chemical, physical and biological properties of PNA have been exploited to produce powerful biomolecular tools, antisense and antigene agents, molecular probes and biosensors. With "recombinant DNA molecule" or "chimeric gene" is meant a hybrid DNA produced by joining pieces of DNA from different sources. With "heterologous nucleotide sequence" is intended a sequence that is not naturally occurring with the promoter sequence. While this nucleotide sequence is heterologous to the promoter sequence, it may be homologous, or native, or heterologous, or foreign, to the plant host. "Sense strand" refers to the strand of a double-stranded DNA molecule that is homologous to a mRNA transcript thereof. The "anti-sense strand" contains an inverted sequence, which is complementary to that of the "sense strand".

A "coding sequence" or "open reading frame" or "ORF" is defined as a nucleotide sequence that can be transcribed into mRNA and/or translated into a polypeptide when placed under the control of appropriate regulatory sequences, i.e. when said coding sequence or ORF is present in an expressible format. Said coding sequence or ORF is bounded by a 5' translation start codon and a 3' translation stop codon. A coding sequence or ORF can include, but is not limited to RNA, mRNA, cDNA, recombinant nucleotide sequences, synthetically manufactured nucleotide sequences or genomic DNA. Said coding sequence or ORF can be interrupted by intervening nucleic acid sequences. Genes and coding sequences essentially encoding the same protein but isolated from different sources can consist of substantially divergent nucleic acid sequences. Reciprocally, substantially divergent nucleic acid sequences can be designed to effect expression of essentially the same protein. Said nucleic acid sequences are the result of e.g. the existence of different alleles of a given gene, or of the degeneracy of the genetic

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

23

code or of differences in codon usage. Thus, as indicated in Table 3, amino acids such as methionine and tryptophan are encoded by a single codon whereas other amino acids such as arginine, leucine and serine can each be translated from up to six different codons. Differences in preferred codon usage are illustrated below for *Agrobacterium tumefaciens* (a bacterium), *Arabidopsis thaliana*, *M. sativa* (two dicotyledonous plants) and *Oryza sativa* (a monocotyledonous plant). These examples were extracted from (<http://www.kazusa.or.jp/codon>). To give one example, the codon GGC (for glycine) is the most frequently used codon in *Agrobacterium tumefaciens* (36.2 %), is the second most frequently used codon in *Oryza sativa* but is used at much lower frequencies in *Arabidopsis thaliana* and *M. sativa* (9 % and 8.4 %, respectively). Of the four possible codons encoding glycine (see Table 3), said GGC codon is most preferably used in *Agrobacterium tumefaciens* and *Oryza sativa*. However, in *Arabidopsis thaliana* this is the GGA (and GGU) codon whereas in *M. sativa* this is the GGU (and GGA) codon. Allelic variants are further defined as to comprise single nucleotide polymorphisms (SNPs) as well as small insertion/deletion polymorphisms (INDELs; the size of INDELs is usually less than 100 bp). SNPs and INDELs form the largest set of sequence variants in naturally occurring polymorphic strains of most organisms. They are helpful in mapping genes and discovery of genes and gene functions. They are furthermore helpful in identification of genetic loci, e.g. plant genes, involved in determining processes such as growth rate, plant size and plant yield, plant vigor, disease resistance, stress tolerance etc.

Table 3. Degeneracy of the genetic code.

Amino Acid	Three-letter code	One-letter code	Possible codons						
Alanine	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCU			
Arginine	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU	
Asparagine	Asn	N	AAC	AAU					
Aspartic Acid	Asp	D	GAC	GAU					
Cysteine	Cys	C	UGC	UGU					
Glutamic Acid	Glu	E	GAA	GAG					
Glutamine	Gln	Q	CAA	CAG					
Glycine	Gly	G	GGA	GGC	GGG	GGU			
Histidine	His	H	CAC	CAU					
Isoleucine	Ile	I	AUA	AUC	AUU				
Leucine	Leu	L	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU	
Lysine	Lys	K	AAA	AAG					
Methionine	Met	M	AUG						
Phenylalanine	Phe	F	UUC	UUU					
Proline	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCU			
Serine	Ser	S	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU	
Threonine	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACU			
Tryptophan	Trp	W	UGG						
Tyrosine	Tyr	Y	UAC	UAU					
Valine	Val	V	GUA	GUC	GUG	GUU			
Possible "STOP" codons									
UAA	UAG	UGA							

- 5 Many techniques are nowadays available to identify SNPs and/or INDELs including (i) PCR followed by denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC; e.g. Cho *et al.* 1999); (ii) constant denaturant capillary electrophoresis (CDCE) combined with high-fidelity PCR (e.g. Li-Sucholeiki *et al.* 1999); (iii) denaturing gradient gel electrophoresis (e.g. Fischer and Lerman 1983); (iv) matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS; e.g. Ross *et al.* 2000); (v) real-time fluorescence monitoring PCR assays (e.g. Tapp *et al.* 2000); (vi) AcryditeTM gel technology (e.g. Kenney *et al.* 1998); (vii) cycle dideoxy fingerprinting (CddF; e.g. Langemeier *et al.* 1994); (viii) single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis
- 10

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

25

(e.g. Vidal-Puig and Moller 1994) and (ix) mini-sequencing primer extension reaction (e.g. Syvanen 1999). The technique of 'Targeting Induced Local Lesions in Genomes' (TILLING; McCallum *et al.* 2000a,b), which is a variant of (i) *supra*, can also be applied to rapidly identify an altered gene in e.g. chemically mutagenized plant individuals showing

5 interesting phenotypes.

"Hybridisation" is the process wherein substantially homologous complementary nucleotide sequences anneal to each other. The hybridisation process can occur entirely in solution, i.e. both complementary nucleic acids are in solution. Tools in molecular biology relying on such a process include the polymerase chain reaction (PCR; and all

10 methods based thereon), subtractive hybridisation, random primer extension, nuclease S1 mapping, primer extension, reverse transcription, cDNA synthesis, differential display of RNAs, and DNA sequence determination. The hybridisation process can also occur with one of the complementary nucleic acids immobilised to a matrix such as magnetic beads, Sepharose beads or any other resin. Tools in molecular biology relying on such a process

15 include the isolation of poly (A+) mRNA. The hybridisation process can furthermore occur with one of the complementary nucleic acids immobilised to a solid support such as a nitro-cellulose or nylon membrane or immobilised by e.g. photolithography to e.g. a siliceous glass support (the latter known as nucleic acid arrays or microarrays or as nucleic acid chips). Tools in molecular biology relying on such a process include RNA and

20 DNA gel blot analysis, colony hybridisation, plaque hybridisation, in situ hybridisation and microarray hybridisation. In order to allow hybridisation to occur, the nucleic acid molecules are generally thermally or chemically denatured to melt a double strand into two single strands and/or to remove hairpins or other secondary structures from single stranded nucleic acids. The stringency of hybridisation is influenced by conditions such as

25 temperature, salt concentration and hybridisation buffer composition. High stringency conditions for hybridisation include high temperature and/or low salt concentration (salts include NaCl and Na₃-citrate) and/or the inclusion of formamide in the hybridisation buffer and/or lowering the concentration of compounds such as SDS (detergent) in the hybridisation buffer and/or exclusion of compounds such as dextran sulphate or

30 polyethylene glycol (promoting molecular crowding) from the hybridisation buffer. Conventional hybridisation conditions are described e.g. (Sambrook *et al.* 1989) but the skilled craftsman will appreciate that numerous different hybridisation conditions can be designed in function of the known or the expected homology and/or length of the nucleic acid sequence. With specifically hybridising is meant hybridising under stringent

35 conditions. Sufficiently low stringency hybridisation conditions are particularly preferred to isolate nucleic acids heterologous to the DNA sequences of the invention defined *supra*.

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

26

Elements contributing to said heterology include allelism, degeneration of the genetic code and differences in preferred codon usage as discussed *supra*.

Accordingly, the current invention is also related to the use of the inventive DNA sequences encoding the inventive sugar beet polypeptides, homologue, derivative and/or immunologically fragment thereof as defined higher in any method of hybridisation. The current invention furthermore also relates to DNA sequences hybridising to said inventive DNA sequences.

DNA sequences as defined in the current invention can be interrupted by intervening sequences. With "intervening sequences" is meant any nucleic acid sequence which disrupts a coding sequence comprising said inventive DNA sequence or which disrupts the expressible format of a DNA sequence comprising said inventive DNA sequence. Removal of the intervening sequence restores said coding sequence or said expressible format. Examples of intervening sequences include introns, mobilizable DNA sequences such as transposons and DNA tags such as e.g. a T-DNA. With "mobilizable DNA sequence" is meant any DNA sequence that can be mobilised as the result of a recombination event.

To effect expression of a protein in a cell, tissue or organ, preferably of plant origin, either the protein may be introduced directly to said cell, such as by microinjection or ballistic means or alternatively, an isolated nucleic acid molecule encoding said protein may be introduced into said cell, tissue or organ in an expressible format.

Preferably, the DNA sequence of the invention comprises a coding sequence or open reading frame (ORF) encoding the inventive sugar beet polypeptides or a homologue or derivative thereof or an immunologically active thereof as defined *supra*.

With "vector" or "vector sequence" is meant a DNA sequence, which can be introduced in an organism by transformation and can be stably maintained in said organism. Vector maintenance is possible in e.g. cultures of *Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Saccharomyces cerevisiae* or *Schizosaccharomyces pombe*. Other vectors such as phagemids and cosmid vectors can be maintained and multiplied in bacteria and/or viruses. Vector sequences generally comprise a set of unique sites recognised by restriction enzymes, the multiple cloning site (MCS), wherein one or more non-vector sequence(s) can be inserted.

With "non-vector sequence" is accordingly meant a DNA sequence which is integrated in one or more of the sites of the MCS comprised within a vector.

"Expression vectors" form a subset of vectors which, by virtue of comprising the appropriate regulatory sequences enabling the creation of an expressible format for the inserted non-vector sequence(s), thus allowing expression of the protein encoded by said non-vector sequence(s). Expression vectors are known in the art enabling protein- (gene-)

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

27

expression in organisms including bacteria (e.g. *Escherichia coli*), fungi (e.g. *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia pastoris*), insect cells (e.g. baculoviral expression vectors), animal cells (e.g. COS or CHO cells) and plant cells (e.g. potato virus X-based expression vectors, see e.g. Vance *et al.* 1998 - WO9844097).

- 5 The current invention clearly includes any vector or expression vector comprising a non-vector DNA sequence encoding the inventive sugar beet polypeptides, homologue, derivative and/or immunologically active fragment thereof as defined *supra*.
- As an alternative to (expression) vector-mediated protein production in biological systems, chemical protein synthesis can be applied. Synthetic peptides can be manufactured in
- 10 solution phase or in solid phase. Solid phase peptide synthesis (Merrifield, 1963) is, however, the most common way and involves the sequential addition of amino acids to create a linear peptide chain. Solid phase peptide synthesis includes cycles consisting of three steps: (i) immobilisation of the carboxy-terminal amino acid of the growing peptide chain to a solid support or resin; (ii) chain assembly, a process consisting of activation,
- 15 coupling and deprotection of the amino acid to be added to the growing peptide chain; and (iii) cleavage involving removal of the completed peptide chain from the resin and removal of the protecting groups from the amino acid side chains. Common approaches in solid phase peptide synthesis include Fmoc/tBu (9-fluorenylmethyloxycarbonyl/t-butyl) and Boc (t-butyloxycarbonyl) as the amino-terminal protecting groups of amino acids. Amino acid
- 20 side chain protecting groups include methyl (Me), formyl (CHO), ethyl (Et), acetyl (Ac), t-butyl (t-Bu), anisyl, benzyl (Bzl), trifluoroacetyl (Tfa), N-hydroxysuccinimide (ONSu, OSu), benzoyl (Bz), 4-methylbenzyl (Meb), thioanisyl, thiocresyl, benzyloxymethyl (Bom), 4-nitrophenyl (ONp), benzyloxycarbonyl (Z), 2-nitrobenzoyl (NBz), 2-nitrophenylsulphenyl (Nps), 4-toluenesulphonyl (Tosyl, Tos), pentafluorophenyl (Pfp), diphenylmethyl (Dpm), 2-chlorobenzyloxycarbonyl (Cl-Z), 2,4,5-trichlorophenyl, 2-bromobenzyloxycarbonyl (Br-Z),
- 25 triphenylmethyl (Trityl, Trt), and 2,5,7,8-pentamethyl-chroman-6-sulphonyl (Pmc). During chain assembly, Fmoc or Boc are removed resulting in an activated amino-terminus of the amino acid residue bound to the growing chain. The carboxy-terminus of the incoming amino acid is activated by conversion into a highly reactive ester, e.g. by HBTU. With
- 30 current technologies (e.g. PerSeptive Biosystems 9050 synthesizer, Applied Biosystems Model 431A Peptide Synthesizer), linear peptides of up to 50 residues can be manufactured. A number of guidelines is available to produce peptides that are suitable for use in biological systems including (i) limiting the use of difficult amino acids such as cys, met, trp (easily oxidised and/or degraded during peptide synthesis) or arg; (ii)
- 35 minimize hydrophobic amino acids (can impair peptide solubility); and (iii) prevent an amino-terminal glutamic acid (can cyclize to pyroglutamate).

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

28

By "expressible format" is meant that the isolated nucleic acid molecule is in a form suitable for being transcribed into mRNA and/or translated to produce a protein, either constitutively or following induction by an intracellular or extracellular signal, such as an environmental stimulus or stress (mitogens, anoxia, hypoxia, temperature, salt, light, dehydration, etc) or a chemical compound such as IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) or such as an antibiotic (tetracycline, ampicillin, rifampicin, kanamycin), hormone (e.g. gibberellin, auxin, cytokinin, glucocorticoid, brassinosteroid, ethylene, abscisic acid etc), hormone analogue (iodoacetic acid (IAA), 2,4-D, etc), metal (zinc, copper, iron, etc), or dexamethasone, amongst others. As will be known to those skilled in the art, expression of a functional protein may also require one or more post-translational modifications, such as glycosylation, phosphorylation, dephosphorylation, or one or more protein-protein interactions, amongst others. All such processes are included within the scope of the term "expressible format".

Preferably, expression of a protein in a specific cell, tissue, or organ, preferably of plant origin, is effected by introducing and expressing an isolated nucleic acid molecule encoding said protein, such as a cDNA molecule, genomic gene, synthetic oligonucleotide molecule, mRNA molecule or open reading frame, to said cell, tissue or organ, wherein said nucleic acid molecule is placed operably in connection with suitable regulatory sequences including a promoter, preferably a plant-expressible promoter, and a terminator sequence.

"Regulatory sequence" refers to control DNA sequences, which are necessary to affect the expression of coding sequences to which they are ligated. The nature of such control sequences differs depending upon the host organism. In prokaryotes, control sequences generally include promoters, ribosomal binding sites, and terminators. In eukaryotes generally control sequences include promoters, terminators and enhancers or silencers. The term "control sequence" is intended to include, at a minimum, all components the presence of which are necessary for expression, and may also include additional advantageous components which determines when, how much and where a specific gene is expressed.

Reference herein to a "promoter" is to be taken in its broadest context and includes the transcriptional regulatory sequences derived from a classical eukaryotic genomic gene, including the TATA box which is required for accurate transcription initiation, with or without a CCAAT box sequence and additional regulatory elements (i.e. upstream activating sequences, enhancers and silencers) which alter gene expression in response to developmental and/or external stimuli, or in a tissue-specific manner.

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

29

Regulatory sequences herein also refer to any of the group comprising a promoter, enhancer, silencer, intron sequence, 3'UTR and/or 5'UTR region, protein and /or RNA stabilizing elements.

The term "promoter" also includes the transcriptional regulatory sequences of a classical
5 prokaryotic gene, in which case it may include a -35 box sequence and/or a -10 box transcriptional regulatory sequences.

The term "promoter" is also used to describe a synthetic or fusion molecule or derivative, which confers, activates or enhances expression of a nucleic acid molecule in a cell, tissue or organ.

10 Promoters may contain additional copies of one or more specific regulatory elements, to further enhance expression and/or to alter the spatial expression and/or temporal expression of a nucleic acid molecule to which it is operably connected. Such regulatory elements may be placed adjacent to a heterologous promoter sequence to drive
15 expression of a nucleic acid molecule in response to e.g. copper, glucocorticoids, dexamethasone, tetracycline, gibberellin, cAMP, abscisic acid, auxin, wounding, ethylene, jasmonate or salicylic acid or to confer expression of a nucleic acid molecule to specific cells, tissues or organs such as meristems, leaves, roots, embryo, flowers, seeds or fruits. In the context of the present invention, the promoter preferably is a plant-expressible promoter sequence. Promoters, however, that also function or solely function in non-plant
20 cells such as bacteria, yeast cells, insect cells and animal cells are not excluded from the invention. By "plant-expressible" is meant that the promoter sequence, including any additional regulatory elements added thereto or contained therein, is at least capable of inducing, conferring, activating or enhancing expression in a plant cell, tissue or organ, preferably a monocotyledonous or dicotyledonous plant cell, tissue, or organ.

25 The terms "plant-operable" and "operable in a plant" when used herein, in respect of a promoter sequence, shall be taken to be equivalent to a plant-expressible promoter sequence.

In the present context, a "regulated promoter" or "regulatable promoter sequence" is a
30 promoter that is capable of conferring expression on a structural gene in a particular cell, tissue, or organ or group of cells, tissues or organs of a plant, optionally under specific conditions, however does generally not confer expression throughout the plant under all conditions. Accordingly, a regulatable promoter sequence may be a promoter sequence that confers expression on a gene to which it is operably connected in a particular location within the plant or alternatively, throughout the plant under a specific set of conditions,
35 such as following induction of gene expression by a chemical compound or other elicitor. Preferably, the regulatable promoter used in the performance of the present invention confers expression in a specific location within the plant, either constitutively or following

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

30

induction, however not in the whole plant under any circumstances. Included within the scope of such promoters are cell-specific promoter sequences, tissue-specific promoter sequences, organ-specific promoter sequences, cell cycle specific gene promoter sequences, inducible promoter sequences and constitutive promoter sequences that have
 5 been modified to confer expression in a particular part of the plant at any one time, such as by integration of said constitutive promoter within a transposable genetic element (*Ac*, *Ds*, *Spm*, *En*, or other transposon). Those skilled in the art will be aware that an "inducible promoter" is a promoter the transcriptional activity of which is increased or induced in response to a developmental, chemical, environmental, or physical stimulus. Similarly, the
 10 skilled craftsman will understand that a "constitutive promoter" is a promoter that is transcriptionally active throughout most, but not necessarily all parts of an organism, preferably a plant, during most, but not necessarily all phases of its growth and development.

Generally by "weak promoter" is intended a promoter that drives expression of a coding sequence at a low level. By "low level" is intended at levels of about 1/10,000 transcripts to about 1/100,000 transcripts, to about 1/500,000 transcripts. Conversely, a "strong promoter" drives expression of a coding sequence at high level, or at about 1/10 transcripts to about 1/100 transcripts to about 1/1,000 transcripts.

The term "cell-specific" shall be taken to indicate that expression is predominantly in a
 20 particular cell or cell-type, preferably of plant origin, albeit not necessarily exclusively in said cell or cell-type.

Similarly, the term "tissue-specific" shall be taken to indicate that expression is predominantly in a particular tissue or tissue-type, preferably of plant origin, albeit not necessarily exclusively in said tissue or tissue-type.

25 Similarly, the term "organ-specific" shall be taken to indicate that expression is predominantly in a particular organ, preferably of plant origin, albeit not necessarily exclusively in said organ. "Root-specific" means that the promoter is expressed in the root only and not in other tissues of the plant.

By "root-preferred" it is intended that expression of the heterologous nucleotide sequence
 30 is most abundant in root, but could also have low expression levels elsewhere in the plant. While some level of expression of the heterologous nucleotide sequence occurs in other plant tissue types, expression occurs most abundantly in the root including primary, lateral and adventitious roots.

By "root" is intended any part of the root structure, comprising the root cap, apical
 35 meristem, protoderm, ground meristem, procambium, endodermis, cortex, vascular cortex, epidermis, and the like.

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

31

The term "cell cycle specific" shall be taken to indicate that expression is predominantly cyclic and occurring in one or more, not necessarily consecutive phases of the cell cycle albeit not necessarily exclusively in cycling cells, preferably of plant origin.

Placing a nucleic acid molecule under the regulatory control of a promoter sequence, or in operable connection with a promoter sequence means positioning said nucleic acid molecule such that expression is controlled by the promoter sequence. A promoter is usually, but not necessarily, positioned upstream, or at the 5'-end, and within 2 kb of the start site of transcription, of the nucleic acid molecule which it regulates. In the construction of heterologous promoter/structural gene combinations it is generally preferred to position the promoter at a distance from the gene transcription start site that is approximately the same as the distance between that promoter and the gene it controls in its natural setting (i.e., the gene from which the promoter is derived). As is known in the art, some variation in this distance can be accommodated without loss of promoter function. Similarly, the preferred positioning of a regulatory sequence element with respect to a heterologous gene to be placed under its control is defined by the positioning of the element in its natural setting (i.e., the gene from which it is derived). Again, as is known in the art, some variation in this distance can also occur.

"Expression" means the production of a protein or nucleotide sequence in the cell itself or in a cell-free system. It includes transcription into an RNA product, post-transcriptional modification and/or translation to a protein product or polypeptide from a DNA encoding that product, as well as possible post-translational modifications.

"Operably linked" refers to a juxtaposition wherein the components so described are in a relationship permitting them to function in their intended manner. A control sequence "operably linked" to a coding sequence is ligated in such a way that expression of the coding sequence is achieved under conditions compatible with the control sequences. In case the control sequence is a promoter, it is obvious for a skilled person that double-stranded nucleic acid is preferably used.

Examples of promoters suitable for use in gene constructs of the present invention include those listed in Table 4, amongst others. The promoters listed in Table 4 are provided for the purposes of exemplification only and the present invention is not to be limited by the list provided therein.

In the case of constitutive promoters or promoters that induce expression throughout the entire plant, it is preferred that such sequences are modified by the addition of nucleotide sequences derived from one or more of the tissue-specific promoters listed in Table 4, or alternatively, nucleotide sequences derived from one or more of the above-mentioned tissue-specific inducible promoters, to confer tissue-specificity thereon. For example, the *CaMV 35S* promoter may be modified by the addition of maize *Adh1* promoter sequence,

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

32

- to confer anaerobically-regulated root-specific expression thereon, as described previously (Ellis *et al.* 1987). Another example describes conferring root specific or root abundant gene expression by fusing the *CaMV35S* promoter to elements of the maize glycine-rich protein GRP3 gene (Feix and Wulff 2000 - WO0015682). Such modifications can be achieved by routine experimentation by those skilled in the art.
- The term "terminator" refers to a DNA sequence at the end of a transcriptional unit which signal termination of transcription. Terminators are 3'-non-translated DNA sequences containing a polyadenylation signal, which facilitates the addition of polyadenylate sequences to the 3'-end of a primary transcript. Terminators active in cells derived from viruses, yeasts, moulds, bacteria, insects, birds, mammals and plants are known and described in the literature. They may be isolated from bacteria, fungi, viruses, animals and/or plants.
- Examples of terminators particularly suitable for use in the gene constructs of the present invention include the *Agrobacterium tumefaciens* nopaline synthase (NOS) gene terminator, the *Agrobacterium tumefaciens* octopine synthase (OCS) gene terminator sequence, the Cauliflower mosaic virus (*CaMV*) 35S gene terminator sequence, the *Oryza sativa* ADP-glucose pyrophosphorylase terminator sequence (t3'Bt2), the *Zea mays* zein gene terminator sequence, the *rbcS-1A* gene terminator, and the *rbcS-3A* gene terminator sequences, amongst others.
- Those skilled in the art will readily be in a position to provide additional promoters and terminators that are useful in performing the present invention.

**Table 4. Exemplary plant-expressible promoters for use
in the performance of the present invention**

I: CELL-SPECIFIC, TISSUE-SPECIFIC, AND ORGAN-SPECIFIC PROMOTERS		
GENE SOURCE	EXPRESSION PATTERN	REFERENCE
α -amylase (<i>Amy32b</i>)	aleurone	Lanahan <i>et al</i> , Plant Cell 4:203-211, 1992; Skriver <i>et al</i> , Proc Natl Acad Sci USA 88:7266-7270, 1991
cathepsin β -like gene	aleurone	Cejudo <i>et al</i> , Plant Mol Biol 20:849-856, 1992
<i>Agrobacterium</i> <i>rhizogenes</i> <i>rolB</i>	cambium	Nilsson <i>et al</i> , Physiol Plant 100:458-462, 1997
AtPRP4	flowers	http://salus.mediam.edu/mmg/terney/html
chalcone synthase (<i>chsA</i>)	flowers	Van der Meer <i>et al</i> , Plant Mol Biol 15:95- 109, 1990
LAT52	anther	Twell <i>et al</i> , Mol Gen Genet 217:240-245, 1989
<i>apetala-3</i>	flowers	
chitinase	fruit (berries, grapes, etc)	Thomas <i>et al</i> , CSIRO Plant Industry, Urrbrae, South Australia, Australia; http://winetitles.com.au/qwrdc/csh95-1.htm
<i>rbcs-3A</i>	green tissue (eg leaf)	Lam <i>et al</i> , Plant Cell 2:857-866, 1990; Tucker <i>et al</i> , Plant Physiol 113:1303-1308, 1992
leaf-specific genes	leaf	Baszczynski <i>et al</i> , Nucl Acid Res 16:4732, 1988
AtPRP4	leaf	http://salus.mediam.edu/mmg/terney/html
chlorella virus adenine methyltransferase gene promoter	leaf	Mitra and Higgins, Plant Mol Biol 26:85-93, 1994
aldP gene promoter from rice	leaf	Kagaya <i>et al</i> , Mol Gen Genet 248:668-674, 1995
<i>rbcs</i> promoter from rice or tomato	leaf	Kyoizuka <i>et al</i> , Plant Physiol 102:991-1000, 1993
<i>Pinus cab-6</i>	leaf	Yamamoto <i>et al</i> , Plant Cell Physiol 35:773-

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

34

		778, 1994
rubisco promoter	leaf	
cab (chlorophyll a/b-binding protein	leaf	
pea Blec4 gene	vegetative and floral epidermal tissues	Mandaci and Dobres, Plant Mol Biol 34:961-965
SAM22	senescent leaf	Crowell <i>et al</i> , Plant Mol Biol 18:459-466, 1992
<i>ltp</i> gene (lipid transfer gene)		Fleming <i>et al</i> , Plant J 2:855-862, 1992
<i>R. japonicum nif</i> gene	nodule	United States Patent No 4 803165
<i>B. japonicum nifH</i> gene	nodule	United States Patent No 5008194
GmENOD40	nodule	Yang <i>et al</i> , Plant J 3:573-585, 1993
PEP carboxylase (PEPC)	nodule	Pathirana <i>et al</i> , Plant Mol Biol 20:437-450, 1992
leghaemoglobin (Lb)	nodule	Gordon <i>et al</i> , J Exp Bot 44:1453-1465, 1993
<i>Tungro bacilliform</i> virus gene	phloem	Bhattacharyya-Pakrasi <i>et al</i> , Plant J 4:71-79, 1992
pollen-specific genes	pollen; microspore	Albani <i>et al</i> , Plant Mol Biol 15:605, 1990; Albani <i>et al</i> , Plant Mol Biol 16:501, 1991
Zm13	pollen	Guerrero <i>et al</i> , Mol Gen Genet 224:161-168, 1993
apg gene	microspore	Twiss <i>et al</i> , Sex Plant Reprod 6:217-224, 1993
maize pollen-specific gene	pollen	Hamilton <i>et al</i> , Plant Mol Biol 18:211-218, 1992
sunflower pollen-expressed gene	pollen	Baltz <i>et al</i> , Plant J 2:713-721, 1992
<i>B. napus</i> pollen-specific gene	pollen; anther; tapetum	Arnoldo <i>et al</i> , J Cell Biochem, Abstract No. Y101, 204, 1992
root-expressible genes	roots	Tingey <i>et al</i> , EMBO J 6:1, 1987
tobacco auxin-inducible gene	root tip	Van der Zaal <i>et al</i> , Plant Mol Biol 16:983, 1991
β -tubulin	root	Oppenheimer <i>et al</i> , Gene 63:87, 1988
tobacco root-specific	root	Conkling <i>et al</i> , Plant Physiol 93:1203, 1990

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

35

genes		
<i>B. napus</i> G1-3b gene	root	United States Patent No 5401836
SbPRP1	roots	Suzuki <i>et al</i> , Plant Mol Biol 21:109-119, 1993
AtPRP1; AtPRP3	roots; root hairs	http://salus.mediam.edu/mmg/turney/html
RD2 gene	root cortex	http://www2.cnsu.edu/ncsu/research
TobRB7 gene	root vasculature	http://www2.cnsu.edu/ncsu/research
AtPRP4	leaves; flowers; lateral root primordia	http://salus.mediam.edu/mmg/turney/html
seed-specific genes	seed	Simon <i>et al</i> , Plant Mol Biol 5:191, 1985; Scofield <i>et al</i> , J Biol Chem 262:12202, 1987; Baszczyński <i>et al</i> , Plant Mol Biol 14:633, 1990
Brazil Nut albumin	seed	Pearson <i>et al</i> , Plant Mol Biol 18:235-245, 1992
legumin	seed	Ellis <i>et al</i> , Plant Mol Biol 10:203-214, 1988
glutelin (rice)	seed	Takaiwa <i>et al</i> , Mol Gen Genet 208:15-22, 1986; Takaiwa <i>et al</i> , FEBS Lett 221:43-47, 1987
zein	seed	Matzke <i>et al</i> , Plant Mol Biol 14:323-32, 1990
napA	seed	Stalberg <i>et al</i> , Planta 199:515-519, 1996
wheat LMW and HMW glutenin-1	endosperm	Mol Gen Genet 216:81-90, 1989; Nucl Acids Res 17:461-462, 1989
wheat SPA	seed	Albani <i>et al</i> , Plant Cell 9:171-184, 1997
cZ19B1, maize 19 kDa zein	seed	WO0011177
m1ps, maize myoinositol-1-PI synthase	seed	WO0011177
wheat α , β , γ -gliadins	endosperm	EMBO J 3:1409-1415, 1984
barley <i>lir1</i> promoter	endosperm	
barley B1, C, D, hordein	endosperm	Theor Appl Gen 98:1253-1262, 1999; Plant J 4:343-355, 1993; Mol Gen Genet 250:750-60, 1996
barley DOF	endosperm	Mena <i>et al</i> , Plant J 116:53-62, 1998
<i>biz2</i>	endosperm	EP99106056.7
synthetic promoter	endosperm	Vicente-Carbajosa <i>et al</i> , Plant J 13:629-640, 1998

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

36

rice prolamin NRP33	endosperm	Wu <i>et al</i> , Plant Cell Physiol 39: 885-889, 1998
rice α -globulin Gib-1	endosperm	Wu <i>et al</i> , Plant Cell Physiol 39:885-889, 1998
maize END genes	endosperm	WO0012733
barley END1	endosperm	WO9808961
barley NUC1	nucellus	WO9808961
rice OSH1	embryo	Sato <i>et al</i> , Proc Natl Acad Sci USA 93:8117-8122, 1996
rice α -globulin REB/OHP-1	endosperm	Nakase <i>et al</i> , Plant Mol Biol 33:513-522, 1997
rice ADP-glucose PP	endosperm	Trans Res 6:157-168, 1997
maize ESR gene family	endosperm	Plant J 12:235-246, 1997
sorghum γ -kafirin	endosperm	Plant Mol Biol 32:1029-1035, 1996
KNOX	embryo	Postma-Haarsma <i>et al</i> , Plant Mol Biol 39:257-271, 1999
rice oleosin	embryo and aleuron	Wu <i>et al</i> , J Biochem 123:386, 1998
sunflower oleosin	seed (embryo and dry seed)	Cummins <i>et al</i> , Plant Mol Biol 19:873-876, 1992
LEAFY	shoot meristem	Weigel <i>et al</i> , Cell 69:843-859, 1992
<i>Arabidopsis thaliana</i> knat1	shoot meristem	Accession number AJ131822
	shoot meristem	Accession number Z71981
CLAVATA1	shoot meristem	Accession number AF049870
stigma-specific genes	stigma	Nasrallah <i>et al</i> , Proc Natl Acad Sci USA 85:5551, 1988; Trick <i>et al</i> , Plant Mol Biol 15:203, 1990
class I patatin gene	tuber	Liu <i>et al</i> , Plant Mol Biol 153:386-395, 1991
PCNA rice	meristem	Kosugi <i>et al</i> , Nucl Acids Res 19:1571-1576, 1991; Kosugi and Ohashi, Plant Cell 9:1607-1619, 1997

Pea TubA1 tubulin	Dividing cells	Stoltz and Long, Plant Mol Biol 41:601-614, 1999
<i>Arabidopsis</i> cdc2a	cycling cells	Chung and Parish, FEBS Lett 362:215-219, 1995
<i>Arabidopsis</i> Rop1A	Anthers; mature pollen + pollen tubes	Li <i>et al</i> , Plant Physiol 118:407-417, 1998

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

37

<i>Arabidopsis</i> AtDMC1	Meiosis-associated	Kirmyuk and Jones, Plant J 11:1-14, 1997
Pea PS-IAA4/5 and PS-IAA6	Auxin-inducible	Wong <i>et al</i> , Plant J 9:587-599, 1996
Pea farnesyltransferase	Meristematic tissues; phloem near growing tissues; light- and sugar-repressed	Zhou <i>et al</i> , Plant J 12:921-930, 1997
Tobacco (<i>N. sylvestris</i>) cyclin B1;1	Dividing cells / meristematic tissue	Trehin <i>et al</i> , Plant Mol.Biol. 35:667-672, 1997
<i>Catharanthus roseus</i> Mitotic cyclins CYS (A-type) and CYM (B-type)	Dividing cells / meristematic tissue	Ito <i>et al</i> , Plant J 11:983-992, 1997
<i>Arabidopsis</i> cyc1At (=cyc B1;1) and cyc3aAt (A-type)	Dividing cells / meristematic tissue	Shaul <i>et al</i> , Proc Natl Acad Sci USA 93:4868-4872, 1996
<i>Arabidopsis</i> tef1 promoter box	Dividing cells / meristematic tissue	Regad <i>et al</i> , Mol Gen Genet 248:703-711, 1995
<i>Catharanthus roseus</i> cyc07	Dividing cells / meristematic tissue	Ito <i>et al</i> , Plant Mol Biol 24:863-878, 1994
II: EXEMPLARY CONSTITUTIVE PROMOTERS		
GENE SOURCE	EXPRESSION PATTERN	REFERENCE
Actin	constitutive	McElroy <i>et al</i> , Plant Cell 2:163-171, 1990
CAMV 35S	constitutive	Odeil <i>et al</i> , Nature 313:810-812, 1985
CaMV 19S	constitutive	Nilsson <i>et al</i> , Physiol Plant 100:456-462, 1997
GOS2	constitutive	de Pater <i>et al</i> , Plant J 2:837-844, 1992
ubiquitin	constitutive	Christensen <i>et al</i> , Plant Mol Biol 18:675-689, 1992
rice cyclophilin	constitutive	Buchholz <i>et al</i> , Plant Mol Biol 25:837-843, 1994
maize histone H3	constitutive	Lepetit <i>et al</i> , Mol Gen Genet 231:276-286, 1992
alfalfa histone H3	constitutive	Wu <i>et al</i> , Nucleic Acids Res 17:3057-3063, 1989; Wu <i>et al</i> , Plant Mol Biol 11:641-649, 1988

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

38

actin 2	constitutive	An <i>et al</i> , Plant J 10:107-121, 1996
III: EXEMPLARY STRESS-INDUCIBLE PROMOTERS		
NAME	STRESS	REFERENCE
P5CS (delta(1)-pyrroline-5-carboxylate synthase)	salt, water	Zhang <i>et al</i> , Plant Sci 129:81-89, 1997
cor15a	cold	Hajela <i>et al</i> , Plant Physiol 93:1246-1252, 1990
cor15b	cold	Wilhelm <i>et al</i> , Plant Mol Biol 23:1073-1077, 1993
cor15a (-305 to +78 nt)	cold, drought	Baker <i>et al</i> , Plant Mol Biol 24: 01-713, 1994
rd29	salt, drought, cold	Kasuga <i>et al</i> , Nature Biotechnol 18:287-291, 1999
heat shock proteins, including artificial promoters containing the heat shock element (HSE)	heat	Barros <i>et al</i> , Plant Mol Biol 19 665-75, 1992. Marrs <i>et al</i> , Dev Genet 14:27-41, 1993. Schoffl <i>et al</i> , Mol Gen Genet 217:246-53, 1989.
smHSP (small heat shock proteins)	heat	Waters <i>et al</i> , J Exp Bot 47:325-338, 1996
wcs120	cold	Ouellete <i>et al</i> , FEBS Lett 423:324-328, 1998
ci7	cold	Kirch <i>et al</i> , Plant Mol Biol 33:897-909, 1997
Adh	cold, drought, hypoxia	Dolferus <i>et al</i> , Plant Physiol 105:1075-87, 1994
pws118	salt and drought	Joshee <i>et al</i> , Plant Cell Physiol 39:64-72, 1998
ci21A	cold	Schneider <i>et al</i> , Plant Physiol 113:335-45, 1997
Trg-31	drought	Chaudhary <i>et al</i> , Plant Mol Biol 30:1247-57, 1996
osmotin	osmotic	Raghothama <i>et al</i> , Plant Mol Biol 23:1117-28, 1993
lapA	wounding, environmental	WO99/03977 University of California/INRA

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

39

IV: EXEMPLARY PATHOGEN-INDUCIBLE PROMOTERS		
NAME	PATHOGEN	REFERENCE
RB7	Root-knot nematodes (<i>Meloidogyne</i> spp.)	US5760386 - North Carolina State University; Opperman <i>et al</i> , Science 263:221-23, 1994
PR-1, 2, 3, 4, 5, 8, 11	fungal, viral, bacterial	Ward <i>et al</i> , Plant Cell 3:1085-1094, 1991; Reiss <i>et al</i> 1996; Lebel <i>et al</i> , Plant J 16:223-233, 1998; Melchers <i>et al</i> , Plant J 5:469-480, 1994; Lawton <i>et al</i> , Plant Mol Biol, 19:735-743, 1992
HMG2	nematodes	WO9503690 - Virginia Tech Intellectual Properties Inc .
Abi3	Cyst nematodes (<i>Heterodera</i> spp.)	unpublished
ARM1	nematodes	Barthels <i>et al</i> , Plant Cell 9:2119-2134, 1997 WO 98/31822 - Plant Genetic Systems
Att0728	nematodes	Barthels <i>et al</i> , Plant Cell 9: 2119-2134, 1997 PCT/EP98/07761
Att1712	nematodes	Barthels <i>et al</i> , Plant Cell 9, 2119-2134, 1997 PCT/EP98/07761
Gst1	Different types of pathogens	Strittmatter <i>et al</i> , Mol Plant-Microbe Interact 9:68-73, 1996
LEMMI	nematodes	WO 92/21757 - Plant Genetic Systems
CLE	geminivirus	PCT/EP99/03445 - CINESTAV
PDF1.2	Fungal including <i>Alternaria brassicicola</i> and <i>Botrytis cinerea</i>	Manners <i>et al</i> , Plant Mol Biol, 38:1071-1080, 1998
Thi2.1	Fungal - <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>matthiola</i>	Vignutelli <i>et al</i> , Plant J 14:285-295, 1998
DB#226	nematodes	Bird and Wilson, Mol Plant-Microbe Interact 7:419-442, 1994 WO 95.322888
DB#280	nematodes	Bird and Wilson, Mol Plant-Microbe Interact 7:419-442, 1994 WO 95.322888
Cat2	Nematodes	Niebel <i>et al</i> , Mol Plant-Microbe Interact 8:371-

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

40

		378, 1995
□Tub	Nematodes	Aristizabal <i>et al</i> (1996), 8 th International Congress on Plant-Microbe Interaction, Knoxville US B-29
sHSP	Nematodes	Fenoll <i>et al</i> (1997) In: Cellular and molecular aspects of plant-nematode interactions. Kluwer Academic, C. Fenoll, F.M.W. Grondler and S.A. Ohi (Eds.),
Taw12	Nematodes	Fenoll <i>et al</i> (1997) In: Cellular and molecular aspects of plant-nematode interactions. Kluwer Academic, C. Fenoll, F.M.W. Grondler and S.A. Ohi (Eds.)
Hs1(proto)	Nematodes	WO 98/122335 – Jung
nsLTP	viral, fungal, bacterial	Molina and Garcia-Olmedo FEBS Lett, 316:119-122, 1993
RIP	viral, fungal	Turner <i>et al</i> , Proc Natl Acad Sci USA 94:3866-3871, 1997

In the context of the current invention, "ectopic expression" or "ectopic overexpression" of a gene or a protein are conferring to expression patterns and/or expression levels of said gene or protein normally not occurring under natural conditions. Ectopic expression can be achieved in a number of ways including operably linking of a coding sequence encoding said protein to an isolated homologous or heterologous promoter in order to create a chimeric gene and/or operably linking said coding sequence to its own isolated promoter (i.e. the unisolated promoter naturally driving expression of said protein) in order to create a recombinant gene duplication or gene multiplication effect.

- 10 "Ectopic expression" not only can result in overexpression of a gene but can also result in "downregulation of expression", for instance of the homologous gene in the plant where expression is effected.

With "ectopic co-expression" is meant the ectopic expression or ectopic overexpression of two or more genes or proteins. The same or, more preferably, different promoters are used to confer expression of said genes or proteins.

- 15 Preferably, the promoter sequence used in the context of the present invention is operably linked to a coding sequence or open reading frame (ORF) encoding one of the inventive sugar beet polypeptides or a homologue, derivative and/or an immunologically active fragment thereof as defined *supra*.

- 20 "Downregulation of expression" as used herein means lowering levels of gene expression and/or levels of active gene product and/or levels of gene product activity. Decreases in expression may be accomplished by e.g. the addition of coding sequences or parts thereof in a sense orientation (if resulting in co-suppression) or in an antisense orientation

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

41

relative to a promoter sequence and furthermore by e.g. insertion mutagenesis (e.g. T-DNA insertion or transposon insertion) or by gene silencing strategies as described by e.g. Angell and Baulcombe 1998 (WO9836083), Lowe *et al.* 1989 (WO9853083), Lederer *et al.* 1999 (WO9915682) or Wang *et al.* 1999 (WO9953050). Genetic constructs aimed at

5 silencing gene expression may have the nucleotide sequence of said gene (or one or more parts thereof) contained therein in a sense and/or antisense orientation relative to the promoter sequence. Another method to downregulate gene expression comprises the use of ribozymes, e.g. as described in Atkins *et al.* 1994 (WO9400012), Lenee *et al.* 1995 (WO9503404), Lutziger *et al.* 2000 (WO0000619), Prinsen *et al.* 1997 (WO9713865) and

10 Scott *et al.* 1997 (WO9738116).

Modulating, including lowering, the level of active gene products or of gene product activity can be achieved by administering or exposing cells, tissues, organs or organisms to said gene product, a homologue, analogue, derivative and/or immunologically active fragment thereof. Immunomodulation is another example of a technique capable of

15 downregulation levels of active gene product and/or of gene product activity and comprises administration of or exposing to or expressing antibodies to said gene product to or in cells, tissues, organs or organisms wherein levels of said gene product and/or gene product activity are to be modulated. Such antibodies comprise "plantibodies", single chain antibodies, IgG antibodies and heavy chain camel antibodies as well as fragments thereof.

20 Modulating, including lowering, the level of active gene products or of gene product activity can furthermore be achieved by administering or exposing cells, tissues, organs or organisms to an inhibitor or activator of said gene product or the activity thereof. Such inhibitors or activators include proteins (comprising e.g. proteinases and kinases) and

25 chemical compounds identified according to the current invention as described *supra*.

In the context of the invention the term "agonist" refers to a substance that can be either a protagonist or an antagonist, i.e. can have either positive or negative effects, can be an enhancer or an inhibitor or a modulator as well.

In the context of the current invention is envisaged the downregulation of the expression

30 the inventive sugar beet genes as defined higher. The invention further comprises downregulation of levels of the activity of the inventive sugar beet polypeptides whereby the inventive sugar beet polypeptides have been defined *supra*.

By "cell fate and/or plant development and/or plant morphology and/or biochemistry and/or physiology" is meant that one or more developmental and/or morphological and/or

35 biochemical and/or physiological characteristics of a plant is altered by the performance of one or more steps pertaining to the invention described herein.

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

42

"Cell fate" refers to the cell-type or cellular characteristics of a particular cell that are produced during plant development or a cellular process therefore, in particular during the cell cycle or as a consequence of a cell cycle process.

"Plant development" or the term "plant developmental characteristic" or similar term shall, when used herein, be taken to mean any cellular process of a plant that is involved in determining the developmental fate of a plant cell, in particular the specific tissue or organ type into which a progenitor cell will develop. Cellular processes relevant to plant development will be known to those skilled in the art. Such processes include, for example, morphogenesis, photomorphogenesis, shoot development, root development, vegetative development, reproductive development, stem elongation, flowering, and regulatory mechanisms involved in determining cell fate, in particular a process or regulatory process involving the cell cycle.

"Plant morphology" or the term "plant morphological characteristic" or similar term will, when used herein, be understood by those skilled in the art to refer to the external appearance of a plant, including any one or more structural features or combination of structural features thereof. Such structural features include the shape, size, number, position, colour, texture, arrangement, and patternation of any cell, tissue or organ or groups of cells, tissues or organs of a plant, including the root, stem, leaf, shoot, petiole, trichome, flower, petal, stigma, style, stamen, pollen, ovule, seed, embryo, endosperm, seed coat, aleurone, fibre, fruit, cambium, wood, heartwood, parenchyma, aerenchyma, sieve element, phloem or vascular tissue, amongst others.

"Plant biochemistry" or the term "plant biochemical characteristic" or similar term will, when used herein, be understood by those skilled in the art to refer to the metabolic and catalytic processes of a plant, including primary and secondary metabolism and the products thereof, including any small molecules, macromolecules or chemical compounds, such as but not limited to starches, sugars, proteins, peptides, enzymes, hormones, growth factors, nucleic acid molecules, celluloses, hemicelluloses, calloses, lectins, fibres, pigments such as anthocyanins, vitamins, minerals, micronutrients, or macronutrients, that are produced by plants.

"Plant physiology" or the term "plant physiological characteristic" or similar term will, when used herein, be understood to refer to the functional processes of a plant, including developmental processes such as growth, expansion and differentiation, sexual development, sexual reproduction, seed set, seed development, grain filling, asexual reproduction, cell division, dormancy, germination, light adaptation, photosynthesis, leaf expansion, fiber production, secondary growth or wood production, amongst others; responses of a plant to externally-applied factors such as metals, chemicals, hormones, growth factors, environment and environmental stress factors (eg. anoxia, hypoxia, high

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

43

temperature, low temperature, dehydration, light, daylength, flooding, salt, heavy metals, amongst others), including adaptive responses of plants to said externally-applied factors.

"Stress" or "environmental stress" is a circumstance caused by elements present in the environment which may include but are not limited to drought, salt, dehydration, heat, cold, freezing, water logging, wounding, mechanical stress, oxidative stress, ozone, high light heavy metals, nutrient deprivation, toxic chemicals, pathogen (including viruses, bacteria, fungi, insects and nematodes) and combinations of these.

"Osmotic stress" is any kind of stress which alters the osmotic potential in the cell. For example osmotic stress can be caused by drought or salt or frost.

10 "Non-environmental stress" is a circumstance caused by elements or factors from the organism (e.g. gene defect).

As used herein, "stress tolerance" refers to the capacity to grow and produce biomass during stress, the capacity to reinitiate growth and biomass production after stress, and the capacity to survive stress. The term "stress tolerance" also covers the capacity of the plant to undergo its developmental program during stress similarly to under non-stressed conditions, e.g. to switch from dormancy to germination and from vegetative to reproductive phase under stressed conditions similarly as under non-stressed conditions.

15 Furthermore it is shown that genes protecting against osmotic stress (like trehalose) also protect against oxidative stress (Benaroudj *et al.* 2001). Therefore a person skilled in the art can assume that when an isolated gene confers salt tolerance to a host organism when transfected herein, it could also confer oxidative stress tolerance. Oxidative stress occurs in situations of cold stress combined with high light or in situations of ozone stress, in case of necrosis as a result of pathogen infection or wounding, in case of senescence or by application of certain herbicides (like atrazine or paraquat). Since the function of many osmoprotectants is actually unknown and that mannitol for example also has been shown to function as a scavenger of oxygen radicals, it can be assumed that oxidative stress also occurs in case of osmotic stress.

Means for introducing recombinant DNA into plant tissue or cells include, but are not limited to, transformation using CaCl_2 and variations thereof, in particular the method described previously (Hanahan 1983), direct DNA uptake into protoplasts (Krens *et al.* 1982; Paszkowski *et al.* 1984), PEG-mediated uptake to protoplasts (Armstrong *et al.* 1990) microparticle bombardment, electroporation (Fromm *et al.* 1985), microinjection of DNA (Crossway *et al.* 1986; Fromm *et al.* 1985), microparticle bombardment of tissue explants or cells (Christou *et al.* 1988), vacuum-infiltration of tissue with nucleic acid, or in the case of plants, T-DNA-mediated transfer from *Agrobacterium* to the plant tissue as described essentially (An *et al.* 1985; Dodds 1985; Herrera-Estrella *et al.* 1983a; Herrera-Estrella *et al.* 1983b). Methods for transformation of monocotyledonous plants are well

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

44

- known in the art and include *Agrobacterium*-mediated transformation (Cheng *et al.* 1997 - WO9748814; Hansen 1998 - WO9854961, Hiei *et al.* 1994 - WO9400977; Hiei *et al.* 1998 - WO9817813; Rikiishi *et al.* 1999 - WO9904618; Saito *et al.* 1995 - WO9506722), microprojectile bombardment (Adams *et al.* 1999 - US5969213; Bowen *et al.* 1998 - 5 US5736369; Chang *et al.* 1994 - WO9413822; Lundquist *et al.* 1999 - US5874265/US5990390; Vasil and Vasil 1995 -US5405765; Walker *et al.* 1999 - US5955362), DNA uptake (Eyal *et al.* 1993 - WO9318168), microinjection of *Agrobacterium* cells (von Holt 1994 - DE4309203) and sonication (Finer *et al.* 1997 - US5693512).
- 10 For microparticle bombardment of cells, a microparticle is propelled into a cell to produce a transformed cell. Any suitable ballistic cell transformation methodology and apparatus can be used in performing the present invention. Exemplary apparatus and procedures are disclosed by Stomp *et al.* (U.S. Patent No. 5122466) and Sanford and Wolf (U.S. Patent No. 4945050). When using ballistic transformation procedures, the gene construct
- 15 may incorporate a plasmid capable of replicating in the cell to be transformed. Examples of microparticles suitable for use in such systems include 1 to 5 μ m gold spheres. The DNA construct may be deposited on the microparticle by any suitable technique, such as by precipitation.
- A whole plant may be regenerated from the transformed or transfected cell, in accordance with procedures well known in the art. Plant tissue capable of subsequent clonal
- 20 propagation, whether by organogenesis or embryogenesis, may be transformed with a gene construct of the present invention and a whole plant regenerated therefrom. The particular tissue chosen will vary depending on the clonal propagation systems available for, and best suited to, the particular species being transformed. Exemplary tissue targets
- 25 include leaf disks, pollen, embryos, cotyledons, hypocotyls, megagametophytes, callus tissue, existing meristematic tissue (e.g., apical meristem, axillary buds, and root meristems), and induced meristem tissue (e.g., cotyledon meristem and hypocotyl meristem).
- The term "organogenesis", as used herein, means a process by which shoots and roots are developed sequentially from meristematic centers.
- 30 The term "embryogenesis", as used herein, means a process by which shoots and roots develop together in a concerted fashion (not sequentially), whether from somatic cells or gametes.
- Preferably, the plant is produced according to the inventive method is transfected or
- 35 transformed with a genetic sequence, or amenable to the introduction of a protein, by any art-recognized means, such as microprojectile bombardment, microinjection, *Agrobacterium*-mediated transformation (including the 'flower dip' transformation method;

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

45

(Bechtold & Pelletier 1998; Trieu *et al.* 2000)), protoplast fusion, or electroporation, amongst others. Most preferably said plant is produced by Agrobacterium-mediated transformation.

The "seedling" is the juvenile plant that arises from the mature embryo after seed germination.

With "differentiation of a cell" it is understood that the cell develops unique features to be engaged for a specific function. Mostly differentiation is irreversible.

Agrobacterium-mediated transformation or agrolistic transformation of plants, yeast, moulds or filamentous fungi is based on the transfer of part of the transformation vector sequences, called the T-DNA, to the nucleus and on integration of said T-DNA in the genome of said eukaryote.

With "Agrobacterium" is meant a member of the *Agrobacteriaceae*, more preferably Agrobacterium or Rhizobacterium and most preferably *Agrobacterium tumefaciens*.

With "T-DNA", or transferred DNA, is meant that part of the transformation vector flanked by T-DNA borders which is, after activation of the Agrobacterium *vir* genes, nicked at the T-DNA borders and is transferred as a single stranded DNA to the nucleus of an eukaryotic cell.

When used herein, with "T-DNA borders", "T-DNA border region", or "border region" are meant either right T-DNA border (RB) or left T-DNA border (LB). Such a border comprises a core sequence flanked by a border inner region as part of the T-DNA flanking the border and/or a border outer region as part of the vector backbone flanking the border. The core sequences comprise 22 bp in case of octopine-type vectors and 25 bp in case of nopaline-type vectors. The core sequences in the right border region and left border region form imperfect repeats. Border core sequences are indispensable for recognition and processing by the Agrobacterium nicking complex consisting of at least VirD1 and VirD2. Core sequences flanking a T-DNA are sufficient to promote transfer of said T-DNA. However, efficiency of transformation using transformation vectors carrying said T-DNA solely flanked by said core sequences is low. Border inner and outer regions are known to modulate efficiency of T-DNA transfer (Wang *et al.* 1987). One element enhancing T-DNA transfer has been characterised and resides in the right border outer region and is called *overdrive* (Peralta *et al.* 1986; van Haaren *et al.* 1987).

With "T-DNA transformation vector" or "T-DNA vector" is meant any vector encompassing a T-DNA sequence flanked by a right and left T-DNA border consisting of at least the right and left border core sequences, respectively, and used for transformation of any eukaryotic cell.

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

46

With "T-DNA vector backbone sequence" or "T-DNA vector backbone sequences" is meant all DNA of a T-DNA containing vector that lies outside of the T-DNA borders and, more specifically, outside the nicking sites of the border core imperfect repeats.

- The current invention includes optimised T-DNA vectors such that vector backbone integration in the genome of a eukaryotic cell is minimised or absent. With "optimised T-DNA vector" is meant a T-DNA vector designed either to decrease or abolish transfer of vector backbone sequences to the genome of a eukaryotic cell. Such T-DNA vectors are known to the one familiar with the art and include those described previously (Hanson *et al.* 1999, Stuiver *et al.* 1999 - WO9901563).
- 10 The current invention clearly considers the inclusion of a DNA sequence of the present invention encoding a DRE-binding factor DBF1, homologue, derivative or immunologically active fragment thereof as defined *supra*, in any T-DNA vector comprising binary transformation vectors, super-binary transformation vectors, co-integrate transformation vectors, Ri-derived transformation vectors as well as in T-DNA carrying vectors used in agrolistic transformation.
- 15 With "binary transformation vector" is meant a T-DNA transformation vector comprising:
a T-DNA region comprising at least one gene of interest and/or at least one selectable marker active in the eukaryotic cell to be transformed; and a vector backbone region comprising at least origins of replication active in *Escherichia coli* and *Agrobacterium* and markers for selection in *Escherichia coli* and *Agrobacterium*. Alternatively, replication of the binary transformation vector in *Agrobacterium* is dependent on the presence of a separate helper plasmid. The binary vector pGreen and the helper plasmid pSoup form an example of such a system as described in e.g. (Hellens *et al.* 2000) or as available on the internet site <http://www.pgreen.ac.uk>.
- 20 The T-DNA borders of a binary transformation vector can be derived from octopine-type or nopaline-type Ti plasmids or from both. The T-DNA of a binary vector is only transferred to a eukaryotic cell in conjunction with a helper plasmid. Also known in the art are multiple binary vector *Agrobacterium* strains for efficient co-transformation of plants (Bidney and Scelonge 2000 - WO0018939).
- 25 With "helper plasmid" is meant a plasmid that is stably maintained in *Agrobacterium* and is at least carrying the set of *vir* genes necessary for enabling transfer of the T-DNA. Said set of *vir* genes can be derived from either octopine-type or nopaline-type Ti plasmids or from both.
- 30 With "super-binary transformation vector" is meant a binary transformation vector additionally carrying in the vector backbone region a *vir* region of the Ti plasmid pTiBo542 of the super-virulent *Agrobacterium tumefaciens* strain A281 (Hiei *et al.* 1994 -
- 35

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

47

EP0604662, Hiei *et al.* 1995 - EP0687730). Super-binary transformation vectors are used in conjunction with a helper plasmid.

With "co-integrate transformation vector" is meant a T-DNA vector at least comprising:

5 a T-DNA region comprising at least one gene of interest and/or at least one selectable marker active in plants; and

a vector backbone region comprising at least origins of replication active in *Escherichia coli* and *Agrobacterium*, and markers for selection in *Escherichia coli* and *Agrobacterium*, and a set of *vir* genes necessary for enabling transfer of the T-DNA.

10 The T-DNA borders and said set of *vir* genes of a said T-DNA vector can be derived from either octopine-type or nopaline-type Ti plasmids or from both.

With "Ri-derived plant transformation vector" is meant a binary transformation vector in which the T-DNA borders are derived from a Ti plasmid and said binary transformation vector being used in conjunction with a 'helper' Ri-plasmid carrying the necessary set of *vir* genes.

15 As used herein, the term "selectable marker gene" or "selectable marker" or "marker for selection" includes any gene which confers a phenotype on a cell in which it is expressed to facilitate the identification and/or selection of cells which are transfected or transformed with a gene construct of the invention or a derivative thereof. Suitable selectable marker genes contemplated herein include the ampicillin resistance (*Amp^r*), tetracycline resistance gene (*Tc^r*), bacterial kanamycin resistance gene (*Kan^r*), phosphinothricin resistance gene, neomycin phosphotransferase gene (*neptII*), hygromycin resistance gene, β -glucuronidase (GUS) gene, chloramphenicol acetyltransferase (CAT) gene, green fluorescent protein (*gfp*) gene (Haseloff *et al.* 1997), and luciferase gene, amongst others.

20 With "agrolistics", "agrolistic transformation" or "agrolistic transfer" is meant here a transformation method combining features of *Agrobacterium*-mediated transformation and of biolistic DNA delivery. As such, a T-DNA containing target plasmid is co-delivered with DNA/RNA enabling in planta production of VirD1 and VirD2 with or without VirE2 (Hansen & Chilton 1996; Hansen *et al.* 1997, Hansen and Chilton 1997 - WO9712046).

25 With "foreign DNA" is meant any DNA sequence that is introduced in the host's genome by recombinant techniques. Said foreign DNA includes e.g. a T-DNA sequence or a part thereof such as the T-DNA sequence comprising the selectable marker in an expressible format. Foreign DNA furthermore includes intervening DNA sequences as defined *supra*.

30 "Plant cell" comprises any cell derived from any plant and existing in culture as a single cell, a group of cells or a callus. A plant cell may also be any cell in a developing or mature plant in culture or growing in nature.

35 "Plant" or "Plants" comprise all plant species which belong to the superfamily *Viridiplantae*. The present invention is applicable to any plant, in particular monocotyledonous plants

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

48

- and dicotyledonous plants including a fodder or forage legume, ornamental plant, food crop, tree, or shrub selected from the list comprising *Acacia* spp., *Acer* spp., *Actinidia* spp., *Aesculus* spp., *Agathis australis*, *Albizia amara*, *Alsophila tricolor*, *Andropogon* spp., *Arachis* spp., *Areca catechu*, *Astelia fragrans*, *Astragalus cicer*, *Baikiaea plurijuga*, *Betula* spp., *Brassica* spp., *Bruguiera gymnorhiza*, *Burkea africana*, *Butea frondosa*, *Cadaba farinosa*, *Calliandra* spp., *Camellia sinensis*, *Canna indica*, *Capsicum* spp., *Cassia* spp., *Centroema pubescens*, *Chaenomeles* spp., *Cinnamomum cassia*, *Coffea arabica*, *Colophospermum mopane*, *Coronilla varia*, *Cotoneaster serotina*, *Crataegus* spp., *Cucumis* spp., *Cupressus* spp., *Cyathea dealbata*, *Cydonia oblonga*, *Cryptomeria japonica*, *Cymbopogon* spp., *Cynthea dealbata*, *Cydonia oblonga*, *Dalbergia monetaria*, *Davallia divaricata*, *Desmodium* spp., *Dicksonia squarosa*, *Diheteropogon amplexans*, *Dioclea* spp., *Dolichos* spp., *Dorycnium rectum*, *Echinochloa pyramidalis*, *Ehretia* spp., *Eleusine coracana*, *Eragrostis* spp., *Erythrina* spp., *Eucalyptus* spp., *Euclea schimperi*, *Eulalia villosa*, *Fagopyrum* spp., *Feijoa sellowiana*, *Fragaria* spp., *Flemingia* spp., *Freylinetia banksii*, *Geranium thunbergii*, *Ginkgo biloba*, *Glycine javanica*, *Gliricidia* spp., *Gossypium hirsutum*, *Grevillea* spp., *Guibourtia coleosperma*, *Hedysarum* spp., *Hemarthra altissima*, *Heteropogon contortus*, *Hordeum vulgare*, *Hyparrhenia rufa*, *Hypericum erectum*, *Hyperthelia dissoluta*, *Indigo incarnata*, *Iris* spp., *Leptarrhena pyrrolifolia*, *Lespedeza* spp., *Lettuca* spp., *Leucaena leucocephala*, *Louretia simplex*, *Lotonus bainesii*, *Lotus* spp., *Macrotyloma axillare*, *Malus* spp., *Manihot esculenta*, *Medicago sativa*, *Metasequoia glyptostroboides*, *Musa sapientum*, *Nicotianum* spp., *Onobrychis* spp., *Ornithopus* spp., *Oryza* spp., *Peltophorum africanum*, *Pennisetum* spp., *Persea gratissima*, *Petunia* spp., *Phaseolus* spp., *Phoenix canariensis*, *Phormium cookianum*, *Photinia* spp., *Picea glauca*, *Pinus* spp., *Pisum sativum*, *Podocarpus totara*, *Pogonarthra fleckii*, *Pogonarthra squarrosa*, *Populus* spp., *Prosopis cineraria*, *Pseudotsuga menziesii*, *Pterolobium stellatum*, *Pyrus communis*, *Quercus* spp., *Rhaphiolepis umbellata*, *Rhopalostylis sapida*, *Rhus natalensis*, *Ribes grossularia*, *Ribes* spp., *Robinia pseudoacacia*, *Rosa* spp., *Rubus* spp., *Salix* spp., *Schyzachyrium sanguineum*, *Sciadopitys verticillata*, *Sequoia sempervirens*, *Sequoiadendron giganteum*, *Sorghum bicolor*, *Splachia* spp., *Sporobolus limbratus*, *Stiburus alopecuroides*, *Stylosanthos humilis*, *Tadehagi* spp., *Taxodium distichum*, *Themeda triandra*, *Trifolium* spp., *Triticum* spp., *Tsuga heterophylla*, *Vaccinium* spp., *Vicia* spp., *Vitis vinifera*, *Watsonia pyramidata*, *Zantedeschia aethiopica*, *Zea mays*, amaranth, artichoke, asparagus, broccoli, brussel sprout, cabbage, canola, carrot, cauliflower, celery, collard greens, flax, kale, lentil, oilseed rape, okra, onion, potato, rice, soybean, straw, sugarbeet, sugar cane, sunflower, tomato, squash, and tea, amongst others, or the seeds of any plant specifically named above or a tissue, cell or organ culture of any of the above species.

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

49

"Cereal" comprises crop plants with edible grain for example plants belonging to the grass family that is cultivated for its nutritious grains such as oats, barley, rye, wheat, rice, and corn etc.

With "yeast two-hybrid assay" is meant an assay that is based on the observation that many eukaryotic transcription factors comprise two domains, a DNA-binding domain (DB) and an activation domain (AD) which, when physically separated (i.e. disruption of the covalent linkage) do not effectuate target gene expression. Two proteins able to interact physically with one of said proteins fused to DB and the other of said proteins fused to AD will re-unite the DB and AD domains of the transcription factor resulting in target gene expression. The target gene in the yeast two-hybrid assay is usually a reporter gene such as the β -galactosidase gene. Interaction between protein partners in the yeast two-hybrid assay can thus be quantified by measuring the activity of the reporter gene product (Bartel & Fields 1997). Alternatively, a mammalian two-hybrid system can be used which includes e.g. a chimeric green fluorescent protein encoding reporter gene (Shioda *et al.* 2000). Yet another alternative consists of a bacterial two-hybrid system using e.g. *HIS* as reporter gene (Joung *et al.* 2000).

The term "fragment of a sequence" or "part of a sequence" means a truncated sequence of the original sequence referred to. The truncated sequence (nucleic acid or protein sequence) can vary widely in length; the minimum size being a sequence of sufficient size to provide a sequence with at least a comparable function and/or activity or the original sequence referred to, while the maximum size is not critical. In some applications, the maximum size usually is not substantially greater than that required to provide the desired activity and/or function(s) of the original sequence. Typically, the truncated amino acid will range from about 5 to about 333 amino acids or ruin length. More typically, however, the sequence will be a maximum of about 333 amino acids in length, preferably a maximum of about 330 amino acids. It is usually desirable to select sequences of at least about 10, 12 or 15 amino acids, or 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275 up to a maximum of about 300 or 325 amino acids. For instance, the truncated nucleic acid will correspond in length with the amino acid fragment it encodes.

Said compound or plurality of compounds may be comprised in, for example, samples, e.g., cell extracts from, e.g., plants, animals or microorganisms. Furthermore, said compound(s) may be known in the art but hitherto not known to be capable of suppressing or activating cell cycle interacting proteins. The reaction mixture may be a cell free extract of may comprise a cell or tissue culture. Suitable set ups for the method of the invention are known to the person skilled in the art and are, for example, generally described previously (Alberts *et al.* 1994), in particular Chapter 17. The plurality of compounds may be, e.g., added to the reaction mixture, culture medium or injected into the cell.

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

50

- If a sample containing a compound or a plurality of compounds is identified in the method of the invention, then it is either possible to isolate the compound from the original sample identified as containing the compound capable of acting as an agonist, or one can further subdivide the original sample, for example, if it consists of a plurality of different compounds, so as to reduce the number of different substances per sample and repeat the method with the subdivisions of the original sample. Depending on the complexity of the samples, the steps described above can be performed several times, preferably until the sample identified according to the method of the invention only comprises a limited number of or only one substance(s). Preferably said sample comprises substances or similar chemical and/or physical properties, and most preferably said substances are identical. Preferably, the compound identified according to the above-described method or its derivative is further formulated in a form suitable for the application in plant breeding or plant cell and tissue culture.
- 15 The present invention is further described by reference to the following non-limiting figures and examples.

WO 02/052012

51

PCT/EP01/15093

FIGURE LEGENDS

Figure 1

Amino acid alignments of BvCKA2 with the catalytic subunit of other CK2. The accession number and sources of each of the CK2 are as follows: AtCKA2 (*Arabidopsis thaliana*,
 5 Acc. number Q08466), ZmCKA2 (*Zea mays*, Acc. number P28523), RnCKA1 (*Ratus norvegicus* Ac. number P19139), XiCKA2 (*Xenopus laevis*, Ac. number P28020) and ScCKA2 (*Saccharomyces cerevisiae* Ac. number P19454). The identical amino acids are shaded. The boxed regions indicate important conserved residues in CKII. These include the motif 71-DWG-73 forming the catalytic site, the essential 63K and the highly basic 69-
 10 KKKKIKR-75 domain.

Figure 2

Southern blot analysis of *BvCKA2* gene. Genomic DNA was digested with *Bam* HI (B), *Hind* III (H) and *Eco* RI (E) and separated on a 0.8 % agarose gel. The DNA was then transferred onto a nylon membrane and UV cross-linked. Hybridization was performed
 15 under high-stringency conditions (see example 8) using two radiolabeled probes: a fragment of 887 bp included in the coding region of *BvCKA2* cDNA (left panel), and a fragment of 323 bp corresponding to the 3 untranslated region of *BvCKA2* cDNA (right panel).

Figure 3

20 *BvCKA2* complements the yeast double mutant *cka1 cka2*. The casein kinase thermosensitive yeast strain YDH8 (*cka1 cka2*) was transformed with either plasmid pYPGE15-*BvCKA2* (4,5,6,7) or the empty plasmid (1,2,3) and grown at the permissive temperature of 25° C (left) or at the thermosensitive temperature of 37° C (right)

Figure 4

25 Increased tolerance to NaCl stress in yeast by overexpression of *ScCKA2* and *BvCKA2*. The yeast mutant strain JM26 was transformed with either the empty plasmid (pYPGE15) or the plasmid containing inserts encoding for *ScCKA2* or *BvCKA2*. Transformed cells were tested for salt tolerance as described in example 7. Plates contained SD medium with leucine, adenine and 150 mM NaCl when indicated.

30

Figure 5

BvCKA2 gene expression is up-regulated by NaCl stress. Northern analysis was performed as described in example 8. RNA was isolated from 3 week old sugar beet

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

52

leaves at 0, 3, 6, 8 and 24 hours after growing with (+) or without (-) 250 mM NaCl. The same RNA blot was hybridized with a 3' UTR fragment of *BvCKA2* and with an α 3 tubulin probe (*AtTUBA*, Ac. number M17189) from *Arabidopsis* used as control of filter transfer. Control of gel loading was done with ethidium bromide staining and is shown by the 3.5

5 Kb band of rRNA.

Figure 6

SEQ ID NO 1 to 5: DNA sequences of the nucleic acids of the invention, start and stop codons are underlined. SEQ ID NO 6 to 10: amino acid sequences of the polypeptides of the invention.

10

Figure 7

In vitro evaluation of the tolerance to NaCl of transgenic *Arabidopsis* expressing clone 154 cDNA (*BvCKA2*)

15 Culture medium: MS, NaCl concentrations: 0, 100 and 125 mM NaCl, Variables studied: % of plants with true leaves (A) and % of plants with cotyledons (B), Number of repetitions of the experiment : 6-8, Number of plants per concentration: 150-200, Statistical analysis: ANOVA, Confidence level: 99%

20

Figure 8

Picture of *Arabidopsis* seedlings grown on MS medium supplemented with 100mM NaCl. The seedlings were not transformed or transformed with the empty vector pBI121 or transformed with the 145 cDNA encoding *BvCKA2*.

25

Figure 9

Quantification of radioactive phenylalanin incorporation into proteins of plants transfected with *BvEIF-1A*.

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

53

EXAMPLES

Example 1: Plant material

Sugar beet seeds (*Beta vulgaris* var. DITA) were sown on pots containing a mixture of sand and vermiculite (1:1 w/w). The plants were grown under greenhouse conditions (8 hours at 20 °C, 16 hours at 25°C with supplementary lighting to stimulate a minimum of 12 hours photoperiod). They were periodically irrigated with a nutrient solution containing 2.4 g/l $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1 g/l KNO_3 , 1 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.3 g/l KH_2PO_4 , 5.6 mg/l Fe-quelate (Kelantren, Bayer), 1.1 mg/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3.3 mg/l $\text{MnO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.3 mg/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 3.8 mg/l H_3BO_3 , 0.18 mg/l $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. For the construction of the cDNA library, three week old plants were irrigated with 200 mM NaCl for 24 hours before harvesting. For the Northern blot analysis plants were irrigated with 250 mM NaCl and the leaves were harvested at different times as indicated in the legend to figure 5. Controls were treated in the same manner but H_2O was supplied to the cultures instead of the NaCl solution.

15 Example 2: Yeast strains and culture conditions

The *Saccharomyces cerevisiae* strain JM26 (*MATa leu 2-3,112 ura 3-1 trp1-1, ade 2-1 his3-11,15 can 1-100, ena 1-4::HIS3, nha1::TRP1*) provided by J.M. Mulet (Universidad Politécnica de Valencia, Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas) was used for the screening of the sugar beet cDNA library and characterization of the *CKA2* cDNA clone. Strain JM26 is a derivative of W303.1A (Wallis *et al.* 1989) with null mutations of the genes *ENA1-4* and *NHA1*, encoding a Na^+ -pumping ATPase and a Na^+/H^+ antiporter, respectively, responsible for most of the yeast sodium extrusion (Garcia-deblas *et al.* 1993, Bañuelos *et al.* 1998). The CK2 temperature sensitive mutant strain YDH8 (*MATa cka1-Δ1::HIS 3 cka2-Δ1::TRP1 ade2-101^{ochre} his3-Δ200 leu2-Δ1 lys2-801^{amber} trp1-Δ1 ura 3-52* [pDH8: *LEU2 cka2-8*]) was a kind gift of Dr. C.V.C. Glover, University of Georgia (Hanna *et al.* 1995).

Yeast were grown in either minimal synthetic glucose medium (SD) or rich medium (YPD). SD medium contained 2% glucose, 0.7% yeast nitrogen base without amino acids and 50 mM succinic acid, adjusted to pH 5 with Tris, plus the required amino acids [100 μg/ml leucine, 30 μg/ml adenine, 100 μg/ml methionine] as indicated. YPD medium contained 1% yeast extract, 2% Bacto peptone and 2% glucose. Media were supplemented with NaCl as indicated. Solid media contained 2% bacteriological-grade agar.

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

54

Example 3: Construction of a sugar beet cDNA library induced by salt stress

Directional cDNAs were synthesized (cDNA synthesis kit, Stratagene) using poly(A)⁺ RNA prepared from leaves of salt-treated sugar beet plants. cDNAs were ligated into phage λPG15 vector and packaged using a Gigapack III gold packaging extract (Stratagene).

- 5 This phage has inserted the excisable expression plasmid pYPGE15 (*URA3* as a selection marker) that is usable directly for both *Escherichia coli* and yeast complementation (Brunelli and Pall, 1993). A plasmid cDNA library was recovered from λPG15 by the *cre-lox* recombinase system (Brunelli and Pall, 1993).

10 **Example 4: screening and isolation of cDNA clones conferring salt tolerance to yeast**

To screen for sugar beet cDNAs which increase salt tolerance in yeast, the cDNA library constructed in pYPGE15 was used to transform the yeast mutant strain JM26 by the LiCl method (Gietz *et al.* 1992). Transformants selected on SD plates with leucine and adenine
 15 by uracil prototrophy were pooled and replated on screening medium (SD with leucine, adenine and methionine supplemented with 0.15 M NaCl) at a density of 2×10^5 cells per plate (12x12 cm). Methionine was added to the selective medium to avoid selection of the *HAL2*-like homologues already found in *Arabidopsis* (Quintero *et al.* 1996, Gil-Masorell *et al.* 1999). Alternatively, for the selection of Li⁺ resistant yeast cells, the transformants
 20 were replated on screening medium (SD with leucine and adenine supplemented with 20 mM LiCl). The putative positive clones were rescreened on the same NaCl or LiCl medium.

One of the confirmed NaCl tolerant clones, clone 154, was selected for further characterization. Plasmid DNA was isolated from the 154 yeast cells (pYPGE15+154) and
 25 reintroduced into JM26 to confirm that it conferred salt tolerance. Selection against the *URA3*-marked plasmid using fluorotic acid restored the salt sensitivity of the yeast cells. The insert of pYPGE15+154 was directly sequenced by the dye-primer cycle sequencing method using a DNA sequencer (Model ABI 377, PE Biosystems). After identifying the insert as subunit alpha of CK2 (see below) it was renamed as pYPGE15+BvCKA2.

30

Example 5: Cloning of the yeast CKA2 gene

The *Saccharomyces cerevisiae* CKA2 gene was PCR-isolated from genomic DNA. The amplification was performed with Pwo DNA polymerase (Roche Molecular Biochemicals) and the primers were designed according to the sequence of the genomic clone
 35 (GenBank Accession number: M33759). The sequence of the primers (*Eco* RI-*Xho* I sites underlined) is the following:

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

55

Forward primer 5'-ATGGATTAGAAATTCATAGAGTTGTAAGGTCTCAGGG-3' (SEQ ID NO 11) and reverse primer 5'-CCTCAGTTCTCGAGTTTATAAATGGAAATCAGTGGTGG-3' (SEQ ID NO 12).

- The 1.1 kb PCR-amplified product was *Eco* RI- *Xho* I digested and directionally cloned into the yeast expression vector pYPGE15. This construct, named pYPGE15+ScCKA2, was used to transform the yeast strain JM26 (Gietz *et al.* 1992). Sequence analysis confirmed that the insert contained in the pYPGE15 plasmid was the yeast gene *CKA2*.

Example 6: Complementation studies of the CKA2 yeast mutant

- As casein kinase 2 catalytic subunit genes (*CKA1* and *CKA2*) are essential for yeast viability, the *ck2* mutant strain YDH8 (*cka1 cka2*) carries the centromeric plasmid pDH8 (*LEU2* marker) coding for a temperature sensitive allele of the catalytic subunit (*cka2-8*). This construct allows cells to grow at 25°C but not at the restrictive temperature of 37°C (Hanna *et al.* 1995). Plasmid pYPGE15+BvCKA2 was introduced into the YDH8 strain by transformation. Afterwards, plasmid pDH8 was removed from YDH8 by growing cells in rich medium to allow plasmid loss and selecting for leucine auxotrophy. Growth of yeast cells at 25 and 37 °C was investigated.

Example 7: Salt tolerance tests and measurements of intracellular ion concentrations

- Yeast cultures were pregrown in liquid SD medium with leucine and adenine. Aliquots of saturated cultures were diluted (1:10) and spotted with an 8 x 6 stainless steel replica plater (SIGMA St. Louis, Mo.) on plates containing the indicated concentrations of salts. For measurements of intracellular ion concentrations 10 ml of yeast culture grown to exponential phase in SD plus leucine, adenine, methionine and 75 mM NaCl (absorbance of 0.7 at 660 nm measured with Spectronic 20D; Milton Roy, Rochester N.Y.) were centrifuged, washed three times by resuspension in ice-cold 10 mM MgCl₂ and finally resuspended in 1 ml of 10 mM MgCl₂. Cell concentration was determined by the absorbance at 660 nm, and intracellular ions were extracted by addition of concentrated HCl to a 0.1 M final concentration. After removal of cell debris by centrifugation, K⁺ and Na⁺ concentrations in the supernatant were determined by atomic absorption spectrometer (Varian) in flame emission mode. Intracellular water was estimated as previously described (Gaxiola *et al.* 1992).

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

56

Example 8: Southern and Northern blot analyses

Genomic DNA was prepared from leaves of 3 week old sugar beet according to Rogers and Bendich (1994). Five µg of DNA were digested with appropriate restriction enzymes, electrophoresed in 0.8 % agarose gel and blotted onto a nylon membrane filter (Hybond N+, Amersham Life Science). The membrane filter was hybridized with two different ³²P-labeled DNA probes. One of them corresponded to a 887 bp PCR amplified fragment (forward primer, 5'-CGAAGCTCTCACTGTTCAATGG-3' (SEQ ID NO 13) and reverse primer, 5'-GGATGTGCCATTG CTTCTTTTGC-3' (SEQ ID NO 14)) including in the coding region of *BvCKA2* cDNA. A second more specific fragment of 323 bp (forward primer, 5'-CTCTCAAGTTAGAGCTGCAGA-3' (SEQ ID NO 15) and reverse primer, 5'-GCTATTAGCAAACTATATTAAGTG-3' (SEQ ID NO 16)) includes the 3' non-coding region of *BvCKA2* cDNA. Hybridization and washes were carried out under high-stringency conditions (65° C) according to Church and Gilbert (1984).

For Northern blot analysis total RNA was isolated from control or Na⁺-treated sugar beet leaves as described by Davis *et al.* (1998). Thirty µg of total RNA were separated on a 1% agarose gel containing 2.2% formaldehyde and blotted onto a nylon membrane filter (Hybond N, Amersham Life Science). Hybridization was carried out with the 3'UTR specific probe of 323 bp described above for the Southern blotting. The filter was washed twice with SSC 4X, 0.1 % SDS for 5 min and twice with SSC 0.4X, 0.1 SDS for 5 min at 65° C. The same filter was rehybridized with a 1.9 Eco RI fragment comprising the α_2 tubulin gene of *Arabidopsis* (Ludwig *et al.* 1987). Hybridization and wash temperatures were reduced to 55° C for this heterologous probe.

Example 9: Rice transformation with the sugar beet genes

Expression of sugar beet genes involved in salt tolerance in yeast in rice mediating stress tolerance in rice.

To investigate the stress tolerance activation of the sugar beet stress tolerance genes in monocots, the aforementioned genes (SEQ ID NO. 1 – 5), operably linked to a promoter, are each transformed to rice using the standard transformation procedures well known to the persons skilled in the art and outlined in the following paragraph. After several time periods ranging from 1 day to 1 or more weeks, the seedling is checked for the expression of the transformed gene. This is done by growing the seedlings in organogenesis medium, and checking the presence of the DNA or mRNA by PCR or reverse PCR. After the confirmation of gene expression the transformed rice plants are checked for the enhanced tolerance to stress situations including salt, drought and cold (see WO97/13843). This is done by growing the transformed rice plants in medium containing

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

57

increased amounts of NaCl or LiCl. Also the increased resistance to cold or drought is tested by growing the transformed plants in suboptimal growing temperatures and suboptimal levels of humidity, respectively (WO97/13843).

5 Agrobacterium-mediated rice transformation

The sugar beet genes of the present invention can be operably linked to a promoter and cloned into a vector. These vectors can be transformed to *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 or C58 by means of electroporation and subsequently transformed bacterial cells can be selected on a solid agar medium containing the appropriate antibiotics.

For demonstration of the expression of the genes of current invention in rice, 309 mature dry seeds of the rice japonica cultivars Nipponbare or Taipei are dehusked, sterilised and germinated on a medium containing 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). After incubation in the dark for four weeks, embryogenic, scutellum-derived calli are excised and propagated on the same medium. Selected embryogenic callus is then co-cultivated with *Agrobacterium*. Co-cultivated callus is grown on 2,4-D-containing medium for 4 to 5 weeks in the dark in the presence of a suitable concentration of the appropriate selective agent. During this period, rapidly growing resistant callus islands develop. After transfer of this material to a medium with a reduced concentration of 2,4-D and incubation in the light, the embryogenic potential is released and shoots develop in the next four to five weeks. Shoots are excised from the callus and incubated for one week on an auxin-containing medium from which they can be transferred to the soil. Hardened shoots are grown under high humidity and short days in a phytotron. Seeds can be harvested three to five months after transplanting. The method yields single locus transformants at a rate of over 50 % (Chan *et al.* 1993, Hiei *et al.* 1994).

Example 10: Transformation of *Arabidopsis* with *Beta vulgaris* CKA2 gene

The tolerance to NaCl of transgenic plants expressing 154cDNA (*BvCKA2*) was studied. *Arabidopsis thaliana* plants (Ecotype Columbia) were transformed either with the empty plasmid pBI121 (CLONTECH) or pBI121*BvCKA2* expressing the sugar beet CK2 protein kinase catalytic subdomain (SEQ ID Nr. 6). *BvCKA2* cDNA was inserted between the BamHI and Sac I sites of pBI121. The constructs were introduced into *Agrobacterium tumefaciens* C58Rif^R Rif strain (Van Larebeke *et al.* 1974). This strain was used to transform *Arabidopsis* plants by the floral dipping method.

The effect of NaCl on plant survival was determined *in vitro* and in greenhouse experiments.

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

58

In vitro experiments.

Seeds were grown in plates with MS medium plus 100 or 125 mM NaCl. Survival was determined as the number of seedlings that developed cotyledons and/or true leaves.

- 5 Results are shown in figure 7 and 8. These results clearly show that the *Arabidopsis* plants transfected with the cDNA having a nucleic acid sequence as represented in SEQ ID NO 1, encoding a the *Beta vulgaris* casein kinase α subunit having an amino acid sequence as represented in SEQ ID NO 6 of the present invention, clearly have an enhanced survival rate in salt stress conditions, when compared to wild type plants.

10

Greenhouse experiments.

Plants were sown on pots containing a mixture of soil and vermiculite (2:1). The plants were grown as previously described (Kanhonou *et al.* 2001). Tolerance to 50 mM NaCl of control plants (Wild type plants and plants transformed with the empty plasmid) and plants overexpressing *BvCKA2* was determined as the percentage of adult plants per sowed plants (Table 5). The dry weight was also determined (Table 5). The data are the mean \pm SD.

15

TABLE 5.

PLANT	Control Medium			50 mM NaCl		
	% Adult plants/Sowed plants	Shoot weight (mg/plant)	dry	% Adult plants/Sowed plants	Shoot weight (mg/plant)	dry
Control WT	93 \pm 3	103 \pm 8		46 \pm 5	32 \pm 7	
Transgenic Control	89 \pm 6	84 \pm 27		48 \pm 4	33 \pm 10	
TBvCKA2,1	90 \pm 3	96 \pm 11		52 \pm 1.5	33 \pm 10	
TBvCKA2,2	93 \pm 11	115 \pm 11		58 \pm 2	47 \pm 3	
TBvCKA2,3	90 \pm 6	110 \pm 10		62 \pm 4	45 \pm 3	

20

Example 11: The use of *BvCKA2* gene for controlling the flowering independently of the photoperiod.

CK2 has recently been described as a Quantitative trait loci (QTL) involved in controlling flowering time (Takahashi *et al.* 2001). Specifically CK2 seems to be involved in controlling photoperiod sensitivity.

25

WO 02/052012

59

PCT/EP01/15093

The inventors observed that the transgenic Arabidopsis plants as described in example 10 have a delay in the flowering time. This phenotype has a practical use, since growers are interested in controlling the process of flowering independently of the photoperiod. Delays or advances of flowering time is regulated by controlling the level of expression of CK2, or
5 by modulating the activity of the CK2 protein in a plant cell or by using mutants of this protein.

Example 12: Functional characterization of BvelF-1A

The *Saccharomyces cerevisiae* yeast strain JM26 (Kanhonou *et al.* 2001) was transformed with either the empty plasmid pYPGE15 (Brunelli and Pall 1993) or
10 76pYPGE15. Plasmid 76pYPGE15 carries a *Beta vulgaris* cDNA coding for the translation initiation factor e-IF1A. The incorporation of radioactive phenylalanine into yeast proteins was determined in liquid culture as described (Pascual Ahuir *et al.* 2001). The experiment was done in the presence (pYPGE15-300mM NaCl, 76pYPGE15- 300mM NaCl) or
15 absence (pYPGE15, 76pYPGE15) of 300 mM NaCl. Results are shown in Figure 9. These results show clearly in the absence of NaCl the transgenic yeast carrying the BvelF-1A incorporate less phenylalanin compared to the cells transformed with the empty vector. On the contrary, when the yeast cells are put under severe salt stress conditions it is clear that protein synthesis occurs much better in the yeast cells transformed with the BvelF-1A.
20

WO 02/052012

60

PCT/EP01/15093

REFERENCES

- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., & Watson J.D. (1994) Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing Inc..
- Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389-3402.
- 5 An G., Watson B.D., Stachel S., Gordon M.P., & Nester E.W. (1985) New cloning vehicles for transformation of higher plants. *EMBO J.* **4**, 277-284.
- Apse M.P. et al (1999) Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in Arabidopsis. *Science* **285**, 1256-1258.
- Armstrong C.L., Petersen W.P., Buchholz W.G., Bowen B.A., & Sulc S.L. (1990) Factors affecting PEG-mediated stable transformation of maize protoplasts. *Plant Cell Reports* **9**, 335-339.
- 10 Bañuelos et al. (1996) *Microbiology* **144**, 2749-2758.
- Baron M.H. & Baltimore D. (1982) Antibodies against the chemically synthesized genome-linked protein of poliovirus react with native virus-specific proteins. *Cell* **28**, 395-404.
- 15 Bartel P.L. & Fields S. (1997) The Yeast Two-Hybrid System. Oxford University Press.
- Bechtold N. & Pelletier G. (1998) In planta Agrobacterium-mediated transformation of adult Arabidopsis thaliana plants by vacuum infiltration. *Methods Mol.Biol.* **82**, 259-266.
- Benaroudj et.al. (2001) Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals. *J. Biol. Chem.* **276**(26), 924261-24267.
- 20 Bidwai et al. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 10395-10404.
- Brunelli & Pall (1993) *Yeast* **9**, 1309-1318.
- Chan et al. (1993) *Plant Mol. Biol.* **22**, 491-506.
- 25 Cho R.J., Mindrinos M., Richards D.R., Sapolsky R.J., Anderson M., Drenkard E., Dewdney J., Reuber T.L., Stammers M., Federspiel N., Theologis A., Yang W.H., Hubbell E., Au M., Chung E.Y., Lashkari D., Lemieux B., Dean C., Lipshutz R.J., Ausubel F.M., Davis R.W., & Oefner P.J. (1999) Genome-wide mapping with biallelic markers in Arabidopsis thaliana. *Nat.Genet.* **23**, 203-207.
- 30 Church & Gilbert (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 1991-1318.
- Christou P., McCabe D.E., & Swain W.F. (1988) Stable transformation of soybean callus by DNA-coated gold particles. *Plant Physiol.* **87**, 671-674.

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

61

- Crossway A., Oakes J.V., Irvine J.M., Ward B., Knauf V.C., & Shewmaker C.K. (1986) Integration of foreign DNA following microinjection of tobacco mesophyll protoplasts. *Mol.Gen.Genet.* **202**, 179-185.
- Davis et al. (1998) Basic methods in molecular biology. *Elsevier* p143.
- 5 Dodds J.H. (1985) Plant genetic engineering. Cambridge University Press.
- Donald & Cashmore (1990) *EMBO J.* **9**, 1717-1726.
- Ellis J.G., Llewellyn D.J., Dennis E.S., & Peacock W.J. (1987) Maize Adh-1 promoter sequences control anaerobic regulation: addition of upstream promoter elements from constitutive genes is necessary for expression in tobacco. *EMBO J.* **6**, 11-16.
- 10 Espunya et al. (1999) *Plant J.* **19**, 655-666.
- Fromm M., Taylor L.P., & Walbot V. (1985) Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **82**, 5824-5828.
- Garcia-deblas et al. (1993) *Mol. Gen. Genet.* **236**, 363-368.
- Gaxiola R. et al. (1992) A novel and conserved salt-induced protein is an important determinant of salt tolerance in yeast. *EMBO J.* **11**, 3157-3164.
- 15 Gietz et al. (1992) *Nucleic Acids Res.* **20**, 1425.
- Gil-Mascarell et al. (1999) *Plant J.* **17(4)**, 373-383.
- Glover C.V. (1998) *Prog. Nucleic acid research* **59**, 96-133.
- Grein et al. (1999) *Mol. Cell. Biochem.* **191**, 105-109.
- 20 Hanahan D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J.Mol.Biol* **166**, 557-580.
- Hanks et al. (1995) *FASEB J.* **9**, 576-596.
- Hanna et al. (1995) *J. Biol. Chem.* **270(43)**, 25905-25914.
- Hansen G. & Chilton M.D. (1996) "Agrolistic" transformation of plant cells: integration of T-strands generated in planta. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**, 14978-14983.
- 25 Hansen G., Shillito R.D., & Chilton M.D. (1997) T-strand integration in maize protoplasts after codelivery of a T-DNA substrate and virulence genes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**, 11726-11730.
- Hanson B., Engler D., Moy Y., Newman B., Ralston E., & Gutterson N. (1999) A simple method to enrich an *Agrobacterium*-transformed population for plants containing only T-DNA sequences. *Plant J.* **19**, 727-734.
- 30 Harlow E. & Lane D. (1988) Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

62

- Hasegawa, P.M. et al. (2000a). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **51**, 463-499.
- Hasegawa et al. (2000b) *Trends Plant Sci.* **5(8)**, 317-9.
- 5 Hasegawa J., Siemerling K.R., Prasher D.C., & Hodge S. (1997) Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic Arabidopsis plants brightly. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**, 2122-2127.
- Hellens R.P., Edwards E.A., Leyland N.R., Bean S., & Mullineaux P.M. (2000) pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Plant Mol.Biol.* **42**, 819-832.
- 10 Herrera-Estrella L., De Block M., Messens E.H.J.P., Van Montagu M., & Schell J. (1983a) Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells. *EMBO J.* **2**, 987-995.
- Herrera-Estrella L., Depicker A., Van Montagu M., & Schell J. (1983b) Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *Nature* **303**, 209-213.
- 15 Hiei Y., Ohta S., Komari T., & Kumashiro T. (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J.* **6**, 271-282.
- Joung J.K., Ramm E.I., & Pabo C.O. (2000) A bacterial two-hybrid selection system for studying protein-DNA and protein-protein interactions. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**, 7382-7387.
- 20 Kanhonou et al. (2001) *Plant Mol. Biol* **47**, 571-579.
- Kenney, M. S. Ray, and T. C. Boles. Mutation typing using electrophoresis and gel-immobilized Acrydite probes. *Biotechniques* **25** (3): 516-521, 1998.
- Krens F.A., Molendijk L., Wullems G.J., & Schilperoort R.A. (1982) *In vitro* transformation of plant protoplasts with Ti-plasmid DNA. *Nature* **296**, 72-74.
- 25 Langemeier J.L., Cook R.F., Issel C.J., & Montelaro R.C. (1994) Application of cycle dideoxy fingerprinting to screening heterogeneous populations of the equine infectious anemia virus. *Biotechniques* **17**, 484-6, 488, 490.
- Lee et al. (1999) *Plant Physiol.* **119**, 989-1000.
- 30 Lerner R.A. (1982) Tapping the immunological repertoire to produce antibodies of predetermined specificity. *Nature* **299**, 593-596.
- Lerner R.A., Green N., Alexander H., Liu F.T., Sutcliffe J.G., & Shinnick T.M. (1981) Chemically synthesized peptides predicted from the nucleotide sequence of the

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

63

- hepatitis B virus genome elicit antibodies reactive with the native envelope protein of Dane particles. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **78**, 3403-3407.
- Liddle J.E. & Cryer A. (1991) A Practical Guide to Monoclonal Antibodies. Wiley New York.
- 5 Li-Sucholeiki X.C., Khrapko K., Andre P.C., Marcelino L.A., Karger B.L., & Thilly W.G. (1999) Applications of constant denaturant capillary electrophoresis/high-fidelity polymerase chain reaction to human genetic analysis. *Electrophoresis* **20**, 1224-1232.
- Löffler J., Langui D., Probst A., & Huber G. (1994) Accumulation of a 50 kDa N-terminal fragment of beta-APP695 in Alzheimer's disease hippocampus and neocortex.
- 10 *Neurochem.Int.* **24**, 281-288.
- Ludwig et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 5833-5837.
- Magyar Z., Meszaros T., Miskolczi P., Deak M., Feher A., Brown S., Kondorosi E., Athanasiadis A., Pongor S., Bilgin M., Bako L., Koncz C., & Dudits D. (1997) Cell cycle phase specificity of putative cyclin-dependent kinase variants in synchronized alfalfa cells. *Plant Cell* **9**, 223-235.
- 15 Marschner (1995) Mineral nutrition of higher plants. Springer, Berlin.
- Matthias K. et al. (1996) Salt stress induces an increased expression of V-type H⁺-ATPase in mature sugar beet leaves. *Plant Mol. Biol.* **32**(3), 543-547.
- McCallum C.M., Comai L., Greene E.A., & Henikoff S. (2000a) Targeting induced local lesions IN genomes (TILLING) for plant functional genomics. *Plant Physiol* **123**, 439-442.
- McCallum C.M., Comai L., Greene E.A., & Henikoff S. (2000b) Targeted screening for induced mutations. *Nat.Biotechnol.* **18**, 455-457.
- Merrifield R.B. (1963) Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide.
- 25 *J.Amer.Chem.Soc.* **85**, 2149-2154.
- Mizoguchi et al. (1995) *FEBS Lett.* **358**, 199-204.
- Murakami T., Simonds W.F., & Spiegel A.M. (1992) Site-specific antibodies directed against G protein beta and gamma subunits: effects on alpha and beta gamma subunit interaction. *Biochemistry* **31**, 2905-2911.
- 30 Nadal et al. (1999a) *Eur. J. Biochem* **189**, 251-257.
- Nadal et al. (1999b) *J. Bacteriol.* **181**, 6456-6462.
- Niefind et al. (1998) *EMBO J.* **17**, 2451-2462.
- Padmanabha et al. (1990) *Mol. Cell. Biol.* **10**, 4089-4099.

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

64

- Palmgren G. (1997) Transgenic plants: environmentally safe factories of the future. *Trends Genet.* **13**, 348.
- Pasqual Ahuir et al. (2001) *Mol. Cell. Biol.* **21**, 16-25.
- Paszkowski J., Shillito R.D., Saul M., Mandak V., & Hohn T.H.B.P.I. (1984) Direct gene transfer to plants. *EMBO J.* **3**, 2717-2722.
- Peralta E.G., Hellmiss R., & Ream W. (1986) Overdrive, a T-DNA transmission enhancer on the *A. tumefaciens* tumour-inducing plasmid. *EMBO J.* **5**, 1137-1142.
- Quintero et al. (1996) *Plant Cell* **8**, 529-537.
- Rogers and Bendich (1994) *Plant Mol. Biol. Manual* D1: 1-8.
- Ross P., Hall L., & Haff L.A. (2000) Quantitative approach to single-nucleotide polymorphism analysis using MALDI-TOF mass spectrometry [In Process Citation]. *Biotechniques* **29**, 620-629.
- Russel B. L. (1998) Osmotic stress induces expression of choline monooxygenase in sugar beet and amaranth. *Plant Physiology* **116** (2), 859-865.
- Sambrook J., Fritsch E.F., & Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Semler B.L., Anderson C.W., Hanecak R., Dorner L.F., & Wimmer E. (1982) A membrane-associated precursor to poliovirus VPg identified by immunoprecipitation with antibodies directed against a synthetic heptapeptide. *Cell* **28**, 405-412.
- Serrano (1996) The isolation of genes which upon overexpression increase salt tolerance. *Int. Rev. Cytol.* **165**, 1-52.
- Shi H. et al. (2000) The *Arabidopsis thaliana* gene SOS1 encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. *Proc. Natl Acad Sci USA* **97**, 6896-68901.
- Shioda T., Andriole S., Yahata T., & Isselbacher K.J. (2000) A green fluorescent protein-reporter mammalian two-hybrid system with extrachromosomal maintenance of a prey expression plasmid: Application to interaction screening. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**, 5220-5224.
- Sugano et al. (1998) *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 12362-12366.
- Suggano et al. (1999) *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 11020-11025.
- Syvanen A. C. From gels to chips: "minisequencing" primer extension for analysis of point mutations and single nucleotide polymorphisms. *Hum.Mutat.* **13** (1):1-10, 1999.
- Tamura R.N., Cooper H.M., Collo G., & Quaranta V. (1991) Cell type-specific integrin variants with alternative alpha chain cytoplasmic domains. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **88**, 10183-10187.

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

65

- Tapp, I. L. Malmberg, E. Rennel, M. Wik, and A. C. Syvanen. Homogeneous scoring of single-nucleotide polymorphisms: comparison of the 5'-nuclease TaqMan assay and Molecular Beacon probes. *Biotechniques* **28** (4):732-738, 2000.
- 5 Takahashi et al. (2001) Hd6, a rice quantitative trait locus involved in photoperiod sensitivity, encodes the alpha subunit of protein kinase CK2. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 7922-7.
- Teney & Glover (1999) *Mol. Cell. Biochem.* **191**, 161-167.
- Trieu A.T., Burleigh S.H., Kardailsky I.V., Maldonado-Mendoza I.E., Versaw W.K., Blaylock L.A., Shin H., Chiou T.J., Katagi H., Dewbre G.R., Weigel D., & Harrison M.J.
- 10 (2000) Technical Advance: Transformation of *Medicago truncatula* via infiltration of seedlings or flowering plants with *Agrobacterium*. *Plant J.* **22**, 531-541.
- van Haaren M.J., Sedee N.J., Schilperoort R.A., & Hooykaas P.J. (1987) Overdrive is a T-region transfer enhancer which stimulates T-strand production in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nucleic Acids Res.* **15**, 8883-8897.
- 15 Van Larebeke et al. (1974) *Nature* **252**, 169-170.
- Vidal-Puig A. & Moller D.E. (1994) Comparative sensitivity of alternative single-strand conformation polymorphism (SSCP) methods. *Biotechniques* **17**, 490-2, 494, 496.
- Wallis et al. (1989) *Cell* **58**, 409-419.
- Wang K., Genetello C., Van Montagu M., & Zambryski P.C. (1987) Sequence context of the T-DNA border repeat element determines its relative activity during T-DNA transfer to plant cells. *Mol. Gen. Genet.* **210**, 338-346.
- 20 Woulfe J., Lafortune L., de Nadai F., Kitabgi P., & Beaudet A. (1994) Post-translational processing of the neurotensin/neuromedin N precursor in the central nervous system of the rat--II. Immunohistochemical localization of maturation products. *Neuroscience*
- 25 **60**, 167-181.
- Yoon K., Cole-Strauss A., & Kmiec E.B. (1996) Targeted gene correction of episomal DNA in mammalian cells mediated by a chimeric RNA/DNA oligonucleotide. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **93**, 2071-2076.
- Zhu J.K., (1997) Molecular aspects of osmotic stress in plants. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.*
- 30 **16**, 253-277.

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

66

CLAIMS

1. Use of a *Beta vulgaris* nucleic acid for enhancing stress tolerance in a plant comprising expression of said *Beta vulgaris* nucleic acid characterized in that it confers stress tolerance to yeast cells
- 5 2. Use of a *Beta vulgaris* nucleic acid according to claim 1 wherein said yeast cells are derived from the Na⁺ sensitive yeast strain JM26.
3. Use of a *Beta vulgaris* nucleic acid according to claim 1 or 2 for enhancing osmotic or oxidative stress tolerance to a plant wherein said *Beta vulgaris* nucleic acid confers osmotic or oxidative stress tolerance to said yeast cells.
- 10 4. Use of a *Beta vulgaris* nucleic acid for enhancing osmotic or oxidative stress tolerance in a plant according to any of claims 1 to 3 wherein said *Beta vulgaris* nucleic acid is chosen from:
 - (a) a nucleic acid comprising a DNA sequence as given in any of SEQ ID NOs 1 to 5 or the complement thereof,
 - 15 (b) a nucleic acid comprising the RNA sequence corresponding to any of SEQ ID NOs 1 to 5 or the complement thereof,
 - (c) a nucleic acid specifically hybridizing to the nucleic acid of (a) or (b) under high stringency conditions,
 - (d) a nucleic acid encoding a protein with an amino acid sequence which is at least 93% identical to the amino acid sequence as given in SEQ ID NO 6,
 - 20 (e) a nucleic acid encoding a protein with an amino acid sequence which is at least 80% identical to the amino acid sequence as given in SEQ ID NO 7,
 - (f) a nucleic acid encoding a protein with an amino acid sequence which is at least 89% identical to the amino acid sequence as given in SEQ ID NO 8,
 - 25 (g) a nucleic acid encoding a protein with an amino acid sequence which is at least 75% identical to the amino acid sequence as given in SEQ ID NO 9,
 - (h) a nucleic acid encoding a protein with an amino acid sequence which is at least 65% identical to the amino acid sequence as given in SEQ ID NO 10,
 - (i) a nucleic acid encoding a protein comprising the amino acid sequence as given in any of SEQ ID NOs 6 to 10,
 - 30 (j) a nucleic acid encoding an immunologically active and/or functional fragment of a protein encoded by a DNA sequence as given in any of SEQ ID NOs 1 to 5,
 - (k) a nucleic acid which is degenerated to a nucleic acid as given in any of SEQ ID NOs 1 to 5, or which is degenerated to a nucleic acid as defined in any of (a) to (j) as a result of the genetic code,
 - 35

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

67

- (l) a nucleic acid which is diverging from a nucleic acid encoding a protein as given in any of SEQ ID NOs 6 to 10, or which is diverging from a nucleic acid as defined in any of (a) to (j) as a result of differences in codon usage between organisms,
- (m) a nucleic acid which is diverging from a nucleic acid encoding a protein as given in any of SEQ ID NOs 6 to 10, or which is diverging from a nucleic acid as defined in any of (a) to (j) as a result of differences between alleles, and
- (n) a nucleic acid as defined in any one of (a) to (m) characterized in that said nucleic acid is DNA, cDNA, genomic DNA or synthetic DNA.
5. A method for enhancing stress tolerance in a plant comprising the expression or altering the expression of any nucleic acid as defined in claim 4 in cells, tissues or parts of said plant.
6. A method for enhancing stress tolerance in a plant comprising the expression or altering the expression of a nucleic acid encoding a casein kinase alpha subunit in cells, tissues or parts of said plant.
7. A method according to claim 6 wherein said nucleic acid encodes a casein kinase alpha subunit as defined in claim 4, or a homologue, an orthologue or a paralogue thereof.
8. A method for enhancing stress tolerance in a plant comprising the expression or altering the expression of a nucleic acid encoding a dihydroorotase in cells, tissues or parts of said plant.
9. A method according to claim 8 wherein said nucleic acid encodes a dihydroorotase as defined in claim 4, or a homologue, an orthologue or a paralogue thereof.
10. A method for enhancing stress tolerance in a plant comprising the expression or altering the expression of a nucleic acid encoding a translation initiation factor 1A in cells, tissues or parts of said plant.
11. A method according to claim 10 wherein said nucleic acid encodes a translation initiation factor 1A as defined in claim 4, or a homologue, an orthologue or a paralogue thereof.
12. A method for enhancing stress tolerance in a plant comprising the expression or altering the expression of a nucleic acid as represented by SEQ ID NO 4 or 5, or a homologue, an orthologue or a paralogue thereof.
13. A method according to any of claims 5 to 12 wherein said expression of said nucleic acid occurs under the control of a promoter.
14. A method according to any of claims 5 to 13 wherein said stress is osmotic stress.

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

68

15. A method according to claim 14 wherein said osmotic stress is caused by salt.
16. A method according to claim 14 wherein said osmotic stress is caused by drought.
17. A method according to claim 14 wherein said osmotic stress is caused by frost.
18. A method according to claim 14 wherein said osmotic stress is caused by cold.
- 5 19. A method according to any of claims 5 to 18 wherein said method leads to an increase in yield.
20. An isolated nucleic acid encoding a protein for enhancing osmotic or oxidative stress tolerance to a plant, or an immunologically active and/or functional fragment of such a protein selected from one of the following:
- 10 (a) a nucleic acid comprising a DNA sequence as given in any of SEQ ID NOs 1 to 5 or the complement thereof,
- (b) a nucleic acid comprising the RNA sequence corresponding to any of SEQ ID NOs 1 to 5 or the complement thereof,
- 15 (c) a nucleic acid specifically hybridizing to the nucleic acid of (a) or (b) under high stringency conditions,
- (d) a nucleic acid encoding a protein with an amino acid sequence which is at least 93% identical to the amino acid sequence as given in SEQ ID NO 6,
- (e) a nucleic acid encoding a protein with an amino acid sequence which is at least 80% identical to the amino acid sequence as given in SEQ ID NO 7,
- 20 (f) a nucleic acid encoding a protein with an amino acid sequence which is at least 89% identical to the amino acid sequence as given in SEQ ID NO 8,
- (g) a nucleic acid encoding a protein with an amino acid sequence which is at least 75% identical to the amino acid sequence as given in SEQ ID NO 9,
- (h) a nucleic acid encoding a protein with an amino acid sequence which is at least 25 65% identical to the amino acid sequence as given in SEQ ID NO 10,
- (i) a nucleic acid encoding a protein comprising the amino acid sequence as given in any of SEQ ID NOs 6 to 10,
- (j) a nucleic acid encoding an immunologically active and/or functional fragment of a protein encoded by a DNA sequence as given in any of SEQ ID NOs 1 to 5,
- 30 (k) a nucleic acid which is degenerated to a nucleic acid as given in any of SEQ ID NOs 1 to 5, or which is degenerated to a nucleic acid as defined in any of (a) to (j) as a result of the genetic code,
- (l) a nucleic acid which is diverging from a nucleic acid encoding a protein as given in any of SEQ ID NOs 6 to 10, or which is diverging from a nucleic acid as defined in any of (a) to (j) as a result of differences in codon usage between organisms,
- 35

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

69

- (m) a nucleic acid which is diverging from a nucleic acid encoding a protein as given in any of SEQ ID NOs 6 to 10, or which is diverging from a nucleic acid as defined in any of (a) to (j) as a result of differences between alleles, and
- (n) a nucleic acid as defined in any one of (a) to (m) characterized in that said nucleic acid is DNA, cDNA, genomic DNA or synthetic DNA.
- 5 21. A nucleic acid molecule of at least 15 contiguous nucleotides in length specifically hybridizing with a nucleic acid of claim 20.
22. A nucleic acid molecule of at least 15 contiguous nucleotides in length specifically amplifying a nucleic acid of claim 20.
- 10 23. A vector comprising a nucleic acid sequence according to claim 20.
24. A vector according to claim 23 which is an expression vector wherein said nucleic acid sequence is operably linked to one or more control sequences allowing the expression of said sequence in prokaryotic and/or eukaryotic host cells.
25. A host cell containing a nucleic acid molecule according to claim 20 or a vector
- 15 according to claim 23 or 24.
26. A host cell according to claim 25, wherein the host cell is a bacterial, insect, fungal, yeast, plant or animal cell.
27. An isolated polypeptide encodable by a nucleic acid of claim 20, or a homologue or a derivative thereof, or an immunologically active and/or functional fragment thereof.
- 20 28. A polypeptide of claim 27 having an amino acid sequence as given in any of SEQ ID NOs 6 to 10, or a homologue or a derivative thereof, or an immunologically active and/or functional fragment thereof.
29. A method for producing a polypeptide of claim 27 or 28 comprising culturing a host cell of claim 25 or 26 under conditions allowing the expression of the polypeptide and
- 25 recovering the produced polypeptide from the culture.
30. An antibody specifically recognizing a polypeptide of claim 27 or 28 or a specific epitope of said polypeptide.
31. A method for the production of altered plant cells, plant tissues or plants comprising the introduction of a polypeptide of claim 27 or 28 directly into said plant cell or tissue or in an organ of said plant.
- 30 32. A method for effecting the expression of a polypeptide of claim 27 or 28 comprising the introduction of a nucleic acid molecule of claim 20 operably linked to one or more control sequences or a vector of claim 23 or 24 stably into the genome of a plant cell.

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

70

33. A method for the production of transgenic plant cells, plant tissues or plants comprising the introduction of a nucleic acid of claim 20 in an expressible format or a vector of claim 23 or 24 in said plant cell, plant tissue or plant.
- 5 34. A method for enhancing osmotic or oxidative stress tolerance in a plant cell, tissue or plant comprising the introduction of any nucleic acid as identified in any of claims 5 to 13 into said plant cell, tissue or organ of said plant
35. A method according to any of claims 32 to 34 further comprising regenerating a plant from said plant cell.
- 10 36. A transgenic plant cell comprising a nucleic acid of claim 20 which is operably linked to regulatory elements allowing transcription and/or expression of said nucleic acid in plant cells or a transgenic plant cell obtainable by a method of claim 33.
37. A transgenic plant cell of claim 36 wherein said nucleic acid of claim 20 is stably integrated into the genome of said plant cell.
- 15 38. A transgenic plant or plant tissue comprising plant cells of claim 36 or 37 or a transgenic plant obtainable by the method of claim 35.
39. A transgenic plant of claim 38 which displays increased tolerance to stress, preferably osmotic or oxidative stress, compared to the corresponding wild type plant.
40. A harvestable part of a plant of claim 38 or 39.
- 20 41. The harvestable part of a plant of claim 40 which is selected from the group consisting of seeds, leaves, fruits, stem cultures, rhizomes and bulbs.
42. The progeny derived from any of the plants or plant parts of any of claims 38 to 41.
43. A method for identifying and obtaining proteins interacting with a polypeptide of claim 27 or 28 comprising a screening assay wherein a polypeptide of claim 27 or 28 is used.
- 25 44. The method of claim 43 comprising a two-hybrid screening assay wherein a polypeptide of claim 27 or 28 as a bait and a cDNA library as prey are used.
45. A method for modulating the interaction between a polypeptide of claim 27 or 28 and interacting protein partners obtainable by a method according to claim 43 or 44.
- 30 46. A method for identifying and obtaining compounds interacting with a polypeptide of claim 27 or 28 comprising the steps of:
- (a) providing a two-hybrid system wherein a polypeptide of claim 27 or 28 and an interacting protein partner obtainable by a method according to claim 43 and 44 are expressed,

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

71

- (b) interacting said compound with the complex formed by the expressed polypeptides as defined in a), and,
 - (c) performing measurement of interaction of said compound with said polypeptide or the complex formed by the expressed polypeptides as defined in (a).
- 5 47. A method for identifying compounds or mixtures of compounds which specifically bind to a polypeptide of claim 27 or 28, comprising the steps of:
- (a) combining a polypeptide of claim 27 or 28 with said compound or mixtures of compounds under conditions suitable to allow complex formation, and,
 - (b) detecting complex formation, wherein the presence of a complex identifies a
- 10 compound or mixture of compounds which specifically binds said polypeptide.
48. Use of a compound or mixture of compounds identified by means of a method of claim 46 or 47 as a factor that enhances stress tolerance in plants.
49. Use of a nucleic acid of claim 20, a vector of claim 23 or 24, a polypeptide of claim 27 or 28 for increasing yield.
- 15 50. Use of a nucleic acid molecule of claim 20, a vector of claim 23 or 24, a polypeptide of claim 27 or 28 for stimulating plant growth, which can be in any part of that plant, such as root, leaf or seed.
51. Diagnostic composition comprising at least a nucleic acid of claim 20, a vector of claim 23 or 24, a polypeptide of claim 27 or 28 or an antibody of claim 30.
- 20 52. Use of a plant obtainable by a method of claim 31 or 32 or the plant of claim 38 or 39 for culturing on soil with a salt content of more than 1mM salt ions.
53. A method for controlling the process of flowering of a plant comprising the expression or altering the expression of a nucleic acid encoding a casein kinase alpha subunit represented by SEQ ID NO 6 in cells, tissues or parts of said plant.
- 25 54. Use of a nucleic acid encoding a casein kinase alpha subunit represented by SEQ ID NO 6 for controlling the process of flowering of a plant.

FIGURE 1

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

2/12

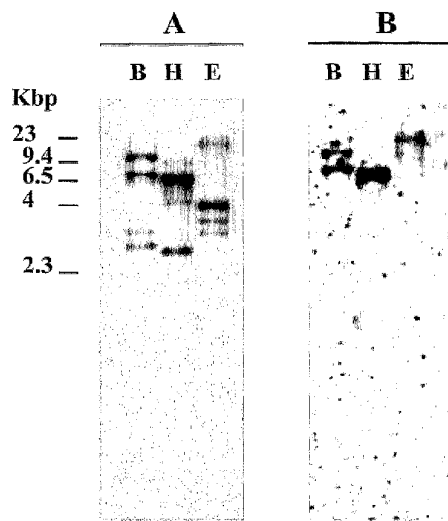


FIGURE 2

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

3/12

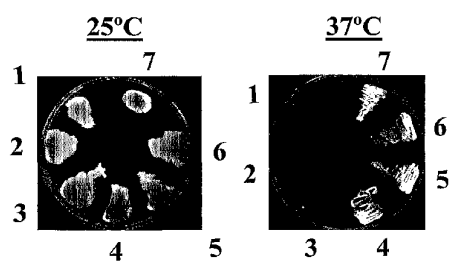


FIGURE 3

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

4/12

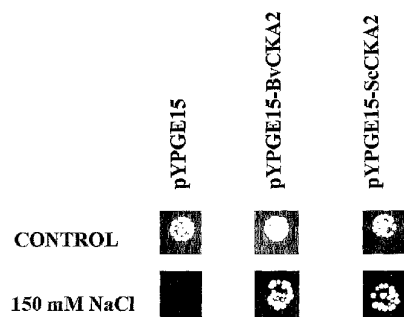


FIGURE 4

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

5/12

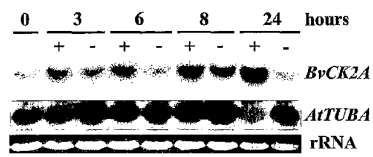


FIGURE 5

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

6/12

Figure 6 :

SEQ ID NO 1 : DNA sequence of the red beet gene clone 154 BvCK2 (casein kinase α catalytic subunit)

```
GAATTCGGCACGAGGAAATTTGAGATTGTCGGGTTCACTCCTCTTCACTACTAATCTTTT
TCCATCTTCTCTCTCACTGCTTACTGTGCGCACTCCTTGCTCTCCGTGCACCGCTGGCC
ATCCTCTATCTTGGCCCATCAACCTAAATTTGCGCCGCTAAATTTGAGATCTCCGCC
GACGCAAAATTTCTCGATGTCGAAGTCGCGAGTTTACGCCGACGTTAATGTTCTCCGACCTCG
AGAGTACTGGGATTACGAAGCTCTCACTGTTCAATGGGGTGATCAAGATGACTATGAAGTCG
TGCGGAAGATTGGAAGGGGAAATACAGTGAAGTTTGAAGGATTAAACGTCATATGATTAAT
GAACGATCGGTTATCAAGATCTGAAACCTGTGAAGGAGAAAAAGATCAAAAGAGAGATAAA
AATCCTTCAGAAACCTATGTGGGGACCAACGTCATAAAGCTGCTTGATATCGTCAGGGATC
AGCACTCCAAAACACCAAGCTTAGTTTGTAGCTTTGTCAACAGTACAGATTTCAAGTTCTG
TATCCAAAGTTATCTGATTATGACATACGTTATTACATCTATGAGCTTCTGAAGGCTTAGA
TTTCTGCCATTCAAGGGATTAATGACCGAGATGTCAAGCCTCATAATGTAATGATAGACC
ATGAAATTGAGGAAATCCGGTTAATAGATTGGGGTCTGGCAGAGTTCTACCATCCAGGGAAG
GAATACAATGTTGCTGTGGCTTCGAGATACTTAAAGGGCCGGAACTTCTTGTTGATTTACA
AGACTATAGCTATTCTTGGACATCTGGAGCCTTGGTTGCATGTTGCTGGGATGATTTTCC
GGAAAGAACCTTCTTATGTTCAAGACCAACATGATCAGCTTGTAAATTTGCTAAGSTA
CTTGGAAACAGATGAATGAATGCTTATTTGAACAAGTATCATTTGGAGCTTGATCTCAACT
TGATGCTCTTGTGGAAAGGACAGCAGGAAGCCATGTTCAAGATTGTTAATCCGATAATC
AGCATTTAGTTTCCCTTGAGGCTATTGACTTCTTGATAAGCTTCTTCGCTATGACCAACAG
GATAGGCTTACTGCAAAAGAAAGCAATGGCACATCCTTATTCTCAAGTTAGAGCTGCAGA
GAGTAGCAGAAATGCGGACACAATAGCTCGTCACTCTAATACATCTTGAATGATGATTTTC
CATTTGATAGTTGTTTCAATGTTAAGTCAATGACTGTGTTCCCGTCTTAAACATGCACTACT
TGCAGCCTCAGGTAGACAGCTTTGATTGCGCGGGGAAATTTTATGTAAAATGCAATGATTACT
AGTCTTTCTAAAACGCAATCTGCAATGCCACAACTATTGTACTGCTATTTTAATTGTTG
AAGCCCTCTGTACATCTCCAACTTGGTTGTTCACTTAATATAGTTTGCTAATAGCATCTGTA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

SEQ ID NO 2 : DNA sequence of the red beet gene clone 35 BvDHO (dihydroorotase)

```
AAATTCGGCACGAGCACAGCTCCACTCCTCTTTCTCTCAAGAAGACGAACACACCAATTC
AGATCTGAAGTTTCGTATTTTCTCTCTCTCTTCTCGACATCTTCTCTGCTCGAATTGC
AAGCGTTCCAGGCATCAAAATTTGCTTATCCCGGGTTTGAACACATAACGGACTAAATATC
AAAGCAGTAAAGATGGAACGACTGACTCTTACACGCCCTGATGACTGGCATCTACATCTCCGGA
TGGAGATCTTCTGCTGCTGTGCTCCTCACAGTGAAGACATTTGGAAGGGCAATCGTTA
TGCCGAATCTAAGGCTCTCTGTACTACTACAGGTGCTGCTATTGCTTAACGAAAGTCTATT
ATGGAAGTATGCTGATGATAGCAGCTTCAATCTCTCATGACACTTTATTGACTGATAC
GACCAAGCCCTAATGAGATCAAGCTTGCCAGAAAAAGTGAGGTGTAATGCTGTCAAATTAT
ACCCTGCTGGCSCAACAACTAATTTCTCAGGACGGTCACTGATCTTTAGGAAAGTGTCTG
CCTGTGCTTGAAGAGATGGCTGAGCAAGATATGCTCTTCTGTTCCATGGAGAAGTTACAGA
TCTTGATGTAGATATATTGATCGTGAAAGGTTTATTATTGAGTCAGTTTAAAGACCTTAA
TTCAAGAAATTAACCAAGCTAAAGGTTGTGATGGAACACATCACTACTGCTGATGCTGTCAAG
TTTATTGAGTCTCTTAATCGAGGAATGTPACGAGCCACTGTGAGCCGCGCAGCACTTGTCT
GAATAGAACTCTCTTCCAGGAGGTTGCAACCCGATTAATATTGCTTCTCACTGCTCA
AAAGAGAAATCCATAGACAGGCACTTGTTCAGCGGTAAACCACTGGAGCAAGCAATTTT
CTTGGGACTGATAGTCTCTCATGAAAGCGGAGGAAAGAAATGTTGCTGTGATGTGCTGG
```

AATCTAATCTATCCCTCTGTGCTCTATCATCTATATGCCCAAGATTTTGAAGAGGCGTGGCGCC
TTGTACCAAGTTAGAGCCATTTCAACGCTTTAATAGCCCAAGCTTTCTATGGTCTTCCAGGAAT
AGCTCGAAGGTCAGTTCAGTGA AAAAAGAACAGTGGAAAGCTCTAGAGCGTATACCTTTCCCA
CGGAGAAATAATCTCATTTGTTCTGGCAAAATGCTGACTGGAGAGCCATCTCTTCGAGCTC
ATCTCTCATTCATCTTTACCACTCGCATCTTCCCTCTTTTCAATGCATTTGTGTCTCATGT
TAGAGAAATGTGTACTCTCTGAGCTCAATTTTGTGGGCACTCAGTTTGTGAAGACCTCTTAC
CTTTTCTGAAGAAGAACAGGACCAACAGCTGCTGGATCGAGAGTGTAGTAGAAGGTTTGTG
CTCAATCAAGAAATTCAGATTCTCGAGCTTCAGCACTGTTGCGAGAGTCTCCCCCAATCGAG
CTCTCGCGCGCGCAATCTAGGCTGCTTGCAAGCTCTGGTAGGCTCTAAATTTAGCTGGGTTAT
CTCTTATATCTCTCCCTCTTAATGAAGAAAGCTGGAGCAGATATGAGGAGGAGGAGTAT
CT
TTTTTAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA
AATAAATA

TATGCAACACACACAAACATCAAAACAGAGCTGTTTTTCACAAAATCAGACACCGTCGATC
 TAGGTTGTTTCGTGTAGAGAAAGATGCGGAGAACAAAGGAAGGAGGAAGAAGACAGAC
 AGAGAGGAAGAAATGAACTGATGATGAGAAAGAAGACACTGTTTTCACAAAGAAATGGACAA
 GATGACCGCGAAGTGTGCTGATCTCGTAAATGGCGCTGTGAAGCTATGTCATGCGATT
 TATTAACGCTGTTCGATCATTCGCTGATAGCGACAAAGAAAGCTGGATCGCTCGCTGGT
 GTATTATCTCTGCTGGCTATCTGCGATTATCAGAGTACAGACAGCTGATGTGTCCTAAAGTAT
 ATGCGCAAGTGAAGCCAGCTGCTCTCAAGATCTAGCGCGAGTGGCCAGACACATCAGACATG
 TATGCT
 AAGACAGACACATGATAAGATATAGCAATTAGTGTTCCTTACCAATGCACCTTTCTGCTG
 GACTGTGCACTTATATGTCATCTGTATGTGTTCTCTGGGTGTGATCAATATTGAGTGTAAA
 AAAAAA

TGTCATGTCACCAATCATAGCATATCATCAATGGTCTGTAAGCGAGTTTCAAGACGGTCCGAACAGAG
TTATCTCAAGTGGCCCTAAAGCTGTGAGAAAGATGGGATTAAGTCCAGAGAGGACAGAGCTATTTGG
AAGCAAGTGAAGTGGAGATTCCTATACCCATTACGAGATGTTGGTGCAGGACATGGGTTTTCACAA
GAAATCATCACCCTATGCGGTGGTGACATGTGAACCTCTGTCTCAAGGACAGGAGAAAGCATCT
CTCATCTTTTCAGCAAGCGCGAGATTTCCGTGATCCAGGTGTGACAAAGACCAATCGAAGAGTGT
GTCAACCAAGAGTGGGATGATTTGTGATACCACTTGGCCGGAAGGAAGACAGTGTGAACATGTATAA
GGATCATCTTAACATTACAGAAAGAGTGTGATGATTAAGAAGTTGTGACGACGAGGGCTCTAAGATG
TCTGTGTTTGGATGAGGAATGAAGTGGTTCCGAGACTTCAGAAAGAAAGGTTTGCATGTGCGAG
TGAATCGGATAGGAATGGCAATGACATACATCAAGCCCTCTAGGTCGAGTATTTGTTTGTTATG
ACTAGGTTGTGTGTAGCTATTAGCTTTGTGGAATATAGCTGGTTTGTGTGTGTTTAAATG
TTDRAGGATGAACATATATCTTTTGGGACCTGGAGAGTTCCAGAAAGAGGTTTGTGATGTG
AGTGAACAACTATAGGAATGGCAATGACATTAACCTCAAGCCCTCTATAGTGAAGTATAGTGTG
TGACATTAATCTCTGTAGCCCTTAAGTGTGGCTCTTAAAGTTTAAGGATTTGAACATATCTATATA
ATTGGGACCTTGAAGATGGGACCAATAGATGAATATTGGGG

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

8/12

SEQ ID NO 5 : DNA sequence of the red beet gene clone 20Li Bv20Li (unknown protein)

ATGATGGGTGAAGGTAACAGGGACAAAGAGTAAGAAGAAGAAGAAGAGAGGTGGTGCCTAA
AAGAAGGATGACTGTGAAACAACTTCAGCTTTGAAATCTGTAANTGAATGGGTTATTTGG
CTCAACATCCTGATGAACAAGAGAAGATCAAGAGGATGATTTCTACCTGAAATATGCGC
ATTGCTAGAGTTCTGAGAAATATTGTGTTTGAATGCATCTCATATATTGTCAGTGATGG
GTTTTATCCCTTCTGCTCTGTTGAGAAAGCTCATCAAAATGGGGTGAAAGTCTTGCTT
TGACTGATCATGACACAATGCTGGTATCCCGAGGCCCTGCAAGCGGCCGTAGATTGGT
ATCAAGATTATCCAGGTGTTGAGATCAGTTTCTGCTTCTACTACAAGAGATGAATCTGA
AGCAGAAGAACCAGTTCCATTCCTTGCAATATTATAGCAGCTGTGGACCTGCAAGATTGAAG
AGTAGATCAATTTTGGCCAACTAAGGGACGGACGTACCTCGTGCCAAAAATATGCTC
GCAAACTTGCAGAACTCAAAAAGCCCTCAAGTGGGACGTGTCATAAAGATTGCAGGCAA
TGAGTTGCTCCTGGGAGACTGCATGTAGCTCGTCTTGTGTGGAAGCTGGCCATGTTGAAG
ATCTTAAACAAGCATTCGATCGGTATCTTCAIGATGGGGCCCTGCTTATTCGAAGGGAAGT
GAGCCTTCTGCGGAAGAAGCTGTGCAAAATGGTGTGTAAGCTGGGGGAATAGCTGCTTGGC
ACATCCATGGGCATTAAAAAATCCTTCCCCAGTAGTCAACAGATTGAAGGAGGCGAGTCTT
CATGGAAATGA

SEQ ID NO 6 : amino acid sequence of the red beet gene clone 154 BvCK2 (casein kinase α catalytic subunit)

MSKSRVYADV NVLRPREYWD YEALTVQWGD QDDYEVVRKI GRGKYSEVFE
GLNVNSNERC VKILKPKVK KKIKRBIKIL QNLCSGPNVI KLLDIVRDQH
SKTPSLVFEF VNSTDFKVLV PTLSDYDIRV YIVELLKALD FCHSQGIMHR
DYKPHNVIMD HELRKLRLID WGLAEFYHPG KEYNVRVARS YPKGPHLLVD
LQDYDYSLDM WSLGCMFAGM IFRKEPFYFG HDNHDQLVKI AKVLGTDLELN
AYLNKYHLEL DFLDALVGR HSRKFWRSFV NFDNQLHVSF EADFLDKLL
RYDRQDRLTA KBAMAHFYFS QVRAABSSRM RTQ*

SEQ ID NO 7 : amino acid sequence of the red beet gene clone 35 BvDHO(dihydroorotase)

MELTLTRPDD WHLHLRDGDL LAAVAPH SAR HFGRATVMPN LRFPVTTTGA
AIAYRKSIME VLPDDSDFN P LMTLYLTDTT SPNEIKLARK SEVVYAVKLY
PAGATTNSQD GVTDLGKCL PVL EEMABQD MPLLVHGEVT DEDVDIFDRE
KVFIESVLRP LIQKLPQLKV VMEHITTADA VKFIESCNGG NVAATVTPQH
LVLNRRSLFP GGLQPHNYCL PVLKREIHRQ ALVSAVTS GS KQYPLGTD SA
PHERRRKECS CGCAGIYN SP VALSLYAKVF EEAGALDKLE APTSFNGPDP
YGLPRNTSKI KKKKEPKVKL ERIFPPSGET TPFAGQMLD WKPSF*

SEQ ID NO 8 : amino acid sequence of the red beet gene clone 76 BveIF-1A (translation initiation Factor 1A)

MPKNKGKGGK NRRKGKNEAD DEKRELVPKE DGQBYAQVVR MGNRCCEAT
CIDYVRRLCH IRGKMHKKVW IAGDIIIVG LRDYQDQAD VILKYMPDEA
RLKAYGELP DNIRLNEGVA NLDEEDDGA DDYIEFEDED IDKI*

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

9/12

SEQ ID NO 9 : amino acid sequence of the red beet gene clone 120 Bv120
(putative protein)

MVRKRFDVQ TGIQWAKVLR KVGLGKEDRY FWKQV GKALL CTYAVFGAAM
VYNETSPLGW WTLKPRPKKEE KEIAHLYERR EFYPGDKRA MEEFVTKGGM
IGTTIGPKGT VETDKDSFNY QKALQDKKFE QEAHKLWFRM RNEVVAE LQE
KGF DVE*

SEQ ID NO 10 : amino acid sequence of the red beet gene clone 20Li Bv20Li
(unknown protein)

MMGEGNRDKS KKKKKRGGG KRRMTVEQTS ALKSVNEWVY LAQHAEQEK
IKEDDFLPEI MRIARVSENI VFELHSHTIC SDGFLSPSAL VEKAHQNGVK
VLALTDHDTM SGIPALQAA GRFGIKIIFG VETSSVFSTT RDESRABEPV
HILAYSSCG PARFELDQF LANIRDGRL RAKNMLAKLA KLKKPVKWER
VIKLAGNCVA PGR LHVARAL LEACHVEDLK QAFDRYLHDG GPAYSKGSEP
SAEEAVQWVC KTGGLAVLAH FWALKNPSEV VNRLKGRSS WN*

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

10/12

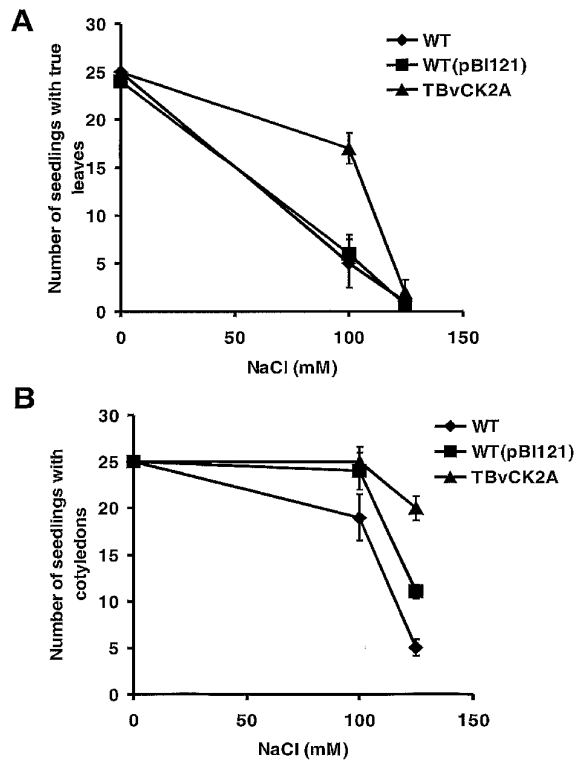


FIGURE 7

MS+100 mM NaCl after 12 days culture

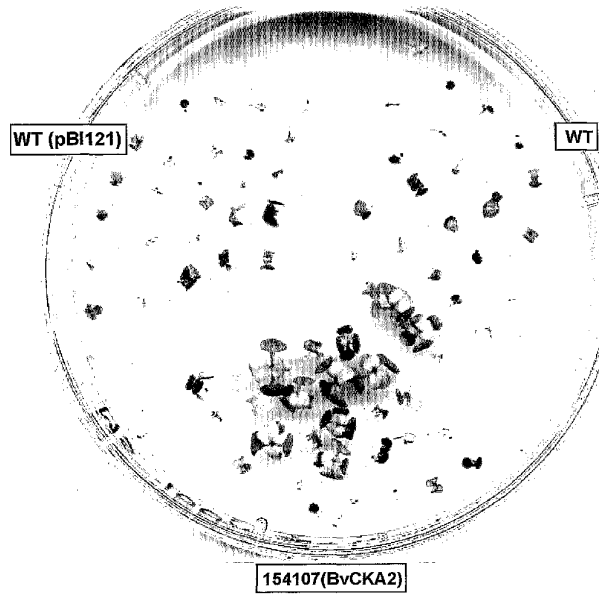


FIGURE 8

WO 02/052012

PCT/EP01/15093

12/12

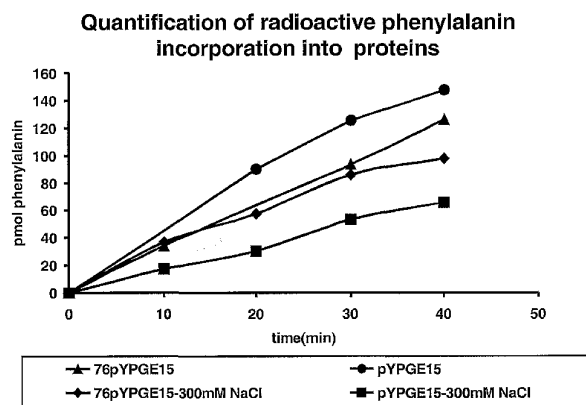


FIGURE 9

WO 02/052012

1

PCT/EP01/15093

SEQUENCE LISTING

<110> CropDesign N.V.
 <120> Red beet genes involved in stress tolerance
 <130> CROP-017-PCT
 <150> EP 00870319.1
 <151> 2000-12-22
 <150> US 60/271,656
 <151> 2001-02-26
 <160> 16
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 1527
 <212> DNA
 <213> Beta vulgaris
 <400> 1
 gaattcggca cgaggaaatt tgagattgtc gggttcaactc ctcttcacac tactaacttt 60
 ttccatctt ctctctcaact cgtcttactg tgccgactcc ttgctctcog tgcaccggtg 120
 gcgcactctc ctatcctgcg cccatcaacc ctaaatttcg ccgcgcgtaa ttccgagatc 180
 tccgcgcagc caaattctcc gatgtcgaag tcgcgagttt acgcgcagct taatgtttctc 240
 cgacctcgag agtactggga ttacgaagct ctcaactgtc aatggggtga tcaagatgac 300
 tatgaagtcg tcgggaagat tgggaagggg aaatacagtg aagtttttga aggattaaac 360
 gtcaatagta atgaacgatg cgttatcaag atcctgaac ctgtgaagaa gaaaaagatc 420
 aaaagagaga taaaaatcct tcagaaccta tgtgggggac caaacgtcat aaagctgctt 480
 gatatcgta gggatcagca ctccaaaaca ccaagcttag tttttgagtt tgtcaacagt 540
 acagatttca aagttctgtg tccaacgtta tctgattatg acatacgtta ttacatctat 600
 gagcttctga aggcctttaga tttctgcat tcacaaggga taatgcaccc agatgtcaag 660
 cctcataatg taatgataga ccatgaattg aggaactcc ggttaataga ttgggtctcg 720
 gcagagttct accatccagg gaaggaatac aatgttcgtg tggcttcgag atactttaag 780
 gggccggaac ttcttgttga tttaacaagac tatgactatt ccttgacat gtggagcctt 840
 ggttgcattg ttgctgggat gatcttcgag aaagaacctt tctctatgg tcatgacaac 900
 catgatcagc ttgttaaaat tgctaaggta cttggaacag atgaactgaa tgcattattg 960
 aacaagtatc atttggagct tgatcctcaa cttgatgctc ttgttgggaag gcacagcagg 1020
 aagccatggt caagatttgt taatccgat aatcagcatt tagtttcccc ttaggctatt 1080
 gactttcttg ataagcttct tcgctatgac caccaggata ggcttactgc aaaagaagca 1140
 atggcacatc cttatttctc tcaagttaga gctgcagaga gtagcagaat gcggacacaa 1200

WO 02/052012

2

PCT/EP01/15093

```

tagctcgtca ctctaataca tacttgagaa tgatgatttc cattgtagag tgtttcatgt 1260
taagtcattg actgtgttcc cgtcttaaac attgcagcta cttgcagcgt caggtagaca 1320
gctttgattg cgcggggaaa ttttatgtaa aatgcgatgat tactagtctt tctaaaactg 1380
caaactctga abgccacaaa ctattgtact gctattttta ttgttgaagc cctctgtaca 1440
tctccaacat tgggtgtcac ttaatatagt ttgctaatag catctgtaaa aaaaaaaaaa 1500
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 1527

```

```

<210> 2
<211> 1743
<212> DNA
<213> Beta vulgaris

```

```

<400> 2
aatlcggcac gagcacagct ccactccctc tttctctcaa gaagaogaac acacaccaat 60
tcagatctga agtttctgtat tttctctctc ctcttctctg acatcttctc cgtctctgaa 120
ttgcaagcgt tccaggcatc aaatttgctt attcccgggt ttgaaacaca taacggacta 180
aatatcaagc cagtaaaagat ggaactgact cttacacgcc ctgatgactg gcactctacat 240
ctccgcgatg gagatcttct tgcctctgtt gctctctaca gtgcaagaca ttttggaagg 300
gcaatcgtta tgcgaatctc aaggcctctc gttactacta caggtgctgc tattgcttac 360
cgaaagtcta ttatggaagt attgctgat gatagcgcact tcaatctctc catgacactt 420
tatttgactg atacgaccag ccctaatgag atcaagcttg ccagaaaaag tgagggtggt 480
tatgctgtca aattataccc tgcctggcga acaactaatt ctacggacgg tgctactgat 540
cttttaggaa agtctctgcc tgtgcttgaa gagatggctg agcaagatat gcctcttctg 600
gtccatggag aagttacaga tctctgatga gatataattg atcgtgaaaa ggtttttatt 660
gagtcagttt taagaccttt aattcagaaa ttaccacagc taaagggtgt gatggaacac 720
atcactactg ctgatgctgt caagtttatt gactctgtga atggaggaaa tgtagcagcc 780
actgtgacgc cgcagcacct tgttctgaat agaaactctc tcttccaagg aggggttgcaa 840
ccgcataact attgtcttcc agtgcctcaa agagaaatcc atagacaggc acttggttca 900
gcggtaacca gcgggagcaa gcaatatttt cttgggactg atagtgtccc tcatgaaagg 960
cggaggaaag aatgttctgt tggatgtgct ggaatctata attcccctgt tgctctatca 1020
ctatatgcca aagtatttga agaggctggt gcccttgaca agttagagggc atttacaagc 1080
tttaatggac ccgatttcta tggctctcca aggaatacgt cgaagatcaa gttgaaaaaa 1140
gaaccatgga aagtctctaga gcgtatacct ttccatccg gagaaataat ccctatgttt 1200
gctggacaaa tgcttgactg gaagccatct ttctgagatc atctctctac catctttacc 1260
atctgtactt tccctttctt tcaatgcatt tgcgtctcat tgatgagaaa tgtgtactgc 1320

```

WO 02/052012

3

PCT/EP01/15093

```

ttgaacatca attttgtggg cactcagttt gtaagacctc ttaccttttt tagaaagaaa 1380
caaggaccaa caagtgcctg gatcagggtg tagtaagagg ttccggctca atcaaaggat 1440
tcagattoga gcttcaagca cttgttcgga gagtccccc caatcgagcc ttccgcgcgc 1500
gaatctacgg tcgttcgaac tcgtgtaggc tctaaattac tgggtgtttt tctttatctt 1560
ctcccccttt aatgaaaaa aagggggcac agattataag ttccaattta atttctacaa 1620
gacaaattta taataattct aataaagttc tataccagct taatcttacc ttatatttaa 1680
aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa 1740
aaa 1743

```

```

<210> 3
<211> 634
<212> DNA
<213> Beta vulgaris

```

```

<400> 3
ctagcaacaa acaacaaact caaaaaccag cctttttttt acaaaatcag aaccgtctga 60
tctagggttt tctgttagag agaaaagatg ccgaagaaca aaggaaaggg aggaagaagc 120
aggaagagag gaaagaatga agctgatgat gagaaaaag aacttggttt caaagaagat 180
ggacaagagt acgcgcaagt tgttcgtatg ctcggtaatg gccgttgtga agctacttgc 240
atcgattatg ttaagcgtct tttcatatt cgtggttaaga tgcacaaaaa agtctggatc 300
gctgctgggtg atattattct cgtcggtctt cgcgattatc aggatgacaa ggctgatgtg 360
atcctaaagt atatgccaga tgaagccagg ttgctcaaag cttacggcga gttgccagac 420
aacatcagac ttaatgaagg tgttgctaatt ctgatgagg aagacgatgg tgggtctgat 480
gactacatcg agttcgaaga cgaagacatt gataagatat aagcaattta agtttgttta 540
caaatgcacc tttactgcga ctgttgaaac ttatatgtca attgtatgtt tcttgggttt 600
gatcaatatt tgatgtaaaa aaaaaaaaaa aaaa 634

```

```

<210> 4
<211> 845
<212> DNA
<213> Beta vulgaris

```

```

<400> 4
tgtcagtcac aatcatcaga ctatatcaat ggttcgtaag cgatttcaag acgtgcaaac 60
aggatttcaa tgggctaaaag tgttgagaaa agtgggatta ggcaagggaag acaggtactt 120
ttggaagcaa gtgggtaagg cattgctatg cacctatgca gtgtttgttg cagcatgggt 180
ttacaatgaa acatcaccac ttgggtggtg gacattgaag cctcgtcta aggaggagaa 240
agaactagct catctttacg aacggcgaga gtttcggtat ccaggtgaca aagaagcaat 300

```

WO 02/052012

4

PCT/EP01/15093

```

ggaagagttt gtaacaaaag gtgggatgat tggtactacc attggccga aaggaacagt 360
tgaactgat aaggattoat ttaactatca gaaagcattg caggataaga agttttgagca 420
ggaggctcat aagtttgtgt ttaggatgag gaatgaagtg gttgcggagc ttcaagaaaa 480
gggtttcgtat gtcgagtgat acgattagga atggcaatga caataacatc aagcctctag 540
gtgaagtatt tgttttgaac tggtttgtgt tagcttatta gctttgtgga aataatgcct 600
tggtttgtgg tgctttaagt ttaaggattg aacatatata ttgtttgga cttgagagtt 660
ccaagaaaag ggttttgatg tcagtgaac aattgaggaa tggcaatgac aattacatca 720
agcctctata ggtgaagtat ggtctgaact aattctgtta gccttaagtt gtgtgcctta 780
aagtttaagg atcgaacata tctataattg ggacttgaga atgggacaat aagatacaat 840
tgggg

```

```

<210> 5
<211> 879
<212> DNA
<213> Beta vulgaris

```

```

<400> 5
atgatgggtg aaggtaacag ggacaagagt aagaagaaga agaagaagag aggtggtgct 60
aaaagaagga tgactgttga acaaacctca gctttgaant ctgtaaatga atgggtttat 120
ttggctcaac atgctgatga acaagagaag atcaaaagag atgattttct acctgaaatt 180
atgcgcattg ctgagtttct tgagaatatt gtgtttgaat tgcattctca tactatttgc 240
agtgatgggt ttttatcccc ttctgctctt gttagaaaag ctcatcaaaa tggggtgaaa 300
gttcttgctt tgactgatca tgacacaatg tctggtatcc ccgaggccct gcaagcggcc 360
ggtagatbtg gtatcaagat tattccaggt gttgagatca gttcagtttt ctctactaca 420
agagatgaat ctgaagcaga agaaccagtt cacattcttg catattatag cagctgtgga 480
cctgcaagat ttgaagagtt agatcaattt ttggccaaca taagggacgg acgttacctt 540
cgtgccaaaa atatgctcgc aaaacttgcg aaactcaaaa agcccgtaaa gtgggaacgt 600
gtcataaaga ttgcaggcaa tggagttgct cctgggagac tgcattgagc tcgtgctttg 660
ttggaagctg gccatgttga agatctttaa caagcattcg atcggtatct tcatgatggg 720
ggccctgctt attccaaggg aagtgagcct tctgcggaag aagctgtgca aatgggtgtg 780
aaaactgggg gaatagctgt cttggcacat ccatgggcat taaaaaatcc ttcccagta 840
gtcaacagat tgaaggagg caggtcttca tggaattga 879

```

```

<210> 6
<211> 333
<212> PRT
<213> Beta vulgaris

```


WO 02/052012

5

PCT/EP01/15093

<400> 6

```

Met Ser Lys Ser Arg Val Tyr Ala Asp Val Asn Val Leu Arg Pro Arg
1      5      10      15

Glu Tyr Trp Asp Tyr Glu Ala Leu Thr Val Gln Trp Gly Asp Gln Asp
20     25     30

Asp Tyr Glu Val Val Arg Lys Ile Gly Arg Gly Lys Tyr Ser Glu Val
35     40     45

Phe Glu Gly Leu Asn Val Asn Ser Asn Glu Arg Cys Val Ile Lys Ile
50     55     60

Leu Lys Pro Val Lys Lys Lys Lys Ile Lys Arg Glu Ile Lys Ile Leu
65     70     75     80

Gln Asn Leu Cys Gly Gly Pro Asn Val Ile Lys Leu Leu Asp Ile Val
85     90     95

Arg Asp Gln His Ser Lys Thr Pro Ser Leu Val Phe Glu Phe Val Asn
100    105    110

Ser Thr Asp Phe Lys Val Leu Tyr Pro Thr Leu Ser Asp Tyr Asp Ile
115    120    125

Arg Tyr Tyr Ile Tyr Glu Leu Leu Lys Ala Leu Asp Phe Cys His Ser
130    135    140

Gln Gly Ile Met His Arg Asp Val Lys Pro His Asn Val Met Ile Asp
145    150    155    160

His Glu Leu Arg Lys Leu Arg Leu Ile Asp Trp Gly Leu Ala Glu Phe
165    170    175

Tyr His Pro Gly Lys Glu Tyr Asn Val Arg Val Ala Ser Arg Tyr Phe
180    185    190

Lys Gly Pro Glu Leu Leu Val Asp Leu Gln Asp Tyr Asp Tyr Ser Leu
195    200    205

Asp Met Trp Ser Leu Gly Cys Met Phe Ala Gly Met Ile Phe Arg Lys
210    215    220

Glu Pro Phe Phe Tyr Gly His Asp Asn His Asp Gln Leu Val Lys Ile
225    230    235    240

Ala Lys Val Leu Gly Thr Asp Glu Leu Asn Ala Tyr Leu Asn Lys Tyr

```

WO 02/052012

6

PCT/EP01/15093

245

255

His Leu Glu Leu Asp Pro Gln Leu Asp Ala Leu Val Gly Arg His Ser
 260 265 270

Arg Lys Pro Trp Ser Arg Phe Val Asn Pro Asp Asn Gln His Leu Val
 275 280 285

Ser Pro Glu Ala Ile Asp Phe Leu Asp Lys Leu Leu Arg Tyr Asp His
 290 295 300

Gln Asp Arg Leu Thr Ala Lys Glu Ala Met Ala His Pro Tyr Phe Ser
 305 310 315 320

Gln Val Arg Ala Ala Glu Ser Ser Arg Met Arg Thr Gln
 325 330

<210> 7
 <211> 345
 <212> PRT
 <213> Beta vulgaris

<400> 7

Met Glu Leu Thr Leu Thr Arg Pro Asp Asp Trp His Leu His Leu Arg
 1 5 10 15

Asp Gly Asp Leu Leu Ala Ala Val Ala Pro His Ser Ala Arg His Phe
 20 25 30

Gly Arg Ala Ile Val Met Pro Asn Leu Arg Pro Pro Val Thr Thr Thr
 35 40 45

Gly Ala Ala Ile Ala Tyr Arg Lys Ser Ile Met Glu Val Leu Pro Asp
 50 55 60

Asp Ser Asp Phe Asn Pro Leu Met Thr Leu Tyr Leu Thr Asp Thr Thr
 65 70 75 80

Ser Pro Asn Glu Ile Lys Leu Ala Arg Lys Ser Glu Val Val Tyr Ala
 85 90 95

Val Lys Leu Tyr Pro Ala Gly Ala Thr Thr Asn Ser Gln Asp Gly Val
 100 105 110

Thr Asp Leu Leu Gly Lys Cys Leu Pro Val Leu Glu Glu Met Ala Glu
 115 120 125

Gln Asp Met Pro Leu Leu Val His Gly Glu Val Thr Asp Pro Asp Val

WO 02/052012

7

PCT/EP01/15093

130 135 140
 Asp Ile Phe Asp Arg Glu Lys Val Phe Ile Glu Ser Val Leu Arg Pro
 145 150 155 160
 Leu Ile Gln Lys Leu Pro Gln Leu Lys Val Val Met Glu His Ile Thr
 165 170 175
 Thr Ala Asp Ala Val Lys Phe Ile Glu Ser Cys Asn Gly Gly Asn Val
 180 185 190
 Ala Ala Thr Val Thr Pro Gln His Leu Val Leu Asn Arg Asn Ser Leu
 195 200 205
 Phe Gln Gly Gly Leu Gln Pro His Asn Tyr Cys Leu Pro Val Leu Lys
 210 215 220
 Arg Glu Ile His Arg Gln Ala Leu Val Ser Ala Val Thr Ser Gly Ser
 225 230 235 240
 Lys Gln Tyr Phe Leu Gly Thr Asp Ser Ala Pro His Glu Arg Arg Arg
 245 250 255
 Lys Glu Cys Ser Cys Gly Cys Ala Gly Ile Tyr Asn Ser Pro Val Ala
 260 265 270
 Leu Ser Leu Tyr Ala Lys Val Phe Glu Glu Ala Gly Ala Leu Asp Lys
 275 280 285
 Leu Glu Ala Phe Thr Ser Phe Asn Gly Pro Asp Phe Tyr Gly Leu Pro
 290 295 300
 Arg Asn Thr Ser Lys Ile Lys Leu Lys Lys Glu Pro Trp Lys Val Leu
 305 310 315 320
 Glu Arg Ile Pro Phe Pro Ser Gly Glu Ile Ile Pro Met Phe Ala Gly
 325 330 335
 Gln Met Leu Asp Trp Lys Pro Ser Phe
 340 345
 <210> 8
 <211> 144
 <212> PRT
 <213> Beta vulgaris
 <400> 8
 Met Pro Lys Asn Lys Gly Lys Gly Gly Lys Asn Arg Lys Arg Gly Lys

WO 02/052012

8

PCT/EP01/15093

1 5 10 15

Asn Glu Ala Asp Asp Glu Lys Arg Glu Leu Val Phe Lys Glu Asp Gly
20 25 30

Gln Glu Tyr Ala Gln Val Val Arg Met Leu Gly Asn Gly Arg Cys Glu
35 40 45

Ala Thr Cys Ile Asp Tyr Val Lys Arg Leu Cys His Ile Arg Gly Lys
50 55 60

Met His Lys Lys Val Trp Ile Ala Ala Gly Asp Ile Ile Leu Val Gly
65 70 75 80

Leu Arg Asp Tyr Gln Asp Asp Lys Ala Asp Val Ile Leu Lys Tyr Met
85 90 95

Pro Asp Glu Ala Arg Leu Leu Lys Ala Tyr Gly Glu Leu Pro Asp Asn
100 105 110

Ile Arg Leu Asn Glu Gly Val Ala Asn Leu Asp Glu Glu Asp Asp Gly
115 120 125

Gly Ala Asp Asp Tyr Ile Glu Phe Glu Asp Glu Asp Ile Asp Lys Ile
130 135 140

<210> 9
<211> 156
<212> PRT
<213> Beta vulgaris

<400> 9

Met Val Arg Lys Arg Phe Gln Asp Val Gln Thr Gly Ile Gln Trp Ala
1 5 10 15

Lys Val Leu Arg Lys Val Gly Leu Gly Lys Glu Asp Arg Tyr Phe Trp
20 25 30

Lys Gln Val Gly Lys Ala Leu Leu Cys Thr Tyr Ala Val Phe Gly Ala
35 40 45

Ala Trp Val Tyr Asn Glu Thr Ser Pro Leu Gly Trp Trp Thr Leu Lys
50 55 60

Pro Arg Pro Lys Glu Glu Lys Glu Leu Ala His Leu Tyr Glu Arg Arg
65 70 75 80

Glu Phe Pro Tyr Pro Gly Asp Lys Glu Ala Met Glu Glu Phe Val Thr

WO 02/052012

9

PCT/EP01/15093

85 90 95
 Lys Gly Gly Met Ile Gly Thr Thr Ile Gly Pro Lys Gly Thr Val Glu
 100 105 110
 Thr Asp Lys Asp Ser Phe Asn Tyr Gln Lys Ala Leu Gln Asp Lys Lys
 115 120 125
 Phe Glu Gln Glu Ala His Lys Leu Trp Phe Arg Met Arg Asn Glu Val
 130 135 140
 Val Ala Glu Leu Gln Glu Lys Gly Phe Asp Val Glu
 145 150 155
 <210> 10
 <211> 292
 <212> PRT
 <213> Beta vulgaris
 <400> 10
 Met Met Gly Glu Gly Asn Arg Asp Lys Ser Lys Lys Lys Lys Lys
 1 5 10 15
 Arg Gly Gly Ala Lys Arg Arg Met Thr Val Glu Gln Thr Ser Ala Leu
 20 25 30
 Lys Ser Val Asn Glu Trp Val Tyr Leu Ala Gln His Ala Asp Glu Gln
 35 40 45
 Glu Lys Ile Lys Glu Asp Asp Phe Leu Pro Glu Ile Met Arg Ile Ala
 50 55 60
 Arg Val Ser Glu Asn Ile Val Phe Glu Leu His Ser His Thr Ile Cys
 65 70 75 80
 Ser Asp Gly Phe Leu Ser Pro Ser Ala Leu Val Glu Lys Ala His Gln
 85 90 95
 Asn Gly Val Lys Val Leu Ala Leu Thr Asp His Asp Thr Met Ser Gly
 100 105 110
 Ile Pro Glu Ala Leu Gln Ala Ala Gly Arg Phe Gly Ile Lys Ile Ile
 115 120 125
 Pro Gly Val Glu Ile Ser Ser Val Phe Ser Thr Thr Arg Asp Glu Ser
 130 135 140
 Glu Ala Glu Glu Pro Val His Ile Leu Ala Tyr Tyr Ser Ser Cys Gly

WO 02/052012 10 PCT/EP01/15093

145 150 155 160

Pro Ala Arg Phe Glu Glu Leu Asp Gln Phe Leu Ala Asn Ile Arg Asp
165 170 175

Gly Arg Tyr Leu Arg Ala Lys Asn Met Leu Ala Lys Leu Ala Lys Leu
180 185 190

Lys Lys Pro Val Lys Trp Glu Arg Val Ile Lys Ile Ala Gly Asn Gly
195 200 205

Val Ala Pro Gly Arg Leu His Val Ala Arg Ala Leu Leu Glu Ala Gly
210 215 220

His Val Glu Asp Leu Lys Gln Ala Phe Asp Arg Tyr Leu His Asp Gly
225 230 235 240

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

Gln Met Val Cys Lys Thr Gly Gly Ile Ala Val Leu Ala His Pro Trp
260 265 270

Ala Leu Lys Asn Pro Ser Pro Val Val Asn Arg Leu Lys Gly Gly Arg
275 280 285

Ser Ser Trp Asn
290

<210> 11
<211> 36
<212> DNA
<213> primer

<400> 11
atggattaga attctcatag agttgtaagg tctcag 36

<210> 12
<211> 38
<212> DNA
<213> primer

<400> 12
cctcagttct cgagtttata aatggaaatc agtggtgg 38

<210> 13
<211> 22
<212> DNA
<213> primer

<400> 13

WO 02/052012

11

PCT/EP01/15093

cgaagctctc actgttcaat gg

22

<210> 14
<211> 23
<212> DNA
<213> primer

<400> 14
ggatgtgcca ttgcttcttt tgc

23

<210> 15
<211> 21
<212> DNA
<213> primer

<400> 15
ctctcaagtt agagctgcag a

21

<210> 16
<211> 24
<212> DNA
<213> primer

<400> 16
gctattagca aactatatta agtg

24

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
4 July 2002 (04.07.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/052012 A3(51) International Patent Classification: C12N 9/12,
15/29, 15/54, 15/63, 15/80, 15/82, 15/85, 15/81, C07K
14/415, C12N 9/86, 15/55, 1/19, 1/21, 5/10, C07K 16/16,
16/40, A01H 15/00, 5/10, G01N 33/50, 33/53, C12Q 1/68

(21) International Application Number: PCT/EP01/15093

(22) International Filing Date:
20 December 2001 (20.12.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
00870319.1 22 December 2000 (22.12.2000) EP
60/271,656 26 February 2001 (26.02.2001) US(71) Applicant (for all designated States except US):
CROPDESIGN N.V. [BE/BE]; Technologiepark 3,
B-9052 Zwijnaarde (BE).(72) Inventors: and
(75) Inventors/Applicants (for US only): KANHONOU,
Rodolphe, Arthur [BJ/US]; Albocacer, 16, 7, E-46020
Valencia (ES); SERRANO SALOM, Ramon [ES/ES];
Asturias, 22, 2, E-46023 Valencia (ES); ROS PALAU,
Roque [ES/ES]; Sornells, 20, 13, E-46006 Valencia (ES).(74) Agents: DE CLERCQ, Ann et al.; De Clercq, Brans &
Partners, E. Gevaertdreef 10 a, B-9830 Sint-Martens-Latem
(BE).(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CL, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU,
ZA, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SI, TR), OAPI patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).Published:
— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments(88) Date of publication of the international search report:
12 September 2002For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance
Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning
of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/052012 A3

(54) Title: SUGAR BEET GENES INVOLVED IN STRESS TOLERANCE

(57) Abstract: The present invention relates to isolated genes originating from Beta vulgaris, sugar beet, that are involved in responses to stress situations. The genes were isolated from a sugar beet cDNA library screened in a functional selection procedure with transformed yeast cells that were able to grow in selection medium with high salt concentrations. Subsequently these genes were sequenced and further characterized. One of the genes is a sugar beet casein kinase a \$gga\$-subunit, one is a sugar beet dihydroorotase, one is a sugar beet translation initiation factor 1A and two others are of a unknown protein type. All of these isolated plant genes were functional as stress tolerance enhancers in yeast cells and are therefore useful to confer stress tolerance to an organism when transfected herein. More particularly, these genes can be used to render crops resistant to stress situations like osmotic stress caused by salt, drought, cold or frost.

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

REVISED VERSION

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
4 July 2002 (04.07.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/052012 A3(51) International Patent Classification: C12N 9/12,
15/29, 15/54, 15/63, 15/80, 15/82, 15/85, 15/81, C07K
14/415, C12N 9/86, 15/55, 1/19, 1/21, 5/10, C07K 16/16,
16/40, A01H 15/00, 5/10, G01N 33/50, 33/53, C12Q 1/68

(21) International Application Number: PCT/EP01/15093

(22) International Filing Date:
20 December 2001 (20.12.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
00870319.1 22 December 2000 (22.12.2000) EP
60/271,656 26 February 2001 (26.02.2001) US(71) Applicant (for all designated States except US):
CROPDESIGN N.V. [BF/BF]; Technologiepark 3,
B-9052 Zwijnaarde (BE).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): KANHONOU,
Rodolphe, Arthur [BJ/ES]; Albocacer, 16, 7, E-46020
Valencia (ES). SERRANO SALOM, Ramon [ES/ES];
Asturias, 22, 2, E-46023 Valencia (ES). ROS PALAU,
Roque [US/US]; Sornells, 20, 13, E-46006 Valencia (ES).(74) Agents: DE CLERCQ, Ann et al.; De Clercq, Brants &
Partners, E. Gevaertdreef 10 a, B-9830 Sint-Martens-Latem
(BL).(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GU, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU,
ZA, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM,
KI, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent
(BF, BJ, CH, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).Published:
— with international search report(88) Date of publication of the international search report:
12 September 2002
Date of publication of the revised international search
report:
20 February 2003(15) Information about Correction:
see PCT Gazette No. 08/2003 of 20 February 2003, Sec-
tion IIFor two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/052012 A3

(54) Title: SUGAR BEET GENES INVOLVED IN STRESS TOLERANCE

(57) Abstract: The present invention relates to isolated genes originating from Beta vulgaris, sugar beet, that are involved in re-
sponses to stress situations. The genes were isolated from a sugar beet cDNA library screened in a functional selection procedure
with transformed yeast cells that were able to grow in selection medium with high salt concentrations. Subsequently these genes
were sequenced and further characterized. One of the genes is a sugar beet casein kinase 4 (gla)-subunit, one is a sugar beet dihy-
droorotase, one is a sugar beet translation initiation factor 1A and two others are of a unknown protein type. All of these isolated plant
genes were functional as stress tolerance enhancers in yeast cells and are therefore useful to confer stress tolerance to an organism
when transfected herein. More particularly, these genes can be used to render crops resistant to stress situations like osmotic stress
caused by salt, drought, cold or frost.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				International Application No. PCT/EP 01/15093	
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER					
IPC 7	C12N9/12	C12N15/29	C12N15/54	C12N15/63	C12N15/80
	C12N15/82	C12N15/85	C12N15/81	C07K14/415	C12N9/86
	C12N15/55	C12N1/19	C12N1/21	C12N5/10	C07K16/16
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC					
B. FIELDS SEARCHED					
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)					
IPC 7 C12N C07K C12Q A01H G01N					
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched					
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)					
MEDLINE, EP0-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ					
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT					
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages				Relevant to claim No.
X	G. PERACCHIA ET AL: "CHARACTERISATION, SUBCELLULAR LOCALIZATION AND NUCLEAR TARGETING OF CASEIN KINASE 2 FROM ZEA MAYS" PLANT MOLECULAR BIOLOGY, vol. 10, 1999, pages 199-211, XP002181563 abstract page 200, column 1, paragraph 3 page 200, column 2, paragraph 2 - paragraph 3; figure 1 --- -/-				1-3, 6-10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.					
* 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 document 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 relating 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 "S" document member of the same patent family					
Date of the actual completion of the international search			Date of mailing of the international search report		
21 June 2002			05/07/2002		
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Palantian 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016			Authorized officer Keller, Y		

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 01/15093
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K16/40 A01H15/00 A01H5/10 G01N33/50 G01N33/53 C12Q1/68		
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)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MI-JEONG ET AL: "Isolation and characterisation of the gene encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 278, no. 1, 2000, pages 192-196, XP000216272	1,2
Y	abstract page 193, column 1, paragraph 2 -column 2, paragraph 2 page 195, column 1, paragraph 2 --- -/--	3,6-10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* 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 document 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 "S" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
21 June 2002		
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5010 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31 - 70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Keller, Y

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 01/15093
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HAI LAN PIAO ET AL: "An Arabidopsis GSK3/shaggy-like gene that complements yeast salt stress-sensitive mutants is induced by NaCl and Absciscic Acid" PLANT PHYSIOLOGY, vol. 119, April 1999 (1999-04), pages 1527-1534, XP002181564	1,2
Y	abstract page 1528, column 1, paragraph 3 -column 2, paragraph 3 figures 1,7,9 page 1531, column 1, paragraph 3 -page 1532, column 2, paragraph 1	3,6-10
X	TATJANA KLEINOW ET AL: "Functional identification of an Arabidopsis snf4 ortholog by screening for heterologous multicopy suppressor of snf4 deficiency in yeast" THE PLANT JOURNAL, vol. 23, no. 1, 2000, pages 115-122, XP002181565 abstract page 115, column 1, paragraph 1 -column 2, paragraph 2 table 1 figure 2 page 119, column 2, paragraph 2 -page 1120, column 1, paragraph 1 page 120, column 2, paragraph 2 -page 121, column 1, paragraph 1	1,2
X	DATABASE EMBL 'Online! Acc. No Y11526, 2 November 1998 (1998-11-02) XP002181566 the whole document	6-10
T	I. WINICOV: "New molecular approaches to improving salt tolerance in crop plants" ANNALS OF BOTANY, vol. 82, 1998, pages 703-710, XP001007288	

Form PCT/ISA219 (continuation of second sheet) (July 1992)

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	C 1 2 N 5/00	A
	C 1 2 N 5/00	C

(81) 指定国 AP (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, P T, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72) 発明者 セラノ, サロム ラモン

スペイン国 エ - 4 6 0 2 3 バレンシア, アスチュリアス, 2, 2 2

(72) 発明者 ロス, パラウ ロク

スペイン国 エ - 4 6 0 0 6 バレンシア, ソーネルス, 1 3, 2 0

F ターム (参考) 2B030 AA02 AB03 AD04 CA17 CA19 CB02

2G045 AA40 BB03 BB20 CB20 DA12 DA13 DA14 DA36 FB02 FB03

4B024 AA08 BA47 BA80 CA04 DA01 DA05 DA12 EA04 GA11 HA12

4B063 QA18 QQ42 QR55 QR62 QR69 QR76 QR80 QS24 QS25 QS34

4B064 AG01 CA06 CA19 CC24 DA11

4B065 AA80X AA88X AA89X AA89Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA53

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA30 DA76 DA86 EA05 EA50

FA74

专利名称(译)	甜菜基因与胁迫耐受有关		
公开(公告)号	JP2004524015A	公开(公告)日	2004-08-12
申请号	JP2002553492	申请日	2001-12-20
[标]申请(专利权)人(译)	克罗普迪塞恩股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	裁剪设计NTT Weserblick		
[标]发明人	カンホノウラドルフアーサー セラノサロムラモン ロスパラウロク		
发明人	カンホノウ, ラドルフ アーサー セラノ, サロム ラモン ロス, パラウ ロク		
IPC分类号	A01H1/00 A01H5/00 A01H5/10 A01H15/00 C07K14/415 C07K16/16 C07K16/40 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/12 C12N9/86 C12N15/09 C12N15/18 C12N15/29 C12N15/54 C12N15/55 C12N15/63 C12N15/80 C12N15/81 C12N15/82 C12N15/85 C12P21/02 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53		
CPC分类号	C07K14/415 C12N9/12 C12N9/1205 C12N9/14 C12N9/86 C12N15/8273 C12Y207/01037 C12Y305/02003		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A01H1/00.A A01H5/00.A C07K14/415 C07K16/16 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z C12N5/00.A C12N5/00.C		
F-TERM分类号	2B030/AA02 2B030/AB03 2B030/AD04 2B030/CA17 2B030/CA19 2B030/CB02 2G045/AA40 2G045/BB03 2G045/BB20 2G045/CB20 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA08 4B024/BA47 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/DA01 4B024/DA05 4B024/DA12 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA12 4B063/QA18 4B063/QQ42 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR69 4B063/QR76 4B063/QR80 4B063/QS24 4B063/QS25 4B063/QS34 4B064/AG01 4B064/CA06 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA11 4B065/AA80X 4B065/AA88X 4B065/AA89X 4B065/AA89Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA53 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA30 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA05 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	2000870319 2000-12-22 EP 60/271656 2001-02-26 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及甜菜起源的甜菜 (*Beta vulgaris*) 的分离基因，所述分离的基因与应激状态的应答有关。该基因是从使用转化的酵母细胞在功能选择程序中筛选的甜菜cDNA文库中分离的，所述转化的酵母细胞可以在具有高盐浓度的选择性培养基中生长。其中一个基因是糖蜜蜂酪蛋白激酶的 α -亚基，一个是甜菜二氢转录酶，一个是甜菜翻译起始因子1A，另外两个是未知蛋白质。它是一种基因。所有分离的植物基因作为酵母细胞都具有作为胁迫耐受性增强剂的功能，因此在转染时可赋予生物体胁迫耐受性。

結果を、3回の独立した実験の平均値 \pm SDとして示す。

	[K]	[Na]
PYPGE15	57 \pm 11	136 \pm 9
PYPGE15+BvCKA2	56 \pm 3	146 \pm 9