

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-148071

(P2017-148071A)

(43) 公開日 平成29年8月31日(2017.8.31)

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

審査請求 有 請求項の数 18 O L 外国語出願 (全 37 頁)

(21) 出願番号 特願2017-94173 (P2017-94173)
 (22) 出願日 平成29年5月10日 (2017.5.10)
 (62) 分割の表示 特願2015-18851 (P2015-18851) の分割
 原出願日 平成20年11月28日 (2008.11.28)

(71) 出願人 511131147
 エンブレサ ブラジレイラ デ ベスキサ
 アグロベクアリアーエンブラパ
 ブラジル国, 70770-901 ブラジ
 リア ディストリト フェデラル, プラノ
 ピロート, エディフィシオ セザ, パル
 ケ エスタサン ビオロジカーペーケーエ
 ーペー エス/エニ
 (74) 代理人 100099759
 弁理士 青木 篤
 (74) 代理人 100077517
 弁理士 石田 敬
 (74) 代理人 100087871
 弁理士 福本 積

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 オクテニジン組成物

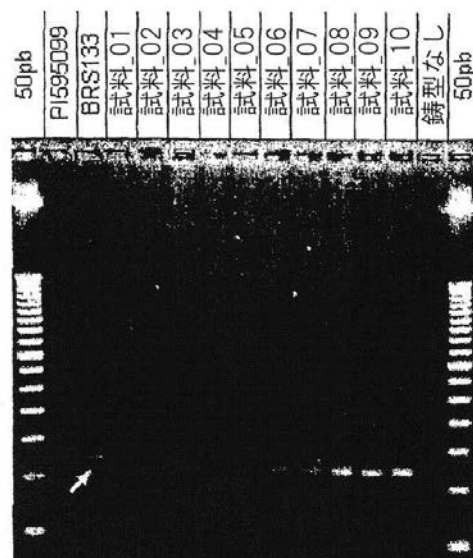
(57) 【要約】

【課題】植物におけるコード配列の発現レベルを制御する方法の提供。GUSタンパク質に融合した異なる数のAT挿入物を有する遺伝子のプロモーター領域を含む遺伝子発現カセットの提供。AT_(n)-挿入物を含む遺伝子的に改変された植物を得るための方法の提供。

【解決手段】植物におけるコード配列の発現レベルを調節するためのプロモーターエレメントにおけるAT_(n)挿入物の使用。GUSタンパク質に融合した異なる数のAT挿入物を有する遺伝子のプロモーター領域を含む遺伝子発現カセット。

【選択図】 図1

FIGURE 1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

植物におけるコード配列の発現レベルを制御する方法であって、

(i) 対象遺伝子に操作可能に連結されたプロモーターエレメント内の A T _(n) 挿入物を担持する発現カセットを用いて植物細胞を安定に形質転換し；

(i i) 植物細胞の増殖条件下で安定に形質転換された植物細胞を培養し；

(i i i) (i) のカセットがそのゲノムに安定に組み込まれたトランスジェニック植物を再生する

ことを含み、ここで、前記トランスジェニック植物は、対照植物と比較した場合に、異なるレベルの遺伝子発現を示す前記方法。

10

【請求項 2】

前記 A T 挿入物が異なるサイズである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記 A T 挿入物がプロモーター領域内の特定部位に局在化している、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記プロモーター領域が G m h s p 1 7 . 6 - L 遺伝子に関連する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

植物の線虫を駆除するために使用される、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 6】

前記線虫が、優先的に根こぶ (g a l l) 線虫であるメロイドギネ・ジャワニカ (M e l o i d o g y n e j a v a n i c a) である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

G m h s p 1 7 . 6 - L 遺伝子のプロモーター領域に連結された異なる数の A T - 挿入物を有する 2 つのプロモーター領域を含む発現カセット。

【請求項 8】

大豆胚を形質転換する能力を含む、請求項 7 に記載の発現カセット。

【請求項 9】

前記カセットが植物の線虫を駆除するために使用される、請求項 7 又は 8 に記載の発現カセット。

30

【請求項 10】

前記線虫が、優先的に根こぶ線虫であるメロイドギネ・ジャワニカである、請求項 9 に記載の発現カセット。

【請求項 11】

A T _(n) - 挿入物を含む遺伝子的に改変された植物を得るための方法であって、

(i) 対象遺伝子に操作可能に連結されたプロモーターエレメント内に A T _(n) 挿入物を担持する発現カセットを用いて植物細胞を安定に形質転換し；

(i i) 植物細胞の増殖条件下で安定に形質転換された植物細胞を培養し；

(i i i) 安定に遺伝子的に改変された植物を再生する

ことを含む前記方法。

40

【請求項 12】

前記 A T - 挿入物が異なるサイズである、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記 A T - 挿入物がプロモーター領域内の特定部位で生じる、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 14】

前記プロモーター領域が G m h s p 1 7 . 6 - L 遺伝子に関連する、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

50

前記植物が、A T - 挿入物の比率サイズで、プロモーター領域に存在し、過剰発現した遺伝子を有する、請求項 1 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記植物が、A T - 挿入物の比率サイズで、プロモーター領域に存在し、低 (u n d e r) 発現した遺伝子を有する、請求項 1 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記植物が線虫に耐性である、請求項 1 1 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記線虫が、優先的に根こぶ線虫メロイドギネ・ジャワニカである、請求項 1 7 に記載の方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、ある種の制限内において、人工的に上方制御（上流）又は下方制御（下流）され得る、植物におけるコード配列の発現レベルを調節するために、プロモーター領域配列における特定点における A T _(n) 挿入物の使用に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

遺伝子のプロモーター領域は、一般には、遺伝子転写開始部位から上流に 1 ~ 1 0 0 及び 2 0 0 塩基対を有する D N A 配列に含まれ、典型的には、1 以上の転写因子結合部位を含み、及び / 又はそれに隣接している。全ての遺伝子は、転写開始部位の上流（上側）及び下流（下側）に転写調節を有する。転写因子は、これらの調節配列を認識及び結合し、転写されたメッセンジャー R N A の合成を制御する。これらの配列には、プロモーター、エンハンサー及び調節配列が含まれる。プロモーターは、遺伝子構築物において使用され、構成様式において、遺伝子を過剰発現させ、阻害し、若しくはその発現を調節するために、遺伝子工学の手段によって操作され、ある種の環境によって誘導され得る。

20

【0 0 0 3】

遺伝子を過剰発現させるための種々の技術は、現在、バイオテクノロジーの分野において利用可能であり、そのうち、主な技術は、カリフラワー・モザイク・ウイルス (C a M V) から単離された、構成的プロモーター 3 5 S を含む発現カセットの構築物を含む。しかしながら、遺伝子構築物におけるこのプロモーターの使用にはいくつかの例外がある。短鎖ウイルス D N A、及び植物ゲノムへのその挿入物の使用により、植物に感染しているウイルスゲノム間、又はより正確には、メッセンジャー R N A 転写物間に、遺伝子組換えの潜在的なリスクの存在が実験的に明らかになった。このリスクは、新規なウイルス株、できればより悪性のタイプの創生に至る。

30

【0 0 0 4】

プロモーター 3 5 S C a M V は、偶然的であると考えられ、全ての植物において、及び緑藻類、酵母、大腸菌において効果的に機能する。それは、他の植物及び動物ウイルスのプロモーターと共通して、相互交換できる対を有するモジュラー構造を有する。また、それは組換えホットスポットを有し、他の組換えホットスポットに類似した組換えプロセスに関与する複数の誘因物によって位置づけられ、トランスジェニック植物においてしばしば用いられる、アグロバクテリウム (A g r o b a c t e r i u m) 種の T - D N A ベクターの境界が含まれる。このホットスポットは、分割し、他の D N A に結合する傾向にあり、それにより、遺伝子の水平移動及び組換えプロセスの可能性を増加させる。したがって、侵襲的な外来性 D N A のゲノムへの挿入、野生型ウイルスと比較して、いくつかの選択的利点を貢献する場合に安定であるだけである、休眠ウイルスの再活性化及び新規ウイルスの発生に起因して、潜在的なリスクは突然変異生成及び発癌である。

40

【0 0 0 5】

内因性ホモロガスの発現の部分的若しくは完全転写イベント及び / 又は阻害は、プロモーター 3 5 S C a M V を用いて観察された (N a p o l i e t a l (1 9 9 0) T

50

he Plant Cell 2:279-289; Van der Krol et al (1990) Plant Cell 2 291-299)。この不活性化は、メチル化及びエピジェネティックな変化を伴う複雑な機構に起因して起こる (Rencken et al (1992) Mol. Gen. Genet. 233:53-64; Neuhaber et al (1994) Mol. Gen. Genet. 244:230-241; Meyer & Heidmann (1994) Mol. Gen. Genet. 243:390-399; Thierry & Vaucheret (1996) Plant Mol. Biol. 32:1075-1083)。メチルトランスフェラーゼ又はエピジェネティックな変化に関する他の酵素にある種の配列を指示する現実の機構は未知のままであるが、DNA-DNA、DNA-RNA及びRNA-RNA間の依存したホモロガスの相互作用の関与を示唆するという仮説がある (Grierson et al. (1991) Trends in Biotechnology 9:122-123); Matzke & Matzke (1995) Plant Physiology 107:679-685)。

10

【0006】

文献では、CaMV遺伝子が、感染ウイルスのゲノムで組換えられたキャノーラ (canola) 染色体に組み込まれ、新規な複数の悪性ウイルスを生じさせたことを証明するデータがある。CaMVウイルス間のこれらの組換えはプロモーター領域を含み (Vaden & Melcher (1992) Virology 177:111)、DNAとDNAとの間、又はRNAとRNAとの間で起こる場合があり、しばしば、親の対応物よりも重度である感染を生じさせる (Mol. Plant-Microbe Interactions 5:48, 1992)。

20

【0007】

さらに、プロモーター35S CaMVの使用は、通常、全タンパク質の1%より低い比率で内因性遺伝子の生成物の発現をもたらす。このプロモーターにおけるいくつかの改善、例えば、ある配列の重複やエンハンサーの追加は、その発現を増加させたが、いくつかの用途については、内因性遺伝子生成物の発現レベルはさらに増加させる必要がある。

【0008】

一般に、生物的ストレス及び非生物的ストレスへの耐性の特徴に関して、遺伝子操作された植物を得るために、構成的プロモーター35S CaMVを用いて行われた実験では、この耐性はいくつかのケースでは増加するが、このプロモーターの使用から導かれる望ましくない効果の1つは、植物の大きさの減少であり、植物の成長及び発育が通常影響され、形質転換された植物種とは無関係に小植物に至る (Kasuga et al. (1999) Nature America Inc. 287-291)。

30

【0009】

したがって、植物成長における遅延などのある種の負の効果が起こる可能性があるが、遺伝子発現を調節するストレス誘導性プロモーターの使用のようなストラテジーはこのような効果を妨げるか又は軽減する場合がある。

【0010】

別の作業では、Gelvinら (Plant Molecular Biology Manual. Norwell, MA: Kluwer Academic Publishers, 1995) は、細菌アグロバクテリウム・ツメファシエンス (Agrobacterium tumefaciens) の2つの遺伝子: オバインシンターゼ (ocs) 及びマンノパインシンターゼ (mas) の配列を調節する種々の組み合わせを用いて構築された、いくつかのプロモーターによって検出されるGUSの発現を分析した。そして、種々の組み合わせのうち、mas活性化エレメントとmasプロモーター領域を用いて融合されたocs遺伝子活性化配列の3反復によって形成されたハイブリッドプロモーターは、「(Aocs)3AmasPmas」と呼ばれ、プロモーターCaMV 35Sを含む細胞と比較した場合、10倍大きいGUSマーカー遺伝子の、形質転換タバコ細胞の発現レベルにおいて提示された。この新規なプロモーターは、形質転換効率に影響を及ぼ

40

50

さなかったが、しかし、高レベルのマーカ-遺伝子発現は、より大きな比率の形質転換細胞の同定を促進した。発現レベルは、葉、根、及び種々の細胞型において高かった。また、このプロモーターは、マニオク (manioc) 及びエンドウ植物において非常に活性があり、2つの穀物はアグロバクテリウム種を用いて形質転換することが困難であった。このグループは、さらにこのプロモーター「(Aocs)3AmasPmas」を用いて、タバコ及びコーン植物に導入された(18時間後)遺伝子の迅速転写の研究における成功を記載し、プロモーターCaMV 35Sによって調節された発現とは異なり、その活性は弱く、この時期内での遺伝子発現のいずれの検出も可能にしない。

【0011】

遺伝子構築物における遺伝子の過剰発現に対してストレス誘導性プロモーターを用いるというさらなるオプションがあり、これに関して、アラビドプシス・タリアーナ (Arabidopsis thaliana) から単離されたプロモーターrd29は、非生物学的ストレスに対して良好な耐性を有する植物のサーチに最も使用されている。概して、これらの遺伝子構築物は、通常、干ばつ、塩分、並びに低温及び高温などの環境ストレスに回答した遺伝子発現を調節するファミリーDREB (脱水応答エレメント結合) の遺伝子に融合される。異なる植物種を使用したいいくつかの作業では、誘導されたストレスプロモーターを用いた遺伝子形質転換の結果として、非生物学的ストレスにより耐性な植物が報告された (Ono et al. (2003) The Plant Journal, 34: 868 - 887; Kasuga et al. (2004) Plant Cell Physiology 45 (3): 346 - 350)。

【0012】

Fugantiら (2004) は、シスト線虫に耐性であり、影響を受けやすい大豆遺伝子型を用いた。この文献には、シスト線虫に耐性な大豆遺伝子型の支援選択に使用された分子マーカ-に関する初期データが含まれる。しかしながら、DNA配列のレベル又はこの遺伝子によってコードされたmRNAの発現に関して、試験された個体間の分子相違のいかなるタイプも検出されなかった。

【0013】

Fuganti (Master's Thesis, State University of Londrina [Universidade Estadual de Londrina], 2004) は、耐性菌株の選択を示し、ここでは、対象遺伝子を含むゲノム領域の耐性遺伝子及び分子的特徴のある遺伝子と関連した分子マーカ-を用いた。この研究では、遺伝子プロモーターにおけるAT_(n)挿入物のサイズとそのmRNA又はタンパク質の発現の得られたレベルとの間の可能な相関を示す定性的及び定量的データが開示されていない。本発明は、ある種の数のAT_(n)挿入物がプロモーター領域に挿入されているという条件で、いずれかの発現レベルと調節し、及び/又は上方制御若しくは下方制御する能力を提案する。このような提案はこの研究には示されておらず、試験されていない。

【0014】

Fuganti (PhD Thesis, State University of Maringa [Universidade Estadual de Maringa], 2007) は、遺伝子Gmhsp17.6-Lのプロモーター領域内の異なるサイズのAT_(n)挿入物と、種々の非生物学的ストレス及び生物学的ストレス(寒さ、暑さ、干ばつ、塩、線虫の幼虫による感染)に反応したその発現レベルとの間の可能な相関を示す定量的及び定性的データを示した。しかしながら、コード領域が、生物学的ストレス及び非生物学的ストレスの不存在及び/又は存在下、異なるAT_(n)サイズを含むプロモーター領域に融合されてもよい、任意の遺伝子の発現レベルを上方制御又は下方制御する可能性は、示されず、及び検討されていない。

【0015】

特許文献米国第2005059623号は、選択された細胞に発現される、熱ショックタンパク質(HSP)プロモーターに融合した、治療遺伝子の発現を調節するために、超

10

20

30

40

50

音波の制御された応用を用いて、局所発熱を使用する方法を提供する。提案された発明は、遺伝子配列において、全ての形質転換された細胞において発現された種々のサイズの $AT_{(n)}$ 挿入物を有する熱ショックタンパク質のプロモーター領域に融合した任意の遺伝子の発現レベルを調節し、及び上方制御又は下方制御することを目的とする。生物学的ストレス又は非生物学的ストレスは植物全体に適用されてもよい。同一物がそのプロモーター領域に挿入されることを条件として、遺伝子発現の調節における AT 挿入物の役割、及び任意の遺伝子発現を制御するためのツールとしてその使用の可能についてのいずれの指示も開示されていない。

【0016】

特許文献米国第2003190706号は、遺伝子産物(タンパク質)の総量の増加を促進する、プロモーター活性を示すDNA配列に融合された内因性遺伝子に関する。プロモーター活性を有するこの領域は、窒素を化合した塩基の置換及び欠失を含む変異変更から生成させた。本発明は、mRNAの合成を誘導するために必要される全ての遺伝子エレメントを含む、完全な遺伝子プロモーターの使用を必要とする。遺伝子発現の調節は、遺伝子のプロモーター領域におけるランダム突然変異というよりはむしろ、 $AT_{(n)}$ 挿入物のサイズに従って分化されたレベルをもたらすことは、本発明において明らかである。

【0017】

特許文献欧州第1930423号は、発現レベルが他の従来のプロモーターによって調節されない、異種タンパク質を生成するためのシステムにおいて使用される、異なる最終サイズに分けられた熱ショックタンパク質のプロモーター領域を開示する。発現を活性化するために、非生物的又は化学的な特定のストレスが使用される。本発明は、試験された遺伝子型において既存のバリエーション、文献EP1930423において使用された1000bpより小さい断片を用い、これは、遺伝子Gmhs p17.6-Lのプロモーター領域において検出される。このバリエーションは、プロモーターの特定領域における異なる数の $AT_{(n)}$ 挿入物によって提供され、 $AT_{(n)}$ 挿入物に依存した312bp(AT_9)と358bp(AT_{33})の間にサイズバリエーションをもたらす。

【0018】

特許文献米国第5929302号は、葉及び花托などの組織において、成熟時に遺伝子発現を制御する一過性の組織特異的なプロモーターを使用する。プロモーターは、キメラ遺伝子を発現するために、ラズベリーにおけるdru遺伝子自体から、又はそのホモログから単離された。このプロモーターと、特異的な遺伝子、例えば、色及び香りの変化を制御する遺伝子、植物細胞プロセスを修飾する酵素又は触媒産物の遺伝子、生成物がエチレン合成に影響を及ぼす遺伝子、代替の真菌調節遺伝子、並びにスクロース蓄積遺伝子との組み合わせを示唆している。本発明は、全ての細胞において、及び植物のライフサイクル全体を通じて、いずれかの遺伝子の発現を変更するために、その遺伝子のプロモーター領域における変更を有する。遺伝子産物の発現レベルのバリエーションは、プロモーターへの種々の数の $AT_{(n)}$ 挿入物と相関し、結果として、異なるサイズのプロモーターと相関する。本発明は、これらの変更を含む任意の遺伝子発現を調節することを提案する。

【0019】

したがって、本発明は、遺伝子を過剰発現する科学論文において利用可能な現在既存の全ての方法とは異なるため、革新的である。そうするために、本発明は、多数及び少数の繰り返しを有する AT 配列の挿入を用い、遺伝子発現のレベルの調節を可能にし、それを増加又は減少させることができる。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0020】

本発明は、植物におけるコード配列の発現レベルを調節するためのプロモーターエレメントにおける $AT_{(n)}$ 挿入物の使用に関する。また、本発明は、大豆胚を形質転換するために、GUSタンパク質に融合した、異なる数の AT 挿入物を有する遺伝子のプロモーター領域を含む遺伝子発現カセットに関する。

10

20

30

40

50

【0021】

本発明は、植物におけるコード配列の発現レベルを制御する方法を提供し、該方法は、
 (i) 対象遺伝子に操作可能に連結されたプロモーターエレメント内の $AT_{(n)}$ 挿入物を担持する発現カセットを用いて植物細胞を安定に形質転換し；
 (ii) 植物細胞の増殖条件下で安定に形質転換された植物細胞を培養し；
 (iii) (i) のカセットがそのゲノムに安定に組み込まれたトランスジェニック植物を再生することを含み、ここで、該トランスジェニック植物は、対照植物と比較した場合に、異なるレベルの遺伝子発現を示す。

【0022】

さらに、本発明は、Gm h s p 1 7 . 6 - L 遺伝子のプロモーター領域に連結された異なる数の AT 挿入物を有する2つのプロモーター領域を含む発現カセットを提供する。

【0023】

本発明の別の態様では、 $AT_{(n)}$ - 挿入物を含む遺伝子的に改変された植物を得るための方法が提供され、該方法は、
 (i) 対象遺伝子に操作可能に連結されたプロモーターエレメント内に $AT_{(n)}$ 挿入物を担持する発現カセットを用いて植物細胞を安定に形質転換し；
 (ii) 植物細胞の増殖条件下で安定に形質転換された植物細胞を培養し；
 (iii) 安定に遺伝子的に改変された植物を再生することを含む前記方法。

【0024】

結果は、ある種の遺伝子の発現レベルが、遺伝子工学的ツールを介して、プロモーター領域内に $AT_{(n)}$ 繰り返し塩基を挿入することによって、ある種の制限内で、人工的に上方制御（上流）又は下方制御（下流）され得る。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】耐性親試料 P I 5 9 5 0 9 9、感受性親試料 B R S 1 3 3、並びに耐性集団（試料 0 1 ~ 試料 0 5）及び感受性試料（試料 0 6 ~ 試料 1 0）の個体において、マイクロサテライトマーカー S O Y H S P 1 7 6 の増幅を用いたアガロースゲルを示す。矢印は、感受性親におけるマーカー増幅によって生じたバンドを示し、また感受性集団におも見られる。

【図2】GenBank（受入番号：M 1 1 3 1 7）から利用可能である遺伝子 G m h s p 1 7 . 6 - L の配列を示す。下線、プライマー p S o y H s p P s t I __ F 及び p S o y H s p - B a m H I __ R は、プロモーター領域の増幅断片を規定する。点のボックスでは $AT_{(n)}$ 挿入物、灰色ボックスではコード配列の開始コドン（A T G）と停止コドン（T A A）である。

【図3】遺伝子 G m h s p 1 7 . 6 - L（GenBankの受入番号：M 1 1 3 1 7）の配列を示す。灰色ボックスではコード配列を規定する開始コドン（A T G）と停止コドン（T A A）、点ボックスではプロモーター領域中の $AT_{(n)}$ 挿入物を強調し、下線は、遺伝子の完全な配列決定のために設計されたプライマー p S o y H s p P s t I __ F と S o y H S P C l __ R である。

【図4】GenBank（受入番号：M 1 1 3 1 7）から利用可能な遺伝子の完全配列に基づいて設計されたプライマー p S o y H s p __ A l e I __ F と p S o y H s p __ N c o I __ R を用いた遺伝子 G m h s p 1 7 . 6 - L のプロモーター領域の増幅を示す。ラダーは 1 0 0 p b と 5 0 0 p b である。

【図5】GenBank（受入番号：M 1 1 3 1 7）から利用可能な遺伝子の完全配列に基づいて設計されたプライマー p S o y H S P P s t I F と p S o y H S P C l R を用いて完全遺伝子 G m h s p 1 7 . 6 - L の増幅を示す。ラダーは 1 0 0 p b と 5 0 0 b p である。

【図6】プロモーター領域を規定するプライマー p S o y H S P P s t I __ F と p S o y

10

20

30

40

50

H S P B a m H I __ R のセットを用いた、耐性親個体 P I 5 9 5 0 9 9、感受性親 B R S 1 3 3、感受性集団 2 5 6 - S、2 5 9 - S の個体、並びに耐性集団 J F 7 0 0 2、J F 7 0 2 7 及び J F 7 0 5 6 の個体の増幅によって生じた遺伝子 G m h s p 1 7 . 6 - L のプロモーター領域の配列のアラインメントを示す。プライマーは、遺伝子 G m h s p 1 7 . 6 - L (G e n B a n k の受入番号：M 1 1 3 1 7) の完全配列に基づいて規定された。点のボックスでは A T _(n) 挿入物である。ボックスではおそらく T A T A - ボックスである。白字を有する黒いボックスは、コンセンサス配列 5 ' A G G A A n n T T C T 3 ' の熱ショックエレメント (H S E) の 1 つである。白字を有する灰色ボックスでは、コア 5 ' C T n G A A n n T T C n A G 3 ' を有する別のコンセンサス配列 5 ' c T T C t a G A A g c T T C t a G A A g 3 ' である。

10

【図 7】G e n B a n k で利用可能な遺伝子 (受入番号：M 1 1 3 1 7) の配列と比較した、遺伝子 G m h s p 1 7 . 6 - L のプロモーター領域とコード配列の開始の間に存在する遺伝子配列を示し、研究の材料は、感受性 (B R S 1 3 3) と耐性 (P I 5 9 5 0 9 9)、感受性集団 2 5 6 - S、2 5 9 - S 及び 2 6 6 - S の個体、並びに耐性集団 J F 7 0 0 2、J F 7 0 2 7 及び J F 7 0 5 6 の個体である。灰色ボックスのヌクレオチドはコード領域の転写開始部位のコドン A T G を強調する。

【図 8 A】G e n B a n k で利用可能な遺伝子 (受入番号：M 1 1 3 1 7) の配列と比較した、研究中の全ての材料の感受性親 B R S 1 3 3 と耐性 P I 5 9 5 0 9 9、感受性集団 2 5 6 - S、2 5 9 - S 及び 2 6 6 - S の個体、並びに耐性集団 J F 7 0 0 2、J F 7 0 2 7 及び J F 7 0 5 6 の個体由来の遺伝子 G m h s p 1 7 . 6 - L のコード配列のアラインメントを示す。灰色ボックスのヌクレオチドはコード領域を規定する A T G 開始コドン及び T A A 熱転写コドンを強調する。

20

【図 8 B】G e n B a n k で利用可能な遺伝子 (受入番号：M 1 1 3 1 7) の配列と比較した、研究中の全ての材料の感受性親 B R S 1 3 3 と耐性 P I 5 9 5 0 9 9、感受性集団 2 5 6 - S、2 5 9 - S 及び 2 6 6 - S の個体、並びに耐性集団 J F 7 0 0 2、J F 7 0 2 7 及び J F 7 0 5 6 の個体由来の遺伝子 G m h s p 1 7 . 6 - L のコード配列のアラインメントを示す。灰色ボックスのヌクレオチドはコード領域を規定する A T G 開始コドン及び T A A 熱転写コドンを強調する。

【図 9】G e n B a n k で利用可能な遺伝子 (受入番号：M 1 1 3 1 7) の配列と比較した、研究中の全ての材料の感受性親 B R S 1 3 3 と耐性 P I 5 9 5 0 9 9、感受性集団 2 5 6 - S、2 5 9 - S 及び 2 6 6 - S の個体、並びに耐性集団 J F 7 0 0 2、J F 7 0 2 7 及び J F 7 0 5 6 の個体由来の遺伝子 G m h s p 1 7 . 6 - L のコード配列によってコードされたアミノ酸配列のアラインメントを示す。

30

【図 10】M . ジャワニカに耐性及び感受性試料を用いて、遺伝子 G m h s p 1 7 . 6 - L (G e n B a n k の受入番号：M 1 1 3 1 7) の断片から構築したプローブ (3 2 6 p b) を用いて行ったリボヌクレアーゼ保護を示す。上部の数は使用された試料に同等である：感受性親 (B R S 1 3 3) と耐性 (P I 5 9 5 0 9 9) と M . ジャワニカの卵を用いて接種 (2 及び 4) された処理、キットの陽性対照 (5 - 矢印で指示)、R N a s e 酵素の対照、設計されたプローブ (6)、並びに R N a s e の未消化 (7) である。

【図 11】シスト線虫 M . ジャワニカの接種及び非接種の処理における耐性 (P I 5 9 5 0 9 9) と感受性 (B R S 1 3 3) 親における遺伝子 G m h s p 1 7 . 6 - L の相対的定量化を示す。G e n B a n k で利用可能な遺伝子 (受入番号：M 1 1 3 1 7) の完全配列を用いて、プログラム P r i m e r E x p r e s s (登録商標) ソフトウェア v 2 0 を用いて設計されたプライマー S O Y H S P P S C F と S o y H S P P S C R によるリアルタイム P C R によってデータを得た。定量化は、 2^{-C_t} 法を用いて行った。遺伝子 r R N A 1 8 S は、ゲージとして規定及び非接種試料として使用された。試料は、S Y B R 法を用いた 3 つの独立した稼働において 3 点測定において増幅された。

40

【図 12】シスト線虫 M . ジャワニカの接種及び非接種の処理における感受性集団 2 5 6 - S、2 5 9 - S 及び 2 6 6 - S の個体；並びに耐性集団 J F 7 0 0 2、J F 7 0 2 7 及び J F 7 0 5 6 の個体における遺伝子 G m h s p 1 7 . 6 - L の相対的定量化 (x) を示

50

す。GenBankで利用可能な遺伝子(受入番号:M11317)の完全配列を用いて、プログラムPrimer Express(登録商標)ソフトウェアv2.0を用いて設計されたプライマーSOYHSP_PSC_FとSoyHSP_PSC_RによるリアルタイムPCRによってデータを得た。定量化は、 2^{-Ct} 法を用いて行った。遺伝子rRNA 18Sは、ゲージとして規定及び非接種試料256-Sとして使用された。試料は、SYBR法を用いた3つの独立した稼働において3点測定において増幅された。

【図13】酵素 - グルクロニダーゼをコードするGusレポーター遺伝子、遺伝子Ahas及びプロモーターact2を例示する、プラスミドpAG1の図式的モデルを示す。また、制限マップを示す。

【図14】試験された材料: BRS133、PI595099、256-S、259-S及び266-S、JF7002、JF7027及びJF7056を用いて得られた発現カセットの全ての構築物の、遺伝子Gmhs p17.6-Lのプロモーター領域のPCRを介した増幅を示す。反応は、363pbの断片を増幅するプライマーpSoyHs pSSTI__FとpSoyHs pBamHI__Rを用いて行われ、次にアガロースゲル(1.0%)の電気泳動によって分離した。試料BRS133とJF7056の増幅反応はPCR中に濃縮した。

【図15】試験された材料: BRS133、PI595099、256-S、259-S及び266-S、JF7002、JF7027及びJF7056を用いて得られた発現カセットの全ての構築物の、プラスミドpAG1に存在する遺伝子Ahasの部分のPCRを介した増幅を示す。反応は、654pbの断片を増幅するプライマーAhas1__FとAhas2__Rを用いて行われ、次にアガロースゲル(1.0%)の電気泳動によって分離した。

【図16】試験された材料: BRS133、PI595099、256-S、259-S及び266-S、JF7002、JF7027及びJF7056を用いて得られた発現カセットの全ての構築物の、プラスミドpAG1に存在する末端領域NosのPCRを介した増幅を示す。反応は、200pbの断片を増幅するプライマーNos1__FとNos3__Rを用いて行われ、次にアガロースゲル(1.0%)の電気泳動によって分離した。

【図17】非生物的ストレス及び生物的ストレスの試験プラークの構造を例示する図式的モデルを示し、それに、異なる発現カセットで形質転換された、シスト線虫、BRS133及びピントド(Pintado)(斑点)に感受性である品種の大豆胚を与えた。CN-負の対照、形質転換されていない胚; CP-正の対照、プラスミドpAG1で形質転換された胚; S-感受性親起源のプロモーター領域を用いて構築された発現カセットで形質転換された胚、pAG1/プロモーターGmHs p__BRS133; R-耐性集団の個体起源のプロモーター領域を用いて構築された発現カセットで形質転換された胚、pAG2/プロモーター領域GmHs p__JF7027。

【図18】シスト線虫ジャワニカに感受性であり、発現カセットpAG1/プロモーターGmHs p__BRS133とpAG1/プロモーターGmHs p__JF7027を用いてバイオバリティクス(biobalistics)によって形質転換され、2時間、4時間及び24時間、25℃の温度で熱ストレスに供された大豆の品種BRS133とピントド(斑点)の胚で行った組織化学的試験を示す。青色ドットは陽性反応を指示する。CN-負の対照、形質転換されていない胚; CP-正の対照、プラスミドpAG1で形質転換された胚; S-発現カセットpAG1/プロモーターGmHs p__BRS133で形質転換された感受性胚; R-発現カセットpAG1/プロモーターGmHs p__JF7027で形質転換された耐性胚。

【図19】シスト線虫ジャワニカに感受性であり、発現カセットpAG1/プロモーターGmHs p__BRS133とpAG1/プロモーターGmHs p__JF7027を用いてバイオバリティクスによって形質転換され、2時間、4時間及び24時間、35℃の温度で熱ストレスに供された大豆の品種BRS133とピントド(斑点)の胚で行った組織化学的試験を示す。青色ドットは陽性反応を指示する。CN-負の対照、形質転換されていない胚; CP-正の対照、プラスミドpAG1で形質転換された胚; S-発現カセットp

10

20

30

40

50

A G 1 / プロモーター G m h s p __ B R S 1 3 3 で形質転換された感受性胚 ; R - 発現カセット p A G 1 / プロモーター G m h s p __ J F 7 0 2 7 で形質転換された耐性胚。

【図 2 0】シスト線虫ジャワニカに感受性であり、発現カセット p A G 1 / プロモーター G m H s p __ B R S 1 3 3 と p A G 1 / プロモーター G m h s p __ J F 7 0 2 7 を用いてバイオパリティクスによって形質転換され、2 時間、4 時間及び 2 4 時間、4 5 の温度で熱ストレスに供された大豆の品種 B R S 1 3 3 とピンタド (斑点) の胚で行った組織化学的試験を示す。青色ドットは陽性反応を指示する。C N - 負の対照、形質転換されていない胚 ; C P - 正の対照、プラスミド p A G 1 で形質転換された胚 ; S - 発現カセット p A G 1 / プロモーター G m h s p __ B R S 1 3 3 で形質転換された感受性胚 ; R - 発現カセット p A G 1 / プロモーター G m h s p __ J F 7 0 2 7 で形質転換された耐性胚。

10

【図 2 1】シスト線虫ジャワニカに感受性であり、発現カセット p A G 1 / プロモーター G m h s p __ B R S 1 3 3 と p A G 1 / プロモーター G m h s p __ J F 7 0 2 7 を用いてバイオパリティクスによって形質転換され、2 時間、4 時間及び 2 4 時間、4 の温度で熱ストレスに供された大豆の品種 B R S 1 3 3 とピンタド (斑点) の胚で行った組織化学的試験を示す。青色ドットは陽性反応を指示する。C N - 負の対照、形質転換されていない胚 ; C P - 正の対照、プラスミド p A G 1 で形質転換された胚 ; S - 発現カセット p A G 1 / プロモーター G m h s p __ B R S 1 3 3 で形質転換された感受性胚 ; R - 発現カセット p A G 1 / プロモーター G m h s p __ J F 7 0 2 7 で形質転換された耐性胚。

【図 2 2】シスト線虫ジャワニカに感受性であり、発現カセット p A G 1 / プロモーター G m h s p __ B R S 1 3 3 と p A G 1 / プロモーター G m h s p __ J F 7 0 2 7 を用いてバイオパリティクスによって形質転換され、2 時間、4 時間及び 2 4 時間、1 5 の温度で熱ストレスに供された大豆の品種 B R S 1 3 3 とピンタド (斑点) の胚で行った組織化学的試験を示す。青色ドットは陽性反応を指示する。C N - 負の対照、形質転換されていない胚 ; C P - 正の対照、プラスミド p A G 1 で形質転換された胚 ; S - 発現カセット p A G 1 / プロモーター G m h s p __ B R S 1 3 3 で形質転換された感受性胚 ; R - 発現カセット p A G 1 / プロモーター G m h s p __ J F 7 0 2 7 で形質転換された耐性胚。

20

【図 2 3】シスト線虫ジャワニカに感受性であり、発現カセット p A G 1 / プロモーター G m H s p __ B R S 1 3 3 と p A G 1 / プロモーター G m h s p __ J F 7 0 2 7 を用いてバイオパリティクスによって形質転換され、2 4 時間、2 0 0 m M、4 0 0 m M 濃度の N a C l₂ の塩に供された大豆の品種 B R S 1 3 3 とピンタド (斑点) の胚で行った組織化学的試験を示す。青色ドットは陽性反応を指示する。C N - 負の対照、形質転換されていない胚 ; C P - 正の対照、プラスミド p A G 1 で形質転換された胚 ; S - 発現カセット p A G 1 / プロモーター G m h s p __ B R S 1 3 3 で形質転換された感受性胚 ; R - 発現カセット p A G 1 / プロモーター G m h s p __ J F 7 0 2 7 で形質転換された耐性胚。

30

【図 2 4】シスト線虫ジャワニカに感受性であり、発現カセット p A G 1 / プロモーター G m H s p __ B R S 1 3 3 と p A G 1 / プロモーター G m h s p __ J F 7 0 2 7 を用いてバイオパリティクスによって形質転換され、2 時間、4 時間及び 6 時間、温室中で 3 7 でペーパーフィルターに胚を維持しながら干ばつストレスに供された大豆の品種 B R S 1 3 3 とピンタド (斑点) の胚で行った組織化学的試験を示す。青色ドットは陽性反応を指示する。C N - 負の対照、形質転換されていない胚 ; C P - 正の対照、プラスミド p A G 1 で形質転換された胚 ; S - 発現カセット p A G 1 / プロモーター G m h s p __ B R S 1 3 3 で形質転換された感受性胚 ; R - 発現カセット p A G 1 / プロモーター G m h s p __ J F 7 0 2 7 で形質転換された耐性胚。

40

【図 2 5】シスト線虫ジャワニカに感受性であり、発現カセット p A G 1 / プロモーター G m H s p __ B R S 1 3 3 と p A G 1 / プロモーター G m h s p __ J F 7 0 2 7 を用いてバイオパリティクスによって形質転換され、2 0 0 0 ~ 3 0 0 0 J₂ / m L の接種のよる生物的ストレスに供された大豆の品種 B R S 1 3 3 の胚で行った組織化学的試験を示す。試料は、2 4 時間、4 8 時間及び 7 2 時間、病原体と接触し続けた。青色ドットは陽性反応を指示する。C N - 負の対照、形質転換されていない胚 ; C P - 正の対照、プラスミド p A G 1 で形質転換された胚 ; S - 発現カセット p A G 1 / プロモーター G m h s p __ B

50

R S 1 3 3 で形質転換された感受性胚； R - 発現カセット p A G 1 / プロモーター G m h s p __ J F 7 0 2 7 で形質転換された耐性胚。

【図 2 6】シスト線虫ジャワニカに感受性であり、発現カセット p A G 1 / プロモーター G m h s p __ B R S 1 3 3 と p A G 1 / プロモーター G m h s p __ J F 7 0 2 7 を用いてバイオパリティクスによって形質転換され、2000 ~ 3000 J₂ / mL の接種のよる生物的ストレスに供された大豆の品種ピントド（斑点）の胚で行った組織化学的試験を示す。試料は、24 時間、48 時間及び 72 時間、病原体と接触し続けた。青色ドットは陽性反応を指示する。C N - 負の対照、形質転換されていない胚； C P - 正の対照、プラスミド p A G 1 で形質転換された胚； S - 発現カセット p A G 1 / プロモーター G m h s p __ B R S 1 3 3 で形質転換された感受性胚； R - 発現カセット p A G 1 / プロモーター G m h s p __ J F 7 0 2 7 で形質転換された耐性胚。

10

【発明を実施するための形態】

【0026】

本発明は、植物におけるコード配列の発現レベルを調節するためのプロモーターエレメントにおける A T_(n) 挿入物の使用に関する。集団における耐性及び感受性の個体のうちで、熱ショックタンパク質（G m h s p 1 7 . 6 - L）の発現レベルについて比較し、定量的 P C R あたりの最大発現レベルは、プロモーター領域における最大 A T 挿入物を含む個体に存在していた。大豆胚を形質転換するために、G U S タンパク質に融合した異なる数の A T 挿入物をとともに、遺伝子のプロモーター領域を含む遺伝子発現カセットを構築した。本発明の実験結果により、ある種の遺伝子の発現レベルは、遺伝子工学的ツールを介して、プロモーター領域内に A T_(n) 繰り返し塩基を挿入することによって、ある種の制限内で人工的に情報制御（上流）又は下方制御（下流）され得たことが示唆される。したがって、本発明において開発された技術は、A T_(n) 繰り返し挿入物がプロモーター領域の配列内の特異的な点で挿入されるという条件で、遺伝子の発現レベルの調節を可能にする。

20

【0027】

線虫メロイドギネ・ジャワニカに耐性な大豆遺伝子型の支援された選択における使用のための分子マーカーを特定しようとする従来の研究に基づいて、F 結合基のマイクロサテライトマーカー S O Y H S P 1 7 6 は、試験された集団について高い有意性を示し、根におけるシストの特徴的数について説明し、表現型パリエーションは 43%、記入尺度法でそのパリエーションの 70% を示した。このマーカーによって増幅した断片は、感受性個体にのみ存在し、耐性個体では存在しないことを指摘するのは重要である。

30

【0028】

このマーカーを配列決定し、その後、遺伝子バンクに寄託された核酸の他の配列との類似性について探索され、この配列は、低分子量の熱ショックタンパク質（G m h s p 1 7 . 6 - L）のプロモーター領域と高い相同性を示し、大豆に見出され、G e n B a n k（受入番号：M 1 1 3 1 7）で寄託された。G e n B a n k で利用可能であるこの遺伝子の完全な配列を用いて、新しいプライマー対は、両方の遺伝子型における断片を増幅するために設計された。

40

【0029】

この戦略は成功し、断片は、感受性個体と耐性個体の両方で得られた。得られた断片の全てをクローニング及び配列決定し、また、遺伝子 G m h s p 1 7 . 6 - L の同じプロモーター領域と相同性を示した。しかしながら、配列のアラインメントは、感受性植物と比較した場合、耐性植物は、A T_(n) 繰り返しによって特徴付けられる、マイクロサテライトのより大きな挿入物を遺伝子のプロモーター領域に有していた。このようにして、耐性親 P I 5 9 5 0 9 9 起源の断片は、G e n B a n k で利用可能である遺伝子 G m h s p 1 7 . 6 - L の配列と比較した場合に、15 及び 13 の A T のさらなる繰り返しを示した。他方、感受性親 B R S 1 3 3 起源の断片は、G e n B a n k で利用可能である配列よりも 6 回少ない A T 繰り返しを有する。これらの結果は、配列決定もされたこの異種交配に起因した集団の耐性及び感受性の個体について繰り返された。

50

【 0 0 3 0 】

また、アラインメントは、増幅された断片の全ては、マイクロサテライトマーカー S O Y H S P 1 7 6 のプライマーに相補的な配列を有することを示した。これを達成した場合、次に以下の疑問が生じる：マイクロサテライトプライマーのアニリング領域が高い確立で存在するとしても、増幅が初期に耐性な植物に生じなかったのか？ 1つの可能性は、例えばヘアピンなどのある種の三次構造の形成を与える、耐性個体においてより多数の A T 繰り返しであり、その結果、D N A ポリメラーゼを増幅プロセス中にプライマーがアニリングすることを困難にし、結論として、これらの植物においてアンプリコンの形成を阻害したのである。

【 0 0 3 1 】

この遺伝子のプロモーター領域内のマイクロサテライトの挿入は、これらの個体においてのみマーカー S O Y H S P 1 7 6 が増幅したことから、感受性植物においてそれを非活性化すると考えられた。しかしながら、研究は、全ての試料はマイクロサテライトの挿入を示したことを表し、おそらくは、それは線虫に対する大豆の応答において干渉している可能性があるプロモーター領域内に A T 繰り返し数である。遺伝子のプロモーター領域への繰り返し配列のより多くの又はより少ない挿入の存在が、このプロモーターによって調節されるタンパク質を非活性化し、活性化し、又はその発現レベルを変更する場合がある。

【 0 0 3 2 】

文献によると、熱ショックタンパク質の遺伝子発現の調節において繰り返しされるこれらの A T - エレメントの主な機能の1つは、転写開始部位への R N A ポリメラーゼのアクセスを促進することであり、さらに、転写の誘導に関与する、熱ショックタンパク質の結合を促進するためにヒストンを排除することである。文献によれば、熱ショックタンパク質は、細胞内で分子シェペロンとして作用し、新生ポリペプチド鎖を確立し、それらの正しいフォールディングを支援し、タンパク質及び/又は変性した膜を再確立し、さらにシグナル伝達において重要な役割を果たす。

【 0 0 3 3 】

したがって、遺伝子 G m h s p 1 7 . 6 - L のプロモーター領域への挿入の長さが M . ジャワニカによって影響される耐性及び感受性個体におけるタンパク質 G m h s p 1 7 . 6 - L の発現レベルを変更するという仮説を調べるために、リボヌクレアーゼ保護アッセイを使用した。結果は、全ての個体は、耐性である又は感受性であるかに関係なく、そして、処置に関わらず、線虫を接種されるか又はされないかに関係なく、タンパク質を発現することを示した。遺伝子制御における A T 配列の生物学的機能、及びプロモーター内の繰り返し数に関する個体間に存在する差異により、リボヌクレアーゼ保護アッセイは、異なる個体において遺伝子 G m h s p 1 7 . 6 - L の発現鎖を示すと考えられたが、なお、その結果は、理論的には、線虫による感染に反応して、この遺伝子の発現に差異がないことを示し、少なくとも使用された技術によって検出可能なレベルではなかった。

【 0 0 3 4 】

これらの結果を確認する試みにおいて、新たな研究は、遺伝子発現レベルを定量するための正確かつ精密な技術であるリアルタイム P C R (R T - P C R) を用いて案出された。親 B R S 1 3 3 (感受性) 及び P I 5 9 5 0 9 9 (耐性) 、さらに、この異種交配に由来する感受性集団の個体 (2 5 6 - S 、 2 5 9 - S 及び 2 6 6 - S) 並びに耐性集団の個体 (J F 7 0 0 2 、 J F 7 0 2 7 及び J F 7 0 5 6) に線虫を接種した。メロイドギネ・ジャワニカで接種された及び接種されていない処置の根は、R N A の抽出に回収され、全 c D N A 合成は、その後、相対的定量のための R T - P C R 反応に使用された。

【 0 0 3 5 】

結果は、全ての耐性の親個体 P I 5 9 5 0 9 9 、その集団の J F 7 0 0 2 、 J F 7 0 2 7 及び J F 7 0 5 6 は、シスト線虫で接種処理された遺伝子 G m h s p 1 7 . 6 - L のより高い発現を提示することが示された。この集団のこれらの個体は、配列決定において、遺伝子のプロモーター領域内のより高い A T _(n) 繰り返しを示したのと同じである。我々

10

20

30

40

50

の仮説は、線虫によって感染させた場合、細胞内のシャペロンの機能を有するその転写を活性化する、耐性植物の遺伝子 *Gm h s p 1 7 . 6 - L* のプロモーターの A T リッチ領域と相互作用するある種の因子を生成するということである。A T 領域などの因子の相互作用に感受性のある植物において、それはこのような激しいやり方で生じなく、これは、タンパク質 *Gm h s p 1 7 . 6 - L* の発現レベルが線虫に感受性のある植物においてより低いことを意味する。

【0036】

本発明の技術を通じて、プロモーター領域の特定の点における異なるサイズの A T 挿入物を含む、異なる遺伝子の発現レベルを制御することが可能となる。また、A T 挿入のサイズに比例して、プロモーター領域に存在する、遺伝子を過剰発現又は低発現する G M 植物を開発することが可能となる。

10

【実施例】

【0037】

生物材料

構築物は、根こぶ (*g a l l*) 線虫であるメロイドギネ・ジャワニカ (*M e l o i d o g y n e j a v a n i c a*) にそれぞれ耐性であり、影響を受けやすい大豆遺伝子型の親 P I 5 9 5 0 9 9 及び B R S 1 3 3 を用いて生じさせた。この高配から、F 4 世代において、感受性集団の個体 2 5 6 - S、2 5 9 - S 及び 2 6 6 - S、並びに耐性集団である個体 J F 7 0 0 2、J F 7 0 2 7 及び J F 7 0 5 6 を選択し、本試験に用いた。

20

【0038】

また、線虫に感受性である品種ピントド (*P i n t a d o*) は、異なる試料から構築され、遺伝子 *Gm h s p 1 7 . 6 - L* (*G e n B a n k* 受入番号: M 1 1 3 1 7) のプロモーター領域における異なる A T_(n) を含む発現カセットを用いて大豆胚の形質転換工程において、粒子衝突を介して用いられた。

【0039】

実施例 1 : プロモーター及び完全遺伝子の単離及び特徴付け

マイクロサテライトマーカース O Y H S P 1 7 6 プライマーを用いて感受性材料の増幅断片の初期配列決定から得た遺伝子 *Gm h s p 1 7 . 6 - L* の完全配列を用いて、初期に、感受性遺伝子型だけがマイクロサテライトマーカース O Y H S P 1 7 6 を増幅したことを考慮して、分析中の全ての遺伝子型におけるバンドを得るために、新規なプライマーセットを設計した (図 1)。

30

【0040】

プライマー (*p S o y H s p __ A l e I F 5 ' C A C C G C C G G T G G A A T T C T G A A A T T G G G T C T T T T T G 3 ' ; p S o y H s p __ N c o I R 5 ' C C A T G G A A T G G G G A C A C T C G A G G T A T T 3 '*) は、遺伝子 *Gm h s p 1 7 . 6 - L* のプロモーター領域の開始において合成され、後のクローニング用に制限部位を付した。図 2 は、*G e n B a n k* で利用可能である遺伝子 *Gm h s p 1 7 . 6 - L* の配列におけるプライマーアニーリング部位を示す。

【0041】

より新しいプライマーセット (*p S o y H S P __ P s t I __ F 5 ' G G G C T G C A G G A A T T C T G A A A T T G G G T C T T T T T G 3 ' ; S o y H S P C L __ R 5 ' C C C C C C G G G T T A A C C A G A G A T T T C T A T A G C C T 3 '*) を設計し、これは、コード領域のプロモーターの開始から終止コドンまでの全遺伝子を増幅し、根こぶ線虫である *M . j a v a n i c a* に感受性である遺伝子型と耐性である遺伝子型との間のプロモーター良識の A T_(n) 挿入物以外に、遺伝子配列における他の相違の存在を確認するためであった。図 3 は、完全な遺伝子を増幅し、配列決定するために設計された、*G e n B a n k* で利用可能である、遺伝子 *Gm h s p 1 7 . 6 - L* の配列におけるプライマーアニーリング部位を示す。

40

【0042】

50

種子由来のゲノムDNAを全ての分析された試料から抽出した。各々の分析した試料からの約50mgの種子は、カミソリの刃で薄片にスライスし、1.5mLマイクロチューブに回収し、300 μ Lの抽出緩衝液を添加した。材料を粉碎し、さらに700 μ Lの抽出緩衝液を添加した。以下の表に示されたプロトコールに従って抽出緩衝液を調製した：

【0043】

【表1】

試薬	保存濃度	最終濃度	10 mLに対して
Tris-HCl pH 7.5	1 mol/L	200 mM	2 mL
NaCl	5 mol/L	288 mM	575 μ L
EDTA	500 mM	25 mM	500 μ L
SDS	10%	0.5%	500 μ L
H ₂ O	—	—	6.5 mL

10

20

【0044】

30秒～1分間、ボルテックスを用いて溶液をホモジナイズし、4分間、16,000 \times gで室温にて遠心分離した。懸濁液を新しい1.5mLチューブに移し、前回と同じ条件で新たに遠心分離工程に提供し、新しい1.5mLチューブに移した。

【0045】

タンパク質を排除するために、0.1mgのプロテイナーゼKと0.01mMのCaCl₂を試料に添加し、水浴中で37 $^{\circ}$ Cにて90分間インキュベートした。900 μ Lの冷イソプロパノールを添加し、2分間インキュベーション後、7分間、16,000 \times gで遠心分離を行った。上清を捨て、ペレットを90分間乾燥させた。40 μ g/ μ LのRNase Aを含む300 μ LのTE緩衝液(Tris-HCl 1M、pH8.0、EDTA 0.5M、pH8.0)にペレットを再懸濁させ、RNAを排除するために、もう一度、水浴中で37 $^{\circ}$ Cにて90分間、試料をインキュベートした。次に、新たに沈殿工程を行い、最終的に、DNAペレットを300 μ LのTE緩衝液に再懸濁させ、分光偏光計を用いて定量し、その質及び完全性を0.8%アガロースゲルにおいて確認した。

30

【0046】

全ての耐性試料及び感受性試料から、プロモーター領域と完全遺伝子配列を増幅するために、PCR反応をPerkin Elmer 9600サーモサイクラーを用いて行い、30ngの鋳型DNA、10 \times 反応緩衝液(100mMのTris-HCl pH8.3、500mMのKCl、及び400 μ Lの超純水)、1.5mMのMgCl₂、1.3mMのdNTP、1UのTaq DNAポリメラーゼ、及び5 μ Mの各FとRプライマーから構成され、超純水を用いて最終体積を10 μ Lにして完了した。

40

【0047】

DNA試料を増幅するために使用した熱サイクルプログラムは、以下のように構成される：94 $^{\circ}$ Cで7分間の初期変性段階、続く、94 $^{\circ}$ Cで1分間の変性、60 $^{\circ}$ Cで1分間のアニリング、及び72 $^{\circ}$ Cで2分間の伸長の30サイクル。72 $^{\circ}$ Cで7分間のサイクルを最終に行った。増幅生成物を1%アガロースゲルで分離し、1 \times TBE緩衝液(108g Tris塩基、55g ボロン酸、40mLのEDTA 0.5M pH8.0、及び蒸留水、最終体積を1Lとして完了する)を用いて調製され、エチジウムブロマイド(10mg/mL)で染色した。Kodak Digital DC290システムを用いてイメージを得た。

50

【0048】

増幅した断片(図4及び5)は、Pure Link(商標) Quick Gel Extraction(Invitrogen)キットを用いて、製造業者の使用説明書に従って抽出された。DNAを精製後、 -20°C にて保存した。次に、DNAを定量し、断片とプラスミドベクターとの間の連結反応をTOPO(登録商標)TAクローニングキット(Invitrogen)を用いて行った。連結反応は以下の構成であった： $2\mu\text{L}$ 超純水； $1\mu\text{L}$ 塩溶液($7\mu\text{L}$ の塩溶液の希釈： $21\mu\text{L}$ の超純水)； $1\mu\text{L}$ のTOPO(登録商標)ベクター及び $2\mu\text{L}$ (約 10ng)の精製バンド。試料を室温にて5分間インキュベートした。

【0049】

得られたベクターは、エレクトロポレーションを通じて、大腸菌(DH10B菌株)細胞形質転換のために使用された。エレクトロコンピテント細胞を調製し、グリセロールストックからプレートストリーキングを通じて単離されたコロニーを得た。次に、5個の単一コロニーは、一晚、 10mL のLB培地-Luria Bertani(1L の蒸留水に対して、トリプトファン、酵母エキス及びNaOHの 20g 混合物)中で 37°C にて 200rpm で培養された(プレ接種) 5mL のプレ接種は、OD500が $0.5\sim 0.7$ に到達するまで、 37°C にて 300rpm 回転した 500mL のLB培地に添加された。この期間後、氷上で20分間、細胞をインキュベートし、無菌状態で、氷で予め冷やした 250mL 遠沈管に移した。 4°C 、 $278\times\text{g}$ で15分間、 4°C での遠心分離工程を行い、上清を捨て、ペレットを冷却した 10% グリセロールの 500mL 中に再懸濁させた。同じ条件下で新たに遠心分離を行い、上清を捨て、ペレットを冷却した 10% グリセロールの 250mL に再懸濁させた。もう一度、遠心分離工程を行い、ペレットを冷却した 10% グリセロールの 20mL に再懸濁させた。溶液を 50mL の滅菌チューブに移し、 $3997\times\text{g}$ で15分間、 4°C にて遠心分離を行った。最終行程として、ペレットを冷却した 10% グリセロールの $1\text{mL}\sim 2\text{mL}$ に再懸濁させた。エレクトロコンピテント細胞を $500\mu\text{L}$ のマイクロチューブに分注し、 -80°C の冷凍庫で保存した。

【0050】

2.5kV 、 $25\mu\text{F}$ に設定したMicroPulsar(BioRad)エレクトロポレーター、及び 200 又は 400 オームに設定したパルスコントローラーでエレクトロポレーションを行った。 $2\mu\text{L}$ の連結反応物及び $100\mu\text{L}$ のエレクトロコンピテント細胞を用いた。細胞救出は、 15mL の滅菌Falconチューブにおいて、 1mL のSOC培地(0.5g 酵母エキス、 2g トリプトファン、 10mM のNaCl、 2.5mM のKCl、 10mM の MgCl_2 、 10mM の MgSO_4 、 20mM グルコース、及び 96mM の蒸留水)中の細菌懸濁液を培養し、 37°C にて1時間 200rpm でインキュベートすることによって得られた。この期間後、 $300\mu\text{L}$ のエレクトロポレーションした細胞は、アンピシリン($100\mu\text{g}/30\text{mL}$)を補足し、IPTG/X-Gal($50\mu\text{L}$ のIPTG-イソプロピル- β -チオガラクトピラノシド 0.1M 、及び $10\mu\text{L}$ のX-Gal- β -プロモ-4-クロロ-3-インドリル-D-ガラクトシド($50\text{mg}/\text{mL}$)/プレート)を含む固体LB培地に播種した。プレートを 37°C にて、一晚、コロニー増殖のためにインキュベートした。組換えコロニーの選択はlacZシステムを用いて行い、組換えコロニーは、白いコロニーを示し、非組換えコロニーは青いコロニーを示す。これは、lacZ遺伝子産物と基質(X-Gal)との反応の得られる生産物に起因している。

【0051】

次に、断片のクローニング及びサイズを確認するために、プラスミドDNA抽出物は、 1mL のCG培地-サイクルグロ-(100mL の水に対して 4g の市販混合物)及び $100\mu\text{L}/\text{mL}$ のアンピシリン(50mL のCG培地に対して $50\mu\text{L}$ のアンピシリン($100\text{mg}/\text{mL}$))を含む、 96 ウェルマイクロプレート中に単一の白色コロニーの接種によって実施された。プレートを密封し、 37°C にて 320rpm で22時間、材料をインキュベートした。

10

20

30

40

50

【0052】

プラスミド抽出を進める前に、成長細菌の永続培養を得て、一晚増殖させたCG培地75mlと50%無菌グリセロールを滅菌プレートに含む。この培養物を-80で超冷凍庫にて保存し、ストックとした。

【0053】

ミニプレップを続行し、細胞の堆積物を得るために、マイクロプレートを6分間、1,310×g、10で遠心分離した。上清を捨て、吸収ペーパー上にプレートを素早く逆さにした。次に、200μLのGET(20%グルコース、0.5M EDTA pH8.0、1M Tris-HCl pH7.4及び500mLに満たすための水)を各植えるに添加し、プレートを密封し、2分間、ボルテックスを用いて激しく振とうし、細胞を再懸濁させた。新たに9分間、1,310×g、10の遠心分離を行い、上清を捨て、吸収ペーパー上にプレートを素早く逆さにし、乾燥させた。

10

【0054】

RNase A(10mg/mL)を含む65μLのGETをマイクロプレートの各ウェルに添加した。全ての材料は、ボルテックスを用いて再懸濁させ、「U」底のプレートに移した。次に、各ウェルに65μLのNaOH 0.2N/SDS 1%(0.5mL NaOH 4M+1mL SDS 10%+超純水、10mLの体積になるようにする)を添加した。この溶液は、使用される工程の直前に調製された。プレートを密封し;材料を5~10分間の反転により混合し、10分間室温にてインキュベートした。接着シールに溶液が残らなくなるまで、数秒の迅速遠心分離を行った。

20

【0055】

各ウェルに、4で保存した3M酢酸カリウム(KOAc)60mLを添加し、プレートを密封し、材料を10回反転することによって混合し、10分間のインキュベートを氷上で行った。15分間、1,310×g、4の遠心分離工程を行い、80μLの上清をMillipore(登録商標)(MAGV N22)プレートに移し、250μLの「V」底ポリプロピレン製マイクロプレートの上部に予め固定した。プレートを5分間、1,310×g、4にて遠心分離し、又は全容積が底プレート(V底)に移されるまで行われた。Millipore(登録商標)プレートを取り出し、捨て、「V」底プレートに移されるる過された溶液に80μLのイソプロパノールを添加した。

30

【0056】

「V」底プレートをアルコール耐性接着剤を用いて密封し、材料を反転して混合した。45分、1,310×g、4の遠心分離工程を行い、上清をプレートを反転することによって捨て、150μLの冷70%エタノールを各試料に添加した。プレートを再度、5分間、1,310×g、4にて遠心分離し、上清を捨てた後、吸収ペーパー上にプレートを反転させ、素早く82×g、4でスピンドウンした。プレートをペーパータオルで覆い、60分間室温にて乾燥させ、最終的には、DNAを30μLの超純水に再懸濁させた。プレートを密封し、プラスミドDNAの完全な溶出のために室温にて一晚インキュベートした。この期間の経過後、プラスミドDNAを含むプレートを-20の冷凍庫に保存した。

40

【0057】

試料は、配列決定のために調製される前に、挿入物の存在及びそのサイズを確認するために、制限酵素を用いて消化反応に供された。消化反応物は、1.5μLの試薬3酵素緩衝液;0.5μLのEcoRI(10U/μL);5μLのプラスミドDNA(約10ng)及び8μLの超純水から構成させ、37で2時間インキュベートした。この期間の経過後、反応物のアリコートをして1%アガロースゲル電気泳動に供した。

40

【0058】

断片は、ABI Prism 3100(Applied Biosystems)キャピラリーシーケンサーによって配列決定され、この場合、DNA二本鎖の両配向に基づいて、ABI Prism BigDyeターミネーターサイクルシーケンシング(Applied Biosystem)キットを使用し、異なる反応物と異なる配列決定実

50

験、M13R及びFプライマーを用いた。配列決定反応は、各試料から1.5 µLのDNAをプレート上に置き、以下の表に記載のプロトコールに従って調製した反応混合物の8.5 µLを用いた。

【0059】

表2：配列決定反応のために使用した反応混合物の調製に用いた試薬

【0060】

【表2】

試薬	反応あたりの体積
超純水	2.5 µL
Save Money	2.0 µL
Big Dye V. 3.1	2.0 µL
プライマー-M13 (2 pmol/µL)	2.0 µL

10

【0061】

配列決定反応は、Applied Biosystemサーモサイクラーを以下の条件で行った：96 で2分間；96 で15秒間、50 で15秒間、及び60 で4分間の30サイクル。最終的に、DNA沈殿のための反応は、各試料に75%のイソプロパノールを80 µL添加して行い、次に、15分間、室温にてインキュベートし、遮光し、45分間、1,310 × gの遠心分離を行った。

20

【0062】

上清を捨て、100 µLの70%エタノールを用いてペレットを洗浄し、次に、15分間、1,310 × gの遠心分離工程を行った。上清を捨て、室温にて、遮光し、ペレットを乾燥させた。配列決定機械における試料適用について、10 µLのhi-ホルムアミドにペレットを再懸濁させ、次に、DNA変性を引き起こすために、95、5分間、サーモサイクラーで使用をインキュベートした。DNAの再アニーリングを回避するために、プレートを即座に氷に移し、その後、配列決定機械に置いた。

30

【0063】

プロモーター領域及び完全な遺伝子領域の配列決定後、生物学的配列の配列データベースサーチを行い、得られた断片と既知のDNA、及びタンパク質配列の間の類似性を検証した(図6)。これを達成するために、プログラムBLASTnとBLASTx(Altshuler et al. (1997), Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402)を用いた。ヌクレオチド配列(図7及び図8)並びにアミノ酸配列(図9)のアラインメントはまた、適切なソフトウェア、例えば、Vector NTI Advanced 10.0.1(Invitrogen Corp.)、BioEdit Sequence Alignment Editor and Clustal Wを用いて行った。

40

【0064】

実施例2：遺伝子発現の調節研究 - RPA

親遺伝子型PI595099(耐性)及びBRS133(感受性)をRPA実験のために選択した。大豆に存在する熱ショックタンパク質Gmhs p17.6-L(GenBank受入番号：M11317)の完全配列から、プライマーセットをコード配列に対して設計した(RPA2__F 5' GAC ATC ATC AAA CAA GAG AA 3' 及びRPA2__R 5' TCT CTC CGC TAA TCT GAA 3')。

【0065】

分析した親試料由来の種子DNA抽出物、PCRを通じた断片の増幅、PCRにより生じた生成物のクローニング及び配列決定は、前述の項目において従前に詳述されたプロト

50

コールに従って行われた。

【0066】

親PI595099（耐性）及びBRS133（感受性）由来の総RNAは、2つの異なる処置（M・ジャワニカ線虫卵の接種及び非接種）に供された大豆根から抽出された。トリゾール試薬（Life Technology）キットを用いて抽出を行った。すり鉢と乳棒を用いて液体窒素中で根を粉碎し、オートクレーブしたファルコンチューブに移し、ドラフトで保存し、これは20mLのトリゾールを含む。ホモジナイゼーション後、試料を5分間、室温（15～30）にて試料をインキュベートした。1mLのトリゾールの各々に対して0.2mLのクロロホルムを添加し、15秒の激しい攪拌後、溶液を室温（15～30）にてさらに3分間インキュベートした。次に、12.240×g、15分間、4の遠心分離工程を行った。RNAを含む液相を新しいファルコンチューブに移し、最初に使用したトリゾール1mLの各々に対して、0.5mLのイソプロパノールを用いて沈殿させた。溶液を室温（15～30）で10分間インキュベートした。12.240×g、10分間、4の新たな遠心分離工程を行った。チューブの底に形成したペレットには沈殿したRNAが含まれる。全上清を取り除き、RNAペレットを75%エタノール（使用したトリゾール1mLの各々に対して1mLエタノール）を用いて洗浄した。溶液を4.285×g、5分間、4で遠心分離を行い、再度、全上清（エタノール）を除いた。ペレットを溶解するために、400μLのDEPC水を添加した（必要に応じて、ペレットを溶解するために温度を50～60に上昇させた）。抽出後、総RNAを分光偏光計で定量した；その完全性を2%アガロースゲルで検証し、最後に、-80で超冷凍庫で保存した。

10

20

【0067】

初期に、対象の断片を含むプラスミドを線状化した。30.6μLのDEPC水、4μLの緩衝液、1μgの精製プラスミド、0.4μLのBSA、及び1μLの制限酵素ApaIを含む反応物を37、2時間、サーモサイクラーでインキュベートした。この期間の経過後、プラスミドは、1体積のフェノールを用いて精製され、ボルテックスを用いて2分間混合され、11.750×g、10分間、4の遠心分離工程に供された。次に、水相を回収し、酢酸アンモニウム（NH₄OAc）を添加して、最終濃度を0.5Mにした。3体積の冷95%エタノールを添加し、溶液を-20にて1時間インキュベートした。11.750×g、4、15分間の新たな遠心分離工程を行い、上清を注意深く捨てた。チューブを開け；ペレットを5分間乾燥させ、次に、30μLのDEPC水に再懸濁させ、-20にて冷凍庫で保存した。

30

【0068】

プローブを得ること

プローブを得るための転写反応は、MAXIScript（商標）インビトロ転写（Ambion Inc.）キットを用いて行った。RNAポリメラーゼT7とP³²-標識したホスフェートジデオキシヌクレオチド（CTP）を用いた。最初に、全てのキット試薬を解凍し、氷上で維持した。ただし、室温に保存しなければならないTranscriptiion緩衝液（登録商標）は除く。全最終体積20μLを用いた転写反応は、1.5mLマイクロチューブで、室温にて、以下の表に記載のプロトコールに従って行った。

40

【0069】

表3：放射活性プローブの転写反応に使用される試薬

【0070】

【表 3】

試薬	反応あたりの体積
DEPC水	5 μ L
10X転写緩衝液	2 μ L
10 mMのATP	1 μ L
10 mMのUTP	1 μ L
10 mMのCTP	1 μ L
10 mMのGTP	1 μ L
直線化されたDNA (0.5 μ g/ μ L)	~5-6 μ L
[α - ³² P] CTP (800 Ci/mmol, 20 mCi/mL)	2 μ L
<i>RNAポリメラーゼ+リボヌクレアーゼ阻害剤</i>	2 μ L

10

【0071】

次に、全ての試薬をマイクロチューブ中で穏やかに混合し、反応物を 37 にて 1 移管、サーモサイクラーを用いてインキュベートした。2 U の DNase I RNase フリーを添加し、反応物を 15 分間、37 にてインキュベートした。1 体積のゲルローディング緩衝液 (95%ホルムアミド、0.025%プロモフェノールブルー、0.025%キシレンシアノール、0.5 mM EDTA、0.025% SDS) を反応物に添加し、チューブを 3~5 分間、85~95 で加熱し、全試料を 5% ポリアクリルアミドゲル、尿素 8 M、1x TBE 緩衝液上に適用した。

20

【0072】

12.01 g の尿素、3.12 mL の 40% アクリルアミド : ビス - アクリルアミド (19 : 1) 及び 2.5 mL の 10x TBE を用いて、最終体積が 25 mL のゲルを調製した。ゲルの最終体積を超えるのを避けるために少量の水をさらに添加した。尿素を溶解するために、ヒーターを備えた磁気攪拌システム中で溶液を維持し、その後、冷却し ; シリンダーに移し、最終体積のゲルを DEPC 水で満たした。次に、12.5 μ L の TEMED を添加し、最後に 156.2 μ L の 10% 過硫酸アンモニウムを添加した。

30

【0073】

この溶液を即座にガラスプレートに適用し、ウェルコム (well comb) を置き、プレートを動かすことなしに重合をさせた。ガラスプレート及び電気泳動チャンバーを洗浄し、RNase AWAY (登録商標) (Invitrogen - Life Technology) を用いて処理することからなる、これらの材料の前処理を施すことができる。より小さなプレート上で、1~3 mL の Repel をドラフト中で提供し、5~10 分間、プレートを乾燥させることができる。この処理は、電気泳動後のゲル除去を促進する。

40

【0074】

電気泳動を行う前に、プレートを洗浄し、過剰の尿素を排除し、ウェルコムの除去後、注射器の助けでランニング緩衝液を用いてウェルを洗浄した。チャンバーに対して所定電圧を用いたゲルの 20~30 分の予備駆動を行い、その後、使用を適用した。プローブのサイズに従って、約 2 時間の電気泳動を 200~300 ボルトで行った。

【0075】

全長プローブだけをゲル精製した。これを達成するために、電気泳動後、プレート開け、ゲルをプラスチックフィルムで覆い、バンド位置の同定をガイドするために記されたオートラジオグラフィフィルムを約 1 時間晒した。次に、フィルムを 5 分間、暗室中で、

50

現像液に浸して現像し、過剰分を除き、洗浄のために約3分間水に浸し、最後に固定溶液中に5分浸した。次に、フィルムを水に浸し、空気乾燥させた。フィルムとゲルを並べて、全長転写物の位置を特定した。ゲルの対象領域を取り出し、350 mLの溶出緩衝液(0.5 M酢酸アンモニウム、1 mMのEDTA、2% SDS)を含むマイクロチューブに移した。プローブを含むチューブを4 にて一晚インキュベートし、プローブ再生を最大にし、それをハイブリダイゼーションする時まで20 で保存した。プローブを標識するためのキットは、その質をモニターするための正の対照を与えた。

【0076】

250 bpのラット - アクチン遺伝子の挿入物を含む対照DNA、直線化されたpTRIPLEScrip プラスミドからプローブを合成し、ラット肝臓総RNAにハイブリダイズした。それらもキットに与えられた。2つの対照チューブは、酵母総RNAのみを含み、RNase酵素の活性を検証するために使用された。このようにして、酵素陽性対照チューブはRNaseと緩衝液を含み、一方、陰性対照チューブは酵素を含まない緩衝液だけを含んだ。

【0077】

試料ハイブリダイゼーションと消化

HySpeed(商標)RPA-High-スピードハイブリダイゼーション・リボヌクレアーゼ保護アッセイ(Ambion Inc.)キットを用いて、リボヌクレアーゼ保護アッセイは(RPA)を行った。各マイクロチューブに対して、標識プローブを総RNA(20 mg)に(高い比活性を有する、約100~800 pgの250 nt又は1~10 fmolの2~8x10⁴ cpm)添加した。また、30 mgの酵母総RNAを試料に添加し、最終50 mg/試料を得た。10 mLの酵母総RNA(50 mg)を含む2つの他の酵素対照チューブを得て、1つは、プローブ陽性対照としてラット肝臓総RNAを含んだ。プローブ+試料を共沈させるために、0.5 MのNH₄OAcと3体積の冷95%エタノールを添加し、ホモジナイゼーション後、チューブを15分間-20 でインキュベートした。最大速度(最小8.160xg)で5分間、4 にて遠心分離工程を行った。上清を除去し、ペレットを乾燥させた。10 mLのHySpeedハイブリダイゼーション緩衝液(登録商標)(予め95 に加熱)を各試料に添加し、このチューブを即座に95 (水浴又はサーモサイクラー)でインキュベートした。ペレットを溶解するために、試料を数秒間ボルテックスし、95 に戻した。ペレットを完全に溶解後、チューブを95 で3分間、68 で10分間インキュベートした。温度を68 に維持しなければならず、移動工程は30秒以下でなければならない。最初に、HySpeed RNase消化緩衝液(登録商標)を解凍し、RNase A/T1と緩衝液の混合物(1:100希釈-99 mLの緩衝液中の1 mL RNase)を各試料に対して、100 mLの適切な体積で調製し、室温にて保存した。100 mLの混合RNase A/T1+緩衝液を各試料、及び酵母総RNAだけを含む対照チューブに添加し、酵素を含まない100 mLのHySpeed RNase消化(登録商標)緩衝液を1つのチューブに添加し、酵素を含む完全な混合物を他の対照チューブに添加した。試料をボルテックスし、37 にて30分間、消化させるためにインキュベートした。150 mLのHySpeedインキュベーション/沈殿緩衝液(登録商標)を試料に添加し、素早くボルテックスし、チューブを15分間、-20 の冷凍庫でインキュベートした。消化後、試料を15分間、最大速度、4 にて遠心分離し、上清を除去し、ゲルローディング緩衝液(通常9~10 mLの体積)中に再懸濁させた。ピペットによるホモジナイゼーション後、チューブを3~4分間、90~95 に加熱し、再生を避けるために即座に氷に移した。5%ポリアクリルアミドゲル、8 M尿素に試料を適用し、1xTBE緩衝液に希釈し、200~300ボルトで約2時間の電気泳動を行い、保護された断片を分離した。電気泳動後、前述のプロトコールに詳述されたフィルム露光及び現像について標準的な手法を行った(図10)。

【0078】

実施例3：遺伝子発現-RT-qPCR-温室に設定された実験

遺伝子Gmhs p17.6-Lのプロモーターの発現試験については、RT-PCR技

10

20

30

40

50

術を用いて、材料PI595099、BRS133、256-S、259-S、266-S、JF7002、JF7027及びJF7056は由来の種子は、成長チャンバーで発芽ペーパー上に播種され、8日後、苗をプラスチック容器に移した。温室で、これらの苗は、発生J2の感染段階で幼虫のメロイドギネ・ジャワニカで感染させた。使用された線虫集団は、品種Doko由来の大豆植物から得た。根からの線虫卵抽出物は、0.5%次亜塩素酸塩溶液中で30秒間、ブレンダーを用いて材料を挽くことによって得られた。根を水中で洗浄し、排除サイズ500を有するミニスクリーンを用いて卵を回収した。その後、遊離(free)卵懸濁液を26に設定した孵化チャンバーに移し、24時間ごとに、ジャワニカ(J2)を回収して、冷蔵庫に保存した。ジャワニカJ2をPeter'sチャンバーで定量した。ピペットの助けを得て、664のJ2/ml(植物あたり)を接種し、接種の第1、3及び6日後に、試験中の8個の材料の各々の3つの大豆植物由来の根をバルクで回収し、ジャワニカで接種されたものと接種されていないもの(対照処理)について液体窒素に移した。RNA抽出実験の開始まで、根を超冷凍庫(-80)で保存した。

10

【0079】

RT-qPCRプライマー設計

リアルタイムPCRに使用したプライマー(SoyHspPSC__F 5'GCTGTG TGT CAT TGT CAT CGA A3'; SoyHspPSC__R 5'CAC GGT CTA TTT CTT GCC TAC ATC3')は、Gmhspp17.6-L遺伝子(GenBank受入番号:M11317)の配列pos終止コードン(TAA-ヌクレオチド位置884)を用いて、Primer Express 2.0(Applied Biosystems)プログラムで設計された。これらのプライマーは、約80bpの断片を増幅するために使用された。プライマーを設計するためにPrimer Expressプログラムに適用された選択されたパラメータは、50bp~150bp(120bpはRT-PCRに推奨される)のアンプリコン長、40%~60%のCG含量、最大では一列に4個のG塩基、58~60のプライマーTm(融解温度)、FとRプライマー間のTmの最大相違が1であり、一列に最大4個の同一塩基を避けるべきである。その後、プライマー二量体の形成を分析するために、プログラムOMIGAを使用し、3'末端の6遊離塩基の最小の存在を観察した。

20

【0080】

cDNA合成用の総RNA入手

リアルタイムPCR実験を行うために、総RNAをトリゾール試薬(Invitrogen-Life Technology)を用いて抽出した。最初に、1mLのトリゾール/試料をファルコンチューブに分注し、55に加熱した。試料の植物組織を液体窒素中でホモジナイズし、0.1gを窒素に維持されたチューブに分注された。その後、1mLの加熱したトリゾールを試料に添加し、1分間ボルテックスし、素早くスピンドウンし、2分間55にてインキュベートした。試料を4、20分間、16.000xgで遠心分離し、200µLのクロロホルムを含むチューブに上清を移し、残渣を捨てた。試料を振とうし、室温(22~25にて)2分間インキュベートし、次に、16.000xg、30分間、4にて遠心分離した。上清を新しいチューブに移し、8MのLiClを1/3体積添加した。振とう後、チューブをフリーザー中で-80、1時間インキュベートした。溶液を解凍するために、チューブを40の水浴中に1~3分維持し、16.000xg、4にて30分間遠心分離した。上清を除去し、捨て、RNAを含むペレットを妨げることを避ける各試料に400µLの75%エタノールを添加し、チューブを穏やかに反転した。4、5分間、16.000xgの遠心分離工程を行い、上清を除去し、完全に捨てた。100µLの超純水をペレットに添加し、チューブを穏やかに軽く叩いて、ペレットを溶解した(ペレットが迅速に溶解しない場合、さらに100µLの超純水を添加することができるが、次の工程で酢酸ナトリウムとイソプロパノールの体積を2倍にすべきである)。次に、10µLの酢酸ナトリウム(3M)と100µLのイソプロパノールを添加し、チューブを穏やかに反転した。試料を-80で30分間インキュベ

30

40

50

トし、水浴に37℃で1～3分間移し、16,000×g、4℃にて15分間遠心分離した。上清を除去し、400μLの70%エタノールを添加し、もう一度、チューブを16,000×g、4℃にて15分間遠心分離した。上清を除去し、捨て、10分間、ペレットをベンチで乾燥させた。最後に、50μLの超純水（又はペレットがすぐに溶解しない場合には100μL）を添加し、ペレットと溶液を37℃にて10分間加熱し、ペレットの溶解を促進した。RNAを定量し、-80℃のフリーザー中に保存した。逆転写反応に関して、RNAを希釈し、cDNA合成は、逆転写酵素（モロニー（Moloney）マウス白血病ウイルス：M-MLV）を用いて行われた。このようにして、1.5mgの総RNAをマイクロチューブに分注し、DEPC水を最終体積9mLまで添加し、6mMのランダムプライマーを反応に添加し、次に80℃にて3分間インキュベーションした。この期間の経過後、チューブを氷上で冷却し、14mLの混合物を試料に添加した。この混合物は、以下の表に記載されたプロトコールに従って調製された。

【0081】

表4：cDNA合成用の混合物調製に使用された試薬

試薬 反応あたりの体積

5×第1鎖緩衝液 6mL dNTP (2.5mM) 4mL

DTT (0.1M) 2mL

逆転写酵素 2mL

【0082】

反応物をサーモサイクラーを用いて、37℃にて1時間インキュベートし、その後、10分、65℃の工程を行った。cDNAを-20℃にて保存した。

【0083】

RT-qPCR

PCR反応は、サーモサイクラー7300リアルタイムシステム（Applied Biosystem）を使用し、製造業者の使用説明書に従って、Platinum（登録商標）SYBER（登録商標）グリーンqPCR SuperMix UDG（Invitrogen-Life Technology）キットを用いて行われた。Applied Biosystemによって推奨されるように、増幅効率曲線は、標的遺伝子Gm hsp17.6-Lと内因性対照遺伝子rRNA 18S（GenBank受入番号：X02623.1）（試料標準化のために使用される）について行われた。実験プレートは、両方の遺伝子について3点測定で試料を用いて設定された。曲線は傾きを与え、それは、プライマーの増幅効率を計算するために使用され、両遺伝子について類似し、100%（値1）に近くなければならない。相対的定量化のための増幅反応は、分析された試料の各々について回収の3日からcDNAのバルクを用いて行われた。別々の実験において、親使用について2つのリアルタイムPCR実験、及び集団試料について2つを行った。親菌株BRS133とPI595099、及び感受性集団由来の6個の得られた個体、259-S、259-S及び266-S、並びに耐性JF7002、JF7027及びJF7056は、線虫接種処理及び非接種処理について分析された。反応は3点測定で行い、8.0μLの超純水、0.5μLのROX、12.5μLのSYBER（登録商標）グリーンqPCR SuperMix UDG及び2μLのバルクDNA（約1.5μg）から成っていた。増幅反応のサイクリングパラメータは以下の通りであった：50℃にて2分間；95℃にて2分間；次に、95℃にて15秒、60℃にて30秒、及び72℃にて30秒の45サイクル。データを伸長工程（72℃）にて回収した。相対的定量化を結論付けた後、プライマー二量体の形成、非特異的（inespecific）増幅、可能なエラー及び汚染を検証するために、解離曲線を行った。RT-PCRによって生じたデータの解釈は、SDS-配列検出システム（Applied Biosystem）ソフトウェアを用いて行われた。

【0084】

これらの分析では、相対的遺伝子発現（RQ）の計算を個別に行い、較正（値1）として、非接種試料を用いて、線虫接種処理及び非接種処理について、別々に試料を比較した

10

20

30

40

50

。RQ値は Ct法を用いて計算した。このようにして、遺伝子発現のレベル(RQ)は、各処理の標的試料のCtを内因性対照Ctで差し引くことによって計算し、Ctを生じさせる。この値は、対照試料のCtから差し引かれ(較正-値1)、Ctの値を得る。RQは式2 - Ctを通じて得られる。ここで、2は標的遺伝子効率(100% = 1)の合計と、100%効率曲線で得られた内因性対照(100% = 1)の合成に対応する(Livak and Schmittgen(2001), Methods 25: 402-408)。標的遺伝子及び内因性遺伝子の効率は、100%に近くなければならないが、必ずしもそうでなくてもよいが、それらはより低くてもよく、しかしながら、それらは近くなければならない。そして、この場合、式2 - Ctの値2は、標的遺伝子と内因性遺伝子の効率の合計によって置換される。根こぶ線虫M. ジャワニカによる接種及び非接種の治療における親菌株BRS133及びPI595099の分析について、非接種の試料PI595099を較正(値1X)として使用し、感受性群(256-S、259-S及び266-S)の分析及び耐性集団(JF7002、JF2027及びJF7056)について、非接種の感受性試料256-Sを較正試料として使用した。この材料は、Gmhs p17.6-L遺伝子のプロモーター領域の配列決定において、低数のAT(n)挿入物を示したという事実に起因して選ばれた。

10

【0085】

実施例4: Gmhs p17.6-L遺伝子のプロモーター領域における、異なるサイズのAT(n)挿入物を含む発現カセット構築物

耐性個体はGmhs p17.6-L遺伝子のプロモーター領域における高数のAT(n)挿入物を示し、これらの個体は、RT-PCRに供された場合、根こぶ線虫M. ジャワニカで接種されると、高レベルのこの遺伝子発現を示すことが確認されると、発現カセットをGmhs p17.6-L遺伝子のプロモーター領域における、異なる数のAT挿入物を含むように構築されるように決定された。これらの構築物の利用の目的は、これらのプロモーターは、AT(n)挿入物とともに、他の遺伝子の発現を誘導し、またそれらの遺伝子の応答、異なるストレスによるそれらの活性化若しくは非活性化を評価することができる。粒子衝突を用いて、線虫感受性品種BRS133とPintado由来の大豆胚を形質転換するためにカセットを使用した。得られた構築物において、Gmhs p17.6-L遺伝子のプロモーターは、異なるストレスへの胚の曝露後、組織化学的アッセイを介した発現を有するGus遺伝子前に位置している。

20

30

【0086】

8個の分析された試料であるBRS133、PI595099、256-S、266-S、JF7002、JF2027及びJF7056のプロモーター領域を含む発現カセットを得て、全体で96カセット(各材料について12個)であった。しかしながら、ただ2つの構築物をこの試験の次の工程に使用し、それは、AT(9)である、より少ない数の挿入物を有する感受性親BRS133由来の増幅されたプロモーター領域を含むカセットpAG1/プロモーターGmhs p__BRS133と、AT(32)を有する耐性集団JF7027由来の個体からの増幅されたプロモーター領域を含むカセットpAG1/プロモーターGmhs p__JF7027であった。プラスミドpAG1は発現カセットを構築するための鋳型として選ばれた。設計された戦略は、プラスミドに存在するアクチン遺伝子由来のact2プロモーターの除去、及び感受性親菌株BRS133と、耐性集団JF7027の個体である、分析されるべき材料由来の増幅されたプロモーターの挿入であった。また、このプラスミドは、それらのカセットを用いた形質転換プロセスが上手くいく場合に、組織化学的アッセイを通じて、トランスジェニック胚における視覚化によって許可さえる、 β -グルクロニダーゼ酵素をコードするレポーター遺伝子Gusを示す。また、プラスミドpAG1は、653位における突然変異により、除草剤Imazapyr(2-[4,5-ジヒドロ-4-メチル-4-(1-メチルエチル)-5-オキソ-1H-イミダゾール-2-イル]-3-ピリジンカルボン酸)(Tuet al.(2004), Weed control methods handbook; London: Academic)が属するクラスに含まれる除草剤イミダゾリノンに対する耐

40

50

性を与えるシロイヌナズナ由来の酵素のアセト乳酸ピルビン酸リアーゼ (A H A S) - アセト乳酸シンターゼ (A L S) をコードする *als / ahas* 遺伝子のプロモーター (*ahas 5*)、コード配列 (*ahas*) 及びターミネーター (*ahas t*) を含む。このようにして、この遺伝子は、形質転換後、除草剤含有培地において陽性植物の選択を可能にする。図 13 はプラスミドマップを示す。このストラテジーを発展させるために、Wizard Plus Maxi preps DNA 精製システム (Promega) キットを用いてプラスミド DNA 抽出を行った。このようにして、単一コロニーは、抗生物質アンピシリン (0.5 mg) を含む 2 ~ 5 mL の LB 培地に植菌され、37 °C にて 8 時間、200 rpm で回転させながらインキュベートした (プレ接種物)。1 mL のプレ接種物を 500 mL の LB / アンピシリン培地に移し、37 °C にて 12 ~ 20 時間、200 rpm で回転させながらインキュベートした。250 mL チューブに細胞を分注し、5,000 × g で 10 分間、室温にて遠心分離し、上清を捨て、15 mL の細胞再懸濁液 (50 mM Tris - HCl、pH 7.5、19 mM の EDTA、100 µg / mL の RNase A) にペレットを完全に再懸濁させた。15 mL の細胞溶解溶液 (0.2 M NaOH、1% SDS) を添加し、反転して混合し、溶液を 20 分間、室温でインキュベートした。次に、15 mL の中和溶液 (1.32 M 酢酸カリウム、pH 4.8) を添加し、溶液を反転して混合し、白色フレークの形成をもたらし、溶解物は粘性が低かった。沈殿した材料は、ゲノム DNA、タンパク質、細胞残屑及び SDS を含む。14,000 × g、15 分間、室温での遠心分離工程を行い、上清は、Whatman 1 フィルターペーパーを含むシリンダーでろ過された。体積を測定し、50 mL 遠沈管に移し、室温の 0.5 体積のイソプロパノールを添加し、反転して混合した。14,000 × g、15 分間、室温での新たな遠心分離工程を行い、上清を捨て、ペレットを 2 mL の TE 緩衝液に再懸濁させた。この DNA を含む溶液に、10 mL の Wizard Maxi preps DNA 精製レジン (登録商標) を添加し、レジン + DNA の混合物は、真空ポンプに連結された Maxicolumn に移された。真空にし、25 mL のカラム洗浄溶液 (80 mM 酢酸カリウム、8.3 mM の Tris - HCl、pH 7.5、40 µM の EDTA、55% エタノール) を添加し、さらに真空にした。5 mL の 80% エタノールを Maxicolumn に適用し、真空にし、その後、全体積のエタノールをカラムに通過させ、さらに 1 分間真空を維持した。次に、Maxicolumn を 50 mL ファルコンチューブに移し、1,300 × g で 5 分間遠心分離した。レジンを乾燥させるために、真空をさらに 5 分間行った。最後に、Maxicolumn をキットから与えられるチューブに移し、1.5 mL の予熱した水 (65 ~ 70 °C) をカラムに添加した。1 分経過後、DNA を溶出するために、遠心分離工程 (1,300 × g、5 分間、室温) を行った。抽出後、プラスミド DNA を定量し、1% アガロースゲルにおいてその完全性を検証した。act2 プロモーター切り出し (-1000 bp) について、制限酵素消化を行った。第 1 段階では、pAG1 を酵素 Pst1 と Not1 による二重消化に供した。この消化により、約 5,500 bp (*als / ahas* 遺伝子のプロモーター - *ahas 5*、コード配列 - *ahas* 及びターミネーター - *ahas t* に対応する) と 6,500 pb (Gus 遺伝子、act2 プロモーター及びプラスミド骨格、Ori 及び Nos に対応する) の 2 つの断片を得た。消化反応物は、10 µL のプラスミド DNA (約 1.5 µg)、2 µL の React 2 緩衝液、5.0 µL の Pst1 酵素 (10 U / µL)、及び 3 µL の超純水から構成された。チューブを 37 °C にて 2 時間、サーモサイクラーを用いてインキュベートした。この期間の経過後、さらに 2 µL の Pst1 酵素 (10 U / µL) を溶液に添加し、37 °C にて 2 時間、サーモサイクラーを用いてインキュベートした。同じマイクロチューブで、Not1 を用いた反応を行い、3.5 µL の Not1 酵素 (10 U / µL)、1.5 µL の React 2 緩衝液及び 2 µL の NaCl (1 M) を添加した。新たに 2 時間、37 °C のインキュベートし、この期間の経過後、さらに 2 µL の Not1 酵素を添加した。37 °C のサーモサイクラーを用いて反応を一晩維持した。pAG1 消化した断片を 0.8% アガロースゲルにおいて分離し、前述のプロトコールに従って、PureLink (商標) Quick Gel Extraction (Invitrogen) キットを用

いてゲルを抽出した。消化の第2工程では、より大きな断片(6.500 pb)は、act2プロモーターの切り出しのために制限酵素BamHIで消化された。反応物は、0.5 μLのBamHI酵素、15 μLのReact 3緩衝液、12 μLのDNA消化断片、及び1 μLの超純水から構成された。サーモサイクラーを用いて、マイクロチューブを2時間、37 °Cにてインキュベートした。この期間の経過後、さらに0.5 μLのBamHI酵素を添加し、反応物をさらに37 °Cにて一晩インキュベートした。断片を0.8%アガロースゲルにおいて分離し、より大きな断片(Gus遺伝子、プラスミドDNA、Ori及びNosに対応する)は、製造業者の使用説明書に従って、PureLink(商標)Quick Gel Extraction(Invitrogen)キットを用いてゲル精製した。親菌株BRS133と耐性個体JF7027から異なる増幅されたプロモーターを含む発現カセット構築物を得るために、連結反応は、11 μLの超純水、それぞれ試験した試料からの2 μL(約10 ng)のAhas断片、1 μL(約10 ng)のGus断片、Gmhs p17.6-Lプロモーター由来の1 μL(約10 ng)の精製されたバンド、4 μLのリガーゼ緩衝液及び1 μLのT4リガーゼ酵素を混合して行った。反応を一晩、14 °Cにてインキュベートした。2つの選択した試料由来のプロモーター領域断片は、プライマーpSoyHspPstI__F(5' GGG CTG CAG GA A TTC TGA AAT TGG GTC TTT TTG 3')及びpSoyHspBamHI__R(5' CCC GGA TCC AAT GGG GAC ACT C GA GGT ATT 3')を用いて、ゲノムDNAから増幅された。プライマーにおいて設計及び合成された制限酵素部位により、act2プロモーターを従前に位置したのと同じ位置で正しい配向のGmhs p17.6-L遺伝子のプロモーターのクローニングが可能になった。前述のプロトコールに従って、E. coli細胞、DH10B菌株は、カセットの連結反応を用いてエレクトロポレートされ、LB培地中で一晩、37 °Cにて増殖させた。得られたコロニーから、特定のプライマーを用いた一連のPCR増幅、制限酵素を用いた消化反応は、構築物のクローニングが成功したことを検証するために行われた。発現カセットが得られたという成功を証明するこの工程後、Gmhs p17.6-L遺伝子のプロモーター領域に特異的なプライマー、pAG1プラスミドの、Ahas遺伝子(654 bp)については(Ahas1__F 5' ACT AGA GAT TCC AGC GTC AC 3'; Ahas2__R 5' GTG GCT ATA CAG ATA C CT GG 3')、及びNosターミネーターについては(Nos1__F 5' GAA T CC TGT TGC CGG TCT TG 3'; Nos3__R 5' TTA TCC TAG TTT GCG CGC TA 3')を用いてPCR反応は、全ての得られた試料を用いて行われた。図14、15及び16は、それぞれ、得られた発現カセットの各々の12試料のGmhs p17.6-Lのプロモーター領域の増幅、Ahasの一部及びNos領域の一部を示す。

【0087】

実施例5：一時的発現又はGUS(-グルクロニダーゼ)活性の研究

粒子衝突を介したトランスジェニック植物の取得

発現カセットpAG1/プロモーターGmHSP__BRS133及びpAG1/プロモーターGmHSP__JF7027を用いて形質転換されたトランスジェニック植物を得るために、最初に、プラスミドDNA抽出を前述のプロトコールに従って行った。この手法により、バイオパリティクス法、遺伝子銃法又は粒子衝突を介した形質転換手法に使用されるのに十分な多量のプラスミドDNAが得られた。この手法では、植物中の遺伝材料の導入は、微粒子を用いて行われ、通常、内因性DNAで被覆された、0.4~0.2 mmの直径を有する金又はタングステンでできている。粒子を対象のDNA分子で被覆し、高圧下でのヘリウムガス放電によって引き起こされる衝撃波により高速で加速し、発射する。標的細胞又は組織に衝突した場合、破壊することなしに細胞壁及び原形質膜を貫通し(Klein et al. (1987), Nature 327:70-73)、内因性DNAは、細胞液の作用によって微粒子から解離し、植物ゲノムに組み込まなければならない。インビトロで培養され、再生された後、これらのトランスジェニック組織又は細

胞は、遺伝子改変された植物を生じる (Brasileiro and Aragao (2001), Plant Biotechnol J. 3 (3): 113-121; Rech et al. (2008), Nat Protoc 3: 410-418)。

【0088】

種子除染

根こぶ線虫とともに感受性である品種 BRS 133 及び Pintado 由来の大豆種子を用いた。計量後、種子は、70%エタノールで10分間、その後、1%ナトリウム (V/V) で20分間の浸漬により除染された。層流フード中で、オートクレーブした蒸留水で種子を3回洗浄し、種子の2倍量の水に埋め込み、約16時間~18時間、水和のために浸漬し続けた。

【0089】

胚の単離及び衝突用の支持プレートの調製

除湿機及び低い部屋の湿度にするエアコンを用いて、水和された種子から胚を単離した。無菌した鉗子及び外科用ブレードの助けにより、種子を切開し、胚軸を除き、乾燥を避けるため、蒸留水を含むペトリディッシュに移した。次に、実体顕微鏡の助けにより、葉原基を切り出し、頂端分裂組織領域を露呈した。層流フード中のフィルターペーパーに胚を移し、過剰な水を取り除き、それは、屈折する粒子に対する障壁として振る舞う形質転換効率を低下させることができる。衝突について、16mm径の中心塩 (デッドゾーン) は、無菌鉗子を用いて、MS培地 (Murashige and Skoog Salt)、3%スクロース及び0.8%フィタゲル (pH 5.7) を含む小さなペトリディッシュ中に設計された。実体顕微鏡の助けにより、プレート中の溝に胚を配置し、頂端分裂組織領域を上に向けた。担体メンブレン支持体及び支持シリンダーを火で滅菌し、4つの破壊メンブレンセットを別々にし、使用するまでイソプロパノール中に浸漬し続けた。担体メンブレンをそれらの支持体中に集めた。

【0090】

タングステン微粒子の滅菌及び洗浄

遠沈管において、60mgのM10タングステン微粒子を計量し、それは、約100回の発射には十分な材料である。この遠沈管に、10mLの70%エタノールを添加した；溶液を激しくホモジナイズし、攪拌機上で、動きを維持するには十分な速度で15分間維持した。15.000gで5分の遠心分離工程を行い、微粒子沈下の障害を避けるために、マイクロピペットの助けにより、上清を除去し、捨てた。1mLの滅菌蒸留水をこのチューブに添加し、混合物を攪拌機を用いて激しくホモジナイズし、もう一度15.000gで5分間遠心分離した。上清を捨て、洗浄工程を2回繰り返した。最終洗浄し、上清を捨てた後、微粒子を1mLの50%グリセロール (V/V) 中に再懸濁した。

【0091】

タングステン微粒子のDNAコーティング

1.5mLの遠沈管に、50µLの微粒子懸濁液を分注し、ホモジナイゼーションのために15分間ソニケーターに供し、このようにして、微粒子の凝集を避け、均一な沈殿を可能にした。最小6µgに同等なDNAを上清に添加し、マイクロピペットの助けにより、穏やかにホモジナイズした。50µLのCaCl₂ (2.5M) を溶液に添加し、穏やかにホモジナイズした後、20µLのスペルミジンを添加した。さらにホモジナイゼーション後、適合したチューブ攪拌機で、溶液を10分間、室温にて、穏やかに回転させながらインキュベートした。チューブを10秒間、最大速度で沈降させ、上清を注意深く除去し、捨て、微粒子の再懸濁液を避けた。150µLの100%エタノールを添加した；溶液を激しくホモジナイズし、10秒間、最大速度 (スピン) でもう一度遠心分離した。上清を除去し、洗浄工程をもう一度繰り返した。上清を捨てた後、最終洗浄で、24µLの100%エタノールは、激しくホモジナイズされた試料に添加された。最後に、上清の3.2µLのアリコートは、メンブレン支持体上に予め配置された各担体メンブレンの中心領域に適用された。各沈殿は、DNAで被覆された微粒子を含む6個の担体メンブレンを調製するには十分である。微粒子の適用後、シリカゲルを含むプレート上でメンブレンを

10

20

30

40

50

即座に保存し、解剖チャンバーに維持した。それは、50%を超える空気の相対湿度の状態へのDNA被覆された微粒子の曝露が凝集を可能するためであり、結果として、外来遺伝子発現の頻度を減少させる。

【0092】

遺伝子銃の使用及び衝突実験

いくつかの変更を加えたが、Aragaoら(Crop. Sci. 42:1298-1302(2002))によって開発されたプロトコルに従って、根こぶ線虫に感受性である品種BRS133及びPintado由来の大豆種子胚の分裂組織部位を発射の標的とした。衝突前、層流フードを70%エタノールで清潔にし、UV照射(15分間)により滅菌した。保持スクリーン、胚を含むペトリディッシュ、4つセットであり、イソプロパノールに浸漬した破壊メンブレン、及び外来DNAを含む担体メンブレンをオペレーターの近くに維持した。ヘリウムガスシリンダーのバルブを開け、圧力を1.200psiに設定した。その後、破壊メンブレンセット(300psi/メンブレン)は、高圧ヘリウムガスチャンバーの遠端に配置し、密封スクリーをきつく閉め、高圧チャンバーを反転させ、真空チャンバーにフィットさせた。衝突されるべき材料を含むプレートを配置し、支持体シリンダー上に、DNA被覆された微粒子を含む、保持スクリーン及び担体メンブレン支持体も配置した。注意深く、支持体シリンダーを配置し、真空チャンバーを閉めた。圧力が27pol/Hgに到達するまで、チャンバー内で真空を可能にする値を緩やかに開け、このとき、このバルブを閉じた。高圧チャンバー内にヘリウムガスを押し込めるバルブを開き、破壊膜がヘリウムガスの存在により曲がりを示したとき、引き金を押すことによって発射した。発射後、バルブを閉じ、一方、高圧チャンバーからのヘリウムガスを放出するバルブを開いた。その後、真空を開放するバルブをゆっくり開け、衝突される胚を含むプレートを装置から取り出した。各衝突では、これらの工程を繰り返した。各衝突後、大部分の胚を異なるプレートに移し、非生物的及び生物的ストレスに供した。しかしながら、いくつかの胚は、BAP 5mg/mL(ベンジルアミノプリン)3%スクロース、0.6%寒天(pH)を添加したMS培地を含むプレートに移し、その中で、再生誘導のために、18時間維持され、28で光から保護された。

【0093】

トランスジェニック胚の選択

トランスジェニック細胞と非トランスジェニック細胞との識別は、個別に又は同じ形質転換ベクター中の対象遺伝子に連結して、酵素活性を有するタンパク質を発現する選択遺伝子を植物ゲノムに導入することにより行うことができる。作用様式に従って、マーカー遺伝子は、抗生物質への耐性を付与する遺伝子、除草剤への耐性を付与する遺伝子、及びポジティブ選択を有するマーカー遺伝子として分類される(Brasileiro and Dusil(1999), In: TORRES, A.C; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. Ed. Cultura de tecidos. and transfor magao genetica de Plantas. Brasilia: Embrapa - SPI/Embrapa - CNPH, 1999. p. 679-735. v. 2)。遺伝子ahasは、除草剤への耐性を付与する遺伝子に分類される。この遺伝子は、アセトヒドロキシル酸シンターゼ(AHAS)酵素の改変形態をコードし、アセト乳酸シンターゼ(ALS)としても知られている。この配列の653位への変異により、アスパラギンによるセリンの置換をもたらし、改変酵素を生じさせ、除草剤クラスのイミダゾリノンによって認識されない。この遺伝子で形質転換された分裂組織細胞は、選択分子の分裂組織部位への全体の転移及び内因性AHAS酵素の不活性化の基づくプロセスにおいて、除草剤Imazapyrの存在下で選択される。選択剤は頂端分裂組織に局在するため、非トランスジェニック細胞は死滅し、植物に生育するトランスジェニック細胞の生存が支持される(Aragao and Brasileiro(2002), J.P. Phytio, 14(I))。このようにして、再生後、いくつかの胚は、選択培地MS、3&スクロース、0.15µMのImazapyr除草剤、0.8%寒天及びB5ビタミン(pH5.7)を含むプラスチックカップに移され、約45日間、成長チャンバーで、

28にて、16時間の光周期で生育された。光強度は $50\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ であり、相対湿度は80%を超えた。次に、再生された植物は、オートクレーブされた砂：パーミキュライト(1:1)を含むプラスチックカップに移され、栄養溶液(pH6.6)で加筆された。後に、順化のために、カップをプラスチックバックで覆い、必要に応じて栄養溶液で散水し、さらに28~30日間、成長チャンバーで生育した。順化のこの器官の経過後、プラスチックバックを取り除き、特異的プライマーを用いたPCR技術を介して、分子分析及び陽性植物の特定のために試料回収が可能な限り、通常に発育させることができた。

【0094】

種々のストレスに供されたトランスジェニック胚を用いた実験

根こぶ線虫に感受性であり、種々の発現カセット(親感受性株BRS133(S-pAG1/プロモーターGmHSP__BRS133)及び耐性集団JF7027由来の個体(R-pAG1/プロモーターGmHSP JF7027)から増幅されたGmhs p17.6-L遺伝子のプロモーター領域を含む)で形質転換された大豆品種BRS133及びPintado由来の胚は、生物的ストレス、この場合は、M.ジャワニカのジャワニカJ2による接種、及び非生物的ストレス、例えば、熱、冷却、塩分及び脱水(干ばつ)に供された。非トランスジェニック胚(CN-負の対象)及びpAG1プラスミドのみで形質転換した胚(CP-正の対象)を同じ処置に供した。熱ストレスを適用し、胚を25(室温)、35及び45(温室中)にて維持した。4(冷蔵庫)及び15(温室)の処理は冷却ストレスに用いた。これらのストレスは、2時間、4時間、及び24時間の時点で溶液中で胚に適用された。脱水(干ばつ)は、温室にて37にて行い、フィルターペーパー上で2時間、4時間、及び6時間の時点で維持した。塩分ストレスについては、胚は、200mM及び400mMのNaCl濃度で24時間維持された。生物的ストレスは、24時間、48時間、及び72時間、J2発生段階(2.000~3.000のJ2/mL)で線虫を含む溶液で胚を維持することによって行われた。図17は、ストレスをどのように適用したかを示す。

【0095】

種々の発現カセットを用いて形質転換され、種々のストレスに供された胚における組織化学的アッセイ

Gus遺伝子の発現産物は、組織化学的アッセイを通じて、植物組織におけるその酵素的活性を検出することによって、選択のマーカーレポーターとして使用され得る。この定量的方法は、b-グルクロニダーゼ酵素によって、酸素の存在下で不溶性の青色沈澱物をもたらす二量体を生じさせる、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-b-D-グルクロニド(X-gluc)基質の開裂に基づいている。この方法論は、組織特異性、プロモーターの単離、トランスジェニック植物の同定、及び移動条件に関する遺伝子発現制御研究を補助する(Brasileiro(1998), In: Brasileiro, A.C.M.; Carneiro, V.T.C. (ed.). Manual de trans formacao genetica de plantas. Brasilia: Embrapa - SPI/Embrapa - Cenargen, 1998, p. 143-154; Aragao et al. (2000), Theor. Appl. Gen, 101: 1-6)。このようにして、種々のカセットで形質転換され、その後に種々のストレスに供された、2つの遺伝子型であるBRS133とPintadoの胚をプレートに移し、試料を覆うには十分な体積でX-Gluc反応緩衝液を添加した。この緩衝液は、85mLのジメチルホルムアミド中に8.5mgのX-Glucを希釈することによって調製された。リン酸緩衝液(NaH₂PO₄-50mM pH7.0)は、17mL、最後は17mLのTriton X-100の体積に添加された。この溶液を調製後、冷蔵庫で保存した。胚及び緩衝液を含むプレートを密封し、暗所中、温室にて37で約16時間インキュベートした。その後、緩衝液を取り除き、1mLの70%エタノールを添加して、反応を停止させた。試料を実体顕微鏡(SQZ-DS4-BI(Tecnival))下で分析し、画像を獲得して結果を書面にした。組織化学的アッセイは、ス

10

20

30

40

50

トレスに供した後、試薬 X - G l u c が実施されると、品種 B R S 1 3 3 はより強い応答を示すことが示され、これは、青色スポットが明確であり、形質転換された細胞を示す制限された領域において視認されるためである。この不溶性の青色沈澱物は、 β -グルクロニダーゼをコードする構築カセットに存在する G u s 遺伝子反応産物であり、この酵素は、O₂の存在下で沈殿する二量体を形成する X - G l u c 基質と反応する。品種 P i n t a d o からの胚アッセイ結果を分析する場合、ストレスの大部分において、正の青色スポットは検出されなかった。この品種では、内因性 G U S 発現がより高く、完全な青色胚をもたらし、その結果が分析と干渉する。大豆胚のバックグランド内因性 G U S 活性は以前の研究において報告されていた。H u 及び共同研究者 (P l a n t C e l l R e p o r t s , 9 : 1 - 5 , 1 9 9 0) は、53の種々の植物種を分析し、葉、果実部分、種子及び胚における固有の G U S 活性を試験した。この研究では、大豆は、新鮮な果実由来の成熟胚と脱水された種子の成熟胚において、強力な正の染色を示し、内因性 G U S 活性の結果を示した。このようにして、熱ストレスは、温室中で2時間、4時間、及び24時間、25℃、35℃、及び45℃の温度にトランスジェニック胚を供することによって適用された。図18、19及び20は、それぞれ、試験された両品種に対するこれらの処置を示す。冷却ストレスは、冷蔵庫及び温室中で、2時間、4時間、及び24時間、4℃及び15℃の温度にトランスジェニック胚を供することによって適用された(図21及び22)。このストレスについて、組織化学的反応の陽性青色スポットに関する、品種間の相違は、P i n t a d o 胚においてより非常に顕著であり、それらは構造的に青色であり、内因性 G U S 活性に起因している。従前の文献 (H u e t a l . (1 9 9 0) , P l a n t C e l l R e p o r t s , 9 : 1 - 5) に記載されている。もう一度、品種 B R S 1 3 3 由来の胚は、組織化学的アッセイに対してより良好な応答を示し、それは、この品種が選択されるものであり、この研究の次の工程で使用されなければならないことを示す。塩分ストレス実験は、対照としての水、200mM、400mMの濃度の N a C l 濃度に24時間、トランスジェニック胚を維持することによって行われた。品種 B R S 1 3 3 由来の胚は、このアッセイに正に応答し続け、制限された領域で青色スポットを示し、以前のストレスとは相違し、品種 P i n t a d o は明らかでありかつ検出可能な応答を示さなかった。図23はそれらの結果を示す。干ばつストレスは、フィルターペーパー上に37℃で胚を配置し、温室中で2時間、4時間、及び6時間維持することによって適用された。もう一度、品種 B R S 1 3 3 は、組織化学的アッセイに陽性応答を示し、一方、品種 P i n t a d o は、再度、陰性応答を示した。後者は、図24に示される通り、内因性 G U S 発現の結果として、胚の非特異的な青色染色を示した。根こぶ線虫 M . ジャワニカの感染段階であるジャワニカ J 2 を用いて、品種 B R S 1 3 3 及び P i n t a d o 由来の胚への感染は生物的ストレスを構築した。約2000~3000の J 2 / m L をトランスジェニック試料とともにインキュベートし、24時間、48時間及び72時間維持した。結果は、品種 B R S 1 3 3 (図 2 5) は、組織化学的アッセイの陽性の青色スポットを示したことを表し、これは、カセット発現が満足いくように起きたことを示す。この時間を経過したとき、胚は、それらの局面が改変され、赤茶色を示し、対照試料を含むことを示している。この変化は、72時間後により視認され、感染時に、ホルモン及び物質を注射する染色の感染形態によって胚を攻撃することによって引き起こすことができ、それは、宿主植物の根において起こると同じように、細胞改変を可能にする。しかしながら、Rと命名された胚は、耐性カセット p A G 1 / プロモーター G m h s p 1 7 - L J F 7 0 2 7 で形質転換されたものであり、影響が少ないという局面を有し、72時間で接種された試料は、元の局面を維持し、白色であり、これは、どうも、より高い数の A T (n) 繰り返して、耐性集団 J F 7 0 2 7 からの個体由来の G m h s p 1 7 - L 遺伝子のプロモーター領域を含むカセットが、おそらく、より高い発現レベルのシャペロンにより、病原体攻撃に対するより良好な応答を示すことを示唆している。P i n t a d o 由来の胚はまた、J 2 線虫の接種により生物的ストレスに供された場合、構成的に青色に染色される組織化学的アッセイに対して負の応答に加えて、色の変化の応答を示し、48時間から、特に72時間からより顕著であった。図26は結果を示す。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 6 】

生物的ストレス及び非生物的ストレスに供された後、組織化学的アッセイはマーカー遺伝子Gusの存在を検出した、品種BRS133及びPintadoに対する示された結果から結論付けることがえきるが、しかし、高い内因性活性も、特に品種Pintadoにおいて観察され、異なる材料が形質転換プロセスへの明確な応答を示したことを示唆している。

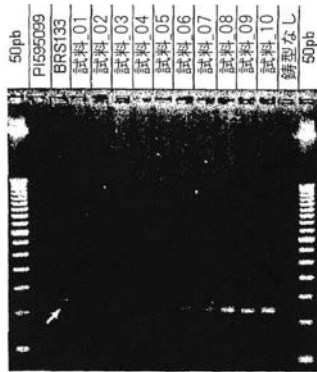
【 0 0 9 7 】

Gus発現はまさに形質転換の証拠として考えられると言及するには価値があるが、植物ゲノムへのGus遺伝子の組み込みの決定的証拠としては不十分である(Potrykus(1990), Physiologia Plantarum 79:129-134)。内因性DNA配列の組み込みの決定的証拠は、分子生物学的技術を介して、特異的プローブを用いてゲノムDNAハイブリダイゼーションによって与えられる。

10

【 図 1 】

FIGURE 1

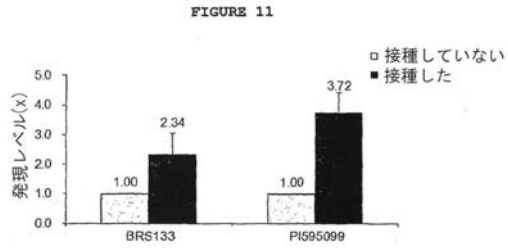


【 図 2 】

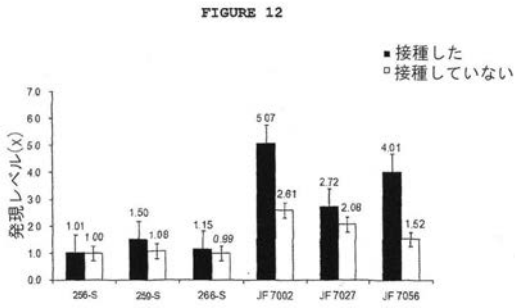
FIGURE 2

Genomic DNA sequence alignment showing Gus gene integration sites. The sequence is presented in a grid format with line numbers on the left and sequence coordinates on the top. Underlined regions indicate the Gus gene structure.

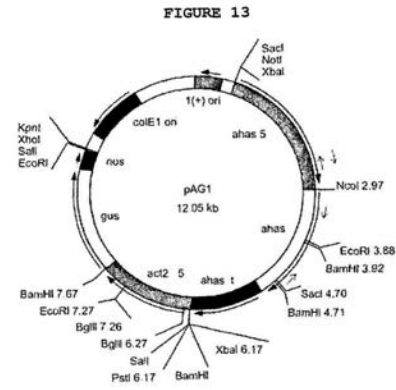
【 図 1 1 】



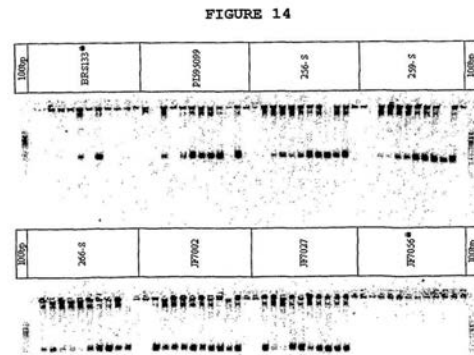
【 図 1 2 】



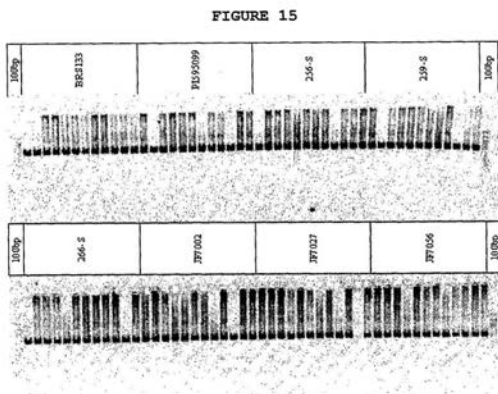
【 図 1 3 】



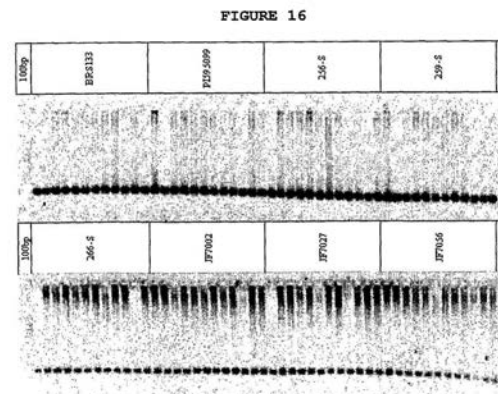
【 図 1 4 】



【 図 1 5 】



【 図 1 6 】



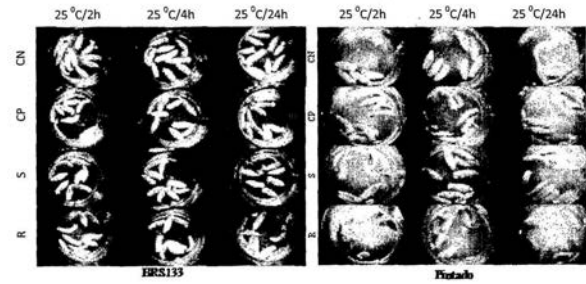
【 図 1 7 】

FIGURE 17

熱ストレス					
CN-25°C/2h	CN-35°C/2h	CN-45°C/2h	CN-25°C/4h	CN-45°C/4h	CN-35°C/4h
CP-25°C/2h	CP-35°C/2h	CP-45°C/2h	CP-25°C/4h	CP-45°C/4h	CP-35°C/4h
S-25°C/2h	S-35°C/2h	S-45°C/2h	S-25°C/4h	S-45°C/4h	S-35°C/4h
R-25°C/2h	R-35°C/2h	R-45°C/2h	R-25°C/4h	R-45°C/4h	R-35°C/4h
CN-25°C/24h	CN-35°C/24h	CN-45°C/24h			
CP-25°C/24h	CP-35°C/24h	CP-45°C/24h			
S-25°C/24h	S-35°C/24h	S-45°C/24h			
R-25°C/24h	R-35°C/24h	R-45°C/24h			
冷却ストレス					
CN-4°C/2h	CN-15°C/2h	CN-4°C/4h	CN-15°C/4h	CN-4°C/24h	CN-15°C/24h
CP-4°C/2h	CP-15°C/2h	CP-4°C/4h	CP-15°C/4h	CP-4°C/24h	CP-15°C/24h
S-4°C/2h	S-15°C/2h	S-4°C/4h	S-15°C/4h	S-4°C/24h	S-15°C/24h
R-4°C/2h	R-15°C/2h	R-4°C/4h	R-15°C/4h	R-4°C/24h	R-15°C/24h
塩ストレス-NaCl		干ばつストレス			
CN-200mM	CN-400mM	CN-H ₂ O	CN-37°C/2h	CN-37°C/4h	CN-37°C/6h
CP-200mM	CP-400mM	CP-H ₂ O	CP-37°C/2h	CP-37°C/4h	CP-37°C/6h
S-200mM	S-400mM	S-H ₂ O	S-37°C/2h	S-37°C/4h	S-37°C/6h
R-200mM	R-400mM	R-H ₂ O	R-37°C/2h	R-37°C/4h	R-37°C/6h
線虫ストレス					
対照	幼虫	対照	幼虫	対照	幼虫
CN-S/J	CN-J/24h	CN-S/J/48h	CN-J/48h	CN-S/J/72h	CN-J/72h
CP-S/J	CP-J/24h	CP-S/J/48h	CP-J/48h	CP-S/J/72h	CP-J/72h
S-S/J	S-J/24h	S-S/J/48h	S-J/48h	S-S/J/72h	S-J/72h
R-S/J	R-J/24h	R-S/J/48h	R-J/48h	R-S/J/72h	R-J/72h

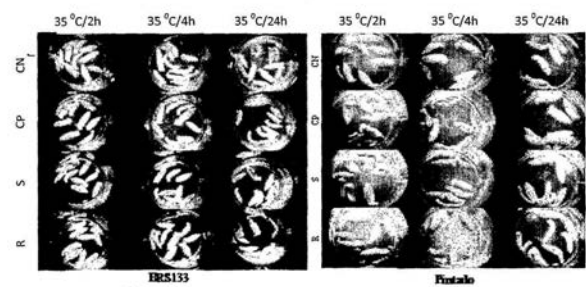
【 図 1 8 】

FIGURE 18



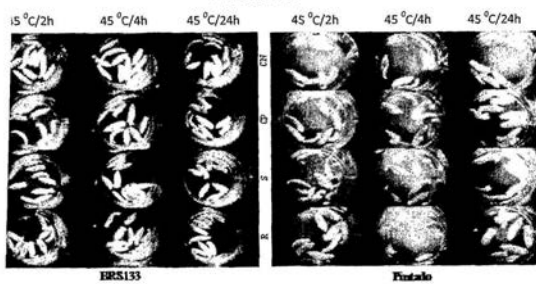
【 図 1 9 】

FIGURE 19



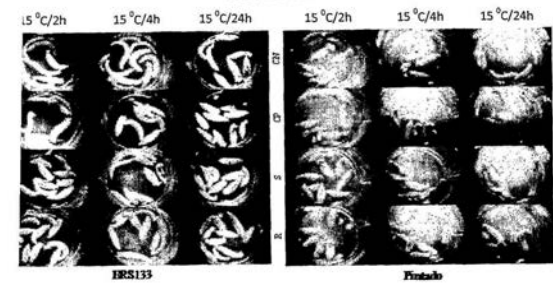
【 図 2 0 】

FIGURE 20



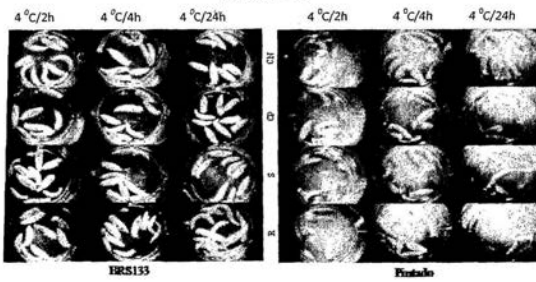
【 図 2 2 】

FIGURE 22



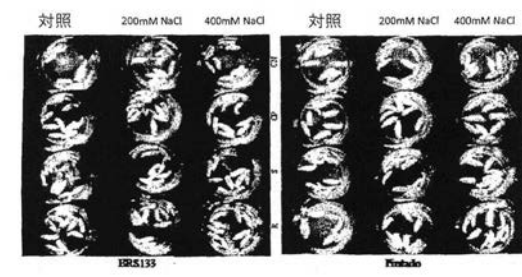
【 図 2 1 】

FIGURE 21

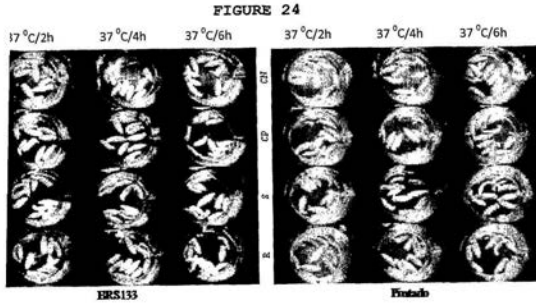


【 図 2 3 】

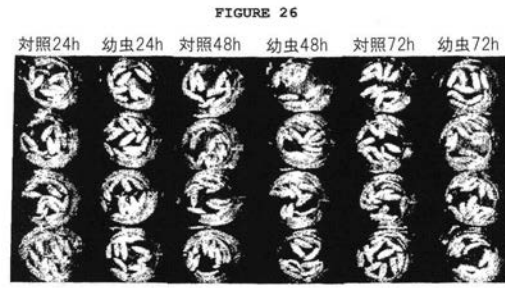
FIGURE 23



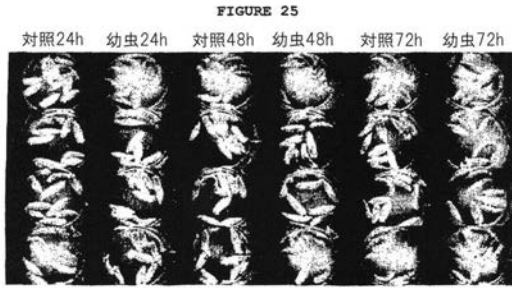
【 图 2 4 】



【 图 2 6 】



【 图 2 5 】



【 配列表 】

2017148071000001.app

フロントページの続き

- (74)代理人 100087413
弁理士 古賀 哲次
- (74)代理人 100117019
弁理士 渡辺 陽一
- (74)代理人 100150810
弁理士 武居 良太郎
- (74)代理人 100197169
弁理士 柴田 潤二
- (72)発明者 フガンティ, レナータ
ブラジル国, 8 6 0 2 0 - 3 3 0 ロンドリーナ - パラナ, ファ セルジペ, 1 3 5 3, アパルタ
メント 5 3
- (72)発明者 ネポムセーノ, アレクサンドレ リマ
ブラジル国, 8 6 0 6 1 - 5 0 0 ロンドリーナ - パラナ, ファ ダス グレビレアス, 3 8 1,
コリーナ ベルデ
- (72)発明者 マルセリーノ, フランシスマール コレア
ブラジル国, 8 6 0 6 0 - 1 6 0 ロンドリーナ - パラナ, ファ アリストテレス 1 3 9, ジャ
ルディム マリンガ
- (72)発明者 シルバ, ジョアン フラビオ ベロツソ
ブラジル国, 8 6 0 4 0 - 7 4 0 ロンドリーナ - パラナ, ファ ジョゼ アルセー ジメネス,
3 0 5, ジャルディン モンテ クラロ
- (72)発明者 マリン, シルバナ レジーナ ロシェンバーシュ
ブラジル国, 8 6 0 2 7 - 2 3 0 ロンドリーナ - パラナ, ファ ビセンテ カレスティーノ, 2
7 6, ジャルディン カステーロ
- (72)発明者 シルベイラ, セサル アウグスト
ブラジル国, 8 6 0 7 3 - 6 6 0 ロンドリーナ - パラナ, ファ イサウラ マルケス ペレイラ
, 1 8 1, インペリオ ド ソル
- (72)発明者 ビネック, エリゼウ
ブラジル国, 8 6 0 1 0 - 0 6 0 ロンドリーナ - パラナ, セントロ, アベニダ サンパウロ,
5 5 0 - アパルタメント 1 0 0 8

Fターム(参考) 2B030 AA02 AD04 CA17

【外国語明細書】

2017148071000001.pdf