

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5186076号
(P5186076)

(45) 発行日 平成25年4月17日 (2013. 4. 17)

(24) 登録日 平成25年1月25日 (2013. 1. 25)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 N 5/10 (2006. 01)	C 1 2 N 5/00 1 O 3
A O 1 H 5/00 (2006. 01)	A O 1 H 5/00 A

請求項の数 20 (全 14 頁)

(21) 出願番号	特願2002-525779 (P2002-525779)	(73) 特許権者	503087223
(86) (22) 出願日	平成13年8月30日 (2001. 8. 30)		アグリカルチャー ビクトリア サービス
(65) 公表番号	特表2004-507271 (P2004-507271A)		ーズ プロプライエタリー リミテッド
(43) 公表日	平成16年3月11日 (2004. 3. 11)		オーストラリア国 3049 ビクトリア
(86) 国際出願番号	PCT/AU2001/001092		, アトウッド, ミッケルハム ロード
(87) 国際公開番号	W02002/020772		475
(87) 国際公開日	平成14年3月14日 (2002. 3. 14)	(73) 特許権者	502155345
審査請求日	平成20年8月20日 (2008. 8. 20)		ラトローブ ユニバーシティ
(31) 優先権主張番号	PQ 9946		オーストラリア国、ビクトリア州 308
(32) 優先日	平成12年9月6日 (2000. 9. 6)		3、バンデウーラ、プレンティ ロード
(33) 優先権主張国	オーストラリア (AU)	(74) 代理人	100108453
			弁理士 村山 靖彦
		(74) 代理人	100064908
			弁理士 志賀 正武

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 m y b 遺伝子プロモーターおよびサイトカイニン生合成遺伝子を使用する植物の老化の操作

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

植物の老化を遅延させる方法であって、該方法は、イソペンテニルトランスフェラーゼ (i p t) 遺伝子に作動可能に連結された、m y b 遺伝子プロモーターを含む遺伝子構築物を、該植物中に導入することを包含する、方法。

【請求項 2】

前記 m y b 遺伝子プロモーターが、m y b 3 2 遺伝子プロモーターである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記 m y b 遺伝子プロモーターが、A r a b i d o p s i s 由来である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記 m y b 遺伝子プロモーターが、
(a) 本明細書の図 1 に示される配列 (配列番号 1)、ならびに
(b) (a) に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有する配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記 i p t 遺伝子が、A g r o b a c t e r i u m 由来である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記 i p t 遺伝子が、

(a) 本明細書の図 2 に示される配列 (配列番号 2)、ならびに

(b) (a) に対して少なくとも 90 % の同一性を有する配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記遺伝子構築物が、植物細胞の形質導入、トランスフェクション、または形質転換によって前記植物に導入される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記遺伝子構築物を取り込んでいる植物細胞が選択され、次いで、形質転換植物を再生するために培養される、請求項 7 に記載の方法。

10

【請求項 9】

植物の老化を遅延させ得るベクターであって、該ベクターは、イソペンテニルトランスフェラーゼ (i p t) 遺伝子に作動可能に連結された、m y b 遺伝子プロモーターを含む、ベクター。

【請求項 10】

ターミネーターをさらに含み；前記プロモーター、遺伝子、およびターミネーターが作動可能に連結される、請求項 9 に記載のベクター。

【請求項 11】

前記 m y b 遺伝子プロモーターが、m y b 3 2 遺伝子プロモーターである、請求項 10 に記載のベクター。

20

【請求項 12】

前記 m y b 遺伝子プロモーターが、A r a b i d o p s i s 由来である、請求項 11 に記載のベクター。

【請求項 13】

前記 m y b 遺伝子プロモーターが、

(a) 本明細書の図 1 に示される配列 (配列番号 1)、ならびに

(b) (a) に対して少なくとも 90 % の同一性を有する配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項 9 に記載のベクター。

【請求項 14】

前記 i p t 遺伝子が、A g r o b a c t e r i u m 由来である、請求項 13 に記載のベクター。

30

【請求項 15】

前記 i p t 遺伝子が、

(a) 本明細書の図 2 に示される配列 (配列番号 2)、ならびに

(b) (a) に対して少なくとも 90 % の同一性を有する配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項 14 に記載のベクター。

【請求項 16】

遅延された老化特性を有する、トランスジェニック植物細胞、植物、植物種子、または植物の他の部分であって、該植物細胞、植物、植物種子、または植物の他の部分は、イソペンテニルトランスフェラーゼ (i p t) 遺伝子に作動可能に連結された、m y b 遺伝子プロモーターを含む遺伝的構築物、を含む、植物細胞、植物、植物種子、または植物の他の部分。

40

【請求項 17】

請求項 1 に記載の方法によって産生された、請求項 16 に記載のトランスジェニック植物細胞、植物、植物種子、または植物の他の部分。

【請求項 18】

請求項 9 に記載のベクターを含む、請求項 16 に記載のトランスジェニック植物細胞、植物、植物種子、または植物の他の部分。

【請求項 19】

請求項 16 に記載の植物細胞に由来する、植物、植物種子、または植物の他の部分。

50

【請求項 20】

請求項 16 に記載の植物に由来する、植物、植物種子、または植物の他の部分。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、植物の老化を操作する方法に関する。本発明はまた、このような方法において有用であるベクター、改変された老化特性を有する形質転換植物、ならびに植物細胞、種子、およびこのような植物の他の部分にも関する。

【0002】

葉の老化は、細胞死の前の細胞における代謝および構造上の変化に関係している。これはまた、活発に増殖している領域への栄養物質の再循環にも関係している。

10

【0003】

サイトカイニンによる植物および植物器官の老化の調節は、重要な農業上の結果を有する。葉のサイトカイニンレベルの増大は、老化を遅らせる傾向にある。多数のプロモーターが、i p t 遺伝子の発現を調節するために使用されている。i p t の産物（イソペンテニルトランスフェラーゼ）は、サイトカイニンの合成の重要な工程を触媒する。しかし、一般的には、i p t 遺伝子を過剰発現するトランスジェニック植物は、根および苗条（s h o o t）の生長を遅らせること、根を形成しないこと、頂部優性を減少させること、および葉の面積を減少させることが報告されている。

【0004】

本発明の目的は、先行技術に付随する問題点または不備の 1 つ以上を克服するかまたは少なくとも軽減することである。

20

【0005】

1 つの局面においては、本発明は、植物の老化を操作する方法を提供する。上記の方法は、サイトカイニンの生合成に関係している酵素をコードしている遺伝子またはその機能的に活性なフラグメントもしくは変異体に作動可能に連結された、m y b 遺伝子プロモーターまたはその機能的に活性なフラグメントもしくは変異体を含む遺伝子構築物を、上記の植物中に導入することを包含する。

【0006】

老化の操作は、植物および/または特異的な植物器官に関係している。種々の植物器官（例えば、葉、根、苗条、茎、塊茎、花、匍匐、および果実）の老化が操作され得る。植物および植物器官の老化の操作は、以下のような重要な農業上の結果を有する場合がある：例えば、園芸産物の果実、花、葉、および塊茎、ならびに切花の貯蔵期間の増大、園芸作物の腐敗しやすさの減少、老化を遅らせられた葉の中での炭素固定の増大（これによって収量の増大を導く）、飼料植物のバイオマスの産生量の増大、種子の産生量の増大など。

30

【0007】

「老化の操作」は、一般的には、形質転換されていない対照植物と比較して、形質転換植物の老化を遅延させることに関する。しかし、一部の適用については、植物の老化を促進するかまたは別の方法で老化を改変することが所望される場合がある。老化は、例えば、アンチセンス遺伝子を利用することによって、促進され得るかまたは別な方法で改変され得る。

40

【0008】

上記の遺伝子構築物の有効量が、任意の適切な技術によって（例えば、形質導入、トランスフェクション、または形質転換によって）上記の植物に導入され得る。「有効量」によって、上記の植物、または植物種子、もしくはそれらが由来する植物の他の部分の定義可能な表現型形質を生じるために十分な量が意味される。このような量は、植物の型、投与経路、および他の関連する因子を考慮して、適切な当業者によって容易に決定され得る。このような当業者は、適切な投与量および投与方法を容易に決定することができる。例えば、Maniatisら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harborを参照のこと。その開示全体が、本明細書中で参

50

考として援用されている。

【0009】

myb遺伝子プロモーターは任意の適切な型であり得る。好ましくは、myb遺伝子プロモーターは、myb32遺伝子プロモーターである。好ましくは、myb遺伝子プロモーターは、Arabidopsis由来であり、より好ましくは、Arabidopsis thaliana由来である。最も好ましくは、myb遺伝子プロモーターは、本明細書の図1に示される配列（配列番号1）、ならびにその機能的に活性なフラグメントおよび変異体からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む。

【0010】

適切なプロモーターは、Liら、Cloning of three MYB-like genes from Arabidopsis (PGR 99-138) Plant Physiology 121:313 (1999)に記載されている。その開示全体が、本明細書中で参考として援用されている。

【0011】

「機能的に活性な」によって、フラグメントまたは変異体（例えば、アナログ、誘導体、または変異体）が本発明の方法によって植物の老化を操作することが可能であることが意味される。このような変異体には、天然に存在している対立遺伝子変異体、および天然には存在していない変異体を含む。1つ以上のヌクレオチドの付加、欠失、置換、および誘導が、その改変がフラグメントまたは変異体の機能的活性の消失を生じない限りは、企図される。好ましくは、機能的に活性なフラグメントまたは変異体は、上記の配列の関連する部分に対して少なくとも約80%の同一性、より好ましくは、少なくとも約90%の同一性、最も好ましくは、少なくとも約95%の同一性を有する。好ましくは、フラグメントは、少なくとも10ヌクレオチド、より好ましくは、少なくとも15ヌクレオチド、最も好ましくは、少なくとも20ヌクレオチドの大きさを有する。

【0012】

サイトカイニンの生合成に関係している酵素をコードする遺伝子は、任意の適切な型であり得る。好ましくは、この遺伝子は、イソペンテニルトランスフェラーゼ（ipt）遺伝子である。好ましくは、この遺伝子は、Agrobacterium由来であり、より好ましくは、Agrobacterium tumefaciens由来である。最も好ましくは、遺伝子は、本明細書の図2に示される配列（配列番号2）、ならびにその機能的に活性なフラグメントおよび変異体からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む。

【0013】

「機能的に活性な」によって、フラグメントまたは変異体（例えば、アナログ、誘導体、または変異体）が、本発明の方法によって植物の老化を操作することが可能であることが意味される。このような変異体には、天然に存在している対立遺伝子変異体、および天然には存在していない変異体を含む。1つ以上のヌクレオチドの付加、欠失、置換、および誘導が、その改変がフラグメントまたは変異体の機能的活性の消失を生じない限りは、企図される。好ましくは、機能的に活性なフラグメントまたは変異体は、上記の配列の関連する部分に対して少なくとも約80%の同一性、より好ましくは、少なくとも約90%の同一性、最も好ましくは、少なくとも約95%の同一性を有する。このような機能的に活性な変異体およびフラグメントとして、例えば、対応しているアミノ酸配列中に1つ以上の残基の保存的アミノ酸置換を生じる核酸変化を有しているものが挙げられる。好ましくは、フラグメントは、少なくとも10ヌクレオチド、より好ましくは、少なくとも15ヌクレオチド、最も好ましくは、少なくとも20ヌクレオチドの大きさを有する。

【0014】

遺伝子構築物は、任意の適切な技術によって植物に導入され得る。本発明の遺伝子構築物を植物細胞中に取り込むための技術（例えば、形質導入、トランスフェクション、または形質転換による）は、当業者に周知である。このような技術として、Agrobacterium媒介性形質導入、組織、細胞、およびプロトプラストへのエレクトロポレーション、プロトプラスト融合、生殖器官（reproductive organ）への注入

10

20

30

40

50

、未成熟胚への注入、ならびに細胞、組織、カルス、未成熟胚、および成熟胚および成熟胚への高速粒子発射導入 (high velocity projectile introduction)、ならびにそれらの組合せが挙げられる。技術の選択は、形質転換される植物の型に大きく依存し、そして当業者によって容易に決定され得る。

【0015】

本発明の遺伝子構築物を取り込んでいる細胞は、下記のように選択され得、次いで、当該分野で周知の技術を使用して形質転換植物を再生するために、適切な培地中で培養される。培養条件 (例えば、温度、pHなど) は、当業者に明らかである。得られた植物は、形質転換植物の良好な再生を生じるように、当該分野で周知の方法を使用して、有性交配または無性交配のいずれかで再生され得る。

10

【0016】

本発明の方法は、以下を含む種々の植物に適用され得る：単子葉植物 (例えば、草生 (飼料および芝生 (turf grass))、トウモロコシ、オート麦、小麦、および大麦)、双子葉植物 (例えば、Arabidopsis、タバコ、クローバー (例えば、白花クローバー、ムラサキツメクサ、地下クローバー (subterranean clover)、アルファルファ、カノラ、アブラナ、レタス、ホウレンソウ)、ならびに裸子植物。

【0017】

本発明の第2の局面においては、植物の老化を操作することができるベクターが提供される。上記のベクターは、サイトカイニンの生合成に関係している酵素をコードする遺伝子またはその機能的に活性なフラグメントもしくは改変体に作動可能に連結された、myb遺伝子プロモーターまたはその機能的に活性なフラグメントもしくは改変体を含む。

20

【0018】

本発明のこの局面の好ましい実施態様においては、ベクターは、ターミネーターを含む。上記のプロモーター、遺伝子、およびターミネーターは、作動可能に連結される。

【0019】

「作動可能に連結された」によって、上記のプロモーターが植物細胞中で上記の遺伝子を発現することができること、および上記のターミネーターが植物細胞中で上記の遺伝子の発現を終結させることができることが、意味される。好ましくは、上記のプロモーターは、上記の遺伝子の上流に存在し、そして上記のターミネーターは上記の遺伝子の下流に存在する。

30

【0020】

このベクターは、任意の適切な型であり得、そしてウイルス性または非ウイルス性であり得る。ベクターは発現ベクターであり得る。このようなベクターは、染色体配列、非染色体配列、および合成核酸配列 (例えば、植物ウイルスの誘導体；細菌性プラスミド、Agrobacterium tumefaciens由来のTiプラスミドの誘導体；Agrobacterium rhizogenes由来のRiプラスミドの誘導体；ファージDNA、酵母の人工染色体；細菌の人工染色体；2成分の細菌の人工染色体；プラスミドおよびファージDNAの組合せから誘導されたベクターを含む。しかし、任意の他のベクターが、それが植物細胞中で複製可能であるか組み込みが可能であるかまたは生存が可能である限りは、使用され得る。

40

【0021】

プロモーター、遺伝子、およびターミネーターは、任意の適切な型であり得、そして標的植物細胞に対して内因性であり得るか、またはそれらが標的植物細胞中で機能的である限りは、外因性であり得る。

【0022】

本発明のベクター中で使用され得る種々のターミネーターもまた、当業者に周知である。ターミネーターは、プロモーター配列と同じ遺伝子由来であり得るか、または異なる遺伝子由来であり得る。詳細には、適切なターミネーターは、CaMV 35SポリA、ならびにノパリン合成酵素 (nos) およびオクトピン合成酵素 (ocs) 遺伝子に由来する

50

他のターミネーターのような、ポリアデニル化シグナルである。

【 0 0 2 3 】

プロモーター、遺伝子、およびターミネーターに加えて、ベクターはさらに、遺伝子の発現に必要な以下のエレメントを異なった組合せで含み得る：例えば、ベクター骨格、複製起点 (o r i)、マルチクローニング部位、スパーサー配列、エンハンサー、イントロン (例えば、トウモロコシユビキチン U b i イントロン)、抗生物質耐性遺伝子、および他の選択マーカー遺伝子 (例えば、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ (n p t I I) 遺伝子、ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ (h p h) 遺伝子、ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ (b a r または p a t) 遺伝子)、ならびにレポーター遺伝子 (例えば、 β -グルクロニダーゼ (G U S) 遺伝子 (g u s A))。このベクターはまた、翻訳開始のためのリボソーム結合部位を含み得る。このベクターはまた、発現を増幅するために適切な配列を含み得る。

10

【 0 0 2 4 】

形質転換された宿主細胞の選択のための表現形質を提供するための選択マーカー遺伝子の使用の代替的なものとして、形質転換された細胞中のベクターの存在が、当該分野で周知の他の技術 (例えば、P C R (ポリメラーゼ連鎖反応)、サザンブロットハイブリダイゼーション分析、組織化学的アッセイ (例えば、G U S アッセイ)、薄層クロマトグラフィー (T L C)、ノーザンおよびウェスタンブロットハイブリダイゼーション分析) によって決定され得る。

【 0 0 2 5 】

上記の遺伝子の発現を生じるように作動可能に連結されるベクターの種々の成分が、当業者に明らかである。本発明のベクターの成分を作動可能に連結するための技術が、当業者に周知である。このような技術には、リンカー (例えば、合成のリンカー) (例えば、1つ以上の制限酵素部位を含む) の使用を含む。

20

【 0 0 2 6 】

本発明のさらなる局面においては、改変された老化特性を有する、トランスジェニック植物細胞、植物、植物種子、または植物の他の部分が提供される。好ましくは、トランスジェニック植物細胞、植物、植物種子、または植物の他の部分は、本発明の方法によって産生される。

【 0 0 2 7 】

本発明はまた、本発明の植物細胞に由来する植物、植物種子、または植物の他の部分を提供する。

30

【 0 0 2 8 】

本発明はまた、本発明の植物に由来する植物、植物種子、または植物の他の部分を提供する。

【 0 0 2 9 】

本発明は、添付の実施例および図面を参照して本明細書中でより完全に記載される。しかし、以下の記載は単に例証であり、そして上記の本発明の普遍性の限定としては決して受け取られるべきではないことが理解されるはずである。

【 0 0 3 0 】

(実施例)

(実施例 1 : a t m y b 3 2 : i p t トランスジェニック植物の産生)

トランスジェニック白色クローバー植物 (T r o f o l i u m r e p e n s c v . H a l f a および I r r i g a t i o n) を、キメラ a t m y b 3 2 : : i p t 遺伝子を保有している 2 成分ベクターを使用して A g r o b a c t e r i u m 媒介性形質転換によって産生した (図 3 a)。トランスジェニック植物を、i p t プライマーおよび n p t I I プライマーを使用する P C R によってスクリーニングした (図 3 b)。サザン DNA ハイブリダイゼーション分析に供した H i n d I I I で消化したゲノム DNA サンプルは、4 . 4 k b より大きい DNA フラグメントが、i p t プローブおよび n p t I I プローブの両方によって全ての株において検出されることを示した。このことは、全長の T - DNA

40

50

の白色クローバーのゲノム中での存在およびその中への組み込みを示している（図3）。トランスジェニック株 Hmi 01、lmi 06、lmi 11、および lmi 18（それぞれ、レーン1、3、5、8、および12）は、ゲノム中に組み込まれた1コピーの全長の T-DNA を有することが明らかである。他のトランスジェニック株は、複数のコピーの atmyb32::ipt 導入遺伝子を有した。

【0031】

（実施例2：トランスジェニック植物中での atmyb32::ipt 遺伝子の発現）
トランスジェニック白色クローバー（T. repens）植物中での atmyb32::ipt 導入遺伝子の発現を、RT-PCRによって評価した。ipt mRNAを、試験した全ての atmyb32::ipt トランスジェニック白色クローバー植物の葉組織中

10

【0032】

（実施例3：atmyb32::ipt トランスジェニック植物の切り取った葉の老化の遅延）

atmyb32::ipt トランスジェニック植物の切り取った葉の老化を評価するための実験を行った。迅速な黄変を、非形質転換白色クローバー植物および atmyb32::gusA トランスジェニック白色クローバー植物の両方の栽培品種から切り取った葉において、1週間以内に観察した。トランスジェニック株 Hmi 01、Hmi 08、lmi 16、および lmi 18 は、老化の遅延を示したが、lmi 11 および lmi 12 は、7 日間の終わりには黄変の徴候を示さなかった。2週間後、全ての atmyb32::ipt トランスジェニック植物の葉は、非形質転換植物および atmyb32::gusA 対照トランスジェニック植物のものよりもはるかに緑色であった（図5）。切り取った葉の老化の程度は、cv. Halfa については、HC、Hmg > Hmi 01 > Hmi 08 の順序であり、そして cv. Irrigation については、IC および Img > lmi 16 > lmi 18 > lmi 11 および lmi 12 であった。HC は、Halfa の非形質転換対照であり、Hmg は Halfa の atmyb32::gusA 対照であり、IC は、Irrigation の非形質転換対照であり、Img は、Irrigation の atmyb32::gusA 対照である。Hmi 01、Hmi 08、lmi 16、lmi 18、lmi 11、および lmi 12 は、それぞれ、栽培品種 Halfa (H) および Irrigation (I) に由来する別々の atmyb32::ipt トランスジェニック

20

30

【0033】

（実施例4：atmyb32::ipt トランスジェニック植物の正常な植物形態学および根の生育）

正常な植物形態学、ならびに正常な苗条および正常な根の生育を、atmyb32::ipt トランスジェニック白色クローバー植物において観察した（図6）。従ってこれは、atmyb32 プロモーターの制御下での ipt 遺伝子の調節された発現が、トランスジェニック白色クローバー植物の根の形成および頂部優性のいずれにも負の影響は与えないことを示している（表1）。

（表1）

40

【0034】

【表1】

形質転換体	栽培品種	構築物	<i>ipt</i> コピー数	表現型
Hmi01	Haifa	<i>atmyb32::ipt</i>	1	正常
Hmi08	Haifa	<i>atmyb32::ipt</i>	>3	正常
Imi06	Irrigation	<i>atmyb32::ipt</i>	1	正常
Imi07	Irrigation	<i>atmyb32::ipt</i>	3	正常
Imi09	Irrigation	<i>atmyb32::ipt</i>	>3	正常
Imi10	Irrigation	<i>atmyb32::ipt</i>	>3	正常
Imi11	Irrigation	<i>atmyb32::ipt</i>	1	正常
Imi12	Irrigation	<i>atmyb32::ipt</i>	2	正常
Imi16	Irrigation	<i>atmyb32::ipt</i>	2	正常
Imi18	Irrigation	<i>atmyb32::ipt</i>	1	正常

10

正常な植物の形態学および正常な根の形成を、分析した10個の独立した *atmyb32::ipt* トランスジェニック白色クローバー株中で観察した。10個の独立した *atmyb32::ipt* トランスジェニック白色クローバー株中に見積もった *ipt* 遺伝子のコピー数を示す。

【0035】

20

本明細書中で開示されそして定義される本発明が、本文または図面に記載されるかまたはそれから明らかである個々の特徴の2つ以上の代替的な組合せの全てに及ぶことが、理解される。これらの異なる組み合わせの全てが、本発明の種々の代替的な局面を構成する。

【0036】

最後に、種々の変更、改変、および/または付加が本明細書中に概説される本発明の精神を逸脱することなく行われ得ることが、理解される。

【0037】

用語「含む (comprise)」(またはその文法上の変形) は、本明細書中で使用される場合には、用語「含む (include)」と等価であり、そして他の要素または特徴の存在を排除するように受け取られるべきではないこともまた、理解される。

30

【0038】

本明細書中で引用されている文献は、参照の目的だけのためであり、そしてそれらの内容は、それらが関連分野での共通の一般的な知識の一部を形成することの認定ではない。

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、*Arabidopsis thaliana* 由来の *myb32* 遺伝子 (*atmyb32*) に由来するプロモーターのヌクレオチド配列を示す (配列番号1)。

【図2】 図2は、*Agrobacterium tumefaciens* 由来のイソペンテニルトランスフェラーゼ (*ipt*) 遺伝子のヌクレオチド配列を示す (配列番号2)。

。

【図3】 図3は、*atmyb32::ipt* トランスジェニック白色クローバー (*Trifolium repens*) 植物のPCRおよびサザンDNA分析を示す。a) サザンハイブリダイゼーションに使用したプローブの制限酵素部位および位置を示す、*patmyb32::ipt* の T-DNA 領域。b) PCR増幅した599bpの *nptII* および583bpの *ipt* 産物のエチジウムブロマイド染色した1%のアガロースゲル。c) *ipt* プローブとハイブリダイズしたPCR陽性の白色クローバー植物から単離した、*HindIII* で消化した全ゲノムDNAでのサザンハイブリダイゼーションプロット。d) *nptII* プローブとハイブリダイズしたPCR陽性白色クローバー植物から単離した、*HindIII* 消化した全ゲノムDNAとのサザンプロットハイブリダイゼーション。レーン1~2: 2つの別々のカナマイシン耐性の *cv. Haifa* 再生植物 (*regenerants*)、コード: それぞれ、Hmi01、Hmi08; レーン3~12: 12個

40

50

の別々のカナマイシン耐性の *cv. Irrigation* 再生植物、コード：それぞれ、*lmi06*、*lmi07*、*lmi08*、*lmi09*、*lmi10*、*lmi11*、*lmi12*、*lmi14*、*lmi16*、*lmi18*；レーンC：形質転換されていない白色クローバー；レーンP：陽性の対照プラスミド *p at my b 3 2 i p t*。

【図4】 図4は、*at my b 3 2 :: i p t* トランスジェニック白色クローバー (*T. repens*) 植物中での *i p t* mRNA の発現の RT-PCR 分析を示す。レーン1～11は、図4.8のような対応する植物コードを有する11個の異なるトランスジェニック株に由来するサンプルである；レーンC、対照の非形質転換植物；レーンP、陽性対照としてのプラスミド。全RNAを、葉組織から単離した。全RNA (13 µg) をそれぞれ逆転写反応に使用し、そしてRT産物の1/5をPCRによって増幅した。右のゲルのDNA産物を、2×30サイクルの集約PCR (*Intensive PCR*) によって増幅した。別のレーンに充填した対応するRT-PCR反応には逆転写酵素を添加しなかった。

10

【図5】 図5は、*at my b 3 2 :: i p t* トランスジェニック白色クローバー (*T. repens*) 植物から切り取った葉の老化の生物学的試験を示す。少なくとも30枚の葉を、それぞれの株から植物株の匍匐上の同様の位置から回収した。A. 切り取った葉の総数の関数としての黄変している葉の数。B. 2週間の間、光線下の水上で維持した葉の典型的な外観。植物株についての重要事項：それぞれ、HC、ICおよびHmg、Img、非形質転換植物および *at my b 3 2 :: g u s A* トランスジェニック植物 (*cv. Halfa* および *Irrigation*)；01および08、それぞれ、*at my b 3 2 :: i p t* トランスジェニック *Halfa* 株 *Hmi01* および *Hmi08*；11、12、16、および18、それぞれ、*at my b 3 2 :: i p t* トランスジェニック *Irrigation* 株、それぞれ、*lmi11*、*lmi12*、*lmi16*、および *lmi18*。

20

【図6】 図6は、A) 全体的な植物の形態学、B) 正常な苗条の生育、およびC) 対照植物 (左) と比較した、*at my b 3 2 :: i p t* トランスジェニック白色クローバー (*T. repens*) (右) 植物における正常な根の生育。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Agriculture Victoria Services Pty Ltd
La Trobe University

<120> Manipulation of plant senescence

<130> M80132140

<150> AU PQ9946

<151> 2000-06-09

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 941

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

10

<400> 1

```

gtttgtgtct tctagattaa tcctccaaac ttttgattaa ccaaaaaaat tatcaaacta   60
acatgttctc cttttttctt tagaaattct aacgaattta tctttatact gatttgaata   120
tacttaattt ggtcatttgg atgcccttta caacctcctt accaaactca ctatggcaaa   180
tatatactat ttccattgtt aacataaatg tccataattt gaattaaatt cgttgcagta   240
cgaaccatc caactttgtc caaaaacaaa atccttataa ctatttactt taatgtaaatt   300
atatcctcta cttttgtttt tacaacccta gctcaaacaa atttattatt tgcgataaaa   360
aatcatatcg aacaaactcg atgatttttt ttttcttacg ttattaatga aactaaaata   420
tagaaaaaaa caagatgaac caaattttca cctatctaac tacttaaata taatatgatt   480
aaatttggtt aagtttgaaa agtttcttta gaaatgtgaa atattgatca cagtttctat   540
tgctaaaaac accaacaacaa cgcatgtcgc cattcataat tatggtttca cacctacaac   600
taggctaata agtaaataag tagacaacta gactcagggt tgaaaaaac ataaaagcca   660
tatagcgttt tctcattgaa actgcgaaca cgatcgtgtg aatgttgtag tttctagttt   720
tgatacaaac aaacaaaaac acaattttaa cttagattaa aaagaaaaaa gagaacggag   780
cccactagcc actccttcaa acgtgtctta ccaactctct tctagaaaca aattaggctt   840
caccttctct ttccaacctc tctctctctc tctctctctt tttctcaaac catctctcca   900
taaagoccta atttcttcat cacaagaatc agaagaagaa a                               941

```

20

30

<210> 2

<211> 1988

<212> DNA

<213> Agrobacterium tumefaciens

<400> 2

```

ggatcctgtt acaagtattg caagttttat aaattgcata ttaatgcaat cttgattttt   60
aacaacgaac gtaatggcgt aaaaaatgta tggtatatta tttatattta attatattgg   120
agtgcgcat aatatgatga tttataatta aaaaatattt actgtcacat tgactgagat   180
ggcactgtta tttcaaccat gaaattttgt tgattttttt acaataacaa taattgcagg   240

```

aagtaaataa tagacgccgt tgttaaaaaa ttgcaatcat atgtgcctaa ctatagggac 300
aattaagtca attgtaatag tctcccttat ttaacgact cacctaataca agtattacaa 360
aatatctcac ttttcgctcag taatgatgta atcagaactg aatagtacaa gtaaaacgtg 420
gaaaaacgtc atagagtggc atgattatat tcctctgcat tgccaattta ttcagcttta 480
tttgacttag gtgtgccttc gttagcgaca aattgctttc aaggagacag ccatgccccca 540
cactttgttg aaaaaacaagt tgccttttgg gatacggtaa agccagttgc acttcaataa 600
tgaatttcaa ggagacaata taaccgcctc tgataacaca attctctaata ataaaaatca 660
gtttgtattc aatatactgc aaaaaactta tggacctgca tctaattttc ggtccaactt 720
gcacaggaaa gacgacgacc gcgatatgctc ttgccagca gacagggctt ccagtccttt 780
cgcttgatcg ggtccaatgc tgtcctcaac tatcaaccgg aagcggacga ccaacagtg 840
aagaactgaa aggaacgacg cgtctctacc ttgatgatcg gcctctgggtg gagggatatca 900
tcgcagccaa gcaagctcat cataggctga tcgaggaggt gtataatcat gaggccaacg 960
gcgggcttat tcttgaggga ggatccacct cgttgctcaa ctgcatggcg cgaacagct 1020
atlggagtgc agattttcgt tggcatatta ttgccacaa gttaccggac caagagacct 1080
tcattgaaagc ggccaaggcc agagttaagc agatgttgca ccccgctgca ggccattcta 1140
ttattcaaga gttggtttat ctttggaatg aacctcggct gagggccatt ctgaaagaga 1200
tcgatggata tcgatatgcc atgttggttg ctagccagaa ccagatcacg gcagatatgc 1260
tattgcagct tgacgcaaat atggaaggta agttgattaa tgggatcgct caggagtatt 1320
tcattccatgc gcgccaacag gaacagaaat tcccccaagt taacgcagcc gctttcgacg 1380
gattcgaagg tcattcgttc ggaatgtatt aggttacgcc agcctcgct cgcacctgtc 1440
ttcatctgga taagatgttc gtaattgttt ttggctttgt cctgttgttg cagggcgga 1500
aatacttccg acaatccatc gtgtcttcaa actttatgct ggtgaacaag tcttagtttc 1560
cacgaaagta ttatgttaaa ttttaaaatt tcgatgtata atgtggctat aattgtaaaa 1620
ataaactatc gtaagtgtgc gtgttatgta taatttgtct aaatgtttaa tatatatcat 1680
agaacgcaat aaatattaaa tatagcgctt ttatgaaata taaatacatc attacaagtt 1740
gtttatatatt cgggtacctt ttccattatt ttgcgcaaca agtcacggat attcgtgaaa 1800
acgacaaaaa ctgcgaaatt tgcgggcagt gocttcagtt ttcctattaa tatttagttt 1860
gacaccagtt gctatcattg cggccaagct cagctgtttc ttttcttgaa acgatggatc 1920
gaatgagcat ggctcgga ggttggttg taccatgtct ttctcatggc aaagatgatc 1980
aactgcag 1988

10

20

30

【 図 1 】

```

1 gtttgggtct tctagattaa tctccaaac ttttgattaa ccaaaaaat tatcaaaact
61 acatgtctct cttttttctt tagaaattct aacgaattta tttttatact gatttgaaata
121 tacttaattt ggtcatttgg atgcocctta caacctcttt accaaactca ctatggcaaa
181 tatatactat tttocattgt aacataaatg tccataattt gaattaaatt cgttggaata
241 cgaacccatc caactttgtc caaaaacaaa atctctataa ctatttaatt taatgtaaat
301 atatctctta cttttgtttt tacaacccct gctcaaaaca atttattatt tgcgataaaa
361 aatcatatcg aacaaactcg atgatttttt tttttttacg ttattaatga aactaaataa
421 tagaaaaaaa cagatgggac caaattttca cctatctaac tacttaata taattgattt
481 aaatttggtt aagtttgaaa agttttctta gaattgtaa atattgata cagtttttat
541 tgcataaact accaaacaaa cgcattgctg catctaatat tatggtttca cactacaac
601 taggtaata agtaataaag tagacaacta gactcaggtt tgaaaaaaco ataaagcca
661 tatagctttt tctcaatgaa actgogaaca cgtcgtgtgt aatgttgacg tttctagttt
721 tgatacaaac aacaaaaaac acaatttaatt cttagattaa aaagaaaaaa gagaaggag
781 cccactagcc actctctcaa acgtgtctta ccaactctct tctagaacaa aattaggctt
841 caccttctct tctcaactct tctctctctt tctctctctt tttctcaaac catctctcca
901 taagccctta atttctcat cacaagaact agaagaagaa a

```

FIGURE 1

【 図 2 】

```

1 ggatcctggtt acaagtattg caagttttat aaattgcaat ttaattgcaat cttgattttt
61 aacacagaaac gtaattgggt aaaaaatgta tgttatatta ttttatatta attatatttg
121 agtgccgcac ataatgatga tttataatta aaaaatattt actgtcacat tgcctgagat
181 ggcaactgta tttcaacat gaattttgt tgaatttttt acaataaaca aaattgcagg
241 agtaaatata tagacgcgtt tgttaaaaaa tggcaatcat atgtgcctaa ctatagggac
301 aattaagtca attgtaantg tctcctctat tttacagact caactaanta agtattacaa
361 aatatctcac ttttctcag taatgatgta atcagaaact aatagtaca gtaaaactgt
421 gaaaaacytc atagagtgtc atgattatat tctctgcat tgcacatta ttcagcttta
481 ttgacttagt gtgtgccttc gttagacaca aattgcttc aaggagacag caatgcccc
541 cactttgttg aaaaacagt tgccttttgc gatacgttaa agccagtgc acttcaataa
601 tgaatttcaa ggagacaata taacgccttc gataacaca attctctaatt ataaaatca
661 gtttctatcc aataactgc aaaaaactta tggacotgca tctaatttct ggtccaaact
721 gcacaggaaa gacgacgacc gcgatagctc tggccacaga gacagggtct ccagtccttt
781 cgtctgatcg ggtccaatgc tgcctctaac tatcaacgg aagcgagcga ccaacagtgg
841 aagaactgaa aggaacgacg cgtctctaac ttgatgatcg gctctgtgtg gaggttatca
901 tgcgacgcaa gcaagctcat catagctgta togaggaggt gtataatcat gaggcacag
961 gcggccttat tcttgaggga ggtccacact cgttgctaaa ctgcattggg cgaacacagt
1021 attggagtgc agattttcgt tggcatatta ttcgcaaca gttaccgac caagagacot
1081 tcatgaaagc ggccaaggcc agagttaagc agatgttgca ccccgctgca ggcatttcta
1141 ttattcaaga gttgttttat ctttgtaagt aacctggctt gaggcccat ctgaagaga
1201 tccatggata tccatgatgc atgtgttttg ctgacagaaa ccagatcacg ccagatagtc
1261 tattgcagct tgcgcgaact atggaaagta agttgattaa tggatcgtct caggatatt
1321 tcatctatgc gcgcacacag gaacagaact tccccaaat taacgcagcc gctttgagc
1381 gattcgaagg tcatccgttc ggaatgtatt aggttaagcc agccctcgtt cgcacctgtc
1441 ttcactctga taagtgttc gtaattgttt ttggctttgt cctgtgtgtg caggcgccga
1501 aatactctcg acaatccatc gtgtcttcaa actttatgct ggtgaacaag tcttagtttc
1561 aacgaagtta ttatgttaaa ttttaaaatt tccatgata atgtggctat aatgttaaaa
1621 ataaactatc gtaagtgtgc gtgttatgta taattgtctc aatgttttaa tatatcatc
1681 agaaagcaat aaatatcaaa tatagcgttt ttatgaata taaatacatc attacaagtt
1741 gtttatattt cgggtacott ttcattattt ttgcgcaaca agtcacggat attcgtgaaa
1801 acgcaaaaaa ctgcgaactt tgcgggaagt gcttcagtt ttctatttaa tatttagttt
1861 gaacacaggt gctatcattg cggccaagct cagctgtttc tttcttgaa acgattgata
1921 gaatgagcat ggtcggcaaa ggttgctgtt taccattgtc tttctatgca aaagatgata
1981 aactgcag

```

FIGURE 2

【 図 3 】

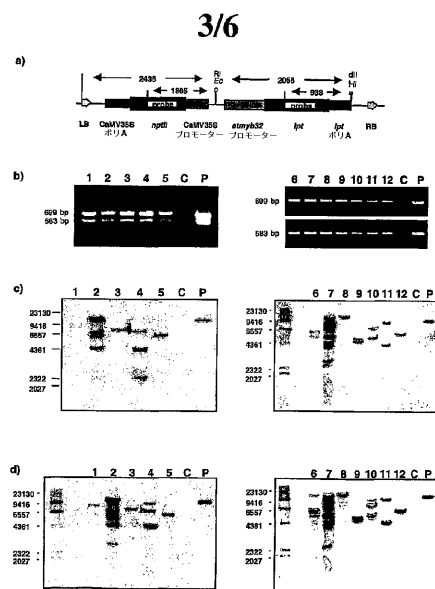


FIGURE 3

【 図 4 】

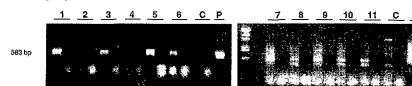


FIGURE 4

【 図 5 】

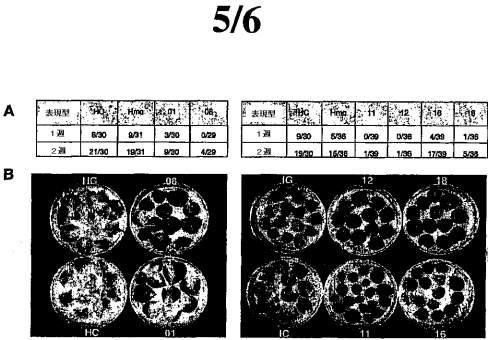


FIGURE 5

【 図 6 】

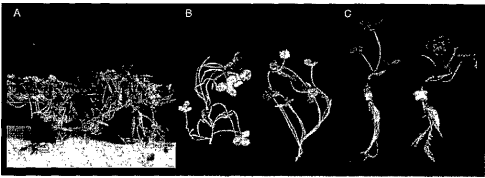


FIGURE 6

フロントページの続き

(74)代理人 100089037

弁理士 渡邊 隆

(74)代理人 100110364

弁理士 実広 信哉

(72)発明者 スパンジェンバーグ, ジャーマン

オーストラリア国 3 0 8 3 ビクトリア, バンドーラ, アーサー ストリート 5 6

(72)発明者 リン, イ ハン

シンガポール国 1 1 8 6 9 9 シンガポール, パシール パンジャン ロード 3 6 0, ゴ
ールドコースト コンドミニウム ナンバー 0 4 - 1 0

(72)発明者 パリッシュ, ロジャー ダブリュー.

オーストラリア国 3 1 1 3 ビクトリア, ワランダイト, ウェブ ストリート 6 0

(72)発明者 リ, ソン フェン

オーストラリア国 3 1 0 5 ビクトリア, ブリーン, ペンデレル ウェイ 2 4

(72)発明者 ヒーズルウッド, ジョシュア

オーストラリア国 6 1 5 8 ウェスタン オーストラリア, イースト フリーマントル, マ
ーミオン ストリート 1 2 7

(72)発明者 パラギー, チャールズ ケイ.

オーストラリア国 3 0 8 3 ビクトリア, バンドーラ, フラナリー アベニュー 3 9

審査官 吉森 晃

(56)参考文献 The Plant Cell, vol.3, pp.647-656 (1991)

Mol.Breeding, vol.6, pp.135-144 (2000)

Science, vol.270, pp.1986-1988 (1995)

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

C12N 15/00-15/90

BIOSIS/WPIDS(STN)