(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2005-198600
(P2005-198600A)
(43)公開日　平成17年7月28日(2005.7.28)

| (51)Int.Cl.[7] | F I | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|
| A01H 1/00 | A01H 1/00 | A | 2B030 |
| A01H 5/00 | A01H 5/00 | ZNAA | 4B024 |
| C12N 15/09 | C12N 15/00 | A | |

審査請求 未請求　請求項の数 12　ＯＬ　（全 16 頁）

(21)出願番号　特願2004-9649(P2004-9649)
(22)出願日　平成16年1月16日(2004.1.16)

(71)出願人　802000020
財団法人浜松科学技術研究振興会
静岡県浜松市城北３－５－１　静岡大学浜松キャンパス内
(74)代理人　100078662
弁理士　津国　肇
(74)代理人　100075225
弁理士　篠田　文雄
(72)発明者　丹羽　康夫
静岡県静岡市谷田５２番１号　静岡県立大学内
(72)発明者　加藤　美知代
静岡県沼津市大岡３６００　沼津工業高等専門学校内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】遺伝子組換ツバキ科樹木及びその作製方法

(57)【要約】
【解決課題】　従来の方法による遺伝子組換え体の作製が困難であったツバキ科樹木、特にチャ樹における遺伝子組換え体の効率的な作製方法及び遺伝子組換え樹木並びに組換え体の選択方法の提供。
【解決手段】　ツバキ科樹木の胚カルスに遺伝子、特に細胞小器官に局在化する蛍光たんぱく質をコードする遺伝子を含む遺伝子を導入することを特徴とする遺伝子組換えツバキ科樹木の作製方法
【選択図】　なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ツバキ科樹木の胚カルスに遺伝子導入することを特徴とする遺伝子組換えツバキ科樹木の作製方法。
【請求項２】
ツバキ科樹木が、チャ樹である請求項１に記載の作製方法。
【請求項３】
胚カルスが、芽の培養にて生じる葉の先端及び中助の部分より発生する胚カルスである請求項１又は２に記載の作製方法。
【請求項４】
遺伝子が蛍光たんぱく質をコードする遺伝子を含む請求項１、２又は３に記載の作製方法。
【請求項５】
蛍光たんぱく質がオワンクラゲ由来の緑色蛍光たんぱく質ＧＦＰ又はその変異体ｓＧＦＰ（Ｓ６５Ｔ）である請求項４に記載の作製方法。
【請求項６】
蛍光たんぱく質をツバキ科樹木の細胞小器官に局在化させる請求項５に記載の作製方法。
【請求項７】
細胞小器官がミトコンドリア及び色素体である請求項６項に記載の作製方法。
【請求項８】
請求項１～７のいずれか１項に記載の方法により作製された遺伝子組換えツバキ科樹木。
【請求項９】
蛍光たんぱく質をコードする遺伝子を導入した遺伝子組換えツバキ科樹木。
【請求項１０】
ツバキ科樹木が、チャ樹である請求項９に記載のツバキ科樹木。
【請求項１１】
蛍光たんぱく質を細胞小器官に局在化させた請求項９又は１０に記載のツバキ科樹木。
【請求項１２】
細胞小器官がミトコンドリア及び色素体である請求項１１に記載のツバキ科樹木。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、ツバキ科樹木、特にチャ樹における胚カルスを利用した遺伝子組換え樹木作製方法及び遺伝子組換えツバキ科樹木に関する。また、本発明は、細胞小器官に局在化させて蛍光たんぱく質を細胞非破壊的に測定する形質転換体の選択工程を含む遺伝子組換えツバキ科樹木の作製方法及び遺伝子組換えツバキ科樹木に関する。
【背景技術】
【０００２】
オオムギ、ムギ、イネ、タバコなどの草本植物に遺伝子組換え的手法により新しい形質を供与した遺伝子組換え植物の作製は一般に行われており、また、ポプラのような樹木においても同様な方法で遺伝子組換え樹木の作製が報告されている。しかしながら、経済植物として有用でありながらチャ樹においての遺伝子組換え植物の作製はこれまで２００１年にインドのＭｏｎｄａｌ等のグループが子葉を用い、アグロバクテリア法を用い遺伝子導入を行い、ＧＵＳ（β－グルクロニダーゼ）の系で形質転換植物の選択を行なった報告（非特許文献１）のみである。チャ樹における形質転換が少ないのは、効率的な遺伝子組換え植物の作製に必要な遺伝子導入に適し、分化誘導能を備えた植物培養細胞やその後の効率的な形質転換植物の選択方法が不十分なためと考えられる。Ｍｏｎｄａｌ等のグループは、子葉を用いて遺伝子導入している。しかし、チャ樹おける子葉は１つの種子より２

個しか得ることが出来ず、決して効率的な遺伝子組換え体作製方法とは言い難い。
【０００３】
１９９６年に加藤は、従来の組織片ではなく芽より誘導した胚カルスで発芽を誘導できたこと報告（非特許文献２）しているが、これまでこの胚カルスを用いた遺伝子組換えの報告はない。さらに、効率的に遺伝子組換え体を得るには、形質転換体の選択方法が簡便であり、選択後にそのまま分化誘導できることが望ましい。Ｍｏｎｄａｌ等のグループの組換え体の作製は、ＧＵＳ（β－グルクロニダーゼ）レポーターシステムを形質転換体の選択方法としているが、これは細胞の固定化を必要とするためその後の発芽への誘導には使用できず効率的な遺伝子組換え体の取得方法とは言い難い。一般に、簡便で細胞非破壊的な形質転換体の選択方法としてオワンクラゲ由来の緑色蛍光たんぱく質ＧＦＰを蛍光マーカーとして使用する形質転換体の選択方法が良く知られている（非特許文献３）。しかし、チャ樹等のツバキ科樹木にはＧＦＰの蛍光波長と重なる自家蛍光があり、一般的に使用されている方法ではＧＦＰをマーカーとして使用できないことが明らかとなった（図２）。
【非特許文献１】T. K. Mondal, A. Bhattacharya, P. S. Ahuja and P.K. Chand, (2001) Transgenic tea [Camellia sinensis (L.) O. Kuntze cv. Kangra Jat] plants obtained by Agrobacterium-mediated transformation of somatic embryos. Plant Cell Rep 20: 712-720.
【非特許文献２】M. Kato, (1996) Somatic embryogenesis from immature leaves of in vitro grown tea shoots. Plant Cell Rep 15: 920-923.
【非特許文献３】M.-J.Cho, H.W.Choi, D.Okamoto, S.Zhang and P.G.Lemaux, (2003) Expression of green fluorescent protein and its inheritance in transgenic oat plants generated from shoot meristematic cultures. Plant cell Rep 21:467－474.
【非特許文献４】Niwa Y, Hirano T, Yoshimoto K, Shimizu M, Kobayashi H. (1999) Non-invasive quantitative detection and applications of non-toxic, S65T-type green fluorescent protein in living plants. Plant J. 18:455 -463.
【発明の開示】
【発明が解決しようとする課題】
【０００４】
本発明は、遺伝子組換えが困難であった従来技術の上記問題点を解決し、ツバキ科樹木、特にチャ樹における遺伝子組換え樹木の効率的な作製方法及び遺伝子組換えツバキ科樹木を提供するものである。また、蛍光たんぱく質をマーカーとして用いる遺伝子組換えツバキ科樹木の選択が行えなかった従来技術の問題を解決し、効率的な選択方法を提供するものである。
【課題を解決するための手段】
【０００５】
本発明は、ツバキ科樹木の胚カルスに遺伝子導入することを特徴とする遺伝子組換えツバキ科樹木の作製方法に関する。
【０００６】
本発明は、ツバキ科樹木が、チャ樹である遺伝子組換えツバキ科樹木の作製方法に関する。
【０００７】
本発明は、胚カルスが、芽の培養にて生じる葉の先端及び中助の部分より発生する胚カルスである遺伝子組換えツバキ科樹木の作製方法に関する。
【０００８】
本発明は、遺伝子が蛍光たんぱく質をコードする遺伝子を含む遺伝子組換えツバキ科樹木の作製方法に関する。
【０００９】
本発明は、蛍光たんぱく質がオワンクラゲ由来の緑色蛍光たんぱく質ＧＦＰ又はその変異体ｓＧＦＰ（Ｓ６５Ｔ）である遺伝子組換えツバキ科樹木の作製方法に関する。

【００１０】
本発明は、蛍光たんぱく質をツバキ科樹木の細胞小器官に局在化させる遺伝子組換えツバキ科樹木の作製方法に関する。
【００１１】
本発明は、細胞小器官がミトコンドリア及び色素体である遺伝子組換えツバキ科樹木の作製方法に関する。
【発明の効果】
【００１２】
本発明は、従来の技術では困難であったツバキ科樹木、特にチャ樹における効率的な遺伝子組換えツバキ科樹木の作製を可能とする。また、本発明では、従来の技術では困難である遺伝子組換えツバキ科樹木の効率的な選択を可能とする。
【発明を実施するための最良の形態】
【００１３】
本発明におけるツバキ科樹木は、ツバキ、サザンカ、チャなどが挙げられるが、特にチャ樹が好ましい。
【００１４】
本発明における胚カルスは、根、茎、葉、花等の成体組織片より生じるカルスとは異なり、芽の培養にて生じる葉の先端及び中助の部分より作製できる。ツバキ科樹木の胚カルスは、一般に自家蛍光を伴う。
【００１５】
本発明において胚カルスの導入に使用する遺伝子は、例えば、プラスミド、バイナリーベクター、薬剤耐性遺伝子、遺伝子の発現制御に関わる遺伝子、選択マーカーに関わる遺伝子などの一般の遺伝子組換え手法において使用される遺伝子、及びその他に耐寒性、抗菌性、耐病性、カテキン含量などに関わる遺伝子などが挙げられるが、プラスミド、バイナリーベクター、抗生物質耐性遺伝子、プロモーター遺伝子、ポリアデニン付加シグナル配列遺伝子、細胞小器官標的化シグナル配列、蛍光たんぱく質マーカー遺伝子等の有用遺伝子が好ましい。
【００１６】
本発明において薬剤耐性遺伝子には、アンピシリン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子などがあるが、カナマイシン耐性遺伝子、カルベニシリン耐性遺伝子及びハイグロマイシン耐性遺伝子が好ましい。
【００１７】
本発明において遺伝子の発現制御に関わるプロモーターには、カリフラワーモザイクウイルス３５Ｓプロモーター、ノパリン合成酵素遺伝子のプロモーター、イネのアクチンプロモーター、シロイヌナズナＣＡＢ２、シロイヌナズナＲＤ２９Ａプロモーター、タバコＥＦ１αプロモーターなどがあり、またポリアデニン付加シグナル配列には、ノパリン合成酵素遺伝子のポリアデニン付加シグナル配列、カリフラワーモザイクウイルスのポリアデニン付加シグナル配列などがあるが、カリフラワーモザイクウイルス３５Ｓプロモーターおよびノパリン合成酵素遺伝子のポリアデニン付加シグナル配列が好ましい。
【００１８】
本発明において蛍光たんぱく質マーカー遺伝子は、ＧＦＰ，ＣＦＰ，ＹＦＰ，ＲＦＰなどがあるが、ｓＧＦＰ（Ｓ６５Ｔ）が好ましい。
【００１９】
本発明において細胞内で蛍光たんぱく質が局在化する細胞小器官は、細胞膜、細胞壁、核小体、滑面小胞体、粗面小胞体、液胞、ペルオキシソーム、リボソーム、核、ゴルジ小胞、リソソーム、ゴルジ、タンパク質顆粒、小胞体、ミトコンドリア又は色素体などが挙げられるが、ミトコンドリア又は色素体であることが好ましい。蛍光たんぱく質を細胞小器官に局在化させるには、例えば、蛍光たんぱく質に細胞小器官標的化シグナル配列を周知の遺伝子組換え手法で付加させる方法がある。
【００２０】

本発明において蛍光タンパク質マーカーがミトコンドリア又は色素体で局在化するために使用する細胞小器官標的化シグナル配列は、これには限定されないが、ミトコンドリア標的化にはシロイヌナズナのＦ１ＡＴＰａｓｅガンマーサブユニットのＮ末端７８アミノ酸残基、色素体標的化にはリブロース１，５二リン酸カルボキシラーゼ／オキシゲナーゼ小－サブユニットのトランジットペプチドが好ましい。

【００２１】

本発明における蛍光たんぱく質マーカー発現のためのプロモーター遺伝子、ポリアデニン付加シグナル配列遺伝子、細胞小器官標的化シグナル配列、蛍光たんぱく質マーカー遺伝子等の有用遺伝子の再構成は、実施例に記載の３５Ω－ｓＧＦＰ（Ｓ６５Ｔ）プラスミドにおいて実施するのが好ましいが、市販の適当なプラスミドｐＢＲ３２２、ｐＵＣ、ｐＢｌｕｅｓｃｉｐｔなどで実施してもよい。

【００２２】

本発明におけるプロモーター遺伝子、ポリアデニン付加シグナル配列遺伝子、蛍光たんぱく質マーカー遺伝子等の有用遺伝子は、市販のＥＧＦＰ（クロンテック）、カリフラワーモザイクウイルス３５Ｓプロモーター（クロンテック）、ノパリン合成酵素遺伝子のポリアデニン付加シグナル配列（クロンテック）をＰＣＲなどにより改変して使用してもよい。

【００２３】

本発明において再構成した有用遺伝子を胚カルスへ導入するのに使用するバイナリーベクターは、植物細胞への感染力を有する遺伝子（Ｔ－ＤＮＡ）を有し、適切な制限酵素部位及び薬剤耐性遺伝子を有したバイナリーベクターであればよく、ｐＧＡバイナリーベクター、ｐＢＩ１２１バイナリーベクターなどがあるが、ｐＩＧ１２１ＨＭバイナリーベクター、ｐＢＣＨ１バイナリーベクターが好ましい。

【００２４】

本発明においてバイナリーベクターの胚カルス細胞への遺伝子導入法は、これに限定されないが、アグロバクテリア法又はパーティクルガン法によることが好ましく、アグロバクテリア法は、例えば、アグロバクテリアＥＨＡ１０５株と胚カルスを共培養することで、パーティクルガン法は、例えばＢＩＯ－ＲＡＤ社のパーティクルガン（ＰＤＳ－１０００／Ｈｅ）を使用することで実施できる。

【００２５】

本発明の遺伝子組換えツバキ科樹木の作製方法において、一般的な遺伝子組換え手法で使用される導入した抗生物質耐性遺伝子に基づく抗生物質による選択を行うことが好ましく、抗生物質としては、これに限定されないが、カナマイシン、カルベニシリン及びハイグロマイシンが好ましく、抗生物質耐遺伝子導入細胞をカナマイシン、カルベニシリン及びハイグロマイシンを含有した培地で培養することで実施できる。

【００２６】

本発明における、遺伝子組換え樹木の選択は、生きたままの細胞中の蛍光たんぱく質マーカーの存在を確認することができ、蛍光スペクトル分解可能なスペクトラルイメージングシステム、例えばApplied Spectral Imaging 社のSpectral Unmixing を備えたSpectral Imaging Inc.社のＳＰＥＣＴＲＡＶＩＥＷ等を使用することによりツバキ科チャ樹胚カルスの自家蛍光と区別して確認できる。また、細胞小器官に蛍光たんぱく質を局在化する態様の本発明の組換えツバキ科樹木の作製方法においては、細胞小器官への蛍光たんぱく質の局在化による蛍光の増強を共焦点レーザー顕微鏡（例えば、バイオラッド社のＭＲＣ１０２４）を使用して測定することによりツバキ科チャ樹胚カルスの自家蛍光と区別して組換えツバキ科樹木の選択を行うことも出来る。

【００２７】

本発明の遺伝子組換えツバキ科樹木の作製方法において、植物ホルモンによる分化誘導を行うことが好ましく、植物ホルモンとしてＩＢＡ（インドール－３－ブチル酸）ＢＡ（Ｎ６－ベンジルアデニン）及びＧＡ（ジベレリン）が好ましく、後述の実施例に記載のようにＩＢＡ、ＢＡ、及びＧＡを含有した培地で遺伝子導入細胞を培養することで実施でき

る。
【実施例１】
【００２８】
ミトコンドリア、色素体局在化用ｓＧＦＰ（Ｓ６５Ｔ）バイナリーベクターの構築
ＤＮＡ断片の加工やＤＮＡ断片相互の結合、ＤＮＡ断片のクローニング、ＤＮＡ配列の確認、大腸菌等の処理（形質転換、培養、プラスミドの抽出等）などの一般的操作の手順は、特に記載のない限り、Molecular Cloning 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press等に記載されている方法に従って行った。
【００２９】
ミトコンドリア用ｓＧＦＰ（Ｓ６５Ｔ）は、シロイヌナズナのＦ１ＡＴＰａｓｅガンマーサブユニットｃＤＮＡを、制限酵素ＨａｅＩＩＩで消化後、Ｎ末端７８アミノ酸残基を含むＤＮＡ断片（ＭＡＭＡＶＦＲＲＥＧ　ＲＲＬＬＰＳＩＡＡＲ　ＰＩＡＡＩＲＳＰＬＳ　ＳＤＱＥＥＧＬＬＧＶ　ＲＳＩＳＴＱＶＶＲＮ　ＲＭＫＳＶＫＮＩＱＫ　ＩＴＫＡＭＫ　ＭＶＡＡ　ＳＫＬＲＡＶＱＧ；配列番号４）を、ＳａｌＩ，ＮｃｏＩ消化後、平滑末端化処理をしたカリフラワーモザイクウイルス３５Ｓプロモーター、ｓＧＦＰ（Ｓ６５Ｔ）遺伝子およびノパリン合成酵素遺伝子のポリアデニン付加シグナル配列を含有した３５Ω－ｓＧＦＰ（Ｓ６５Ｔ）プラスミド（Chui et al.）に導入した（Niwa et al.）。
【００３０】
得られたプラスミドから、シロイヌナズナのＦ１ＡＴＰａｓｅガンマーサブユニットのＮ末端７８アミノ酸残基とｓＧＦＰ（Ｓ６５Ｔ）の融合遺伝子そしてノパリン合成酵素遺伝子のポリアデニン付加シグナル配列からなるキメラ遺伝子をＥｃｏＲＩ消化後、平滑末端化、さらにＸｂａＩ消化して５０ｎｇのＤＮＡ断片として得た。これと制限酵素ＸｂａＩおよびＳｍａＩで消化した１００ｎｇのバイナリーベクターｐＢＣＨ１（Ito et al. これはｐＩＧ１２１ＨＭ（Ohta et al.,）のＧＵＳ遺伝子をＸｂａＩ，ＳａｃＩで切り出した後、ＳａｃＩ，ＸｂａＩ，ＳｐｅＩ，ＳｍａＩ，ＸｈｏＩ，ＫｐｎＩ認識配列を含むリンカーＤＮＡを挿入することにより構築されたバイナリーベクター）とをライゲーション反応にて結合させた後、大腸菌に形質転換し目的のミトコンドリア用ｓＧＦＰ（Ｓ６５Ｔ）バイナリーベクターを作成した。
【００３１】
色素体用ｓＧＦＰ（Ｓ６５Ｔ）は、シロイヌナズナのリブロース１，５二リン酸カボキシラーゼ／オキシゲナーゼ小－サブユニット１Ａ遺伝子を含むプラスミドから、トランジットペプチド領域（ＭＡＳＳＭＬＳＳＡＴ　ＭＶＡＳＰＡＱＡＴＭ　ＶＡＰＦＮＧＬＫＳＳ　ＡＡＦＰＡＴＲＫＡＮ　ＮＤＩＴＳＩＴＳＮＧ　ＧＲＶＮＣ；配列番号５）を含むＤＮＡ断片をＢｆａＩ，　ＳｐｈＩで切り出し、平滑末端化処理をへて、ＳａｌＩ，ＮｃｏＩ消化後、平滑末端化処理をした３５Ω－ｓＧＦＰ（Ｓ６５Ｔ）プラスミドに導入した（Chui et al.）。
【００３２】
得られたプラスミドから、カリフラワーモザイクウイルス３５Ｓプロモーター、シロイヌナズナのリブロース１，５二リン酸カルボキシラーゼ／オキシゲナーゼ小－サブユニット１ＡのトランジットペプチドとｓＧＦＰ（Ｓ６５Ｔ）の融合遺伝子そしてノパリン合成酵素遺伝子のポリアデニン付加シグナル配列からなるキメラ遺伝子を、ＥｃｏＲＩ消化後平滑末端化さらにＸｂａＩ消化して５０ｎｇのＤＮＡ断片として得た。これと、制限酵素ＸｂａＩおよびＳｍａＩで消化した１００ｎｇのバイナリーベクターｐＢＣＨ１（Ito et al.）とをライゲーション反応にて結合させた後、大腸菌に形質転換し目的の色素体用ｓＧＦＰ（Ｓ６５Ｔ）バイナリーベクターを作成した（図１）。
【００３３】
大腸菌からのミトコンドリア及び色素体用ｓＧＦＰ（Ｓ６５Ｔ）バイナリーベクターの精製は、QIAfilter Plasmid Midi Kit（Ｑｉａｇｅｎ）により実施した。
【００３４】
バイナリーベクターｐＢＣＨ１は譲渡を受けたものである。

【実施例２】
【００３５】
アグロバクテリアへのバイナリーベクターの導入
ミトコンドリア及び色素体用ｓＧＦＰ（Ｓ６５Ｔ）バイナリーベクターはアグロバクテリアＥＨＡ１０５株へエレクトロポレーション法により導入した。エレクトロポレーション用に調製されたアグロバクテリア懸濁液（アグロバクテリアＥＨＡ１０５株は、ＬＢ液体培地１００mL中でＯＤ６００が０．７になるまで３０℃で培養後、氷上で冷却。遠心にて集菌後、滅菌水で１回、１０％グリセリン液で２回洗浄。最後に０．５mLの１０％グリセリン液に懸濁して調整）４０μLと上記のように構築調製されたミトコンドリア及び色素体用ｓＧＦＰ（Ｓ６５Ｔ）バイナリーベクターＤＮＡ；１０ngとをエレクトロポレーション用セルに入れた後、氷冷下で電圧；１．８kV，コンデンサー；２５μF、抵抗；２００Ωの条件で成された。エレクトロポレーション後、アグロバクテリアＥＨＡ１０５株は、ハイグロマイシン５０mg／Ｌを含むＬＢ培地上でのハイグロマイシン耐性により選択された。ハイグロマイシン耐性アグロバクテリアＥＨＡ１０５株は、その後のチャ樹カルスとの共培養のためにハイグロマイシン５０mg／Ｌを含むＬＢ培地で培養された。
【実施例３】
【００３６】
チャ樹カルスの形質転換
インドの紅茶種の実生より芽約０．０２ｇを取り、ＢＡ４mg／ｌ，ＩＢＡ２mg／ｌ添加のＭＳ培地３０mlで培養すると、芽は増殖するとともに、葉の先端や中助の部分より不定胚が分化する。これらの不定胚０．００１ｇを同じ培地にて培養し、胚カルスにする。これを材料とした（Kato，1996）。
【００３７】
この胚カルス０．１ｇを５－１０分間、ハイグロマイシン耐性アグロバクテリウム菌０．００１ｇを含むＭＳ液体培地３０mlに浸漬した。その後ＢＡ４mg／ｌ，ＩＢＡ２mg／ｌを添加したＭＳ培地の入った９cmのシャーレに移し、３日間共存培養のため、２５℃で暗黒条件においた。
【００３８】
パーティクルガンによる遺伝子導入には、ＢＡ４mg／ｌ，ＩＢＡ２mg／ｌ添加のＭＳ培地上に胚カルス０．００５ｇを直径約２cmに一様に広げ、０．５μgのミトコンドリア及び色素体用ｓＧＦＰ（Ｓ６５Ｔ）バイナリーベクターＤＮＡをＰＤＳ－１０００／Ｈｅ，ＢＩＯ－ＲＡＤ（金粒子：１マイクロm、ラプチャーディスク：１１００ｐｓｉ、真空度：２８インチＨｇ、胚カルスまでの距離：６cm）で導入した。
【実施例４】
【００３９】
形質転換チャ樹カルスの選択プロトコール
アグロバクテリウム法では、共存培養後、ＢＡ４mg／ｌ，ＩＢＡ２mg／ｌ，カナマイシン２５μg／ml，カルベニシリン３００μg／ml添加のＭＳ培地３０mlで８週間培養し、ＢＡ０．４mg／ｌ，ＩＢＡ２mg／ｌ，カナマイシン２５μg／ml，カルベニシリン３００μg／ml添加のＭＳ培地３０mlにて胚を育て、芽を得た。又は５mg／ｌ　ＧＡ３、３mg／ｌ　ＢＡ、０．５mg／ｌ　ＩＢＡ、カナマイシン２５μg／ml，カルベニシリン３００μg／ml添加した培地においても培養を行った。
【００４０】
パーティクルガン法では、遺伝子導入後の胚カルス０．００５ｇは、２週間、光条件、２５℃で培養した後、ＢＡ４mg／ｌ，ＩＢＡ２mg／ｌ，カナマイシン２５μg／ml，カルベニシリン３００μg／ml添加のＭＳ培地３０mlに移した。その後の経過は、アグロバクテリウムと同様である。
【実施例５】
【００４１】
ＧＦＰモニターリング

ＧＦＰ蛍光の測定は、遺伝子導入した胚カルス細胞０．０５ｇ及び葉０．００５ｇ、対照として遺伝子導入していない胚カルス細胞０．０５ｇ及び葉０．００５ｇをスペクトルイメージングシステム　ＳＰＥＣＴＲＡＶＩＥＷ（Spectral Imaging Inc.）上に乗せ、Spectral Unmixing（Applied Spectral Imaging）により個々の蛍光をスペクトル分解することでチャ樹の自家蛍光を消去した遺伝子導入した発現ＧＦＰの蛍光だけが測定された。また、ミトコンドリア、色素体でのＧＦＰ蛍光の観察は、同様に遺伝子導入した胚カルス細胞０．０５ｇ及び葉０．００５ｇと対照として遺伝子導入していない胚カルス細胞０．０５ｇ及び葉０．００５ｇを共焦点レーザー顕微鏡（励起光：４８８nmのＫｒ／Ａｒレーザー光、蛍光：５０６－５３８nmのバンドパスフィルター、バイオラッドＭＲＣ１０２４）に乗せ、観察した。

【実施例６】

【００４２】

ＰＣＲ及びＲＴ－ＰＣＲ

ゲノムＤＮＡ及び全ＲＮＡは形質転換胚カルスの細胞及び葉より抽出した。ｍＲＮＡは、OligotexTM-dT30Super mRNA Purification Kit（タカラ、日本）を使用して得られた。ゲノムへのｓＧＦＰ（Ｓ６５Ｔ）ｃＤＮＡの挿入及び発現は、ＰＣＲ及びＲＴ－ＰＣＲにより確認した。ｓＧＦＰ（Ｓ６５Ｔ）（配列番号１）の配列より化学的に合成したオリゴヌクレオチドプライマーＧＦＰ１；５’ＡＡＧＣＴＧＡＣＣＣＴＧＡＡＧＴＴＣＡＴＣ３’（配列番号１の配列の第１３０番目～１５０番目、配列番号２）及びＧＦＰ２；５’ＴＴＡＣＴＴＧＴＡＣＡＧＣＴＣＧＴＣＣＡ３’（配列番号１の配列の第７０７番目～７２７番目の相補鎖、配列番号３）をＰＣＲ及びＲＴ－ＰＣＲのために使用した。ＰＣＲは、１μgのゲノムＤＮＡ及び５．０μＭプライマー、１サイクルが９４℃、３０秒の変性、６０℃、１分のアニーリング、７０℃、１分の伸長反応の３５サイクル反応で行った。ｓＧＦＰ（Ｓ６５Ｔ）ｃＤＮＡのｍＲＮＡは、２μgのｍＲＮＡ、５．０μＭプライマー、mix reaction Qiagen onestep RT-PCR（Ｑｉａｇｅｎ）を使用し、逆転写反応（５０℃、３０分間）、最初のＰＣＲ活性化ステップ（９５℃、１５分）と、９４℃、１分の変性、５０℃、１分のアニーリング、７０℃、１分の伸長反応の３０サイクル反応で行った。増幅ＤＮＡの確認はアガロース電気泳動で分離し、エチジュウムブロマイド染色で行った。

【００４３】

結果

図２は非組換えおよびミトコンドリア局在型ＧＦＰ組み換え茶葉の蛍光画像を示す。葉の中心部分（葉脈）で強い蛍光シグナル（黒く表示）が見られ、この蛍光シグナルは一見組み換え茶葉の方が強く見えるが、単に葉脈の太さの違いに起因するものであり、両者で顕著な違いはみられない。

【００４４】

表１は、アグロバクテリウム法（Ａ）、はパーティクルガン法（Ｂ）で行ったチャ樹の胚の組換え結果を示す。アグロバクテリウム法及びパーティクルガン法供にミトコンドリア局在化用ＧＦＰで形質転換された胚は、効率的に２次胚形成が見られ、ｓＧＦＰ（Ｓ６５Ｔ）のミトコンドリアへの局在化が２次胚形成に影響のないことが示された。また、色素体への局在化ｓＧＦＰ（Ｓ６５Ｔ）はパーティクルガン法において影響のないことが示された。

【００４５】

【表１】

表１．茶樹の胚の組換え結果

| 染色体ＤＮＡ | 一次胚形成（個） | 二次胚形成（個） | 再生率（%） |
|---|---|---|---|
| A) ミトコンドリア | 66 | 53 | 80.3 |
| 色素体 | 22 | 1 | 5.0 |
| B) ミトコンドリア | 53 | 53 | 100 |
| 色素体 | 28 | 28 | 100 |

A) アグロバクテリウム法

B) パーティクルガン法

【００４６】

表２は、異なる培地上での胚の生長状況を示す。ＢＡ０．４mg／ｌ，ＩＢＡ２mg／ｌで培養したとき、少ないけれども発芽するものが認められた。そして、５mg／ｌ　ＧＡ３、３mg／ｌ　ＢＡ、０．５mg／ｌ　ＩＢＡで培養したとき、より多くで発芽が認められ、形質転換チャ樹胚カルスからの発芽への分化誘導が示された。

【００４７】

【表２】

表２．異なる培地上での胚の生長状況

| 胚の発育時期 | 4 mg/l BA+ 2 mg/l IBA | 0.4 mg/l BA+ 2 mg/l | 5mg/l GA3+ 3mg/l BA+ 0.5 IBA |
|---|---|---|---|
| 胚カルス | 増殖 | 胚形成 | 胚形成<br>褐色化あり |
| 小さい胚 | 二次胚形成による増殖 | 発根しないが胚生長 | 発根にともなう胚生長 |
| 大きい胚 | 二次胚形成による増殖 | 発芽にともなう胚生長 | 発芽し芽が伸長 |

【００４８】

図３は、スペクトルイメージングシステム（ＳＰＥＣＴＲＡＶＩＥＷ（Spectral Imaging Inc.）、Spectral Unmixing（Applied Spectral Imaging））を使用した、非形質転換チャ樹胚カルス（Ａ）、およびアグロバクテリウム法又はパーティクルガン法による形質転換チャ樹カルス（Ｂ）並びに形質転換チャ樹カルスからの発芽（Ｃ）の写真である。ｓＧＦＰ（Ｓ６５Ｔ）の緑色蛍光が自家蛍光に紛れることなく形質転換体でのみ観察される。さらに、共焦点レーザー顕微鏡によりミトコンドリアに局在化した蛍光が認められた。

【００４９】

また、チャ樹胚ゲノムへのｓＧＦＰ（Ｓ６５Ｔ）の組込み及び組換え茶葉での発現を確認（５９８ｂｐのサイズ断片）するためにＰＣＲ及びＲＴ－ＰＣＲを実施した。パーティクルガン法による組換えチャ樹胚での増幅は弱かった（図４、レーン３，４，５）が、アグロバクテリウム法よる組換えチャ樹胚での増幅は非常に強く、ゲノムへの組込みが確認された。さらに、組換え茶葉での発現がｒｔ－ＰＣＲ（図５、レーン３）により確認された。

【００５０】

図６は、本発明により作製された組換えチャ樹胚から再生された芽の写真である。

【産業上の利用可能性】

【００５１】

本発明によれば、遺伝子組換えツバキ科樹木を効率的に作製できる。また、本発明によれば、遺伝子組換えツバキ科樹木を効率的に選択できる。その結果、遺伝子組換え的にツバキ科樹木、好ましくはチャ樹へ耐寒性、抗菌性、耐病性、カテキン含量等の有用な特性の付与を目的とした品種改良を行う場合に、本発明を使用することにより効率的にツバキ科樹木の新品種の開発が可能となる。

【００５２】

参照文献

・Y. Niwa, T. Hirano, K. Yoshimoto, M. Shimizu, and H. Kobayashi : Non-invasive quantitative detection and applications of nontoxic-, S65T-type green fluorescent protein in living plants. Plant J. (1999) 18 : 455-463.
・Yukihiro Ito, Mitsugu Eiguchi, Nori Kurata. (2001) KNOX homeobox genes are sufficient in maintaining cultured cells in an undifferentiated state in rice. Genesis 30:231-238
・Ohta S, Mita S, Hattori T, Nakamura K. (1990) Construction and expression in tobacco of a β-glucuronidase (GUS) reporter gene containing an intron within the coding sequence. Plant Cell Physiol. 31:805-813.
・W-I. Chiu, Y. Niwa, W. Zeng, T. Hirano, H. Kobayashi, and J. Sheen : Engineered GFP as a vital reporter in plants. Current Biology (1996) 6, 325-330.
・M. Kato, (1996) Somatic embryogenesis from immature leaves of in vitro grown tea shoots. Plant Cell Rep 15: 920-923.

【図面の簡単な説明】

【００５３】

【図１】ミトコンドリア、色素体用ｓＧＦＰ（Ｓ６５Ｔ）発現ベクターのＴ－ＤＮＡ領域図。

【図２】非組み換えおよびミトコンドリア局在型ＧＦＰ組み換え茶葉の蛍光画像。左：非組み換え茶葉、右：ミトコンドリア局在型ＧＦＰ組み換え茶葉。蛍光画像の取り込みはＦｌｕｏｒＩｍａｇｅｒ（アマシャム　ファルマシア　バイオテック）による。取り込み条件は、励起光：４８８nm、検出条件：５３０　ＤＦ３０（５１５－５４５nm）フィルター使用、ピクセルサイズ；２００マイクロン、デジタル解像度；８ビット、検出感度：ノーマル、ＰＭＴ；８００Ｖ。

【図３】スペクトルイメージングシステム　ＳＰＥＣＴＲＡＶＩＥＷ（Spectral Imaging Inc.）による非形質転換チャ樹胚カルス（Ａ）及び形質転換チャ樹カルス（Ｂ）および形質転換チャ樹カルスからの発芽の写真。バーは、１０μmを示す。

【図４】パーティクルガンによる組換えチャ樹とアグロバクテリウム感染による組換えチャ樹の胚のゲノムのＰＣＲ。レーン１：分子量マーカー（ＴａＫａＲａ、λＨｉｎｄＩＩＩ）、レーン２：（プラスミド）、レーン３：（パーティクルガン組換え胚）、レーン４：（パーティクルガン組換え胚）、レーン５：（パーティクルガン組換え胚）、レーン６：（アグロバクテリウム組換え胚）、レーン７：（アグロバクテリウム組換え胚）、レーン８：（アグロバクテリウム組換え胚）。目的の５９８ｂｐのサイズのバンドを示す。

【図５】組換え茶葉のＲＴ－ＰＣＲ。レーン１：分子量マーカー（ＴａＫａＲａ、λＨｉｎｄＩＩＩ）、レーン２：ＧＦＰのプラスミド、レーン３：組換え茶葉抽出ＲＮＡをＲＴ－ＰＣＲ、レーン４：組換え茶葉抽出ＲＮＡをＰＣＲ。

【図６】組換えチャ樹胚から再生された芽の写真。

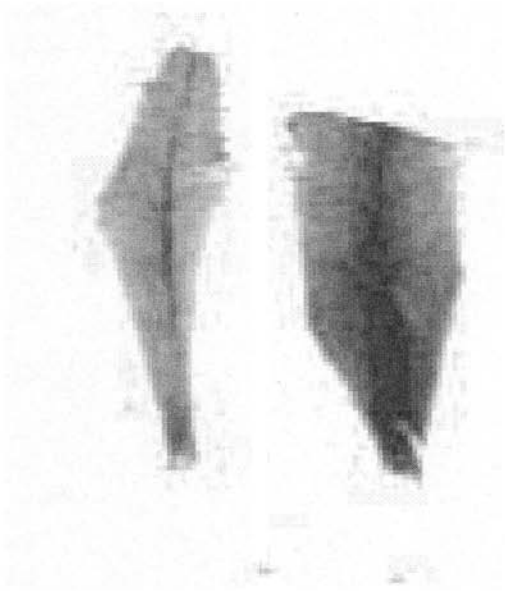
【図１】

ミトコンドリア及び色素体局在化用
ｓＧＦＰ（Ｓ６５Ｔ）発現ベクターのＴ－ＤＮＡ領域図



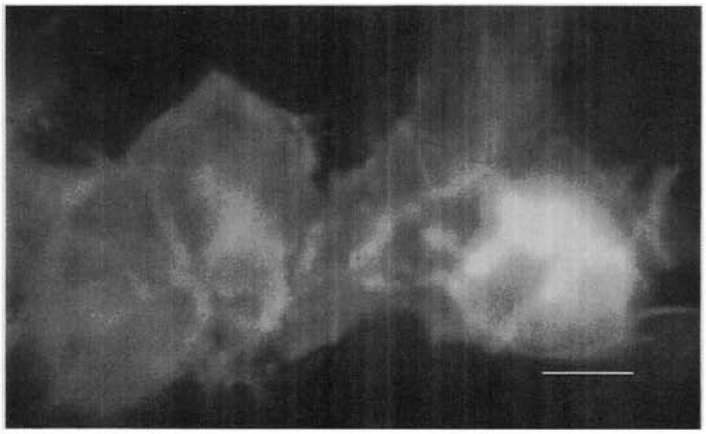

【図２】

非組み換えおよびミトコンドリア局在型ＧＦＰ組み換え茶葉の蛍光画像



左：非組み換え茶葉
右：ミトコンドリア局在型ＧＦＰ組み換え茶葉

【図３】



A)



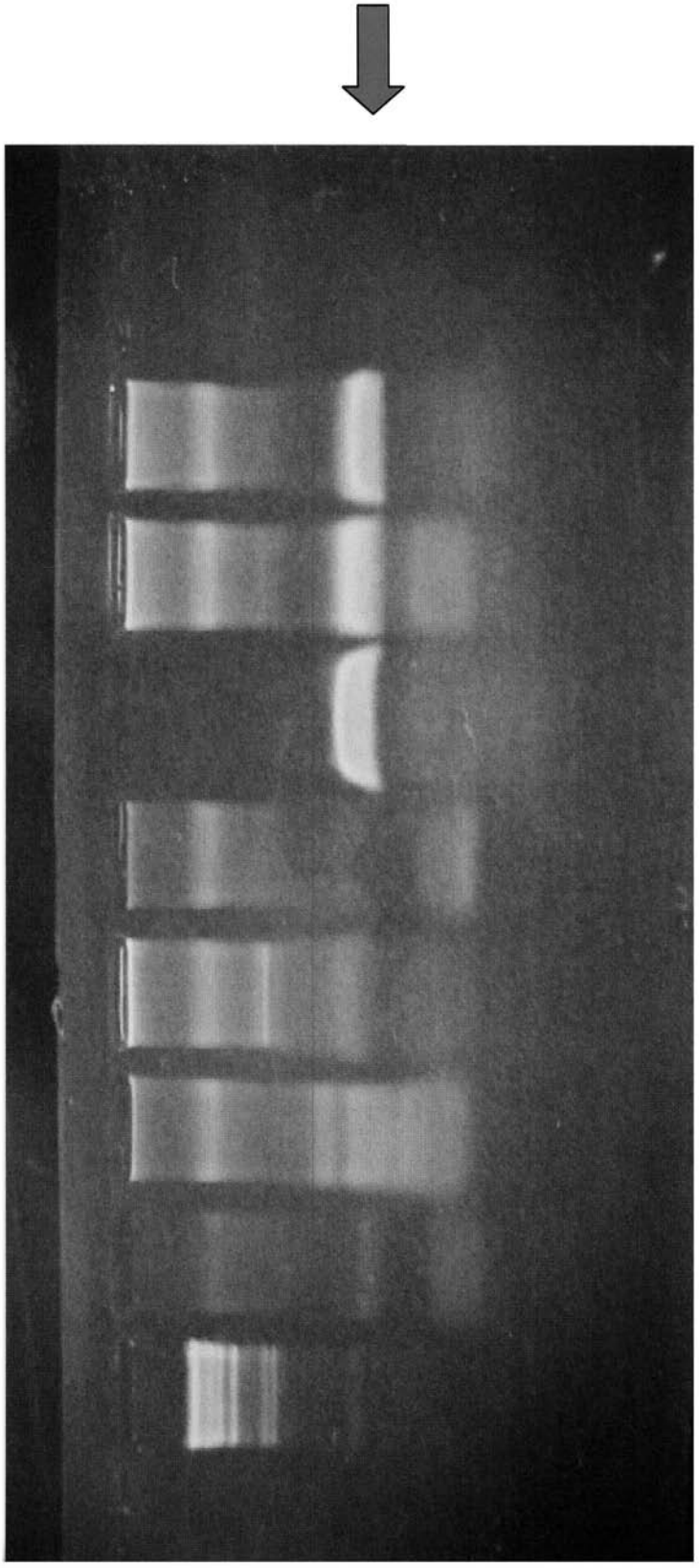
B)



C)

スペクトルイメージシステムによる非形質転換チャ樹胚カルス（Ａ）及び形質転換チャ樹カルス（Ｂ）及び形質転換チャ樹カルスからの発芽（Ｃ）の写真

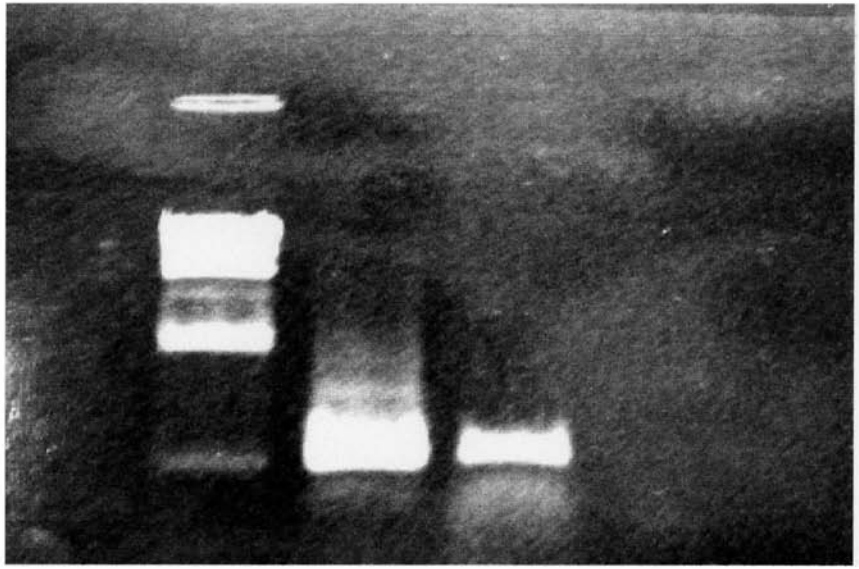
【図４】



１　２　３　４　５　６　７　８

パーティクルガンによる組換茶樹とアグロバクテリウム感染による組換え茶樹の胚のＰＣＲ

# 抽出RNAからRT-PCR




レーン１：分子量マーカー
レーン２：GFPのプラスミド
レーン３：組換え茶葉抽出RNAを
rt－PCR
レーン４：組換え茶葉抽出RNAを
PCR

【図６】

組換え茶樹胚から再生された芽



【配列表】
2005198600000001.app

フロントページの続き

Ｆターム(参考) 2B030 AA03 AB03 AD08 CA05 CA17 CA18 CB02 CD03 CD06 CD07
CD10 CD13 CD17
4B024 AA08 BA80 CA01 DA01 DA05 EA04 FA10 FA20 GA11 GA14
GA17 HA01