

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4987734号
(P4987734)

(45) 発行日 平成24年7月25日 (2012. 7. 25)

(24) 登録日 平成24年5月11日 (2012. 5. 11)

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

請求項の数 4 (全 17 頁)

(21) 出願番号	特願2007-555893 (P2007-555893)	(73) 特許権者	501167644
(86) (22) 出願日	平成19年1月16日 (2007. 1. 16)		独立行政法人農業生物資源研究所
(86) 国際出願番号	PCT/JP2007/050522		茨城県つくば市観音台2丁目1-2
(87) 国際公開番号	W02007/086282	(73) 特許権者	000242002
(87) 国際公開日	平成19年8月2日 (2007. 8. 2)		北興化学工業株式会社
審査請求日	平成21年7月30日 (2009. 7. 30)		東京都中央区日本橋本石町四丁目4番20号
(31) 優先権主張番号	特願2006-18661 (P2006-18661)	(73) 特許権者	305027401
(32) 優先日	平成18年1月27日 (2006. 1. 27)		公立大学法人首都大学東京
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		東京都新宿区西新宿二丁目8番1号
		(74) 代理人	100099623
			弁理士 奥山 尚一
		(74) 代理人	100096769
			弁理士 有原 幸一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ストレス応答性遺伝子が導入された形質転換植物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする DNA、

(b) 配列番号 1 に記載の塩基配列のコード領域を含む DNA、

(c) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び/又は付加したアミノ酸配列を有し、成長促成効果を有するタンパク質をコードする DNA、

(d) 配列番号 1 に記載の塩基配列からなる DNA にストリンジントな条件下でハイブリダイズし、成長促成効果を有するタンパク質をコードする DNA、及び

(e) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列と 90% 以上のアミノ酸配列の同一性を有し、成長促成効果を有するタンパク質をコードする DNA

からなる群から選択される DNA を植物細胞に導入して形質転換植物細胞を得るステップと、

前記形質転換植物細胞から形質転換植物体を再生させるステップとを含む、植物の成長を促進させる方法。

【請求項 2】

前記植物体から有性生殖又は無性生殖により子孫植物を得るステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記植物体が単子葉植物である請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記植物体が、イネ又はベントグラスである請求項 3 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、耐暑性が高められた又は成長が促進された植物体の製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

一般に自然界に存在する植物は、種々の環境ストレス、例えば乾燥ストレス、高温ストレス、低温ストレス、塩ストレスなどにさらされている。特に地球環境の変化は、二酸化炭素濃度の増加とそれとともに地球の温暖化、さらに作物などの耕作地の砂漠化などの要因となりつつある。そして、乾燥と高塩濃度化の環境ストレスが農作物の生産性を減少させる主要な環境要因となってきている。したがって、種々の環境ストレスに対する耐性を作物や園芸植物、緑化植物に付与することは、栽培の省力化、栽培可能な地域の拡大、砂漠の拡大防止や緑化にかかわる重要な課題と考えられる。

10

【0003】

近年、遺伝子工学的技術を用いて植物に環境ストレス遺伝子を導入することによって、塩や乾燥などに対するストレス耐性の向上を図ることができる可能性があり、このような技法によって耐乾燥性植物を作出する試みが進められている。

【0004】

20

例えば、コリンデヒドロゲナーゼ遺伝子及びベタインアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子の両者（特許文献 1）、DREB 遺伝子（特許文献 2 及び特許文献 3）、ベタイン合成酵素遺伝子（特許文献 4）、ポリアミン代謝関連酵素遺伝子（特許文献 5）、YK1 遺伝子（特許文献 6）、真核藻類由来のグルタチオンペルオキシダーゼ様タンパク質をコードする遺伝子（特許文献 7）、SRK2C 遺伝子（特許文献 8）、ポリアミン代謝関連遺伝子（特許文献 9）などを植物に導入することにより、耐塩性、耐乾燥性、低温ストレス耐性を高めた植物を得る方法が知られている。

【0005】

発明者らは、以前、塩及び乾燥処理により顕著にタンパク質量が増加するタンパク質として、RO-292 を同定している（特許文献 10）。このタンパク質をコードしていると考えられる RSI1 は、アブシシン酸に非依存的に乾燥ストレス及び塩ストレスに応答することが確かめられた。しかし、この RSI1 が耐暑性及び成長促進に関係していることは確認されていない。また、RSI1 を導入した形質転換植物に、耐乾燥性及び耐塩性が付与されることは確認されていない。

30

【特許文献 1】特開平 08 - 266179 号公報

【特許文献 2】特開 2000 - 116260 号公報

【特許文献 3】特開 2000 - 116259 号公報

【特許文献 4】特開 2003 - 143988 号公報

【特許文献 5】特開 2004 - 180588 号公報

【特許文献 6】特開 2004 - 261136 号公報

40

【特許文献 7】特開 2005 - 073505 号公報

【特許文献 8】特開 2005 - 253395 号公報

【特許文献 9】特開 2005 - 237387 号公報

【特許文献 10】特開 2003 - 334084 号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

上記耐塩性及び耐乾性のような環境ストレス以外にも、低緯度地域など高温及び強光下でも生育できる植物が求められている。高温及び強光下でも生育できる性質、すなわち耐暑性は、耐塩性及び耐乾燥性とは直接の関連性は見いだされていない。

50

【 0 0 0 7 】

近年では、特に農作物について、収量増加や生育時期の短縮を図り、食料生産の効率を上げる試みが行われている。さらに、生育時期の短縮は、園芸作物や芝生等にも求められる性質である。特に低緯度地域において、高温及び強光に耐性を持ちつつ、生育の早い植物を生成することは非常に意義がある。

【 0 0 0 8 】

したがって、本発明は、成長の促進された植物及び耐暑性が高められた植物を生成することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 9 】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討し、R S I 1（特許文献10参照）遺伝子を植物に導入することによって、成長が促進され及び/又は耐暑性が高められた形質転換植物を提供することに成功した。

【 0 0 1 0 】

すなわち、本発明は、（a）配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA、（b）配列番号1に記載の塩基配列のコード領域を含むDNA、（c）配列番号2に記載のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び/又は付加したアミノ酸配列を有し、成長促進効果を有するタンパク質をコードするDNA、（d）配列番号1に記載の塩基配列からなるDNAにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、成長促進効果を有するタンパク質をコードするDNA、及び（e）配列番号2に記載のアミノ酸配列と90%以上のアミノ酸配列の同一性を有し、成長促進効果を有するタンパク質をコードするDNAからなる群から選択されるDNAを、植物細胞に導入して形質転換植物細胞を得るステップと、前記形質転換植物細胞から形質転換植物体を再生させるステップとを含む、成長が促進された植物体を製造する方法を提供する。

【 0 0 1 1 】

さらに、本発明は、（a）配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA、（b）配列番号1に記載の塩基配列のコード領域を含むDNA、（c）配列番号2に記載のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び/又は付加したアミノ酸配列を有し、耐暑性に関するタンパク質をコードするDNA、（d）配列番号1に記載の塩基配列からなるDNAにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、耐暑性に関するタンパク質をコードするDNA、及び（e）配列番号2に記載のアミノ酸配列と90%以上のアミノ酸配列の同一性を有し、耐暑性に関するタンパク質をコードするDNAからなる群から選択されるDNAを、植物細胞に導入して形質転換植物細胞を得るステップと、前記形質転換植物細胞から形質転換植物体を再生させるステップとを含む、耐暑性が改良された植物体を製造する方法を提供する。

【 0 0 1 2 】

また、さらに、本発明は、（a）配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA、（b）配列番号1に記載の塩基配列のコード領域を含むDNA、（c）配列番号2に記載のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び/又は付加したアミノ酸配列を有し、成長促進効果及び耐暑性に関するタンパク質をコードするDNA、（d）配列番号1に記載の塩基配列からなるDNAにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、成長促進効果及び耐暑性に関するタンパク質をコードするDNA、及び（e）配列番号2に記載のアミノ酸配列と90%以上のアミノ酸配列の同一性を有し、成長促進効果及び耐暑性に関するタンパク質をコードするDNAからなる群から選択されるDNAを、植物細胞に導入して形質転換植物細胞を得るステップと、前記形質転換植物細胞から形質転換植物体を再生させるステップとを含む、耐暑性が改良され、かつ、成長が促進された植物体を製造する方法を提供する。

【 0 0 1 3 】

さらに、本発明は、（a）配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコー

10

20

30

40

50

ドするDNA、(b)配列番号1に記載の塩基配列のコード領域を含むDNA、(c)配列番号2に記載のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び/又は付加したアミノ酸配列を有し、耐乾燥性に関するタンパク質をコードするDNA、(d)配列番号1に記載の塩基配列からなるDNAにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、耐乾燥性に関するタンパク質をコードするDNA、及び(e)配列番号2に記載のアミノ酸配列と90%以上のアミノ酸配列の同一性を有し、耐乾燥性に関するタンパク質をコードするDNAからなる群から選択されるDNAを、植物細胞に導入して形質転換植物細胞を得るステップと、前記形質転換植物細胞から形質転換植物体を再生させるステップとを含む、耐乾燥性を有する植物体を製造する方法を提供する。

【0014】

10

さらに、本発明は、(a)配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA、(b)配列番号1に記載の塩基配列のコード領域を含むDNA、(c)配列番号2に記載のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び/又は付加したアミノ酸配列を有し、耐塩性に関するタンパク質をコードするDNA、(d)配列番号1に記載の塩基配列からなるDNAにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、耐塩性に関するタンパク質をコードするDNA、及び(e)配列番号2に記載のアミノ酸配列と90%以上のアミノ酸配列の同一性を有し、耐塩性に関するタンパク質をコードするDNAからなる群から選択されるDNAを、植物細胞に導入して形質転換植物細胞を得るステップと、前記形質転換植物細胞から形質転換植物体を再生させるステップとを含む、耐塩性を有する植物体を製造する方法を提供する。

20

【0015】

本発明の方法では、前記植物体から有性生殖又は無性生殖により子孫植物を得るステップをさらに含んでもよい。

【0016】

本発明の方法において、植物体は、単子葉植物、特にイネ科植物を用いることができる。また、本発明は、上記の方法により得られた植物体にも関する。

【発明の効果】

【0017】

本発明において、RSI1遺伝子を植物に導入して、形質転換植物を得ることによって、耐暑性を示し、さらに成長が促進された植物を提供することができる。得られた植物は、遺伝子を導入していない植物と比べて、高温下や強光条件下でも生育可能であり、また、遺伝子を導入していない植物と比べて、草丈及び葉が大きくなり成長が促進される。この植物は、例えば、低緯度地域や、強光下における作物の栽培や、園芸植物の改良、農作物の品種改良などに応用できる。

30

【発明を実施するための最良の形態】

【0018】

以下に、本発明を詳細に説明する。本発明のストレス応答性を有する遺伝子が導入されたイネ科の形質転換体は以下の方法により作出することができる。

ストレス応答性遺伝子を包含する組換えDNAの構築

本発明では、RSI1タンパク質をコードするDNAを植物細胞に導入し、植物細胞を植物体に再生させることによって、成長が促進された及び/又は耐暑性が改良された植物体を得ることができる。

40

【0019】

RSI1タンパク質をコードするDNA(以下、RSI1遺伝子ともいう)は、具体的には、イネ由来のストレスに応答する根特異的遺伝子RSOsPR10 [Plant Cell Physiology 45巻、5号、第550頁-559頁、2004;特開2003-334084号]に記載されたDNAが挙げられる。

【0020】

本発明で用いられるRSI1遺伝子は、植物の根において塩化ナトリウム又は乾燥による処理によりその産生が誘導されるが、アブシジン酸によっては誘導されないタンパク質

50

をコードする遺伝子として、本発明者により同定された。すなわち、RSI1遺伝子は、植物体に対し、塩、乾燥などのストレス処理を行い、その処理によって特異的に発現するタンパク質を処理した葉もしくは根から単離し、遺伝子配列を解析することによって得られた遺伝子である。本発明は、RSI1遺伝子が、さらに、耐暑性及び成長促進作用を付与する遺伝子であることが明らかにされたことにより完成されたものである。一般にこのような種々の環境変化（ストレス）に応答して発現するタンパク質は、PR（Pathogenesis-related）タンパク質が挙げられ、環境ストレスに対する植物の生体防御タンパク質のひとつと考えられている。

【0021】

RSI1タンパク質は、いわゆる「天然型」のタンパク質をコードするDNA（配列番号1）のみならず、RSI1タンパク質のアミノ酸配列（配列番号2）において1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び/又は付加したアミノ酸配列を有し、植物体に耐暑性及び/又は成長促進効果を付与する機能を有する変異タンパク質を含んでもよい。また、配列番号2に記載のアミノ酸配列と90%以上のアミノ酸配列の同一性を有し、植物体に耐暑性及び/又は成長促進効果を付与する機能を有する変異タンパク質を含んでもよい。

【0022】

RSI1タンパク質は、本発明者により配列決定されたタンパク質であり、配列番号2により表される。RSI1タンパク質をコードする、イネ由来のDNAは、配列番号1により表される。

【0023】

RSI1タンパク質をコードするDNAとして、(a)配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA、(b)配列番号1に記載の塩基配列のコード領域を含むDNA、(c)配列番号2に記載のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び/又は付加したアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNA、(d)配列番号1に記載の塩基配列からなるDNAにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA、及び(e)配列番号2に記載のアミノ酸配列と90%以上のアミノ酸配列の同一性を有するDNAからなる群から選択されるDNAを用いることができる。上記(a)～(e)のDNAは、成長促進効果、耐暑性、耐乾乾性及び/又は耐塩性に関するタンパク質をコードするDNAである。

【0024】

本発明のRSI1タンパク質をコードするDNAには、ゲノムDNA、cDNA、および化学合成DNAが含まれる。ゲノムDNAおよびcDNAの調製は、当業者にとって常套手段を利用して行うことが可能である。ゲノムDNAは、例えば、RSI1遺伝子を有するイネ品種からゲノムDNAを抽出し、ゲノミックライブラリー（ベクターとしては、プラスミド、ファージ、コスミド、BAC、PACなどが利用できる）を作製し、これを展開して、本発明タンパク質をコードするDNA（例えば、配列番号1）を基に調製したプローブを用いてコロニーハイブリダイゼーションあるいはブランクハイブリダイゼーションを行うことにより調製することが可能である。また、本発明タンパク質をコードするDNA（例えば、配列番号1）に特異的なプライマーを作製し、これを利用したPCRを行うことによって調製することも可能である。また、cDNAは、例えば、RSI1遺伝子を有するイネ品種から抽出したmRNAを基にcDNAを合成し、これをλZAP等のベクターに挿入してcDNAライブラリーを作製し、これを展開して、上記と同様にコロニーハイブリダイゼーションあるいはブランクハイブリダイゼーションを行うことにより、また、PCRを行うことにより調製することが可能である。

【0025】

配列番号2に記載のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び/又は付加したアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする変異体、誘導体、アシル、ホモログ又はオルソログを用いることができる。変異は人為的に導入することもできる。塩基配列の変異によりコードするタンパク質のアミノ酸配列が変異することは、

10

20

30

40

50

自然界において生じ得る。アミノ酸配列が改変されたタンパク質をコードするDNAを調製するための当業者によく知られた方法としては、例えば、site-directed mutagenesis法 (Kramer, W.&Fritz, H.-J. (1987) Oligonucleotide-directed construction of mutagenesis via gapped duplex DNA. *Methods in Enzymology*, 154: 350-367) が挙げられる。このように天然型のRSI1タンパク質をコードするアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失もしくは付加したアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNAであっても、天然型のRSI1タンパク質 (配列番号2) と同等の機能を有するタンパク質をコードする限り、本発明のDNAに含まれる。また、たとえ、塩基配列が変異した場合でも、それがタンパク質中のアミノ酸の変異を伴わない場合 (縮重変異) もあり、このような縮重変異体も本発明のDNAに含まれる。

10

【0026】

配列番号2に記載のRSI1タンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードするDNAを調製するために、当業者によく知られた他の方法としては、ハイブリダイゼーション技術 (Southern, E.M. (1975) *Journal of Molecular Biology*, 98, 503) やポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 技術 (Saiki, R. K. et al. (1985) *Science*, 230, 1350-1354, Saiki, R. K. et al. (1988) *Science*, 239, 487-491) を利用する方法が挙げられる。即ち、当業者にとっては、RSI1遺伝子の塩基配列 (配列番号1) もしくはその一部をプローブとして、またRSI1遺伝子に特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドをプライマーとして、イネや他の植物からRSI1遺伝子と高い相同性を有するDNAを単離することは通常行いうることである。このようにハイブリダイズ技術やPCR技術により単離するRSI1タンパク質と同等の機能を有するタンパク質をコードするDNAもまた本発明のDNAに含まれる。

20

【0027】

このようなDNAを単離するためには、好ましくはストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーション反応を行なう。本発明においてストリンジェントなハイブリダイゼーション条件とは、6M尿素、0.4% SDS、0.5×SSCの条件またはこれと同等のストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件を指すが、特にこれらの条件に限定されるものではない。よりストリンジェンシーの高い条件、例えば、6M尿素、0.4% SDS、0.1×SSCの条件を用いることにより、相同性のより高いDNAの単離を期待することができる。一方、RSI1タンパク質と同等の機能を有する限り、よりストリンジェンシーの低い条件、例えば、より低い温度条件でハイブリダイゼーションを行ったり、塩濃度を高くしてハイブリダイゼーションを行っても良い。

30

【0028】

ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに影響する要素としては、温度や塩濃度など複数の要素が考えられ、当業者であればこれら要素を適宜選択することで最適なストリンジェンシーを実現することが可能である。これにより単離されたDNAは、アミノ酸レベルにおいて、RSI1タンパク質のアミノ酸配列 (配列番号2) と高い相同性を有すると考えられる。高い相同性とは、アミノ酸配列全体で、少なくとも50%以上、さらに好ましくは70%以上、さらに好ましくは90%以上 (例えば、95%以上) の配列の同一性を指す。

40

【0029】

アミノ酸配列や塩基配列の同一性は、カーリンおよびアルチュールによるアルゴリズムBLAST (Karlin S, Altschul SF, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 2264-2268 1990 ; Karlin S, Altschul SF, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 5873-5877 1993) を用いて決定できる。BLASTのアルゴリズムに基づいたBLASTNやBLASTXと呼ばれるプログラムが開発されている (Altschul SF, et al., *J. Mol. Biol.*, 215: 403 1990)。BLASTNを用いて塩基配列を解析する場合は、パラメーターは、例えばscore=100、wordlength=12とする。また、BLASTXを用いてアミノ酸配列を解析する場合は、パラメーターは、例えばscore=50、wordlength=3とする。BLASTとGapped BLASTプログラムを用いる場合は、各プログラムのデフォルトパラメーターを

50

用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。

【0030】

植物細胞にDNAを導入するためには、上記(a)～(e)のDNAをベクターに組み込んで導入するのが好ましい。例えば、上記(a)～(e)のDNAを恒常的にイネ細胞内で機能させるために、上流にプロモーターを連結させ、さらに、ターミネーターを下流に連結させて、ベクターDNAに組み込むことができる。これらプロモーター等を最適化することは、当業者にとって容易なことである。

【0031】

本発明で利用するプロモーターは、構成的プロモーター又は誘導的プロモーターのいずれのプロモーターを用いることができ、また、根や葉など組織又は器官特異的プロモーターを用いることも可能である。例えばカリフラワーモザイクウイルス由来のCaMV35Sプロモーター[ザ エンボ ジャーナル(The EMBO J.)、第6巻、第3901頁、1987年]、トウモロコシ由来のユビキチンプロモーター[プラント モレキュラー バイオロジー(Plant Mol. Biol.)第23巻、第567頁、1993年]が挙げられ、ターミネーターとしては、例えばカリフラワーモザイクウイルス由来のターミネーターやノパリン合成酵素遺伝子由来のターミネーターが挙げられるが、植物体中で機能するプロモーターやターミネーターであればこれらのものに限定されない。

【0032】

ストレス応答性遺伝子を包含するベクターが導入されたイネの選抜を容易にするために、ストレス応答性遺伝子と同時に選抜マーカー遺伝子を併用して導入しても良い。その際に使用する選抜マーカー遺伝子としては、抗生物質ハイグロマイシンに耐性であるハイグロマイシンフォスフォトランスフェラーゼ遺伝子(HPT)、除草剤フォスフィノスリシンに耐性であるフォスフィノスリシンアセチルトランスフェラーゼおよびカナマイシン、ゲンタマイシンに耐性であるネオマイシンフォスフォトランスフェラーゼ遺伝子などから選ばれる1つ以上の遺伝子を使用することができるが、選抜マーカーとして機能する遺伝子であればこれらに限定されない。好ましくはハイグロマイシンフォスフォトランスフェラーゼ遺伝子を用いるのが良い。

【0033】

イネ科植物への遺伝子導入および形質転換植物体の作製

本発明は、任意の植物、すなわち、単子葉植物及び双子葉植物に適用することができ、好ましくは、単子葉植物、より好ましくはイネ科植物に導入することができる。イネ科植物として、例えば、イネ、トウモロコシ、コムギ、オオムギ、ライムギ、エンバク、シバ類(ベントグラス、ノシバ、高麗シバ)、フェスク類(トールフェスク、レッドフェスク)が挙げられる。遺伝子導入に用いられるイネ科植物としては、種子、根、茎、葉などの各種器官の組織などが挙げられ、さらにカルス、プロトプラストなどの植物細胞などが挙げられるが、好ましくはカルスである。

【0034】

次に、イネ科植物への遺伝子導入および形質転換植物体の作製を行う。公知の遺伝子導入法でストレス応答性遺伝子を包含する組換えDNAを導入できる。公知の遺伝子導入法としては、電気穿孔法(エレクトロポレーション)、ポリエチレングリコール法、アグロバクテリウム法およびパーティクルガン法(モデル植物の実験プロトコル、イネ・シロイヌナズナ編、細胞工学別冊植物細胞工学シリーズ4巻、秀潤社、89-98頁、島本ら著1996年)、ウイスキー法(特許第3312867号)またはそれに準じた方法が挙げられ、これらの方法は、当業者には公知である。本発明で用いる遺伝子導入方法としては、アグロバクテリウム法が好ましい。

【0035】

遺伝子導入を行った組織片を、次のようにして調整した選抜培地に置床する。この選抜培地は、特定の基本培地に特定の植物ホルモン、酸素源、ビタミン類を加え、特定のゲル化剤を加えて固化した固体培地である。例えばMS培地の無機塩濃度をそのままか、1/

10

20

30

40

50

2 ~ 1 / 3 濃度に希釈したものにショ糖 10 ~ 60 g / l、好ましくは 20 ~ 40 g / l、植物ホルモンとしてオーキシン類を 0.01 ~ 10 mg / l、好ましくは 0.1 ~ 5 mg / l、とサイトカイニン類を 0.01 ~ 10 mg / l、好ましくは 0.1 ~ 5 mg / l、さらにアセトシリングンを 1 ~ 50 mg / l、好ましくは 10 ~ 30 mg / l をそれぞれ加え、pH 4 ~ 7、好ましくは pH 5 ~ 6 とし、ゲランガム 1 ~ 10 g / l、好ましくは 2 ~ 4 g / l を加えて調整する。

【0036】

このような本発明の選抜工程では、培地に加えられる植物ホルモンとして、オーキシン類として 2, 4-D、ナフタレン酢酸 (NAA)、インドール酢酸 (IAA) などが挙げられ、サイトカイニン類としてベンジルアデニン (BA)、カイネチン、チジアズロンなどを挙げることができる。

10

【0037】

この選抜培地には、効率的に目的の形質転換細胞を選抜するために、選抜マーカー遺伝子の種類に応じた選抜薬剤を添加する。選抜薬剤としては、例えばハイグロマイシンを 10 ~ 100 mg / l、好ましくは 30 ~ 50 mg / l の濃度で添加する。

【0038】

さらに、遺伝子導入処理の終了したアグロバクテリウム菌の除菌薬剤として、カルベニシリンを 50 ~ 500 mg / l、好ましくは 100 ~ 300 mg / l の濃度で添加する。これを、10 ~ 30、好ましくは 25 ~ 30 の温度で、暗所で、20 ~ 90 日間、好ましくは 30 ~ 60 日間培養すると、組換え DNA が導入されたカルスが選抜される。

20

【0039】

上記で培養した選抜カルスを次のようにして調整した植物育成培地に置床する。この植物育成培地は、特定の基本培地に特定の植物ホルモン、酸素源、ビタミン類を加え、特定のゲル化剤を加えて固化した固体培地である。例えば MS 培地の無機塩濃度をそのまま、1 / 2 ~ 1 / 3 濃度に希釈したものにショ糖 10 ~ 60 g / l、好ましくは 20 ~ 40 g / l、植物ホルモンとしてオーキシン類を 0.01 ~ 10 mg / l、好ましくは 0.1 ~ 5 mg / l、とサイトカイニン類を 0.01 ~ 10 mg / l、好ましくは 0.1 ~ 5 mg / l、カルベニシリンを 50 ~ 1000 mg / l、好ましくは 300 ~ 500 mg / l、pH 4 ~ 7、好ましくは pH 5 ~ 6 とし、ゲランガム 1 ~ 10 g / l、好ましくは 2 ~ 4 g / l を加えて調整する。

30

【0040】

このような本発明の再生工程では、培地に加えられる植物ホルモンとして、オーキシン類として 2, 4-D、ナフタレン酢酸 (NAA)、インドール酢酸 (IAA) などが挙げられ、サイトカイニン類としてベンジルアデニン (BA)、カイネチン、チジアズロンなどを挙げることができる。

【0041】

これを、10 ~ 30、好ましくは 25 ~ 30 の温度で、明所で、30 ~ 120 日間、好ましくは 30 ~ 60 日間培養すると、カルスから形質転換植物体が再生、育成される。ここに明所条件とは、照度が 500 ~ 10000ルクス、好ましくは 500 ~ 2000ルクスであり、光照射時間は 1 日 5 ~ 24 時間、好ましくは 14 ~ 18 時間である。

40

【0042】

形質転換植物細胞からの植物体の再生は、植物細胞の種類に応じて当業者に公知の方法で行うことが可能である (Tokiら (1992) Plant Physiol. 100:1503-1507)。例えば、イネにおいては、形質転換植物体を作成する手法については、ポリエチレングリコールによりプロトプラストへ遺伝子導入し、植物体 (インド型イネ品種が適している) を再生させる方法 (Datta, S.K. (1995) In Gene Transfer To Plants (Potrykus I and Spangenberg Eds.) pp66-74)、電気パルスによりプロトプラストへ遺伝子導入し、植物体を再生させる方法 (Toki et al (1992) Plant Physiol. 100, 1503-1507)、パーティクルガン法により細胞へ遺伝子を直接導入し、植物体を再生させる方法 (Christou et al. (1991) Bio/technology, 9: 957-962.)、アグロバクテリウムを介して遺伝子を導入し、植物体を再

50

生させる方法（単子葉植物の超迅速形質転換法（特許第3141084号））など、いくつかの技術が既に確立し、本願発明の技術分野において広く用いられている。本発明においては、これらの方法を好適に用いることができる。

【0043】

遺伝子の植物体への導入の確認

上記の工程で得られた形質転換細胞（カルス）および形質転換植物体に目的とするストレス応答性遺伝子が組み込まれていることの確認は、これらの細胞から常法に従ってDNAを抽出し、公知のPCR（Polymerase Chain Reaction）法もしくはサザンハイブリダイゼーション法により行うことができる。

【0044】

形質転換植物の耐暑性および成育の確認

RSI1遺伝子を導入した形質転換植物の生育促進及び高温及び/又は強光ストレスに対する耐性は、簡易的な検定方法において確認することができる。

【0045】

本明細書において、成長又は生育が促進されたとは、葉の大きさ、草丈、茎の太さ、葉重、根の長さなどが、未処理の同種の植物と比べて、大きいことをいう。又は、未処理の植物と比べて、同じ期間内で、葉の大きさ、草丈、茎の太さ、葉重、根の長さなどが、より大きく成長できることをいう。

【0046】

本明細書において、耐暑性とは、強光ストレス及び/又は高温ストレスに対する耐性をいう。強光ストレスとは、植物の生育に適する光量を超える環境下に植物がおかれた場合に受けるストレスであり、植物の組織、細胞が強光により生理機能が損なわれて傷害が起こることをいう。高温ストレスとは、植物の生育に適する気温を超える環境に植物が置かれた場合に受けるストレスであり、植物の組織、細胞が高温により生理機能が損なわれて傷害が起きることをいう。耐暑性が高まるとは、未処理の同種の植物と比べて、より強光下及び/又は高温下で生育可能であることをいう。

【0047】

また、RSI1遺伝子を導入した形質転換イネ科植物の生育評価試験は、20～30で栽培することにより確認することができる。

【0048】

一旦、ゲノム内に本発明のDNAが導入された形質転換植物体を得られれば、該植物体から有性生殖または無性生殖により子孫を得ることが可能である。また、該植物体やその子孫あるいはクローンから繁殖材料（例えば、種子、果実、切穂、塊茎、塊根、株、カルス、プロトプラスト等）を得て、それらを基に該植物体を量産することも可能である。本発明には、本発明のDNAが導入された植物細胞、該細胞を含む植物体、該植物体の子孫およびクローン、並びに該植物体、その子孫、およびクローンの繁殖材料が含まれる。このようにして作出された植物体は、野生型植物体と比較して、成長が促進され及び/又は耐暑性が向上していると考えられる。本発明の手法を用いれば、イネなどの有用農作物の生産性を向上させることができ非常に有益である。

【0049】

本発明の態様例として、以下が挙げられる。

- (1) ストレス応答性遺伝子が導入された形質転換植物。
- (2) ストレス応答性遺伝子がイネ由来のタンパク質をコードする遺伝子である、(1)に記載の形質転換植物。
- (3) イネ科植物である(1)および(2)に記載の形質転換植物
- (4) 耐乾燥性が改良された植物であることを特徴とする(1)に記載の形質転換植物。
- (5) 耐塩性が改良された植物であることを特徴とする(1)に記載の形質転換植物。
- (6) 耐暑性が改良された植物であることを特徴とする(1)に記載の形質転換植物。
- (7) 形質転換植物が成長が促進された植物であることを特徴とする(1)に記載の形質転換植物。

10

20

30

40

50

【実施例】

【0050】

以下に、本発明の実施例の例示により具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらに限定されるものではない。以下の実験操作の手順は特に記述しない限り、「モレキュラー クローニング (Molecular Cloning) 第2版」(J. Sambrookら、Cold Spring Harbor Laboratory press, 1989年)に記載されている方法に従った。

【0051】

<実施例1: R S I 1 遺伝子による形質転換イネの作製>

(1) イネ由来の R S I 1 遺伝子を含有する組換え DNA の構築

イネ由来のストレス応答性遺伝子 (R S I 1) を、植物体に導入する遺伝子として用い、R S I 1 遺伝子を植物体において恒常的に発現させるための発現ベクターを作製した。

【0052】

オープンリーディングフレームを含むように、上記ストレス応答性遺伝子 R S I 1 の DNA の 5' 側および 3' 側に PCR 法によって制限酵素サイト B a m H I を付与した。5' 末端及び 3' 末端に B a m H I サイトを付与した R S I 1 を、pBluescript IISK - ベクターに挿入した。これを制限酵素 B a m H I で処理し R S I 1 遺伝子を切り出した後、DNA Blunting Kit (タカラバイオ社製) により平滑末端化し、グラスミルク法で精製した。一方、カリフラワーモザイクウイルス 3 5 S プロモーターを保有する公知のイネ発現ベクター pIG121 - Hm (首都大学東京より入手) を制限酵素 X b a I および S a c I で切断した後、DNA Blunting Kit (タカラバイオ社製) により平滑末端化した。上記の R S I 1 遺伝子を pIG121 - Hm ベクター内の 3 5 S プロモーターの下流に DNA Ligation Kit 法 (タカラバイオ社製) によりライゲーションした。このプラスミドベクターを pBIH1 - IG と命名した。

【0053】

組換えベクター pBIH1 - IG をアグロバクテリウム・ツメファシエンズ菌 (E H A 1 0 1) に公知の凍結融解法 (例えば、「植物細胞工学」、1992年、第4巻、第3号、193頁 ~ 203頁) により移行させたアグロバクテリウム・ツメファシエンズ菌 EHA101/ pBIH1 - IG を作製した。

組換えベクター pBIH1 - IG は、カリフラワーモザイクウイルス由来の 3 5 S プロモーターとノパリンシンターゼ由来の NOS ターミネーターの間に連結したストレス応答性遺伝子 (RSI1) 前記した 3 5 S プロモーターとアグロバクテリウム菌由来のターミネーターの間に連結したハイグロマイシンフォスフトランスフェラーゼ遺伝子 (H P T) およびアグロバクテリウム菌由来のノパリンシンターゼプロモーター (P n o s) と前記のミネーターの間に連結したネオマイシンフォスフトランスフェラーゼ遺伝子 (N P T) を有する。

【0054】

(2) イネの組織への遺伝子の導入

イネ (品種: 日本晴) の完熟種子を有効塩素濃度が 1% の次亜塩素酸ナトリウム液で 60 分間浸漬し滅菌後、1 試験区あたり 100 個の種子を、N6 培地にショ糖 3%、植物ホルモンとして 2, 4 - D を 2 mg / l を加え、pH 5.8 として、ゲルライト 0.3% を加えた固体培地に置床した。この培養に用いられる容器は、滅菌したプラスチックシャーレ (直径 9 cm、高さ 1.5 cm) であり、シャーレ 1 枚あたり組織片 20 個を置床している。これを 28℃ で暗所にて 30 日間培養し、カルスを誘導した。

【0055】

上記で得られた組換えベクター pBIH1 - IG を包含するアグロバクテリウム・ツメファシエンズ菌 (EHA101/ pBIH1 - IG) を LB 培地で 28℃ で一晩培養した培養液に、上記に記載のイネのカルス 100 個を 2 分間浸漬処理した。浸漬処理後、N6 培地にショ糖 3%、植物ホルモンとして 2, 4 - D を 2 mg / l、アセトシリングンを 10 mg / l それぞれ加え、pH 5.8 として、ゲルライト 0.3% を加えた固体培地に置床した。25℃ の温度条件下で暗所にて 3 日間共存培養を行った。

【0056】

共存培養後のカルス100個を、50ml容の無菌の遠心管（内径27mm、長さ115mm）に移し入れ、洗浄液（1/2無機塩濃度のMS液体培地にカルベニシリン300mg/lを加えたもの）30mlを加えて洗浄した。さらにこの操作を2回繰り返した後、無菌のろ紙を用いて余分な水分を取り除いた。洗浄された組織片は、N6培地にショ糖3%、植物ホルモンとして2,4-Dを2mg/l、カルベニシリンを500mg/l、ハイグロマイシンを50mg/lそれぞれ加え、pH5.8として、ゲルライト0.3%を加えた固体選抜培地に置床した。28℃の温度条件下で暗所にて1ヶ月毎に新しい選抜培地に移植した。

【0057】

（3）形質転換イネの再生

選抜培地に移植後、ハイグロマイシン抵抗性の形質転換カルスを形成させた。これらのカルスは、MS培地にショ糖3%、植物ホルモンとしてNAAを1mg/l、BAを2mg/l、カルベニシリンを300mg/l、ハイグロマイシンを50mg/lをそれぞれ加え、pH5.8として、ゲルライト0.3%を加えた固体再生培地に置床した。28℃の温度条件下で明所（1000ルクス、16時間照明）培養した。その結果、ストレス応答性遺伝子RSI1により形質転換されたイネ植物体が19個体得られた。

【0058】

これらの植物体はすべて、十分に発根させた後に順化、鉢上げを行った。これらの形質転換植物体は、インキュベーター内で、28℃の温度条件下で明所（2000ルクス、16時間照明）で栽培した。その後、当該形質転換植物体（T1世代）を閉鎖型温室内で栽培することにより、種子（T2世代）を収穫した。これらの後代種子は、選抜マーカーである抗生物質ハイグロマイシンを含有する培地上での抵抗性試験（分離比検定）を行い、ホモ系統（T3世代、T4世代）を取得した

【0059】

（4）導入遺伝子の解析

上記（3）で得られた形質転換植物の葉を遺伝子解析用の材料とした。イネの葉片10mgから公知のCTAB法に従って全DNAを抽出した。これらはPCR法により導入遺伝子の確認を行った。用いたプライマーは、化学合成により作製した

（a）プライマーNo.1（配列番号3に示す）

5' - GTGTGATCAGTAGGAAGTTG -3'

（b）プライマーNo.2（配列番号4に示す）

5' - ACCTCAAACACAAATCACTC -3'

を組み合わせ用いた。

【0060】

上記において抽出した各形質転換イネの系統のDNA溶液の1μlを鋳型とした。ここで使用される増幅反応液は、PCRキット（宝酒造（株）製、LA PCR Kit Ver.2.1）により調製した。

【0061】

PCR法によるDNAの上記の増幅反応は、PCR反応装置（ASTEK社製、Program Temp Control System PC-700）を用いて、変性を94℃、30秒間、アニーリングを55℃、1分間、また伸張（Extension）を72℃、30秒分間行う3つの反応操作を35回繰り返すことによって実施した。

【0062】

PCR後、反応液の一部を1.2%アガロースゲルで電気泳動し、バンドの有無および大きさを比較した。その結果、すべての植物体においてRSI1遺伝子の形質転換が確認された。

【0063】

（5）形質転換イネの環境ストレス耐性の検定

上記（3）で得られた形質転換イネのホモ固定系統（T4世代）と通常品種（日本晴）の種子を次の検定試験に用いた。

10

20

30

40

50

A) 耐塩性の検定

形質転換イネのホモ系統（系統番号：S3）および非形質転換イネ日本晴品種の種子各系統10粒を、水道水中で発芽させた後、所定濃度の塩化ナトリウム（50 mM）を含む1/1000濃度のハイポネックスを加え、14日間、27℃、12時間明期、12時間暗期の条件下でインキュベーター内で生育させた。そして14日後にそれぞれの幼苗の草丈、根長を測定した。その結果を表1に示す。

【0064】

【表1】

系統No.	草丈 (mm)	根長 (mm)
形質転換イネ S3	22	15
非形質転換イネ 日本晴	13	4

10

【0065】

表1から、非形質転換イネは、50 mMのNaCl溶液では草丈、根の伸長とも著しく抑制されたのに比べて、形質転換イネのS3系統は草丈および根長とも明らかに優っていて、塩に対する耐性が向上されていることがわかった。

【0066】

B) 耐乾燥性の検定

20

形質転換イネのホモ系統（系統番号：S3）および非形質転換イネ日本晴品種の種子各系統4粒を、水道水の入った試験管内に1粒ずつ播種し、インキュベーター内の28℃の温度条件下で明所（20000ルクス、12時間照明）で14日間栽培した。その後、それぞれの幼苗体をクリーンベンチ内に5時間置いて、風乾処理を行い、その後再び生育培地に戻して上記と同様の条件で栽培を行った。そして7日後にそれぞれの幼苗体の生育株数および枯死株数を調査した。その結果を表2に示す。

【0067】

【表2】

系統No.	生育株数	枯死株数
形質転換イネ S3	4	0
非形質転換イネ 日本晴	1	3

30

【0068】

表2から、非形質転換イネは風乾処理によってほとんどが枯死したのに比べて、形質転換イネのS3系統は正常に成育し、乾燥に対する耐性が向上されていることがわかった。

【0069】

(6) 形質転換イネの成長試験

形質転換イネのホモ系統（系統番号：S2、S3、S4、S19）および日本晴品種の種子5粒を、粒状培土（くみあい粒状培土）を充填したワグネルポット内で栽培し、閉鎖型温室内の条件下で栽培した。栽培開始後、止め葉が展開した時点で栽培を終了し、草丈を測定した。また第12葉目を切り取り、葉重量の測定を行った。その結果を表3に示す。

40

【0070】

【表 3】

系統No.	草丈	葉重
形質転換イネ S 2	92	0.6
形質転換イネ S 3	105	0.7
形質転換イネ S 4	82	0.4
形質転換イネ S 19	90	0.5
非形質転換イネ 日本晴	70	0.4

10

【0071】

非形質転換イネに比べて、形質転換イネの S 2、S 3、S 4、S 19 系統の草丈および葉重は明らかに大きく、生育が促進されていることがわかった。

【0072】

<実施例 2：RSI 1 遺伝子による形質転換ベントグラスの作製>

(7) イネ由来のストレス応答性遺伝子を含有するベントグラス遺伝子導入用組換え DNA の構築

RSI 1 遺伝子をベントグラス植物体において恒常的に発現させるための発現ベクターを作製した。上記ストレス応答性遺伝子 RSI 1 は、その塩基配列よりオープンリーディングフレームを含むように DNA の 5' 側および 3' 側に PCR 法によって制限酵素サイト BamHI を付与された後、pBluescript IISK⁺ ベクターに挿入された。これを制限酵素 BamHI で処理し RSI 1 遺伝子を切り出した後、DNA Blunting Kit (タカラバイオ社製) により平滑末端化し、グラスミルク法によって精製した。一方、カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターを保有する公知の植物細胞形質転換用ベクター pBI221 (Clontech 社製) を制限酵素 XbaI および SacI で切断した後、DNA Blunting Kit (タカラバイオ社製) により平滑末端化した。上記の RSI 1 遺伝子をベクター pBI221 内の 35S プロモーターの下流に DNA Ligation Kit 法 (タカラバイオ社製) によりライゲーションした。このプラスミドベクターを pBIH2 と命名した。

20

【0073】

(8) ベントグラスのカルス細胞への組換えベクターの導入

上記で得られた組換えベクター pBIH2 をベントグラスのカルス細胞へ導入を行った (特許第 3312867 号参照)。

まず、ベントグラス (品種：ペンクロス) の完熟種子から籾殻を取り除いた。得られた種子を 70% エタノール溶液に 1 分間、次いで次亜塩素酸ナトリウム 1% (有効塩素濃度) 溶液に 60 分間浸漬して種子を殺菌処理した。公知の MS 培地の無機成分組成にショ糖 30g/l、カサミノ酸 500mg/l、植物ホルモンとして dicamba 6.6mg/l、ベンジルアデニン 0.5mg/l をそれぞれ加え pH 5.8 として、ゲルライト 3g/l を加えた固体培地に、上記で殺菌したベントグラス種子を置床した。この培養に用いられる容器は、滅菌したプラスチックシャーレ (直径 9cm、高さ 1.5cm) であり、シャーレ 1 枚あたり種子 25 粒を置床している。これを 28℃ で暗所にて 60 日間培養し、カルスを誘導した。カルスが形成された後、それらのカルスを、孔 1mm のステンレスメッシュの篩を用いて、1mm 以下のカルスを PCV (Packed Cell Volume; 圧縮細胞量) として 3ml の量を得た。

30

40

【0074】

チタン酸カリウム製ウイスカ LS20 (チタン工業社製) 5mg を 1.5ml 容のチューブに入れ、1 時間放置した後、エタノールを除去し、完全に蒸発させて、殺菌されたウイスカを得た。このウイスカのいったチューブに滅菌水 1ml を入れ、良く攪拌した。ウイスカと滅菌水を遠心分離し、上清の水を捨てた。このウイスカ洗浄操作を 3 回行った。その後、公知の MS 培地にショ糖 30g/l を加え pH 5.8 に調整した MS 液体培地 0.5ml を加え、

50

5 mlを、同チューブに加えてウイスカ懸濁液を得た。

【0075】

上記で得られたウイスカ懸濁液の入ったチューブに1 mm以下のベントガラスのカルス
を250 μ l入れて攪拌した。カルスとウイスカ懸濁液との混合液を1000 rpmで1
0秒間遠心分離し、カルスとウイスカを沈殿させ、上清を捨て、カルスとウイスカの混合
物を得た。

この混合物を入れたチューブに、前記の組換えベクター（すなわち前記の組換えベク
ターpBIH2）の10 μ l（10 μ g）と、公知のハイグロマイシン耐性遺伝子を保有す
る組換えベクターpCH（Breeding Science:55 465-468(2005)）の10 μ l（10 μ g）
（ハイグロマイシン耐性）を加え、十分振り混ぜて均一な混合物を得た。

10

【0076】

次にこの均一な混合物の入ったチューブを18000 $\times$ gで5分間遠心分離した。遠心
分離した混合物を再度振り混ぜ、この操作を3回反復した。

上記のようにして得られた、カルス細胞と、ウイスカと、本発明のDNA配列を有する
組換えベクターとを含むチューブを超音波発生機の浴槽にチューブが十分浸るように設置
した。周波数40 kHzの超音波を強度0.25 w/cm²で1分間照射した。照射後、
10分間、4でこの混合物を保持した。このように超音波処理した混合物を前記のMS
液体培地で洗浄し、組換えベクターpBIH2を導入した目的の形質転換カルスを得た。

【0077】

上記で組換えベクターを導入して得た形質転換カルスを、3.5 cmシャーレに入れた。
さらに、MS培地の無機成分組成にショ糖30 g/l、カサミノ酸500 mg/l、植物
ホルモンとしてdicamba 6.6 mg/l、ベンジルアデニン0.5 mg/lをそれぞれ加
えpH 5.8に調整した液体培地を3 ml加えた。その後、28℃、暗所に設置したロ
ータリーシェーカー（50 rpm）上でカルス細胞を培養した。

20

培養6日目に、遺伝子導入操作を行ったカルス細胞を、公知のMS培地の無機成分組成
にショ糖30 g/l、カサミノ酸500 mg/l、植物ホルモンとしてdicamba 6.6 m
g/l、ベンジルアデニン0.5 mg/lをそれぞれ加えpH 5.8として、ゲルライト
3 g/lおよび選抜用薬剤としてハイグロマイシン100 mg/lを添加してなる培地上
に均一に広げた。培地上の細胞を、28℃、暗所にて培養した。

30日後に、ハイグロマイシン含有培地上で健全に生育している形質転換カルスを選抜
した。

30

【0078】

（9）形質転換ベントガラスカルス細胞からの植物体の再生

上記で得られたハイグロマイシン耐性である形質転換培養細胞を、MS培地の無機成分
組成にショ糖30 g/l、カサミノ酸500 mg/l、植物ホルモンとしてベンジルアデ
ニン1 mg/lをそれぞれ加えpH 5.8として、ゲルライト3 g/lを添加してなる培
地上に移植した。28℃で2000ルクスの光を1日当たり16時間照射しながら形質
転換培養細胞を培養した。30日後に形成された再生植物体（幼芽）を、MS培地の無機
成分組成にショ糖30 g/lを加えpH 5.8として、ゲルライト3 g/lを添加してな
る培地を入れた試験管（直径40 mm、長さ130 mm）に移植した。移植された幼芽を
10日間培養して形質転換ベントガラス植物体を得た。こうして、ベントガラスのカルス
3 mlから合計2個体（系統番号BPR1、BPR2）の形質転換体が作製された。

40

【0079】

（10）導入遺伝子の解析

上記（9）で得られた形質転換ベントガラス植物の2個体の葉片10 mgから公知のC
TAB法に従って全DNAを抽出した。これらはPCR法により導入遺伝子の確認を行っ
た。用いたプライマーは、化学合成により作製した。

（a）プライマーNo.1（配列番号3に示す）

5' - GTGTGATCAGTAGGAAGTTG -3'

（b）プライマーNo.2（配列番号4に示す）

50

5' - ACCTCAAACACAAATCACTC -3'

を組み合わせて用いた。

【0080】

上記において抽出した各形質転換イネの系統のDNA溶液の1μlを鋳型とした。ここで使用される増幅反応液は、PCRキット（宝酒造（株）製、LA PCR Kit Ver. 2.1）により調製した。

【0081】

PCR法によるDNAの上記の増幅反応は、PCR反応装置（ASTEK社製、Program Temp Control System PC-700）を用いて、変性を94℃、30秒間、アニーリングを55℃、1分間、また伸張（Extension）を72℃、30秒分間行う3つの反応操作を35回繰り返すことによって実施した。

PCR後、反応液の一部を1.2%アガロースゲルで電気泳動し、バンドの有無および大きさを比較した。その結果、系統番号BPR1の植物体においてRSI1遺伝子の形質転換が確認された。系統番号BPR2においては、RSI1遺伝子は検出されなかった。

【0082】

（11）形質転換ベントグラスの生育試験

上記（9）で得られた、RSI1遺伝子の導入が確認された形質転換ベントグラス植物体BPR1と確認されなかったBPR2植物体を、MS培地の無機成分組成にショ糖30g/lを加えpH5.8として、ゲルライト3g/lを添加してなる培地を入れた試験管（直径40mm、長さ130mm）に、移植した。各系統、3個体ずつ28℃で2000ルクスの光を1日当たり16時間照射しながら培養した。培養開始30日後に草丈、最大根長の測定を行い、平均値を求めた。その結果を表4に示す。RSI1遺伝子の導入が確認された系統番号BPR1植物体では、導入されなかったBPR2植物体に比べて、草丈、最大根長は明らかに大きく、生育が促進されていることがわかった。

【0083】

【表4】

形質転換ベントグラスの生育試験結果

系統番号	RSI1 遺伝子の有無	草丈 (mm)	最大根長 (mm)
BPR1 (試験区)	有	180	44
BPR2 (対照区)	無	139	17

表4から、RSI1遺伝子が導入されたBPR1は、RSI1が導入されていないBPR2と比べて、草丈および根長とも明らかに優っていることがわかった。

【0084】

(12) 形質転換ベントガラスの耐塩性試験

上記(9)で得られた、RSI1遺伝子の導入が確認された形質転換ベントガラス植物体BPR1と確認されなかったBPR2植物体を、0、50、100、200、300mMの濃度でNaClを添加した、1/10濃度のMS培地の無機成分組成にショ糖30g/lを加えpH5.8として、寒天8g/lを添加してなる培地を入れた試験管(直径40mm、長さ130mm)に、移植した。各系統、5個体ずつ28℃で2000ルクスの光を1日当たり16時間照射しながら培養した。培養開始30日後に草丈、最大根長の測定を行い、平均値を求めた。NaCl濃度0mMにおける草丈、最大根長の値を100%として各NaCl濃度区の草丈、最大根長の相対比を算出し、草丈、最大根長生育程度(%)を求めた。結果を表5に示す。RSI1遺伝子の導入が確認された系統番号BPR1植物体では、草丈、最大根長ともにNaCl濃度50mMでは98%とほとんど抑制されず、100mMで約70%、200mM以上で30%以下と生育阻害を受けたが、RSI1遺伝子が導入されなかったBPR2植物体に比べて、NaCl濃度増加に伴う草丈、最大根長の抑制程度は小さく、耐塩性が增強されていることがわかった。

【0085】

【表5】

形質転換ベントガラスの耐塩性試験結果

系統番号	RSI1 遺伝子の有無	NaCl 濃度 (mM)	草丈生育程度 (%)	最大根長 生育程度 (%)
BPR1 (試験区)	有	0	100	100
		50	98	98
		100	73	69
		200	34	7
		300	7	0
BPR2 (対照区)	無	0	100	100
		50	75	68
		100	50	46
		200	13	1
		300	6	0

【産業上の利用可能性】

【0086】

本発明により、耐塩性、耐乾燥性などの環境ストレスに対する抵抗性が増加し、生育が促進された、様々な環境ストレスを受ける地域での安定的な栽培が可能な環境ストレス耐性イネ科植物を提供される。

【配列表】

0004987734000001.app

フロントページの続き

- (74)代理人 100107319
弁理士 松島 鉄男
- (74)代理人 100114591
弁理士 河村 英文
- (74)代理人 100118407
弁理士 吉田 尚美
- (74)代理人 100125380
弁理士 中村 綾子
- (74)代理人 100130960
弁理士 岡本 正之
- (74)代理人 100125036
弁理士 深川 英里
- (74)代理人 100142996
弁理士 森本 聡二
- (74)代理人 100154298
弁理士 角田 恭子
- (74)代理人 100156443
弁理士 松崎 隆
- (72)発明者 小柴 共一
東京都八王子市南大沢 1 - 1 公立大学法人首都大学東京 南大沢キャンパス内
- (72)発明者 寺川 輝彦
神奈川県厚木市森の里 2 丁目 1 番 6 - 1 0 3 号
- (72)発明者 長谷川 久和
神奈川県厚木市戸田 1 4 0 4 - 1 0
- (72)発明者 小松 節子
茨城県つくば市観音台 2 - 1 - 2 独立行政法人農業生物資源研究所内
- (72)発明者 岡本 龍史
東京都八王子市南大沢 1 - 1 公立大学法人首都大学東京 南大沢キャンパス内
- (72)発明者 古川 聡子
東京都八王子市南大沢 1 - 1 公立大学法人首都大学東京 南大沢キャンパス内
- (72)発明者 島谷 健太郎
東京都八王子市南大沢 1 - 1 公立大学法人首都大学東京 南大沢キャンパス内

審査官 幸田 俊希

- (56)参考文献 特開 2 0 0 3 - 3 3 4 0 8 4 (J P , A)
特開 2 0 0 1 - 0 7 8 6 0 3 (J P , A)
HASHIMOTO, M. et al. , A novel rice PR10 protein, RS0sPR10, specifically induced in roots by biotic and abiotic stresses, possibly via the jasmonic acid signaling pathway. , Plant Cell Physiol. , 2 0 0 4 年 5 月 , Vol.45, No.5 , pp.550-9

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C12N 15/09
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
UniProt/GeneSeq
SwissProt/PIR/GeneSeq
PubMed
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)