

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2010年8月5日(05.08.2010)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2010/087048 A1

- (51) 国際特許分類:
A01G 7/06 (2006.01) A01H 5/00 (2006.01)
A01G 16/00 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2009/064876
- (22) 国際出願日: 2009年8月26日(26.08.2009)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2009-021846 2009年2月2日(02.02.2009) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 日本製紙株式会社 (NIPPON PAPER INDUSTRIES CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1140002 東京都北区王子1丁目4番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 笠原 さおり (KASAHARA, Saori) [JP/JP]; 〒1140002 東京都北区王子5丁目21番1号 日本製紙株式会社 森林科学研究所内 Tokyo (JP). 和才 昌史 (WASAI, Masafumi) [JP/JP]; 〒1140002 東京都北区王子5丁目21番1号 日本製紙株式会社 森林科学研究所内 Tokyo (JP). 杉田 耕一 (SUGITA,

Koichi) [JP/JP]; 〒1140002 東京都北区王子5丁目21番1号 日本製紙株式会社 森林科学研究所内 Tokyo (JP). 島田 照久 (SHIMADA, Teruhisa) [JP/JP]; 〒1140002 東京都北区王子5丁目21番1号 日本製紙株式会社 森林科学研究所内 Tokyo (JP).

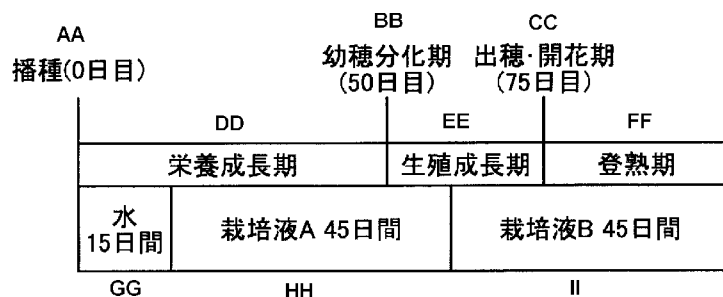
- (74) 代理人: 酒井 宏明 (SAKAI, Hiroaki); 〒1006020 東京都千代田区霞が関三丁目2番5号 霞が関ビルディング 酒井国際特許事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR CULTIVATION OF TRANSGENIC PLANT

(54) 発明の名称: 遺伝子組換え植物の栽培方法

[図1]



- AA SEEDING (DAY 0)
BB PANICLE INITIATION STATE (DAY 50)
CC HEADING AND FLOWERING STAGE (DAY 75)
DD VEGETATIVE GROWTH STAGE
EE GENERATIVE GROWTH STAGE
FF RIPENING STAGE
GG WATER, FOR 15 DAYS
HH CULTIVATION SOLUTION A, FOR 45 DAYS
II CULTIVATION SOLUTION B, FOR 45 DAYS

(57) Abstract: Disclosed is a method for cultivating a transgenic plant that can produce a desired protein in high yield. More specifically disclosed is a method for cultivating a transgenic plant, which comprises cultivating the transgenic plant in a cultivation medium that is so modified as to have a nitrate nitrogen content of 70 to 750 mg/L and/or an ammonium nitrogen content of 70 to 750 mg/L for a certain period falling within the period between 30 days before the estimated blooming date of the transgenic plant and the blooming date of the transgenic plant, wherein the transgenic plant is a transformant of a plant produced by introducing an expression vector into the plant, and wherein the expression vector contains a polynucleotide encoding a protein of interest and a promoter capable of modulating the expression of RNA or a seed storage protein which is isolated from a plant capable of highly expressing the RNA and the seed storage protein under nitrogen-rich conditions.

(57) 要約: 本発明は、所望のタンパク質を高生産できる遺伝子組換え植物の栽培方法を提供する。より具体的に

は、本発明は、高窒素条件下でRNAおよび種子貯蔵タンパク質を高発現する植物から単離されるRNAおよび種子貯蔵タンパク質の発現を調節するプロモーターと、目的タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターが導入されて形質転換された遺伝子組換え植物を、その遺伝子組換え植物の開花予定日の30日前から開花日まで間の一定期間、硝酸態窒素が70mg/L〜750mg/L、および/または、アンモニウム態窒素が70mg/L〜750mg/Lとなるよう調整した培地にて栽培することを含む、遺伝子組換え植物の栽培方法を提供する。

WO 2010/087048 A1



(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL,
NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ,
CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,
TD, TG).

規則 4.17 に規定する申立て:

- 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に
関する申立て (規則 4.17(v))
- 添付公開書類:
- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))

明 細 書

発明の名称 ： 遺伝子組換え植物の栽培方法

技術分野

[0001] 本発明は、遺伝子組換え植物の栽培方法に関し、詳しくは、所望の目的タンパク質を高発現するように形質転換された遺伝子組換え植物の栽培方法および所望の目的タンパク質を含む種子を生産する方法に関する。

背景技術

[0002] 植物の品種改良法として、遺伝子組換え技術が応用され、すでに、除草剤耐性や害虫耐性などの機能が付加された大豆、トウモロコシ、ナタネ、ワタ、ジャガイモ等の遺伝子組換え農作物が開発され実用化されている。さらに近年では、医薬または検査薬等の機能性タンパク質やペプチドを生産する手段として、有用な外来遺伝子を植物の染色体上に導入し、遺伝子組換え植物を作出する研究開発も進められている。なお、遺伝子組換え植物を用いて生産する機能性成分には、導入した遺伝子の産物であるタンパク質やペプチドだけでなく、例えば導入した酵素タンパク質の反応による生成物等も含まれる。植物での機能性成分生産には多くの利点があり、特に、動物トランスジェニック系に比べてコストが削減されること、市場規模に応じた生産規模の調節が容易なこと、ウイルスおよびプリオンなどの動物由来病原体が混入する恐れがないことがある。

[0003] 機能性成分を効率的に植物で生産する技術に関しては、例えば、機能性成分の発現の時期、発現の場所、発現量を制御するために、機能性成分を蓄積する組織に特異的なプロモーターを遺伝子組換えに利用する方法が開示されている（例えば、特許文献1参照）。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特開2007-306941号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] しかしながら、機能性成分を植物体内に高蓄積させる技術を開発する場合、上記の特許文献 1 では、機能性成分を高発現させるプロモーターを遺伝子組換えに利用する技術に留まり、機能性成分の生産性という観点からは未だ改良の余地がある。

[0006] 上記のような状況に鑑み、本発明は、所望の機能性成分を発現するように形質転換された遺伝子組換え植物を用いて、所望の機能性成分をより収量性を高く生産できる方法を提供することを目的とする。なお、本明細書において、遺伝子組換え植物に高発現させることを所望する任意のタンパク質やペプチドのことを「目的タンパク質」という場合がある。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、鋭意研究を進めたところ、所定の高窒素栽培条件下で発現量が増える RNA および種子貯蔵タンパク質を検出することに成功した。さらに、本発明者らは、この検出方法により得られた RNA および種子貯蔵タンパク質の発現を調節するプロモーターを単離し、このプロモーターとその下流に所望の目的タンパク質をコードするポリヌクレオチドを導入した遺伝子組換え植物の作製に成功すると共に、このような遺伝子組換え植物を所定の高窒素栽培条件下で栽培することにより、目的タンパク質を収量性高く生産させることに成功した。本発明は、下記遺伝子組換え植物の栽培方法および種子の生産方法を提供するものである。なお、本明細書において「植物の栽培」の用語は、「植物の生産」と置き換え得る。

[0008] 〔1〕下記式（1）：

$$V/W > 1.0 \quad \cdots (1)$$

（但し、式（1）において、Vは、開花予定日の30日前から開花日までの間の一定期間、硝酸態窒素が70mg/L～750mg/L、および／または、アンモニウム態窒素が70mg/L～750mg/Lとなるように調整した培地にて所定の植物を栽培した場合における該植物の種子に含まれるRNA量である。Wは、開花予定日の30日前から開花日までの間の一定期間

、窒素 $0 \text{ mg/L} \sim 50 \text{ mg/L}$ となるように調整した培地にて該植物を栽培した場合における該植物の種子に含まれる RNA 量である。)

を満たす種子で発現する RNA の発現を調節するプロモーターと、前記プロモーターの下流に位置し目的タンパク質をコードするポリヌクレオチドとを含む発現ベクターが導入されて形質転換された遺伝子組換え植物を、該遺伝子組換え植物の開花予定日の 30 日前から開花日まで間の一定期間、硝酸態窒素が $70 \text{ mg/L} \sim 750 \text{ mg/L}$ 、および/または、アンモニウム態窒素が $70 \text{ mg/L} \sim 750 \text{ mg/L}$ となるよう調整した培地にて栽培することを含む、遺伝子組換え植物の栽培方法。

〔2〕下記式 (2) :

$$X/Y > 1.0 \quad \dots (2)$$

(但し、式 (2) において、X は、開花予定日の 30 日前から開花日までの間の一定期間、硝酸態窒素が $70 \text{ mg/L} \sim 750 \text{ mg/L}$ 、および/または、アンモニウム態窒素が $70 \text{ mg/L} \sim 750 \text{ mg/L}$ となるように調整した培地にて所定の植物を栽培した場合における該植物の種子に含まれる種子貯蔵タンパク質の含有量である。Y は、開花予定日の 30 日前から開花日までの間の一定期間、窒素 $0 \text{ mg/L} \sim 50 \text{ mg/L}$ となるように調整した培地にて該植物を栽培した場合における該植物の種子に含まれる該種子貯蔵タンパク質の含有量である。)

を満たす種子貯蔵タンパク質の発現を調節するプロモーターと、前記プロモーターの下流に位置し目的タンパク質をコードするポリヌクレオチドとを含む発現ベクターが導入されて形質転換された遺伝子組換え植物を、該遺伝子組換え植物の開花予定日の 30 日前から開花日まで間の一定期間、硝酸態窒素が $70 \text{ mg/L} \sim 750 \text{ mg/L}$ 、および/または、アンモニウム態窒素が $70 \text{ mg/L} \sim 750 \text{ mg/L}$ となるよう調整した培地にて栽培することを含む、遺伝子組換え植物の栽培方法。

〔3〕前記所定の植物と前記遺伝子組換え植物とが、同種の植物種である、上記〔1〕および〔2〕に記載の遺伝子組換え植物の栽培方法。

〔４〕前記所定の植物がイネ科の植物であり、前記遺伝子組換え植物がイネ科の植物である、上記〔３〕に記載の遺伝子組換え植物の栽培方法。

〔５〕前記プロモーターが、グルテリン、グロブリン、およびプロラミンからなる群より選ばれる種子貯蔵タンパク質の発現を調節するプロモーターである、上記〔４〕に記載の遺伝子組換え植物の栽培方法。

〔６〕前記遺伝子組換え植物の栽培を、水耕栽培によって行う、上記〔１〕から〔５〕のいずれか一項に記載の遺伝子組換え植物の栽培方法。

〔７〕上記〔１〕から〔６〕のいずれか一項に記載の遺伝子組換え植物を栽培し、種子を採集することを含む、種子の生産方法。

〔８〕前記植物がイネであり、前記種子が米である、上記〔７〕に記載の種子の生産方法。

発明の効果

[0009] 本発明によれば、所望の目的タンパク質をより収量性高く生産することができる。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]図１は、栽培管理等のスケジュールの概要を示す図である。

[図2]図２は、タンパク質の２次元ゲル電気泳動の画像解析結果を示す図である。

[図3]図３は、発現ベクター構築のプロセスを模式的に示す図である。

発明を実施するための形態

[0011] 本発明の遺伝子組換え植物の栽培方法は、所定の特徴を備える遺伝子組換え植物を所定の条件下で栽培するものである。そこで、以下、本発明の実施形態について、下記の順を追って詳説することとする。

- １．遺伝子組換え植物の作製方法
- ２．遺伝子組換え植物の栽培方法および種子の生産方法

[0012] １．遺伝子組換え植物の作製方法

本発明において用いられる遺伝子組換え植物を作製する方法は、概要として次の工程Ａと工程Ｂの２つの工程に分けることができる。工程Ａは、所定

の植物において、高窒素栽培条件下で高発現するRNAおよび種子貯蔵タンパク質を検出する工程である。工程Bは、高窒素栽培条件下で高発現するRNAおよび種子貯蔵タンパク質の発現を調節するプロモーターを単離し、目的タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを調製し、その発現ベクターを宿主植物細胞に導入して遺伝子組換え植物を作製する工程である。

[0013] <工程A：RNAの検出>

工程AのRNAの検出においては、少なくとも2つの異なる窒素条件下で植物を栽培し、RNAの含有量の違いを指標として、ある植物種において所定の高窒素栽培条件下で高発現するRNAを検出するものである。

工程AのRNAの検出方法の実施形態としては、下記式(1)を満たすRNAを検出する。

$$V/W > 1.0 \quad \dots (1)$$

(但し、式(1)において、Vは、開花予定日の30日前から開花日までの間の一定期間、硝酸態窒素が70mg/L～750mg/L、および/または、アンモニウム態窒素が70mg/L～750mg/Lとなるように調整した培地にて所定の植物を栽培した場合における該植物の種子に含まれるRNA量である。Wは、開花予定日の30日前から開花日までの間の一定期間、窒素0mg/L～50mg/Lとなるように調整した培地にて該植物を栽培した場合における該植物の種子に含まれるRNA量である。)

[0014] 上記式(1)を満たすRNAは、高窒素栽培条件下で高発現するRNAである。このようにして検出されたRNAの情報から高窒素栽培条件下でRNAの発現を促進するプロモーターなどの発現調節領域を採集することができる。

<工程A：種子貯蔵タンパク質の検出>

工程Aの種子貯蔵タンパク質の検出においては、少なくとも2つの異なる窒素条件下で植物を栽培し、種子貯蔵タンパク質の蓄積量の違いを指標として、ある植物種において所定の高窒素栽培条件下で高発現する種子貯蔵タン

パク質を検出するものである。

工程Aの種子貯蔵タンパク質の検出方法の実施形態としては、下記式（2）を満たす種子貯蔵タンパク質を検出する。

$$X/Y > 1.0 \quad \dots (2)$$

（但し、式（2）において、Xは、開花予定日の30日前から開花日までの間の一定期間、硝酸態窒素が70mg/L～750mg/L、および/または、アンモニウム態窒素が70mg/L～750mg/Lとなるように調整した培地で植物を栽培したときの該植物の種子貯蔵タンパク質含有量である。Yは、開花予定日の30日前から開花日までの間の一定期間、窒素0mg/L～50mg/Lとなるように調整した培地で植物を栽培したときの該植物の種子貯蔵タンパク質含有量である。）

[0015] 上記式（2）を満たす種子貯蔵タンパク質は、高窒素栽培条件下で高発現する種子貯蔵タンパク質である。このようにして検出された種子貯蔵タンパク質の情報から高窒素栽培条件下で種子貯蔵タンパク質の発現を促進するプロモーターなどの発現調節領域を採集することができる。

[0016] <被検対象の植物>

工程Aにおける「所定の植物」とは、被検対象とする植物のことを意味する。工程Aにおいて被検対象とする植物は、RNAおよび種子貯蔵タンパク質の発現を促進するプロモーターを探索する対象とする植物であり、後に作製する遺伝子組換え植物の種類等の条件も参酌しつつ、適宜選択してよい。RNAおよび種子貯蔵タンパク質の検出対象となる植物としては、種子が形成されるものであれば、特に限定されるものではない。例えば、双子葉植物としては、タバコ、ナタネ、ダイズ等を、単子葉植物としては、イネ、トウモロコシ、オオムギ、コムギ等の穀類や、アスパラガス等を、代表的なものとして挙げることができる。これらのうちでもイネは、種子中へのタンパク質の蓄積能力が高く、種子の保存性が良好という点で好適な植物である。

[0017] <栽培条件>

被検対象となる植物は、少なくとも2つの異なる窒素条件下で栽培される

。好ましい実施形態としては、第1の栽培条件および第2の栽培条件で栽培を行う。第1の栽培条件下は、供給される窒素濃度が高い条件下である。他方、第2の栽培条件は、第1の栽培条件より相対的に窒素濃度の低い条件下である。具体的には、次のような条件が例示される。

[0018] 第1の栽培条件：開花予定日の30日前から開花日までの間の一定期間に、硝酸態窒素が50mg/L～750mg/L、および/または、アンモニウム態窒素が50mg/L～750mg/Lとなるよう調整した培地で栽培する。

[0019] 第2の栽培条件：開花予定日の30日前から開花日までの間の一定期間に、窒素0mg/L～50mg/Lとなるよう調整した培地で栽培する。

[0020] 培地中の窒素条件は、開花予定日の30日前の時点から開始する。開花予定日は植物ごとに異なるが、栽培作物類でのどの時点かは各植物ごとに研究がなされている。例えば、イネの場合であれば、開花予定日の30日前は、幼穂分化期に該当する。

[0021] 培地中の窒素条件は、開花予定日の30日前から開花日の間の一定期間において調整する。この期間中に少なくとも一度高窒素条件に植物を曝し、一定の生理的刺激を与えることが重要である。すなわち、ここでいう「一定期間」とは、植物に対し一定の生理的刺激を与えるに足る期間でよい。高窒素条件にする期間は、植物の生育状態や植物の種類などの条件によって適宜調整してよい。植物の生育状態や植物の種類などの条件によっても異なるが、好ましくは1週間程度、より好ましくは2週間程度、高窒素栽培条件下で栽培することが好ましい。また、開花予定日の30日前を経過した直後および/または開花の直前の一定期間に高窒素栽培条件下に植物をおくことが好ましい。イネの場合、開花予定日の30日前から開花日までの全期間に渡って高窒素栽培条件下に置いてもよい。

[0022] 植物の栽培においては、植物による養分の吸収や、培地の肥料を保持する能力等に起因して、培地中の窒素濃度は容易に変動する。上記第1および第2の栽培条件では、培地中の窒素濃度を常に一定に保つ必要は必ずしもなく

、上記の濃度範囲の間に収まるように施肥管理を行えばよい。培地中の窒素濃度を上記のように管理する限りにおいて、施肥のタイミング、回数、肥料の濃度などは適宜調整してよい。

[0023] また、培地中の窒素濃度の測定は、培地の種類などに応じて、硝酸イオンメーターやアンモニア態窒素メーター、また、農林水産省が定める肥料分析法などの、一般的な、土壌分析法、肥料分析法に基づき行うことができる。

[0024] 硝酸態窒素とは、硝酸イオンのように酸化窒素の形態で存在する窒素成分のことである。通常は NO_3^- の形の硝酸イオンに金属が結合した硝酸塩の形で存在している。

また、アンモニウム態窒素とは、窒素成分のうちアンモニウム塩の形態で存在する窒素成分のことである。

[0025] 培地中の窒素源の調整は、培地中の硝酸態窒素が $70\text{ mg/L} \sim 750\text{ mg/L}$ 、および/または、培地中のアンモニウム態窒素が $70\text{ mg/L} \sim 750\text{ mg/L}$ となるように行う。すなわち、硝酸態窒素とアンモニウム態窒素の両方を窒素源として用い、それらの濃度をそれぞれ調整してもよいし、いずれか一方のみを窒素源として用い、その濃度を調整してもよい。好ましくは、両者を窒素源として用いる。硝酸態窒素とアンモニウム態窒素の含有量の比率は、例えば、 $750 : 0 \sim 0 : 750$ 、好ましくは $100 : 1 \sim 1 : 100$ であり、より好ましくは $30 : 1 \sim 1 : 30$ であり、より好ましくは $10 : 1 \sim 1 : 10$ であり、さらに好ましくは、 $3 : 1 \sim 1 : 3$ 程度である。

[0026] 第1の栽培条件における硝酸態窒素の含有量は、 $70\text{ mg/L} \sim 750\text{ mg/L}$ であり、好ましくは $100\text{ mg/L} \sim 700\text{ mg/L}$ であり、より好ましくは $150\text{ mg/L} \sim 700\text{ mg/L}$ である。硝酸態窒素の含有量を 70 mg/L 以下に調整した場合、種子貯蔵タンパク質含有量が減少し、第2の栽培条件の場合と比較する適切な指標を得にくくなりやすい。他方、硝酸態窒素の含有量を 750 mg/L 以上に調整した場合、根腐れを起こし生育不良となりやすい。

[0027] 第1の栽培条件におけるアンモニウム態窒素の含有量は、 $70\text{ mg/L} \sim 750\text{ mg/L}$ であり、好ましくは $100\text{ mg/L} \sim 700\text{ mg/L}$ であり、より好ましくは $150\text{ mg/L} \sim 700\text{ mg/L}$ である。アンモニウム態窒素の含有量を 70 mg/L 以下に調整した場合、種子の貯蔵タンパク質含有量が減少し、第2の栽培条件の場合と比較する適切な指標を得にくくなりやすい。他方、アンモニウム態窒素の含有量を 750 mg/L 以上に調整した場合、根腐れを起こし生育不良となりやすい。

[0028] 上記のように、異なる所定の窒素条件下とする以外の点については、栽培する植物の種類などに応じ、適宜その植物に適した施肥管理を行ってよい。培地に含まれる他の成分としては、リン、カリウム、マンガン、ホウ素、鉄、カルシウム、銅、亜鉛、マグネシウム等が挙げられる。

[0029] 植物の栽培は、水耕栽培または土耕栽培が挙げられる。土耕栽培では、土中に肥料成分が吸着されるため、肥料成分の急激な変動を抑制できるという利点があるが、その反面、植物が利用できる肥料成分が減少してしまう。他方、水耕栽培では、培地中の肥料成分はすべて植物が利用できる状態である。本発明の植物の選抜方法では、窒素を所定の条件に整えるように施肥管理を行う必要があるため、水耕栽培の方が培地中の肥料成分を調整しやすいという点においては、より好ましい。

[0030] <種子に含まれるRNAの測定およびRNAの決定>

上記第1および第2の栽培条件下でそれぞれ栽培された植物から得られた種子に含まれるRNAを測定する。第1の栽培条件下で栽培された植物の種子に含まれるRNA量をV、第2の栽培条件下で栽培された植物の種子に含まれるRNA量をWとする。

[0031] 上記RNA含有量VおよびWは、様々な公知のRNA検出方法を利用し得る。一実施形態としては、例えば、次のようにマイクロアレイを利用して、RNA量を測定することができる。まず、種子からRNAを抽出し、蛍光標識をしたcDNAを合成した後に、マイクロアレイ上のDNA断片とハイブリダイズさせる。スキャナーを用いてマイクロアレイ画像を取り込んだ後、

解析ソフトを用いて各スポットの蛍光強度を算出する。算出されたスポット強度からRNA量を求めることができる。RNAを抽出する種子としては、RNAが盛んに合成されている開花後15日から開花後25日までの種子が望ましい。

[0032] 測定対象とするRNAは、種子に含まれるRNAであればよい。V/W値を求めるためのRNAとしては、例えば、イネの場合であれば、例えば、AK101497、AK120826、AJ002893、Os05g0329200、AK107271（グルテリンA-3）、AK102194、AK120697、AK067141、AK065009、AF017360、AK071205、AK059164、AK107238、AB016505、AK099086、AY166458、AY987390（グルテリンB-2）、AK107314、X15833、AY196923（グルテリンB-5）、AK061894、AK107343（グルテリンB-1）、AK063995、J100041C23、J090009I07、AK065456、AK107314、AK107633、U43530、AK064310、AK064485、AK101309、AK107983、AK099918、AK100306、X83434、AK070414、AK103220、AK121856、AK062758、AK103306、AK061207、AK068266、Os06g0598500、AK119900、L19598、AK070851、Os01g0840300、AK059805、AK106244、AK108127、AK108230、AK061237、AK062517、AK065259、AK065604、AK106964、AK060983、J075074G08、AK099719（GenBank Accession No.）、グルテリン、グロブリン、プロラミンなどが挙げられる。

[0033] RNA含有量VおよびWに基づき、下記式（1）：

$$V/W > 1.0 \quad \dots (1)$$

を満たすRNAを選抜する。式（1）を満たすということは、所定の高窒素

栽培条件下において発現量が多くなるRNAである蓋然性が高い。また、このようなRNAをコードするDNAのプロモーターは、高窒素栽培条件下でタンパク質の発現をより促進する蓋然性が高い。 V/W の値は、好ましくは1.25以上であり、より好ましくは1.5以上であり、さらに好ましくは2.0以上である。他方、 V/W の値が1以下の場合、培地中の窒素量を増やしても、所望の目的タンパク質を高生産させる効果は期待できない。

[0034] <種子貯蔵タンパク質含有量の測定および種子貯蔵タンパク質の決定>

上記第1および第2の栽培条件下でそれぞれ栽培された植物から得られた種子に貯蔵されるタンパク質を測定する。第1の栽培条件下で栽培された植物の種子貯蔵タンパク質含有量をX、第2の栽培条件下で栽培された植物の種子貯蔵タンパク質含有量をYとする。

[0035] 上記種子貯蔵タンパク質含有量XおよびYは、様々な公知のタンパク質検出方法を利用し得る。一実施形態としては、例えば、次のように電気泳動法を利用して、タンパク質含有量を測定することができる。まず、二次元ゲル電気泳動法により各種子貯蔵タンパク質をゲル上で単一のスポットに分離する。次に、ゲルの情報をスキャナーで画像ファイルに変換した後、画像解析ソフトを用いて、各スポットの蛍光強度として算出する。算出されたスポット強度からタンパク質含有量を求めることができる。タンパク質を抽出する種子としては、種子貯蔵タンパク質が十分に蓄積される開花後30日以降、好ましくは開花後45日以降の種子が望ましい。

[0036] 測定対象とするタンパク質は、種子貯蔵タンパクであればよい。 X/Y 値を求めるための種子貯蔵タンパク質としては、例えば、イネの場合であれば、例えば、グルテリン、グロブリン、プロラミンタンパク質などが挙げられ、より具体的には、グルテリンB-1、グルテリンB-2、グルテリンB-5、グルテリンA-3、グロブリン、13KDaプロラミンなどが挙げられる。

[0037] 種子貯蔵タンパク質含有量XおよびYに基づき、下記式(2)：

$$X/Y > 1.0 \quad \dots (2)$$

を満たす種子貯蔵タンパク質を選抜する。式（２）を満たすということは、所定の高窒素栽培条件下において発現量が多くなる種子貯蔵タンパク質である蓋然性が高い。また、このような種子貯蔵タンパク質のプロモーターは、高窒素栽培条件下でタンパク質の発現をより促進する蓋然性が高い。 X/Y の値は、好ましくは１．５以上であり、より好ましくは２．０以上である。他方、 X/Y の値が１以下の場合、培地中の窒素量を増やしても、所望の目的タンパク質を高生産させる効果は期待できない。

[0038] 以上のようにして、所定の高窒素栽培条件下において発現量が多くなるRNAおよび種子貯蔵タンパク質を選抜し得る。また、選抜されたRNAおよび種子貯蔵タンパク質のプロモーターは、高窒素栽培条件下でタンパク質の発現をより促進する。このようなプロモーターは以下に説明する遺伝子組換え植物に導入することにより、所定の高窒素栽培条件下で所望の目的タンパク質を高発現する遺伝子組換え植物の材料となり得る。

[0039] <工程B：形質転換体の作製>

工程Bでは、まず高窒素栽培条件下で高発現するRNAおよび種子貯蔵タンパク質の発現を調節するプロモーターを単離する。このようなプロモーターは、例えば、上記工程Aで被検対象とされ、高窒素栽培条件下で高発現するRNAおよび種子貯蔵タンパク質が検出された植物から単離することができる。プロモーターは、RNAおよび種子貯蔵タンパク質をコードする核酸の上流に位置する発現調節領域から単離し得る。

[0040] RNA並びに種子貯蔵タンパク質およびそれをコードする核酸配列については既知のデータベースなどにより様々なものが知られている。RNAおよび種子貯蔵タンパク質の発現を調節するプロモーターの位置および配列もまた公知となっている場合がある。本発明においては、公知の配列を利用してプロモーターを特定してもよいし、工程Aで選抜されたRNAおよび種子貯蔵タンパク質をコードする核酸配列を探索し、その上流の核酸配列をプロモーターとして利用してもよい。プロモーターの特定は、例えば、転写領域の上流部にあるTATAボックス、CCAATボックス、GCリッチな配列な

どのプロモーターに共通的に観察される配列を手がかりに特定してもよいし、既知のタンパク質をコードする核酸とプロモーターと推察される核酸配列を連結し、既知のタンパク質の発現量を測定して特定してもよい。

[0041] <発現ベクターの構築>

目的タンパク質を発現させるための発現ベクターを構築する。発現ベクターは、少なくとも上記のようにして特定されたプロモーターと目的タンパク質をコードする核酸とを含む。発現ベクターにはその他にもターミネーター、公知の発現促進配列、マーカー配列などを挿入してもよい。

[0042] 上記のようにして特定されたプロモーターは、ベクターに組み込めるように調製する。プロモーターは、選抜された植物の細胞から単離してもよいし、また配列を特定し、合成してもよい。ベクターは植物細胞への導入に適したものが好ましい。またベクターは公知または市販のものを利用し得る。

[0043] 目的タンパク質は、種子中に高発現させることを予定する任意のタンパク質やペプチドでよい。好ましい一実施形態としては、所謂機能性タンパク質などが挙げられる。機能性タンパク質とは、抗菌成分、酵素等の人類にとって有用なタンパク質を意味する。目的タンパク質をコードする核酸は、cDNAまたはゲノムDNAのクローニングなどの手法によって得ることができる。また、予めそのDNA配列が明らかにされているものであれば、これらを化学合成して得てもよい。さらに、DNA配列が明らかでなくとも、アミノ酸配列が明らかであれば、アミノ酸配列から推定されるDNA配列を化学合成し得る。

[0044] プロモーターの下流に目的タンパク質をコードする核酸を配置し、これをベクター内に挿入し、発現ベクターを作製できる。核酸断片を所定の位置で切断、結合させる方法は、公知の制限酵素等を利用することにより可能である。

[0045] ベクターの構築に関する一実施形態を図3を参照しつつ、説明する。

まず、ステップ(S1)として、工程Aで選抜された植物の細胞に含まれる染色体Gに含まれるプロモーター(pmr1)を単離する。プロモーター

(p m r 1) は、ターミネーター (t m r 1) と共にタンパク質 (p t n 1) の発現を調整する領域を構成している。この染色体から P C R などの手法により、プロモーター (p m r 1) とターミネーター (t m r 1) を増幅する。P C R プライマーは、染色体 G においてプロモーター (p m r 1) およびターミネーター (t m r 1) をそれぞれ挟む前後の配列に基づいて適宜設計できる。

[0046] 次にステップ (S 2) として、増幅して得られたプロモーター (p m r 1) とターミネーター (t m r 1) の間に、目的タンパク質をコードする核酸 (p t n 2) を挟む核酸断片 (F 2) を構築する。

[0047] さらにステップ (S 3) として、ステップ (S 2) で得られた核酸断片 (F 2) をプラスミドベクター (v c t) に組み込む。このようにして、発現ベクターを構築できる。

[0048] <宿主とする植物>

上記のようにして作製されたベクターが導入される宿主としては、遺伝子組換え植物として目的タンパク質を生産する植物の細胞が用いられる。宿主とする植物の種類は、上記のプロモーターが認識され、目的タンパク質を発現し得るものであればよく、その他の点について限定されるものではない。宿主とする植物は、栽培管理の容易さ、栽培地の環境、成育期間、収穫の容易性、並びに、種子の性質、大きさ及び収量などの条件を考慮し、目的タンパクの生産面から好適なものを適宜選択してよい。また、上記にて取得した R N A および種子貯蔵タンパク質の発現を促進するプロモーターの由来と同じ種類の植物を宿主とすることにより、遺伝子発現システム上の弊害は避けやすい。そのため、好ましい一実施形態としては、プロモーターの由来と同じ植物種を宿主として選択する形態が挙げられる。

[0049] 宿主とする植物、すなわち、遺伝子組換え植物として栽培が予定される植物としては、例えば、タバコ、ナタネ、ダイズ等の双子葉植物や、イネ、トウモロコシ、オオムギ、コムギ等の穀類や、アスパラガス等の単子葉植物などを挙げることができる。これらのうちでもイネは、種子中へのタンパク質

の蓄積能力が高く、種子の保存性が良好という点で好適な植物である。

[0050] <構築した発現ベクターの植物細胞への導入>

次に、構築した発現ベクターを用いて植物の形質転換細胞を作製する。形質転換される植物細胞は、工程の簡略化という観点からは、ホストとなる植物細胞は、これをそのまま再生し、遺伝子組換え植物として大量に栽培し得る植物であることが好ましい。

[0051] 構築した発現ベクターを植物細胞に導入する方法としては、例えば、マイクロインジェクション法、エレクトロポレーション法、ポリエチレングリコール法、融合法、高速バリスティックペネトレーション法等の物理的・化学的手法を、植物または動物細胞への直接導入法として使用することができる（I. Potrykus、Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.、42:205、1991）。また、植物細胞に対しては、植物に感染するウイルスや細菌を介して行う、間接導入法も使用することができる（I. Potrykus、Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.、42:205、1991）。この場合、ウイルスとしては、カリフラワーモザイクウイルス、ジェミニウイルス、タバコモザイクウイルス、ブロムモザイクウイルス等が使用でき、細菌としては、アグロバクテリウム・ツメファシエンス、アグロバクテリウム・リゾジェネス等が使用できる。

[0052] <形質転換体の再分化>

次に、上記の方法で外来遺伝子を導入した植物細胞から、組換え組織または組換え個体を培養する。遺伝子導入処理を行った細胞を、適宜、目的遺伝子や選抜マーカー遺伝子による特定形質の発現、遺伝子の欠失等による特定形質の消失などを指標として選抜を行いつつ、定法によって増殖させ、再分化させ、組換え組織または組換え個体を培養することができる。再分化して得られた植物から種子を採取し、得られた種子を利用して、遺伝子組換え体を繁殖させることができる。

[0053] 必ずしも明確ではないが、本発明により所望の目的タンパク質の生産性が

向上する一つの理由としては、次のように推測される。開花期前の生殖成長期にアミノ酸生成の原料となる窒素分を過剰に与えることにより、アミノ酸の合成に関与する遺伝子を活性化できると推察される。開花期後の種子の登熟期に入ると、植物体中に蓄積したアミノ酸と、活性化したアミノ酸の合成に関与する遺伝子の影響で種子のタンパク質合成遺伝子が活性化すると推察される。さらに、他のタンパク質合成遺伝子と比較して、より活性化されるタンパク質合成遺伝子のプロモーター領域を利用することで、より効率よく目的タンパク質が生産されることが考えられる。

[0054] 2. 遺伝子組換え植物の栽培方法および種子の生産方法

本発明の遺伝子組換え植物の栽培方法は、上記「1. 遺伝子組換え植物の作製方法」のようにして準備し得る遺伝子組換え植物を所定の条件下で栽培するものである。なお、具体的な実施形態については下記にて後述するが、上記「1. 遺伝子組換え植物の作製方法」のようにして一旦、高窒素栽培条件下で目的タンパク質を高発現するように形質転換された遺伝子組換え植物を得た後は、上記のような工程A：RNAおよび種子貯蔵タンパク質の検出や、工程B：形質転換の作製を、必ずしもそれぞれ繰り返す必要はない。すなわち、一旦高窒素栽培条件下で目的タンパク質を高発現するように形質転換された遺伝子組換え植物を得た後は、その遺伝子組換え植物をその植物種の通常の繁殖方法にしたがって系統維持し、その植物を繰り返し栽培してもよい。

[0055] <工程C：遺伝子組換え植物の栽培>

上記「1. 遺伝子組換え植物の作製方法」により作製された遺伝子組換え植物を、該植物の開花予定日の30日前から開花日までの間の一定期間、硝酸態窒素が70mg/L～750mg/L、および／または、アンモニウム態窒素が70mg/L～750mg/Lとなるよう調整した培地で栽培する。

[0056] 工程Cは、遺伝子組換え植物を所定の高窒素栽培条件下で栽培する工程である。工程Cにおける栽培条件の実施形態は、上記「1. 遺伝子組換え植物

の作製方法」における「第2の栽培条件」（すなわち低窒素条件とする場合）にのみ関する部分を除き、同様に適用し得る。言い換えると、工程Cにおける栽培条件の実施形態としては、栽培の窒素条件に関しては上記「1. 遺伝子組換え植物の作製方法」における「第1の栽培条件」としての窒素条件が同様に適用され、その他の栽培に関する諸条件：所定の窒素条件とする開始時期およびその一定期間の形態、培地中の窒素濃度を制御するための形態、培地中の窒素濃度の測定の形態、培地中の窒素源の調整の形態、施肥管理の形態、並びに、水耕栽培または土耕栽培の形態などは、上記「1. 遺伝子組換え植物の作製方法」の＜栽培条件＞に記載の実施形態と同様に適用し得る。また、窒素条件以外の具体的な栽培条件は、遺伝子組換え植物についての植物の種類に応じて適宜調整してよい。

[0057] ＜種子の生産方法＞

本発明で栽培された遺伝子組換え植物は、そのまま、あるいは導入された目的タンパク質を分離・精製した形で摂取して、利用することができる。

遺伝子組換え植物が種子植物である場合、本発明の遺伝子組換え植物の栽培方法は、種子の生産方法でもある。種子タンパク質の貯蔵性が高いことから、種子物としては、イネ科の植物、より好ましくはイネが挙げられる。

[0058] 種子の生産の場合、種子が形成され、所定の成熟度に達したら採取する。ここでいう採取とは、農業、園芸などの分野でいう収穫と同義である。したがって、種子そのものを単離することのみならず、栽培地から種子を含む植物体を回収することを広く含む。

[0059] 本発明の種子植物の生産方法で生産された種子には、目的タンパク質が高発現している。種子からその目的タンパク質を精製してもよいし、或いは、その種子自体をそのまま利用してもよい。目的タンパク質が、ヒトが摂取可能な機能性タンパク質である場合、種子をそのまま或いは調理して簡便に摂取することができる。

[0060] 高窒素条件下で高発現を促進するプロモーターを発見し、これを組み込んだ遺伝子組換え体を作製した種（または品種）を保存することにより、以後

は、RNAおよび種子貯蔵タンパク質の検出やそれに基づく遺伝子組換え植物の作製を、毎度繰り返す必要はない。例えば、ある植物種について高窒素栽培条件下で高発現し得るRNAおよび種子貯蔵タンパク質の発現を調節するプロモーターが一旦特定されれば、上記工程AのRNAおよび種子貯蔵タンパク質の検出を毎度行う必要はなく、その知見に基づいて遺伝子組換え植物を作製し得る。

[0061] 例えば、イネからプロモーターを単離する場合であれば、単離するプロモーターとして好ましくは、AK101497、AK120826、AJ002893、Os05g0329200、AK107271（グルテリンA-3）、AK102194、AK120697、AK067141、AK065009、AF017360、AK071205、AK059164、AK107238、AB016505、AK099086、AY166458、AY987390（グルテリンB-2）、AK107314、X15833、AY196923（グルテリンB-5）、AK061894、AK107343（グルテリンB-1）、AK063995、J100041C23、J090009I07、AK065456、AK107314、AK107633、U43530、AK064310、AK064485、AK101309、AK107983、AK099918、AK100306、X83434、AK070414、AK103220、AK121856、AK062758、AK103306、AK061207、AK068266、Os06g0598500、AK119900、L19598、AK070851、Os01g0840300、AK059805、AK106244、AK108127、AK108230、AK061237、AK062517、AK065259、AK065604、AK106964、AK060983、J075074G08、AK099719（GenBank Accession No.）、グルテリン、グロブリン、プロラミンなどのプロモーターが挙げられ、より好ましくは、グルテリンB-1、グルテリンB-2、グルテリンB-5、グルテリンA-3、グロブリン、または、13K

D a プロラミンなどのプロモーターが挙げられ、さらに好ましくはグルテリン B-1、グルテリン B-5 のプロモーターが挙げられる。これらのプロモーターは、高窒素栽培条件下でその下流にある構造遺伝子の発現を促進させ得る。これらのプロモーターを用いる場合、形質転換される宿主となる植物としてはイネが好適である。すなわち、本発明の遺伝子組換え植物の栽培方法の他の実施形態としては、 $V/W > 1.0$ となる種子に含有される RNA をコードする DNA の発現を調節するプロモーターおよび、グルテリン、グロブリン、およびプロラミンなどから選ばれる種子貯蔵タンパク質の発現を調節するプロモーターと、高発現させることを予定している目的タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを導入することにより形質転換された遺伝子組換え植物を、該植物の開花予定日の 30 日前から開花日までの間の一定期間、硝酸態窒素が $70 \text{ mg/L} \sim 750 \text{ mg/L}$ 、および/または、アンモニウム態窒素が $70 \text{ mg/L} \sim 750 \text{ mg/L}$ となるよう調整した培地で栽培する形態も挙げられる。

[0062] さらに、一旦上記のような遺伝子組換え植物が作製されれば、その植物種の通常の繁殖方法に従って、その遺伝子組換え植物の系統を維持し、これを上記工程 C に従って栽培してもよい。

実施例

[0063] 以下、実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明に係る実施例に限定されるものではない。なお、以下の実施例において、更に詳細な実験操作は、特に述べる場合を除き、分子生物学的手法については Molecular Cloning (Sambrook et. al., 1989) または、製造業者の取り扱い説明書に従い行われた。

[0064] [実施例 1]

1. 植物の栽培

下記のように第 1 の栽培条件および第 2 の栽培条件で、イネを栽培した。栽培のスケジュールの概要を図 1 に示す。また、用いた栽培液 A および栽培液 B の組成を表 1 に示す。

[0065] [表1]

表1:栽培液の成分表

成分	栽培液A	栽培液B
	含有量(mg/L)	
KNO_3	38.9	621.8
NH_4NO_3	21.8	349.5
$(\text{NH}_4)_2\cdot\text{SO}_4$	8.3	132.7
$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	35.7	571.4
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	47.0	752.6
硝酸態窒素(mg/L)	33	600
アンモニア態窒素(mg/L)	17	200

[0066] <RNA含有量Vおよび種子貯蔵タンパク質Xを測定するための第1の栽培条件>

イネの一品種である日本晴の種子を次亜塩素酸とエタノールで殺菌後、滅菌水が入ったシャーレに均等に広げ、遮光した後、28度で5日間培養した。

[0067] 人工太陽光室の室内にて、育苗箱の中に水を含ませたウレタンマットを敷き、出芽した種子を播種した。明条件：気温28度、湿度50%、11時間、暗条件：気温23度、湿度50%、13時間で15日間苗を培養した。

[0068] 湛液方式の栽培ベッド（M式水耕研究所製）に100Lの栽培液A（表1参照）を充填し、得られた苗を1本ずつ77株植え付け、明条件：気温28度、湿度50%、11時間、暗条件：気温23度、湿度50%、13時間で45日間培養した。

[0069] 栽培液B（表1参照）の成分になるよう追肥を行い、明条件：気温28度、湿度50%、11時間、暗条件：気温23度、湿度50%、13時間で45日間培養後、種子を得た。

[0070] 上記のように水耕栽培を行ったので、栽培ベッド内の水分の窒素濃度を制御することにより、培地中の窒素濃度を制御した。硝酸態窒素濃度は、硝酸

イオン複合電極(東亜ディーケーケー社製)を用いて測定した。またアンモニウム態窒素濃度は、アンモニア複合電極(東亜ディーケーケー社製)を用いて測定した。

[0071] <RNA含有量Wおよび種子貯蔵タンパク質Yを測定するための第2の栽培条件>

日本晴の種子を次亜塩素酸とエタノールで殺菌後、滅菌水が入ったシャーレに均等に広げ、遮光した後、28度で5日間培養した。

[0072] 人工太陽光室の室内にて、育苗箱の中に水を含ませたウレタンマットを敷き、出芽した種子を播種した。明条件：気温28度、湿度50%、11時間、暗条件：気温23度、湿度50%、13時間で15日間培養した。

[0073] 栽培ポットに窒素を50mg/L含有する土壌を5L充填し、得られた苗を1本植え付け、明条件：気温28度、湿度50%、11時間、暗条件：気温23度、湿度50%、13時間で45日間培養した。

[0074] 土壌中の窒素が50mg/Lとなるように追肥を行い、明条件：気温28度、湿度50%、11時間、暗条件：気温23度、湿度50%、13時間で45日間培養後、種子を得た。

[0075] 2. RNAの解析

<マイクロアレイ用試料の調整>

上記条件で栽培して得た開花後20日目の各々の種子を、液体窒素で凍結後、乳鉢で破碎し、Fruit-mate for RNA Purification (タカラバイオ社より購入)で処理後、RNAiso Plus (タカラバイオ社より購入)で抽出した。その後Recombinant DNase I (RNase-free) (タカラバイオ社より購入)で処理し、OligotexTM-dT30<Super>mRNA Purification Kit (From Total RNA) (タカラバイオ社より購入)で精製して、RNA溶液を得た。

[0076] Total RNAを800ng/1サンプルとなるように調整し、シアニン 3-CTP色素ラベル用400ng、シアニン 5-CTP色素ラベ

ル用400ngとなるようにそれぞれチューブに分注した。Low RNA Fluorescent Linear Amplification Kit PLUS, 2カラー用（アジレント・テクノロジー株式会社より購入）を用いて、シアニンラベル化 cRNAを生成し、RNeasy mini kit（Qiagen社より購入）を用いて、精製した。

[0077] <ハイブリダイゼーション>

シアニン 3-CTP色素ラベルしたcDNA825ngとシアニン 5-CTP色素ラベルしたcDNA825ngをそれぞれチューブに分注し、Gene Expression Hybridization Kit（アジレント・テクノロジー株式会社より購入）で処理後、イネ オリゴDNAマイクロアレイ 4 x 44K RAP-DB（アジレント・テクノロジー株式会社より購入）へ充填し、ハイブリダイゼーションさせた。

[0078] <画像解析>

DNA マイクロアレイスキャナ（アジレント・テクノロジー株式会社製）で画像をスキャンし、スポットを数値化した。さらに、画像解析ソフトGeneSpring GX（アジレント・テクノロジー株式会社製）を用いて、 $V/W > 1.0$ となるRNAを検出した。スポット強度の値を表2に示す。

[0079]

[表2]

表2:スポット強度

GenBank accession No.	V/W	V	W	GenBank accession No.	V/W	V	W
AK101497	1.127	91451	81143	AK107343	1.427	50738	35568
AJ002893	1.753	81314	46396	U43530	1.264	50377	39859
AJ002893	1.699	77978	45898	AK061894	1.212	50086	41334
Os05g0329200	1.177	75370	64061	AK064310	2.573	14139	5495
AK107271	1.557	75252	48343	AK064485	2.886	10076	3491
AK102194	1.751	74943	42797	AK101309	3.056	9545	3124
AK120697	1.215	71656	58957	AK107983	2.116	9180	4338
AK067141	1.005	70527	70180	AK064310	2.206	8272	3750
AK102194	1.748	69923	40007	AK099918	5.833	7159	1227
AK065009	1.116	68916	61749	AK100306	3.804	7106	1868
AF017360	1.118	68870	61584	AK099918	6.539	6960	1064
AK107271	1.736	68402	39408	X83434	2.155	5838	2709
AK120697	1.193	66986	56154	AK099918	6.427	5222	812.4
AK102194	1.715	66926	39028	AK070414	2.089	5169	2474
AK065009	1.092	65756	60201	AK103220	3.165	4961	1568
AK071205	1.014	65560	64659	AK121856	2.627	4631	1763
AK059164	1.135	65268	57482	AK121856	2.59	4432	1711
AK107238	1.413	64078	45359	AK070414	2.044	4322	2114
AF017360	1.006	64006	63630	AK062758	3.851	4153	1078
AB016505	1.238	64000	51698	AK103306	2.089	3874	1855
AK099086	1.014	62402	61556	AK061207	2.257	3780	1675
AK071205	1.088	61875	56864	AK068266	2.285	3746	1640
AY166458	1.269	61323	48330	Os06g0598500	2.276	3662	1609
AY987390	1.222	60449	49479	AK119900	2.119	3565	1683
AK107314	1.034	59883	57936	L19598	2.881	3442	1195
X15833	1.477	59854	40533	AK070414	2.22	3230	1455
AK061894	1.175	59530	50670	AK121856	2.66	3043	1144
AK071205	1.046	59412	56780	AK070851	3.648	2948	808
AK107343	1.469	59250	40327	Os01g0840300	2.534	2705	1067
AK107314	1.074	58790	54715	AK059805	2.185	2704	1237
AK063995	1.066	58227	54628	AK106244	2.16	2628	1217
AK071205	1.059	57140	53974	AK108127	2.516	2569	1021
AK102194	1.744	56990	32685	AK070851	3.621	2524	697.3
J100041C23	1.507	56290	37364	AK059805	2.169	2511	1157
AK108210	1.128	55144	48904	AK108230	9.596	2398	249.9
AK102194	1.747	54892	31425	L19598	2.718	2389	879.2
J090009I07	1.151	54746	47583	AK061237	3.027	2384	787.5
AK067141	1.029	53508	52003	AK062517	5.115	2240	437.9
AK107314	1.025	53428	52134	AK059805	2.162	2228	1031
AK065456	1.075	53355	49652	AK065259	2.361	2207	934.7
AK067141	1.024	53298	52053	AK065604	2.036	2123	1043
AK107314	1.04	52587	50542	L19598	2.792	2107	754.7
AK061894	1.241	52460	42255	AK106964	2.882	2093	726.3
AK061894	1.232	52324	42461	AK060983	2.228	2049	919.8
AK102194	1.908	51474	26985	J075074G08	2.106	2036	966.6
AK107633	1.006	51256	50971	AK099719	2.257	2034	901.2
AY196923	1.59	16127	10160				

[0080] 3. タンパク質の解析

< 2次元ゲル用試料の調製 >

上記第1および第2の栽培条件下で栽培して得た開花後45日目の各々の種子を、胚盤を取り除いた後に、マルチビーズショッカー（安井器械社製）で破碎し、8M尿素、4%（w/v）SDS、20%（w/v）グリセロール、50mMリン酸バッファーを含有する抽出溶液中にホモジナイズして、タンパク質溶液を得た。得られたタンパク質溶液をReadyPre 2-D Cleanup Kit（BIO-RAD LABORATORIES社（以下、BIO-RAD社と略称する）より購入）で精製し、ReadyStrip 7-10 Buffer（BIO-RAD社より購入）を添加した。RC DC Protein Assay（BIO-RAD社より購入）を用いて全タンパク質濃度を決定した。

[0081] <2次元ゲル電気泳動>

1次元目のタンパク質分離用等電点電気泳動は、PROTEAN IEF cell（BIO-RAD社より購入）および7cm ReadyStrip IPG Strip 3-7NL（BIO-RAD社より購入）を用いて実施した。2次元目のタンパク質分離用電気泳動は、IPG Stripをequilibration buffer I、equilibration buffer II（BIO-RAD社より購入）で平衡化し、PROTEAN cell（BIO-RAD社より購入）および10-20% resolving Ready Gel Precast Gel（BIO-RAD社より購入）を用いて実施した。画像解析の際のタンパク質スポットの分子量および等電点計算のために、試料は分子量マーカーおよび等電点pI校正マーカーとともに泳動した。2次元SDS-PAGEの直後に、Gelを40%エタノール、10%酢酸を含有する固定液に2時間浸透し、Flamingo Gelstain（BIO-RAD社より購入）で処理した。

[0082] <2次元ゲルの画像解析>

処理したゲルをPharos FX Molecular Imager（BIO-RAD社より購入）を用いてデジタル化した。Quantity

OneおよびPDQuest（BIO-RAD社より購入）を用いて、6種類の種子貯蔵タンパク質のスポット位置をそれぞれ特定し、スポット強度を測定した。6種類の種子貯蔵タンパク質は、グロブリン、グルテリン、グルテリンB-5、グルテリンB-1、10KDaプロラミン、および13KDaプロラミンである。2次元ゲルの画像解析図を図2に、スポット強度の値を表3に示す。

[0083] [表3]

表3:スポット強度

スポットNo.		1	2	3	4	5	6
プロモーター		グロブリン	グルテリン	グルテリンB-5	グルテリンB-1	10KDaプロラミン	13KDaプロラミン
スポット強度	X	8338	4530	7902	9159	1521	16784
	Y	7624	2369	3292	4220	1730	4587
X/Y		1.09	1.91	2.40	2.17	0.88	3.66

[0084] 4. 遺伝子組換え植物の作製

<発現ベクターの作製>

上記「2. RNAの解析」「3. タンパク質の解析」の結果、 $V/W=1.47$ 、 $X/Y=2.17$ であったグルテリンB-1をコードする核酸配列（GluB-1 gene: Accession No. X54314、AK107343）と、そのプロモーター配列（GluB-1 Promoter region: Accession No. AY427569）をNCBI Home Page, Nucleotide Databaseより取得した。グルテリンB-1をコードする核酸周辺の核酸配列をRice Annotation Project Databaseより検索し、グルテリンB-1をコードする核酸の下流1.0kbの核酸配列をターミネーター配列として取得した。

[0085] 取得した核酸配列情報を基にPCRプライマーを設計し、N末端にSse8387Iサイトを付加したグルテリンB-1のプロモーター配列とグルテリンB-1のシグナルペプチド配列を含む断片（断片A）（Primer 1

: CCTGCAGGACAGATTCTTGCTACCAACA (配列番号 1)、Primer 2: CAGGAGTGTTGGAGTATCGAGGT AAAAGAA (配列番号 2))、N末端にSacI サイト、C末端にEcoRI サイトを付加したグルテリンB-1のターミネーター配列を含む断片 (断片B) (Primer 3: GAGCTCTGTAATTGAGAACT AGTATC (配列番号 3)、Primer 4: GAATTCTCTTAA CTTTACCTATGAT (配列番号 4)) をPCRにより取得した。

[0086] 取得した断片A、Bをゼロブラント TOPOPCRクローニングキット (インビトロジェン社より購入) を用いてE. coliに導入し、増幅させた。断片Aと7crp (花粉症緩和ペプチド) とKDEL配列を連結した断片C (特開2004-321079) とをNcoI (タカラバイオ社より購入) で処理後、DNA Ligation Kit (タカラバイオ社より購入) を用いて連結した。断片Aと断片Cを連結した断片と断片BをSacI (タカラバイオ社より購入) で処理後、DNA Ligation Kit (タカラバイオ社より購入) を用いて連結した。得られた連結断片 (A, B, C) をSse8387I (タカラバイオ社より購入) とEcoRI (タカラバイオ社より購入) で処理後、プラスミドpTL7 (H. Ebinuma et al., Molecular Methods of Plant Analysis, 22: 95, 2002) のEcoRI-Sse8387I 制限酵素部位間に、DNA Ligation Kit (タカラバイオ社より購入) を用いて連結し、発現ベクターを構築した。なお、上記配列番号は、それぞれ配列表中におけるそれぞれに対応する。

[0087] <アグロバクテリウムへの導入>

アグロバクテリウム ツメファシエンス (A. ツメファシエンス) EHA105株を、10mlのYEB液体培地 (5g/l ビーフエキス、1g/l 酵母エキス、5g/l ペプトン、5g/l ショ糖、2mM MgSO₄、22℃でのpH7.2 (以下、特に示さない場合、22℃でのpHとする。)) に接種し、OD₆₃₀が0.4から0.6の範囲に至るまで、28℃で培養し

た後、培養液を $6900 \times g$ 、 4°C 、10分間遠心して菌体を回収した。回収した菌体は、20mlの10mM HEPES (pH 8.0) に懸濁して、再度 $6900 \times g$ 、 4°C 、10分間遠心することにより集菌し、この菌体を $200 \mu\text{l}$ のYEB液体培地に懸濁して、プラスミド導入用菌液とした。

0.5mlチューブ内で、上記プラスミド導入用菌液 $50 \mu\text{l}$ と発現ベクターとを混合し、エレクトロポレーション法（ジーンパルサーIIシステム（BIORAD社より購入））を用いて、A. ツメファシエンズEHA105株への発現ベクター導入処理を行った。発現ベクター導入処理後の菌体は、 $200 \mu\text{l}$ のYEB液体培地を加えて 25°C で、振とうしつつ1時間培養を行ってから、 50mg/l カナマイシン添加YEB寒天培地（寒天1.5w/v%、他の組成は上記に同じ。）に播種し、 28°C 、2日間培養した。次いで、生じた菌コロニーをYEB液体培地に移植して更に培養し、増殖した菌体からアルカリ法でプラスミドを抽出して、これらの菌体に発現ベクターが導入されていることを確認した。

[0088] <アグロバクテリウムEHA105によるイネの形質転換>

イネ品種「日本晴」の完熟種子を、細胞工学別冊 植物細胞工学シリーズ 4 モデル植物の実験プロトコル (p 93-98) の方法に従い殺菌した後、この完熟種子を、N6C12培地（N6無機塩類及びビタミン類（Chu C. C.、1978, Proc. Symp. Plant Tissue Culture, Science Press Peking, pp. 43-50）、 30g/l シュクロース、 2.8g/l プロリン、 0.3g/l カザミノ酸、 2mg/l 2, 4-D、 4g/l ゲルライト、pH=5.8）に置床し、サージカルテープでシールしてから 28°C 明所で培養して発芽させ、アグロバクテリウムEHA105による感染材料とした。YEB寒天培地（ 15g/l バクトアガー、他の組成は上記に同じ。）にて培養した発現ベクターを導入したアグロバクテリウムEHA105を、YEB液体培地に移植して、 25°C 、 180rpm で一晩培養した後、 3000rpm 、20分間遠心して集菌し、アセトシリゴン 10mg/l を含むN6液体培地

(N 6 無機塩類及びビタミン類、30 g/l シュークロース、2 mg/l 2, 4-D、pH=5.8) に、OD₆₃₀=0.15 となるように懸濁し、感染用アグロバクテリウム懸濁液とした。調整したイネの発芽種子を50 ml チューブに入れ、感染用アグロバクテリウム懸濁液を注いで1.5 分間浸漬した。浸漬後、アグロバクテリウム懸濁液を捨て、発芽種子を滅菌したろ紙の上に置いて余分な水分を除去してから、この種子を、共存培養培地 N 6 C 1 2 培地 (N 6 無機塩類及びビタミン類、30 g/l シュークロース、2.8 g/l プロリン、0.3 g/l カザミノ酸、2 mg/l 2, 4-D、4 g/l ゲルライト、pH=5.2) に置床し、サージカルテープでシールして28℃暗所で3日間培養し、次いで、N 6 C 1 2 T C H 2 5 培地 (N 6 無機塩類及びビタミン類、30 g/l シュークロース、2.8 g/l プロリン、0.3 g/l カザミノ酸、2 mg/l 2, 4-D、500 mg/l カルベニシリン、25 mg/l ハイグロマイシン、4 g/l ゲルライト) に移植して培養した。

[0089] <形質転換体の再分化>

上記 N 6 C 1 2 T C H 2 5 培地での培養開始から1週間後、発芽した芽を胚盤組織から除去して、残った胚盤組織を、N 6 C 1 4 T C H 2 5 培地 (N 6 無機塩類及びビタミン類、30 g/l シュークロース、2.8 g/l プロリン、0.3 g/l カザミノ酸、4 mg/l 2, 4-D、500 mg/l カルベニシリン、25 mg/l ハイグロマイシン、4 g/l ゲルライト) で1週間培養し、更に、MSRC 培地 (MS 無機塩類及びビタミン類 (Murashige, T. and Skoog, F., 1962 Physiol. Plant., 15, 473)、30 g/l シュークロース、30 g/l ソルビトール、2 g/l カザミノ酸、500 mg/l カルベニシリン、4 g/l ゲルライト) に移植して培養することにより、芽又は幼植物体を再分化させた。

[0090] 5. 遺伝子組換え植物の栽培

上記「3. 遺伝子組換え植物の作製」により得られたイネを以下の要領に

て栽培した。栽培に用いた栽培液Cおよび栽培液Dの組成を表3に示す。

まず、上記「3. 遺伝子組換え植物の作製」により得られた胚盤組織から再分化させた芽又は幼植物体を、発根培地に移植して背丈20cm程度の幼苗となるまで生育させた。

[0091] 湛液方式の栽培ベッド（M式水耕研究所製）に100Lの栽培液C（表3参照）を充填し、得られた苗を1本ずつ77株植え付け、明条件：気温28度、湿度50%、11時間、暗条件：気温23度、湿度50%、13時間で45日間培養した。

栽培液D（表3参照）の成分になるよう追肥を行い、明条件：気温28度、湿度50%、11時間、暗条件：気温23度、湿度50%、13時間で45日間培養した。

[0092] [表4]

表4:栽培液の成分表

成分	栽培液C	栽培液D
	含有量(mg/L)	
KNO ₃	38.9	174.1
NH ₄ NO ₃	21.8	97.9
(NH ₄) ₂ ·SO ₄	8.3	37.1
Mg(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	35.7	160.0
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	47.0	210.7
硝酸態窒素(mg/L)	33	150
アンモニア態窒素(mg/L)	17	50

[0093] 6. タンパク質含有量の測定

上記「4. 遺伝子組換え植物の栽培」にて得られた植物から種子を採取し、種子中のタンパク質含有量を、下記の要領にて測定した。

<種子の総タンパク質含有量>

杯盤を除去した種子中のタンパク質含有量を、近赤外線タンパク質解析装置NIRFLEX N-500（BUCHI社製）で測定し、種子重量から

総タンパク質含有量を算出した。

[0094] <機能性タンパク質（花粉症緩和ペプチド：7c r p）の量>

種子中のタンパク質と既知濃度のタンパク質マーカーをSDS-PAGEキット（BIO-RAD社より購入）で泳動し、Gelを40%エタノール、10%酢酸を含有する固定液に2時間浸透し、Flamingo Gel stain（BIO-RAD社より購入）で処理した。処理したゲルをPharos FX Molecular Imager（BIO-RAD社より購入）を用いてデジタル化した。Quantity One（BIO-RAD社より購入）を用いて7c r pのバンド位置を特定し、濃度既知のマーカーのバンド強度と比較して、花粉症緩和ペプチド（7c r p）の重量を算出した。このようにして、遺伝子組換え植物から採取された種子中の総タンパク質の量と、形質転換により導入された機能性タンパク質の量とを求めた。

[0095] [実施例2]

培養液Dのアンモニウム態窒素含有量を150mg/Lとした以外は、実施例1と同様にして遺伝子組換え植物の栽培、タンパク質含有量の測定を行った。

[0096] [実施例3]

培養液Dの硝酸態窒素含有量を50mg/Lとし、アンモニウム態窒素含有量を150mg/Lとした以外は、実施例1と同様にして遺伝子組換え植物の栽培、タンパク質含有量の測定を行った。

[0097] [実施例4]

培養液Dの硝酸態窒素含有量を600mg/Lとし、アンモニウム態窒素含有量を200mg/Lとした以外は、実施例1と同様にして遺伝子組換え植物の栽培、タンパク質含有量の測定を行った。

[0098] [実施例5]

培養液Dの硝酸態窒素含有量を70mg/Lとし、アンモニウム態窒素含有量を70mg/Lとした以外は、実施例1と同様にして遺伝子組換え植物

の栽培、タンパク質含有量の測定を行った。

[0099] [実施例 6]

培養液 D の硝酸態窒素含有量を 750 mg/L とし、アンモニウム態窒素含有量を 750 mg/L とした以外は、実施例 1 と同様にして遺伝子組換え植物の栽培、タンパク質含有量の測定を行った。

[0100] [実施例 7]

目的タンパク質の発現用プロモーターとしてグルテリン B-5 のプロモーターを用いた以外は、実施例 1 と同様にして、遺伝子組換え植物の栽培、タンパク質含有量の測定を行った。

[0101] [実施例 8]

Y の栽培条件を水耕栽培とした以外は、実施例 1 と同様にして、遺伝子組換え植物の栽培、タンパク質含有量の測定を行った。

[0102] [実施例 9]

培養液 B のアンモニウム態窒素含有量を 20 mg/L とした以外は、実施例 1 と同様にして、遺伝子組換え植物の栽培、タンパク質含有量の測定を行った。

[0103] [実施例 10]

培養液 B の硝酸態窒素含有量を 20 mg/L とした以外は、実施例 1 と同様にして、遺伝子組換え植物の栽培、タンパク質含有量の測定を行った。

[0104] [比較例 1]

培養液 D の硝酸態窒素含有量を 20 mg/L とし、アンモニウム態窒素含有量を 20 mg/L とした以外は、実施例 1 と同様にして、遺伝子組換え植物の栽培、タンパク質含有量の測定を行った。

[0105] [比較例 2]

培養液 D の硝酸態窒素含有量を 800 mg/L とし、アンモニウム態窒素含有量を 800 mg/L とした以外は、実施例 1 と同様にして、遺伝子組換え植物の栽培、タンパク質含有量の測定を行った。

[0106] [比較例 3]

目的タンパク質の発現用プロモーターとして10KDaプロラミンのプロモーターを用いた以外は、実施例1と同様にして、遺伝子組換え植物の栽培、タンパク質含有量の測定を行った。

[0107] [比較例4]

培養液Bの硝酸態窒素含有量を20mg/Lとし、アンモニウム態窒素含有量を20mg/Lとした以外は、実施例1と同様にして、遺伝子組換え植物の栽培、タンパク質含有量の測定を行った。

[0108] [比較例5]

培養液Bの硝酸態窒素含有量を800mg/Lとし、アンモニウム態窒素含有量を800mg/Lとした以外は、実施例1と同様にして、遺伝子組換え植物の栽培、タンパク質含有量の測定を行った。

[比較例6]

培養液Dの硝酸態窒素含有量を20mg/Lとし、アンモニウム態窒素含有量を20mg/Lとした以外は、比較例3と同様にして、遺伝子組換え植物の栽培、タンパク質含有量の測定を行った。

[0109] 上記、実施例1～10および比較例1～6の試験結果を下記表5に示す。

[表5]

表5.試験結果

種子貯蔵タンパク質遺伝子のプロモーターの選択																遺伝子組換え植物の栽培				種子中のタンパク質量	
X				Y				プロモーター	V/W	X/Y	開花期前の窒素含有量 (mg/L)		栽培方法	総タンパク質量 (mg)	機能性タンパク質量 (μg)						
開花期前の窒素含有量 (mg/L)		栽培方法		窒素含有量 (mg/L)		栽培方法															
硝酸態窒素	アンモニア態窒素																				
実施例1	600	200	水耕栽培	50	土耕栽培	グルテリンB-1 (AK107343)	1.47	2.17	150	50	水耕栽培	2.09	11.2								
実施例2	600	200	水耕栽培	50	土耕栽培	グルテリンB-1 (AK107343)	1.47	2.17	150	150	水耕栽培	2.19	11.7								
実施例3	600	200	水耕栽培	50	土耕栽培	グルテリンB-1 (AK107344)	1.47	2.17	50	150	水耕栽培	1.93	10.3								
実施例4	600	200	水耕栽培	50	土耕栽培	グルテリンB-1 (AK107345)	1.47	2.17	600	200	水耕栽培	2.66	14.3								
実施例5	600	200	水耕栽培	50	土耕栽培	グルテリンB-1 (AK107346)	1.47	2.17	70	70	水耕栽培	1.95	10.4								
実施例6	600	200	水耕栽培	50	土耕栽培	グルテリンB-1 (AK107347)	1.47	2.17	750	750	水耕栽培	2.59	13.9								
実施例7	600	200	水耕栽培	50	土耕栽培	グルテリンB-5 (AY196923)	1.59	2.40	150	50	水耕栽培	2.12	12.6								
実施例8	600	200	水耕栽培	50	水耕栽培	グルテリンB-1 (AK107347)	-	1.43	-	-	-	-	-								
実施例9	600	20	水耕栽培	50	土耕栽培	グルテリンB-1 (AK107347)	-	1.98	-	-	-	-	-								
実施例10	20	200	水耕栽培	50	土耕栽培	グルテリンB-1 (AK107347)	-	1.82	-	-	-	-	-								
比較例1	600	200	水耕栽培	50	土耕栽培	グルテリンB-1 (AK107347)	1.47	2.17	20	20	水耕栽培	1.14	6.1								
比較例2	600	200	水耕栽培	50	土耕栽培	グルテリンB-1 (AK107347)	1.47	2.17	800	800	水耕栽培	※1	-								
比較例3	600	200	水耕栽培	50	土耕栽培	10KDaプロラミン	0.80	0.88	150	50	水耕栽培	2.01	4.4								
比較例4	20	20	水耕栽培	50	土耕栽培	グルテリンB-1 (AK107347)	-	0.98	-	-	-	-	-								
比較例5	800	800	水耕栽培	50	土耕栽培	グルテリンB-1 (AK107347)	-	※2	-	-	-	-	-								
比較例6	600	200	水耕栽培	50	土耕栽培	10KDaプロラミン	0.80	0.88	20	20	水耕栽培	1.12	3.0								

※1.2 根腐れを起こし、種子を収穫できなかった。

産業上の利用可能性

[0110] 本発明は、生物資源生産、機能性食品生産、バイオテクノロジーおよび植物の品種改良などの分野において有用である。

符号の説明

[0111] G 染色体
 p m r 1 プロモーター
 p t n 1、p t n 2 タンパク質をコードする構造遺伝子領域
 t m r 1 ターミネーター
 v c t プラスミドベクター

配列表フリーテキスト

[0112] 配列番号 1 : プライマー 1
 配列番号 2 : プライマー 2
 配列番号 3 : プライマー 3
 配列番号 4 : プライマー 4

請求の範囲

[請求項1] 下記式（１）：

$$V/W > 1.0 \quad \dots (1)$$

（但し、式（１）において、Vは、開花予定日の３０日前から開花日までの間の一定期間、硝酸態窒素が70mg/L～750mg/L、および／または、アンモニウム態窒素が70mg/L～750mg/Lとなるように調整した培地にて所定の植物を栽培した場合における該植物の種子に含まれるRNA量である。Wは、開花予定日の３０日前から開花日までの間の一定期間、窒素0mg/L～50mg/Lとなるように調整した培地にて該植物を栽培した場合における該植物の種子に含まれるRNA量である。）

を満たす種子で発現するRNAの発現を調節するプロモーターと、前記プロモーターの下流に位置し目的タンパク質をコードするポリヌクレオチドとを含む発現ベクターが導入されて形質転換された遺伝子組換え植物を、該遺伝子組換え植物の開花予定日の３０日前から開花日まで間の一定期間、硝酸態窒素が70mg/L～750mg/L、および／または、アンモニウム態窒素が70mg/L～750mg/Lとなるよう調整した培地にて栽培することを含む、遺伝子組換え植物の栽培方法。

[請求項2] 下記式（２）

$$X/Y > 1.0 \quad \dots (2)$$

（但し、式（２）において、Xは、開花予定日の３０日前から開花日までの間の一定期間、硝酸態窒素が70mg/L～750mg/L、および／または、アンモニウム態窒素が70mg/L～750mg/Lとなるように調整した培地にて所定の植物を栽培した場合における該植物の種子に含まれる種子貯蔵タンパク質の含有量である。Yは、開花予定日の３０日前から開花日までの間の一定期間、窒素0mg/L～50mg/Lとなるように調整した培地にて該植物を栽培した場

合における該植物の種子に含まれる該種子貯蔵タンパク質の含有量である。)

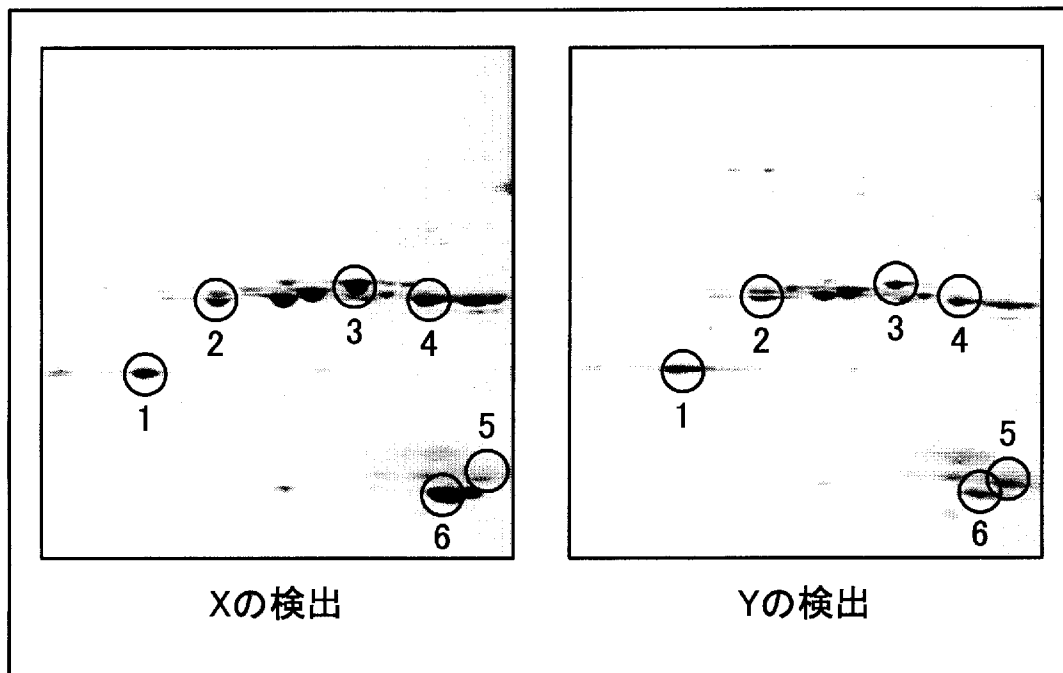
を満たす種子貯蔵タンパク質の発現を調節するプロモーターと、前記プロモーターの下流に位置し目的タンパク質をコードするポリヌクレオチドとを含む発現ベクターが導入されて形質転換された遺伝子組換え植物を、該遺伝子組換え植物の開花予定日の30日前から開花日まで間の一定期間、硝酸態窒素が70mg/L~750mg/L、および/または、アンモニウム態窒素が70mg/L~750mg/Lとなるよう調整した培地にて栽培することを含む、遺伝子組換え植物の栽培方法。

- [請求項3] 前記所定の植物と前記遺伝子組換え植物とが、同種の植物種である、請求項1および請求項2に記載の遺伝子組換え植物の栽培方法。
- [請求項4] 前記所定の植物がイネ科の植物であり、前記遺伝子組換え植物がイネ科の植物である、請求項3に記載の遺伝子組換え植物の栽培方法。
- [請求項5] 前記プロモーターが、グルテリン、グロブリン、およびプロラミンからなる群より選ばれる種子貯蔵タンパク質の発現を調節するプロモーターである、請求項4に記載の遺伝子組換え植物の栽培方法。
- [請求項6] 前記遺伝子組換え植物の栽培を、水耕栽培によって行う、請求項1から5のいずれか一項に記載の遺伝子組換え植物の栽培方法。
- [請求項7] 請求項1から6のいずれか一項に記載の遺伝子組換え植物を栽培し、種子を採集することを含む、種子の生産方法。
- [請求項8] 前記植物がイネであり、前記種子が米である、請求項7に記載の種子の生産方法。

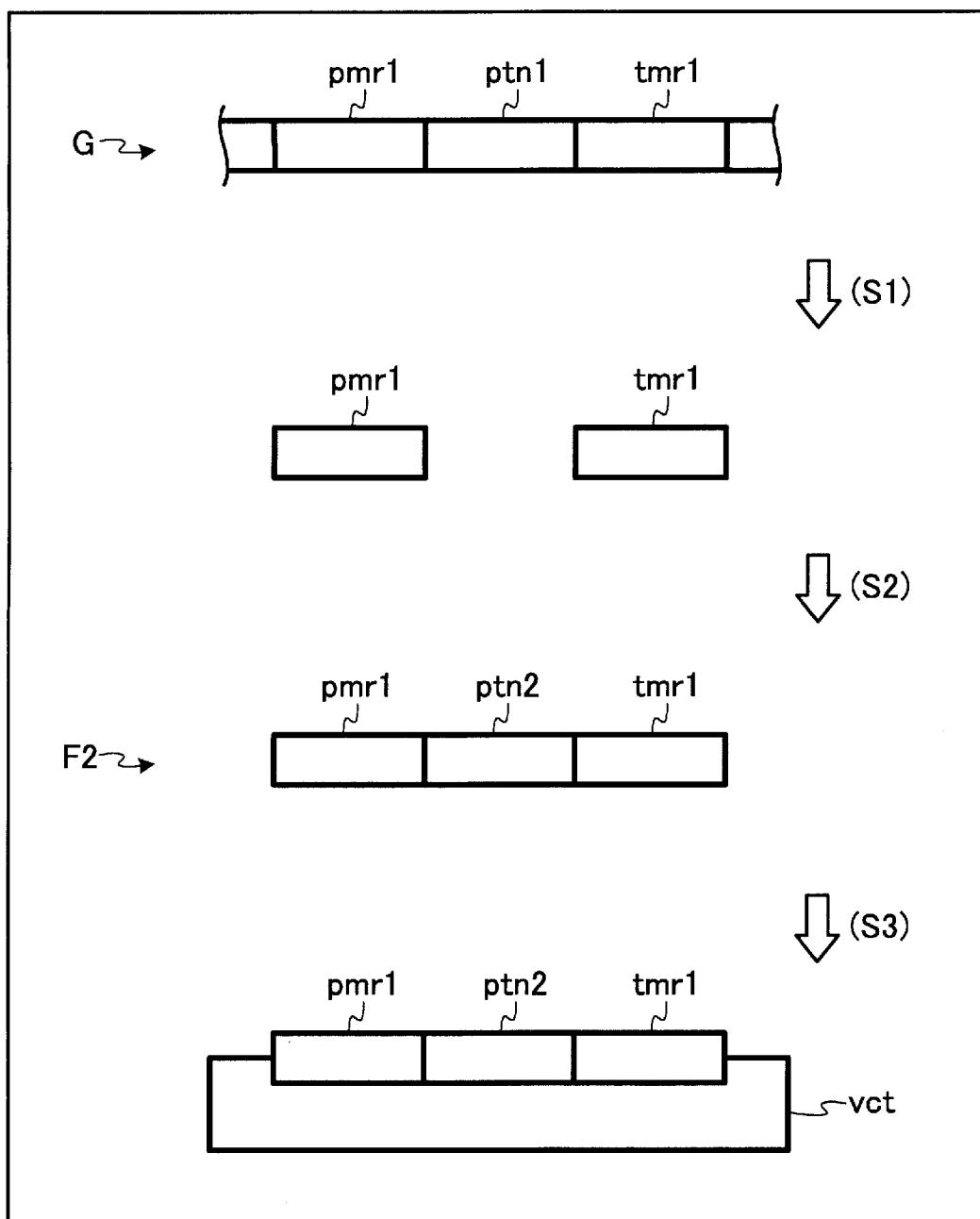
[図1]

播種(0日目)		幼穂分化期 (50日目)	出穂・開花期 (75日目)
栄養成長期		生殖成長期	登熟期
水 15日間	栽培液A 45日間		栽培液B 45日間

[図2]



[図3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/064876

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A01G7/06(2006.01)i, A01G16/00(2006.01)n, A01H5/00(2006.01)n, C12N15/09(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A01G7/06, A01G16/00, A01H5/00, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2009
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2009	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2009

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, PubMed, CiNii, BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2006/095749 A1 (Nagoya University), 14 September 2006 (14.09.2006), page 5, line 30 to page 12, line 20 & DE 112006000559 T	1-8
Y	Koichi INOUE, Hiroshi YOKOTA, Yoshio YAMADA, "Calcium Nodo no Kotonaru Joken ni Oite, Suikoekichu no Ammonium-tai Chisso Narabini Shosantai Chisso ga Sakumotsu no Ne no Seiiku ni Oyobosu Eikyo", Japanese journal of the science and plant nutrition, 05 October 1986 (05.10.1986), vol.57(5), pages 493 to 502	1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
23 October, 2009 (23.10.09)

Date of mailing of the international search report
02 November, 2009 (02.11.09)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/064876

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Taiji Kawakatsu, Masayuki P. Yamamoto, Sakiko Hirose, Masahiro Yano, and Fumio Takaiwa, Characterization of a new rice glutelin gene GluD-1 expressed in the starchy endosperm, Journal of Experimental Botany, vol.59(15), Oxfordjournal, 2008.11.02, pp.4233-4245	1-8
A	JP 7-308137 A (Nippon Paper Industries Co., Ltd.), 28 November 1995 (28.11.1995), entire text & US 5654190 A & CA 2149705 A & CA 2149705 A1	1-8

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. A01G7/06(2006.01)i, A01G16/00(2006.01)n, A01H5/00(2006.01)n, C12N15/09(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. A01G7/06, A01G16/00, A01H5/00, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 0 9 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 0 9 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 0 9 年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, PubMed, CiNii, BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	WO 2006/095749 A1（国立大学法人名古屋大学）2006.09.14, 第5頁 第30行ー第12頁第20行 & DE 112006000559 T	1 - 8
Y	井上 興一、横田 弘司、山田 芳雄, カルシウム濃度の異なる条件に おいて、水耕液中のアンモニウム態窒素ならびに硝酸態窒素が作物 の根の生育に及ぼす影響, 日本土壤肥料学雑誌, 1986.10.05, Vol.57(5), pp.493-502	1 - 8

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 3 . 1 0 . 2 0 0 9

国際調査報告の発送日

0 2 . 1 1 . 2 0 0 9

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

坂田 誠

2 B

4 0 1 2

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 2 3 7

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	Taiji Kawakatsu, Masayuki P. Yamamoto, Sakiko Hirose, Masahiro Yano, and Fumio Takaiwa, Characterization of a new rice glutelin gene GluD-1 expressed in the starchy endosperm, Journal of Experimental Botany, Vol.59(15), Oxfordjournal, 2008.11.02, pp. 4233-4245	1 - 8
A	JP 7-308137 A (日本製紙株式会社) 1995.11.28, 全文 & US 5654190 A & CA 2149705 A & CA 2149705 A1	1 - 8