

(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2004-16201

(P2004-16201A)

(43) 公開日 平成16年1月22日(2004.1.22)

(51) Int.Cl.⁷

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N 15/09

C 1 2 N 15/00

Z N A A

2 B O 3 O

A O 1 H 5/00

A O 1 H 5/00

A

4 B O 2 4

C O 7 K 14/415

C O 7 K 14/415

4 B O 6 5

C 1 2 N 5/10

C 1 2 N 5/00

C

4 H O 4 5

審査請求 有 請求項の数 15 O L (全 37 頁)

(21) 出願番号

特願2002-180289 (P2002-180289)

(22) 出願日

平成14年6月20日 (2002. 6. 20)

(71) 出願人

501203344

独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構

茨城県つくば市観音台3-1-1

(74) 代理人

100091096

弁理士 平木 祐輔

(74) 代理人

100118773

弁理士 藤田 節

(74) 代理人

100096183

弁理士 石井 貞次

(72) 発明者

古藤田 信博

岩手県岩手郡滝沢村滝沢字葉の木沢山15
17-11 パチェラー207号室

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 花芽形成抑制遺伝子及び早期開花性が付与された植物

(57) 【要約】

(修正有)

【課題】 永年性植物において花芽形成抑制に関与している T E R M I N A L F L O W E R 1 様遺伝子を単離し、さらに、該遺伝子のアンチセンスDNAで植物を形質転換して、早期開花性を有する植物を提供する。

【解決手段】 リンゴから新規な T E R M I N A L F L O W E R 1 様遺伝子をクローニングした。該遺伝子の塩基配列及び該塩基配列の全部若しくは一部に相補的な配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ花芽形成抑制活性を有するタンパク質をコードするDNA。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の (a) 又は (b) のタンパク質。

(a) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されており、かつ花芽形成抑制活性を有するタンパク質

【請求項 2】

以下の (a) 又は (b) の DNA を含む遺伝子。

(a) 配列番号 1 に示す塩基配列からなる DNA

(b) 配列番号 1 に示す塩基配列の全部若しくは一部に相補的な配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ花芽形成抑制活性を有するタンパク質をコードする DNA

【請求項 3】

請求項 2 記載の遺伝子の塩基配列に対し相補的な配列からなるアンチセンス DNA。

【請求項 4】

請求項 2 記載の遺伝子の全部又は一部を含む組換えベクター。

【請求項 5】

請求項 3 記載のアンチセンス DNA の全部又は一部を含む組換えベクター。

【請求項 6】

請求項 4 又は 5 記載の組換えベクターを含む形質転換体。

【請求項 7】

植物である請求項 6 記載の形質転換体。

【請求項 8】

植物が永年性植物である請求項 7 記載の形質転換体。

【請求項 9】

永年性植物が永年性果樹植物である請求項 8 記載の形質転換体。

【請求項 10】

早期開花性を有することを特徴とする請求項 7～9 のいずれか 1 項に記載の形質転換体。

【請求項 11】

請求項 7～10 のいずれか 1 項に記載の形質転換体から得られる種子。

【請求項 12】

請求項 2 記載の遺伝子又は請求項 3 記載のアンチセンス DNA を植物に導入することの特徴とする、植物に早期開花性を付与する方法。

【請求項 13】

請求項 2 記載の遺伝子又は請求項 3 記載のアンチセンス DNA を含む組換えベクターを構築する工程、該組換えベクターを用いて植物宿主を形質転換する工程、及び得られる形質転換体から植物体を再生する工程を含むことを特徴とする早期開花性植物の作出方法。

【請求項 14】

植物が永年性植物である請求項 13 記載の方法。

【請求項 15】

永年性植物が永年性果樹植物である請求項 14 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、永年性植物に早期開花性を付与するために有用で新規な花芽形成抑制遺伝子に関する。また本発明は、上記遺伝子をコードする DNA 又は該遺伝子のアンチセンス DNA を含む組換えベクター、該組換えベクターを含む形質転換体、並びに該形質転換体から得られる種子に関する。さらに本発明は、植物に早期開花性を付与する方法、及び早期開花性植物の作出方法に関する。

【0002】

10

20

30

40

50

【従来の技術】

木本植物は、草本植物と異なり、開花・結実までの期間、すなわち幼若期間が長い。従って、バラ科に属するリンゴ等の永年性果樹作物育種においては、品種改良に長期間を要する。例えば播種から初結実までに、リンゴでは7～8年の期間が必要である。果樹育種では、野生品種が有する耐病性遺伝子等の農業上有用な遺伝子を栽培品種に導入する場合、10回近く交配を行われなければ確率的に良い品質を備えた系統が得られず、木本植物特有の幼若性は、交雑育種の効率を妨げる大きな要因である。

【0003】

早期開花・結実により果樹の育種年限を短縮する手段として、従来からわい性台木の利用、結果母枝の誘因等が試みられているが、いずれの方法も画期的な効果を発揮しうるものとはいえない。 10

【0004】

一方、近年、双子葉植物のモデル植物であるシロイヌナズナにおいて、花芽形成を制御する遺伝子が複数単離され、花芽形成の分子メカニズムが明らかにされつつある。例えば、花芽形成を抑制する機能を有する遺伝子 (late-flowering genes) として TERMINAL FLOWER 1 遺伝子 (TFL1) が知られている。シロイヌナズナにおいて、該遺伝子を強制発現させると開花が遅れ、発現を抑制すると開花が早まることが実験的に示されている。しかしながらリンゴ属を含むバラ科植物では、現在までこのような花芽形成に関わる遺伝子やタンパク質の本体は明らかにされていない。また、農業分野において、花芽形成を抑制する遺伝子を制御して、永年性作物に早期開花性を付与するなどの試みは報告されていない。 20

【0005】**【発明が解決しようとする課題】**

本発明は、永年性植物において花芽形成抑制に関与している TERMINAL FLOWER 1 (TFL1) 様遺伝子を単離し、さらに、該遺伝子のアンチセンスDNAで植物を形質転換し、早期開花性を有する植物を提供することを目的とする。

【0006】**【課題を解決するための手段】**

本発明者は、上記課題を達成するため鋭意検討した結果、リンゴから新規な TERMINAL FLOWER 1 様遺伝子をクローニングすることに成功した。そこで本発明者は、該遺伝子のアンチセンスDNAを組み込んだベクターDNAを用いて植物の細胞を形質転換し、該細胞をカルス形成させた。続いて、カルス増殖の後、植物体を再分化し、台木に接ぎ木すると、早期開花性が付与された再生植物が作出されることを見出し、本発明を完成するに至った。 30

【0007】

すなわち、本発明は、以下の (a) 又は (b) のタンパク質である。

(a) 配列番号2に示すアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号2に示すアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されており、かつ花芽形成抑制活性を有するタンパク質

【0008】

また本発明は、以下の (a) 又は (b) のDNAを含む遺伝子である。 40

(a) 配列番号1に示す塩基配列からなるDNA

(b) 配列番号1に示す塩基配列の全部若しくは一部に相補的な配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ花芽形成抑制活性を有するタンパク質をコードするDNA

【0009】

本発明はまた、上記遺伝子の全部又は一部を含む組換えベクターである。

さらに本発明は、上記遺伝子の塩基配列に対し相補的な配列からなるアンチセンスDNAである。

本発明はまた、上記アンチセンスDNAの全部又は一部を含む組換えベクターである。 50

【0010】

さらにまた本発明は、上記組換えベクターを含む形質転換体である。ここで該形質転換体としては、例えば植物が挙げられる。該植物は、永年性植物、特に永年性果樹植物であることが好ましい。上記形質転換体は、早期開花性を有するものである。

【0011】

また本発明は、上記形質転換体から得られる種子である。

本発明は、上記遺伝子又は上記アンチセンスDNAを植物に導入することを特徴とする、植物に早期開花性を付与する方法である。

【0012】

また本発明は、上記遺伝子又は上記アンチセンスDNAを含む組換えベクターを構築する工程、該組換えベクターを用いて植物宿主を形質転換する工程、及び得られる形質転換体から植物体を再生する工程を含むことを特徴とする早期開花性植物の作出方法である。ここで植物は、永年性植物、特に永年性果樹植物であることが好ましい。

【0013】

【発明の実施の形態】

以下、本発明について詳細に説明する。

【0014】

本発明者らは、バラ科に属する植物、特にリンゴ (*Malus*) 属に属する植物に由来するTFL様タンパク質をコードする遺伝子を単離するために、他の植物由来のTFL様タンパク質間でよく保存されているアミノ酸配列に基づいて設計した縮重プライマーを用いて、リンゴ茎頂由来cDNAを鋳型としてPCR反応を行って遺伝子断片を取得し、さらにRACE-PCRにより全長cDNAを増幅することによって新規なTFL様遺伝子を見出した。なお、この遺伝子は、シロイヌナズナのTERMINAL FLOWER 1 (TFL1) 遺伝子と相同性が高く (約75%)、バラ科植物においては最初にリンゴ (*Malus domestica*) から単離されたため、MdTFL (*Malus domestica* TFL1) という。本発明は、MdTFL遺伝子の発現を促進又は抑制することによってMdTFL遺伝子が導入された植物の開花時期を調節しようとするものである。

【0015】

MdTFL遺伝子は、バラ科植物の花芽形成の抑制に関与している。従って、内在性MdTFL遺伝子の発現が抑制されるよう形質転換された植物は、花芽形成抑制活性が阻害される結果として早期開花性を示すことになる。

【0016】

遺伝子の発現を抑制する手法としては、遺伝子のアンチセンスDNAを導入する手法 (アンチセンス法) が知られている。アンチセンス法は、目的遺伝子の配列にアンチセンス配列を特異的に結合させて、目的遺伝子の発現を抑えるというものである。このアンチセンス配列は、細胞mRNA又はゲノムDNAに結合して翻訳又は転写をブロックすることにより、目的遺伝子の発現を阻害する。また別の手法としては、コサプレクションを利用する手法がある。コサプレクションとは、植物において、例えば恒常的かつ強力な発現を引き起こすプロモーターの下流に遺伝子をセンス方向で連結して植物に導入した場合に、導入された遺伝子と内在性遺伝子との双方の発現が抑制される現象である (Montgomery, MK and Fire, A (1998), Trends Genet., 14, 255-8)。

【0017】

従って、本発明においては、強力なプロモーターにより制御されるMdTFL遺伝子、又は該遺伝子のアンチセンスDNAのいずれかを植物に導入することにより、内在性MdTFL遺伝子の発現を抑制し、花芽形成抑制活性を阻害して、早期開花性を示す植物を作出する。

【0018】

一方、通常は、MdTFL遺伝子をセンス方向で植物に導入した場合には、該MdTFL

遺伝子の発現は増強される。このような場合には、該植物は、花芽形成抑制活性が高まるため、遅延開花性を示す。遅延開花性を有する植物は、花芽形成を抑制する機構の研究に有用である。

【0019】

以下に、Md T F L 遺伝子の単離、Md T F L タンパク質の製造、組換えベクターの作製、及び形質転換体の作出について説明する。

【0020】

1. Md T F L 遺伝子の単離・同定

(1) mRNA及びcDNAライブラリーの調製

Md T F L 遺伝子は、バラ科植物の組織から抽出したRNAから精製したmRNAを用いて、公知の方法、例えばRACE (rapid amplification of cDNA ends) - PCR、RT-PCR、cDNAライブラリーからのスクリーニングなどにより得ることができる。Md T F L 遺伝子は、主に植物の葉、茎頂、がく等に発現していることから、mRNAの供給源としては、バラ科植物の葉、茎頂など植物体の一部が挙げられる。また、MS培地などで無菌的に培養したバラ科植物の組織（例えば表皮、師部、柔組織、木部、維管束、柵状組織、海綿状組織等）又は組織培養細胞（例えばカルス）も用いることができる。本発明において遺伝子単離のための供給源となる植物としては、バラ科に属する植物であれば特に限定されるものではなく、例えば以下に示すものが挙げられる。

リンゴ (Malus) 属：リンゴ (Malus × domestica)、ヒメリンゴ (Malus baccata var. mandshurica)、ミツバカイドウ (Malus sieboldii)、マルバカイドウ (Malus prunifolia var. ringo ASAMI) 20

バラ (Rosa) 属：バラ (Rose hybrida)

サクラ (Prunus) 属：モモ (Prunus persica)、オウトウ (Prunus avium)、アーモンド (Prunus amygdalus)

ナシ (Pyrus) 属：ナシ (Pyrus pyrifolia)、セイヨウナシ (Pyrus communis)

イチゴ (Fragaria) 属：イチゴ (Fragaria × ananassa)

マルメロ (Cydonia) 属：マルメロ (Cydonia oblonga) 30

キイチゴ (Rubus) 属：キイチゴ (Rubus palmatus)

【0021】

mRNAの調製は、例えば、バラ科植物の茎頂部分を液体窒素で凍結した後で、通常行われる手法により行うことができる。例えば、凍結した植物体を乳鉢などで摩砕後、得られた摩砕物から、塩化セシウム法、セチルトリメチルアセチルブロマイド (CTAB) 法などにより粗RNA画分を抽出調製する。次いで、この粗RNA画分から、オリゴdT-セルロースを担体とするアフィニティーカラム法、又はオリゴdT固定化ラテックス粒子を用いた方法などにより、ポリ(A)⁺ RNA (mRNA) を得ることができる。

【0022】

このようにして得られたmRNAを鋳型として、市販のキット（例えば、cDNA Synthesis Kit (STRATAGENE社製)）を用い、オリゴdT20及び逆転写酵素によって一本鎖cDNAを合成した後、該一本鎖cDNAから二本鎖cDNAを合成する。次いで得られた二本鎖cDNAに適切なアダプター又はカセット（例えば、EcoRIカセット (TAKARA社製)）を付加することにより、例えばRACE-PCRの鋳型となるcDNAライブラリーを作製することができる。RACE-PCR法を行うためのキットとしては、例えば3'-Full RACE Core Set (Takara社製)、5'-Full RACE Core Set (Takara社製) などを用いることができる。

【0023】

(2) Md T F L 遺伝子断片の取得

Md T F L 遺伝子をクローニングする方法としては、該遺伝子の断片を用いて、R A C E - P C R により未知の D N A 領域を明らかにし、最終的に全長 c D N A を P C R により増幅して、該遺伝子を含む増幅産物を適切なベクターにクローニングする方法が挙げられる。

【0024】

Md T F L の断片は、シロイヌナズナ (*A r a b i d o p s i s t h a l i a n a*) の T F L 1 (G e n B a n k アクセション番号 U 7 7 6 7 4) 及びキンギョソウ (*A n t i r r h i n u m m a j a s*) の C E N T R O R A D I A L I S (C E N 遺伝子: G e n B a n k アクセション番号 S 8 1 1 9 3) のコンセンサス配列から設計した縮重プライマーを使用して、P C R を行うことによって得ることができる。ここで P C R で用いることのできる鋳型 D N A としては、バラ科植物のゲノム D N A 又は上記 (1) で得られた c D N A ライブラリーが挙げられる。また縮重プライマーの例として、センスプライマーとしては 5' - A A T / C G G I C A T / C G A A / G T / C T I T T T / C C C - 3' (配列番号 3)、アンチセンスプライマーとしては 5' - C G / T T / C T G I G C A / G T T A / G A A A / G A A I A C - 3' (配列番号 4) が挙げられる。ただし、本発明においてはこれらのプライマーに限定されるものではなく、当業者であれば上記コンセンサス配列に基づいて適当なプライマーを設計することができる。

10

【0025】

(3) Md T F L 遺伝子の取得

上記 (2) で得られた Md T F L 遺伝子の断片内に、遺伝子特異的なセンスプライマー及びアンチセンスプライマーを適切な領域にそれぞれ 2 つ設計し、該遺伝子の 5' 側の未知配列の解明には 2 つのアンチセンスプライマーと 2 つのカセットプライマー、該遺伝子の 3' 側の未知配列の解明には 2 つのセンスプライマーと 2 つのカセットプライマーを用いて R A C E - P C R を行い、Md T F L 遺伝子の 5' 上流又は 3' 下流を含む D N A 断片を得る。このプライマーは、5' - R A C E に対しては、上記 (2) で得られた遺伝子断片の 3' 側に 20 b p 程度の特異的配列、また 3' - R A C E に対しては、上記 (2) で得られた遺伝子断片の 5' 側に 20 b p 程度の特異的配列として設計する。

20

【0026】

次いで、5' 上流及び 3' 下流の特異的配列をもつプライマーを作製し、P C R を行うことにより Md T F L c D N A を増幅することができる。このプライマーは、5' - R A C E で得られた 5' 上流の 20 b p 程度の特異的配列及び 3' - R A C E で得られた 3' 下流領域 (ポリ A 領域を除く) の特異的配列として設計する。P C R の鋳型としては、上記 (1) で得られた c D N A ライブラリーを用いることができる。

30

【0027】

上記 (3) で得られた Md T F L 遺伝子を、例えばプラスミド p B l u e s c r i p t の E c o R V 部位に T 末端を付加したプラスミドベクターに連結した後、大腸菌 (*E s c h e r i c h i a c o l i*) 等を形質転換することにより、この遺伝子をクローニングすることができる。

【0028】

具体的には、使用し得るベクターとしては、プラスミド p B l u e s c r i p t 以外に、p U C 1 8、p U C 1 1 9、p B R 3 2 2 等が挙げられる。P C R 産物は、通常は末端にアデニン (A) が付加する傾向があり、ベクターは、例えば E c o R V 等の平滑末端を生じる制限酵素で切断し、チミン (T) 末端を付加することにより容易にクローニングできる (T A クローニング法)。該遺伝子の P C R 産物と、T 末端処理したプラスミド p B l u e s c r i p t との結合は、例えば T A K A R A 社製の L i g a t i o n k i t を用いて、通常 16 °C で約 1 時間処理することにより行えばよい。

40

【0029】

大腸菌の形質転換は周知の方法を用いて行うことができる。ベクターとして p B l u e s c r i p t を用いた場合は、得られる形質転換体がアンピシリン耐性になり、同時に、β ガラクトシダーゼをコードしている領域に外来遺伝子が挿入されることにより、β ガラク

50

トシダーゼ活性が欠失する。そのため、アンピシリン耐性で、かつX-GALを分解できない、白色のコロニーを形質転換体として選択できる（ブルー・ホワイトセクション）。このようにして、ベクタープラスミドpBluescriptにMdTF L遺伝子が組み込まれたプラスミドpBMDTF L 12を有する形質転換体を得ることができる。例えば、大腸菌JM109に導入して、形質転換体である大腸菌JM109（pBMDTF L 12）を得ることができる。

【0030】

また、形質転換された微生物、例えば上記のプラスミドpBMDTF L 12を有する大腸菌を培養し、例えばアルカリ-SDS法等の周知の手段を用いることにより、MdTF L遺伝子が組み込まれたプラスミドpBMDTF L 12を大量に得ることが可能である。

10

【0031】

（４）遺伝子の解析

上記（３）で得られたプラスミドベクターpBMDTF L 12を用いて、MdTF Lの全塩基配列の決定を行う。塩基配列の決定は、マクサム-ギルバートの化学修飾法、又はジデオキシヌクレオチド鎖終結法などの周知の手法により行うことができるが、通常は自動塩基配列決定機（例えば日立製作所製SQ-5500 DNAシーケンサーなど）を用いて配列決定を行う。

【0032】

配列番号１に、本発明のMdTF L遺伝子の塩基配列を、配列番号２に、該MdTF L遺伝子をコードするタンパク質（以下、「MdTF Lタンパク質」という）のアミノ酸配列を例示する。ただし、植物間でも品種等によって多少のアミノ酸配列の相違はあり得る。また、同一植物品種であっても突然変異等によってアミノ酸が変化する場合がある。よって、本発明では、配列番号２に示すアミノ酸配列のうち複数個（１若しくは数個、例えば１～１０個）のアミノ酸が置換、欠失又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつ花芽形成抑制活性を有するタンパク質も本発明に含まれる。

20

【0033】

例えば、配列番号２に示されるアミノ酸配列の１～１０個、好ましくは１～５個のアミノ酸が欠失してもよく、配列番号２に示されるアミノ酸配列に１～１０個、好ましくは１～５個のアミノ酸が付加してもよく、あるいは、配列番号２に示されるアミノ酸配列の１～１０個、好ましくは１～５個のアミノ酸が他のアミノ酸に置換したものの、本発明のMdTF Lタンパク質に含まれる。

30

【0034】

本発明において「花芽形成抑制活性」とは、花芽形成を抑制し、開花の遅延を引き起こす性質を指す。この活性は、モデル植物であるシロイヌナズナやタバコに、該活性を有すると考えられる遺伝子を導入し、それらの開花時期を調べることによって確認することができる。

【0035】

さらに、上記MdTF L遺伝子の塩基配列からなるDNAの全部又は一部の配列に相補的な配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、花芽形成抑制活性を有するタンパク質をコードする遺伝子も本発明のMdTF L遺伝子に含まれる。ストリンジェントな条件とは、特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。例えば、高い相同性（相同性が７６％以上、好ましくは８０％以上）を有するDNAがハイブリダイズする条件をいう。より具体的には、ナトリウム濃度が３００～２０００mM、好ましくは６００～９００mMであり、温度が４０～７５℃、好ましくは６５℃での条件をいう。例えば、ハイブリダイゼーション条件が、ナトリウム濃度が５００mM、温度が６５℃の場合に、慣例的な手法、例えばサザンブロット、ドットブロットハイブリダイゼーションなどによってハイブリダイズすることが確認された場合には、ストリンジェントな条件でハイブリダイズするといえる。

40

【0036】

ここで、「一部の配列」とは、上記MdTF L遺伝子の塩基配列の一部分を含むDNAの

50

塩基配列であって、該DNAが花芽形成抑制活性を有するタンパク質をコードするものを指す。

【0037】

一旦本発明のMdTF L遺伝子の塩基配列が確定されると、その後は化学合成によって、又は該遺伝子のcDNA又はゲノムDNAを鋳型としたPCRによって、あるいは該塩基配列を有するDNA断片をプローブとしてハイブリダイズさせることにより、本発明のMdTF L遺伝子を得ることができる。

本発明のMdTF L遺伝子の塩基配列及びMdTF Lのアミノ酸配列は、DDBJにアクセッション番号AB052994として登録されている。

【0038】

(5) MdTF L遺伝子のコピー数、及び植物組織における発現部位の分析

MdTF L遺伝子のバラ科植物におけるコピー数の確認は、バラ科植物の細胞及び組織から常法に従ってDNAを抽出し、サザン分析を用いて行うことができる。このようにしてMdTF L遺伝子のコピー数及び発現部位を分析することによって、ジーンファミリーを形成する傾向があるTF L 1様遺伝子の特徴を調べることができる。

【0039】

また、MdTF L遺伝子の植物組織における発現は、バラ科植物の各組織におけるmRNAの発現又はタンパク質の発現を解析することにより確認することができる。具体的には、本発明のMdTF L遺伝子の発現を確認する方法としては、RT-PCR、ノーザン分析等が挙げられ、MdTF Lタンパク質の発現の確認方法としては、MdTF Lタンパク質に対する抗体を用いたウェスタン分析等が挙げられる。MdTF L遺伝子の発現様式を特定することによって、MdTF L遺伝子の特徴を明らかにすることができるため、機能の解明に役立つ。

【0040】

2. MdTF Lタンパク質の製造

本発明のMdTF Lタンパク質は、前述したバラ科植物の細胞又は組織から当技術分野で公知のタンパク質の精製方法によって製造することができる。また、当技術分野で公知の化学的ペプチド合成方法、例えば固相合成法などによって製造することもできる。また、MdTF Lタンパク質をコードするDNAで形質転換された形質転換体を培養し、得られる培養物から該タンパク質を回収することによっても製造することができる。このような遺伝子工学的手法を利用したタンパク質の生産方法は当技術分野で周知であり、以下に具体的に説明する。

【0041】

(1) ベクターの作製

形質転換用の組換えベクターは、MdTF L遺伝子を適当なベクターに連結することにより得ることができ、形質転換体は、この組換えベクターを、MdTF L遺伝子が発現し得るように宿主中に導入することにより得ることができる。

【0042】

ベクターには、宿主において自律的に増殖し得るファージ又はプラスミドが使用される。プラスミドDNAとしては、大腸菌由来のプラスミド（例えばpBR322、pUC18、pUC19等）、枯草菌由来のプラスミド（例えばpUB110、pTP5等）、酵母由来のプラスミド（例えばYEp13、YEp24、YCP50等）などが挙げられ、ファージDNAとしてはλファージ（λgt10、λgt11、λZAP等）が挙げられる。さらに、レトロウイルス又はワクシニアウイルスなどの動物ウイルス、バキュロウイルスなどの昆虫ウイルスベクターを用いることもできる。

【0043】

ベクターにMdTF L遺伝子を挿入するには、まず、精製されたDNAを適当な制限酵素で切断し、適当なベクターDNAの制限酵素部位又はマルチクローニングサイトに挿入してベクターに連結する方法などが採用される。

【0044】

10

20

30

40

50

M d T F L 遺伝子は、その遺伝子の機能が発揮されるようにベクターに組み込まれることが必要である。そこで、組換えベクターには、プロモーター、M d T F L 遺伝子のほか、所望によりエンハンサーなどのシスエレメント、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、リボソーム結合配列（S D 配列）などを連結することができる。なお、選択マーカーとしては、例えばジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子等が挙げられる。さらに、大腸菌及び酵母などの2種以上の宿主微生物で自律的増殖が可能なベクターのほか、各種のシャトルベクターを使用することもできる。このようなベクターについても、前記制限酵素で切断し、その断片を得ることができる。

【0045】

10

DNA断片とベクター断片とを連結させるには、公知のDNAリガーゼを用いる。そして、DNA断片とベクター断片とをアニーリングさせた後連結させ、組換えベクターを作製する。

【0046】

(2) 形質転換

形質転換に使用する宿主としては、M d T F L 遺伝子を発現できるものであれば特に限定されるものではない。例えば、細菌（大腸菌、枯草菌等）、酵母、植物細胞、動物細胞（COS細胞、CHO細胞等）、昆虫細胞が挙げられる。

【0047】

細菌を宿主とする場合は、組換えベクターが該細菌中で自律複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、M d T F L 遺伝子、転写終結配列により構成されていることが好ましい。また、プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。大腸菌としては、例えばエッシャーヒア・コリ（*Escherichia coli*）DH5 α などが挙げられ、枯草菌としては、例えばバチルス・ズブチリス（*Bacillus subtilis*）などが挙げられる。プロモーターは、大腸菌等の宿主中で発現できるものであればいずれを用いてもよい。例えばtrpプロモーター、lacプロモーター、P_Lプロモーター、P_Rプロモーターなどの、大腸菌やファージに由来するプロモーターが用いられる。tacプロモーターなどのように、人為的に設計改変されたプロモーターを用いてもよい。細菌への組換えベクターの導入方法は、細菌にDNAを導入する方法であれば特に限定されるものではない。例えばカルシウムイオンを用いる方法、エレクトロポレーション法等が挙げられる。

20

30

【0048】

酵母を宿主とする場合は、例えばサッカロミセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）、シズサッカロミセス・ポンベ（*Schizosaccharomyces pombe*）などが用いられる。この場合、プロモーターは酵母中で発現できるものであれば特に限定されず、例えばGAL1プロモーター、GAL10プロモーター、ヒートショックタンパク質プロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター等を用いることができる。酵母への組換えベクターの導入方法は、酵母にDNAを導入する方法であれば特に限定されず、例えばエレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法等が挙げられる。

40

【0049】

動物細胞を宿主とする場合は、サル細胞COS-7、Vero、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO細胞）、マウスL細胞、ラットGH3、ヒトFL細胞等が用いられる。プロモーターとしてSR α プロモーター、SV40プロモーター、CMVプロモーター等が用いられ、また、ヒトサイトメガロウイルスの初期遺伝子プロモーター等を用いてもよい。動物細胞への組換えベクターの導入方法としては、例えばエレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等が挙げられる。

【0050】

昆虫細胞を宿主とする場合は、Sf9細胞などが用いられる。昆虫細胞への組換えベクターの導入方法としては、例えばリン酸カルシウム法、リポフェクション法、エレクトロポ

50

レーション法などが挙げられる。

【0051】

(3) MdTFLタンパク質の生産

本発明において、MdTFLタンパク質は、MdTFL遺伝子を保有する前記形質転換体を培養し、その培養物から採取することにより得ることができる。「培養物」とは、培養上清、培養細胞、培養菌体、又は細胞若しくは菌体の破碎物のいずれをも意味するものである。本発明の形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行われる。

【0052】

大腸菌や酵母菌等の微生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行うことができる培地であれば、天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。 10

【0053】

炭素源としては、グルコース、フラクトース、スクロース、デンプン等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコール類が用いられる。窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸若しくは有機酸のアンモニウム塩、ペプトン、肉エキス、コーンステープリカー、又はその他の含窒素化合物が用いられる。無機物としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等が用いられる。 20

【0054】

培養は、通常、振盪培養又は通気攪拌培養などの好氣的条件下、約37℃で約5～30日間行う。培養期間中、pHは中性付近に保持する。pHの調整は、無機又は有機酸、アルカリ溶液等を用いて行う。培養中は必要に応じてアンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0055】

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養する場合は、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、Lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピルーβ-D-チオガラクトシド (IPTG) 等を、trpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドール酢酸 (IAA) 等を培地に添加してもよい。 30

【0056】

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI 1640培地、DMEM培地又はこれらの培地に牛胎児血清等を添加した培地等が用いられる。培養は、通常、5%CO₂存在下、37℃で約1～30日間行う。培養中は必要に応じてカナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0057】

培養後、MdTFLタンパク質が菌体内又は細胞内に生産される場合には、菌体又は細胞を破碎することによりタンパク質を抽出する。また、MdTFLタンパク質が菌体外又は細胞外に生産される場合には、培養液をそのまま使用するか、遠心分離等により菌体又は細胞を除去する。その後、タンパク質の単離精製に用いられる一般的な生化学的方法、例えば硫酸アンモニウム沈殿、ゲルクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等を単独で又は適宜組み合わせて用いることにより、前記培養物中からMdTFLタンパク質を単離精製することができる。 40

MdTFLタンパク質が得られたか否かは、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動等により確認することができる。

【0058】

3. 組換えベクターの作製及び形質転換植物の作出

上記「1. MdTFL遺伝子の単離・同定」の節に記載のようにして得られたMdTFL 50

遺伝子又は該遺伝子のアンチセンスDNAを植物宿主に導入し、該MdTFL遺伝子の発現を増強又は抑制することにより、花芽形成時期を制御することができる。例えば、植物宿主のMdTFL遺伝子の発現を抑制することによって、早期開花性を有する形質転換植物を作出することができる。一方、MdTFL遺伝子の発現を増強することによって、遅延開花性を有する形質転換植物を作出することができる。このようにMdTFL遺伝子の発現が制御された形質転換植物は、植物の花芽形成及び開花を研究するために利用することができる。

【0059】

本発明において「早期開花性」とは、植物体が発生してから初めて開花するまでの期間が対照植物（非形質転換体）より短いことを意味する。また「遅延開花性」とは、植物体が発生してから初めて開花するまでの期間が対照植物より遅いことを意味する。

10

【0060】

（１）形質転換のための植物宿主

本発明において植物宿主とは、植物培養細胞、栽培植物の植物体全体、植物器官（例えば葉、花卉、茎、根、根茎、種子等）、又は植物組織（例えば表皮、師部、柔組織、木部、維管束等）のいずれをも意味するものである。植物宿主として用いることのできる植物としては、特に限定されるものではないが、幼若期間が長い植物種に早期開花性を付与するという本発明の目的を考慮した場合、モデル植物であるシロイヌナズナの他に、特に永年性植物や樹木が望ましい。「永年性」とは、イネやムギなどのように１年で一生を終えるのではなく、数年間（５～１０年以上）生育できること（多年生）を指す。永年性植物としては、例えば果実を有する植物（果樹植物）が挙げられる。永年性果樹植物としては、バラ科植物（リンゴ、ナシ、モモ、オウトウ等）、カキノキ科植物（カキ等）、ブドウ科植物（ブドウ等）、ミカン科植物（カラタチ属、キンカン属、カンキツ属等に属する植物）、ツツジ科（ブルーベリー、クランベリー等）、クルミ科（クルミ等）、ブナ科（クリ等）などが挙げられる。樹木としては、スギ科（スギ等）、マツ科（アカマツ、クロマツ等）、ヒノキ科（ヒノキ等）などが挙げられる。

20

【0061】

（２）組換えベクター

MdTFL遺伝子又は該遺伝子のアンチセンスDNAを含む組換えベクターは、適当なベクターに、該遺伝子又は該アンチセンスDNAを連結（挿入）することにより得ることができる。MdTFL遺伝子又は該遺伝子のアンチセンスDNAを挿入するためのベクターは、植物宿主中で複製可能なものであれば特に限定されず、例えば、プラスミドDNA、ファージDNA、バイナリーベクター系などが挙げられる。

30

【0062】

プラスミドDNAとしては、大腸菌由来のプラスミド（例えばpBR322、pUC18、pUC19等）、枯草菌由来のプラスミド（例えばpBU110、pTP5等）などが挙げられ、ファージDNAとしてはλファージ（λgt10、λgt11、λZAP等）が挙げられる。また、アグロバクテリウム法（後述参照）を用いて形質転換を行う場合には、バイナリーベクター系（pBI121、pGA482、pSMAK251等）を使用することができる。

40

【0063】

MdTFL遺伝子は、上記「１．MdTFL遺伝子の単離・同定」の節に記載のようにして得ることができる。またMdTFL遺伝子のアンチセンスDNAとしては、配列番号１に示す塩基配列に対し相補的な配列からなるDNAを例示することができる。ただし、本発明において用いるアンチセンスDNAは、植物宿主に導入されて、内在性MdTFL遺伝子の発現を抑制する限り、配列番号１に示す塩基配列に対して完全に相補的な配列である必要はない。従って、配列番号１に示す塩基配列の全部若しくは一部に相補的な配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ花芽形成抑制活性を有するタンパク質をコードするDNAに対し相補的な配列からなるDNAもまた本発明においてアンチセンスDNAとして利用可能である。さらに、アンチセンスDNAは、植

50

物宿主に導入されて、内在性M d T F L遺伝子の発現（翻訳又は転写）を抑制又は阻害する限り、配列番号1に示す塩基配列に対し相補的な配列の一部であってもよい。ストリンジェントな条件及びD N Aの合成方法は、「1. M d T F L遺伝子の単離・同定」の節に記載の通りである。

【0064】

組換えベクターに、M d T F L遺伝子又は該遺伝子のアンチセンスD N Aを挿入するには、まず、精製されたD N Aを適当な制限酵素で切断した後、必要に応じて適切なリンカーを連結し、適当なベクターD N Aの制限酵素部位又はマルチクローニングサイトに挿入してベクターに連結する方法などが採用される。

【0065】

M d T F L遺伝子又は該遺伝子のアンチセンスD N Aは、その機能が発揮されるようにベクターに組み込まれることが必要である。そこでベクターには、発現カセットとして、（i）植物細胞内で転写可能なプロモーター配列、（i i）プロモーター配列の下流にM d T F L遺伝子又は該遺伝子のアンチセンスD N Aと、（i i i）該遺伝子又は該アンチセンスD N Aの下流に結合された、転写の終結及びポリアダニル化に必要な配列を含むターミネーター配列を連結する。発現カセットには、プロモーター以外にも転写をさらに促進するためのD N A配列、例えばエンハンサー配列などのシスエレメント、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、リボソーム結合配列（S D配列）などを連結することができる。

10

【0066】

用いられるプロモーターとしては、植物内で機能するものであれば特に制限されない。例えば、35Sプロモーターなどの恒常的な発現のためのプロモーターや誘導可能なプロモーターを用いることも可能である。

20

【0067】

また、必要に応じて転写終結を指令するターミネーターをM d T F L遺伝子又は該遺伝子のアンチセンスD N Aの下流に連結することもできる。ターミネーターとしては、カリフラワーモザイクウイルス由来ターミネーター、ノパリン合成酵素遺伝子ターミネーターなどが挙げられる。ただし、植物内で機能することが知られているターミネーターであればこれに限定されるものではない。

【0068】

さらに、効率的に目的とする形質転換植物を選択するために、有効な選択マーカー遺伝子を組換えベクターに連結することが望ましい。その際に使用する選択マーカーとしては、カナマイシン耐性遺伝子（N T P I I）、抗生物質ハイグロマイシンに対する抵抗性を植物に付与するハイグロマイシンホスフィノスリシンアセチルトランスフェラーゼ（h t p）遺伝子、ピアラホス（b i a l a p h o s）に対する抵抗性を付与するホスフィノスリシンアセチルトランスフェラーゼ（b a r）遺伝子などが挙げられる。

30

【0069】

（3）形質転換体の作出

本発明の形質転換植物は、上記（2）に記載の組換えベクターを、該ベクターに連結したM d T F L遺伝子又は該遺伝子のアンチセンスD N Aが機能し得るように植物宿主中に導入することにより得ることができる。

40

【0070】

上記組換えベクターは、公知の種々の方法を用いて植物宿主に導入することができる。例えば、アグロバクテリウムを利用した間接導入法や、エレクトロポレーション法、ポリエチエングリコール法、パーティクルガン法等に代表される直接導入法を用いることができる。これらのうち、バラ科をはじめとする双子葉植物に対しては、アグロバクテリウムを用いる方法が安定な形質転換を確実にできる点から極めて有効である。

【0071】

例えばアグロバクテリウム法を用いる場合は、構築した組換えベクターを、適当なアグロバクテリウム、例えばアグロバクテリウム・チュメファシエンス（A g r o b a c t e r

50

ium tumefaciens) C58、LBA4404、EHA101、C58 Cl Rif^R、EHA105等、アグロバクテリウム・リゾゲネス (Agrobacterium rhizogenes) LBA9402等に、凍結融解法、エレクトロポレーション法などを利用して導入する。続いてこの株をフローラルディップ法、リーフディスク法などに従って無菌培養葉片に感染させて、形質転換植物を得ることができる。また、アグロバクテリウム感染法には、中間ベクター法、バイナリーベクター法などがあり、本発明においてはいずれの感染法を利用しても遺伝子導入が可能である。

【0072】

また、パーティクルガン法を用いる場合は、植物体、植物器官、植物組織自体をそのまま使用してもよく、切片を調製した後に使用してもよく、プロトプラストを調製して使用してもよい。このように調製した試料を遺伝子導入装置（例えばPDS-1000 (BIO-RAD社)等）を用いて処理することができる。処理条件は植物又は試料により異なるが、通常は450～2000 psi程度の圧力、4～12 cm程度の距離で行う。植物培養細胞を宿主として用いる場合は、形質転換は、組換えベクターをパーティクルガン法、エレクトロポレーション法等で培養細胞に導入する。

【0073】

組換え効率及び取り扱いの容易性の観点から、本発明の好ましい例として、以下にバイナリーベクター系を用いたアグロバクテリウム感染法による形質転換植物の作出を具体的に説明する。

【0074】

アグロバクテリウム感染法により遺伝子を導入する場合、目的の遺伝子を含むプラスミドを保有するアグロバクテリウムを植物宿主に感染させる工程が必要である。この工程をフローラルディップ法により行う場合には、形質転換対象の植物宿主を生育させ、Md TFL遺伝子又は該遺伝子のアンチセンスDNAを有するプラスミドを含むアグロバクテリウム懸濁溶液に直接該植物宿主の花芽を浸漬し、鉢をトレーに移し、覆いをして一晚湿度を保つ。翌日覆いを取り、植物をそのまま生育させて種子を収穫する。次いで、導入遺伝子保有個体を選択するために、様々な株由来の種子を適切な抗生物質を加えたMS寒天培地に播種する。この培地で生育した植物を鉢に移植し、生育させることにより、本発明のMd TFL遺伝子又は該遺伝子のアンチセンスDNAが導入された形質転換植物の種子を得ることができる。

【0075】

一方、永年性植物を宿主とした場合のアグロバクテリウムの感染は、直接かつ多数の形質転換体を作成し得るという観点から、リーフディスク法を採用することが望ましい。すなわち、無菌培養したリンゴ属植物の無菌葉から採取したリーフディスクを、例えばアグロバクテリウム・ツメファシエンスEHA101 (pSMdTFL)の培養液に浸漬した後、茎葉分化培地にて培養してカルスを形成させ、増殖させればよい。茎葉分化培地としては、例えばMS培地等の公知の培地に植物ホルモンを添加したものを使用することができる。その後選択用の茎葉分化培地を用いてカルスの選択を行う。選択用の培地としては、上記の茎葉分化培地にさらに、形質転換体の選抜のために例えばカナマイシンを25～100 µg/mL、またアグロバクテリウムの殺菌のためにセフトキシム等の殺菌剤を200～500 µg/mL加えたものを使用すればよい。

【0076】

形質転換の結果得られるカルスやシュート、毛状根などは、そのまま細胞培養、組織培養又は器官培養に用いることが可能であり、また従来知られている植物組織培養法を用い、適当な濃度の植物ホルモン（オーキシン、サイトカイニン、ジベレリン等）の投与などにより植物体に再生させることができる。また形質転換植物の鉢上げは、形質転換した植物体を発根培地に移植して自根を形成させ、次いでポット土に移植する。あるいは、適当な台木に接ぎ木することにより鉢上げを行う。これにより培養室レベルから温室レベルの栽培に移行することが可能となる。

【0077】

10

20

30

40

50

Md T F L 遺伝子又は該遺伝子のアンチセンス D N A が植物に導入されたか否かの確認は、P C R 法、サザンハイブリダイゼーション法、ノーザンハイブリダイゼーション法等により行うことができる。例えば、形質転換植物から D N A を調製し、D N A 特異的プライマーを設計して P C R を行う。その後は、増幅産物についてアガロースゲル電気泳動、ポリアクリルアミドゲル電気泳動又はキャピラリー電気泳動等を行い、臭化エチジウム、S Y B R Green 液等により染色し、そして増幅産物を 1 本のバンドとして検出することにより、形質転換されたことを確認することができる。また、予め蛍光色素等により標識したプライマーを用いて P C R を行い、増幅産物を検出することもできる。さらに、マイクロプレート等の固相に増幅産物を結合させ、蛍光又は酵素反応等により増幅産物を確認する方法も採用することができる。

10

【0078】

(4) 形質転換植物における Md T F L 遺伝子の発現解析

Md T F L 遺伝子又は該遺伝子のアンチセンス D N A を導入した形質転換植物における Md T F L 遺伝子の発現レベル及び発現部位の分析は、これらの細胞及び組織から当技術分野で公知の方法に従って m R N A を抽出し、公知の R T - P C R 法又はノーザン分析を用いて Md T F L 遺伝子の m R N A を検出することにより行うことができる。

【0079】

Md T F L 遺伝子の発現が増強された形質転換植物は、植物の花芽形成及び開花を研究するために利用することができる。また Md T F L 遺伝子の発現が抑制された形質転換植物は、早期開花性を示すため、農業的に価値が高いものである。

20

【0080】

4. 早期開花性植物

上記「2. 組換えベクターの作製及び形質転換植物の作出」の節に従って作出された、Md T F L 遺伝子の発現が抑制された形質転換植物は早期開花性を示し、該遺伝子の発現が増強された形質転換植物は遅延開花性を示す。

【0081】

この形質転換植物の開花時期に関する評価（例えば早期開花性又は遅延開花性）は、Md T F L 遺伝子又は該遺伝子のアンチセンス D N A を導入した形質転換植物と非形質転換植物を同様の条件で栽培し、それぞれの開花時期を比較することにより行うことができる。例えば、モデル植物であるシロイヌナズナでは、バーミキュライト及びパーライトを含む土を入れた植木鉢に形質転換植物を植え、20～25℃で生育させ、開花時期を調べればよい。また永年性植物では、上記無菌培養系で形質転換されたシュートを接ぎ木するなどして鉢上げし、温室に移した後、開花時期を調べればよい。

30

【0082】

さらに、上記の感染細胞からの植物体の分化／誘導の手順を用いて、形質転換された植物体の組織（例えば、根、茎、葉）又は器官（例えば、生長点、花粉）の組織培養によって、生殖過程（種子）を介することなく、さらなる形質転換植物を得ることができる。このような技術及び手順は当業者には公知であり、組織培養の一般的な方法は、種々の実験マニュアルに記載されている。

【0083】

このようにして作出した本発明の形質転換植物から得られる種子もまた正常に発芽及び成長し、そして早期開花性を示す。これは導入された Md T F L 遺伝子又は該遺伝子のアンチセンス D N A が次世代においても保存されることを示し、それゆえ上記早期開花性が安定して後代に受け継がれることを示す。従って、本発明により、早期開花性を示す実用的で有用な植物が得られる。

40

【0084】

【実施例】

以下の実施例によって本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0085】

50

〔実施例 1〕 M d T F L 遺伝子の単離

(1) 実験に使用したリンゴ植物体

マルバ台に接ぎ木した 15～16 年生の紅玉 (M a l u s × d o m e s t i c a v a r . J o n a t h a n) を使用した。

【0086】

(2) ポリ (A) ⁺ R N A の調製

花芽分化前後の 7 月～9 月に、上記 (1) の植物体より茎頂部分を採取し、C T A B 法により全 R N A を調製した。すなわち、凍結したリンゴ茎頂 3 g を粉末状に磨砕後、3 m L の 2 × C T A B 溶液 (2 % C T A B、0.1 M T r i s - H C l p H 9.5、20 m M E D T A、1.4 M N a C l、1 % 2 - プロパノール) に懸濁し、65 °C で 10 10
分間インキュベートした。溶液をクロロホルム・イソアミルで 2 回抽出後、1 / 4 倍量の 10 M 塩化リチウムを加え、-20 °C にて 2 時間放置し、R N A を析出させた。その後、4 °C、12,000 × g で 10 分間遠心し、R N A を沈殿させた。

【0087】

得られた全 R N A を T E (10 m M T r i s - H C l (p H 8.0)、1 m M E D T A) に溶解し、T E 飽和フェノール、フェノール / クロロホルム処理、及びエタノール沈殿を行うことにより全 R N A を得た。得られた全 R N A を滅菌水に溶解し、吸光度測定法及びホルムアルデヒド変性アガロースゲル電気泳動法により、良質の全 R N A が調製されたことを確認した。

【0088】

上記全 R N A 140 μ g を、235 μ l の滅菌水に溶解し、35 μ l の o l i g o t e x (d T) 30 (T O Y O B O 社製) を加え、70 °C で 10 分間加熱後、氷中で急冷した。これに 17.5 μ l の 5 M N a C l を加え、攪拌した後、37 °C で 10 分間加熱した。次いで、25 °C、12,000 × g で 5 分間遠心し、上清を捨て、500 μ l の洗浄バッファ (10 m M T r i s - H C l (p H 7.5)、1 m M E D T A、0.5 M N a C l、0.1 % S D S) を加えて再度 25 °C、12,000 × g で 5 分間遠心した。沈殿に 100 μ l の蒸留水を加え、65 °C で 5 分間加熱した後、25 °C、12,000 × g で 10 分間遠心した。上清を保存し、沈殿に再度 100 μ l の蒸留水を加え、65 °C で 5 分間加熱した後、25 °C、12,000 × g で 10 分間遠心した。上清を回収し、1 回 30
目の上清と合わせた。次いで、エタノール沈殿を行って、3.0 μ g のポリ (A) ⁺ R N A を得た。

【0089】

(3) c D N A ライブラリーの合成

上記 (2) によって得られたポリ (A) ⁺ R N A 3.0 μ g を使って、c D N A 合成キット (A m e r s h a m 社製) により 1 本鎖 c D N A を合成した。この反応には、プライマーとして、オリゴ (d T) 25 を用いた。R N A / プライマー混合液は以下の組成で調製した。

R N A	30 μ l (3 μ g)
プライマー	3 μ l
全量	33 μ l

【0090】

上記混合物を、70 °C で 5 分間加熱した。氷上に 1 分間置き、以下の試薬を加えた。

RNA／プライマー混合液	33 μ l
5×第1鎖合成反応用緩衝液	12 μ l
リン酸	3 μ l
HPRI (ヒト胎盤RNase阻害剤)	3 μ l
第1鎖用NTPミックス	6 μ l
全量	57 μ l

【0091】

10

上記溶液に、逆転写酵素 3 μ l (20 単位/ μ l) を添加して、42 °C で 2 時間インキュベートすることにより一本鎖 cDNA を合成した。次に、得られた一本鎖 cDNA の反応液に、以下の試薬を加えた。

一本鎖cDNA反応液	60 μ l
5×第2鎖合成用緩衝液	120 μ l
第2鎖用NTPミックス	6 μ l
0.8単位/ μ l RNase H	3 μ l
23単位/ μ l DNAポリメラーゼI	20 μ l
滅菌蒸留水	97 μ l
全量	200 μ l

20

【0092】

30

上記反応液を、12 °C で 1 時間、22 °C で 1 時間、さらに 70 °C で 10 分間インキュベートすることにより、二本鎖 cDNA を合成した。合成した二本鎖 cDNA を、T4 ポリメラーゼ 6 単位を用いて 37 °C で 10 分間インキュベートすることにより末端を平滑にした。次いで、フェノール／クロロホルム抽出及びエタノール沈殿を行った後、得られたペレットを 20 μ l の TE バッファーに溶解した。3 μ l の cDNA 溶液 (1.0 g) に、3 μ l の EcoRI アダプター、3 μ l のライゲーションキット溶液 I 及び 6 μ l のライゲーションキット溶液 II (Takara 社製) を混合し、4 °C で 12 時間インキュベートすることにより cDNA に EcoRI 末端を付加した。次いで 4.5 μ l (500 μ g) の EcoRI 末端化 cDNA 溶液、1.0 μ l の EcoRI カセット (Takara 社製)、5 μ l のライゲーションキット溶液 I 及び 10 μ l のライゲーションキット溶液 II (Takara 社製) を混合し、4 °C で 12 時間インキュベートすることにより二本鎖 cDNA に EcoRI カセットを付加し、RACE-PCR クローニング用の cDNA ライブラリーを調製した。

【0093】

40

(4) プライマーの作製

シロイヌナズナの TFL1 及びキンギョソウの CENTRORADIALIS (CEN) のタンパク質間でよく保存されているアミノ酸配列をもとに、プライマーを合成した。すなわち、5' センスプライマーとして、両植物の TFL 様タンパク質に共通する N 末端側の IVTDIPG (配列番号 5) に基づいて、プライマー 5'-ATTGTGACTGACATCCCAAGGC-3' (配列番号 6) を合成した。一方、3' アンチセンスプライマーとして、C 末端側の VYFNAQRE (配列番号 7) に基づいて、縮重プライマー 5'-CG/TT/CTGIGCA/GTTA/GAAA/GAAIAC-3' (配列番号 4) を合成した。

【0094】

50

(5) RT-PCR によるリンゴ Md TFL 遺伝子断片の増幅

上記（２）で合成した二本鎖 cDNA を鋳型として、プライマーとしては上記（３）で作製したセンスプライマー及びアンチセンスプライマーを用いて PCR を行った。PCR の反応液の組成は以下の通りである。

cDNA 溶液	1 μ l
滅菌蒸留水	17.5 μ l
10 $\times$ PCR 緩衝液	2.5 μ l
2.5mM dNTP ミックス	2 μ l
10 μ M センスプライマー	1 μ l
10 μ M アンチセンスプライマー	1 μ l
5U/ μ l Taq ポリメラーゼ	0.25 μ l
全量	25.25 μ l

10

上記反応液をよく混合し、95℃で10分間加熱した。PCR は、94℃で1分間の熱変性、50℃で1分間のアニーリング及び72℃で2分間の伸長反応の条件を1サイクルとして40サイクル行った。

【0095】

得られた PCR 産物を 1.5% アガロースゲル電気泳動に供試し、235bp の単一バンドを確認した。この PCR 産物を、EcoRV で切断しかつチミン（T）末端を付加した pBluescript SKII (+) (STRATAGENE 社製) に連結し、組換えプラスミドを構築した。この組換えプラスミドを大腸菌（DH5 α 株）に形質転換した。単一コロニーを LB 培地中で培養し、プラスミドを精製し、Thermo Sequenase premixed cycle sequence kit (Amersham 社製) を用いて、蛍光自動 DNA シーケンサー（日立製作所製、SQ5500）により解析した。複数の PCR 産物の塩基配列を決定した結果、いずれも同配列であり、シロイヌナズナ TFL1 と高い相同性（約 75%）を示した。従って、この遺伝子断片はリンゴの TFL 相同遺伝子の一部分と考えられた。

20

【0096】

（６）リンゴ MdTFL 遺伝子の単離

上記（３）において調製した cDNA ライブラリー及び上記（５）において調製した遺伝子断片を用いて RACE-PCR を行い、MdTFL 遺伝子の全長の単離を行った。すなわち、上記（５）において得られた遺伝子断片内に、特異的な DNA 配列を有する 2 つのセンスプライマー（R1S、R2S）（それぞれ配列番号 8 及び 9）並びに特異的な DNA 配列を有する 2 つのアンチセンスプライマー（R1A、R2A）（それぞれ配列番号 10 及び 11）を設定し、これら 4 つのプライマーとカセットプライマー（C1、C2）（それぞれ配列番号 12 及び 13）（TAKARA 社製）との間で 5' RACE 及び 3' RACE-PCR を行った。5' RACE では、1 回目の PCR は cDNA ライブラリーを鋳型に C1 及び R2A プライマーを用いて行い、2 回目の PCR は 1 回目の PCR 産物を鋳型に C2 及び R2A プライマーを用いて行った。一方、3' RACE では、1 回目の PCR は cDNA ライブラリーを鋳型に C1 及び R1S プライマーを用いて行い、2 回目の PCR は 1 回目の PCR 産物を鋳型に C2 及び R2S プライマーを用いて行った。PCR の反応組成は以下の通りである。

30

40

cDNA溶液／1回目のPCR産物	1 μ l
滅菌蒸留水	17.5 μ l
10×PCR緩衝液	2.5 μ l
2.5mM dNTPミックス	2 μ l
10 μ Mカセットプライマー	1 μ l
10 μ M特異的プライマー	1 μ l
5U/ μ l LA Taqポリメラーゼ	0.25 μ l
全量	25.25 μ l

10

【0097】

上記反応液をよく混合し、1回目及び2回目のいずれのPCR反応も、94℃で30秒間の熱変性、62℃で4分間のアニーリング及び伸長反応の条件を1サイクルとして30サイクル行った。5' RACE-PCR産物として550bp、3' RACE-PCR産物として450bpの増幅産物が得られ、上記(5)に記載の方法で、それぞれの遺伝子断片を複数クローニングし、塩基配列を決定した。5'上流の550bp断片には翻訳開始点のATG、3'下流の450bp断片にはポリA配列の存在が判明したため、それぞれの遺伝子断片内に特異的プライマー(2S、2A)(それぞれ配列番号14及び15)を設定し、LA-PCRによりMdTFL遺伝子の全長を増幅した。PCR反応の条件は、94℃で1分間熱変性、50℃で1分間アニーリング及び72℃で2分間の伸長反応を1サイクルとし、25サイクル行った。以上の操作により、650bpの遺伝子増幅断片を得た。次いで、上記(5)に記載の方法で、遺伝子断片を複数クローニングし、4つの組換えプラスミドpBMDTFL1、pBMDTFL2、pBMDTFL5、及びpBMDTFL12をそれぞれ得た。PCRの反応組成は以下の通りである。

20

cDNA溶液	1 μ l
滅菌蒸留水	17.5 μ l
10×PCR緩衝液	2.5 μ l
2.5mM dNTPミックス	2 μ l
10 μ Mセンスプライマー	1 μ l
10 μ Mアンチセンスプライマー	1 μ l
5U/ μ l LA Taqポリメラーゼ	0.25 μ l
全量	25.25 μ l

30

【0098】

(7) 塩基配列の決定

これらのプラスミドpBMDTFL1、pBMDTFL2、pBMDTFL5、及びpBMDTFL12を用いて、得られたcDNAの全塩基配列を決定した。プラスミドは、培養した大腸菌細胞からアルカリSDS法によって調製した。塩基配列決定は、上記(5)と同様の方法で行った。その結果、プラスミドpBMDTFL1、pBMDTFL2、pBMDTFL5、及びpBMDTFL12中のcDNAは、いずれも656bpの塩基から構成されており(配列番号1)、該塩基中には172アミノ酸残基からなると推定されるタンパク質をコードする唯一のオープンリーディングフレームの存在が明らかとなった。

40

【0099】

〔実施例2〕MdTFL遺伝子のサザンブロット解析

50

(1) ゲノムDNAの調製

リンゴ「紅玉」の葉から、CTAB法によって、ゲノムDNAを調製した。すなわち、リンゴ葉3gを液体窒素で凍結し、乳鉢で迅速に砕いて粉末化した。糖類を除去するため、抽出緩衝液（10%ポリエチレングリコール6000、0.35Mソルビトール、0.1M Tris-HCl pH7.5、1% 2-メルカプトエタノール）を加えて50mLチューブ内でよく混合した後、室温で1,2000×gで5分間遠心した。上清を捨て、ペレットに9mLの分解緩衝液（0.35Mソルビトール、0.1M Tris-HCl pH7.5、1% 2-メルカプトエタノール）と1mLの10%サルコシンを加え、室温で10分間穏やかに攪拌した後、10mLの2×CTAB（2%CTAB、0.1M Tris-HCl pH9.5、20mM EDTA、1.4M NaCl、1% 2-メルカプトエタノール）を加え、56℃で20分間穏やかに振とうした。

【0100】

上記CTAB溶液をクロロフォルム／イソアミルで2回処理した後、等量の2-プロパノールを加え、白い沈殿を得た。このDNA繊維をガラス棒に巻き付けることにより回収し、5mLの1M NaCl溶液に溶解して、56℃で2～3時間のRNase処理（10mg・mL⁻¹）を行った。次いで、得られた消化溶液をエタノール沈殿処理し、1mLのTEに溶解してゲノムDNAを得た。

【0101】

(2) ハイブリダイゼーション

上記(1)で得られたゲノムDNA 10μgをBamHI、EcoRI、HindIII、NcoI、XbaI及びXhoIで消化し、その分解物を0.8%アガロース電気泳動に供試した。泳動後、DNA断片をナイロンメンブレンにトランスファーし、そのメンブレンをプレハイブリダイゼーション溶液（0.5M リン酸水素2ナトリウムpH7.2、7%SDS、1mM EDTA）中に65℃で30分浸漬することにより、プレハイブリダイゼーションを行った。

【0102】

次いで、プローブとして、MdTFI遺伝子を鋳型とし、DIG発光検出キットを用いてPCRによりDIG（ジゴキシゲニン）標識したものを、ハイブリダイゼーションを行った。すなわち、ハイブリダイゼーションは、標識PCRプローブを含むハイブリダイゼーション用緩衝溶液（0.5M リン酸水素2ナトリウムpH7.2、7%SDS、1mM EDTA）中、65℃で16時間メンブレンを浸漬することにより行った。次いで、メンブレンをリン酸緩衝液（40mM リン酸水素二ナトリウムpH7.2、7%SDS、1mM EDTA）中、65℃で20分間3回洗浄し、抗体反応を行った。反応後、オートラジオグラムをとってプローブとハイブリダイズしたバンドを調べた。その結果を図1に示す。

【0103】

DNAの消化に用いた制限酵素のうち、NcoI、XbaI及びXhoIは、いずれもその切断部位がプローブ内に存在しないものであり、メジャーなバンド以外にマイナーなバンドが認められることから、目的のMdTFI遺伝子と相溶性が比較的高い別の遺伝子も存在すると考えられた。

【0104】

〔実施例3〕MdTFI遺伝子のノーザンブロット解析

(1) RNAの調製

リンゴの各器官、すなわち萼、花弁、雄蕊、雌蕊、茎頂、葉、子葉、茎及び根より、上記実施例1の(2)に記載の方法により全RNAを調製した。また、リンゴの茎頂及び花芽部分を、6月から翌年の4月まで一定期間をおいて採取し、それぞれの時期における花芽茎頂の全RNAを調製した。

【0105】

(2) ハイブリダイゼーション

上記(1)で得られた全RNA 10μgをホルムアルデヒド変性1.2%アガロースゲ

10

20

30

40

50

ル電気泳動に供試し、ナイロンメンブレンに転写した。そのメンブレンをプレハイブリダイゼーション溶液（ $5\times$ SSC、 $10\times$ デンハルト溶液、 10mM Na_2PO_4 （ pH 6.5）、 0.5% SDS、 50% フォルムアミド、 $10\text{mg}/\text{mL}$ サケ精子DNA）中に 65°C で1時間浸漬することにより、プレハイブリダイゼーションを行った。次いで、プローブとして、MdTF L遺伝子（配列番号1）を鋳型とし、DIG-RNAラベリングキットを用いて試験管内逆転写反応によりDIG（ジゴキシゲニン）標識したRNAプローブを使用してハイブリダイゼーションを行った。すなわち、ハイブリダイゼーションは、DIGラベルRNAプローブを含むハイブリダイゼーション用緩衝溶液中、 65°C で16時間浸漬することにより行った。次いで、メンブレンを 0.1% SDSを含む $2\times$ SSC中に室温で15分間の洗浄を2回行い、さらに 0.1% SDSを含む $0.2\times$ SSC中に 65°C で15分間の洗浄を2回行った。次いで抗体反応を行った後、オートラジオグラムをとってプローブとハイブリダイズしたバンドを調べた。その結果を図2及び図3に示す。

【0106】

MdTF L遺伝子はリンゴの器官中では、がく、葉及び茎頂部分に発現が認められた（図2）。またリンゴの花芽茎頂部分における時期別の発現パターンは、花芽分化期直前の6月の後半に強い発現が見られ、その後次第に発現レベルが減少する傾向が認められた（図3）。

【0107】

〔実施例4〕植物への遺伝子導入（形質転換）

（1）植物プラスミドの構築

上記実施例1で得られた、MdTF L遺伝子がセンス方向に導入されたpBMDF L12（ $1\mu\text{g}$ ）を、Lバッファー（ 10mM Tris-HCl（ pH 7.5）、 10mM MgCl_2 、 1mM ジチオトレイトール）中 37°C でKpn I（3ユニット）を用いて、次いでKバッファー（ 20mM Tris-HCl（ pH 7.5）、 10mM MgCl_2 、 1mM ジチオトレイトール、 100mM NaCl）中 30°C でBamHI（3ユニット）を用いてそれぞれ2時間かけて切断し、MdTF L遺伝子を含む約 650bp のDNA断片を得た。一方、プラスミドベクターpUC119を同様の制限酵素で切断し、ライゲーションキットを用いて該遺伝子をpUC119ベクターに連結してpUMDF L12.1+を作製し、これを大腸菌DH5 α に形質転換した。

【0108】

得られた形質転換体を培養後、該培養物からpUMDF L12を精製した。次いで、pUMDF L12.1+（ $10\mu\text{g}$ ）を、Mバッファー（ 10mM Tris-HCl（ pH 7.5）、 10mM MgCl_2 、 1mM ジチオトレイトール、 50mM NaCl）中、Xba I（30ユニット）とSac I（30ユニット）を用いて 37°C で12時間切断し、MdTF L遺伝子を含む約 650bp のDNA断片を得た。一方、CaMV35SプロモーターDNAを持つバイナリーベクターpSMAK251（ $10\mu\text{g}$ ）を、Xba I（30ユニット）とSac I（30ユニット）を用いて上記と同様に処理し、GUS領域を除去した。MdTF Lを含む約 650bp の前記DNA断片とpSMAK251とを、ライゲーションキット（TAKARA社製）を用いて、 4°C で16時間反応させることにより連結し、得られた連結物を上記と同様に大腸菌に形質転換した。得られた形質転換体を培養し、該培養物からpSMDTF L12.1.2+を精製した。pSMDTF L12.1.2+は、Sac Iで切断することにより、センス方向に結合したものであることを確認した（図4A）。

【0109】

次いで、MdTF L遺伝子をアンチセンス方向に結合したバイナリーベクターを作製するため、MdTF L遺伝子がアンチセンス方向に導入されたプラスミドpBMDF L5を用いて、上記と同様の方法で操作を行い、pSMDTF L5.1-を得た。pSMDTF L5.1-は、Sac Iで切断することにより、アンチセンス方向に結合したものであることを確認した（図4B）。

【0110】

(2) 植物プラスミド pSMDTFL12. 1. 2+及び pSMDTFL5. 1-を含むアグロバクテリウムの調製

上記(1)において得られた植物プラスミド pSMDTFL12. 1. 2+及び pSMDTFL5. 1-を凍結融解法によりアグロバクテリウム・ツメファシエンスの EHA101株 (E. E. Hood et al., The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of a TiBo542 outside of T-DNA, J. Bacteriol. 168 (1986) 1291-1301) に導入した。すなわち、アグロバクテリウム菌を 500 mL の ψ B 培地 (2% バクトトリプトン、0.5% バクト酵母抽出物、1.0% $MgSO_4$ 、pH 7.2) にて 28℃ で 1 晩培養し、O. D. 650 が 1.0 になったときに細胞を回収し、6000×g で 5 分遠心した。ペレットを 100 mL の LB 培地で洗浄して上記と同様に遠心し、ペレットを 25 mL の LB 培地に再懸濁した。1.5 mL チューブに 200 μ l ずつ分注した後、-80℃ に保存し、コンピテント細胞を得た。

【0111】

200 μ l のコンピテント細胞と pSMDTFL12. 1. 2+又は pSMDTFL5. 1-の精製プラスミド (5 μ g) と 100 μ l の LB 培地を混合し、この混合液を液体窒素に 5 分間静置した。次に 37℃ で 25 分間インキュベートした後、15 mL の LB 培地を加えた。このようにして得た形質転換アグロバクテリウム懸濁液を 28℃ で一晩インキュベーターに静置した。

【0112】

上記懸濁液を 6000×g で 5 分間遠心して細胞を回収した。ペレットを 300 μ l の LB 培地に懸濁し、抗生物質 (100 μ g/mL スペクチノマイシン (トロビシン)、50 μ g/mL ストレプトマイシン) を含む LB 寒天プレートに前記アグロバクテリウム菌懸濁液を 100 μ l 塗りつけた。28℃ で 2 日間培養し、pSMDTFL12. 1+及び pSMDTFL5. 1-が導入されたアグロバクテリウムをそれぞれ得た。

【0113】

(3) シロイヌナズナへのアグロバクテリウムの感染

シロイヌナズナへのアグロバクテリウムの感染は、フローラル・ディップ法で行った。すなわち、上記(2)において得られた形質転換アグロバクテリウムの接合体を、スペクチノマイシン 100 μ g/mL を含む ψ B 培地 (10 mL) 中 28℃ で O. D. 600 nm が 0.8 になるまで培養した。この培養液を遠心して培地を除き、5% ショ糖溶液を O. D. 600 nm が 0.8 になるように添加し、懸濁した。次に Silwet 77 (日本ユニカー社製) を最終濃度 0.02~0.05% (v/v) になるように加え、処理液とした。

【0114】

一方、バーミキュライトとパーライトを等量ずつ合わせた土を入れた 7 センチの植木鉢で 20 本ほどのシロイヌナズナ (コロンビア) を 3 週間育てた。プラスミド pSMDTFL12. 1. 2+又は pSMDTFL5. 1-を含む上記のアグロバクテリウム処理液に、抽台したシロイヌナズナの蕾を 3 秒間浸透しアグロバクテリウムを感染させた。鉢をトレイに移し、一日コップで覆い湿度を保った。植物をそのまま成育させて種子を得た。種子は 0.05% の Tween 20 を含む 2.5% 次亜塩素酸ナトリウム水溶液にて滅菌後、選択用の 1/2 MS 培地にカナマイシン 25 mg/mL を加えた寒天培地に播種した。この選択培地で生育したシロイヌナズナを鉢に移し、形質転換体シロイヌナズナを得た。この種子を選択培地に同様に播種し、さらに後代を獲得した。

【0115】

(4) リンゴ葉へのアグロバクテリウムの感染

組織培養系のリンゴ (*Malus x domestica*) 品種「王林」を、培地 1 L 当たり 1 mg/mL の 6-ベンジルアミノプリン、0.1 mg/mL の 3-インドール酢酸及

び B 5 ビタミンを含む M S 培地に継代し、約 1 ヶ月後に展開した葉を得た。

葉を約 5 m M × 1 0 m M の切片にし、2 8 ° C で一晩培養し、p S M D T F L 5 . 1 - を保有するアグロバクテリウム菌液を葉片に加え、3 0 分間感染させた。次いでこの葉片を M S 培地上に移し、一週間共存培養した。

【0 1 1 6】

(5) 形質転換細胞の選抜及び植物体への再生

共存培養後、葉切片を選択培地（上記 M S 培地に 3 . 3 8 m g / m L の 6 - ベンジルアミノプリン、0 . 9 3 m g / m L の α - ナフチル酢酸、5 0 0 μ g / m L のセフトキシム、2 5 μ g / m L のカナマイシンを添加したもの）に移し、2 5 ° C で 2 週間暗下で培養し、その後、明 1 6 時間及び暗 8 時間のサイクルで培養した。約 1 ~ 2 ヶ月後、カルス上に生じたカナマイシン耐性の不定芽を形質転換体として得た。 10

【0 1 1 7】

得られた不定芽を継代培養し、展開した葉を採取した。これより D N A を抽出し、導入遺伝子である M d T F L の存在を P C R により確認した。すなわち、前記 D N A を鋳型として、プライマーとしては上記 (6) で作製したセンスプライマー (2 S) 及びアンチセンスプライマー (2 A) を用いて P C R を行った。P C R 反応の条件は、9 4 ° C で 1 分間熱変性、5 0 ° C で 1 分間アニーリング及び 7 2 ° C で 2 分間の伸長反応を 1 サイクルとし、4 0 サイクル行った。P C R の反応液の組成は以下の通りである。

DNA溶液	1 μ l
滅菌蒸留水	1 7 . 5 μ l
1 0 × P C R 緩衝液	2 . 5 μ l
2 . 5 m M d N T P ミックス	2 μ l
1 0 μ M センスプライマー	1 μ l
1 0 μ M アンチセンスプライマー	1 μ l
5 U / μ l T a q ポリメラーゼ	0 . 2 5 μ l
全量	2 5 . 2 5 μ l

20

30

【0 1 1 8】

(5) 形質転換体の鉢上げ

上記 (4) で M d T F L 遺伝子が導入された個体を、特異的プライマーを用いた P C R により遺伝子導入を確認した後、培養シュートを台木に接ぎ木することにより、鉢上げを行った。このようにして得られた組換えリンゴを隔離温室に移し、形質評価のため栽培を行った。

【0 1 1 9】

〔実施例 5〕形質転換植物の形態学的解析

(1) M d T F L 遺伝子のセンス及びアンチセンスを導入した形質転換シロイヌナズナの形態学的解析 40

M d T F L 遺伝子のセンスを導入したシロイヌナズナは 3 1 系統、M d T F L 遺伝子のアンチセンスを導入したシロイヌナズナは 6 系統獲得した (T 1 世代)。また、各系統の後代を獲得した (T 2 世代)。センス遺伝子である p S M D T F L 1 2 . 1 . 2 + を導入した 3 1 系統の形質転換シロイヌナズナのなかで 6 系統に開花の遅延が観察された。さらにこれら 6 系統の T 2 世代を獲得し、長日条件下 (1 6 時間照明・8 時間暗下) にて栽培して開花時期を調べた (図 5 及び表 1)。

【0 1 2 0】

【表 1】

MdTFL遺伝子のセンスを導入した形質転換シロイヌナズナ(T2世代)
における開花時期

形質転換系統 (T1世代)	開花までの日数	開花時の ロゼット葉数	獲得個体数 (T2世代)
対照(野生株)	30.3 ± 1.6	8.0 ± 1.0	10
T-S6	39.4 ± 5.1	11.8 ± 3.6	5
T-S10	59.0 ± 15.6	15.6 ± 4.3	5
T-S11	45.4 ± 6.0	11.8 ± 2.3	5
T-S21	44.7 ± 6.9	18.0 ± 4.3	3
T-S22	47.0 ± 0	23.0 ± 4.6	3
T-S28	53.0 ± 6.0	21.5 ± 1.5	2

10

20

対照である野生型のシロイヌナズナは平均30日で開花したのに対し、形質転換体は9日から29日ほどの開花遅延が見られた。

【0121】

(2) MdTFL遺伝子のアンチセンスを導入した形質転換リンゴの形態学的解析

MdTFL遺伝子のアンチセンスを導入した形質転換リンゴは3系統10個体(303-1、303-2、303-3、303-4、614-1、614-2、705-1、705-2、705-3及び705-4)得た。このうち、303-1、303-4、705-1、705-2、705-3及び705-4については、接ぎ木後8～15ヶ月のうちに早期開花が観察された(図6及び表2)。

【0122】

【表2】

30

MdTFL遺伝子のアンチセンスを導入した形質転換リンゴにおける開花時期

形質転換 系統	導入遺伝子 の発現	開花までの 接木後月数	花粉発芽 能力	接木時期 (年、月)
対照	なし	—	—	1997.8
303-1	+++	11	未検定	2000.6
303-2	++	—	—	2000.6
303-3	++	—	—	2000.6
303-4	+++	11	未検定	2000.6
705-1	+++	8	+	2000.4
705-2	++	15	+	2000.4
705-3	+	11	+	2000.6
705-4	+	11	+	2000.6
614-1	未検定	—	—	2001.6
614-2	未検定	—	—	2001.6
614-3	未検定	—	—	2001.6

10

20

対照として栽培している非形質転換体の王林は6年生であるが、61ヶ月経過しても未だに開花していない。特に705-1は接木後8ヶ月で開花した(図6A)。非形質転換リンゴと比較すると、早期開花系統の花の数は一花叢につき平均1、2花で少ない傾向にあったが、正常な花器官であることが観察された(図7B及びC)。葉の形態は、303の系統においてやや鋸歯が多く見られる傾向が認められたが、705の系統においては対照の王林と比較して大きな差異はなかった(図6D)。

30

【0123】

早期開花系統の花粉稔性を、交雑及び寒天培地上での発芽試験により調査した。早期開花系統に和合性品種を交雑させたところ結実した。また、早期開花系統の花粉を一般品種に交雑させたところ結実し、稔性のあることを確認した(図7D～F)。さらに供試したいずれの系統の花粉も発芽能力を有していた(図8)。

40

【0124】

〔実施例6〕リンゴ形質転換体におけるMdTFL遺伝子の発現

MdTFL遺伝子を導入した形質転換体の葉から全RNAを抽出し、上記実施例3に従ってノーザンブロット解析を行った。プローブには、MdTFL遺伝子の全長を鋳型にしたセンスRNAプローブを用いた。バンドの検出は、LAS1000(富士フイルム社製)を用いて行った。

【0125】

獲得したリンゴの形質転換系統は、MdTFL遺伝子を35Sプロモーターの下流にアンチセンス方向に連結したベクターを導入した個体である。ノーザンブロット解析により、供試したいずれの系統においてもアンチセンスmRNAが過剰発現していることが確認さ

50

れた（図 9）。303-1、303-4 及び 705-1 においては、アンチセンス mRNA の発現が比較的高く、これらの系統は接ぎ木後 8 ～ 11 ヶ月という短い期間で早期開花している（表 2 参照）。

【0126】

【発明の効果】

本発明により、花芽形成を抑制する遺伝子及び該遺伝子のアンチセンス DNA を含む形質転換植物が提供される。本発明により得られる形質転換植物は、早期開花性及び早期結実性を有し、かつ形態異常が起こらないため、農業において有用である。

【0127】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> National Institute of Fruit Tree Science, National Agriculture
Research Organization

<120> A DNA coding for a protein which suppress flowering

10

<130> P02-0153

<140>

<141>

<160> 15

20

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 772

<212> DNA

<213> Malus domestica

30

<400> 1

ccctctctctc tctctctctc tctctctctc tctcttaaaa tgaaaagagc ctctggagcct 60
ctgggttggtg ggagagtgat aggagatggt cttgattcct tcaactgcaac aacaaaaaatg 120
tcigtcaactt acaacaccaa gctagtctgc aatggacttg agctctttcc ttcgtttgtc 180
acagccaaac ctagagttaga gattcaagga ggggatatga gatctttctt tactttgggtg 240
atgaccgacc cagattttcc tggccctagt gatccttacc taaggagagca cctgcactgg 300
attgtgacag acattccagg caccacagat gccacatttg gaagagaggt ggtgagttat 360
gagatgccga agcccaacat tggcatccac cggtttgtgt ttgttctttt caagcagaat 420

40

caaagacaat caatcaacac accttcctcg agggatcact tcagcactcg aagcttcgcg 480
 gctgaaaatg acctgggtct tectgtcgt gccgtctact tcaacgcgca gagagaaact 540
 gcagctagaa gacgctagct agtagctcta cccagaactc ctccatccat tatccatata 600
 tatgttaaatt aaaggcttct ttagagatag gccattgtaa cttttgtttc ccaataacct 660
 aaattttaac ttattgacat gtgagaaaat aagtaacacg ttattaatta ttacaatgt 720
 atgccacaat attaattatg ttaaattaat tattattacc aaaaataatt at 772

10

<210> 2

<211> 172

<212> PRT

<213> *Malus domestica*

<400> 2

Met Lys Arg Ala Ser Glu Pro Leu Val Val Gly Arg Val Ile Gly Asp

20

1

5

10

15

Val Leu Asp Ser Phe Thr Ala Thr Thr Lys Met Ser Val Thr Tyr Asn

20

25

30

Thr Lys Leu Val Cys Asn Gly Leu Glu Leu Phe Pro Ser Val Val Thr

35

40

45

30

Ala Lys Pro Arg Val Glu Ile Gln Gly Gly Asp Met Arg Ser Phe Phe

50

55

60

Thr Leu Val Met Thr Asp Pro Asp Phe Pro Gly Pro Ser Asp Pro Tyr

65

70

75

80

40

Leu Arg Glu His Leu His Trp Ile Val Thr Asp Ile Pro Gly Thr Thr

85

90

95

Asp Ala Thr Phe Gly Arg Glu Val Val Ser Tyr Glu Met Pro Lys Pro
100 105 110

Asn Ile Gly Ile His Arg Phe Val Phe Val Leu Phe Lys Gln Asn Gln
115 120 125

10

Arg Gln Ser Ile Asn Thr Pro Ser Ser Arg Asp His Phe Ser Thr Arg
130 135 140

Ser Phe Ala Ala Glu Asn Asp Leu Gly Leu Pro Val Ala Ala Val Tyr
145 150 155 160

20

Phe Asn Ala Gln Arg Glu Thr Ala Ala Arg Arg Arg
165 170

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

30

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic
oligonucleotide

<220>

40

<222> 6

<223> n = inosine

<220>

<222> 14

<223> n = inosine

<400> 3

aaygg ncayg arynt ttycc

20

10

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic
oligonucleotide

<220>

<222> 6

<223> n = inosine

30

<220>

<222> 18

<223> n = inosine

<400> 4

ckytg ngcrt traar aanac

20

40

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic
peptide

10

<400> 5

Ile Val Thr Asp Ile Pro Gly

1

5

20

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic
oligonucleotide

30

<400> 6

attgtgactg acatcccagg c

21

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

40

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic
peptide

<400> 7

10

Val Tyr Phe Asn Ala Gln Arg Glu

1

5

<210> 8

<211> 23

<212> DNA

20

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic
oligonucleotide

<400> 8

30

gaccacagat gccacatttg gaa

23

<210> 9

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic
oligonucleotide

<400> 9

gaggtaggiga gttatgagat gcc

23

<210> 10

10

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic
oligonucleotide

20

<400> 10

ttcgagtgct gaagtgatcc ctc

23

<210> 11

<211> 23

<212> DNA

30

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic
oligonucleotide

<400> 11

40

cagcgacagg aagacccagg tca

23

<210> 12

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic
oligonucleotide

<400> 12

gtacatatg tcgtagaac gcgtaatag actca

35

<210> 13

20

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic
oligonucleotide

30

<400> 13

cgtagacgc gtaatagac tcactatagg gaga

34

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

40

<213> Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Description of Artificial Sequence: synthetic
oligonucleotide

〈400〉 14

ctcttaaaat gaaaagagcc

20

10

〈210〉 15

〈211〉 20

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

20

〈223〉 Description of Artificial Sequence: synthetic
oligonucleotide

〈400〉 15

ttctcacatg tcaataagtt

20

【 0 1 2 8 】

【配列表フリーテキスト】

30

配列番号 3 : 合成オリゴヌクレオチド

n は、イノシンを表す。(存在位置 : 6 及び 1 4)

配列番号 4 : 合成オリゴヌクレオチド

n は、イノシンを表す。(存在位置 : 6 及び 1 8)

配列番号 5 : 合成ペプチド

配列番号 6 : 合成オリゴヌクレオチド

配列番号 7 : 合成ペプチド

配列番号 8 : 合成オリゴヌクレオチド

配列番号 9 : 合成オリゴヌクレオチド

配列番号 10 : 合成オリゴヌクレオチド

40

配列番号 11 : 合成オリゴヌクレオチド

配列番号 12 : 合成オリゴヌクレオチド

配列番号 13 : 合成オリゴヌクレオチド

配列番号 14 : 合成オリゴヌクレオチド

配列番号 15 : 合成オリゴヌクレオチド

【図面の簡単な説明】

【図 1】非形質転換リングにおける M d T F L 遺伝子をサザン・ブロット法により検出した結果を示す写真である。レーン上のアルファベットはそれぞれ B, B a m H I ; E, E c o R I ; H, H i n d I I I ; N, N c o I ; X b, X b a I ; 及び X h, X h o I の各制限酵素を示す。

50

【図 2】非形質転換リンゴの各組織におけるMdTFL遺伝子の発現をノーザン・ブロット法により検出した結果を示す電気泳動像写真である。

【図 3】非形質転換リンゴの新梢茎頂におけるMdTFL遺伝子の経時的発現をノーザン・ブロット法により検出した結果を示す電気泳動像写真である。

【図 4】本発明においてシロイヌナズナ及びリンゴの形質転換に用いたバイナリーベクター「pSMDTFL12.1.2+」(A)及び「pSMDTFL5.1-」(B)を示す図である。

【図 5】MdTFLのセンス遺伝子を導入した形質転換シロイヌナズナの生育を示す写真である。この写真は播種後35日に撮影した。

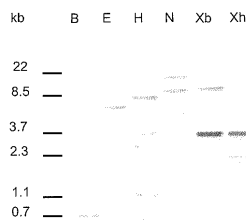
【図 6】早期開花したリンゴ形質転換体を示す。A及びBは、接木後8ヶ月及び接木後12ヶ月の705-1系統である。Cは、接木後11ヶ月の705-4系統である。Dは各系統の葉の形態を比較した写真、E及びFは生長段階にあるシュートの先端に形成された花芽を示している。写真A中のfは花、gtは接ぎ木部位を示す。また写真Fは写真Eの拡大で、矢印は分化した花芽を示す。

【図 7】MdTFLのアンチセンス遺伝子を導入した形質転換リンゴの開花及び結実状況を示す写真である。

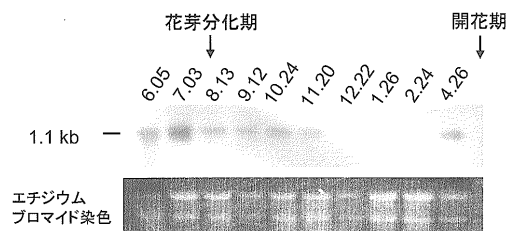
【図 8】早期開花した形質転換リンゴの花粉発芽能力を示す写真である。

【図 9】形質転換体リンゴの葉における導入遺伝子(MdTFL遺伝子のアンチセンス)の発現をノーザン・ブロット法により検出した結果を示す電気泳動像写真である。

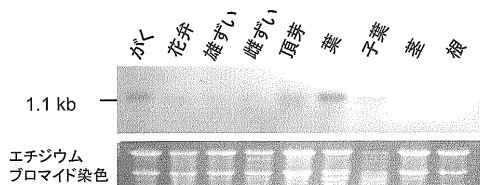
【図 1】



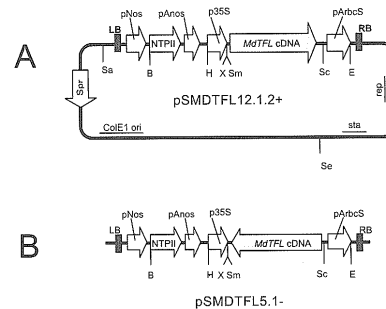
【図 3】



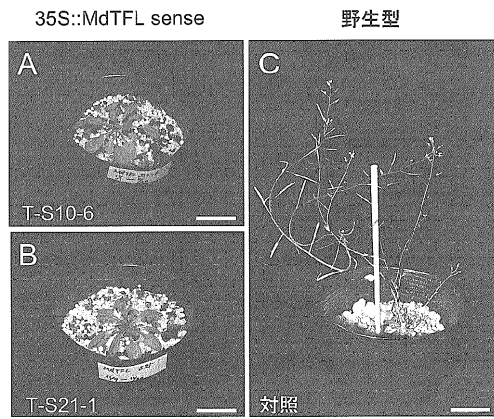
【図 2】



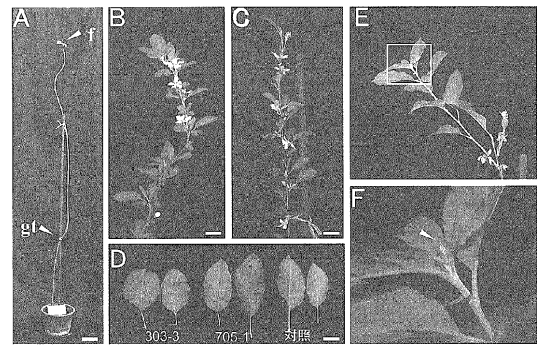
【図 4】



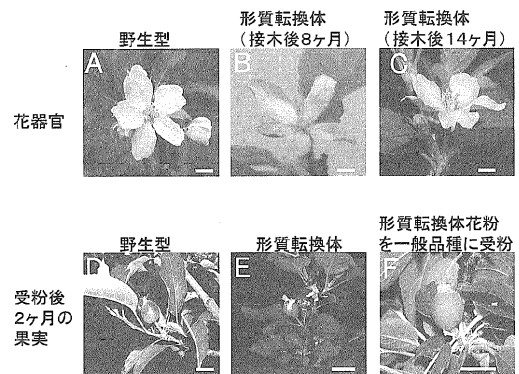
【図 5】



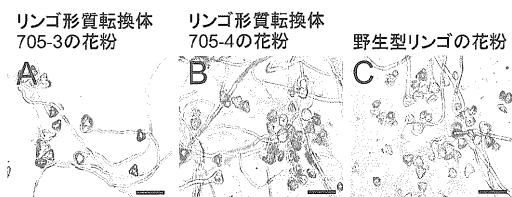
【図 6】



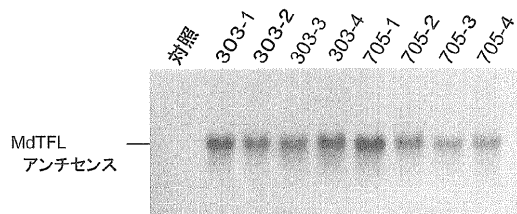
【図 7】



【図 8】



【図 9】



フロントページの続き

(72)発明者 和田 雅人

岩手県盛岡市下厨川字赤平4 東北農試宿舎RC3-14

(72)発明者 副島 淳一

岩手県盛岡市下厨川字赤平4 東北農試宿舎RC3-25

Fターム(参考) 2B030 AA02 AA03 AD20 CA06 CA17 CA19 CB02 CD03 CD07 CD09

CD10 CD14 CD21

4B024 AA08 CA04 CA05 DA01 GA17

4B065 AA88 AB03 BA02 CA53

4H045 AA10 AA30 BA10 CA30 EA05