(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3730658号
(P3730658)
(45)発行日　平成18年1月5日(2006.1.5)　(24)登録日　平成17年10月14日(2005.10.14)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
A01H 5/00	(2006.01)	A01H	5/00	A
C12P 21/02	(2006.01)	C12P	21/02	C
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/00	C
C11B 1/00	(2006.01)	C11B	1/00	

請求項の数 15　(全 30 頁)

(21)出願番号　特願平4-507189
(86)(22)出願日　平成4年4月8日(1992.4.8)
(65)公表番号　特表平6-506584
(43)公表日　平成6年7月28日(1994.7.28)
(86)国際出願番号　PCT/GB1992/000627
(87)国際公開番号　WO1992/018634
(87)国際公開日　平成4年10月29日(1992.10.29)
審査請求日　平成11年4月6日(1999.4.6)
(31)優先権主張番号　91303098.7
(32)優先日　平成3年4月9日(1991.4.9)
(33)優先権主張国　英国(GB)

微生物の受託番号　NCIMB　40396

(73)特許権者　590003065
ユニリーバー・ナームローゼ・ベンノートシヤープ
オランダ国、３０１３・エイエル・ロッテルダム、ヴェーナ　４５５
(74)代理人　100064908
弁理士　志賀　正武
(74)代理人　100089037
弁理士　渡邊　隆
(74)代理人　100108453
弁理士　村山　靖彦
(74)代理人　100110364
弁理士　実広　信哉

最終頁に続く

(54)【発明の名称】種子における脂質生合成の制御に関与する植物プロモーター

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
種子特異性植物プロモーターとして作用できるプロモーターを含む組換えＤＮＡ構築物であって、前記プロモーターが、遺伝子が植物細胞における脂肪酸又は脂質の生合成の前の段階又は生合成の間に発現されるように、前記プロモーターの制御下に置かれた異種遺伝子の発現を制御し、及び前記プロモーターが、クローンＡＣＰ０５の少なくとも２９１ｂｐのポリヌクレオチド：
【表１】
1

```
AGATCTGATT GGTAAGATAT GGGTACTGTT TGGTTTATAT GTTTTGACTA 50
TTCAGTCACT ATGGCCCCCA TAAATTTTAA TTCGGCTGGT ATGTCTCGGT 100
TAAGACCGGT TTGACATGGT TCATTTCAGT TCAATTATGT GAATCTGGCA 150
CGTGATATGT TTACCTTCAC ACGAACATTA GTAATGATGG GCTAATTTAA 200
GACTTAACAG CCTAGAAAGG CCCATCTTAT TACGTAACGA CATCGTTTAG 250
AGTGCACCAA GCTTATAAAT GACGACGAGC TACCTCGGGG C          291
```

を含む、当該ＤＮＡ構築物。
【請求項２】
配列表１に記載したセイヨウアブラナのＡＣＰ０５遺伝子の少なくとも１ｋｂのＰｓｔＩ

－Ｂｇ１II５’上流断片を含む、請求項１に記載のＤＮＡ構築物。
【請求項３】
配列表１に記載したセイヨウアブラナのＡＣＰ０５遺伝子の少なくとも１．４ｋｂのＢａｍＨＩ－Ｂｇ１II５’上流断片を含む、請求項１に記載のＤＮＡ構築物。
【請求項４】
大腸菌ＪＭ１０１／ｐＡＰ１ＧＵＳ（ＮＣＩＭＢ　４０３９６）に存在するプラスミドｐＡＰ１ＧＵＳに存在する種子特異性植物プロモーターを含む、請求項１に記載のＤＮＡ構築物。
【請求項５】
植物細胞を形質転換するための、好ましくは脂肪酸の種子特異性の生合成を修飾するための、請求項１～４のいずれか１項に記載の種子特異性プロモーターを含むＤＮＡ構築物の使用方法。
【請求項６】
植物細胞を、続いて修飾された脂肪酸の生合成が種子において特異的に起こる完全な双子葉植物に生育させる、請求項５に記載の使用方法。
【請求項７】
双子葉植物細胞を形質転換する方法であって、請求項１～４のいずれか１項に記載の種子特異性プロモーターを含むＤＮＡ構築物を、形質転換可能な植物細胞に導入して、生じた形質転換植物細胞が完全な植物に生育した後に、導入された種子特異性で時間的に調節する植物プロモーターにより制御された前記遺伝子の構造遺伝子を形成する部分が、当該遺伝子が植物細胞における脂肪酸又は脂質の生合成の前の段階又は生合成の間に発現されるように、植物の種子において発現され、それにより前記構造遺伝子に対応するタンパク質が産生されるようにすることを特徴とする方法。
【請求項８】
前記構造遺伝子が、脂肪酸又はそれに対応する脂質の種子特異性の生合成を修飾するタンパク質をコードする、請求項７に記載の方法。
【請求項９】
植物種子油の形成を修飾する方法であって、双子葉植物細胞を、苗木を経由して種子を有する植物にまで生育させ、修飾された組成を有する植物油を含有する得られる種子を回収することを包含し、前記双子葉植物細胞又は植物又は種子が、請求項１～４のいずれか１項に記載のＤＮＡ構築物を含むことを特徴とする方法。
【請求項１０】
前記ＤＮＡ構築物が、前記プロモーターの制御下にある遺伝子を含み、この遺伝子が、脂肪酸産生又は脂質形成の生合成経路を修飾するタンパク質をコードする、請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
前記ＤＮＡ構築物が、好ましくはプラシカ・ナプス由来のものである、基本的に種子特異性アシルキャリヤータンパク質（ＡＣＰ）プロモーターからなるプロモーターと、野生型遺伝子とは異なる、ＡＣＰをコードする構造遺伝子とを含む、請求項９又は１０に記載の方法。
【請求項１２】
請求項１～４のいずれか１項記載のＤＮＡ構築物を含む双子葉植物の種子であって、前記ＤＮＡ構築物が種子と同種の種子特異性植物プロモーターを含む場合、前記ＤＮＡ構築物は前記種子のゲノムにおいて前記プロモーターに関して天然部位でない部位に存在することを特徴とする種子。
【請求項１３】
前記ＤＮＡ構築物が、外来性のタンパク質をコードする目的のＤＮＡ配列をも含み、前記目的のＤＮＡ配列が種子特異性植物プロモーターの制御下にある、請求項１２に記載の種子。
【請求項１４】

前記種子が、ブラシカ科に属する植物の種子である、請求項１２に記載の種子。
【請求項１５】
好ましくは種子細胞である植物細胞において、所望のタンパク質を産生させる方法であって、前記タンパク質をコードする構造遺伝子を発現させ、植物細胞が前記構造遺伝子を含む請求項１～４のいずれか１項に記載の組換えＤＮＡ構築物を含み、場合によっては前記タンパク質の産生後に前記タンパク質を植物細胞から単離することを含むことを特徴とする方法。
【発明の詳細な説明】
技術分野
本発明は、種子に特異的な脂肪酸産生を修飾して種子油の脂肪酸組成の変化を生じさせるための形質転換植物細胞に関する。特に本発明はブラシカ・ナプス（Brassica napus、脂肪種子セイヨウアブラナ）に存在する、種子に特異的なアシルキャリヤータンパク質（ＡＣＰ）遺伝子から単離した新しいプロモーターを提供する。
背景及び先行技術
過去10年の間に、遺伝子を植物に導入し、その遺伝子が発現して、得られる形質転換植物に新規な又は改良された性質を与えることにより、植物を形質転換する方法が開発されてきた。これらの方法の一つは、形質転換されるべき植物の染色体に所望の遺伝子を導入するために、細菌アグロバクテリウム・チュメファシエンス(Agrobacterium tumefacience)を使用することである。この技法についての数多くの論文が発表されてきた。一般的な概論としては、James D. Watson、Jhon Tooze及びDavid T. Kurtzによる、'Recombinant DNA, A Short Course'［サイエンティフィック・アメリカン・ブックス、1983年出版、W. H.フリーマン・アンド・カンパニー（米国、ニューヨーク）販売］の、13章（Genetic Engineering of Plants by Using Crown Gall Plasmids）p.164-175を参照。
欧州特許出願公開0255378（CALGENE, INC.、1988年２月３日公開、優先権主張日：1986年７月31日）によれば、ナピン（napin）遺伝子のいわゆる転写開始領域が同定され、植物細胞から単離され、種子に特異的な転写のため植物細胞内に挿入される発現カセットを調製するために用いられた。その公開明細書には、その方法が種子の組織における脂肪酸産生の修飾と共に適用されることが記載されている。
その欧州特許出願公開0255378から、以下の一節を引用する。
３頁、6-9行、
「特に興味深い転写開始領域はブラシカ・ナプスまたはカンペストリス（campestris）のナピン遺伝子、アシルキャリヤータンパク質遺伝子と関連しており、それらは種子において、およそ７日から40日で発現し、特におよそ10日からおよそ20日に発現の最大値を有し、そこでは種子では発現産物が豊富に見られるのに対し、葉には発現された遺伝子は見られない。」
４頁、11-12行、
「構築物を用いて（中略）種子における脂肪酸組成を修飾するため、すなわち長さや不飽和などについての種々の脂肪酸の比及び／又は量を変えること。（中略）生来の遺伝子の転写産物に相補的な転写産物の生産により、その転写産物の成熟及び／又は発現を阻害することによって、１つ以上の内在性産物、特に酵素又は補因子の発現の減少を与えるか、または脂肪酸合成に関連した、内在性あるいは外来性の遺伝子の発現を与えることにより、これらの結果は達成される。脂肪酸合成に関連した発現産物には、アシルキャリヤータンパク質、チオエステラーゼ、アシルトランスアシラーゼ、アセチルＣｏＡカルボキシラーゼ[m]、ケトアシルシンテターゼ、マロニルトランスアシラーゼ、ステアロイル-ＡＣＰデサチュラーゼ及び他のデサチュラーゼ酵素を含む。」
５頁、57-64行、
「特に興味ある発現カセットは、脂質産生、特にアシルキャリヤータンパク質を含む、脂肪酸産生に関連する、ホウレンソウのアシルキャリヤータンパク質、ブラシカのアシルキャリヤータンパク質、ナプス又はカンペストリスのアシルキャリヤータンパク質、クヘア（Cuphea、ミソハギ科）のアシルキャリヤータンパク質、動植物又は細菌由来のアセチル

トランスアシラーゼ、マロニルトランスアシラーゼ、β-ケトアシルシンテターゼＩ及びＩＩ、チオエステラーゼ、特にチオエステラーゼII、例えばラットのチオエステラーゼII、アシルＡＣＰ又はホスホリピドアシルデサチュラーゼのような、ある植物にとって内在性又は外来性の構造遺伝子を制御しているナピン遺伝子の、特にブラシカナピン遺伝子、さらにはブラシカ・ナプス又はブラシカ・カンペストリスの、転写領域を含む。」

３頁、6-9行から引用される一節に示され、花成後の日数（ＤＡＦ）として時に記載されている時期は、それが同一の植物に関しても、生育の場所及び条件により変わり得るため、常に正確な単位ではないということに注意しなければならない。従って、ＤＡＦは絶対的なパラメーターとしてではなく、相対的なパラメーターとして用いるべきである。それ故、異なる時間又は異なる場所で行なった実験から、この種の結果を比較する際には、ＤＡＦ値の差に基づいて結論を導くことには特に注意しなければならない。

さらに、タバコの実験では、個々の種子のさやの成育速度は単一の植物であっても変わり得る、すなわち、最も初期のさやが最も速く成育するので、その場合タバコでは、種子の成育段階を正確に決定するためにＤＡＦを用いることはできない。このような状況では形態学的特徴を用いて種子を段階づけすべきである。このことは本明細書において後で詳述する（実施例１．ｃ．５及び実施例３、実験２参照）。

欧州特許出願公開0255378の実施例Ｉは、Ｂ．ナプス由来のナピンプロモーターの制御下にある、ホウレンソウ葉のアシルキャリヤータンパク質をコードする構造遺伝子を含む構築物を開示している。タンパク質が形成されたという証拠はない。すなわち、ノザンブロットにより、胚では対応するｍＲＮＡがもっともらしく作られたが、葉では見られず、そのことはホウレンソウの葉のＡＣＰ遺伝子の、種子特異性発現を示唆している。

実施例IIは、Ｂ．カンペストリスのナピンプロモーターカセットの構築を開示している。脂肪酸合成に関与する遺伝子がそのカセット内に挿入されたことのみが示唆される。そのような遺伝子の挿入あるいは発現についての実験上の詳細は何も与えられていない。実施例IIIによれば、「ブラシカ種子由来のアシルキャリヤータンパク質のような、種子のトリアシルグリセロール合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子から、種子特異性の他のプロモーターが単離されるであろう。ツケナ（turnip rape）の自家和合性変種、ブラシカ・カンペストリスの品種「Ｒ-500」から未熟な種子を集めた。花成後およそ14日から28日に相当する段階ですべての種子を集め（中略）ｃＤＮＡバンクの調製（中略）。ｃＤＮＡバンクをプローブするため、オリゴヌクレオチド（中略）を合成し、（中略）。この合成ＤＮＡ分子はアミノ酸配列（ala-ala-lys-pro-glu-thr-val-glu-lys-val）をコードするＤＮＡ又はＲＮＡ配列とあまり厳格でなくハイブリダイズするであろう。このアミノ酸配列は、ブラシカ・ナプス種子から単離されたＡＣＰについて報告されたものである〔A. R. Slabasら、第７回植物脂質の構造と機能に関する国際シンポジウム、（7th International Symposium of the Structure and Function of Plant Lipids）、カリフォルニア州、デイビス、カリフォルニア大学、1986年〕；Ｂ．カンペストリス種子由来のＡＣＰは高度に均一であり（中略）オリゴヌクレオチドプローブに明らかなハイブリダイゼーションを示している２つのＤＮＡクローンのＤＮＡ配列分析は、pCGN1Bcsと称する一方が、ＡＣＰ前駆タンパク質を実際にコードすることを、コードされたアミノ酸配列とブラシカ・ナプスからの記載されているＡＣＰタンパク質とのかなりの相同性により示唆した（A. R. Slabasら、198[6]前記）。実施例IIと同様に、ＡＣＰ　ｃＤＮＡクローンをゲノムクローンの単離のために用いることができ、そこからＢ．カンペストリスのナピンカセットと全く類似した方法で、発現カセットを作ることができる。」

その次の項、他の実施例の下では、次のように述べられている。

「開花後１４－２８日のＢ．カンペストリス種子のｃＤＮＡライブラリー（前の実施例に記した）から、９６クローンをスクリーニングした（中略）。種子特異性の他の遺伝子もまたプロモーターの有用な源として役立つであろう。（中略）それらの特異的な機能を知らなくても、なお他のｃＤＮＡクローンを種子組織におけるそれらの発現レベルや発現のタイミング（すなわち、開花後のいつ発現されるか）に関して分類できる（中略）。脂肪酸合成又は種子の他の機能に関係する遺伝子を発現させるのに必要な基準を合致するクロ

ーンを、発現に必要な５′及び３′の調節領域を含んでいるゲノムクローンについての、ゲノムライブラリーのスクリーニングに使用することができる。先の実施例の中でナピン遺伝子について記載されている一般的な方法により非コード調節領域を操作して、組織特異性発現カセットを作ることができる。

ｃＤＮＡクローンの一例はEA9である。それはＢ．カンペストリスの、葉ではなく種子で高度に発現される。（中略）開花後14日、21日及び28日の種子の胚から、EA9の700bpのEcoRI断片をプローブとして用いて単離したｍＲＮＡのノザンブロット分析は、EA9が14日に高度に発現されており、21日及び28日ではより低いレベルで発現されていることを示している。（中略）クローンEA9について本明細書中に提供した部分的な配列（図３）は、ブラシカの種子特異性プロモーターの、唯一の種類を同定するプローブの合成に使用することができる。」

関連した欧州特許出願公開0255377（CALGENE, Inc.、1988年２月３日公開、優先権主張日：1986年７月31日）には、ホウレンソウおよびブラシカ・カンペストリスのＡＣＰをコードしている構造遺伝子のＤＮＡ配列が提供されており、それは、最終産物としてのＡＣＰの産生に用いることができ、あるいは植物種子における種子油産生を増加できる。実質的に種子組織に対するＡＣＰ遺伝子の発現を制御する、Ｂ．ナプスおよびＢ．カンペストリスのナピンプロモーターも記載されており、それらのプロモーターは欧州特許出願公開0255378に記載されているものと同じである。

しかし、M. A. Post-Beittenmillerらによる、The Plant Cell 1(1989)889-899によれば、タバコ・リブロース-1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼプロモーターと運搬ペプチド及び、成熟したホウレンソウのＡＣＰ-Iをコードする配列から成るキメラ遺伝子を用いてタバコを形質転換した際、葉における脂質合成は、脂質分析によってレベルにおいても組成においても何ら有意な変化が検出されなかった。彼等はさらに、成熟したホウレンソウのＡＣＰ-I遺伝子が内在性のタバコＡＣＰよりも高いレベルで発現されていることをタンパク質のイムノブロットで示した。この後の仕事は、植物組織におけるＡＣＰ産生の増加は必ずしも脂肪酸の組成の変化に帰着する必要がないことを示した。

この発見は、V. C. Knaufにより、“The application of genetic engineering to oilseed crops”、TIBTECH ５巻（1987年２月）、40-47頁において発表された記載と一致し、その中で彼は、なぜセイヨウアブラナ種子の脂肪酸組成を変えるための「典型的なプロジェクト」が、植物組織における脂質生合成の複雑さにより失敗するかについて多くの可能性を記述している。

「ブラシカ・ナプスのプラスチドに局在する種子アシルキャリヤータンパク質は別個の、核の多重遺伝子族によりコードされている」(Plastid-localised seed acyl carrier protein of Brassica napus is encoded by a distinct, nuclear multigene family)という表題の論文の中でR. SaffordらはEur. J. Biochem. 174(1988)287-295頁に、油をもつ種子の脂肪酸生合成を調和的に働かせている遺伝子の、起源、構造及び発現についての最初の洞察を提供している。それは、プラスチド体内に局在し、核ＤＮＡにコードされる種子ＡＣＰが、そのタンパク質の移入をプラスチド内へ向けさせると考えられているＮ末端の延長配列を含んでいる前駆物質として合成されることを示している。いくつかのｃＤＮＡクローンの分析は、配列異質性を示し。それ故にＡＣＰ多重遺伝子族が証明された。更なる実験が、少なくともこれらの遺伝子の一部が、葉組織では発現されていないことを示した。その刊行物の図８Ａには、ＡＣＰ開始コドンの上流の５′非コード領域の56より多くないヌクレオチドが記されている。この実験は、プロモーター領域を含む転写調節領域をもっている染色体ＤＮＡの代わりに、転写された配列のみをもつ、出発物質としてのｍＲＮＡからのｃＤＮＡを用いて行われたために、プロモーターは決定できなかった。

J. de Silvaらの次の論文［Plant Molecular Biology、14巻（1990年）、537-548頁］の中で、同グループは、種子で発現したアシルキャリヤータンパク質遺伝子をコードする２つのゲノムクローンの、ブラシカ・ナプスからの単離及び配列決定を記載している。後者の論文は、転写開始部位が、構造遺伝子の(ATG)開始コドンの69pb上流に位置することを開示した。

従って、両論文において示された５′領域は70ヌクレオチド長さより短く、転写開始部位の下流のＤＮＡ配列を記載している。ゆえに、それらは種子特異性の遺伝子転写の一時的な調節を与えるプロモーター領域も、調節領域も含んでいない。
先行技術をまとめると、欧州特許出願公開0255378は、Ｂ．ナプス及びＢ．カンペストリスのナピンプロモーターの単離と使用を記載し、ＡＣＰプロモーターのような、他のプロモーターをどのようにして単離できるかを示唆し、欧州特許出願公開0255377は、同じナピンのプロモーターについて記載し、R. Saffordら（1988）とJ. de Silvaら（1990）の刊行物は、Ｂ．ナプスの、種子特異性ＡＣＰをコードする構造遺伝子に先行する５′領域の70ヌクレオチドよりわずかに短いヌクレオチドについて記載しており、これらの刊行物はいずれも、ＡＣＰプロモーターのヌクレオチド配列は開示していない。

発明の概要

本発明は、ブラシカ・ナプスから単離した、種子特異性の新規のＡＣＰプロモーターと、植物細胞の操作に用いて種子特異性の転写を与えることが可能なＤＮＡ構築物とを提供する。
本発明の１つの態様によれば、脂肪酸産生のための生合成経路において活性なタンパク質をコードする、所望の遺伝子を、新規なＡＣＰプロモーターの制御下に置き、植物ゲノムに導入し、種子特異性の転写を与え、それにより、その遺伝子は植物ゲノムに相同であるか又は非相同である。構築物は内在性の産物又はそれらの産生の調節を、異種の産物の産生と同様に供する。脂肪酸生合成に影響を及ぼすことができるようにするために、産生されるべきタンパク質は細胞の正しい細胞内部位、すなわちプラスチドを標的としなければならない。このことは、所望の遺伝子が、適する運搬配列と連結して、結果として得られるキメラタンパク質がプラスチドを標的とするようにＤＮＡ構築物を作ることを必要とし、これにより所望の遺伝子に対応するタンパク質の成熟型の、プラスチド内での放出が可能になる。脂肪酸生合成経路において活性なタンパク質の例は、アセチルＣｏＡカルボキシラーゼ、アセチルトランスアシラーゼ、ＡＣＰ、デサチュラーゼ、エロンガーゼ（elongases）、エノイルレダクターゼ、β－ケトレダクターゼ、ケトアシルシンテターゼ、マロニルトランスアシラーゼ及びチオエステラーゼである。
本発明のもう１つの態様によれば、所望のタンパク質をコードする遺伝子は、新規なＡＣＰプロモーターの制御下に置かれている。これらの所望のタンパク質は、そのタンパク質の植物における産生、および場合によってはそれに続く単離が望ましいいかなるタンパク質でもよい。これらのタンパク質の実例は以下のように列挙される。
(1)食物加工に使用される酵素、例えばグアー（guar）α－ガラクトシダーゼ、ソーマチン、キモシン
(2)抗栄養因子の形成を阻害することのできるタンパク質
(3)製薬学的に活性のタンパク質、たとえば血液因子、インターフェロン、ホルモン、ヒト血清アルブミン及び
(4)所望のアミノ酸組成により近い、植物タンパク質例えば非形質転換植物内に生成するより高リジン含有のタンパク質
所望のタンパク質が、細胞の代謝に及ぼす影響に応じて、そのタンパク質を細胞質に置くこともでき、あるいはプラスチドを標的とすることもできるが、その場合、所望のタンパク質をコードする遺伝子は、前記のように標的配列に連結されていなければならない。代わりに、細胞内の他のオルガネラを標的とすることもでき、そのためには他の標的配列が必要である。他のいくつかの標的配列が先に記載されている。例えば、外来性タンパク質の葉緑体へのターゲティングについてはG. Van den Broekらによる、Nature 313巻（1985年１月31日）358-363頁参照。Advances in Botanical Research、14巻（1978/8）1-24頁［アカデミックプレス社出版(ISBN 0-12-005914-2］におけるR. J. Ellis及びC. Robinsonによる、タンパク質のターゲティングについての総説は植物の葉緑体、ミトコンドリア及び核へのターゲティングを示している。

具体的な態様の説明

本発明は、ブラシカ・ナプスのような植物の種子における、脂肪酸合成に関与するタンパ

ク質の発現に影響を及ぼし得る因子についての研究の遂行に基づくものである。この研究は、セイヨウアブラナのような種子油の脂肪酸のプロフィルを変えることに向けられたプロジェクトにおいて必要であった。遺伝子工学の手法によって植物の貯蔵脂質の脂肪酸組成を変えるために又は、所望のポリペプチド又はタンパク質の植物の種子における産生を誘導するためには、関連する遺伝子の発現を、以下の様式で制御しなければならない。
i)所望の遺伝子の発現は、種子組織に限られ、成育の適切な段階において、適切なレベルで成されねばならない。
ii)特に種子の脂質の脂肪酸のプロフィルを修飾（改変）する場合には、
a)生じたタンパク質の、脂肪酸を合成している細胞内小区画（いわゆるプラスチド）への生物学的に活性な形態での運搬及び
b)合成された脂肪酸のプラスチドの外への運搬及びそれに続くトリアシルグリセリドへの変換。
工程i)を達成するための１つの方法は、脂肪酸生合成に関与する内在性遺伝子から単離した、プロモーター領域を使用することである。そのようなプロモーターは、脂肪酸の生合成が種子で起こる前又は起こる時に、遺伝子の発現を活性化させる。
例えばセイヨウアブラナ種子のような植物において、所望の遺伝子の制御された発現を得るためには、構造遺伝子を、例えばセイヨウアブラナ種子の脂質生合成用の内在性の遺伝子から単離したプロモーター領域の制御下に置かなければならない。前記のようにいくつかの、種子特異性のプロモーターが既に知られているにもかかわらず、植物における種子の脂質生合成に関与するそのような調節遺伝子のＤＮＡ配列の単離及び機能上の特徴を記載した報告はない。
そのような遺伝子の一例が、ＡＣＰをコードする遺伝子であり、ＡＣＰは植物の脂肪酸生合成機構の重要成分で脂肪酸合成酵素（ＦＡＳ）の成分として働き、デサチュレーション及びアシル転移反応にも関与する［P. K. Stumpfらによる“Fatty acid biosynthesis in higher plants”（Fatty Acid Metabolism and Its Regulation）、Elsevier Press、アムステルダム、Numa S.編（1984年）155-179頁］。
本発明に至った研究の過程において、J. de Silvaらにより記載された（1990年、前記）染色体遺伝子ACP05に属するものから、１つのプロモーターを選択したが、ACP05遺伝子はR. Saffordらによって、より早く記載された（1988年、前記）、ＡＣＰをコードする29C08ｃＤＮＡに対応する。後者の刊行物は、セイヨウアブラナ胚ＡＣＰをコードしているｃＤＮＡクローンの単離及び特徴づけを示し、さらにＡＣＰがＮ末端の運搬配列を含んでいる前駆物質として合成されることを示した。後者は外来遺伝子の産物を、脂肪酸合成するプラスチドへ運搬するための「道具」として使うことができる。
ＡＣＰ遺伝子の５′上流に存在するプロモーター要素の機能分析を、β－グルクロニダーゼ（ＧＵＳ）リポーター遺伝子及び、タバコの形質転換を用いて行なった。
セイヨウアブラナACP05遺伝子の1.4kb ５′上流断片（AP1プロモーター）をβ－グルクロニダーゼ（GUS）リポーター遺伝子と融合し、アグロバクテリウム感染を介してタバコに移入した。形質転換した15のタバコ植物の葉及び種子組織の分析は、ＧＵＳ発現のレベルが種子成育を通して増加し、平均して、葉で見られる値のおよそ100倍高い値まで増加することを示した。植物の構成プロモーター(CaMV 35S)に連結されたＧＵＳ遺伝子を含む構築物で形質転換した、対照植物の分析は、葉と種子成育の全段階において、同様のレベルのＧＵＳ発現を示した。これらの結果は、単離されたAP1プロモーター配列が機能して、遺伝子移入（transgenic）タバコにおけるＧＵＳ遺伝子の発現を、所望の種子特異性かつ成育様式で制御することを示している。
CaMV 35SとAP1プロモーターを用いた比較研究では、AP1プロモーターを用いて、種子の最大脂質合成期に得られるGUS発現のレベルは、強力な植物プロモーターCaMV 35Sを用いて得られるものと等しかった。従って、AP1プロモーターは「強力な」種子特異性プロモーターであると考えられる。CaMV 35プロモーター自体は、構成プロモーターであり、望ましくない、植物全体でのタンパク質の合成を起こすので、この目的には使用できない。
セイヨウアブラナのACP05プロモーターの、何らかの特異的かつ成育調節配列（複数）を

含んでいる主要部分をさらに厳密に定義するために、欠失分析を行った。β－グルクロニダーゼ（ＧＵＳ）リポーター遺伝子に融合させた、ACP05遺伝子の転写開始部位の上流の領域のそれぞれ1.4kb、0.92kb、及び0.29kbを含んでいるキメラ遺伝子構築物を、タバコに移入した。各々の構築物につき10の形質転換植物を、ＧＵＳ発現の様式について分析した。もともとの1.4kbの構築物に比較して、ＡＣＰプロモーターの欠失した変形体で形質転換した植物におけるＧＵＳ活性には、レベルにおいても、組織分布においても何ら有意差が見られなかった。それ故dACP05遺伝子の、転写レベル及び種子特異性を決定するＤＮＡ配列は、その遺伝子の転写開始部位のすぐ上流の0.29kb領域内にあることが結論付けられる。転写開始部位についてはJ. de Silvaらの1990年の刊行物（前記）に記載されている。このＤＮＡ断片を配列決定し、そして得られた291bpのＤＮＡ配列は以下の通りである。

1

```
AGATCTGATT GGTAAGATAT GGGTACTGTT TGGTTTATAT GTTTTGACTA  50
TTCAGTCACT ATGGCCCCCA TAAATTTTAA TTCGGCTGGT ATGTCTCGGT 100
TAAGACCGGT TTGACATGGT TCATTTCAGT TCAATTATGT GAATCTGGCA 150
CGTGATATGT TTACCTTCAC ACGAACATTA GTAATGATGG GCTAATTTAA 200
GACTTAACAG CCTAGAAAGG CCCATCTTAT TACGTAACGA CATCGTTTAG 250
AGTGCACCAA GCTTATAAAT GACGACGAGC TACCTCGGGG C          291.
```

ACP05プロモーターの時間的な調節を、他の、種子特異性の植物プロモーターとの関係において比較するため、脂質生合成遺伝子（ACP05）及び２つの貯蔵タンパク質遺伝子に由来する各々のプロモーター要素が、実際に種子成育の間の特異な遺伝子の発現を与えることができるかどうかを測定した。これを、キメラ遺伝子AP1-GUS、ナピン-GUS及びクルーシフェリン（cruciferin）-GUSのタバコへの移入により、さらに種子成育にわたる種々の段階におけるそれらの発現をモニターすることにより調べた。それに対し、これらの組み合わせを用いたセイヨウアブラナにおける同様の発現実験は現在進行中である。

ACP05遺伝子の５′上流の1.4kb断片、セイヨウアブラナのナピン遺伝子の上流1.1kb断片及び、セイヨウアブラナのクルーシフェリン遺伝子の上流2kb断片をβ－グルクロニダーゼ（ＧＵＳ）リポーター遺伝子に融合し、アグロバクテリウム感染を介してタバコに移入した。ＧＵＳ活性を、２つの成育段階の種子（中間成熟及び成熟）と葉組織で分析した。これら３つのセイヨウアブラナのプロモーターはすべて、種子特異性の様式でＧＵＳの発現を調節することがわかったが、種子成育の間の時間的な調節の様式は異なっていた。例えば、AP1-GUS形質転換植物では、ＧＵＳ活性は、中間成熟種子において最大であり、一方、２つの貯蔵タンパク質プロモーター構築物で形質転換した植物では、ＧＵＳ活性は成熟した種子において最大であった（図12参照）。

ＡＣＰプロモーター及びクルーシフェリンのプロモーターをもつタバコの種子において得られるＧＵＳ発現の最大レベルは、カリフラワーモザイクウィルスの強力な構成プロモーターである35Sプロモーターを用いて得られるものと同様であり（10植物の平均／構築物）、ナピンプロモーターを用いて得られるものの約３倍であった。

種子成育の間に、脂質生合成遺伝子プロモーター（AP1）及び貯蔵タンパク質遺伝子プロモーター（クルシフェリン）によって、ＧＵＳ発現において与えられる時間的な差異の性質を、さらに厳密に決定するために、第二の実験を行なった。最初の研究で最もよく発現しているAP1GUS及びCRUGUS植物からの種子を用いて、新しい植物を繁殖させた。開花時の花に標識をつけ、開花後７－20日に種子のさやを集め、種子の抽出物のＧＵＳ活性を測定した。ＡＣＰプロモーター-ＧＵＳ融合物で形質転換した植物では、活性は11-12ＤＡＦでピークを成し、それは種子における脂質合成の最大速度に相当する。クルーシフェリンプロモーター-GUS融合物で形質転換した植物では、活性は16-19ＤＡＦでピークを成し、それは種子成育において、タンパク質含有量はすみやかに増加しているが、脂質合成が減少している段階に相当する（図14参照）。

これらの調査の結果は、遺伝子工学によってセイヨウアブラナの油の組成を修飾することを目的とするプログラムに対して、重要な意味をもつ。成功するためには、脂肪酸の生合成を混乱させるタンパク質をコードする、移入された遺伝子が、種子成育の脂質合成相と一致して発現されねばならない。この結果は、その目的を達成するためには、移入された遺伝子の発現が、種子の脂質生合成遺伝子のプロモーター、たとえばＡＣＰ遺伝子のプロモーターによって調整されるべきであることを明らかに示している。そのような遺伝子を、種子の貯蔵タンパク質遺伝子のプロモーター、例えばナピン遺伝子のプロモーターに融合させると、脂質合成の最も活性な相の後に、移入された遺伝子の最大の発現が生じ、従って、脂肪酸プロフィルの意味のある混乱を生じそうもない。

従って本発明は、種子の脂質生合成遺伝子の新規なプロモーターを提供し、さらにそのプロモーターの、種子成育において、形成されたタンパク質あるいはポリペプチドが、脂肪酸及びそれらの脂質エステルの生合成による形成に影響を及ぼし得る段階における遺伝子発現における使用を提供する。本発明は、特定の種、ブラシカ・ナプスから単離した天然と等しい植物プロモーターに基づいて説明されているが、当業者には、脂肪酸又は脂質の生合成と協奏して遺伝子を発現することのできる、天然と同一の種子特異性の他のプロモーターが、本明細書の教示を用いて単離することができることは明らかであろう。本明細書で用いる「～と協奏して」という表現は、発現の結果得られるタンパク質が、植物細胞における脂肪酸又は脂質の生合成に役割を果たすことができるような場所及び時間にその遺伝子が発現されることを意味している。特に前記プロモーターは、その制御下に置かれている遺伝子を、脂肪酸又は脂質の生合成の前の段階又は生合成の間に発現させる能力を有する。

さらに、ＤＮＡ修飾のための周知の技術を用いて、他のＤＮＡ配列を調製することが可能であり、それらの、種子特異的なかつ時間的な様式で遺伝子の発現を促進する能力を調べることが可能である。

従って、より広い意味において「種子特異性の植物プロモーターとして作用することのできるプロモーター」という表現は、天然に等しいプロモーターと、種子特異性の植物プロモーターとして活性であるそれらの修飾物との両者を、種子特異性の植物プロモーターとして活性であるように他の方法でデザインされたプロモーターと同様に包含する。

従って、本発明は、種子特異性の植物プロモーターとして作用することのできるプロモーターを含み、前記プロモーターが、植物細胞における脂肪酸又は脂質の生合成と協奏して、前記プロモーターの支配下に置かれた遺伝子の発現を可能にする組換えＤＮＡ構築物に関する。

本明細書では「組換えＤＮＡ構築物」という表現を、それらの自然環境にある類似のＤＮＡ配列を除外するために用いた。それは構築物を調製するためにヒトが介入し、次いで植物に取り込まれ、安定して子孫に遺伝しうることを示している。例えば、天然と等しいプロモーターを自然界で制御している遺伝子とは異なる構造遺伝子に結合することができる。又は、それをエンハンサーに結合し、天然の遺伝子の転写レベルを増加させることができる。天然の構造遺伝子によりコードされているタンパク質の産生のレベルは、プロモーターにアンチセンスＤＮＡを結合するか、又は切端型構造遺伝子を結合することにより減少させることができる。これらの方法は先行技術に記載されている。もちろん、これらの方法を非相同の遺伝子に適用することもできる。

あるいは、それをアンチセンスＤＮＡに結合し、天然の構造遺伝子によりコードされているタンパク質の産生レベルを減少させることができる。

さらに明確には、前記ＤＮＡ構築物におけるプロモーターは、先に記したACP05クローンの、少なくとも291bpのポリヌクレオチドを含んでいる。このＤＮＡ配列は、図１に示したセイヨウアブラナACP05遺伝子の５′上流の1kb Pst-BglII断片から決定した。図１に示したセイヨウアブラナのゲノム遺伝子sACP05の５′のより大きい1.4kb BamHI-BglII断片を、AP1プロモーターと呼び、大腸菌JM101/pAP1GUS(NCIMB40396)に存在するプラスミドpAP1GUSに取り込ませた。

本発明の他の態様は、本発明による種子特異性のプロモーターを含有するＤＮＡ構築物を

、植物細胞の形質転換のために、好ましくは、種子特異性の脂肪酸の生合成を修飾するために使用することである。好ましくは、植物細胞は続いて成長して完全な植物体となり、そこでは脂肪酸の修飾された生合成が、種子に特異的に起こる。かかる用途の実際的な態様は、植物細胞を形質転換させる方法であり、その中で本発明による、種子特異性のプロモーターを含んでいるＤＮＡ構築物を、形質転換可能な植物細胞に以下の工程を導入する。すなわち、結果として得られる形質転換植物細胞が完全な植物に成長した後、種子特異性でかつ時間的に調節する導入された植物プロモーターによって支配されている前記遺伝子の一部を形成する構造遺伝子が、植物種子での脂肪酸又は脂質の生合成と協奏して発現し、それにより前記構造遺伝子に対応するタンパク質を産生する工程である。このような方法を行うための好ましい方法においては、前記構造遺伝子は、脂肪酸又は対応する脂質の、種子特異性の生合成に必要なタンパク質をコードする。

このような工程は野菜の種子油生成を修飾するための方法となることができ、その方法は植物細胞を苗木（plantlet）を経由して種子をつけた植物にまでの育成及び結果としてできた、修飾された組成をもつ植物油を含む種子の収穫を包含し、それにより前記植物細胞、又は植物又は種子の細胞は、本発明によるＤＮＡ構築物を含み、特に、もし前記ＤＮＡ構築物が脂肪酸産生又は脂質形成のための生合成経路において活性のタンパク質をコードする遺伝子を含んでいれば、この方法で導入されたタンパク質又はタンパク質群は、生合成経路を修飾することができる。

もし、本質的に種子特異性のＡＣＰプロモーターから成っているプロモーター、好ましくはブラシカ・ナプスに由来するプロモーター、及びＡＣＰをコードする構造遺伝子を用いるとすると、後者は野生型遺伝子とは異なる。この態様は、本発明によるＤＮＡ構築物を含む種子を生じるが、しかしもし前記ＤＮＡ構築物が、その種子と相同な種子特異性の植物プロモーターを含んでいれば、前記ＤＮＡ構築物は、前記種子のゲノム中の、前記プロモーターの天然部位以外の部位に存在するはずである。

本発明の他の態様は種子に関するもので、好ましくはアブラナ科の種子に関しており、その中でＤＮＡ構築物は、外来性のタンパク質をコードする、興味の対象となるＤＮＡ配列も含んでおり、そのことによって、その配列は種子特異性の植物プロモーターの制御下にある。しかしながら、実際的な目的のためには、外来性のタンパク質がＤＮＡ構築物に加えて存在するはずである。従って、後者の態様は主として、所望のタンパク質を植物細胞内で、好ましくは種子の細胞内で産生するための工程に向けられており、その種子細胞は前記タンパク質をコードする構造遺伝子の発現を含み、本発明による組換えＤＮＡ構築物を含む前記植物細胞は、前記構造遺伝子及び、前記タンパク質の産生を含んでいる。いくつかの用途では、例えば動物の飼料原料やヒトによる消費には、種子をそれ自体使うために、もし種子が所望のタンパク質を含んでいれば十分である。他の用途のためには、前記タンパク質の植物細胞からの単離がそのような工程の次に続くことが望ましい。

本発明は以下の実施例により、それに制限されることなく例示される。

主として、Maniatis, T.、Fritsch, E. F.及びSambrook, J.による、Molecular Cloning; Cold Spring Harbor Laboratory Publ.（1982年）に記載されている、標準的な方法を用いた。変法を用いた場合は、それらを以下に記載する。次の制限部位が本明細書に言及されている。

BamHI	G↓GATCC	KpnI	GGTAC↓C
BglII	A↓GATCT	PstI	CTGCA↓G
EcoRI	G↓AATTC	SAlI	G↓TCGAC
HaeIII	GG↓CC	Sau3A	↓GATC
HindIII	A↓AGCTT	SstI	GAGCT↓C

実施例１　ブラシカ・ナプス（B. napus）ＡＣＰプロモーターの単離

ａ）ＡＣＰゲノムクローンの単離

核ＤＮＡを野外で生育した植物ブラシカ・ナプス（B. napus）の葉から単離した。葉を0.6Mのショ糖、50mMのTris-HCl pH8.0、10mMの$MgCl_2$、10mMのβ-メルカプトエタノール中で均質化し、核をペレットにし、1.2%のTriton X-100も含有する同じ均質緩衝液で２回洗浄し、50mMのTris-HCl pH8.0、20mMのEDTA及び１％のSarcosyl中で溶解した。ＤＮＡをフェノール抽出／CsCl遠心分離により精製し、Sau3Aで部分消化し、ショ糖密度勾配遠心分離により分別した。15～20kbのＤＮＡを、アガロースからの電気的溶出によりあらかじめ精製しておいた、BamHIで消化したラムダEMBL 4アームに連結した。連結混合物をガイガパックプラス（Gigapack Plus）抽出（Stratageneより）を用いてパッケージングし、大腸菌K803の中で増殖させた。得られたライブラリーを、ＡＣＰｃＤＮＡクローン29C08（R. Saffordら、1988年、前記）由来の^{32}ＰラベルしたＲＮＡプローブでスクリーニングし、SP6ベクター（Amershamより）にクローニングして陽性のプラークを得た。ACP05と名づけたこれらの１つを精製し、ＤＮＡを単離し、pTZ18R（United States Biochemical Corp.より）にサブクローニングし、制限地図作製およびＤＮＡ配列決定により特性を明らかにした。

ｂ）ACP05の構造分析

ACP05 ＤＮＡを１組の制限酵素で分解し、切断部位の地図を作製した（図１）。制限されたＤＮＡをサザンブロットし、前記のＡＣＰ　ＲＮＡプローブに対する相同性でＤＮＡ断片を同定した。1.15kbのHindIII断片、5kbのBamHI断片及び1kb SalI断片がハイブリダイズすることが判明した（図１参照）。重複している制限断片をM13ベクターにサブクローニングし、修飾したT7バクテリオファージのＤＮＡポリメラーゼ（United States Biochemical Corp.より）を用いてＤＮＡの配列を調べた。万能かつ合成のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、およそ2233bpの全配列を得た（図３）。ドットマトリックス分析法により、ACP05のＤＮＡ配列とセイヨウアブラナ胚のｃＤＮＡクローン29C08との間に相同性を見出だし（図２参照）、従ってクローニングしたゲノム断片がＡＣＰ遺伝子をコードしていることが確認された。ACP05のゲノムクローン及びｃＤＮＡクローン29C08のヌクレオチド配列を一直線に並べると、図３に示したゲノム配列のヌクレオチド1048-1317、1426-1501及び1625-1726に相当する３つの介在配列（イントロン）がＡＣＰ遺伝子内に同定された。エクソンと、種子が発現したｃＤＮＡ配列との間には完全な相同性（100%）がみられ、ACP05遺伝子が種子で発現されている証拠を与える。

ACP05の転写開始部位を決定するため、さらには遺伝子の上流の調節配列の開始を明らかにするために、ＲＮアーゼ防御の調査を行なった（J. de Siilvaら、1990年、前記参照）。遺伝子の予想される転写開始部位にかかる、ゲノムクローンACP05の、1kbのPst-SalI断片を、SP65転写ベクター（Amershamより）に連結し、鋳型として用いて、完全な長さの^{32}Ｐ-ラベルしたアンチセンスＡＣＰ　ＲＮＡを生成した。アンチセンスプローブ（およそ200,000dpm）を、R. Saffordら（1988年前記）の方法に従って単離したブラシカ・ナプス(B. napus)胚のポリＡ$^+$ ＲＮＡ及びＡＣＰ　ｃＤＮＡクローン29C08のＲＮＡ転写物に、50%のホルムアミド、40mMのPIPES pH6.4、0.4MのNaCl、1mMのＥＤＴＡ中で45℃で一晩ハイブリダイズさせ、続いてＲＮアーゼＡ（40mg／l）及びＲＮアーゼＴＩ（2mg／l）で30℃で30分処理した（ｄｐｍ＝１分間当りの分解、ＰＩＰＥＳ＝ピペラジン-N,N'-ビス［2-エタンスルホン酸］又は1,4-ピペラジンジエタンスルホン酸、Sigmaから）。ＲＮアーゼ活性を、プロテアーゼＫ（125mg／ｇ）及びＳＤＳ（0.5%）で37℃で30分間処理して破壊した。防御されたＲＮＡをフェノール／クロロホルム抽出とエタノール沈澱により回収し、６％アクリルアミド／尿素　配列決定用ゲルで分析した。胚のポリＡ$^+$ ＲＮＡにより防御された主要断片は、転写産物に由来するｃＤＮＡにより防御された主要断片より12塩基長いことがわかった。

従って、この結果は、ACP05の転写開始点をACP cDNA 29C08の５′末端から12塩基上流で、GGCATCA配列内の最初のアデニンであると特定し、５′の非コード配列の長さを69ヌクレオチドと特定した（図３）。

ｃ）ACP05プロモーターの機能分析

ACP05の５′上流領域（プロモーター）の、植物での遺伝子発現の種子特異性でかつ時間的な調節を与える能力を評価するために、ACP05の1.4kbの５′上流断片とリポーター遺伝子、β-グルクロニダーゼ（ＧＵＳ）との間に転写の融合を行なった。キメラ遺伝子(AP1GUS)をタバコに移入し、ＧＵＳ活性の発現を、結果として得られた形質転換植物の葉と種子の組織でモニターした。

ｃ．１）pAP1GUSの構築

遺伝子の転写ユニット約1kbを、その遺伝子の５′上流領域の1.5kbと共に含んでいる、ゲノムクローンACP05の2.5kbBamHI-SstI制限断片を、pTZ18Rへクローニングして（実施例１．ａ参照）pTZ5BSを作成した。この組換えプラスミドを、BamHIを用いる消化により直鎖化し、BglIIで部分消化して、長さ4.9、3.8、3.5、1.4、1.1及び0.3kbの制限断片を生成した。遺伝子のプロモーター領域を含む1.4kbのBamHI-BglII断片を回収し、BamHIで直鎖化し、ホスファターゼ処理したpTAKベクターＤＮＡに連結し（図４）、pAP1GUSを生成した（pTAKはClontech Labs. Inc.よりの植物の形質転換用のバイナリーベクターで、損傷した植物組織のアグロバクテリウム感染に続いて植物染色体に移入することのできるＤＮＡ領域を画定するＴ－ＤＮＡ境界配列の間に、ＧＵＳマーカー遺伝子を含んでおり、ＧＵＳ遺伝子に加えて、Ｔ－ＤＮＡは、抗生物質カナマイシンに対する耐性を与える細菌ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ、NPTII遺伝子を含み、それ故形質転換植物細胞を選択できる）。pAP1GUSを含む混合物を用いて、市販されている大腸菌JM101を形質転換し、組換えクローンをスクリーニングして単一のプロモーター断片が正しい方向に挿入されていることを確かめた。

ｃ．２）pAP1GUSによるアグロバクテリウムの形質転換

組換えpAP1GUSプラスミドを、ヘルパープラスミドpRK2013［Holstersらによる、Mol. Gen. Genet. 163巻（1978年）181-187頁］を有し、市販されている大腸菌HB101を用いて、大腸菌JM101からアグロバクテリウムチュメファシエンス（Agrobacterium tumefacience）ACH5/pLBA4404［A. Hoekemaらによる、Mature 303（1983年）179-181頁参照）ヘトリパレートメイティング法（treparate mating）で移動させた。アグロバクテリウム（Agrobacterium）の受容株を一晩培養した培養物及び、大腸菌の供与株とヘルパー株の対数期培養物を得た。各々の培養物２mlを遠心分離し、細胞を10mMの$MgSO_4$１mlに再懸濁した。３種の細胞懸濁液を同量ずつ混合し、Ｌ－寒天板に広げ、28℃で一晩インキュベーションした。得られた細菌のローンを、10mMの$MgSO_4$に懸濁し、リファンピシン50mg／ｌとカナマイシン50mg／ｌを含んでいるＬ－寒天上に広げた。リファンピシン耐性、カナマイシン耐性のコロニーを選択し、プラスミドＤＮＡを単離し、大腸菌にもどして形質転換し、制限分析により特性を明らかにしてpAP1GUSの完全なコピーが存在することを確かめた。

ｃ．３）タバコの形質転換および再生

本実施例は本質的には、Horschらによる、Science 227（1985年）1229-1231頁に述べられている様式で行なった。ニコチアナ・タバカム（Nicotiana tabacum）の変異株SR1の直径0.5cmのリーフディスクをpLBA4404/pAP1GUSを含んでいるアグロバクテリウム・チュメファシエンス（A. tumefacience）ACH5の一晩培養した培養物と10分間インキュベートした。吸取紙で吸湿した後、ディスクを、一倍体のニコチアナ・プランバジニフォリア(Nicotiana plumbaginifolia)の懸濁培養物（Barfieldらによる、Plant Cell Reports 4（1985年）104-107頁）２mlを20mlのシュート（Shoot）誘導培地［0.9%寒天、ＭＳ塩類、３％ショ糖、0.02mg／インドール酢酸（ＩＡＡ）、１mg／mlベンジルアミノプリン（ＢＡＰ）］を含んでいるペトリ皿に広げて調製したニコチアナ・プランバジニフォリア（Nicotiana plumbaginifolia）の支持細胞（feeder）プレート上においた。ＭＳ培地はMurashige, T. 及びSkoog, F.によりPhysiol. Plant 15巻（1962年）473-497頁に記載されている。

３日間の培養の後、ディスクを、セフォタキシム500mg／ｌカナマイシン100mg／ｌを含むシュート誘導培地に移した。選択培地上に再生した苗条を切り取り、セフォタキシム500mg／ｌを含むホルモン欠損培地（ＭＳ塩類、３％ショ糖、0.9%寒天）上においた。一旦根が定着しはじめたら、再びシュートを切り取り、カナマイシン100mg／ｌを含んでいるホルモン欠損培地上においた。選択培地上で根づいた植物を土壌に移し、25℃で16時間の光

周期の下で育てた（＝AP1GUS植物）。

ｃ．４）形質転換植物のサザン分析

再生したAP1GUS植物の葉からＤＮＡを単離し［Dollaporta, Plant Mol. Biol. Repoter 1（1983年）19-21頁］、PstI及びEcoRIで制限し、ニトロセルロースに移して^{32}ＰラベルしたＡＣＰ　ＲＮＡプローブにハイブリダイズさせた。３kbのPstI-EcoRIハイブリッド形成断片は、植物ゲノムへの完全なＡＣＰプロモーターＧＵＳカセットの組み込みを示しており、また再生した植物のＤＮＡ消化物がこの断片を示す15の植物を選びさらに分析した。オートラジオグラフの走査レーザーデンシトメトリーは、形質転換植物内のAP1GUC遺伝子のコピー数が１から４まで異なることを示した。

ｃ．５）ＧＵＳ酵素活性についての形質転換植物の分析

種々の成育段階における、葉の組織及び種子におけるＧＵＳ活性を検査した。用いた特定の成育条件下では、タバコの単一の植物体の個々の種子のさやの成育速度は異なり、最も初期のさやがしばしば最も速く発育することがわかった。そのためＤＡＦを用いて種子の成育段階を正確に測定することは不可能であった。この理由から形態学的特徴を用いて種子を段階にわけた。種子の大きさ及び着色性に基づき、種子の成育の５つの段階を定めた。

１．長さ0.4-0.5mmで着色性なし（白色）
２．長さ0.5-0.6mmで薄茶色
３．長さ0.6-0.8mmで硬い種皮があり着色している
４．長さ0.6-0.8mmで強度に着色している（茶色）
５．乾燥している（成熟した種子と呼ぶ）

ＤＡＦと種子成育の種々の段階との関係の特徴を図５に示した。

AP1GUSで形質転換した15の植物のＧＵＳ活性を、pcTAKで形質転換した４つの対照植物と共に分析した。pcTAKは、植物の構成プロモーターであるカリフラワーモザイクウイルス(CaMV)35S［この構築物はRichard Jefferson, Plant Breeding Institute（ケンブリッジ）の好意により提供された］に連結されたＧＵＳ遺伝子を含んでいる構造物である。

AP1GUS及びpcTAKで形質転換した植物の葉と段階１、２、３の種子の抽出物のＧＵＳ活性を、メチルウンベリフェリルグルクロニド（ＭＵＧ）とのインキュベーション及び、放出されたメチルウンベリフェロン（ＭＵ）の蛍光測定により、分析した。植物の組織を氷上で、酸で洗浄した砂の存在下に、ＧＵＳ抽出緩衝液［50mM　リン酸ナトリウムpH7.5、0.1% Triton X-100、1mM EDTA、10mMジチオトレイトール（ＤＴＴ）、1mMフェニルメチルスルホニルフルオリド（ＰＭＳＦ）］中で粉砕することにより、植物抽出物を調製した。不溶性物質をベンチトップ型遠心分離機での５分間の遠心分離により除去した。可溶性抽出物の0.05mlを1mlの検定用緩衝液［１mMＭＵＧを含んでいるＧＵＳ抽出緩衝液］と37℃でインキュベートし、０分、５分、15分及び30分後に0.25mlのアリコートを、0.75mlの0.2M Na_2CO_3に移した。ＭＵの蛍光を、励起光の波長を365nm、発光波長を455nmにセットしたBaird Nova 1分光蛍光計で測定した。

発現の絶対レベルは植物ごとにかなり異なっていたが、個々の形質転換植物では、組織特異性及び成育調節に関して一致したＧＵＳ活性のパターンが得られた（図６）。遺伝子移入集団内で得られる遺伝子発現の変動するレベルは一般的な現象であり、移されたＤＮＡのランダムな組み込みに起因する位置の影響によるものと考えられる（Jonesらによる、EMBO J. 4（1985年）2411-2418頁）。ＧＵＳ発現のレベルと挿入された遺伝子のコピー数との間には何ら関連性はなかった。

pAP1GUS形質転換植物では、葉組織におけるＧＵＳ活性のレベル（pmol MU／分／mg新鮮重）は、種子組織に比べて非常に低く（平均値7.2）、種子組織では段階１の平均68.7から段階３の平均301まで、成育を通して増加することがわかった。それに対しpcTAKで形質転換した植物では、ＧＵＳの発現は種子組織より葉組織の方が高く（平均237）、種子組織では段階１の188から段階３の56に平均値が下がった（図６）。

葉と比較した種子組織のＧＵＳ活性の相対レベルを、AP1GUS及びcTAK形質転換植物の種子の各段階について算定した。このことは、組織特異性及び発現の成育調節について、それ

がＧＵＳ活性の絶対レベルにおける植物ごとの差とは無関係であるというデータを与えた。13のAP1GUS植物及び４つのcTAK植物から得られた平均値をヒストグラムの形に表わした（図７）。AP1GUS形質転換植物では、ＧＵＳ活性のレベルは種子の成育の間増加して最大値に達するが、それは平均して葉組織に見られるものより100倍高い。対照的にcTAK植物では、種子成育の３段階すべてにおいて、ＧＵＳ活性のレベルは葉組織に見られるものと同様であり、従って種子／葉の平均値はほぼ１に等しい。従ってこのデータは、単離されたAP1プロモーターが機能して、種子特異性かつ成育が調節される様式で、遺伝子の発現を制御していることを示している。

さらにAP1GUS及びcTAK形質転換植物の段階３の種子のＧＵＳ発現の比較では、AP1GUS植物における、より高い平均活性レベルを示している。cTAK構築物に存在しているCaMV35Sプロモーターは、植物の強力な構成プロモーターであることが広く知られているので、単離されたAP1プロモーター自体が、この特定の組織での遺伝子発現のための強力なプロモーターであることになる。

実施例２　ACPプロモーター断片の削除分析

組織特異性及び、遺伝子発現の成育上の制御を与えることのできる配列の位置をより厳密に決定するため、実施例１に述べた1.4kbのACPプロモーター断片の欠失分析を行なった。β-グルクロニダーゼ（ＧＵＳ）リポーター遺伝子に融合されたアシルキャリアータンパク質遺伝子ACP05の５′上流領域の、各々1.4kb(pAP1GUS)、0.93kb(pAP3GUS)及び0.29kb(pAP2GUS)を含むキメラ遺伝子構築物をタバコに移入し、結果として得られた形質転換植物のＧＵＳ活性の発現を分析した。

ａ）pAP1GUSの構築

実施例１参照。

ｂ）pAP2GUSの構築（図８参照）

pTZ5BSDNA（実施例１、c-1項参照）をBglIIで完全に消化し、3.5、1.1及び0.3kbの長さの制限断片を生成した。0.3kb断片をBamHIで直鎖化したpTAKに連結し、その混合物を用いて大腸菌RRIを形質転換した。

組換クローンをPstI-SstI＋HindIIIとで消化してスクリーニングし、単一のプロモーター断片が正しい方向に挿入されていることを確認した。結果として得られたプラスミドAP2GUSはＧＵＳ遺伝子に連結した0.29kbのＡＣＰプロモーターを含んでいた。

ｃ）pAP3GUSの構築（図９参照）

pTZ25BS ＤＮＡをPstIで完全に消化し、自己連結させ、その混合物を用いて大腸菌RRIを形質転換させた。組換クローンを、HindIIIで消化して再び環状化した大きなPstI断片をスクリーニングし、pTZ5PSと称するプラスミドを得た。後者のプラスミドのＤＮＡをHindIIIで消化し、1kbのプロモーター断片を回収し、HindIIIで消化したAP2GUSＤＮＡに連結し、大腸菌RRIを形質転換させた。0.29kbのAP2プロモーター断片の代わりに1kbのプロモーター断片が存在することを調べるため、組換クローンをPstI+BglIIで分解してスクリーニングした。結果として得られたプラスミド（pAP3GUS）は、ＡＣＰ構造遺伝子の転写開始部位のすぐ上流のＡＣＰプロモーターの最初の924bpに連結してその制御下にあるＧＵＳ遺伝子を含んでいた。

ｄ）アグロバクテリウムの形質転換

ベクターpAP1GUS、pAP2GUS、pAP3GUSを、対照ベクターpcTAK及びpTAK（プロモーターのないＧＵＳ遺伝子構築物）とともに、アグロバクテリウム・チュメファシエンスACH5/pLBA4404へ直接ＤＮＡを取り込ませるプロトコール［Anらによる、Binary vectors, Plant Molecular Biology Manual,（Galvin, Schilperoort共編）、A3（1988年）1-19頁］を用いて移入した。形質転換したコロニーを選択し、プラスミドＤＮＡを単離し、大腸菌にもどして形質転換し、生じたプラスミドを制限分析して各々の遺伝子の完全なコピーの存在を確認した。

ｅ）タバコの形質転換

実施例１に記載したように行った。

ｆ）形質転換植物のサザン分析

再生した植物が完全なキメラ遺伝子の挿入されたコピーを含んでいることを、実施例１に記載したサザン分析により確認した。

ｇ）遺伝子移入植物のＧＵＳ活性の分析

遺伝子移入植物の葉及び段階３と５の種子の抽出物について、ＧＵＳ活性を分析した（構築物グループ当り10植物）。この実験ではＧＵＳ活性をＤＮＡの関数として表わしたが、それは新鮮重又はタンパク質濃度より、より一定の細胞パラメーターを表わしており、両者はともに胚成育の細胞伸長期の間に劇的に増加する。葉の抽出物の最初のＤＮＡ評価の間に、ＧＵＳ抽出用緩衝液（実施例１参照）中に存在するTriton X-100がHoechst法を用いたＤＮＡ濃度の測定を妨げることがわかった。ＳＤＳは支障なくTriton X-100に代わることができ、次の抽出に使用した。

実施例１に記載したように、個々の植物におけるＧＵＳ発現の絶対レベル（pMol MU／分／μｇ ＤＮＡ）はかなり異なることがわかった。しかしながら、各々の構築物群の個々の植物では、ＧＵＳ発現の一致した組織パターンが得られた。２つの欠失したＡＣＰプロモーター構築物（AP2GUS及びAP3GUS）で形質転換した植物におけるＧＵＳ発現の様式は、1.4kbプロモーター(AP1GUS)で形質転換した植物で得られるものと差がなかった。従って、３つのＡＣＰプロモーター構築物の各々で形質転換した植物は、葉よりも種子において高い発現レベルを有し、段階３の種子では活性の最大値を有していた。対照的に、pcTAKで形質転換した植物は、種子及び葉組織で同様の発現レベルを示した。図10は、個々の構築物群の10植物のＧＵＳ活性を平均して得た値を示している。ＡＣＰプロモーター構築物で形質転換した３つの群において、ＧＵＳ活性は段階３の種子で最も高く、段階３の種子＞成熟した種子＞葉であり（葉で得られる活性レベルは、プロモーターのないpTAK構築物で形質転換した植物で得られるバックグラウンドレベル以上ではなく）、従ってＡＣＰプロモーターを欠失した変形体は両者とも、組織特異性のそして成育調節に携わる要素をまだ含んでいることを示している。ＧＵＳ活性のレベルに関しては、0.29kbＡＣＰプロモーター構築物(AP2GUS)は実際に1.4kbプロモーターよりもやや高い平均活性レベルを示したが、1.4kbプロモーターの値は、924bpAP3プロモーターの値よりも高かった。

結論として、組織特異性で成育の調節の両方及び、ACP05遺伝子の発現レベルを与える要素が、遺伝子の転写開始部位の0.29kb内に存在することが示された。

実施例３　セイヨウアブラナのＡＣＰプロモーター、ナピンプロモーター及びクルシフェリンプロモーターの比較

セイヨウアブラナでは、種子成育の間の種々の貯蔵産物の合成は別々に調節されている。例えば、貯蔵脂質は最初に合成され、続いて二つの貯蔵タンパク質、ナピン及びクルシフェリンが合成される。この調節はおそらく、種子の成育の間に種々の貯蔵産物の合成に係わる遺伝子と特異的に活性化する、種子特異性プロモーター群に仲介されているのであろう。

本実施例に記載した研究の目的は、脂質生合成遺伝子（ＡＣＰ）及び２つの貯蔵タンパク質遺伝子（ナピン及びクルシフェリンから得たセイヨウアブラナの個々のプロモーター要素が、実際に種子成育の間に遺伝子の特異的な発現を与えることができるか否かを決定することであった。キメラ遺伝子ACP-GUS、ナピン-GUS、クルシフェリン-GUSをタバコに移入し、種子成育の間の種々の段階における発現をモニターすることによりこのことを研究した。

キメラ遺伝子の構築

pAP1GUSの構築物、すなわちACP05の1.4kb ５′上流の領域1.4kbとＧＵＳ遺伝子との間の転写の融合は実施例１に記載した。ＧＵＳ遺伝子に融合したセイヨウアブラナの貯蔵タンパク質のプロモーターを含み、植物形質転換ベクターpTAKにクローニングした構築物は、ダラム大学のA. Ryan博士より入手した。後者は各々1.1kbのナピンの５′上流断片とＧＵＳ遺伝子との間の（pNAPGUS）、及び2.0kbのクルシフェリンの５′上流断片とＧＵＳ遺伝子との間の（pCRUGUS）、転写の融合物である（図11）。

ベクターを、実施例２に記載したようにアグロバクテリウム・チュメファシエンスACH5/pLBA4404に移入し、これらを対照であるpTAK及びpcTAKと共に用いて、実施例１に記載した

ようにタバコを形質転換した。各々の構築物について10植物を再生した。

サザン分析

実施例１に記載したサザン分析により、再生した植物が完全なキメラ遺伝子の挿入されたコピーを含んでいることを確認した。

遺伝子移入植物のＧＵＳ活性の分析

実験１

遺伝子移入植物の葉及び段階３ならびに５の種子におけるＧＵＳ活性を、実施例２に記載したように分析した。調べた組織においては、各々の構築物群の個々の植物について、ＧＵＳ活性の絶対値は異なっていたが、一致したパターンが得られた。（実施例１及び２に記載した通り）。

ナピン又はクルシフェリン構築物で形質転換した植物では、葉のＧＵＳ活性が低く（図12）、最大の活性は段階５の種子に見られた。ナピン形質転換体では、段階３の種子のＧＵＳ活性は平均で最大値の75%であるのに対し、クルシフェリン形質転換体では段階３の種子には最大活性の30%しか見られなかった。

AP1GUS形質転換植物では最大ＧＵＳ活性は段階３の種子に見られ、これは段階５の種子より平均2.5倍高かった。

これらの結果は、種子成育を通じて、２つの貯蔵タンパク質遺伝子のプロモーターに比較してＡＣＰプロモーターのより早い活性化を示している。この特異的な活性化の性質をより正確に決定するために、種子の段階を詳しく分けたＧＵＳ活性の分析を用いて第二の実験（下記参照）を行なった。

各々の構築物群から得られるＧＵＳ活性の平均値の比較は、プロモーターの相対的な強さの量的評価を可能にする。AP1GUS形質転換植物では、ＧＵＳ活性の最大値は、段階３の種子にあり、それはpCRUGUS形質転換植物の段階５に得られるものと同様であった（pcTAK形質転換植物の葉組織で得られる最大値とも同様である）。この値は、pNAPGUS形質転換植物の段階５の種子に見られる最大のものより約３倍高い。

実験２

最も盛んにＧＵＳを発現している、AP1GUSおよびCRUGUS遺伝子移入植物の種子を、カナマイシン上で発芽させ、生じたＦ１植物を用いて、種子成育の間のＧＵＳ発現の詳しい分析を行なった。

初期の研究（実施例１参照）では、植物を５インチの鉢で育成し、すべての花を受粉させたが、さやの成育速度には変動が見られたため、種子成育の段階づけには形態学的な性質を用いた。ＡＣＰ及び貯蔵タンパク質遺伝子のプロモーターによって与えられる、観察された遺伝子の特異的活性化の性質をより厳密に決定できるようにするため、花に標識をつけるという別の方法を用い、それによりＤＡＦを種子成育の意味あるマーカーとして使用することが可能になった。このように、開花が始まる時期にタバコ植物を直径7.5インチの、堆肥を入れた鉢に移した。毎日、設定した時間に、葯の開いた新しい花を数え、一つの花に標識をつけ、残りの花を除去した。標識づけを14日間（０日～13日）行ない、20日目に7-20ＤＡＦを表わす14鉢を収穫した。種子を回収し、タンパク質含有量および脂質含有量を分析した。種子を0.1%ＳＤＳ、1M NaCl、50mM リン酸ナトリウムpH7.5、1mM ＥＤＴＡ、10mM ジチオトレイトールで均質化し、遠心分離し、タンパク質試薬（Bio-Radより）を用いて上清を検定することにより、タンパク質の見積りを行なった。全脂質含有量は、種子をクロロホルム／メタノール（2:1）で抽出し、抽出された脂質をメタノール・トルエン・濃硫酸（20:10:1）で還流することにより生成される、脂肪酸メチルエステルのＧＬＣ分析により測定した。種子成育の間の脂質およびタンパク質の合成について得られたデータを図13に示す。脂肪酸含有量は、９日と13日の間に急激に増加するように見え、一方タンパク質合成の主要相は17日から20日の間に起こっている。２つの貯蔵産物に見られるＳ字状曲線での蓄積は、花の標識法が、これらの確立された成育条件下では、意味のある成育マーカーとして使用できることを示している。「標識をつけた」種子を抽出し、ＧＵＳ活性を、実施例１に記載したように分析した。図14は、AP1GUS形質転換植物において、ＧＵＳ活性（２植物の平均）が９ＤＡＦで始まり、10ＤＡＦで最大値の50%に達

し、脂質合成の最も活発な相に相当する11-12ＤＡＦにピークを成したことを示している。14ＤＡＦまでに、活性は最大値の20%に落ち、20ＤＡＦ（段階５）までこのレベルのまま残る。
CRUGUS形質転換植物においては、ＧＵＳ活性は10ＤＡＦで最大値の1.3%であり、最も活発な脂質合成相である11ＤＡＦでは７％にすぎない。15ＤＡＦまでに最大活性の50%に達し、タンパク質合成の最も活発な相に相当する16ＤＡＦと19ＤＡＦの間に活性のピークがあった。
タバコの種子成育の間の脂肪酸におけるＧＵＳ活性とタンパク質の蓄積の重ね合わせは（図15）、ＡＣＰプロモーターによって推進されるＧＵＳの発現が、脂質生合成の最も活発な相と一致しており、一方クルシフェリンプロモーターによって推進されるＧＵＳの発現は、数日後に貯蔵タンパク質合成の主要相と協奏して、ピークに達することを示している。
これらの調査結果は、遺伝子工学により貯蔵用脂質組成物の修飾を目的とするいかなるプログラムに対しても極めて重要である。脂質生合成の進行を混乱させるためには、移された遺伝子が種子の脂質生合成のプロモーターの調節下になければならない。移された遺伝子を、貯蔵タンパク質遺伝子のプロモーターに連結すると、種子における貯蔵脂質の大半が合成された後に、その遺伝子が発現することになる。
実施例４　セイヨウアブラナにおける、AP1に制御されたＭＣＨの産生
本実施例AP1プロモーターの、同一植物すなわち、セイヨウアブラナ脂肪種子における機能性を証明する。AP1プロモーターは、セイヨウアブラナの種子成育の間に、外来遺伝子の発現を時間的に調節することが示されている。使用された外来遺伝子は、ラット由来のS-アシル脂肪酸シンテターゼチオエステルヒドロラーゼの中間鎖（ＭＣＨ）をコードする。ＭＣＨは、ラット乳腺において、授乳期に誘導される酵素であり、脂肪酸合成の未成熟な鎖の終結を引き起こし、乳産生のための脂肪酸の中間鎖の合成という結果に終わる［Libertini及びSmith, J. Biol. Chem. 253,（1978年）1393-1401頁］。
ラットＭＣＨをコードするｃＤＮＡは単離され配列が決定されている［R. Saffordらによる、Biochem. 26（1987年）1358-1364頁］。ＭＣＨ遺伝子産物を、子葉細胞内の脂肪酸合成の正しい細胞内部位、すなわちプラスチドオルガネラへターゲティングするためには、MCHcDNAにプラスチドを標的とする配列に連結する必要があった。この配列はセイヨウアブラナACPcDNAから単離された（R. Saffordら、1988年、前記）。生じたACPMCHキメラ遺伝子を、セイヨウアブラナのAP1プロモーターに融合し、pAP1A2Mと呼ぶ最終的な構築物をアグロバクテリウム感染により。セイヨウアブラナへ移入した。
ａ）pAP1A2Mの構築
歴史的には、pAP1A2Mは非常に遠回りの経路を介して構築され、数多くの探査上の構築物の最終産物である。その構築物のすべての構成部分は、本明細書の中ですでに記載され、あるいは文献の中に発表されているので、本発明者らは、単純化のため、最終的な構築物とそのＤＮＡ配列の記載のみを提供する（図16および図16の説明参照）。
その構築物は、以下の要素からなる。
i)ＡＣＰプロモーター
配列決定された975bpのPstI-BglII断片（図３のポリヌクレオチド7-981）に、さらに0.4kbのBamHI-PstI　５′断片（配列決定されていない）を含む、クローンACP05に由来する1.4kbのBamHI-BglII配列（実施例１：pAP1GUSの構築参照）。
ii)ＡＣＰ運搬配列
ＡＣＰゲノムクローン05E01の183bpのSau3A-HaeIII断片（R. Saffordら、1988年、前記）。ＭＣＨ構造遺伝子と融合させるため、断片の３′末端にBglIIリンカーが結合している。
iii)ＭＣＨ構造遺伝子
MCHcDNAクローン43H09の320-1179のヌクレオチドを表わす断片（ＡＴＧ開始コドンのすぐ下流のＧＡＧコドンから、翻訳停止コドンの71ヌクレオチド下流まで）であり、植物ベクターへのクローニングを容易にするために、最後の２つのヌクレオチドAGをBglIIリンカ

ーへ伸ばした。
ＡＣＰ分子の天然の開裂部位（C↓A）を保存するため、ＡＣＰ運搬配列とＭＣＨ構造遺伝子との間の接合を、部位特定の突然変異生成により修飾した。これは、BglIIリンカーとＭＣＨのＡＴＧ開始コドンに相当する、９塩基配列の欠失を含む。従って最終的な構築物pAP1A2Mは、ＡＣＰ運搬配列に加えて、成熟ＡＣＰタンパク質の最初の２つのアミノ酸（Ala-Ala）と、それに続く開始ＡＴＧを欠いたＭＣＨタンパク質から成る融合タンパク質をコードした。
ｂ）アグロバクテリウム・チュメファシエンスの形質転換
ＤＮＡを直接取り込ませる方法（Anら、1988年、前記）を用いて、pAP1A2MをＡ．チュメファシエンスpGV3850［Zambryskiらによる、ＥＭＢＯ　２（1983年）2143－2150頁］に移すことによりバイナリーベクターを構築した。得られたアグロバクテリウムのコロニーから、ＤＮＡを抽出し、大腸菌を形質転換し、そこから再び単離することにより、遺伝子の正しい挿入を確かめることができた。
ｃ）ブラシカ・ナプスの栽培品種ウェスター（Brassica napus cv. Wester）の形質転換
茎（stem）の部分を切り取り、バイナリーベクターpGV3850:pAP1A2Mを含むＡ．チュメファシエンスで形質転換した。用いた方法はFryらによる、Plant Cell Reports 6巻（1987年）321-325頁の方法で、次のような修正をした。
ｉ．カナマイシンによる選択は20μg/mlととし、感染後２週間まで延期し、
ii．カルベニシリンをセフォタキシム500μg/mlに代え、
iii．再生培地からアルギニンを除去し、
iv．0.8%寒天を１％アガロースに代え、
ｖ．感染の前に茎の部分を標準苗条用培地（standard shooting media）で２－３日、前処理し、
vi．支持細胞層としてＮ．プランバギニフォリア細胞系（Barfieldら、1985年、前記）を用いた。
２回の移し変えの後、選択培地上に残っている緑色の苗条について、ノパリンの存在を調べた［Otten及びSchilperoortにより、B．B．A．527（1978年）497-500頁］。陽性の苗条を土壌に移し５インチの鉢に入れ、16時間明期（22℃）、８時間暗期（18℃）周期で運転している育成室に移した。
ｄ）形質転換植物の組織の分析
葉組織からＤＮＡを抽出し、制限し、消化し、KpnI-BglII MCH断片を用いて、サザンブロット分析をし、挿入されたＭＣＨ遺伝子の存在を確認した。
サザン陽性植物から、特定した成育上の５段階での種子を回収し、ＭＣＨタンパク質の発現を、ウェスターン法を用いて分析した。ＤＡＦに対する５つの段階の関係は次の通りである。

段階１	＜15ＤＡＦ	段階４	25-30ＤＡＦ
段階２	15-20 ＤＡＦ	段階５	30-35ＤＡＦ
段階３	20-25 ＤＡＦ		

種子をLaemmli試料緩衝液（Laemmli, Nature 227［（1970年）80-685頁］（1:1v/v）で、砂を研磨剤として用いて均質化した。抽出液を５分間沸騰させ、マイクロ遠心機を用いて遠心し（microfuged）、上清を取り分析した。新鮮重10mgに相当する抽出物を、10％ＳＤＳ－ＰＡＧＥで電気泳動し、ニトロセルロース上にブロットし、ブロットをR．Saffordらによる（1987年）前記の方法でラット抗ＭＣＨ抗体と反応させた。
得られたオートラジオグラフ（図17）において、種子抽出物は、精製したＭＣＨタンパク質と移動度が等しく単一の交差反応をするバンドを示した。このことは、ＡＣＰ－ＭＣＨキメラタンパク質のＡＣＰ運搬配列が、おそらくＭＣＨのプラスチド内への取り込みに際してプロセッシングされたことを示している。オートラジオグラフはＭＣＨ発現がセイヨウアブラナの種子成育の間に、時間的様式において調節されていることを示している。ＭＣＨ発現は、段階１及び２では、わずかに検出されるが、段階３では劇的な増加が見られ、それは脂肪種子セイヨウアブラナにおける、貯蔵脂質の堆積開始直前にあたる（図18参

照）。従ってこの結果は、脂肪種子セイヨウアブラナにおいて、AP1プロモーターが種子成育の貯蔵脂質合成相と一致して機能し、特異的に遺伝子を発現させていることを示している。

大腸菌JM101/pAP1GUSはブダペスト条約の下、ナショナル・コレクション・オブ・インダストリアル・アンド・マリン・バクテリア（National Collection of Industrial and Marine Vacteria）［アバディーン（Aberdeen）に1991年３月２日に寄託され、受託番号ＮＣＩＭＢ 40396を得た。

EPC規則28(4)に従って、第三者の試料の入手は指名された専門家への試料の配給によってのみ達成される。

図面の説明

図１

ACP05 ＤＮＡを、制限酵素BamHI、PstI、BglII、HindIII、SalI及びSstIで消化することにより得られたACP05ゲノムクローンの制限地図と制限部位のマッピング。

図２

DNA Star Dotplotソフトウェアを用いた、ACP05（ｘ軸）とACP cDNA 29C08（ｙ軸）との間の相同関係のドットマトリックス分析。10ヌクレオチド配列のかたまりを比較し、100％の相同性を共有している領域を点で特定した。

図３（1/3-3/3）

本図はACP05ゲノムクローンの決定されたヌクレオチド配列(2233bp)を示しており、対応するＤＮＡ配列の上に、導き出されるアミノ酸を配し、図１に示した制限酵素部位を太字でＤＮＡ配列の下に示したものである。

ヌクレオチド1-6（SalI部位）は、実施例１．ｂに記載したM13クローニングベクターの残部であり、それに対しポリヌクレオチド7-2233はACP05クローンに由来する。ヌクレオチド7-12は、PstI制限部位CTGCAGである。AP2プロモーター(0.29kb)は、ポリヌクレオチド640-930であり、従ってBglII制限部位AGATCTから始まり、転写開始部位の直前の、GGGCATCACGの最初のAに終わる。

イントロンは、ポリヌクレオチド1048-1317、1426-1501および1625-1726である。

ポリヌクレオチド1000-1047と1318-1422は-51から-1までの運搬用ペプチド（Met Ser Thr・・・Val Ser Cys）をコードする。ヌクレオチド1423-1425、1502-1624及び1727-1849は成熟したACP1から83（Ala Ala Lys・・・Ala Lys Lys）をコードする。ヌクレオチド1850-1852は停止コドンＴＧＡを成す。

図４

植物の形質転換ベクターpAP1GUSの構築。

図５

タバコの種子の成育。花成後の日数（ＤＡＦ）＝開花後の日数（dpa）とタバコ種子の形態学的段階との関係。

図６

AP1GUSの遺伝子移入のタバコの個々の植物におけるＧＵＳ（β－グルクロニダーゼ）活性。ＧＵＳ活性（pmol MU/分/mg新鮮重）を、pAP1GUS又はpcTAK（対照）ベクターで形質転換した植物の、段階１、２及び３の種子及び葉について測定した。

図７

AP1GUS遺伝子移入のタバコ植物におけるＧＵＳ活性。13のAP1GUS形質転換植物と４つのcTAK（対照）遺伝子移入の植物から得た個々の植物について、種子／葉の値を決定し、得られた数値を平均し、段階１、２及び３についてのＧＵＳ活性の相対値（種子／葉）を計算した。

図８

植物形質転換ベクターpAP2GUSの構築。

図９

植物形質転換ベクターpAP3GUSの構築。

図10

遺伝子移入タバコ植物AP1GUS、AP2GUS及びAP3GUSにおけるＧＵＳ活性。AP1GUS、AP2GUS、AP3GUS植物及び対照であるTAKならびにcTAK植物からの葉、段階３の種子及び成熟した種子のＧＵＳ活性（pmol MU／分／μｇ ＤＮＡ）の平均値（10植物より）。

図11

ナピン及びクルシフェリンのプロモーター配列とＧＵＳ構造遺伝子との、各々プラスミドpNAPGUS及びpCRUGUSを生ずる転写の融合。両側の三角形は、左右のＴ－ＤＮＡ境界配列を示す。

図12

遺伝子移入タバコ植物、AP1GUS、NAPGUS、CRUGUS、cTAK及びTAKにおけるＧＵＳ活性。葉、段階３の種子及び成熟した種子のＧＵＳ活性（pmol MU／分／μｇ ＤＮＡ）の平均値（10植物から）。

図13

タバコ種子の成育の間の脂質及びタンパク質の蓄積。数値を（新鮮重％としての）を、最大測定値の百分率としてプロットしてある。

図14

AP1GUS及びCRUGUS遺伝子移入タバコ植物の種子成育の間のＧＵＳ活性（pmol MU／分／mg新鮮重）。

図15

種子成育の間の脂質及びタンパク質の蓄積（すなわち図13と図14を合わせたもの）と重ね合わせた、AP1GUS及びCRUGUS遺伝子移入タバコ植物の種子成育を通してのＧＵＳ活性の測定。

図16(1/4-4/4)

本図は、1.4kb AP1プロモーターを含むキメラ構築物のヌクレオチド配列で、配列が決定されている部分だけを示したものである。すなわち、約970bpのPstI-BglII断片、ＡＣＰ運搬配列、ほぼ完全なＭＣＨ遺伝子及びＭＣＨ遺伝子の３′の遺伝暗号のない配列部分である。ヌクレオチド配列には、導き出されるアミノ酸配列を、対応するＤＮＡ配列の上に与え、関連のある制限酵素部位をＤＮＡ配列の下に太字で示した。従って、ポリヌクレオチド1-987は図３のACP05遺伝子のＤＮＡ配列の7-993のポリヌクレオチドと同一である。ポリヌクレオチド988-1149は、種々のキメラ構築物に由来し、運搬配列であるACP cDNAクローン05E01に加えてＡＣＰ構造遺伝子の最初のコドン（Alaをコードする GCG）を含む。このＡＣＰ開始部分を、ＭＣＨ構造遺伝子に結合し、ＡＴＧ開始コドンをAlaをコードするGCAに置換した。従ってポリヌクレオチド1153-1938は図16のポリペプチド3-264をコードし、ＭＣＨタンパク質のポリペプチド2-263と同一である。コドン1939-1941はＭＣＨ構造遺伝子の停止コドンである。ポリヌクレオチド1942-2010は、ＭＣＨ遺伝子の３′の遺伝暗号のない領域である。ヌクレオチド2011-2015は、ＤＮＡ配列のクローニングを容易にするために加えられたBglII部位に由来する。

図17

本オートラジオグラフは、ＭＣＨ発現を、pAP1A2Mプラスミドで形質転換したセイヨウアブラナの段階１－５の種子の抽出物のウェスターン法により示している。ＭＣＨ発現は段階１及び２ではわずかであるが、段階３、すなわち、セイヨウアブラナにおいて脂質の貯蔵が開始される直前には劇的に増加する（図18参照）。オートラジオグラフの左側部は、分子量マーカー、精製ＭＣＨ、対照としてpTAKで形質転換した植物の抽出物及びpAP1A2Mプラスミドで形質転換したタバコの種子を示している。

図18

セイヨウアブラナの種子成育の間の、脂質の蓄積。脂肪種子セイヨウアブラナにおいては、貯蔵脂質蓄積の開始は14ＤＡＦごろ始まり、段階３に相当する19ＤＡＦと27ＤＡＦのＳ間に相当な値に達し、29ＤＡＦ以降に劇的に増加する。

明細書中に記載した文献

欧州特許出願公開第0255377号［（CALGENE, INC.）、優先権主張日1986年７月31日、1988年２月３日公開

欧州特許出願公開第0255378号［（CALGENE, INC.）、優先権主張日1986年７月31日、1988年２月３日公開
Anらによる、Plant Molecular Biology Manual（Galvin及びSchilperoort編）におけるBinary vectors、Ａ３（1988年）１-19頁
Barfieldらによる、Plant Cell Reports、４巻（1985年）104-107頁
Dellaportaによる、Plant Mol. Biol. Reporter、１巻（1983年）19-21頁
R. J. Ellis及びC. Robinson ; In ; Advances in Botanical Research、14巻（1987／8年）、１-24頁、Academic Press Ltd.により出版（ＩＳＢＮ 0-12-005914-2）
Fryらによる、Plant Cell Reports、６巻（1987年）、321-325頁
A. Hoekemaらによる、Nature、303巻（1983年）、179-181頁
Holstersらによる、Mol. Gen. Genet.、163巻（1978年）、181-187頁
Horschらによる、Science、227巻（1985年）、1229-1231頁
Jonesらによる、ＥＭＢＯ Ｊ.、４巻（1985年）、2411-2418頁
V. C. Knaufによる、ＴＩＢＴＥＣＨ、５巻（1987年２月）、40-47頁、The application of genetic engineering to oilseed crops
Laemmliによる、Nature、227巻（1970年）、680-685頁
Libertini及びSmithによる、J. Biol. Chem.、253巻（1978年）、13931401
T. Maniatis、E. F. Fritsch及びJ. Sambrookによる、Molecular Cloning、Cold Spring Harbor Laboratory Publ.（1982年）
T. Murashige及びF. Skoog、Physical. Plant、15巻（1962年）、473-497頁
Otten及びSchilperoortによる、Biochem. Biophys. Acta. 527巻（1987年）、497-500頁
M. A. Post-Beittenmillerらによる、The Plant Cell、１巻（1989年）、889-899頁
R. Saffordらによる、Biochem.、26巻（1987年）、1358-1364頁
R. Saffordらによる、Eur. J. Biochem.、174巻（1988年）、287-295頁、Plastid-localised seed acyl-carrier protein of Brassica napus is encoded by a distinct, nuclear multigene family
J. de Silvaらによる、Plant Molecular Biology、14巻（1990年）、537-548頁、The isolation and sequence analysis of two seed-expressed acyl carrier protein genes from Brassica napus
A. R. Slabasらによる、7th International Symposium of the Structure and Function of Plant lipids、カリフォルニア大学（カリフォルニア州、デービス）（1986年）
P. K. Stumpfらによる、Fatty Acid Metabolism and Its RegulationにおけるFatty acid biosynthesis in higher plants、Elsevier Press（アムステルダム）、Numa S.編（1984年）、155-179頁
G. Van den Broekらによる、Nature、313巻（1985年）、358-363頁
J. D. Watson、J. Tooze及びD. T. Kurtsによる、Recombinant DNA, A Short Courseにおける13章（Genetic Engineering of Plants by Using Crown Gall Plasmids）、Scientific American Books（1983年）発行、W. H. Freeman and Company（米国、ニューヨーク）販売
Zambryskiらによる、ＥＭＢＯ、２巻（1983年）、2143-2150頁

配列表１：図３に対応するＡＣＰ０５ゲノムクローンのヌクレオチド配列

ctcgacctgc agccagaagg ataaagaaat tttggacgcc tgaagaagag gcagttctga 60

gggaaggagt aaaagagtat gtctccttaa ctctactatc aagtttcaag aagctgagct 120

tggctctacc ttgatatgtt tattgctgtt gtgcaggtat ggtaaatcat ggaaagagat 180

aaagaatgca aaccctgaag tattcgcaga gaggactgag gtgagagagc atgtcacttt 240

tgtgttactc atctgaatta tcttatatgc gaattgtgag tggtactaaa aaaggttgta 300

acttttggta ggttgatttg aaggataaat ggaggaactt ggttcggtag ccgtaacaag 360

tttttgggaa tctcttgggt tttaaattgc tatggagttt ttttttgcct gcgtgacaac 420

atatcatcag ctgttgagaa ggaagatggt attagaaagg gtctttcttt cacattttgt 480

gttgtggaca aatattaaag tcaaatgtgg cacatggatt ttaattcggc cggtatggtt 540

tggttaagac tggtttaaca tgtataatta gtctttgttt tatttggctc agcggtttgt 600

tggtgttggt taggaactta ggcttgtctc tttctgataa gatctgattg gtaagatatg 660

ggtactgttt ggtttatatg ttttgactat tcagtcacta tggcccccat aaattttaat 720

tcggctggta tgtctcggtt aagaccggtt tgacatggtt catttcagtt caattatgtg 780

aatctggcac gtgatatgtt taccttcaca cgaacattag taatgatggg ctaatttaag 840

acttaacagc ctagaaaggc ccatcttatt acgtaacgac atcgtttaga gtgcaccaag 900

cttataaatg acgacgagct acctcggggc atcacgctct ttgtacactc cgccatctct 960

ctctccttcg agcacagatc tctctcgtga atatcgacaa tgtcgaccac tttctgctct 1020

tccgtctcca tgcaagccac ttctctggta ttagatcatt ttgcctctga tctgattctt 1080

gctgtttgtc accgttcaaa actctcgacg catgttttga ttatgttgag aattagaaaa 1140

atgttagctt tacgaatctt tagtgatcat ttcaattgga tttgcaatcc tgtgtgatct 1200

gtattcattt tgatctgtat tcattttgaa tcacaacttg cgtgcgagct gtaatagtgt 1260

gattgagtag tagtgttttt gaatgaacat gttttgttgt attgatggaa caaacaggca 1320

gcaacaacga ggattagttt ccagaagcca gctttggttt caaggactaa tctctccttc 1380

aatctaagcc gttcaatccc cactcgcctc tcagtctcct gcgcggtatg ttcttttcta 1440

acaccactct cagcatttgt ttcgagattt cttaagtttt tgtctatttt ggttttatta 1500

ggccaaacca gagacagttg agaaagtgtc taagatcgtc aagaagcagc tatcactcaa 1560

agacgatcaa aacgtcgttg cggaaaccaa atttgctgat cttggagcag attctctcga 1620

cactgtaatt caccaaatga atcactctct atgtgaatta aacaacttgt gtagtttttt 1680

ttttttttt ttttaatact gattagattg agtgttttgc atgcaggttg agatagtgat 1740

gggtttagag gaagagtttc atatcgaaat ggctgaagaa aaagcacaga agatcacaac 1800

ggtggaggaa gctgctgagc tcattgatga gctcgtgcaa gccaagaagt gacttttagt 1860

attaagagaa gaaccaaagg ctttgttgtt ttcataatct ttctgtcatt ttcttttatt 1920

atgatgtcaa gtcaagcgac tctttgctag taatctgtat gccatggatc tctctctcta 1980

tttgtcgact gaaaactttt gggttacaca tgaaagcttt ttctttttct aaaatccaaa 2040

atgaaagagt tgtattaaca gatacataag tgaaagagta gtccctaaga tgacactagc 2100

ttcatttata aacaatccta tcacattgta tatacaggtt atgatttatt cccaatcagc 2160

gtcaaagaat ccagcatctt tcatctctga atagtagaca ttctccaagt ttagatcttc 2220

ctcctcgatc aaa 2233

【図１】

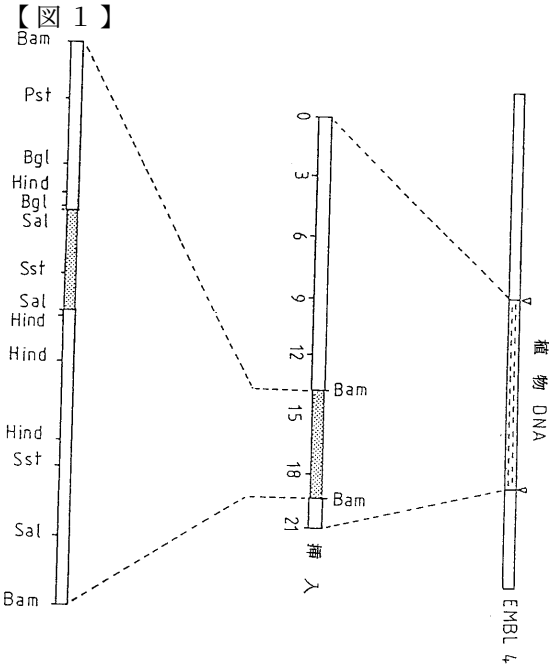


Fig. 1

【図２】

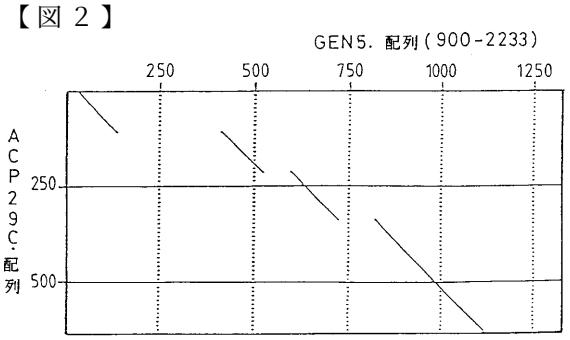


Fig. 2

【図３】

```
001                                                GTCGAC  006
                                                   SalI
CTGCAGCCAG AAGGATAAAG AAATTTTGGA CGCCTGAAGA AGAGGCAGTT  056
PstI
CTGAGGGAAG GAGTAAAAGA GTATGTCTCC TTAACTCTAC TATCAAGTTT  106

CAAGAAGCTG AGCTTGGCTC TACCTTGATA TGTTTATTGC TGTTGTGCAG  156

GTATGGTAAA TCATGGAAAG AGATAAAGAA TGCAAACCCT GAAGTATTCG  206

CAGAGAGGAC TGAGGTGAGA GAGCATGTCA CTTTTGTGTT ACTCATCTGA  256

ATTATCTTAT ATGCGAATTG TGAGTGGTAC TAAAAAAGGT TGTAACTTTT  306

GGTAGGTTGA TTTGAAGGAT AAATGGAGGA ACTTGGTTCG GTAGCCGTAA  356

CAAGTTTTTG GGAATCTCTT GGGTTTTAAA TTGCTATGGA GTTTTTTTTT  406

GCCTGCGTGA CAACATATCA TCAGCTGTTG AGAAGGAAGA TGGTATTAGA  456

AAGGGTCTTT CTTTCACATT TTGTGTTGTG GACAAATATT AAAGTCAAAT  506

GTGGCACATG GATTTTAATT CGGCCGGTAT GGTTTGGTTA AGACTGGTTT  556

AACATGTATA ATTAGTCTTT GTTTTATTTG GCTCAGCGGT TTGTTGGTGT  606

TGGTTAGGAA CTTAGGCTTG TCTCTTTCTG ATAAGATCTG ATTGGTAAGA  656
                                   BglII
TATGGGTACT GTTTGGTTTA TATGTTTTGA CTATTCAGTC ACTATGGCCC  706

CCATAAATTT TAATTCGGCT GGTATGTCTC GGTTAAGACC GGTTTGACAT  756

GGTTCATTTC AGTTCAATTA TGTGAATCTG GCACGTGATA TGTTTACCTT  806

CACACGAACA TTAGTAATGA TGGGCTAATT TAAGACTTAA CAGCCTAGAA  856

AGGCCCATCT TATTACGTAA CGACATCGTT TAGAGTGCAC CAAGCTTATA  906
                                              HindIII
AATGACGACG AGCTACCTCG GGGCATCACG CTCTTTGTAC ACTCCGCCAT  956
```

```
                                                                -51
                                                                Met
CTCTCTCTCC TTCGAGCACA GATCTCTCTC GTGAATATCG ACA ATG      1002
                    BglII
-50                 -45                 -40
Ser Thr Thr Phe Cys Ser Ser Val Ser Met Gln Ala Thr
TCG ACC ACT TTC TGC TCT TCC GTC TCC ATG CAA GCC ACT      1041
SalI
    -36
Ser Leu  1048
TCT CTG     GTATTAGAT CATTTTGCCT CTGATCTGAT TCTTGCTGTT 1086

TGTCACCGTT CAAAACTCTC GACGCATGTT TTGATTATGT TGAGAATTAG 1136

AAAAATGTTA GCTTTACGAA TCTTTAGTGA TCATTTCAAT TGGATTTGCA 1186

ATCCTGTGTG ATCTGTATTC ATTTTGATCT GTATTCATTT TGAATCACAA 1236

CTTGCGTGCG AGCTGTAATA GTGTGATTGA GTAGTAGTGT TTTTGAATGA 1286

                                        -35
                                1317    Ala Ala Thr Thr
ACATGTTTTG TTGTATTGAT GGAACAAACA G      GCA GCA ACA ACG  1329

    -30                 -25                 -20
Arg Ile Ser Phe Gln Lys Pro Ala Leu Val Ser Arg Thr
AGG ATT AGT TTC CAG AAG CCA GCT TTG GTT TCA AGG ACT      1368

            -15                 -10
Asn Leu Ser Phe Asn Leu Ser Arg Ser Ile Pro Thr Arg
AAT CTC TCC TTC AAT CTA AGC CGT TCA ATC CCC ACT CGC      1407

 -5             -1   1
Leu Ser Val Ser Cys Ala      1426
CTC TCA GTC TCC TGC GCG         G TATGTTCTTT TCTAACACCA 1446

CTCTCAGCAT TTGTTTCGAG ATTTCTTAAG TTTTTGTCTA TTTTGGTTTT 1496

          2           5                   10
 1501    Ala Lys Pro Glu Thr Val Glu Lys Val Ser Lys
ATTAG    GCC AAA CCA GAG ACA GTT GAG AAA GTG TCT AAG     1534
```

Fig. 3 (1/3)

Fig. 3 (2/3)

```
         15                  20                  25
Ile Val Lys Lys Gln Leu Ser Leu Lys Asp Asp Gln Asn
ATC GTC AAG AAG CAG CTA TCA CTC AAA GAC GAT CAA AAC     1573

                30                  35
Val Val Ala Glu Thr Lys Phe Ala Asp Leu Gly Ala Asp
GTC GTT GCG GAA ACC AAA TTT GCT GAT CTT GGA GCA GAT     1612

     40      42
Ser Leu Asp Thr 1625
TCT CTC GAC ACT    GT AATTCACCAA ATGAATCACT CTCTATGTGA 1656

ATTAAACAAC TTGTGTAGTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTAA TACTGATTAG 1706

                    43      45
                1726   Val Glu Ile Val Met Gly Leu
ATTGAGTGTT TTGCATGCAG   GTT GAG ATA GTG ATG GGT TTA     1747

 50                 55                  60
Glu Glu Glu Phe His Ile Glu Met Ala Glu Glu Lys Ala
GAG GAA GAG TTT CAT ATC GAA ATG GCT GAA GAA AAA GCA     1786

         65                  70                  75
Gln Lys Ile Thr Thr Val Glu Glu Ala Ala Glu Leu Ile
CAG AAG ATC ACA ACG GTG GAG GAA GCT GCT GAG CTC ATT     1825
                                        SstI
                80          83
Asp Glu Leu Val Gln Ala Lys Lys     ***
GAT GAG CTC GTG CAA GCC AAG AAG     TGACTTT TAGTATTAAG 1866

AGAAGAACCA AAGGCTTTGT TGTTTTCATA ATCTTTCTGT CATTTTCTTT 1916

TATTATGATG TCAAGTCAAG CGACTCTTTG CTAGTAATCT GTATGCCATG 1966

GATCTCTCTC TCTATTTGTC GACTGAAAAC TTTTGGGTTA CACATGAAAG 2016
              SalI                                HindIII
CTTTTTCTTT TTCTAAAATC CAAAATGAAA GAGTTGTATT AACAGATACA 2066

TAAGTGAAAG AGTAGTCCCT AAGATGACAC TAGCTTCATT TATAAACAAT 2116

CCTATCACAT TGTATATACA GGTTATGATT TATTCCCAAT CAGCGTCAAA 2166

GAATCCAGCA TCTTTCATCT CTGAATAGTA GACATTCTCC AAGTTTAGAT 2216

CTTCCTCCTC GATCAAA                                     2233
```

Fig. 3 (3/3)

【図４】

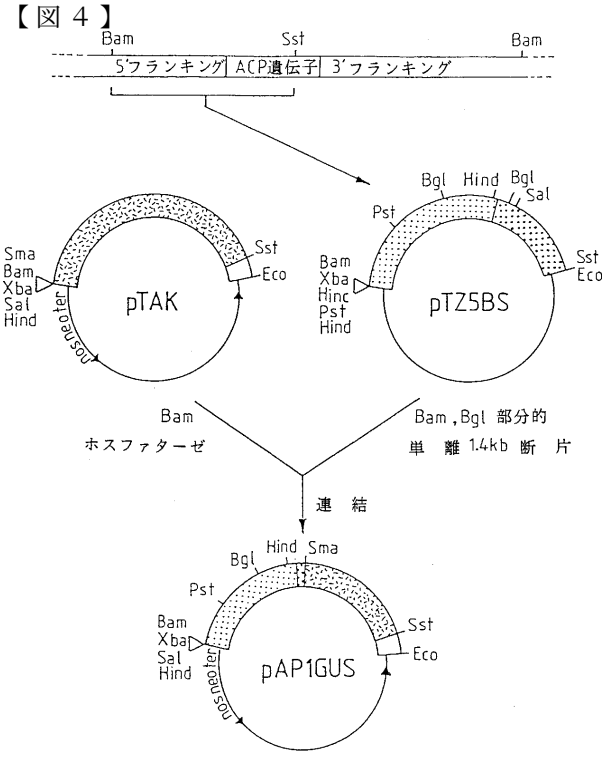


Fig. 4

【図５】

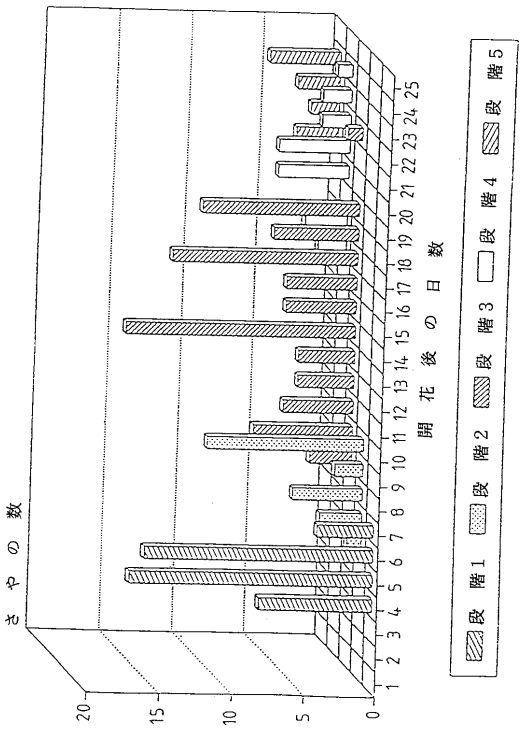


Fig. 5

【図６】

AP1GUS	葉	種子 段階１	種子段階２	種子 段階３
5	3.4	10.0	187.2	551.2
6	5.0	68.5	99.2	249.6
10	2.4	8.6	5.6	38.7
12	0.6	0.2	0.5	1.3
14	14.3	1.2	2.0	165.6
16	25.4	209.2	424.0	264.0
18	18.4	320.0	348.0	248.0
19	8.8	144.0	200.0	284.0
25	7.8	79.2	136.4	516.0
26	2.1	41.2	137.6	426.0
27	1.8	0.3	138.4	448.0
28	0.6	0.1	52.4	300.0
29	3.3	10.9	22.0	416.0
平均	7.22	68.72	134.87	300.65

cTAK	葉	種子 段階１	種子段階２	種子 段階３
3A	14.8	15.1	32.2	5.1
3B	9.6	2.6	7.0	24.4
21	24.8	12.4	5.1	18.4
23	900.0	720.0	-	176.0
平均	237.3	187.5		56.0

Fig. 6

【図７】

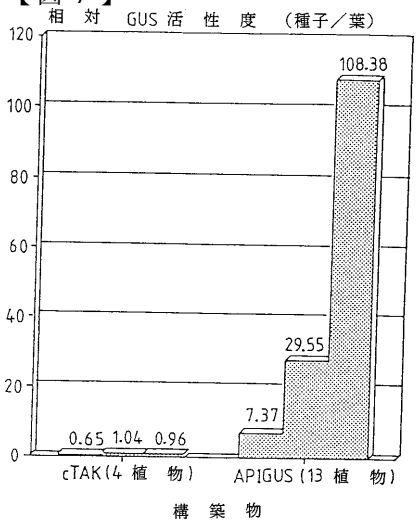


Fig. 7

【図８】

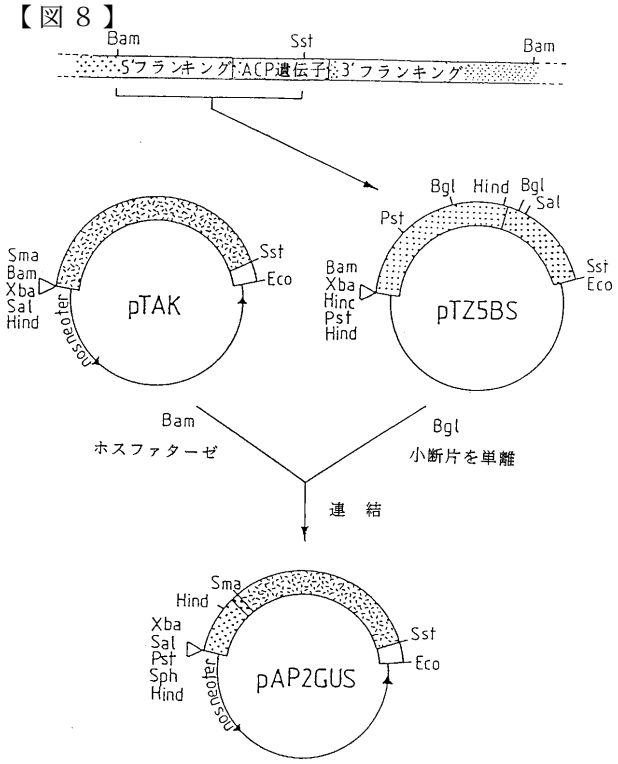


Fig. 8

【図９】

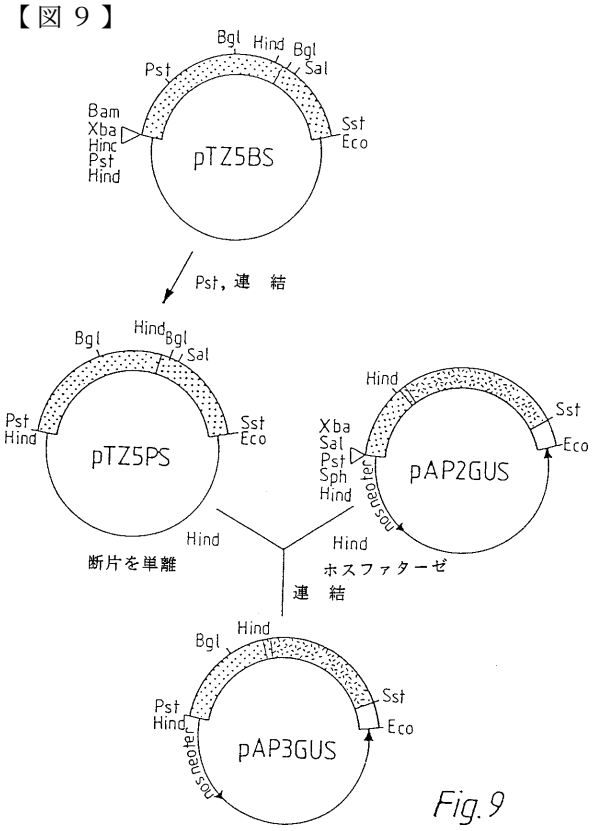


Fig. 9

【図１０】

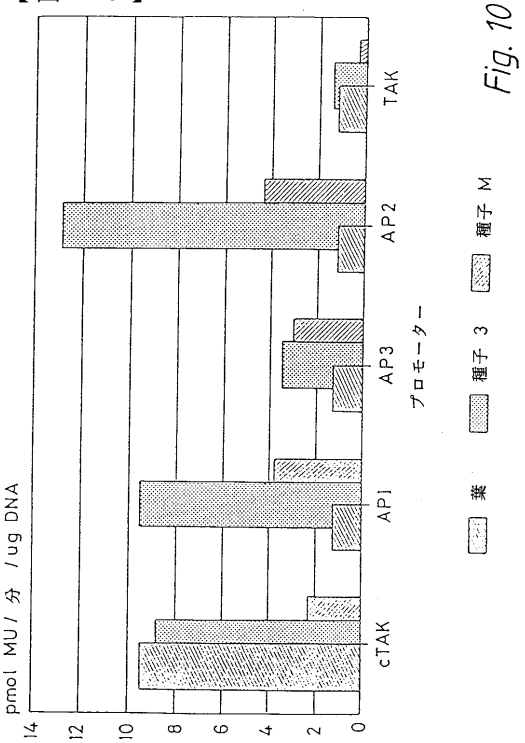


Fig. 10

【図１１】

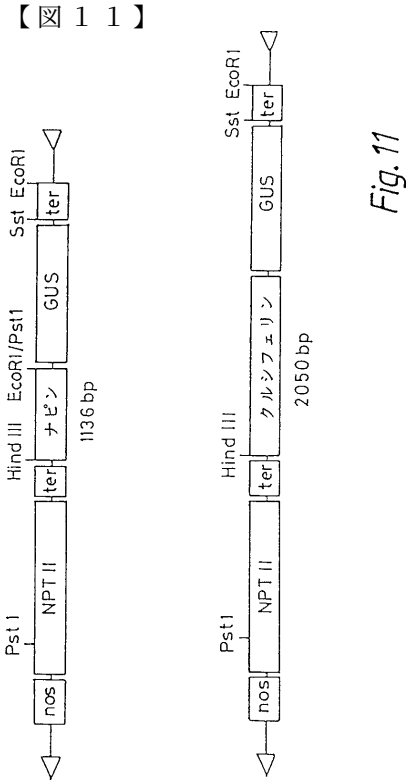


Fig. 11

【図１２】

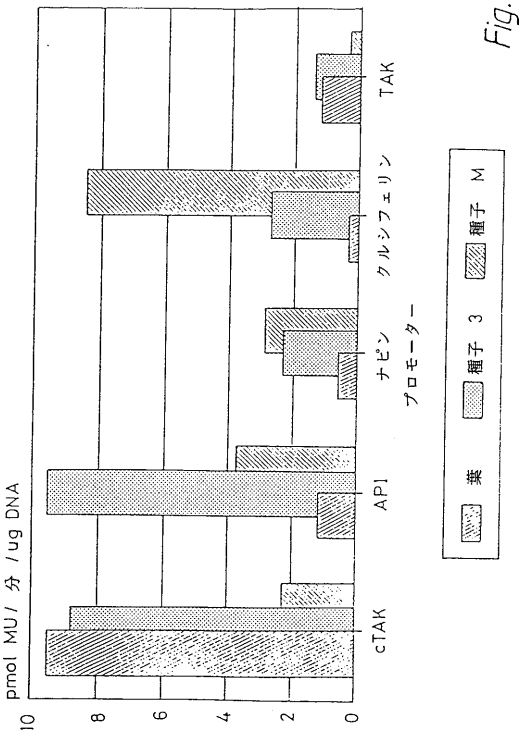


Fig. 12

【図１３】

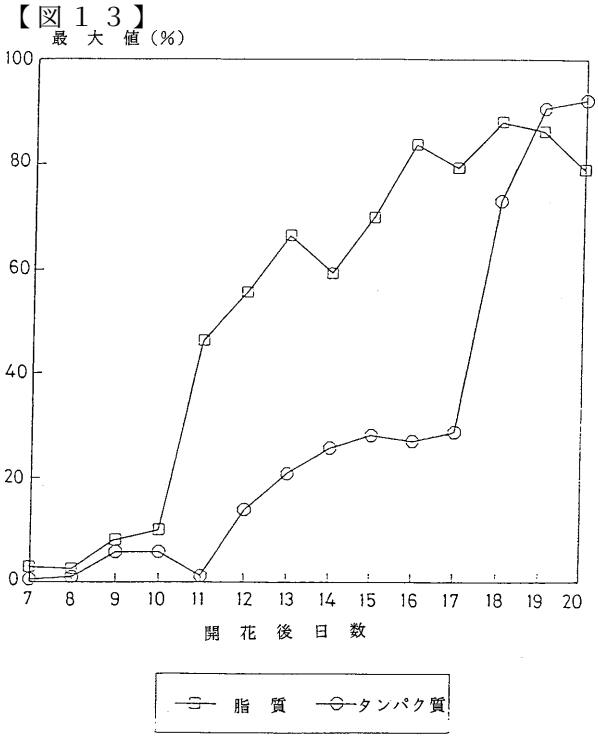


Fig. 13

【図１４】

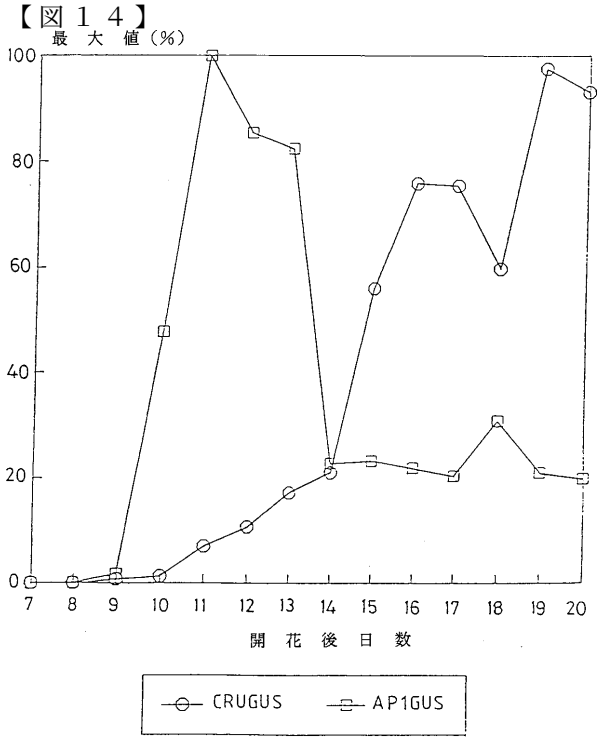


Fig. 14

【図１５】

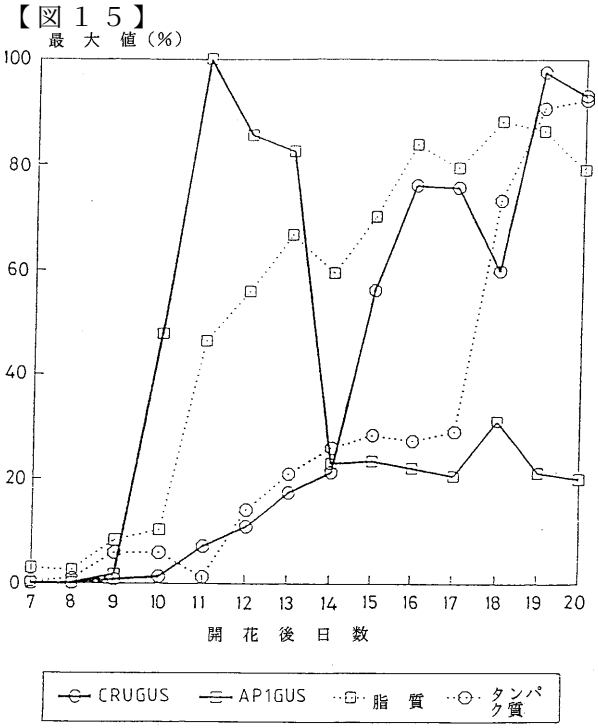


Fig. 15

【図１６】

```
CTGCAGCCAG AAGGATAAAG AAATTTTGGA CGCCTGAAGA AGAGGCAGTT    50
PstI
CTGAGGGAAG GAGTAAAAGA GTATGTCTCC TTAACTCTAC TATCAAGTTT   100
CAAGAAGCTG AGCTTGGCTC TACCTTGATA TGTTTATTGC TGTTGTGCAG   150
GTATGGTAAA TCATGGAAAG AGATAAAGAA TGCAAACCCT GAAGTATTCG   200
CAGAGAGGAC TGAGGTGAGA GAGCATGTCA CTTTTGTGTT ACTCATCTGA   250
ATTATCTTAT ATGCGAATTG TGAGTGGTAC TAAAAAAGGT TGTAACTTTT   300
GGTAGGTTGA TTTGAAGGAT AAATGGAGGA ACTTGGTTCG GTAGCCGTAA   350
CAAGTTTTTG GGAATCTCTT GGGTTTTAAA TTGCTATGGA GTTTTTTTTT   400
GCCTGCGTGA CAACATATCA TCAGCTGTTG AGAAGGAAGA TGGTATTAGA   450
AAGGGTCTTT CTTTCACATT TTGTGTTGTG GACAAATATT AAAGTCAAAT   500
GTGGCACATG GATTTTAATT CGGCCGGTAT GGTTTGGTTA AGACTGGTTT   550
AACATGTATA ATTAGTCTTT GTTTTATTTG GCTCAGCGGT TTGTTGGTGT   600
TGGTTAGGAA CTTAGGCTTG TCTCTTTCTG ATAAGATCTG ATTGGTAAGA   650
                                    BglII
TATGGGTACT GTTTGGTTTA TATGTTTTGA CTATTCAGTC ACTATGGCCC   700
CCATAAATTT TAATTCGGCT GGTATGTCTC GGTTAAGACC GGTTTGACAT   750
GGTTCATTTC AGTTCAATTA TGTGAATCTG GCACGTGATA TGTTTACCTT   800
CACACGAACA TTAGTAATGA TGGGCTAATT TAAGACTTAA CAGCCTAGAA   850
AGGCCCATCT TATTACGTAA CGACATCGTT TAGAGTGCAC CAAGCTTATA   900
                                          HindIII
AATGACGACG AGCTACCTCG GGGCATCACG CTCTTTGTAC ACTCCGCCAT   950
```

Fig. 16 (1/4)

```
                                                    -51
                                                    Met
CTCTCTCTCC TTCGAGCACA GATCTCTCTC GTGAATAACG AAA     ATG     996
                   BglII
 -50                -45                -40
 Ala Thr Thr Phe Ser Ala Ser Val Ser Met Gln Ala Thr
 GCG ACC ACT TTC AGC GCT TCA GTC TCC ATG CAA GCT ACC    1035

       -35                -30                -25
 Ser Leu Val Thr Thr Thr Arg Ile Ser Phe Gln Lys Pro
 TCT CTG GTC ACA ACA ACG AGG ATT AGT TTC CAA AAG CCA    1074

                -20                -15
 Val Leu Val Ser Asn His Gly Arg Thr Asn Leu Ser Phe
 GTT TTG GTT TCC AAC CAT GGA AGG ACT AAT CTC TCC TTC    1113

    -10                -5                -1   1
 Asn Leu Ser Arg Thr Arg Leu Ser Ile Ser Cys Ala Ala
 AAC CTA AGC CGC ACT CGC CTT TCA ATC TCT TGC GCG GCA    1152

          5                 10                15
 Glu Thr Ala Val Asn Ala Lys Ser Pro Arg Asn Glu Lys
 GAG ACA GCA GTC AAT GCT AAG AGT CCC AGG AAT GAA AAG    1191

                20                25
 Val Leu Asn Cys Leu Tyr Gln Asn Pro Asp Ala Val Phe
 GTT TTG AAC TGT TTG TAT CAA AAT CCT GAT GCA GTT TTC    1230

     30                35                40
 Lys Leu Ile Cys Phe Pro Trp Ala Gly Gly Gly Ser Ile
 AAG CTG ATC TGC TTC CCT TGG GCA GGA GGC GGC TCC ATC    1269

           45                50
 His Phe Ala Lys Trp Gly Gln Lys Ile Asn Asp Ser Leu
 CAT TTT GCC AAG TGG GGC CAA AAG ATT AAC GAC TCT CTG    1308

 55                60                65
 Glu Val His Ala Val Arg Leu Ala Gly Arg Glu Thr Arg
 GAA GTG CAT GCT GTA AGA CTG GCT GGA AGA GAA ACC CGA    1347
```

Fig. 16 (2/4)

```
                70                75                80
 Leu Gly Glu Pro Phe Ala Asn Asp Ile Tyr Gln Ile Ala
 CTT GGA GAA CCT TTC GCA AAT GAC ATC TAC CAG ATA GCT    1386

                85                90
 Asp Glu Ile Val Thr Ala Leu Leu Pro Ile Ile Gln Asp
 GAT GAA ATC GTG ACC GCC CTG TTG CCC ATC ATT CAG GAT    1425

       95                100               105
 Lys Ala Phe Ala Phe Phe Gly His Ser Phe Gly Ser Tyr
 AAA GCT TTT GCG TTT TTT GGC CAC AGT TTT GGA TCC TAC    1464

              110               115
 Thr Ala Leu Ile Thr Ala Leu Leu Leu Lys Glu Lys Tyr
 ACT GCT CTT ATT ACT GCT CTG CTC CTA AAG GAG AAA TAC    1503

 120               125               130
 Lys Met Glu Pro Leu His Ile Phe Val Ser Gly Ala Ser
 AAA ATG GAG CCG CTG CAT ATT TTT GTA TCC GGT GCA TCC    1542

          135               140               145
 Ala Pro His Ser Thr Ser Arg Pro Gln Val Pro Asp Leu
 GCC CCT CAC TCA ACA TCC CGG CCT CAA GTT CCT GAT CTT    1581

              150               155
 Asn Glu Leu Thr Glu Glu Gln Val Arg His His Leu Leu
 AAC GAA TTG ACA GAA GAA CAA GTC AGA CAT CAC CTT CTG    1620

     160               165               170
 Asp Phe Gly Gly Thr Pro Lys His Leu Ile Glu Asp Gln
 GAT TTC GGA GGC ACG CCC AAG CAT CTC ATA GAA GAC CAG    1659

          175               180
 Asp Val Leu Arg Met Phe Ile Pro Leu Leu Lys Ala Asp
 GAT GTT CTG AGG ATG TTC ATT CCT TTG CTG AAG GCA GAT    1698

 185               190               195
 Ala Gly Val Val Lys Lys Phe Ile Phe Asp Lys Pro Ser
 GCT GGC GTT GTG AAA AAA TTC ATC TTT GAC AAG CCC TCC    1737
```

Fig. 16 (3/4)

```
          200               205               210
 Lys Ala Leu Leu Ser Leu Asp Ile Thr Gly Phe Leu Gly
 AAA GCT CTT CTC TCT CTG GAC ATA ACG GGC TTC CTT GGA    1776

               215               220
 Ser Glu Asp Thr Ile Lys Asp Ile Glu Gly Trp Gln Asp
 TCT GAA GAT ACA ATA AAG GAC ATA GAA GGC TGG CAA GAC    1815

     225               230               235
 Leu Thr Ser Gly Lys Phe Asp Val His Met Leu Pro Gly
 CTA ACC AGT GGG AAG TTT GAT GTC CAC ATG CTG CCA GGC    1854

           240               245
 Asp His Phe Tyr Leu Met Lys Pro Asp Asn Glu Asn Phe
 GAC CAC TTT TAT CTG ATG AAG CCC GAC AAC GAG AAC TTT    1893

 250               255               260
 Ile Lys Asn Tyr Ile Ala Lys Cys Leu Glu Leu Ser Ser
 ATC AAG AAC TAC ATA GCC AAG TGC TTG GAA CTC TCG TCA    1932

    264
 Leu Thr ***
 CTC ACT TGA  CTACTTTTA GATGAGCTTT CTTTGGGGCT          1970

 GTGGATATGC AGACGGTTCA AAAGCTGCTC CTCTGGGTCC AGATC     2015
                                                BglII
```

Fig. 16 (4/4)

【図１７】

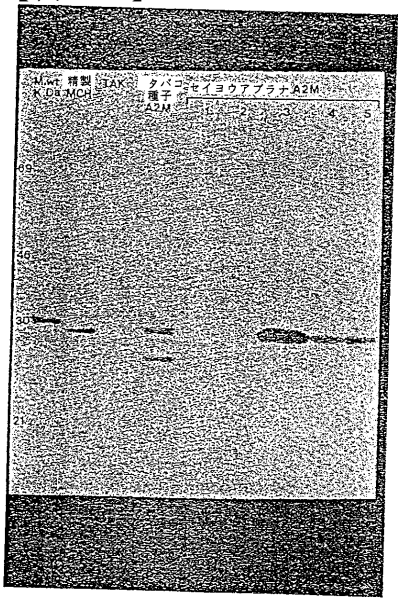


Fig. 17

【図１８】

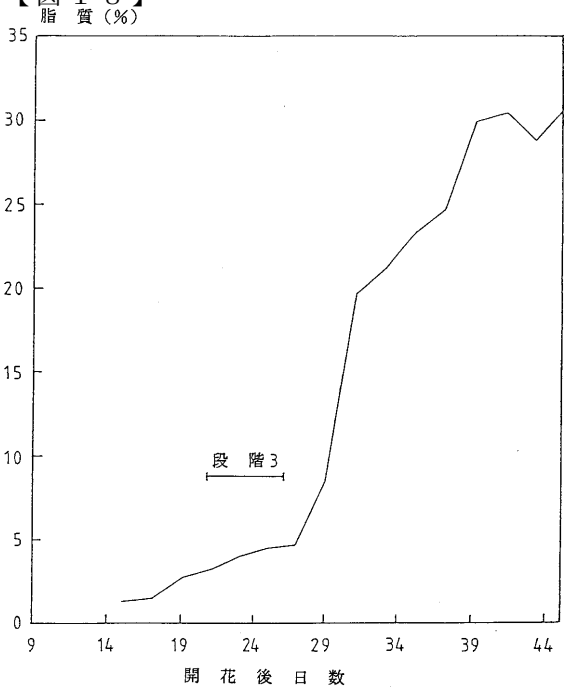


Fig. 18

フロントページの続き

(72)発明者　ドゥ・シルバ、ジャクリーン
英国、ベッドフォード・エムケイ４３・７ジェイエフ、フェルマーシャム、ティザ・バーン　１０
(72)発明者　サフォード、リチャード
英国、ベッドフォード・エムケイ４１・８アールエヌ、ファーネス・クロース　１０
(72)発明者　ヒュージス、スティーブン・グリン
英国、ケンブリッジシャー・シービー１０・２エイエル、サフロン・ウォルデン、アシュダン・ロード　７０

審査官　胡田　尚則

(56)参考文献　DE SILVA,J., ET AL., PLANT MOLECULAR BIOLOGY, １９９０年, Vol.14, p.537-548

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
C12N 15/09 ZNA
A01H 5/00
C12N 5/10
C12P 21/02
C11B 1/00