

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4010013号

(P4010013)

(45) 発行日 平成19年11月21日(2007.11.21)

(24) 登録日 平成19年9月14日(2007.9.14)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 5/04 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 F
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 C
A O 1 H 5/00 (2006.01)	A O 1 H 5/00 Z
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	A O 1 H 5/00 A
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A

請求項の数 10 (全 7 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平9-541751	(73) 特許権者	フロリモン・デブレ・ブーブ・エ・フィス
(86) (22) 出願日	平成9年5月30日(1997.5.30)		フランス国、59242カペル・アン・ブ
(65) 公表番号	特表2001-502882(P2001-502882A)		ブル、リュウ・フロリモン・デブレ、3
(43) 公表日	平成13年3月6日(2001.3.6)	(74) 代理人	弁理士 広瀬 章一
(86) 国際出願番号	PCT/FR1997/000944		
(87) 国際公開番号	W01997/045548	(72) 発明者	ドレサレ、ルイ
(87) 国際公開日	平成9年12月4日(1997.12.4)		フランス国、59242カペル・アン・ブ
審査請求日	平成16年5月27日(2004.5.27)		ブル、リュウ・ドゥ・トゥアール、1ビス
(31) 優先権主張番号	96/06725	(72) 発明者	ドルメ、シャルル
(32) 優先日	平成8年5月31日(1996.5.31)		フランス国、59242カペル・アン・ブ
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		ブル、リュウ・ラドルリエ、33

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 特異的チコリ遺伝子と雄性不稔を与えるヌクレオチド配列を含む組換え植物ゲノムおよびその用途

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

細胞質雄性不稔を示すチコリ属の植物を生産する方法であって、(a) ヘリアンツス・アヌウス orf 522配列を含む雄性不稔植物のミトコンドリアをチコリ属植物の細胞に導入すること、(b) チコリ属植物を再生すること、および(c) 一端に配列番号1のヌクレオチド配列を、他端に配列番号2のヌクレオチド配列を有する、該orf 522の347bp断片を含むチコリ属植物を同定することを含む、前記方法。

【請求項2】

チコリ属植物がシコリウム・インチブスまたはシコリウム・エンディビア由来の核を含む、請求項1記載の方法。

【請求項3】

チコリ属植物を雌性親とし、第2のチコリ属植物と交雑を行うことをさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項4】

第2のチコリ属植物が細胞質雄性不稔を示さない、請求項3記載の方法。

【請求項5】

細胞質雄性不稔を発現するチコリ属植物の細胞を生産する方法であって、(a) チコリ属植物の細胞を、細胞質雄性不稔を付与するヌクレオチド配列を含む第2の植物細胞と融合させること、ここで該ヌクレオチド配列は一端に配列番号1のヌクレオチドを他端に配列番号2のヌクレオチド配列を有する、ヘリアンツス・アヌウス orf 522の347bp断片を含み

10

20

、および (b) 該植物細胞中に347 bp断片を検出することを含む、前記方法。

【請求項6】

チコリ属植物の細胞がシコリウム・インチブスまたはシコリウム・エンディビア由来のものである、請求項5記載の方法。

【請求項7】

第2の植物細胞がヘリアンツス・アヌウス由来である、請求項5記載の方法。

【請求項8】

347 bp断片を含む融合チコリ属植物細胞から細胞質雄性不稔を有するチコリ属植物を再生することをさらに含む、請求項5記載の方法。

【請求項9】

再生したチコリ属植物を雌性親とし、第2のチコリ属植物と交雑を行うことをさらに含む、請求項8記載の方法。

【請求項10】

第2のチコリ属植物が細胞質雄性不稔を示さない、請求項9記載の方法。

【発明の詳細な説明】

本発明は、細胞質型の雄性不稔をシコリウム (Cichorium) 属の植物に付与することができるヌクレオチド配列の使用に関する。

シコリウム属は、各種のチコリおよびエンダイブといった、農食品産業で大いに興味ある植物を含んでいる。

これらは同時に雌雄の生殖系を持つ植物であり、従って自殖することができる。このような事態は、雑種を得るために別の系統の植物との交雑を行いたい場合には望ましくない。シコリウム・インチブス (Cichorium intybus) では、核性の雄性不稔を示す植物が既に提案されている。しかし、細胞質性の雄性不稔は、雑種生産に対する興味ある解決策である。

細胞質雄性不稔は、植物の雌性の親により伝えられる (母性遺伝の)、生存可能な花粉の形成を妨げる一つの特性である。高品質の雄性不稔は、その植物を雄性稔性植物と交雑させることができるように、その植物の雌性稔性に影響を及ぼしてはならない。従って、かかる安定な細胞質雄性不稔を付与する系が利用可能になることが望ましい。

また、表現型特性の全てを示す完全な植物の発育の前であっても植物細胞を選択することを可能にする、この細胞質雄性不稔の信頼できるマーカーが利用可能になることも望ましい。

よって、本発明は、特異的チコリ遺伝子と、ヒマワリ orf 522配列、または該 orf 522配列と少なくとも50%、有利には少なくとも90%の相同性を持つ配列、が持っている雄性不稔を付与するヌクレオチド配列、とを含んでいることを特徴とする、組換え植物ゲノムに関する。

orf 522配列は、ヒマワリ [ヘリアンツス (Helianthus)]、特にH.アヌウス (annuus) に現れる配列であり、細胞質雄性不稔に関与していると思われる

(Köhler et al., Mol. Gen. Genet., 1991, 227:369-376)。

本出願人は、シコリウム属植物のゲノム中にこの orf 522配列が存在すると細胞質雄性不稔に結びつくことを見出した。

本発明を実施するのに適した配列は、上記 orf 522配列、および少なくとも50%、好ましくは少なくとも80%の類似性を有する配列が持つ配列を含む。適した配列はこの orf 522配列と90%の類似性を示すのが有利であり、特に、遺伝暗号の縮重を考慮して同じタンパク質、またはあるアミノ酸が等価 (equivalent) のアミノ酸で置換されたタンパク質をコードする配列を含む。「等価のアミノ酸」とは、類似の化学的挙動および／または類似の分子量を有するアミノ酸を意味する。また、配列は、活性に必須ではない1または2以上のアミノ酸が欠失もしくは置換されているタンパク質をコードする配列も含む。

上記ゲノムは核型でもミトコンドリア型でもよい。

上記配列が核ゲノムに存在する場合、これはこの配列の翻訳産物がミトコンドリアに入ることを可能にするプレ配列をも含むであろう。

10

20

30

40

50

組換えゲノムはミトコンドリアゲノムであるのが好ましい。従って、本発明は上で定義した組換えゲノムを含むミトコンドリアにも関する。

特に、本発明は、orf 522配列またはこの断片と少なくとも90%の相同性を有する配列が持つ347bpのヌクレオチド断片を少なくとも1つ含有することを特徴とするミトコンドリアに関する。

orf 522配列

(Köhler et al., Mol. Gen. Genet., 1991)

内では、347bp配列の両端に下記配列のプライマーが存在する：

配列番号 1 : 5' CCCCCTCCCTGGTGGATCCGGCG3'

配列番号 2 : 5' CCCTCTATGAGTACCGTTCTCTCAG3'

10

本発明は、シコリウム属のゲノムを含む核および上に定義した組換えゲノムを含有することを特徴とする組換え植物細胞質、特に、ヘリアンツス・アヌウスのorf 522配列または少なくとも50%の相同性を有する配列がもつヌクレオチド配列を含むミトコンドリアを含有する細胞質に関する。

かかる細胞質を含む組換え植物細胞、特にシコリウム・インチブスおよびシコリウム・エンディビア (*Cichorium endivia*) から選ばれた種のゲノムを本質的に有する核を含む植物細胞は本発明の範囲内である。

これらの種の中で下記に示す栽培グループが挙げられるが、本発明を何ら限定するものではない：

20

シコリウム・インチブスL.:

- 「野生改良型」 チコリ類
- 「バルブ・ド・カプサン (Barbe de Capucin)」 チコリ類
- 「円錐形 (sugar loaf)」 チコリ類
- 「チオジア (Chioggia)」 チコリ類
- 「ベローナ (Verona)」 チコリ類
- 「カタロニア (Catalonia)」 チコリ類
- 「トレビソ (Treviso)」 チコリ類
- 「バリエガト・ジ・カステルフランコ (Variegato di Castelfranco)」 チコリ類
- ウィットルーフ (Witloof)」 チコリ類 (または「ブラッセルズ (Brussels)」 チコリ
- もしくは「チコン (chicon)」 チコリ)
- 「ソンチノ (Soncino)」 チコリ類
- 「工業用」 チコリ類 (焙煎用および砂糖用) — 「飼料 (fodder)」 または「嗜好用 (game)」 チコリ類

30

シコリウム・エンディビアL. : — 「スカロール (Scarole)」 エンダイブ類

— 「フリゼエ (frisée)」 エンダイブ類...

これらは巨大根チコリ類 (工業用、飼料およびWitloof) と言われるもの、またはサラダチコリ類 (緑色、赤色、まだら、促成栽培用またはそうでないもの) と言われるものである。

当業者であれば本発明を容易に、特に

40

「Génétique et Amélioration de la Ch

icorée industrielle」 (工業用チコリの遺伝および改良) DESPREZ et al., Académie d'Agriculture de France

における1994年11月30日の専門家会議No.80 (7) 48-49を参照すれば応用できる。

別の側面によれば、本発明は、ヒマワリのorf 522配列もしくはこのorf 522配列と少なくとも50%、好ましくは少なくとも90%の相同性を有する配列が持つヌクレオチド配列を、チコリ属植物の細胞ゲノムに組み込むことを特徴とする、細胞質雄性不稔を示すチコリ属の植物、またはこの植物の生殖材料 (reproduction material) の生産方法に関する。

50

また本発明は、上記方法で得られる植物を、ヘリアンツス・アヌウスのorf 522配列もしくはこのorf 522配列と少なくとも90%の相同性を有する配列をもたない同じ種の植物と交雑することを特徴とする、雑种植物の本質的に非生物学的な生産方法に関する。別の側面では本発明は、シコリウム属植物のミトコンドリア核酸をorf 522配列の少なくとも10個のヌクレオチド含む標識プローブと接触させることを特徴とする、シコリウム属植物において細胞質雄性不稔を選択する方法に関する。

本発明の他の変形や特徴は以下の実施例を読めば明らかとなるであろう。

実施例1：植物材料の調製

シコリウム・インチブス

L. cv. Pèvèle

10

の種子はFlorimond Desprezから供給され、(細胞質雄性不稔すなわちSMC)ヘリアンツス・アヌウスの種子は市販品を用いた。

シコリウム・インチブスの種子を0.1% (w/v) HgCl_2 溶液で表面滅菌し、蒸留水で3回洗浄し、ペトリ皿中の19.5mg/l Fe-EDTA、20g/l ショ糖および6g/l 寒天 (Bioakar E型) を添加したHellerの培地 (1953) (FeCl_3 無添加のマクロおよびマイクロ塩) 上に起き、Rambaud et al. (1990) により報告されている培養条件下で栽培した。次いで無菌の種苗を培養管中の同じ培地に移した。ヘリアンツス・アヌウスの種子を50g/l 次亜塩素酸カルシウム溶液で滅菌し、次いで蒸留水で3回洗浄し、ショ糖 (10g/l) / 寒天 (0.6%) 溶液中に移した。

チコリの葉を12~14日令の植物から収穫した。葉を細かく刻み、15g/l のcaylase 345、0.5g/l のcylase M2 (Cayla, Toulouse, フランス) および90g/l のマンニトールを有する溶液でインキュベーションした。

20

ヒマワリの種子に関する限り、胚軸は発芽後6~10日で取れ、同じ解離溶液でインキュベーションした。

プロトプラストを暗中で動かさずに5時間30分間インキュベーションし、50 μm -メッシュのふるいによる濾過で精製し、集めて15分間の低速の遠心分離 (100 $\times$ g) により3回洗浄した。

パストールピペットを用いて上清を除去した後、プロトプラストを1:3 (ヒマワリ/チコリ) の割合で混合し、7~11.10⁶ プロトプラスト/mlを含む懸濁液を得た。

プロトプラストを次のように変形したKaoの方法 (Wetter LRL and Constabel F (eds) Plant Tissue Culture Methods, ch 7, pp49-56, 1982) で融合させた：プロトプラスト混合物の溶液1体積をペトリ皿に入れ、10%ジメチルスルホキシド (DMSO) の30%ポリエチレングリコール (PEG 4000 Serva) 溶液の3体積を滴下した。穏やかにホモゲナイズした後、この溶液を3分間静置した。1分後、Kaoの溶液No. 3 (1982) をさらに3.5体積添加した。次いでKaoの溶液No. 3 (1982) を3.5体積添加し、3分後6 $\times$ 3.5体積の洗浄用培地 (Saksi N et al., CR Acad, Sci. Paris 302: 165-170, 1986) を添加した。10~15分後プロトプラストを遠心分離 (8分、100 $\times$ g) で集め、次いで、洗浄用培地の8ml量で3回洗浄し、MCl培地 (Saksi et al, 1986) —この培地中1-ナフチル酢酸 (NAA) の濃度は2mg/lであり、イノシトール濃度は250mg/l、 KNO_3 濃度は144mg/lである—中に再懸濁した。

30

40

この培地で1~2日培養して2.10⁴ プロトプラスト/mlの密度となった後、分離したヘテロカリオサイト (heterokaryocyte) を、2- (N-モルホリノ) エタンスルホン酸 (MES) (5mM)、カゼイン水解物 (150mg/l) およびココナットミルク (2%; V/V) を添加した修飾MCl培地 (0.5mg/l NAA) において30°Cで低密度 (12/100 μl) で培養した。

1ヵ月後、ヘテロプラズミック (heteroplasmic) プロトプラストの融合から得られたコロニーを増殖用培地、次いで再生培地 (Rambaud et al. 1990) に移した。根付いた後、植物を数週間温室に移し、次いで圃場に移植した。

得られた植物はチコリの表現型を有する。それらの中でCT 52/3と名付けた系統は葯の烈開のない雄性不稔を示し；CT 41/1は葯が完全に欠けて雄性不稔を示す。

実施例2

50

材料および方法

植物材料

FD1からFD16の番号の正常細胞質を有する工業用チコリ類の16集団、工業用チコリ

cv. Pevèle

およびFlorimond-Desprez社から提供された細胞質雄性不稔 (cms) を有する工業用チコリ (CT41/1) 20540 Uの群、チコリCT52/3 (cms)、ヒマワリcv. Mirasol (cms)。温室で育てた植物から若い葉を除き、-80℃で保存した。

DNA

全DNAミニ抽出のためのDellaporta研究所のプロトコル(Plant. Mol. Report., 1983)の適用：各工程は4℃で行った。新鮮重量で150~200mgの葉の部分を液体窒素で細かく破碎する。2mlマイクロチューブに移す。Tris-HCl 0.1 M, pH8.0, EDTA 50mM, NaCl 0.5 M, β-メルカプトエタノール10mMの緩衝液940μlを添加する。20% SDS 62μlを添加し、激しく攪拌する。65℃で15分間インキュベーションする。5 M酢酸カリウムを310μl添加し激しく攪拌する。30分間放置して沈殿させる。遠心分離。17,500 gで15分間遠心分離する。上清1 mlを2 mlのマイクロチューブに移す。イソプロパノール0.5mlを添加し混合する。15分間放置し沈殿させる。12,000 gで10分間遠心分離する。マイクロピペットを用いて上清を除く。低温に設定して10分間Speed-Vac装置でペレットを乾燥する。Tris-HCl 50 mM, pH8.0, EDTA 10mM, リボヌクレアーゼA 0.2mg/mlの緩衝液100μl中にペレットを再溶解させ、37℃で2時間インキュベーションする。フェノールで3回、次いでクロロホルムで1回抽出する。3 M酢酸ナトリウム, pH5.2の0.1体積と4℃の無水エタノール2体積を添加する。4℃で15分間放置して沈殿させる。12,000 gで10分間遠心分離する。4℃の70%エタノールでペレットを洗浄する。12,000 gで3分間遠心分離する。マイクロピペットを用いてデカントし、低温で10分間Speed-Vac装置で乾燥する。Tris/HCl 1 mM, pH8.0, EDTA 0.1mMの緩衝液中にペレットをとる。

5 μl 部分を、0.8% アガロースゲル, TBE ix, EtBr 0.5 μg/ml中で水平電気泳動により定量する。

PCR

orf 522配列

(Köhler et al., Mol. Gen. Genet., 1991)

内の347bp断片の両端にある23および26塩基の2つのプライマー。

プライマー配列：

配列番号1：5' CCCCCTCCCTGGTGGATCCGGCG3'

配列番号2：5' CCCTCTATGAGTACCGTTCTCTCAG3'

60 Bio-Medサーモサイクラーを次のように設定する：初期サイクル：3分、92℃；30サイクル：1.30秒、92℃；2.30秒、55℃；3.1分、72℃；最終サイクル：5分、72℃。反応混合物：

Appligène

緩衝液1x：Tris:HCl 10mM, pH9.0. Triton X-100 0.1%, MgCl₂ 1.5mM, BSA 0.2mg/ml; dNTP 100 μM; プライマー各0.2 μM;

Appligene Taq

Taqポリメラーゼ 2 U/100 μl; DNAマトリックス50mg/100 μl; H₂O 10 μl まで; 鉱油: 50 μl。生成物の分析は1.6%アガロースゲル、TBE 1x、EtBr 0.5 μg/ml中の水平電気泳動による。

ハイブリダイゼーション

サザン法 (「Maniatis」) による伝統的転移技術。Dig-High-Primeキット (Boehringer-Mannheim) を用いたorf 522プローブの化学標識。化学発光基質としてCSPD (Tropix) を用いたBoehringer-Mannheimのプロトコルに記載された視覚化。膜の露出時間：1時間から一晩まで (非常に弱い増幅断片の場合)。

結果

10

20

30

40

50

FD1～FD16の各集団につき4個体、20540 U群、チコリCT 52/3およびヒマワリ「Mirasol」の8個体、すなわち全部で73個体について全DNAを抽出する。DNA抽出物中に存在する不純物によるPCRの阻害がないことを、各反応混合物に数十フェムトグラムの347 bp断片を加えて確認した。52/3 DNA、ヒマワリ「Mirasol」DNAおよび20540 U群のDNAのPCR分析はすべて、orf 522の約350bp断片の実質量（約200ng）の増幅を可能にする。正常細胞質を有するチコリはすべてこの断片を持たない。Mirasolヒマワリの全DNAからPCRで調製したorf 522プローブを用いた分子ハイブリダイゼーションによるこれらのPCR産物の分析により、（cms）チコリ類中の増幅断片とプローブとの相同性を確認する。

結論

得られた結果は、orf 522が稔性チコリ類には存在しないことを実証した。従って、orf 522配列の存在/不存在のPCR法による決定は定まった分析と考えることができる。

配列表

（1）一般情報：

（i）出願人：

（A）名称：フロリモン・デプレ・ブーブ・エ・フィス

（B）通り：BP 41

（C）市：カペル・アン・プブル

（E）国：パリ

（F）郵便番号：59242

（ii）発明の名称：組換え植物ゲノム、それを含有するミトコンドリアおよび細胞、ならびにシコリウム属植物において細胞質雄性不稔を選択する方法

（iii）配列の数：2

（iv）コンピュータ読み取り可能な形態：

（A）媒体の種類：プロッピーデスク

（B）コンピュータ：IBM PC コンパティブル

（C）オペレーティングシステム：PC-DOS/MS-DOS

（D）ソフトウェア：パテントイン・リリース#1.0，バージョン#1.30（EP0）

（vi）先の出願のデータ：

（A）出願番号：FR 9606725

（B）出願日：1996年5月31日

（2）配列番号1の情報

（i）配列の特徴：

（A）配列の長さ：23塩基対

（B）配列の型：ヌクレオチド

（C）鎖の数：一本鎖

（D）トポロジー：直鎖状

（ii）配列の種類：DNA

（xi）配列：配列番号1：

CCCCCTCCCT GGTGGATCCG GCG

23

（2）配列番号2の情報

（i）配列の特徴：

（A）配列の長さ：26塩基対

（B）配列の型：ヌクレオチド

（C）鎖の数：一本鎖

（D）トポロジー：直鎖状

（ii）配列の種類：DNA

（xi）配列：配列番号2：

CCCTCTATGA GTACCGTTCT CTCACG

26

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 Q 1/68 A

(72)発明者 デブレ, ミシェル
フランス国、5 9 2 4 2 カペルーアンープブル、リュウ・フロリモン・デブレ、レ・ディアプロタ
ン (番地なし)

審査官 中村 正展

(56)参考文献 C. R. Acad. Agric. Fr., 1 9 9 4年, Vol. 80, 63-67
Theor. Appl. Genet., 1 9 9 3年, Vol. 87, 347-352
Mol. Gen. Genet., 1 9 9 1年, 227, 369-376

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A01H 1/00 - 17/00

C12N 5/00 - 5/10

C12N 15/00 - 15/90

C12Q 1/68

JSTPlus(JDream2)

PubMed

AGRICOLA/BIOSIS/CABA(STN)

CROPU/WPIDS(STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq