

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003 年 9 月 4 日 (04.09.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/072775 A1

(51) 国際特許分類: **C12N 15/09**,
A01H 13/00, C12N 15/82, 7/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP03/02112

(22) 国際出願日: 2003 年 2 月 26 日 (26.02.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2002-52885 2002 年 2 月 28 日 (28.02.2002) JP
特願 2002-374188
2002 年 12 月 25 日 (25.12.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): タカラバイオ株式会社 (TAKARA BIO INC.) [JP/JP]; 〒520-2193 滋賀県 大津市 瀬田三丁目 4 番 1 号 Shiga (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 福田 覚 (FUKUDA, Satoru) [JP/JP]; 〒041-0822 北海道 函館市 亀田港町 5 2-1 2-1 0 3 Hokkaido (JP). 嵯峨 直恒 (SAGA, Naotsune) [JP/JP]; 〒042-0935 北海道 函館市 駒場町 7-1 0 Hokkaido (JP). 大場 利治 (OHBA, Toshiharu) [JP/JP]; 〒510-0833 三重県 四日市市 中川原 1-5-1 7-4 0 4 Mie (JP). 長島 佐和子 (NAGASHIMA, Sawako) [JP/JP]; 〒520-2193 滋賀県 大津市 瀬田三丁目 4 番 1 号 タカラバイオ株式会社内 Shiga (JP). 高橋 秀一 (TAKAHASHI, Shuichi) [JP/JP]; 〒525-0025 滋賀県 草津市 西渋川 2-1 2-1-4 1 1

Shiga (JP). 浅田 起代蔵 (ASADA, Kiyozo) [JP/JP]; 〒520-3333 滋賀県 甲賀郡 甲南町 希望ヶ丘 3-2 0-9 Shiga (JP). 加藤 郁之進 (KATO, Ikunoshin) [JP/JP]; 〒611-0028 京都府 宇治市 南陵町 1-1-1 5 0 Kyoto (JP).

(74) 代理人: 青山 葆, 外 (AOYAMA, Tamotsu et al.); 〒540-0001 大阪府 大阪市 中央区 城見 1 丁目 3 番 7 号 IMP ビル 青山特許事務所 Osaka (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: ALGA-ORIGIN PROMOTER, INTRON AND TERMINATOR

(54) 発明の名称: 藻類由来プロモーター、イントロンおよびターミネーター

(57) Abstract: A promoter, an intron and a terminator by which a useful foreign gene can be efficiently expressed in algae and which are thus useful in breeding algae using genetic engineering techniques.

(57) 要約: 藻類において外来有用遺伝子を効率よく発現させ、藻類の遺伝子工学的育種に有用なプロモーター、イントロン、ターミネーター。



WO 03/072775 A1

明 細 書

藻類由来プロモーター、イントロンおよびターミネーター

5 技術分野

本発明は、遺伝子組換え技術を用いた海藻の育種や海藻の細胞を用いた工業生産に用いるための遺伝子発現用のプロモーター、ベクターに関する。

背景技術

- 10 従来、産業上有用な海藻を得るためには、海藻の収集や選抜に頼ってきた。また、交配育種法によって海藻をさらに有用なものに改変する試みも行われているが、交配選抜するには、その培養、栽培が長期におよび、また非常に手間がかかり、十分な成果は挙げられていない。

- 15 陸上植物においては、遺伝子組換えによる植物の改変が頻繁に行われ、成果があがってきている。しかしながら、海洋の大型藻類においては、遺伝子組換えによる改変はおろか、遺伝子を導入し発現させることすら成功した例は知られてない。

- 20 生体内で遺伝子を発現させる場合、その宿主に適したプロモーターが必須である。即ち、藻類で遺伝子を発現させる場合、藻類で働くプロモーターが必須である。しかしながら、現在まで、藻類に由来するプロモーターは全く知られておらず、藻類における遺伝子の発現は不可能であった。

発明の目的

- 25 本発明の目的は、上記従来技術を鑑みて行われたものであり、藻類において外来有用遺伝子を効率よく発現させ、藻類の遺伝子工学的育種に有用なプロモーター、イントロン、ターミネーターを提供するものである。

発明の概要

本発明者らは、鋭意研究した結果、広く食用に供されているスサビノリの遺伝

子を解析し、2種類のエロンゲーションファクター (e l o n g a t i o n f a c t o r ; E F) 遺伝子が生活環の全てのステージにおいて高発現していることを見出し、該遺伝子の5' 上流領域を単離し、プロモーター活性を有することを見出した。さらに、本発明者らは、現在まで未知であった1種類のE F 遺伝子のゲノムの配列をも明らかにし、該配列中にイントロン配列、ターミネーター配列を見出し、これらの配列が導入遺伝子の発現効率を上昇させる活性を有することを明らかにし、本発明を完成させた。

即ち、本発明を概説すれば、本発明の第1の発明は、下記(a)～(c)から選択されるDNAであって、かつ、藻類においてプロモーター活性を示すことを特徴とする、単離されたDNAに関する：

- (a) 配列表の配列番号9に示される塩基配列を有するDNAまたはその一部、
- (b) (a)のDNAまたはその相補鎖と厳密な条件下でハイブリダイズし得るDNA、
- (c) (a)のDNAに、1以上の塩基の置換、欠失、挿入、付加を有するDNA。

本発明の第2の発明は、下記(d)～(f)に記載のDNAから選択され、かつ、藻類における遺伝子の転写効率を上昇させる活性を示すことを特徴とする、単離されたDNAに関する：

- (d) 配列表の配列番号10に示される塩基配列を有するDNAまたはその一部、
- (e) (d)のDNAまたはその相補鎖と厳密な条件下でハイブリダイズし得るDNA、
- (f) (d)のDNAに、1以上の塩基の置換、欠失、挿入、付加を有するDNA。

本発明の第3の発明は、本発明の第1の発明の単離されたDNAの下流に隣接して、もしくは1～10000塩基のDNA断片を介した位置に、本発明の第2の発明のDNAを有し、かつ、藻類においてプロモーター活性を示すことを特徴とする、単離されたDNAに関する。本発明の第3の発明において、単離されたDNAとしては、配列表の配列番号3の87-1367番目の塩基配列が例示される。

本発明の第4の発明は、下記（g）～（i）に記載のDNAから選択され、かつ、藻類においてターミネーター活性を示すことを特徴とする、単離されたDNAに関する：

- （g）配列表の配列番号11に示される塩基配列を有するDNAまたはその一部、
- 5 （h）（g）のDNAまたはその相補鎖と厳密な条件下でハイブリダイズし得るDNA、
- （i）（g）のDNAに、1以上の塩基の置換、欠失、挿入、付加を有するDNA。

本発明の第5の発明は、本発明の第1～4の発明のいずれかのDNAに所望の遺伝子が発現可能な状態で連結されていることを特徴とする、組換えDNAに関する。本発明の第5の発明において、所望の遺伝子としては、例えばタンパク質をコードする核酸、アンチセンス核酸をコードする核酸、デコイをコードする核酸およびリボザイムをコードする核酸が例示される。

本発明の第6の発明は、本発明の第1～5の発明のDNAを含有するベクターに関する。本発明の第6の発明において、ベクターとしては、プラスミドベクターまたはウイルスベクターが例示される。

本発明の第7の発明は、本発明の第5の発明のDNAが導入された、もしくは本発明の第6の発明のベクターで形質転換された藻類に関する。

本発明の第8の発明は、下記の（j）～（l）に記載のDNAから選択され、かつ、エロンゲーションファクター（*elongation factor*）活性を有するポリペプチドをコードすることを特徴とする、単離されたDNAに関する：

- （j）配列表の配列番号1に示される塩基配列を有するDNAまたはその一部、
- （k）（j）のDNAまたはその相補鎖と厳密な条件下でハイブリダイズし得る
- 25 DNA、
- （l）（j）のDNAに、1以上の塩基の置換、欠失、挿入、付加を有するDNA。

本発明の第9の発明は、下記の（m）～（o）に記載のDNAから選択され、かつ、エロンゲーションファクター（*elongation factor*）活

性を有するポリペプチドをコードすることを特徴とする、単離されたDNAに関する：

(m) 配列表の配列番号2に示される塩基配列を有するDNAまたはその一部、

(n) (m) のDNAまたはその相補鎖と厳密な条件下でハイブリダイズし得る
5 DNA、

(o) (m) のDNAに、1以上の塩基の置換、欠失、挿入、付加を有するDNA。

本発明のプロモーター活性を示すDNA、転写効率を上昇させる活性を示すDNA、および／またはターミネーター活性を示すDNAを用いることにより、海藻の遺伝子組換え用のベクターが提供され、さらには、海藻の遺伝子組換えによ
10 って、海藻の育種の道を切り開くと同時に、その結果、新規な産業上有用な海藻を提供することができる。

また本発明は、海藻由来のエロンゲーションファクター活性を有するポリペプチドの遺伝子工学的製造を可能とするものである。

15

図面の簡単な説明

図1：A1遺伝子のアガロースゲル電気泳動の結果を示す図である。

図2：A2遺伝子のアガロースゲル電気泳動の結果を示す図である。

図3：クローンNo. 20およびクローンNo. 47のサザンハイブリダイゼーションのオートラジオグラムの結果を示す図である。
20

図4：p47GUSベクターを導入した細胞における、1週間後のインジゴチン色素の蓄積を示す図である。A：脱色前；B：脱色7日後。

発明の詳細な説明

25 以下に本発明について詳細に説明する。

本明細書でいう「プロモーター」とは、遺伝子の転写、即ちDNAを鋳型としたmRNAの合成を開始させる機能を有するDNAを意味する。本発明のプロモーターは前記機能に限定されるものではなく、転写開始点(+1)から20～30塩基対上流にあつて、RNAポリメラーゼに正確な位置から転写を開始させる

機能を担うTATAボックスまたはTATAボックス類似の領域や発現調節のために必要な他の領域を含んでいても良い。

本明細書で言う「プロモーター活性」とは、プロモーターの下流に発現可能な状態で所望の遺伝子を連結し、宿主（藻類）に導入した際、宿主内または宿主外
5 において所望の遺伝子の遺伝子産物を生産する能力および機能を有することを示す。

一般的に、プロモーターの下流に、定量が容易に行なえるタンパク質をコードする遺伝子（レポーター遺伝子）を発現可能な状態で連結させ、宿主に導入し、これらタンパク質の発現量を測定することでプロモーターの有無や強弱をプロモ
10 ーターの活性として表わす。このように、プロモーターの下流に発現可能な状態で所望の遺伝子の発現が確認された場合、そのプロモーターは導入した宿主において活性を有することになる。

本明細書で言う「イントロン」とは、遺伝子またはその転写物の内部にあって、その遺伝子から作られる最終RNA産物に含まれない配列を言う。

15 イントロンはアミノ酸配列情報を持たない塩基配列であるが、外来遺伝子を宿主に導入する際、イントロン配列を含む導入遺伝子を用いることにより、転写効率が高まり、導入遺伝子にコードされた目的のタンパク質が高生産される例がある。例えば、高等植物において知られている〔タナカ A. (Tanaka
A.) ら；ヌクレイック アシズ リサーチ (Nucleic Acids
20 Res.)、第18巻、第23号、第6767～6770頁（1990年）〕。

転写効率は、例えば転写されたRNA量をノザンハイブリダイゼーション法、RT-PCR法等の公知の方法で測定することで調べることが出来る。

本発明で言う「ターミネーター」とは、RNAの転写を終結させる活性を有するものを指す。ターミネーターは、例えば転写されたRNAのサイズをノザン
25 ハイブリダイゼーション法等の公知の方法で測定することでその存在を調べることが出来る。

本発明で言う「藻類」には特に限定はなく、例えばスサビノリ等の紅藻、コンブ、ワカメ、ヒジキ等の褐藻、アオノリ等の緑藻等、任意の真核生物に属する藻類が挙げられる。

本発明で言う「所望の遺伝子」には特に限定はなく、例えば藻類において発現可能なタンパク質をコードする核酸、アンチセンスRNAをコードする核酸、デコイをコードする核酸、リボザイムをコードする核酸等が挙げられる。

5 また、本発明に開示されたプロモーター活性を有するDNA、転写効率を上昇させる活性を有するDNA、ターミネーター活性を有するDNAと本来は機能的に連結されていない「異種の遺伝子」を本発明に使用することができる。

藻類において発現可能なタンパク質をコードする核酸としては、例えば藻類由来のものが挙げられるが、本発明においてはこれに限定にされるものではなく、藻類において発現可能であれば、細菌類；酵母類；放線菌類；糸状菌類；子囊菌類；担子菌類等の微生物由来、植物由来、動物由来、またはウイルス由来の核酸も、本明細書で言う所望の遺伝子に含まれる。前記タンパク質をコードする核酸としては、酵素、レセプター、サイトカイン類、成長因子、遺伝子発現やその制御に関連する因子類、構造タンパク質等をコードする核酸が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

15 本発明のプロモーター活性を有するDNA（以下、プロモーターと記載する）は、藻類においてプロモーター活性を有するものであり、例えば、スサビノリ（*Porphyra yezoensis* Ueda）由来EF1- α A2遺伝子のプロモーター、例えば、配列表の配列番号3に示される塩基配列において、87～859番目の塩基配列、すなわち配列表の配列番号9に記載の塩基配列を有するDNAまたはその一部を含むDNAが挙げられる。即ち、本発明

20 のプロモーターは、藻類においてプロモーター活性を有する範囲において、配列表の配列番号9に示される塩基配列中のいかなるDNAであってもよい。

また、これらのDNAまたはその相補鎖と厳密な条件下でハイブリダイズすることができるDNAであって、藻類においてプロモーター活性を有するものも、

25 本発明のプロモーターに含まれる。ハイブリダイゼーションは公知の方法、例えば、1989年、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー発行、T. マニアティス（T. Maniatis）ら編集、モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリー・マニュアル第2版（*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed.）に記載の方法によ

り実施することが出来る。上記の厳密な条件としては、例えば、 $6\times\text{SSC}$
($1\times\text{SSC}$ の組成： 150mM 塩化ナトリウム、 15mM クエン酸3ナ
トリウム二水和物、 $\text{pH}7.0$)、 0.5% SDS、 $5\times$ デンハルト (Den
hardt's)、 100mg/ml ニシン精子DNAを含む溶液中、プロ
5 ブとともに 65°C で一晩保温するという条件が挙げられる。

さらに、これらのDNAに1以上の塩基の置換、欠失、挿入、付加を有するDNAであって、かつ、藻類においてプロモーター活性を有するDNAも本発明のプロモーターに含まれる。

本発明のプロモーターの下流に所望の遺伝子を発現可能な状態で連結した組換えDNAを藻類に導入することにより、藻類において所望の遺伝子を発現させることができる。このことは、藻類の遺伝子工学的育種、藻類を宿主とした有用物質の生産等を可能とするものである。

本発明の藻類における転写効率を上昇させる活性を有するDNAは、例えば、スサビノリ由来EF1- α A2遺伝子のイントロン、例えば、配列表
15 の配列番号3に示される塩基配列において、878～1331番目の塩基配列、すなわち配列表の配列番号10の塩基配列を有するDNAまたはその一部を含むものが挙げられる。即ち、前記の本発明のDNAは、藻類において転写効率を上昇させる活性を有する範囲において、配列表の配列番号10に示される塩基配列中のいかなるDNAであってもよい。

20 また、これらのDNA断片またはその相補鎖と厳密な条件下でハイブリダイズすることができるDNAであって、藻類における転写効率を上昇させる活性を有するものも、本発明のDNAに含まれる。ハイブリダイゼーションの条件は、例えば、前記のものが挙げられる。

さらに、これらのDNAに1以上の塩基の置換、欠失、挿入、付加を有するDNA
25 NAであって、かつ、藻類における転写効率を上昇させる活性を示すDNAも本発明の転写効率を上昇させる活性を有するDNAに含まれる。

上記した本発明のプロモーター活性を有するDNAと所望の遺伝子を発現可能な状態で連結した組換えDNAに、さらに本発明の藻類における転写効率を上昇させる活性を有するDNAを適当な位置に挿入することにより、転写効率を上昇

させることが出来る。ここで、適当な位置としては、例えばプロモーター活性を有するDNAの下流に隣接する、もしくは1～10000塩基のDNA断片を介した位置が例示される。

5 本発明のターミネーター活性を有するDNA（以下、ターミネーターと記載する）は、藻類においてターミネーター活性を有するものであり、例えば、スサビノリ由来EF1- α A2遺伝子のターミネーター、例えば、配列表の配列番号3に示される塩基配列において、2718～3764番目の塩基配列、すなわち配列表の配列番号11の塩基配列を有するDNAまたはその一部を含むものが挙げられる。即ち、本発明のDNAは、配列表の配列番号11に示される
10 塩基配列中のいかなるDNAであつてもよい。

また、これらのDNA断片またはその相補鎖と厳密な条件下でハイブリダイズすることができるDNAであつて、藻類においてターミネーター活性を有するものも、本発明のターミネーターに含まれる。ハイブリダイゼーションの条件は、例えば、前記のものが挙げられる。

15 さらに、これらのDNAに1以上の塩基の置換、欠失、挿入、付加を有するDNAであつて、かつ、藻類においてターミネーター活性を有するDNAも本発明のターミネーターに含まれる。

上記した本発明のプロモーター活性を有するDNAと所望の遺伝子を発現可能な状態で連結した組換えDNAの下流に、さらに本発明のターミネーター活性を
20 有する断片を連結することにより、所望の遺伝子の発現効率を上昇させることが出来る。また、所望により、さらに本発明の藻類における遺伝子の転写効率を上昇させる活性を示すDNAを導入することにより、さらに所望の遺伝子の発現効率を上昇させることができる。

25 本発明のエロンゲーションファクター（*elongation factor*）活性を有するポリペプチドをコードするDNA（以下、EF遺伝子と記載する）としては、例えば、配列表の配列番号1に示される塩基配列を有するDNAまたはその一部、配列表の配列番号2に示される塩基配列を有するDNAまたはその一部、配列表の配列番号3に示される塩基配列を有するDNAまたはその一部、あるいは配列表の配列番号8に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド

又はその一部をコードするDNAが挙げられる。好適な本発明のEF遺伝子の例としては、配列表の配列番号1に示される塩基配列の79～1425番目の塩基配列を有するDNA、配列表の配列番号2に示される塩基配列の65～1401番目の塩基配列を有するDNAが挙げられる。また、配列表の配列番号3に示される塩基配列の1368～2714番目の塩基配列を有するDNAが挙げられる。

5 さらに、配列表の配列番号8に示されるアミノ酸配列中のいかなるポリペプチドをコードするDNAであっても良い。

また、これらのDNA断片またはその相補鎖と厳密な条件下でハイブリダイズすることができるDNAであって、EF活性を有するポリペプチドをコードするものも、本発明のDNAに含まれる。ハイブリダイゼーションの条件は、例えば、前記のものが挙げられる。

10

さらに、これらのDNAに1以上の塩基の置換、欠失、挿入、付加を有するDNAであって、かつ、EF活性を有するポリペプチドをコードするものも本発明のEF活性を有するポリペプチドをコードするDNAに含まれる。

15 これらのDNAまたはその相補鎖と厳密な条件下でハイブリダイズすることができるDNA、またはこれらのDNAに1以上の塩基の置換、欠失、挿入、付加を有するDNAとしては、上記したDNAと例えば90%以上、好ましくは95%以上、さらに好ましくは97%を超える相同性を有するDNAが挙げられる。

なおEF活性は、例えば、シャラク V. F. (Shalak V. F.) ら; ウクラインスキー ビオヒミチュスキー ジュルナル (Ukr. Biokhim. Zh.)、第69巻、第104～109頁(1997年)に記載の方法で測定することができる。

20

本発明のプロモーターと、藻類における転写効率を上昇させる活性を有するDNA、あるいはターミネーター活性を有するDNAをそれぞれ単独でもしくは組合わせて所望の遺伝子を発現可能な状態で連結した組換えDNAは、ベクターを介してあるいはベクターを介さずに藻類に導入することができる。ベクターとしては、プラスミドベクターまたはウイルスベクターが好適に使用される。

25

DNAが導入される藻類の形態に特に限定はなく、糸状体、孢子、葉状体、培養細胞、プロトプラスト等、任意の形態の藻類を用いることが出来る。

藻類へのDNAの導入方法に特に限定はなく、公知の方法、例えばパーティクルガンによる導入方法が使用される。

本発明のプロモーターは、例えば、スサビノリより、以下のようにして単離することが出来る。

5 スサビノリ (*Porphyra yezoensis* Ueda) は、紅藻植物門 (*Rhodophyta*) 紅藻綱 (*Rhodophyceae*) 原始紅藻亜綱 (*Protofloridae*) ウシケノリ目 (*Bangiales*) ウシケノリ科 (*Bangiaceae*) に属する海藻であり、北海道西部、南部、本州北部、および朝鮮半島などに自生している。

10 このスサビノリは広く食用に供されている海藻であり、盛んに養殖されており、広く市販されている。本発明の目的には、海中で自生しているものを採取したもの、養殖されているもの、あるいは市販されているもののいずれも使用することが出来る。また、公知の方法〔クワノ K. (*Kuwano K.*) ；プラン
15 トサイエンス (*Plant Sci.*)、第116巻、第1集、第117～124頁 (1996年)〕によって株化されたものも同様に本発明の目的に使用される。

＜プロモーターを単離するための候補遺伝子の選定＞

20 外来遺伝子を高発現させるための遺伝子発現プロモーターを発見するためには、宿主海藻において高発現している遺伝子を知り、そのゲノム配列を単離し、その構造を解析する必要がある。

 スサビノリのEST配列 (*expressed sequence tag*) は、かずさDNA研究所のホームページ [<http://www.kazusa.or.jp/en/plant/porphyra/EST/>] にて公開されている。

25 この配列情報をもとにESTクラスタリング解析 (*EST clustering analysis*) を、例えばPARACEL CLUSTERING PACKAGEソフトウェア (パラセル社製) を用いて行なう。クラスタリング解析の結果、同一クラスに属するEST配列の数が多いものが、高発現している可能性のある遺伝子と考えられるので、それらの遺伝子のプロモーターを単離

するための配列の候補とすることが出来る。

例えば、その中の2つの遺伝子〔*Porphyra yezoensis* elongation factor EF1- α A1 遺伝子および *Porphyra yezoensis* elongation factor EF1- α A2 遺伝子（本明細書では以下それぞれA1 遺伝子、A2 遺伝子と呼ぶ）〕を選び、本発明のプロモーターを単離するための材料とすることが出来る。

上記候補遺伝子の cDNA のクローニングは、上記クラスタリング解析において選定された候補遺伝子が属するクラスタに含まれる EST 配列、アセンブル (assemble) してできたコンセンサス配列 (consensus sequence) またはそれらの一部をプローブとして行なうことが出来る。例えば、A1 遺伝子に属する EST 配列をアセンブルしてできたコンセンサス配列からプライマーを設計し、このプライマーを使用した PCR で増幅した A1 遺伝子断片をプローブとして用いて行なうことが出来る。

このようにして、本発明において単離された新規候補遺伝子の cDNA の一例が配列表の配列番号 1 に示される A1 遺伝子の cDNA である。

<海藻のすべての生活環で高発現している遺伝子か否かの確認>

候補遺伝子が海藻のすべての生活環で高発現している遺伝子か否かの確認は、海藻の生活環のさまざまなステージにおける mRNA の発現量を、候補遺伝子の DNA 配列をプローブに用いたノーザンハイブリダイゼーションで測定することにより調べることができる。

海藻の組織から全 RNA を抽出するには、公知の方法、例えば、グアニジンチオシアネート法やフェノール／クロロホルム法などが用いられる。このように抽出された全 RNA を、目的の mRNA の発現量を測定するために使用することが出来る。

例えば、海藻スサビノリの生活環ステージのうち、

- (1) 単孢子未形成ステージ、
- (2) 単孢子形成ステージ、
- (3) 単孢子形成後の栄養成長配偶体ステージ、

(4) 糸状体ステージ、

からそれぞれ改変フェノール／クロロホルム法を用いて、全RNAを抽出して、アガロースゲル電気泳動を行った後、候補遺伝子のDNAをプローブにしてノザンハイブリダイゼーションを行うことができる。

- 5 また、別の方法としてRT-PCRによっても発現様式を解析することができる。この場合、特異的なプライマーを設計することにより、より厳密にファミリー遺伝子と区別した解析が可能である。

10 例えば、候補遺伝子のcDNAの非翻訳領域にプライマーと翻訳領域内のプライマーを用いて、上記の各ステージから、例えば、グアニジンチオシアネート法を用いて抽出した全RNAを鋳型にして、TaKaRa RNA PCR Kit Ver. 2. 1 (宝酒造社製) 等を用いてRT-PCRを行い、各ステージにおける遺伝子の発現量を測定することができる。

このようにして、各ステージの海藻で高発現している遺伝子を探し出すことができる。

- 15 <プロモーターを含有する領域のクローニング>

上記のようにして選択された各ステージで高発現している遺伝子のプロモーターを含有する領域は、例えば、ゲノムライブラリーより該遺伝子のゲノムDNAをスクリーニングすることにより単離することが出来る。

20 海藻で高発現する遺伝子のプロモーターのクローニングは、ゲノムライブラリーを用いたプラークハイブリダイゼーション法、ゲノムDNAと既知の配列をもとに未知の配列を増幅するPCR法などがあるが、これらに限定されるわけではない。

25 本発明において単離された、配列表の配列番号3に示される新規なelongation factor EF1- α A2遺伝子を含むゲノムDNA断片は、各ステージで高発現している遺伝子の一例である。このA2遺伝子(配列番号3)と配列番号1のcDNAおよびクラスタリング解析したEST配列を比較すること、転写因子検索、コード領域検索、イントロン・エキソン検索をすることにより、この配列には、プロモーター配列、イントロン配列、ターミネーター配列が含まれることがわかった。

即ち、配列表の配列番号3に示される塩基配列は、e l o n g a t i o n f a c t o r E F 1 - a l p h a A 2 遺伝子のゲノムの全長をカバーする配列であり、該配列中の1 3 6 8 ~ 2 7 1 7 番目の塩基配列がA 2 ポリペプチドをコードする配列（終止コドンを含む）、8 7 8 ~ 1 3 3 1 番目の塩基配列が第1イントロン配列、1 ~ 8 5 9 番目の塩基配列がプロモーター配列、2 7 1 8 ~ 3 7 6 4 番目の塩基配列がターミネーター配列である。

また、この配列番号3で表される塩基配列と配列番号1のcDNAおよびクラスティング解析したEST配列を比較することにより、A 2 遺伝子のcDNA配列が明らかとなった。該配列を配列表の配列番号2に示す。該配列中、配列表の配列番号3の塩基配列に含有されている領域がE F 1 - a l p h a A 2 遺伝子のエキソン領域である。

本発明で単離された上記のプロモーターは、藻類においてプロモーター活性を有するDNAであり、所望の遺伝子を藻類において発現させるために使用することが出来る。また、該配列に厳密な条件下でハイブリダイズし、プロモーター活性を有するDNA、該配列にプロモーター活性を失わない範囲で塩基の置換、欠失、挿入、付加がなされたDNAも上記目的のために使用することが出来る。

本発明で単離された上記のターミネーターは、藻類においてターミネーター活性を有するDNAであり、所望の遺伝子を藻類において発現させる際、その発現効率を上昇させる目的で使用することが出来る。また、該配列に厳密な条件下でハイブリダイズし、ターミネーター活性を有するDNA、該配列にターミネーター活性を失わない範囲で塩基の置換、欠失、挿入、付加がなされたDNAも上記目的のために使用することが出来る。

高等植物では、イントロン配列を含む導入遺伝子を使うことにより転写効率が高まり導入遺伝子の目的タンパクが高生産される例が知られている。本発明で単離された上記第1イントロンは、所望の遺伝子を藻類において発現させる際、その転写効率を上昇させる目的で使用することが出来る。また、前記の転写効率上昇活性を有するものであれば、該配列に厳密な条件下でハイブリダイズするDNA、該配列に塩基の置換、欠失、挿入、付加がなされたDNAも上記目的のために使用することが出来る。

本発明で単離された上記エキソン領域は、藻類の新規なエロンゲーションファクター（EF）であるEF 1-a l p h a A 2ポリペプチドをコードする配列である。該配列はEF 1-a l p h a A 2ポリペプチドの遺伝子工学的生産に使用でき、また、さらに新規なEF遺伝子のスクリーニング、特に藻類由来の新規EF遺伝子のスクリーニングのプロープ、プライマーとして使用できる。

本願明細書に開示された本発明のDNAは、上記のようにして単離することが出来る。また本明細書に開示された配列情報をもとに化学的に合成することも出来る。

本発明で、藻類においてプロモーター活性を有するDNAが初めて単離されたことにより、現在まで全く不可能であった、藻類での所望の遺伝子的人為的な発現が初めて可能となった。さらに、藻類由来のターミネーター活性を有するDNA、イントロンが初めて単離されたことにより、藻類での所望の遺伝子の発現の効率を高めることも可能となった。このことは、藻類における有用物質の遺伝子工学的生産を可能とするのみならず、従来、甚だ効率の悪い交配法に頼るしかなかった藻類の育種を、遺伝子工学的に効率よく行なうことをも可能にするものである。

本発明で、藻類由来の新規エロンゲーションファクター遺伝子が初めて単離されたことにより、現在まで採取あるいは培養した藻類からしか取得することが出来なかった藻類由来のエロンゲーションファクターを遺伝子工学的に生産することが可能となった。

実施例

以下に実施例をもって本発明を示すが、本発明はこれらの実施例の範囲のみに限定されるものではない。

25 実施例1 スサビノリの各ステージからのmRNAの調製

1. 材料

クワノ K. (K u w a n o K.) ら [プラントサイエンス (P l a n t S c i.)、第116巻、第1集、第117~124頁 (1996年)] により確立された、スサビノリの純系株である、P o r p h y r a y e z o e n s i

s Ueda TU-1株の葉状体の配偶子および糸状の孢子体を用いた。

2. 培養条件

葉状体の配偶子は15℃、10時間明期〔光量80 μ E / ($m^2 \cdot s$) ; 白色
5 蛍光灯〕、14時間暗期のもと、ESL培地〔3.5% (w/v) SEALIFE
E power (マリン テック (Marine Tech) 社製)、1% (v
/v) ESS₂〕の入ったガラス製の1リットル容枝付き平底フラスコ (パイレ
ックス (PYREX) 社製) 中で通気 (フィルター濾過滅菌した空気、0.12
リットル/min) し、還流浮遊状態で培養した。

糸状の孢子体は25℃、24時間明期〔光量17 μ E / ($m^2 \cdot s$) ; 白色蛍
10 光灯〕のもと、ESL培地の入ったガラス製の500ml容三角フラスコ中で静
置培養した。

3. 全RNA抽出

スサビノリTU-1株の各ステージの全RNAは、単孢子が未形成で葉長1~
2mmの葉状の配偶体、単孢子の放出の誘導を30分間かけた葉長2mmの葉状
15 の配偶体、葉長1~2cmの葉状の配偶体、および糸状の孢子体からそれぞれ抽
出した。

全RNAの抽出は、アプト K. E. (Apt K. E.) らのフェノー
ル/クロロホルム法を一部改変して行った〔モレキュラー アンド ジェネラル
ジェネティクス (Mol. Gen. Genet.)、第246巻、第4号、
20 第455~464頁 (1995年)〕。

藻体から全RNAを抽出する手順を以下に示す。

培養した藻体の水分を紙タオルで除いた後、重量を測定した。1.2gの藻体
を液体窒素中で乳鉢と乳棒を用いて破碎し、液体窒素で予冷した葉さじを用いて、
16.8mlの抽出バッファー〔100mM Tris-HCl (pH 8.
25 0)、1.5M NaCl、20mM EDTA、20mM DTT (ジチオト
レイトール)、2%CTAB (セチルトリメチルアンモニウムブロミド)〕を入
れた50ml容の遠沈管に移した。これを振盪機 (NR-1、タイテック (TA
ITEC) 社製) を用いて110rpm/min、室温で15分間混合した後、
等量のクロロホルムを加えて攪拌した。

この混合液を遠心して上層を集め、ここに1/3量のエタノールを一滴ずつゆっくりと加え混合した。これを遠心して沈澱（主に多糖類が含まれている。）を除去した後、上清に等量のクロロホルムを加えて攪拌した。これを遠心して上清を集めた。この操作を上清の色が抜けるまで繰り返した。

- 5 上清を回収し、上清の1/2量の9M LiClと上清の1/100量のβ-メルカプトエタノールを加え混合し、-20℃で一晩静置した。生じた沈澱を遠心分離により回収し、沈澱を50μlのDEPC（ジエチルピロカーボネート）処理水に溶かして、等量のフェノール/クロロホルム（1：1）による抽出を行なった。この抽出操作を中間層がなくなるまで繰り返した。

- 10 上層を回収し、上層の1/10量の3M 酢酸ナトリウムと2倍量のエタノールを加え混合した。生じた沈澱を遠心分離により回収し、75%エタノールでリンスした後、風乾した。

- 15 沈澱物を90μlのDEPC処理水に溶かし、これに1mlのISOGEN（和光純薬社製）を加えて混合した後、5分間室温で保持した。これに0.2mlのクロロホルムを加えて攪拌した後、2～3分間室温で保持した。

これを遠心分離し、得られた上清に0.5mlのイソプロパノールを加え、生じた沈澱を遠心分離により回収した。沈澱を75%エタノールでリンスした後、風乾し、400μlのDEPC処理水に溶かした。

- 20 さらに、残存している多糖類を除くため、200μlの高塩沈澱溶液（1.2M NaCl、0.8M クエン酸3ナトリウム二水和物、pH未調整）ならびに200μlのイソプロパノールを加え、遠心した。得られた沈澱を75%エタノールでリンスした後、風乾し、100μlのDEPC処理水に溶かした。

- 25 このようにして抽出された全RNAの濃度および純度は、分光光度計（UV-2200、島津製作所製）により測定した。また、1.0%アガロースゲルで電気泳動し、全RNAが分解されていないことを確認した。

mRNAは、上記の方法で抽出された全RNAからOligotexTM-dT30 super（ロシュ（Roche）社製）を用いて分離した。操作手順は付属の説明書に従った。

実施例2 スサビノリEST配列のクラスタリング解析

解析に用いるスサビノリEST配列は、かずさDNA研究所のホームページ
[http://www.kazusa.or.jp/en/plant/po
rphyra/EST/]よりダウンロードした。ダウンロードしたスサビノリ
EST配列の全10154配列について、パラセル社のPARACEL CLU
5 STERING PACKAGEを用いて、配列のクラスタリングを行った。

その結果、8243個の配列が1140のクラスタに分類された。また、どの
クラスタにも属さない配列が1911個あった。

以下の表1～4に、各クラスタに属する配列の数が多い上位50位のクラスタ
ID (cluster ID) をリスト化したものを示す。同一のクラスタに属
10 する配列の数 (sequence count) が多いほど高発現の遺伝子と考
えられる。

さらに、各クラスタに属する配列をアセンブルしてできたコンティグ (Con
t ig) のコンセンサス配列をNCBI (National Center f
or Biotechnology Information) [http://
15 /www.ncbi.nih.gov/] のヌクレオチドデータベース (non-
redundantな核酸のデータベース) に対して、BLASTプログラム
[アルトシュル S. F. (Altschul S. F.) ら;ヌクレイッ
ク アシヅ リサーチ (Nucleic Acids Res.)、第25巻、
第17号、第3389～3402頁 (1997年)] にて、ホモロジー検索を行
20 った。

その結果のうち、各クラスタのコンティグ (Cont ig) がもっとも高いス
コアでヒットしたコンティグID (cont ig ID)、配列の数 (sequ
ence count) およびヒットしたGenBank登録番号 (GenBa
nk accession No) を、表1～4のCont ig ID、Seq
25 uence Count、GenBank Accession Noの欄に番
号 (No) とともに示す。また、その時のスコア (Score) とE値 (E
value) を、表1～4のScore、E valueの欄に示す。

表1 スサビノリ E S T 配列のクラスタリング

No	Cluster ID	Sequence Count	Contig ID	GenBank Accession No	Score	E value
1	145	687	3	X60733.1	220	8.00E-55
2	13	500	5	L26199.1	3495	0
3	0	394	3	X57263.1	163	8.00E-38
4	40	131	1	U65510.1	42	0.041
5	17	113	B1	D10167.1	42	0.21
6	72	90	1	AC003030.1	42	0.47
7	16	80	1	NM_003654.1	48	0.006
8	107	76	1	M72894.1	48	0.005
9	261	75	1	AC006214.1	44	0.075
10	25	60	1	Y00545.1	42	0.11
11	284	58	2	Z79601.1	40	0.94
12	459	57	1	U77477.1	46	0.019
13	38	49	1	AL009198.1	42	0.28
14	4	47	1	AJ012146.1	38	4.3

表2 スサビノリ E S T 配列のクラスタリング (つづき 1)

No	Cluster ID	Sequence Count	Contig ID	GenBank Accession No	Score	E value
15	189	47	1	X62072.1	46	0.027
16	74	46	1	AC004476.1	48	0.002
17	334	41	1	AB025619.1	44	0.052
18	120	40	1	AL008728.1	44	0.037
19	291	38	1	AF080121.1	488	E-135
20	350	38	2	D86993.1	40	0.94
21	508	38	1	AC006213.1	42	0.18
22	5	37	1	M11779.1	42	0.28
23	114	37	1	AF034863.1	40	0.96
24	401	35	1	AB025615.1	42	0.33
25	97	32	1	M88684.1	551	E-155
26	515	32	1	AL021707.2	42	0.32
27	56	31	1	X97257.1	44	0.047
28	676	31	1	Z98747.1	42	0.2
29	320	30	1	Z79702.1	40	0.98
30	369	30	1	D86051.1	58	2.00E-06

表3 スサビノリEST配列のクラスタリング (つづき2)

No	Cluster ID	Sequence Count	Contig ID	GenBank Accession No	Score	E value
31	700	30	1	AB005232.1	44	0.043
32	9	29	1	U08844.1	1889	0
33	348	29	1	U58679.1	74	5.00E-11
34	812	29	1	AF071752.1	50	8.00E-04
35	14	28	1	AC005615.1	42	0.62
36	251	28	1	AF064842.1	46	0.024
37	383	28	1	AJ012478.1	220	4.00E-55
38	806	28	1	AF117660.1	40	0.75
39	122	27	1	NM_003330.1	40	1
40	321	26	1	X61361.1	42	0.19
41	564	26	1	AB022100.1	40	0.83
42	132	25	1	AF055296.1	64	9.00E-08
43	279	25	1	U13168.1	86	2.00E-14
44	382	25	1	M74056.1	42	0.32
45	140	24	1	D38516.1	188	2.00E-45
46	451	24	1	X80345.1	593	E-167

表4 スサビノリEST配列のクラスタリング (つづき3)

No	Cluster ID	Sequence Count	Contig ID	GenBank Accession No	Score	E value
47	672	24	1	Z97055.1	44	0.056
48	662	23	1	AP000133.1	40	0.67
49	34	22	1	D12631.1	74	6.00E-11
50	399	22	1	AC005288.1	42	0.29

- 5 以下の表5～8に、ヒットした各GenBank登録（アクセッション）番号（GenBank Accession No）のタイトルをHit nameの欄に示す。

表5 ヒットした各アクセッションのタイトル

No*	Hit Name
1	<i>O. cuniculus</i> mRNA for gamma-non muscle actin.
2	<i>Porphyra leucosticta</i> DNA fragment.
3	Chicken gene for histone H2B-IV.
4	<i>Rhodospirillum rubrum</i> CO-induced hydrogenease operon (cooM, cooK, cooL, cooX, cooU, cooH) genes, iron sulfur protein (cooF) gene, carbon, monoxide dehydrogenase (cooS) gene, carbon monooxide dehydrogenase accessory proteins (cooC, cooT, cooJ) genes, putative transcriptional activator (cooA) gene, nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase (nadC) gene, complete cds, L-aspartate oxigenase (nadB) gene, and alkyl hydroperoxide reductase (ahpC) gene, partial cds.
5	Chicken rig gene for ribosomal protein S15.
6	<i>Homo sapiens</i> chromosome 19, overlapping cosmids R29828 and F25496, complete sequence.
7	<i>Homo sapiens</i> carbohydrate (chondroitin 6/keratan) sulfotransferase 1 (CHST1), mRNA.
8	Soybean ferritin (SOF-H2) mRNA, partial cds.
9	<i>Drosophila melanogaster</i> , chromosome 2L, region 36A7-36A13, P1 clones DS04680 and DS00592, complete sequence.
10	<i>Bordetella pertussis</i> cya gene for calmodulin-sensitive adenylate cyclase.
11	<i>Caenorhabditis elegans</i> cosmid K09A9, complete sequece.
12	<i>Oryctolagus cuniculus</i> coagulation factor VII mRNA, complete cds.
13	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv complete genome; segment 144/162.
14	<i>Ovis aries</i> cyp19 gene, exon 4.

* : 表5のNoは、表1のNoに対応している。

表6 ヒットした各アクセッションのタイトル (つづき1)

No*	Hit Name
15	<i>Erwinia chrysanthemi</i> kdgR gene for KdgR gene for KdgR repressor.
16	<i>Homo sapiens</i> chromosome 19, cosmid R29388, complete sequence.
17	<i>Arabidopsis thaliana</i> genomic DNA, chromosome 5, P1 clone: MBA10.
18	Human DNA sequence from clone 125N5 on chromosome 6q26-27. Contains a putative novel gene, ESTs, STSs and GSSs, complete sequence.
19	<i>Arabidopsis thaliana</i> BAC T25C13.
20	<i>Homo sapiens</i> immunoglobulin lambda gene locus DNA, clone: 23C6.
21	<i>Homo sapiens</i> , clone hRPK.15_A_1, complete sequence.
22	Pig calpain I light subunit mRNA, complete cds.
23	<i>Rattus norvegicus</i> synaptic scaffolding molecule (S-SCAM) mRNA, complete cds.
24	<i>Arabidopsis thaliana</i> genomic DNA, chromosome 3, TAC clone: K5K13.
25	<i>Aglaothamnion neglectum</i> ubiquitin mRNA, complete cds.
26	Human DNA sequence from clone RP3-508115 on chromosome 22q12-13. Contains the gene for GTPBP1 (GTP binding protein 1), two novel genes KIAA0063 and KIAA0668, a novel gene based on ESTs and cDNA, a pseudogene similar to AOP1 (antioxidant protein 1), ESTs, STSs, GSSs, a genomic marker D22S272, a CA repeat and CpG island, complete sequence.
27	Pseudorabies virus UL[5, 6, 7, 8, 8.5, 9, 10, 11, 12, 13] genes.
28	Human DNA sequence from clone 37J18 on chromosome 1p36.2-36.3. Contains a putative novel gene, ESTs and GSSs, complete sequence.
29	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv complete genome; segment 102/062.
30	<i>Porphyridium purpureum</i> mRNA for carbonic anhydrase, complete cds.

* : 表6のNoは、表2のNoに対応している。

表7 ヒットした各アクセッションのタイトル (つづき2)

No*	Hit Name
31	Arabidopsis thaliana genomic DNA, chromosome 5, P1 clone: MBG8.
32	Porphyra purpurea elongation factor EF1-alpha (tef-c) mRNA.
33	Porphyridium cruentum light-harvesting complex I polypeptide (Lhca1) mRNA, complete cds.
34	Neurospora crassa protein phosphatase-Z-link serine/threonine protein phosphatase (pzl-1) mRNA, complete cds.
35	Homo sapiens chromosome 19, cosmid R28058, complete sequence.
36	Homo sapiens map 2q30-p32; 202.6 cR from top repeat reagon, complete sequence.
37	Salmo salar mRNA for Ran protein.
38	Triticum aestivum S-adenosylmethionine decarboxylase precursor, mRNA, complete cds.
39	Homo sapiens thioredoxin reductase 1 (TXNRD1), mRNA.
40	E. gracilis gene for light harvesting chlorophyll a/b binding protein of photosystem II.
41	Mus musculus mRNA for T-cadherin, complete cds.
42	Zantedeschia aethiopica geranylgeranyl reductase mRNA, partial cds.
43	Chlamydomonas reinhardtii YptC1 (yptC1) gene, complete cds.
44	Myxococcus xanthus protein U gene, complete cds.
45	Human Rab11B mRNA.
46	H. catenoides gene for 28S ribosomal RNA.

* : 表7のNoは、表3のNoに対応している。

表8 ヒットした各アクセッションのタイトル (つづき3)

No*	Hit Name
47	Human DNA sequence from clone RP3-388M5 on chromosome 22. Contains an RPL4 (60S Ribosomal Protein 4) pseudogene, the HMG17L1 gene for high-mobility group (non-histone chromosomal) protein 17-like 1, the gene for a novel Sulfotransferase (sulfokinase, EC 2.8.2.1) like protein, the gene for a GS2 like protein, ESTs, STSs, GSSs and four putative CpG island, complete sequence.
48	Homo sapiens genomic DNA of 21q22.1, GART and AML, f43D11-119B8 reagon, segment 8/10, complete sequence.
49	Rice mRNA for ribosomal protein L7A, complete cds.
50	Homo sapiens chromosome 17, clone hCIT.131_K_11, complete sequence.

* : 表8のNoは、表4のNoに対応している。

ヒットした遺伝子タイトルに対して、ゲノム配列やその断片のクローン等ではなく、mRNAまたはcDNAであるヒット、あるいは*Porphyr a*の語を含むヒットを検索したところ、スサビノリの近縁の遺伝子が見出された。

5 さらに、高発現している遺伝子のある配列を探索したところ、上記50のクラスタ中、スサビノリの近縁のmRNAまたはcDNA配列として、クラスタID 13番（表1および表5のNo2）、クラスタID9番（表3および表7のNo32）の2種類が見出された。

10 見出された2種類のmRNAまたはcDNA配列のうち、クラスタID13番は18S rRNAとホモロジーが高いものであった。一方、クラスタID9番のコンティグ（Contig）1のコンセンサス配列はホモロジー検索の結果、GenBank登録番号（GenBank Accession No.）U08844の*Porphyr a purpurea elongation factor EF1-alpha (tef-c)* mRNAにヒットし、本発明
15 のための候補として最も適しているものの1つと考えられた。

また、クラスタID9番のコンティグ（Contig）1のアセンブル結果を見ると、ミスマッチがあり、2つのグループに分かれること、特に5'末端の非翻訳領域の配列が明らかに異なることが判明した。

20 これより、この2つのグループをそれぞれ、*Porphyr a yezoensis elongation factor EF1-alpha A1*、*elongation factor EF1-alpha A2*と命名した（以下、それぞれA1遺伝子、A2遺伝子と呼ぶ）。

実施例3 A1遺伝子の全長cDNAクローニング、シーケンシング、および配列解析

25 1. 材料

cDNAクローニングの材料として、クワノ K.（*Kuwano K.*）ら
〔プラントサイエンス（*Plant Sci.*）、第116巻、第1集、第1
17～124頁（1996年）〕により確立された、スサビノリTU-1株の葉
状の配偶体単藻培養株を用いた。

2. 培養条件

スサビノリTU-1株は、15℃、10時間明期〔光量80 μ E / (m² · s) ; 白色蛍光灯〕、14時間暗期の短日条件で培養した。ESL培地が入った1リットル容の枝付き平底フラスコ（パイレックス（PYREX）社製）中で通気（ポアサイズ0.2 μ mのフィルター（アドバンテック（ADVANTEC）社製）でろ過滅菌した空気、0.25リットル/min）し、還流浮遊状態で培養した。培地は7日ごとに交換した。

3. RNA抽出

スサビノリTU-1株の葉状配偶体単藻培養株の1.2gの藻体より、実施例1と同様の方法で全RNAを抽出した。

4. cDNAライブラリースクリーニングのためのプローブ作製

スサビノリTU-1株のDNA抽出をキタデ（Kitade）ら〔ジャーナルオブフィコロジー（J. Phycol.）、第32巻、第496～498頁（1996年）〕による方法に従って行った。

このDNAを鋳型とし、AmpliTaq Gold（アプライド バイオシステムズ（Applied Biosystems）社製）と2種類のプライマー〔PYEF1（配列番号7）およびPYEFR1（配列番号5）〕を用いてPCRを行った。これらのプライマーは、実施例2のESTのクラスタリングの結果をもとに設計したものであり、elongation factor EF1- α 遺伝子におけるモチーフを含む、保存性の高い配列を増幅するプライマーである。PCRは94℃で2分間の予温後、94℃で1分間、53℃で1分間、72℃で2分間を1サイクルとし、このサイクルを30回繰り返し、最後に72℃で10分間反応させる条件で行った。

得られたPCR産物（約170bp）を1.5%アガロースゲルで電気泳動した。目的のバンドを、GeneClean II kit（バイオ101（Bio101）社製）を用いてゲルから回収し、DNA Ligation Kit Ver. 2（宝酒造社製）を用いてTAクローニング用ベクターであるpT7Blueベクター（ノバジェン（Novagen）社製）に連結した。これを常法（マニアティス（Maniatis）ら編、モレキュラー クローニング、ア

ラボラトリー マニュアル (Molecular Cloning, a Laboratory Manual [コールド スプリング ハーバー (Cold Spring Harbor) 社、1989年刊]) によりコンピテント細胞大腸菌 JM109 (宝酒造社製) に導入し、アンピシリン含有 LB 寒天培地で培養することによって大腸菌の形質転換体のコロニーを得た。

その後、形質転換されたコロニーを無作為に選び、該コロニーが保持するプラスミド中のインサートの長さを、pT7Blue ベクター内の配列を有する T7 プロモータープライマー (ノバジェン (Novagen) 社製)、M4 プライマー (宝酒造社製) による PCR 増幅産物を電気泳動することによって確認し、目的の長さの DNA 断片を持つ大腸菌のコロニーを選定した。

選定した大腸菌の形質転換体のコロニーを液体培養した後、QIAGEN Plasmid Mini Kit (キアゲン (Qiagen) 社製) を用いてプラスミド抽出を行った。

このプラスミドを鋳型とし、dRhodamine Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (アプライド バイオシステムズ (Applied Biosystems) 社製) を用いたサイクルシーケンシング法にて塩基配列の決定を行なった。サイクルシーケンシング反応は、96℃で2分間の予温後、96℃で10秒間、50℃で5秒間、60℃で4分間を1サイクルとし、このサイクルを25回繰り返すことによって行なった。

得られた反応産物を、簡易型のエタノール沈澱を利用した方法により精製した後、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (アプライド バイオシステムズ (Applied Biosystems) 社製) により塩基配列を決定した。プラスミド抽出および塩基配列決定の手順は付属の説明書に従った。

塩基配列を決定した後、得られた配列が目的の配列であることを確かめるため、NCBI が公開している BLAST プログラム [アルトシュル S. F. (Altschul S. F.) ら; ヌクレイック アシズ リサーチ (Nucleic Acids Res.)、第25巻、第17号、第3389~340

2頁（1997年）]を用いて、核酸配列データベースに対し相同性検索を行った。検索の結果、得られた配列は、クラスタリング、アッセブリングから予測したA1遺伝子の配列に最も強くマッチすることが明らかとなった。

このようにして配列が決定されたプラスミドを鋳型とし、プライマーPYEF
1（配列番号7）およびPYEFR1（配列番号5）を用い、上述した条件で再
度PCRを行った。このPCR産物をPCR DIG Labeling Mi
x（ロシュ（Roche）社製）を用いてジゴキシゲニンで標識した。標識反応
後、未反応の基質を除くため標識した産物をQuick Spin Colum
nsTM G-50（ロシュ（Roche）社製）を用いて精製し、スクリーニ
ング用のプローブとした。標識および精製の手順は付属の説明書に従った。

5. cDNAライブラリーの作製

cDNAライブラリーの作製に使用したcDNAは、実施例3-4で調製した
ポリ（A）⁺ mRNAからTime Saver cDNA Synthesis
Kit（アマシャム ファルマシア バイオテック（Amersham Phar
macia Biotech）社製）を用いて合成した。cDNA合成の際に用
いる逆転写酵素には、EFLCpureTM Cloned Murine R
everse Transcriptase（アマシャム ファルマシア バイ
オテック（Amersham Pharmacia Biotech）社製）を用
い、反応温度は44℃で行った。

合成されたcDNAはλZAPIIベクター（ストラタジーン（Stratagene）社製）に連結し、連結反応産物はGigapack III Gold Packaging Extract（ストラタジーン（Stratagene）社製）を用いてパッケージング（packaging）した。以下、このパッケージングして得られたファージ液をcDNAライブラリーとして使用した。

6. 一次スクリーニング

上記のパッケージングして得られたファージ液をZAP-cDNA syn
thesis Kit（ストラタジーン（Stratagene）社製）付属の説
明書に従い、1プレートにつきプラーク数が約 1×10^5 となるように、あら
かじめボトムプレートを作製、保温しておいた24×24cm角型シャーレ

(MS-12450、住友ベークライト (Sumitomo Bakelite) 社製) にまいた。常法に従い、プレートに生じたファージプラークをニトロセルロースメンブレン (NITROPLUS 2000、フナコシ (Funakoshi) 社製) に写しとった。

5 このメンブレンをアルカリ変性液 (0.9M NaOH、1.5M NaCl) に2～5分間、次に中和液 (1.5M Tris-HCl (pH7.5)、1.5M NaCl) に2～5分間浸した。次いで、このメンブレンを6×SSCで洗い、乾燥させた後、乾熱滅菌機 (SP-650、アドバンテック (ADVANTEC) 社製) にて80℃で2時間加熱した。

10 このメンブレンを、終濃度100 µg/mlの変性サケ精子DNAを含むハイブリダイゼーション溶液 [5×デンハルト (Denhardt's) 溶液、4.1mM EDTA、0.5% SDS、6×SSC] 中で65℃、2時間インキュベートすることでプレハイブリダイゼーションを行った。

15 次に、メンブレンを、終濃度100 µg/mlの変性サケ精子DNAならびに熱変性させ1本鎖にした実施例3-4で調製したプローブを終濃度10 ng/mlで含むハイブリダイゼーション溶液中で60℃で一晩 (12時間以上) インキュベートすることでハイブリダイゼーションを行った。

20 ハイブリダイゼーション後、メンブレンを、洗浄溶液 (2×SSC、0.1% SDS) 中で室温、5分間保持し、結合していないプローブ、ハイブリダイゼーション溶液などを洗い落とした。この洗浄を2回繰り返した。

 次に、メンブレンを、あらかじめ60℃に保温しておいた洗浄溶液 (0.5×SSC、0.1% SDS) 中で60℃、20分間保持し、非特異的結合をしているプローブを解離させた。この洗浄を2回繰り返した。

25 次いで、メンブレンを、あらかじめ60℃に保温しておいた洗浄溶液 (0.1×SSC、0.1% SDS) 中で60℃、20分間保持し、非特異的結合をしているプローブを解離させた。この洗浄を2回繰り返した。

 ジゴキシゲニンの検出は、DIG DNA Labeling and Detection Kit (ロシュ (Roche) 社製) 付属の説明書に従い、発色反応で行った。検出結果の確認は、写真用ライトボックス (LIGHT BOX

X NEW 5000 INVERTER, フジ写真フィルム株式会社 (F u j i C o l o r) 製) を用いて行った。以上の手順で一次スクリーニングを行った。

7. 二次スクリーニング

- 5 上記の一次スクリーニングで陽性となったファージを回収し、ライブラリーの増幅を真壁 [真壁和裕; バイオ実験イラストレイテッド (4) 苦労なしのクローニング 秀潤社 (1997年)] の方法に従って行った。

10 二次スクリーニングは、増幅されたファージ液を、1プレートにつきプラーク数が50~100となるように、あらかじめボトムプレートを作製、保温しておいた9cmシャーレ (高さ1.5cm、直径9cm) にまき、得られたプラークについて二次スクリーニングを行なった。二次スクリーニングの操作は、一次スクリーニングと同様の条件で行った。

- 15 上記の方法に従って、葉状配偶体に由来するcDNAライブラリーを作成し、一次スクリーニングを行ない、分離された陽性クローンにつき、増幅を行った。増幅されたファージ液より得られたプラーク約 1×10^5 をスクリーニングすることによって、5個の陽性クローンが分離された。二次スクリーニングで陽性と判断されたプラークについては、ベクター配列に特異的な2種類のプライマー [T3プロモータープライマー (ノバジェン (Novagen) 社製) およびT7プロモータープライマー (ノバジェン (Novagen) 社製)] を用いてP
- 20 CRを行い、増幅産物を1.0%アガロースゲル電気泳動に供することにより挿入断片の長さを確認した。

- ファージベクター中の挿入断片のプラスミドベクターへのサブクローニングは、i n v i v oエキシジョンにより行った。操作手順はZAP-cDNA S y n t h e s i s K i t s (ストラタジーン (Stratagene) 社製) 付属の説明書に従った。
- 25

i n v i v oエキシジョンによって得られたコロニーを無作為に選び、上述のプライマー対 (T3プロモータープライマーおよびT7プロモータープライマー) を用いてPCRを行い、増幅産物を1.0%アガロースゲル電気泳動に供することにより挿入断片の長さを確認した。

8. 塩基配列の解析

最も長い cDNA が挿入されたプラスミドを大腸菌に導入し、得られた形質転換体を液体培養した後、QIAGEN Plasmid Mini Kit (キアゲン (Qiagen) 社製) を用いてプラスミドを抽出し、このプラスミドを用いて挿入 cDNA 領域の塩基配列をプライマーウォーキング法により決定した。

決定された cDNA 配列を配列表の配列番号 1 に示す。全長 1644 bp の cDNA 配列中に 1350 bp の長さの読み取り枠 (open reading frame、ORF) が見いだされ (塩基番号 79~1428) (終止コドンを含む)、この ORF は、449 個のアミノ酸からなるタンパク質をコードしていた。該 ORF にコードされるタンパク質のアミノ酸配列を配列表の配列番号 8 に示す。該 ORF にコードされるタンパク質の予測される分子量は 49.4 kDa であり、等電点は 9.18 である。

開始コドンを含む塩基番号 76~82 の領域にコザック規則 [Kozak M.; Cell, 第 44 巻, 第 283 頁~第 292 頁 (1986 年)] と似た配列 (ATCATGG) が見られた。

一方、cDNA 配列中にポリ (A) 配列付加信号 (AATAAA) およびポリ (A) 尾部は見つからなかったが、出芽酵母 (Saccharomyces cerevisiae) 由来の CYC1 遺伝子において報告されている、ポリ (A) 付加配列 (TACATA) [プラウフット N. (Proudfoot N.); セル (Cell)、第 64 巻、第 4 号、第 671~674 頁 (1991 年)] に似た配列 (TACTATT) が塩基番号 1579~1585 の領域に見られた。

得られた配列が EF-1 α をコードする遺伝子であることを確かめるため、相同性検索ならびにモチーフ検索を行った。

相同性検索には NCBI が公開している BLAST 2.0 ADVANCED BLAST SEARCH の BLASTX 2.0.10 プログラム [アルトシュール S. F. (Altschul S. F.) ら; ヌクレイック アシッズ リサーチ (Nucleic Acids Res.)、第 25 巻、第 17 号、第 3389~3402 頁 (1997 年)] を用いて行った。

モチーフ検索は、InterPro [<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>] が公開しているプログラム InterPro Release 4.0 [アプヴァイラー R. (Apweiler R.) ら; ジャーナル オブ バイオサイエンス (J. Biosci.)、第26巻、第2号、第277~284頁 (2001年)] を用いて、PROSITEのモチーフデータベース [<http://www.expasy.ch/prosite/>] に対して検索を行った。

BLASTX (核酸の配列をアミノ酸の配列のデータベースに対して検索する) プログラムによる相同性検索の結果、一番初めに的中したのは類似性の評点が887の *Porphyra purpurea* の EF-1 α tef-c であった。E 値 (E value) (対象データベースと同じ大きさの任意の配列ライブラリーを無作為に検索したときに、類似性の評点以上の評点を持つものが的中する個数の期待値) は、有意に低い数値を示したので、偶然に的中したのではなく、本実施例で決定された上記配列は *Porphyra purpurea* 由来 EF-1 α tef-c と類似する配列であることは明らかである。

InterProによるアミノ酸のモチーフ検索の結果は、次のとおりであった。

PROSITEのデータベースに対して、配列表の配列番号8に示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号14から21の領域 (GHVDSGKS) に、ATP/GTP-binding site motif A (P-loop) [PROSITE登録番号 (PROSITE accession number) PS00017] が、また、配列表の配列番号8に示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号61から76の領域 (DKLKAERERGITIDIA) に、GTP-binding elongation factors signature [PROSITE登録番号 (PROSITE accession number) PS00301] が見つかった。

このことより、本実施例で得られたDNA断片は elongation factor として機能するアミノ酸をコードする新規のDNA断片と考えられる。

実施例4 スサビノリのライフサイクルの各ステージにおけるA1遺伝子およ

びA 2 遺伝子の発現様式のR T - P C Rによる解析

1. A 1 遺伝子

(1) プライマー合成

5 A 1 遺伝子の発現様式を調べるためのR T - P C R用プライマーとして、プライマーP Y E F R T 1 (配列番号4) およびプライマーP Y E F R 1 (配列番号5) を合成した。

10 プライマーP Y E F R T 1 の配列は、実施例3で明らかにされた配列番号1で示されるA 1 遺伝子の5' 末端非翻訳領域の配列を、実施例2でクラスタリングしたE S T 配列のうちA 2 遺伝子のグループに属し、最も5' 末端非翻訳領域の配列が長い配列A V 4 3 5 9 8 2 とを比較し、明らかに配列が異なる領域を選択し、設定した配列である。

即ち、プライマーP Y E F R T 1 の配列は、配列番号1で示されるA 1 遺伝子の5' 末端非翻訳領域中の配列で、かつA 2 遺伝子の5' 末端非翻訳領域の配列とホモロジーを持たない配列である。

15 また、プライマーP Y E F R T 1 の配列は、実施例2でクラスタリングしたE S T 配列のうち、A 2 遺伝子のグループに属する配列とも、共通にホモロジーの高い、P o r p h y r a p u r p u r e a e l o n g a t i o n f a c t o r E F 1 - a l p h a (t e f - c) m R N A 中の配列である。

(2) R T - P C R

20 スサビノリT U - 1 株の各ステージの全R N A は、単胞子が未形成で葉長1 ~ 2 m m の葉状の配偶体、単胞子の放出の誘導を3 0 分間かけた葉長2 m m の葉状の配偶体、葉長1 ~ 2 c m の葉状の配偶体、そして糸状の胞子体から、実施例1と同様の方法でそれぞれ抽出した。

25 得られたそれぞれ2 0 0 n g のポリ (A) ⁺ R N A からR N A P C R K i t (A M V) V e r . 2 . 1 (宝酒造社製) を用いてc D N A を合成した。逆転写反応は、O l i g o d T - A d a p t o r P r i m e r (宝酒造社製) をプライマーとして用いて5 3 ° C で行った。操作手順は付属の説明書に従った。

得られた5 n g のc D N A を鋳型とし、G e n e T a q N T (和光純薬社

製)と2種の合成プライマー〔PYEFRT1 (配列番号4) およびPYEFRT1 (配列番号5)〕を用いてPCRを行った。PCRは94℃で2分間の予温後、94℃で30秒間、53℃で30秒間、72℃で1分30秒間を1サイクルとし、このサイクルを30回繰り返し、最後に72℃で7分間反応させる条件で行った。

- 5 ネガティブコントロールとして、逆転写反応を行わない各ステージのポリ(A)⁺ RNA鋳型として上述と同様の条件でPCRを行った。PCR産物は1.5%アガロースゲルで電気泳動した。

アガロースゲル電気泳動の結果を図1に示す。

- 10 図1において、逆転写反応を行ったサンプルのアガロース電気泳動の結果を図1 (A) に、逆転写反応を行わなかったサンプル (ネガティブコントロール) のアガロース電気泳動の結果を図1 (B) に、それぞれ示す。

図1 (A)、(B) それぞれにおいて、

Mは100bp ラダーマーカー (宝酒造社製)、

- 15 レーン1は単孢子未形成葉状配偶体 (大きさ: 1~2mm) から調製したmRNAを鋳型とした場合、

レーン2は単孢子形成葉状配偶体 (大きさ: 2mm) から調製したmRNAを鋳型とした場合、

レーン3は葉状配偶体 (大きさ: 1~2cm) から調製したmRNAを鋳型とした場合、

- 20 レーン4は糸状胞子体から調製したmRNAを鋳型とした場合、
である。

いずれのステージにおいても391bpの増幅産物が確認され、A1遺伝子はスサビノリのライフサイクルのどのステージにおいても強く発現していると考えられた。

25 2. A2遺伝子

(1) プライマー合成

A2遺伝子の発現様式を調べるためのRT-PCR用プライマーとして、プライマーPYEFRT4 (配列番号6) を以下のようにして設計した。

プライマーPYEFRT4の配列は、前記したA2遺伝子のグループに属し、

最も 5' 末端非翻訳領域の配列が長い配列 A V 4 3 5 9 8 2 を、実施例 3 で明らかにされた配列番号 1 で示される A 1 遺伝子の 5' 末端非翻訳領域の配列と比較し、明らかに配列が異なる領域を選択し、設定した。

5 即ち、プライマー P Y E F R T 4 の配列は、A 2 遺伝子の 5' 末端非翻訳領域中の配列で、かつ A 1 遺伝子の 5' 末端非翻訳領域の配列とホモロジーを持たない配列である。

このプライマー P Y E F R T 4 と、上述のプライマー P Y E F R 1 (配列番号 5) とを用いて R T - P C R を行なった。

(2) R T - P C R

10 スサビノリ T U - 1 株の各ステージの全 R N A は、単胞子が未形成で葉長 1 ~ 2 mm の葉状の配偶体、単胞子の放出の誘導を 3 0 分間かけた葉長 2 mm の葉状の配偶体、葉長 1 ~ 2 c m の葉状の配偶体、そして糸状の胞子体から、実施例 1 と同様の方法でそれぞれ抽出した。

15 得られたそれぞれ 2 0 0 n g のポリ (A) + R N A から R N A P C R K i t (AMV) V e r . 2 . 1 (宝酒造社製) を用いて c D N A を合成した。逆転写反応は、O l i g o d T - A d a p t o r P r i m e r (宝酒造社製) をプライマーとして用いて 5 3 ° C で行った。操作手順は付属の説明書に従った。

20 得られた 5 n g の c D N A を鋳型とし、G e n e T a q N T (和光純薬社製) と 2 種の合成プライマー P Y E F R T 4 (配列番号 6) と P Y E F R 1 (配列番号 5) を用いて P C R を行った。P C R は 9 4 ° C で 2 分間の予温後、9 4 ° C で 3 0 秒間、5 3 ° C で 3 0 秒間、7 2 ° C で 1 分 3 0 秒間を 1 サイクルとし、このサイクルを 3 0 回繰り返す、最後に 7 2 ° C で 7 分間反応させる条件で行った。

25 ネガティブコントロールとして、逆転写反応を行なわない各ステージのポリ (A) + R N A 鋳型として上述と同様の条件で P C R を行った。P C R 産物は 1 . 5 % アガロースゲルで電気泳動した。

アガロースゲル電気泳動の結果を図 2 に示す。

図 2 において、逆転写反応を行ったサンプルのアガロース電気泳動の結果を図 2 (A) に、逆転写反応を行わなかったサンプル (ネガティブコントロール) の

アガロース電気泳動の結果を図2 (B) に、それぞれ示す。

図2 (A)、(B) それぞれにおいて、

Mは100bp ラダーマーカー (宝酒造社製)、

レーン1は単孢子未形成葉状配偶体 (大きさ: 1~2mm) から調製したmRNAを鋳型とした場合、

レーン2は単孢子形成葉状配偶体 (大きさ: 2mm) から調製したmRNAを鋳型とした場合、

レーン3は葉状配偶体 (大きさ: 1~2cm) から調製したmRNAを鋳型とした場合、

レーン4は糸状胞子体から調製したmRNAを鋳型とした場合、
である。

いずれのステージにおいても369bpの増幅産物が確認され、A2遺伝子はスサビノリのライフサイクルのどのステージにおいても強く発現していると考えられた。

実施例5 ゲノムライブラリーからのA2遺伝子の単離、配列決定とプロモーター配列の単離

1. ゲノムDNAの調製

スサビノリTU-1株のゲノムDNAの抽出は、Nucleon Plant and fungal DNA extraction kits (アマシャム ファルマシア バイオテック (Amersham Pharmacia Biotech) 社製) を用いて、キットに付属の説明書の方法を一部改変して行った。

葉状体ステージの藻体からゲノムDNAを抽出する場合の手順を以下に示す。

培養した葉状体ステージの藻体の水分を紙タオルで除いた後、重量を測定した。

2. 5gの藻体を液体窒素中で乳鉢と乳棒を用いて破碎し、液体窒素で予冷した薬さじを用いて、11.5mlの上記キットに添付のReagent 1緩衝液を入れた50ml容の遠沈管に移し、終濃度20μg/mlとなるようRNase Aを加え、37℃で30分間保持した。これに3.75mlの上記キットに添付のReagent 2を加え、均一になるまで攪拌した後、65℃で途中3回引き

上げてよく混ぜながら10分間保持した。これを氷中で20分間保持した後、2
mlのクロロホルムを加え、 -20°C で20分間保持した。これに $500\mu\text{l}$ の
Nucleon PhytoPure DNA extraction res
in (アマシャム ファルマシア バイオシステムズ社製)を加えて、室温で1
5 0分間混合した。

これを遠心した後、上層を回収し、ここに終濃度 $3.2\text{g}/3\text{ml}$ となるよう
塩化セシウムを加えて溶解した後、さらに $1/10$ 量のエチジウムブロマイド
(終濃度 $10\text{mg}/\text{ml}$)を添加し、超遠心チューブ(12PAシールチューブ、
日立製作所(HITACHI)製)に分注し、 $50,000\text{rpm}$ 、 15°C で2
10 0時間、日立超遠心機65P(日立製作所(HITACHI)製)にて遠心分離
した。

遠心分離後、超遠心チューブに紫外光を当てながら注射針($22\text{G}\times 1$ 、テ
ルモ(Terumo)社製)を装着したシリンジ(テルモシリンジ 2.5ml 、
テルモ(Terumo)社製)を用いてDNA層を抜き取った。抜き取ったDN
15 A層に等量のイソブタノールを加えて攪拌、遠心した後、下層を回収した(イソ
ブタノール処理)。エチジウムブロマイドの色が確認できなくなるまでイソブタ
ノール処理を繰り返した(2~3回繰り返す)。

回収した下層を透析膜(Spectra/Por 7 Membrane、ス
ペクトラム(Spectrum)社製)に入れ、1リットルのTEバッファー
20 (10mM Tris-HCl 、 1mM EDTA 、 $\text{pH}7.5$)に対して室温
で一晩透析を行なった。透析後、 $1/10$ 量の 3M 酢酸ナトリウムと2倍量の
エタノールを加え混合し、生じた沈澱を遠心分離により回収し、 75% エタノー
ルでリンスした後、風乾した。

こうして得られた沈澱物を $100\mu\text{l}$ のTEバッファーに溶かした。抽出され
25 たゲノムDNAの濃度および純度は、分光光度計(Gene Quant、アマ
シャム ファルマシア バイオテック(Amersham Pharmacia
Biotech)社製)により測定した。また、 1.0% アガロースゲルで電気
泳動し、ゲノムDNAが分解されていないことを確認した。

2. プローブの作成

実施例2での解析から、プロモーターの単離候補のA1遺伝子、A2遺伝子は、
GenBank登録番号 (GenBank Accession No.) U0
8844のPorphyrin purpura elongation factor EF1- α (tef-c) mRNAとホモロジーが高い
5 ことがわかっていた。

これを基に、A1、A2両方の遺伝子のゲノム配列を単離できるように、e
longation factor EF1- α 遺伝子におけるモチーフ
を含む保存性の高い配列を検索した。そして、該モチーフを挟むようにフォー
ワードプライマー PYEF1 (配列番号7) およびリバースプライマー PYEF
10 R1 (配列番号5) を設計した。

両プライマーとAmpli Taq Gold (パーキンエルマー (Perk
inElmer) 社製) を用い、スサビノリTU-1株のゲノムDNAを鋳型と
して、Gene Amp PCR System 9600 (パーキンエルマー
(PerkinElmer) 社製) を使用してPCRを行った。PCRは95℃
15 で10分間の予温後、94℃で1分間、52℃で1分間、72℃で2分間を1サ
イクルとし、このサイクルを30回繰り返し、最後に72℃で10分間反応させ
る条件で行った。PCR産物を2.0%シーケムGTG (宝酒造社製) アガロー
スゲルで電気泳動し、目的のDNA断片 (約170bp) をゲルから切り出して
回収し、Gene Clean II (バイオ101 (Bio101) 社製) を
20 用いてDNAを精製した。このDNAをLigation Kit ver. 1
(宝酒造社製) を用いてTAクローニング用ベクターであるpT7Blueベク
ター (ノバジェン (Novagen) 社製) へ連結した。約16時間のライゲー
ション反応後、得られたライゲーション産物にて大腸菌JM109コンピテント
セル (宝酒造社製) を形質転換し、該形質転換JM109をアンピシリン添加L
25 B寒天培地にて培養し、コロニーを形成させた。

コロニーが保持するプラスミド中のインサートを、pT7Blueベクター中
の配列を有するT7プロモータープライマー (ノバジェン (Novagen) 社
製) およびM4プライマー (宝酒造社製) を用いたコロニーPCRによって確認
し、目的のDNA断片を持つプラスミドを保持する大腸菌のコロニーを選定した。

選定した大腸菌からQ i a g e n P l a s m i d M i n i K i t (キア
ゲン (Q i a g e n) 社製) を用いてプラスミドを抽出、精製した。操作手順は
該キットの説明書に従った。このプラスミドを鋳型にし、D y e T e r m i n
a t i o n C y c l e S e q u e n c i n g F S R e a d y R e a c
5 t i o n K i t (パーキンエルマー (P e r k i n E l m e r) 社製)、A B
I P r i s m 3 1 0 G e n e t i c a n a l y z e r (パーキンエルマ
ー (P e r k i n E l m e r) 社製) を使用し、ジデオキシ法を用いたサイクル
シーケンス法によって塩基配列の決定を行った。操作手順は該キットの説明書
に従った。

- 10 このようにして塩基配列が決定されたプラスミドをP C R D I G ラベリン
グキット (ロシュ (R o c h e) 社製) を用いて標識し、ゲノムライブラリーの
スクリーニングを行うためのプローブを作製した。操作手順は該キットの説明書
に従った。標識反応後、Q u i c k S p i n C o l u m n s ^{T M} G-50
(ロシュ (R o c h e) 社製) を用いて余分な基質を除き、精製標識産物を得た。
15 該精製標識産物をスクリーニング用のプローブとした。

3. ゲノムライブラリーの作製

- 実施例5-1で抽出したゲノムDNAをλ D A S H I I / B a m H I V e c
t o r K i t (ストラタジーン (S t r a t a g e n e) 社製) を用いてλ D
A S H I I ベクターに連結し、ゲノムライブラリーを作製した。操作手順は該キ
20 ャットに付属の説明書に従った。連結反応産物はG i g a p a c k I I I G o
l d P a c k a g i n g E x t r a c t (ストラタジーン (S t r a t a g
e n e) 社製) を用いてP a c k a g i n g し、得られたファージ液を、該p a
c k a g i n g e x t r a c t に付属の説明書に従い、1プレートのプラーク
数が 1×10^4 となるように、あらかじめボトムプレートを作製、保温してお
25 いた90×20mm滅菌シャーレ (S H-20、イワキ (I w a k i) 社製)
にまいた。

4. 一次スクリーニング

プレートに生じたファージプラークを、常法に従ってニトロセルロースメンブ
レン (N I T R O P L U S 2 0 0 0、フナコシ (F u n a k o s h i) 社製) に

写しとった。

メンブレンをアルカリ変性液 (1. 5M NaCl、0. 5M NaOH) に
5分間、次に中和液 (1. 5M NaCl、1. 5M Tris-HCl (pH
7. 5)) に5分間浸した。メンブレンを6×SSCで洗い、乾燥させた後、
5 乾熱滅菌器 (SP-650、アドバンテック (ADVANTEC) 社製) にて、8
0℃で2時間加熱した。

このメンブレンを、終濃度100 μg/mlのサケ精子DNAを含むハイブリ
ダイゼーション溶液 [5×SSC、50%ホルムアミド、50mM チャーチ
リン酸緩衝液 (Church phosphate buffer) (pH 7.
10 0)、10%Blocking reagent (ロシュ (Roche) 社製)、
7%SDS、0. 1%N-ドデカノイルサルコシン酸ナトリウム] 中で65℃、
2時間インキュベートすることによりプレハイブリダイゼーションを行った。

次に、メンブレンを、一本鎖に熱変成させたプローブを添加した終濃度100
μg/mlのサケ精子DNAを含むハイブリダイゼーション溶液で50℃で一晩
15 インキュベートすることによりハイブリダイゼーションを行なった。

ハイブリダイゼーション後、メンブレンを洗浄溶液1 (2×SSC、0.
1%SDS) 中で室温、5分間保持し、結合していないプローブ、ハイブリダイ
ゼーション溶液などを洗い落とした。この洗浄を2回繰り返した。

次に、あらかじめ加温しておいた洗浄溶液2 (0. 1×SSC、0. 1%SDS)
20 DS) で68℃、15分間保持し、非特異的結合をしているプローブを解離させ
た。この洗浄を2回繰り返した。

ジゴキシゲニンの検出は、DIG DNA Labeling and Detection Kit (ロシュ (Roche) 社製) 付属の説明書に従い、発
色反応で行った。

25 5. 二次スクリーニング

上記の一次スクリーニングにて陽性となったファージを回収し、常法に従って
ファージ液を調製し、二次スクリーニングを行なった。

二次スクリーニングは、ファージ液を1プレートにつきプラーク数が50～1
00となるように、あらかじめボトムプレートを作製、保温しておいた90×

20mm滅菌シャーレにまいた。他は一次スクリーニングと同様に行った。

その結果、2つの陽性クローン、No. 20およびNo. 47が得られた。これらの陽性と判断されたプラークについては、杉浦の方法〔杉浦昌弘：クローニングとシーケンス、農村文化社、東京、第152頁～第156頁（1989年）〕に従って、λファージの増幅とλファージDNAの抽出を行なった。

6. λファージDNAのサザンハイブリダイゼーション

二次スクリーニングの結果得られた陽性クローンNo. 20、No. 47につき、ゲノムライブラリーのスクリーニングに使用したプローブを用いたサザンハイブリダイゼーションを行なった。

10 サザンハイブリダイゼーションは、マニアティス (Maniatis) ら編、モレキュラー クローニング、ア ラボラトリー マニュアル (Molecular Cloning, a Laboratory Manual)、第9章、第31～58頁〔コールド スプリング ハーバー (Cold Spring Harbor) 社、1989年刊〕に記載の方法に準じて行った。

15 すなわち、陽性クローンのNo. 20およびNo. 47より抽出したDNAを種々の制限酵素にて切断を行なった後、1%アガロースゲル電気泳動に供し、泳動後、ゲルをアルカリ変性、中和し、常法に従い、DNAをナイロンメンブレン (ハイボンドーN (Hybond-N)、アマシャム ファルマシア バイオテク (Amersham Pharmacia Biotech) 社製) に一晩かけてブロッティングした。ブロッティング後、メンブレンに紫外線トランスイルミネーターにて紫外線 (254nm) を5分間照射し、DNAをメンブレンに固定した。

20 このメンブレンを、20mlのDIG-Easy-Hyb. Granules (ロシュ (Roche) 社製) 中で42℃、2時間インキュベートすることにより、プレハイブリダイゼーションを行った。

次に、メンブレンを4mlの上述のハイブリダイゼーション溶液ならびに一本鎖に熱変成させたプローブとともに42℃で一晩インキュベートすることによりハイブリダイゼーションを行なった。

ハイブリダイゼーション後、メンブレンを洗浄溶液1 (2×SSC、0.

1 % SDS) 中で室温、5 分間保持し、結合していないプローブ、ハイブリダイゼーション溶液などを洗い落とした。この洗浄を 2 回繰り返した。

次いで、あらかじめ 68℃ に加温しておいた洗浄溶液 2 (0.1 × SSC、0.1 % SDS) で 68℃、15 分間保持し、非特異的結合をしているプローブを解離させた。この洗浄を 2 回繰り返した。

メンブレンは、DIG DNA Labeling and Detection Kit (ロシュ (Roche) 社製) を用いて処理して発光させ、乾燥させた後、X 線フィルム (コダック (Kodak) 社製) を入れたカセット内で 30 秒感光させ、オートラジオグラフィーをとった。

この結果を図 3 に示した。

図 3 において、M は pHY マーカー (宝酒造社製)、

レーン 1 は Hind III、

レーン 2 は Hind III および Xba I、

レーン 3 は Xba I、

レーン 4 は Xba I および Sal I、

レーン 5 は Sal I、

レーン 6 は Sal I および EcoRI、

レーン 7 は EcoRI、

にて、クローン No. 20 またはクローン No. 47 をそれぞれ制限酵素処理したものである。

また、各レーンの a がクローン No. 20、b がクローン No. 47 である。

その結果、クローン No. 20 に関しては約 4 kbp の制限酵素 Hind III と Xba I の 2 重消化断片に、クローン No. 47 に関しては約 5.5 kbp の制限酵素 Hind III 消化断片に遺伝子およびその上流域が存在する可能性が高いと考えられた。

そこで、クローン No. 20 の DNA を制限酵素 Hind III および Xba I で完全消化した後、1 % アガロースゲル電気泳動し、約 4 kbp のサイズのバンドをアガロースゲルから切り出し回収した。

また、クローン No. 47 の DNA を制限酵素 Hind III で完全消化した

後、1%アガロースゲル電気泳動し、約5.5kbpのサイズのバンドをアガロースゲルから切り出し回収した。

回収したそれぞれDNA断片をベクタープラスミドpBluescript I (東洋紡 (ToY o B o) 社製) に TaKaRa Ligation Kit ver. 1 (宝酒造社製) を用いてライゲーションした。約30分のライゲーション後、得られたライゲーション産物で大腸菌 JM109 コンピテントセル (宝酒造社製) を形質転換し、該形質転換 JM109 をアンピシリン添加LB寒天培地にて培養し、コロニーを形成させた。

コロニーが保持するプラスミド中のインサートを、pBluescript I ベクター中の配列を有するRVプライマー (宝酒造社製) およびM4プライマー (宝酒造社製) でコロニーPCRを行うことによって確認し、目的のDNA断片を持つ大腸菌のコロニーを選定した。選定された大腸菌から Qiagen Plasmid Mini Kit (キアゲン (Qiagen) 社製) を用いて、プラスミドを抽出、精製した。操作手順は該キットの説明書に従った。調製したプラスミドは、それぞれ pEF20、pEF47 と命名した。

プラスミド pEF20、pEF47 をそれぞれ用いて大腸菌 JM109 株を形質転換した。得られた形質転換体を Escherichia coli JM109/pEF20、Escherichia coli JM109/pEF47 (FERM P-19160) と命名、表示した。これは、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター [日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1、中央第6 (郵便番号305-8566)] に平成14年 (2002年) 12月18日 (原寄託日) より FERM P-19160 として寄託され、前記独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに FERM BP-8285 [国際寄託への移管請求日: 平成15年 (2003年) 1月29日] として寄託されている。

これらのプラスミド pEF20、pEF47 を鋳型とし、Dye Termination Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (パーキンエルマー (PerkinElmer) 社製)、ABI Prism 310 Genetic analyzer (パーキンエル

マー (PerkinElmer) 社製) を使用し、ジデオキシ法を用いたサイクルシーケンス法によって塩基配列の決定を行った。操作手順は、該キットの説明書に従った。

5 その結果、クローンNo. 20ファージDNAには、A2遺伝子の翻訳開始点から173bp以降が含まれていることが分かった。即ち、ゲノムDNAの上流の配列が含まれていない為、プロモーター配列は含まれていないと言える。

一方、クローンNo. 47ファージDNAには、A2遺伝子の翻訳開始点から約1.3kb上流までの配列が含まれていた。該配列を、配列表の配列番号3に示す。

10 また、決定したクローンNo. 47の塩基配列、即ち配列番号3と、配列番号1のcDNAおよびクラストリング解析したEST配列を比較し、転写因子検索、コード領域検索、イントロン・エキソン検索を行なったところ、クローンNo. 47の配列には、プロモーター配列、イントロン配列、ターミネーター配列が含まれることが明らかとなった。

15 即ち、全長3764bpのDNA配列中、塩基番号87～859の配列が5' 隣接領域 (5' flanking region)、塩基番号860～877番目の配列が第1エキソン、塩基番号878～1331番目の配列が第1イントロン、塩基番号1332～2961番目の配列が第2エキソン、塩基番号2962～3764番目の配列が3' 隣接領域 (3' flanking region)
20 であることが明らかになった。また、5' 隣接領域がプロモーター配列、3' 隣接領域がターミネーター配列であることが明らかになった。

開始コドンを含む塩基番号1365～1371の領域にコザック規則 [Kozak M. ; Cell, 第44巻, 第283頁～第292頁 (1986年)] と似た配列 (ATCATGG) が見られた。一方、高等植物の核遺伝子のポリ

25 (A) 配列付加信号CAYTG [ジョシ C. P. ; Nucl. Acids Res., 第15巻, 第9627～9640頁 (1987年)] が塩基番号2951～2965の領域に見られ (CATTG)、また他のポリ (A) 配列付加信号AATAAAに類似の配列AATAGAが塩基番号2897～2902の領域に見られた。

また、上記の検索から、配列番号3の配列中の塩基番号860～877、1332～2961の配列がA2遺伝子のcDNA配列であることが明らかとなった。該配列を配列表の配列番号2に示す。該配列中、塩基番号65～1404番目の配列がA2ポリペプチドをコードする配列（終止コドンを含む）である。該配列がコードする499アミノ酸からなるポリペプチドのアミノ酸配列は、A1遺伝子のORFがコードするポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号8）と同一であった。このことより、本実施例で得られたDNA断片もまたエロンゲーションファクター（*elongation factor*）として機能するアミノ酸をコードするDNA断片と考えられる。

10 実施例6 プロモーター配列の活性の確認

（1）プロモーター活性測定用のプラスミドの作製

β -グルクロニダーゼ遺伝子の一過性発現におけるGUS活性をみることによりプロモーター活性を測定できるように、以下のプロモーター活性測定用プラスミドベクターを構築した。

15 比較コントロールのプラスミドベクターはpBI221（クロンテック社製）とし、このベクターの35Sプロモーター部分（HindIIIサイトからXbaIサイトまでの断片）をpEF47のHindIIIサイトからEF-1 α A2遺伝子のイントロンを含まない転写開始直前までのプロモーター配列（配列表の配列番号9の配列）と入れ替えることにより、プロモーター配列に β -グルクロニダーゼ遺伝子を連結したベクターを作製した。つまり、配列番号9の配列は、pEF47プラスミドを鋳型にM13RVプライマー（タカラバイオ製）と5'側にXbaIサイトを持つように合成した配列表の配列番号12に記載のEF47X2プライマーを用いてPCR増幅することにより得られた約0.8kbpのフラグメントを制限酵素HindIIIとXbaIで完全消化し、約0.8kbpのフラグメントをアガロースゲル電気泳動により切り出して精製し、入手した。このDNA断片をpBI221から同様に制限酵素HindIIIとXbaIで完全消化し35Sプロモーター部分をのぞいたベクター断片にライゲーションした後、E. coli JM109に形質転換した。このプラスミドは、p47GUS-ILと命名し、p47GUS-ILで形質転換されたE. coli

i JM109は、*Escherichia coli* JM109/p47GUS-ILと命名した。このp47GUS-ILは、PCRおよび塩基配列解析によりHindIIIサイトから転写開始直前までのプロモーター配列（配列表の配列番号9の配列）をもつことを確認した。

- 5 比較コントロールのプラスミドベクターpBI221の35Sプロモーター部分（HindIIIサイトからXbaIサイトまでの断片）を、上記のプロモーター配列＋第1エクソン＋第1イントロン＋第2エクソンのATG直前までの配列（配列番号3の87～1367番目の配列）と入れ替えることにより、プロモーター配列（配列表の配列番号9の配列）とその下流に第1イントロン（配列表の配列番号10）を含む配列に、 β -グルクロニダーゼ遺伝子を連結したベクターを作製した。つまり、上記のプロモーター配列＋第1エクソン＋第1イントロン＋第2エクソンのATG直前までの配列（配列番号3の87～1367番目の配列）は、pEF47プラスミドを鋳型にM13 RVプライマー（タカラバイオ製）と5'側にXbaIサイトを持つように合成した配列表の配列番号13に記載のEF47Xプライマーを用いてPCR増幅することにより得られた約1.3 kbpのフラグメントを制限酵素HindIIIとXbaIで完全消化し、約1.3 kbpのフラグメントをアガロースゲル電気泳動により切り出して精製し、入手した。このDNA断片をpBI221から同様に制限酵素HindIIIとXbaIで完全消化し35Sプロモーター部分を除いたベクター断片にライゲーションした後、*E. coli* JM109に形質転換した。このプラスミドは、p47GUSと命名し、p47GUSで形質転換された*E. coli* JM109は、*Escherichia coli* JM109/p47GUSと命名した。このp47GUSは、PCRおよび塩基配列解析により配列番号3の87～1367番目の配列をもつことを確認した。

25 (2) プロモーター活性の確認

パーティクルガンによりpBI221、p47GUS-IL、p47GUSベクターのスサビノリTU-1株への導入を行い、 β -グルクロニダーゼ遺伝子の一過性発現におけるGUS活性を組織化学的アッセイにより細胞内に蓄積される青色のインジゴチン色素の有無を正立顕微鏡で観察することにより、プロモータ

一活性を測定した。

ベクターを細胞に導入するための金粒子にDNAをコーティングする手順を以下に示した。金粒子60mgを微量遠心チューブ（1.5ml容量）に測り取った。これに1mlの新しく調製された70%エタノールを加え試験管ミキサー

- 5 (VORTEX GENIE 2、Scientific Industries)を用いて5分間攪拌を行い、15分間室温に放置した。卓上遠心機（チビタン、ミリポア）で5秒間遠心し、上清を除いた。これに1mlの滅菌水を加え試験管ミキサーで1分間攪拌した後、1分間静置して金粒子を沈殿させ、卓上遠心機で2秒間遠心した後、上清を除いた。これを3回繰り返した。これに金粒子の終濃度が60mg/mlとなるように50%グリセロールを加えた。50%グリセロール中の金粒子（60mg/ml）の再懸濁と凝集の破壊のために、試験管ミキサーで5分間激しく攪拌した。この溶液50μl（金粒子が約3mg相当含まれる）を微量遠心チューブ（1.5ml容量）に測り取り、激しく試験管ミキサーで攪拌しながら10μlのDNA（1μg/μl）と50μlの2.5M
- 10 CaCl₂と20μlの0.1M スペルミジンを加え、さらに3分間攪拌した。1分間静置して金粒子を沈ませた後、卓上遠心機で2秒間遠心し上清を除いた。ペレットを崩さないように140μlの70%エタノールを加え、上清を除き、次にペレットを崩さないように140μlの100%エタノールを加え、上清を除いた。これに48μlの100%エタノールを加え混合した。1回の導入には
- 20 8μlを使用した。

- スサビノリのTU-1株の葉状の配偶体単藻培養株（以下スサビノリTU-1株とする）を、15℃、10時間明期（光量80 μE/m²/s；白色蛍光灯）・14時間暗期の短日条件で、ESL培地が入った容量2Lの簡易式培養容器（藤森工業）中で通気（ポアサイズ0.2 μmのフィルターでろ過滅菌した空気、0.25 l/min）し、還流浮遊状態で培養した。培地は7日ごとに交換した。葉状の配偶体を約2cm²の大きさに切断し、ESL培地で広げながら4分の1のGlass Microfibre（GF/C：47mm、Whatman）上に貼り付けた。これをブフナー漏斗（適合ろ紙70mm用、MT）にろ紙（90mm、Whatman）を載せて、ESL培地で湿らせた上に
- 25

載せ、ろ過びんと吸引機を用いて吸引し、余分の水分を除きつつ吸着させた。これをE S L寒天培地上に置き、パーティクルガン (G I E- I I I、タナカ) でDNAをコーティングした金粒子の導入を行った。パーティクルガンの操作手順は、付属の説明書に従った。打込み条件は、発射口と試料との距離は7~9 cm、
5 発射時の圧力は0. 5~6. 0 k g f / c m² の範囲で設定し、発射時間は0. 0 1 5秒で打込みを行い、1条件ごとに試料3つ準備しそれぞれに導入を行った。

導入を行った後の試料は、G l a s s M i c r o f i b r eから剥がし取り、導入したベクター別に発射口と試料との距離の条件ごとに集め、簡易式培養容器で15℃、14時間明期・10時間暗期の長日条件で2日間培養した。その後、
10 固定液〔2% P a r a f o r m a l d e h y d e、0. 1M N a - p h o s p h a t e (pH 7. 0)、1mM E D T A、1. 5M D-ソルビトール〕で1時間固定し、洗浄液〔0. 1M リン酸ナトリウム (N a - p h o s p h a t e) (pH 7. 0)、1. 5M D-ソルビトール〕で3回洗浄した。これを細胞・組織全体が浸るようにX-G l u c 溶液〔2mM X-G l u c
15 (5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-グルクロニド、50mM リン酸ナトリウム (pH 7. 0)、10mM E D T A、0. 5mM K₄ F e (C N)₆、0. 5mM K₃ F e (C N)₆、1. 5M D-ソルビトール、0. 5% T r i t o n X-100)を加え、適当な容器に入れ密封した後、37℃インキュベータ (M I R-253、三洋) 中で一晩インキュベートした。
20 β-グルクロニダーゼ活性 (G U S活性) は細胞内に蓄積される青色のインジゴチン色素の有無を正立顕微鏡で観察することにより確認し、これをプロモーター活性とした。

その結果、p B I 2 2 1ベクターを導入した試料について発射口と試料との距離が9 cmの条件の中で2つG U S活性が確認された。同様にp 4 7 G U S - I
25 Lベクターについては、発射口と試料との距離が8 cmと9 cmの条件でそれぞれ1つの合計2つG U S活性が確認された。したがって、このベクターのプロモーター (配列表の配列番号9) がプロモーター活性があることが確認された。

p 4 7 G U Sベクターについては、発射口と試料との距離が7 cmの条件で1つ、8 cmと9 cmでそれぞれ3つの合計7つのG U S活性が確認された。

また、GUS活性が見られた試料について、細胞の色素を脱色したところ、発
射口と試料の距離が9 cmでp 47 GUSベクターを一過性に導入した12の圧
力条件(0.5~6.0 Kg/cm²)の1つが、約1週間経過しても青色のイ
ンジゴチン色素の蓄積が残っていた(図4)。図4において、Aは脱色前、Bは
5 脱色7日後の結果を示す。したがって、このベクターのプロモーター(配列表の
配列番号9)はその下流に第1イントロン(配列表の配列番号10)を含むこと
により効率よく遺伝子発現が可能でありかつ非常に高い発現の誘導が可能と考え
られた。

10 産業上の利用の可能性

本発明により、藻類に由来するプロモーターが初めて提供され、該プロモータ
ーを利用した藻類における遺伝子発現が可能となった。さらに、本発明により、
藻類に由来するターミネーター、イントロンが初めて提供され、これらを利用し
て藻類における遺伝子発現効率の向上が可能となった。即ち、本発明は、藻類に
15 おける有用物質の遺伝子工学的生産を可能とするのみならず、藻類の遺伝子工学
的育種を可能とするものである。

また、本発明により、藻類に由来する新規エロンゲーションファクターの遺伝
子が提供され、該遺伝子を利用して藻類に由来するエロンゲーションファクター
の遺伝子工学的生産が可能となった。

20

配列表フリーテキスト

SEQ ID No:1; cDNA sequence of A1 gene

SEQ ID No:2; cDNA sequence of A2 gene

SEQ ID No:3; Genomic DNA sequence of A2 gene

25 SEQ ID No:4; Primer PYEFRT1

SEQ ID No:5; Primer PYEFR1

SEQ ID No:6; Primer PYEFRT4

SEQ ID No:7; Primer PYEF1

SEQ ID No:8; Amino acid sequence of A1

SEQ ID No:9; Promotor region of A2 gene

SEQ ID No:10; Intron 1 of A2 gene

SEQ ID No:11; Terminator region of A2 gene

SEQ ID No:12; Primer EF47X2

5 SEQ ID No:13; Primer EF47X

請 求 の 範 囲

1. 下記 (a) ~ (c) から選択されるDNAであって、かつ、藻類においてプロモーター活性を示すことを特徴とする、単離されたDNA :
- 5 (a) 配列表の配列番号 9 に示される塩基配列を有するDNAまたはその一部、
(b) (a) のDNAまたはその相補鎖と厳密な条件下でハイブリダイズし得るDNA、
(c) (a) のDNAに、1 以上の塩基の置換、欠失、挿入、付加を有するDNA。
- 10 2. 下記 (d) ~ (f) に記載のDNAから選択され、かつ、藻類における遺伝子の転写効率を上昇させる活性を示すことを特徴とする、単離されたDNA :
- (d) 配列表の配列番号 10 に示される塩基配列を有するDNAまたはその一部、
(e) (d) のDNAまたはその相補鎖と厳密な条件下でハイブリダイズし得るDNA、
15 (f) (d) のDNAに、1 以上の塩基の置換、欠失、挿入、付加を有するDNA。
3. 下記 (a) ~ (c) から選択されるDNAであって、かつ、藻類においてプロモーター活性を示すことを特徴とする、単離されたDNA :
- (a) 配列表の配列番号 9 に示される塩基配列を有するDNAまたはその一部、
20 (b) (a) のDNAまたはその相補鎖と厳密な条件下でハイブリダイズし得るDNA、
(c) (a) のDNAに、1 以上の塩基の置換、欠失、挿入、付加を有するDNA
- の下流に隣接して、もしくは1~10000塩基のDNA断片を介した位置に、
25 下記 (d) ~ (f) に記載のDNAから選択され、かつ、藻類における遺伝子の転写効率を上昇させる活性を示すことを特徴とする、単離されたDNA :
- (d) 配列表の配列番号 10 に示される塩基配列を有するDNAまたはその一部、
(e) (d) のDNAまたはその相補鎖と厳密な条件下でハイブリダイズし得るDNA、

(f) (d) のDNAに、1以上の塩基の置換、欠失、挿入、付加を有するDNA
A
を有し、かつ、藻類においてプロモーター活性を示すことを特徴とする、単離されたDNA。

5 4. 配列表の配列番号3の87-1367番目の塩基配列である請求項3記載の単離されたDNA。

5. 下記(g)～(i)に記載のDNAから選択され、かつ、藻類においてターミネーター活性を示すことを特徴とする、単離されたDNA：

(g) 配列表の配列番号11に示される塩基配列を有するDNAまたはその一部、
10 (h) (g) のDNAまたはその相補鎖と厳密な条件下でハイブリダイズし得るDNA、
(i) (g) のDNAに、1以上の塩基の置換、欠失、挿入、付加を有するDNA。

6. (1) 下記(a)～(c)から選択されるDNAであって、かつ、藻類においてプロモーター活性を示すことを特徴とする、単離されたDNA：

(a) 配列表の配列番号9に示される塩基配列を有するDNAまたはその一部、
(b) (a) のDNAまたはその相補鎖と厳密な条件下でハイブリダイズし得るDNA、
(c) (a) のDNAに、1以上の塩基の置換、欠失、挿入、付加を有するDNA；
20

(2) 下記(d)～(f)に記載のDNAから選択され、かつ、藻類における遺伝子の転写効率を上昇させる活性を示すことを特徴とする、単離されたDNA：

(d) 配列表の配列番号10に示される塩基配列を有するDNAまたはその一部、
(e) (d) のDNAまたはその相補鎖と厳密な条件下でハイブリダイズし得るDNA、
25 (f) (d) のDNAに、1以上の塩基の置換、欠失、挿入、付加を有するDNA；

(3) 下記(g)～(i)に記載のDNAから選択され、かつ、藻類においてターミネーター活性を示すことを特徴とする、単離されたDNA：

(g) 配列表の配列番号 11 に示される塩基配列を有する DNA またはその一部、
(h) (g) の DNA またはその相補鎖と厳密な条件下でハイブリダイズし得る DNA、

5 (i) (g) の DNA に、1 以上の塩基の置換、欠失、挿入、付加を有する DNA

のいずれかに所望の遺伝子が発現可能な状態で連結されていることを特徴とする、
組換え DNA。

7. (1) の DNA の下流に隣接して、もしくは 1 ～ 10000 塩基の DNA 断片を介した位置に (2) の DNA を有する単離された DNA に所望の遺伝子が
10 発現可能な状態で連結されていることを特徴とする請求項 6 記載の組換え DNA。

8. 配列表の配列番号 3 の 87-1367 番目の塩基配列を示す単離された DNA に所望の遺伝子が発現可能な状態で連結されていることを特徴とする請求項
7 記載の組換え DNA。

9. 所望の遺伝子が、タンパク質をコードする核酸、アンチセンス核酸をコードする核酸、デコイをコードする核酸およびリボザイムをコードする核酸からなる群より選択される核酸であることを特徴とする、請求項 6 記載の DNA。
15

10. (1) 下記 (a) ～ (c) から選択される DNA であって、かつ、藻類においてプロモーター活性を示すことを特徴とする、単離された DNA :

(a) 配列表の配列番号 9 に示される塩基配列を有する DNA またはその一部、
20 (b) (a) の DNA またはその相補鎖と厳密な条件下でハイブリダイズし得る DNA、

(c) (a) の DNA に、1 以上の塩基の置換、欠失、挿入、付加を有する DNA ;

(2) 下記 (d) ～ (f) に記載の DNA から選択され、かつ、藻類における遺伝子の転写効率を上昇させる活性を示すことを特徴とする、単離された DNA :
25

(d) 配列表の配列番号 10 に示される塩基配列を有する DNA またはその一部、
(e) (d) の DNA またはその相補鎖と厳密な条件下でハイブリダイズし得る DNA、

(f) (d) の DNA に、1 以上の塩基の置換、欠失、挿入、付加を有する DNA

A ;

(3) 下記 (g) ~ (i) に記載のDNAから選択され、かつ、藻類においてターミネーター活性を示すことを特徴とする、単離されたDNA :

(g) 配列表の配列番号 11 に示される塩基配列を有するDNAまたはその一部、

5 (h) (g) のDNAまたはその相補鎖と厳密な条件下でハイブリダイズし得るDNA、

(i) (g) のDNAに、1以上の塩基の置換、欠失、挿入、付加を有するDNA

のいずれかに記載のDNAを含有するベクター。

10 11. (1) のDNAの下流に隣接して、もしくは1~10000塩基のDNA断片を介した位置に(2)のDNAを有する単離されたDNAを含有する請求項10記載のベクター。

12. 配列表の配列番号3の87-1367番目の塩基配列を示す単離されたDNAを含有する請求項11記載のベクター。

15 13. ベクターがプラスミドベクターまたはウイルスベクターであることを特徴とする、請求項10記載のベクター。

14. 請求項6~9のいずれか1項に記載のDNAが導入された、もしくは請求項10~13のいずれか1項に記載のベクターで形質転換された藻類。

20 15. 下記の(j) ~ (l) に記載のDNAから選択され、かつ、エロンゲーションファクター (e l o n g a t i o n f a c t o r) 活性を有するポリペプチドをコードすることを特徴とする、単離されたDNA :

(j) 配列表の配列番号1に示される塩基配列を有するDNAまたはその一部、

(k) (j) のDNAまたはその相補鎖と厳密な条件下でハイブリダイズし得るDNA、

25 (l) (j) のDNAに、1以上の塩基の置換、欠失、挿入、付加を有するDNA。

16. 下記の(m) ~ (o) に記載のDNAから選択され、かつ、エロンゲーションファクター (e l o n g a t i o n f a c t o r) 活性を有するポリペプチドをコードすることを特徴とする、単離されたDNA :

- (m) 配列表の配列番号 2 に示される塩基配列を有する DNA またはその一部、
- (n) (m) の DNA またはその相補鎖と厳密な条件下でハイブリダイズし得る DNA、
- (o) (m) の DNA に、1 以上の塩基の置換、欠失、挿入、付加を有する DNA。
- 5
17. 配列番号 8 のアミノ酸配列をコードする DNA。
18. 請求項 17 に記載の DNA に、1 以上の塩基の置換、欠失、挿入、付加を有し、かつ、エロンゲーションファクター (e l o n g a t i o n f a c t o r) 活性を有するポリペプチドをコードすることを特徴とする DNA。

図 1

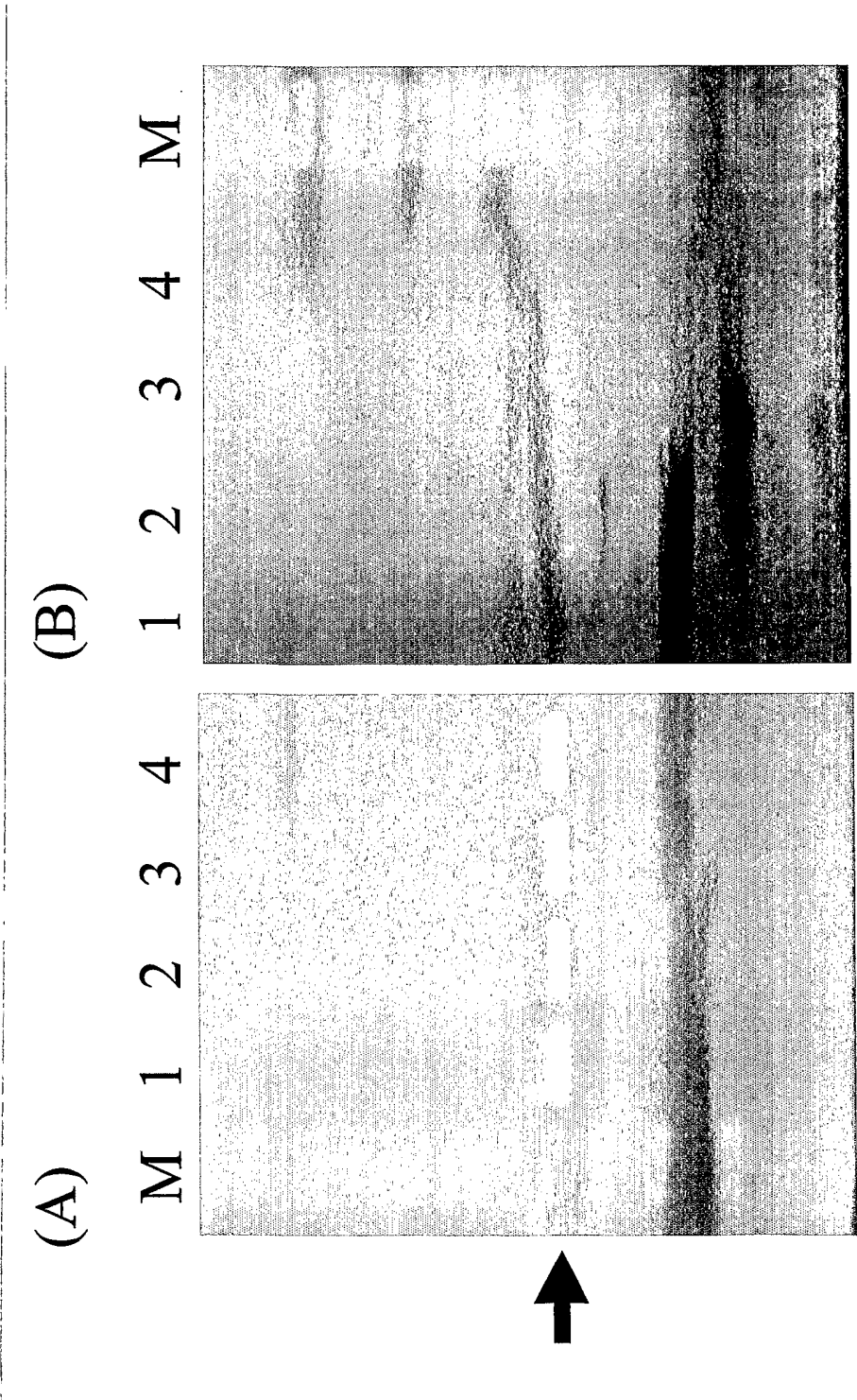


図 2

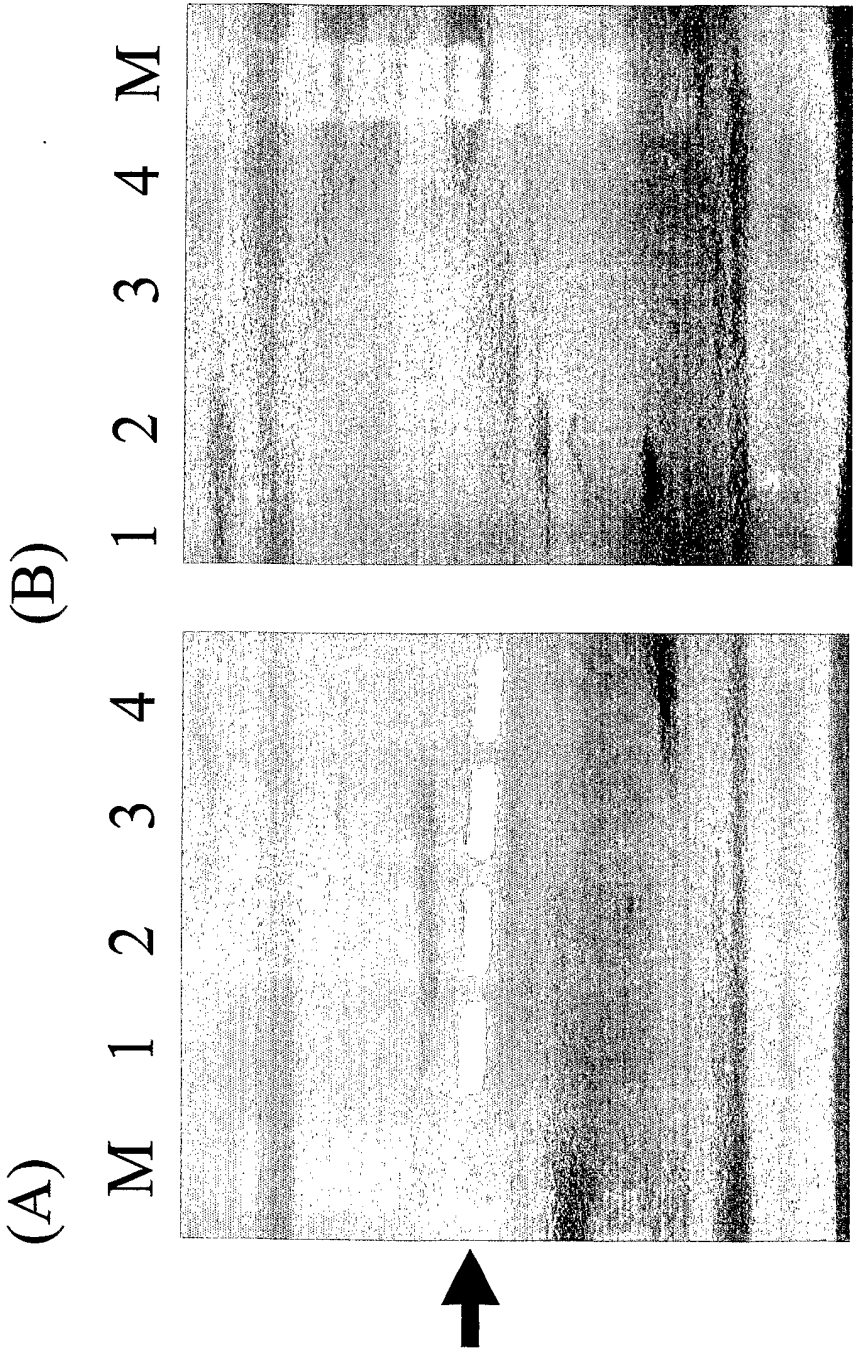
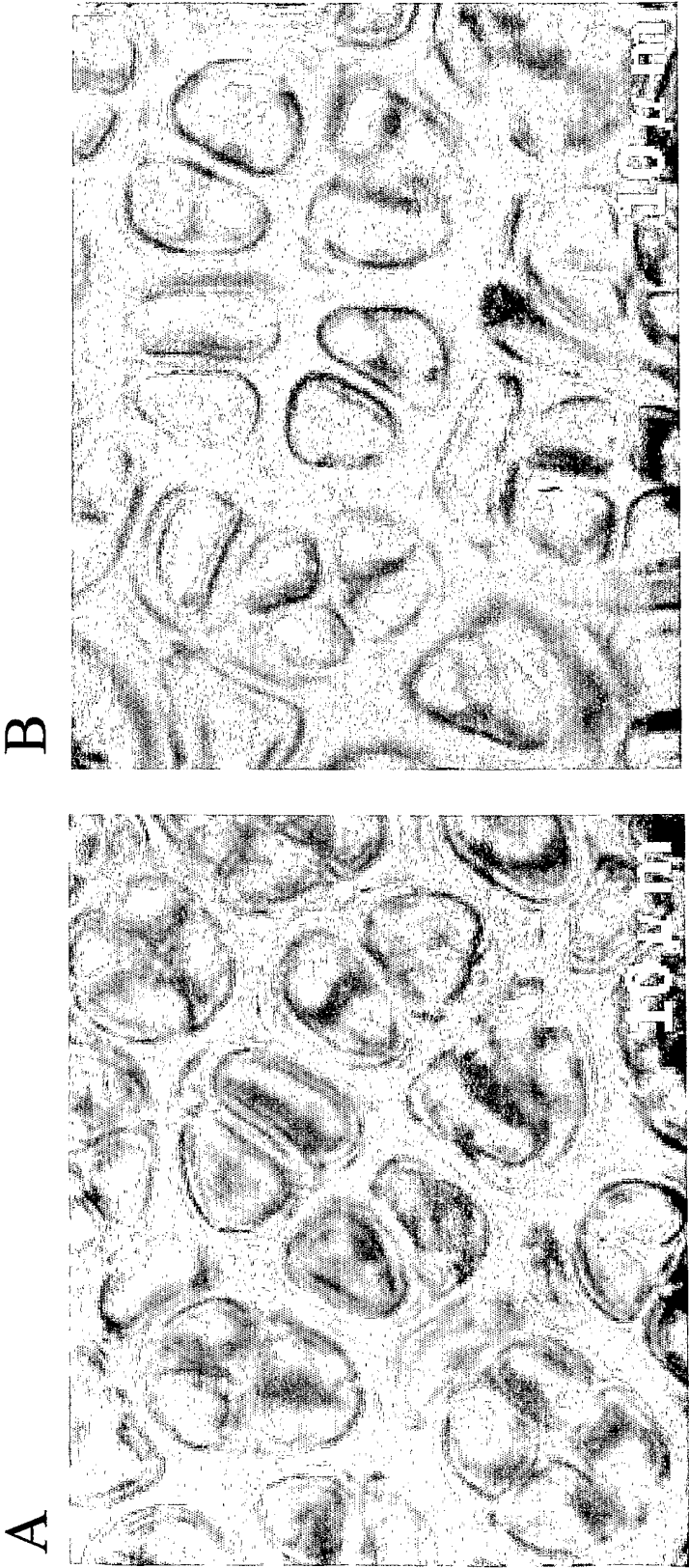


図 3



図 4



1/14

SEQUENCE LISTING

<110> TAKARA BIO INC.

<120> Promoter, intron and terminator derived from algae

<130> 663658

<150> JP 2002-52885

<151> 2002-02-28

<150> JP 2002-374188

<151> 2002-12-25

<160> 13

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1644

<212> DNA

<213> Porphyra yezoensis Ueda

<220>

<223> cDNA sequence of A1 gene

<400> 1

caccatcccg ctcgacctac cggttgttgc ccagtcccggt cccgcgcgga gtgagagcag 60

cccacctagt ctctcatcat ggggaaggag aagcagcatg tgtccattgt ggtcattggc 120

2/14

```

cacgtcgact ctggcaagtc gacgaccacc ggccatctga tctacaagtg cgggggtatc 180
gagaagcgcg cgattgagaa gttcgagaag gaggctgctg agatgggcaa gggctcgttc 240
aagtacgcgt ggggtgctgga caaactgaag gccgagcgcg agcgcggtat caccattgac 300
attgctctgt ggaagttcga gacggagaag tacagcttca ctatcattga cgccccgggt 360
caccgtgact tcatcaagaa catgatcacg ggcacgtcgc aggcggtatc ggccatcctg 420
gtcattgctt cgccgccggg cgagtttgag gcggttatct ccagaaacgg gcagaccgcg 480
gagcacgcgc tgctggccta caccctgggc gtcaagcaga tgattgtggc ttgcaacaag 540
atggacgaca agaacgtcaa ctggtcgcag gaccgctacg aggaggtgtc caaggagatg 600
gacctgtacc tgaagaaggt cgggtacaac ccgcgaagg tgccaaggt gccgacgtcg 660
ggctggacgg gtgagaacct gttcgagagg accgataaga cgcacgccct cggcaagtgg 720
tacaagggcc cgtgcctgct ggaggctctg gacaactgcg acccgccgaa gcgcccgggt 780
gacaagccgc tgcgcctgcc cctccaggac gtctacaaga tcggcggcat tggcacagtg 840
ccggtgggccc gtgtggagac tgggtcatc aagcccgga tggtcgtgac gtttgcgccc 900
tcgggcctgt cgactgaggt gaagtcggtc gagatgcacc acgaggcgct gccccaggcc 960
ggccccggcg acaacgttgg cttcaacgtc aagaacgtgt cggtaagga cctgaagcgc 1020
ggctacgtgt gcggtgactc gaagaacgac ccgccgaagg ggtgcgcttc gttcaacgcc 1080
caggtcatca tcctgaacca ccctggtgag atccacgctg gctacgcgcc ggtgctggat 1140
tgccacacgg cgcacattgc gtgcaagttc tcggagctga tcctgaagat ggaccgccgc 1200
tcgggcaaga agctggagga cagcccaag atgatcaagt ccggtgacgc tgctatggtg 1260
aagatggttg cctccaagcc gatgtgcgtg gaggccttca ccagtagcc gccgctgggc 1320
cgctttgccg tgcgtgacat gcgccagacg gtcgctgttg gtgtcatcaa gtcggtggag 1380
aagaaggagg ttgagggcaa gatgaccaag tcggcgcca agaaatagca gccaatgtg 1440
ctcgcttcgg cgtcgtgtat ggcatcgtgg gtggacttgt tttttgcggt gcgatctagt 1500
cacgcgctct tacgcctcgc gtgtggggtc ctggcggtgg tgcgtggcga ctgtcggtct 1560
cccgtagtgg accgtttgta ctattcgacc cttgcgaagg ggagaatagg agttagttt 1620
accctcttgt tttgtatctt tttg                                     1644

```

3/14

<211> 1648

<212> DNA

<213> *Porphyra yezoensis* Ueda

<220>

<223> cDNA of sequence of A2 gene

<400> 2

```
ccgtcttccc cgccgattac gtcttgagtt tacctgttca cctagccttt catcatgggg 60
aaggagaagc agcatgtgtc catttgtgtc attggccacg tcgactctgg caagtcgacg 120
accaccggcc atctgatcta caagtgcggg ggtatcgaga agcgcgcgat tgagaagttc 180
gagaaggagg ctgctgagat gggcaagggc tcgttcaagt acgcgtgggt gctggacaaa 240
ctgaaggccg agcgcgagcg cggatcacc attgatattg ctctgtggaa gttcgagacg 300
gagaagtaca gcttcaactat cattgacgcc ccgggtcacc gtgacttcat caagaacatg 360
atcacgggca cgtgcaggc ggatctggcc atcctgttca ttgcttcgcc gccgggagcg 420
tttgaggcgg gtatctccca gaacgggcag acccgcgagc acgcgctgct ggcctacacc 480
ctgggcgtca agcagatgat tgtggcttgc aacaagatgg acgacaagaa cgtcaactgg 540
tcgcaggacc gctacgagga ggtgtccaag gagatggacc tgtacctgaa gaaggtcggg 600
tacaaccccg ccaaggtgcc caaggtgccg acgtcgggct ggacgggtga gaacctgttc 660
gagaggaccg ataagacgca cgccctcggt aagtgttaca agggcccggt cctgctggag 720
gctctggaca actgcgaccc gccgaagcgc ccggttgaca agccgctgcg cttgcccctc 780
caggatgtct ataagatcgg cggcattggc acagtgccgg tgggccgtgt ggagactggg 840
ctcatcaagc ccggcatggt cgtgacgttt gcgccctcgg gcctgtcgac tgaggtgaag 900
tcggtcgaga tgcaccacga ggogctgccc caggccggcc ccggcgacaa cgttggcttc 960
aacgtcaaga acgtgtcggt caaggacctg aagcgcggct acgtgtgcgg tgactcgaag 1020
aacgaccgcg cgaaggggtg cgcttcgttc aacgccaggt tcatcatcct gaaccaccct 1080
ggtgagatcc acgccgcta cgcgccgtg ctggactgcc acacggcgca cattgcgtgc 1140
aagttctcgg agctgatcct gaagatggac cgccgctcag gcaagaagct ggaggacacg 1200
cccaagatga tcaagtccgg tgacgtgct atggtgaaga tggttgctc caagccgatg 1260
```

4/14

tgcgtggagg ccttcaccca gtacccgccg ctgggccgct ttgccgtgcg tgacatgcgc 1320
cagacggctc ctgttgggtg catcaagtcg gtggagaaga aggaggttga gggcaagatg 1380
accaagtcgg cggccaagaa atagcagcca acccatccgg ctgtgaggtc gctgggtggcc 1440
tcgctcgctg cagaccagat gcgagtcaac caggagcgcg ttatcgcgct cttcgttgtc 1500
aacgctgtca tgactgtcgc gaaggatggg tgccgggtccg cagcagtcga ccgcctctac 1560
tactcgacgc tcgcgaaagg gagaatagaa atgtagcgtg cttgtcttgc ttttgctagg 1620
gtgtttcttg aggcttgcac tgtctcgc 1648

<210> 3

<211> 3764

<212> DNA

<213> *Porphyra yezoensis* Ueda

<220>

<223> Genomic sequence of A2 gene

<400> 3

gactgattcg ccagcgcgca attaacctc actaaaggga acaaaagctg ggtaccgggc 60
ccccctcga ggtcgacggt atcgataagc ttcgctgccg ggctctccat cagcgacttg 120
cggtcgggtg tgtttgggga ccggcgggaa gcgcaccaga atgtgggggg agacaggcag 180
ggctcagaga cacgagtgga gagcattgat cagtaacagt cgcacgtcag actgggtctg 240
cgtggggcca cgaaagcgca aaaatgggcc tagcaggcgc cgtcaacctt ctcaagctca 300
gagcgccgcc aggctgcaca ccccgaggc gacggccagt agcacctgcg ccacggagac 360
accgtctcct gctaacatac gttgttcgt ccgccatcga gaacagctag gtacagaata 420
ccacaggagaa gggaagaaaa gccttgaatg gcaaagggtg gtcgaaggca agccagagag 480
ggacgttcta catgcaccaa agccagtagg agcgcactac gcggtgaagc gtcgccgaaa 540
gagggggggc gaccacgct cgtcactgca gttgtattg tgccgggtcc caactgccac 600
tggcgggtgt tgtcaagcgg ccaccacgag tctcgagggc tcagcaattg caccgctggc 660

5/14

acgcagaatg tggccttccc cgagttttaca gtggtccttt tccccgaaag catccctaaa 720
aaaaggaatt gagcgacggc gacgccgacc gacgtccgcg gcggcggcca caggcgaggg 780
acggaggacc accggccttt taaatgggcg tcgaagacca cgtgctcggc acaccacccc 840
gtcgacatcg ctatcgtacc cgtcttcccc gccgattgta cgtttttttt atcctcccg 900
cgctcagcct cccgttactc ccgcgcatac gtgtgggcgt gggtagctg ggtgcgcgca 960
tgggcgtttc ctccctgcc ggtgtgccga gtaacggctg gctggtttgg gtggctcaac 1020
ctttgtggga gagggtcgca ctttgcacc agctgggggtg gtttgccgta tgaccaacag 1080
gctcggcaat acggatcatt gtccgactac tggcgctggg gtgcattcag gcatgcggac 1140
actggaagaa gatcagtgtt ggcccccg cagttgtcgt tggctcctctg gtatatgcgt 1200
tcgacagttg atcatctctt ctggtgaaga ttgtgacgc tctccggtct cttgcactgt 1260
tgtggtgatt gtttgggcgc atgttctatt cttctgatct gatcgttcct actgtcgacg 1320
gggatcaca gacgtcttga gtttacctgt tcacctagcc tttcatcatg gggaaggaga 1380
agcagcatgt gtccattgtg gtccattggc acgtcgactc tggcaagtcg acgaccaccg 1440
gccatctgat ctacaagtgc ggggggtatcg agaagcgcgc gattgagaag ttcgagaagg 1500
aggctgctga gatgggcaag ggctcgttca agtacgcgtg ggtgctggac aaactgaagg 1560
ccgagcgcga gcgcggtatc accattgata ttgctctgtg gaagttcgag acggagaagt 1620
acagcttcac tatcattgac gccccgggtc accgtgactt catcaagaac atgatcacgg 1680
gcacgtcgca ggcgatctg gccatcctgg tcattgcttc gccgccgggc gagtttgagg 1740
cgggtatctc ccagaacggg cagaccgcg agcacgcgt gctggcctac accctgggcg 1800
tcaagcagat gattgtggct tgcaacaaga tggacgacaa gaacgtcaac tggctgcagg 1860
accgctacga ggaggtgtcc aaggagatgg acctgtacct gaagaaggtc ggggtacaacc 1920
ccccaaggt gcccaaggtg ccgacgtcgg gctggacggg tgagaacctg ttcgagagga 1980
ccgataagac gcacgcctc ggtaagtgg acaagggcc gtgcctgctg gaggtctctg 2040
acaactgcga cccgccgaag cggccggtt acaagccgt gcgcttgccc ctccaggatg 2100
tctataagat cggcggcatt ggcacagtgc cgggtgggcg tgtggagact gggctcatca 2160
agccccgcat ggtcgtgacg tttgcgcct cgggcctgtc gactgaggtg aagtcggctg 2220
agatgcacca cgaggcgtg ccccaggccg gccccggcga caacgttggc ttcaacgtca 2280
agaacgtgtc ggtcaaggac ctgaagcgcg gctacgtgtg cggtgactcg aagaacgacc 2340
cgccgaaggg gtgcgcttcg ttcaacgccc aggtcatcat cctgaaccac cctggtgaga 2400

6/14

tccacgccgg ctacgcgccg gtgctggact gccacacggc gcacattgcg tgcaagttct 2460
cggagctgat cctgaagatg gaccgccgct caggcaagaa gctggaggac acgcccaga 2520
tgatcaagtc cggtagcgt gctatggtga agatggtgc ctccaagccg atgtgcgtgg 2580
aggccttcac ccagtaccgc ccgctgggccc gctttgccgt gcgtgacatg cgccagacgg 2640
tcgctgttgg tgtcatcaag tcggtggaga agaaggaggt tgagggaag atgaccaagt 2700
cggcggccaa gaaatagcag ccaaccatc cggctgtgag gtcgctggtg gcctcgctcg 2760
ctgcagacca gatgcgagtc aaccaggagc gcgttatcgc gctcttcgtt gtcaacgctg 2820
tcatgactgt cgcgaaggat gggtagcgt ccgcagcagt cgaccgcctc tactactcga 2880
cgctcgcgaa aggagaata gaaatgtagc gtgcttctct tgcttttctg aggggtgttc 2940
ttgaggcttg cattgtctcg cgaaaaaac attgctttcg tacgcaactg gtcaacatgg 3000
atattgaacg aggacggtga agactccgtg gggcgccagg aatgcgtgat cagactttct 3060
tgacagctta gctgctttgc aagaggggccc cccatcctgc ccagagccg gtcaagagac 3120
ttaccgctgg cgccgcgcgt gaccagcagc gacgcgttaa gacgaggaca cgtccagcca 3180
catggacaag aaaacaaaaa aacaaaacca agaaacgttt gggcaactgg aaaaaaacgt 3240
ggccacagca gtccaagatg atcgctccgc aacagacgtc catcgcgga atcttgccgg 3300
agcggccacc ccaaactgac catgagaaac aaatcaccac cacaaaaaag agaattccaa 3360
cagagcctga ccatcgacac gcgggggggg gggcagcaac gcgctcgttc ccgggggctc 3420
acccccgccc actgactcca gcacggagcc cgtgggcca cactacctg cgcagcggct 3480
ggaatggggg gtccatgttc acgcacaggc cctggccaag accagctcc atcattggca 3540
aagccagccc caagtcaagg tcgacgtcgg cgttcgcgtt cgcgtctgcg tcggcgtcag 3600
catcagcgtc cgaattgtca gccatgcgg ccctgcccc gtagtccaca tcacgaatgc 3660
tcgtcgggct gtgcccacc cactgtgcgc tgctctctcc ggattcatcc cgtgtccatg 3720
acgctgcctc cattcgagga nnagactgtc gccagcaaca ccgg 3764

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

7/14

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer PYEFRT1

<400> 4

tcgacctacc ggttggtgc

19

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer PYEFR1

<400> 5

ctgcgagggtg cccgtgatca t

21

<210> 6

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer PYEFRT4

<400> 6

8/14

ccgccgatta cgtcttgag

19

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer PYEF1

<400> 7

ggctccttca agtacgctg g

21

<210> 8

<211> 449

<212> PRT

<213> Porphyra yezoensis Ueda

<220>

<223> Amino acid sequence of A1

<400> 8

Met Gly Lys Glu Lys Gln His Val Ser Ile Val Val Ile Gly His Val

1

5

10

15

Asp Ser Gly Lys Ser Thr Thr Thr Gly His Leu Ile Tyr Lys Cys Gly

20

25

30

9/14

Gly Ile Glu Lys Arg Ala Ile Glu Lys Phe Glu Lys Glu Ala Ala Glu
35 40 45

Met Gly Lys Gly Ser Phe Lys Tyr Ala Trp Val Leu Asp Lys Leu Lys
50 55 60

Ala Glu Arg Glu Arg Gly Ile Thr Ile Asp Ile Ala Leu Trp Lys Phe
65 70 75 80

Glu Thr Glu Lys Tyr Ser Phe Thr Ile Ile Asp Ala Pro Gly His Arg
85 90 95

Asp Phe Ile Lys Asn Met Ile Thr Gly Thr Ser Gln Ala Asp Leu Ala
100 105 110

Ile Leu Val Ile Ala Ser Pro Pro Gly Glu Phe Glu Ala Gly Ile Ser
115 120 125

Gln Asn Gly Gln Thr Arg Glu His Ala Leu Leu Ala Tyr Thr Leu Gly
130 135 140

Val Lys Gln Met Ile Val Ala Cys Asn Lys Met Asp Asp Lys Asn Val
145 150 155 160

Asn Trp Ser Gln Asp Arg Tyr Glu Glu Val Ser Lys Glu Met Asp Leu
165 170 175

Tyr Leu Lys Lys Val Gly Tyr Asn Pro Ala Lys Val Pro Lys Val Pro

10/14

180	185	190
Thr Ser Gly Trp Thr Gly Glu Asn Leu Phe Glu Arg Thr Asp Lys Thr		
195	200	205
His Ala Leu Gly Lys Trp Tyr Lys Gly Pro Cys Leu Leu Glu Ala Leu		
210	215	220
Asp Asn Cys Asp Pro Pro Lys Arg Pro Val Asp Lys Pro Leu Arg Leu		
225	230	235
240		
Pro Leu Gln Asp Val Tyr Lys Ile Gly Gly Ile Gly Thr Val Pro Val		
245	250	255
Gly Arg Val Glu Thr Gly Leu Ile Lys Pro Gly Met Val Val Thr Phe		
260	265	270
Ala Pro Ser Gly Leu Ser Thr Glu Val Lys Ser Val Glu Met His His		
275	280	285
Glu Ala Leu Pro Gln Ala Gly Pro Gly Asp Asn Val Gly Phe Asn Val		
290	295	300
Lys Asn Val Ser Val Lys Asp Leu Lys Arg Gly Tyr Val Cys Gly Asp		
305	310	315
320		
Ser Lys Asn Asp Pro Pro Lys Gly Cys Ala Ser Phe Asn Ala Gln Val		
325	330	335

11/14

Ile Ile Leu Asn His Pro Gly Glu Ile His Ala Gly Tyr Ala Pro Val
340 345 350

Leu Asp Cys His Thr Ala His Ile Ala Cys Lys Phe Ser Glu Leu Ile
355 360 365

Leu Lys Met Asp Arg Arg Ser Gly Lys Lys Leu Glu Asp Thr Pro Lys
370 375 380

Met Ile Lys Ser Gly Asp Ala Ala Met Val Lys Met Val Ala Ser Lys
385 390 395 400

Pro Met Cys Val Glu Ala Phe Thr Gln Tyr Pro Pro Leu Gly Arg Phe
405 410 415

Ala Val Arg Asp Met Arg Gln Thr Val Ala Val Gly Val Ile Lys Ser
420 425 430

Val Glu Lys Lys Glu Val Glu Gly Lys Met Thr Lys Ser Ala Ala Lys
435 440 445

Lys

<210> 9

<211> 773

<212> DNA

<213> Porphyra yezoensis Ueda

<220>

12/14

<223> Promotor region of A2 gene

<400> 9

```
aagcttcgct gccaggctct ccatcagcga cttgcggtcg gtgctgtttg gggaccggcg 60
ggaagcgcac cagaatgtgg ggggagacag gcagggtca gagacacgag tggagagcat 120
tgatcagtaa cagtcgcacg tcagactggg tctgcgtggg gccacgaaag cgcaaaaatg 180
ggcctagcag gcgccgtcaa ctttctcaag ctacagagcg cgcaggctg cacacccccg 240
aggcgacggc cagtagcacc tgcgccacgg agacaccgtc tctgctaac atacggttgt 300
tcgtccgcca tcgagaacag ctaggtacag aataccacga ggaagggaag aaaagccttg 360
aatggcaaag ggtggtcgaa ggcaagccag agagggacgt tctacatgca ccaagccag 420
taggagcgca ctacgcgta agcggtcgcc gaaagagggg gggcgacca cgctcgtcac 480
tgcaggttgt attgtgccgg tccgcaactg ccactggcgg tgtttgtcaa gcggccacca 540
cgagtctcga gggctcagca attgcaccgc tggcacgcag aatgtggcct tccccagtt 600
tacagtggtc cttttccccg aaagcatccc taaaaaaagg aattgagcga cggcgacgcc 660
gaccgacgtc cgcggcggcg gccacaggcg agggacggag gaccaccggc cttttaaatg 720
ggcgtcgaag accacgtgct cggcacacca ccccgtcgac atcgctatcg tac 773
```

<210> 10

<211> 454

<212> DNA

<213> *Porphyra yezoensis* Ueda

<220>

<223> Intron 1 of A2 gene

<400> 10

```
gtacgttttt tttatcctcc cgccgctcag cctcccgtta ctcccgcgca tacgtgtggg 60
cgtgggtgac ctgggtgcgc gcatgggcgt ttccttcctt gccggtgtgc cgagtaacgg 120
ctggctgggt tgggtggctc aacctttgtg ggagagggtc gcacctttgc accagctggg 180
```

13/14

gtggtttgcc gatatgaccaa caggctcggc aatacggatc attgtccgac tactggcgtc 240
 ggggtgcatt caggcatgcg gacactggaa gaagatcagt ggtggcgccc cggcagttgt 300
 cgttggctcct ctggtatatg cgttcgacag ttgatcatct cttctgggtga agattgctga 360
 cgctctccgg tctcttgcaac tgttgtgggtg attgtttggg cgcatgttct attcttctga 420
 tctgatcggt cctactgtcg acggcggatc acag 454

<210> 11

<211> 803

<212> DNA

<213> *Porphyra yezoensis* Ueda

<220>

<223> Terminator region of A2 gene

<400> 11

gaaaaaaaca ttgctttcgt acgccactgg tcaacatgga tattgaacga ggacggtgaa 60
 gactccgtgg ggcgccagga atgcgtgac agactttctt gacagcttag ctgctttgca 120
 agagggggcg ccactctgcc ccagagccgg tcaagagact taccgctggc gccgcgcatg 180
 accagcagcg acgcgttaag acgaggacac gtccagccac atggacaaga aaacaaaaaa 240
 aaaaaccaa gaaacgtttg ggcaactgga caaaaacgtg gccacagcag tccaagatga 300
 tcgctccgca acagacgtcc atgcgggcaa tcttgccgga gcggccaccc caaacgtgcc 360
 atgagaaaca aatcaccacc aaaaaaaga gaattccaac agagcctgac catcgacacg 420
 cggggggggg ggcagcaacg cgctcgttcc cggggggtca ccccgccca ctgactccag 480
 cacggagccc gtgggccaac cactacctgc gcagcggctg gaatgggggg tccatgttca 540
 cgcacaggcc ctggccaaga ccagctcca tcattggcaa agccagcccc aagtcaaggt 600
 cgacgtcggc gttcgcgttc gcgtctgcgt cggcgtcagc atcagcgtcc gaattgtcag 660
 ccatgccggc cctgcccccg tagtccacat cacgaatgct cgtcgggctg tgcccccccc 720
 actgtgcgct gctctctccg gattcatccc gtgtccatga cgctgcctcc attcgaggan 780
 nagactgtcg ccagcaacac cgg 803

14/14

<210> 12

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer EF47X2

<400> 12

ggtctagaaa gacgggtacg atagcga

27

<210> 13

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer EF47X

<400> 13

cctctagact tctccttccc catgatga

28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/02112

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/09, A01H13/00, C12N15/82, C12N7/00

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/09, A01H13/00, C12N15/82, C12N7/00

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

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

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Liu QY et al., Elongation factor 1 alpha genes of the red alga Porphyra purpurea include a novel, developmentally specialized variant, Plant Mol. Biol., 1996, Vol.31(1), pages 77 to 85	1-18
Y	SAGA N. et al., Cryopreservation of clonal gametophytic thalli of porphyra(Rhodophyta), Plant Sci, 1996, Vol.116, pages 117 to 124	1-18
A	NIKAIDO I. et al., Generation of 10, 154 expressed sequence tags from a leafy gametophyte of a marine red alga, Porphyra yezoensis, DNA Res., 2000, Vol.7(3), pages 223 to 227	1-18
A	Lee EK et al., Analysis of expressed sequence tags of Porphyra yezoensis, Mol.Cells, 2000, Vol.10(3), pages 338 to 342	1-18



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

"T"

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

"X"

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

"Y"

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

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

01 May, 2003 (01.05.03)

Date of mailing of the international search report

17 June, 2003 (17.06.03)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/02112

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	FUKUDA S. et al., Isolation, characterization and expression of a cDNA encoding an elongation factor -1 from phophyra yezoensis (Bangiales, Rhodophyta), Phycological Res., 2002, Vol.50, pages 11 to 15	1-18

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ C12N15/09 A01H13/00 C12N15/82 C12N7/00		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ C12N15/09 A01H13/00 C12N15/82 C12N7/00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
SwissProt/PIR/GeneSeq Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq MEDLINE (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Liu QY et al., Elongation factor 1 alpha genes of the red alga Porphyra purpurea include a novel, developmentally specialized variant, Plant Mol Biol., 1996, Vol.31(1), p. 77-85	1-18
Y	Saga N et al., Cryopreservation of clonal gametophytic thalli of porphyra (Rhodophyta), Plant Sci, 1996, Vol. 116, p. 117-124	1-18
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 01.05.03	国際調査報告の発送日 17.06.03	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 光本 美奈子 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Nikaido I et al., Generation of 10,154 expressed sequence tags from a leafy gametophyte of a marine red alga, <i>Porphyra yezoensis</i> , DNA Res, 2000, Vol.7(3), p.223-227	1-18
A	Lee EK et al., Analysis of expressed sequence tags of <i>Porphyra yezoensis</i> , Mol Cells, 2000, Vol.10(3), p.338-342	1-18
PX	Fukuda S et al., Isolation, characterization and expression of a cDNA encoding an elongation factor-1 from <i>Porphyra yezoensis</i> (Bangiales, Rhodophyta), Phycological Res, 2002, Vol.50, p.11-15	1-18