

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4312012号

(P4312012)

(45) 発行日 平成21年8月12日 (2009. 8. 12)

(24) 登録日 平成21年5月22日 (2009. 5. 22)

(51) Int. Cl.

F I

A O 1 H 5/00 (2006. 01)

A O 1 H 5/00 A

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C O 7 K 14/415 (2006. 01)

C O 7 K 14/415

C 1 2 N 5/10 (2006. 01)

C 1 2 N 5/00 C

C 1 2 Q 1/68 (2006. 01)

C 1 2 Q 1/68 A

請求項の数 3 (全 25 頁)

(21) 出願番号 特願2003-322051 (P2003-322051)

(22) 出願日 平成15年9月12日 (2003. 9. 12)

(65) 公開番号 特開2005-87033 (P2005-87033A)

(43) 公開日 平成17年4月7日 (2005. 4. 7)

審査請求日 平成18年4月26日 (2006. 4. 26)

(73) 特許権者 000003207

トヨタ自動車株式会社

愛知県豊田市トヨタ町1番地

(73) 特許権者 591060980

岡山県

岡山県岡山市北区内山下2丁目4番6号

(74) 代理人 100091096

弁理士 平木 祐輔

(74) 代理人 100118773

弁理士 藤田 節

(74) 代理人 100096183

弁理士 石井 貞次

(72) 発明者 伊藤 寿

岡山県倉敷市中庄3120-7

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 パラコート (登録商標) 耐性遺伝子並びに維管束及びトライコーム特異的プロモーター

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードする遺伝子と外来遺伝子又は外来DNA断片とを含む組換えベクターを植物に導入し、パラコート(登録商標)耐性を指標として、形質転換植物を選抜する方法。

(a) 配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(b) 配列番号2に記載のアミノ酸配列における1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、パラコート(登録商標)耐性を付与するタンパク質。

【請求項2】

以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードする遺伝子を含む組換えベクターを植物に導入し、該植物にパラコート(登録商標)耐性を付与する方法。

(a) 配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(b) 配列番号2に記載のアミノ酸配列における1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、パラコート(登録商標)耐性を付与するタンパク質。

【請求項3】

以下の(a)、(b)又は(c)のDNAを含む維管束及びトライコーム特異的プロモーターを利用した遺伝子発現方法であって、該プロモーターの下流に外来遺伝子又は外来DNA断片を含む組換えベクターを植物に導入し、維管束及びトライコーム特異的に該外来遺伝子又は外

来DNA断片を発現させることを含む、前記方法。

(a) 配列番号3の塩基配列からなるDNA。

(b) 配列番号3の塩基配列において1若しくは複数の塩基が置換、欠失又は付加された塩基配列からなり、かつ維管束及びトライコーム特異的プロモーターとして機能するDNA。

(c) 配列番号3の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ維管束及びトライコーム特異的プロモーターとして機能するDNA。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、パラコート(登録商標)(以下、(登録商標)を省略)耐性を付与するパラコート耐性遺伝子並びに維管束及びトライコーム特異的プロモーターに関する。

【背景技術】

【0002】

植物は、日ごろより低温、乾燥、強光、塩、大気汚染ガス、病原菌等の様々な環境ストレスにさらされている。そして、これら環境ストレス下でも十分生育できる有用な植物、例えば穀物などが開発できれば、環境ストレスにより穀物が生育できない地域においても食料生産が可能となり、将来予想されている深刻な食糧危機への備えとなる可能性が高い。このため、これら環境ストレスに対する耐性が向上した植物の作出が世界的に繰り返されてきた。例えば、低温耐性(Nature, 356, 710-703, 1992、Plant Physiol., 105, 601-605, 1994)、乾燥耐性(Plant Physiol., 107, 125-130, 1995、Nature, 379, 683-684, 1996、Nature Biotech., 17, 287-291, 1999)、塩耐性(Science, 259, 508-510, 1993、Biotechnology, 14, 177-180, 1996、Plant J., 12, 133-142, 1997)、大気汚染物質耐性(Plant Cell Physiol., 34, 129-135, 1993、Biotechnology, 12, 165-168, 1994)、病害抵抗性(化学と生物, 37, 295-305, 385-392, 1999)等を遺伝子組換え技術により付与された植物が作出されている。また遺伝子組換え技術により農業耐性(Nature, 317, 741-744, 1985、Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 85, 391-395, 1988、EMBO J., 6, 2513-2518, 1987、EMBO J., 7, 1241-1248, 1988)を付与された植物は実用化されているものもある。

【0003】

これら環境ストレスは、生体内の活性酸素分子種(スーパーオキシドラジカル: $O_2^{\cdot-}$ 、過酸化水素: H_2O_2 、ヒドロキシラジカル: $OH^{\cdot}$)の発生と密接に関係している。活性酸素分子種は、呼吸、光合成、環境ストレス等により発生し、タンパク質、核酸、膜構造等を過度に酸化することにより細胞に致命的な障害を与える。遺伝子組換え技術により作出された活性酸素耐性植物が、これら環境ストレス耐性の向上につながった報告も見られる(Plant Physiol., 111, 1177-1181, 1996、FEBS Letters, 428, 47-51, 1998)。

【0004】

活性酸素耐性植物の作出には、主に活性酸素分子種の消去系酵素(スーパーオキシドディスムターゼ、ペルオキシダーゼ、カタラーゼ及びグルタチオンレダクターゼ等)の遺伝子を植物に導入する方法がとられている。

【0005】

パラコートは、光化学系で活性酸素を連続的に発生させ、全ての植物を枯死させる非選択性で、かつ強力な除草剤である。そこで、活性酸素耐性の指標としてパラコート耐性を用いることができ、植物のパラコート耐性の機構に関する解析が行われてきた(非特許文献1~3)。

【0006】

一方、パラコートに耐性を付与する遺伝子として、細胞死抑制遺伝子(特許文献1~3)、アルドースレダクターゼ相同タンパク質遺伝子(特許文献4)及び鉄結合性タンパク質(フェリチン)遺伝子(特許文献5)が開示されている。また、特許文献6及び7には、パラ

10

20

30

40

50

コートに耐性を付与する遺伝子としてパラコート耐性カルス由来のペルオキシダーゼが開示されている。

【0007】

強力なパラコート耐性を付与するパラコート耐性遺伝子が単離されれば、様々な環境ストレス（低温、乾燥、強光、塩、大気汚染ガス、病原菌等）条件下で発生する活性酸素に対して耐性の高い植物の開発に有用であると信じられてきた。しかし、最近、活性酸素は植物の成長やストレス応答を制御する分子として重要な存在であることが解明されてきている。したがって、収穫量等の重要な形質に影響を与えないためには、植物における活性酸素による生長・生理制御機構に影響を与えずに、パラコート等のストレスに対して耐性を高めさせることが重要である。

10

【0008】

一方、維管束は、シダ植物及び種子植物の茎、葉、根などの各器官を貫いて分化した条束状の組織系である。維管束の構成要素は、木部及び篩部であり、これら木部及び篩部が水分や体内物質移動の通路となっている。また、維管束間形成層及び維管束内形成層を含む維管束形成層が、維管束には存在する。この維管束形成層は、細胞増殖の場所であり、すなわち、植物の生長に非常に重要な場所である。このように、維管束は、水分及び体内物質移動並びに細胞増殖等に関与する場所である。従って、水分若しくは体内物質移動又は細胞増殖に関与する遺伝子を植物に導入し、維管束特異的に発現できれば、水分若しくは体内物質移動又は細胞増殖を制御することができる。

【0009】

20

さらに、植物病害の観点からみると、維管束は、ナス科の植物に感染する青枯病菌が増殖及び移動する場所である。また、植物ウイルスが植物に感染した際に、葉から上位にある葉へ植物ウイルスが長距離移行し、植物の全身感染を引き起こす移行場所でもある。従って、菌若しくは植物ウイルスの増殖又は移動に関与する遺伝子を植物に導入し、維管束特異的に発現できれば、菌及び植物ウイルスから植物を防御することもできる。

【0010】

一方、トライコームは、植物体の葉、茎及びがく片などの表面に存在する毛状の突起物である。トライコームは、植物体表面からの分泌及び排出に関与する。例えば、植物に重金属(カドミウム)ストレスにさらすと、葉表面のトライコーム数が増加し、葉の表面にカドミウムやカルシウムを含む結晶が付着する、すなわち、トライコームからカドミウムが排出されることが報告されている(Planta, 213 (1), 45-50, 2001, May)。また、トライコームは、植物を侵す糸状菌、細菌及び虫などが最初に接触する場所でもある。また、病虫害の防御として、例えばトライコームの1つである、バラ科のハマナスの腺毛、腺状突起からは、抗微生物活性及び摂食阻害効果を有する液が分泌されている。従って、重金属等の排出に関与する遺伝子、又は抗微生物活性若しくは摂食阻害効果を有する液の分泌に関与する遺伝子を植物に導入し、トライコーム特異的に発現できれば、重金属を植物から効率的に排出したり、又は植物を侵す糸状菌、細菌若しくは虫から植物を効果的に防御することができる。

30

【0011】

以上のように維管束又はトライコームで特異的な遺伝子発現を行うことが望まれる。特異的な遺伝子発現を行う方法としては、維管束又はトライコームで特異的なプロモーター活性を示すプロモーターの使用が考えられる。なお、維管束及びトライコームの双方で特異的にプロモーター活性を示すプロモーターは、今日同定されていない。

40

【0012】

【特許文献1】特開平10-309142号公報

【特許文献2】特開2000-23583号公報

【特許文献3】特開2002-300822号公報

【特許文献4】特表2001-523466号公報

【特許文献5】特表2001-519671号公報

【特許文献6】特開2002-281979号公報

50

【特許文献7】特開2001-95585号公報

【非特許文献1】Pestic. Biochem. Physiol., 26, 22-28, 1986

【非特許文献2】Theor. Appl. Genet. 75, 850-856, 1988

【非特許文献3】Plant Physiol., 91, 1174-1178, 1989

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

本発明は、シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)の遺伝子を同定、分析することにより、例えば、パラコート耐性遺伝子並びに維管束及びトライコーム特異的プロモーターを提供することを目的とする。

10

【課題を解決するための手段】

【0014】

上述した目的を達成した本発明は以下を包含する。

(1) 以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードする遺伝子。

(a) 配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(b) 配列番号2に記載のアミノ酸配列における1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、パラコート耐性を付与するタンパク質。

(2) (1) 記載の遺伝子によりコードされるパラコート耐性を付与するタンパク質。

(3) (1) 記載の遺伝子を含む組換えベクター。

(4) さらに外来遺伝子又は外来DNA断片を含むことを特徴とする(3) 記載の組換えベクター。

20

(5) (3) 又は(4) 記載の組換えベクターを有する形質転換体。

(6) (3) 又は(4) 記載の組換えベクターを有し、かつパラコート耐性を有する植物体。

(7) (4) 記載の組換えベクターを植物に導入し、パラコート耐性を指標として、形質転換植物を選抜する方法。

(8) 以下の(a)、(b)又は(c)のDNAを含む、維管束及びトライコーム特異的プロモーター。

(a) 配列番号3の塩基配列からなるDNA。

(b) 配列番号3の塩基配列において1若しくは複数の塩基が置換、欠失又は付加された塩基配列からなり、かつ維管束及びトライコーム特異的プロモーターとして機能するDNA。

30

(c) 配列番号3の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ維管束及びトライコーム特異的プロモーターとして機能するDNA。

(9) (8) 記載の維管束及びトライコーム特異的プロモーターを含む組換えベクター。

(10) 上記維管束及びトライコーム特異的プロモーターの下流に外来遺伝子又は外来DNA断片を含むことを特徴とする(9) 記載の組換えベクター。

(11) 上記外来遺伝子が(1) 記載の遺伝子であることを特徴とする(10) 記載の組換えベクター。

40

(12) (9) ～(11) のいずれか1記載の組換えベクターを有する形質転換植物。

【発明の効果】

【0015】

本発明によりパラコート耐性遺伝子並びに維管束及びトライコーム特異的プロモーターを提供される。本発明に係るパラコート耐性遺伝子は、様々な環境下における活性酸素の発生によって制御を受ける生長制御に影響を与えることなく、パラコートに特異的な耐性を付与することができる。

【0016】

また、本発明に係る維管束及びトライコーム特異的プロモーターにより、植物の維管束及びトライコームにおいて遺伝子発現を制御することができる。

50

【発明を実施するための最良の形態】

【0017】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明に係る遺伝子は、以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードする遺伝子である。

(a) 配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(b) 配列番号2に記載のアミノ酸配列における1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、パラコート耐性を付与するタンパク質。

(a)に記載のタンパク質をコードする遺伝子は、配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるパラコート耐性を付与するタンパク質をコードする遺伝子(以下、「AtMVR遺伝子」という)である。

【0018】

なお、AtMVR遺伝子の塩基配列に基づいて、シロイヌナズナ全塩基配列データベース(例えば、GenBank、EMBL、DDBJ、tair:The Arabidopsis Information Resource)上で検索したところ、シロイヌナズナゲノム上には、AtMVR遺伝子には、13個のAtMVR相同遺伝子が存在する(AtMVR3-1~AtMVR3-13)。各AtMVR相同遺伝子の塩基配列及び該AtMVR相同遺伝子がコードする推定アミノ酸配列は、以下の表1に示す配列番号で示される。また、AtMVR遺伝子と各AtMVR相同遺伝子との相同性分析の結果を表1に示す。なお、相同性分析は、アミノ酸レベルでBLAST Pを用いて行っている。アミノ酸は側鎖の化学的性質に基づいて分類され、BLOSUM62アミノ酸置換行列(Proc. Natl. Acad. Sci., 89, 10915-10919, 1992)では、メルカプト基(C)、分子量が小さくて親水性(S・T・P・A・G)、酸・酸アミド・親水性(N・D・E・Q)、塩基性(H・R・K)、分子量が小さくて疎水性(M・I・L・V)、芳香族(F・Y・W)に分類されている。Identitiesは、アミノ酸として100%一致を意味し、Positivesは、100%一致に、BLOSUM62アミノ酸置換行列における正のスコアのアミノ酸を加えたものを含めた数値である(バイオインフォマティクス、岡崎康司/坊農秀雄監訳(発行者メディカル・サイエンス・インターナショナル)参照)。

【0019】

【表1】

AtMVR 相同遺伝子名	塩基配列	アミノ酸配列	Identities(%)	Positives (%)
AtMVR3-1	配列番号 4	配列番号 5	57	70
AtMVR3-2	配列番号 6	配列番号 7	55	69
AtMVR3-3	配列番号 8	配列番号 9	39	56
AtMVR3-4	配列番号 10	配列番号 11	39	55
AtMVR3-5	配列番号 12	配列番号 13	37	54
AtMVR3-6	配列番号 14	配列番号 15	36	52
AtMVR3-7	配列番号 16	配列番号 17	34	52
AtMVR3-8	配列番号 18	配列番号 19	34	51
AtMVR3-9	配列番号 20	配列番号 21	37	58
AtMVR3-10	配列番号 22	配列番号 23	25	44
AtMVR3-11	配列番号 24	配列番号 25	33*	51*
AtMVR3-12	配列番号 26	配列番号 27	25	41
AtMVR3-13	配列番号 28	配列番号 29	22	41

*AtMVR11 との比較は、AtMVR11 の部分配列との相同性の結果である。

【0020】

表1に示されるように、AtMVRと13個のAtMVR相同性遺伝子との相同性は、Identitiesで22~57%、Positivesで41~70%である。これらAtMVR相同遺伝子は、AtMVR遺伝子と同様にパラコート耐性を付与すると考えられる。

【0021】

また、AtMVR遺伝子は、senescence-associated protein、DSA 5(GenBank登録番号AF082030)(Plant Molecular Biology 40:237-248, 1999)に相同性を有する。BLAST Xによる相同性分析の結果、AtMVR遺伝子がコードするタンパク質とDSA 5がコードするタンパク質とは、アミノ酸レベルで89%の同一性を有する。このDSA 5は、ユリ(Hemerocallis hybrid cultivar)の花弁が老化する際に発現する遺伝子であると報告されている(Plant Molecular Biology 40:237-248, 1999)。しかしながら、DSA 5がコードするタンパク質は、既知のタンパク質と相同性がないことから、いずれの機能を有するかは不明である。従って、AtMVR遺伝子は、パラコート耐性を付与する新規な遺伝子である。

【0022】

ここで「パラコート耐性」とは、パラコートに対して耐性を有することを意味する。すなわち、パラコート耐性植物とは、所定のパラコートによる効果を得るために非耐性植物より多くのパラコートを必要とする植物を意味する。パラコートは、光化学系で活性酸素を連続的に発生させ、全ての植物を枯死させる非選択性で、かつ強力な除草剤である。AtMVR遺伝子が、パラコート耐性を付与するパラコート耐性遺伝子であることは、該遺伝子を導入した形質転換体がパラコート存在下で、生育することができるか否かにより確認できる。

【0023】

(b)に記載のタンパク質をコードする遺伝子は、配列番号2に記載のアミノ酸配列において1又は数個(例えば1~10個、1~5個)のアミノ酸が置換、欠失または付加されたアミノ酸配列からなり、かつパラコート耐性を付与するタンパク質をコードする遺伝子である。

【0024】

一旦本発明に係る遺伝子の塩基配列が確定されると、その後は化学合成によって、又はクローニングされたクローンを鋳型としたPCRによって、あるいは該塩基配列を有するDNA断片をプローブとしてハイブリダイズさせることによって、本発明に係る遺伝子を得ることができる。さらに、部位特異的突然変異誘発法等によって本発明に係る遺伝子の変異型であって、変異前と同等の機能を有するものを合成することができる。

【0025】

なお、本発明に係る遺伝子に変異を導入する方法としては、Kunkel法、Gapped duplex 法等の公知の手法又はこれに準ずる方法が挙げられる。例えば部位特異的突然変異誘発法を利用した変異導入用キット(例えばMutant-K(TAKARA社製)やMutant-G(TAKARA社製))などを用いて、あるいは、TAKARA社のLA PCR in vitro Mutagenesis シリーズキットを用いて変異の導入が行われる。

【0026】

本発明に係るパラコート耐性を付与するタンパク質は、本発明に係る遺伝子によりコードされるタンパク質である。例えば、本発明に係る遺伝子は大腸菌等に由来するベクターに組み込み、次に得られた組換えベクターで大腸菌を形質転換する。その後、大腸菌内で合成されたタンパク質を抽出することで、本発明に係るタンパク質を得ることができる。

【0027】

さらに本発明に係る組換えベクターは、本発明に係る遺伝子を含む組換えベクターである。適当なベクターに本発明に係る遺伝子を挿入することにより、本発明に係る組換えベクターを得ることができる。本発明に係る遺伝子を挿入するためのベクターは、宿主中で複製可能なものであれば特に限定されず、例えばプラスミド、シャトルベクター、ヘルパープラスミドなどが挙げられる。また該ベクター自体に複製能がない場合には、宿主の染色体に挿入することなどによって複製可能となるDNA断片であってもよい。

【0028】

プラスミドDNAとしては、大腸菌由来のプラスミド(pBI221など、例えばpET30bなどのpET系、pBR322およびpBR325などのpBR系、pUC118、pUC119、pUC18およびpUC19などのpUC系、pBluescript、pBI221等)、枯草菌由来のプラスミド(例えばpUB110、pTP5等)、アグロバクテリウム・ツメファシエンズ由来のバイナリープラスミド(例えば、pBIN19由来のpB

I系、pBI101、pBI121等）、酵母由来のプラスミド（例えばYEp13などのYEp系、YCp50などのYCp系等）などが挙げられる。またファージDNAとしては、 λ ファージ（Charon4A、Charon21A、EMBL3、EMBL4、 λ gt10、 λ gt11、 λ ZAP等）が挙げられる。さらに、レトロウイルス又はワクシニアウイルスなどの動物ウイルス、カリフラワーモザイクウイルスなどの植物ウイルス、またはバキュロウイルスなどの昆虫ウイルスベクターを用いることもできる。

【0029】

ベクターに本発明に係る遺伝子を挿入するには、まず適当な制限酵素で本発明に係る遺伝子のcDNAを切断し、次いで適当なベクターDNAの制限酵素部位又はマルチクローニングサイトに挿入してベクターに連結する方法が用いられる。またベクターと本発明に係る遺伝子のcDNAのそれぞれ一部に相同な領域を持たせることにより、PCRなどを用いたin vitro法または酵母などを用いたin vivo法によって両者を連結する方法であってもよい。

10

【0030】

また、本発明に係る組換えベクターは、本発明に係る遺伝子の他に外来遺伝子又は外来DNA断片を含むことができる。外来遺伝子又は外来DNA断片を挿入する方法は、ベクターに本発明に係るDNA断片を挿入する方法と同様である。外来遺伝子又は外来DNA断片としては、いずれの遺伝子又はDNA断片であってもよい。このことにより、例えばカナマイシン又はハイグロマイシンなどに対する抗生物質耐性遺伝子のように、本発明に係る遺伝子をパラコート耐性を指標とする選択マーカー遺伝子として使用できる。

20

【0031】

本発明に係る形質転換体は、本発明に係る組換えベクターを有する形質転換体である。本発明に係る形質転換体は、本発明に係る組換えベクターを宿主中に導入することにより得ることができる。宿主としては、本発明に係る遺伝子を発現できるものであれば特に限定されるものではないが、植物が好ましい。宿主が植物である場合は、形質転換植物（トランスジェニック植物）は以下のようにして得ることができる。

【0032】

本発明において形質転換の対象となる「植物」とは、植物全体、植物器官(例えば葉、花卉、茎、根、種子等)、植物組織(例えば表皮、師部、柔組織、木部等)又は植物培養細胞のいずれをも意味する。形質転換に用いられる植物としては、イネ科、アブラナ科、ナス科、マメ科等に属する植物（下記参照）が挙げられるが、これらの植物に限定されるものではない。

30

イネ科：イネ(*Oryza sativa*)、トウモロコシ(*Zea mays*)

アブラナ科：シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)

ナス科：タバコ (*Nicotiana tabacum*)

マメ科：ダイズ(*Glycine max*)

【0033】

本発明に係る組換えベクターは、通常の形質転換方法、例えば電気穿孔法（エレクトロポレーション法）、アグロバクテリウム法、パーティクルガン法、PEG法等によって植物中に導入することができる。

【0034】

40

例えばエレクトロポレーション法を用いる場合は、パルスコントローラーを備えたエレクトロポレーション装置により、電圧500～1600V、25～1000 μ F、20～30msecの条件で処理し、本発明に係る組換えベクターを宿主に導入する。

【0035】

また、パーティクルガン法を用いる場合は、植物全体、植物器官、植物組織自体をそのまま使用してもよく、切片を調製した後に使用してもよく、またはプロトプラストを調製して使用してもよい。次いで遺伝子導入装置（例えばBio-Rad社のPDS-1000/He等）を用いて、調製した試料を処理することができる。処理条件は植物又は試料により異なるが、通常は450～2000psi程度の圧力、3～12cm程度の距離で行う。

【0036】

50

アグロバクテリウムのTiプラスミド又はRiプラスミドを利用する方法においては、アグロバクテリウム(*Agrobacterium*)属に属する細菌が植物に感染すると、それが有するプラスミドDNAの一部を植物ゲノム中に移行させるという性質を利用して、本発明に係る遺伝子を植物宿主に導入する。アグロバクテリウム属に属する細菌のうちアグロバクテリウム・ツメファシエンス(*Agrobacterium tumefaciens*)は、植物に感染してクラウンゴールと呼ばれる腫瘍を形成する。またアグロバクテリウム・リゾゲネス(*Agrobacterium rhizogenes*)は、植物に感染して毛状根を発生させる。これらは、感染の際にTiプラスミド又はRiプラスミド上のT-DNA領域(Transferred DNA)と呼ばれる領域が植物中に移行し、植物のゲノム中に組み込まれることに起因するものである。従って、Ti又はRiプラスミド上のT-DNA領域中に植物ゲノム中に組み込みたいDNAを挿入する。次いでアグロバクテリウム属の細菌を植物宿主に感染させると、植物ゲノム中に該DNAを組み込むことができる。

10

【0037】

植物宿主へのアグロバクテリウム属の細菌の形質転換方法としては、例えば上記で説明した電気穿孔法(エレクトロポレーション法)、パーティクルガン法、PEG法の他に、*in planta*法が挙げられる。*in planta*法としては、例えば、アグロバクテリウム直接注入法及び浸潤法が挙げられる。

【0038】

形質転換の結果得られる腫瘍組織やシュート、毛状根などは、そのまま細胞培養、組織培養又は器官培養に用いることが可能である。また従来知られている植物組織培養法を用い、適当な濃度の植物ホルモン(オーキシン、サイトカイニン、ジベレリン、アブシジン酸、エチレン、ブラシノライド等)の投与などにより植物体に再生させることができる。

20

【0039】

また、植物ウイルスをベクターとして利用することによって、本発明に係る遺伝子を植物に導入することができる。利用可能な植物ウイルスとしては、例えば、カリフラワーモザイクウイルスが挙げられる。まず、ウイルスゲノムを大腸菌由来のベクターなどに挿入して組換え体を調製した後、ウイルスのゲノム中に本発明に係る遺伝子を挿入する。このようにして修飾されたウイルスゲノムを制限酵素によって組換え体から切り出し、植物宿主に接種することによって、本発明に係る遺伝子を植物宿主に導入することができる。

【0040】

本発明に係る組換えベクターは、上記植物宿主に導入するのみならず、大腸菌(*Escherichia coli*)等のエッシェリヒア属、バチルス・ズブチリス(*Bacillus subtilis*)等のバチルス属、又はシュードモナス・プチダ(*Pseudomonas putida*)等のシュードモナス属に属する細菌、サッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロミセス・ポンベ(*Schizosaccharomyces pombe*)等の酵母、COS細胞、CHO細胞等の動物細胞、あるいはSf9等の昆虫細胞などに導入することもできる。大腸菌、酵母等の細菌を宿主とする場合は、本発明に係る組換えベクターは該細菌中で自律複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、転写終結配列および本発明に係る遺伝子により構成されていることが好ましい。また、プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

30

【0041】

細菌への本発明に係る組換えベクターの導入方法は、細菌にDNAを導入する方法であれば特に限定されず、例えばカルシウムイオンを用いる方法、エレクトロポレーション法等が挙げられる。

40

【0042】

酵母への本発明に係る組換えベクターの導入方法は、酵母にDNAを導入する方法であれば特に限定されず、例えばエレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法等が挙げられる。

【0043】

動物細胞を宿主とする場合は、サル細胞COS-7、Vero、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO細胞)、マウスL細胞などが用いられる。動物細胞への本発明に係る組換えベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であれば特に限定されず、例えば

50

エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等が挙げられる。

【0044】

昆虫細胞を宿主とする場合は、Sf9細胞などが用いられる。昆虫細胞への本発明に係る組換えベクターの導入方法としては、昆虫細胞にDNAを導入する方法であれば特に限定されず、例えばリン酸カルシウム法、リポフェクション法、エレクトロポレーション法などが挙げられる。

【0045】

一方、PCR法、サザンハイブリダイゼーション法、ノーザンハイブリダイゼーション法等によって、本発明に係る遺伝子が宿主に組み込まれたか否かの確認を行うことができる。例えば、形質転換体からDNAを調製し、DNA特異的プライマーを設計してPCRを行う。次いで、増幅産物についてアガロースゲル電気泳動、ポリアクリルアミドゲル電気泳動又はキャピラリー電気泳動等を行い、臭化エチジウム、SYBR Green液等により染色し、そして1本のバンドとして増幅産物を検出することにより、形質転換されたことを確認する。また、予め蛍光色素等により標識したプライマーを用いてPCRを行い、増幅産物を検出することもできる。さらに、マイクロプレート等の固相に増幅産物を結合させ、蛍光又は酵素反応等により増幅産物を確認する方法を採用してもよい。

【0046】

本発明に係る植物体は、本発明に係る遺伝子を含む組換えベクターを有し、かつパラコート耐性を有するものである。ここで「植物体」とは、本発明に係る遺伝子を含む組換えベクターによって形質転換された植物全体を意味する。上記組換えベクターを植物細胞等に導入し、得られた形質転換植物細胞から形質転換植物体に再生させることによって、本発明に係る植物体を得ることができる。再生方法としては、カルス状の形質転換細胞をホルモンの種類、濃度を変えた培地へ移して培養し、不定胚を形成させ、完全な植物体を得る方法が採用される。使用する培地としては、LS培地、MS培地等が挙げられる。なお組換えベクターの植物細胞等への導入は、上記と同様の方法によって行うことができる。

【0047】

本発明に係る植物体では、本発明に係る遺伝子によりコードされるパラコート耐性を付与するタンパク質が植物体全体で過剰発現する。このようにして本発明に係る植物体はパラコートに対して耐性を有することができる。

【0048】

本発明に係る形質転換植物を選抜する方法は、本発明に係る組換えベクターを植物に導入し、パラコート耐性を指標として、形質転換植物を選抜する方法である。本発明に係る遺伝子をパラコート耐性を指標とする選択マーカー遺伝子とし、形質転換を確認できる。選抜方法としては、パラコート含有培地中に本発明に係る組換えベクターにより形質転換した植物を生育させ、植物の生死及び生長差で選抜する方法が挙げられる。選抜時のパラコートの濃度は、植物種、植物の大きさなどにより変化するが、例えば、シロイヌナズナが宿主である場合には、パラコートは、培地中に好ましくは $0.1 \sim 3.0 \mu\text{M}$ 、より好ましくは $1.0 \sim 3.0 \mu\text{M}$ 、最も好ましくは $3.0 \mu\text{M}$ の濃度で存在する。非形質転換植物、すなわち野生型は、パラコート含有培地中では白化枯死する。一方、本発明に係る組換えベクターにより形質転換した植物はパラコート含有培地中でも緑色をしている。このように、非形質転換植物と本発明に係る組換えベクターにより形質転換した植物とは、パラコート含有培地中の生育に明らかな差異が確認できる。

【0049】

抗生物質又は除草剤耐性を指標とする場合、植物によっては、感受性に違いがあるため、選抜の段階で擬陽性がみられ得る。一方、パラコートは、全ての植物を枯死させる非選択性で、かつ強力な除草剤である。従って、本発明に係る形質転換植物を選抜する方法では、選抜の段階で擬陽性は見られない。また、本発明に係る形質転換植物を選抜する方法によれば、生育初期段階で耐性を効率的に確認できる。

【0050】

一方、本発明に係るプロモーターは、以下の(a)、(b)又は(c)のDNAを含む、維管束及び

トライコーム特異的プロモーターである。

(a) 配列番号3の塩基配列からなるDNA

(b) 配列番号3の塩基配列において1若しくは複数の塩基が置換、欠失又は付加された塩基配列からなり、かつ維管束及びトライコーム特異的プロモーターとして機能するDNA

(c) 配列番号3の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ維管束及びトライコーム特異的プロモーターとして機能するDNA

【0051】

(a)に記載の維管束及びトライコーム特異的プロモーターは、AtMVR遺伝子の5'上流側の非翻訳領域に存在し、配列番号3の塩基配列からなる維管束及びトライコーム特異的プロモーターである。AtMVR遺伝子の5'上流側約3000塩基について、シロイヌナズナ全塩基配列データベースに基づいて検索することで、(a)に記載のプロモーターを同定できる。

10

【0052】

ここで「維管束及びトライコーム特異的プロモーター」とは、植物の維管束及びトライコームで特異的に活性を示すプロモーターを意味する。「維管束」とは、シダ植物及び種子植物の茎、葉、根などの各器官を貫いて分化した条束状の組織系である。維管束の構成要素は、木部及び篩部であり、これら木部及び篩部が水分や体内物質移動の通路となっている。一方、「トライコーム」とは、植物体の葉、茎及びがく片などの表面に存在する毛状の突起物である。トライコームは、植物体表面からの分泌及び排出に参与する。

【0053】

維管束及びトライコーム特異的プロモーター活性は、定法に従って測定することができる。例えば、プロモーターの下流に発現可能に例えば、レポーター遺伝子を連結した発現ベクターを構築する。次に、発現ベクターで適当な植物を形質転換する。得られた形質転換体を所定の条件下で培養し、維管束及びトライコームにおけるレポーター遺伝子の発現量をmRNAレベル或いはタンパク質レベルで定量することによって、当該条件下におけるプロモーター活性を測定することができる。また、レポーター遺伝子が β -Glucuronidase(GUS)遺伝子の場合には、発現したGUSによる組織化学的な発色を観察することで、維管束及びトライコームにおけるプロモーター活性の特異性を測定することができる。

20

【0054】

例えば、GUSによる組織化学的な発色方法としては、GUS遺伝子を導入した形質転換体の組織に、GUSの基質である5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide (X-Gluc)を含む反応液を添加する方法が挙げられる。GUS遺伝子が発現する場合には、X-Glucが脱エステル化され、インドキシル誘導体モノマーが生じ、これが空気酸化重合して青色のインジゴチン(indigotin)色素が生成する。形質転換した細胞、組織では、この青色の色素が蓄積し青色を示す。

30

【0055】

また、特定されたAtMVR遺伝子の5'上流側の非翻訳領域は、該領域の両端の塩基配列に相補的なプライマーを用い、シロイヌナズナから抽出したゲノムを鋳型としたPCRによって容易に得ることができる。

【0056】

本発明に係るプロモーターは、配列番号3に記載の塩基配列、すなわち5'上流側の非翻訳領域の全部であっても良いし、維管束及びトライコーム特異的プロモーターとしての機能を示す限り、配列番号3に記載の塩基配列からなるDNAの一部であっても良い。

40

【0057】

(b)記載の維管束及びトライコーム特異的プロモーターは、配列番号3の塩基配列において1又は数個(例えば1~10個、1~5個)の塩基が置換、欠失又は付加された塩基配列からなり、かつ維管束及びトライコーム特異的プロモーターとして機能するものである。

【0058】

(c)記載の維管束及びトライコーム特異的プロモーターは、配列番号3の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ維管束及びトライコーム特異的プロモーターとして機能するものである。

50

【0059】

ここで、「ストリンジェントな条件」とは、例えばリン32で標識したプローブDNAを用いる場合には、5 X SSC(0.75M NaCl、0.75Mクエン酸ナトリウム)、5 X デンハルト試薬(0.1%フィコール、0.1%ポリビニルピロリドン、0.1%ウシ血清アルブミン)および0.1%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)からなるハイブリダイゼーション溶液中で、温度が45℃～68℃、好ましくは60℃～68℃である。また洗浄ステップにおいては、2 X SSCおよび0.1%SDSからなる洗浄溶液中で温度が45℃～55℃、より好ましくは0.1 X SSCおよび0.1%SDSからなる洗浄溶液中で温度が45℃～55℃である。AlkPhos direct labeling module(アマシャムバイオテック)のキットを用いて酵素標識したプローブDNAを用いる場合には、該キットのマニュアルに記載されている組成のハイブリダイゼーション溶液(0.5M NaClおよび4%ブロッキング試薬を含む)中で温度が55℃～75℃である。また洗浄ステップにおいては、該キットのマニュアルに記載されている一次洗浄液(2M 尿素を含む)中で55℃～75℃、かつ二次洗浄液中で室温である。また、他の検出法であってもよく、その場合にはその検出法の標準的な条件であってよい。

10

【0060】

一旦本発明に係るプロモーターの塩基配列が確定されると、その後は化学合成によって、又はクローニングされたプローブを鋳型としたPCRによって、あるいは該塩基配列を有するDNA断片をプローブとしてハイブリダイズさせることによって本発明に係るプロモーターを得ることができる。さらに、部位特異的突然変異誘発法等によって本発明に係るプロモーターの変異型であって変異前と同等の機能を有するものを合成することができる。

20

【0061】

なお、本発明に係るプロモーターに変異を導入するには、Kunkel法、Gapped duplex法等の公知の手法又はこれに準ずる方法を採用することができる。例えば部位特異的突然変異誘発法を利用した変異導入用キット(例えばMutant-K(TAKARA社製)やMutant-G(TAKARA社製))などを用いて、あるいは、TAKARA社のLA PCR in vitro Mutagenesis シリーズキットを用いて変異の導入が行われる。

【0062】

本発明に係るプロモーターを含む本発明に係る組換えベクターは、適当なベクターに本発明に係るプロモーターを挿入することにより得ることができる。本発明に係るプロモーターを挿入するためのベクターは、宿主中で複製可能なものであれば特に限定されず、例えばプラスミド、シャトルベクター、ヘルパープラスミドなどが挙げられる。また該ベクター自体に複製能がない場合には、宿主の染色体に挿入することなどによって複製可能となるDNA断片であってもよい。

30

【0063】

プラスミド DNAとしては、大腸菌由来のプラスミド(pBI221など、例えばpET30b等のpET系、pBR322およびpBR325などのpBR系、pUC118、pUC119、pUC18およびpUC19などのpUC系、pBluescript、pBI221等)、枯草菌由来のプラスミド(例えばpUB110、pTP5等)、アグロバクテリウム・ツメファシエンズ由来のバイナリープラスミド(例えば、pBIN19由来のpBI系、pBI101、pBI121等)、酵母由来のプラスミド(例えばYEpl3などのYEp系、YCp50などのYCp系等)などが挙げられ、ファージDNAとしてはλファージ(Charon4A、Charon21A、EMBL3、EMBL4、λgt10、λgt11、λZAP等)が挙げられる。さらに、レトロウイルス又はワクシニアウイルスなどの動物ウイルス、バキュロウイルスなどの昆虫ウイルスベクターを用いることもできる。

40

【0064】

ベクターに本発明に係るプロモーターを挿入するには、まず、精製されたDNAを適当な制限酵素で切断し、適当なベクターDNAの制限酵素部位又はマルチクローニングサイトに挿入してベクターに連結する方法などが採用される。またベクターと本発明に係るプロモーターのそれぞれ一部に相同な領域を持たせることにより、PCRなどを用いたin vitro法または酵母などを用いたin vivo法によって両者を連結する方法であってもよい。

【0065】

50

本発明に係るプロモーターを含む本発明に係る組換えベクターは、本発明に係るプロモーターの下流にさらに外来遺伝子又は外来DNA断片を挿入することができる。外来遺伝子又は外来DNA断片を挿入する方法は、ベクターに本発明に係るプロモーターを挿入する方法と同様である。

【0066】

本発明に係るプロモーターを含む本発明に係る組換えベクターにおいて、本発明に係るプロモーターの下流に置かれる外来遺伝子としては、いかなる外来遺伝子であっても良いが、特に水分若しくは体内物質移動又は細胞増殖に関与する遺伝子、菌若しくは植物ウイルスの増殖又は移動に関与する遺伝子、あるいは重金属等の排出に関与する遺伝子又は抗微生物活性若しくは摂食阻害効果を有する液の分泌に関与する遺伝子が例として挙げられる。より具体的には、トランスポーターやポンプに関する遺伝子、PR(Pathogenesis related protein)タンパク質(キチナーゼ、パルオキシダーゼ他)の遺伝子、defensin family 遺伝子、ファイトアレキシン合成系遺伝子及び害虫等の忌避フェロモン合成遺伝子などである。また、外来遺伝子としては、上述した本発明に係る遺伝子、AtMVR遺伝子が挙げられる。

10

【0067】

さらに本発明に係るプロモーターの下流に置かれる外来DNA断片としては、RNA自体が機能するアンチセンスRNA又はリボザイムなどが挙げられる。

【0068】

本発明に係る形質転換植物は、本発明に係るプロモーターを含む本発明に係る組換えベクターを有する形質転換植物である。本発明に係る形質転換植物は、本発明に係るプロモーターを含む本発明に係る組換えベクターを植物中に導入することにより得ることができる。形質転換植物(トランスジェニック植物)は以下のようにして得ることができる。

20

【0069】

本発明において形質転換の対象となる「植物」は、植物全体、維管束及び/又はトライコームが存在する植物器官(例えば葉、花卉、茎、根、種子等)、植物組織(例えば表皮、師部、柔組織、木部等)又は植物培養細胞のいずれをも意味する。形質転換に用いられる植物としては、イネ科、アブラナ科、ナス科、マメ科等に属する植物(下記参照)が挙げられるが、これらの植物に限定されるものではない。

イネ科：イネ(*Oryza sativa*)、トウモロコシ(*Zea mays*)

30

アブラナ科：シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)

ナス科：タバコ(*Nicotiana tabacum*)

マメ科：ダイズ(*Glycine max*)

【0070】

本発明に係るプロモーターを含む本発明に係る組換えベクターは、通常の形質転換方法、例えば電気穿孔法(エレクトロポレーション法)、アグロバクテリウム法、パーティクルガン法、PEG法等によって植物中に導入することができる。

【0071】

例えばエレクトロポレーション法を用いる場合は、パルスコントローラーを備えたエレクトロポレーション装置により、電圧500~1600V、25~1000 μ F、20~30msecの条件で処理し、本発明に係るプロモーターを含む本発明に係る組換えベクターを宿主に導入する。

40

【0072】

また、パーティクルガン法を用いる場合は、植物全体、植物器官、植物組織自体をそのまま使用してもよく、切片を調製した後に使用してもよく、またはプロトプラストを調製して使用してもよい。次いで遺伝子導入装置(例えばBio-Rad社のPDS-1000/He等)を用いて、調製した試料を処理することができる。処理条件は植物又は試料により異なるが、通常は450~2000psi程度の圧力、3~12cm程度の距離で行う。

【0073】

アグロバクテリウムのTiプラスミド又はRiプラスミドを利用する方法においては、アグロバクテリウム(*Agrobacterium*)属に属する細菌が植物に感染すると、それが有するプラ

50

スミドDNAの一部を植物ゲノム中に移行させるという性質を利用して、本発明に係るプロモーター及び外来遺伝子又は外来DNA断片を植物宿主に導入する。アグロバクテリウム属に属する細菌のうちアグロバクテリウム・ツメファシエンス(*Agrobacterium tumefaciens*)は、植物に感染してクラウンゴールと呼ばれる腫瘍を形成する。またアグロバクテリウム・リゾゲネス(*Agrobacterium rhizogenes*)は、植物に感染して毛状根を発生させる。これらは、感染の際にTiプラスミド又はRiプラスミド上のT-DNA領域(Transferred DNA)と呼ばれる領域が植物中に移行し、植物のゲノム中に組み込まれることに起因するものである。従って、Ti又はRiプラスミド上のT-DNA領域中に植物ゲノム中に組み込みたいDNAを挿入する。次いでアグロバクテリウム属の細菌を植物宿主に感染させると、植物ゲノム中に該DNAを組み込むことができる。

10

【0074】

植物宿主へのアグロバクテリウム属の細菌による形質転換方法としては、例えば上記で説明した電気穿孔法(エレクトロポレーション法)、パーティクルガン法、PEG法の他に、in planta法が挙げられる。in planta法としては、例えば、アグロバクテリウム直接注入法及び浸潤法が挙げられる。

【0075】

形質転換の結果得られる腫瘍組織やシュート、毛状根などは、そのまま細胞培養、組織培養又は器官培養に用いることが可能である。また従来知られている植物組織培養法を用い、適当な濃度の植物ホルモン(オーキシン、サイトカイニン、ジベレリン、アブシジン酸、エチレン、ブラシノライド等)の投与などにより植物体に再生させることができる。

20

【0076】

また、植物ウイルスをベクターとして利用することによって、本発明に係るプロモーター及び外来遺伝子又は外来DNA断片を植物に導入することができる。利用可能な植物ウイルスとしては、例えば、カリフラワーモザイクウイルスが挙げられる。まず、ウイルスゲノムを大腸菌由来のベクターなどに挿入して組換え体を調製した後、ウイルスのゲノム中に本発明に係るプロモーター及び外来遺伝子又は外来DNA断片を挿入する。このようにして修飾されたウイルスゲノムを制限酵素によって組換え体から切り出し、植物宿主に接種することによって、本発明に係るプロモーター及び外来遺伝子又は外来DNA断片を植物宿主に導入することができる。

【0077】

以上のように作製された本発明に係る形質転換植物は、本発明に係るプロモーターによって、外来遺伝子又は外来DNA断片を維管束及びトライコームにおいて特異的に発現することができる。

30

【0078】

維管束は、水分及び体内物質移動並びに細胞増殖等に関与する場所である。従って、本発明に係る形質転換植物において、外来遺伝子として水分若しくは体内物質移動又は細胞増殖に関与する遺伝子が導入された場合、水分若しくは体内物質移動又は細胞増殖を制御することができる。また、維管束は、ナス科の植物に感染する青枯病菌が増殖及び移動する場所であり、植物ウイルスが植物に感染した際に、葉から上位にある葉へ植物ウイルスが長距離移行し、植物の全身感染を引き起こす移行場所でもある。従って、本発明に係る形質転換植物において、外来遺伝子として菌若しくは植物ウイルスの増殖又は移動に関与する遺伝子が導入された場合、菌若しくは植物ウイルスから植物を防御することもできる。

40

【0079】

一方、トライコームは、植物体表面からの分泌及び排出に関与する。例えば、植物に重金属(カドミウム)ストレスにさらすと、葉表面のトライコーム数が増加し、葉の表面にカドミウムやカルシウムを含む結晶が付着する、すなわち、トライコームからカドミウムが排出されることが報告されている(Planta, 213 (1), 45-50, 2001, May)。また、トライコームは、植物を侵す糸状菌、細菌及び虫などが最初に接触する場所でもある。また、病虫害の防御として、例えばトライコームの1つである、バラ科のハマナスの腺毛、腺状突

50

起からは、抗微生物活性及び摂食阻害効果を有する液が分泌されている。従って、本発明に係る形質転換植物において、外来遺伝子として、重金属等の排出に関与する遺伝子、又は抗微生物活性若しくは摂食阻害効果を有する液の分泌に関与する遺伝子が導入された場合、重金属を植物から効率的に排出したり、あるいは植物を侵す糸状菌、細菌又は虫から植物を効果的に防御することができる。

【0080】

さらに、本発明に係る形質転換植物において、外来遺伝子として本発明に係る遺伝子が導入された場合、植物体に取り込まれたパラコートの輸送、排出促進などにより、パラコートに耐性を付与することができる。

【実施例】

10

【0081】

以下、実施例を用いて本発明をより詳細に説明するが、本発明の技術的範囲はこれら実施例に限定されるものではない。

【0082】

〔実施例1〕パラコート耐性遺伝子の単離

本実施例において、シロイヌナズナのアクティベーションタグラインは、Nottingham Arabidopsis Stock Center(<http://nasc.nott.ac.uk/>)より入手したWeigel T-DNA linesを用いた。

【0083】

(1) シロイヌナズナのアクティベーションタグライン (Weigel T-DNA lines) よりパラコート培地で生育する個体を選抜

20

Weigel T-DNA linesの種子を、3 μ Mパラコート (METHYL VIOLOGEN:SIGMA社製) を含む1/2MS寒天(1%)培地 (ムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類 (Murashige and Skoog Plant Salt Mixture) 2.3g/l: 和光純薬工業社製、チアミン塩酸塩1.5mg/l、ニコチン酸2.5mg/l、ピリドキシン塩酸塩0.25mg/l、ショ糖濃度1.5%、寒天1%) に無菌播種し、22°C、60 μ E/m²/sの照明下 (16時間明期/8時間暗期のサイクル) で培養した。培養して約10日間後に、パラコート培地で生育する個体を選抜した。

【0084】

(2) 選抜したパラコート培地で生育するシロイヌナズナ個体からTAIL-PCR法によるT-DNAの挿入部位を推定

30

選抜した個体が由来するWeigel T-DNA linesの種子を、バーミキュライト (旭化学工業社製) を入れたポットに播種し、100 μ E/m²/sの光強度、23°C、16時間明期/8時間暗期の日長条件下で、約1ヵ月間生育した。

【0085】

生育した個体の葉からDNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN社製) によりゲノムDNAを調製し、Weigel T-DNA linesで用いられているアクティベーションタギング用ベクター (pSKI015: GenBank accession No.AF187951) の左のT-DNA配列 (T-DNA left border: 配列番号30) 付近に3種類の特異的プライマー (TL1: 配列番号31、TL2: 配列番号32、TL3: 配列番号33) を設定し、任意プライマー1 (配列番号34) を用いて、以下のPCR反応液及び反応条件下でTAIL-PCR (島本功、佐々木卓治監修, 新版, 植物のPCR実験プロトコール, 2000, 83-89pp, 秀潤社, 東京、Genomics, 25, 674-681, 1995、Plant J., 8, 457-463, 1995) を行い、T-DNAに隣接するゲノムDNAを増幅した。なお、配列番号34において、nは、a、g、c又はtを表し (存在位置: 1及び11)、またsは、g又はcを表し (存在位置: 7)、さらにwは、a又はtを表す (存在位置: 8及び13)。

40

【0086】

1回目のPCRの反応液組成及びPCR条件を表2及び3に示す。

【表 2】

鋳型(ゲノム DNA)	: 10ng	
10XPCR バッファー(タカラバイオ社製)	: 2 μ l	
2.5mM dNTPs(タカラバイオ社製)	: 1.6 μ l	
1 個目の特異的プライマー(TL1 : 配列番号 3 1)	: 3pmol	
任意プライマー1(配列番号 3 4)	: 80pmol	10
<u>AmpliTag(アプライドバイオシステム社製)</u>	<u>: 0.8unit</u>	
総容量	20 μ l	

【0087】

【表 3】

# 1 : 94°C(1 分)/95°C(1 分)	20
# 2 : 94°C(1 分)/65°C(1 分)/72°C(3 分)を 5 サイクル	
# 3 : 94°C(1 分)/25°C(3 分)→3 分で 72°Cへ/72°C(3 分)を 1 サイクル	
# 4 : 94°C(30 秒)/68°C(1 分)/72°C(3 分)	
94°C(30 秒)/68°C(1 分)/72°C(3 分)	
94°C(30 秒)/44°C(1 分)/72°C(3 分)を 14 サイクル	30
# 5 : 72°C(5 分)	

【0088】

2 回目の PCR の反応液組成及び PCR 条件を表 4 及び 5 に示す。

【表 4】

鋳型(1回目のPCR産物50倍希釈)	: 1 μ l	
10XPCR バッファー	: 2 μ l	
250 μ M dNTPs	: 2 μ l	
2個目の特異的プライマー(TL2: 配列番号32)	: 4pmol	10
任意プライマー1(配列番号34)	: 60pmol	
<u>AmpliTaq</u>	<u>: 0.6unit</u>	
総容量	20 μ l	

【0089】

【表 5】

6 : 94°C(30秒)/64°C(1分)/72°C(3分)
 94°C(30秒)/64°C(1分)/72°C(3分)
 94°C(30秒)/44°C(1分)/72°C(3分)を10サイクル
 # 5 : 72°C(5分)

20

30

【0090】

3回目のPCRの反応液組成及びPCR条件を表6及び7に示す。

【表 6】

鋳型(2回目のPCR産物50倍希釈)	: 1 μ l	
10XPCR バッファー	: 10 μ l	
2.5mM dNTPs	: 1 μ l	40
3個目の特異的プライマー(TL3: 配列番号33)	: 30pmol	
任意プライマー1(配列番号34)	: 300pmol	
<u>AmpliTaq</u>	<u>: 3unit</u>	
総容量	100 μ l	

【0091】

50

【表 7】

7 : 94°C(1 分)/44°C(1 分)/72°C(3 分)を 20 サイクル

5 : 72°C(5 分)

【0092】

次いで、2回目と3回目の反応産物をアガロースゲルで電気泳動した後、増幅の有無と反応産物の特異性を確認した。 10

また、3回目の増幅産物は、特異的プライマーTL3(配列番号33)を用いて、直接ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (アプライドバイオシステム社製)でシーケンス反応を行い、ジェネティックアナライザーABI PRISM 310 (アプライドバイオシステム社製)によって塩基配列の決定を行った。その結果、278bpの配列情報が得られた(配列番号35)。なお、配列番号35において、nは、a、g、c又はtを表す(存在位置:13、35、73、108、156、190、198及び201)。この得られた配列をシロイヌナズナ全塩基配列データベース上で検索したところ、挿入部位はBACクローンF17I23の77240bpと判明した。

【0093】

(3) パラコート耐性遺伝子のcDNAの単離 20

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia (Col-0)) の種子を、バーミキュライト (旭化学工業社製) を入れたポットに播種し、100 μ E/m²の光強度、23°C、16時間明期/8時間暗期の日長条件下で、約1ヵ月間生育した。

【0094】

生育後、個体の葉を液体窒素で凍結した。次いで、RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN社製)により全RNAを抽出した。抽出した全RNA からProSTAR First Strand RT-PCR Kit (STRATAGEN社製)を用いてcDNAを合成した。

【0095】

上記(2)で得られた塩基配列(配列番号35)を有する構造遺伝子の近傍10kb以内に存在する推定Open reading frame(ORF)遺伝子の配列に基づいて、その推定構造遺伝子に対するプライマー141dF(配列番号36)及びプライマー141dR(配列番号37)を設計し、そのプライマーを用いて、上記で合成したcDNAを鋳型とし、以下のTakara EX-Taq (タカラバイオ社製)を含む反応液(表8)でPCRを行った。 30

【0096】

【表 8】

鋳型(cDNA)	: 50ng	
10X Ex Taq バッファー(タカラバイオ社製)	: 2 μ l	40
dNTPs	: 200 μ M	
各プライマー	: 0.2 μ M	
Takara EX-Taq	: 1unit	
総容量	20 μ l	

【0097】

反応条件は、94℃（30秒）/55℃（30秒）/72℃（60秒）を30サイクルとした。

増幅産物を、pGEM-T Easyベクター(Promega社製)にクローニングし、ジェネティックアナライザー ABI PRISM 310（アプライドバイオシステム社製）によって塩基配列の決定を行った。その結果、857bpのcDNA断片が得られた（配列番号1）。このcDNA断片をAtMVR遺伝子と命名し、AtMVR遺伝子を含むpGEM-T EasyベクターをpAtMVRとした。なお、AtMVR遺伝子がコードするアミノ酸配列は、配列番号2に示される。

【0098】

〔実施例2〕AtMVR遺伝子に対するAtMVR相同遺伝子の検索

AtMVR遺伝子の塩基配列に基づいて、シロイヌナズナ全塩基配列データベース上で検索したところ、シロイヌナズナゲノム上には、AtMVR遺伝子の塩基配列の他に13個のAtMVR相同遺伝子が存在することが判明した。

【0099】

各々のAtMVR相同遺伝子をAtMVR3-1～AtMVR3-13と命名した。各AtMVR相同遺伝子の塩基配列及び該AtMVR相同遺伝子がコードする推定アミノ酸配列は、以下の表2に示す配列番号で示される。また、AtMVR遺伝子と各AtMVR相同遺伝子との相同性分析の結果を表9に示す。なお、相同性分析は、アミノ酸レベルでBLAST Pを用いて行っている。Identitiesは、アミノ酸として100%一致を意味し、アミノ酸は側鎖の化学的性質に基づいて分類され、BLOSUM62アミノ酸置換行列では、メルカプト基(C)、分子量が小さくて親水性(S・T・P・A・G)、酸・酸アミド・親水性(N・D・E・Q)、塩基性(H・R・K)、分子量が小さくて疎水性(M・I・L・V)、芳香族(F・Y・W)に分類されている。Identitiesは、アミノ酸として100%一致を意味しPositivesは、100%一致に、BLOSUM62アミノ酸置換行列における正のスコアのアミノ酸を加えたものを含めた数値である。

【0100】

【表9】

AtMVR 相同遺伝子名	塩基配列	アミノ酸配列	Identities(%)	Positives (%)
AtMVR3-1	配列番号4	配列番号5	57	70
AtMVR3-2	配列番号6	配列番号7	55	69
AtMVR3-3	配列番号8	配列番号9	39	56
AtMVR3-4	配列番号10	配列番号11	39	55
AtMVR3-5	配列番号12	配列番号13	37	54
AtMVR3-6	配列番号14	配列番号15	36	52
AtMVR3-7	配列番号16	配列番号17	34	52
AtMVR3-8	配列番号18	配列番号19	34	51
AtMVR3-9	配列番号20	配列番号21	37	58
AtMVR3-10	配列番号22	配列番号23	25	44
AtMVR3-11	配列番号24	配列番号25	33*	51*
AtMVR3-12	配列番号26	配列番号27	25	41
AtMVR3-13	配列番号28	配列番号29	22	41

*AtMVR11 との比較は、AtMVR11 の部分配列との相同性の結果である。

【0101】

表1に示されるように、AtMVRと13個のAtMVR相同性遺伝子との相同性は、Identitiesで22～57%、Positivesで41～70%であった。

【0102】

〔実施例3〕植物用AtMVR発現ベクターの構築とAtMVR形質転換植物の作出

適用した形質転換技術は、Hincheeらにより概説されたアグロバクテリウム遺伝子搬送システム(Plant Cell and Tissue Culturepp. 231-270eds. I. K. Vasil T. A Thorpe,

Kluwer Academic Publisher 1994) に基づいて、Pellegrineschiらにより記載されたベクターシステム (1995, Biochemical Society Transitions 23: 247-250) を使用した。

【0103】

(1) 植物用AtMVR発現ベクターの構築

AtMVR遺伝子配列を、SacI/SacIIを用いてpAtMVRより切り出し、pBlueScript (STRATAGENE社製) にサブクローニングした。次いで、XbaI/SacIでAtMVR遺伝子配列を含む断片を切り出し、pBI121 (Clontech社製) のCaMV 35Sプロモーターの下流に存在するXbaI/SacI部位に導入した。得られたベクターを以下において植物用AtMVR発現ベクターとして用いた。

【0104】

(2) AtMVR形質転換植物の作出

(1)において作製した植物用AtMVR発現ベクターを、エレクトロポレーション法 (Plant Molecular Biology Manual, Second Edition, B. G. Stanton A. S. Robbert, Kluwer Academic Publishers 1994) により、アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404株に導入した。次いでこの植物用AtMVR発現ベクターが導入されたアグロバクテリウム・ツメファシエンスを、Cloughらにより記載された浸潤法 (1998, The Plant Journal 16: 735-743) により、野生型シロイヌナズナエコタイプCol-0に導入した。

【0105】

カナマイシン含有培地で形質転換体を選抜し、自家受粉によりT3世代の植物 (1 AtMVR遺伝子が導入されたホモ系統) を作製した。

【0106】

次に導入したAtMVR遺伝子の発現量について検討した。上記で作製した形質転換体と非形質転換体の種子を、それぞれパーミキュライト (旭化学工業社製) を入れたポットに播種し、 $100 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ の光強度で、 23°C 、16時間明期/8時間暗期の日長条件下で、約1ヵ月間生育した。

【0107】

生育後に、形質転換体及び非形質転換体の野生型シロイヌナズナエコタイプCol-0からRNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN社製) により全RNAを抽出した。次いでRNA $1 \mu\text{g}$ をProSTAR First Strand RT-PCR Kit (STRATAGEN社製) を用いて逆転写した。合成したcDNAの1/50量を鋳型とし、AtMVR遺伝子に対するプライマー (プライマー141d1 (配列番号38) 及びプライマー141d2 (配列番号39)) を用いて、以下のTakara EX-Taq (タカラバイオ社製) を含む反応液 (表10) でPCRを行った。

【0108】

10

20

30

【表 10】

PCR 反応液；

鋳型(cDNA)	: 50ng	
10X Ex Taq バッファー(タカラバイオ社製)	: 2 μ l	
dNTPs	: 200 μ M	10
各プライマー	: 0.2 μ M	
Takara EX-Taq	: 1unit	
総容量	20 μ l	

【0109】

反応条件は、94℃（30秒）/55℃（30秒）/72℃（60秒）を30サイクルとした。

20

増幅産物をアガロースゲルで電気泳動を行った。図1に電気泳動の結果を示す。図1から判るように、作製した形質転換体は、非形質転換体と比較してAtMVR遺伝子を過剰に発現していた。

【0110】

〔実施例4〕 AtMVR遺伝子形質転換体のパラコートに対する耐性評価

作製したAtMVR遺伝子形質転換体及び非形質転換体（野生型シロイヌナズナエコタイプCol-0）由来の種子を、3 μ Mパラコート（METHYL VIOLAGEN:SIGMA社製）を含む1/2MS寒天(1%)培地（ムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類（Murashige and Skoog Plant Salt Mixture）2.3g/l:和光純薬工業社製、チアミン塩酸塩1.5mg/l、ニコチン酸2.5mg/l、ピリドキシン塩酸塩0.25mg/l、ショ糖濃度1.5%）に無菌播種し、22℃、60 μ mol /m²/s 照明下（16時間明期/8時間暗期のサイクル）で8日間培養した後、発芽した個体の成育を評価した。結果を図2に示す。なお、図2Bは、パラコート非含有1/2MS培地におけるAtMVR遺伝子形質転換体及び非形質転換体の生育を示す写真であり、図2Cは、パラコートを含有1/2MS培地におけるAtMVR遺伝子形質転換体及び非形質転換体の生育を示す写真である。図2Aは、図2B又はCにおけるAtMVR遺伝子形質転換体及び非形質転換体の位置を示す概略図である。

30

【0111】

その結果、図2Bから判るように、パラコート非含有培地では、AtMVR遺伝子形質転換体は非形質転換体と同様の成長を示した。一方で、図2Cから判るように、パラコートを含有培地では、非形質転換体は、白化枯死し、生長が著しく阻害されたのに対して、AtMVR遺伝子形質転換体の芽生えは生育することが可能であった。このことよりAtMVR遺伝子形質転換体は、パラコート非含有培地では、AtMVR遺伝子の発現にも関わらず非形質転換体と同様の成長を示すことが確認でき、またパラコートを含有培地では、非形質転換体よりも明らかにパラコート耐性を有することが確認できた。

40

【0112】

〔実施例5〕 維管束/トライコーム特異的プロモーターの単離

シロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia (Col-0)）の種子を、パーミキュライト（旭化学工業社製）を入れたポットに播種し、100 μ E/m²/sの光強度で、23℃、16時間明期/8時間暗期の日長条件下で約1ヵ月間生育した。

【0113】

50

生育後に、個体の葉からDNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN社製)によりゲノムDNAを調製した。次いで、得られたゲノムDNAを鋳型として、上記実施例1に記載したAtMVR遺伝子断片(配列番号35)に基づくプライマー141dpF(配列番号40)及びプライマー141dpR(配列番号41)を用いて、以下のTakara EX-Taq(タカラバイオ社製)を含む反応液(表11)及び反応条件下でPCRを行った。

【0114】

【表11】

鋳型ゲノム DNA	: 50ng	10
10X Ex Taq バッファー(タカラバイオ社製)	: 2 μ l	
dNTPs	: 200 μ M	
各プライマー	: 0.2 μ M	
Takara EX-Taq	: 1unit	
総容量	20 μ l	20

【0115】

反応条件は、94℃(30秒)/55℃(30秒)/72℃(60秒)を30サイクルとした。

増幅産物を、pGEM-T Easyベクター(Promega社製)にクローニングし、ジェネティックアナライザー ABI PRISM 310(アプライドバイオシステム社製)によって塩基配列の決定を行った。その結果、1722bpのAtMVRプロモーター(配列番号3)が得られた。

【0116】

〔実施例6〕 維管束/トライコーム特異的プロモーターの組織特異性分析

(1) AtMVRプロモーターを有する発現ベクターの構築

30

AtMVRプロモーターを、HindIII/PstIにより実施例5で作製したAtMVRプロモーター(配列番号3)を有するpGEM-T Easyベクターより切り出し、pBI221(Clontech社製)のCaMV 35Sプロモーター上流にサブクローニングした。得られたベクターをPstI/SmaIで処理しCaMV 35Sプロモーターを除去し、DNA T4ポリメラーゼ(タカラバイオ社製)で末端を平滑化し自己連結させた。この結果、ベクター上では、 β -グルクロニダーゼ(GUS)遺伝子上流にAtMVRプロモーターが連結された。次いで、AtMVRプロモーター及びGUS遺伝子を含む断片を、上記ベクターからHindIII/EcoRIで切り出し、pBI221(Clontech社製)のCaMV 35Sプロモーター- β -GUS遺伝子と入れ替えた。このようにして得られたベクターを、以下で用いるAtMVRプロモーターを有する発現ベクターとした。

【0117】

40

(2) 形質転換植物の作出

実施例3(2)と同様にして、上記AtMVRプロモーターを有する発現ベクターを、アグロバクテリウム・ツメファシエンシスLBA4404株に導入し、これを浸潤法により野生型シロイヌナズナエコタイプCol-0に導入した。次いで、カナマイシン含有培地で形質転換体を選抜し、自家受粉によるT3世代の植物を作製した。

【0118】

(3) AtMVRプロモーターの組織特異性分析

上記(2)で作製した形質転換体由来の種子を、1/2MS寒天(1%)培地(ムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類(Murashige and Skoog Plant Salt Mixture) 2.3g/l:和光純薬工業社製、チアミン塩酸塩1.5mg/l、ニコチン酸2.5mg/l、ピリドキシン塩酸塩0.25mg/l、ショ糖

50

濃度1.5%)に無菌播種し、22℃、60 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ の照明下(16時間明期/8時間暗期のサイクル)で、約7日間培養した。

【0119】

培養後に、生育した形質転換体をアセトンにて固定した。固定した組織に5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide(X-Gluc)を含む反応液を、全体が浸るように添加した。反応液の組成は、X-Gluc:1.9mM、 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$:0.5mM、 $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$:0.5mM、Triton X-100:0.3%である。

【0120】

そして容器をシールし、37℃恒温器中で一晩インキュベートした後、70%エタノールを加え反応を停止させ、発色を観察した。(福田裕穂、西村幹夫、中村研三監修、植物の細胞を観る実験プロトコル、1997、71-79pp、秀潤社、東京)。結果を図3～5に示す。なお、図3～5は、それぞれ形質転換体全体、葉及び根の顕微鏡写真である。

10

【0121】

図3～5から判りますように、維管束及びトライコームに特異的な発色が観察された。このことより、得られたAtMVRプロモーター(配列番号3)は、維管束及びトライコームにおける組織特異的な転写活性のある転写プロモーターであることが判明した。

【図面の簡単な説明】

【0122】

【図1】AtMVR遺伝子形質転換体由来のcDNAの電気泳動写真である。

【図2】図2Aは、図2B又はCにおけるAtMVR遺伝子形質転換体及び非形質転換体の位置を示す概略図である。図2Bは、パラコート非含有1/2MS培地におけるAtMVR遺伝子形質転換体及び非形質転換体の生育を示す写真である。図2Cは、パラコートを含有1/2MS培地におけるAtMVR遺伝子形質転換体及び非形質転換体の生育を示す写真である。

20

【図3】GUSによって組織化学的に発色されたAtMVRプロモーター及びGUS遺伝子を含む形質転換体全体の顕微鏡写真である。

【図4】GUSによって組織化学的に発色されたAtMVRプロモーター及びGUS遺伝子を含む形質転換体の葉の顕微鏡写真である。

【図5】GUSによって組織化学的に発色されたAtMVRプロモーター及びGUS遺伝子を含む形質転換体の根の顕微鏡写真である。

【配列表フリーテキスト】

30

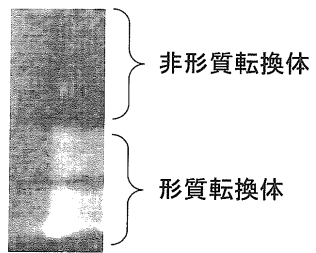
【0123】

配列番号31～41はプライマーである。

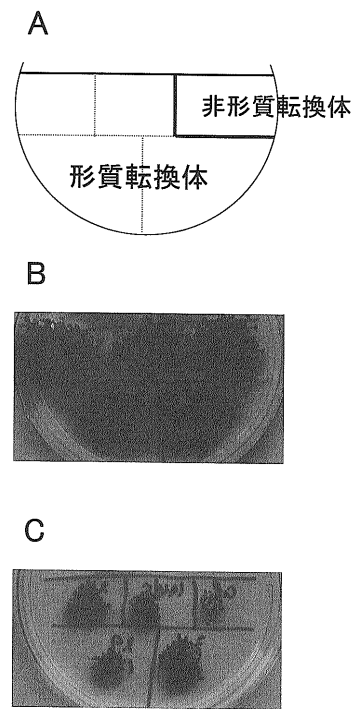
配列番号34において、nは、a、g、c又はtを表す(存在位置:1及び11)。sは、g又はcを表す(存在位置:7)。wは、a又はtを表す(存在位置:8及び13)。

配列番号35において、nは、a、g、c又はtを表す(存在位置:13、35、73、108、156、190、198及び201)

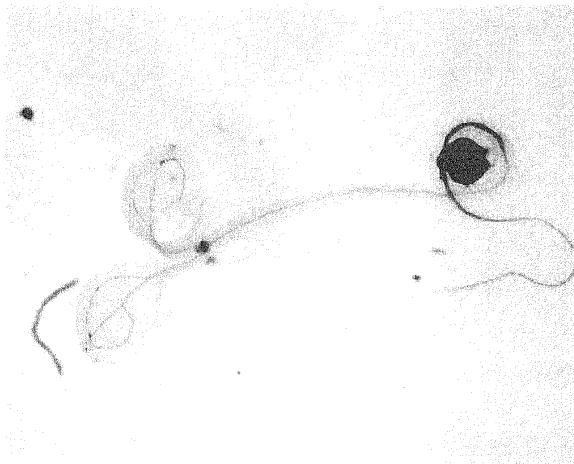
【図 1】



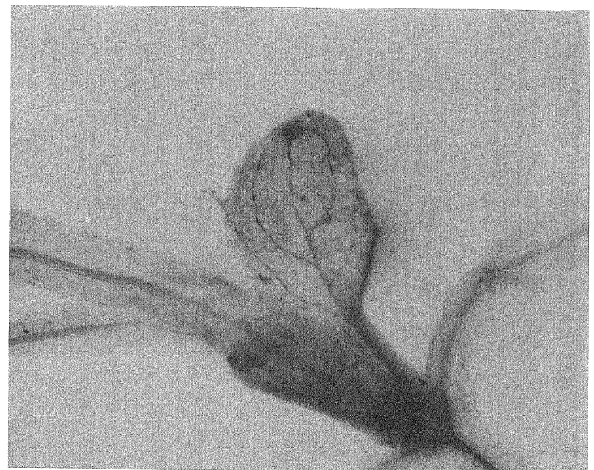
【図 2】



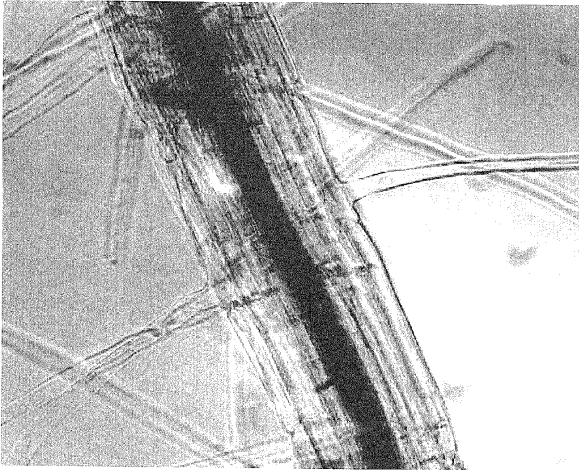
【図 3】



【図 4】



【図 5】



【配列表】

0004312012000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 田中 良和
福井県敦賀市木崎12-1-2 フローラルハイツ木崎201号
- (72)発明者 小川 健一
岡山県岡山市田中584番地 県公舎1棟13
- (72)発明者 近藤 聡
愛知県豊田市トヨタ町1番地 トヨタ自動車株式会社内
- (72)発明者 大音 徳
愛知県豊田市トヨタ町1番地 トヨタ自動車株式会社内
- (72)発明者 古澤 巖
京都府京都市左京区高野東開町1-23 36-303

審査官 中村 正展

- (56)参考文献 欧州特許出願公開第01033405 (EP, A1)
GenBank Accession AL161577, 2003年 8月 8日, GI: 7269938, URL, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?7269938:OLD04:1008463>
GenBank Accession AY084949, 2003年 4月14日, GI: 21403659, URL, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?21403659:OLD04:650114>
日本農芸化学会2003年度(平成15年度)大会 講演要旨集, 2003年 3月 5日, 287 (3E06p12)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/90

C12N 5/00-5/10

A01H 5/00

C07K 14/415

C12Q 1/68

PubMed

JSTPlus (JDreamII)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq