

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-295819

(P2005-295819A)

(43) 公開日 平成17年10月27日(2005.10.27)

(51) Int.Cl. ⁷	F I		テーマコード (参考)
AO 1 H 1/00	AO 1 H 1/00	Z N A A	2 B O 3 O
AO 1 H 5/00	AO 1 H 5/00	A	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	A	

審査請求 未請求 請求項の数 10 O L (全 19 頁)

(21) 出願番号	特願2004-112911 (P2004-112911)	(71) 出願人	503360115
(22) 出願日	平成16年4月7日(2004.4.7)		独立行政法人科学技術振興機構
			埼玉県川口市本町4丁目1番8号
		(74) 代理人	100102668
			弁理士 佐伯 憲生
		(72) 発明者	林 誠
			愛知県豊橋市関屋町171-2
		(72) 発明者	西村 幹夫
			愛知県岡崎市竜美旭町6-16
		(72) 発明者	八木 美奈
			愛知県名古屋市西区こも原町57
		Fターム(参考)	2B030 AA02 AB04 AD20 CA17 CA19
			4B024 AA08 CA02 CA11 DA01 EA04
			GA11 HA20

(54) 【発明の名称】 植物の発芽を抑制する方法、及び発芽が抑制された形質転換植物

(57) 【要約】

【課題】 本発明は、植物のペルオキシソームの機能に着目して、植物の発芽のみが抑制され、発芽後は正常に生育することができる植物の発芽抑制方法、及び発芽のみが抑制された新規な植物を提供する。

【解決手段】 本発明は、タンパク質輸送因子 P e x 7 p をコードする遺伝子を欠損させた植物、その作出方法に関する。また、本発明は、植物のタンパク質輸送因子 P e x 7 p をコードする遺伝子を欠損させて、ショ糖の存在しない培地での植物の発芽を抑制する方法に関する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

タンパク質輸送因子 P e x 7 p をコードする遺伝子を欠損させた植物。

【請求項 2】

遺伝子の欠損が、遺伝子の発現の阻害である請求項 1 に記載の植物。

【請求項 3】

遺伝子の欠損が、R N A i 法によるものである請求項 2 に記載の植物。

【請求項 4】

植物が、高等植物である請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の植物。

【請求項 5】

植物が、植物の種子である請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の植物。

10

【請求項 6】

植物のタンパク質輸送因子 P e x 7 p をコードする遺伝子を欠損させて、発芽時の生育にショ糖を必要とするが、生育に必要な他の機能は備えている植物を作出する方法。

【請求項 7】

タンパク質輸送因子 P e x 7 p をコードする遺伝子を欠損させる方法が、R N A i 法によるものである請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

P N A i 法が、ヘアピンループ型の 2 本鎖 R N A を産生する D N A の導入によるものである請求項 7 に記載の方法。

20

【請求項 9】

植物のタンパク質輸送因子 P e x 7 p をコードする遺伝子を欠損させて、ショ糖の存在しない培地での植物の発芽を抑制する方法。

【請求項 10】

遺伝子の欠損が、遺伝子の発現の阻害である請求項 9 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、タンパク質輸送因子 P e x 7 p をコードする遺伝子、即ち P E X 7 遺伝子を欠損させることによる植物の発芽を抑制する方法に関する。また、本発明は、P E X 7 遺伝子の発現が抑制された形質転換植物に関し、本発明の形質転換植物は、脂肪酸分解能を失っているために発芽時にショ糖を要求するが、その余の機能に異常はなく、発芽後は正常に生長することができる。

30

【背景技術】

【0002】

真核細胞では、さまざまな代謝機能が生体膜によって区画化されたオルガネラ（細胞内小器官）に存在する。個体が成長するうえで、各種のオルガネラが固有の機能を果たしつつ、協調的に働くことが必要不可欠である。これらのオルガネラは決して静的な状態のまま細胞内に存在しているのではなく、細胞の成長・分化に伴い生成、変換、消失するなどきわめて動的な状態にある。そして、多種多様に分化した真核細胞からなる高等動植物では、個々に分化した細胞内に存在するオルガネラが動的に変化し、それぞれ特殊化した機能をもちあわせている。逆にみれば、これはオルガネラの機能分化こそが真核細胞の多様化を可能にしているといえる。この事実は、動植物が示すさまざまな生理現象を解明していくうえで、オルガネラレベルでの解析が重要であることを示している。

40

【0003】

ペルオキシソームは、真核細胞に普遍的に存在する直径 0 . 5 ~ 1 . 0 μ m ほどのオルガネラである。1950年代にマウスの肝臓組織で発見されて以来、機能をもたないオルガネラと考えられてきた。しかしながら、高等植物のペルオキシソームが脂質代謝に関与するという証明がなされ、さらにその後の研究によってこの機能が生物界全般のペルオキシソームに普遍化されることにより、一躍注目されるオルガネラとなりつつある。

50

高等植物細胞のペルオキシソームは、それぞれの機能により少なくとも次に示す(1)～(3)の3種類に細分される(非特許文献1参照)。

(1) 黄化子葉などに観察されるグリオキシソーム。

(2) 光合成器官に存在する緑葉ペルオキシソーム。

(3) 根などの器官にみられる特殊化していないペルオキシソーム。

これらの分化したペルオキシソームは高等植物のさまざまな器官において、それぞれの代謝系に必要な特異的な酵素群を内包している。

グリオキシソームは主に脂肪性種子の発芽段階における胚乳や子葉のような貯蔵器官細胞に存在している(非特許文献2参照)。このグリオキシソームは脂肪酸β酸化とグリオキシル酸回路の酵素群を有しており、貯蔵脂肪からショ糖への変換過程において中心的な役割を担っている。対照的に、緑葉ペルオキシソームは光合成器官の細胞に広く分布している。この緑葉ペルオキシソームにはいくつかのグリコール酸経路の諸酵素が含まれており、緑葉ペルオキシソーム、葉緑体、ミトコンドリア間における酵素反応によって光呼吸系を成立させている(非特許文献3参照)。一方、特殊化していないペルオキシソームに関する報告はあまり多くはなく、今のところ際だった生理的機能は不明である。

【0004】

興味深いことに、グリオキシソーム、緑葉ペルオキシソーム、特殊化していないペルオキシソームは、個体の成長などの環境変化に応じてその機能を他のペルオキシソームに転換させることが知られている(非特許文献2参照)。この現象は植物ペルオキシソーム固有のものであり、酵母や哺乳類などのペルオキシソームではみられない。黄化子葉のグリオキシソームは、光照射により子葉が緑化していく過程で、直接緑葉ペルオキシソームへと変化する。この過程においてイソクエン酸リアーゼやリンゴ酸合成酵素のような脂質代謝酵素は特異的に分解される。そして、グリコール酸酸化酵素やヒドロキシビルビン酸還元酵素などの光呼吸酵素が新規に合成され、それらがペルオキシソームに輸送されることにより、グリオキシソームから緑葉ペルオキシソームへの機能転換が完了する。さらに、興味深いことに、この植物ペルオキシソームの機能転換は可逆的であり、老化段階にある子葉細胞では緑葉ペルオキシソームからグリオキシソームへの逆の機能転換が観察されている。このような植物ペルオキシソームの可逆的な分化は、これを支えるペルオキシソームへのタンパク質輸送系がたいへん柔軟に機能していることを想像させる。

【0005】

このように植物のペルオキシソームは、その成長過程において可逆的に機能転換することが知られているオルガネラであるが、このような機能転換に関与している物質やペルオキシソームの機能に関与しているタンパク質については十分解明されていない。

ペルオキシソームの機能の転換の過程や、それぞれの機能を発現している場合の当該機能に関与しているタンパク質類を解明するために、ペルオキシソームの機能の欠損した変異体が製造されてきた。

【0006】

例えば、本発明者らは植物細胞におけるペルオキシソーム機能制御に関連した遺伝子を同定するため、脂肪性種子植物のシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)を用いてペルオキシソーム機能を欠損した突然変異体の製造を行っている。例えば、グリオキシソームの形態が大きく変化した変異体を製造してきた(特許文献1参照)。

また、このような突然変異体としてグリオキシソームの脂肪酸β酸化系を欠損したシロイヌナズナ突然変異体(ped1～3)を開発してきた(非特許文献4参照)。この変異体pedは、2,4-ジクロロフェノキシ酪酸(2,4-dichlorophenoxy-butyric acid; 2,4-DB)に対して耐性を示す。野生型では、2,4-DBの酪酸鎖は脂肪酸β酸化系に基質として認識され、切断され、その結果として、除草剤である2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-dichlorophenoxyacetic acid; 2,4-D)に代謝され、死滅する。しかしながら、この変異体では脂肪酸β酸化系が欠損しているためこの変換が行われず、結果として変異個体は生き残る。

本発明者らは、この選抜方法により、独立した3つの突然変異体ped1～3の単離に

10

20

30

40

50

成功した。これらの変異体を、それぞれ *ped 1* ~ *3* (*peroxisome defective; ped*) と命名した。*ped 1* は、脂肪酸 β 酸化酵素の 1 種であるチオラーゼ (*thiolase*) を欠損するものであったが、*ped 2* は脂肪酸 β 酸化系の欠損だけでなく、光呼吸活性の低下も招いていた (非特許文献 5 参照)。このために、発芽時にショ糖を要求するだけでなく、発芽後も酸素の存在する大気中では成長が抑制される結果となっていた。

【0007】

さらに、本発明者らは、ペルオキシソームの形態の変異を解明するために、緑色蛍光タンパク質 (*GFP*) がペルオキシソームに蓄積されるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の変異体を開発してきた。即ち、緑色蛍光タンパク質 (*GFP*) の C 末端側にペルオキシソームへの移行シグナル配列 (*PTS1*) を有する、*D L K A L E L P V S K L* からなるアミノ酸配列を付加したタンパク質が発現するように遺伝子を改変した変異体を製造してきた (非特許文献 6 及び 7 参照)。

10

この変異体は、緑色蛍光タンパク質 (*GFP*) を発現するが、当該タンパク質には C 末端にペルオキシソーム移行シグナル配列が付加されているために、発現した *GFP* はペルオキシソームに蓄積され、その結果ペルオキシソームの形態を緑色の蛍光により確認することができるものである。同時に、付加したペルオキシソーム移行シグナル配列がペルオキシソームへのタンパク質の移行をおこなうものであることが確認された。

【0008】

一方、生物のペルオキシソームにおけるタンパク質輸送因子として、これまでに *Pex 1 p* ~ *Pex 25 p* が報告されてきており、シロイヌナズナにおいては *Pex 1 p* ~ *Pex 7 p*、*Pex 10 p* ~ *Pex 14 p*、*Pex 16 p*、*Pex 17 p*、及び *Pex 19 p* の 15 種類が同定されてきている。ヒトにおいては、これらのタンパク質をコードする遺伝子 (*PEXs*) の欠損は、先天性の異常を引き起こすことが知られている。一方、シロイヌナズナでは、*PEX 2*、*PEX 10*、又は *PEX 16* の欠損は致命的であるが、*PEX 5* 及び *PEX 14* ポイントミューテーションによつては致命的なことにはならないことが知られている。そして、このうち、*Pex 5 p*、*Pex 7 p*、及び *Pex 14 p* についてはそれらの相互の結合関係が明らかにされてきた (非特許文献 8 参照) が、これらのタンパク質輸送因子の詳細な機能については未だ解明されていない。

20

このように、植物のペルオキシソームは、非常に複雑な機能転換の過程や、脂質の分解やタンパク質の蓄積や光合成にも関与などの種々の重要な機能を果たしているオルガネラであり、ペルオキシソームの機能を解明することは脂質の分解などの単一の機能の応用だけでなく、植物の生育の制御のためにも必要なことであり、ペルオキシソームの機能の解析のための各種の変異体の製造が求められている。

30

【0009】

ところで、近年になって、特定の遺伝子の発現を抑制する手法のひとつとして *RNA i* (*RNA interference*) 法が開発されてきた。*RNA i* は、もともと 2 本鎖 *RNA* の導入により、それと相同な *RNA* の発現が強力に抑制されるという生命現象として 1998 年に発見されたものであり、この現象を利用して 2 本鎖 *RNA* (*dsRNA*) の導入により標的とする特定の遺伝子の発現を抑制する方法である。

【0010】

40

【特許文献 1】特願 2003 - 69271 号

【非特許文献 1】ベアパーズ エイチら、アヌアル レビュー プラント フィジオロジー、30 巻、159 - 193 頁 (1979 年) (Beavers, H.: Annu. Rev. Plant Physiol. 30, 159-193 (1979))

【非特許文献 2】ニシムラ エムら、セル ストラクチャー ファンクション、21 巻、387 - 393 頁 (1996 年) (Nishimura, M. et al.: Cell Struct. Funct. 21, 387-393 (1996))

【非特許文献 3】トルバート エヌ イー、エヌワイ アカデミック サイエンス、386 巻、254 - 268 頁 (1982 年) (Tolbert, N.E.: Ann. NY Acad. Sci. 386, 254-268 (1982))

50

【非特許文献4】ハヤシ エムら、プラントセル、10巻、183-195頁 (1998年) (Hayashi M., et al.: Plant Cell 10, 183-195 (1998))

【非特許文献5】ハヤシ エムら、エムボ ジャーナル、19巻、5701-5710頁 (2002年) (Hayashi, M., et al., (2000) EMBO J., 19, 5701-5710)

【非特許文献6】マノ、エス、及びハヤシ、エムら、1999年、プラント ジェー、17巻、309-320頁 (Mano, S., Hayashi, M., et al., (1999) Plant J., 17, 309-320)

【非特許文献7】マノ、エス、及びナカモリ、シーら、2002年、プラント セル フィジオロ、43巻、331-341頁 (Mano, S., Nakamori, C., et al., (2002) Plant Cell Physiol., 43, 331-341)

10

【非特許文献8】ニト ケーら、プラントセルフィジオロジー、43巻、355-366頁 (2002年) (Nito, K., et al., (2002) Plant Cell Physiol., 43, 355-366)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

本発明者らは、植物細胞におけるペルオキシソームの機能転換に関与している物質やペルオキシソームの機能に関与しているタンパク質を解明することを目的として、ペルオキシソームの機能に関連する新規な変異体を提供するものである。

また、本発明は、植物のペルオキシソームの機能に着目して、植物の発芽のみが抑制され、発芽後は正常に生育することができる植物の発芽抑制方法、及び発芽のみが抑制された新規な植物を提供することを目的としている。

20

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明者らは、ペルオキシソームの機能転換に関与している物質やペルオキシソームの機能に関与しているタンパク質を解明するために、ペルオキシソームにおけるタンパク質輸送因子である各種の Pex の機能を検討してきた。その中で Pex 5 p 及び Pex 7 p に着目して、それらの機能を解明するためにこれらのタンパク質をコードしている遺伝子である P E X 5 及び P E X 7 の欠損株を製造した。また、Pex 5 p の C 末端の 71 アミノ酸を欠損させた、Pex 5 p の 1 番目のメチオニン (Met) から 657 番目のチロシン (Tyr) までのアミノ酸配列 (¹ M - ⁶⁵⁷ Y) を過剰発現させるための P E X 5 Δ 7 を構築することにより、これらのタンパク質の機能を種々の観点から検討してきた。その結果、驚くべきことに、Pex 7 p は植物の光呼吸の機能に影響を与えることなく、植物の発芽時の生育における脂肪酸の代謝のみに影響を与える因子であることを見出した。したがって、Pex 7 p をコードする遺伝子である P E X 7 のみを欠損させることにより、通常の培地では発芽することができないが、ショ糖を含有する培地では発芽することができ、その後は正常に生育することができる植物、形質転換植物を創製することに成功した。

30

【0013】

即ち、本発明は、タンパク質輸送因子 Pex 7 p をコードする遺伝子を欠損させた植物に関する。

また、本発明は、植物のタンパク質輸送因子 Pex 7 p をコードする遺伝子を欠損させて、ショ糖の存在しない培地での植物の発芽を抑制する方法に関する。

40

さらに、本発明は、植物のタンパク質輸送因子 Pex 7 p をコードする遺伝子を欠損させて、発芽時の生育にショ糖を必要とするが、生育に必要な他の機能は備えている植物を作出する方法に関する。

【0014】

本発明は、植物のペルオキシソームにおけるタンパク質輸送因子 Pex 7 p の機能を欠損させることを特徴とする形質転換植物を提供するものである。本発明における Pex 7 p の機能を欠損させる手法としては、当該タンパク質をコードする遺伝子を欠損させる方法が挙げられる。

本発明における遺伝子を欠損させる手法としては、当該遺伝子の発現を阻害できる方法

50

であれば特に制限はなく、ジーンターゲット法などにより、ゲノム中の当該遺伝子の転写又は正常な発現を阻害することによってもよいし、また、アンチセンスやRNAi法によりその発現を阻害するだけでもよい。

RNAi法としては、2本鎖RNA(dsRNA)を導入してもよいが、ヘアピンループ型の2本鎖RNAが細胞内で生成されるように、当該RNAへの転写が可能なDNAを細胞内又はゲノム中へ導入してもよい。

当該ヘアピンループ型のRNAとしては、標的となるPEX7のRNAの塩基配列の全部または一部の塩基配列部分が2本鎖になるように設計され、それぞれの末端がスパーサー配列、例えばバー遺伝子などの塩基配列で結合されているものが挙げられる。このような塩基配列を有するDNAを、てきとうなプロモーターに結合してゲノム中に挿入することにより、当該遺伝子がRNAに転写され、当該スパーサー部分の両端には互いに相補的な配列が結合されていることから、転写後には、スパーサー配列部分で折れ曲がり、2本鎖のRNA部分を有するヘアピンループ型のRNAが生成されることになる。

当該ヘアピンループ型のRNAにおける2本鎖部分の塩基配列は、PEX7の発現を抑制することができる十分な長さを有しているならば、PEX7の全長である必要はなく、部分長でよい。スパーサー配列も特に制限はなく、ヘアピンループにおけるループを形成するに十分な長さがあればよい。

当該RNAを転写させるプロモーターとしては、常に転写活性を有するものであってもよいし、特定の条件下のみで転写活性を有するものであってもよい。

【0015】

本発明における植物としては、ペルオキシソームを含有する植物であって、Pex7pが機能しているものであれば特に制限はないが、穀物植物などの食糧用植物、花などの観賞用植物などの高等植物が実用性の観点から好ましい。

本発明の形質転換植物は、Pex7pの機能の欠損により発芽時にショ糖を必要することとを特徴とするものであり、ショ糖を含有する培地で発芽させた後は、生育に必要な他の機能は備えていることから通常の培地で正常に生育させることができる。したがって、穂の形質転換植物は、苗として製造することができるが、当該植物から得られる種子は、ショ糖を含有する培地でないと発芽することはできず、当該種子は通常の培地、例えば耕作地では発芽させることができないので、種子を採取しても次世代の生育ができないという特異的な性質を有するものである。

したがって、本発明の植物の消費者は常に苗の供給を受けなければ、仮に当該植物の種子を採取したとしても本発明の植物を発芽・生育させることはできないことになる。

【0016】

また、本発明は、植物のタンパク質輸送因子Pex7pの有する新たな機能を見出したものである。植物のタンパク質輸送因子Pex7pは、輸送シグナル配列としてPTS2を含有するタンパク質のみを介在していることを見出した。したがって、Pex7pの欠損はPTS2-依存性タンパク質のみの機能を低下させることになる。そして、これらのPTS2-依存性タンパク質は、脂肪酸β酸化に関与する酵素が包含されているが、光呼吸に関与する酵素は深く関与しておらず、その結果として、Pex7pをコードする遺伝子を欠損させることにより、ショ糖の存在しない培地での植物の発芽を抑制することができる方法を見出したものである。

【0017】

以下に、本発明による知見を確認するための詳細な説明を行うが、本発明はこれらの具体的な事項に限定されるものではなく、本発明の技術的な内容を具体的に説明するための事項に過ぎない。

PEX5及びPEX7の遺伝子転写産物の発現を阻害するために、2本鎖のRNAi(RNA interference)(dsRNAi)を用いた。シロイヌナズナにdsRNAiを導入するために、pex5i及びpex7iと命名した2種類の人工遺伝子を構築した。これらの人工遺伝子は、標的遺伝子に特異的な配列の2本鎖のRNAを形成するようにレビンらの方法(Levin, J.Z., et al., (2000) Plant Molecular Biology, 44, 759-775.)

10

20

30

40

50

に準じて作成した。構築された人工遺伝子 $pex5i$ 及び $pex7i$ の概要を図 1 に示す。図 1 は、 $PEX5\Delta7$ の構築の概要も示している。

これらの遺伝子是对應するタンパク質の一部分のアミノ酸配列をコードするセンス鎖とアンチセンス鎖からなる同じ配列を含んでおり、これらの配列はバー遺伝子 (bar gene) により相互に結合して 2 本鎖を形成する。 $pex5i$ は、シロイヌナズナの $Pex5p$ の 28 番目のロイシン (Leu) から 207 番目のグルタミン (Gln) までのアミノ酸配列 ($^{28}L - ^{207}Q$) をコードする DNA フラグメントのセンス鎖とアンチセンス鎖の方向 (図 1 中の四角枠の矢印はその方向を示している。) で、550-bp のバー遺伝子 (図 1 中では中央の四角枠で示されている。) に結合されている。同様に、 $pex7i$ は、シロイヌナズナの $Pex7p$ の 50 番目のグリシン (Gly) から 239 番目のバリン (Val) までのアミノ酸配列 ($^{50}G - ^{239}V$) をコードする DNA フラグメントが使用されている (図 1 中では斜線入りの四角枠で示されている。)

10

これらの遺伝子は、それぞれカリフラワーモザイクウイルスの 35S プロモーター (図 1 中では、 ^{355}P と記入された大きな矢印枠で示されている。) の下流にインサートされている。これらの遺伝子の末端には、ノパリンシンターゼ (nopaline synthase) (図 1 中では、 ^{905}T と記入された四角枠で示されている。) が結合されている。

【0018】

また、 $Pex5p$ の C 末端の 71 アミノ酸を欠損させた、 $Pex5p$ の 1 番目のメチオニン (Met) から 657 番目のチロシン (Tyr) までのアミノ酸配列 ($^1M - ^{657}Y$) を過剰発現させるための $PEX5\Delta7$ を構築した。この概要を図 1 の下段に示す。図 1 中の $PEX5\Delta7$ の欄の ^{355}P と記入された大きな矢印枠はカリフラワーモザイクウイルスの 35S プロモーターを示し、黒抜きの四角枠は $^1M - ^{657}Y$ をコードする遺伝子部分を示し、 ^{355}T と記入された四角枠は 35S ターミネーターを示す。

20

これらの人工遺伝子を、植物を選択するときのマーカーとなるハイグロマイシン (hygromycin) 耐性遺伝子を含むしている *Ti* ベクターにインサートした。そして、アグロバクテリウムによる形質転換法により、カナマイシン耐性形質転換植物である 2 種類の、即ち *AtGFP-PTS1* 及び *AtPTS2-GFP* のゲノム中に組み込んだ。*GFP-PTS1* は、その C 末端にヒドロキシビルビン酸還元酵素の C 末端側の 10 アミノ酸残基を含むする *GFP-融合タンパク質* を発現するものであり、また *PTS2-GFP* はその N 末端にクエン酸生成酵素の N 末端側の 49 アミノ酸残基を含むする *GFP-融合タンパク質* を発現する (Mano, S., et al., (2002) Plant Cell Physiol, 43, 331-341)。なお、*At* はシロイヌナズナであることを示している。このために、これらの形質転換体の親の代はペルオキシソームによる緑色の蛍光を有している。

30

【0019】

最初の形質転換体を T_0 植物とする。カナマイシン及びハイグロマイシンの両方の耐性を示す子孫の T_1 は、それぞれ $pex5i / GFP-PTS1$ 、 $pex5i / PTS2-GFP$ 、 $pex7i / GFP-PTS1$ 、 $pex7i / PTS2-GFP$ 、 $PEX5\Delta7 / GFP-PTS1$ 、及び $PEX5\Delta7 / PTS2-GFP$ として表記する。これらを各種の分析に使用した。子孫の T_1 は外来遺伝子のヘテロ接合体であるから、以下に記述する全ての表現型は優性であった。

40

【0020】

子孫の T_1 における外来遺伝子の作用効果を免疫ブロット分析で試験した。形質転換植物及びその親の植物の葉からサンプルを抽出し、全タンパク質の量が $10 \mu g$ になるようにして SDS-PAGE を行った。免疫ブロットは各々のタンパク質の抗体を用いて行った。結果を図 2 に図面に代わる写真で示す。図 2 のコントロール (cont) は親の植物 (*AtGFP-PTS1* 及び *AtPTS2-GFP*) の場合を示し、 $pex5i$ 、 $pex7i$ 及び $PEX5\Delta7$ は、それぞれ、前記で構築した人工遺伝子で形質転換した植物の場合を示し、それぞれの 1 及び 2 は親の植物、即ち 1 は親の植物が *AtGFP-PTS1* である場合を、2 は親の植物が *AtPTS2-GFP* である場合を示している。図 2 中の矢印はそれぞれのタンパク質を示し、黒三角印は $PEX5\Delta7$ を示す。

50

この結果、*pex5i* / *GFP* - *PTS1*、及び *pex5i* / *PTS2* - *GFP* は、いずれも *AtPex5p* の量が極度に減少しているが、*AtPex7p* の量の変化はほとんど観察されなかった。これに対して *pex7i* / *GFP* - *PTS1*、及び *pex7i* / *PTS2* - *GFP* は、いずれも *AtPex7p* の量が極度に減少しているが、*AtPex5p* の量の変化はほとんど観察されなかった。一方、*PEX5Δ7* / *GFP* - *PTS1*、及び *PEX5Δ7* / *PTS2* - *GFP* は、*PEX5Δ7* をコードするポリペプチドの分子量に相応する箇所にバンドが現れており、*AtPex7p* の量の変化はほとんど観察されなかった。

このように、本発明で使用した *RNAi* 法により、遺伝子特異的に標的遺伝子の *Pex5p* や *Pex7p* の発現を阻害することができることが確認された。

10

【0021】

形質転換植物である *pex5i* / *GFP* - *PTS1* 及び *pex5i* / *PTS2* - *GFP* における *GFP* - *PTS1* 及び *PTS2* - *GFP* の非細胞膜 (subcellular) への局在化を共焦点レーザースキャニング顕微鏡を用いて分析した。結果を図3に図面に代わる写真で示す。図3の左側の欄の写真は葉の表皮細胞からのものであり、右側の欄の写真は根からのものである。図3の *PTS1* と示されている上段は *pex5i* / *GFP* - *PTS1* からのものであり、*PTS2* と示されている中段は *pex5i* / *PTS2* - *GFP* からのものであり、*cont* と示されている下段の左側は野生型に *GFP* - *PTS1* を発現させるようにした親の形質転換体の葉の表皮細胞からのものであり、その右側は野生型に *PTS2* - *GFP* を発現させるようにした親の形質転換体の根の細胞からのものである。黒三角印はペルオキシソームで検出された蛍光を示し、矢印は細胞質ゾルにおいて検出された蛍光を示す。これらの写真の拡大率は同じであり、図3右下に示すバーは $20\mu\text{m}$ を示す。

20

この結果、*pex5i* / *GFP* - *PTS1* の葉及び根の細胞は、周辺部のみに緑色の蛍光が観察され (図3の上段参照)、中央の液胞の周囲の細胞質ゾルでも同時に起こっている。同様な蛍光イメージは、ハイグロマイシン/カナマイシン耐性を示す20の T_1 世代の中から *pex5i* / *GFP* - *PTS1* として独立して単離された19の形質転換体においても観察された。細胞質ゾルの蛍光は、42の T_1 世代の中から *pex5i* / *PTS2* - *GFP* として独立して単離された35の形質転換体においても観察された (図3の中段参照)。細胞質ゾルに蛍光を示す T_1 世代は *Pex5p* の量が減少している (図2参照)。これらのデータは、*Pex5p* が細胞内から消失すれば、*PTS1* - 及び *PTS2* - 含有タンパク質の両者の細胞内輸送の能力が阻害されることを示している。

30

【0022】

同様に、形質転換植物である *pex7i* / *GFP* - *PTS1* 及び *pex7i* / *PTS2* - *GFP* の葉及び根の細胞における *GFP* - *PTS1* 及び *PTS2* - *GFP* の非細胞膜 (subcellular) への局在化を共焦点レーザースキャニング顕微鏡を用いて分析した。結果を図4に図面に代わる写真で示す。図4の左側の欄の写真は葉の表皮細胞からのものであり、右側の欄の写真は根からのものである。図4の *PTS1* と示されている上段は *pex7i* / *GFP* - *PTS1* からのものであり、*PTS2* と示されている下段は *pex7i* / *PTS2* - *GFP* からのものである。黒三角印はペルオキシソームで検出された蛍光を示し、矢印は細胞質ゾルにおいて検出された蛍光を示す。これらの写真の拡大率は同じであり、図4右下に示すバーは $20\mu\text{m}$ を示す。

40

この結果、*pex7i* / *GFP* - *PTS1* として独立して単離された55全ての形質転換体は、*Pex7p* の量が減少している (図2参照) にもかかわらず、これらの親の植物と同様にペルオキシソームに対応する箇所に蛍光を観察することができた (図4の上段参照)。一方、34の T_1 世代の中から *pex7i* / *PTS2* - *GFP* として独立して単離された32の形質転換体の細胞は、細胞質ゾルのみに緑色の蛍光を観察することができた (図3の下段参照)。細胞質ゾルに蛍光を示す T_1 世代は *Pex7p* の量が減少している (図2参照)。これらのデータは、*Pex7p* が細胞内から消失すれば、*PTS2* - 含有タンパク質のみの細胞内輸送の能力が阻害されることを示している。

このような蛍光タンパク質によるイメージングにより、*PTS1* - 依存性タンパク質は

50

P e x 5 p によってのみ介在されるが、P T S 2 - 依存性タンパク質は P e x 5 p 及び P e x 7 p の両者によって介在されることが明らかになった。

【 0 0 2 3 】

シロイヌナズナの P e x 5 p は、カルボキシ末端における T P R (tetratricopeptide repeat) モチーフを有している (Brickner, D.G., et al., (1998) Plant Physiol., 118, 330)。T P R モチーフは P T S - 1 に作用するのに必要なモチーフであり (Brocard, C., et al., (1994) Biochemical and Biophysical Research Communications, 204, 1016-1022.)、7 個の双頭の共通アミノ酸配列からなっている。P E X 5 Δ 7 遺伝子の産物である P E X 5 Δ 7 p は、この T P R モチーフの最後の繰り返し部分を欠損している。

この P e x 5 Δ 7 p の、P T S - 1 タンパク質、P e x 7 p、及び P e x 1 4 p との結合活性をニトラが報告した方法 (Nito, K., et al., (2002) Plant Cell Physiol, 43, 355-366.) に準じた酵母ツーハイブリッド分析法により分析した。各々のタンパク質を G a l 4 - A D 又は G a l 4 - B D と融合させ、酵母の試験株 P J 6 9 - 4 A (James, P., et al., (1996) Genetics, 144, 1425-1436.) で発現させた。タンパク質間相互作用を H I S 3 及び β - ガラクトシダーゼをレポーター遺伝子とした G a l 4 依存性の転写活性により測定した。この結果を図 5 に図面に代わる写真で示す。形質転換体をヒスチジンを含まない培地 (- H i s) で培養して、β - ガラクトシダーゼ活性を定量した。図 5 中の B D は G a l 4 - B D との融合を示し、A D は G a l 4 - A D と融合を示し、- H i s はヒスチジンを含まない培地での培養結果を示し、β - gal activity は β - ガラクトシダーゼ活性 (U / m g タンパク質) を示す。

この結果、H I S 3 及び β - ガラクトシダーゼからなるレポーター遺伝子の顕著な転写活性が見られなかったことから、P e x 5 Δ 7 p は P T S - 1 を含有するタンパク質と結合できないことが判明した。しかしながら、P e x 5 Δ 7 p と P e x 7 p との結合活性は、P e x 5 p と P e x 7 p との結合活性と同じであった。一方、P e x 1 4 p は弱いながらも P e x 5 p よりも P e x 5 Δ 7 p との結合活性が示された。

【 0 0 2 4 】

また、形質転換植物である P E X 5 Δ 7 / G F P - P T S 1 及び P E X 5 Δ 7 / P T S 2 - G F P の葉及び根の細胞における G F P - P T S 1 及び P T S 2 - G F P の非細胞膜 (subcellular) への局在化を共焦点レーザースキャニング顕微鏡を用いて分析した。結果を図 6 に図面に代わる写真で示す。図 6 の左側の欄の写真は葉の表皮細胞からのものであり、右側の欄の写真は根からのものである。図 6 の P T S 1 と示されている上段は P E X 5 Δ 7 / G F P - P T S 1 からのものであり、P T S 2 と示されている下段は P E X 5 Δ 7 / P T S 2 - G F P からのものである。黒三角印はベルオキシソームで検出された蛍光を示し、矢印は細胞質ゾルにおいて検出された蛍光を示す。これらの写真の拡大率は同じであり、図 6 右下に示すバーは 2 0 μ m を示す。

この結果、P E X 5 Δ 7 / G F P - P T S 1 及び P E X 5 Δ 7 / P T S 2 - G F P の両者の葉及び根の細胞は細胞質ゾルのみに緑色の蛍光を有していた (図 6 の上段参照)。同様な蛍光イメージは、1 0 の T₁ 世代の中から P E X 5 Δ 7 / G F P - P T S 1 として独立して単離された 5 の形質転換体においても観察され、8 T₁ 世代の中から P E X 5 Δ 7 / P T S 2 - G F P として独立して単離された 6 の形質転換体においても観察された。これらのデータは、P E X 5 Δ 7 の遺伝子産物が細胞内で過剰発現すれば、P T S 1 - 及び P T S 2 - 含有タンパク質の両者の細胞内輸送の能力が減少することを示している。

【 0 0 2 5 】

また、本発明者らは、グリオキシソームの脂肪酸 β 酸化機能を欠失した植物は 2 , 4 - ジクロロフェノキシ酪酸 (2 , 4 - D B) に対して耐性となり、発芽の生育にショ糖を必要とすることを報告してきた (Hayashi, M., et al., (1998) Plant Cell, 10, 183-195)。グリオキシソームの機能を解析するために、細胞質ゾルに蛍光を発する T₁ 植物の子孫である T₂ 植物を用いて、2 , 4 - D B を含有する培地での生育試験を行った。p e x 5 i / G F P - P T S 1 及び p e x 5 i / P T S 2 - G F P、p e x 7 i / G F P - P T S 1 及び p e x 7 i / P T S 2 - G F P、並びに、G F P - P T S 1 及び P T S 2 - G F

P の T_2 世代の種子を 2, 4 - DB を 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 含有する培地 (2, 4 - DB)、ショ糖を含有しない培地 (- sucrose)、及び通常の培地 (GM) でそれぞれ 10 日間生育させた。発芽後は、培地から寒天プレートに移植した。

結果を図 7 に図面に代わる写真で示す。図 7 中の pex5i、pex7i はそれぞれの変異体を示し、cont は、コントロールとしての親株からの GFP 植物の場合を示し、それぞれの 1 及び 2 は PTS 1 について PTS 2 についてを示す。図 7 の上段は 2, 4 - DB を 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 含有する培地 (2, 4 - DB) の場合を示し、中段はショ糖を含有しない培地 (- sucrose) の場合を示し、下段は通常の培地 (GM) の場合をそれぞれ示す。

この結果、2, 4 - DB に耐性を示す T_2 の実生は、その 71 % が発芽後に伸長した根を有していた。一方、これらの変異体の親株からのものは (図 7 中の cont)、その親株と同様に強い生育阻害を示し、実生は休眠状態であった (図 7 の上段参照)。加えて、 T_2 の実生のほとんどは、発芽後の生育にショ糖を必要とし、ショ糖の欠如した条件下では正常に生育することができなかった (図 7 の中段参照)。発芽時に 2, 4 - DB 耐性を示し、かつショ糖を必要とする全てのものは、細胞質ゾルに緑色の蛍光を示し、ハイグロマイシン及びカナマイシンの両者に耐性があった。

【0026】

次に、pex5i 及び pex7i による形質転換体における光呼吸活性について検討した。

まず、光を照射しながら、野生型 (cont)、pex5i / GFP - PTS 1 (pex5i) 及び pex7i / PTS 2 - GFP (pex7i) を、通常の大気下 (36 Pa CO_2)、又は 1000 Pa CO_2 を含有する大気下で、8 週間生育させた。その結果を図 8 に図面に代わる写真で示す。図 8 の左側から、通常大気下での野生型 (air cont)、pex5i / GFP - PTS 1 の CO_2 存在下 (C02 pex5i)、同通常の大気下 (air pex5i)、pex7i / PTS 2 - GFP の CO_2 存在下 (C02 pex7i)、同通常の大気下 (air pex7i) をそれぞれ示している。

この結果、通常の大気下で pex5i / GFP - PTS 1 (図 8 の中央) 及び pex5i / PTS 2 - GFP (図では示されていない。) を生育させた場合には、野生型 (図 8 の左端) に比べて葉が黄緑色となり、矮小形の形態となった。このフェノタイプは、この植物を CO_2 の条件で生育させた場合には回復した (図 8 の C02 pex5i 参照)。おなじようなフェノタイプは、P EX 1 4 遺伝子が欠損し、光呼吸能が減少した ped2 でも観察されている (非特許文献 5 参照)。これに対して、pex7i / GFP - PTS 1 (図 8 の右端) 及び pex5i / PTS 2 - GFP (図では示されていない。) は、通常の大気下であっても正常に生育することができた。これらのことから、光呼吸能においては、Pex5p のみが影響しており、Pex7p は影響を与えないことがわかった。

【0027】

次に、これらの植物の光化学系 II (F_v/F_m) における最大量子収量を測定した。この最大量子収量は、最大蛍光 (F_m) に対する暗所に適応したクロロフィルの蛍光の変化量 (F_v) の比 (F_v/F_m) として評価することができる (Franklin, L.A., et al., (1992) *Planta*, 187, 399-408.; Krause, G.H., (1988) *Physiologia Plantarum*, 74, 56 6-574.)。そこで、細胞質ゾルにおいて緑色の蛍光を有する pex5i / GFP - PTS 1 及び pex7i / PTS 2 - GFP と、野生型の暗所に適応した葉の F_v/F_m を比較した。光化学系 II で安定電子受容体として働いている Q_A と Q_B キノンが過剰に還元を受け光合成電子伝達反応が停止する原因であると考えられている強光阻害という現象を減少させるために、まず、弱い光 ($50 \mu\text{E m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) を照射しながら、1000 Pa の CO_2 を含有する大気下で 3 週間、これらの植物を生育させた。この条件下では全ての植物は正常に生育した。そして、この条件下での F_v/F_m の値は約 0.8 であると推定された。その後、これらの植物を通常の大気下 (36 Pa CO_2) で、強い光 ($450 \mu\text{E m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) を照射した。このような条件下では、リブローズ - 1, 5 - 二リン酸 (RuBP) と CO_2 から 2 分子のグリセリン酸 - 3 - リン酸 (PGA) を生成する

10

20

30

40

50

反応と、RuBPとO₂からPGAとグリコール酸磷酸を生成する反応とを触媒する酵素であるリブロース-1,5-二磷酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ(RuBisCO)は、光合成における炭酸固定において必要とされるカルボキシラーゼ活性に加えてオキシゲナーゼとして作用する。オキシゲナーゼの反応による副産物であるホスホグリコレートは光呼吸の酵素により代謝され、最終的にはカルビン-ベンソンサイクル(Calvin-Benson cycle)に戻される。それ故に、野生型の植物におけるF_v/F_mの値は、強い光の照射を受けた後も変化することはない。

【0028】

GFP-PTS1、pex5i/GFP-PTS1、PTS2-GFP、pex7i/PTS2-GFP、及びpex2変異体を、弱い光(50 μE m⁻² · sec⁻¹)を照射しながら、1000 PaのCO₂を含有する大気下で4週間生育させた。これらの植物に、通常の大気下(36 Pa CO₂)で、4時間強い光(450 μE m⁻² · sec⁻¹)を照射した。0時間照射及び4時間照射のそれぞれの植物の葉における光化学系II(F_v/F_m)の最大量子収量を、これらの植物を30分間暗所に放置した後に測定した。この結果を図9にグラフで示す。図9の左側(0h)は、0時間照射の場合を示し、右側(4h)は4時間照射の場合を示し、それぞれの場合の左側から、野生型としての親株のGFP-PTS1、変異株のpex5i/GFP-PTS1、野生型としての親株のPTS2-GFP、変異株のpex7i/PTS2-GFP、及び変異株のpex2をそれぞれ示す。図9の縦軸は、F_v/F_mの値を示す。それぞれのF_v/F_mの値は、各植物について6枚の葉からの測定値の平均を示す。棒グラフ中のバーは標準偏差を示す。

【0029】

この結果、野生型では予想どおり強い光を照射したときもF_v/F_mの値はほとんど変化が見られなかったし、pex7i/PTS2-GFPについてもF_v/F_mの値の顕著な減少は観察されなかった(図9参照)。これに対して、pex5i/GFP-PTS1のF_v/F_mの値については、顕著な減少が観察された。このような減少は、PEX14オルソログが欠損しているpex2についても同様に観察された(図9参照)。

観察されたF_v/F_mの値の減少は、光反応とカルビン-ベンソンサイクルの不均衡と対応していることから、pex5i/GFP-PTS1は、光呼吸の不全により低CO₂/強力な光の条件下ではカルビン-ベンソンサイクルの活性を十分に維持することができないことを示している。

【0030】

これらの結果は、pex5i及びpex7iの両変異体は、いずれもグリオキシソームの機能は欠如していることを示している。表現型の分離は、T₂の個体群における遺伝子操作による遺伝子型がヘテロであったためと考えられる。しかし、ハイグロマイシン/カナマイシン耐性は全ての子孫が受け継いだにもかかわらず、T₂の多くは細胞質ゾルにおける蛍光を失い、そして成長と共にペルオキシソームにおける蛍光を回復し、T₃世代の極少数のみが細胞質ゾルにおける蛍光を示しただけであった。

【0031】

高等植物においては、細胞質アコニターゼ(cytosolic aconitase)を除くグリオキシレートサイクル、及び脂肪酸ベータ酸化の関連する全ての酵素は、グリオキシソームに局在化している。これらの酵素の中の、短鎖アシルCoAオキシダーゼ、中鎖アシルCoAオキシダーゼ、多機能酵素(multifunctional enzyme)、リンゴ酸合成酵素、及びイソクエン酸リアーゼはPTS1を含有するタンパク質であり、中鎖アシルCoAオキシダーゼ、長鎖アシルCoAオキシダーゼ、3-ケトアシルCoAチオラーゼ、リンゴ酸脱水素酵素、及びクエン酸合成酵素はPTS2を含有するタンパク質である。したがって、Pex5pの欠損は、これらの全ての酵素のグリオキシソームへの輸送が阻害されることになる。この結果、グリオキシソームの機能が低下し、2,4-DBに対する耐性が獲得されることになる。そして、発芽に際してはショ糖を必要としてくる。加えて、Pex5pの欠損は、葉におけるペルオキシソームの機能をも低下させる(図8及び9参照)。光合成器官における葉のペルオキシソームは光呼吸に関連する酵素を含有しており、これらの酵

素は P T S 1 を含有するタンパク質であり、ペルオキシソームへの輸送には P e x 5 p が介在しているからである。

【 0 0 3 2 】

これに対して、P e x 7 p の欠損は、グリオキシソームの機能を低下させるが、葉のペルオキシソームの機能には大きな影響を与えないことがわかった（図 7 ～ 9 参照）。即ち、葉のペルオキシソームの機能は P e x 5 p が介在する P T S 1 - を含有するタンパク質によって主として機能しており、これが P e x 7 p の欠損によっても光呼吸の活性に影響を与えない原因であると考えられる。ただひとつの例外は、リンゴ酸脱水素酵素であり、この酵素は P T S 2 を含有しており、この酵素はヒドロキシビルビン酸還元酵素によって触媒される反応に必要な N A D H を供給している。P e x 7 p の欠損は、ペルオキシソームにおけるこの酵素の機能も低下させると考えられるが、本発明者らの観察では（図 7 ～ 9 参照）では、N A D H の低下は観察されていない。これは、N A D H の供給がリンゴ酸脱水素酵のみによりにされるのではなく、他の供給経路が存在していると考えられる。

10

これらに結果から、P e x 7 p のみの欠損は、グリオキシソームの機能を低下させるが、植物のその他の機能の低下を招かないということになる。即ち、より端的には、P e x 7 p のみの欠損は、発芽時にショ糖を必要とすること以外の植物の機能の低下を招かないということになる。このことは、本発明により初めて明らかにしたものである。

【発明の効果】

【 0 0 3 3 】

本発明は、植物におけるペルオキシソームのタンパク質輸送因子 P e x 7 p の有する新たな機能を明らかにするものであり、当該機能を応用した新規かつ有用な形質転換植物を提供するものである。本発明の形質転換植物は、発芽後は通常の培地で正常に生育することができるが、発芽時のみにショ糖を要求するという特異的な性質を有するものである。このような性質は、通常の消費者においては種子から発芽させることが困難であり、常に苗の供給を必要とされるものであり、植物が生育して仮に種子が採取されても、消費者は苗の供給を必要とし、種子産業における新たな植物の供給手法を提供するものである。

20

【 0 0 3 4 】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれら実施例により何ら限定されるものではない。

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の野生型はコロンビア (*Columbia*) の生態種を用いた。

30

G F P - P T S 1 及び P T S 2 - G F P を発現する形質転換体の構築、並びに p e d 2 変異体の特性については非特許文献 5 及び 7 を参照されたい。

すべての種子は表面を 0 . 0 2 % のトリトン X - 1 0 0 を含む 2 % N a C l O で殺菌し、抗生物質の存在下又は非存在下で生育培地（2 . 3 m g / m L ムラシゲ及びスコグ塩（Murashige and Skoog salts）（和光純薬、大阪、日本）、1 % ショ糖、1 0 0 μ g / m L ミオイノシトール、1 μ / m L チアミン塩酸塩、0 . 5 μ g / m L ピリドキシム、0 . 5 μ g / m L ニコチン酸、0 . 5 m g / m L メス - K O H （Mes-KOH）、p H 5 . 7、及び 0 . 8 % 寒天）で生育した。ただし、実験の内容によって、前記生育培地にさらに 0 . 2 μ g / m L の 2 , 4 - ジクロロフェノキシ酪酸を添加したり、ショ糖を取り除いた生育培地とした。発芽後は、パーライトとパーミュキュライトの 1 : 1 の混合物を用いて生育させた。生育の条件は、2 2 °C で、通常の大気下又は 1 0 0 0 P a の C O ₂ を含有する大気下で、1 6 時間光を照射し（1 0 0 μ E m⁻² s⁻¹）、8 時間暗くするというサイクルであった。

40

【実施例 1】

【 0 0 3 5 】

p e x 5 i 及び p e x 7 i の構築

センス側の配列を、両端に S p e I 及び S a c I サイトが導入できるように P C R で増幅した、一方、アンチセンス側は両端が B a m H I 及び X h o I サイトになるように増幅した。センス側及びアンチセンス側の D N A フラグメントをそれぞれ、p B l u e s c r

50

i p t K S - (ストラタジーン、La Jolla, CA, USA) の S p e I - S a c I サイト B a m H I - X h o I サイトに挿入した。バー遺伝子 (bar gene) を含有するプラスミド p A R K 2 2 におけるバー遺伝子 (bar gene) をコードしている B a m H I - B g l I I フラグメントを、前記のプラスミドの B a m H I サイトにリンカーとして挿入した。

これらのプラスミドから人工的な部分 (artificial genes) を切り取り、 p B I 1 2 1 - H m - リンカーの X h o I - S a c I サイトに挿入した。この p B I 1 2 1 - H m - リンカーは、G U S 遺伝子を X b a I、X h o I、S m a I、S p e I、K p n I 及び S a c I サイトを含有するリンカー配列で置換した p B I 1 2 1 の T i ベクターから構築されたものである。これは、植物を選択するときのマーカーとなるハイグロマイシン (hygromycin) 耐性遺伝子を含有している。

10

これらの概要を図 1 に模式的に示す。

【実施例 2】

【0036】

P E X 5 Δ 7 の構築

P e x 5 p の 1 番目のメチオニンから 6 5 7 番目のチロシン (¹ M - ⁶⁵⁷ Y) をコードする DNA フラグメントを P C R で増幅した。この P C R 産物を p D O N R 2 2 1 (インビトロジェン、Carlsbad, CA, USA) に挿入し、これをメーカー (インビトロジェン、Carlsbad, CA, USA) のプロトコルに従って、B P 及び L R クローザーを用いて p G W B 2 の T i ベクターに転換した。

これらの概要を図 1 に模式的に示す。

20

【実施例 3】

【0037】

アグロバクテリアによる形質転換

実施例 1 で製造した p e x 5 i 又は p e x 7 i をそれぞれ含有するベクターをそれぞれ、カナマイシン耐性を有し、G F P - P T S 1 及び P T S 2 - G F P を発現している形質転換イロイヌナズナに、アグロバクテリウムツメファシエンス (Agrobacterium tumefaciens) (C 5 8 C 1 R i f 株^R) を用いて、ベクトールドラ (Bechtold, N., et al., (1993) C. R. Acad. Sci., 316, 1194-1199) に記載の真空浸透法により導入した。これらのベクターが導入された形質転換体を、50 μg / mL のカナマイシン及び 25 μg / mL のハイグロマイシンを含有するムラシゲ / スコグ (Murashige / Skoog) プレートで選別した。

30

【実施例 4】

【0038】

免疫プロットティング

試料の調製及び P e x 5 p 又は P e x 7 p に対する抗体を用いた免疫プロット分析法は、ニトラの方法 (Nito, K., et al., (2002) Plant Cell Physiol, 43, 355-366) に準じて行った。

粗抽出物は、細胞質に緑色の蛍光を有する T₁ 植物の 3 週齢の葉から調製した。免疫プロットティングには 10 μg のタンパク質を用いた。

結果を図 2 に示す。

40

【実施例 5】

【0039】

G F P - P T S 1 及び P T S 2 - G F P による蛍光の分析

根の細胞を分析するために、生育培地で生育している T₁ 植物の 10 日齢の根から標本を作製した。また、葉の細胞を分析するために、T₁ 植物の 3 週齢の葉から標本を作製した。これらの標本の蛍光イメージ像を、アルゴンレーザー及び F I T C フィルターセットを有する L S M 5 10 レーザースキャニング共焦点顕微鏡 (励起波長 ; 465 - 505 nm、発光波長 ; 505 - 550 nm) (カールツワイス、ドイツ) を用いて測定した。

結果を図 3、図 4、図 6 にそれぞれ示す。

【実施例 6】

50

【 0 0 4 0 】

酵母のツーハイブリッドシステムによる分析

P E X 5 Δ 7 の酵母によるツーハイブリッドシステムによる分析を、既に報告された方法に準じて行った。プラスミド p D O N R 中の P E X 5 Δ 7 をコードしている D N A フラグメントを、酵母のツーハイブリッドベクター p G A D - G W に転換した。このベクターは、p G A D - C 1 (James, P., et al., (1996) Genetics, 144, 1425-1436) のマルチクローニングサイトをゲイトウェイコンバージョンカセット (インビトロジェン、La Jolla, CA, USA) で置換して構築した。他のベクターの構築は、ニトラの方法 (Nito, K., et al., (2002) Plant Cell Physiol, 43, 355-366) に準じて行った。

形質転換体をヒスチジンを含有しない 5 0 m M の 3 - アミノトリアゾールを含有する合成培地で生育し、β - ガラクトシダーゼの活性を定量した。 10

結果を図 5 に示す。

【 実施例 7 】

【 0 0 4 1 】

光化学系 II (F v / F m) における最大量子収量の測定

光障害の効果を減少させるために、植物を 4 週間 1 0 0 0 P a の C O ₂ を含む大気中で、光を少なくした条件 (5 0 μ E m ⁻² s ⁻¹) で生育させた。これらの植物に、通常の大気下 (3 6 P a C O ₂) で、強力な光 (4 5 0 μ E m ⁻² s ⁻¹) を、それぞれ 0、30、60、120 分間、照射した。光の照射後、植物を 30 分間暗所に置いた。最大蛍光 (F m) と変化した蛍光 (F v) の比 (F v / F m) を、暗所に適応した葉の上側の表面からのクロロフィルの蛍光発色を、パルス増幅調節型蛍光計 (pulse amplitude modulation fluorometer) (Mini-PAM; H. Walz, Effeltrich, Germany) を用いて測定した結果から計算した。 20

結果を図 9 にグラフ化して示す。

【 産業上の利用可能性 】

【 0 0 4 2 】

本発明は、植物の P E X 7 遺伝子の発現を抑制することからなる植物の発芽のみを抑制する方法、及び植物の P E X 7 遺伝子の発現が抑制され発芽のみが抑制された形質転換植物を提供するものであり、本発明の形質転換植物は、植物の通常の栽培条件下では発芽することができず、発芽にショ糖を必要とすることから、消費者は栽培に当たっては発芽後の苗を入手しなければならず、本発明の形質転換体は農業分野、特に種子産業、において新たな植物の供給形態を提供するものであり、産業上有用なものである。 30

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 4 3 】

【 図 1 】 図 1 は、本発明により構築された人工遺伝子 p e x 5 i、p e x 7 i、及び P E X 5 Δ 7 の概要を模式的に示したものである。

【 図 2 】 図 2 は、本発明により R N A i 法のために導入した外来遺伝子の作用効果を免疫ブロット分析で試験した S D S - P A G E の結果を示す図面に代わる写真である。図 2 のコントロール (cont) は親の植物 (A t G F P - P T S 1 及び A t P T S 2 - G F P) の場合を示し、p e x 5 i、p e x 7 i 及び P E X 5 Δ 7 は、それぞれ、前記で構築した人工遺伝子で形質転換した植物の場合を示し、それぞれの 1 及び 2 は親の植物、即ち 1 は親の植物が A t G F P - P T S 1 である場合を、2 は親の植物が A t P T S 2 - G F P である場合を示している。図 2 中の矢印はそれぞれのタンパク質を示し、黒三角印は P E X 5 Δ 7 を示す。 40

【 図 3 】 図 3 は、本発明の形質転換植物である p e x 5 i / G F P - P T S 1 及び p e x 5 i / P T S 2 - G F P における G F P - P T S 1 及び P T S 2 - G F P の膜への局在化を共焦点レーザーキャニング顕微鏡を用いて分析した結果を示す図面に代わる写真である。図 3 の左側の欄の写真は葉の表皮細胞からのものであり、右側の欄の写真は根からのものである。図 3 の P T S 1 と示されている上段は p e x 5 i / G F P - P T S 1 からのものであり、P T S 2 と示されている中段は p e x 5 i / P T S 2 - G F P からのものであ 50

り、contと示されている下段の左側は野生型にGFP-PTS1を発現させるようにした親の形質転換体の葉の表皮細胞からのものであり、その右側は野生型にPTS2-GFPを発現させるようにした親の形質転換体の根の細胞からのものである。黒三角印はペルオキシソームで検出された蛍光を示し、矢印は細胞質ゾルにおいて検出された蛍光を示す。これらの写真の拡大率は同じであり、図3右下に示すバーは20 μ mを示す。

【図4】図4は、本発明の形質転換植物であるpex7i/GFP-PTS1及びpex7i/PTS2-GFPの葉及び根の細胞におけるGFP-PTS1及びPTS2-GFPの局在化を共焦点レーザーキャニング顕微鏡を用いて分析した結果を示す図面に代わる写真である。図4の左側の欄の写真は葉の表皮細胞からのものであり、右側の欄の写真は根からのものである。図4のPTS1と示されている上段はpex7i/GFP-PTS1からのものであり、PTS2と示されている下段はpex7i/PTS2-GFPからのものである。黒三角印はペルオキシソームで検出された蛍光を示し、矢印は細胞質ゾルにおいて検出された蛍光を示す。これらの写真の拡大率は同じであり、図4右下に示すバーは20 μ mを示す。

10

【図5】図5は、本発明で製造したPEX5 Δ 7pのPTS-1タンパク質、Pex7p、及びPex14pとの結合活性を酵母ツーハイブリッド分析法により分析した結果を示す図面に代わる写真である。図5中のBDはGal4-BDとの融合を示し、ADはGal4-ADと融合を示し、-Hisはヒスチジンを含まない培地での培養結果を示し、 β -gal activityは β -ガラクトシダーゼ活性(U/mgタンパク質)を示す。

【図6】図6は、本発明の形質転換植物であるPEX5 Δ 7/GFP-PTS1及びPEX5 Δ 7/PTS2-GFPの葉及び根の細胞におけるGFP-PTS1及びPTS2-GFPの局在化を共焦点レーザーキャニング顕微鏡を用いて分析した結果を示す図面に代わる写真である。図6の左側の欄の写真は葉の表皮細胞からのものであり、右側の欄の写真は根からのものである。図6のPTS1と示されている上段はPEX5 Δ 7/GFP-PTS1からのものであり、PTS2と示されている下段はPEX5 Δ 7/PTS2-GFPからのものである。黒三角印はペルオキシソームで検出された蛍光を示し、矢印は細胞質ゾルにおいて検出された蛍光を示す。これらの写真の拡大率は同じであり、図6右下に示すバーは20 μ mを示す。

20

【図7】図7は、pex5i/GFP-PTS1及びpex5i/PTS2-GFP、pex7i/GFP-PTS1及びpex7i/PTS2-GFP、並びに、GFP-PTS1及びPTS2-GFPのT₂世代の種子を、それぞれ10日間生育させた結果を示す図面に代わる写真である。図7中のpex5i、pex7iはそれぞれの変異体を示し、contは、コントロールとしての親株からのGFP植物の場合を示し、それぞれの1及び2はPTS1についてPTS2についてを示す。図7の上段は2,4-DBを0.2 μ g/ml含有する培地(2,4-DB)の場合を示し、中段はショ糖を含有しない培地(-sucrose)の場合を示し、下段は通常の培地(GM)の場合をそれぞれ示す。

30

【図8】図8は、光を照射しながら、野生型(cont)、本発明のpex5i/GFP-PTS1(pex5i)及び本発明のpex7i/PTS2-GFP(pex7i)を、通常の大気下(36PaCO₂)、又は1000PaCO₂を含有する大気下で、8週間生育させた結果を示す図面に代わる写真である。図8の左側から、通常大気下での野生型(air cont)、pex5i/GFP-PTS1のCO₂存在下(CO2 pex5i)、同通常の大気下(air pex5i)、pex7i/PTS2-GFPのCO₂存在下(CO2 pex7i)、同通常の大気下(air pex7i)をそれぞれ示している。

40

【図9】図9は、細胞質ゾルにおいて緑色の蛍光を有するpex5i/GFP-PTS1及びpex7i/PTS2-GFPと、野生型の暗所に適応した葉のFv/Fmを比較した結果を示すグラフである。図9の左側(0h)は、0時間照射の場合を示し、右側(4h)は4時間照射の場合を示し、それぞれの場合の左側から、野生型としての親株のGFP-PTS1、変異株のpex5i/GFP-PTS1、野生型としての親株のPTS2-GFP、変異株のpex7i/PTS2-GFP、及び変異株のped2をそれぞれ示す。図9の縦軸は、Fv/Fmの値を示す。それぞれのFv/Fmの値は、各植物につい

50

て6枚の葉からの測定値の平均を示す。棒グラフ中のバーは標準偏差を示す。

【配列表フリーテキスト】

【0044】

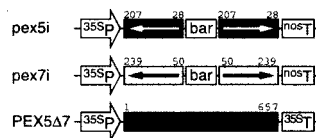
配列番号1： シロイヌナズナの PEX7 の塩基配列

配列番号2： シロイヌナズナの Pex7p のアミノ酸配列

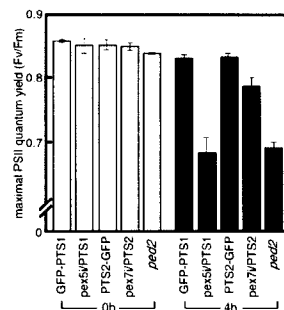
配列番号3： pex5i を導入した遺伝子の塩基配列

配列番号4： pex7i を導入した遺伝子の塩基配列

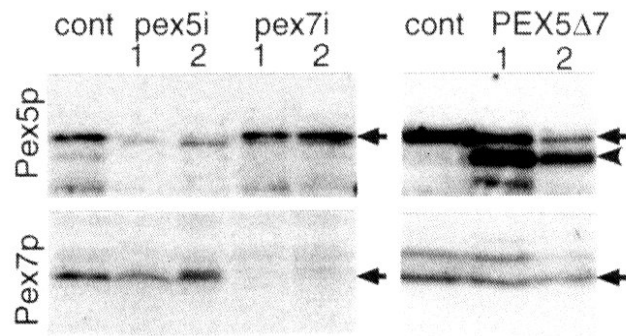
【図1】



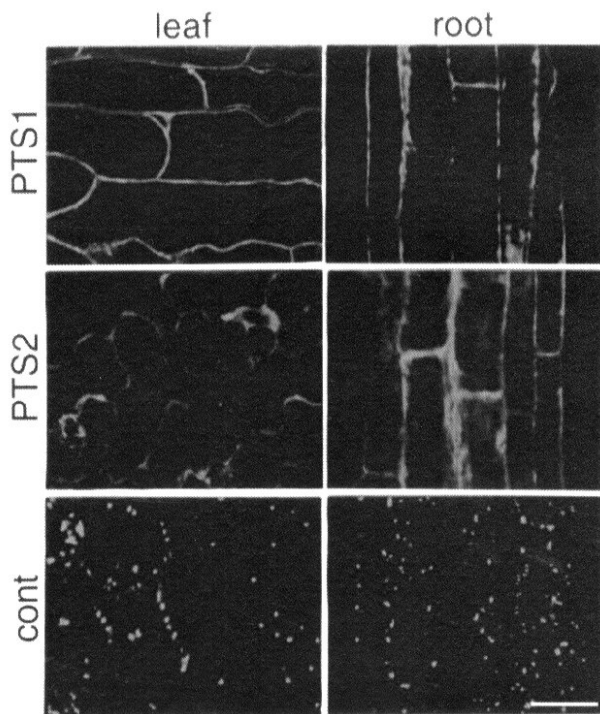
【図9】



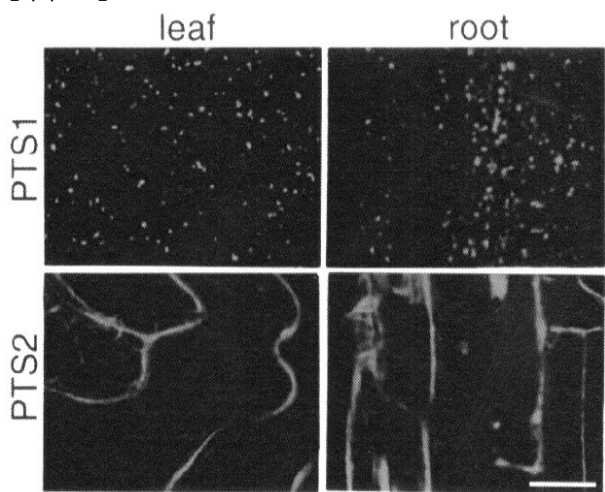
【 図 2 】



【 図 3 】



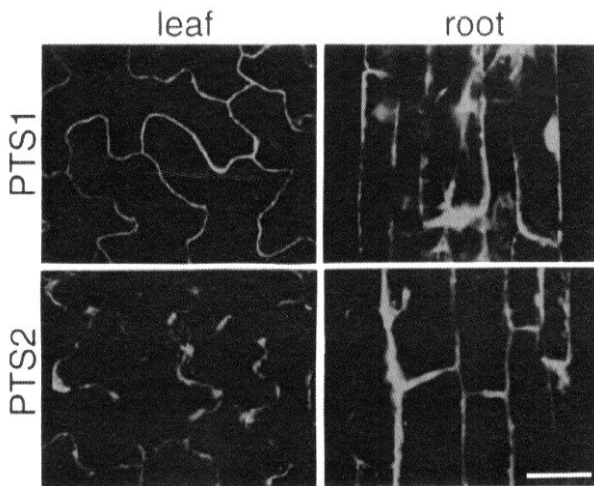
【 図 4 】



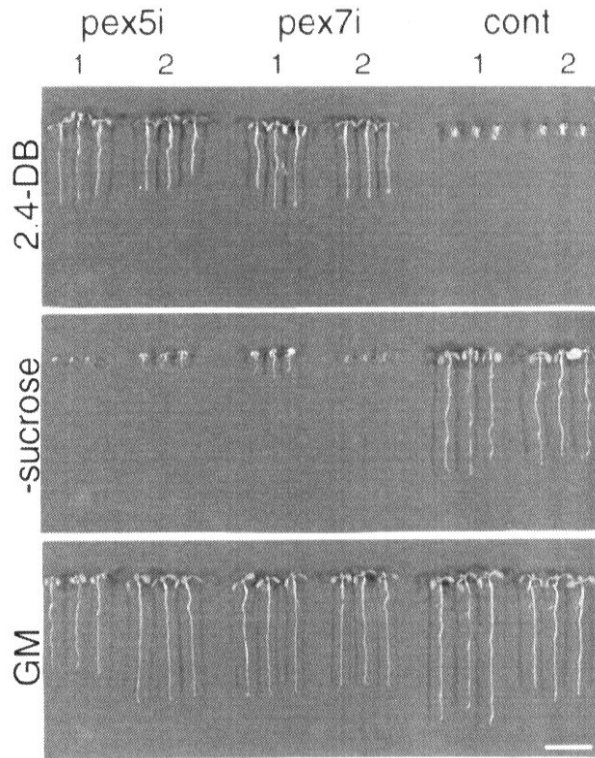
【 図 5 】

BD	AD	-His	β -gal activity (U/mg protein)
PTS1	Pex5p Δ 7		1.1
PTS1	Pex5p		475.3
Pex7p	Pex5p Δ 7		275.4
Pex7p	Pex5p		217.9
Pex14p	Pex5p Δ 7		200.6
Pex14p	Pex5p		582.9

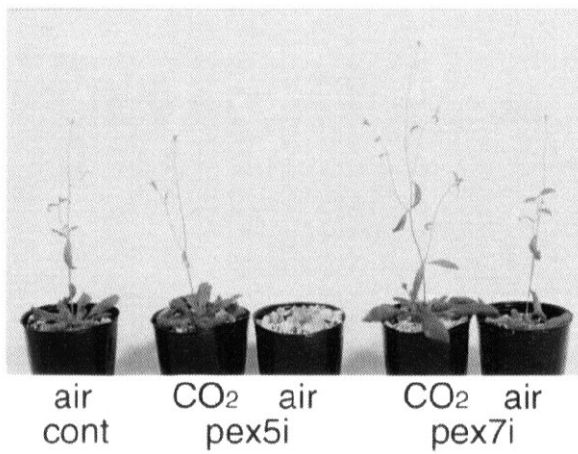
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



【 配列表 】

[2005295819000001.app](#)