

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3605411号
(P3605411)

(45) 発行日 平成16年12月22日(2004.12.22)

(24) 登録日 平成16年10月8日(2004.10.8)

(51) Int. Cl.⁷

F I

A O 1 H 5/00

A O 1 H 5/00

A

C 1 2 N 15/00

C 1 2 N 15/00

請求項の数 15 (全 16 頁)

<p>(21) 出願番号 特願平4-511001 (86) (22) 出願日 平成4年5月11日(1992.5.11) (65) 公表番号 特表平6-500474 (43) 公表日 平成6年1月20日(1994.1.20) (86) 国際出願番号 PCT/US1992/003955 (87) 国際公開番号 W01992/020809 (87) 国際公開日 平成4年11月26日(1992.11.26) 審査請求日 平成11年5月7日(1999.5.7) (31) 優先権主張番号 701,416 (32) 優先日 平成3年5月15日(1991.5.15) (33) 優先権主張国 米国(US)</p>	<p>(73) 特許権者 302057797 モンサント・カンパニー アメリカ合衆国ミズリー州63167, セ ントルイス, ノース・リンドバーグ・ブー ルバード 800 (74) 代理人 100059959 弁理士 中村 稔 (74) 代理人 100067013 弁理士 大塚 文昭 (74) 代理人 100082005 弁理士 熊倉 禎男 (74) 代理人 100065189 弁理士 穴戸 嘉一 (74) 代理人 100074228 弁理士 今城 俊夫</p>
---	---

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 形質転換された稲植物の製法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

- (a) 核酸構築体の複製物を調整する工程、
- (b) 該核酸構築体複製物を生物学的に不活性な担体粒子上に被覆する工程、
- (c) 未成熟の稲胚を単離する工程、
- (d) 該単離された胚を標的表面上に配置する工程、
- (e) 該配置された胚に該核酸で被覆した担体粒子による衝撃を与える工程、ここで該粒子を該標的表面に向けて物理的に加速して、該粒子の幾つかを該胚細胞の少なくとも幾つかの内部に包含させる、
- (f) 該衝撃を与えた胚を栽培して、該胚から苗条を発生させる工程、
- (g) 工程(f)で形成した該苗条を性的に成熟した完全な植物に育成する工程、
- (h) 工程(f)で形成した該苗条または工程(g)で形成した該植物中における該遺伝子構築体の存在を明らかにする工程、および
- (j) 該胚が上記工程(e)の前に、2,4-Dを追加したCC培地上または2,4-Dを追加したMS培地上、暗所において25 で24~48時間予備的条件付けされる工程を含む形成転換された稲植物の製法。

10

【請求項2】

更に、(i) 該核酸構築体の遺伝性を確認する工程をも含む請求項1に記載の方法。

【請求項3】

該予備的条件付けが、オーキシンの存在下で該胚を培養することを含む請求項1に記載の

20

方法。

【請求項 4】

該単離された胚の長さが、約0.5～1.5mmである請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

該単離された胚が、インディカ変種の胚である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

該単離された胚が、ジャポニカ変種の胚である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

該工程 (f) が、各胚から胚形成カルス培養物を誘発し、かつ該胚形成カルスを培養して苗条とすることを含む請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 8】

該工程 (f) が、選別剤に暴露することにより形質転換される再生苗条の割合を富化する工程を更に含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

該選別剤が除草剤ピアラホスである請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

(a) 核酸構築体の複製物を調製する工程、
 (b) 該核酸構築体複製物を生物学的に不活性な担体粒子上に被覆する工程、
 (c) 稲苗から分裂性盤状組織を単離する工程、
 (d) 該分裂性盤状組織を標的表面上に配置する工程、
 (e) 該分裂性盤状組織に該核酸で被覆した担体粒子による衝撃を与える工程、ここで該粒子を該標的表面に向けて物理的に加速して、該粒子の幾つかを該分裂性細胞の少なくとも幾つかの内部に包含させる、
 (f) 該衝撃を与えた分裂性盤状組織を栽培して、少なくとも幾つかの該衝撃を与えた分裂性盤状組織から苗条を発生させる工程、
 (g) 工程 (f) で形成した該苗条を性的に成熟した完全な植物に育成する工程、
 (h) 工程 (f) で形成した該苗条または工程 (g) で形成した該植物中における該遺伝子構築体の存在を明らかにする工程、および
 (j) 該分裂性盤状組織が上記工程 (e) の前に、2,4 - Dを追加したCC培地上または2,4 - Dを追加したMS培地上、暗所において25 で24～48時間予備的条件付けされる工程
 を含む形質転換された稲植物の製法。

20

30

【請求項 11】

更に、(i) 該核酸構築体の遺伝性を確認する工程をも含む請求項10に記載の方法。

【請求項 12】

該予備的条件付けが、オーキシンによる処理を含む請求項10に記載の方法。

【請求項 13】

該単離された分裂性盤状組織の長さが約0.5～1.5mmである請求項10に記載の方法。

【請求項 14】

該稲がインディカ変種の稲である請求項10に記載の方法。

【請求項 15】

該稲がジャポニカ変種の稲である請求項10に記載の方法。

40

【発明の詳細な説明】

発明の背景

本発明は植物分子生物学の分野に関する。特に、本発明は加速粒子による形質転換された稲植物の製造に関する。

背景技術

米、オリザサチバ (Oryza sativa) は重要な食用作物であって、1ヘクタールを基準とした場合にあらゆる他の穀物よりも高いカロリーを与え、しかも世界中の収穫面積においては小麦に次いで第二位にある。新規な稲の品種には多大な興味もたれているが、従来の植物の育種法には幾つかの固有の制限がある。自家受粉の数世代が同型接合のために必要

50

であり、従って新規な稲品種の育種プログラムには数年が必要とされる。野性の稲品種由来の遺伝的特徴は、恐らく有害生物、病気および有害な環境に対する稲の耐性を改良する上で有用であるが、野性型稲の変種は栽培稲とは十分に交雑しない。

これら従来の植物育種の限界のために、稲は遺伝子操作にかけられている。ルオおよびウー (Luo and Wu) は、*Plant Molec.Biol.Rep.*, 1988, 6 (3), pp.165 - 174および*Plant Molec.Biol.Rep.*, 1989, 7 (1), pp.69 - 77において、外来DNAを最近受粉された稲の小花に移入する方法を報告し、彼等はこの方法を「花粉管路 (pollen tube pathway)」形質転換と呼んでいる。この花粉管路法は稲小花の頂部を切り取って、柱頭を切り取る工程を含み、従ってその花柱は切断された端部をもつことになる。DNA - 含有溶液を該小花の切断末端に滴下し、該花粉管を流下させる。最終的に種子を栽培し、発芽させる。しかし、花粉管路法は他の研究者により追跡されておらず、再現性のあるものとは考えられない。稲の原形質体、即ち細胞壁から単離された稲植物細胞は遺伝子工学の一般的な標的となっている。一般的な形成転換法の一つは、原形質体をDNAおよびポリエチレングリコールと共にインキュベートし、後に該原形質体を選択剤の存在下で培養して植物とすることである。例えば、ウチミヤ (Uchimiya) 等は、*Mol.Gen.Genet.*, 1986, pp.204 - 207において、形質転換されたカルス中で外来遺伝子を1現させるための、稲原形質体のPEG - 媒介形質転換を開示している。PEG - 媒介原形質体形質転換の他の例はハヤシモト (Hayashimoto) 等,*Plant Physiol.*, 1990, 93, pp.857 - 863およびペング (Peng) 等,*Plant Cell Reports*, 1990, 9, pp.168 - 172に見出すことができる。

稲原形質体はエレクトロポレーションによっても形質転換されている。多くのエレクトロポレーション法においては、稲の原形質体をDNA溶液と混合し、これに電気パルスを加する。PEG - 媒介形質転換と同様に、該DNA分子が該細胞膜を透過し、該細胞のゲノムに組み込まれる。最近、テラダおよびシマモト (Terada and Shimamoto) は、*Mol.Gen.Genet.*, 1990, 2201, pp.389 - 392において、エレクトロポレーションによって稲の原形質体を形質転換して、外来遺伝子を発現する成熟稲植物を製造する方法を記載している。最近タダ (Tada) 等,*Theor.Appl.Genet.*, 1990, 80, pp.475 - 480およびバットローおよびホール (Batt raw and Hall) も、エレクトロポレーションによる稲の形質転換を報告している。シマモト (Shimamoto) 等は、*Nature*, 1989, 338, pp.274 - 276において、原形質体中にハイグロマイシン耐性の遺伝子をエレクトロポレーションにより導入し、後代の植物中の該外来遺伝子を検出したことを報告している。

稲はPEGとエレクトロポレーションとの組み合わせにより形質転換されている (ヤン (Yang) 等,*Plant Cell Reports*, 1988, 7, pp.421 - 425)。形質転換は、無作為的に選択したカナマイシン耐性クローンにおける酵素アッセイにより確認された。

形質転換された稲原形質体からの全形質転換稲植物の再生に依存しているという理由から、PEGまたはエレクトロポレーションの何れかに基づく形質転換法も制限される。多くの該原形質体培養物の再生に固有の問題および制限がある。一般に利用されている原形質体再生法はソマクローナルバリエーション、白化および不稔性の高い頻度をもたらす。更に、かつ最も重要なことに、全ての稲品種が原形質体から再生できる訳ではない。稲は2種の主な群、即ちジャポニカ (Japonica) およびインディカ (Indica) に分類される。ジャポニカおよびインディカ品種は、その地理的な分布並びに形態、および生理的な構成要素において異なっている。ジャポニカおよびインディカ品種は、また組織培養の容易性および再生法の点で異なっている。一般に、ジャポニカ品種は高いカルス収率と高い再生能を有し、またインディカ種は極めて低いカルス成長および低い再生能を有する。インディカ種は、一般に商業的には最も望ましい品種である。

上記の方法により製造される形質転換稲植物はジャポニカ種であった。ルオおよびウー (Luo and Wu) の文献、*Plant Molec.Biol.*, 1989, 7 (1), pp.69 - 77は、その花粉管路実験において1種のインディカ品種を含んでいた。しかし、報告された正の形質転換の結果は再現されておらず、従って確認できない。ダッタ (Datta) 等は、*Biotechnology*, 1990, 8, pp.736 - 740において、インディカ型の原形質体からの植物の再生のためのPEG - 媒介形質転換プロトコルを確立した。サザン分析および酵素アッセイは、外来遺伝子が安定

10

20

30

40

50

に組み込まれ、かつその子孫に継承されることを明らかにしている。しかし、この方法は1種の特定の商業的に価値の低いインディカ品種に対して実施されたに過ぎない。これが、形質転換植物を与えるインディカ稲植物に関してこれまでに実施され報告された唯一の方法である。一般に、インディカ品種を再生する再現性のある系の開発について多大な努力がなされてきたが、この様な方法は今のところ報告されていない。

稲は成熟胚のアグロバクテリウム (Agrobacterium) 感染を介して形質転換されている。初期に広範に利用された植物遺伝子工学技術は、土壌に生息する微生物アグロバクテリウム ツメファシエンス (Agrobacterium tumefaciens) の、その正常な病理過程としての、そのDNAの一部を植物細胞中に導入する能力に基づくものであった。ある方法によりこのバクテリア中に外来遺伝子を挿入した場合、このアグロバクテリウムを植物に該外来遺伝子を移入するのに利用できる。アグロバクテリウムの形質転換法は多くの植物(その殆どは双子葉植物である)に対して開発されているが、この方法の有用性は植物の種類に大きく依存する。アグロバクテリウムを主体とする形質転換系は、細胞または組織培養並びに植物再生法を必要とすることから、制限される。植物ラインはその組織培養の容易さおよび再生法に依存して変化する。単子葉植物、例えば稲は、特にアグロバクテリウム-媒介形質転換用には向かないものである。しかし、ライネリ(Raineri)等は、*Biotechnology*, 1990, 8, pp.33 - 38において、稲組織のアグロバクテリウム-媒介形質転換を報告し、これをDNAハイブリダイゼーション分析により確認している。このインキュベートした胚は腫瘍形成性カルス組織を形成した。これから再生された植物は報告されておらず、これらの組織から植物を再生することは不可能であると思われる。

新しい形質転換法の1つは、遺伝子物質を担持する加速粒子を植物細胞または組織に衝突させることにより形質転換植物を生成することを試みている。この方法の有用性の第一の指標は、DNA構築物がタングステン粒子上に被覆でき、加速してタマネギ表皮に導入でき、該遺伝子が一時的に発現されたという事実であった(米国特許第4,945,050号)。加速粒子形質転換法の開発における1つの問題は生殖系植物の形質転換体を得ることが困難なことにある。該「生殖系形質転換(germline transformation)」とは、親植物組織に該粒子と共に挿入された該外来核酸構築体を、その子孫が継承するように植物の生殖細胞を形質転換することを意味する。植物の遺伝的形質転換はこの加速粒子法により達成された。米国特許第5,015,580号は大豆植物および植物ラインの生殖系形質転換を記載している。この公開特許出願に記載された一方法は、DNA-被覆粒子を加速して大豆植物の切開した胚軸中に導入することである。該衝撃を受けた大豆の胚軸を高サイトカニン培地で処理した場合、苗条が該処理された胚軸から誘発される。該苗条を培養して完全大豆植物とした場合、該植物の有意な割合が形質転換された生殖系を有するであろう。粒子衝撃と同様に、エアガン装置を使用した稲の形質転換も試みられている。オード(Oard)等は、*Plant Physiol.*, 1990, 92, pp.334 - 339において、稲の胚のカルスを衝撃した場合の一時的な遺伝子発現を報告している。しかし、粒子-媒介形質転換の努力に対しては、生殖系形質転換体植物を得るよりも、カルス中に一時的な活性を得る方がずっと容易である。植物分子生物学の分野は形質転換されたインディカ型稲植物を製造する効果的な方法を必要としている。この方法は最適には原形質体の培養および再生に依存せず、遺伝子型に独立であるべきであり、かつ形質転換された子孫を生成する生殖系形質転換体を容易に生成するものであるべきである。同一の手法がジャポニカ品種にも適用可能であることが最も望ましい。

発明の概要

本発明は形質転換された稲植物および形質転換されたインディカ型稲植物両者の製法に関する。この方法は核酸構築体の複製物の調製から出発する。これらの複製物を生理学的に不活性な担体粒子上に被覆する。本発明の様態においては、該核酸で被覆した担体粒子を未成熟の稲胚に向けて物理的に加速する。もう一つの態様において、盤状組織を稲の苗の分裂組織から切り取る。これらの盤状組織を該核酸で被覆した担体粒子による衝撃に付す。該衝撃を受けた胚および盤状組織両者を培養して苗条を生成する。これらの苗条を完全な性的に成熟した植物に育成する。該核酸構築体の存在は該苗条または該性的に成熟し

10

20

30

40

50

た植物の何れかにおいて確認される。

本発明の一つの目的は形質転換されたインディカ型稲植物を製造することにある。

本発明のもう一つの目的は形質転換された子孫をもつインディカ型稲植物を製造することにある。

本発明の方法の利点の一つは、全ての稲の変種に対して好結果を与えることにある。

本発明の方法のもう一つの利点は、再生プロトコールがより一層遺伝子型依存性である原形質体培養または胚懸濁培養に依存しないことである。

本発明の他の目的、利点、並びに特徴は明細書の以下の記載を添付図に照らして考察することにより明らかとなる。

図の説明

第1図は本発明において有用な粒子加速装置の拡大した模式的な図である。

第2図は第1図に示した装置の平面図である。

第3図は実施例で使用使用するプラスミドpCMC2114を説明するための図である。

好ましい態様の説明

本発明は形質転換された稲植物を得る方法に関する。一般的な方法は、分裂組織に衝撃を与えて、生殖細胞系の形質転換を達成することであった。分裂組織は該植物細胞が分裂している組織である。草および関連単子葉類、例えば稲は葉の付着領域である節近傍の分裂性の組織である。稲の胚も分裂性細胞を含む。

粒子媒介遺伝子の形質転換法において、処理した細胞の内の少数のみが形質転換されることが分かるであろう。従って、この方法の困難な部分は形質転換体細胞または植物の同定または選別である。この問題のために、幾人かの研究者は、あらゆる再生植物が単一の細胞から生じ、結果としてキメラ植物の生成を回避するという理論に基づいて、単一の細胞系、例えば原形質体を使用したあるいは懸濁培養による研究を行った。しかしながら、このような単一の細胞系の使用は、ある種の遺伝子型の稲のみがこのような培養により再生できるに過ぎないという重大な欠点を有する。

もう一つの方法は加速DNA-担持担体粒子を分化した組織中に導入することであり、これが本発明で使用する方法である。この方法は単一細胞培養に依存せず、従って遺伝子型に対して独立である。この方法による理論的な欠点はキメラ事象が支配的となる可能性があることであり、このことは任意の生殖細胞系形質転換事象の同定またはその検索を困難にする。驚くべきことに、分枝系生殖細胞形質転換体の苗条が、衝撃を与えた分裂性稲組織から実質的な頻度で回収できることが分かった。

本発明の一態様においては、未成熟稲胚が標的組織である。この胚を核酸被覆粒子による衝撃に付して胚形成性のまたは器官形成性のカルスの形成を誘発させ、形質転換植物を該カルスから再生する。胚形成により生成した植物から、分枝生殖系形質転換植物が妥当な頻度で見出された。本発明の第二の態様においては、盤状組織を稲の苗の分裂組織部分から切り取る。これらの分裂性盤状組織を培養し、次いで核酸で被覆した粒子による衝撃を与える。これら両態様において、衝撃を受けた胚または盤状組織を栽培して苗条を生成する。これらの苗条を再生して完全な性的に成熟した植物とする。該核酸構築体の存在は該苗条または該性的に成熟した植物において確認することができる。

A. 稲胚および分裂性盤状組織の調製

1. 胚の調製

本発明の第一の態様においては、未成熟の稲胚を単離する必要がある。稲種子を成熟稲植物の穂から単離し、滅菌処理する。胚盤(子葉)および苗条/根軸から構成される稲の胚を、胚乳を除去することにより種皮から切り取った。好ましくは、未成熟胚を切り取る。用語「未成熟」により、該胚が長さ約0.5mm~1.5mmを有する、開花から約10-18日のものであることを意味する。成熟胚も本発明において使用できるが、これら胚を培養することはより困難である。極未成熟の胚も使用できるが、該胚のサイズはその取扱いを困難にし、胚は噴射によりより一層容易に損傷を受け、かつこのような小さな胚は、一時的な発現実験において低い形質転換効率を与えた。

切開後、該稲胚を形質転換のための予備的な条件付けに付す。「予備的な条件付け(prec

10

20

30

40

50

onditioning)」とは、切り取られた組織を形質転換の直前に胚の培養を容易にする培地上に配置することを意味する。いまのところ明かでない理由のために、この予備的な条件付けはこの形質転換工程の効率を増大し、この処理なしに得ることのできる以上に多くの形質転換体数を与えるように思われる。インディカ品種にとって適した培地はポトリカス (Potrykus) 等により *Theor. Appl. Genet.*, 1979, 54, pp. 209 - 214 に定義され、かつ以下の表 1 に記載されたような CC 培地である。この培地は塩、糖およびオーキシン、2,4 - D を含む。我々は、典型的には、追加の 2,4 - D およびカゼイン水解物をこの CC 培地に補充する。ジャポニカ品種に適した培地は 0.5mg/l の 2,4 - D を含む MS 培地である。この MS 培地は ムラシゲおよびスクーグ (Murashige and Skoog) により *Physiol. Plant*, 1962, 15, pp. 473 - 497 において定義されている。

10

典型的には、この切り取られた胚を暗所において 25℃ にて 24～48 時間該予備的条件付け用培地中に維持する。該胚軸を該培地に接触させ、該胚盤を露出させるべきである。予備的な条件付けの後、胚を上記の如く核酸で被覆した粒子による衝撃に付す。この予備的な条件付けは好ましいが、この予備的な条件付けをある特定の培地上で実施することが、首尾よく形質転換を実施するための必須の要件ではない。

一般に、粒子噴射の 24～48 時間前に、この組織外植片を切り出すことに利点があるかの如く思われる。特定の培地の使用は臨界的条件ではないように考えられるが、切り出しかつ成熟した (24～48 時間) 胚は、新たに粒子噴射された比較胚よりも、挿入遺伝子の一時的発現活性の大幅な増加をもたらす。

表 1 : CC培地

KNO ₃	1212.0	mg/l	
NH ₄ NO ₃	640.0	mg/l	
CaCl ₂ · 2H ₂ O	588.0	mg/l	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	247.0	mg/l	
KH ₂ PO ₄	136.0	mg/l	
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.8	mg/l	10
Na ₂ EDTA	37.3	mg/l	
H ₃ BO ₃	3.1	mg/l	
MnSO ₄ · 4H ₂ O	11.15	mg/l	
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	5.76	mg/l	
KI	0.83	mg/l	
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.24	mg/l	20
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.025	mg/l	
CoSO ₄ · 7H ₂ O	0.028	mg/l	
ニコチン酸	6.0	mg/l	
チアミン-HCl	8.5	mg/l	
ピリドキシン-HCl	1.0	mg/l	
グリシン	2.0	mg/l	30
m-イノシトール	90.0	mg/l	
ココナッツ水*	100.0	ml/l	
スクロース	20.0	g/l	
マニトール	36.43	g/l	
pH (KOH)	5.8	g/l	
2,4-D	2.0	mg/l	40
濾過滅菌			

* : ギブコ(Gibco) No. 570-5180、希釈せず。

2. 分裂性盤状組織の調製

本発明のもう一つの態様は分裂性盤状組織から開始する稲植物の形質転換を包含する。ジャポニカまたはインディカ品種の何れかから分裂性盤状組織を調製しかつ再生する我々の方法には何等差異はないが、インディカ品種は僅かに高い応答性を有するように思われる

。分裂性盤状組織を得るために、成熟乾燥種粒をサンドペーパー処理して種皮を除去し、滅菌処理する。次いで、これらの種子を処理して、発芽を誘発させる。苗の成長に必要な要素を与える光の存在下および温度にて、該種子を培地上に配置する。典型的には、この条件は26 にて16時間の光周期である。適当な成長用培地はスクロース、カルベンシリン (Carbencillin)、セホタキシム (Cefotaxime) およびベンレート (Benlate) を補充した1/2MS培地である。約3インチの小さな苗が5~7日後に形成される。

根圏および茎頂の接合部に小さな水平の切れ目を入れることにより、これら苗から分裂性盤状組織を切り取る。厚み約0.5~1.5mmの盤状組織をこの接合部から切り取ることができる。この盤状組織を細胞培養を容易にする培地、例えば2,4-Dおよびカゼイン水解物を補充したCC培地上で予備的な条件付けに付した。典型的には、これを配置した容器に純窒素を吹き込むことにより達成される低酸素条件下で、暗所にて25 にて24時間に渡りこの盤状組織の予備的な条件付けを行う。この予備的な条件付けの後、該盤状組織を核酸で被覆した粒子の衝撃にかける。

B. 核酸被覆粒子の調製

多数の核酸構築物の複製物、RNAまたはDNAを公知のクローニング生物学的技術により調製した。用語「核酸構築体」とは稲細胞中で機能できる任意のRNAまたはDNA分子を意味するものとする。適当な核酸構築体は調節シグナルを有する単離または構築遺伝子であるか、あるいはRNAまたはDNA分子の集団であり得る。該核酸は稲起源のものであっても、また任意の他の種由来のものであってもよい。

粒子-媒介形質転換法において有用であるためには、該核酸構築体は標的植物組織中の細胞内である有用な機能を果たし得るものでなければならない。この形質転換する遺伝子構築体は、その遺伝子物質が一種以上の生物由来のものであるという意味から、通常はキメラ構築体であろう。この遺伝子構築体は該標的組織内で遺伝子生成物を発現できるものであり得る。このような遺伝子生成物は典型的には外来タンパクであるが、他の遺伝子生成物、例えば内在性植物系を阻害するためのアンチセンスRNA構築体であってもよい。

外来遺伝子生成物は、しばしば植物細胞用の発現カセットベクター中に実現され、その多くは当分野で公知である。典型的には、このような植物発現ベクター系は所定の外来遺伝子のコード配列および適当な調節配列を含む。この適当な調節配列は転写を開始し得るプロモータ配列および翻訳ターミネータを含んでいてもよい。他の植物において有効であることが分かっている幾つかのプロモータおよび翻訳ターミネータが稲においても有用である。翻訳および転写エンハンサーを、該プロモータと該遺伝子配列のコード領域との間に組み込むことも可能である。

この形質転換する核酸構築体はマーカー遺伝子を含むことができ、該マーカー遺伝子は該処理植物組織に選別またはスクリーニング能を付与できる。選別可能なマーカーは植物の形質転換事象にとって一般に好ましいが、全植物種に対して入手できるわけではない。選別可能なマーカーは該形質転換された植物細胞の特徴を条件付けし、該細胞は該植物組織を選別剤に暴露することにより選別可能となる。適当な選別可能なマーカーは抗生物質または除草剤耐性遺伝子であり得、これらは培養中の植物の幾つかの細胞中に挿入された場合には、該マーカーはこれらの特定の細胞に抗生物質または除草剤耐性への暴露に耐える耐性を付与するであろう。

他の型のマーカー遺伝子は、該遺伝子が選別し得なかったとしても、組織化学的または生化学的なアッセイによりスクリーニングできるものである。このような植物形質転換実験において有用であることが分かっている適当なマーカー遺伝子はGUS遺伝子である。ジェファーソン (Jefferson) 等は、EMBO J., 1987, 6, pp. 3901 - 3907において、GUSアッセイの一般的なプロトコールを開示している。このGUS遺伝子は、開裂の際に青色を呈する基質である5-プロモ-4-クロロ-3-インドリルグルクロニドの開裂を触媒する酵素をコードする。かくして、GUS遺伝子の使用は、植物組織の組織化学的解析による該植物組織中に導入されたDNAの発現を検出するための便利なアッセイを与える。典型的な形質転換法において、該植物中で発現されるとされる遺伝子は該GUS遺伝子とタンデム状に結合できる。このタンデム構築体は植物組織内で形質転換でき、生成する植物組織は該GU

10

20

30

40

50

S酵素の発現について分析できる。

我々の実験では、第3図に示されたプラスミドpCMC2114を使用した。このプラスミドはGUSをコードする遺伝子およびBar遺伝子を含む。このBar遺伝子はある種の除草剤、例えばピアラホス(Bialaphos)に対する耐性をコードし、かつ選択剤を与える。というのは、形質転換植物が該除草剤の存在下で成長できるからである。

この形質転換法は耐久性のある高密度の生物学的に不活性な材料の担体粒子を必要とする。金はこの担体粒子として使用するのに適した材料である。この担体粒子は極小さなサイズ、典型的には1~3μmのものであって、該稲の標的細胞に対して相対的に小さなものである。本発明者およびその共同研究者等は金担体粒子に対して2種の物理的形状を使用した。その一つは公称上のサイズ範囲(μm)を有し、かつ典型的には各バッチにつき±50%で変動する小さな球状金粒子からなる。他の形状は微結晶質の金または金粉末からなり、該金属は顕微鏡観察した場合不規則な形状のフレーク状または偏平結晶であり、またそのサイズはかなり大幅に変動する。好ましくは、この微結晶質の金粒子を担体粒子として使用する。微結晶質の金粒子の好ましい源はニュージャージー州、イーストブランスウィックのエンゲルハート社(Engelhart Corporation)からの「金粉末A1570」である。不規則な形状の微結晶質担体粒子が球状の金粒子により達成されるよりも高い形質転換効率を与えることが分かった。

該細胞に挿入すべき該遺伝子物質を該担体粒子に被覆する。これはDNAまたはRNA溶液を該担体粒子自体の上に沈殿させることにより容易に実施できる。適当な安定剤を該混合物に添加して、該担体粒子上の該遺伝物質の延命をはかることができる。

核酸構築体を金ビーズ上に被覆するための典型的な方法は以下の通りである。即ち、10mgのアモルファス結晶性金を1.5mlのエッペンドルフ微量遠心管の底部に計り取る。該管の側部に金が付着しないように注意すべきである。というのは、該付着はこの調製法で使用する小体積内で該金を再懸濁することを困難にするからである。100μlのバッファを添加し、該管を穏やかに攪拌する。該バッファは150mMNaCl、10mM Tris-HCl(pH 8.0)である。20.0μgのプラスミドDNAを該微量遠心管に添加し、該管を5~10秒間穏やかに攪拌する。100μlの0.1Mのスペルミジン溶液(遊離塩基)をこの微量遠心管に添加し、該遠心管を攪拌する。100μlの25%PEG溶液(Mw1300-1600)を添加し、この管を十分に攪拌する。このDNA/担体粒子/PEG混合物を攪拌しつつ、100μlの2.5M CaCl₂を該管に滴下すべきである。攪拌を停止し、該管を室温にて10分間インキュベートする。この時点で、該核酸は溶液から該金上に沈殿する。

DNAと担体粒子との混合物を軽く微量遠心機で回転させる。透明化した上澄を完全に除去する。該DNAと担体粒子とからなる該沈殿を100%エタノール10ml中に再懸濁する。この再懸濁したDNAと担体粒子との混合物を水浴を備えた超音波発信機で各1秒間2~3回超音波処理する。この処方物はある期間に渡り保存できる。次いで、得られた懸濁液を18×18mmの担体シート当たり163μlの割合で、あるいは該担体シート1cm²当たりで計算された0.05mgなる割合で該シート上に塗布する。簡単に言えば、該金粒子は約2μg DNA/1mg粒子なる比率でDNAにより被覆され、該粒子は0.5-1.0mg粒子/1mlエタノールの濃度で再懸濁される。

C. 培養胚および分裂性盤状組織の衝撃

本発明で使用する装置は、適当な数の細胞が形質転換されるように、該核酸-被覆粒子を植物細胞中に放出できるものでなければならない。ある頻度で、該担体粒子は該稲細胞内に含まれ、かつ殆ど解明されていない方法により、該遺伝子物質は該担体粒子を離れて該宿主稲細胞のDNA内に組み込まれる。多くの型の機械的装置により、該担体粒子を加速してこれを植物細胞内に挿入できる。可能なメカニズムは粒子の弾道型爆発加速、粒子の遠心加速、粒子の静電加速、または小粒子に運動量および速度を与えることのできる他の同様な装置を包含する。

実施例で我々が使用するメカニズムは調節可能な電圧火花放電装置による粒子加速に基づくものであり、該装置は標的表面に向けて平坦な担体シートを加速できるものである。この装置を、第1図および第2図を参照しつつ更に以下に説明する。

10

20

30

40

50

この粒子加速装置は第1図において、一般的に参照番号10で示されている。この装置は火花放電チャンバー12を含み、その内部には約1~2mmの間隔で隔置された2つの電極が挿入されている。この火花放電チャンバー12は、その上端部に延びた2つの開口16および18を有する水平に広がった矩形のものである。該開口16はアクセス板20により覆われている。該火花放電チャンバーの該矩形体の該電極14とは反対側に配置された該開口18は最終的に担体シート22により覆われることになる。

電極14は適当な調節可能な放電電位源(図示せず)に接続されている。適当な放電電位源は1~2 μ Fの範囲のキャパシタを包含する。該キャパシタに導入される電荷の電位は調節可能であるべきである。調節可能な電位は、1,000~50,000Vの範囲内で調節可能な単巻変圧器を使用して、このようなキャパシタ中に容易に導入できる。好ましくは、高電圧電気スイッチを設けて、作業者に悪影響を及ぼすことなしに、該電極14により安全に該キャパシタを放電させる。

担体シート22は該火花放電チャンバー12の開口18上に配置される。この担体シート22は比較的固い材料の平坦なシートであり、該材料はその上の小さな、不活性の担体粒子を該標的表面に向けて搬送できる。好ましくは、該担体シート22はアルミニウム処理した、サラン(Saran)-被覆マイラーの小さなシートである。我々は他の比較的剛性の平坦な材料を該担体シート22用の材料として使用することを意図する。この担体シート22の機能は、該電極により生成された外側に作用する力を、均等な力で多数の担体粒子を平行に加速することのできる広範囲に渡り水平に分布した力に転化することである。放電以外の他の力も該担体シート22を上方に推進するために利用できる。この力は調節できるものであって、該担体シート22の運動する力を調節できるものであるべきである。

再度第1図および第2図の装置を参照すると、保持スクリーン24が該開口18および該火花放電チャンバー12の上方約15mmの位置にある。標的表面26が5~25mmの範囲内の距離で該保持スクリーン24の上方に配置されている。該標的表面26は任意の適当な培養表面であり、その上に形質転換すべき稲組織を容易に配置できる。我々は反転させたペトリ皿を植物組織の形質転換のために使用できることを見出した。ペトリ皿の底部の固体寒天を主体とする培地を使用して、該寒天上に稲組織を配置し、そこに保持することが可能である。このペトリ皿自体が、該寒天上に該稲組織を保持したまま標的表面として機能できる。

DNA-被覆粒子を該担体シート22の上部に層状に配置する。この層の形成は、該担体シート22の全上部面に担体粒子を比較的均一なパターンで分配するように実施する。好ましくは、この被覆担体粒子は、該担体シート1cm²当たり該被覆担体粒子0.025~0.050mgなる担持率で該担体シートに適用する。この担体シート22は開口18上に配置される。上部に該稲組織を有する該標的表面26を該保持スクリーン24上の所定の位置に配置する。水の小滴、好ましくは10 μ lを2つの電極14間のチャンバー橋絡部に配置する。アクセスカバー20を該火花放電チャンバー12の頂部上の所定の位置に配置する。

この時点において、この全装置を真空チャンバー内に収容し、約500mmHgに真空引きする。この真空引きに伴って、該真空チャンバー内にヘリウムを流出させる。かくして、この真空チャンバーは大気と比較して真空となり、該真空チャンバー内の雰囲気はヘリウムを含む。この低密度のヘリウムは、該減圧との組み合わせで該担体シート22および担体粒子両者に作用する抗力を低下する。同時に、該放電チャンバー12内の真空引き前に該アクセス板20および該担体シート22が該放電チャンバー12に配置されるので、未だヘリウムにより置換されていない純空気の高い圧力が維持されている。

この加速粒子形質転換法はこの時点で開始される。該キャパシタからの電位により該電極14は電氣的に放電する。本発明の方法で使用する電位は10~15kVの範囲内にある。10~16kVの範囲内の電位が好ましい。この電位により、上記した適当な電気スイッチの使用を通して放電を行う。この放電の力は該電極14間のギャップを飛翔するスパークを発生し、該電極間に配置された小さな水滴を蒸発させる。この蒸発力は該火花放電チャンバー12内に激しい雰囲気衝撃波を生ずる。この衝撃波は該電極からその外側のあらゆる方向に放射される。該チャンバーの不動の側部の存在のために、該放電チャンバー12内部への放射された衝撃波の衝撃は該担体シート22の方向に収束され、次いで極めて大きな速度で該シート

10

20

30

40

50

を上方に推進する。この上方に移動する担体シート22は、これが該保持スクリーン24と接触するまで大きな力で上方に加速される。ヘリウムを含む該チャンバー内の残留雰囲気移動は該担体シート22の移動を補佐する。というのは、ヘリウムは該担体シートの飛翔並びに該担体粒子自体にそれ程高い抗力を与えないからである。該保持スクリーン24の位置において、該担体シート22は該保持スクリーン24に衝撃を与え、そこで維持される。該核酸-被覆粒子は、逆に該担体シートから飛翔して、該標的稲組織に向かって自由に運動する。次いで、この小さな担体粒子は該標的表面上の該稲細胞に衝突し、該組織細胞内に侵入する。

D. 稲植物の再生

該衝撃を与えた胚および分裂性盤状組織から植物が生成されなければならない。該細胞または植物の何れかのレベルで、該植物をスクリーニングまたは選別して、形質転換された組織および植物を形質転換されていない組織並びに植物から分離する必要がある。なぜならば、多くの粒子-媒介植物形質転換においては、該再生された植物の大多数が非形質転換植物であるからである。例えば、pCMC2114で衝撃された稲胚および分裂性盤状組織は除草剤ピアラホスの存在下で成長でき、結果として形質転換植物を非形質転換植物から分離できる。この選別を実施するためには、該選別剤に連続的に暴露するか、あるいは該薬物のパルスに暴露する方法を利用できる。該植物が形質転換された生殖細胞をもつか否かを決定するために、該植物の子孫を該挿入された外来遺伝子の存在に関してアッセイする必要がある。この選択プロトコールは多数の非形質転換体の逸出のために完全に有効であることは立証されていない。しかし、選別の利用は依然として有用である。というのは、選別された植物が選択されなかった植物から再生される比率と比較して高比率で形質転換されているであろうという意味で、この選別された植物はスクリーニングすべき潜在的形質転換植物のプールに富むからである。

1. インディカ種の胚からの再生

まず、該形質転換細胞からカルスを誘導する必要がある。カルス誘発は植物生物学の分野で周知である。例えば、ハートケおよびロルツ (Hartke and Lorz), J. Genet. & Breeding, 1989, 43, pp. 205 - 214は種々のインディカ遺伝子型からの体細胞胚形成および植物再生を開示している。2,4-Dを添加したMS培地も使用できるが、それ程最適の結果を与えないように思われる。衝撃を与えた胚をカルス成長を促進する培地に移す。適当な培地は1g/lのカゼイン水解物および2mg/lの2,4-Dを補充したCC培地である。適当な成育条件は暗所で25°Cである。約4週間後にカルスが形成される。

この形質転換されたカルスから苗条を誘発する必要がある。適当な苗条誘発培地は0.05mg/lのゼアチンおよび1mg/lのIAAを含むCC培地である(この組み合わせを「CCIZ1」と呼ぶ)。適当な成長条件は26°Cにて16時間の光周期である。苗条は、典型的には10~20日後に現れる。次いで、この苗条をCCIZ1上での継代培養のために分離する。これらの苗条または任意の他の衝撃を与えたまたは形質転換した組織を該外来遺伝子の存在につきアッセイすることができる。苗条を適当な培地、例えば20g/lのスクロースおよび0.5mg/lのIBAを含む1/2MS培地上に植え付け、成熟稲植物に発育させる。成熟植物を該外来遺伝子の存在につきアッセイすることができる。

2. 胚形成によるジャポニカ胚からの再生

ジャポニカ胚の再生はインディカ胚の再生とかなり類似する。しかし、ジャポニカに対してはCC培地よりもMS培地が一般に好ましい。衝撃を与えた後、該ジャポニカ胚を0.5mg/lの2,4-Dを含むMS培地上に配置し、カルス成長を誘発する。約2週間後に、カルスを苗条-促進培地、例えば50g/lのスクロース、2mg/lのカイネチン、1mg/lのNAA、0.8%の洗浄寒天および300mg/lのカゼイン水解物を含むMS培地(この組み合わせを「MS⁺」と呼ぶ)に移す。適当な成長条件は26°Cにて16時間の光周期である。苗条は7~14日で発生し、これを取り出して更に成長を促進する培地、例えば1mg/lのIAAおよび1mg/lのゼアチンを含むMS培地に移す。個々の苗条を根付け-状態調節(root-conditioning)培地、例えば20g/lのスクロースおよび0.5mg/lのIBAを含む1/2MS培地上に植付け、成熟植物に発育させる。インディカ品種と同様に、形質転換組織または成熟植物を外来遺伝子の存在につきアッ

10

20

30

40

50

セイすることができる。

変種、ジャポニカ、インディカまたはその混系とは無関係に、植物の再生は胚形成により最も容易に実施できるが、器官形成性苗条を含むこともできる。胚形成は、体細胞が接合型胚形成に類似する発育パターンにより完全な植物に発育する過程を言う。胚形成による苗条が上記の再生プロトコールにおいて支配的である。この胚形成による苗条は、これらがクローンまたは非-キメラであることから、単一細胞原基由来のものであるようにみえる。器官形成過程は分化した組織構造からの器官構造（即ち、苗条または根）の発育を含み、また通常はキメラ植物を生ずる。驚くべきことに、これらカルス培養においては、胚形成による再生が支配的であり、かつクローン形質転換胚が比較的高い頻度で再生される。

10

3. 器官形成を利用した分裂性盤状組織からの再生

分裂性盤状組織に衝撃を与えた後、該盤状組織を即座に徒長枝形成を促進する培地に移すべきである。適当な培地はMSR培地（0.38mg/lのBAPおよび0.4mg/lのIBAを含むMS培地）であり、また適当な成長条件は26℃にて16時間の光周期である。これらの盤状組織が苗条の形成を始めた後、該盤状組織を上記のMS⁺培地に移すべきである。典型的には、多数の苗条および根が形成されるであろう。これらの苗条を、更に根形成のために0.5mg/lのIBAを含む1/2MS培地等の根形成-促進培地に移して、成熟植物を発育させるべきである。再生された胚に関連して、該苗条または成熟植物の何れかを該外来遺伝子の存在につきアッセイすることができる。

実施例

20

A. ジャポニカ手法を利用した稻胚の形質転換

温室で育成した、米国で一般的な変種であるガルフモント（Gulfmont）稲から種子を収穫した。この実験を実施するにつれて、ガルフモントは純粋なジャポニカ変種の一つであるものと考えられた。後に詳述する系統情報は、これは正しくなくかつガルフモントはインディカおよびジャポニカ遺伝子の両者を含む可能性があることを示した。未成熟の種子を5分間漂白剤に浸して滅菌し、次いでSDW（滅菌蒸留水）およびCCB（カルベンシリン400mg/l、セホタキシム100mg/lおよびベノミル（benomyl）50mg/l）の溶液内で十分にすすいだ。該種子を包囲するほうを顕微鏡観察しつつ除去し、該種子を再度SDWとCCBとの混合物中に入れた。これらの未成熟の種子を更に50%漂白剤中で1分間滅菌し、SDWとCCBとの混合物中で4回洗浄した。

30

該未成熟胚を該滅菌した種子から切取った。これら胚の寸法は0.5～1.5mmの範囲内にあった。該切り取った胚を胚盤と共に、2.0mg/lの2,4-Dおよび1g/lのカゼイン水解物を補充したCC培地上に塗り付け、次いで暗所で25℃にて24時間保った。

24時間の予備的条件付けの後、該胚にプラスミドpCMC2114（第3図）で被覆した担体粒子による衝撃を与えた。本例においては、約100個の胚を10～16kVにて衝撃にかけた。この衝撃の2日後に、これらの外植片を、0.5mg/lの2,4-Dおよび10mg/lのピアラホスを添加したMS培地上に塗り付けた。ピアラホス選別をMS⁺培地上での培養全体を通じて維持した。次いで、これらの胚をカルス誘発培地上で2週間維持した。

カルスの誘発後、該カルスをMS⁺培地に移し、26℃にて16時間の光周期で生存させた。このカルスから苗条が発育した。該苗条が発育したら、1mg/lのIAAおよび1mg/lのゼアチンを補充したMS培地上での更なる培養のために取り出した。この個々の苗条を20g/lのスクロースおよび0.5mg/lのIBAを含む1/2MS培地上に植付けた。

40

100個の外植片のうち、18個の苗条が再生した。GUS組織化学的アッセイに付した場合、3個の苗条が少なくとも部分的に正であった。1つの苗条を破壊アッセイに付したが、全体的に青色であった。もう一つの苗条はポリメラーゼ連鎖反応（PCR）アッセイにおいて正の反応を示したが、生殖系形質転換体ではないと思われた。小さな部分について正のPCRアッセイを与えたもう一つの苗条を温室から取り出し、ライスミックス（砂、ピート、パーライトおよび土の等量混合物）中に植付けた。この植物は成長し、子孫を与えた。この植物自体（R0）は、その全ての葉においてGUSおよびBAR遺伝子両者を発現することがわかった。この植物のDNAのサザンブロット分析はこれら両遺伝子に対するDNAの存在を立証し

50

た。この結果は、この稲植物が形質転換された生殖細胞系をもつことを示す。この植物の子孫はpCMC2114によりコードされる遺伝子生成物を発現することが明らかとなった。第一世代 (R1) におけるトランス遺伝子植物 (transgenes) の分離は3:1の期待値であった。この植物の数百個のR1子孫が現在成熟状態に達している。サザンブロット分析はこの挿入DNAの安定な組み込みおよび遺伝を確認している。この植物は、またグルタミンシンターゼ阻害性除草剤の適用に対して極めて高い耐性をもつ。葉面散布による、500ppmの割合での除草剤バスタ (BASTA: ピアラホスの商品名) の適用は、肉眼的には該植物に害を与えず、該植物は成長を続け、かつ活発性を維持する。破壊的アッセイ (GUSに対する) において、形質転換された分枝系の胚は、選別しもしくは選別なしで、該再生に付された胚の10% ~ 50%の範囲で再生できた。

10

B. インディカ稲胚の形質転換

本発明で実施するインディカ稲の形質転換法はジャポニカ稲の形質転換法と極めて類似する。衝撃を与えたインディカ胚を、その成長にとって最適の培地上で培養した。

種子を、インディカ変種である温室栽培したIR54稲の穂から収穫した。これら未成熟種子を5分間50%漂白剤に浸して滅菌し、SDWとCCBとの混合物中で十分にすすいだ。該種子を包囲するほうを顕微鏡観察しつつ除去し、該種子をSDWとCCBとの混合物中に入れた。この未成熟種子を再度1分間50%の漂白剤中で滅菌し、SDWとCCBとの混合物中で洗浄した。

0.5 ~ 1.5mmの未成熟胚を種皮から切り出し、1g/lカゼイン水解物と2mg/lの2,4-Dを補充したCC培地 (表1) 上で形質転換のための予備的条件付けした。これらの胚を25の暗所に置いた。この培地上で24時間維持した後、胚に上記の如く核酸被覆担体粒子による衝撃を与えた。本例では、約100個の胚に10kVにてプラスミドpCMC1515で被覆した粒子で衝撃を与えた。プラスミドpCMC1515はプラスミドpCMC2114と類似するが、BAR遺伝子コード配列の代わりにハイグロマイシン耐性のコード配列を含む。

20

衝撃を与えた後、胚を、1g/lのカゼイン水解物と2mg/lの2,4-Dとを含むCC培地上に置き、暗所で25にて4週間維持した。衝撃を与えた2日後に、2週間のハイグロマイシン選別に課した。4週間後に、生成したカルスを、0.05mg/lのゼアチンと1mg/lのIAAとを含むCC培地に移し、26にて16時間の光周期なる条件下においた。苗条が出現したので、CCIZ 1上での継代培養のために分離した。分離した苗条は20g/lのスクロースと0.5mg/lのIBAとを含有する1/2MS培地上に植付けた。

我々は、標準的組織化学的アッセイにより、GUS活性について多数の苗条をアッセイした。非生殖系形質転換植物が一様に再生された。生殖系形質転換植物も同定され、これは該トランス遺伝子両者に対して正のPCRを示し、かつ全ての細胞においてGUSを十分に発現した。

30

C. 分裂性盤状組織の形質転換および器官形成による再生

分裂性盤状組織を介する形質転換は稲の遺伝子型に対して独立である。以下の例における盤状組織を採取した稲植物はインディカ種の稲であったが、ジャポニカ品種の稲も殆ど同一の方法で形質転換できる。乾燥種子を温室栽培した稲植物から採取し、サンドペーパー処理して種皮を除去した。サンドペーパー処理した種子を95%エタノールで1解洗浄して滅菌した。次いで、これら種子をカルベンシリン (400mg/l)、セホタキシム (100mg/l)、およびベンレート (0.05g/l) を含むSDW中で洗浄した。

40

次に、これら滅菌した種子を、1%の「アンチライフ (Antilife)」を添加したSDWとCCBとの混合物 (上記のもの) を吸収させた。アンチライフは、ブラボ (Bravo) (WP 50%) 10.0g/l、ベノミル (DF 50%) 10.0g/l、およびカプタン (Captan) (WP 50%) 10.0g/l を含有する。種子の膨化は暗所にて28で24時間実施した。この膨化の後、種子を10分間50%の漂白剤中に浸した。この滅菌した種子を5回に渡り、SDWとCCBとの混合物中で洗浄した。

この滅菌種子を、20mg/lのスクロース、400mg/lのカルベンシリン、100mg/lのセホタキシムおよび0.05g/lベンレートを含有する1/2MS培地上に、胚側を上にして植え付けた。この間、小さな稲の苗が出現した。約5 ~ 7日後に、盤状組織を根圏および茎頂の接合部の苗領域から切り取った。これが該苗の分裂性領域である。これらの盤状組織を、この接合部に2

50

つの水平な切り込みを入れることにより切り取った。厚み0.5～1.5mmの盤状組織が得られた。

これらの分裂性盤状組織を、2mg/lの2,4-Dを補充したCC培地上で暗所にて24時間低酸素条件下で予備的な条件付けに付した。この24時間の予備的な条件付けの後、該分裂性盤状組織を衝撃に付した。本例では、50個の分裂性盤状組織をプラスミドpCMC2114(第3図)で被覆した粒子で12～18kVにて衝撃した。衝撃条件は上記の通りであった。

衝撃後、該盤状組織を即座にMSR培地に移した。該衝撃した盤状組織を、26℃にて16時間の光周期なる条件下でMSR培地上に基底部を下にして植え付けた。約2週間後に、該盤状組織は苗条の形成を開始した。該苗条が、約3～5日後に5～10mmに達した時点で、全盤状組織/苗条複合体をMS⁺培地に移して、1～2週間培養した。この時点で、多数の苗条および根が形成された。次いで、この全複合体を、20g/lのスクロースと0.5mg/lのIBAとを含む50%濃度のMS培地に移し、分離前に1週間培養した。この複合体を個々の苗条に分離し、0.5mg/lのIBAを含む1/2MS培地に移して、更に根を形成させた。

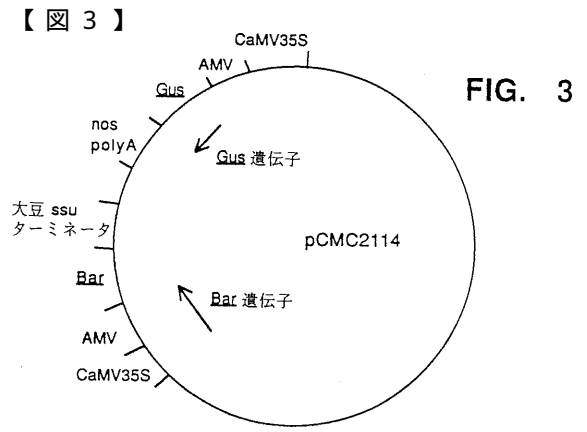
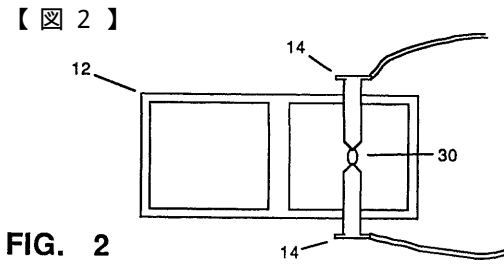
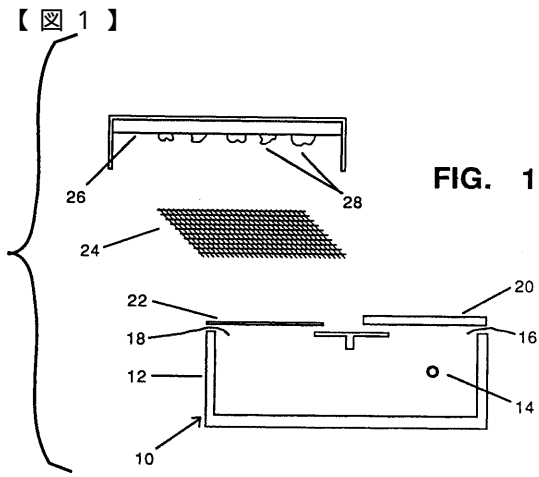
現在までのところ、生殖系の形質転換された植物はこの方法では得られていない。しかし、生殖系形質転換体は、我々がこれまでに見てきた多数のキメラ植物に基づくものであると予想される。衝撃処理した50個の盤状組織の内、9種の苗条がPCRアッセイにおいて正であることが分かった。正のPCRアッセイの結果を与える苗条を更に育成するために室温に移した。他の種および系において、この効率でキメラの植物の回収率は、生殖系形質転換事象の低効率での復元をもたらす。

D. 形質転換体の選別

上記のジャボニカおよびインディカに対する胚復元系において、除草剤または抗生物質のストレスによる推定形質転換体の選別および/または富化は機能的であると思われる。幾つかのカルス培養物を、ピアラホスを10mg/l添加した胚誘発性培地に移した。(GUSに対する)末端アッセイにより終端させた繰り返し実験において、該カルスは多数の苗条を形成し、その多くがアッセイによれば、クローン形質転換されていた。かくして、該選別は完全ではないかも知れないが、復元された苗条密度の富化はこのような選別を正当化しているように考えられる。

10

20



フロントページの続き

- (74)代理人 100084009
弁理士 小川 信夫
- (74)代理人 100082821
弁理士 村社 厚夫
- (74)代理人 100086771
弁理士 西島 孝喜
- (74)代理人 100084663
弁理士 箱田 篤
- (72)発明者 クリストー ポール
アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 5 3 7 1 5 マディソン サンディー コート 2 6
- (72)発明者 フォード タメリア エル
アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 5 3 5 9 7 ウォーナキー ウェスト ストリート 6 0 4
- (72)発明者 コフロン マット
アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 5 3 7 1 1 マディソン シー . ティー . エイチ . エムエム
2 7 2 2

審査官 長井 啓子

- (56)参考文献 Plant Gene Transfer , 1 2 9 (1 9 9 0 - 3 - 5) p . 2 1 - 3 3
KARTHA, k.k. et al., Transient Expression of Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT) Gene in Barley Cell Cultures and Imm, Plant Cell Reports, 1 9 8 9 年 , Vol.8, No.8, p.429-432
松尾孝嶺編「稲学大成第3巻遺伝編」(1 9 9 0 - 8 - 3 1) 農山漁村分化協会 p . 5 4 2 - 5 4 3 , 5 5 4 -
育種学雑誌、4 0 [別冊 1] (1 9 9 0) p . 1 6 4 - 1 6 5
SHIMAMOTO, K. et al., Nature, vol.338, pp.274-276(1989)

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)

C12N 15/00
A01H 1/00
A01H 5/00
BIOSIS/WPIDS(STN)