

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5924782号  
(P5924782)

(45) 発行日 平成28年5月25日(2016.5.25)

(24) 登録日 平成28年4月28日(2016.4.28)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N	15/09	(2006.01)	C 12 N	15/00	Z NAA
C 07 K	14/415	(2006.01)	C 07 K	14/415	
C 12 N	1/15	(2006.01)	C 12 N	1/15	
C 12 N	1/19	(2006.01)	C 12 N	1/19	
C 12 N	1/21	(2006.01)	C 12 N	1/21	

請求項の数 20 (全 31 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-518299 (P2013-518299)
(86) (22) 出願日	平成23年7月7日(2011.7.7)
(65) 公表番号	特表2013-538554 (P2013-538554A)
(43) 公表日	平成25年10月17日(2013.10.17)
(86) 国際出願番号	PCT/NL2011/050499
(87) 国際公開番号	W02012/005591
(87) 国際公開日	平成24年1月12日(2012.1.12)
審査請求日	平成26年7月4日(2014.7.4)
(31) 優先権主張番号	201010222842.3
(32) 優先日	平成22年7月8日(2010.7.8)
(33) 優先権主張国	中国(CN)

(73) 特許権者 510036355

シャンハイ インスティチューツ フォー  
バイオロジカル サイエンシーズ チャ  
イニーズ アカデミー オブ サイエンシ  
ーズ  
SHANGHAI INSTITUTE  
FOR BIOLOGICAL SCI  
ENCES CHINESE ACADE  
MY OF SCIENCES  
中華人民共和国 シャンハイ ユエ ヤン  
ロード 320 オフィス オブ テク  
ノロジー トランシファー アンド コミ  
ュニケーションズ  
Office of Technology Transfer & Commun  
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】熱抵抗性植物遺伝子JAZ5aおよびその使用

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

(a) 乃至 (c) のうちのいずれかである、植物由来の単離された熱抵抗性タンパク質：

(a) 配列番号4のアミノ酸配列を有するタンパク質

(b) 配列番号4のアミノ酸配列中の1～20の残基の置換、欠損または付加によって生じたものであり、かつ、配列番号4によって表されるアミノ酸配列と同一の機能を有する(a)のタンパク質由来のタンパク質

(c) 配列番号4のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有し、かつ、配列番号4によって表されるアミノ酸配列と同一の機能を有する(a)のタンパク質由来のタンパク質。

10

## 【請求項2】

下記(A)及び(B)からなる群から選択されるヌクレオチド配列を有する単離されたポリヌクレオチド。

(A) 配列番号2に記載されるヌクレオチド配列

(B) 配列番号2に記載されるヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列

## 【請求項3】

(i) および(ii)からなる群から選択されるポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

20

( i ) 請求項 1 に記載のタンパク質をコードするポリヌクレオチド  
( i i ) ( i ) のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド。

【請求項 4】

請求項 3 に記載の発現ベクターを含むか、または、請求項 2 に記載のポリヌクレオチドを含む、遺伝的に操作された宿主細胞。

【請求項 5】

請求項 2 に記載のポリヌクレオチド、または、請求項 3 に記載の発現ベクターが、そのゲノム中に組み込まれた遺伝的に操作された宿主細胞。

【請求項 6】

( a ) 請求項 4 または 5 に記載の宿主細胞を培養する工程と、  
( b ) 請求項 1 に記載のタンパク質を発現させる工程と、  
( b ) 請求項 1 に記載のタンパク質を単離する工程と、  
を含む請求項 1 に記載のタンパク質の製造方法。

【請求項 7】

植物の熱抵抗性を改善するための、請求項 1 に記載のタンパク質または請求項 1 に記載のタンパク質をコードするポリヌクレオチドの使用。

【請求項 8】

前記植物中の請求項 1 記載のタンパク質の発現または活性を与えるかまたは促進させる工程を含む改善された熱抵抗性を有する植物の製造方法。

【請求項 9】

前記製造方法は、前記植物を、請求項 1 に記載のタンパク質をコードするポリヌクレオチドで形質転換させる工程を含む請求項 8 に記載の製造方法。

【請求項 10】

請求項 1 に記載のタンパク質をコードするポリヌクレオチドは、前記植物のゲノムに形質転換される請求項 9 に記載の製造方法。

【請求項 11】

( 1 ) 請求項 1 に記載のタンパク質のコード配列を含む発現ベクターを含むアグロバクテリウム株を準備する工程と、  
( 2 ) 植物細胞、器官または組織を準備する工程と、  
( 3 ) 工程 ( 2 ) の前記植物細胞、器官または組織と、工程 ( 1 ) の前記アグロバクテリウム株とを接触させ、前記タンパク質のコード配列を前記植物細胞、器官または組織内に導入する工程と、  
( 4 ) 任意に、植物細胞を選択する工程と、  
( 5 ) 前記植物細胞、器官または組織を植物に生育させる工程と、を含む請求項 9 または 10 に記載の製造方法。

【請求項 12】

前記コード配列が前記植物細胞、器官または組織内に導入された後に、前記コード配列が前記植物細胞、器官または組織のゲノムに組み込まれる請求項 11 に記載の製造方法。

【請求項 13】

請求項 2 に記載のポリヌクレオチド、または請求項 3 に記載の発現ベクターを含む遺伝的に改変された植物。

【請求項 14】

前記植物は、アブラナ科、イネ科およびバラ科の植物からなる群から選択される請求項 13 に記載の遺伝的に改変された植物。

【請求項 15】

請求項 2 に記載のポリヌクレオチド、または、請求項 3 に記載の発現ベクターを含む、遺伝的に改変された植物から得られた種子。

【請求項 16】

配列番号 1 または 2 の配列のうち少なくとも 50 ヌクレオチドを含む、植物における熱抵抗性を特定するための分子マーカー。

10

20

30

40

50

**【請求項 17】**

前記分子マーカーは、植物細胞のDNAの配列決定によって、植物中で特定される請求項16に記載の分子マーカーを特定するための方法。

**【請求項 18】**

前記分子マーカーは、配列番号1または2のうち少なくとも50ヌクレオチドを増幅し、かつ、増幅産物を検出することによって、植物中で特定される請求項16に記載の分子マーカーを特定するための方法。

**【請求項 19】**

配列番号1または2のうち少なくとも50ヌクレオチドは、ヌクレオチド配列番号5および6によって表されるプライマー対を使用することによって増幅される請求項18に記載の分子マーカーを特定するための方法。 10

**【請求項 20】**

抽苔期における植物の熱抵抗性を改善するための請求項7、および17乃至19のいずれか1項に記載の使用または方法。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本発明は、バイオテクノロジーおよび植物学の分野に属する。本発明は、植物の熱抵抗性を改善するための新規な方法に関する。本発明は、熱抵抗性を改善するための、上記植物中のタンパク質の使用に関する。本発明は、上記タンパク質の発現または活性の増強に関し、その増強の結果、上記タンパク質の発現を促進するように改変されていない植物と比較して、改善された熱抵抗性を植物に与える。 20

**【背景技術】****【0002】**

キャベツ類(Cabbages)としては、主にハクサイ種(*Brassica campestris* L. ssp. *Pekinensis*)およびタイナ種(*Brassica campestris* L. ssp. *Chinensis*)が挙げられる。タイナ種は、グリーンキャベツ(green cabbage)とも呼ばれ、これは中国北部の幼若のタイナ種である。 30

**【0003】**

タイナ種は、高い適応性、成長性、生産性および栄養性を示す。タイナ種は、様々な野菜のうち最も消費される野菜であり、中国において、長江流域の地帯で広く生育されている。タイナ種には様々な種類および変種がある。キャベツ類は生育期間が短く、広範な適応性および高い生産性を有する。キャベツ類はまた、植え付けが容易であるため、持続的な通年の供給が可能である。タイナ種の産物は新鮮かつ痛みやすく、豊富な栄養を有し、消費者に好まれる。タイナ種は、1年の国内の総野菜生産量の約30~40%を占め、また、農閑期における野菜の供給において顕著に寄与し、通年にわたって野菜の供給の平衡を保っている。

**【0004】**

ハクサイ種およびタイナ種の両方は、涼しい気候を好み、通年植え付けができる。最も適した生育温度は15~20である。近年、市場の要求に応えるため、キャベツ類は、主に集中的な培養技術によって植え付けがされる。四季間での均一な生産および供給を確実にするため、タイナ種は、一般的に、異なる季節においては異なる方法で植え付けがなされる必要がある。過去、タイナ種は、主に、春および冬に植え付けがされた。現在、タイナ種は、様々な栽培方法によって、暑い夏および秋に植え付けがされてきている。このことは、タイナ種を、その生育期間(特に晩春、夏および初秋)において、高温からのストレスに確実にさらす。高温期に栽培されたタイナ種は、20日間の栽培後に大量に市場に流され得る。しかし、通常、高温は、伸張した節間、緩慢な生育、苦味および好ましくない纖維の増加等をもたらす。このことは、低い生産性および低い品質をもたらす。その 40

結果、価格が上がり、供給が需要に追いつかなくなり、消費者の需要を満たすことができない。ハクサイ種は、高温への耐性が低い。ハクサイ種は、ロゼット期および結球期において、温度感受性が高い。平均温度が高過ぎる場合、心葉が堅固な鱗茎を構築する (bulilt a tight bulb) ように巻く (amplexate) ことができないか、または全く鱗茎ができない (not bulb up)。不自然に鱗茎ができたとしても、穂が束ねられていらない (loose)。夏における天然の田畠の条件では、生産性は、熱抵抗性植物の、通常の葉状の穂を形成できる力に依存する。そして、田畠における天然の高温下での結球形成能は、ハクサイ種の熱抵抗性の兆候となる。ハクサイ種およびタイナ種の両方はもともと中国において植えられた。

## 【0005】

10

外国においては、キャベツ類の育種についてほとんど研究されていない。日本、韓国および台湾由来の変種は、熱抵抗性に乏しく、中国における栽植に不向きである。国内で優性なものは、主に、秋に植え付けられる疾病抵抗性変種である。キャベツ類の野菜は、熱抵抗性についての小さな遺伝子ライブラリーしかない。熱抵抗性キャベツ変種の育種は、キャベツ材料のスクリーニングに限られ、これにより、乏しい熱抵抗性および低いストレス抵抗性を有するいくつかの変種のみが得られた。

## 【0006】

これらの問題を解決するため、国内の育種の専門家は、伝統的な育種方法を利用し、キャベツ類の野菜の熱抵抗性変種の広いスクリーニングおよび栽培を行い、熱抵抗性遺伝子を導入し、利用の供給源を広げた。この結果、ある程度までキャベツ類の野菜の熱抵抗性が改善され、実際の生産において効果を生んだ。

20

## 【0007】

しかし、現在の方法は、局地気候および高温ストレス下での形態学的变化の下での熱抵抗性の評価に限定されている。これらの方法は、適した選択ストレスを有する田畠の条件を与えることができない温度の地域には適していない。単一の熱抵抗性植物を選択したとしても、次の春まで回収した種子中の熱抵抗性を維持するために、一連の複雑な方法および手段が要求されるだろう。

## 【0008】

スクリーニングは長い期間を必要とし、地理的に制限されるため、普遍的に適応可能な熱抵抗性変種を提供できない。従って、熱抵抗性のキャベツ類の野菜の育種において、実生段階における熱障害の発生および発育についての集中的な研究、および実生段階における熱抵抗性のスクリーニングのための方法および技術の開発が急務である。これにより、改善された実現性、安定性、効率および適応性が与えられる。キャベツ類の熱抵抗性に非常に関連のある特性は、定量的性質のものであり、これは、遺伝子型の同定において非常な困難性をもたらす。特に、分子育種については、困難性には、補助的選択に有用なDNAマーカーの数が限られていることだけではなく、量的形質遺伝子座 (QTL) の数および有意性が整合していないことも含まれる。従って、キャベツ類のゲノム配列決定がまだ終了しておらず、機能的ゲノム研究についての検討が注目されて来ているため、迅速で、高感受性かつ効率的な、植物およびDNAプロファイルにおける様々な特性についての質的分析、植物の表現型ならびに遺伝子発現の変化についての定量分析に対するニーズがあり、これは熱抵抗性のキャベツ類の育種にとって有用である。

30

## 【0009】

近年、分子生物学は迅速に発展してきた。特に、遺伝子チップは、作物の分子育種において広く使用されている。遺伝子チップ技術は、1990年代半ばから重大な影響を有する偉大な成果のうちの1つである。遺伝子チップは、マイクロエレクトロニクス、生物学、物理学、化学およびコンピューター科学を組み合わせた新規かつ高度な交雑技術である。遺伝子チップは、多くの特定のオリゴヌクレオチド断片または遺伝子断片がプローブとして配置され、かつ固定され、DNAマイクロアレイが形成された基板を有する。

40

## 【0010】

試料中のDNAまたはRNAは、様々な技術 (PCR増幅およびin vitro転写

50

等)によって蛍光で標識される。プローブが試料中の標識された分子とハイブリダイズされた後に、チップは蛍光検出システムによってスキャンされ、コンピューターシステムを使用することによって全てのプローブの蛍光シグナルが比較および測定される。各プローブ分子の検出されたハイブリダイゼーションシグナルの強度を得ることによって、試料分子の量および配列に関する情報を迅速に得ることができる。現在、遺伝子チップ技術は、様々な分野(例えば、薬物のスクリーニング、農業、疾病の診断および治療、伝統的な漢方薬の種の同定、司法鑑定、食品および衛生設備への監督、環境検出、国家の防衛等)において広く使用されている。植物における遺伝子チップの使用についての報告は多くない。報告は、シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)、イチゴおよびアサガオ等に主に焦点を当てている。遺伝子チップの用途については、遺伝子発現レベルの分析および検出が最も一般的であり、かつ、確立されている可能性がある。10

#### 【0011】

遺伝子チップでは、何千ものプローブをチップ上に固定できるため、同時に多くの遺伝子を検出できる。これにより、1つのゲノムにおいて、多くの遺伝子について異なる条件下での異なる転写レベルを比較できるだけではなく、異なるゲノム中の対応する遺伝子の異なる転写レベルも比較できる。従って、遺伝子チップは、1または2の遺伝子しか一度に研究できなかった以前の研究におけるボトルネックを克服する。従って、いくつかの有用な熱抵抗性植物遺伝子を得るために、チップ技術の利用による熱抵抗性植物遺伝子の開発方法に対するニーズがある。

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0012】

本発明の目的は、植物に熱抵抗性を与えることである。熱抵抗性を与えられた植物によれば、例えば、植物が熱い期間にさらされている間、熱抵抗性を与えられていない植物と比較して、作物および/または植物生産物の収率を高めることができる。上記植物中のJAZ5a遺伝子の発現を促進すると、植物に熱抵抗性を与えることができる事が見出された。従って、本発明は、単離された熱抵抗性植物タンパク質ならびにその方法および使用を提供する。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0013】

1つの実施態様では、下記のいずれかの単離された熱抵抗性植物タンパク質が提供される:

- (a) 配列番号4のアミノ酸配列を有するタンパク質
- (b) 配列番号4のアミノ酸配列中の1以上の残基の置換、欠損または付加によって生じたものであり、かつ、配列番号4によって表されるアミノ酸配列と同一の機能を有する(a)のタンパク質由来のタンパク質
- (c) 配列番号4のアミノ酸配列と少なくとも60%の同一性を有し、かつ、配列番号4によって表されるアミノ酸配列と同一の機能を有する(a)のタンパク質由来のタンパク質。

#### 【0014】

1つの実施態様では、単離された熱抵抗性植物タンパク質は、配列番号4で表されるアミノ酸配列と少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有する。1つの実施態様では、配列番号4のアミノ酸配列中において1~20、好ましくは1~10、より好ましくは1~5、最も好ましくは1~3の残基が置換され、欠損され、または付加される。

#### 【0015】

1つの実施態様では、上記植物はアブラナ科(*Cruciferae*)の植物である。1つの実施態様では、上記アブラナ科植物は、ナノハナ(*Brassica spp.*)植物およびシロイヌナズナ(*Arabidopsis spp.*)植物からなる群から選択される。

10

20

30

40

50

**【0016】**

1つの実施態様では、上記ナノハナ植物はハクサイである。

**【0017】**

1つの実施態様では、上記シロイヌナズナ植物はシロイヌナズナ (*A r a b i d o p s i s thaliana* (L.) Heynh) である。

**【0018】**

1つの実施態様では、上記熱抵抗性植物タンパク質は、ナノハナ植物由来であり、好ましくは、タイナ種由来である。

**【0019】**

本発明の1つの実施態様では、単離されたポリヌクレオチドは、下記からなる群から選択される：

(i) 上記タンパク質をコードするポリヌクレオチド

(ii) (i) のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド。

**【0020】**

1つの実施態様では、上記ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列は、配列番号1または2である。

**【0021】**

1つの実施態様では、上記ポリヌクレオチドを含むベクターが提供される。

**【0022】**

1つの実施態様では、上記ベクターまたは上記ポリヌクレオチドを含み、上記宿主細胞のゲノム中に組み込まれ得る遺伝的に操作された宿主細胞が提供される。

**【0023】**

1つの実施態様では、上述のポリヌクレオチドのうちのいずれかを含む植物が提供される。

**【0024】**

1つの実施態様では、

(a) 発現に適した条件下で上記宿主細胞を培養する工程と、

(b) 培養物から上記タンパク質を単離する工程と、

を含む上述のタンパク質の製造方法が提供される。

**【0025】**

1つの実施態様では、植物の熱抵抗性を改善するため、または、熱抵抗性植物を提供するため、上述のタンパク質またはそのコード遺伝子の使用が提供される。

**【0026】**

1つの実施態様では、上述のタンパク質またはそのコード遺伝子は、抽苔期における植物の熱抵抗性を改善するために使用される。

**【0027】**

1つの実施態様では、上記植物中の上述のタンパク質の発現または活性を促進する工程を含む、植物の熱抵抗性を改善するための方法が提供される。

**【0028】**

1つの実施態様では、上記方法は、上述のタンパク質をコードするポリヌクレオチドを上記植物のゲノムに形質転換する工程を含む。

**【0029】**

別の好ましい実施形態では、上記方法は、

(1) 上述のタンパク質のコード配列を含む発現ベクターを有するアグロバクテリウムを準備する工程と、

(2) 植物細胞、器官または組織を準備する工程と、

(3) 上記植物細胞、器官または組織と、工程(1)の上記アグロバクテリウムとを接触させ、上記タンパク質のコード配列を上記植物細胞内に導入する工程と、

(4) 任意に、上記タンパク質の導入されたコード配列を含む植物細胞、器官または組織を選択する工程と、

10

20

30

40

50

(5) 工程(3)の植物細胞、器官または組織を植物に再生させる工程と、  
を含む。

**【0030】**

1つの実施態様では、上記導入されたコード配列は、上記植物細胞のゲノム中に組み込まれる。

**【0031】**

本発明の別の態様では、上述の方法によって得られる遺伝子導入植物、または得ることができる遺伝子導入植物が提供される。

**【0032】**

本発明の1つの実施態様では、植物における熱抵抗性または改善された熱抵抗性を特定するための分子マーカーが提供され、上記分子マーカーは、配列番号1または2の配列の少なくとも50ヌクレオチドを含む。1つの実施形態では、上記分子マーカーは、植物中において、植物細胞のDNAの配列決定によって特定される方法が提供される。1つの実施態様では、上記分子マーカーは、配列番号1または2の配列を増幅し、かつ、増幅産物を検出することによって特定される方法が提供される。1つの実施態様では、配列番号1または2の配列を増幅できるプライマー対が提供される。1つの実施態様では、ヌクレオチド配列番号5および6によって表されるプライマー対が提供される。

10

**【0033】**

本発明の他の態様は、本願明細書の内容に基づき、当業者に明らかであろう。

**【図面の簡単な説明】**

20

**【0034】**

**【図1】**図1は、ハクサイ(*Brassica chinensis*)の熱抵抗性および熱感受性の変種におけるBccLOX3およびBccJAZ5のcDNA-AFLPの結果を示す。HS0、HS1、・・・、およびHS5中の番号0、1、・・・、および5は、それぞれ処理番号を指し、この番号は、その上に示されたサンプリング時間に相当する。「m」は分を意味し、「h」は時間を意味する。

**【図2】**図2は、RT-PCRによって検出された、ハクサイの熱抵抗性および熱感受性変種におけるBccJAZ5aおよびBccJAZ5bの転写レベルを示す。46、1時間での熱処理後、全RNAを抽出した。UBQ5は、対照である。CKは、熱処理にさらされていない対照を指す。つまり、この対照は、通常の生育温度にさらされた。0-1および1-2は、対照について2回繰り返された実験を示し、1-1および1-2は、熱処理について2回繰り返された実験を示す。

30

**【図3】**図3は、遺伝子導入植物35S: : BccJAZ5aのT2世代の熱抵抗性の表現型を示す。パネルAは、RT-PCRによる、遺伝子導入植物(gBccJAZ5a)および野生型植物(Co1)における、BccJAZ5aおよび内在性のAtJAZ5の発現レベルを示す。gBccJAZ5A HR / Co1 T2は、BccJAZ5AゲノムDNAで形質転換された遺伝子導入シロイヌナズナ植物から繁殖した第2世代のヘテロ接合性植物を指す('g'はゲノムDNAを示す)。記号1-1、1-2、2-1、2-2、3-1、3-2において、「-」の前の番号は、それぞれ遺伝子導入植物1、2および3を指し、「-」の後の番号は、それぞれ遺伝子導入植物について2回繰り返された実験を指す。Co1-1およびCo1-2は、野生型シロイヌナズナについての2回の実験を指す。パネルBは、熱処理にさらされた遺伝子導入植物および野生型植物を示す。7日齢の実生を22で栽培し、次いで、44~46で1時間熱処理にさらした。次いで、さらに7日間、22にもどした後に写真を撮影した。パネルCは、実生段階における3つの遺伝子導入植物の生育状態を示す。通常の生育条件下で、2番(#2)の遺伝子導入系統の植物は、他の2つの遺伝子導入系統の植物よりも小さかった。

40

**【図4】**図4は、35S: BccJAZ5a遺伝子導入系統が、抽苔期における改善された熱抵抗性を有することを示す。当該植物は、22で、抽苔まで栽培した。次いで、45で3時間または46で、2.5時間熱処理にさらし、44、60分間に変え、次いでさらに5日間22に切り替えた後に写真を撮影した。各系統について、2回の実験

50

を繰り返して行った。図中、記号 1 - 1 - 1 および 1 - 1 - 2 は、それぞれ遺伝子導入系統 1 の 2 つの T 2 世代植物を指し、記号 2 - 1 - 8 は、遺伝子導入系統 2 の 1 つの T 2 世代植物を指し、2 - 1 - 7 は、遺伝子導入系統 2 の別の T 2 世代植物を指す。同様に、3 - 1 - 1 および 3 - 1 - 3 は、遺伝子導入系統 3 の 2 つの T 2 世代植物を指す。

【図 5】図 5 は、B c c J A Z 5 a タンパク質（配列番号 4）中のドメインの分析を示す。

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0035】

###### （定義）

下記の記載および実施例では、いくつかの用語が使用される。明細書および請求項（このような用語に与えられる範囲を含む）の明確かつ一貫した理解を与えるために、下記の定義が提供される。本願明細書において特に定義されていない限り、使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する分野の当業者によって通常理解されるものと同一の意味を有する。全ての文献、特許出願、特許および他の参考文献の開示は、参照によってその全体を本願明細書に援用する。

##### 【0036】

本発明の方法において使用される従来の技術を実行する方法は、当業者に明らかであろう。分子生物学、生化学、計算化学、細胞培養、組換えDNA、生物情報学、ゲノム科学、配列決定および関連分野における従来の技術の実行は、当業者に周知であり、例えば、下記の文献において議論されている：Sambrook et al. . , Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989; Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons. New York, 1987 and periodic updates; and the series Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego。

##### 【0037】

本願明細書および請求項中において、動詞「含む」およびその活用は、その非限定的な意味で使用され、当該用語の後に続く事項が含まれることを意味するが、特に言及されていない事項は除外されない。

##### 【0038】

本願明細書で使用される単数形は、特段の明示がない限り複数形の対象を含む。例えば、上記で使用された、（単数の）DNA分子を単離する方法は、複数の分子（例えば、数十、数百、数千、数万、数十万、数百万またはそれ以上の分子）を単離することを含む。

##### 【0039】

本願明細書で使用される用語「熱ストレス」または「熱」は、温度に関連する最適以下の環境条件を指す。本願明細書で使用される用語「熱」は、大気および／または土壤の温度が生育および／または発育に最適な温度よりも高い環境条件を指す。例えば、キャベツ類の生育に最適な大気の温度は、15～20 の範囲である。温度がこの範囲よりも高いと、キャベツ類は、「熱ストレス」にさらされる。植物を「熱ストレス」にさらす影響は、その植物が最適に生育および／または発育しないことである。例えば、タイナ種を熱ストレスにさらすと、節間の伸張、生育の緩慢化、苦味の発生、纖維量の増加等の影響が生じ得る。ロゼット期および結球期の間にハクサイを熱ストレスにさらすと、心葉が堅固な鱗茎を構築するように巻くことができないか、または全く鱗茎ができないという効果を生じ得る。不自然に鱗茎ができたとしても、穂が束ねられていない。

##### 【0040】

用語「熱抵抗性」とは、植物が熱抵抗性を与えられた場合（または熱抵抗性である場合）に、熱ストレスにさらされた際に、影響を示さないか、または、熱抵抗性を与えられて

10

20

30

40

50

いない植物と比較して軽減された影響を示すことを指す。植物が「熱抵抗性」である場合、さもなければ通常の植物に低減された生育および／または発育をもたらす高温にさらされても、通常の生育および／または通常の発育を維持できる。従って、熱抵抗性は、植物を別の植物と比較することによって特定される相対的な用語である。そのため、（通常の）生育を最も維持できる植物は「熱抵抗性」植物である可能性があり、一方、維持できない植物は、「熱感受性」植物と呼ばれ得る。従って、熱抵抗性を与えることは、熱抵抗性を与えていない植物と比較して、植物の熱抵抗性を改善することを含むことが理解されるだろう。

#### 【0041】

アライニングおよびアラインメント：用語「アライニング」および「アラインメント」とは、同一のまたは類似するヌクレオチドの短いまたは長い配列の存在に基づく、2以上のヌクレオチド配列の比較を意味する。ヌクレオチド配列のアラインメントのためのいくつかの方法は、当該技術分野で公知であり、下記でさらに説明する。

10

#### 【0042】

「遺伝子の発現」とは、適切な調節領域（特にプロモーター）に作動可能に連結されたDNA領域が、生物学的に活性な（例えば、生物学的に活性なタンパク質もしくはペプチドまたは活性なペプチド断片に翻訳され得る）RNAに転写される工程を指す。ある実施態様では、活性なタンパク質とは、構成的に活性なタンパク質を指す。コード配列は、好みしくは、センス方向であり、所望の、生物学的に活性なタンパク質もしくはペプチド、または活性なペプチド断片をコードする。

20

#### 【0043】

「機能的な」とは、タンパク質（または変異体（オルソログまたは変異体等）および断片）と関連して、植物の定量的および／または質的な特徴に対して効果を与えることができる、遺伝子および／またはコードされたタンパク質の能力を指す。上記遺伝子の発現レベルを（例えば、発現を促進させること、または発現を低下させることによって）改変することによって、植物の定量的および／または質的な特徴が影響される。例えば、タンパク質が熱抵抗性の機能を有する場合、遺伝子発現を促進すると、熱抵抗性がもたらされ得る。当業者ならば、非生物的ストレス（熱等）についての機能性を検討することに困難性はないであろう。

#### 【0044】

30

用語「遺伝子」は、適した調節領域（例えばプロモーター）に作動可能に連結される領域（転写された領域）を含むDNA配列を意味し、これは細胞内でRNA分子（例えばmRNA）に転写される。従って、遺伝子は、いくつかの作動可能に連結された配列（プロモーター、5'リーダー配列（例えば翻訳開始に関与する配列を含むもの）、（タンパク質）コード領域（cDNAまたはゲノムDNA）および3'非翻訳配列（例えば転写終結配列部位を含むもの）等）を含む可能性がある。

#### 【0045】

「同一性」は、ヌクレオチド配列またはアミノ酸配列の同一性の基準である。一般的に、配列は順序の一致が最も高くなるようにアラインメントされる。「同一性」自体は、当該技術分野で承認された意味を有し、公知の技術を使用して算出できる。例えば、下記を参照：（COMPUTATIONAL MOLECULAR BIOLOGY, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988；BIOCOMPUTING: INFORMATIC S AND GENOME PROJECTS, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993；COMPUTER ANALYSIS OF SEQUENCE DATA, PART I, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994；SEQUENCE ANALYSIS IN MOLECULAR BIOLOGY, von Heine, G., Academic Press, 1987；およびSEQUENC

40

50

E ANALYSIS PRIMER; Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991).

【0046】

2つのポリヌクレオチドまたはポリペプチドの配列の間の同一性を測定するための方法としては、いくつかの方法が存在するが、用語「同一性」は、当業者に周知である (Carillo, H., and Lipton, D., SIAM J. Applied Math (1988) 48:1073)。2つの配列の間の同一性または類似性を特定するために一般的に使用される方法としては、下記に開示されたものが挙げられるが、これに限定されない: GUIDE TO HUGE COMPUTERS, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego, 1994, および Carillo, H., and Lipton, D., SIAM J. Applied Math (1988) 48:1073。同一性および類似性を特定するための方法は、コンピュータープログラムで分類することである。2つの配列の間の同一性および類似性を特定するための好ましいコンピュータープログラム方法としては、下記に開示されたものが挙げられるが、これらに限定されない: GCS program package (Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research (1984) 12(1):387), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, S. F. et al., J. Molec. Biol. (1990) 215: 403)。

【0047】

例として、特定の配列のポリペプチドをコードする参照ヌクレオチド配列と少なくとも、例えば、95%の「同一性」を有するヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドとは、当該ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列が、ポリヌクレオチド配列が参照ポリペプチド配列の各100ヌクレオチドあたり最大5の点変異を含み得る場合を除いて、参照配列と同一であることを意図する。換言すると、参照ヌクレオチド配列と少なくとも95%同一のヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを得るためにには、参照配列中の最大5%のヌクレオチドを欠損させるか、かつ／または別のヌクレオチドによって置換してもよく、かつ／または、参照配列中の全ヌクレオチドの最大5%のいくつかのヌクレオチドを参照配列中に挿入してもよい。参照配列のこれらの変異は、参照ヌクレオチド配列の5'もしくは3'末端の位置、または、参照配列におけるヌクレオチドの間に個々に分散しているか、もしくは参照配列内の1以上の近接する群中に分散している、これらの末端位置の間のどこかに生じていてもよい。

【0048】

同様に、少なくとも、例えば、配列番号1の参照アミノ酸配列と95%の「同一性」を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドとは、ポリペプチド配列が配列番号1の参照アミノ酸の各100アミノ酸あたり最大5のアミノ酸変化を含み得る場合を除いて、当該ポリペプチドのアミノ酸配列は、参照配列と同一であることを意図する。換言すると、参照アミノ酸配列と少なくとも95%同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドを得るためにには、参照配列中の最大5%のアミノ酸残基が欠損させるか、または別のアミノ酸によって置換してもよく、または、参照配列中の全アミノ酸残基の最大5%のいくつかのアミノ酸を参照配列中に挿入してもよい。参照配列のこれらの変化は、参照アミノ酸配列のアミノもしくはカルボキシ末端の位置または、参照配列における残基の間に個々に分散しているか、もしくは参照配列内の1以上の近接する群中に個々に分散している、これらの末端位置の間のどこかに生じていてもよい。

【0049】

本発明の核酸は、ピリミジンおよびプリン塩基（それぞれ、好ましくはシトシン、チミン、およびウラシルならびにアデニンおよびグアニン）のポリマーまたはオリゴマーのうちのいずれかを含んでいてもよい (Albert L. Lehninger, Pri 50

n c i p l e s o f B i o c h e m i s t r y , 7 9 3 - 8 0 0 ( W o r t h P u b . 1 9 8 2 ) を参照、これはその全体を参照によって本願明細書に組み込まれる)。

### 【 0 0 5 0 】

本発明は、全てのデオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチドまたはペプチド核酸成分および全てのその化学的な変異体（例えば、これらの塩基のメチル化された形態、ヒドロキシメチル化された形態またはグリコシリ化された形態等）を意図する。ポリマーまたはオリゴマーは、組成において、異種または同種であってもよく、天然に存在する供給源から単離されたものであってもよく、または、人工的にもしくは合成的に產生されたものであってもよい。さらに、核酸はDNAもしくはRNA、またはその混合物であってもよく、一本鎖のまたは二本鎖の形態（ホモ二本鎖、ヘテロ二本鎖およびハイブリッドの状態等）で持続的にまたは暫定的に存在していてもよい。10

### 【 0 0 5 1 】

本願明細書で使用される用語「作動可能に連結された」とは、機能的な関連性におけるポリヌクレオチド因子の連鎖を指す。核酸は、別の核酸配列との機能的な関連性において配置されると「作動可能に連結される」。例えば、プロモーター、または特に転写制御配列は、コード配列の転写に影響すると、コード配列と作動可能に連結される。作動可能に連結されたとは、連結されたDNA配列が、典型的には近接しており、2つのタンパク質コード領域を結合させる必要がある場合には、近接しており、かつ読み枠中にあり、「キメラタンパク質」を产生することを意味する。「キメラタンパク質」または「ハイブリッドタンパク質」は、それ自体は天然に見出されないが、結合して機能的なタンパク質を形成する様々なタンパク質「ドメイン」（またはモチーフ）から構成される。「キメラタンパク質」または「ハイブリッドタンパク質」は、結合されたドメインの機能性を示す。キメラタンパク質はまた、天然に存在する2以上のタンパク質の融合タンパク質であってもよい。本願明細書で使用される用語「ドメイン」とは、別のタンパク質に導入されて、少なくともドメインの機能的な特徴を有する新規なハイブリッドタンパク質を与えることができる、特定の構造または機能を有するタンパク質のいずれかの部分またはドメインを意味する。20

### 【 0 0 5 2 】

「植物」とは、植物全体または植物の部分（植物から得ることができる細胞、組織または器官（例えば、花粉、種子、生殖体、根、葉、花、花芽、薬、果実等）等）、およびこれらのいずれかの誘導体、ならびに自家受粉または交雑によるこのような植物由来の子孫のいずれかを指す。「植物細胞」としては、単離物中または組織、器官または生物内のプロトプラスト、生殖体、懸濁培養物、小胞子、花粉粒子等が挙げられる。30

### 【 0 0 5 3 】

本願明細書で使用される用語「プロモーター」とは、1以上の遺伝子の転写を制御する機能を有し、遺伝子の転写開始部位の転写方向に対して上流に位置する核酸断片を指し、DNA依存性RNAポリメラーゼ、転写開始部位および任意の他のDNA配列（転写因子結合部位、抑制タンパク質結合部位および活性化タンパク質結合部位および、プロモーターからの転写量を直接的または間接的に制御するように作用する当業者に公知のヌクレオチドの任意の他の配列が挙げられるが、これらに限定されない）についての結合部位の存在によって構造的に特定される。任意に、本願明細書における用語「プロモーター」には、5'UTR領域（5'非翻訳領域）も含まれる。例えば、本願明細書におけるプロモーターは、遺伝子の翻訳開始コドンの上流（5'）の1以上の部分を含み得る。なぜならば、この領域は、転写および/または翻訳を制御する役割を有する可能性があるからである。「構成的」プロモーターは、多くの生理的条件および発育条件下で、多くの組織において活性なプロモーターである。「誘導性」プロモーターは、生理学的に（例えば、特定の化合物の外的処理によって）または発生的に制御されるプロモーターである。「組織特異的な」プロモーターは、特定の種類の組織または細胞においてのみ活性である。「植物または植物細胞において活性なプロモーター」とは、植物または植物細胞内で転写させるプロ40  
モーターを指す。

口モーターの一般的な能力を指す。これは、プロモーターの時空間的な活性を意味するものでは全くない。

【0054】

用語「タンパク質」または「ポリペプチド」は互換的に使用され、特定の作用形態、大きさ、三次構造または由来を参照することなく、アミノ酸鎖からなる分子を指す。従って、タンパク質の「断片」または「部分」も、依然として「タンパク質」と呼ばれ得る。「単離されたタンパク質」は、その天然の環境にもはや存在せず、例えば *in vitro* または組換え細菌の宿主細胞もしくは植物の宿主細胞中にあるタンパク質を指すために使用される。

【0055】

本願明細書において「遺伝的に改変された植物」とは、例えば、発現が促進するような内在性の遺伝子もしくはその部分における変異の導入によって、または、外因性遺伝子もしくは付加的な複製物もしくは内在性の遺伝子の複製物の導入によって形質転換された、植物または植物細胞を指す。上記外因性遺伝子または付加的な内在性の遺伝子は、ゲノム内に組み込まれていてもよい。(単離された) ポリヌクレオチド配列で形質転換された遺伝子導入植物細胞、ならびに当該細胞から再生された植物細胞および植物は全て、上記(単離された) ポリヌクレオチド配列を含むことが理解されるであろう。遺伝子導入植物細胞とは、単離物もしくは組織培養中における植物細胞、または、植物もしくは分化した器官または組織中に含まれる植物細胞をも指していてよく、両方の可能性が特に本願明細書に含まれる。

10

【0056】

従って、本願明細書または請求項中の植物細胞への参照は、培養物中の単離された細胞またはプロトプラストを指すだけではなく、どこに位置するかに関わらず、または、それが存在し得る植物組織もしくは器官の種類に関わらず、全ての植物細胞を指すことを意味する。遺伝子導入植物細胞および植物を得るための方法は当該技術分野で周知であり、下記が挙げられるがこれらに限定されない：植物の外植片のアグロバクテリウム媒介性形質転換、植物の外植片の粒子照射、ウィスカーラーの技術を使用した植物の外植片の形質転換、ウイルスベクターを使用した形質転換、植物プロトプラストの電気穿孔、ポリエチレンギリコールを使用したプロトプラストによるDNAの直接取り込み、植物の外植片および/またはプロトプラストの微量注入。アグロバクテリウム媒介性形質転換は、本発明の核酸分子を植物の外植片中に導入するための好ましい方法である。アグロバクテリウム腫大物は、植物ゲノムへの外在性の核酸分子の導入に適するように操作された、Tiプラスマドと呼ばれる天然のベクターを有する。遺伝子形質転換については、植物由来の外植片は、アグロバクテリウム細胞の懸濁液でインキュベーションした後に、形質転換された細胞のみの生育および再生を促進する選択剤を含む培地で外植片を培養する。

20

【0057】

(本発明の詳細な説明)

根気強い研究の後に、本発明者は、熱抵抗性植物遺伝子の開発におけるチップ技術の使用によって、初めて、アブラナ属(*Brassica spp.*)から新規な熱抵抗性植物遺伝子を単離した。この遺伝子は、植物における熱抵抗性を改善するために使用できる。この単離された遺伝子は、「BccCJA25a」と名付けられ、これにより、改善された熱抵抗性を有する遺伝子導入植物を產生できる。

30

【0058】

本発明において使用できる植物としては、遺伝子によって形質転換するのに適した植物である限り、特に限定されない。上記植物としては、様々な作物、花植物または森林植物等が挙げられる。特に、上記植物としては、双子葉類、單子葉植物または裸子植物が挙げられるが、これらに限定されない。より具体的には、上記植物としては、コムギ、オオムギ、ライムギ、イネ、トウモロコシ、ソルガム、テンサイ、リンゴ、セイヨウナシ、セイヨウスモモ、モモ、アンズ、サクランボ、イチゴ、タイワンウラジロイチゴ(*Rubus swinhoei Hance*)、ブラックベリー、マメ、レンズマメ、エンドウマメ

40

50

、ダイズ、ナタネ、カラシナ、ケシ、オリーブ、ヒマワリ、ココナツ、ヒマシ油を產生する植物、カカオ、ピーナツ、ヒヨウタン、キュウリ、スイカ、ワタ、アマ、アサ、ジユート、柑橘類 (c i t r u s ) 、レモン、グレープフルーツ、ホウレンソウ、レタス、アスパラガス、キャベツ (c a b b a g e ) 、ハクサイ種、タイナ種、ニンジン、タマネギ、マーフィー、トマト、ピーマン、アボカド、カッシア、カンファー、タバコ、ナッツ、コーヒー、ナス、サトウキビ、茶、コショウ、ブドウ、イラクサ、バナナ、天然ゴムノキおよび観賞植物等が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【 0 0 5 9 】

用語「植物」としては、アブラナ科 (C r u c i f e r a e ) 、イネ科 (G r a m i n e a e ) およびバラ科 (R o s a c e a e ) の植物が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、「植物」としては下記のものが挙げられるがこれらに限定されない：アブラナ科のアブラナ属 (B r a s s i c a s p p . ) のハクサイ種およびタイナ種；アブラナ科のシロイスナズナ (A b r a b i d o p s i s s p p . ) 植物；イネ科のイネ；ならびにタバコ、メロンおよび果実、野菜、ナタネ等。より好ましくは、「植物」は、アブラナ科のアブラナ属またはシロイスナズナの植物である。

10

#### 【 0 0 6 0 】

本願明細書で使用される用語「単離された」とは、物質が、それが最初に見出された本来の環境または自然環境から分離されたことを意味する。例えば、生細胞中の、天然の状態でのポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、単離または精製されていない。しかし、そのポリヌクレオチドまたはポリペプチドが上記天然の状態において共存する他の物質から分離された場合、それは、「単離された」および／または「精製された」と呼ばれる。

20

#### 【 0 0 6 1 】

本願明細書で使用される用語「単離された熱抵抗性植物タンパク質（ポリペプチド）」、「植物の熱抵抗性を改善する単離されたポリペプチド」、「単離されたB c c J A Z 5 a タンパク質」または「単離されたB c c J A Z 5 a ポリペプチド」とは、上記タンパク質と天然に関連する他のタンパク質、脂質、糖類および他の物質を実質的に含まないB c c J A Z 5 a タンパク質を指す。当業者は、B c c J A Z 5 a タンパク質を精製するために標準的なタンパク質精製技術を利用できる。実質的に純粋なポリペプチドは、非還元性ポリアクリルアミドゲル上に单一の主要なバンドを形成し得る。

#### 【 0 0 6 2 】

30

本願明細書で使用される用語「含む」、「有する」には、「含んでいる」、「実質的に・・・からなる」、「基本的に・・・からなる」および「からなる」が含まれる。「実質的に・・・からなる」、「基本的に・・・からなる」、および「からなる」は、一般的な用語「含む」、「有する」の特定の概念である。

#### 【 0 0 6 3 】

本発明のポリペプチドは、組換えポリペプチド、天然のポリペプチドまたは合成ポリペプチドであってもよい。好ましくは、本発明のポリペプチドは組換えポリペプチドである。本発明のポリペプチドは、天然の供給源から精製された生成物、化学的に合成された生成物、または原核生物の宿主もしくは真核生物の宿主（細菌、酵母、高等植物、昆虫および哺乳類細胞等）によって組換え的に產生された生成物であってもよい。組換え产生において使用された宿主に応じて、本発明のポリペプチドは、グリコシリ化されていてもよく、または、グリコシリ化されていなくともよい。本発明のポリペプチドは、さらに、第1の天然のメチオニン残基を含んでいてもよく、または含んでいなくともよい。

40

#### 【 0 0 6 4 】

本発明は、B c c J A Z 5 a タンパク質の断片、誘導体および類似体をさらに含む。本願明細書で使用される用語「断片」、「誘導体」および「類似体」は、本発明のB c c J A Z 5 a タンパク質と実質的に同一の生物学的機能および／または活性を有するポリペプチドを指す。本発明のポリペプチド断片、誘導体または類似体は下記のものであってもよい：(i) 1もしくはいくつかの（好ましくは）保存的な、または非保存的なアミノ酸残基が、遺伝的にコードされた（またはコードされていない）1以上のアミノ酸残基によつ

50

て置換されたポリペプチド、または(i i)置換基を有する1以上のアミノ酸残基を有するポリペプチド、または(i i i)成熟ポリペプチドおよび別の化合物(ポリペプチドの半減期を延長するための化合物(ポリエチレングリコール等)等)の融合ポリペプチド、または(i v)ポリペプチド配列に融合する付加的なアミノ酸配列(リーダー配列または分泌配列、または精製を促進する配列、またはタンパク新生配列、または融合タンパク質等)によって形成されたポリペプチド。

#### 【0065】

本願明細書に記載された定義により、これらの断片、誘導体および類似体は当業者に理解されるだろう。

#### 【0066】

本願明細書で使用される用語「B c c J A Z 5 a タンパク質」とは、配列番号4の配列に基づく、改善された熱抵抗性を与えるポリペプチドを指す。これはまた、改善された植物の熱抵抗性を示す配列番号4の変異体を含む。変異としては下記が挙げられるが、これらに限定されない：1以上の(一般的に1～50、好ましくは1～30、より好ましくは1～20、最も好ましくは1～10、さらにより好ましくは1～8または1～5の)アミノ酸欠損、挿入および/または置換、ならびに、C末端および/またはN末端での1以上の(一般的に20以下、好ましくは10以下、より好ましくは5以下の)アミノ酸の付加または欠損。例えば、近いまたは類似する特性を有するアミノ酸残基による置換は、一般的に、タンパク質の機能に影響しないことが理解されるだろう。さらに、例えば、C末端および/またはN末端での1以上のアミノ酸の付加または欠損は、一般的に、タンパク質の機能に影響しない。当該用語には、B c c J A Z 5 a タンパク質の活性断片および活性誘導体も含まれる。

10

#### 【0067】

ポリペプチドの変異体としては、その相同配列、保存的な変異体、対立遺伝子の変異体、天然の変異体、誘導された変異体、高ストリンジェントな条件または低ストリンジェントな条件下でB c c J A Z 5 a タンパク質のDNAとハイブリダイズできるDNAによってコードされたタンパク質、および、B c c J A Z 5 a タンパク質に対する抗血清を利用することによって得られたポリペプチドまたはタンパク質が挙げられる。本発明はまた、より関連するポリペプチド(B c c J A Z 5 a タンパク質またはその断片を含む融合タンパク質等)を提供する。全長ポリペプチドまたはほぼ全長のポリペプチドに加えて、本発明はまた、B c c J A Z 5 a タンパク質の可溶性断片を含む。一般的に、上記断片は、B c c J A Z 5 a タンパク質の少なくとも約20の、一般的に少なくとも約30の、好ましくは少なくとも約50の、より好ましくは少なくとも約80の、最も好ましくは少なくとも約100の連続的なアミノ酸を含む。

20

#### 【0068】

本発明はまた、B c c J A Z 5 a タンパク質またはポリペプチドの類似体を提供する。これらの類似体は、天然のB c c J A Z 5 a タンパク質と、一次配列において、もしくはその一次配列についての修飾パターンにおいて、またはこれらの両方において異なっていてもよい。これらのポリペプチドとしては、天然の遺伝子変異体または誘導された遺伝子変異体が挙げられる。誘導された変異体は、様々な技術によって(例えば、放射線によって、または、変異原にさらしてランダム変異原性を產生することによって)得てもよい。これらは、部位特異的な変異原性またはいくつかの他の公知の生物学的技術によっても得ることができる。類似体としては、天然のL-アミノ酸と異なる残基を有するもの(D-アミノ酸等)、および非天然のまたは合成のアミノ酸(-アミノ酸および-L-アミノ酸等)を有するものも挙げられる。本発明のポリペプチドが上記の代表的な例に限定されないことは理解されるであろう。

30

#### 【0069】

一次構造を変化させない修飾パターンとしては、in vivoまたはin vitroの化学的誘導(アセチル化またはカルボキシル化等)が挙げられる。修飾は、グリコシリ化であってもよい。修飾は、配列中のアミノ酸残基のリン酸化(リン酸化チロシン、リ

40

50

ン酸化セリンおよびリン酸化スレオニン等)であってもよい。改善された抗タンパク質分解特性を有するか、または溶解特性を最適化するように改変されたポリペプチドも含まれる。

### 【0070】

本発明において、「B c c J A Z 5 a タンパク質の保存的な変異体」とは、類似する特性を有するアミノ酸によって置換された配列番号4のアミノ酸配列中の最大20、好ましくは最大10、より好ましくは最大5、最も好ましくは最大3のアミノ酸を有するポリペプチドを指す。これらの変異ポリペプチドは、表1に示されたアミノ酸置換に従って產生されてもよい。

### 【0071】

#### 【表1】

表1

アミノ酸残基	代表的な置換	好ましい置換
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro; Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe	Leu
Leu (L)	Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala	Leu

### 【0072】

本発明は、本発明のB c c J A Z 5 a タンパク質またはその保存的な変異ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列をさらに提供する。

### 【0073】

本発明のポリヌクレオチドは、DNA分子またはRNA分子であってもよい。DNA分子としては、cDNA、ゲノムDNAおよび合成DNAが挙げられる。DNA分子は、一本鎖または二本鎖の形態であってもよい。DNA分子は、コード鎖または非コード鎖であってよい。成熟ポリペプチドをコードするコード配列は、配列番号1または2のコード配列と同一であってもよく、または、それらの変性変異体であってもよい。本願明細書で使用される「変性変異体」とは、配列番号1または2に記載されるコード配列と異なるヌクレオチド配列を含む配列番号4の配列を有するタンパク質をコードする核酸分子を指す。

### 【0074】

配列番号4のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、下記を含んでいてよい：ポリペプチドのみをコードするコード配列；ポリペプチドのコード配列および付加的なコード配列；ポリペプチドのコード配列および非コード配列、ならびに、任意に付加的な

10

20

30

40

50

コード配列。

【0075】

用語「ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド」には、上記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに加えて、任意に、付加的なコードポリヌクレオチドおよび／または非コードポリヌクレオチドが含まれていてもよい。

【0076】

本発明はさらに上記のポリヌクレオチドの変異体に関し、これは本発明のポリペプチドならびにその断片、類似体および誘導体と同一のアミノ酸配列をコードする。ポリヌクレオチドの変異体は、天然に存在する対立遺伝子の変異体または天然に存在しない変異体であってもよい。ヌクレオチド変異体としては、置換変異体、欠損変異体および挿入変異体が挙げられる。先行技術において知られるように、対立遺伝子の変異体は、ポリヌクレオチドの別の形態であり、その変異は1以上のヌクレオチドの置換、欠損または挿入であってもよいが、対立遺伝子の変異体によってコードされたポリペプチドの機能は実質的に変化しない。10

【0077】

本発明はまた、上記の配列のいずれかとハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、少なくとも50%、好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%の2つの配列間の配列同一性を有するポリヌクレオチドに関する。本発明は、特に、ストリンジエントな条件下で本発明のポリヌクレオチドとハイブリダイズするポリヌクレオチドに関する。20

【0078】

本発明において、「ストリンジエントな条件」とは、以下のいずれかを指す：(1)相対的に低いイオン強度および相対的に高い温度(0.2×SSC、0.1%SDS、60等)でハイブリダイゼーションおよび溶出すること；または(2)ハイブリダイゼーションの間に変性剤が存在すること(例えば、50%(v/v)ホルムアミド、0.1%子ウシ血清/0.1%Ficoll、42等)；または(3)少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%同一性を有する2つの配列間でのみハイブリダイゼーションできる条件。さらに、ハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされたポリペプチドは、配列番号4に示された成熟ポリペプチドと同一の生物学的機能および活性を示す。30

【0079】

本発明は、上記の配列のいずれにもハイブリダイズできる核酸断片にも関する。本願明細書で使用される「核酸断片」は、少なくとも15ヌクレオチド、好ましくは少なくとも30ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも50ヌクレオチド、最も好ましくは少なくとも100ヌクレオチドを含む。核酸の断片は、BccJAZ5aタンパク質をコードするポリヌクレオチドを特定および／または単離するために、核酸の增幅技術(PCR等)において使用してもよい。

【0080】

本発明のBccJAZ5aタンパク質またはその断片の全長ヌクレオチド配列は、典型的には、PCR増幅法、組換え方法または人工合成によって調製できる。PCR増幅に関しては、対象の配列は、本発明において開示された関連ヌクレオチド配列(例えば、読み取り枠)に従ってプライマーを設計すること、および当該技術分野で公知の従来の方法のいずれかに従って調製された市販のcDNAライブラリーまたはcDNAライブラリーを鋳型として使用することによって増幅できる。長い配列については、典型的に、2回以上のPCR増幅が必要となる可能性があり、各増幅によって得られた断片は、正しい方向で、例えばライゲーションすることによって、一緒に融合してもよい。40

【0081】

いったん関連配列が得られると、組換え技術を使用して大量に产生できる。当該配列は、ベクター内にクローニングされてもよい。当該ベクターは、細胞内に形質転換されてもよく、次いで、配列を、従来の方法を使用して増殖された宿主細胞から単離できる。50

**【 0 0 8 2 】**

さらに、関連配列は、例えば、断片が相対的に短い場合は、人工合成によって合成できる。いくつかの小断片をまず合成し、次いで、例えば、融合 P C R またはライゲーションによって、長い断片内に融合してもよい。

**【 0 0 8 3 】**

本発明のタンパク質（またはその断片または誘導体）をコードする D N A 配列は、化学合成によって完全に調製できる。得られた D N A 配列は、様々な公知の D N A 分子（ベクター等）内に、次いで、細胞内に組み入れることができる。さらに、変異は、化学合成によって本発明のタンパク質配列内に導入されてもよい。

**【 0 0 8 4 】**

本発明はまた、本発明のポリヌクレオチドを含むベクターに関し、本発明の B c c J A Z 5 a タンパク質のベクターまたはコード配列を含むように遺伝的に操作された宿主細胞、および本発明のポリペプチドを組換え的に製造するための方法に関する。

**【 0 0 8 5 】**

本発明のポリヌクレオチドは、従来の組換え D N A 技術を使用して、組換え B c c J A Z 5 a タンパク質を発現または産生するために使用できる。このような用途において、下記の工程が含まれていてもよい：

( 1 ) 宿主細胞を、本発明の B c c J A Z 5 a タンパク質をコードするポリヌクレオチド（またはその変異体）、または上記ポリヌクレオチドを含む組換え発現ベクターで形質転換または形質移入する工程、

( 2 ) 培地中で宿主細胞を培養する工程、

( 3 ) 培地または培養細胞からタンパク質を単離および精製する工程。

**【 0 0 8 6 】**

本発明において、B c c J A Z 5 a タンパク質のポリヌクレオチド配列は、組換え発現ベクター中に挿入できる。用語「組換え発現ベクター」とは、細菌性プラスミド、ファージ、酵母プラスミド、植物細胞ウイルス、哺乳類細胞ウイルスおよび、当該技術分野で公知の任意の他のベクターを指す。宿主中で安定的に複製および保持できる限り、全てのプラスミドおよびベクターを使用できる。発現ベクターは、複製起点、プロモーター、マーカーおよび／または翻訳調節領域を含んでいてもよい。

**【 0 0 8 7 】**

当該技術分野で公知の様々な方法が、B c c J A Z 5 a タンパク質および適した転写／翻訳制御シグナルをコードする D N A 配列を含む発現ベクターを構築するために使用できる。これらの方法としては、in vitro 組換え技術、D N A 合成、in vivo 組換え技術等が挙げられる。D N A 配列は、適したプロモーター下で、発現ベクター内で m R N A 合成を行うように、作動可能に連結され得る。発現ベクターは、さらに、翻訳開始および転写終結のためにリボソーム結合部位を含んでいてもよい。

**【 0 0 8 8 】**

さらに、発現ベクターは、1 以上の選択的に標識された遺伝子を含み、形質転換された宿主細胞を選択するための表現型特性を与えてよい。標識された遺伝子は、例えば、真核細胞の培養のためにジヒドロ葉酸還元酵素、ネオマイシン抵抗性および緑色蛍光タンパク質（G F P）をコードしてもよく、大腸菌の培養のためにカナマイシンまたはアンピシリン抵抗性をコードしてもよい。

**【 0 0 8 9 】**

上記の適した D N A 配列および適したプロモーターまたは制御配列を含むベクターは、タンパク質の発現のために適した宿主細胞を形質転換するために使用できる。

**【 0 0 9 0 】**

宿主細胞は、原核細胞（細菌細胞等）または下等真核細胞（酵母細胞等）または高等真核細胞（植物細胞等）でもよい。例としては、大腸菌、ストレプトマイセス、アグロバクテリウム、真菌細胞（酵母等）および植物細胞等が挙げられる。

**【 0 0 9 1 】**

10

20

30

40

50

高等真核細胞において本発明のポリヌクレオチドを発現させる場合、エンハンサー配列がベクター内に挿入された際に、転写を促進させてもよい。エンハンサーはDNAのシス作用性因子でもよく、これは約10～300bpを含む可能性があり、プロモーターに作用して遺伝子の転写を促進できる。

#### 【0092】

当業者ならば、ベクター、プロモーター、エンハンサーおよび宿主細胞の選択方法を理解するはずである。組換えDNAによる宿主細胞の形質転換は、当業者に周知の従来の技術を使用して行うことができる。宿主細胞が原核細胞（大腸菌等）である場合、DNAを取り込むことができるコンピテントな細胞は、指数関数的な生育期後に回収することができ、次いで、当該技術分野において十分に記述されたCaCl<sub>2</sub>法によって処理される。別の方法は、MgCl<sub>2</sub>を使用することである。所望であれば、形質転換は電気穿孔を使用して行うことができる。宿主細胞が真核生物由来である場合、下記のDNAトランسفエクト方法のうちの1以上を使用してもよい：リン酸カルシウム沈殿、従来の機械的方法（マイクロインジェクション等）、電気穿孔、リポソームパッキング等。植物の形質転換はまた、アグロバクテリウムまたは遺伝子銃形質転換等（リーフディスク形質転換、イネ未熟胚形質転換等）を使用して実現してもよい。形質転換された植物細胞、組織または器官は、従来の方法によって植物に再生でき、変化した特性を有する植物を得ることができる。

10

#### 【0093】

形質転換体は従来の方法で培養して、本発明の遺伝子によってコードされるポリペプチドを発現させることができる。使用される宿主細胞に応じて、培養のために使用される培地は、様々な従来の培地から選択してもよい。培養は、宿主細胞の生育に適した条件下で行われる。宿主細胞が適した密度に生育したら、選択されたプロモーターを選択した方法（温度変化または化学誘導等）によって導入でき、その後に細胞をさらに一定期間さらに培養してもよい。

20

#### 【0094】

上記の方法において、組換えポリペプチドは、細胞中もしくは細胞膜上に発現させるかまたは、細胞外に分泌させることができる。所望であれば、組換えタンパク質は、様々な単離方法により、タンパク質の物理的特性、化学的特性または他の特性を利用することによって、単離および精製され得る。これらの方は当該技術分野で周知である。例としては、従来の再現処理、タンパク質沈殿剤による処理（塩析等）、遠心分離、（細菌の破壊ための）浸透、超処理、超遠心、分子ふるいクロマトグラフィー（ゲル濾過）、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー（高速液体クロマトグラフィー（HPLC）等）等、およびその組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

30

#### 【0095】

組換えBccJAZ5aは多くの用途において使用できる。例えば、抗体、ポリペプチドまたは、BccJAZ5aタンパク質の機能に作動的または拮抗的な他のリガンドのスクリーニングに使用できる。発現された組換えBccJAZ5aタンパク質によるポリペプチドライブラーのスクリーニングは、BccJAZ5aタンパク質の機能を阻害または促進できる有用なポリペプチド分子の探索に役立つ。

40

#### 【0096】

本発明の全ポリヌクレオチドまたはその部分はプローブとして使用でき、これは遺伝子発現差異解析を行うために、マイクロアレイまたはDNAチップ（「遺伝子チップ」とも呼ばれる）上に固定され得る。in vitroでの增幅のためのRNA逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）を行うための、BccJAZ5aタンパク質に特異的なプライマーもBccJAZ5aタンパク質の転写産物を検出するために使用できる。

#### 【0097】

本発明はまた、（植物の熱抵抗性を改善するために）植物を改変するための方法に関する、植物におけるBccJAZ5a遺伝子の発現および/またはコードされたタンパク質の

50

活性を促進する工程を含む。

**【0098】**

BccJAZ5a遺伝子の発現を促進させるための方法は、当該技術分野で周知である。例えば、植物は、BccJAZ5aコード遺伝子を有する発現構築物で形質転換し、BccJAZ5a遺伝子を過剰発現させることができ。プロモーターをBccJAZ5a遺伝子の発現を促進させるために使用できる。エンハンサー（イネ waxy遺伝子の第1のイントロンまたはアクチン遺伝子の第1のイントロン等）を、BccJAZ5a遺伝子の発現を促進させるために使用できる。プロモーターとしては、35Sプロモーター、およびイネおよびトウモロコシにおけるUb*i*プロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。

10

**【0099】**

本発明の1つの実施態様では、BccJAZ5aタンパク質の発現が促進された植物を得るための方法は下記の工程を含む：

(1) 発現ベクターを含むアグロバクテリウム株を準備する工程であって、当該発現ベクターはBccJAZ5aタンパク質のDNAコード配列を含む工程、

(2) 植物細胞、組織または器官と、工程(1)のアグロバクテリウムとを接触させ、BccJAZ5aタンパク質のDNAコード配列を植物細胞に形質転換し、染色体に組み込む工程、

(3) BccJAZ5aタンパク質のDNAコード配列で形質転換された植物細胞または組織を選択する工程、

20

(4) 工程(3)の植物細胞または組織を植物に再生する工程。

**【0100】**

全ての適した従来の方法（試薬、温度および圧力の制御等）を、この工程において使用できる。

**【0101】**

本発明には、BccJAZ5aタンパク質またはそのコード遺伝子への作動薬もまた含まれる。BccJAZ5aタンパク質の作動薬は、BccJAZ5aタンパク質の活性または発現を制御できるため、上記作動薬は、BccJAZ5aタンパク質に影響し、その特性を改善することで、植物の熱抵抗性を促進することもできる。

30

**【0102】**

BccJAZ5aタンパク質の作動薬とは、BccJAZ5aの活性を促進でき、BccJAZ5aの安定性を維持でき、BccJAZ5aの発現を促進でき、BccJAZ5aの効果持続期間を延長でき、または、BccJAZ5aの転写および翻訳を促進できる全ての物質を指す。これらの物質は、本発明において、植物の熱抵抗性を促進させるための薬剤として使用できる。

**【0103】**

本発明の実施形態では、BccJAZ5a遺伝子が提供され、そのゲノム配列は配列番号1に記載され、そのCDS配列は配列番号2に示される。上記遺伝子は、270のアミノ酸を含むタンパク質をコードする（配列番号4）。上記BccJAZ5a遺伝子は、植物の耐性の修飾ための新規な経路を提供する。

40

**【0104】**

本発明について、下記の実施例と組み合わせてさらに説明する。これらの実施例は、本発明を説明するためのものであるが、本発明の範囲を多少なりとも制限するものとは理解されないことが理解されるはずである。実験方法については、下記の実施例に特定の条件が記載されていない場合、従来の条件（例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002)に記載された条件）または製造者によって推奨される条件に従って行った。特に示さない限り、割合および部は、質量に基づいて算出した。特に示さない限り、本願明細書で使用される全ての科学用語は、当業者に知られたものと同一の意味

50

を有する。さらに、開示された内容と等価な全ての方法および材料を本発明において使用できる。本願明細書に開示された好ましい実施方法および材料は、説明目的のためだけのものである。

#### 【実施例】

##### 【0105】

###### I . 材料および方法

###### (材料)

熱抵抗性タイナ種 (Bcc) のHR種子、温度感受性のタイナ種 (Bcc) のHS種子、ハクサイ種 (Bcp) 99Breの種子およびハクサイ種のCHIFU変種の種子を、Shanghai Agricultural Science and Technology Seed, LLC. から入手した。Colは、Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciencesから入手したシロイヌナズナの野生型である。  
10

##### 【0106】

###### (植物組織からの全RNA抽出)

試薬 : Takara RNAiso Reagentの抽出キット。

###### 工程 :

a ) 液体窒素中で材料をよく粉碎し、抽出バッファー 1 mlあたり 100 mg の材料となるように試料中に抽出バッファーを加え、均一に攪拌し、次いで室温で 10 分間静置した。  
20

b ) 13000 rpmで 5 分間遠心し、上清を新しい遠心管に移し、200 μlのクロロホルムを加え、均一に攪拌し、次いで室温で 10 分間静置し、相分離させた。

c ) 13000 rpmで 5 分間遠心し、上清を新しい遠心管に注意深くピペットで移した。  
。

d ) 等量のイソプロパノールを加え、よく混合した後に室温で 10 分間静置した。

e ) 13000 rpmで 5 分間遠心し、上清を捨て、1 mlの 75% (v/v) エタノールで 1 度洗浄した。

f ) 7800 rpmで 5 分間遠心し、上清を捨て、および低速度で再度遠心した。残りの液をチップで移した。室温で風乾した。RNAが乾き始めたら適量のRNaseフリーの水を加えた。65°で 10 分間、完全に溶解させた。次いで、-70°で保存した。  
30

##### 【0107】

###### (半定量的RT - PCR)

RT - PCRにおいて使用したプライマーは下記の通りである。

##### 【0108】

## 【表2】

*BccJAZ5a:*

フォワード : 5' AAGAACCAAGTCTGTGA 3' ( 配列番号 5);  
 リバース : 5' TCGGAGGATAATGATGAC 3' ( 配列番号 6).

*BccJAZ5b:*

フォワード : 5' GCTAAACGGAAAGACAGAGC 3' ( 配列番号 7);  
 リバース : 5' TGAGGGAGACGAGGACAAG 3' ( 配列番号 8).

10

*BccLOX3:*

フォワード : 5' TCTAATATGGTCCGCAATC 3' ( 配列番号 9);  
 リバース : 5' TTTCAATCCGTCCAATCT 3' ( 配列番号 10).

*AJAZ5:*

フォワード : 5' AAAATGCTAAGGCACAAG 3' ( 配列番号 11);  
 リバース : 5' GATGAGGTAGAGGGTCG 3' ( 配列番号 12).

20

*BccUBQ5:*

フォワード : 5' TCCGTCCACCTTGTAGAACTG 3' ( 配列番号 13);  
 リバース : 5' TGAAAACCTAACGGGGAAA 3' ( 配列番号 14).

## アクチン：

フォワード : 5' TGGCATCAYACTTTCTACAA 3' ( 配列番号 15);  
 リバース : 5' CCACCACTDAGCACAAATGTT 3' ( 配列番号 16).

30

## 【0109】

## 試薬：

A M V 逆転写酵素 ( T A K A R A )  
 R N a s e 阻害剤 ( T A K A R A )  
 D N a s e I ( R N a s e フリー ) ( T A K A R A )

## 【0110】

## 工程：

a ) 異なる熱処理の後に、タイナ種の葉から全 R N A をそれぞれ抽出した。 D N A s e I ( R N a s e フリー ) で 3 0 分間処理し、次いで、フェノール - クロロホルムによって抽出した。沈殿させ、風乾し、 R N a s e フリーの水中に溶解させた。

40

b ) O D 2 6 0 値を測定し、電気泳動によって定量し、 1 μ g の全 R N A を採取し、標準的な方法に従って 4 2 ℃ で 1 時間および 9 4 ℃ で 5 分間反応させ、逆転写酵素を不活性化させた。

c ) 逆転写物を 2 倍量に溶出させ、それぞれ 1 μ l を採取し、 P C R を行った。 P C R 反応条件は下記の通りである： 9 4 ℃ 、 3 秒間 ; 9 4 ℃ 、 3 0 秒間、 5 5 ℃ 、 3 0 秒間、 7 2 ℃ 、 3 0 秒間、 2 5 ~ 2 8 サイクル ; 7 2 ℃ 、 5 分間。 R T - P C R における錆型量のキャリブレーションのために、平行して行った P C R 反応における内部標準として、ユビ

50

キチンのプライマー( B c c U B Q 5 )およびアクチンを使用した。

【0111】

( C T A B 法による全植物 D N A の抽出 )

試薬 :

2 × C T A B バッファー( 1 0 0 m l ) : 1 0 m l 1 M Tris pH 8 . 0 ;  
4 m l 0 . 5 M EDTA pH 8 . 0 ; 8 . 1 9 g NaCl ; 2 g C T A B ; 1  
g PVP K 3 0 ; 1 0 0 m l にメスアップした。

1 × C T A B バッファー( 1 0 0 m l ) : 5 m l 1 M Tris pH 8 . 0 ; 2  
m l 0 . 5 M EDTA pH 8 . 0 ; 1 g C T A B ; 1 0 0 m l にメスアップした。  
10

高塩濃度の T E ( 1 0 0 m l ) : 1 m l 1 M Tris pH 8 . 0 ; 2 0 0 μ l  
0 . 5 M EDTA pH 8 . 0 ; 5 . 8 4 4 g NaCl ; 1 0 0 m l にメスアップし  
た。

1 0 % ( w / v ) C T A B ( 5 0 m l ) : 5 g C T A B ; 2 . 0 4 5 g NaCl ;  
1 0 0 m l にメスアップした。

【0112】

工程 :

a ) 液体窒素中で 5 g の植物材料を粉碎し、粉末にした。次いで、 4 0 m l の遠心管に移  
した。

b ) 当該遠心管に、 6 5 で予め加熱された 1 5 m l 2 × C T A B バッファー( 1 : 1 )を加え、よく混合した後に、 6 5 で 1 0 分間インキュベーションした。インキュベー  
ションの間、数回転倒混合した。  
20

c ) 1 倍量のクロロホルム : イソアミルアルコール( 2 4 : 1 )を加え、均一に混合した  
後に、 1 1 0 0 0 r p m で 5 分間遠心した。

d ) 上清を新しい遠心管ヘピペットで移し、 1 / 1 0 量の 1 0 % C T A B を加え、次いで  
1 倍量のクロロホルム : イソアミルアルコールを加え、均一に混合した後に 5 分間遠心し  
た。

e ) 上清を移し、工程 d ) を 2 ~ 3 回繰り返し、次いで、上清を新しい遠心管に移し、 2  
倍量超の沈殿バッファー( 1 × C T A B )を加え、穏やかに攪拌し、均一な溶液を生成し  
、室温で 3 0 分間静置した。  
30

f ) 遠心し、沈殿物を回収し、 5 m l の高塩濃度の T E ( 少量の R N a s e が任意に添加  
されていてもよい ) 中に 6 5 で沈殿物を再懸濁し、 3 7 で、 3 0 分間インキュベーシ  
ョンした。

g ) 1 1 0 0 0 r p m で 1 0 分間遠心し、次いで、上清を新しい 1 . 5 m l 遠心管に移し  
た。

h ) 当該遠心管に 2 倍量の無水エタノールを加え、均一に攪拌した後に、 - 2 0 で 3 0  
分間静置した。遠心し、上清を捨て、 7 0 % エタノールで洗浄し、次いで風乾し、 1 0 0  
μ l T E 中に溶解させた。

【0113】

( ベクター( 3 5 S : : B c c J A Z 5 a ゲノム D N A ) の構築 )

ゲノム D N A から B c c J A Z 5 a D N A を增幅するために使用したプライマーは下記  
の通りである。

【0114】

【表 3 】

フォワード : 5' CTTTCTTCATTTGACGC 3' ( 配列番号 17 );

リバース : 5' CTGCAACTAAATTCACTATTG 3' ( 配列番号 18 ).

【0115】

## 工程 :

a ) タイナ種の全ゲノムDNAから、PCRによってBccCJAZ5aのゲノム断片を単離した。

b ) 当該断片をKpn Iで切斷し、その断片を、pCAMBIA1300ベクター(pCAMBIA1300開始ベクターはCAMBIA社から得た)にクローニングした(そのPCR産物は35SとNosとの間につなげた)。この断片は1つの酵素によって切斷されたため、2方向(フォワードおよびリバース)へのライゲーションがあり得る。従って、検証のために配列決定を行った。

c ) フォワード方向の遺伝子を含むpCAMBIA1300-DRE82Aのベクターを、アグロバクテリウムGV3101株(インビトロジェン)に、凍結融解による形質転換によって形質転換し、PCRによって確認した。 10

## 【0116】

(コンピメントなアグロバクテリウム細胞の調製および凍結融解法による形質転換)

a ) 単一のGV3101クローンを未使用のプレートから採取し、28度、48時間培養し、20ml LB液体培地(rif 50mg/l, GM 50 50mg/l)に移し、次いで、250rpmで振とうしながら一晩28度培養した(濃度が高くなり過ぎないようにした)。(下記の全ての操作は無菌条件で行った)。

b ) 工程a)の菌株溶液を氷浴に20分間置いた。次いで、遠心管中へ一定分量に分注した(遠心管あたり4ml)。遠心管を氷浴に10分間置いた。

c ) 遠心管を4000rpm(5~10)で10分間遠心し、上清を捨てた。 20

d ) 20mMの予め冷やしたCaCl<sub>2</sub>を各遠心管に入れ、菌株ペレットを再懸濁した。遠心管を氷浴に10分間置いた。

e ) 遠心管を4000rpm(5~10)で10分間遠心し、上清を捨てた。

f ) 300μlの20mM CaCl<sub>2</sub>(株の濃度に依存する)を各遠心管に入れた。遠心管中の溶液を1.5mlの遠心管に注いだ。

g ) 1μlのプラスミドまたは全ての連結された産物を遠心管に加え、遠心管を氷浴に5分間置いた。その後、遠心管を液体窒素中に4~5分間置いた。

h ) 遠心管を37度5分間静置した。次いで、400μlのLB培地を各遠心管に入れた。遠心管を28度、2時間インキュベーションしてバクテリアを回復させ、適切な抗生物質耐性遺伝子を発現させた。 30

i ) 200μlの溶液を各遠心管から採取し、播種し、プレートを室温で順化のために維持した。次いで28度培養した。

## 【0117】

(f l o r a l - d i p 法およびスクリーニングによるシロイヌナズナの形質転換)

## 試薬 :

形質転換バッファー(1L) : 主要成分(50×) : 10ml ; 微量成分(1000×) : 0.5ml ; CaCl<sub>2</sub>(100×) : 5ml ; 鉄塩(200×) : 2.5ml ; 有機物(100×) : 10ml ; ショ糖 : 50g ; 6-BA(1mg/ml) : 10μl ; Silwet L-77 : 400μl (真空濾過において使用した場合は200μl) ; KOHを使用してpH5.8に調整した。1Lにメスアップした。 40

## 【0118】

スクリーニングのための培養プレート : 3% (w/v) ショ糖MSO 固形培地 (pH 5.8)、カナマイシン(Kan)を加え、濃度を50mg/lにした(シロイヌナズナにおけるNossen バックグラウンドスクリーニングのため)。

## 【0119】

## 工程 :

a ) シロイヌナズナの茎が、抽苔後、高さ5cmに達した際に、形質転換を行った。結実率が低い植物については、形質転換を摘花4日間後に行った。

b ) 形質転換の前に、受粉された花および短角果を除去し、土壤一晩吸水させた。

c ) 一晩培養されたアグロバクテリウムを、培地中に1:100の割合で大きなフラスコ 50

中で希釈した。28で、24時間培養した後、培地を5000 rpm、4で遠心した。上清を捨てた。アグロバクテリウムのペレットを、菌株ストック溶液の2倍量の形質転換バッファー中で再懸濁し、約0.8のOD600を与えた。

d) シロイヌナズナの地上部を菌株溶液中に30秒間完全に浸漬させ、次いで取り出し、保存フィルムおよび新聞紙で包み、一晩暗所に静置した。翌日、植物部分を通常の継代培養のために人工気象室に移した。種子を回収し2週間乾燥させた。

e) 減菌後、種子を50mg/1Kanを含むMSO固形プレートに広げた。4で2日間の春化後、プレートを組織培養庫内に移した。Kan抵抗性を有する実生を選択し、土壤中に移して生育させた。

f) ゲノムDNAを葉から抽出した。PCR同定後、陽性の実生を得た。純粋な遺伝子導入系統を、さらなる2回の継代によって得て、これをさらなる分析に使用した。 10

#### 【0120】

(真空濾過によるキャベツ類の形質転換およびスクリーニング)

##### (1) ハクサイの形質転換

a) ハクサイの種子を水で湿らせた濾紙の上に置き、4で、2ヶ月間春化させた(ハクサイ種植物は、春化にさらされると、若い実生期の間に抽苔し、開花する。これにより、形質転換を促進できる)。次いで、胚軸が伸張したハクサイの実生を土壤に移した。抽苔および第1の開花の時点で、形質転換を行うことができた。形質転換の前に、土壤を一晩灌注した。

b) シロイヌナズナを形質転換するための方法に従って、アグロバクテリウムを含む形質転換溶液を調製した。 20

c) ハクサイ種の地上部分を菌株溶液に完全に浸漬させ、ひっくり返した。次いで、上記部分を真空ポンプを有する乾燥機内に静置した。乾燥機を5分間、2回(2分間の間隔を空けた)、葉が透明になるまで減圧した。乾燥機を通気させ、植物を取り出し、水平に静置し、保存フィルムおよび新聞紙で覆い、一晩暗所に静置した。翌日、植物を移し、大きなツボに植え、従来の方法で栽培した。開花期の間、受粉を芽に対して手作業で行い、次いで、各芽を袋に入れた。種子を回収後、2週間乾燥させた。

d) 減菌された種子を無菌濾紙の上で乾燥させた。次いで、当該種子をKan 50mg/1を含む培地を含む三角フラスコに移した。春化を4で、2~3日間行った。次いで、フラスコをインキュベーションのために恒温室に移した。 30

e) ハクサイ種の形質転換体を本葉(euphylla)が発育した後に特定した。当該形質転換体は緑色の本葉および正常に発育した根を有する。一方、非形質転換体は白い本葉を有し、根を有さない。本葉の3~4葉が形質転換体から発育した後、当該形質転換体を、3日間の順化後に土壤中に移した。

#### 【0121】

##### (2) タイナ種の形質転換

同様に、タイナ種を真空濾過によって形質転換した。形質転換の方法および条件は、ハクサイ種において使用したものと同一である。

#### 【0122】

##### I I . 実施例

###### (実施例1: 目的遺伝子の取得)

植物中の遺伝子発現、特に機能的な遺伝子の発現は、時間的にかつ/または空間的に特異である。本発明者は、異なる熱処理にさらされた試料から抽出したmRNAを、タイナ種における機能的な遺伝子の全てを表すチップとハイブリダイズすることによって、異なる熱処理条件下でのタイナ種の試料中の機能的な遺伝子の発現を検出した。遺伝子発現を検出するための従来の方法は、大規模な配列決定を要求し、これは、1回で少数の遺伝子発現を低い検出感度でしか検出できなかった。遺伝子チップ技術を使用することにより、定量的にかつ定性的に、遺伝子発現レベルを高感度で特定できるだけではなく、1試料中の数千の遺伝子の発現を同時に検討することもできる。遺伝子チップ技術によれば、スクリーニング時間を短縮できるだけではなく、より安定かつ、より特定された結果を得るこ 40

ともできる。遺伝子チップ技術は、その高い適応性および有用な価値によって推奨される。

【0123】

さらに、AFLP（増幅断片長多型）は、制限断片を選択的に増幅するために近年開発された分子マーカーである。この方法は、様々な分野（野菜の遺伝子マッピング、遺伝的多様性および関連性についての分析、重要な遺伝子の位置、遺伝子発現の調節についての研究、野菜における遺伝子指紋法および系統の純度の同定、ならびに分子マーカー支援選択等）で広く使用されている。

【0124】

タイナ種を夏および秋に植えることへのニーズを満たすために、本発明者は、遺伝子チップ技術とcDNA-AFLP技術とを組み合わせて使用し、キャベツ類における熱抵抗性遺伝子についてスクリーニングを行い、キャベツ類における熱抵抗性遺伝子を得た。本発明者は、上記遺伝子を発現する遺伝子導入株も開発した。

【0125】

本発明において得られる遺伝子「BcccJAZ5」は、2つの複製物を有し、その複製物はそれぞれBcccJAZ5a（複製物a）およびBcccJAZ5b（複製物b）である。BcccJAZ5aのゲノム配列は配列番号1に示され、そのCDS配列は配列番号2に示される。これは、270aa（配列番号4）を有するタンパク質「BcccJAZ5a」をコードする。BcccJAZ5bのゲノム配列は配列番号3に示される。

【0126】

（実施例2：熱処理後のRT-PCRによる候補熱抵抗性遺伝子の発現の検出）  
cDNA-AFLPデータにおいて、ジャスモン酸シグナル経路は熱処理後に変化した。本発明者は、この経路における2つの遺伝子について検討した。BcccLOX3はジャスモン酸合成酵素であり、BcccJAZ5は、ユビキチン修飾によって制御される負の相関を有するシグナルタンパク質である。熱感受性変種において、これらの2つの遺伝子は、熱処理によって誘導されると強く発現した。図1を参照。

【0127】

本発明のcDNA-AFLPは、複製物bの発現が有意に変化したことを見出す。ハクサイ種のCHIFU変種の複製物aと複製物bとの間のDNA配列の相同性は、75.8%である。しかし、熱抵抗性および熱感受性の変種における対応する複製物の相同性は、98%超だった。配列アラインメントの結果を表2および3に示す。

【0128】

【表4】

表2. Bcc HRとHS変種とBcc CHIFU変種との間のDNA配列のアラインメント

	BccJAZ5a	BccJAZ5a HR 系統	BccJAZ5b HS 系統
BccJAZ5b	75.8%		99.7%
BccJAZ5b HR 系統			98.8%
BccJAZ5a HS 系統	100%	99%	

【0129】

10

20

30

40

## 【表5】

表3. *AtJAZ5*, *BcpJAZ5a*, *BcpJAZ5b*, *BccJAZ5b*

のアライニングによって得られたcDNA-AFLPの結果に基づくDNA配列の相同性

	<i>AtJAZ5</i>	<i>BcpJAZ5a</i>	<i>BcpJAZ5b</i>
<i>BccJAZ5b</i>	50.3%	40.8%	99.7%
<i>AtJAZ5</i>	-	77.0%	74.3%
<i>BcpJAZ5a</i>	-	-	75.8%

10

## 【0130】

本発明者は、熱処理条件下で、*BccJAZ5b*および*BCCCLOX3*の両方の発現が上方制御され、かつ、この上方制御が熱感受性変種においてより顕著であることを、RT-PCRによってさらに示した。図2を参照。

## 【0131】

(実施例3：熱抵抗性遺伝子を有する遺伝子導入植物の表現型)

熱抵抗性遺伝子の機能を特定するため、本発明者は、35Sプロモーターを含む植物発現ベクター35S：：*BccJAZ5a*を構築した。このベクターを、シロイヌナズナを形質転換するために使用した。シロイヌナズナのT2世代植物の遺伝子発現および熱抵抗性を検出した。

20

## 【0132】

本発明者は、外在性の*BccJAZ5a*および内在性の*AtJAZ5a*を、RT-PCRによって検出した。図3中の3つの遺伝子導入系統35S：：*BccJAZ5a*を参照。全ての遺伝子導入植物における*BccJAZ5a*の発現は上方制御された。しかし、これらは、野生型植物と比較して、より強い熱抵抗性を示さなかった。一方、2番(2#)の遺伝子導入系統は、最も悪い生存率を示した。本発明者は、2番目の遺伝子導入系統における*AtJAZ5a*の発現が阻害されていることを見出した。このことは、熱への低い耐性をもたらし得る。次いで、2#は、明白な生育不良を示した。本発明者は、抽苔期における遺伝子導入植物35S：：*BccJAZ5a*のT4世代の表現型をさらに検討した。全ての3つの遺伝子導入系統は、野生型植物と比較して、改善された熱抵抗性を示した。この結果は、実生段階における植物で得られたものと逆だった。従って、*BccJAZ5a*は、抽苔期における熱抵抗性機能を奏し得る。これは、例えば、実生段階および抽苔期における熱ストレスへの反応機構が異なるからである。図4を参照。

30

## 【0133】

(実施例4：熱処理後の遺伝子導入ハクサイ種およびタイナ種の植物の表現型)

本発明者は、熱処理後の遺伝子導入ハクサイ種およびタイナ種の植物の表現型を検証するために熱処理系を使用した。当該遺伝子導入植物の種子について、出芽を促進し、低温下で春化にさらし、次いでプラスチック製培養器に植えた。実生を25℃で培養した。抽苔が開始したら、着実な生育状態を有する実生を選択し、昇温での熱処理のために培養箱に静置した。温度は32℃に維持し、この処理を10日間続けた。次いで、温度を2日間、25℃に切り替えた。熱障害の指標を算出し、かつ分析した。熱障害の代表的な症候(葉のしわおよびゆがみ、葉の白化、生育遅延、植物のしおれおよび枯れ等)を特定し、かつスコア化した。

40

葉のしわおよびゆがみ：軽度、A；中程度、A+；重度、A++

葉の白化：軽度、B；中程度、B+；重度、B++

生育遅延：軽度、C；中程度、C+；重度、C++

しおれおよび枯れ：軽度、D；中程度、D+；重度、D++

## 【0134】

実験結果は、ハクサイ種植物の遺伝子導入植物における熱障害の症候は、全て軽度であるとスコアされたことを示す(A B C Dとして表される)。対照植物(野生型ハクサイ種

50

、 B - h o t ( キャベツ ) における熱障害の症候は、全て重度としてスコアされた ( A + + B + + C + + D + + として表される )。

#### 【 0 1 3 5 】

実験結果は、タイナ種植物の遺伝子導入植物における熱障害の症候は、全て軽度であるとスコアされたことを示す ( A B C D として表される )。対照植物 ( 野生型タイナ種、熱感受性タイナ種 H S ) における熱障害の症候は、全て重度としてスコアされた ( A + + B + + C + + D + + として表される )。

#### 【 0 1 3 6 】

ハクサイ種およびタイナ種の遺伝子導入植物は、抽苔期において、野生型植物と比較して、熱ストレスに対する耐性がよりずっと高いことが理解できる。

10

#### 【 0 1 3 7 】

( 実施例 5 : J A Z 5 a タンパク質中のドメイン、その変異体および機能についての検討 )

本発明者は、B c c J A Z 5 a タンパク質 ( 配列番号 4 ) 中のドメインを、図 5 に示す通り特定した。当該結果は、位置 1 0 1 - 1 3 0 が t i f y ドメインを構成し、かつ、1 8 4 - 2 0 9 の分節が C C T \_ 2 モチーフであることを示した。これらのドメインは、タンパク質の熱抵抗性機能にとって重要な活性部位である。

#### 【 0 1 3 8 】

上記の分析に基づき、本発明者は、B c c J A Z 5 a タンパク質のいくつかの変異体を下記の通り構築した。

20

B c c J A Z 5 a タンパク質 ( 配列番号 4 ) の配列において、アミノ酸 9 を A から V に改変し、B c c J A Z 5 a - 1 変異体を得た。

B c c J A Z 5 a タンパク質 ( 配列番号 4 ) の配列において、アミノ酸 2 5 3 を L から I に改変し、B c c J A Z 5 a - M 2 変異体を得た。

B c c J A Z 5 a タンパク質 ( 配列番号 4 ) の配列において、アミノ酸 1 4 7 を V から A に改変し、B c c J A Z 5 a - M 3 変異体を得て、アミノ酸 2 3 0 を L から I に改変した。

B c c J A Z 5 a タンパク質 ( 配列番号 4 ) の配列において、アミノ酸 2 6 6 - 2 7 0 を欠損させ、B c c J A Z 5 a - M 4 変異体を得た。

B c c J A Z 5 a タンパク質 ( 配列番号 4 ) の配列において、アミノ酸 1 5 9 - 1 6 1 を欠損させ、B c c J A Z 5 a - M 5 変異体を得た。

30

B c c J A Z 5 a タンパク質 ( 配列番号 4 ) の配列において、4 つのアミノ酸 ( A T A A ) を C 末端に付加し、B c c J A Z 5 a - M 6 変異体を得た。

#### 【 0 1 3 9 】

配列番号 2 に示される B c c J A Z 5 a 遺伝子の C D S 配列を、まず p C A B I A 1 3 0 0 ベクター中に、K p n I 部位でクローニングし、上記 C D S を含む組換えベクターを得た。次いで、部位特異的な変異誘発を行い、対応する置換、欠損および付加を導入し、それぞれ上記変異体を含む組換えベクターを得た。

#### 【 0 1 4 0 】

上記のように構築された組換えベクターでアグロバクテリウム株を形質転換した。次いで、当該アグロバクテリウム株を、シロイヌナズナを形質転換させるために使用し、下記の遺伝子導入シロイヌナズナ植物を得た : M 1 - L i n e 1 、 M 1 - L i n e 2 ; M 2 - L i n e 1 、 M 2 - L i n e 2 ; M 3 - L i n e 1 、 M 3 - L i n e 2 ; M 4 - L i n e 1 、 M 4 - L i n e 2 ; M 5 - L i n e 1 、 M 5 - L i n e 2 ; M 6 - L i n e 1 、 M 6 - L i n e 2 。

40

#### 【 0 1 4 1 】

熱処理系をこれらの遺伝子導入シロイヌナズナ植物の表現型を検証するために使用した。当該植物を 2 2 °C で、抽苔まで生育させた。次いで、当該植物を、4 5 °C で、3 時間熱処理にさらし、次いで、2 2 °C に 5 日間切り替えた後に、写真を撮影した。各系統について、2 回の実験を繰り返して行った。遺伝子導入植物は、野生型植物と比較して、熱スト

50

レスに耐性があった。

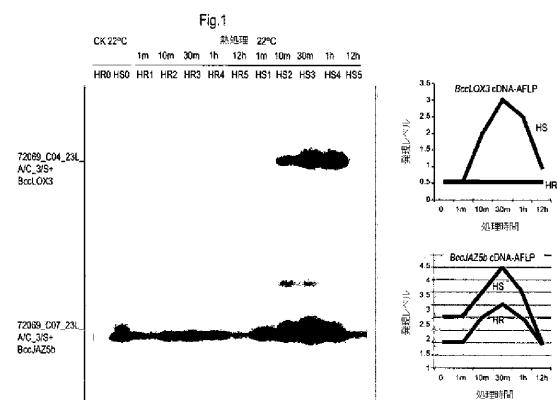
【0142】

要約すると、キャベツ類およびその変異体の *BcccJAZ5a* は、抽苔期における植物の熱抵抗性を改善するために使用できる有効な熱抵抗性遺伝子である。

【0143】

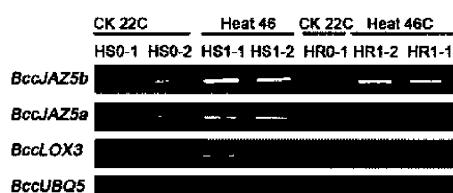
本発明に引用された全ての参考文献は、それらのうちそれぞれ 1 つが各々引用される際に、参照によって本願明細書に援用される。さらに、様々な改変および / または変更は、本発明の教示を考慮し、明細書および請求項によって定義される範囲内であることが当業者に明らかであることが理解される。

【図 1】

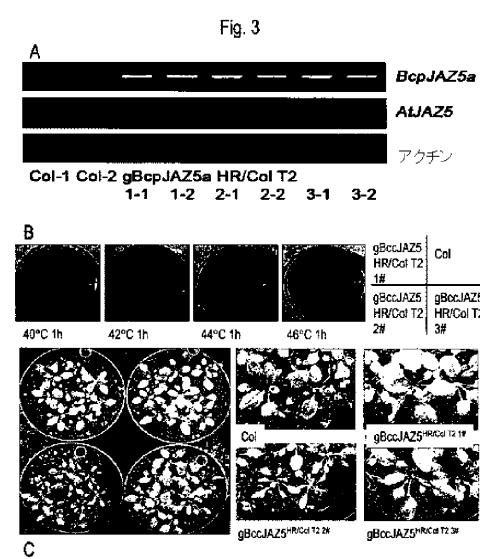


【図 2】

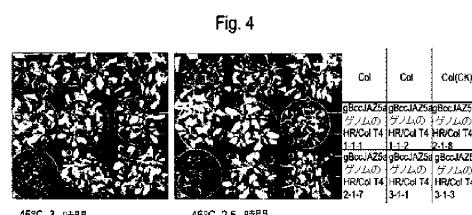
Fig. 2



【図 3】

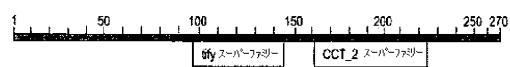


【図 4】



【図5】

Fig. 5



【配列表】

0005924782000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 C
A 0 1 H 1/00 (2006.01)	A 0 1 H 1/00 A
A 0 1 H 5/00 (2006.01)	A 0 1 H 5/00 A
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A

(73)特許権者 510036355

シャンハイ インスティチューツ フォー バイオロジカル サイエンシーズ チャイニーズ アカデミー オブ サイエンシーズ  
 SHANGHAI INSTITUTES FOR BIOLOGICAL SCIENCES  
 CHINESE ACADEMY OF SCIENCES  
 中華人民共和国 シャンハイ ユエ ヤン ロード 320 オフィス オブ テクノロジー トランスマスター アンド コミュニケーションズ  
 Office of Technology Transfer & Communications  
 320 Yue Yang Road, Shanghai China

(74)代理人 100106002

弁理士 正林 真之

(74)代理人 100120891

弁理士 林 一好

(74)代理人 100165157

弁理士 芝 哲央

(74)代理人 100126000

弁理士 岩池 満

(72)発明者 ヘ ユ - ケ

中華人民共和国 200032 シャンハイ 300 フエン リン ロード ニュー メイン  
 ビルディング ルーム 711 チャイニーズ アカデミー オブ サイエンシーズ シャンハイ  
 インスティチューツ フォー バイオロジカル サイエンシーズ内

(72)発明者 スン チュアン - バオ

中華人民共和国 200032 シャンハイ 300 フエン リン ロード ニュー メイン  
 ビルディング ルーム 711 チャイニーズ アカデミー オブ サイエンシーズ シャンハイ  
 インスティチューツ フォー バイオロジカル サイエンシーズ内

審査官 大久保 智之

(56)参考文献 DDBJ accession No. AC172887[online], 2008年, version 172887.2, <http://getentry.ddbj.nig.ac.jp/getentry/na/AC172887/?filetype=html>参照

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N	1 5 / 0 0
C 1 2 N	1 / 0 0
C 1 2 N	5 / 0 0
C 1 2 P	2 1 / 0 0
A 0 1 H	1 / 0 0
A 0 1 H	5 / 0 0
C 0 7 K	1 4 / 0 0
C 1 2 Q	1 / 0 0

GenBank / EMBL / DDBJ / GeneSeq

(31)

JP 5924782 B2 2016.5.25

UniProt/GeneSeq