

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003年1月3日 (03.01.2003)

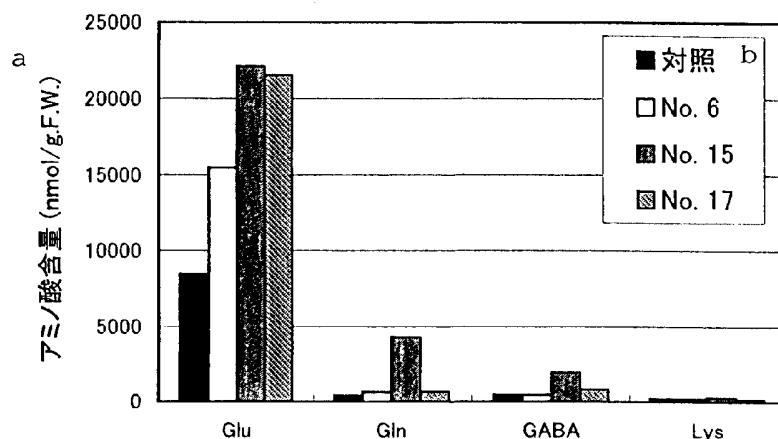
PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/000041 A1

- (51) 国際特許分類: A01H 5/00, C12N 15/53, 15/83 (KISAKA, Hiroaki) [JP/JP]. 木田隆夫 (KIDA, Takao) [JP/JP]; 〒210-0801 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社 中央研究所内 Kanagawa (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/05077
- (22) 国際出願日: 2001年6月14日 (14.06.2001) (74) 代理人: 中村 稔, 外 (NAKAMURA, Minoru et al.); 〒100-8355 東京都千代田区丸の内3丁目3番1号 新東京ビル Tokyo (JP).
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語 (81) 指定国 (国内): CN, JP, PL, RU, US.
- (63) 先の出願に対する継続または一部継続による関係:
US 09/729,821 (一部継続)
出願日 2000年12月6日 (06.12.2000) (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 味の素株式会社 (AJINOMOTO CO., INC.) [JP/JP]; 〒104-0031 東京都中央区京橋1丁目15番1号 Tokyo (JP). 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 木坂広明
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF CONSTRUCTING TRANSGENIC PLANT WITH IMPROVED AMINO ACID COMPOSITION AND YIELD

(54) 発明の名称: アミノ酸組成および収量が改良されたトランスジェニック植物の作出法



a...AMINO ACID CONTENT

b...CONTROL

(57) Abstract: It is intended to provide a transgenic plant capable of accumulating free amino acids, in particular at least one free amino acid selected from among glutamic acid, asparagine, aspartic acid, serine, threonine, alanine and histidine in its edible part and a method of constructing the same. It is also intended to provide a method

[続葉有]



WO 03/000041 A1



of elevating potato yield and a transgenic potato capable of giving an elevated yield. A sequence encoding glutamate dehydrogenase (GDH) gene is transferred into a plant together with a regulatory sequence for the expression in plant cells and thus the GDH gene is expressed in excess.

(57) 要約:

本発明の目的は、植物の可食部分における遊離アミノ酸、特にグルタミン酸、アルパラギン、アスパラギン酸、セリン、スレオニン、アラニン、およびヒスチジンの少なくとも一つの遊離アミノ酸を高度に蓄積するトランスジェニック植物およびその作出方法を提供することである。また、本発明の別の目的は、ポテトの収量を増大させる方法および、収量が増大し得るトランスジェニックポテトを提供することである。本発明において、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ(GDH)遺伝子をコードする配列が植物細胞において発現させるために適切な制御配列と共に植物に導入され、GDH 遺伝子が過剰発現される。

明細書

アミノ酸組成および収量が改良されたトランスジェニック植物の作出法

発明の背景

本発明は、遊離アミノ酸が増強されたトランスジェニック植物およびその作成方法に関する。より具体的には、本発明は、アスパラギン、アスパラギン酸、セリン、スレオニン、アラニン、ヒスチジンおよびグルタミン酸の少なくとも1つを高蓄積するトランスジェニック植物およびその作製方法並びにポテトの収量を増加させる方法および収量が増加し得るトランスジェニックポテトおよびその作製方法に関する。

植物に特定の遺伝子を導入し形質転換させる技術が世界で初めて報告されたのは土壌細菌、*Agrobacterium tumefaciens*を用いてタバコに遺伝子を導入した研究であり、その後多くの有用農業形質を付与した作物が作出され、植物に有用成分を作らせる試みも行われてきた。このようなトランスジェニック植物作成技術を用いた植物育種法は、交配等による従来の伝統的な育種に代わるものとして有望視されている。その中で、窒素同化に関する植物の特性改良の研究も進められてきており、特に、アミノ酸は窒素代謝産物の中でも、果実、塊茎、根菜類の根、種子などにおいて重要な成分であり、また食味にも大きく影響を与えることから盛んに研究が行われてきている。

アミノ酸の生合成に関する研究としては、例えば、大腸菌由来ジヒドロジピコリン酸シンターゼ(DHDPS)遺伝子をタバコに導入し、遊離リジンが200倍上昇したという報告(米国特許第5258300号、Molecular Genetics Res. & Development)、アスパラギン酸キナーゼ(AK)遺伝子の導入により遊離リジンが増加したという報告(EP485970, WO9319190)、アスパラギンシンターゼ(AS)遺伝子をタバコに導入し、アスパラギン含量が100倍上昇したという報告(WO 9509911, Univ New York, W

0 9013533, Univ Rockfeller)、アントラニル酸合成酵素遺伝子をイネに導入しトリプトファン含量が90倍上昇したという報告(WO 9726366, DEKALB Genetic Corp)がなされている。遺伝子導入の対象となる植物はタバコ、シロイヌナズナ等のモデル植物に限られず、トマトなどの果実をもつ植物も利用されている。例えば、トマトについては1986年にアグロバクテリウム法を用いて形質転換体が作出され(S. McCormickら, 1986, Plant Cell Reports, 5, 81-84; Chyiら, 1986, Mol. Gen. Genet., 204, 64-69)、それ以来形質転換系の改良がなされてきている。また、アミノ酸生合成、窒素同化に関与する遺伝子は上述の他にも多数知られており、アスパラギナーゼ、グルタミン酸シンターゼ(GOGAT)等が含まれ、これらの塩基配列も報告されている。

ここで、特に α -アミノ酸の一種であるグルタミン酸は、一般にタンパク質中に広く分布し、調味用途として使用されている、トマトのうま味成分や、ダイズではその醸造食品(例えば、醤油、味噌など)中のうま味成分は、いずれもグルタミン酸であることが知られており、高等植物では窒素代謝の最初の段階で合成されることが知られている。また、グルタミン酸より生じたグルタミン、アスパラギンが篩管を經由して各組織に分配されその他のアミノ酸合成、タンパク質合成に用いられることが分かっている。植物においては、スクロースやアミノ酸などの光合成産物が輸送経路である篩管液中に高濃度に存在する例が報告されている(茅野充男ら、植物栄養・肥料学p125(1993))が、可食部分に高濃度に含まれる例としては、トマト果実に0.25g/100g f.w.程度含まれる例(ときめき2号、日本食品工業学会誌、第39巻、p64-67(1992))が知られている。しかしながら、グルタミン酸の場合は、ソース器官での生合成能が向上できたとしてもアミノ基供与の出発物質であり、前述のように種々の生合成経路で代謝されるため、植物体中でグルタミン酸を高濃度に蓄積させるのは容易ではない。交配育種、遺伝子操作を問わず、これまでグルタミン酸の濃度を植物体中で飛躍的に高めるのに成功し

た例は出願人の知る限り見当たらない。

無機窒素を有機体に同化する第一段階は、上述したように主にグルタミンを生成するためのグルタミン酸へのアンモニアの取り込みであり、これはグルタミンシンターゼ酵素(GS)により触媒される。次いで、このグルタミンは、グルタミン酸シンターゼ(GOGAT)に触媒され、 α -ケトグルタル酸とから2分子のグルタミン酸が生成される。このGS/GOGATサイクルが、植物における窒素同化の主要な経路と考えられている(文献:Miflin および Lea, 1976, *Phytochemistry*, 15;873-885)。一方、アンモニアの取り込みが、GSにより触媒される経路以外の代謝経路により進行する事が知られている(Knight and Langston-Unkefer, 1988, *Science*, 241:951-954)。即ち、グルタミン酸を生成するための α -ケトグルタル酸へのアンモニアの取り込みであり、これはグルタミン酸デヒドロゲナーゼ(GDH)により触媒される。しかし、植物のGDHは、アンモニアに対して高い K_m 値を有しており、一方、アンモニアは毒性があり、細胞内アンモニアは通常低濃度であるため、正常な生育条件下でのこの窒素同化経路の役割については未だ充分には明らかにされていないが、ある研究では、細胞内のアンモニウム濃度が正常レベルを越えて上昇した時の窒素同化に寄与しているとの報告がある(Knight and Langston-Unkefer、前掲)。

植物におけるグルタミン酸デヒドロゲナーゼ酵素(GDH)は上記の様にグルタミン酸を生成するため α -ケトグルタル酸へアンモニアを取り込ませる場合と逆に α -ケトグルタル酸を生成するためにグルタミン酸からアンモニアを解離させる場合と可逆的な反応を触媒する。前者はアンモニア態窒素含量が高い場合に、また後者は硝酸態窒素含量が高い場合に機能すると考えられており(Robinson ら、1991, *Plant Physiol.* 95; 809-816; Robinson ら、1992, *Plant Physiol.* 98; 1190-1195)、微生物に見られるようなグルタミン酸を合成する方向に機能する酵素GDH-Aや分解する方向に機能する酵素GDH-B等のように方向性が明確でない。

また、植物ではクロロプラストで機能するNADP依存型GDHとミトコンドリアで機能するNAD依存型GDHの2種類があると考えられているが、GDHはアンモニアに対して高い K_m 値を示し、また、光呼吸時におけるアンモニアレベルとの相関性が高いことから、ミトコンドリアに局在するNAD依存型GDHがアンモニアの同化に重要な働きをしていると考えられている (SrivastavaおよびSingh RP, 1987, *Phytochemistry*, 26; 597-610)。

植物のGDHは、2種類の異なるポリペプチド (α -サブユニット、 β -サブユニット) がランダムに結合し、ヘキサマーを形成し、さらに、結合の程度により7つのアイソザイムパターンを示すことが知られている。Grapevineのカルス細胞を用いた研究において、硝酸塩やグルタミン酸を加えた培地で培養したカルスは、電気泳動した際 β -サブユニットから成るアイソザイムが陰極側に増加し、アンモニアやグルタミンを加えた培地で培養したカルスは α -サブユニットから成るアイソザイムが陽極側に増加すること、さらに、硝酸塩培地からアンモニア源培地に移した場合、GDH活性が3倍増加し (α -サブユニット4倍増加し、 β -サブユニット減少)、活性が陰極側から陽極側に移行したことが報告され (LoulakakisおよびPoulikakis-Angelakis, 1996, *Plant Physiol.* 97; 104-1111)、アンモニアの同化に α -サブユニットが重要な働きをしていると考えられている。

1995年Sakakibaraら (*Plant Cell Physiol*, 33; 1193-1198) によりトウモロコシの根から7つのアイソザイムバンドのうち陰極側の2つのバンドを元にGDH遺伝子が植物で初めて単離され、その後Grapevine (Syntichakiら, 1996, *Gene* 168; 87-92)、Arabidopsis (Melo-Olivera ら, 1996, *Proc Natl Acad Sci USA* 93; 4718-4723)、トマト (Purnellら, 1997, *Gene* 186; 249-254) からGDH遺伝子が単離されてきた。特に、Grapevineのカルスから単離された遺伝子はアンモニア処理した細胞において発現してきたアイソザイムを元に単離されており、 α -サブユニットをコードする遺伝子であると考えられている。いずれの遺伝子においても

ミトコンドリアで機能するためのトランジェットペプチドを有しているが、トウモロコシやトマトのGDH遺伝子は根で多量に発現しているのに対し、Arabidopsisでは葉や花での発現が高い。またトウモロコシ、Arabidopsis、Grapevineでは複数の遺伝子の存在が示唆されているのに対し、トマトでは1コピーであることが報告されているように植物においても遺伝子構成や機能に違いを有しており、複雑であることが予測されている。

このGDH遺伝子を導入したトランスジェニック植物も作製されており、大腸菌由来グルタミン酸デヒドロゲナーゼ酵素 (NADP-GDHA) 遺伝子を除草剤フオスフィノスリシン耐性付与を目的としてタバコとトウモロコシに導入したところ、根でグルタミン酸含量が1.3~1.4倍増加したことが報告されている (Lightfoot David ら、CA2180786(1996))。この報告では、タバコの根において、14.7mg/100gf.w.であったグルタミン酸含量が20.6mg/100gf.w.に、トウモロコシの根において16.2mg/100gf.wであったグルタミン酸含量が19.1mg/100gf.w.に増大した。また、Lightfootらは、同遺伝子を導入した形質転換トウモロコシの種子においてグルタミン酸含量が有意に減少していたことも報告した(米国特許、第5,998,700号)。これ以外に、GDH遺伝子の利用について記載された報告もあるが、実施例は示されていない (W09509911、クロレラ由来の α 、 β -サブユニット (W09712983))。またグルタミン酸族アミノ酸についての分析値も示されていない。

更に、ポテト塊茎のデンプン含量を改変する目的で、photosynthetic phosphoenolpyruvate carboxylase (C_4 -PEPC)遺伝子とNADP依存型malate dehydrogenase (cpMDH)遺伝子 (Beaujeanら, 2001, Plant Science 160: 1199-1210)、GA20-oxidase遺伝子 (Carrera ら, 2000, Plant J 22: 247-256)、Hexokinase 1遺伝子 (Veramendiら, 1999, Plant Physiol 121: 123-134)、NADP依存型cytosolic isocitrate dehydrogenase (Kruseら, 1998, Planta 205: 82-91)、ADP glucose pyrophosphorylase遺伝子 (Greeneら, 1996, Proc Natl Acad Sci USA 93: 1509-1

513; Roberら, 1996, *Planta* 199: 528-536)、cytosolic fructose-1,6- bisphosphatase遺伝子 (Zrennerら, 1996, *Plant J* 9: 671-681) をポテトに導入したが、ポテト塊茎の収量にはほとんど影響が無かった。Redros ら(1999, *Planta* 209: 153-160)は、ポテトにS-adenosylmethonine decarboxylase 遺伝子を導入し過剰発現させた際に、塊茎数が増加したがサイズが小さく、総重量は非形質転換体と差異が無かったことを報告した。また、Van Asscheら(米国特許第 5981952号)は、sucrose phosphate synthase (SPS) 遺伝子をポテトに導入し、種々のCO₂濃度下でポテト塊茎の収量について調査した結果、塊茎の乾燥重量が増加したことを報告した。しかし、増加量は僅かであり、これまでポテト塊茎の収量を飛躍的に高めるのに成功した例は出願人の知る限り見当たらない。

発明の開示

本発明の目的は、植物の貯蔵器官の遊離アミノ酸含量、特に根、塊茎、果実、種子を含む植物の可食部分における遊離アミノ酸、特にグルタミン酸、アスパラギン、アスパラギン酸、セリン、スレオニン、アラニンおよびヒスチジンの少なくとも1つの蓄積を増強する方法、および、遊離アミノ酸が高度に蓄積されたトランスジェニック植物を提供することである。

また、本発明の別の目的は、ポテトの収量を増加させる方法および、収量が増加し得るトランスジェニックポテトを提供することである。

本発明の目的は、窒素の同化および利用に関わる主要な酵素の発現レベルおよび／または細胞特異的な発現バランスを変化させた植物およびその作製方法を提供することによって達成される。このような植物は、窒素同化または利用酵素をコードする1以上の遺伝子を適切な制御配列と共に導入し、これを過剰発現または発現抑制することによって作製される。

本発明の方法による遊離アミノ酸を高度に蓄積するトランスジェニック植物、

特にグルタミン酸、アスパラギン、アスパラギン酸、セリン、スレオニン、アラニンおよびヒスチジンの少なくとも1つ、とりわけグルタミン酸を高度に蓄積する植物は、真核生物由来のグルタミン酸デヒドロゲナーゼ(GDHA)遺伝子を適切な制御配列と共に植物に導入し、これを過剰発現させることによって得られる。

また本発明の、収量の増加したポテトも、真核生物由来のグルタミン酸デヒドロゲナーゼ(GDHA)遺伝子を適切な制御配列と共に植物に導入し、これを過剰発現させることによって得られる。

図面の簡単な説明

図1は、*Aspergillus nidulans* 由来グルタミン酸デヒドロゲナーゼ(GDHA)遺伝子 *AN-gdh-17* と既知のNADP-GDHA遺伝子配列を比較したものである。上段がNADP-GDHA遺伝子の塩基配列、下段が *AN-gdh-17* 遺伝子の塩基配列である。

図2は、*Aspergillus nidulans* 由来グルタミン酸デヒドロゲナーゼ(GDHA)遺伝子 *AN-gdh-17* と既知のNADP-GDHA遺伝子配列の比較を示したものである(図1 続き)。上段がNADP-GDHA遺伝子の塩基配列、下段が *AN-gdh-17* 遺伝子の塩基配列。

図3は、*AN-gdh-17* 遺伝子のTiプラスミッド(pMAT037)へのクローニング手順を示したものである。図中、35S Proは CaMV 35S プロモーター、Termはターミネーターを表す。

図4は、トランジットペプチドを結合した *Aspergillus* 由来 *AN-gdh-17* 遺伝子をコードする配列を含む遺伝子構築物、pCt-*AN-gdh*、pCt-d*AN-gdh*、pMt-d*AN-gdh* の構築手順およびそれらの構造を模式的に示したものである。

図5は、*AN-gdh-17* 遺伝子中のスプライシング領域を除去する手順の概略を示したものである。図中、太い線はスプライシング領域、P1~P4はPCRプライマーを表す。

図6は、*Aspergillus* 由来 *AN-gdh-17* 遺伝子配列へのトランジットペプチド配列

結合手順の概略を示したものである。図中Aはトランジットペプチドの塩基配列、Bは*AN-gdh-17*遺伝子の塩基配列を表す。P5～P8はそれぞれPCRプライマーを表す。

図7は、2A11プロモーターに接続された*Aspergillus nidulans*由来*AN-gdh-17*遺伝子を有する、遺伝子構築物p2Act-dAN-gdhおよびp2AMt-dAN-gdhの構造を模式的に示したものである。

図8は、トマト由来NAD-GDH遺伝子 (*T-gdh-4*)のTiプラスミッド (pIG121-Hm) へのクローニング手順を示したものである。図中、35SはCaMV 35Sプロモーター、NosはNos-ターミネーターを表す。

図9は、トマト由来NAD-GDH遺伝子、*T-gdh-4*の改変手順の概略を示したものである。

図10は、*Aspergillus nidulans*由来*AN-gdh-17*遺伝子を導入した形質転換体のPCR解析の結果を表す。レーン1:λ-HindIIIマーカー、レーン2、3:非形質転換トマト、レーン4～6:プラスミッド (pMAT037) 遺伝子を導入した形質転換トマト; レーン7～10: *AN-gdh-17*遺伝子を導入した形質転換トマト (No-6, No-8-2, No-15, No-17)、レーン11:100bpマーカー。

図11は、トマト由来NAD-GDH遺伝子GDH (*T-gdh-4*)遺伝子を導入した形質転換体のPCR解析の結果を表す。レーン1:λ-HindIIIマーカー、レーン2, 3:非形質転換トマト; レーン4～6:プラスミッド (pIG121-Hm) 遺伝子を導入した形質転換トマト; レーン7～10: *T-gdh-4*遺伝子を導入した形質転換トマト (No.2, No.7-2, No.9-2, No.10)、レーン11:100bpマーカー。

図12は、*Aspergillus nidulans*由来*AN-gdh-17*遺伝子を導入した形質転換体のRT-PCR分析の結果を表す。レーン1:100bpマーカー、レーン2:非形質転換トマト、レーン3および5:形質転換トマトNo.6、レーン4:形質転換トマトNo.15を表し、() 内は全RNAを抽出した組織を表す。

図13は、トマト由来 *T-gdh-4* 遺伝子を導入した形質転換体のRT-PCR分析の結果を表す。No. 2、No.7-2、No.9-2、No.10は形質転換トマトを表し、() 内は全RNAを抽出した組織を表す。

図14は、*AN-gdh-17* 遺伝子を導入した形質転換体 (No.6、No.15、 No.17) のアミノ酸 (グルタミン酸-Glu、グルタミン-Gln、 γ -アミノ酪酸-GABA、リジン-Lys) 含量を比較したグラフである。

図15は、*T-gdh-4* 遺伝子を導入した形質転換体 (No.2、No.7-2、No.9-2、No.10) のアミノ酸 (グルタミン酸-Glu、グルタミン-Gln、 γ -アミノ酪酸(GABA)、リジン-Lys) 含量を比較した結果である。

図16は、*AN-gdh-17* 遺伝子を導入した形質転換トマトの後代 (T_1) のサザン分析の結果を示したものである。全 DNA (15 μ g) を *Bam*HI および *Eco*RI で消化した (A)、または全 DNA (15 μ g) を *Xba*I で消化した (B) サンプルを使用した。レーン1：非形質転換トマト、レーン2：AN-gdh-17 No.1、レーン3：AN-gdh-17 No.3、レーン4：AN-gdh-17 No.15、レーン5：AN-gdh-17 No.2.1。

図17は、*T-gdh-4* 遺伝子を導入した形質転換トマト (T_1) のサザン分析の結果を表す。全DNA 15 μ g を *Xba*I および *Sac*I で消化したサンプルを使用した。レーン1：非形質転換トマト、レーン2：T-gdh No. 1-2、レーン3：T-gdh No.3-1、レーン4：T-gdh No. 8-1。矢印は導入遺伝子 (1.2kb) に対応するバンドの位置を示す。

図18は、*AN-gdh-17* 遺伝子を導入した形質転換トマトの後代 (T_1) における果実中のアミノ酸含量を比較したグラフである。対照は非形質転換トマトを使用した。測定は3個体ずつ行なった。

図19は、*T-gdh-4* 遺伝子を導入した形質転換トマトの後代 (T_1) における果実中のアミノ酸含量を比較したグラフである。対照は非形質転換トマトを使用した。測定は3個体ずつ行なった。

図20は、*Ct-AN-gdh* と *Mt-dAN-gdh* 遺伝子を導入したポテトのサザン分析の結果

を示したものである。全DNA (15 μ g) の *Eco*RI 消化物を使用した。レーン1：非形質転換ポテト-1、レーン2：非形質転換ポテト-2、レーン3～6はそれぞれの遺伝子構築物を導入した形質転換ポテトに対応する。レーン3：Ct-AN-gdh No. 1、レーン4：Mt-dAN-gdh No. 2、レーン5：Mt-dAN-gdh No. 5、レーン6：Mt-dAN-gdh No.8。矢印は導入遺伝子の断片(1.5kbp)に対応するバンドの位置を示す。

図21は、Ct-AN-gdhとMt-dAN-gdh遺伝子を導入したポテトのマイクロチューバー中のグルタミン酸 (Glu) 含量を示したグラフである。対照としては非形質転換ポテトを使用した。

図22は、Mt-dAN-gdh 遺伝子導入ポテトの地上部生重量を表すグラフである。

図23は、Mt-dAN-gdh 遺伝子導入ポテトの塊茎部総生重量を表すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

本発明は、植物における窒素代謝の遺伝子操作に関する。特に、本発明は、果実、塊茎、根菜類の根、種子など有用植物の可食部分の遊離アミノ酸、特にうま味成分であるグルタミン酸の高蓄積を図るために窒素同化および利用に関与する酵素の発現量を変化させることに関する。これらの酵素はその発現が増強され、あるいは修飾され、あるいは抑制され、所望の性質を有する植物が作製される。

本発明において使用される標的遺伝子は、アンモニアのアミノ酸への同化に係る酵素をコードする遺伝子である。標的遺伝子としては例えば、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (GDH) が挙げられる。この酵素はその発現が増進され、またそれ以外に修飾（例えばトランジット配列付加による異所性発現）されて所望の性質を有する植物が作製される。特に、GDHの発現をポテトにおいて増進または修飾（例えばトランジット配列付加による異所性発現）することにより、ポテトの収量を増加させることもできる。

操作は植物を本明細書に記載された核酸構築物で形質転換することにより行う

ことができる。形質転換された植物またはそれらの子孫は所望の改変された酵素を発現し、相当するmRNAの発現変化、窒素同化または利用能の変化、および／または植物の遊離アミノ酸含量増加についてスクリーニングされる。

簡単には本発明の方法は以下の手順を含み、また本発明のトランスジェニック植物はこのような方法によって作製されたトランスジェニック植物である：

- a) 目的とする遺伝子をクローニングするステップ；
- b) 得られた遺伝子を必要により適切なベクターへ再クローニングするステップ；
- c) 植物細胞へ上記ベクターを導入し、形質転換体を得るステップ；
- d) 得られた形質転換体を植物体へ再生させ栽培するステップ；

本発明の実施態様の一つにおいては、窒素同化または利用酵素をコードする1個または数個の遺伝子が強力な構成的プロモーター制御下に置かれ、植物体中で過剰発現される。このような発現の改変は、例えば、

- a) 酵素のコーディング配列が強力な構成プロモーターに機能し得る状態で結合されているトランスジーン、
- b) 所望の酵素をコードする、多コピー数の天然遺伝子、
- c) 窒素同化または利用のための目的遺伝子の発現を活性化する調節遺伝子、
- d) 発現を高めるように修飾され調節領域を有する1コピーの天然遺伝子、および、
- e) 変異型、改変型またはキメラ型の窒素同化または利用酵素を発現するトランスジーン、

の少なくとも1つを用いて植物を遺伝子操作することによって達成され得る。

本発明の別の実施態様においては、窒素同化または利用酵素の発現パターンが改変される。このような発現パターンの改変は、例えば、

- a) 酵素のコーディング配列が所望の発現パターンを有するプロモーター（例え

ば、器官特異的または生育ステージ特異的発現パターンを示すプロモーター)に機能し得る状態で結合されているトランスジーン、

b) 酵素をコードする遺伝子の好ましいパターンでの発現を活性化する修飾調節遺伝子、

c) 好ましいパターンで発現するように修飾された調節領域を有する、1コピーの天然遺伝子、

の少なくとも1つを用いて植物を遺伝子操作することによって達成され得る。

本発明のさらに別の実施態様においては、窒素同化または利用経路において改変された酵素または異なる型の酵素が発現される。この型の実施態様には、宿主植物の窒素同化または利用酵素の触媒作用とは異なる触媒作用を有する対応酵素をコードする、植物細胞中で発現可能な遺伝子構築物を作製し、これにより植物を遺伝子操作することが含まれる。このような手段をとることにより、増強された遊離アミノ酸を含有する植物が得られる。

また、このような植物を育成するために伝統的な作物育種法では大きな分離集団のスクリーニングを必要とし、多大の時間を要するところ、本発明によればこのような手段をとることによりこうしたことを回避することができる。

以下は本明細書において使用される用語および略語の定義である。

CaMV35S = カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター

NADP-GDH = NADP依存型グルタミン酸デヒドロゲナーゼ

NAD-GDH = NAD依存型グルタミン酸デヒドロゲナーゼ

遺伝子融合体 = 異種遺伝子が連結されたプロモーターを含む遺伝子構築物
(前記プロモーターは異種遺伝子の転写を調節する)

異種遺伝子 = 遺伝子構築において、異種遺伝子はその遺伝子が自然に連結されていないプロモーターに連結されていることを意味する。異種遺伝子は前記プロモーターを寄与する生物からのものであってもよく、またそうでなくてもよ

い。

GABA = γ -アミノ酪酸

本発明に使用できる酵素遺伝子は、細菌、酵母、藻類、動物および植物由来であってよく、これらに限定されず、様々な供給源から得ることができる。そのような供給源から得られた配列は植物細胞内で機能する適切なプロモーターと機能可能に連結させることができ、また宿主植物におけるそれらの翻訳効率を高めるため、あるいはコードされた酵素の触媒作用を変えるために *in vitro* 突然変異誘発または *de novo* 合成によって改変してもよい。これらの改変には基質および／または触媒作用に関与する残基の修飾が含まれるが、これらに限られない。さらに、導入遺伝子は発現される宿主あるいはオルガネラのコドン使用頻度に応じて最適なコドンをもつように改変してもよい。また、必要に応じてこれらの遺伝子配列に適切なトランジットペプチドをコードする核酸配列を連結してもよい。

好ましい改変には、ハイブリッド酵素の構築も含まれる。例えば、同一の、または異なる生物から得られた関連酵素の異なるドメインを組み合わせることで新規な性質を有する酵素が作製されることもある。

さらに、所望の活性を有する限り、上述した様々な核酸配列にストリンジेंटな条件でハイブリダイズする核酸断片も本発明に使用することができる。したがって、1以上のアミノ酸が欠失、付加、置換されたタンパク質をコードする核酸断片が含まれる。「ストリンジेंटな条件」とはSambrookら(1989、前述)に記載されているような、当業者によく知られた一般的な条件をいう。そのような条件でハイブリダイズする核酸配列は一般に60%、好ましくは80%、特に好ましくは90%以上のホモロジーを互いに有しているであろう。

本発明に使用できる窒素同化または利用酵素遺伝子には既に述べたような種々の遺伝子が含まれるが、グルタミン酸を蓄積させるために利用できる好ましい遺

伝子の一つの例としては、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ(GDH)遺伝子が挙げられる。GDH遺伝子が使用される場合はセンス方向で発現される。GDH遺伝子が選ばれる場合は、5'側にトランジットペプチドを結合した融合遺伝子として発現させるのが好ましく、特に好ましいトランジットペプチドはミトコンドリアへのトランジットペプチドおよびクロロプラストへのトランジットペプチドである。

本発明の好ましい実施態様の一つにおいては、カビ (*Aspergillus nidulans*) 由来のNADP依存型GDHA遺伝子 (Alastairら、1989、Mol. Gen. Genetics, 218, 105-111) または、トマト由来のNAD依存型GDH遺伝子 (Purnellら、1997, Gene 186; 249-254) をコードする配列に、機能的に連結された強力な構成的植物プロモーターであるカリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35Sプロモーターをコードする組換え構築物を用いて、トマト植物およびポテト植物を遺伝子工学的に操作した実施例により説明される。GDHを過剰発現する系統は、可食部部分において対照の非形質転換植物よりも遊離アミノ酸含量の増加、特にグルタミン酸含量の増加 (2～3倍) が見られる。

本発明に使用し得る核酸構築物は当業者に公知の方法を使用して作成し得る。例えば、構築物の成分を単離、特性決定、その操作および構築物それ自体を作るのに使用しうる組換えDNA法については、Sambrookら、Molecular cloning-Laboratory manual、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Pressのような出典を参考にし得る。所望の成分の塩基配列が知られているような場合には生物起源からそれを単離するのではなく合成することが有利である。この様な場合当業者はCaruthersら、1980, Nuc.Acids.Res.Symp.Ser.7:215-233及びChow及びKempe,1981, Nuc.Acids.Res. 9:2807-2817のような文献を参考にすることができる。その他の場合、所望の成分はポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 増幅により有利に生産しうる。PCR法については、当業者は、Gelfand, 1989, PCR技術、DNA増幅に関する原理及び応用、H.A.Erlich編集、ストックトンプレス,N.Y.、分子生物学における現行の

プロトコル、2巻、15章、Ausubelら編集、ジョンウイリイ&サンズ,1988を参考にし得る。

本発明に使用される遺伝子構築物は、一般に、目的遺伝子の他に植物細胞内で機能する適切なプロモーター、ノパリン合成酵素遺伝子ターミネーターのような適切なターミネーター、その他の発現制御に有用なエレメント、および、形質転換体を選抜するための適切なマーカー遺伝子、例えばカナマイシン耐性、G418耐性、ハイグロマイシン耐性などの薬剤耐性遺伝子を含んでいる。この構築物に含まれるプロモーターは構成的プロモーターであっても器官特異的若しくは生育特異的であってもよく、使用する宿主、遺伝子、必要とする発現量、発現させるべき器官、生育ステージ等に応じて選択することができる。

本発明によれば、窒素同化または利用酵素の過剰発現を示す植物は、所望の酵素をコードする配列に連結された植物プロモーターを含む遺伝子構築物で植物細胞を形質転換することにより作製することができる。本発明の好ましい実施態様において使用される関連プロモーターは強力かつ非器官特異的または非生育ステージ特異的プロモーター（例えば、多くまたは全ての組織中で強く発現するプロモーター）である。この様な強力な構成的プロモーターの例として、CaMV35Sプロモーターが挙げられる。

本発明の別の実施態様において、器官特異的または生育ステージ特異的プロモーターを所望の酵素をコードする配列に結合させた遺伝子構築物で植物を操作するのが有利なことがある。例えば、光合成組織及び器官中の発現が所望される場合は、リブローズビスフォスフェートカルボキシラーゼ(RuBisCO)遺伝子又は葉緑体a/b結合蛋白質(CAB)遺伝子のプロモーターが使用しうる。種子中の発現が所望される場合は、種々の種子貯蔵蛋白質遺伝子のプロモーターを使用することができ、果実中での発現が所望される場合は、果実特異的プロモーター（例えばトマトの2A11プロモーター）を使用することができ、塊茎中での発現が所望される場

合は、塊茎貯蔵蛋白質遺伝子のプロモーター（例えばポテトのパタチンプロモーター）を使用することができる。

本発明の更に別の実施態様において、誘導プロモーターを所望の酵素をコードする配列に結合させた遺伝子構築物で植物を形質転換する事が有利であり得る。この様なプロモーターの例は多岐にわたる。例えば、熱ショック遺伝子、防御応答遺伝子（例：フェニルアラニンアンモニアリアーゼ遺伝子）、傷害応答遺伝子（例：ヒドロキシプロリンに富む細胞壁蛋白質遺伝子）、化学誘導遺伝子（例：ニトレート還元酵素遺伝子、キチナーゼ遺伝子）、暗所誘導遺伝子（例：アスパラギンシンテターゼ遺伝子（CoruzziおよびTsai、米国特許第US5,256,558号）が挙げられるがこれらに限定されない。

本発明の組換え核酸構築物は、その構築物の伝達追跡のための選択可能なマーカーを含んでもよい。例えば、細菌中で伝達される構築物は抗生物質耐性遺伝子、例えばカナマイシン、テトラサイクリン、ストレプトマイシン、またはクロラムフェニコールに対する耐性を与える遺伝子を含むことが好ましい。構築物を伝達するのに適したベクターとして、プラスミッド、コスミド、バクテリオファージまたはウイルスが挙げられる。加えて、組換え構築物は、これらの構築物により形質転換された植物細胞の単離、同定または追跡のための植物発現性の選択可能なマーカー遺伝子又はスクリーニング可能なマーカー遺伝子を含んでも良い。選択可能なマーカーとして、抗生物質耐性（例えば、カナマイシンまたはハイグロマイシンに対する耐性）、または除草剤耐性（例えば、スルフォニル尿素、フオスフィノスリシン、またはグリフォセートに対する耐性）を与える遺伝子が挙げられるが、これらに限定されない。スクリーニング可能なマーカーとして、 β -グルクロニダーゼをコードする遺伝子（Jefferson, 1987, Plant Mol. Biol. Rep 5:387-405）、ルシフェラーゼをコードする遺伝子（Owら、1986, Science 234:856-859）、アントシアニン色素産生を調節するB及びC1遺伝子産物（Goffら、1

990, EMBO J, 9:2517-2522)が挙げられるがこれらに限定はされない。

本発明に使用できる遺伝子導入法は特に限定されず、植物細胞あるいは植物体への遺伝子導入法として当業者に知られるいずれの方法を使用してもよい。例えば、本発明の実施態様の一つにおいて、アグロバクテリウムが遺伝子構築物を植物に導入するのに用いられる。この様な形質転換は2成分アグロバクテリウムT-DNAベクター (Bevan, 1984, Nuc. acid Res. 12:8711-8721)、および同時培養操作 (Horschら、1985, Science, 227:1229-1231) を使用することが望ましい。一般に、アグロバクテリウム形質転換系が双子葉植物を操作するのに使用される (Bevansら、1982, Ann. Rev. Genet., 16 :357-384; Rogersら、1986, Methods Enzymol., 118:627-641)。アグロバクテリウム形質転換系はまた単子葉植物および植物細胞を形質転換するのに使用することもできる (Hernalsteenら、1984, EMBO J., 3:3039-3041; Hoykass-Van Slogterenら、1984, Nature, 311:763-764; Grimsleyら、1987, Nature, 325 :167-1679; Boultonら、1989, Plant Mol. Biol., 12:31-40; Gouldら、1991, Plant Physiol., 95: 426-434)。植物を形質転換するためにアグロバクテリウム系を利用する場合は、組換えDNA構築物は植物細胞に導入すべきDNA配列に隣接する位置に、T-DNA領域の少なくとも右ボーダー配列を更に含む。好ましい実施態様においては、移入される配列は左右のT-DNAボーダー配列の間に挿入される。この様なT-DNAをベースとする形質転換ベクターの適切な設計及び構築は当業者に公知である。

別の実施態様において、組換え核酸構築物を植物および植物細胞に導入する為の種々の別法を使用することができる。別の遺伝子導入法および形質転換方法として、裸のDNAの、カルシウム、ポリエチレングリコール(PEG)またはエレクトロポレーション介在性取り込みによるプロトプラスト形質転換 (Paszkowskiら、1984, EMBO J., 3:2717-2722 ; Potrykusら、1985, Mol. Gen. Genet., 199:169-177; Frommら、1985, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 82:5824-5828 ; Shimamotoら、

1989, Nature, 338:274-276)が挙げられる。本発明によれば、多種の植物及び植物細胞系が本発明の核酸構築物および上記の形質転換方法を使用して本明細書に記載された所望の生理学的特性につき操作しうる。これらの方法は、標的が単子葉植物または植物細胞である場合に特に有益である。好ましい実施態様において、操作のための標的植物および植物細胞として、トマト、ポテト、ビート、ダイズ、アラビドプシス、トウモロコシ、小麦、イネ、サトウキビ等が挙げられるが、これらに限定されない。

本発明によれば、本明細書に開示されたような遺伝子構築物を、プロトプラスト、組織培養細胞、組織及び器官外殖体、花粉、胚ならびに植物全体を含むがこれらに限定されない種々の植物細胞型に導入および操作することにより所望の植物が得られる。本発明の実施態様において、操作された植物体は下記のアプローチおよび方法に従って形質転換体につき選択又はスクリーニングされる。次に単離された形質転換体を植物個体に再生させてもよい。植物細胞、組織または器官から植物個体に再生するための方法は、多くの植物種において当業者に公知である。

形質転換された植物細胞、カルス、組織または植物は、形質転換に用いた遺伝子構築物に存在するマーカー遺伝子によりコードされた形質につき選択又はスクリーニングする事により同定され、単離することができる。例えば、形質転換遺伝子構築物が耐性を与えるような抑制量の抗生物質または除草剤を含む培地で操作された植物体を生育させることにより、選択を行うことができる。更に形質転換された植物細胞および植物は、本発明の組換え核酸構築物に存在しうる可視のマーカー遺伝子（例えば、 β -グルクロニダーゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、B遺伝子またはC1遺伝子）の活性につきスクリーニングする事により同定しうる。このような選択方法およびスクリーニング方法は当業者に公知である。

また、本発明の遺伝子構築物を含む植物または植物細胞形質転換体を同定する

ために物理的方法および生化学的方法が使用しうる。そのような方法として、

- 1) 組換えDNAインサートの構造を検出および測定するためのサザン分析またはPCR増幅；
- 2) 遺伝子構築物のRNA転写産物を検出および測定するためのノーザンブロット、S1RNase保護、プライマー伸長PCR増幅または逆転写酵素PCR (RT-PCR)増幅；
- 3) 遺伝子構築産物が蛋白質である場合は、蛋白質ゲル電気泳動、ウエスタンブロット、免疫沈殿、またはエンザイムイムノアッセイが挙げられるが、これらに限定されない。これらのアッセイ方法は全て当業者に公知である。

本発明によれば、改良された成分特性を有する植物を得るため、形質転換された植物を所望の生理学的変化に関してスクリーニングしてよい。例えば、GDH酵素の過剰発現に関して操作した場合、形質転換された植物は、所望のレベルで所望の組織および生育段階でGDH酵素を発現する植物について試験されるであろう。次に、所望の生理学的変化、例えば、GDH遺伝子の過剰発現を示す植物を、所望の成分変化について引き続きスクリーニングすることができる。

本発明によれば、窒素同化プロセスまたは利用プロセスの変化で操作された植物は、改良された成分特性、すなわち、遊離アミノ酸高含有、特にグルタミン酸、アスパラギン、アスパラギン酸、セリン、スレオニン、アラニン、ヒスチジン、とりわけうま味成分であるグルタミン酸高含有を示しうる。このような改良された特性を有する操作された植物および植物系統は、植物の遊離アミノ酸含量を測定する事により同定しうる。この分析のための操作および方法は当業者に公知である。また、本発明によればポテトの収量を増加させることができる。このような改良された特性を有するポテトは、単に栽培して、その塊茎数、塊茎部の総重量等を測定することによって同定することができる。

本発明によって得られる植物は、遊離アミノ酸含量において対照植物（非形質転換植物）に対して増加した植物である。非形質転換植物とは、本発明においてG

GDHを発現し得る遺伝子構築物で形質転換する前の植物である。好ましい実施態様において、所望の植物は、その果実、塊茎、根、種子等の可食部分での遊離アミノ酸含量、とりわけうま味成分であるグルタミン酸含量が2倍以上の増加を示し、全アミノ酸量も2～4倍に増加する。グルタミン酸以外のアミノ酸については、特に、アスパラギン酸、アスパラギン、アラニン、セリン、スレオニンおよびヒスチジンの増加が著しい。

また、本発明によって得られるポテトは、その収量において、対照植物（非形質転換植物）に対して増加した植物である。非形質転換植物とは、本発明においてGDHを発現し得る遺伝子構築物で形質転換する前の植物である。好ましい実施態様において、本発明によれば、非形質転換植物に対して、塊茎部総重量(g)について、統計的に有意に増加し、一般に約1.5以上、好ましくは2倍以上に増加し、また塊茎数についても増加する。

実施例

本発明は、NADP-GDH遺伝子またはNAD-GDH遺伝子の過剰発現につき操作された植物の作製に関する以下の実施例により具体的かつ詳細に説明される。

実施例1: *Aspergillus nidulans*およびトマトのGDH遺伝子の単離とTiプラスミッドの構築

(1) *Aspergillus nidulans*由来NADP依存型GDH遺伝子(*AN-gdh-17*)およびトマト由来NAD依存型GDH遺伝子(*T-gdh-4*)の単離

*A. nidulans*をポテトデキストロース寒天培地にまき、一晚30℃で培養し、さらに得られたコロニーをデキストロース液体培地で2日間培養した。増殖した菌よりTotal RNAを調製した。

70%エタノール(30秒)、2%次亜塩素酸ナトリウム(15分)を用いて表面殺菌

したトマト種子を植物ホルモンを含まないMS 寒天培地 (Murashigeおよび Skoog, 1962, *Physiol. Plant.* 15: 473-479) に植え、16時間日長、25°Cで1週間培養し、無菌植物を得た。得られた幼植物の根よりTotal RNAを調製した。

Total RNAはPoly (A) Quick mRNA Isolation Kit (Stratagene社)を用いてmRNAを精製した後、First-Strand cDNA Synthesis Kit (Amersham Pharmacia Biotech 社) を用いてFirst-Strand cDNAを作成した。作成したFirst-Strand cDNAをテンプレートに用いてPCR反応を行ったPCR反応条件は94°C-3分 ; 94°C-45秒、59°C-30秒、72°C-90秒、35サイクル ; 72°C-10分とし、パーキンエルマー社のPCR system 2400を用いて行った。用いたプライマーを表-1 に示した。その結果、*A. nidulans*由来の約1.4 kbpのバンド、およびトマト由来の約1.2kbのバンドが増幅され、それぞれ予測される目的遺伝子サイズと一致した。得られたPCR産物はTA-Cloning Kit (Invitrogen 社)を用いてクローニングした。

*A. nidulans*由来の目的サイズの遺伝子がクローニングできたプラスミッド2クローンおよびトマトの根由来の目的サイズの遺伝子がクローニングできたプラスミッド5クロンの配列をシークエンサー (ABI社377A) を用いて決定し、既知の*A. nidulans* 由来NADP依存型GDH遺伝子 (Alastair ら、1989、*Mol. Gen. Genet.*, 218; 105-111) およびトマト由来GDH遺伝子 (Purnellら、1997, *Gene* 186; 249-254) との相同性について調査した。

*A. nidulans*由来の2クローン中1クローン(*AN-gdh-17*)の塩基配列が既知のNADP-GDHA遺伝子配列と一致した (図1,2)。しかし、その遺伝子には2箇所存在するスプライシングサイトのうち、約50bpのスプライシングサイトが1つ残存していることが分かった。*A. nidulans*は真核生物型のスプライシングサイト認識部位を持つため、本実験では残存するスプライシングサイトを残したまま次の操作に入ることにした。一方、トマトの根由来の5クローン中、2クローン(*T-gdh-4* , *T-gdh-22*)の塩基配列が既知の*legdh1*配列と一致した。*AN-gdh-17*の塩基配列を配列表の

配列番号 1 に、*T-gdh-4* の塩基配列を配列表の配列番号 2 に示した。

表 1. PCR反応に用いたPrimer DNA

a.	5' 側	5' -TCT AGA ATG TCT AAC CTT CCC GTT GAG C- 3' (28 mer)	(配列番号 3)
	3' 側	5' -GAG CTC TCA CCA CCA GTC ACC CTG GTC C- 3' (28 mer)	(配列番号 4)
b.	5' 側	5' -TCT AGA ATG AAT GCT TTA GCA GCA ACT- 3' (27 mer)	(配列番号 5)
	3' 側	5' -GAG CTC TTA CGC CTC CCA TCC TCG AAG-3' (27mer)	(配列番号 6)

a. NADP-GDH遺伝子特異的プライマー (Alastairら、1989, Mol. Gen. Genet, 218; 105-111, PCR産物、約1.4 kbp)

b. *legdh1*特異的プライマー (Purnellら、1997, Gene 186; 249-254, PCR産物、約1.2 kbp)

<配列表フリーテキスト>

配列番号 3 および 4 : *NADP-GDH*特異的PCRプライマー

配列番号 5 および 6 : *legdh1*特異的PCRプライマー

(2) *AN-gdh-17*遺伝子の Tiプラスミッド(pMAT037)へのサブクローニング

PCR2.1ベクターにクローニングした*AN-gdh-17*遺伝子を、植物形質転換用ベクターである、Tiプラスミッド (pMAT037) (Matsuoka および Nakamura, 1991, Proc Natl. Acad Sci USA 88: 834-838) にサブクローニングした。直接挿入するの適切な制限酵素サイトがpMAT037に無いため、一度pUC18につなぎ (*Xba*I,

*Eco*RIサイト使用)、*E. coli* JM109を形質転換した。さらにpUC18中の*Pst*Iサイトと*Eco*RIサイトを用いてTiプラスミッドへ連結しプラスミッドpAN-gdh-17を得 (図3、表2) *E. coli* DH5αにトランスフォーメーションした。*AN-gdh-17*を導

入したTiプラスミッドpAN-gdh-17 (図3)でアグロバクテリウム株 EHA101を形質転換し、得られたアグロバクテリウムをトマトに感染させるために用いた。

(3) pCt-AN-gdh、pCt-dAN-gdh、pMt-dAN-gdhの構築

Aspergillus nidurans 由来NADP-GDHA遺伝子には本来、スプライシングサイトが2箇所存在する。cDNAを用いてPCR法によりGDH遺伝子の増幅を行ったので、これらのスプライシングサイトは除かれ、存在しないはずであるが、本実験で取得したAN-gdh-17遺伝子には、約50bpのスプライシングサイトが1箇所残ったままであった(図1、塩基配列中に記載)。そこでPCR法を用いて、残ったままであった約50bpの塩基配列を取り除いた(表2、図4、5)。

これらの遺伝子構築物の構築手順の概略は図5に示した通りである。すなわち、最初に、クローニングされた上記遺伝子配列の5'端を含むプライマーP1およびスプライシング領域の5'側と3'側を含むがスプライシング領域を含まないプライマーP2、およびスプライシング領域の5'側と3'側を含むがスプライシング領域を含まないプライマーP3とAN-gdh-17遺伝子の3'端を含むプライマーP4を用いて、それぞれAN-gdh-17遺伝子を鋳型としてPCRによってDNA断片を増幅した。次に、電気泳動によりPCR産物のサイズの確認およびゲルからの再抽出を行った。それぞれの再抽出PCR産物を混合し、プライマーP1およびP4を用いて再度PCR反応を行った。得られたPCR産物をクローニングし、シーケンシングを行い、スプライシング領域が正しく除去されていることを確認した。

上述のP1～P4の配列を以下に示す。

P1; 5' -TCTAGAATGTCTAACCTTCCCGTTGAGC-3' (配列番号7)

P2; 5' -CACCCATGTTTAGTCCTGTGAGAG-3' (配列番号8)

P3; 5' -CTCTCACAGGACTAAACATGGGTG-3' (配列番号9)

P4; 5'-GAGCTCTCACCACCAGTCACCCTGGTCC-3' (配列番号10)

これらの操作により、スプライシングサイトを除去した *dAN-gdh-17* 遺伝子を得た (表2、図4、5)。

更に導入遺伝子を適所でより機能的に働かせるために、ミトコンドリアまたはクロロプラストへのトランジットペプチド配列を *AN-gdh-17* 遺伝子又は *dAN-gdh-17* 遺伝子の開始コドンの上流側に連結させた (表2、図4)。用いたペプチド配列はミトコンドリアへのトランジットペプチド配列としてトマト由来GDH遺伝子に付加している約70bpからなる塩基配列を、クロロプラストへのトランジットペプチド配列として、トマト由来RuBisCOの小サブユニット遺伝子に付加している約120bpからなる塩基配列を用いた。また、これらの遺伝子と *AN-gdh-17* 遺伝子又は *dAN-gdh-17* 遺伝子の連結はPCR法を用いて行った。ミトコンドリアへのトランジットペプチド配列は、2種のプライマー (5'-GGATCCATGAATGCTTTAGCAGCAAC-3' : 配列番号11、5'-TCTAGATAAACCAAGAAGCCTAGCTG-3' : 配列番号12) を使用しPCRによって得た。クロロプラストへのトランジットペプチド配列は、2種のプライマー (5'-CTGCAGATGGCTTCCTCAATTGTCTCATCG-3' : 配列番号13、5'-TCTAGAGCATCTAACGCGTCCACCATGCT-3' : 配列番号14) を使用しPCRによって得た。

これらのトランジットペプチド配列の *AN-gdh-17* 遺伝子又は *dAN-gdh-17* 遺伝子への結合は図6に示したように行った。すなわち、トランジットペプチドの5'側に対応するプライマーP5とトランジットペプチドの3'端および *AN-gdh-17* 遺伝子又は *dAN-gdh-17* 遺伝子の5'端の配列を含むプライマーP6、およびトランジットペプチドの3'端および *AN-gdh-17* 遺伝子または *dAN-gdh-17* 遺伝子の5'端の配列を含むプライマーP7および *AN-gdh-17* 遺伝子または *dAN-gdh-17* 遺伝子の3'端配列を含むプライマーP8を用いてそれぞれのDNA断片を増幅後、電気泳動によりPCR産物のサイズの確認およびゲルからの抽出を行った。抽出したそれぞれの断片を混合し、

プライマーP5とP8を用いて再度PCRを行った。増幅された断片をクローニングしシーケンシングを行い、トランジットペプチドの塩基配列が*AN-gdh-17*遺伝子または*dAN-gdh-17*遺伝子に正しく付加されていることを確認した（図6）。

ここで、P5からP8の配列は以下に対応する。

ミトコンドリアへのトランジットペプチド配列との連結の際に用いたプライマーの場合は

P5; 5'-TCTAGAATGAATGCTTTAGCAGCAAC-3' (配列番号15)

P6; 5'-GGGAAGGTTAGACATTAAACCAAGAAGCCT-3' (配列番号16)

P7; 5'-AGGCTTCTTGGTTTAATGTCTAACCTTCCC-3' (配列番号17)

P8; 5'-GAGCTCTTACGCCTCCCATCCTCGAA-3' (配列番号18)

であり、

クロロプラストへのトランジットペプチド配列との連結の際用いたプライマーの場合は

P5; 5'-CTGCAGATGGCTTCCTCAATTGTCTCATCG-3' (配列番号19)

P6; 5'-AAGGTTAGACATGCATCTACCGCG-3' (配列番号20)

P7; 5'-CGCGTTAGATGCATGTCTAACCTT-3' (配列番号21)

P8; 5'-GAGCTCTTACGCCTCCCATCCTCGAA-3' (配列番号22)

である。

ここで、*AN-gdh-17*遺伝子はTiプラスミッドpMAT037のマルチクローニングサイトにセンス方向に導入したが（図3）、pCt-*AN-gdh*、pCt-*dAN-gdh*、pMt-*dAN-gdh*の構築に際してはCaMV35Sプロモーターを用いた場合と後述する果実特異的プロモーター遺伝子（2A11）を用いた場合との導入遺伝子の効果を比較するためTi

プラスミッドpIG121-Hmを用いてクローニングを行い、遺伝子導入を行った（表2、図4）。

<配列表フリーテキスト>

配列番号7～10：スプライシング領域除去のためのPCRプライマー

配列番号11および12：ミトコンドリアへのトランジットペプチドをコードする配列増幅用のPCRプライマー

配列番号13および14：クロロプラストへのトランジットペプチドをコードする配列増幅用のPCRプライマー

配列番号15～18：ミトコンドリアトランジットペプチド-GDHをコードする配列の作製のためのPCRプライマー

配列番号19～22：クロロプラストトランジットペプチド-GDHをコードする配列の作製のためのPCRプライマー

（4）果実特異的プロモーター（2A11プロモーター）を用いた遺伝子構築

果実特異的発現プロモーター(2A11)はトマトの幼植物より調製したTotal DNAをテンプレートに用いて、PCR法により取得した。用いたプライマー（配列番号23および配列番号24）にはTiプラスミッドに導入する際に用いる制限酵素サイト、*Hind*IIIおよび*Xba*Iの配列を各々のプライマーに設計した。

プライマーの配列を以下に示す：

5'-AAGCTTATATAACCCAAAATATACTA-3'（配列番号23）

5'-TCTAGAGGTACCATTAATTGCTAATT-3'（配列番号24）

得られたPCR産物はTAクローニングキットを用いてクローニングした後、シーケンス分析によって塩基配列の確認を行った。得られた2A11プロモーターは上記、制限酵素*Hind*IIIおよび*Xba*Iを用いてTiプラスミッドpIG121-HmのGUS遺伝子前のCaMV35Sプロモーターと置換した。その後、GUS部分と*Ct-dAN-gdh*遺伝子または*Mt-*

*dAN-gdh*遺伝子との置換を行った。*Ct-dAN-gdh*遺伝子または*Mt-dAN-gdh*遺伝子の置換手順についてはCaMV 35Sプロモーターを用いた場合と同様である。これにより、プラスミッドp2Act-dAN-gdhおよびp2AMt-dAN-gdhを得た（図7）。

<配列表フリーテキスト>

配列番号23および24：2A11プロモーター配列増幅用PCRプライマー

上述した手順により作製したプラスミッドの重要な構造を以下の表2にまとめた。

表2. トランスジェニックトマトに導入したNADP-GDH構築体

構築体	遺伝子本体 (NADP-GDH)		トランジットペプチド			プロモーター	
	スプライシング		無し	葉緑体	ミトコン ドリア	35S	2A11
	有り	無し					
pAN-gdh-17(図3)	○		○			○	
pCt-AN-gdh (図4)	○			○		○	
pCt-dAN-gdh (図4)		○		○		○	
pMt-dAN-gdh (図4)		○			○	○	
p2Act-dAN-gdh (図7)		○		○			○
p2AMt-dAN-gdh (図7)		○			○		○

(5) *T-gdh-4*遺伝子のTiプラスミッド (pIG121-Hm)へのサブクローニング

クローニングしたトマト由来GDH遺伝子 (*T-gdh-4*) をTiプラスミッド (pIG121-Hm)に導入しプラスミッドpT-gdh-4を得た。導入に際しては、単離の際に使用したプライマーに予め設けておいた*Xba*Iサイトおよび*Sac*Iサイトを用いた。*T-gdh-*

4遺伝子を導入したTiプラスミッド(図8)は、アグロバクテリウム株 EHA101に形質転換した。

(6) 変異型トマトGDH遺伝子のTiプラスミッド (pIG121-Hm) へのサブクローニング

トマト由来NAD-GDHにおいて、グルタミン酸結合部位の90番目のアミノ酸リジンをアラニンに置換し、その効果について調査した(図9)。これは、高等植物のGDH遺伝子がアンモニアイオン濃度や栄養条件によって、グルタミン酸を減少させる方向に働く可能性が有るため、グルタミン酸と結合できなくすることを目的とした改変である。1アミノ酸の置換はPCRを利用した部位特異的変異導入により、LysをコードするAAGをAlaをコードするGCGに変換することによって行った。得られた改変遺伝子を*Td-gdh*と命名した。次に、*Td-gdh*遺伝子配列をTiプラスミッドへ導入してプラスミッドp*Td-gdh*を得た(図9)。この手順は*T-dgh-4*遺伝子の場合と同様である。

実施例2. トマト形質転換体の作出と解析

(1) 形質転換体の作出

トマト(栽培品種、ミニトマト(株)福花園種苗)の種子を70%エタノール(30秒)、2%次亜塩素酸ナトリウム(15分)を用いて表面殺菌した後、植物ホルモンを含まないMS寒天培地に置床し、16時間日長、25℃で1週間培養した。得られた無菌幼植物より子葉を切り取り、2 mg/l ゼアチンと0.1 mg/l インドール酢酸を加えたMS寒天培地(再分化培地、9cmシャーレ使用)に置床し2日間同条件で培養した。構築した遺伝子を含むアグロバクテリウム(EHA101)はYEP培地(表-3)で一晩培養したものを感染に用いた。2日間培養した子葉を滅菌シャーレに集めアグロバクテリウム液を加え感染させた。滅菌したろ紙を用いて余分なアグロバクテリウム液

を子葉から取り除き、さらに、アグロバクテリウムの急激な増殖を防ぐため、先に用いたシャーレ培地に滅菌ろ紙を敷き、その上に感染させた子葉を乗せ、24時間共存培養した。

その後、子葉を50 mg/l カナマイシン、500 mg/l クラフォランを含むMS再分化培地（選抜培地）に移し、形質転換体の選抜を行った。再分化したシュートを新しい選抜培地に移し再選抜を行った。緑色で旺盛に生育したシュートを茎の部分で切り取り、植物ホルモンを含まないMS培地（発根培地、試験管）に移した。発根した再分化植物を順次土壤に馴化させた。

表3. YEP培地組成

YEP培地の組成	(1リットル)
・バクトトリプトン	10 g
・Yeast Extract	10 g
・グルコース	1 g

(2) 導入遺伝子の確認

AN-gdh-17 遺伝子を含むアグロバクテリウムを感染させて得られた選抜個体4個体、*T-gdh-4* 遺伝子を含むアグロバクテリウムを感染させて得られた選抜個体4個体、目的遺伝子を含まないTiプラスミッドのみのアグロバクテリウムを感染させて得られた植物各々3個体、およびアグロバクテリウムで処理せずに子葉より直接再分化させた植物体2個体からそれぞれTotal DNAを本田らの方法に従い抽出した (Honda および Hirai、1990、Jpn J Breed 40, 339-348)。抽出したDNAはRNAase処理、フェノール/クロロホルム処理、さらにPEG沈殿させ精製した。0.01 μ g/ μ lになるように希釈し、PCR用のテンプレートとした。PCRはNos-PromoterからNPTIIの領域を増幅するプライマーP9およびP10 (PCR産物、1.0kbp) を用い

て行なった。反応条件は、94°C-1分、55°C-1分、72°C-2分、35サイクルで行った。PCR産物は1%アガロースゲルを用いて電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色した（図10および11）。

使用したプライマーは以下の通りである。

P 9 : 5'-CCCCTCGGTATCCAATTAGAG-3' （配列番号 2 5）

P 10 : 5'-CGGGGGGTGGGCGAAGAACTCCAG-3' （配列番号 2 6）

その結果、*AN-gdh-17*遺伝子を感染させた4系統および、*T-gdh-4*遺伝子を感染させた4系統に目的サイズのバンド(1.0kb)が観察され、非形質転換体2系統には検出されなかった。以上の結果から、*AN-gdh-17*遺伝子を含むTiプラスミッドを用いて感染させた4系統および*T-gdh-4*遺伝子を含むTiプラスミッドを用いて感染させた4系統に各々の遺伝子が導入されていることが確認された。

<配列表フリーテキスト>

配列番号25、26 : Nos-Promoter-NPTII領域増幅用PCRプライマー

(3)導入遺伝子の発現の確認

次に、目的の遺伝子が導入されたことが確認できた形質転換トマトにつき、導入遺伝子が発現されていることをRT-PCRによって確認した。*AN-gdh-17*または*T-gdh-4*遺伝子を含むアグロバクテリウムを感染させ、PCR分析によって遺伝子導入が確認された系統、および非形質転換トマトの葉または果実から全RNAを抽出し、DNase処理後、First-Strand cDNAを作製した。次にFirst-Strand cDNAをテンプレートとして各々の遺伝子を単離する際に用いたプライマー（配列番号3と4、及び5と6）を用いてPCRを行なった。反応条件は94°C-1分、55°C-1分、72°C-2分、30サイクルとした。その結果、それぞれにおいて、導入した遺伝子が葉および果

実のいずれにおいても発現していることが確認された（図12、13）。

（4）遊離アミノ酸の抽出と定量

馴化させた形質転換トマトの開花後6週目の果実を収穫し、 -80°C に保存した。果実は約1/6にカットし、重さを測定した後、乳鉢に入れ液体窒素で凍らせすりつぶした。さらに3mlの80%エタノールを加え、丁寧にすりつぶした後、遠心チューブに移し、 80°C で20分間インキュベートした。10,000rpmで20分間遠心し、上澄を新しいチューブに移し、残ったペレットに2mlの80%エタノールを加え、再度乳鉢ですりつぶし、 80°C で20分間インキュベートした。遠心後、上澄をチューブに移し、先の上澄と併せ、80%エタノールを用いて総量を5mlに調製した。良く混合した後、200 μl 取り乾燥させた後、0.02N塩酸に溶解した。0.45 μm のフィルターでろ過し、分析用サンプルとした。アミノ酸分析は日立高速アミノ酸分析計（L-8800）を用いて行った。

*AN-gdh-17*遺伝子を導入した株の開花後6週間目の果実（赤色）を用いてアミノ酸分析を行った結果を非形質転換体植物（対照植物）の分析結果とともに表4に示した。顕著なグルタミン酸含量の増加が見られた系統においては、No.6で1.75倍、No.15で2.54倍、No.17で2.48倍グルタミン酸含量が増加した（図14）。グルタミン酸以外のアミノ酸、例えば、アスパラギン、アスパラギン酸、アラニン、セリン、スレオニン、ヒスチジン等の増加も見られた。

表4. *AN-gdh-17*遺伝子を導入した形質転換トマト(T_0 世代)の果実中のアミノ酸含量.

	Asp	Thr	Ser	Asn	Glu	Gln	Gly	Ala	GABA	His	Total
<u>非形質転換トマト</u>											
対照-1	1.31	0.10	0.14	0.26	8.88	0.68	0.02	0.30	0.45	0.13	12.77
対照-2	1.04	0.07	0.14	0.21	8.48	0.39	0.02	0.22	0.45	0.13	11.90
<u>プラスミッド(pMAT037)のみ導入</u>											
pMAT-1	1.33	0.14	0.32	0.23	6.00	0.70	0.04	0.66	0.14	0.17	10.31
pMAT-2	2.00	0.20	0.37	0.23	11.18	0.50	0.06	0.83	0.62	0.25	17.09
pMAT-3	1.28	0.22	0.44	0.37	3.27	0.85	0.14	0.13	0.22	0.25	12.22
<u><i>AN-gdh-17</i>遺伝子を導入した形質転換体</u>											
No. 6	1.37	0.29	0.70	0.42	15.16	0.65	0.15	1.59	0.46	0.39	22.86
No. 8-2	2.66	0.18	0.51	0.27	13.97	0.65	0.07	1.19	0.27	0.32	20.82
No. 15	5.51	0.43	0.94	1.18	22.08	4.29	0.16	2.53	1.98	0.53	41.42
No. 17	3.19	0.24	0.69	0.38	21.55	0.67	0.12	1.75	0.82	0.37	30.70

(単位: μ mol/g F.W.)

トマト由来の *T-gdh-4* 遺伝子を導入した 4 株についても同じく開花後 6 週間目の果実を用いてアミノ酸分析を行った (表 5)。顕著なグルタミン酸含量の増加が見られた系統においては、No. 2 で 2.28 倍、No. 7-2 で 3.52 倍、No. 9-2 で 2.74 倍、No. 10 で 2.53 倍グルタミン酸含量が増加した (図 15)。グルタミン酸含量が高かった系統においては、他のアミノ酸、例えば、アスパラギン酸、アスパラギン、スレオニン、セリン、アラニン、ヒスチジンの含量も高く、Total アミノ酸含量において、No. 7-2 は 4 倍も増加していることが分かった。これらの結果を以下の表 5 にまとめた。

表5. *T-gdh-4*遺伝子を導入した形質転換トマト(T_0 世代)の果実中のアミノ酸含量.

	Asp	Thr	Ser	Asn	Glu	Gln	Gly	Ala	GABA	His	Total
<u>非形質転換トマト</u>											
対照-1	1.31	0.10	0.14	0.26	8.88	0.68	0.02	0.30	0.45	0.13	12.77
対照-2	1.04	0.07	0.14	0.21	8.48	0.39	0.02	0.22	0.45	0.13	11.90
<u>プラスミッド(pIG121-Hm)のみ導入</u>											
pIG-1	2.13	0.20	0.37	0.36	9.40	1.07	0.07	1.02	0.33	0.26	16.08
pIG-2	1.03	0.12	0.27	0.16	6.59	0.30	0.07	0.68	0.23	0.15	10.10
pIG-3	0.67	0.07	0.21	0.20	3.64	0.15	0.03	0.35	0.14	0.26	5.89
<u><i>T-gdh-4</i>遺伝子を導入した形質転換体</u>											
No. 2	4.01	0.27	0.49	0.64	19.76	0.75	0.08	1.09	0.59	0.37	28.93
No. 7-2	6.21	0.55	0.56	0.91	30.56	4.71	0.08	0.80	3.20	0.74	50.15
No. 9-2	4.27	0.69	1.15	1.14	23.81	3.97	0.23	2.25	1.04	0.70	42.17
No. 10	6.78	0.37	0.87	0.62	21.96	1.21	0.15	1.83	2.41	0.63	38.03

(単位: μ mol/g F.W.)実施例3. トマト形質転換体後代 (T_1) 世代の解析(1) T_1 世代の選抜

実施例2で選抜したトマト形質転換植物(T_0 世代)および、同様にして得られたトマト形質転換植物(T_0 世代)のいくつかの系統より得られた種子を、80%エタノールで30秒、2%次亜塩素酸ナトリウムで15分間表面殺菌した後、カナマイシン350 mg/lを含むMS寒天培地に無菌播種した。1ヵ月後、生育の良い植物を選抜した結果、*AN-gdh-17*遺伝子導入系統では、No. 1、No. 3、No. 15、No.2.1から選抜

個体が得られた。*T-gdh-4*遺伝子導入系統では、No.1、No. 3、No.8から選抜個体
が得られた。株当たりの果実数を増加させるため、屋外の閉鎖系温室で栽培を行
った。栄養条件を同じにするため、馴化時に1kgの培養土(パワーソイル、サカタ
のタネ)に移植した後は、追肥を行わなかった。また、同化能を同一にするために
以下の分析では葉を摘み取らず、腋芽を同一条件で栽培し、その葉組織を用いた。

(2) サザン分析による導入遺伝子の確認

馴化させた植物の腋芽の葉組織より全 DNAを抽出した (Honda and Hirai 1990,
Jpn J Breed 40, 339-348)。15 μ gのDNAを制限酵素*Bam*HIと*Eco*RIの組み合わせ
と*Xba*Iで処理し、電気泳動後、ナイロンメンブランにトランスファーした。DIG-
Labeling and Detection Kit (Roche Molecular Biochemicals)を用いて、*AN-gdh*
*h-17*遺伝子または*T-gdh-4*遺伝子をプローブにし、サザンハイブリダイゼーション
を行った。

*AN-gdh-17*遺伝子をプローブに用いてサザンハイブリダイゼーションを行った
結果、*AN-gdh-17*遺伝子導入系統No.1、3、15、2.1系統に目的サイズのバンド (1.
8kb、0.8kb) が検出され、導入遺伝子が確認できた (図16)。同様に*T-gdh-4*遺伝
子をプローブに用いてサザンハイブリダイゼーションを行った結果、*T-gdh-4*遺伝
子と同じサイズのバンド (1.2 kbp) が確認された。20kbp付近にバンドが見られ
るものもあり内在性の*gdh*遺伝子と考えられた (図17)。

(3) NADP-GDHとNAD-GDH活性の測定

形質転換トマト (T₁) の腋芽の葉組織 (0.2 g) を液体窒素で凍結させ、乳鉢で
破碎した後、重量の5倍量の抽出緩衝液 {200 mM Tris (pH8.0), 14 mM β -メル
カプトエタノール, 10 mM L-システイン-HCl, 0.5 mM PMSF, 0.5% TritonX-100}
を加えた。遠心チューブに移し、4°C、12,000rpmで10分間遠心した後、上清を限

外ろ過 (Millipore、ウルトラフリー-0.5フィルターユニット、バオイマックス-10) し、抽出緩衝液で3回洗浄した。

抽出した酵素は反応液 {100 mM Tris(pH8.0), 20 mM 2- α -ケトグルタル酸, 1.0 mM CaCl₂, 0.2 mM NADPH(NADP - GDH活性測定)又は0.2 mM NADH(NAD-GDH活性測定), 200 mM 塩化アンモニウム} に混合し、室温で反応させ、340 nmにおける吸光度の減少を測定した。

*AN-gdh-17*遺伝子を導入した形質転換トマト (T₁) の葉組織を用いて、NADP-GDH活性を測定した結果、非形質転換体では活性が認められないのに対し、形質転換体は230-400 nmol/ (min $\cdot$ mgタンパク質) の活性が測定できた (表6)。*T-gdh-4*遺伝子を導入した系統ではNAD-GDH活性が非形質転換体に比べて約2倍以上増加していた (表7)。

表6 *AN-gdh-17*遺伝子導入トマトのNADPH-GDH活性.

NADP-GDH 活性		
Lines	(nmol/(min $\cdot$ mgタンパク質))	
非形質転換トマト	0	
形質転換トマト		
AN-gdh-17	No. 1-1	400
AN-gdh-17	No. 3-1	390
AN-gdh-17	No. 15-1	380
AN-gdh-17	No. 2.1-1	230

表7 *T-gdh*-4遺伝子導入トマトのNAD-GDH活性

NAD-GDH活性	
Lines	(nmol/(min.・mgタンパク質))
非形質転換トマト	80
形質転換トマト	
T-gdh No. 1-2	180
T-gdh No. 3-1	160
T-gdh No. 8-1	260

(4) 果実中のアミノ酸含量の測定

第一果房の開花後6週目の果実3個を分析に用いた。果実に80℃に熱した80%エタノールを重量の3倍量加え、乳鉢ですりつぶした後、再度80℃で20分間加熱した。7,000 rpmで遠心して、上清を回収した後、再度80%エタノールを加え、80℃に加温した。エタノールによる抽出を3回行い、総量を80%エタノールで100mlに合わせた。良く混合した後、抽出液200 μ lをエッペンドルフチューブに取り、乾燥させ、200 μ lの滅菌水に溶かした。エチルエーテル200 μ l加え混合後、12,000 rpmで遠心し、エーテル層を取り除いた。水層を再度乾燥させた後、200 μ lの0.02N HClに溶解し、0.45 μ mのろ過フィルターを用いてろ過したろ液をサンプルとし、日立高速アミノ酸計測器(L-8800)を用いて分析を行った。

結果は3個の果実の平均値を示した。*AN-gdh*-17遺伝子導入系統においては、非形質転換体に比べて、*AN-gdh*-17 No.1系統由来のAN1-1-2、AN1-1-3のグルタミン酸含量がそれぞれ、2.1倍、2.8倍増加し、*AN-gdh*-17 No.3 系統由来のAN3-1-2、AN3-1-3が2.8倍、2.5倍それぞれ増加していた。*AN-gdh*-17 No.15系統由来のAN15-1、*AN-gdh*-17 No.2.1系統由来のAN2.1-1-1も2.1倍、1.9倍それぞれ増加していた(表8、図18)。形質転換当代(T_0)で高いグルタミン酸含量を示したNo.15系統の

後代においても同様な傾向が示された。

表8. *AN-gdh-17* 遺伝子を導入した形質転換トマトの後代(T1)における果実中のアミノ酸含量.

	Asp	Thr	Ser	Asn	Glu
対照	1.09±0.48	0.10±0.03	0.22±0.05	0.18±0.09	6.42±1.16
AN-GDH 1-1-2	2.50±0.78	0.19±0.02	0.41±0.02	0.38±0.04	13.71±2.55
AN-GDH 1-1-3	4.17±0.15	0.42±0.06	0.86±0.09	0.63±0.13	18.42±0.99
AN-GDH 3-1-2	4.18±0.96	0.30±0.07	0.66±0.19	0.50±0.18	18.39±2.74
AN-GDH 3-1-3	3.37±0.89	0.33±0.05	0.71±0.12	0.57±0.07	16.25±0.73
AN-GDH 15-1	2.18±0.16	0.15±0.02	0.36±0.02	0.29±0.01	13.95±0.28
AN-GDH 2.1-1-1	2.33±0.38	0.20±0.04	0.46±0.17	0.23±0.06	12.43±0.77
	Gln	Ala	His	GABA	Total
対照	0.44±0.33	0.29±0.11	0.13±0.04	0.96±0.11	10.36±4.24
AN-GDH 1-1-2	0.45±0.11	0.62±0.16	0.23±0.02	2.86±0.58	22.18±3.71
AN-GDH 1-1-3	1.50±1.20	1.54±0.15	0.44±0.02	5.67±0.18	35.46±2.88
AN-GDH 3-1-2	1.05±0.91	1.25±0.84	0.39±0.08	3.33±0.97	31.76±4.76
AN-GDH 3-1-3	1.49±1.02	1.18±0.48	0.39±0.06	2.90±0.40	28.68±1.22
AN-GDH 15-1	0.27±0.10	0.73±0.13	0.23±0.10	1.09±0.13	19.97±0.25
AN-GDH 2.1-1-1	0.19±0.03	0.91±0.47	0.24±0.10	1.84±0.09	19.59±2.29

(単位: μ mol/g. F.W.)

(n=3)

T-gdh-4 遺伝子導入系統では、調査した *T-gdh-4* No.1, 3, 8 系統の後代 TGDH1-2, 3-1, 8-1 で、非形質転換体のグルタミン酸含量に比べて、2.3倍、2.1倍、2.4倍増加していた。(表9、図19)。また、グルタミン酸以外のアミノ酸ではアスパラギン酸、グルタミン、 γ -アミノ酪酸含量の顕著な増加が見られ、結果として全遊離ア

ミノ酸含量も非形質転換体と比較して2-3倍増加した。

表9. T-gdh-4遺伝子を導入した形質転換トマトの
後代(T1)における果実中のアミノ酸含量

	Asp	Thr	Ser	Asn	Glu
対照	1.09±0.48	0.10±0.03	0.22±0.05	0.18±0.09	6.42±1.16
T-gdh 1-2	2.61±0.51	0.28±0.05	0.56±0.12	0.48±0.02	14.74±3.12
T-gdh 3-1	2.41±0.51	0.20±0.04	0.44±0.13	0.30±0.01	13.81±2.64
T-gdh 8-1	2.85±0.60	0.22±0.05	0.46±0.11	0.31±0.07	15.70±3.47
	Gln	Ala	His	GABA	Total
対照	0.44±0.33	0.29±0.11	0.13±0.04	0.96±0.11	10.36±4.24
T-gdh 1-2	0.79±0.65	0.91±0.56	0.29±0.17	1.31±0.96	23.29±3.88
T-gdh 3-1	0.43±0.37	0.70±0.35	0.27±0.06	1.53±0.48	21.09±2.80
T-gdh 8-1	0.46±0.07	0.69±0.05	0.23±0.18	2.24±0.85	24.22±5.19

(単位: μ mol/g F.W.)

(n=3)

実施例4. ポテト形質転換体の作出と解析

(1) 形質転換体の作出

茎頂培養によってポテト（バレイショ）の無菌植物を得、茎頂を継代することによって材料を増やした。MS培地に2%ショ糖を加えた液体培地（10ml）に茎頂を入れ、発根を誘導した。発根後、16%ショ糖を含むMS液体培地を10 ml加え、暗所培養を行い、マイクロチューバーを誘導した。6-8週後のマイクロチューバーをディスク状に切り、皮をむいた後、28℃で一晩培養したアグロバクテリウム液(Ti-プラスミッド、pMt-dAN-gdh又はpCt-AN-gdhを含む)を感染させた。滅菌ろ紙を敷いたMS寒天培地（MS培地、2.0 mg/l ゼアチン、0.1 mg/l インドール酢酸、0.3%

ゲルライト) 上に乗せ、25°C、16時間日長で2日間共存培養した。その後選抜培地 {MS培地、2.0 mg/l ゼアチン、0.1 mg/l インドール酢酸、0.3% ゲルライト、50 mg/l カナマイシン、500mg/l クラフォラン} に移し、同条件で培養した。1週間ごとに新しい選抜培地に移し、再分化したシュートを植物ホルモンを含まない選抜培地に移し、発根を誘導した。Ti-プラスミッドpMt-dAN-gdhおよびpCt-AN-gdhを持つアグロバクテリウムを感染させ、カナマイシン50mg/lを含む培地で選抜を行った結果、Mt-dAN-gdh No.2, 5, 8, Ct-AN-gdh No.1の4系統が選抜できた。

(2) サザン分析による導入遺伝子の確認

馴化させた植物の葉組織よりTotal DNAを抽出した (Honda and Hirai 1990、Jpn J Breed 40, 339-348)。15 μ gのDNAを制限酵素EcoRIで処理し、電気泳動後、ナイロンメンブランにトランスファーした。サザンハイブリダイゼーションはDIG-Labeling and Detection Kit (Roche Molecular Biochemicals)を用いて行った。プローブにAN-gdh-17遺伝子を用いた。

その結果、4系統すべてに導入遺伝子サイズのバンド(約1.5kb)が確認され(図20)、トランジェットペプチドを付加したgdh遺伝子が導入されていることが示唆された。

(3) NADP-GDH活性の測定

形質転換株の葉組織(約0.1 g)を液体窒素で凍結させ、乳鉢で破碎した後、重量の5倍量の抽出緩衝液{200 mM Tris (pH8.0), 14 mM β -メルカプトエタノール、10 mM L-システイン-HCl, 0.5 mM PMSF, 0.5% TritonX-100}を加えた。遠心チューブに移し、12,000 rpmで10分間遠心した後、上清を限外ろ過 (Millipore、ウルトラフリー0.5フィルターユニット、バオイマックス-10) し、抽出緩衝液で3回洗浄した。抽出した酵素は反応液 {100mM Tris(pH8.0), 20mM 2- α -ケト

グルタル酸, 1.0mM CaCl₂, 0.2mM NADPH, 200mM 塩化アンモニウム} に混合し、室温で反応させ、340nmにおける吸光度の減少を測定した。

サザン分析で導入遺伝子が確認できた形質転換ポテトおよび非形質転換ポテトの葉組織を用いて、NADP-GDH活性を測定した結果、非形質転換体では活性が認められないのに対し、形質転換体では150-300nmol/ (min.・mgタンパク質) の活性が測定できた(表10)。Ct-AN-gdh系統よりMt-dAN-gdh系統の方が高い活性を示した。

表 10. *Mt-dAN-gdh*と*Ct-AN-gdh*遺伝子導入ポテトのNADP-GDH活性

系統	NADP-GDH活性 (nmol/min.mgタンパク質)
非形質転換ポテト	0
形質転換ポテト	
Mt-dAN-gdh No. 2	290
Mt-dAN-gdh No. 5	300
Mt-dAN-gdh No. 8	260
Ct-AN-gdh No. 1	150

(4) マイクロチューバーのアミノ酸含量の測定

非形質転換体と形質転換体4系統の茎頂を液体培養し、発根誘導した後、16%ショ糖を加え、暗所処理後6週目のマイクロチューバーを用いて、アミノ酸含量を測定した。

80℃に熱した80%エタノールを重量の3倍量加え、乳鉢ですりつぶした後、再度80℃で20分間加熱した。7,000rpmで遠心して、上清を回収した後、再度80%エタノールを加え、80℃に加温した。エタノールによる抽出を3回行い、総量を80%エタノールで5mlに合わせた。よく混合した後、抽出液200μlをエペンドルフチューブに取り、乾燥させ、200μlの滅菌水に溶かした。エチルエーテル200μl加え混合後、12,000 rpmで遠心し、エーテル層を取り除いた。水層を再度乾燥させた後、400μlの0.02N HClに溶解し、0.45μmのろ過フィルターを用いてろ過したろ液をサンプル

ルとし、日立高速アミノ酸計測器 (L-8800) を用いて分析を行った。

遺伝子導入系統より誘導したマイクロチューバーを用いてアミノ酸分析を行った。それぞれの株は2個以上のマイクロチューバーを分析し、統計処理を行った。

*Mt-dAN-gdh*遺伝子を導入したNo. 2, 5, 8系統由来Mt2-2, Mt5-1, Mt5-2, Mt8-1, Mt8-2株はそれぞれグルタミン酸含量が非形質転換体に比べて、1.7倍, 2.2倍, 2.5倍, 3.0倍, 2.2倍増加していることが分かった(表11、図21)。*Ct-AN-gdh*遺伝子導入系統においては、非形質転換体と比べてグルタミン酸含量に有意差は認められなかった。グルタミン酸以外のアミノ酸ではグルタミンやプロリンの顕著な増加が示され、結果として全遊アミノ酸含量も非形質転換体と比較して2-3倍増加した。

表11. *CtAN-gdh*と*MtdAN-gdh*遺伝子を導入したポテトのマイクロチューバー中のアミノ酸含量.

	Asp	Thr	Ser	Asn
対照	1.08±0.23	0.48±0.13	0.66±0.25	13.77±6.24
<i>CtAN-gdh</i> no. 1-1	1.47±0.36	0.79±0.22	1.57±0.21	42.12±17.05
<i>MtdAN-gdh</i> no.2-2	1.85±0.01	0.88±0.02	1.31±0.03	14.79±2.40
<i>MtdAN-gdh</i> no.5-1	1.62±0.03	0.84±0.29	1.32±0.54	11.12±2.55
<i>MtdAN-gdh</i> no.5-2	4.17±3.01	0.74±0.09	1.44±0.02	28.62±3.28
<i>MtdAN-gdh</i> no.8-1	2.32±0.61	0.88±0.19	1.57±0.24	30.97±2.16
<i>MtdAN-gdh</i> no.8-2	2.00±0.28	0.83±0.15	1.12±0.13	16.69±2.80
	Glu	Gln	Ala	His
対照	2.25±0.58	10.00±4.25	0.52±0.30	0.25±0.08
<i>CtAN-gdh</i> no. 1-1	3.16±1.40	17.74±5.29	1.42±0.59	0.80±0.43
<i>MtdAN-gdh</i> no.2-2	3.75±0.03	27.48±1.98	1.67±0.03	0.26±0.04
<i>MtdAN-gdh</i> no.5-1	4.98±1.93	34.09±8.11	1.14±0.51	0.59±0.30
<i>MtdAN-gdh</i> no.5-2	5.54±0.95	25.31±3.20	1.86±0.17	0.36±0.12
<i>MtdAN-gdh</i> no.8-1	6.71±2.28	20.07±4.90	1.89±0.25	0.46±0.28
<i>MtdAN-gdh</i> no.8-2	4.86±1.14	14.56±2.93	1.06±0.19	0.28±0.13
	GABA	Arg	Pro	Total
対照	1.29±0.53	0.46±0.16	5.03±4.21	38.57±10.31
<i>CtAN-gdh</i> no. 1-1	2.10±1.19	2.93±1.61	15.32±9.30	93.48±20.00
<i>MtdAN-gdh</i> no.2-2	3.22±0.52	0.78±0.11	10.55±1.73	71.66±1.84
<i>MtdAN-gdh</i> no.5-1	2.96±1.74	2.00±1.24	8.65±5.24	73.45±22.78
<i>MtdAN-gdh</i> no.5-2	1.10±0.21	2.18±1.27	11.58±0.73	86.12±3.35
<i>MtdAN-gdh</i> no.8-1	2.03±1.15	1.53±0.81	25.03±1.06	98.66±26.85
<i>MtdAN-gdh</i> no.8-2	1.61±0.47	0.68±0.09	7.71±2.09	55.40±6.08

(単位: μ mol/g. F.W.) ($n \geq 2$)

実施例 5 . ポテト形質転換体の収量調査

実施例 4 および同様にして得られた、*Mt-dAN-gdh* 遺伝子導入ポテトのいくつかの系統について、その収量を調査した。

形質転換無菌植物を馴化後、2.5kgのパワーソイル（表12）を入れた7号鉢に移植した。追肥はせず、水のみを与え、自然光下、25℃にて2ヶ月間栽培を行なった（2001年3月～5月、屋外閉鎖系温室にて栽培）。栽培期間の終わりに、地上部および塊茎部の重量を測定し、また塊茎数、茎数も同様に測定した。その結果を表13、図22および図23に示した。

表 1 2 . パワーソイルの組成

項目	内容
水分	約 1 4 %
粒状分布	粒の直径 0.5～3mm
p H	6.5程度
肥料添加量（1kgあたり）	窒素全量 0.40g
	硝酸態窒素 0.05g
	アンモニア態窒素 0.35g
	リン酸全量 2.00g
	水溶性カリ 0.60g
	く溶性苦土 0.20g

表 13. 形質転換ポテトの収量

	地上部 生重量(g)	塊茎部 総重量(g)	塊茎数 (個)	茎数 (本)
非形質転換体 no.1	5.8	53.9	9	1
非形質転換体 no.2	8.2	54.7	7	1
形質転換体 Mt-dAN no.1-1	56.4	175.6	14	2
形質転換体 Mt-dAN no.2-3	26.4	89.0	10	2
形質転換体 Mt-dAN no.3-1	53.8	228.9	15	3
形質転換体 Mt-dAN no.5-3	41.6	118.0	19	2
形質転換体 Mt-dAN no.8-3	64.4	224.2	16	3

*Mt-dAN-gdh*遺伝子を導入したポテトにおいて、塊茎数、塊茎部総重量の顕著な増加が見られた。

本発明により、遊離アミノ酸を高濃度に含有する植物が得られ、付加価値の高い原料作物および食品素材が提供される。本発明により全アミノ酸量が2～4倍に増加し、特にグルタミン酸、アスパラギン、アスパラギン酸、セリン、スレオニン、アラニンおよびヒスチジンの少なくとも1つについてアミノ酸含量の高い作物が提供され、これらのアミノ酸の後添加を必要としない付加価値の高い原料作物が提供される。また、本発明により、直接調理するような野菜類で高濃度にグルタミン酸を蓄積したもの、すなわち、うま味の優れた食品素材が提供される。

さらに、本発明により、そのような遊離アミノ酸を高度に蓄積する植物を育種するための期間が大幅に短縮される。

また、本発明により、ポテトの収量を増加させることもができる。本発明により、ポテトの塊茎部の総生重量(g)にして約1.5倍以上増加し、植物体あたりの塊茎数も有意に増加する。

請求の範囲

1. 同条件で栽培した同種の非形質転換植物と比べて、植物の可食部分における1以上の遊離アミノ酸をより多く蓄積するトランスジェニック植物を作出する方法であって、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ(GDH)の過剰発現を与える遺伝子構築物で植物を形質転換し、該遺伝子構築物に連結されたマーカー遺伝子により付与された形質に基づいて前記形質転換植物を選択または同定し、1以上のアミノ酸をより多く蓄積する植物について前記形質転換植物をスクリーニングし、前記形質転換植物を選別することを含む、前記方法。
2. 遺伝子構築物が、強力な構成的プロモーターまたは果実特異的プロモーターに機能可能に連結されたGDHをコードする遺伝子を含む、請求項1記載の方法。
3. 構成的プロモーターがCaMV35Sプロモーターであり、果実特異的プロモーターが2A11プロモーターである、請求項2記載の方法。
4. 遺伝子構築物が*Aspergillus nidulans*由来のNADP-GDHA遺伝子を含む、pAN-gdh-17またはpCt-AN-gdhまたはpCt-dAN-gdhまたはpMt-dAN-gdhまたはp2ACt-dAN-gdhまたはp2AMt-dAN-gdhである、請求項1記載の方法。
5. 遺伝子構築物がトマト由来のNAD-GDH遺伝子を含む、pT-gdh-4またはpTd-gdhである、請求項1記載の方法。
6. 遊離アミノ酸が、アスパラギン、アスパラギン酸、セリン、スレオニン、アラニン、ヒスチジンおよびグルタミン酸からなる群より選ばれる、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。
7. 遊離アミノ酸の一つが遊離グルタミン酸である、請求項6に記載の方法。
8. トランスジェニック植物がトランスジェニックトマトである、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。
9. トランスジェニック植物がトランスジェニックポテトである請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

10. 請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載の方法により作出されたトランスジェニック植物および、グルタミン酸デヒドロゲナーゼを過剰発現する遺伝子構築物を含有する、前記植物の子孫。
11. 請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載の方法により作出された、可食部分のグルタミン酸含量が 2 倍以上に増加したトランスジェニック植物および、可食部分のグルタミン酸含量が 2 倍以上に増加したその子孫植物。
12. 請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載の方法により作出された、可食部分の全遊離アミノ酸含量が 2 倍以上に増加したトランスジェニック植物および、可食部分の全遊離アミノ酸含量が 2 倍以上に増加したその子孫植物。
13. 請求項 10～12 のいずれか 1 項に記載のトランスジェニック植物またはその子孫植物の種子であって、グルタミン酸デヒドロゲナーゼを過剰発現する遺伝子構築物を含有する前記種子。
14. GDHを発現し得る遺伝子構築物を含み、同条件で栽培した非形質転換ポテトと比べて、塊茎部の総重量が統計的に有意に増加し得る、形質転換ポテト。
15. GDHを発現し得る遺伝子構築物を含み、同条件で栽培した非形質転換ポテトと比べて、塊茎部の総重量が1.5倍以上増加し得る、請求項 14 に記載の形質転換ポテト。
16. GDHを発現し得る遺伝子構築物が、構成的プロモーターに機能可能に連結されたGDHをコードする遺伝子を含む、請求項 14 または 15 に記載のトランスジェニックポテト。
17. 構成的プロモーターがCaMV35Sプロモーターである請求項 16 に記載のトランスジェニックポテト。
18. 遺伝子構築物が*Aspergillus nidulans*由来のNADP-GDHA遺伝子を含む、請求項 14～17 のいずれか 1 項に記載のトランスジェニックポテト。
19. GDHがミトコンドリアへのトランジットペプチドを有する、請求項 14～18

のいずれか1項に記載の、トランスジェニックポテト。

20. 同条件で栽培した非形質転換ポテトと比べて、塊茎部の総重量が増加するトランスジェニックポテトを作出する方法であって、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ(GDH)の過剰発現を与える遺伝子構築物で植物を形質転換し、該遺伝子構築物に連結されたマーカー遺伝子により付与された形質に基づいて前記形質転換ポテトを選択または同定し、塊茎部の総重量が増加した前記形質転換ポテトをスクリーニングすることによって塊茎部の総重量が増加する形質転換ポテトを選別することを含む、前記方法。
21. 同条件で栽培した非形質転換ポテトと比べて、塊茎部の総重量が1.5倍以上増加し得ることを特徴とする、請求項20に記載の方法。
22. GDHを発現し得る遺伝子構築物が、構成的プロモーターに機能可能に連結されたGDHをコードする遺伝子を含む、請求項20または21に記載の方法。
23. 構成的プロモーターがCaMV35Sプロモーターである請求項22に記載の方法。
24. 遺伝子構築物が*Aspergillus nidulans*由来のNADP-GDHA遺伝子を含む、請求項20～23のいずれか1項に記載の方法。
25. GDHがミトコンドリアへのトランジットペプチドを有する、請求項20～24のいずれか1項に記載の方法。

FIG.1

1 ATGTCTAACCTTCCCGTTGAGCCCGAGTTCGAGCAGGCCTACAAGGAGCTTGCGTCGACC

1 ATGTCTAACCTTCCCGTTGAGCCCGAGTTCGAGCAGGCCTACAAGGAGCTTGCGTCGACC

61 CTCGAGAACTCCACCCTCTTTGAGCAGCACCCTGAATACCGACGGGCTCTCCAGGTCGTC

61 CTCGAGAACTCCACCCTCTTTGAGCAGCACCCTGAATACCGACGGGCTCTCCAGGTCGTC

121 TCCGTTCCCGAGCGCGTTATCCAGTTCGGTGTCTGTTGGGAGAACGACAAGGGCGAGGTT

121 TCCGTTCCCGAGCGCGTTATCCAGTTCGGTGTCTGTTGGGAGAACGACAAGGGCGAGGTT

181 CAGATCAACCGCGGTTACCGTGTTCAGTTCAACTCCGCTCTCGGTCCCTACAAGGGTGGT

181 CAGATCAACCGCGGTTACCGTGTTCAGTTCAACTCCGCTCTCGGTCCCTACAAGGGTGGT

241 CTCCGTTTCCACCCTCCGTCAACCTTTCTATCCTGAAGTTCCTTGGCTTCGAGCAGATC

241 CTCCGTTTCCACCCTCCGTCAACCTTTCTATCCTGAAGTTCCTTGGCTTCGAGCAGATC

301 TTCAAAAATGCTCTCACAGGAC[← スプライシングサイト

301 TTCAAAAATGCTCTCACAGGACGTGCGTAACCGTTACTTCATTGGATGTTTGCCAAGAGT

323 →]TAAACATGGGTGGTGGCAAGGGTGGTTCGACTTCGACCCCAAGG

361 ACTAATTGGTATTAGTAAACATGGGTGGTGGCAAGGGTGGTTCGACTTCGACCCCAAGG

368 GCAAGTCTGACTCTGAAATTCGTGCTTCTGTACCGCTTTCATGACTGAGCTCTGCAAGC

421 GCAAGTCTGACTCTGAAATTCGTGCTTCTGTACCGCTTTCATGACTGAGCTCTGCAAGC

428 ACATCGGCGCGGACACTGACCTTCCCGTGGTGATATCGGTGTTACTGGCCGTGAGGTTG

481 ACATCGGCGCGGACACTGACCTTCCCGTGGTGATATCGGTGTTACTGGCCGTGAGGTTG

488 GTTTCCTTTTCGGCCAGTACCGCAGGATCCGCAACCAAGTGGGAGGGTGTCTCACTGGCA

541 GTTTCCTTTTCGGCCAGTACCGCAGGATCCGCAACCAAGTGGGAGGGTGTCTCACTGGCA

548 AGGGTGGCAGCTGGGGTGGTAGCTTGATCCGCCCTGAAGCCACTGGATACGGTGTGTCT

601 AGGGTGGCAGCTGGGGTGGTAGCTTGATCCGCCCTGAAGCCACTGGATACGGTGTGTCT

608 ACTACGTTTCAGCACATGATCAAGCACGTTACCGGTGGAAAGGAGTCCTTCGCAGGCAAGC

661 ACTACGTTTCAGCACATGATCAAGCACGTTACCGGTGGAAAGGAGTCCTTCGCAGGCAAGC

FIG.2

668 GTGTCGCCATCTCCGGCTCCGGTAACGTTGCCAGTACGCCGCTCTCAAGGTCATCGAGC

721 GTGTCGCCATCTCCGGCTCCGGTAACGTTGCCAGTACGCCGCTCTCAAGGTCATCGAGC

728 TCGGTGGTTCCGTTGTCTCCCTTTCCGACTCCAAGGGCTCTCTCATTGTCAAGGATGAGT

781 TCGGTGGTTCCGTTGTCTCCCTTTCCGACTCCAAGGGCTCTCTCATTGTCAAGGATGAGT

788 CCGCTTCTTTACCCCTGAAGAGATCGCCCTCATTGCCGACCTCAAGGTTGCCGCAAGC

841 CCGCTTCTTTACCCCTGAAGAGATCGCCCTCATTGCCGACCTCAAGGTTGCCGCAAGC

848 AACTCTCCGAGCTCGCCACCTCCTCCGCTTTCCGCCGCAAGTTCACCTACATCCCGATG

901 AACTCTCCGAGCTCGCCACCTCCTCCGCTTTCCGCCGCAAGTTCACCTACATCCCGATG

908 CTCGCCCTTGACCAACATTCCCGGCAAGTTCGAGGTTGCTCTCCCTTCTGCCACTCAGA

961 CTCGCCCTTGACCAACATTCCCGGCAAGTTCGAGGTTGCTCTCCCTTCTGCCACTCAGA

968 ACGAAGTCTCCGGCGAGGAAGCCGAGCACCTCATCAAGTCCGGTGTCGGCTATATTGCTG

1021 ACGAAGTCTCCGGCGAGGAAGCCGAGCACCTCATCAAGTCCGGTGTCGGCTATATTGCTG

1028 AGGGTTCCAACATGGGTTGCACCCAGGCCGCCATCGACATCTTTGAGGCTCACC GCAACG

1081 AGGGTTCCAACATGGGTTGCACCCAGGCCGCCATCGACATCTTTGAGGCTCACC GCAACG

1088 CCAACCCGGCGATGCCATCTGGTACGCCCTGGTAAAGCCGCCAACGCTGGTGGTGTCTG

1141 CCAACCCGGCGATGCCATCTGGTACGCCCTGGTAAAGCCGCCAACGCTGGTGGTGTCTG

1148 CCGTCTCTGGTCTTGAGATGGCTCAGAACTCTGCTCGTCTCTCCTGGACATCCGAGGAGG

1201 CCGTCTCTGGTCTTGAGATGGCTCAGAACTCTGCTCGTCTCTCCTGGACATCCGAGGAGG

1208 TCGATGCTCGCCTCAAGGGCATCATGGAGGACTGCTTCAAGAACGGTCTCGAGACTGCTC

1261 TCGATGCTCGCCTCAAGGGCATCATGGAGGACTGCTTCAAGAACGGTCTCGAGACTGCTC

1268 AGAAGTTCGCTACTCCTGCCAAGGGCGTCTGCCCTTCCCTCGTCACCGGTTCCAACATTG

1321 AGAAGTTCGCTACTCCTGCCAAGGGCGTCTGCCCTTCCCTCGTCACCGGTTCCAACATTG

1328 CCGGTTTCACCAAGGTGCGCGAGGCCATGAAGGACCAGGGTGACTGGTGGTGA

1381 CCGGTTTCACCAAGGTGCGCGAGGCCATGAAGGACCAGGGTGACTGGTGGTGA

FIG.3

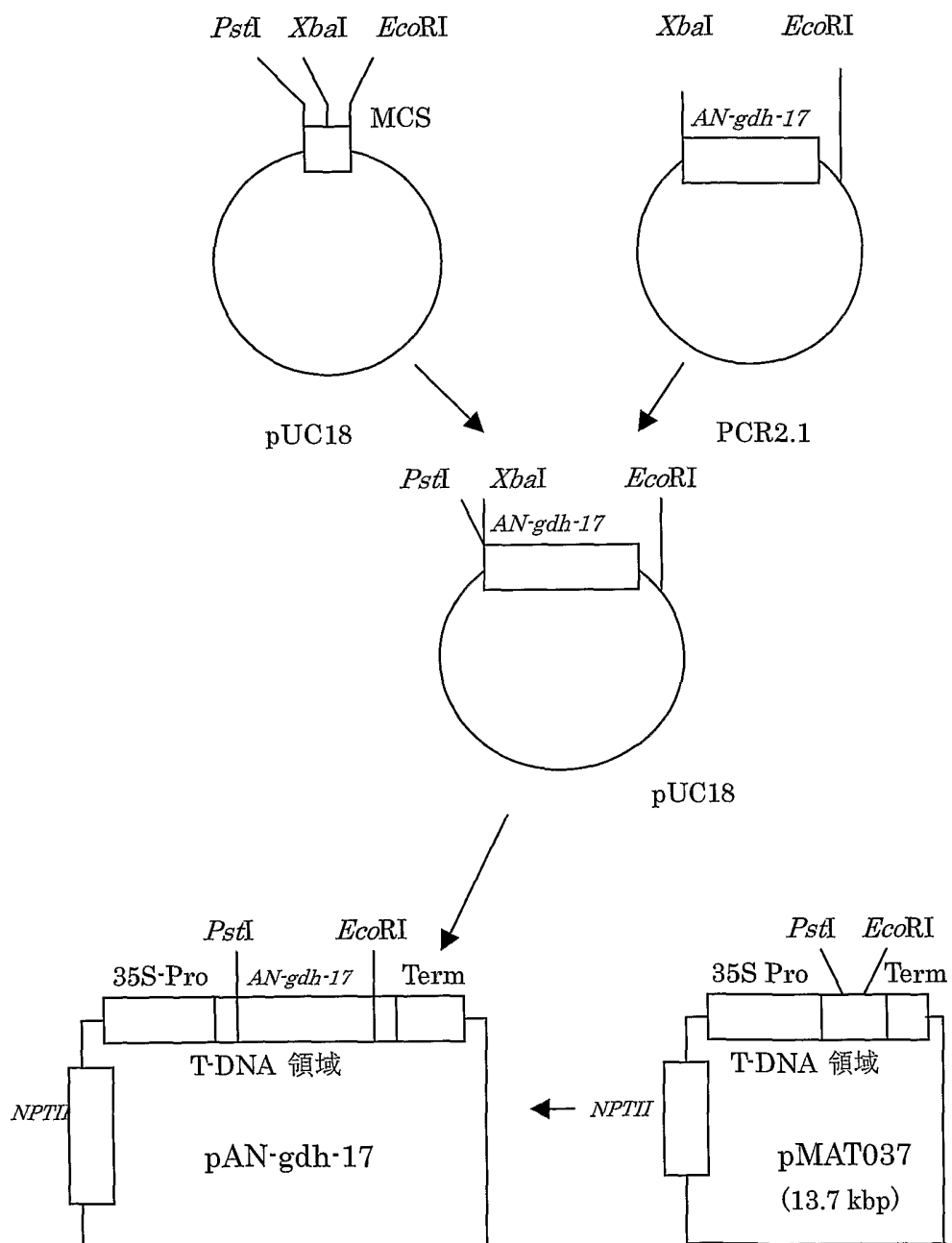


FIG.4

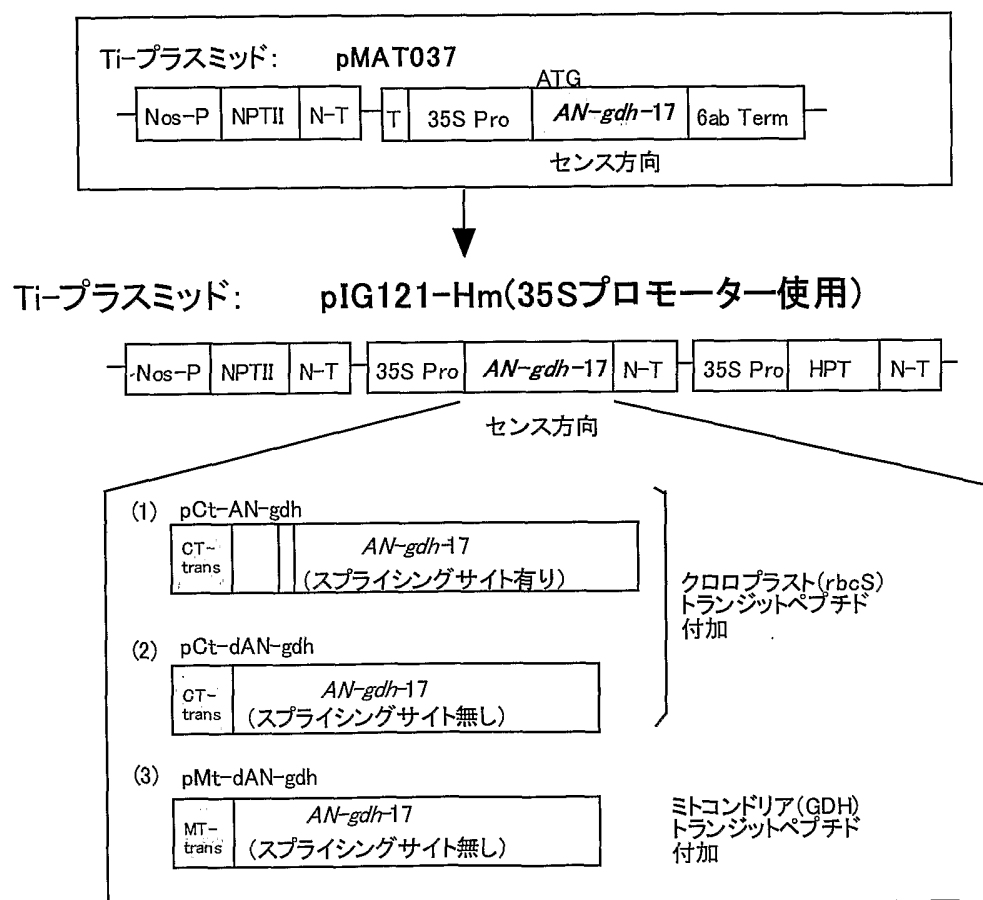


FIG.5

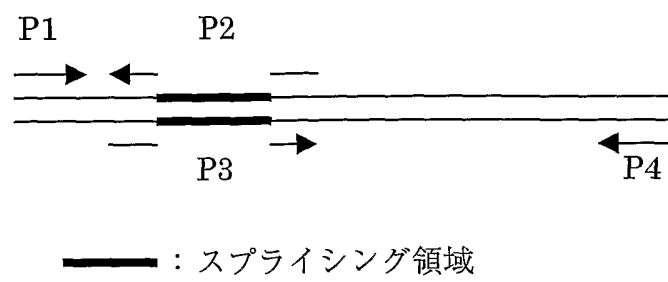


FIG.6

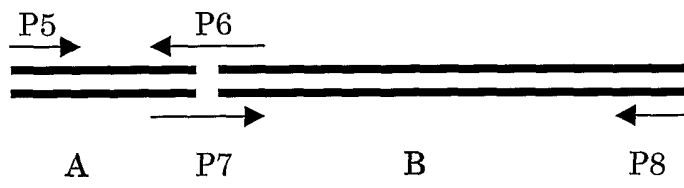


FIG.7

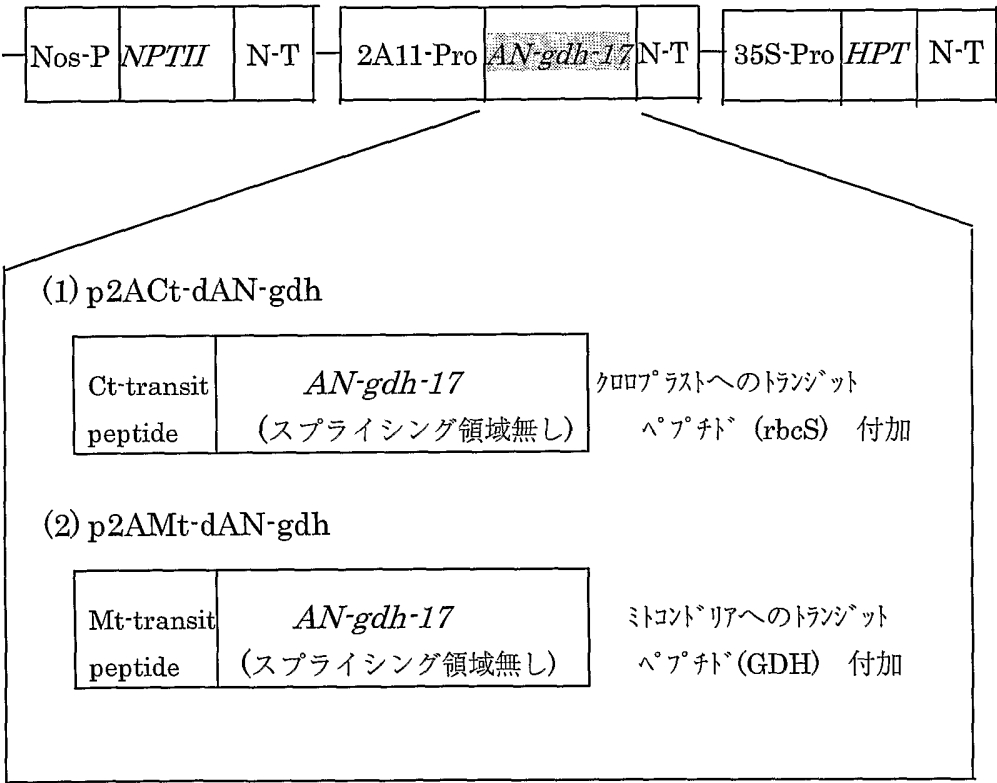


FIG.8

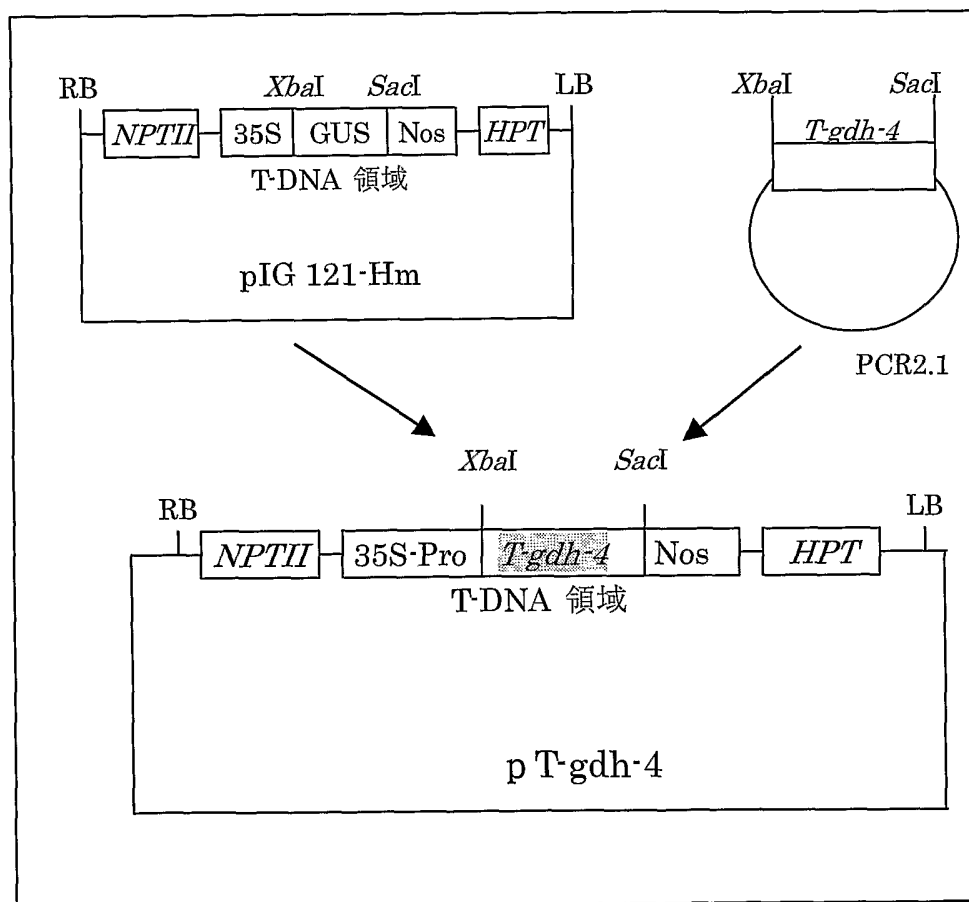


FIG.9

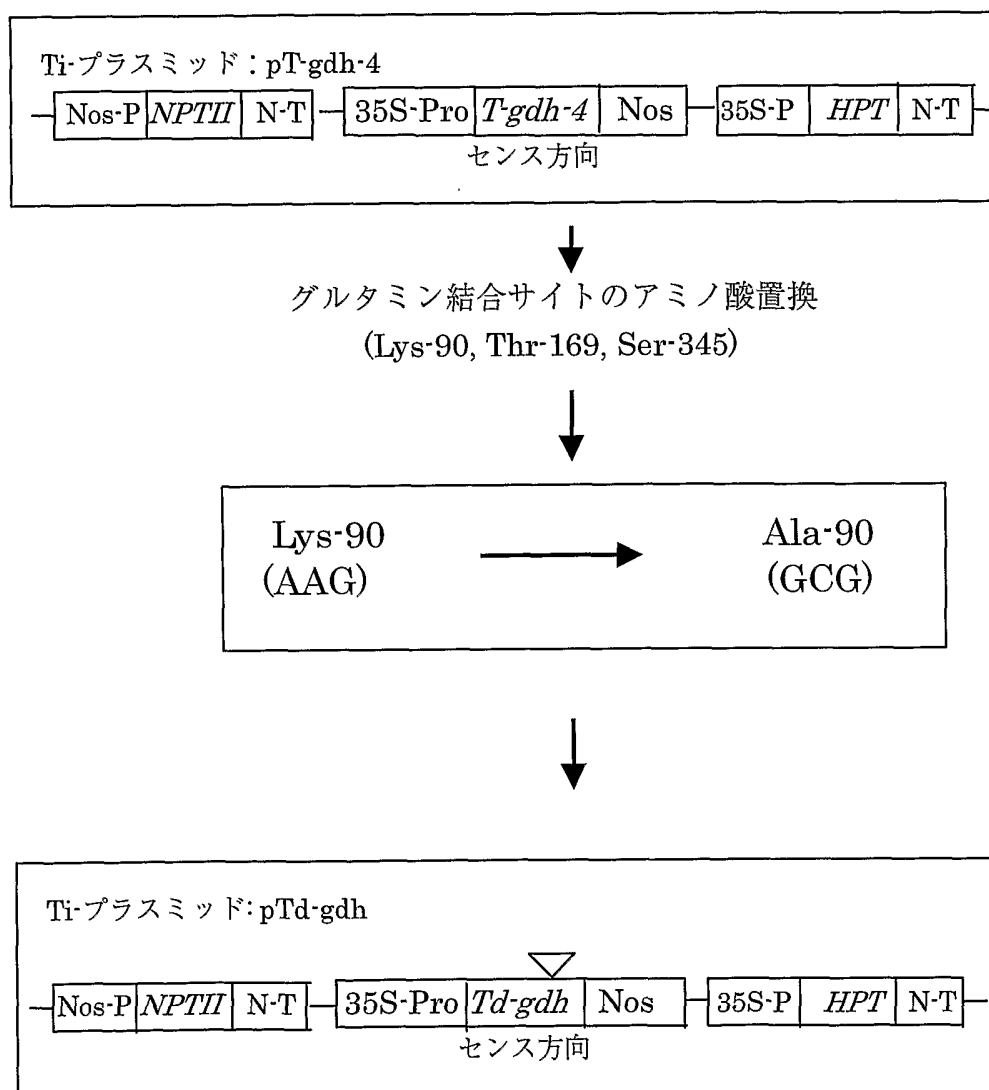
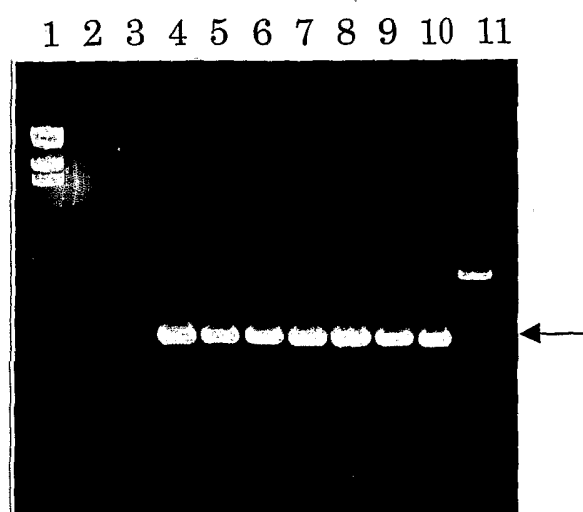
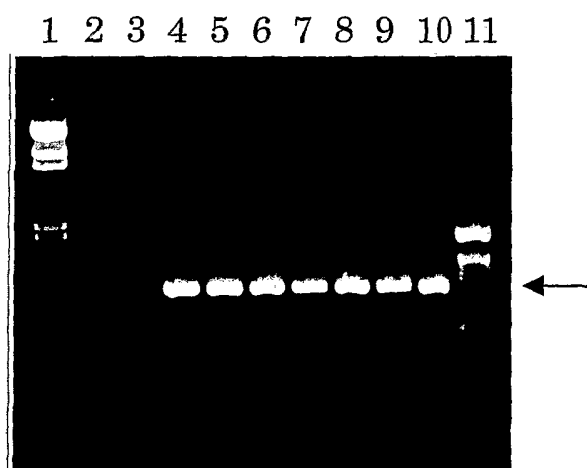


FIG.10



- | | |
|----------------------------|----------------------|
| 1. λ -HindIII マーカー | 2. 非形質転換トマト no. 1 |
| 3. 非形質転換トマト no. 2 | 4. pMAT037 no. 1 |
| 5. pMAT037 no. 2 | 6. pMAT037 no. 3 |
| 7. AN-gdh-17 no. 6 | 8. AN-gdh-17 no. 8-2 |
| 9. AN-gdh-17 no. 15 | 10. AN-gdh-17 no. 17 |
| 11. 100bp マーカー | |

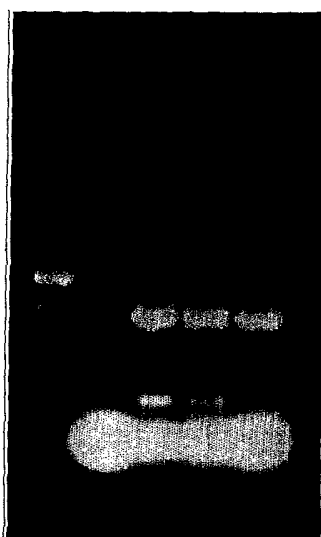
FIG.11



- | | |
|----------------------------|--------------------|
| 1. λ- <i>Hind</i> III マーカー | 2. 非形質転換トマト no. 1 |
| 3. 非形質転換トマト no. 2 | 4. pIG121 no. 1 |
| 5. pIG121 no. 2 | 6. pIG121 no. 3 |
| 7. T-gdh-4 no. 2 | 8. T-gdh-4 no. 7-2 |
| 9. T-gdh-4 no. 9-2 | 10. T-gdh-4 no. 10 |
| 11. 100bp マーカー | |

FIG.12

1 2 3 4 5

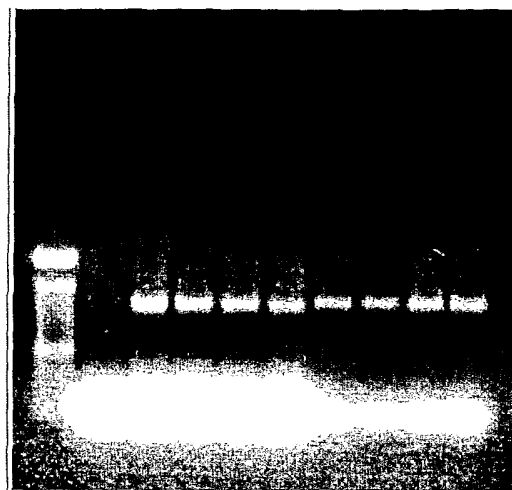


1. 100 bp マーカー
3. AN-gdh-17 no. 6 (葉)
5. AN-gdh-17 no. 6 (果実)

2. 非形質転換トト (葉)
4. AN-gdh-17 no. 15 (葉)

FIG.13

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



- | | |
|-------------------------|------------------------|
| 1. 100bp マーカー | 2. 非形質転換トマト (葉) |
| 3. T-gdh-4 no. 2 (葉) | 4. T-gdh-4 no. 7-2 (葉) |
| 5. T-gdh-4 no. 9-2 (葉) | 6. T-gdh-4 10 (葉) |
| 7. T-gdh-4 no. 2 (果実) | 8. T-gdh-4 7-2 (果実) |
| 9. T-gdh-4 no. 9-2 (果実) | 10. T-gdh-4 10 (果実) |

FIG.14

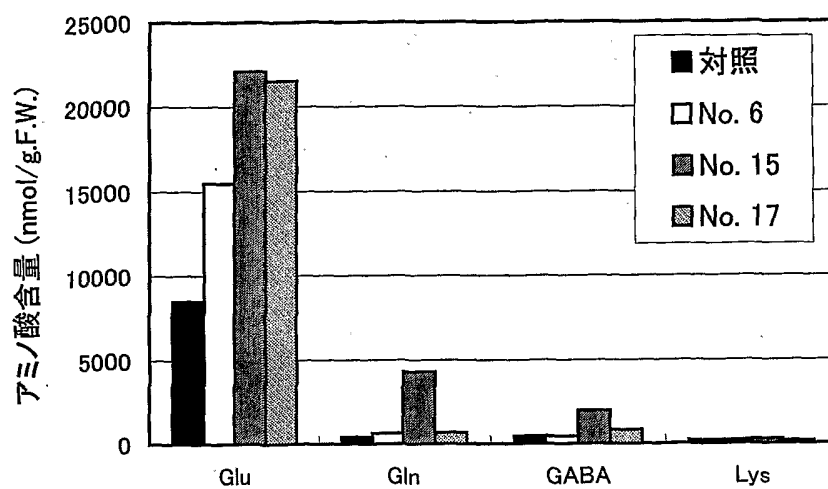


FIG.15

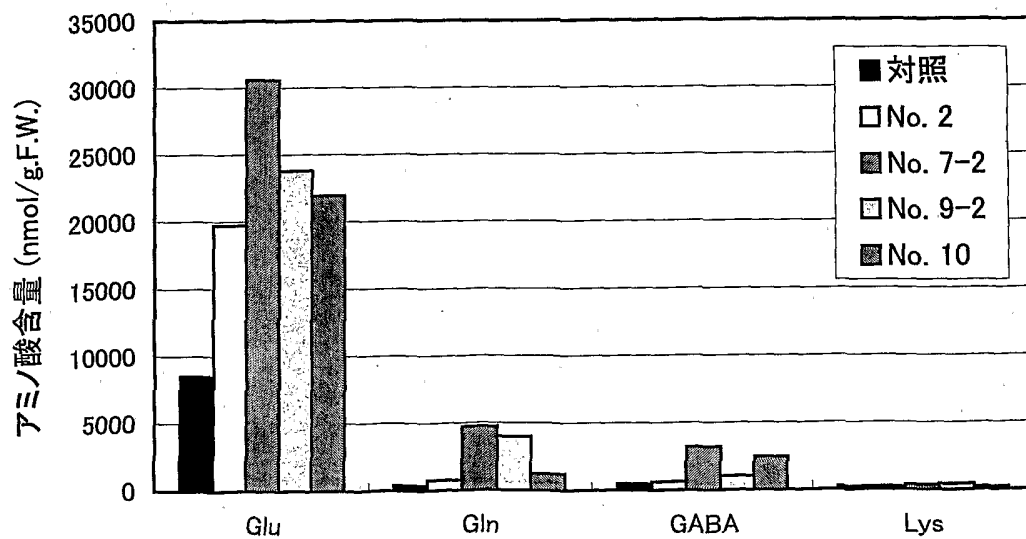


FIG.16

(A) 1 2 3 4 5 (B) 1 2 3 4 5

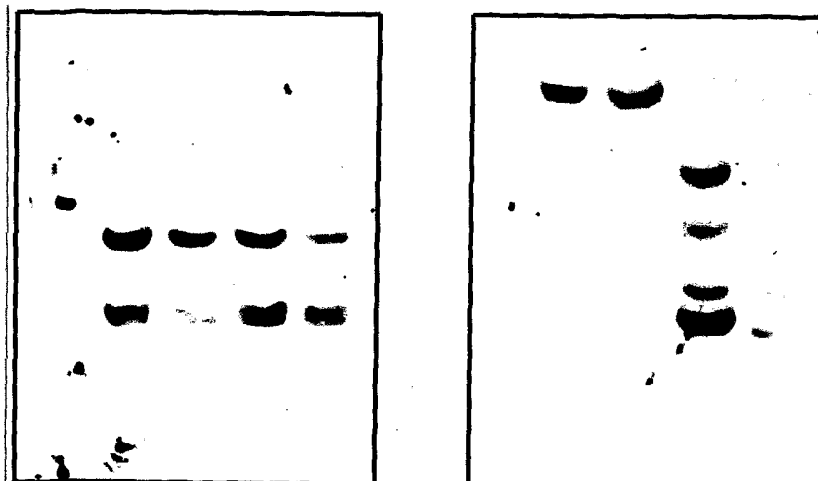


FIG.17

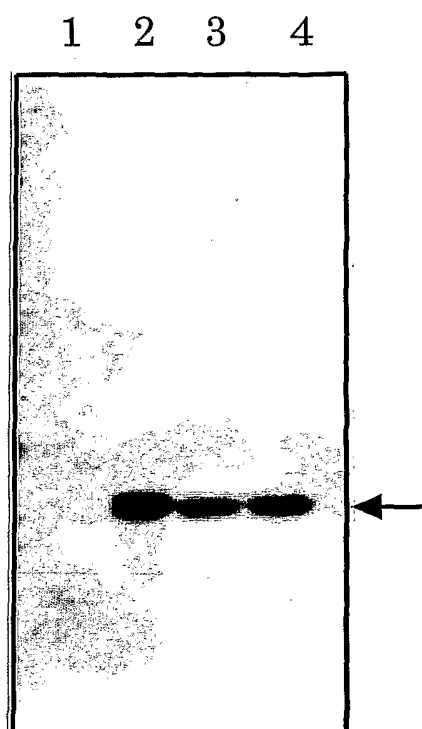
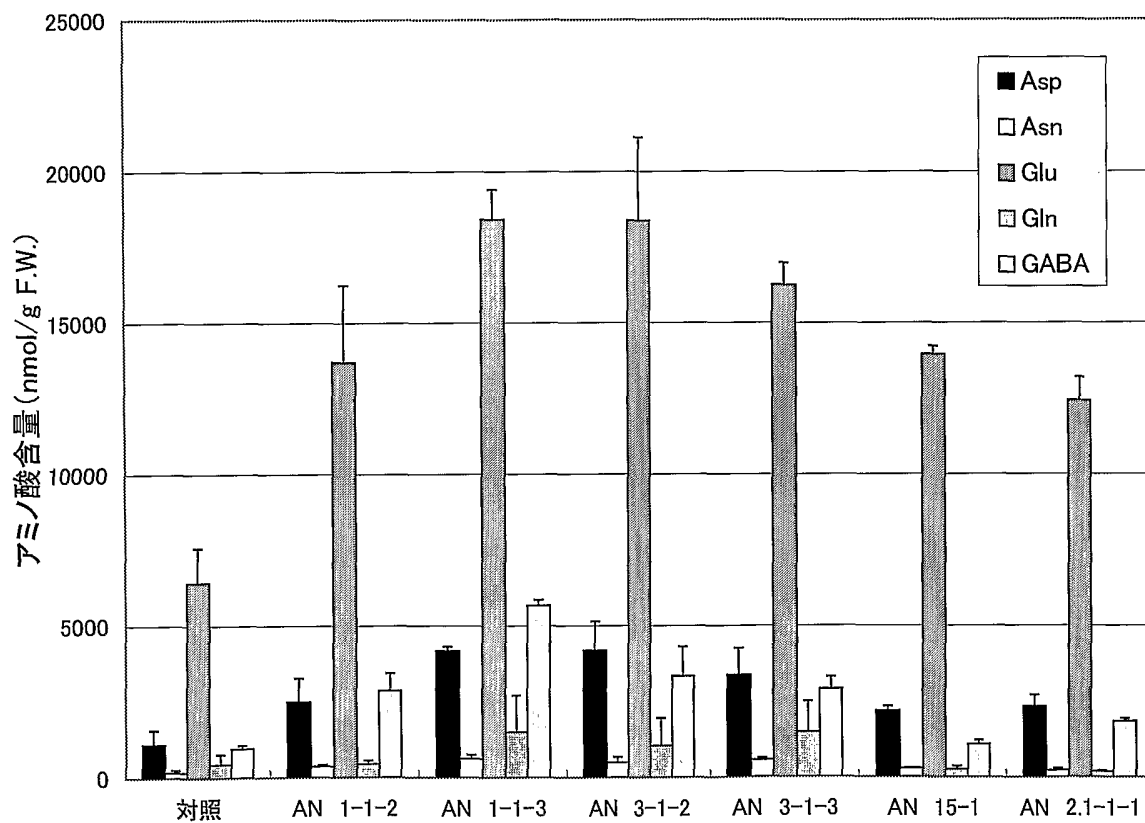


FIG.18

*AN-gdh-17*遺伝子を導入した形質転換トマトの後代 (T₁) における
果実中のアミノ酸含量



(n=3)

FIG.19

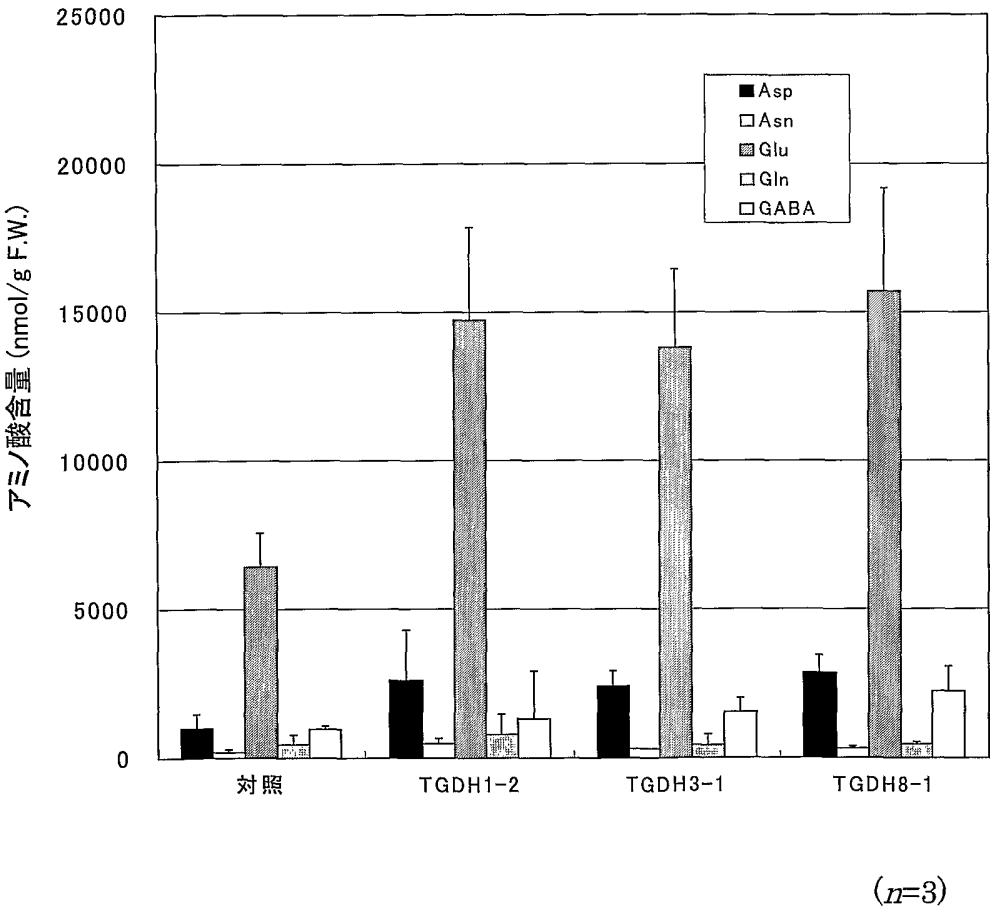


FIG.20

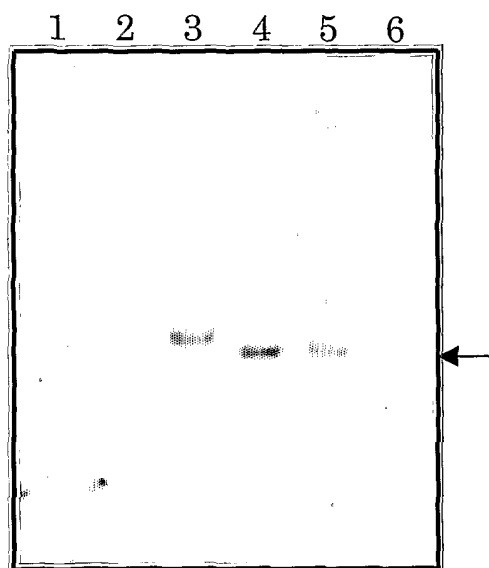


FIG.21

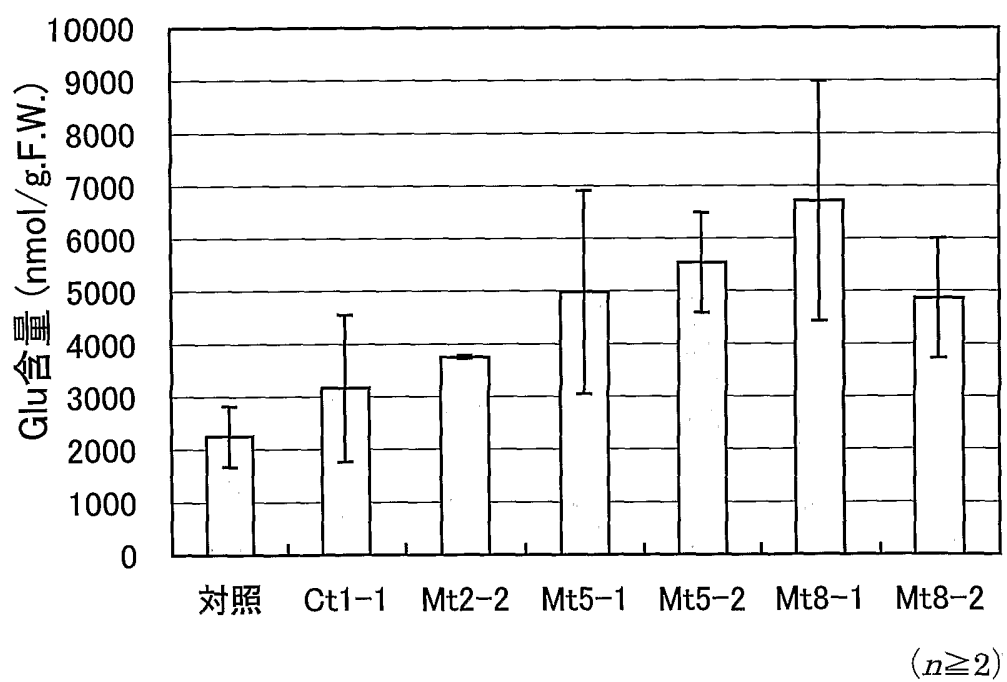


FIG.22

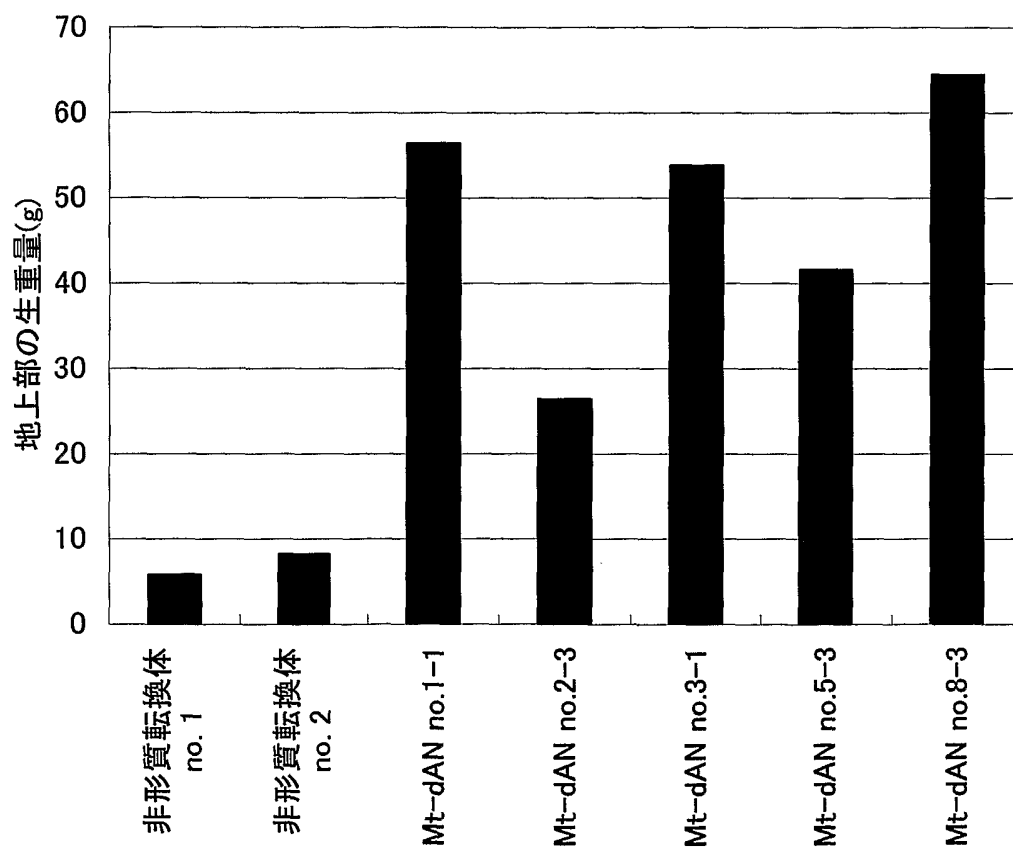
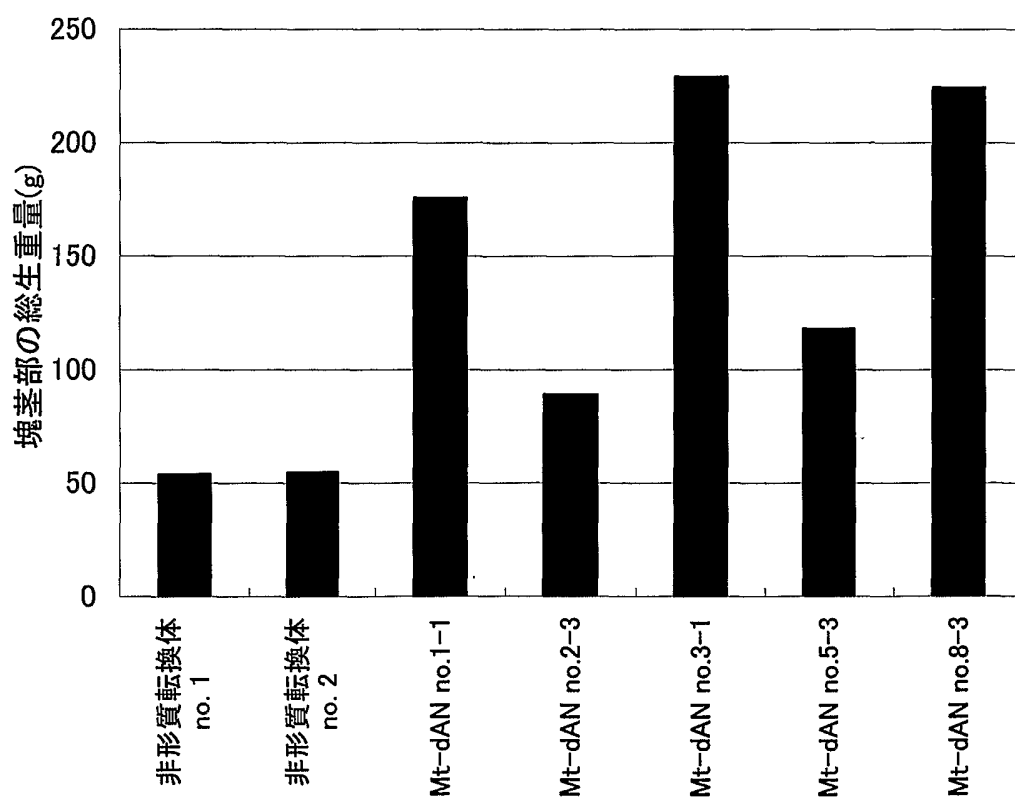


FIG.23



SEQUENCE LISTING

<110> Ajinomoto Co. Inc.

<120> A method for producing transgenic plants having
improved amino acid composition

<130> Y1I0477

<140>

<141>

<160> 26

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1433

<212> DNA

<213> Aspergillus nidulans

<400> 1

```
atgtctaacc ttcccgttga gcccgagttc gagcaggcct acaaggagct tgcgtcgacc 60
ctcgagaact ccacctctt tgagcagcac cctgaatacc gacgggctct ccaggtcgtc 120
tccgttcccg agcgcgttat ccagttccgt gtcgtttggg agaacgacaa gggcgaggtt 180
cagatcaacc gcggttaccc tgttcagttc aactccgctc tcggtcccta caagggtggt 240
ctccgtttcc accctccgt caacctttct atcctgaagt tccttggett cgagcagatc 300
ttcaaaaatg ctctcacagg acgtgcgtaa ccgttacttc attggatggt tgccaagagt 360
actaattggt attagtaaac atgggtggtg gcaagggtgg ttccgacttc gacccaagg 420
```

gcaagtctga ctctgaaatt cgtcgtttct gtaccgcttt catgactgag ctctgcaagc 480
 acatcggcgc ggacactgac cttcccgtcg gtgatatcgg tgttactggc cgtgagggtg 540
 gtttcttttt cggccagtac cgcaggatcc gcaaccagtg ggagggtgtt ctactggca 600
 aggstggcag ctgggggtgt agcttgatcc gccctgaagc cactggatac ggtgttgtct 660
 actacgttca gcacatgate aagcacgtta ccggtggaaa ggagtccttc gcaggcaagc 720
 gtgtcgccat ctccggtcc ggtaacgttg ccagtagcgc cgctctcaag gtcacgagc 780
 tcggtggttc cgttgtctcc ctttcgact ccaagggtc tctcattgtc aaggatgagt 840
 ccgtttcttt caccctgaa gagatcgccc tcattgccga cctcaagggt gcccgcaagc 900
 aactctccga gtcgccacc tcctccgctt tcgccggcaa gttcacctac atccccgatg 960
 ctgcccttg gaccaacatt cccggcaagt tcgaggttgc tctcccttct gccactcaga 1020
 acgaagtctc cggcgaggaa gccgagcacc tcacaaagtc cgggtgtccgc tatattgctg 1080
 aggsttccaa catgggttgc acccaggcgc ccatcgacat ctttgaggct caccgcaacg 1140
 ccaaccccg cgatgccatc tggtagccc ctggtaaagc cgccaacgtt ggtggtgtcg 1200
 ccgtctctgg tcttgagatg gtcagaact ctgctcgtct ctcttgaca tccgaggagg 1260
 tcgatgctcg cctcaagggc atcatggagg actgcttcaa gaacggtctc gagactgtc 1320
 agaagttcgc tactcctgcc aaggcgctc tgccttcct cgtcaccggt tccaacattg 1380
 ccggtttcac caaggtcgcc gaggccatga aggaccaggg tgactggtgg tga 1433

<210> 2

<211> 1240

<212> DNA

<213> *Lycopersicon esculentum*

<400> 2

atgaatgctt tagcagcaac taatagaaat ttttaagctgg cagctaggct tcttggttta 60
 gactcaaagt tggaactaag tctgctaate ctttcagga aattaagggt gagtgacta 120
 taccgaagga tgatggcaca ttggcatctt ttgttgatt cagggtacag caccacaatg 180
 caccagggcc tatgaaaggc ggaatcagat accaccgga ggttgatcct gatgaggta 240
 atgcattagc acagctaattg acatggaaga cagcggctgc caatattacc atatggtggg 300

```

gctaaaggag gaataggatg tagtcctagt gacctgagta tctctgagtt ggaacgactt 360
actcgagtat ttactcaaaa aatacatgac ctaatcgga ttcacaccga tgttcctgca 420
ccagatatgg gaacaaatcc tcagacaatg gcatggattt tagacgagta ctcaaaattt 480
catggttatt cacctgctgt ggtaactgga aaacctgttg atctcggtgg atctctaggc 540
agagatgcag ctactggaag ggggggctct ctttgctaca gaagccctgc ttaatgagca 600
tgggaagagt gttgctggtt cagcgttttg ttatacaggg atttgtaat gttggttcct 660
gggctgcaaa actcatccat gagcaagggt ggaaagttgt agcagtgagt gacataactg 720
gtgccataaa gaatgagaag ggaatcgaca tagaaagcct attcaaacac gtgaaggaaa 780
ctcgtggagt taaaggtttc catgatgcac atccaattga tgcaaattca atactggtag 840
aagactgtga tgttcttata ccagctgccc tcggtggagt aatcaacaag gataaccaca 900
aattgaaaat taaagccaaa tatattattg aggctgctaa ccatccaact gatccagaag 960
ctgatgagat ttgtcaaaga aaggagtcac catcctaccg gatattttatg ccaactcggg 1020
tgggtgcacc gtcagttatt ttgagtgggt ccagaacatc caaggcttta tgtgggatga 1080
gaaaaaagtg aatgatgagt tgaagacata catgacaaga ggtttttaaag atgtcaagga 1140
tatgtgcaag actcacaact gtgacctccg aatgggcgcc ttcaccttag gtgttaaccg 1200
tgtagctaga gcaaccgttc ttcgaggatg ggaggcgtaa 1240

```

<210> 3

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:AN-GDH A
specific PCR primer

<400> 3

tctagaatgt ctaaccttcc cgttgagc

28

<210> 4

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:AN-GDHA
specific PCR primer

<400> 4

gagctctcac caccagtcac cctgggtcc

28

<210> 5

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:legdh1 specific
PCR primer

<400> 5

tctagaatga atgctttagc agcaact

27

<210> 6

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:legdh1 specific
PCR primer

<400> 6

gagctcttac gcctcccatc ctgaag

27

<210> 7

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer for
deleting splicing region of gdh-17

<400> 7

tctagaatgt ctaaccttcc cgttgagc

28

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer for
deleting the splicing region of gdh-17

<400> 8

cacccatgtt tagtcctgtg agag

24

<210> 9

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer for
deleting the splicing region of gdh-17

<400> 9

ctctcacagg actaaacatg ggtg

24

<210> 10

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer for
deleting the splicing region of gdh-17

<400> 10

gagctctcac caccagtcac cctggtcc

28

<210> 11

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer for amplifying
the coding sequence for mitochondria transit peptide

<400> 11

ggatccatga atgctttagc agcaac

26

<210> 12

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer for amplifying
the coding sequence for mitochondria transit peptide

<400> 12

tctagataaaa ccaagaagcc tagctg

26

<210> 13

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer for amplifying
the coding sequence for chloroplast transit peptide

<400> 13

ctgcagatgg cttcctcaat tgtctcatcg 30

<210> 14

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer for amplifying
the coding sequence for chloroplast transit peptide

<400> 14

tctagagcat ctaacgcgtc caccattgct 30

<210> 15

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer for
producing mitochondria transit peptide-GDH coding
sequence

<400> 15

tctagaatga atgctttagc agcaac 26

<210> 16

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer for
producing mitochondria transit peptide-GDH coding
sequence

<400> 16

gggaagggtta gacattaaac caagaagcct

30

<210> 17

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer for
producing mitochondria transit peptide-GDH coding
sequence

<400> 17

aggcttcttg gtttaatgtc taaccttccc

30

<210> 18

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer for
producing mitochondria transit peptide-GDH coding
sequence

<400> 18

gagctcttac gcctcccatc ctcgaa

26

<210> 19

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer for
producing chloroplast transit peptide-GDH coding
sequence

<400> 19

ctgcagatgg cttcctcaat tgtctcatcg

30

<210> 20

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer for
producing chloroplast transit peptide-GDH coding
sequence

<400> 20

aaggttagac atgcatctac cgcg

24

<210> 21

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer for
producing chloroplast transit peptide-GDH coding
sequence

<400> 21

cgcgttagat gcatgtctaa cctt

24

<210> 22

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer for
producing chloroplast transit peptide-GDH coding
sequence

<400> 22

gagctcttac gcctcccatc ctcgaa

26

<210> 23

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer for
amplifying 2A11 promoter region

<400> 23

aagcttatat aaccctaaaat atacta

26

<210> 24

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer for
amplifying 2A11 promoter region

<400> 24

tctagaggta ccattaattg ctaatt

26

<210> 25

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer for
amplifying Nos-promoter-NPTII region

<400> 25

cccctcggta tccaattaga g

21

<210> 26

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer for
amplifying Nos-promoter-NPTII region

<400> 26

cgggggggtgg gcgaagaact ccag

24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/05077

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ A01H5/00, C12N15/53, C12N15/83

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ A01H5/00, C12N15/53, C12N15/83

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

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

JICST FILE (JOIS), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Mol. Gen. Genet., Vol.218[1], (1989), pages 105 to 111	1-25
Y	Gene, Vol.186[2], (1997), pages 249 to 254	1-25
Y	Plant Mol. Biol., Vol.21[4], (1993), pages 625 to 640	1-25



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
25 September, 2001 (25.09.01)

Date of mailing of the international search report
09 October, 2001 (09.10.01)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A01H5/00, C12N15/53, C12N15/83

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A01H5/00, C12N15/53, C12N15/83

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICSTファイル (JOIS)
BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Mol. Gen. Genet., vol. 218[1] (1989), p. 105-111	1-25
Y	Gene, vol. 186[2] (1997), p. 249-254	1-25
Y	Plant Mol. Biol., vol. 21[4] (1993), p. 625-640	1-25

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

25.09.01

国際調査報告の発送日

09.10.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

坂田 誠

2B

9318

電話番号 03-3581-1101 内線 3237