

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-224120

(P2005-224120A)

(43) 公開日 平成17年8月25日(2005.8.25)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 B O 3 O
A O 1 H 5/00	A O 1 H 5/00 A	4 B O 2 4
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 5/00 C	4 B O 6 5

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 18 頁)

(21) 出願番号	特願2004-33675 (P2004-33675)	(71) 出願人	501167644 独立行政法人農業生物資源研究所 茨城県つくば市観音台2丁目1-2
(22) 出願日	平成16年2月10日(2004.2.10)	(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
		(74) 代理人	100096183 弁理士 石井 貞次
		(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
		(74) 代理人	100120905 弁理士 深見 伸子
		(72) 発明者	市川 裕章 茨城県つくば市観音台2丁目1-2 独立 行政法人 農業生物資源研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 構成的発現プロモーター

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 目的遺伝子を植物体内で構成的に発現させるプロモーター活性を有するDNA、該DNAを含有し、目的遺伝子を植物体内で構成的に発現させることを可能にした組換えプラスミド、該組換えベクターを導入した形質転換植物体を提供すること。

【解決手段】 以下の(a)、(b)又は(c)に示す、プロモーターとして機能しうるDNA。(a)特定の塩基配列からなるDNA (b)特定の塩基配列において、1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつ目的遺伝子を植物体内で構成的に発現させるプロモーター活性を有するDNA (c)特定の塩基配列の一部の塩基配列からなり、かつ目的遺伝子を植物体内で構成的に発現させるプロモーター活性を有するDNA。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

以下の ( a )、( b ) 又は ( c ) に示す、プロモーターとして機能しうる DNA。

( a ) 配列表の配列番号 1、4、7、10、13 又は 16 に示す塩基配列からなる DNA

( b ) 配列表の配列番号 1、4、7、10、13 又は 16 に示す塩基配列において、1 若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつ目的遺伝子を植物体内で構成的に発現させるプロモーター活性を有する DNA

( c ) 配列表の配列番号 1、4、7、10、13 又は 16 に示す塩基配列の一部の塩基配列からなり、かつ目的遺伝子を植物体内で構成的に発現させるプロモーター活性を有する DNA

10

## 【請求項 2】

請求項 1 に記載の DNA と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ目的遺伝子を植物体内で構成的に発現させるプロモーター活性を有する DNA。

## 【請求項 3】

請求項 1 又は 2 に記載の DNA を含有する組換えベクター。

## 【請求項 4】

請求項 1 又は 2 に記載の DNA と目的タンパク質をコードする遺伝子を含有する組換えベクター。

## 【請求項 5】

請求項 3 又は 4 に記載の組換えベクターを導入した形質転換植物体。

20

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、目的遺伝子を植物体内で構成的に発現させるプロモーター及びその使用に関するものである。

## 【背景技術】

## 【0002】

植物細胞内で機能可能なプロモーターの下流に発現させたい目的タンパク質をコードする遺伝子を連結させた融合遺伝子を植物細胞に導入し、得られた植物細胞を通常の植物組織培養技術により再生させる方法によって、所望の形質を有する改良植物体を作成することが行われている。

30

## 【0003】

プロモーターの種類としては、構成的、誘導的、組織・器官特異的、時期特異的プロモーターがある。プロモーターは、遺伝子発現の目的に応じて選択され、例えば、特定の刺激に応答して目的遺伝子を発現させる場合は誘導的プロモーター、必要な時期に特定の組織・器官に目的遺伝子の発現を局所化させたい場合は、組織・器官特異的又は時期特異的プロモーターが用いられる。しかしながら、そのような特異性が高くなく、全ての組織において常時目的遺伝子を発現させるプロモーター、すなわち、構成的プロモーターは植物

40

遺伝子工学において最も汎用されており、ニーズも多い。構成的プロモーターには、例えば、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35S RNA 遺伝子のプロモーター (非特許文献 1)、アグロバクテリウム Ti プラスミド由来ノパリン合成酵素遺伝子のプロモーター (Pnos) (非特許文献 2)、トウモロコシ由来ユビキチン遺伝子のプロモーター (非特許文献 3)、イネ由来のアクチン遺伝子のプロモーター (非特許文献 4) 等が報告されている。

## 【0004】

【非特許文献 1】 Odell J.T., et al., Nature, 313, 810-812 (1985)

【非特許文献 2】 Shaw, C.H., Nucleic Acids Res., 12(20):7831-7846 (1984)

【非特許文献 3】 Cornejo MJ., et al., Plant Mol Biol, 23(3), 567-581 (1993)

50

【非特許文献4】McElroy, D. et al., Plant Cell, 2, 163-171 (1990)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

従って、本発明の目的は、目的遺伝子を植物体内で構成的に発現させるプロモーター活性を有するDNA、該DNAを含有する遺伝子を植物体内で構成的に発現させることを可能にした組換えプラスミド、該組換えベクターを導入した形質転換植物体を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは、上記課題を解決すべく、イネゲノム配列情報、イネESTの出現頻度情報、イネ完全長cDNA配列情報等 (<http://www.dna.affrc.go.jp/>) を参考にしつつ鋭意研究を重ねた結果、種々の組織に特異的な発現パターンを有すると期待されるイネ遺伝子を約100種選定し、選定された各遺伝子の5'上流域をポリメラーゼ連鎖反応(PCR)で増幅した断片の中から、目的遺伝子を植物体内で構成的に発現させるプロモーター活性を有するDNA断片を得ることに成功し、本発明を完成させるに至った。

【0007】

即ち、本発明は以下の発明を包含する。

(1) 以下の(a)、(b)又は(c)に示す、プロモーターとして機能しうるDNA。

(a) 配列表の配列番号1、4、7、10、13又は16に示す塩基配列からなるDNA

(b) 配列表の配列番号1、4、7、10、13又は16に示す塩基配列において、1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつ目的遺伝子を植物体内で構成的に発現させるプロモーター活性を有するDNA

(c) 配列表の配列番号1、4、7、10、13又は16に示す塩基配列の一部の塩基配列からなり、かつ目的遺伝子を植物体内で構成的に発現させるプロモーター活性を有するDNA

(2) (1)に記載のDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ目的遺伝子を植物体内で構成的に発現させるプロモーター活性を有するDNA。

(3) (1)又は(2)に記載のDNAを含有する組換えベクター。

(4) (1)又は(2)に記載のDNAと目的タンパク質をコードする遺伝子を含有する組換えベクター。

(5) (3)又は(4)に記載の組換えベクターを導入した形質転換植物体。

【発明の効果】

【0008】

本発明によれば、目的遺伝子を植物体内で構成的に発現させるプロモーター活性を有するDNAが提供される。このプロモーター活性を有するDNAを利用すれば、特定の組織・器官(葉、茎、根、花、雌蕊、雄蕊、カルスなど)、時期(生育初期、中期、後期)、刺激誘導(光、病害、環境ストレスなど)などに限定されることなく、植物の多様な組織・器官、かつ生育の多様な時期において目的遺伝子を発現させることができる。

【0009】

従って、本発明は、植物における有用物質の生産性向上、植物の生長制御、耐病性遺伝子の発現による耐病性付与、環境ストレス抵抗性遺伝子の発現による環境ストレス抵抗性の付与、植物における物質(水、栄養塩、糖など)輸送・分配の制御等に有用である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

1. プロモーター及びその単離

本発明に係るプロモーターとして機能しうるDNA(以下、「プロモーター」という)は、配列番号1、4、7、10、13又は16に示す塩基配列からなるDNAである。

【0011】

10

20

30

40

50

本発明のDNAは、目的タンパク質をコードする遺伝子（以下、「目的遺伝子」という）の翻訳開始点の5'側に挿入することにより、該目的遺伝子の植物体における構成的発現を誘導し、又は該目的遺伝子を植物体の各組織・器官において高レベルで発現させることができる。

#### 【0012】

また、本発明のDNAには、配列番号1、4、7、10、13又は16に示す塩基配列において1以上の塩基が置換、欠失、付加又は挿入された塩基配列からなり、かつ目的遺伝子を植物体内で構成的に発現させるプロモーター活性を有するDNAも含まれる。ここで、置換、欠失、付加又は挿入されてもよい塩基の数は特に限定されないが、好ましくは1個～数個である。例えば、配列番号1、4、7、10、13又は16に示す塩基配列の1～10個、好ましくは1～5個の塩基が欠失してもよく、配列番号1、4、7、10、又は13に示す塩基配列に1～10個、好ましくは1～5個の塩基が付加してもよく、あるいは、配列番号1、4、7、10、13又は16に示す塩基配列の1～10個、好ましくは1～5個の塩基が他の塩基に置換してもよい。

10

#### 【0013】

さらに、本発明のDNAには、配列番号1、4、7、10、13又は16に示す塩基配列の一部の塩基配列からなり、かつ目的遺伝子を植物体内で構成的に発現させるプロモーター活性を有するDNAも含まれる。

配列番号1、4、7、10、13又は16に示す塩基配列からなるDNAにおけるプロモーター活性に必須な部分は、該DNAの様々な欠失体、例えば、5'上流側から様々な長さ  
に欠損させたDNA断片をベータグルクロニダーゼ（GUS）遺伝子等のリポーター遺伝子を融合させたプラスミドを宿主に導入し、プロモーター活性を測定することによって特定でき、そのような活性部分の特定のための手法は、当業者には公知である。

20

#### 【0014】

このような変異体DNAは、目的遺伝子を植物体内で構成的に発現させるプロモーター活性（以下、「構成的発現プロモーター活性」という）を有していればよく、その活性の大きさは特に限定されないが、配列番号1、4、7、10、13又は16に示す塩基配列からなるDNAの構成的発現プロモーター活性を実質的に保持することが好ましい。「配列番号1、4、7、10、13又は16に示す塩基配列からなるDNAの構成的発現プロモーター活性を実質的に保持する」とは、該プロモーター活性を利用した実際の使用態様において、配列番号1、4、7、10、13又は16に示す塩基配列からなるDNAと、同一の条件でほぼ同様の利用が可能程度の活性が維持されていることをいう。

30

#### 【0015】

本発明において「構成的発現プロモーター活性」とは、目的遺伝子を植物体の多様な組織・器官において、生育時期（あるいは生育ステージ）に限定されることなく高度に発現させる活性をいう。

全ての組織・器官とは、葉、花（雌蕊、雄蕊）、茎、根、維管束（根などの植物体地下部組織の維管束系、茎や葉脈などの地上部組織（シュート）の維管束系）、カルスなどを含む。

#### 【0016】

上記のような変異体DNAを取得するための遺伝子変異導入は、Kunkel法又は Gapped duplex法等の公知手法又はこれに準ずる方法によって行うことができ、例えば部位特異的突然変異誘発法を利用した変異導入用キット（例えばMutant-K（TAKARA社製）やMutant-G（TAKARA社製））、TAKARA社のLA PCR in vitro Mutagenesis シリーズキットを利用することができる。

40

#### 【0017】

さらに、当業者であれば、配列番号1、4、7、10、13又は16に示す塩基配列の全部又は一部からなるDNAを用いて、配列番号1、4、7、10、13又は16に示す塩基配列からなるDNAと同様の機能、すなわち、構成的発現プロモーター活性を有する他の塩基配列からなるDNAを種々の生物から新たに取得し、利用することも容易である。この

50

ような他の塩基配列からなるDNAの取得は、例えば、配列番号1、4、7、10、13又は16に示す塩基配列の全部又は一部からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズさせるハイブリダイゼーション、該塩基配列の一部をプライマーとして用いるPCR等によって行うことができる。ここで、ストリンジェントな条件とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。例えば、相同性が高い核酸、すなわち配列番号1、4、7、10、13又は16に示す塩基配列と90%以上、好ましくは95%以上の相同性を有する塩基配列からなるDNAの相補鎖がハイブリダイズし、それより相同性が低い核酸の相補鎖がハイブリダイズしない条件が挙げられる。より具体的には、ナトリウム濃度が10~300mM、好ましくは15~75mMであり、温度が25 ~ 70、好ましくは42 ~ 55 での条件をいう。

10

## 【0018】

上記のように取得した変異体DNAやハイブリダイゼーションにより得られるホモログがプロモーターとしての活性を有するか否かは、種々のレポーター遺伝子、例えばベータグルクロニダーゼ(GUS)、ルシフェラーゼ(LUC)、Green fluorescent protein(GFP)、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)、ベータガラクトシダーゼ(LacZ)、ノパリン合成酵素(NOS)、オクトピン合成酵素(OCS)等の遺伝子を上記プロモーターの下流域に連結したベクターを作製し、該ベクターを用いて従来から周知慣用されている種々の形質転換法(後述)により植物細胞のゲノムに挿入した後、該レポーター遺伝子の発現を測定することにより確認できる。

## 【0019】

例えば、レポーター遺伝子がGUSの場合には、宿主細胞内でのプロモーター活性は、(i)ヒストケミカルなGUS染色による方法(EMBO J. 6, 3901-3907 (1987))により、及び/又は(ii)蛍光基質を用いるCastle & Morrisの方法(Plant Molecular Biology Manual, B5, 1-16 (1994); S.B. Gelvin & R.A. Schilperoort, Kluwer Academic Publishers)に従ってGUS活性を測定し、さらにBradfordの方法(Anal. Biochem. 72, 248-254 (1976))に従ってタンパク質量を測定して、GUS活性をタンパク質量あたりに換算する(nmole 4-MU/min/mg proteinとして算出する)ことにより、それぞれ確認することができる。

20

## 【0020】

本発明のプロモーターは、以下の(i)~(vi)のいずれかのイネ遺伝子の5'上流ゲノム領域(あるいは配列)を単離することによって取得できる。

30

## (i)イネSEC13遺伝子

イネ(日本晴)の第7番染色体ゲノム上に存在し、配列番号3に示すアミノ酸配列を有するSEC13タンパク質をコードするイネ遺伝子[DDBJ(<http://www.ddbj.nig.ac.jp>):アクセッション番号AK111786](塩基配列:配列番号2)

## (ii)イネRPL5遺伝子

イネ(日本晴)の第1番染色体ゲノム上に存在し、配列番号6に示すアミノ酸配列を有する5SリボソームRNA結合タンパク質L5(RPL5)をコードするイネ遺伝子[DDBJ(<http://www.ddbj.nig.ac.jp>):アクセッション番号AK065268](塩基配列:配列番号5)

## (iii)イネHMG1遺伝子

イネ(日本晴)の第6番染色体ゲノム上に存在し、配列番号9に示すアミノ酸配列を有するDNA結合タンパク質(High mobility group protein:HMG1)をコードするイネ遺伝子[DDBJ(<http://www.ddbj.nig.ac.jp>):アクセッション番号AK068898](塩基配列:配列番号8)

40

## 【0021】

## (iv)イネOLP1遺伝子

イネ(日本晴)の第1番染色体ゲノム上に存在し、配列番号12に示すアミノ酸配列を有するオスモチン様タンパク質(osmotin-like protein:OLP1)をコードするイネ遺伝子[DDBJ(<http://www.ddbj.nig.ac.jp>):アクセッション番号AK060655](塩基配列:配列番号11)

## (v)イネGF14b遺伝子

50

イネ（日本晴）の第4番染色体ゲノム上に存在し、配列番号15に示すアミノ酸配列を有する14-3-3タンパク質（GF14b）をコードするイネ遺伝子〔DDBJ（<http://www.ddbj.nig.ac.jp>）：アクセッション番号AK071822〕（塩基配列：配列番号14）

(vi)イネGAPDH遺伝子

イネ（日本晴）の第2番染色体ゲノム上に存在し、配列番号18に示すアミノ酸配列を有するグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素（GAPDH）をコードするイネ遺伝子〔DDBJ（<http://www.ddbj.nig.ac.jp>）：アクセッション番号AK099086〕（塩基配列：配列番号17）

【0022】

プロモーター領域を単離する方法としては、特に限定されないが、例えば、インバースPCR、ゲノムDNAライブラリーから単離する方法等を例示することができる。 10

【0023】

インバースPCRによる場合は、上記の(i)~(vi)のイネ遺伝子（以下、「イネ遺伝子」という）の塩基配列情報に基づいて一对のプライマーを合成し、これら一对のプライマーと所定の制限酵素で処理した後にセルフライゲーションさせたゲノムDNA断片とを用いてPCRを行うことによって、イネ遺伝子の上流領域を増幅することができる。その後、イネ遺伝子の上流領域をクローニングし塩基配列を決定することによって、イネ遺伝子のプロモーター領域の単離、及び塩基配列（配列番号1、4、7、10、13又は16）の決定を行うことができる。

【0024】

また、ゲノムDNAライブラリーから単離する場合には、イネ遺伝子を含むcDNAをプローブとして、定法に従って調製したゲノムDNAライブラリーからイネ遺伝子を含むゲノムDNAをスクリーニングする。その後、スクリーニングしたゲノムDNAの塩基配列を決定することによってイネ遺伝子の上流領域に存在するプロモーター領域を特定することができ、さらに、該プロモーター領域のみをPCR等によって増幅してクローニングすることによって単離することができる。 20

【0025】

いったん本発明のプロモーターの塩基配列が確定されると、その後は化学合成によって、あるいはその塩基配列の一部からなるDNAをプライマーとして合成し、イネの全DNAを鋳型として用いて、該プライマーを用いるPCRによって容易に得ることができる。 30

【0026】

さらに、単離したプロモーター領域（配列番号1、4、7、10、13又は16）の一部を用いてプロモーター活性を測定することによって、単離したプロモーター領域（配列番号1、4、7、10、13又は16）において、プロモーター活性に寄与している領域を特定することができる。プロモーター領域の一部は、該プロモーター領域の一部をPCRによって増幅する方法、プロモーター領域を所定の制限酵素で処理して断片化する方法等を適宜使用して得ることができる。

【0027】

得られたプロモーター領域の一部は、発現量を定量できる遺伝子の上流に組み込み、該遺伝子の発現量を定量することによってプロモーター活性を測定することができる。すなわち、得られたプロモーター領域の一部及び所定の遺伝子を組み込んでなる組換えベクターを構築し、該組換えベクターを用いて形質転換した細胞における該遺伝子の発現量を定量することによって、得られたプロモーター領域の一部におけるプロモーター活性を測定することができる。 40

【0028】

## 2. 組換えベクター

本発明の組換えベクターは、上記1.のプロモーターに目的遺伝子を連結した遺伝子を適当なベクターに導入することにより構築することができる。ここで、ベクターとしては、アグロバクテリウムを介して植物に目的遺伝子を導入することができる、pBI系、pPZP系（Hajdukiewicz P, Svab Z, Maliga P.: The small, versatile pPZP family of Agrob 50

acterium binary vectors for plant transformation., Plant Mol Biol., 25: 989-94, 1994)、pCAMBIA系 ([http://www.cambia.org/main/r\\_et\\_camvec.htm](http://www.cambia.org/main/r_et_camvec.htm))、pSMA系のベクターなどが好適に用いられる。特にpBI系のバイナリーベクター又は中間ベクター系が好適に用いられ、例えば、pBI121、pBI101、pBI101.2、pBI101.3等が挙げられる。バイナリーベクターとは大腸菌 (*Escherichia coli*) 及びアグロバクテリウムにおいて複製可能なシャトルベクターで、バイナリーベクターを保持するアグロバクテリウムを植物に感染させると、ベクター上にあるLB配列とRB配列より成るボーダー配列で囲まれた部分のDNAを植物核DNAに組み込むことが可能である (EMBO Journal, 10(3), 697-704 (1991))。一方、pUC系のベクターは、植物に遺伝子を直接導入することができ、例えば、pUC18、pUC19、pUC9等が挙げられる。また、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV)、インゲンマメモザイクウイルス (BGMV)、タバコモザイクウイルス (TMV) 等の植物ウイルスベクターも用いることができる。

10

## 【0029】

ベクターに目的遺伝子を挿入するには、まず、精製されたDNAを適当な制限酵素で切断し、適当なベクター DNAの制限酵素部位又はマルチクローニングサイトに挿入してベクターに連結する方法などが採用される。

## 【0030】

目的遺伝子としては、対象となる植物における内因性遺伝子、または外来遺伝子であって、その遺伝子産物の発現が植物体内の各組織・器官において所望される任意の遺伝子という。かかる遺伝子としては、有用物質 (医薬、色素、芳香成分など) 生産遺伝子、植物生長制御 (促進/抑制) 遺伝子、耐病虫害性 [昆虫食害抵抗性、カビ (菌類) 及び細菌病抵抗性、ウイルス (病) 抵抗性など] 遺伝子、環境ストレス (低温、高温、乾燥、光障害、紫外線) 抵抗性遺伝子、糖代謝関連遺伝子、糖、窒素源、イオンなどのトランスポーター遺伝子等が挙げられるが、これらに限定はされない。

20

## 【0031】

上記の目的遺伝子は、その遺伝子の機能が発揮されるようにベクターに組み込まれることが必要である。そこで、ベクターには、目的遺伝子の上流、内部、あるいは下流に、本発明のプロモーター、エンハンサー、イントロン、ポリA付加シグナル、5'-UTR配列、選抜マーカー遺伝子などを連結することができる。

## 【0032】

エンハンサーとしては、例えば、目的遺伝子の発現効率を高めるために用いられ、CaMV 35Sプロモーター内の上流側の配列を含むエンハンサー領域などが挙げられる。

30

## 【0033】

ターミネーターとしては、前記プロモーターにより転写された遺伝子の転写を終結できる配列であればよく、例えば、ノパリン合成酵素 (NOS) 遺伝子のターミネーター、オクトピン合成酵素 (OCS) 遺伝子のターミネーター、CaMV 35S RNA遺伝子のターミネーター等が挙げられる。

## 【0034】

選抜マーカー遺伝子としては、例えば、ハイグロマイシン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、ピアラホス耐性遺伝子、プラストサイジンS耐性遺伝子、アセト乳酸合成酵素 (Acetolactate synthase) 遺伝子などが挙げられる。

40

また、選抜マーカー遺伝子は、上記のように目的遺伝子とともに同一のプラスミドに連結させて組換えベクターを調製してもよいが、あるいは、選抜マーカー遺伝子をプラスミドに連結して得られる組換えベクターと、目的遺伝子をプラスミドに連結して得られる組換えベクターとを別々に調製してもよい。別々に調製した場合は、各ベクターを宿主にコトランスフェクト (共導入) する。

## 【0035】

## 3. 形質転換植物体

上記2. で調製した組換えベクターを用いて、対象植物を形質転換し、形質転換植物体を調製することができる。

50

形質転換植物体を調製する際には、既に報告され、確立されている種々の方法を適宜利用することができ、その好ましい例として、アグロバクテリウム法、PEG-リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、リポソーム法、パーティクルガン法、マイクロインジェクション法等が挙げられる。アグロバクテリウム法を用いる場合は、プロトプラストを用いる場合、組織片を用いる場合、及び植物体そのものを用いる場合(in planta法)がある。プロトプラストを用いる場合は、Tiプラスミドをもつアグロバクテリウムと共存培養する方法、スフェロプラスト化したアグロバクテリウムと融合する方法(スフェロプラスト法)、組織片を用いる場合は、対象植物の無菌培養葉片(リーフディスク)に感染させる方法やカルスに感染させる等により行うことができる。また種子あるいは植物体を用いるin planta法を適用する場合、すなわち植物ホルモン添加の組織培養を介さない系では、吸水種子、幼植物(幼苗)、鉢植え植物などへのアグロバクテリウムの直接処理等にて実施可能である。

10

20

30

40

50

#### 【0036】

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

#### 【0037】

本発明において形質転換に用いられる植物としては、イネ、ムギ、トウモロコシ、ネギ、ユリ、ラン等の単子葉植物、ダイズ、ナタネ、トマト、パレイショ、キク、バラ、カーネーション、ペチュニア、カスミソウ、シクラメン等の双子葉植物などの植物が挙げられ、特に限定はされない。好ましくは、本発明のDNAが単離されたイネ科の植物、例えば、イネ、オオムギ、コムギ、トウモロコシ、サトウキビ、シバ、ソルガム、アワ、及びヒエなどの植物が挙げられる。

#### 【0038】

本発明において、形質転換の対象とする植物材料としては、例えば、根、茎、葉、種子、胚、胚珠、子房、茎頂(植物の芽の先端の生長点)、葯、花粉等の植物組織やその切片、未分化のカルス、それを酵素処置して細胞壁を除いたプロプラスト等の植物培養細胞が挙げられる。またin planta法適用の場合、吸水種子や植物体全体を利用し得る。

#### 【0039】

また、本発明において形質転換植物体とは、植物体全体、植物器官(例えば根、茎、葉、花卉、種子、種子、実等)、植物組織(例えば表皮、師部、柔組織、木部、維管束等)、植物培養細胞のいずれをも意味するものである。

#### 【0040】

植物培養細胞を対象とする場合において、得られた形質転換細胞から形質転換体を再生させるためには既知の組織培養法により器官又は個体を再生させればよい。このような操作は、植物細胞から植物体への再生方法として一般的に知られている方法により、当業者であれば容易に行うことができる。植物細胞から植物体への再生については、例えば、以下のように行うことができる。

#### 【0041】

まず、形質転換の対象とする植物材料として植物組織又はプロトプラストを用いた場合、これらが無機要素、ビタミン、炭素源、エネルギー源としての糖類、植物生長調節物質(オーキシン、サイトカイニン等の植物ホルモン)等を加えて滅菌したカルス形成用培地中で培養し、不定形に増殖する脱分化したカルスを形成させる(以下「カルス誘導」という)。このように形成されたカルスをオーキシン等の植物生長調節物質を含む新しい培地に



移しかえて更に増殖（継代培養）させる。

【0042】

カルス誘導は寒天等の固型培地で行い、継代培養は例えば液体培養で行うと、それぞれの培養を効率良くかつ大量に行うことができる。次に、上記の継代培養により増殖したカルスを適当な条件下で培養することにより器官の再分化を誘導し（以下、「再分化誘導」という）、最終的に完全な植物体を再生させる。再分化誘導は、培地におけるオーキシンやサイトカイニン等の植物生長調節物質、炭素源等の各種成分の種類や量、光、温度等を適切に設定することにより行うことができる。かかる再分化誘導により、不定胚、不定根、不定芽、不定茎葉等が形成され、更に完全な植物体へと育成させる。あるいは、完全な植物体になる前の状態（例えばカプセル化された人工種子、乾燥胚、凍結乾燥細胞及び組織等）で貯蔵等を行ってもよい。

【0043】

本発明の形質転換植物体は、形質転換処理を施した再分化当代である「T1世代」のほか、その植物の種子から得られた後代である「T2世代」、薬剤選抜あるいはサザン法等による解析によりトランスジェニックであることが判明した「T2世代」植物の花を自家受粉して得られる次世代（T3世代）などの後代植物をも含む。

【実施例】

【0044】

以下、実施例によって本発明を更に具体的に説明するが、これらの実施例は本発明を限定するものでない。

【0045】

（実施例1） イネ遺伝子プロモーター配列の単離及び形質転換用ベクターへの導入

（1）プロモーターの単離

(i) イネSEC13遺伝子プロモーター

配列番号2に示す塩基配列を有するイネSEC13遺伝子（DDBJ（<http://www.ddbj.nig.ac.jp>）：アクセッション番号AK111786）の5'上流域に位置するプロモーター配列の単離をゲノミックPCR法にて行った。イネ（品種：日本晴）幼植物体の緑葉よりDNeasy Plant Mini Kit（キアゲン社）を使って抽出したゲノムDNAを鋳型とし、DDBJ（<http://www.ddbj.nig.ac.jp>：アクセッション番号AP003821）に登録されているイネゲノム配列情報から設計されたプライマーSEC13-5 [5' - ATGCAAGCTTCGACGGATAGTAGCATCATC -3'（下線部はHindIII制限酵素認識部位）：配列番号19]とSEC13-3 [5' - ATGCCCTAGGTTCAAAGCTATAGTGTGCC -3'（下線部は、AvrII制限酵素認識部位）：配列番号20]をプライマーとして用い、PCRを行った。mRNAの情報から予測される開始コドンATGのAの位置を+1、一つ前の塩基の位置を-1とすると、プライマーは、SEC13遺伝子の-1787位から-1位までに位置する1787塩基対 [配列番号1において7位（1-6位はHindIII認識配列）の塩基から1794位（1794-1799位はAvrII認識配列）までの塩基に対応]の配列を増幅するように設計した。なお、この1787塩基対の配列中、配列番号1において818位-1750位の933塩基対の配列は転写後、イントロンとして除去されることがゲノム配列とmRNAの情報の比較から予測される配列である。また、プライマーは増幅断片のクローニングを容易にするため、増幅断片の5'末端（SEC13-5）及び3'末端（SEC13-3）に、それぞれ唯一のHindIII及びAvrII制限酵素認識部位を導入した。

【0046】

PCR後、増幅断片（約1.8kb）をEx Taqポリメラーゼ（Takara）を用いてdATP存在下で72、5分間処理して末端にAを付加し、Promega社のpGEM-T easy vector systemを用いてpGEM-T easyベクターにクローニングした。

クローニング後、インサートの塩基配列を解読し、上記の登録イネゲノム配列情報と同一であることを確認した。配列番号1にその塩基配列を示す。なお、配列番号1の塩基配列において1位～6位までの塩基配列、1794位～1799位までの塩基配列がクローニングに用いた制限酵素部位であり、1869位以降の塩基配列が転写領域である。

【0047】

10

20

30

40

50

## (ii) イネRPL5遺伝子

配列番号5に示す塩基配列を有するイネRPL5遺伝子(DDBJ(<http://www.ddbj.nig.ac.jp>):アクセッション番号AK065268)の5'上流域に位置するプロモーター配列の単離をゲノミックPCR法にて行った。イネ(品種:日本晴)幼植物体の緑葉よりDNeasy Plant Mini Kit(キアゲン社)を使って抽出したゲノムDNAを鋳型とし、DDBJ(<http://www.ddbj.nig.ac.jp>):アクセッション番号AP003349)に登録されているイネゲノム配列情報から設計されたプライマーRPL5-5[5'-ATGCAAGCTTACCGCAACTAGAAAGGGAGTC-3'(下線部はHindIII制限酵素認識部位):配列番号21]とRPL5-3[5'-ATGCCCATGGCTCCCTGGAGAGACATTATC-3'(下線部は、NcoI制限酵素認識部位):配列番号22]をプライマーとして用い、PCRを行った。プライマーは、-1949位から+690位までに位置する2639塩基対[配列番号4において7位(1-6位はHindIII認識配列)の塩基から2645位(2646-2651位はNcoI認識配列)までの塩基に対応]の配列を増幅するように設計した。なお、この2639塩基対の配列中、配列番号4において1959位-2641位の683塩基対の配列は転写後、イントロンとして除去されることがゲノム配列とmRNAの情報の比較から予測される配列である。また、プライマーは増幅断片のクローニングを容易にするため、増幅断片の5'末端(RPL5-5)及び3'末端(RPL5-3)に、それぞれ唯一のHindIII及びNcoI制限酵素認識部位を導入した。

## 【0048】

PCR後、増幅断片(約2.6kb)をEx Taqポリメラーゼ(Takara)を用いてdATP存在下で72、5分間処理して末端にAを付加し、Promega社のpGEM-T easy vector systemを用いてpGEM-T easyベクターにクローニングした。

クローニング後、インサートの塩基配列を解読し、上記の登録イネゲノム配列情報と同一であることを確認した。配列番号4にその塩基配列を示す。なお、配列番号4の塩基配列において1位~6位までの塩基配列、2646位~2651位までの塩基配列がクローニングに用いた制限酵素部位であり、1869位以降の塩基配列が転写領域である。

## 【0049】

## (iii) イネHMG1遺伝子

配列番号8に示す塩基配列を有するイネHMG1遺伝子(DDBJ(<http://www.ddbj.nig.ac.jp>):アクセッション番号AK068898)の5'上流域に位置するプロモーター配列の単離をゲノミックPCR法にて行った。イネ(品種:日本晴)幼植物体の緑葉よりDNeasy Plant Mini Kit(キアゲン社)を使って抽出したゲノムDNAを鋳型とし、DDBJ(<http://www.ddbj.nig.ac.jp>):アクセッション番号AP004685)に登録されているイネゲノム配列情報から設計されたプライマーHMG1-5[5'-ATGCAAGCTTTAATATTGGGCCTAGTAGCC-3'(下線部はHindIII制限酵素認識部位):配列番号23]とHMG1-3[5'-ATGCTCTAGATGGCTGAATCCTGCGAGAAG-3'(下線部は、AvrII制限酵素認識部位):配列番号24]をプライマーとして用い、PCRを行った。プライマーは、HMG1遺伝子の-1593位から+2位までに位置する1595塩基対[配列番号7において7位(1-6位はHindIII認識配列)の塩基から1601位(うち1601位はXbaI認識配列TCTAGAの一部)までの塩基に対応]の配列を増幅するように設計した。また、プライマーは増幅断片のクローニングを容易にするため、増幅断片の5'末端(HMG1-5)及び3'末端(HMG1-3)に、それぞれ唯一のHindIII及びXbaI制限酵素認識部位を導入した。

## 【0050】

PCR後、増幅断片(約1.6kb)をEx Taqポリメラーゼ(Takara)を用いてdATP存在下で72、5分間処理して末端にAを付加し、Promega社のpGEM-T easy vector systemを用いてpGEM-T easyベクターにクローニングした。

クローニング後、インサートの塩基配列を解読し、上記の登録イネゲノム配列情報と同一であることを確認した。配列番号7にその塩基配列を示す。なお、配列番号7の塩基配列において1位~6位までの塩基配列、1601位~1606位までの塩基配列がクローニングに用いた制限酵素部位であり、1364位以降の塩基配列が転写領域である。

## 【0051】

## (iv) イネOLP1遺伝子

配列番号 1 1 に示す塩基配列を有するイネ OLP1 遺伝子 (DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp>): アクセション番号 AK060655) の 5' 上流域に位置するプロモーター配列の単離をゲノミックPCR法にて行った。イネ (品種: 日本晴) 幼植物体の緑葉より DNeasy Plant Mini Kit (キアゲン社) を使って抽出したゲノムDNAを鋳型とし、DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp>: アクセション番号 AP003241) に登録されているイネゲノム配列情報から設計されたプライマー OLP1-5 [5' -ATGCAAGCTTATATCCGCAGGTTGTTCC-3' (下線部はHindIII制限酵素認識部位): 配列番号 2 5] と OLP1-3 [5' -ATGCCCTAGGGAGCTGACCAGGTCTCGAGC-3' (下線部は、AvrII制限酵素認識部位): 配列番号 2 6] をプライマーとして用い、PCRを行った。プライマーは、OLP1遺伝子の -2060位から -7位までに位置する 2054塩基対 [配列番号 1 0 において6位 (6位はHindIII認識配列 AAGCTTの一部) の塩基から 2059位 (2060-2065位はAvrII認識配列) までの塩基に対応] の配列を増幅するように設計した。また、プライマーは増幅断片のクローニングを容易にするため、増幅断片の5'末端 (OLP1-5) 及び3'末端 (OLP1-3) に、それぞれ唯一のHindIII及びAvrII制限酵素認識部位を導入した。

#### 【0052】

PCR後、増幅断片 (約2.1kb) を Ex Taqポリメラーゼ (Takara) を用いて dATP存在下で72、5分間処理して末端にAを付加し、Promega社の pGEM-T easy vector system を用いて pGEM-T easyベクターにクローニングした。

クローニング後、インサートの塩基配列を解読し、上記の登録イネゲノム配列情報と同一であることを確認した。配列番号 1 0 にその塩基配列を示す。なお、配列番号 1 0 の塩基配列において1位~6位までの塩基配列、2060位~2065位までの塩基配列がクローニングに用いた制限酵素部位であり、2002位以降の塩基配列が転写領域である。

#### 【0053】

(v) イネ GF14b 遺伝子

配列番号 1 4 に示す塩基配列を有するイネ GF14b 遺伝子 (DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp>): アクセション番号 AK071822) の 5' 上流域に位置するプロモーター配列の単離をゲノミックPCR法にて行った。イネ (品種: 日本晴) 幼植物体の緑葉より DNeasy Plant Mini Kit (キアゲン社) を使って抽出したゲノムDNAを鋳型とし、DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp>: アクセション番号 AL606460) に登録されているイネゲノム配列情報から設計されたプライマー GF14b-5 [5' -ATGCAAGCTTGAATGACATCACGGAAGATG-3' (下線部はHindIII制限酵素認識部位): 配列番号 2 7] と GF14b-3 [5' -ATGCCCATGGTTGCTATCTATAAATCTAAAACTCTACAAATGCCAAGTCTGCA-3' (下線部は、NcoI制限酵素認識部位): 配列番号 2 8] をプライマーとして用い、PCRを行った。プライマーは、HMG1遺伝子の -2124位から -3位までに位置する 2122塩基対 [配列番号 1 3 において8位 (1-6位はHindIII認識配列) の塩基から 2129位 (2130-2135位はNcoI認識配列) までの塩基に対応] の配列を増幅するように設計した。また、プライマーは増幅断片のクローニングを容易にするため、増幅断片の5'末端 (GF14b-5) 及び3'末端 (GF14b-3) に、それぞれ唯一のHindIII及びNcoI制限酵素認識部位を導入した。

#### 【0054】

PCR後、増幅断片 (約2.1kb) を Ex Taqポリメラーゼ (Takara) を用いて dATP存在下で72、5分間処理して末端にAを付加し、Promega社の pGEM-T easy vector system を用いて pGEM-T easyベクターにクローニングした。

クローニング後、インサートの塩基配列を解読し、上記の登録イネゲノム配列情報と同一であることを確認した。配列番号 1 3 にその塩基配列を示す。なお、配列番号 1 3 の塩基配列において1位~6位までの塩基配列、2130位~2135位までの塩基配列がクローニングに用いた制限酵素部位であり、1321位以降の塩基配列が転写領域である。

#### 【0055】

(vi) イネ GAPDH 遺伝子

配列番号 1 7 に示す塩基配列を有するイネ GAPDH 遺伝子 (DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp>): アクセション番号 AK099086) の 5' 上流域に位置するプロモーター配列の単離を

ゲノミックPCR法にて行った。イネ（品種：日本晴）幼植物体の緑葉よりDNeasy Plant Mini Kit（キアゲン社）を使って抽出したゲノムDNAを鋳型とし、DDBJ（<http://www.ddbj.nig.ac.jp>：アクセッション番号AP005385）に登録されているイネゲノム配列情報から設計されたプライマー-GAPDH5-5 [5' -ATGCAAGCTTTTGC GTTGACAACAATTGGC-3'（下線部はHindIII制限酵素認識部位）：配列番号29]とGAPDH5-3 [5' -ATGCCCATGGGTGAAAGAGAGCGGAGC-3'（下線部は、NcoI制限酵素認識部位）：配列番号30]をプライマーとして用い、PCRを行った。プライマーは、-967位から-3位までに位置する969塩基対 [配列番号16において7位（1-6位はHindIII認識配列）の塩基から975位（976-981位はNcoI認識配列）までの塩基に対応]の配列を増幅するように設計した。また、プライマーは増幅断片のクローニングを容易にするため、増幅断片の5'末端（GAPDH5-5）及び3'末端（GAPDH5-3）に、それぞれ唯一のHindIII及びNcoI制限酵素認識部位を導入した。

#### 【0056】

PCR後、増幅断片（約1.0kb）をEx Taqポリメラーゼ（Takara）を用いてdATP存在下で72、5分間処理して末端にAを付加し、Promega社のpGEM-T easy vector systemを用いてpGEM-T easyベクターにクローニングした。

クローニング後、インサートの塩基配列を解読し、上記の登録イネゲノム配列情報と同一であることを確認した。配列番号16にその塩基配列を示す。なお、配列番号16の塩基配列において1位～6位までの塩基配列、976位～981位までの塩基配列がクローニングに用いた制限酵素部位であり、761位以降の塩基配列が転写領域である。

以上のイネ遺伝子プロモーター配列のクローニング手順を図1に示す。

#### 【0057】

##### （2）植物形質転換用バイナリーTiプラスミドベクターの構築

上記のプロモーター配列をイネに導入するために、植物形質転換用バイナリーTiプラスミドベクター-pSMAHdN627-M2GUSを構築した（図2）。図2に示すように、本バイナリーベクターには、T-DNA上に植物用選抜マーカー遺伝子として、アグロバクテリウムTiプラスミド由来Nos（ノパリン合成酵素遺伝子）プロモーター：大腸菌由来HPT（ハイグロマシジン耐性）遺伝子のコード領域：Tiプラスミド由来TiaaM（トリプトファンモノオキシゲナーゼ遺伝子）ターミネーターを配置し、形質転換された植物体がハイグロマイシンB耐性を示すようにした。また、その隣接部位にベータグルクロニダーゼ（GUS）遺伝子のコード領域：Tiプラスミド由来Nosターミネーターから構成されるキメラ遺伝子を配置し、GUS遺伝子の5'上流側にプロモーター配列を挿入できるようにマルチクローニング部位を設けた。また、left border（LB）配列とright border（RB）の配列の外側には、微生物細胞で機能し得るスペクチノマイシン耐性（Sp<sup>R</sup>）遺伝子、大腸菌で機能するpBR322由来（ColE1型）複製開始領域、アグロバクテリウム細胞内においてプラスミドが安定に保持されるための配列Sta、及び複製開始領域Repを設けた。

#### 【0058】

##### （3）バイナリーベクターへのプロモーター配列の導入

pGEM-T easyベクターをHindIII及びNcoIで二重消化することにより、イネSEC13遺伝子、イネRPL5遺伝子、イネHMG1遺伝子、イネOLP1遺伝子、イネGF14b遺伝子、イネGAPDH遺伝子の各プロモーター断片をそれぞれ切り出し、（2）で構築したpSMAHdN627-M2GUSベクターの対応する部位にクローニングした。得られたプラスミドをpSMAHdN627-SEC13GUS、pSMAHdN627-RPL5GUS、pSMAHdN627-HMG1GUS、pSMAHdN627-OLP1GUS、pSMAHdN627-GF14bGUS、pSMAHdN627-GAPDHGUSとそれぞれ命名し、バイオラッド社のE. coliパルサーを用いたエレクトロポレーション法（0.2 cmキューベット、パルス条件：2.4kV/cm、25 μF、200 μs）により、アグロバクテリウムEHA105系統に導入した。

#### 【0059】

##### （実施例2）イネ形質転換

イネの形質転換は超迅速形質転換法（WO 01/06844 A1（2001）参照）により行った。イネ（品種：日本晴）種子を、70%エタノール、続いて次亜塩素酸ナトリウムで殺菌し、滅菌蒸留水ですすいで水を切った後、胚が上向きになるようN6寒天培地〔N6 salts 及び

vitamins (Chu C.C., C.S.Wang, C.C.Sun, C. Hsu, K.C. Yin, C.Y. Chu, Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources, *Sci. Sinica*, 18, 659-668 (1975)), 30 g/L ショ糖、0.3 g/L カザミノ酸、2.8 g/L プロリン、2 mg/L 2,4-D, 2 g/L ゲルライト、pH5.7) に置床し、30 かつ明条件下で5日間培養した。

#### 【0060】

一方、イネSEC13遺伝子プロモーター断片を挿入したプラスミドpSMAHdN627-SEC13GUS、イネRPL5遺伝子プロモーター断片を挿入したプラスミドpSMAHdN627-RPL5GUS、イネHMG1遺伝子プロモーター断片を挿入したプラスミドpSMAHdN627-HMG1GUS、イネOLP1遺伝子プロモーター断片を挿入したプラスミドpSMAHdN627-OLP1GUS、イネGF14b遺伝子プロモーター断片を挿入したプラスミドpSMAHdN627-GF14bGUS、イネGAPDH遺伝子プロモーター断片を挿入したプラスミドpSMAHdN627-GAPDHGUSをそれぞれ保持するアグロバクテリウムEHA105系統を、25 mg/Lクロラムフェニコール、25 mg/Lリファンピシン、及び100 mg/Lスペクチノマイシンを含むLB寒天培地にて28 で3日間培養した。続いて増殖した菌体をミクロスパーテルで少量かきとり、20 mg/Lアセトシリンゴンを含むAAM液体培地〔Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T., Kumashiro, T., Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA, *Plant J.*, 6, 271-282 (1994)〕に懸濁した。このアグロバクテリウム懸濁液に、N6D培地で5日間培養したイネ発芽種子を浸し、菌液をよく切ったあと、20 mg/Lアセトシリンゴンを含むAAM寒天培地に置床し、25 の暗条件下で3日間培養した(共存培養)。共存培養後のイネ発芽種子を滅菌水、続いて500 mg/Lカルベニシリンを含む滅菌水で洗浄し、滅菌ろ紙上で余分な水分を切った後にシュート基部を四分割し、500 mg/Lカルベニシリン及び30 mg/LハイグロマイシンBを含むN6D寒天培地に置床し、30 の明条件下で14日間培養した。その後、成長してきたシュート基部を、組換え体再分化及び選択培地〔植物体再分化培地：MS salts及びvitamins (Murashige, T., Skoog, F., A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant*, 15, 473-497 (1962)), 30 g/l ショ糖、30 g/l ソルビトール、2 g/l カザミノ酸、0.02 mg/l NAA、2 mg/l カイネチン、2 g/l ゲルライト、pH 5.8) に、300 mg/Lカルベニシリン + 30 mg/LハイグロマイシンBを添加したもの；Toki, S., 1997, Rapid and Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of rice, *Plant Mol Biol. Rep.*, 15: 16-21参照)に移し、30 かつ明条件下で14日間培養し、さらにこの操作をもう一度繰り返し、ハイグロマイシン耐性を有する植物体を再分化させた。このようにして得られた再分化個体をMSホルモンフリー寒天培地〔MS salts 及びvitamins (Murashige, T.ら、前掲)、30g/l ショ糖、4 g/l ゲルライト、pH5.8) に移植し、30 、明条件下で1~2週間生育させ、シュート(地上部)の伸長、及び発根とその伸長を促した。シャーレ(直径9 cm)内で形質転換体のシュート及び根の長さが約10 cmあるいはそれ以上の長さに到達した際、培養土に移植し、遺伝子組換え体育成用グロースチャンバーにて明期14時間(30 ) - 暗期10時間(25 )のサイクルでさらに生育させた。

#### 【0061】

(実施例3) 植物組織切片の作製とGUS染色による導入遺伝子の発現の観察

イネに導入したイネSEC13、RPL5、HMG1、OLP1、GF14b、GAPDH遺伝子プロモーターの活性を観察するため、GUS酵素活性の組織化学的染色を実施した。実験に用いた植物組織材料のうち、カルス、花器官、根についてはイネ個体あるいはカルス(培養細胞)から切り取った材料をそのまま反応液に浸漬した。葉身については展開葉を5~10 mmの幅で切り取り5%の寒天に包埋し、マイクロスライサー(堂阪イーエム、DTK1000)を用いて80 μmの厚さの切片を作製した〔植物細胞工学 第4巻281-285頁(1992)〕。稈基部については、根を切り取った稈(かん：イネ科植物の茎を表す用語)の根元から5-10 mmの組織を切り取り、また茎頂については前出の稈基部の直上部分を10 mmほど切り取り、葉身と同様の方法で80 μmの厚さの切片を作製した。こうして作製した植物材料をGUS活性測定用の反応液〔50 mMリン酸ナトリウムバッファー(pH 7.0)、1 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- -D-

10

20

30

40

50

glucuronide (X-Gluc)、5%(v/v) メタノール、10 $\mu$ g/mlシクロヘキシミド、1 mMジチオスレイトール]に浸漬し、37 $^{\circ}$ Cで穏やかに振盪しながら24時間置いた。その後、100%エタノールで反応液を置換して反応を停止し、さらに24時間静置することにより緑色組織の細胞より葉緑素を除去した。次にエタノールを純水で置換した後、実体顕微鏡あるいは光学顕微鏡で染色パターンを観察した。

#### 【0062】

その結果、イネSEC13遺伝子プロモーターを導入した場合、茎頂付近、稈基部、葉身、穎花、根、カルスで発現が認められた。穎花では特に花粉で発現が見られた(図3)。

イネRPL5遺伝子プロモーターを導入した場合は、稈基部、茎頂付近、葉身、根、カルスで発現が認められた。特に、根原基、根の先端で発現が著しかった(図4)。

イネHMG1遺伝子プロモーターを導入した場合は、根、葉身、稈基部、穎花、カルスで発現が認められた。穎花においては雄蕊、雌蕊、外穎、内穎ともに発現が見られた(図5)

10

イネOLP1遺伝子プロモーターを導入した場合は、根、葉身、茎頂付近、稈基部、穎花、カルスで発現が認められた。特に根端部で非常に強い発現が見られた(図6)。

イネGF14b遺伝子プロモーターを導入した場合は、根、稈基部、葉身、カルスで発現が認められた。側根分裂組織では発現されなかった(図7)。

イネGAPDH遺伝子プロモーターを導入した場合は、稈基部、葉身、根、穎花、再分化個体(T1世代)を育成して得られたT2後代種子及びT2種子由来カルスで発現が検出された。根では先端部分で強い発現が見られた(図8)。

20

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0063】

【図1】本発明のイネ遺伝子プロモーターのクローニング手順を示す。

【図2】植物形質転換用バイナリーTiプラスミドベクター：pSMAHdN627-M2GUSの構造を示す。

【図3】イネSEC13遺伝子プロモーターを導入した植物から調製した各植物材料におけるGUS染色結果を示す。

【図4】イネRPL5遺伝子プロモーターを導入した植物から調製した各植物材料におけるGUS染色結果を示す。

【図5】イネHMG1遺伝子プロモーターを導入した植物から調製した各植物材料におけるGUS染色結果を示す。

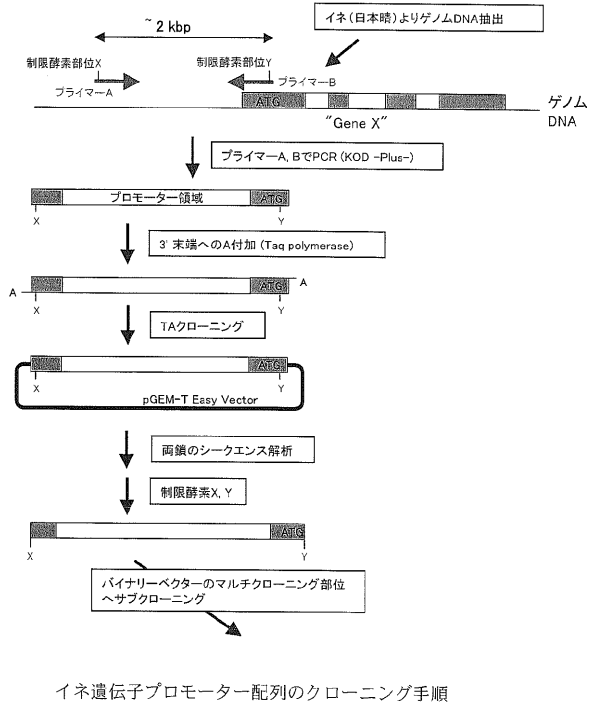
30

【図6】イネOLP1遺伝子プロモーターを導入した植物から調製した各植物材料におけるGUS染色結果を示す。

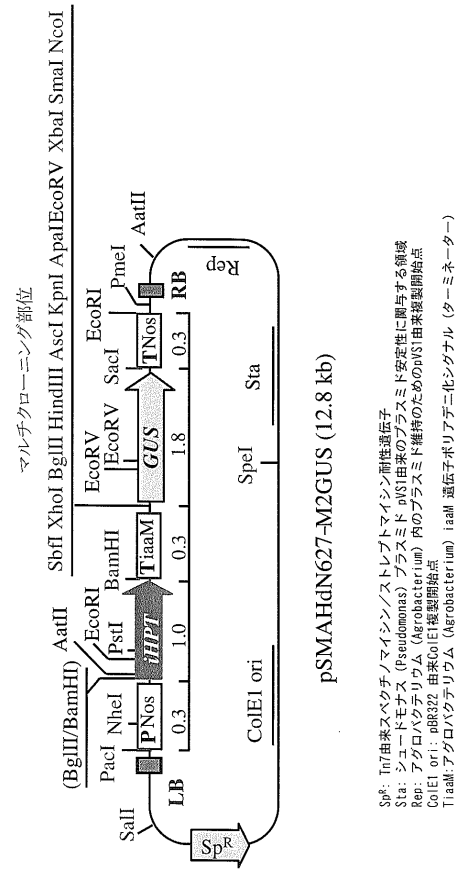
【図7】イネGF14b遺伝子プロモーターを導入した植物から調製した各植物材料におけるGUS染色結果を示す。

【図8】イネGAPDH遺伝子プロモーターを導入した植物から調製した各植物材料におけるGUS染色結果を示す。

【 図 1 】

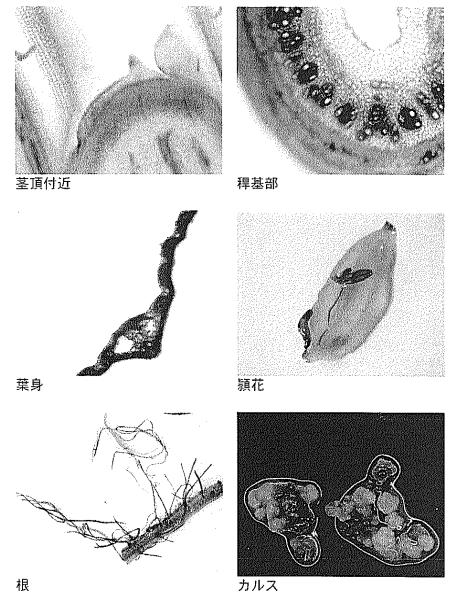


【 図 2 】

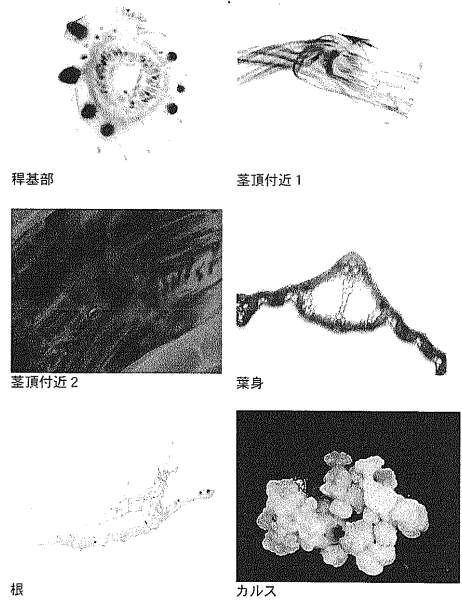


植物形質転換用バイナリーTiプラスミドベクター: pSMAHdN627-M2GUS

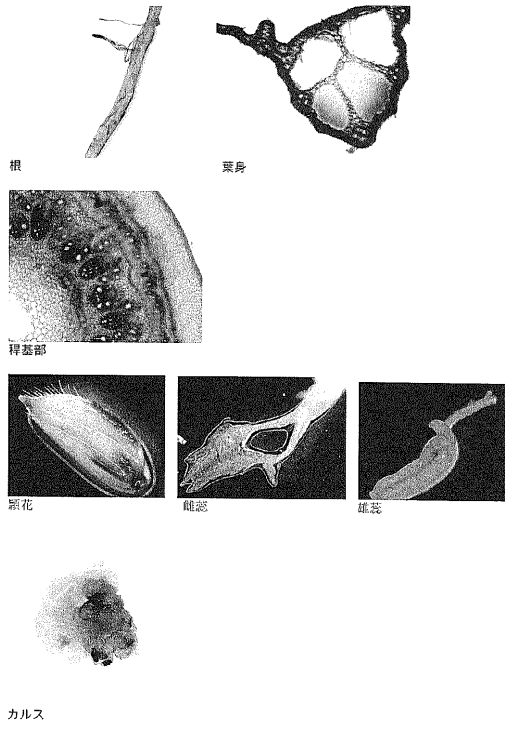
【 図 3 】



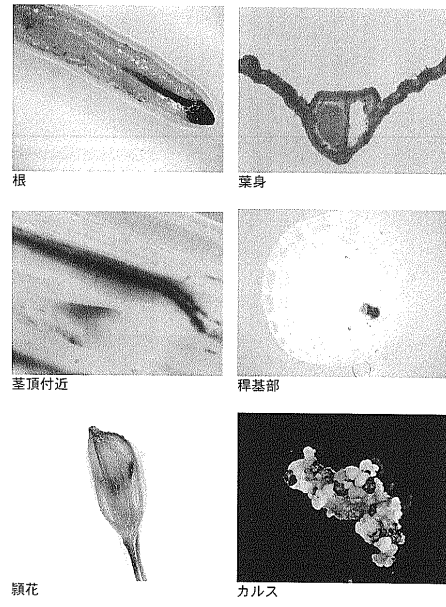
【 図 4 】



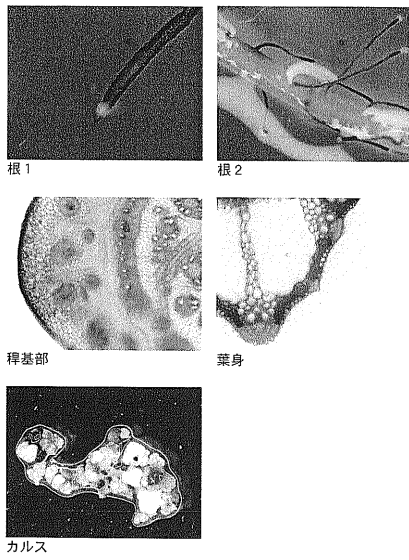
【 図 5 】



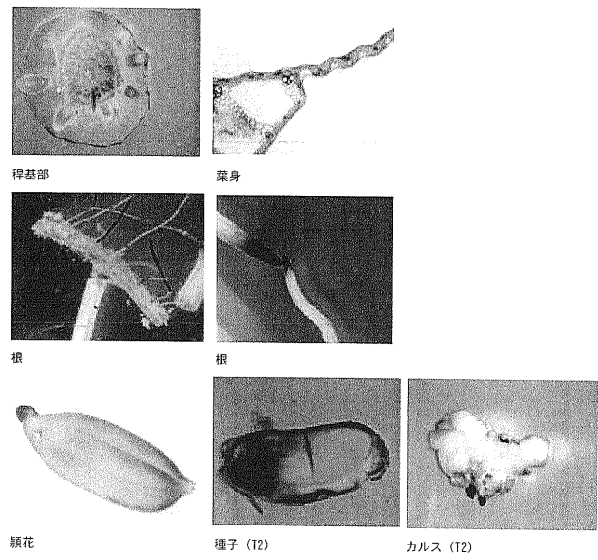
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】





【配列表】

2005224120000001.app

---

フロントページの続き

- (72)発明者 田中 宥司  
茨城県つくば市観音台2丁目1-2 独立行政法人 農業生物資源研究所内
- (72)発明者 中村 英光  
茨城県つくば市観音台2丁目1-2 独立行政法人 農業生物資源研究所内
- (72)発明者 佐々木 卓治  
茨城県つくば市観音台2丁目1-2 独立行政法人 農業生物資源研究所内
- (72)発明者 菊池 尚志  
茨城県つくば市観音台2丁目1-2 独立行政法人 農業生物資源研究所内
- Fターム(参考) 2B030 AA02 AD20 CA17 CB02  
4B024 AA08 CA01 FA02 GA11 GA17 HA20  
4B065 AA89X AA89Y AB01 AC14 BA02 CA53