

(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2007-117099

(P2007-117099A)

(43) 公開日 平成19年5月17日(2007.5.17)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	2B030
AO1H 5/00 (2006.01)	AO1H 5/00 A	4B024
C12N 1/15 (2006.01)	C12N 1/15	4B050
C12N 1/16 (2006.01)	C12N 1/16	4B065
C12N 1/19 (2006.01)	C12N 1/19	

審査請求 有 請求項の数 8 O L (全 11 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2007-31487 (P2007-31487)
 (22) 出願日 平成19年2月13日 (2007. 2. 13)
 (62) 分割の表示 特願2003-86413 (P2003-86413) の分割
 原出願日 平成15年3月26日 (2003. 3. 26)

特許法第30条第1項適用申請有り

(71) 出願人 504155293
 国立大学法人島根大学
 島根県松江市西川津町1060
 (74) 代理人 100116861
 弁理士 田邊 義博
 (72) 発明者 赤間 一仁
 島根県松江市西川津町787-58 合同
 宿舎第3西川津住宅2-302号
 Fターム(参考) 2B030 AA02 AB03 AD08 CA17 CB03
 4B024 AA01 AA03 AA05 AA08 AA20
 BA07 BA79 CA04 CA12 CA20
 DA01 DA05 EA04 GA11 GA17
 GA25 HA11 HA20
 4B050 CC04 DD13 EE01 LL01 LL02
 LL05 LL10

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 グルタミン酸脱炭酸酵素、グルタミン酸脱炭酸酵素をコードするDNA、グルタミン酸脱炭酸酵素が発現可能な形態で導入された微生物、グルタミン酸脱炭酸酵素の製造方法、および、トラン

(57) 【要約】

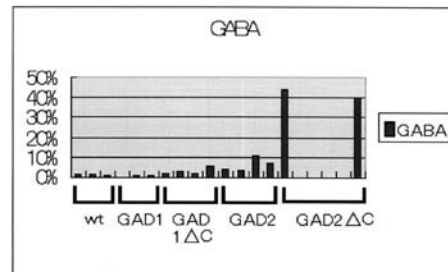
【課題】 酵素活性の高いグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) を提供すること。

【解決手段】 下記 (A) 又は (B) に示すタンパク質。
 (A) イネ由来 GAD のアミノ酸配列からカルモジュリン結合ドメインを欠失させたアミノ酸配列からなるタンパク質。
 (B) 上記 GAD のイソ型のアミノ酸配列からカルモジュリン結合ドメインを欠失させたアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、グルタミン酸脱炭酸酵素活性を有するタンパク質。

【選択図】 図9

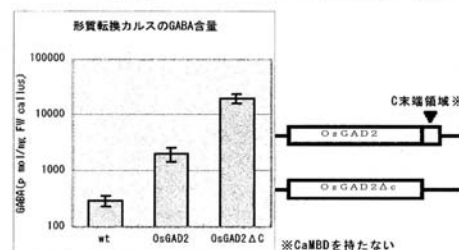
(a)

組換えカルスにおけるGABA含有量
 (全遊離アミノ酸含量に占めるGABAのmol%)



(b)

形質転換カルのGABA含量と導入遺伝子の構造



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記 (C) 又は (D) に示すタンパク質。

(C) 配列番号 5 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(D) 配列番号 5 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、グルタミン酸脱炭酸酵素活性を有するタンパク質。

【請求項 2】

下記 (C) 又は (D) に示すタンパク質をコードする DNA。

(C) 配列番号 5 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(D) 配列番号 5 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、グルタミン酸脱炭酸酵素活性を有するタンパク質。

10

【請求項 3】

下記 (E) 又は (F) に示すタンパク質。

(E) 配列番号 6 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(F) 配列番号 6 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、グルタミン酸脱炭酸酵素活性を有するタンパク質。

【請求項 4】

下記 (E) 又は (F) に示すタンパク質をコードする DNA。

(E) 配列番号 6 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(F) 配列番号 6 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、グルタミン酸脱炭酸酵素活性を有するタンパク質。

20

【請求項 5】

請求項 2 または 4 に記載の DNA によりコードされるタンパク質が発現可能な形態で導入された微生物。

【請求項 6】

請求項 5 に記載の微生物を培地で培養し、培養物中にグルタミン酸脱炭酸酵素を生成蓄積させ、該培養物よりグルタミン酸脱炭酸酵素を採取することを特徴とするグルタミン酸脱炭酸酵素の製造方法。

30

【請求項 7】

請求項 2 または 4 に記載の DNA を有するトランスジェニック植物。

【請求項 8】

イネ科に属する植物である請求項 7 に記載のトランスジェニック植物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、グルタミン酸脱炭酸酵素、グルタミン酸脱酸素酵素をコードする DNA、グルタミン酸脱炭酸酵素が発現可能な形態で導入された微生物、グルタミン酸脱炭酸酵素の製造方法、および、トランスジェニック植物に関し、特に、酵素活性の高いグルタミン酸脱炭酸酵素、グルタミン酸脱酸素酵素をコードする DNA、グルタミン酸脱炭酸酵素が発現可能な形態で導入された微生物、グルタミン酸脱炭酸酵素の製造方法、および、 γ -アミノ酪酸を豊富に含むトランスジェニック植物に関する。

40

【背景技術】

【0002】

非タンパク質性のアミノ酸の一種である γ -アミノ酪酸 (Gamma Amino Butyric Acid: GABA) は、血圧降下作用、肥満防止作用、精神安定作用、アルコール代謝

50

促進作用といった人体に対するさまざまな有用な作用を発揮する物質として知られている。GABAは、グルタミン酸を脱炭酸することにより得られる。このとき、グルタミン酸脱炭酸酵素 (Glutamic Acid Decarboxylase: GAD) を用いることにより脱炭酸反応を効率よく行わせることが可能となる。

【0003】

また、GABAはイネの細胞内にも含まれており、イネ細胞内のGADには少なくとも2種類のアイソフォームが知られている。米の中では他の部分と比較して胚芽の部分にGABAが多く含まれており、胚芽米や玄米や発芽米を食することにより、白米を食する以上に健康の保持増進が期待できる。

10

【0004】

【非特許文献1】Kazuhito Akama et al., "Rice(Oryza sativa) contains a novel isoform of glutamate decarboxylase that lacks an authentic calmodulin-binding domain at the C-terminus", Biochimica et Biophysica Acta, 1522(2001) p143-p150

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

しかしながら、従来の技術では以下の問題点があった。GABAは、微量の摂取では、人体への作用が少なく、GABA本来の作用を見込むためにはある程度の摂取量が必要であることがわかっている。したがって、GABAを効率よく製造することが必要であり、酵素活性の高いGADが望まれている。また、同様に、GABAを多く含むイネが望まれている。

20

【0006】

本発明は上記に鑑みてなされたものであって、酵素活性の高いGAD、当該GADをコードするDNA、当該GADが発現可能な形態で導入された微生物、および、当該GADの製造方法を提供することを目的とする。

【0007】

また、GABAを多量に含む植物を創出することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者は、上記目的を達成するために鋭意検討を行った結果、イネのGADを変異させることにより本発明を完成するに至った。すなわち本発明は以下の通りである。

30

【0009】

1. :

下記(C)又は(D)に示すタンパク質。

(C) 配列番号5に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(D) 配列番号5に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、グルタミン酸脱炭酸酵素活性を有するタンパク質。

40

【0010】

2. :

下記(C)又は(D)に示すタンパク質をコードするDNA。

(C) 配列番号5に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(D) 配列番号5に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、グルタミン酸脱炭酸酵素活性を有するタンパク質。

【0011】

3. :

下記(E)又は(F)に示すタンパク質。

(E) 配列番号6に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。

50

(F) 配列番号 6 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、グルタミン酸脱炭酸酵素活性を有するタンパク質。

【0012】

4. :

下記 (E) 又は (F) に示すタンパク質をコードする DNA。

(E) 配列番号 6 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(F) 配列番号 6 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、グルタミン酸脱炭酸酵素活性を有するタンパク質。

10

【0013】

5. :

上記 2. または 4. に記載の DNA によりコードされるタンパク質が発現可能な形態で導入された微生物。

【0014】

6. :

上記 5. に記載の微生物を培地で培養し、培養物中にグルタミン酸脱炭酸酵素を生成蓄積させ、該培養物よりグルタミン酸脱炭酸酵素を採取することを特徴とするグルタミン酸脱炭酸酵素の製造方法。

【0015】

20

7. :

上記 2. または 4. に記載の DNA を有するトランスジェニック植物。

【0016】

8. :

イネ科に属する植物である上記 7. に記載のトランスジェニック植物。

【発明の効果】

【0017】

本発明によれば、酵素活性の高い GAD、当該 GAD をコードする DNA、当該 GAD が発現可能な形態で導入された微生物、および、当該 GAD の製造方法を提供することができた。また、GABA を多量に含む植物を創出することができた。

30

【発明を実施するための最良の形態】

【0018】

以下、本発明の実施の形態を図面を参照しながら詳細に説明するが、本発明はここに記載した形態のみに限定されるものではなく、本明細書の記載および当分野で公知の技術に基づいて当業者が容易に修飾および改変し得る技術については本発明の範囲内に含まれるものである。本実施の形態では、まず、イネの 2 種類の GAD を示し、その後、本発明を説明する。

【0019】

イネは単子葉植物であり、少なくとも 2 種類の GAD を有することが知られている。ここでは、そのうち、双子葉植物 GAD の C 末端側に普遍的に見出されているカルモジュリン結合ドメイン (Calmodulin-Binding Domain: CaMBD) と相同性の高い部位を備える GAD を OsGAD1 と称し、当該ドメインが無いともいえる相同性の低い部位を備える GAD を OsGAD2 と称することとする。配列表 2 は、OsGAD1 のアミノ酸配列を示したものである。配列表 5 は、OsGAD2 のアミノ酸配列を示したものである。

40

【0020】

(実験概要)

本発明者は、鋭意検討の結果、OsGAD1 および OsGAD2 に基づいて、酵素活性の高い新規なグルタミン酸脱炭酸酵素を創出するに至った。まず、OsGAD1 と OsGAD2 に基づく cDNA であって、C 末端側の約 40 ~ 50 アミノ酸残基をコードする領域

50

を制限酵素により切断し、この部分を欠失させた cDNA を作製した（この cDNA を便宜的にそれぞれ O s G A D 1 C および O s G A D 2 C と適宜称することとする）。なお、制限酵素は、O s G A D 1 に対しては B g l I I を、O s G A D 2 に対しては A p a I を用いた。

【0021】

次に、O s G A D 1、O s G A D 1 C、O s G A D 2、O s G A D 2 C それぞれの cDNA をプラスミド p C A M B I A 1 3 0 2（C A M B I A 社製（オーストラリア））の T - D N A 上のカリフラワーモザイクウイルス 3 5 S プロモータの下流に組み込み、アグロバクテリウム株に導入した。これらの菌株をイネカルスに感染・共存培養することで、ゲノム DNA 中に T - D N A を組み込んだ。組換えカルスは抗生物質ハイグロマイシンを含む培地で選抜し、作製した。

10

【0022】

得られた 4 種類の遺伝子組換えカルスからアミノ酸を抽出し、G A B A 含量を調べて野生型（w t）と比較して評価した。なお、R T - P C R を行ない G A D の発現も確かめた。このとき、アクチン m R N A を内在性のコントロールとして用いた。

【0023】

また、作製したカルスが実際に形質転換体であるか、すなわち、トランスジェニック植物であるかどうかを確認した。その方法としては、カルスから全 DNA を抽出して、ハイグロマイシン耐性遺伝子領域を挟み込むプライマーを用いて G A D の部分を P C R により増幅して確認した。

20

【0024】

以降に実験例を説明する。

（形質転換カルスの作製）

イネ（*O r y z a s a t i v a*）の 2 種類の G A D c D N A（O s G A D 1 および O s G A D 2）と、2 種類の変異 c D N A（O s G A D 1 C および O s G A D 2 C（O s G A D 1 と O s G A D 2 のそれぞれの C 末端側約 4 0 ~ 5 0 アミノ酸残基をコードする領域を除いたもの））とを作製し、アグロバクテリウムを介した遺伝子導入法によってイネ細胞に導入し、形質転換カルスを作製した。

【0025】

（形質転換カルスの作製：カルスの誘導および前培養）

イネの成熟した種子を次に示した培地に 2 8 ℃、3 0 0 0 1 μ x の状態で 2 週間静置した。

30

・ 種子を静置させた培地の組成

N 6 基本塩混合物

ショ糖 3 . 9 8 g / l

カザミノ酸 3 . 0 0 %

プロリン 0 . 2 8 %

2 , 4 - D 2 m g / l

ゲルライト 0 . 4 %

【0026】

カルスの誘導を行った完熟種子の胚乳と芽の部分を除去し、増殖のよいカルスの部分を新しい N 6 D 固形培地に置床した。これを、2 8 ℃ で連続照射下において 3 週間培養した。

40

【0027】

（形質転換カルスの作製：アグロバクテリウムの前培養、懸濁および感染）

アグロバクテリウムを A B 固形培地に塗布し菌体を広げた。これを、2 8 ℃ で暗所において 2 ~ 3 日培養した。培地上で増殖した菌体を採取し、これをアセトシリンゴン 1 0 m g / l の濃度で加えた A A 培地 3 0 m l によく懸濁させた。つぎに、前培養したカルスをステンレスメッシュのかごに入れ、アグロバクテリウムの懸濁液にかごと 1 . 5 分 ~ 2 分間浸した。その後、かごを引き上げ余分な菌液を除去し、感染させたカルスを N 6 D（上記濃度のアセトシリンゴンを含む）固形培地に置床した。この状態で 2 8 ℃ で暗所におい

50

て2～3日培養した。

【0028】

(形質転換カルスの作製：アグロバクテリウムの除去および選抜)

共存培養でカルス表面を菌体が覆ったのを確認し、ステンレスメッシュかごに感染カルスを投入し、かごとN6D液体培地に浸してアグロバクテリウムを洗い流した。その後、かごを引き上げ、余分な水分を除去した。続いて、N6D液体培地にクラフォランを500mg/lになるように加え、この培地でさらに数回カルスを洗浄した。余分な水分を除去した後、カルスをN6D固形培地(クラフォラン250～500mg/lを含む)に置床した。これを、28℃で連続照射下において3週間～4週間培養した。

【0029】

(形質転換カルスの評価：CTAB法によるDNAの抽出)

次に、形質転換カルスと非形質転換カルスからCTAB法により全DNAを抽出した。図1は、カルスからDNAを抽出する手順を示した図である。抽出後、アガロース電気泳動を行った。ゲルは1%ゲル(0.5μg/mlの臭化エチジウムを含む)を用いた。マーカーはDNAをStyIで切断したものをを用いた。

【0030】

(形質転換カルスの評価：形質転換の確認)

抽出したDNAを用いて、PCRにより形質転換されているかどうか確認した。

プライマーはHPT-E(センスプライマー)とHPT-N(アンチセンスプライマー)を用いた。このプライマーの配列をそれぞれ配列番号7および配列番号8に示した。図2は、PCRの条件を示した図である。PCRの結果、野生型DNAを除き、すべての形質転換カルスで、約1kbの予想される増幅産物が観察された。図3は、組換えDNAのPCR解析を示した図である。

【0031】

(形質転換カルスの評価：RNAの抽出)

次に、形質転換カルスにおける導入遺伝子のmRNAレベルでの発現量を調べるために、改変グアニジウム法により、全RNAを単離した。抽出手順を図4に示した。なお、次に説明するRT-PCRの際にゲノムDNAの増幅を防ぐため、RNAの抽出後にDNase I処理をおこなった。DNase I処理の手順を図5に示した。

【0032】

(形質転換カルスの評価：mRNAの蓄積量の測定)

次に、OsGAD1とOsGAD2に特異的なプライマーを用いて逆転写酵素(RT)によりcDNAを合成し、これを鋳型としてOsGAD1で20サイクル、OsGAD1で25サイクル、OsGAD2で33サイクル、OsGAD2で30サイクルとしてPCRを行った。この際に、アクチンmRNAを内在性のコントロールとして用いた。OsGAD1に特異的なセンスプライマーを配列番号9に示し、アンチセンスプライマーを配列番号10に示した。また、OsGAD2に特異的なセンスプライマーを配列番号11に示し、アンチセンスプライマーを配列番号12に示した。また、GAD部分のRT-PCRの処理手順を図6に示した。アクチンのセンスプライマーを配列番号13に示し、アンチセンスプライマーを配列番号14に示した。

【0033】

(形質転換カルスの評価：導入遺伝子の発現評価)

処理後の溶液を1.5%のアガロースゲル電気泳動に掛けて、分画後に泳動パターンを画像として取り込み、GADの発現量を調べた。結果を図7に示す。野生型と比較したmRNAの蓄積量を推定すると、OsGAD1では～3倍、OsGAD1Cでは～22倍であった。一方、OsGAD2とOsGAD2Cでは野生型の発現が低すぎて数値化出来なかったが、相対的に著しく増大していることが確認できた。

【0034】

(形質転換カルスの評価：アミノ酸含有量の定量)

また、形質転換カルスからTCA法により遊離アミノ酸を単離し、GABAを含めて各種

10

20

30

40

50

アミノ酸含量を定量した。定量には自動アミノ酸分析装置を用いた。なお、アミノ酸の抽出手順を図8に示した。また、図9は、組換えカルスにおけるGABA含有量を示した図である。このうち図9(a)は、カルスごとに示した図であり、図9(b)は、平均による比較を表した図である。分析の結果、OsGAD2 Cは野生型に比べて、GABA含有量が100倍近く増大した系統が見つかった。また、OsGAD1 Cは野生型に比べて20倍近く増大した系統が見つかった。また、OsGAD2に関しては、OsGAD1 Cに比してGABA含有量が多い傾向にあった。

【産業上の利用可能性】

【0035】

胚芽米や玄米や発芽米を食することにより、白米を食する以上に健康の保持増進が期待できる。 10

【図面の簡単な説明】

【0036】

【図1】カルスからDNAを抽出する手順を示した図である。

【図2】PCRの条件を示した図である。

【図3】組換えDNAのPCR解析を示した図である。

【図4】RNAの抽出手順を示した図である。

【図5】DNase I処理の手順を示した図である。

【図6】GAD部分のRT-PCRの処理手順を示した図である。

【図7】GADの発現量を示した図である。

【図8】アミノ酸の抽出手順を示した図である。

【図9】組換えカルスにおけるGABA含有量を示した図である。

20

【図1】

(カルスからDNAを抽出する手順)

- 1: 50mgのカルスを1.5mlチューブに入れる。
- 2: 400 μ lのCTAB抽出バッファー(2%CTAB, 1.4M NaCl, 20mM EDTA, 100mM Tris-HCl(pH8.0), 0.2%(v/v)2-メルカプトエタノール)を加える。
- 3: 乳棒で破砕する。
- 4: 60°Cで30分保温する。
- 5: 400 μ lのクロロホルム/イソアミルアルコール(24:1)を加えて、転倒混和する。
- 6: 遠心分離する(13000rpm, 10分間, 4°C)。
- 7: 上層を新しいチューブに回収する。
- 8: 2/3容量の冷イソプロパノールを加えて、混合する。
- 9: 冷凍庫(-20°C)に1時間以上おく。
- 10: 遠心分離する(10000rpm, 5分間, 4°C)。
- 11: 上澄みを捨てる。
- 12: 1mlの冷70%エタノールを加えて、混合する。
- 13: 200 μ lのTE(10 μ g/mlのRNaseAを含む)を加えて、穏やかにボルテックスミキサーで溶解する。
- 14: 37°Cで30分間保温する。
- 15: 20 μ lの3M酢酸ナトリウム(pH5.2)と500 μ lの冷100%エタノールを加えて混合する。
- 16: 冷凍庫(-20°C)に1時間以上おく。
- 17: 遠心分離する(6000rpm, 5分間, 4°C)。
- 18: 上澄みを捨てる。
- 19: 70%エタノールを1ml加えて、穏やかに混合する。
- 20: 遠心分離する(12000rpm, 5分間, 4°C)。
- 21: 沈殿物を乾燥させる。
- 22: 200 μ lのTEを加えて、ミキサーでけん濁する。

【図2】

(形質転換の確認に際してのPCR条件)

反応系:

植物DNA	5 μ l
10 \times Taq DNA ポリメラーゼ バッファー	2.5 μ l
dNTP(各2mM)	2.5 μ l
プライマー-HPT-E(10pmol/ μ l)	1.0 μ l
プライマー-HPT-N(10pmol/ μ l)	1.0 μ l
Taq DNA ポリメラーゼ	0.5 μ l
H ₂ O	12.5 μ l
合計	25.0 μ l

反応温度と反応時間

1サイクル=変性+アニーリング+伸長反応		
変性	: 94°C	30秒
アニーリング	: 50°C	30秒
伸長反応	: 72°C	30秒

合計35サイクル行った。

【 図 4 】

(改変グアニジウム法による全RNAの抽出手順)

- 1 : 100mg カルスを 2ml チューブに入れ、液体窒素を加えて乳棒ですり潰す。
- 2 : D 溶液 (4M 塩酸グアニジウム, 25mM クエン酸ナトリウム, 0.5% ギャロコシル, 0.1M 2-メルカプトエタノール) を 400 μ l 加える。
- 3 : ミキサーで 10 秒撹拌する。
- 4 : 2M 酢酸ナトリウム (pH4.0) を 40 μ l 加える。
- 5 : 水飽和フェノールを 400 μ l 加える。
- 6 : クロロホルム/イソアミルアルコール (49 : 1) を 100 μ l 加える。
- 7 : 約 10 秒間ミキサーで撹拌する。
- 8 : 氷上に 30 分間おく。
- 9 : 遠心分離する (13000 rpm, 20分, 4℃)。
- 10 : 上層をマイクロチューブに移す。
- 11 : 冷イソプロパノールを 500 μ l 加えて混合する。
- 12 : 冷凍庫 (-20℃) に 1 時間おく。
- 13 : 遠心分離する (13000 rpm, 20分間, 4℃)。
- 14 : 上澄みを捨てる。
- 15 : D 溶液を 200 μ l 加えて、ミキサーでけん濁する。
- 16 : 等量の冷イソプロパノールを加えて混合する。
- 17 : -80℃で 20 分間おく。
- 18 : 遠心分離する (13000 rpm, 10分間, 4℃)。
- 19 : 上澄みを捨てる。
- 20 : 1ml の冷 70% エタノールを加えて、混合する。
- 21 : 遠心分離する (13000 rpm, 5分間, 4℃)。
- 22 : 上澄みを捨てる。
- 23 : 100 μ l の DEPC 処理水を加えてけん濁する。

【 図 6 】

(RT-PCR の手順)

< RT 反応系 >

全 RNA	X μ l (1 μ g)
アンチセンスプライマー(10pmol/ μ l)	1 μ l
DEPC H ₂ O	Y (10-X) μ l
	合計 11 μ l

70℃で 10 分間熱処理後、氷上で急冷して下記の試薬を加えて、良く混合し、42℃で 60 分間反応させ、75℃で 15 分間熱処理を行う。

5×ファーストストランドバッファー*	4 μ l
0.1M DTT	2 μ l
10mM dNTP	1 μ l
Superscript II™ Reverse Transcriptase(200 エツ/μl)	0.1 μ l
DEPC H ₂ O	1.9 μ l
(*250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl ₂)	

< PCR >

鋳型 DNA (上記反応液)	2 μ l
10×Taq ポリメラーゼ バッファー	2 μ l
センスプライマー(10pmol/ μ l)	1 μ l
アンチセンスプライマー(10pmol/ μ l)	1 μ l
dNTP(各 2mM)	2 μ l
Taq DNA ポリメラーゼ	0.5 μ l
H ₂ O	11.5 μ l
合計	20 μ l

反応温度と反応時間

- 1 サイクル=変性+アニーリング+伸長反応
 変性 : 94℃ 30秒
 アニーリング : 50℃ 30秒
 伸長反応 : 72℃ 30秒

(OsGAD1 : 20 サイクル, OsGAD1ΔC : 25 サイクル,
 OsGAD2 : 33 サイクル, OsGAD2ΔC : 30 サイクル)

【 図 5 】

(DNase I 処理)

- 1 : 下記の試料を混合し、軽く遠心分離する。

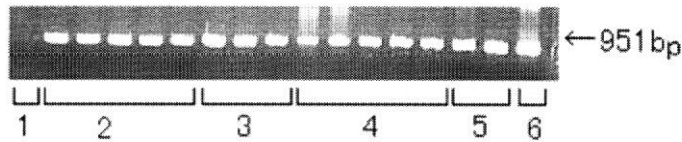
全 RNA	44 μ l
10×制限酵素バッファー	5 μ l
DNase I (10 ユニット/ μ l)	1 μ l
- 2 : 37℃で 1 時間保温する。
- 3 : 50 μ l のフェノール/クロロホルム (1 : 1) を加える。
- 4 : ボルテックスミキサーで 5 分間撹拌する。
- 5 : 遠心分離する (13000 rpm, 5分間, 4℃)。
- 6 : 5 μ l の 3M 酢酸ナトリウム (pH5.2) と 125 μ l の冷 100% エタノールを加える。
- 7 : -80℃に 15 分間おく。
- 8 : 遠心分離する (13000 rpm, 20分間, 4℃)。
- 9 : 上澄みを捨てる。
- 10 : 500 μ l の冷 70% エタノールを加えて転倒混和する。
- 11 : 遠心分離する (13000 rpm, 5分間, 4℃)。
- 12 : 上澄みを捨てる。
- 13 : 沈澱物を乾燥させる。
- 14 : 50 μ l の DEPC 処理水に溶かす。

【 図 8 】

(遊離アミノ酸の抽出法)

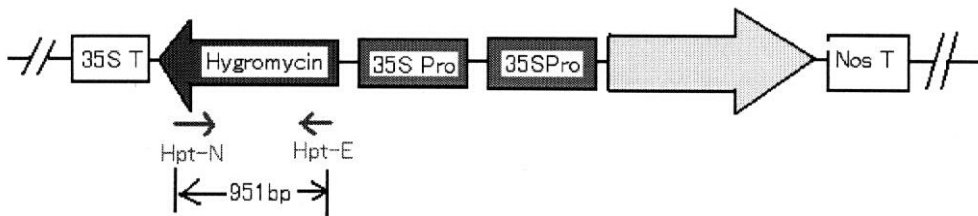
- 1 : 50mg のカルスを 2ml チューブに入れ、液体窒素を加えてカルスを破砕する。
- 2 : 8% TCA (トリクロロ酢酸) を 200 μ l 入れて混合する。
- 3 : 氷上に 15 分間おく。
- 4 : 遠心分離する (12000 rpm, 5分間, 4℃)。
- 5 : 上澄みを 1.5ml チューブに移す。
- 6 : 沈澱物に 8% TCA を 200 μ l 加える。
- 7 : ボルテックスミキサーで 5 分間撹拌する。
- 8 : 遠心分離する (12000 rpm, 5分間, 4℃)。
- 9 : 上澄みを回収して、初めの上澄みと合わせる。
- 10 : 400 μ l の上澄みにジエチルエーテルを 600 μ l 加える。
- 11 : 5 分間ボルテックスミキサーで撹拌する。
- 12 : 遠心分離する (13000 rpm, 5分間)。
- 13 : 上層を捨てる。
- 14 : ジエチルエーテル抽出を繰り返す。
- 15 : クリーンベンチ内に 10 分間放置して、ジエチルエーテルを飛ばす。
- 16 : 遠心濃縮機を用いて、減圧乾燥させる。
- 17 : 超純水を 360 μ l 加えてミキサーで溶かす。
- 18 : 遠心濾過フィルターで不純物を除く。
- 19 : 40 μ l の 1N HCl を加える。
- 20 : 自動アミノ酸分析器に供するまで -20℃で保管する。

【 図 3 】



1:wt 2:OsGAD1 3:OsGAD1ΔC 4:OsGAD2 5:OsGAD2ΔC

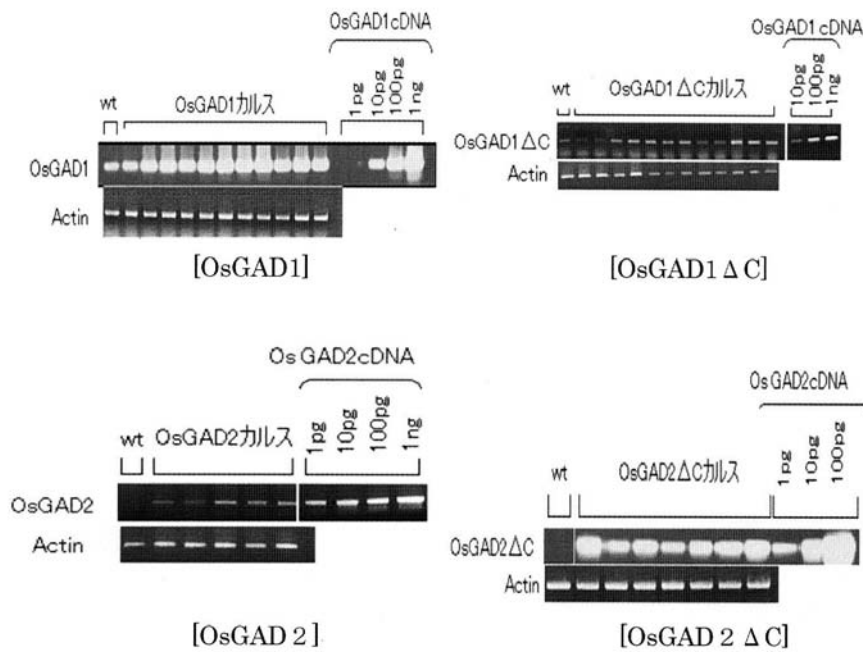
6:コントロール(プラスミド DNA pCAMBIA 1302 を植物 DNA の代わりに用いた)



<植物染色体 DNA に組み込まれた OsGAD の構造>

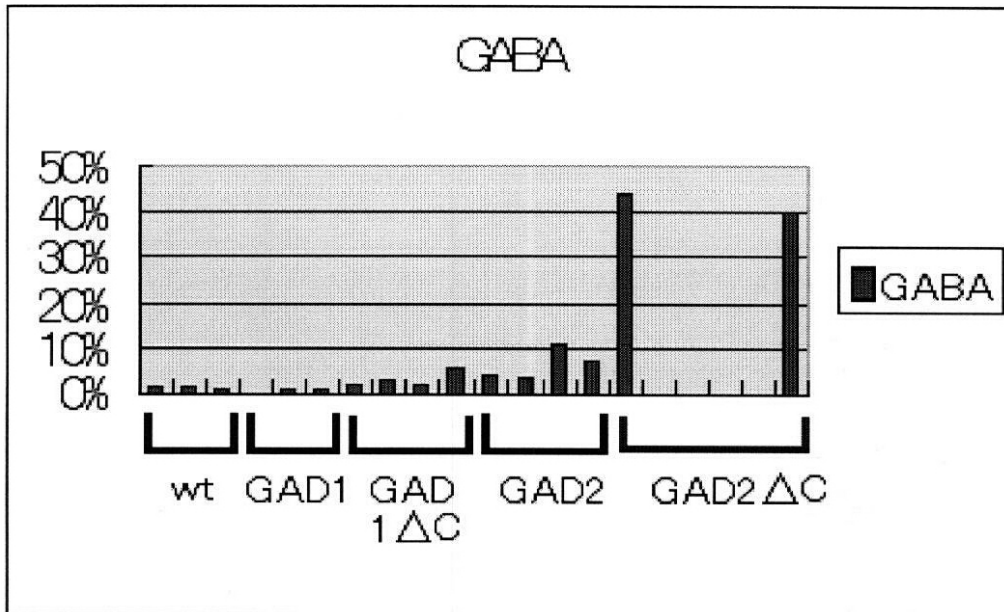
【 図 7 】

<GAD mRNA とアクチン mRNA の RT-PCR の結果>



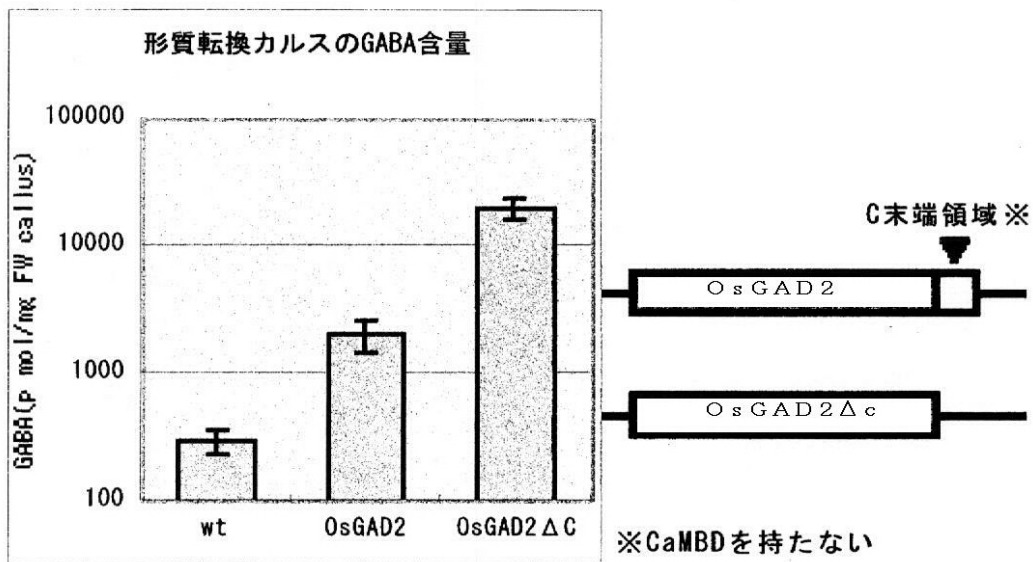
【図9】
(a)

組換えカルスにおけるGABA含有量
(全遊離アミノ酸含量に占めるGABAの割合%)



(b)

形質転換カルのGABA含量と導入遺伝子の構造



【配列表】

2007117099000001.app

フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I			テーマコード(参考)
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21		
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	A	
C 1 2 N	9/88	(2006.01)	C 1 2 N	9/88		

Fターム(参考) 4B065 AA01X AA58X AA72X AA87X AA88X AA88Y AB01 AC14 AC20 BA01
BA02 BA16 CA27 CA41 CA43 CA44 CA53

(54) 【発明の名称】グルタミン酸脱炭酸酵素、グルタミン酸脱炭酸酵素をコードするDNA、グルタミン酸脱炭酸酵素が発現可能な形態で導入された微生物、グルタミン酸脱炭酸酵素の製造方法、および、トランスジェニック植物