

(19)日本国特許庁 (JP)

再公表特許 (A1)

(11)国際公開番号

WO 00 / 7 1 6 9 9

発行日 平成14年12月17日 (2002. 12. 17)

(43)国際公開日 平成12年11月30日 (2000. 11. 30)

(51)Int.Cl.⁷

識別記号

F I

C 1 2 N 15/09
5/10

C 1 2 N 15/00
5/00

A
C

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 26 頁)

出願番号 特願2000-620076(P2000-620076)
(21)国際出願番号 PCT/JP99/02749
(22)国際出願日 平成11年5月25日(1999. 5. 25)
(81)指定国 AU, CA, JP, KR, US
特許法第30条第1項適用申請有り 平成10年11月25日第
21回日本分子生物学会年会講演要旨集に発表。

(71)出願人 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
(72)発明者 廣近 洋彦
茨城県つくば市観音台2-1-2 独立行
政法人農業生物資源研究所内
(72)発明者 岡本 裕行
茨城県つくば市観音台2-1-2 独立行
政法人農業生物資源研究所内
(74)代理人 弁理士 山本 秀策

(54)【発明の名称】 タバコのレトロトランスポゾンを利用した遺伝子破壊法

(57)【要約】

本発明は、タバコレトロトランスポゾンを用いて植物における遺伝子を破壊する方法であって、該レトロトランスポゾン将该植物に導入する工程；および該レトロトランスポゾンが導入された植物を培養することにより再分化させ、形質転換植物を作出する工程を包含する、方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】タバコレトロトランスポゾンを用いて植物における遺伝子を破壊する方法であって、

該レトロトランスポゾン将该植物に導入する工程；および

該レトロトランスポゾンが導入された植物を培養することにより再分化させ、形質転換植物を作出する工程を包含する、方法。

【請求項 2】前記レトロトランスポゾンが T t o 1 である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】前記植物がタバコ以外の植物である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】前記植物が作物植物である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】前記植物がシロイヌナズナである、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 6】前記レトロトランスポゾンが導入された植物が、該レトロトランスポゾンを低コピー数で含有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】前記コピー数が 1 ~ 3 コピーである、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】前記形質転換植物から後代植物を得る工程、および該後代植物を組織培養して植物体に再分化させる工程をさらに包含する、請求項 1 に記載の方法。

【 発 明 の 詳 細 な 説 明 】

技 術 分 野

本発明は、トランスポゾンタギングによる遺伝子破壊および遺伝子単離に関する。より詳細には、本発明は、タバコレトロトランスポゾンを使用する異種植物（例えば、シロイヌナズナ）の遺伝子破壊に関する。

背 景 技 術

挿入因子による遺伝子破壊は、有用遺伝子の単離および機能解析において重要な手段となっている。モデル植物として研究の進められているシロイヌナズナにおいては、挿入因子として、T-DNAおよびトランスポゾンが用いられている。

T-DNAの場合、アグロバクテリアを用いてTiプラスミドを形質転換させると、Tiプラスミドの一部であるT-DNAが植物染色体に挿入され、遺伝子が破壊される。しかし、T-DNAによる遺伝子破壊では、変異体がT-DNAがうまく組み込まれなかったことにより実質的にタグされていない例が50～60%にのぼるという報告がある。

トランスポゾンの場合、形質転換の過程もしくはその後の転移の過程で遺伝子破壊が生じる。トランスポゾンは、動物、酵母、細菌および植物のゲノムに遍在することが知られる変異誘発遺伝子である。トランスポゾンは、その転移（transposition）機構により2つのクラスに分類されている。クラスIIに属するトランスポゾンは、複製することなくDNAの形態で転移する。クラスIに属するトランスポゾンは、レトロトランスポゾンとも呼ばれ、複製し、そしてRNA中間体を介して転移する。

クラスIIに属するトランスポゾンとして、トウモロコシ（Zea mays）のAc/Ds、Spm/dSpmおよびMu要素（Fedoroff、1989、Cell 56、181-191；Fedoroffら、1983、Cell 35、235-242；Schiefelbeinら、1985、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82、4783-4787）、キンギョソウ（Antirrhinum majus）のTam要素（Bonasら、1984、EMBO J、3、1015-1019）が知られている。クラスI

I に属するトランスポゾン、トランスポゾン・タグgingを利用する遺伝子単離に広く利用されている。この技術は、トランスポゾンがゲノム上で転移して、ある遺伝子中に挿入されると遺伝子の生理学的および形態学的変異が起こり、遺伝子が制御する表現型が変化することを利用する。この変化を検出することにより影響を受けた遺伝子を単離する (B a n c r o f t ら、1993、The Plant Cell、5、631-638 ; C o l a s a n t i ら、1998、Cell、93、593-603 ; G r a y ら、1997、Cell、89、25-31 ; K e d d i e ら、1998、The Plant Cell、10、877-887 ; W h i t h a m ら、1994、Cell、78、1101-1115)。しかし、DNA型のトランスポゾンによるタグgingでは、トランスポゾンが切り出されてしまったためタグされていない変異体が報告されている (B a n c r o f t ら、1993、The Plant Cell、5、631-638)。これらのトランスポゾンはまた、主に染色体上の近傍の部位に転移する性質を有することが知られている (B a n c r o f t および D e a n、1993、Genetics、134、1221-1229 ; K e l l e r ら、1993、Theor. Appl. Genet.、86、585-588)。すべての遺伝子を網羅した破壊系を作出するためには、これらのトランスポゾンとは異なり染色体上をランダムに転移するトランスポゾンの利用が望まれている。また、これらの因子の組み込みの標的部位にそれぞれ特徴があるため、これらの因子とは異なった因子による遺伝子破壊系の作出が望まれている。

クラスIトランスポゾンは、最初、ショウジョウバエおよび酵母で同定され、そして特徴付けられたが、最近の研究により植物ゲノム中に遍在し、そのかなりの部分を占めていることが明らかにされている (B e n n e t z e n、1996、Trends Microbiol.、4、347-353 ; V o y t a s、1996、Science、274、737-738)。レトロトランスポゾンの大部分は、非移動性の組み込みユニットであるようである。レトロトランスポゾンは、両端に同方向反復配列であるLTRをもち、その内側にウイルス様粒子を構成するgagタンパクと逆転写酵素polタンパクなどをコードする領域を有する。LTRプロモーターから転写されて生じたRNAはpolタンパクに

よって逆転写されてcDNAとなり、宿主染色体に挿入される。レトロトランスポゾンの使用は、転移がそれ自身のコードするタンパクによって行われ、また転移コピーが切り出されることはないため、遺伝子破壊の手法としては優れている。

最近の研究は、レトロトランスポゾンのいくつかは、創傷、病原体の攻撃および細胞培養などのストレス条件下で活性化されることを示している(Grandbastien, 1998, Trends in Plant Science, 3, 181-187; Wessler, 1996, Curr. Biol., 6, 959-961; Wesslerら, 1995, Curr. Opin. Genet. Devel., 5, 814-821)。例えば、タバコではTnt1AおよびTto1(Pouteauら, 1994, Plant J., 5, 535-542; Takedaら, 1988, Plant Mol. Biol., 36, 365-376)、およびイネではTos17(Hirochikaraら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 7783-7788(1996))について、ストレス条件下における活性化が報告されている。

イネにおいては、イネレトロトランスポゾンTos17が、培養により活性化され、遺伝子内に転移する(Hirochikaraら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 7783-7788(1996))ことから、イネの大量遺伝子破壊の手段として利用されている。

ところが、シロイヌナズナでは、転移活性のあるレトロトランスポゾンはこれまでに単離されていない。Grandbastienらにより単離されたタバコレトロトランスポゾンTnt1がシロイヌナズナに形質転換により導入される過程で転移することが報告されたが、遺伝子内に転移するかどうかは明らかになっていない(Lutasら, 1995, EMBO J., 14, 2364-2393)。タバコレトロトランスポゾンTto1もまた、シロイヌナズナに導入される過程で転移することが示された(HirochikaraおよびKakutani、投稿準備中)。Tto1は、イネにおいて培養によって転移する(Hirochikaraら, 1996, Plant, Cell, 8, 725-734)ことから、幅広い宿主で転移能を持つことが示唆される。しかし、転移の頻度は系統によ

り異なっていて、必ずしも高頻度の転移が再現よくみられたわけではなかった。

発明の開示

シロイヌナズナにおいてもタバコレトロトランスポゾン T t o 1 が転移して遺伝子破壊を生じるかどうかを検討した。T t o 1 を低コピーで有するシロイヌナズナを培養して再分化させ、T t o 1 の転写量および T t o 1 標的部位における隣接配列の系統的な分析を行ったところ、培養細胞で T t o 1 が転移し、クローン細胞から再分化した形質転換個体が提供された。T t o 1 の隣接配列を増幅して配列決定し、相同性解析を行った結果、様々な遺伝子の内部に T t o 1 が挿入された多数の例が認められた。

以上の結果は、T t o 1 が、活性なレトロトランスポゾンを持たないとされるシロイヌナズナにおいて、トランスポゾンタギングによる遺伝子単離の新たな手段として利用可能であることを示している。シロイヌナズナにおける、レトロトランスポゾンを用いた遺伝子破壊および遺伝子単離の可能性を示したのは本研究が初めてである。内在性ではなく異種のレトロトランスポゾンを用いても、トランスポゾンタギングによる遺伝子破壊および遺伝子単離が可能であることが、本願により明らかにされた。

本発明は、タバコレトロトランスポゾンを用いて植物における遺伝子を破壊する方法であって、当該レトロトランスポゾン将该植物に導入する工程；および当該レトロトランスポゾンが導入された植物を培養することにより再分化させ、形質転換植物を作出する工程を包含する、方法に関する。

本発明の1つの実施態様では、上記レトロトランスポゾンは T t o 1 である。

本発明の1つの実施態様では、上記植物は、タバコ以外の植物である。好ましくは、上記植物は作物植物である。好ましくは、上記植物はシロイヌナズナである。

本発明の1つの実施態様では、上記レトロトランスポゾンが導入された植物は、当該レトロトランスポゾンを低コピー数で含有する。低コピー数とは、1～5コピーを意味し、好ましくは、1～3コピーであり、より好ましくは、1～2コピーであり、最も好ましくは1コピーである。

本発明の1つの実施態様では、上記方法は、上記形質転換植物から後代植物を

得る工程、および該後代植物を組織培養して植物体に再分化させる工程をさらに包含する。

発明を実施するための最良の形態

本発明によれば、タバコレトロトランスポゾンを用いて植物における遺伝子を破壊する方法が提供される。

本願明細書で用いる用語「遺伝子を破壊する」とは、細胞にDNAを導入し、転移による組換え体を選択することにより、目的の特定遺伝子に突然変異を導入し、その結果、その遺伝子を破壊することを意味する。従って、本願発明の遺伝子破壊が達成されるためには、レトロトランスポゾンは、単に植物細胞内に入るだけではなく、植物細胞内に含まれる遺伝子のゲノム上に組み込まれることを必要とする。本願明細書で用いる用語「転移」は、組み込まれたレトロトランスポゾンがゲノム上の別の部位にさらに組み込まれることを指す。

本発明で用いられるタバコレトロトランスポゾンは、好ましくは、T t o 1である。T t o 1は、全長が5.3 kbであって、574 bpのLTRを両端に有し、1338 アミノ酸からなるORFを有するTy1/copiaタイプのレトロトランスポゾンである。T t o 1は、タバコにおいて、培養および傷、ジャスモン酸、ウイルス感染などのストレスにより活性化される。T t o 1は、タバコにおいて、培養により転移を活性化することが知られていた。本願では、T t o 1が、タバコとは異種の植物であるシロイヌナズナに対しても転移を生じ、さらにシロイヌナズナにおける遺伝子の破壊をも生じた。

用語「植物」は、遺伝子導入のできるいずれの植物をも包含する。「植物」は、単子葉植物および双子葉植物を包含する。このような植物には、モデル植物であるシロイヌナズナおよび任意の作物植物が含まれる。作物植物としては、例えば、イネ、コムギ、トウモロコシ、ジャガイモ、ナタネ（アブラナ科）、トマト、ダイズなどが挙げられるが、これらに限定されない。

本発明の「タバコレトロトランスポゾンを用いて植物における遺伝子を破壊する方法」は、該レトロトランスポゾンを該植物に導入する工程；および該レトロトランスポゾンが導入された植物を培養することにより再分化させ、形質転換植物を作出する工程を包含する。

植物体へのレトロトランスポゾンの導入には、当業者に公知の方法が用いられ得る。例えば、アグロバクテリウムを介する方法と直接細胞に導入する方法とが周知である。アグロバクテリウムを介する方法は、例えば、N a g e l らの方法 (M i c r i b i o l . L e t t . , 6 7 , 3 2 5 (1 9 9 0)) が用いられ得る。この方法は、まず、例えば発現ベクターをエレクトロポレーションによってアグロバクテリウムに形質転換し、次いで、形質転換されたアグロバクテリウムを P l a n t M o l e c u l a r B i o l o g y M a n u a l (S . B . G e l v i n e t a l . , A c a d e m i c P r e s s P u b l i s h e r s) に記載の方法で植物細胞に導入する方法である。遺伝子を直接細胞に導入する方法としては、エレクトロポレーション法、遺伝子銃法が知られている。

遺伝子が導入された細胞は、まずハイグロマイシン耐性等の薬剤耐性で選択され、次いで、常法により、植物体に再生され得る。植物体への再生に用いられ得る培養は、通常当該分野で用いられ得る固形培地および液体培地のいずれもが使用され得る。固形培地での培養の場合、誘導培地中の植物ホルモン(オーキシンおよびサイトカイニン)の量を調節することにより、カルス、シュート、および根を誘導させ得る。液体培地を用いる懸濁培養では、カルスから不定胚を形成させることにより完全な植物体へ再分化させ得る。不定胚の形成のためには、胚軸、葉などのような組織を培養する際に、まず初めにオーキシン含有培地で培養する。黄色粒状カルス(E C) が増殖し、この E C は、さらに継代培養できる。次いでこれをオーキシン非含有培地に移植することにより不定胚が形成される。例えば、上記誘導に用いられる培地としては、通常の固体または液体の M u r a s h i g e - S k o o g の基本培地 (M u r a s h i g e T , S k o o g F . 1 9 6 2 . P h y s i o l . P l a n t . 1 5 : 4 7 3 - 4 9 7) が用いられ得る。これら植物ホルモンは、天然に存在するものよりもホルモン活性を有する人工的に合成した化合物を用いることが好ましい。植物体への再分化で用い得る好ましい培地としては、V a l u e k e n s ら、P N A S , 8 5 , 5 5 3 6 - 5 5 4 0 (1 9 8 8) に記載される再分化培地が挙げられる。培養条件は、例えば、2 2 で約 4 週間培養で実施され得る。

次いで、再生された植物体を、レトロトランスポゾンの転移について解析し得

る。このような解析に用いられ得る技術としては、DNAを調べるサザンハイブリダイゼーションおよびRNAを調べるノーザンハイブリダイゼーションが挙げられる。解析のために、例えば、イントロンを逆方向に有するマーカー遺伝子を、転写と逆向に組み込んだ改変レトロトランスポゾンを用いる手法も用いられ得る。このような解析は、当代植物を繁殖させて得た次代植物でも可能である。なぜなら、T t o 1は、本願により明らかにされたように、メンデル様式で安定に次代に遺伝するからである。T t o 1の転移は、T t o 1が導入されてから当代の形質転換植物作成の過程で生じている。

T t o 1は、タバコにおいて、培養により転移が活性化されることが知られている(H i r o c h i k a、E M B O J . 1 2 , 2 5 2 1 - 2 5 2 8 (1 9 9 3))。よって、シロイヌナズナについても、培養により転移が活性化されるか否かを検討した。転移コピー数の多く見られた形質転換植物で転移の高活性化が起こると期待されたが、予想に反し、全くまたはほとんど転移をしていない形質転換植物を用いた場合にのみ高度な転移の活性化が見られた(図2)。

本発明の遺伝子破壊のために用いられる植物は、レトロトランスポゾンを低コピー数で有し得る。「低コピー数」とは、1~5コピーを意味し、好ましくは、1~3コピーであり、より好ましくは、1~2コピーであり、最も好ましくは、1コピーである。低コピー数を有する形質転換植物を選抜し、次いでこの植物を組織培養して再分化させることにより、非常に効率よく転移を生じさせ、遺伝子破壊を行い得る。この選抜のために、上記のような解析が用いられ得る。

破壊された遺伝子を解析するために、再分化植物において、転移されたレトロトランスポゾンを標的としてプローブし、その隣接配列を回収し得る。この隣接配列は、PCRによって増幅され得る。PCR増幅の方法は、当該分野で周知である(P C R T e c h n o l o g y : P r i n c i p l e s a n d A p p l i c a t i o n s f o r D N A A m p l i f i c a t i o n、H A E r l i c h編、F r e e m a n P r e s s、N e w Y o r k、N Y (1 9 9 2) ; P C R P r o t o c o l s : A G u i d e t o M e t h o d s a n d A p p l i c a t i o n s、I n n i s、G e l f l a n d、S n i s k y、およびW h i t e編、A c a d e m i c P r e s s、S a n D i e g o、

CA (1990) ; Mattiila (1991) Nucleic Acids Res . 19 : 4967 ; Eckert、K . A . およびKunkel、T . A . (1991) PCR Methods and Applications 1 : 17 ; PCR、McPherson、Quirkies、およびTaylor、IRL Press、Oxford、これらは、本明細書中で参考として援用する) 。ここで用いられるオリゴヌクレオチドプライマーは、代表的には、本明細書に記載の方法に従って得られるが、本発明に開示された配列を基に、化学合成によっても得られ得る。例えば、本発明で用いられるオリゴヌクレオチドプライマーは、Applied Bio Systemsのオリゴヌクレオチド合成機を用いて製造業者によって提供される仕様書に従って合成され得る。次いで、隣接配列を当該分野で周知の方法により配列決定し得る。決定された配列を当該分野で周知の相同性検索プログラムを用いて同定し得る。

本発明の方法によって遺伝子破壊が行われる遺伝子は、以下の表1に例示されるが、これらの遺伝子に限定されない。

本発明の1つの実施態様では、上記形質転換植物から後代植物を得る工程、および該後代植物を組織培養して植物体に再分化させる工程をさらに包含する。上述したように、レトロトランスポゾンTto1は、メンデル形式で遺伝するため、レトロトランスポゾンが転移された当代植物のさらに後代の植物を用いても、遺伝子破壊を行い得る。

Tto1が、活性なレトロトランスポゾンを持たないとされるシロイヌナズナにおいて、トランスポゾンタギングによる遺伝子単離の新たな手段として利用可能であることが示された。レトロトランスポゾンの培養・再分化によって独立な遺伝子破壊系統を得るという手法は、イネのTos17などの内在性のレトロトランスポゾンについては有効な手段であることが明らかにされていたが、異種由来のレトロトランスポゾンにおいても適用可能であることが本研究により初めて明らかにされた。

また、DNAタイプのトランスポゾンとは異なり、染色体上をランダムに転移する性質を有することも明らかにした。この系を利用することによりシロイヌナズナのすべての遺伝子を網羅した破壊系統を効率的に作出することが可能になっ

た。

本発明の遺伝子破壊方法は、シロイヌナズナに限定されず、遺伝子導入のできるいずれの植物にも適用可能である。

以上のように、レトロトランスポゾンを用いる遺伝子破壊方法が確立されれば、植物における遺伝子の機能解析および未知遺伝子の単離の可能性が拡大される。

実施例

以下、本願発明を実施例を挙げて説明する。以下の実施例は、本発明の例示するものであって、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

実施例 1 . バイナリープラスミド p B I T t o 1 (- 3 6) の構築とアグロバクテリウムへの導入

図 1 に p B T t o 1 (- 3 6) の構造を示す。すでに報告した T t o 1 のクローン p S K T t o 1 (- 3 6) (H i r o c h i k a ら、1996、Plant Cell、8、725-734) から T t o 1 の 5' 部分を H i n d I I I と P s t I で、3' 部分を P s t I と X h o I できりだし、H i n d I I I と S a I I で処理したバイナリーベクター p B I 1 0 1 - H m (A k a m a ら、Plant cell Rep. 12, 7-11 (1992)) に挿入することにより、T t o 1 を組み込んだバイナリーベクター p B I T t o 1 (- 3 6) を構築した。構築したプラスミドを電気穿孔法により A g r o b a c t e r i u m t u m e f a c i e n c e E H A 1 0 1 株 (H o o d ら、J. Bacteriol. 168, 1291-1301 (1986)) に導入した。T t o 1 が導入された株を、50 u g / m l のカナマイシンおよび 50 u g / m l のハイグロマイシンを含む L B 寒天培地 (p H 7 . 0) (B a c t o T r y p t o n e (D i f c o 社製) 10 g / l、B a c t o Y e a s t E x t r a c t (D i f c o 社製) 5 g / l、N a C l 10 g / l、B a c t o A g a r (D i f c o 社製) 15 g / l、硫酸カナマイシン、およびハイグロマイシン B (S i g m a) を含む) で選抜した。

実施例 2 . 植物への感染

以下の全ての実験において、シロイヌナズナ生態型 W a s s i l e u s k i j

a (W S) を使用した。アグロバクテリウムのシロイヌナズナの根または胚軸への感染は、A k a m a ら 1 9 9 2 の方法 (P l a n t C e l l R e p . , 1 2 , 7 - 1 1) にしたがった。本実施例で使用された培地は、V a l u e k e n s ら、P N A S , 8 5 , 5 5 3 6 - 5 5 4 0 (1 9 8 8) に記載される。要約すれば、無菌的に育成させたシロイヌナズナの胚軸および根の断片を、カルス誘導培地 C I M (G a m b o r g ' s B 5 3 . 1 g / l 、グルコース 2 0 g / l 、M E S - K O H (p H 5 . 7) 0 . 5 g / l 、2 , 4 - D 0 . 5 m g / l 、カイネチン 0 . 0 5 m g / l を含む ; 5 g / l の G e l l a n G u m で固形化された) で 2 2 で約 1 0 日間 (1 6 時間明条件および 8 時間暗条件) 培養した。次いでこれら胚軸および根の断片にアグロバクテリウムを感染させた。培地を新しい C I M と取り替えた後、これら胚軸および根の断片を、アグロバクテリウムと 3 日間共存培養した。

アグロバクテリウムを洗浄した後、上記根または胚軸の断片を、5 0 u g / m l のハイグロマイシンを含む S I M (シュート誘導培地 ; G a m b o r g ' s B 5 3 . 1 g / l 、グルコース 2 0 g / l 、M E S - K O H (p H 5 . 7) 0 . 5 g / l 、I A A (インドール - 3 - 酢酸) 0 . 1 5 m g / l 、3 - i p N⁶ - (2 - イソペンテニル) アデニン 5 m g / l を含む ; 5 g / l の G e l l a n G u m で固形化) で、2 2 で 4 週間、1 6 時間明条件および 8 時間暗条件下で培養した。1 週間ごとに新しい培地に移植し、培養を続けた。形質転換植物 (T 0) を得た。再生したシュートを G M (発芽培地 ; M u r a s h i g e a n d S k o o g S a l t 4 . 4 g / l 、スクロース 1 0 g / l 、および M E S - K O H (p H 5 . 7) 0 . 5 g / l を含む ; 5 g / l の G e l l a n G u m で固形化) に移して培養し、その後培地 R I M (根誘導培地 ; M u r a s h i g e a n d S k o o g S a l t 4 . 4 g / l 、スクロース 1 0 g / l 、M E S - K O H (p H 5 . 7) 0 . 5 g / l 、I B A (インドール - 3 - 酪酸) 2 0 μ l / l を含む ; 5 g / l の G e l l a n G u m で固形化) に移して培養した。

実施例 3 . サザンハイブリダイゼーションによる転移の確認

実施例 2 で得られた形質転換植物から、セチルトリメチルアンモニウムブロマ

イド (C T A B) 沈澱法 (M u r r a y および T h o m p s o n , N u c l e i c A c i d s R e s . 8 , 4 3 2 1 - 4 3 2 5 (1 9 8 0)) によって D N A を調製した。得られた D N A を制限酵素 E c o R V で切断し、アガロース電気泳動後、ナイロンメンブレンに吸着させた。プラスミド p S K T t o 1 (- 3 6) から調製した T t o 1 領域の D N A 断片を 3 2 P - d C T P で標識し、記載のようにサザンハイブリダイゼーションを行った (H i r o c h i k a , E M B O J . , 1 2 , 2 5 2 1 - 2 5 2 8 (1 9 9 3)) 。また、導入された遺伝子のコピー数を、3 2 P - d C T P (M u l t i p r i m e D N A l a b e l l i n g s y s t e m , A m e r s h a m P h a r m a c i a B i o t e c h) で標識したハイグロマイシン耐性遺伝子を用いたサザンハイブリダイゼーションにより調べた (H i r o c h i k a , E M B O J . , 1 2 , 2 5 2 1 - 2 5 2 8 (1 9 9 3)) 。

転移が起こると、導入された遺伝子のコピー数よりも T t o 1 のコピー数が増えることが期待される。解析の結果、全く転移の起こっていない形質転換植物から、1 5 コピーも転移した形質転換植物まで得られたことがわかった。

形質転換植物の次代 (T 1) について同様の解析を行った。その結果、T t o 1 の配列はメンデル様式で安定に次代に遺伝すること、新たな転移は起こらないことが示された。このことは、形質転換植物 (T 0) で見られた T t o 1 の転移は形質転換植物作成の過程で生じたことを示している。

実施例 4 . 培養による転移の活性化

T t o 1 はタバコにおいて培養によって活性化されることが知られている (H i r o c h i k a , E M B O J . 1 2 , 2 5 2 1 - 2 5 2 8 (1 9 9 3)) 。従って、本実施例では、培養による T t o 1 の転移の活性化について調べた。

実施例 2 の記載からアグロバクテリウムの感染を除いた工程により、無菌的に育成させた形質転換植物 (T 2) の葉および根の断片を培養して、2 9 8 の再分化植物体 (R 0) を得た。植物を鉢上げした。同時に、これらの植物を D N A 抽出のためにプールした。2 5 5 個の再生株から種子が得られ、残りの株は不稔であった。R 0 植物のシュートから D N A を、実施例 3 と同様にして調製し、そしてサザンハイブリダイゼーションにより T t o 1 の転移活性 (コピー数の増加)

を調べた。

図 2 は、T t o 1 が 1 コピー導入された形質転換体 (T 1) の次代の T 2 世代の幼植物の葉および根を用いて行った実験の結果を示す。転移コピー数の多く見られた形質転換植物で転移の高活性化が起こると期待された (結果は示さず) が、予想に反し、全く転移をしていない形質転換植物を用いた場合にのみ高度な転移の活性化が見られた (図 2) 。

実施例 5 . 遺伝子破壊の解析

実施例 4 で同定された、培養により T t o 1 の転移が活性化されコピー数の増加した再分化植物から、実施例 3 に記載の C T A B 法により D N A を調製した。この D N A を鋳型として用いて、T A I L - P C R により T t o 1 の隣接配列を増幅した。反応条件および熱サイクリング設定は記載の通りである (L i u ら、P l a n t J . 8 , 4 5 7 - 4 6 3 (1 9 9 5)) 。要約すると、L A - T a q (宝酒造) を T a q ポリメラーゼのために使用した。T t o 1 特異的プライマーの配列は、以下の通りであった :

T t o 1 - R 1、5 ' - T G G A T A T G A A T A G T G C C C G T A T G G -
3 ' (外側ネステッドプライマー (T t o 1 の 6 5 2 ~ 6 2 9 に対応する)) ;

T t o 1 - R 2、5 ' - T A C T C T A A C C A A A G C T C T G A T A C C -
3 ' (内側ネステッドプライマー (T t o 1 の 6 0 1 ~ 5 7 8 に対応する)) 。

これらと共に、3つの異なる任意プライマーを使用した。それらの配列は、以下の通りである :

A D 1、5 ' - N G T C G A (G / C) (A / T) G A N A (A / T) G A A -
3 ' ;

A D 2、5 ' - G T N C G A (G / C) (A / T) C A N A (A / T) G T T -
3 ' ;

A D 3、5 ' - (A / T) G T G N A G (A / T) A N C A N A G A - 3 ' 。

二次 T A I L - P C R 産物を 1 . 2 % 低融点アガロースゲル (S e a P l a q u e G T G、F M C、R o c k l a n d、M E) 上の電気泳動により分離した。P C R 産物をアガロースゲル薄片から Q i a q u i c k G e l E x t r a c t i o n K i t (G i a g e n , V a l e n c i a , C A) により精製した

。精製された産物を、Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reactionキット(Perkin Elmer / Applied Biosystems, Foster City, USA)を用いてABI 377 DNAシーケンサー(Perkin Elmer / Applied Biosystems)で直接配列決定した。使用した配列決定プライマーは、以下の通りであった：

Tto1 - R1、5' - CTC ACT AAG GAG AGT TGC ATC - 3' (Tto1の69～49に対応する))。

Tto1の隣接配列の相同性検索をBLAST (Altschallら、Nucleic Acids Res. 25, 3389 - 3402 (1997))を利用して行った。その結果の一部を以下の表1に示す。

表1 *Tto1* の転移部位のホモロジー検索およびマッピング

Serial No.	Seq. No.	BlatX	Score	E-Value	BlatN	Map position
1	3	FzFul1 CDS (Arabidopsis, 3377807, AF075971: Zinc finger protein?	63	9.00E-10	PI, MULA, ch.5, AB009054	ch V / 79.0cM
2	6	Proline-rich protein APO isolog (Arabidopsis, 2062107, AC001645)	78	2.00E-14	PI, MED24, ch.5, AB005235	V / 7.1
3	8	Hypothetical protein (Campylobacter)	29	5.2		
4	10				PI, AB009054, Ch.5	
5	12	Glucosyltransferase (Arabidopsis, 292335), 100%	258	1.00E-68	ESSA 1 contig (segment No.9, ch.5, Z97325)	
6	16	ATP dependent dsDNA endonuclease (Aquifex, Z984155)	31	1.3		
7	20	Hypothetical protein (Arabidopsis, 3805761, AC005693), 100%	136	2.00E-32	BAC, T25N23, ch.2, AC000699	II / 18.6
8	21				Nested Tto1	
9	22	Hypothetical protein (Arabidopsis, e1250518, AL021811), 100%	177	2.00E-44	BAC, F10M6, ch.4, AL021811	
10	24	Esponin (Arabidopsis, AtEXF5, 1041704, U10478)	40	0.007		
11	26	tRNA-glutamine synthetase, (Lupinus luteus, c1284527, X91787)	76	1.00E-13		
12	28	Similar to hml (harpalin-induced gene 1)(Arabidopsis, 3193310, AF069300)	85	2.00E-16	PI, MHF15, ch.5, AB006700	V / 17.9
13	35				PI, MU83, Ch.5, AB010076	V / 123.2
14	36	F8M12.2 (Arabidopsis, 2513734), F8M12.4, F8M12.5 gene product	72	5.00E-13	BAC, F8M12, AF080118	
15	38	NAM-like protein, 100% (Arabidopsis, 3695377, AF096370, 3695378, 3695379)	87	5.00E-17	BAC, F1104, AF096370	IV / 8.7
16	39	Receptor-like kinase, 100%? (Arabidopsis, 3236253, AC004684)	105	8.00E-23	BAC, F13M2, ch.2, AC004684	II / 68.9
17	41	C. elegans EST yk317c7.5 (c1247655, Z99282)	32	1.6		
18	42	Serine/threonine kinase (Sorghum bicolor, c1184909, Y12464)	45	1.00E-04		
19	43	C. elegans hypothetical protein (z257868, Z78064)	34	0.12	BAC, F21B12, ch.4, AL022604	IV / 84.8
20	44				Nested Tto1	
21	47				BAC, T188, ch.2, U78721	II / 64.3
22	57	Hypothetical protein (Arabidopsis, 3337367, AC004481)	49	2.00E-10		
23	66	Passive protein (Myb?) (Arabidopsis, e1248723, AL021637)	77	2.00E-15		
24	72				into LTR of Tto1?	
25	77	Olfactory receptor ODR-10, (C. elegans, 2921626, U42830)	29	3.9	BAC, T8P5, ch.1, AC004512	I / 90.3
26	79				PI, MN18, ch.5, AB017068	
27	80	Hypothetical protein similar to T18A10.3, (Arabidopsis, 2262177, AC002329)	46	6.00E-05		
28	82	EST T21788 (Arabidopsis, 2341027, AC000104), 100%	164	2.00E-40	BAC, F19P9, ch.1, AC000104	
29	85	CLV1 receptor kinase (Arabidopsis, 2160036, U96879)	38	0.044		
30	86	Reverse gyrase (Aquifex, Z959417, AB000712)	30	2.1		
31	92				PI, MQ116, ch.5, AB012544	V / 42.3
32	95				BAC, F18A17, ch.5, AC005403	V / 57.0
33	97	CdsF (Drosophila burgomeyeri, 1653793, U40414)	30	6.2	BAC, T4E14, ch.2, AC005171	II / 18.6
34	105				BAC, T21L14, ch.2, AC000033	II / 62.5
35	109	Hypothetical protein, (Arabidopsis, 2194134, AC002062), 100%, co-repressor SIN3A	102	1.00E-21	BAC, F20P5, ch.1, AC002062	I / 107.4
36	110	Similar to uridylyl transferase, (Arabidopsis, 2225923, AC002291)	61	1.00E-10	BAC, F22K20, ch.1, AC002291	I / 114.2
37	115	hairy protein (GHLH), (Drosophila virilis, F29303)	31	4.1		
38	116				PI, MN18, ch.3, AB017069	
39	125	Prizimycin 1 synthetase 3,4 (Streptomyces, e308993)	29	8.5		
40	128				BAC, T24D22, repetitive seq.?	
41	134	Annexin p35 (Lycopersicon, 3378204, AF079231)	42	0.001		
42	140	AURAB8 (Arabidopsis, 2289961, U83434)	29	9.3		
43	145	Phosphatidate-specific phospholipase C (Arabidopsis, D56864, S71170)	100	8.00E-21	PLC cDNA (D50804)	
44	150				into LTR of Tto1?	
45	165	Urtasec (Canavalia ensiformis, 167228, M63260)	56	2.00E-07		
46	166	MAP Kinase (Arabidopsis, 2191146, AF007269), MTPK, ATMFK4, ATMFK6,...	106	6.00E-23	MAPK cDNAs	
47	170	Gemin-like protein (Arabidopsis, 1755162, U75192)	43	7.00E-04	gemin cDNA	
48	174	EST (c134701), Z77565, D64926)	29	7.8		
49	175				passive transmembrane protein AF049256	
50	176	Hypothetical protein (Arabidopsis, 2252828, AF013293)	42	1.00E-06		
51	177	Serine/threonine kinase (Arabidopsis, 3333352, AC004512)	42	0.002		
52	180				BAC, T14N5, ch.1, AC004360	I / 114.2
53	182	HSV58 (Simian herpes B virus) glycoprotein D precursor (P06342)	33	0.54		
54	183				BAC, T20D16, ch.2, AC002391	II / 39.9
55	188	Ste20-like kinase homolog (Arabidopsis, 3176674, AC036711)	35	0.14		
56	190	Recombinase gene (Arabidopsis, c327519, Z97242)	58	3.00E-08	PI, M2K10, ch.3, AB003248	V / 78.9
57	192	Tenascin-carbonic nerve (A-13903)	31	6.9	TAC, T21C13, ch.5, AB010699	V / 91.8
58	195	alpha-N-acetylglucosaminidase (Mus musculus, c1311488, AJ223966)	29	8.3		

(表 1 続き)

59	200	Phosphatidic acid phosphatase 2a (Carrisa porcilla, 3641334, AF088283)	71	5.00E-12		
60	201	Hypothetical protein (Arabidopsis, 326887, Z97336)	65	3.00E-10	BAC, F9H3, ch.4, 18.8cM, AF071527	IV / 18.8
61	205	Malate oxidoreductase (Oryza sativa, P43279)	59	4.00E-10	BAC, F1B17, ch.5, 60.5cM, AC005405	V / 57.0
62	211	Dihydrofolate reductase-thymidylate synthetase (Daucus carota, c1289612, AJ003139)	37	3.00E-06	repetitive seq.	
63	212	Similar to glyoxyl hydrolases, (Arabidopsis, 3047123, AF058919), 100%	92	1.00E-18	BAC, F6N23, AF058919	IV / 4.5
64	214	Similar to cytochrome P450, (C. elegans, c1347959, Z30742)	29	8		
65	217	Chitinase (Emicella nidulans, d1025495, D87895)	31	5.2		
66	218				P1, MJB3, ch.5, AB010076	V / 123.2
67	221	Protein phosphatase 1 catalytic subunit (Arabidopsis, d1025195, AB000094), 100%	63	1.00E-09	genomic, AB000094	
68	222	Kinesin-like protein A (Arabidopsis, Q07970)	79	3.00E-26	repetitive seq.	
69	226	Autan-responsive GHS-like protein, (Arabidopsis, 3650057, AC005196), 100%	247	3.00E-65	BAC, T26120, ch.2, AC005196	II / 29.2
70	228	Urease (Fibrobactia, 3688063, AF005062)	29	5.7		
71	230	FtN21.11 (Arabidopsis, 2760326, AC002130), glyoxal oxidase	78	2.00E-17		
72	231	Thioesterase M-type (pen, P68344)	125	1.00E-28	repetitive seq.	
73	236				YAC, YUP8812R, ch.1, AC002586	I / 4.0
74	242				into Tto17	
75	243	Hypothetical protein (Arabidopsis, c327517, Z97342)	47.3	1.00E-05		
76	249				into Tto1	
77	251	Hypothetical protein (Arabidopsis, e1249684, AL021713)	123	1.00E-28	BAC, T9A21, ch.4, AL021713	IV / 58.1
78	256	Hypothetical protein, (Arabidopsis, 2392765, AC002534), myosin heavy chain	94	1.00E-19		
79	266				BAC, F1715, ch.4, AL031032	IV / 80.5
80	268	Putative protein (Arabidopsis, c1287886, AL022605)	71	2.00E-12	P1, MQN23, ch.5, AB013395	V / 123.2
81	270	Hypothetical protein (Arabidopsis, c1283955, AL022273)	56	1.00E-07	P1, M9EP, ch.4, AL022273	
82	277	Putative protein (Arabidopsis, e1248669, AL021712)	83	8.00E-22		
83	278	DNA-dependent RNA polymerase (Methanobaculum, 2622150, AB000876)	36	0.2	AE000876	
84	281	Putative receptor kinase, (Arabidopsis, 2642433, AC002391), 100%	90	3.00E-18	BAC, T20D16, ch.2, AC002391	II / 39.9
85	286	Putative serine/threonine kinase (Arabidopsis, 3786010, AC005499), 100%, CDC2B...	173	5.00E-43	BAC, T6A23, AC005499, ch.2	II / 68.9
86	288	Hypothetical protein (Arabidopsis, 2347195, AC002318)	78	2.00E-14		
87	289	Hypothetical Protein (Arabidopsis, 3785969, AC005560), and-inducible protein	149	9.00E-36	BAC, F2B, ch.2, AC005560	II / 1.7
88	293	Similar to Myb1 (isolg T01024-1 (Arabidopsis, 3249980, AC004473)	34	0.002		
89	297	Hypothetical protein, (Arabidopsis, 2347195, AC002318)	53	3.00E-07		
90	302	ATHB-4 (HD-Zip) (Arabidopsis, F929531, 100%)	79	1.00E-14	ATHB-4 (Y08682), BAC, T13E5, ch.2 (AC002388)	
91	306	DNA topoisomerase II, (Arabidopsis, F301822, 100%)	124	1.00E-28	Topo II, (L21015), 100%	
92	310				Nested Tto1	
93	311	Similar to Sporebox hypothetical protein C3H1.10 (C. elegans, c1347126, Z66513)	30	1.8	P1, MRH10, ch.5, AB005703	V / 91.8
94	312	putative receptor kinase, (Arabidopsis, 2462756, AC002392), 100%	153	4.00E-37	BAC, F8A5, AC002392	I / 84.3
95	315				Nested Tto1	
96	326				BAC, T6B13, ch.2, AC005398	II / 29.2
97	327	NuH transporter (Symphyotermis sp., d1017724, D90902)	33	0.9		
98	332	Similar to ubiquitin conjugating enzyme (C. elegans, D06704, U41076)	31	2.2		
99	336	Putative zinc finger protein (Arabidopsis, 3341678, AC003672), Ring finger RFA3b...	48	9.00E-06		
100	340	Transcription Factor SF31 (Arabidopsis, 2088643, AF002109), ~100%	53	3.00E-07	BAC, T7B421, ch.2, AF002109	II / 72.4
101	347	Purple acid phosphatase, (Arabidopsis, c353237, Z97708)	75	3.00E-13		
102	348	Sat1 Suppressor of sable, (Drosophila viridis, 671708, U20660)	30	7.3		
103	349	Predicted protein, (Arabidopsis, e1248844, AL021684), Brassica hcd chain a.a. aminotransferase	73	1.00E-12		
104	350	Hypothetical protein (Platanus, 3845215, AE001402)	35	0.12	chA, ESSA I contig fragment No.1, Z97336	
105	355	Putative apolipoprotein N-acyltransferase (Treponema, 3322520, AB001206)	28	7.2		
106	361	Calmodulin-like protein, (Arabidopsis, F30188)	72	1.00E-12	BAC, F13H10, ch.2, AC005662	II / 78.5
107	363	Putative receptor protein kinase (Arabidopsis, 3461838, AC005315)	46	3.00E-05		
108	368	Hypothetical protein, (Arabidopsis, 3510258, AC005310)	57	2.00E-08		
109	371	Putative protein (Arabidopsis, c1249569, AL021712)	64	2.00E-10	BAC, T1014, ch.4, AL021712?	IV / 62.9
110	375	Monoxygenase, (Arabidopsis, e1315911, AJ007387)	67	5.00E-11	ESSA I contig fragment 4, Z97339	
111	376	Putative cytochrome P450, (Arabidopsis, 3927833, AC005727), 100%, DWARF3 (Maize)	173	3.00E-43	BAC, F8N16, ch.2, AC005727	II / 56.2
112	377	Putative cytochrome P450, (Arabidopsis, 2880052, AC002340)	135	1.00E-31		
113	379	Hypothetical protein, (Arabidopsis, 3226239, AC004684), 100%	54	4.00E-07		
114	380	Putative arabin, (Arabidopsis, 3785996, AC005499)	57	6.00E-08	BAC, T6A23, ch.2, AC005499	II / 68.9
115	381				P1, MAC9, ch.5, AB010069	V / 115.0
116	391	iroB, irxA, (Arabidopsis, Y09581)	53	9.00E-07		
117	392	Hypothetical protein, (Arabidopsis, 3373359, AC004481), 100%, Myb7	144	1.00E-34	BAC, F13P17, ch.2, AC004481	II / 66.8
118	394	Senescence-associated protein 6, (Hemerocallis, 3551956, AF082031)	34	0.46		
119	396	Unknown protein, (Arabidopsis, 3340194, AC004121) ~100%	83.5	2.00E-16	BAC, T2711, ch.1, AC004121	I / 9.3

表 1 において、様々な遺伝子の内部に T t o 1 が挿入された多数の例が認められた。

実施例 6 . T t o 1 の転移標的部位のマッピング

B L A S T を利用する相同性解析により、T t o 1 が、これまでに解析された配列の中に挿入する多数の例が多数見られた。これらの内いくつかの配列は、染色体上にマッピングされている。この情報に基づいて、T t o 1 の点標的部位をマッピングし得る (図 3)。図 3 に示されるように、タバコレトロトランスポゾン T t o 1 は、トウモロコシのトランスポゾンとは異なり、染色体上にほぼランダムに転移する性質を有した。3 番染色体にマップされる例が見つからないのは、この染色体の塩基配列情報がデータベースに極めて少ないことに起因していると考えられる。* 印は、同一の B A C クローンの塩基配列内に、複数の転移個所が同定された部位を示す。

上記の実施例は、本発明の種々の局面、および本発明の特定のオリゴヌクレオドがどのように作成され、および利用されるのかを例示して記載している。本発明の範囲を制限するものではない。

産業上の利用可能性

活性化レトロトランスポゾンが存在しないとされるシロイヌナズナにおいて、トランスポゾンタギングによる遺伝子破壊および遺伝子単離の新たな手段が提供された。レトロトランスポゾンの培養・再分化によって独立な遺伝子破壊システムを得るという手法は、異種由来のレトロトランスポゾンにおいても適用可能であることが明らかにされた。本発明の遺伝子破壊方法は、シロイヌナズナに限定されるものではなく、遺伝子導入のできるいずれの植物にも適用可能である。

本発明で使用されるレトロトランスポゾン T t o 1 はまた、DNA タイプのトランスポゾンとは異なり、染色体上をランダムに転移する性質を有することも明らかになった。この系を利用することにより、モデル植物であるシロイヌナズナのすべての遺伝子を網羅した破壊システムを効率的に作出することが可能になった。

【配列表】

<110> National Institute of Agrobiological Resources, Ministry of Agriculture, Forestry, and Fisheries

<120> A method for gene disruption using the tobacco retrotransposon

<130> F5-99PCT290/ARO16PCT

<140>

<141>

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence: Tto1-specific primer

<400> 1

tggatatgaa tagigcccgt atgg

24

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence: Ttol-specific primer

<400> 2

tactctaacc aaagctctga tacc

24

<210> 3

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence: arbitrary primer for amplification of

genomic sequence flanking Ttol

<400> 3

ngtcgaswga nawgaa

16

<210> 4

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence: arbitrary primer for amplification of

tion of
genomic sequence flanking Tto1
<400> 4
gtncgaswca nawgit 16

<210> 5
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of artificial sequence: arbitrary primer for amplification of
genomic sequence flanking Tto1
<400> 5
wgtgnagwan canaga 16

<210> 6
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of artificial sequence: sequencing primer

<400> 6
ctcactaagg agagttgca c 21

【図面の簡単な説明】

図 1 は、p B I T t o 1 (- 3 6) の構造を示す図である。

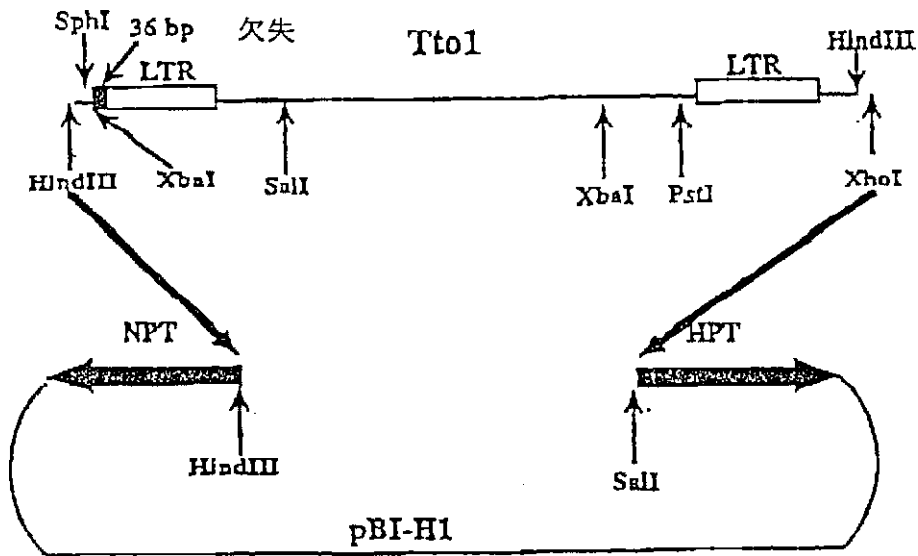
図 2 は、シロイヌナズナにおける T t o 1 の転移の D N A ゲルプロット分析を示す写真である。独立した再生植物から単離した 1 . 0 μ g のゲノム D N A を X b a I で消化し、そして電気泳動した。プロットを T t o 1 の ³ ² P 標識 0 . 3

k b の X b a I / P s t I フラグメント (4 2 8 4 ~ 4 6 8 8 に 対 応) を 用 い て
プ ロ ー プ し た 。 元 の T - D N A コ ピ ー に 対 応 す る バ ン ド お よ び 線 状 分 子 に 対 応 す
る バ ン ド を 示 す 。 レ ー ン 1 ~ 1 2 は 、 葉 外 植 片 か ら 再 生 し た 植 物 か ら 単 離 さ れ た
D N A で あり 、 レ ー ン 1 3 ~ 2 4 は 、 根 外 植 片 か ら 再 生 し た 植 物 か ら 単 離 さ れ た
D N A で あり 。

図 3 は 、 T t o 1 の 転 移 標 的 部 位 の マ ッ ピ ン グ を 示 す 図 で あり 。

マ ッ ピ ン グ さ れ た T t o 1 挿 入 を 有 す る 遺 伝 子 座 を R I マ ッ プ (L i s t e r お よ び D e a n
、 P l a n t J . 4 , 7 4 5 - 7 5 0 1 9 9 3) と 並 べ 、 矢 印 で 示 す 。 各 矢
印 は 、 独 立 し た 挿 入 事 象 を 示 し て い る 。 染 色 体 長 の 目 盛 を 右 側 に 示 す 。 い く つ か
の 染 色 体 マ ー カ ー を マ ッ プ 中 に 示 す 。

【 図 1 】

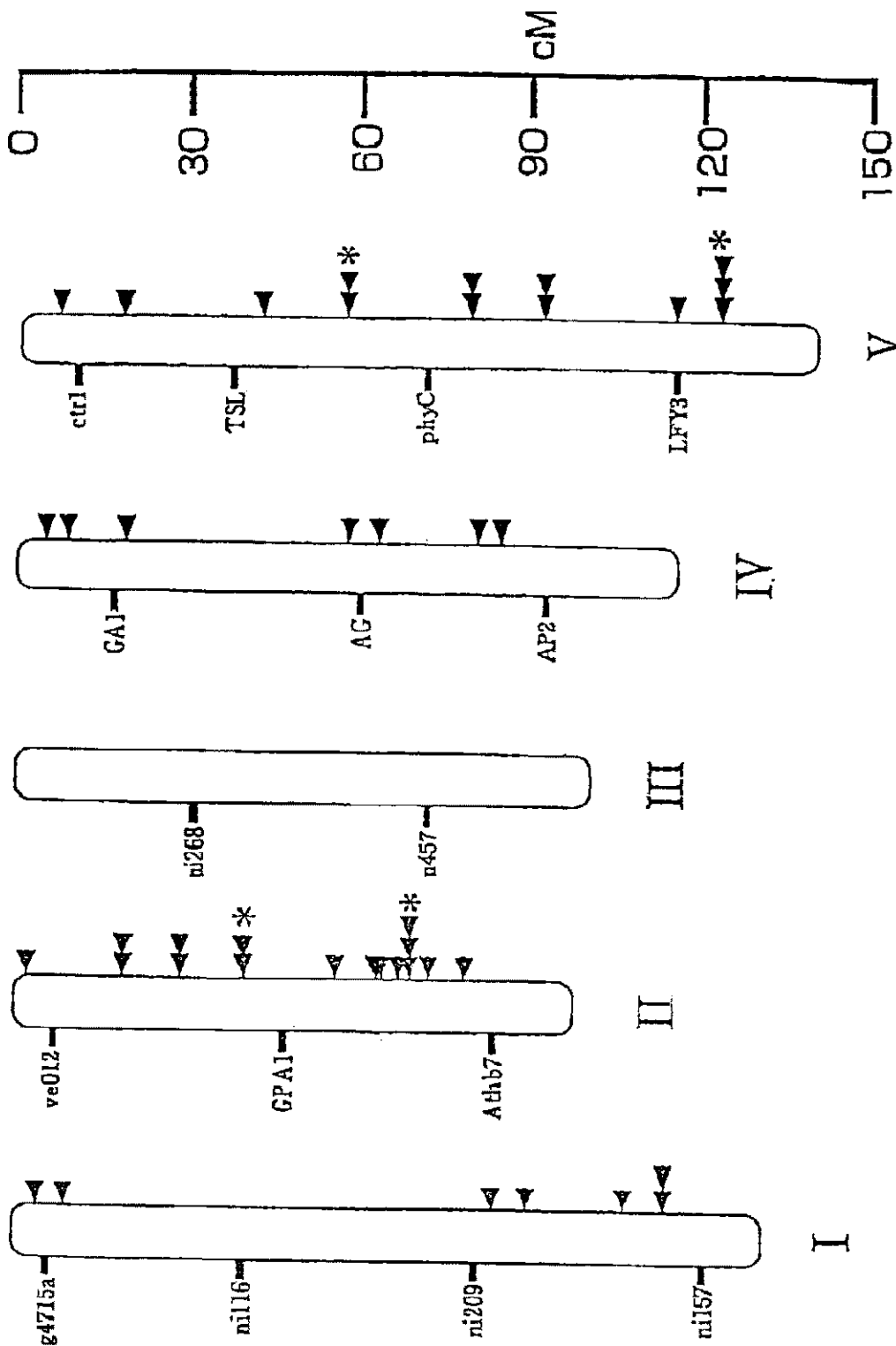


【 図 2 】




図 2

【 図 3 】



【 図 3 】

【 国 際 調 査 報 告 】

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 99/02749	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))			
Int.Cl ⁶ C12N15/10// C12N5/10			
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.Cl ⁶ C12N15/10、 C12N5/10			
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			
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)			
BIOSIS(DIALOG), WPI(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	
X/A	Plant J., Vol. 9, No. 3(1996) Corinne Moreau-Mhiri et al.; "Regulation of expression of the tobacco Tnt1 retro- transposon in heterologous species following pathogen- related stress", p. 409-419	1, 3-8/2	
X/A	J. Virology, Vol. 71, No. 5(1997) Frank Feuerbach et al.; "Retrovirus-like end processing of the tobacco Tnt1 retro- transposon linear intermediates of replication", p. 4005-4015	1, 3-8/2	
X/A	EMBO J., Vol. 14, No. 10(1995) Helene Lucas et al.; "RNA-mediated transposition of the tobacco retrotransposon Tnt1 in <i>Arabidopsis thaliana</i> ", p. 2364-2373	1, 3-8/2	
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> 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 9. 9. 99		国際調査報告の発送日 21.09.99	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 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) 滝本 晶子  4 B 9452 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。

なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。