

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11)特許番号

特許第3507856号  
(P3507856)

(45)発行日 平成16年3月15日(2004.3.15)

(24)登録日 平成16年1月9日(2004.1.9)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I
C 1 2 N 15/09	Z N A	A 0 1 H 5/00 A
A 0 1 H 5/00		C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 N 5/10		5/00 C

請求項の数8(全 6 頁)

(21)出願番号	特願平10-162186	(73)特許権者	391012501 九州大学長 福岡県福岡市東区箱崎6丁目10番1号
(22)出願日	平成10年6月10日(1998.6.10)	(72)発明者	射場 厚 福岡県福岡市東区箱崎6丁目10番1号
(65)公開番号	特開平11-346774	(72)発明者	島田 多喜子 石川県石川郡野々市町末松1-308
(43)公開日	平成11年12月21日(1999.12.21)	(72)発明者	草野 友延 奈良県生駒市高山町8916-5
審査請求日	平成11年8月25日(1999.8.25)	(74)代理人	100072051 弁理士 杉村 興作 (外6名)
		審査官	鈴木 美葉子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 DNAフラグメント、組み換えDNA、形質転換植物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の(a)または(b)に示す塩基配列からなることを特徴とする、DNAフラグメント。

(a) 配列表の配列番号1に示す塩基配列のうち、塩基番号1-3794で表される塩基配列

(b) (a)の塩基配列の1個または数個が欠失、置換若しくは付加された塩基配列

【請求項2】 トウモロコシの低温誘導性遺伝子m1i<sub>p</sub>15を含むことを特徴とする、請求項1記載のDNAフラグメント。

【請求項3】 低温応答性のプロモーター活性を示す、以下の(c)または(d)に示す塩基配列からなることを特徴とする、DNAフラグメント。

(c) 配列表の配列番号1に示す塩基配列のうち、塩基番号1-2797で表される塩基配列

(d) (c)の塩基配列の1個または数個が欠失、置換若しくは付加された塩基配列

【請求項4】 低温応答性のプロモーター活性を示す、以下の(e)または(f)に示す塩基配列からなることを特徴とする、DNAフラグメント。

(e) 配列表の配列番号1に示す塩基配列のうち、塩基番号1-2271で表される塩基配列

(f) (e)の塩基配列の1個または数個が欠失、置換若しくは付加された塩基配列

【請求項5】 請求項1に記載のDNAフラグメントを含む組み換えDNA。

【請求項6】 請求項3に記載のDNAフラグメントを含む組み換えDNA。

【請求項7】 請求項1に記載のDNAフラグメントを含む組み換えDNAが導入されている、耐冷性を有する

形質転換植物。

【請求項8】 請求項3に記載のDNAフラグメントを含む組み換えDNAが導入されている、低温に应答して特定のタンパク質を形質発現する形質転換植物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、トウモロコシ、イネ等の耐冷性品種などを作出するのに好適なDNAフラグメント、組み換えDNA、および形質転換植物に関するものである。

【0002】

【従来の技術】植物の耐冷性と、生体膜を構成する脂肪酸の不飽和度との間には有為な相関があることが、これまでの研究で指摘されてきた。本発明者は、形質転換タバコ植物体において、シロイヌナズナ由来の脂肪酸不飽和化酵素遺伝子FAD7を高発現させることにより、低温に対して一層耐性となることを、実験的に示した。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】一方、植物細胞で、ある蛋白質を生産しようとする際には、従来は構成的に発現し、かつプロモーター活性の強いものが使われてきた。こうしたプロモーターは絶えず機能するため、植物にとっての経済学上は不利益なことも起こっていた。

【0004】例えば、植物に耐冷性を付与するようなタンパク質を形質発現させる場合にも、構成的プロモーターを用いているので、植物は、常温時においては不必要な、耐冷性を付与するための遺伝子の発現を強いられる結果となり、好ましいことではない。

【0005】このような背景から、部位特異的、誘導的プロモーターの開発が求められていた。特に、脂肪酸不飽和化酵素遺伝子やその他の耐冷性に寄与するタンパク質遺伝子等を低温誘導的に発現する育種中間母本を作出するために、あるいは不安定機能タンパク質を、植物細胞を用いて生産できるようにするために、特定遺伝子の発現を低温時にのみ強化する必要がある。

【0006】本発明の課題は、脂肪酸不飽和化酵素遺伝子、その他の耐冷性に寄与するタンパク質遺伝子の発現を、低温に应答して強化できるようなプロモーターを提供することである。

【0007】また、本発明の課題は、前記のプロモーターを利用して、耐冷性品種を作出できるようにすることである。また、本発明の課題は、植物細胞における低温時特異的な機能タンパク質の誘導生産系に対して、本プロモーターを利用することである。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明は、(a)または(b)に示す塩基配列からなることを特徴とする、DNAフラグメントに係るものである。

(a)配列表の配列番号1に示す塩基配列のうち、塩基番号1-3794で表される塩基配列

(b)(a)の塩基配列の1個または数個が欠失、置換若しくは付加された塩基配列

【0009】また、本発明は、前記のDNAフラグメントを含む組み換えDNA、および、前記のDNAフラグメントを含む組み換えDNAが導入されている、耐冷性を有する形質転換植物に係るものである。

【0010】また、本発明は、低温応答性のプロモーター活性を示す、(c)または(d)に示す塩基配列からなることを特徴とする、DNAフラグメントに係るものである。

(c)配列表の配列番号1に示す塩基配列のうち、塩基番号1-2797で表される塩基配列

(d)(c)の塩基配列の1個または数個が欠失、置換若しくは付加された塩基配列

【0011】また、本発明は、(c)または(d)に示す塩基配列からなるDNAフラグメントを含む組み換えDNA、および、この組み換えDNAが導入されている、低温に应答して特定のタンパク質を形質発現する形質転換植物に係るものである。

【0012】また、本発明は、低温応答性のプロモーター活性を示す、以下の(e)または(f)に示す塩基配列からなることを特徴とする、DNAフラグメントに係るものである。

(e)配列表の配列番号1に示す塩基配列のうち、塩基番号1-2271で表される塩基配列

(f)(e)の塩基配列の1個または数個が欠失、置換若しくは付加された塩基配列

【0013】イネ低温誘導性遺伝子*lip19*及びトウモロコシ低温誘導性遺伝子*mlip15*は、DNA結合因子をコードすることから、低温ストレス時に誘導あるいは抑制される他の遺伝子群の転写を左右する遺伝子ではないかと考えられている。本発明者は、トウモロコシ*mlip15*遺伝子の低温誘導性プロモーターの機能単位を明らかにし、かつこの機能部分が形質転換植物においても機能することを明らかにした。

【0014】本発明者は、トウモロコシ*mlip15*遺伝子のゲノムクローンを、通常の方法により単離した。塩基配列決定により、当該遺伝子は、イントロンを含まないことが明らかとなった(配列表の配列番号1を参照)。

【0015】*mlip15*ゲノム遺伝子の2.8kbのゲノム配列(*mlip15*cDNAの5'-非翻訳領域0.6kbと左記配列に連なる上流の2.2kbのゲノム配列)と、2.2kbの(2.8kbゲノム断片より上述の0.6kbの5'-非翻訳領域を除いた)ゲノム配列とを、レポーター遺伝子である-グルクロニダーゼ遺伝子にそれぞれ連結し、各組み換えDNAを構築した。これらの各組み換えDNAを、イネはい盤に由来するカルスに対して、パーティクルガン装置を用いて導入したところ、前者では低温に対する反応性が保持されて

いたが、0.6 kbの5' - 非翻訳領域を除いた2.2 kb断片のみでは、低温反応性が失われていた。従って、5' - 非翻訳領域0.6 kbを含む2.8 kb断片に、低温応答性のプロモーター機能があることが明らかとなった。

【0016】本発明において、組み換えDNAを作製する際のベクターとしては、例えばプラスミドを使用できる。また、組み換えDNAを導入するための植物としては、トウモロコシ、イネ、小麦、大麦、オート麦、粟、ひえ等の単子葉有用栽培植物が好ましい。また、前記の各DNAフラグメントの塩基配列においては、一個または数個の塩基について、欠失、置換、付加が行われても、本発明のプロモーター機能を損なうものでない限り、本発明の範囲内である。また、本発明のプロモーター機能によって生産が誘導されるタンパク質としては、オメガ-3脂肪酸不飽和化酵素等がある。

【0017】

【実施例】(m*l*i

15

ゲノムクローンの単離、および、塩基配列の決定)

トウモロコシ(品種;ハニーバントム)より調製したゲノムDNAを、制限酵素Sau3Aで部分消化した後、ショ糖密度勾配遠心法により分離し、9.7-2.2 kbの鎖長のDNA画分を得た。このDNA画分を、ラムダEMBL3をBamHIで消化したものに連結した後、Giga-pack Gold Kitを用いてファージ粒子とした。大腸菌XL1-BlueMRA(P2)を宿主として検定したところ、 $1 \times 10^7$  pfu/mlのライブラリーを得た。m*l*i

15

cDNA全長をプローブとして、このライブラリーを選抜し、3つのポジティブクローンを得た。このうち、「ラムダH1」と名付けたクローンは、m*l*i

15

cDNAと、その5'上流側に5 kbと、その3'下流側に5 kbとを含む、11.5 kbの断片を含んでいた。

【0018】配列表1には、m*l*i

15

cDNAの全長を含む、3,794 bpからなるEcoRI-BamHI断片の塩基配列を示す。なお、m*l*i

15

タンパク質をコードする領域の推定アミノ酸配列は、1文字表記で遺伝子配列の下に記した。この推定アミノ酸配列に対応する塩基番号は、2798-3204である。この塩基配列の終止コドンは、「米」印で示した。予想された「TATA box」配列には下線を施し、併せて表記した。m*l*i

15

の転写開始点は、白抜き文字(T、塩基番号2272)で表わした。

【0019】(イネカルスへ導入するためのDNA組換え体の構築)

トウモロコシm*l*i

15

ゲノムクローンを鋳型とし、配列番号1の塩基番号1-2797の断片と、1-2271の断片とを、それぞれPCR法(ポリメラーゼ連鎖反応法)で増幅した。塩基番号1-2797の断片は、前述した2.8 kbのゲノム配列であり、m*l*i

15

cDNAの5' - 非翻訳領域0.6 kbと、5' - 非翻訳領域0.6 kbに連なる上流の2.2 kbのゲノム配列とからなる。塩基番号2798-3204は、m*l*i

15

タンパク質をコードする領域である。塩基番号1-2271の断片は、前述した2.2 kbのゲノム配列であり、2.8 kbゲノム断片から、5' - 非翻訳領域0.6 kbを除いたものである。

【0020】増幅の際の酵素は、校正活性を持つLATAaq DNAポリメラーゼを用いた。なお、その際、各断片において、塩基数1から6までがHind III部位(AAGCTT)になるように、塩基数2792-2797と、2266-2271とか、それぞれ、BamHI部位(GGATCC)になるように、各プライマーを設計した。

【0021】各増幅断片を、大腸菌用ベクターpUC18のBamHIとHind III部位との間に組み込み、各塩基配列の確認を行った。各塩基配列を確認した各プラスミドより、2797 bpと2271 bpからなる各Hind III-BamHI断片を再度調製して、pBI221のHind III-BamHI間に組み込んだ。得られた各組換えプラスミドを、pBImp28(m*l*i

15

 promoter 2.8 kb領域を含む)とpBImp22(m*l*i

15

 promoter 2.2 kb領域を含む)と名付けた。

【0022】図1に、m*l*i

15

プロモーター領域を模式的に表わした。+1は転写開始点を表しており(塩基番号2272)、鍵矢印は転写の向きを表しており、「ATG」は翻訳開始コドンの位置を示す(塩基番号2798)。上記した組換えプラスミドが含むm*l*i

15

プロモーターの部分を図示した。レポーター遺伝子として、ベータ-グルクロニダーゼ遺伝子(GUSと略記)を用いているが、図1のGUS遺伝子の部分は、表記が定規どおりではない。

【0023】(導入プラスミドの低温反応性)

イネ(品種、ノトヒカリ)胚盤由来カルスに、パーティクルガン(BIO-RAD社製)を用いて、上記の各プラスミドを導入した。導入後、摂氏25度暗所にてカルスを24時間培養した後、均等に2分割した。一方を25度で、他方を5度でさらに24時間培養し、GUS検定を行った。GUS活性は、X-Glucを基質として行い、胚盤あたりの青スポットの数の5度/25度の比から低温反応性の有無を判定した(表1)。両プラスミドについて3度の繰り返し実験を行った。この結果を表1に示す。

【0024】

【表1】

導入プラスミドの低温反応性

導入プラスミド	低温反応性	
	GUS 活性の比 (5度/25度) *	
pBImp28		
実験1	2.7	
実験2	6.0	
実験3	4.7	
pBImp22		
実験1	1.1	
実験2	0.62	
実験3	0.57	

【0025】 pBImp28を導入した場合には、高度のGUS活性が得られた。これに比べると、pBImp22を導入した場合には、GUS活性は劣っていた。この結果から、次のことが分かる。

(a) トウモロコシ m l i p 1 5 ゲノムクローンの塩基番号1 - 3794の塩基番号のDNAフラグメントが、低温応答性のプロモーター領域を、m l i p 1 5 タンパク質をコードする領域の推定アミノ酸配列の上流側に有している。

(b) 塩基番号1 - 2797が低温応答性のプロモータ

```

1 GAATTCGAATAACGCGCCCGCATGCAACCAGATAGCGGATCTTTTCGGCGCTAAACTCA 60
61 GAGGGAAGCAATTGCCGGAAGAGTCGGCGTGCAAGAATAACATAAGTAGATAAGATTTCA 120
121 CGATCTATAAAAGGATATCTCCCTAGTCGGCTATATAAGGCTAGGGAGGTACCCAAACAA 180
181 AACGAATCACTCTCTTTACCACCATAACGCCCACTAGTAGACTAATATGAGATCTCATC 240
241 CACCGTCACCCGCGAATCATCTGTAACCCAAGCAAACCTCAATACCCAACATCACACATGA 300
301 CTTAGGGTATTACGCATTTAGGCGACCCGAACCTGTATAATTTTCTTGTTTCAACGTG 360
361 CACCTGCACGTACCATCGAGTTGCGATTAACGTGCGCTCCTCCAAAAATACTGGTGGT 420
421 CCTCCAAAAAAGTACGACCGGACGATAGAAATAGTGTATGGCTAAGTAGAGCAAGGTGGC 480
481 TTTGGTCCGCGGCTATGATGAGAATCCAGTAGACTGAATCCACGTGCTAAACCAACATC 540
541 ACTGGTTTTGGCTGCATCTTCTCGGATTACGTGTGTGTGCAAATTCATAATCCACGG 600
601 CAACCAGACGGGGCGCAACCAATTGGTGTCTTAGGAAGCCCCCGGTTACATTGGAT 660
661 CATAGGATGATTCAAGGGTTATGATTTTTTAGCTACTAATTGGTTGTCATCATGGTTTAT 720
721 AGGTGAAGATTGTTATTCATCAAGGGCGACATATCCCTCCGCTTTAGAGACTTGGCT 780
781 GTAGTGTAACATGGATGTAATTTGCTACCTTTAATAGAGTCCCTTAGCTCTTCAAAAA 840
841 CAAATCTTATTATATATTAATTACTAGTCCATCCATTTTATTCTAATTTAGTTTCGAAAT 900
901 TACTAAATATAGAAAATAAAATAGAGTTTTAGTAGCAATATGAAAAGTAAATATAGTT 960
961 TTAATTTCCGTATTTAGTGATTTAAATACTAAAATATAATAAAATGGAGAGACTAAAAAC 1020
1021 TAGTCCCTATAAACCAACATTCTTTAAATAAGCCCCGGTGGCTAGGACAATGACCTATT 1080
1081 TTTTCTCGCAACCGGAAGAATAAAAAATTCACCGTAACCTTTCTTTCTTTCTTTT 1140
1141 TGCGAAGAAGATAGTTGCAAGACGAATCCAGAGTTTATCTGGAAGAAGAAAGTCCATA 1200
1201 TCCTCTCCTTCCCTGTAGATATTATCAGCAAGGCAAGCGTGTACGGCTTCTTGCTTGA 1260
1261 GTAATCCGCTCCTATTTTTTTTTTTGGGAGGGCGCTTCTACCGCTTCGCTTCTAAAC 1320
1321 GGTGGGCAATTTGGTACGATAAAGAAAAAAGAGGAGGACGAGTGGGAGGCACTTCTGG 1380
1381 AAAAACTTTTTAATGAGCTGGACCAAGCAGCTGGGCAAGCTGCTACTAGGACTGGACAA 1440
1441 AATACTCGTGGCTCGATAAAGCTCGCTCGACTCGGCTCGTTAGTAGCTCAGCTCGACTCGGC 1500
1501 TCGTTTTAATTTGTAGCGAGCCAAGCTAGCATTCTAGCTCGATTCTCTAATGAGCCAGC 1560
1561 TCGGGTTAGCTCGTGTAGCTAGCTCGCGAGCCAAACGAGCTAAGCCACAACACAAATTTGT 1620
1621 CTAGTCATTGATGTCGTCTCATCTCTCATAGTCTTGTCTCGTAGTTATGATCTGTGA 1680
1681 TATGGACATGTGTGGATGTCCATGTGCTTAAATATTTATATTATTGCATGGCTACATGT 1740

```

ー領域を含んでいる。

(c) 塩基番号1 - 2771がプロモーターとして作用するはずであるが、これは単独では低温に対する応答性が低く、塩基番号2772 - 2797の断片が低温に対して応答性を有しており、プロモーターの発現に關与している。

【0026】

【配列表】出願人氏名：九州大学長

発明の名称：DNAフラグメント、組み換えDNA、形質転換植物

配列の数：1

配列番号：1

配列の長さ：3794

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直線状

起源：トウモロコシ

ハニバンタム種

m l i p 1 5 遺伝子のゲノム

配列：mlip15のゲノム配列

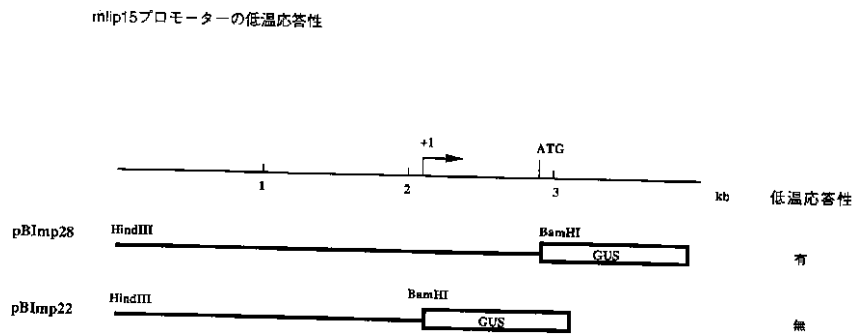
1741 TTGTAGTGTTAAACTTAAATATAATTTTTTCGGTTATAAATATATTTATGTACATAGA 1800  
 1801 TATTTATATTTAGTTGTGTGGCTCACGAGCCTAACGAGCTGGCTCGAGCTTCTAACGAG 1860  
 1861 CCGAGCCGAGCCAGCTATTTAGCTCGTTAGTATAACGAGCCGAGCCGAGCTGGCTCGTTA 1920  
 1921 TAGTAACGAGCCATAACGAGCCGAGCCATAACGAGCCAAGCTGGTTCGATATCCACCCCT 1980  
 1981 AGCTGTCACCGTCGCCCAGTCCGCTTCGTTCCGTCAGCGGGCCCCACCTCATCTGCATT 2040  
 2041 TTCCATTCTCGTCTCCGACCTCATCTGCATTTTCCAGCCAAGTAGTAGGTAAACTAGT 2100  
 2101 GGCGTCCCGTGGCCGTGGCATCAGGAAAAGAATATGCCGTCCAGCCACCATCCCCC 2160  
 2161 ACCGTCCCGAAATTCAGAACTACCCTCGGCTCCAGCTATAAATAGCCGCCCCCGGAGA 2220  
 putative TATA box  
 2221 CGTTCGAAACCTTCCCATCTCCGATAAAAGATAAGGAGTGTCTCTCTCTCTTTTCAGC 2280  
 cDNA start site  
 2281 TAAGTCCCTGCTCCCTCTCTTTTTCTTACATTCAGGTCCCTCGCAGCTCCTCTCTTTTTTC 2340  
 2341 TTGTTTCTTTCTTTTCGATCTGCGAGCCGTCAGGTCCAGTACTCTCTTTCCGTGAAGGA 2400  
 2401 ACTCTTGACGCCGCCCTCTGGTTTCTCGAATCTTGTTCGCCGGTCCCTCTCTGT 2460  
 2461 CCCCCTGATAGTCCGTCGCTCCGAGGAGCACACCGTCCCAACCCCATGTTTACCACCA 2520  
 2521 GTTCTCTGACGGCCGCGTCCGATGAAGCTGAGCGTCTCCGTATCCGCCGCTCCC 2580  
 2581 ACTCCTTCTCCGTCGCCCTTCTACTGGTCTACGTCTTCTCATGAACGCATCGCCCT 2640  
 2641 CTCCACCTGCTGATCCTTCGCATCTCTCCATCTCTTTCTCTCTGAGATAGTCTTTCC 2700  
 2701 AATCCATCTCTAGGGCTCTGTTTCTCCCATCTCCCCACCCACCCACCCACCAAAC 2760  
 2761 ACAAGTCCCTTGTCAATCCGACAAGACAAGCATCCATGTCGTCGTCACGCCGAGCTC 2820  
 M S S S R R S S  
 2821 GAGCCCCGACAGCAACGACACGACGACGAGCGCAAGCGGAAGCGGATGCTGTCCAACAG 2880  
 S P D S N D T T D E R K R K R M L S N R  
 2881 GGAGTGGCGCGGCGGTCCGCGCGCGGAAGCAGCAGCGGCTGGAGGAGCTGGTGGCGGA 2940  
 E S A R R S R A R K Q Q R L E E L V A E  
 2941 GGTGGCCCGCTGCAGGCGGAGAACGCGGCGACGAGCCCGCACCGCGGCTGGAGCG 3000  
 V A R L Q A E N A A T Q A R T A A L E R  
 3001 CGACCTGGGAGGGTGGACGGGACAACGCGGTCGTGCGGCCCGCCACGCCGAGCTGGC 3060  
 D L G R V D G D N A V V R A R H A E L A  
 3061 CGGCCCGCTGCAGTCGCTGGGCGGCTCCTCGAGGTGCTCCAGATGGCCGGCGCCGCGT 3120  
 G R L Q S L G G V L E V L Q M A G A A V  
 3121 CGACATCCCGGAGATGGTCACCGACGACCCATGCTCCGCCCTGGCAGCCGCTCTTCCC 3180  
 D I P E M V T D D P M L R P W Q P S F P  
 3181 CCCGATGCAGCCCATCGGGTCTGAGAATCTGAGCCTCAGCCGGCGGAGAGGCCAATT 3240  
 P M Q P I G F \*  
 3241 TCTGTCGTCGTCGCTGTCTATCTCGTATTGGTATATCTATTCATAAATCATCCTTGT 3300  
 3301 ATGTTTGTCTTCTTGTTCAGTGTATAAATTTGCTTCTTGTAGTGTATAAATTTGG 3360  
 3361 CCATCGAAAGGATGTGTTTGTAGTTGTAATATCTTGTGGAGTTGTAATATCTTATCT 3420  
 3421 TGCTTATGAAATCGAATATGCCTATATATATATGTTATGCTGTACGAGTATGTGGCTCA 3480  
 polyA additional site  
 3481 AATTTGTGAGCCTTCTGTCTGTATGGTGAGGCGATGAATCCAATTTGTGAGCACACATG 3540  
 3541 AATCAATTTGAGATTCGACATGTCAAGTTGATCGTTGCAGGAAGGACGGTTTTTGTATG 3600  
 3601 GACGGACATACCAAGTTACTGCATTTTACTTAAATATCTCACTTATTTTTTATAGTCGGC 3660  
 3661 ATTTCTCCACTCGTTAGATTTCTGTTCTTGTGAGTCAGAAGATAACTACAGCATGTATAT 3720  
 3721 CTCAATTGGAATACCATTAGGGTCCCTCATCTTAACCTATTTTATCTCTTTAATACGTA 3780  
 3781 GATTTTTTGGATCC 3794

【図面の簡単な説明】

す図である。

【図1】 mlip15プロモーター領域を模式的に表

【図1】



フロントページの続き

(56) 参考文献 Mol. Gen. Denet  
 (1995), Vol. 248, No. 5, p.  
 507 - 517  
 Mol. Gen. Denet  
 (1993), Vol. 240, No. 1, p.  
 1 - 8

(58) 調査した分野(Int.Cl.7, DB名)  
 C12N 15/00  
 GenBank / EMBL / DDBJ / G  
 eneSeq  
 MEDLINE (STN)