

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2000-316582
(P2000-316582A)

(43) 公開日 平成12年11月21日 (2000. 11. 21)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A 2 B 0 3 0
A 0 1 H 5/00		A 0 1 H 5/00	A 4 B 0 2 4
C 1 2 N 5/10		C 1 2 N 5/00	C 4 B 0 6 5

審査請求 有 請求項の数 6 O L (全 11 頁)

(21) 出願番号 特願平11-132706

(22) 出願日 平成11年 5 月13日 (1999. 5. 13)

(71) 出願人 598169457

奈良先端科学技術大学院大学長
奈良県生駒市高山町8916-5

(72) 発明者 平塚 和之

奈良県生駒市高山町8916-5 大学宿舎A
204

(72) 発明者 堀田 康雄

奈良県生駒市高山町8916-5 大学宿舎B
206

(74) 代理人 100059258

弁理士 杉村 暁秀 (外 2 名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 減数分裂細胞に特異的な植物プロモーター

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 減数分裂細胞において特異的にプロモーター機能を有する植物プロモーターの提供。

【解決手段】 テッポウユリの花粉母細胞より、特定の塩基配列から成るプロモーターが提供された。ルシフェラーゼ活性測定による転写活性化の評価により、当該プロモーターの作用を検討したところ、本発明のプロモーターは減数分裂期の薬において特異的に転写活性化をもたらした。よって、本発明のプロモーターが、減数分裂細胞において特異的にプロモーターとして機能する作用が示された。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 以下の (a) 又は (b) に示す塩基配列から成り、植物の減数分裂細胞に於いて特異的にプロモーター機能を有する事を特徴とする、植物プロモーター。

(a) 配列表の配列番号 1 記載の、塩基番号 1 - 1309 で示される塩基配列からなることを特徴とする、植物プロモーター。

(b) 減数分裂細胞に於いて特異的にプロモーター機能を有し、(a) の一部が欠損、置換若しくは付加された、植物プロモーター。

【請求項 2】 以下の (c) 又は (d) に示す塩基配列から成り、植物の減数分裂細胞に於いて特異的にプロモーター機能を有する事を特徴とする、植物プロモーター。

(c) 配列表の配列番号 2 記載の、塩基番号 1 - 1461 で示される塩基配列からなることを特徴とする、植物プロモーター。

(d) 減数分裂細胞に於いて特異的にプロモーター機能を有し、(c) の一部が欠損、置換若しくは付加された、植物プロモーター。

【請求項 3】 請求項 1 又は 2 記載の植物プロモーターを挿入した、発現ベクター。

【請求項 4】 請求項 1 又は 2 記載の植物プロモーターを発現ベクターに挿入し、当該発現ベクターを植物細胞に導入して形質転換細胞を得て、当該形質転換細胞から植物種子を得て、当該植物種子から形質転換植物を生産する過程より構成される事を特徴とする、形質転換植物の生産方法。

【請求項 5】 請求項 1 又は 2 記載の植物プロモーターを挿入した、形質転換植物。

【請求項 6】 請求項 5 記載の形質転換植物由来の植物種子。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、減数分裂細胞において特異的にプロモーター機能を有する植物プロモーター及びその利用方法に関する。

【0002】

【従来の技術】プロモーターとは、ゲノム DNA 配列上に存在する、転写 (mRNA 合成) の開始を規定するシグナルである。転写開始点の近傍上流には、転写開始に必要な TATA ボックスと呼ばれる開始点が存在し、この部位が転写開始点に必要であると考えられている。遺伝子組み換え技術において、目的の遺伝子を人為的に導入し発現させるためには、強力なプロモーターが有用であり、例えばカリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の 35S プロモーターは構成的に発現する性質を持ち、これまで頻繁に用いられてきた。

【0003】しかし、時間的、空間的に極めて限定され

た遺伝子発現制御が望まれる場合には、組織特異的、時期特異的なプロモーターを使用する必要がある。従来、生殖細胞における特異的な遺伝子発現を司るプロモーター配列として、花粉特異的なプロモーターの報告はあるが、減数分裂期において特異的な発現を示すプロモーターは見出されておらず、減数分裂期に減数分裂特異的に発現するプロモーターの取得とその利用が望まれていた。

【0004】これまでに、減数分裂に伴って発現する遺伝子のプロモーターとしては、ただ一例のみシロイヌナズナの AtDMC1 遺伝子の報告があるが (Klimyuk and Jones, Plant J. 11: 1-14 (1997))、その発現特異性は厳密でなく、根で非常に高い発現レベルを示し、分裂期の体細胞においても発現することが示されている (Doutriaux et al., Mol Gen Genet 257: 283-91 (1998))。一方、分裂酵母の減数分裂特異的な遺伝子である mei2 のプロモーターを植物細胞において一過的に発現させ、その機能を観察した研究があるが、それらは形質転換植物などを用いておらず、培養細胞における知見であり、組織、器官レベルの知見は全く得られていない (Tabata et al., Plant Sci 8931-41 (1993))。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、高等植物の減数分裂細胞において特異的に発現するプロモーターを提供する事にある。即ち、現在未発見、未開発の減数分裂期に減数分裂細胞でのみ特異的に転写活性化が起こる様なプロモーターを単離し、それを利用した外来遺伝子系を構築することにある。そのような減数分裂特異的なプロモーターが開発されれば、植物の生殖あるいは遺伝子組み換えの人為的制御に関連する基盤技術となりうる。さらに、本発明の目的は、巨大ゲノム生物からのプロモーター配列の単離方法と、それを利用した外来遺伝子の形質転換植物における、組織特異的、時期特異的発現方法を提供する事にある。

【0006】

【課題を解決するための手段】LIM (lily messages Induced at Meiosis) 遺伝子群は花粉母細胞で発現する遺伝子であり、時期特異性、組織特異性を示す事が知られている (Kobayashi et al. (1994) DNARes. 1, 15-26)。そのような特異性を有する遺伝子群の単離と特徴付けは、斉一な減数分裂進行が観察可能なテッポウユリでのみ可能である。従って、LIM 遺伝子群の上流に位置する発現制御領域 (プロモーター) を取得すれば、その特異性を司るプロモーターの特性解明につながると考えられる。また、減数分裂あるいは花粉形成といった現象は、高等植物に保存されていると考

えられることから、テッポウユリから単離したプロモーターは他の分類群に属する植物でも同様に時期及び組織特異性を示すことが期待される。以上の知見より、テッポウユリの花粉母細胞より、LIM遺伝子群の上流に位置するプロモーターを採取した。その結果、ルシフェラーゼ活性測定による転写活性化の評価により、減数分裂期の葯において特異的に転写活性化をもたらす作用が示された。

【0007】本発明のプロモーターは、植物においては最初の減数分裂特異的なプロモーターである。上述したように、これまでに種々の植物のプロモーターが単離され、それらの発現特異性が調べられてきたが、未だ減数分裂細胞においてのみ特異的に発現するプロモーターは報告がない。本発明のDNA断片は減数分裂特異的なプロモーターとしての時間的、空間的な発現特異性が極めて厳密であり、その点でも有用であると考えられる。本発明の具体的な利用方法としては、雄性不稔植物の作出等があるが、植物の生殖あるいは遺伝的組み換えの、人為的な制御を可能とする基盤技術開発の端緒となることも期待される。

【0008】

【発明の実施の形態】本発明の減数分裂細胞に特異的な植物プロモーターは、配列表の配列番号1及び配列表の配列番号2に記載した塩基配列により特定される。遺伝子組み換え技術によれば、基本となるDNAの特定の部位に、当該DNAの基本的な特性を変化させることなく、あるいはその特性を改善する様に、人為的に変異を起こすことができる。本発明により提供される天然の塩基配列を有する遺伝子、あるいは天然のものとは異なる塩基配列を有する遺伝子に関しても、同様に人為的に挿入、欠失、置換を行うことにより天然の遺伝子と同等のあるいは改善された特性を有するものとするのが可能であり、本発明はそのような変異遺伝子を含むものである。また、本発明で明らかにされた減数分裂細胞に特異的な植物プロモーターは、下記の実験方法により得られた最も長い配列であるが、その一部を欠いた、あるいは置換した植物プロモーターも本発明の範囲である。即ち、本発明の植物プロモーターには、減数細胞に於いて特異的に植物プロモーター機能を有する限り、配列表の配列番号1及び配列表の配列番号2に記載した塩基配列の一部が欠損、置換若しくは置換された植物プロモーターもまた含有される。

【0009】また、本発明の植物プロモーターを植物に導入して形質転換を行う方法、当該植物プロモーターを導入した発現ベクター、当該植物プロモーターを植物に導入して得た形質転換した植物、及びそのようにして得た形質転換植物由来の植物種子もまた、本発明の範囲内である。本発明の植物プロモーターを植物に導入することにより、減数分裂を行う生殖細胞において特異的に転写活性化を行う事が可能である。本発明の植物プロモ

ーターを導入する植物の例としては、ユリ、イネ、トウモロコシ、アスパラガス、コムギ等の単子葉植物、またシロイヌナズナ、タバコ、ニンジン、ダイズ、トマト、ジャガイモ等の双子葉植物が挙げられる。形質転換体の作製方法としては、本技術分野において知られている通常の方法を用いる事ができる。本発明において使用可能なベクターはプラスミドベクターであり、例えば実施例で使用したpBI121及びpBI221等が挙げられるが、それらに限定されるものではない。そのようなベクターを、例えばアグロバクテリウム菌に導入して、カルス又は幼植物に感染させることにより、形質転換植物を作製する事が可能であり、更に、そのような形質転換植物に由来する種子を得る事が可能である。本発明の植物プロモーターを植物に導入する形質転換法はアグロバクテリウム法に限定されるものではなく、パーティクルガン法、電気穿孔法等の方法を用いる事も可能である。

【0010】

【実施例】(DNAの抽出)テッポウユリ花粉母細胞より、フェノール、クロロホルム法によりDNAの抽出を行った。即ち、CTAB法によりムライ等の報告の方法に準じて(Murray, G. C. and Thompson, W. F. (1980) Nucl. Acid Res. 8, 4321-4325)、DNAを抽出した。具体的には、約1から1.5mlの花粉母細胞に海砂と液体窒素を加えて乳鉢と乳棒で良くすりつぶし、3mlの2%CTABを加えさらに十分にホモジェナイズし、それを65℃で30分間インキュベートした。次に、クロロホルム/イソアミルアルコール(24:1)を3ml加え5分間転倒混和した。それを、ベックマンJA-20ローターで8000rpm、20分間遠心し、上清を得た。それを、約800µlづつ微量遠心チューブに分注し、さらに1%CTABを1ml加えて転倒混和した。室温で1時間静置後、8000rpmで10分間遠心し、沈殿を得た。それに、1MのCsClを600µl加え45℃に加熱し沈殿を溶解させた。それに100%エタノールを1.2ml加え12000rpmで5分間遠心し沈殿を得た。それを70%エタノールでリンスして、600µlのTE緩衝液に溶解し、さらにRnase処理を行い、フェノール/クロロホルム処理を3回繰り返しエタノール沈殿後、300µlのTEに溶かしDNAを得た。

【0011】(プライマーの設計)プロモーターを取得するために、減数分裂特異的な発現を示すLIM10及びLIM18遺伝子のcDNAの塩基配列情報(Kobayashi et al. (1994) DNA Res. 1, 15-26)に基づき設計したプライマーを合成した。使用したプライマーの塩基配列を下記に示す。
10Pro1: ACGCTGGCGACTTCGAGTCGAACCGTCAG (29mer)
10Pro2: GCGGCGAGCAAAGTATCATATTCCTCTCTT (3

0mer)

18Pro1: ATCATTGGCTTGTACACGGGTGCCGAGATC (30mer)

18Pro2: GGTCGCTGAAGTGACGGCCGATCAGCCGC (29mer)

18Pro3: ATGACTCGCGCACTCTCTGGATCGTTCGAG (30mer)

18Pro4: AGTGAGGTCGCCATGGTTCTCCGTTGCGAG (30mer)

【0012】(LIM10プロモーターの取得) 鋳型となるゲノムDNAをBamHIで処理しキットに添付のカセットを付加した後、カセットプライマーC1とプライマー10Pro1を用いてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行った。PCRは、94で5分加熱した後、94で30秒-64で1分-72で2分の反応を30サイクルという条件で行い、反応終了後は4で保存した。さらに、カセットプライマーC2とプライマー10Pro2を用いて、94で5分加熱後、94で30秒-66で1分-72で2分の反応を30サイクル行うという条件でPCRを行い、DNA断片を得た。このDNA断片をノバゲン社製pT7BlueT-vectorに、TA法によりクローニングした。塩基配列の解析を行った結果、LIM10の上流配列である、図1及び配列表の配列番号1記載の塩基配列を得た。

【0013】(LIM18プロモーターの取得) 鋳型となるゲノムDNAをEcoRIで処理してキットに添付のカセットを付加した後、カセットプライマーC1と18Pro1を用いてPCRを行った。PCRは94で5分加熱後、94で30秒-62で1分-72で2分の反応を30サイクルという条件で行い、反応終了後は4で保存した。さらに、カセットプライマーC2と18Pro2を用いて、94で5分加熱後、94で30秒-62で1分-72で2分の反応を30サイクル行うという条件でPCRを行い、DNA断片を得た。このDNA断片をノバゲン社製pT7BlueT-vectorにTA法によりクローニングし、塩基配列決定を行った。

【0014】さらに、得られた塩基配列情報に基づき、2種類のプライマー18Pro3および18Pro4を合成し、ゲノムDNAをXhoI処理したキット(宝酒造製LA-PCR™インビトロクローニングキット)に添付のカセットを付加後、カセットプライマーC1と18Pro3を用いて、94で5分加熱後、94で30秒-66で1分-72で2分の反応を30サイクルという条件でPCRを行い、反応終了後は4で保存した。さらに、カセットプライマーC2と18Pro4を用いて、94で5分加熱後、94で30秒-66で1分-72で2分の反応を30サイクルという条件でPCRを行い、DNA断片を得た。

【0015】当該DNA断片を宝酒造製DNAブラントイングキットを用いて平滑化し、さらに宝酒造製ポリヌクレオチドキナーゼを用いて5'末端をリン酸化した。それを、SmaIで切断し、脱リン酸化処理したストラタジーン社製pBluescript SKII+ベクターにクローニングした。塩基配列の決定を行った結果、LIM18のコード領域の上流配列である、図2及び配列表の配列番号2記載の塩基配列を得た。

【0016】(ベクターの構築) 配列表の配列番号1及び配列番号2に示す、本発明のDNA断片を任意の塩基配列からなるDNAの上流に挿入する事により、減数分裂細胞特異的にその転写産物を発現させることができる。本実施例において、タバコ(Nicotiana tabacum cv. SR1)にホタルルシフェラーゼ遺伝子を導入した。植物形質転換遺伝子ベクターとして良く用いられるpBI121(クロンテック社製)及びpBI221(クロンテック社製)を改変して作成した植物用ベクターpBI121-LUCとpBI221-LUC+(平塚和之 細胞工学別冊植物細胞工学シリーズ6(1997))を用いて、当該DNA断片を挿入して作成したプラスミドベクターを構築した。図3において、使用した形質転換用ベクターの概要を示した。121-LUCの構造を上、221-LUC+の構造を下に示す。減数分裂特異的発現のためのプラスミド構築には、図3に示すCaMV 35S proの代わりに配列表の配列番号1及び配列表の配列番号2に示した塩基配列を挿入した。主要な制限酵素切断部位と、NOSTターミネーター(NOSTer)、さらにカナマイシン耐性遺伝子(NOTII)の位置を示した。

【0017】(ベクターの導入及び形質転換) アグロバクテリウム菌(Agrobacterium tumefaciens LBA4404)に、エレクトロポレーション法により導入した。それを用いて、リーフディスク法によりタバコを形質転換し、植物体を得た。形質転換植物体より得られた種子をカナマイシンを含むMS寒天培地に播種し、カナマイシン耐性植物をそのまま、あるいは培養土に移植して生育させ、観察に供試した。

【0018】(ルシフェラーゼ活性測定) 形質転換した植物について転写活性化の指標である、ルシフェラーゼ活性の測定を行った。本発明の当該DNA断片をプロモーターとして用いた場合、ルシフェラーゼ活性は、減数分裂期の細胞を多く含む時期の薬に於いて特に高く、その他の器官、組織ではルシフェラーゼ活性は極めて低かった。即ち、減数分裂期の細胞を多く含む薬と葉、茎、根などの組織を取り分け、市販のルシフェラーゼ活性測定キットに添付された抽出緩衝液を用いて、添付の手段に従い抽出操作を行い、ベルトールド社製ルミノメーターLB9501にて10秒間のフォトンカウンティングを行い、発光活性を比較した。図4に、配列表の配列番号1記載の塩基配列のプロモーターを導入して各組織の

ルシフェラーゼ活性を測定した結果を、図5に、配列表の配列番号2記載の塩基配列のプロモーターを導入して各組織のルシフェラーゼ活性を測定した結果を、図6に、対象区として、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターを導入して各組織のルシフェラーゼ活性を測定した結果を、それぞれ示す(縦軸: count/sec/tube)。

【0019】その結果、配列表の配列番号1記載の塩基配列と配列番号2記載の塩基配列のプロモーターのどちらを導入した場合においても、葉、茎、根では活性が極めて低く、検出限界以下の活性を示す例がほとんどであるのに対し、薬においてはそれらの数百倍以上の活性が検出された(図4、図5)。このことは、当該DNA断片が減数分裂期の薬において特異的に転写活性化をもたらす作用があることを示している。また、薬以外の葉、茎、根では転写活性化は全く観察されないことから、当該DNA断片がもたらす時間的、空間的な制御は極めて厳密なものであり、その特異性は極めて高いものであることを明瞭に示している。また、対象区として、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターを用いた形質転換タバコを用いた場合では、葉、茎、根では極めて高い転写活性化が観察されたが、薬ではそれらの組織よりも、むしろ低い活性を示した(図6)。

【0020】(GUS遺伝子の発現)さらに、当該DN

- <110> 出願人氏名: 奈良先端科学技術大学院大学長
- <120> 発明の名称: 減数分裂細胞に特異的な植物プロモーター
- <160> 配列の数: 2
- <210> 配列番号: 1
- <211> 配列の長さ: 1309
- <212> 配列の型: 核酸
- <213> 起源: テッポウユリ花粉母細胞
- <400> 配列

```

ATGCATGCAC ATGTAAGTCC TCGTACTCA TATAAAAAAG TGAACATACA CACGAGTATG 60
GTTTGCTTCC ACCTAGTCAT CGTATATTCC AGATTTGTCA AACACGATAT ATTTGCATAC 120
ATATCCTCCG AATGTTTGTG CATATCAAAA AGTACATGTG TACCACTAAC AACTATGTGC 180
ACATAATAAT GTCAACCTTC ACTTCAACTT ACAACCCATG TATGCATACT TTTTTTATCC 240
ACTACATGGA CCTATATATA TAGAAATTTG AACTAAATAT CCAGCTTCAT TAATATTGTT 300
AGCTTAACAT GCATCTCTAC TTCATTATGC ATCTTGATGT TCCATTGAT GAAATCTTCC 360
TCACTAATAA TCATCACACA TCTAGCCTCT TCACCAGAGA GCATCACACA TCAACAGTCT 420
TCAAAATTCA GTGTCCAACA ACACGGATCT TATTGTGCAT CAGTTAACAC CCTGCGTACC 480
CACTTCACCA AAGATCATAA CACATTATTG GCCTTCAAAA TTCAATGCCC AACACACGA 540
ATCATGTCTG ACATCAATCA TGTCGTACAT CAGTTATCAC CCCGCTTCT AGCTGCATCT 600
TCCAAAGGCT GCTTACGCAC CCCGCAATGG TAGAATGATC AAGTGTTG TTCTATAAG 660
TGAGTAGAGA AACACATGAA TCAGGCTCCA CAAACACATA CTGTATTTCT TTTCTTAACG 720
TCATTTTTAA CAAATTATAA TATTAATTT TCTCTAAGGT CAGAGATTAC CACACATAAA 780
AAAGTAAATT TTAGTATCTT TAAACTCATA TAAATAGAA TGGACAAAAT ATTATAAATC 840
ATAAGACAAC CAACCAATTC CACATTATAC TAAATGAAAT ATCACAATA TGACAATAA 900
TAAAAAATAA AAATCGCATG GTTTTCAGAA ATTGGAGGGG TAAGATAAGA AATAAGTCAT 960
CCTCAAAATA CGCGCGGGG CACGTGTGAA TTCATTTTGT CGGTAGAAAC ACAGCTCGTT 1020
TTTTACTATG ACGATACCAA CCTTACGTAA TACATTCGTT CCATCAACAT GATCGGAATT 1080

```

A断片のプロモーターとしての作用をより詳細に検討する目的で、ルシフェラーゼ遺伝子のかわりにGUS遺伝子を用いて、形質転換タバコを作成し、GUS遺伝子の発現の様子を調べた。GUS遺伝子発現の検出には、X-Glucを基質として用いた組織染色化学的染色法(Jefferson et al. EMBO J. 6: 3901-3907 (1987))を用いた(図7)。その結果、減数分裂細胞である花粉母細胞において青緑色の色素の沈着が観察された。このことから、ルシフェラーゼ活性で示された、薬における特異的な発現は、花粉母細胞における特異的な発現に由来することが確かめられた。

【0021】以上の結果より、当該DNA断片をプロモーターとして植物形質転換用のプラスミドベクターDNAに挿入することにより、減数分裂特異的な転写活性を付与することが可能であること、すなわち、減数分裂特異的な遺伝子発現をもたらす作用があることが示された。

【0022】

【発明の効果】本発明により、減数分裂期の細胞において特異的に作用するプロモーターの、塩基配列が与えられた。

【0023】

【配列表】

GACACAGAAA ACCTCGGTTC AAATTTACC GGTTCATC TCGACCGCTA GCCGGCCGAA 1140
 GGCAGACCTC TGCCACCCAT GAAAGCACGA GAAGCTTCCA TCCTCTTCTT GACCCTTTGT 1200
 GAAGCATCGA GACCTCTTCC CTCAGTCTTT ATATAAACC CCAACCCACT CCCAATTCCA 1260
 CCGTCTCCAT CGAACACCAG ATAAGTGGAC CTCAAAGAAA TCAAGATCC 1309

< 2 1 0 > 配列番号 : 2

< 2 1 1 > 配列の長さ : 1 4 6 1

< 2 1 2 > 配列の型 : 核酸

< 2 1 3 > 起源 : テッポウユリ花粉母細胞

< 4 0 0 > 配列

ATGTACGAAC TATTGCACAC TCTTGAGGGC TCCCTACGCT GCCTAAGCTA TGTGCTTTCA 60
 CCTTCTCTAC TCGACATGCA CTCTCACATT GGAGGGGTGT CGCAGGGCTC ATACTCTGCG 120
 CTCCTTCTCA AAAGGTTTTT TCCCTCACAG GTTTCTCTCC ACGTCAACCC AAGCTCAAAA 180
 ATTCGGGGCC CAGCCCGCTG AGGATATTTT TGGCGTCATT AGTTGTTGAT GATGAATTAT 240
 TCATTCCTAA AATCTTGCA TGAATGCTTG ATTTTTTCAT CATTATCTT ATGTATTTCC 300
 TCCAAACTTG TATTGCTTAT CATGCACAAA AGAGTTTAAAC TTACATTAGT GACATCAAGC 360
 AAATACATGG AATACACGTT AACAAATGAT TAAATGTTGG TTATAATTGT GCACAATTAT 420
 TGTCTGGTCA CCTAGTCATC TTCTTTCATG AATCCTCCAC TGATGAGATC CTCCTCAAT 480
 GAGTTCATTC TCAAACAAGT TACCATTACC CGTAGAAGGA AAAGAGGAAG AAAAATAAAC 540
 ACGTGATGAT GACCAAAAGT AATGAAAGAG AGAACACGAT AAATGATGTT CGAGAAAACA 600
 ATCCAAAAT ATATGGATAC GATATTGAAA TACTTATTGA GAAACCCAAA CAAAACAAGC 660
 ATGCACTGAC ATAGGAATAT TGTGACTTTT GTGTGCCCTT GCAAGGTGAT TGACGATAGA 720
 TCATAATCAA CATCCTTACA CTTTACCGTT CGCCCACCAT CCCTTTGTTC CTCCTTCCCT 780
 CTTTCGAAGA TGTTTTCTCG TTATCTTTGC TACTTTCCTC ATAAATAGAC ATCGTATCAT 840
 TTTTGGCGTA AATCATTTTT TTGTTGTTGA ATTTTAGCGA AATTCACCCA GACCATCCAT 900
 GTGCACCACG ACAAAATTTAT CCCCAGACA TTGTGGCATA AAGTTACTAA TGACTTGATA 960
 GCCTAGTGGT TGGGACTTGG ATGGTTATCA ATGAGGTCTG TGGTTGAGT CTCGGAAAAC 1020
 TACTGGAAAC AGCCTCCATT TAATAAATAG GAATGCTGCG TACATTTCTG TCCCCGTAA 1080
 GCCTGCGCAA GCGAGATAGG AATGCTGCGT ACATTTCTGT CCCCCTAAG CCTGCGCAAG 1140
 CGAGAAAATA CGGATTATCC ACATTGGGGC GTAAAATTAA TCCCCTACAT TTCTGTCCCC 1200
 CGTAAGCCTG CACAAGCGAG AAAATACGGA TTATCCACAT TGGGGTGTA AATTAATCCC 1260
 CTACCAACAT GTTTTGTGTC AGTCTGCCTA ACTGGGCCAA TAATAACCCT GCAATCTCT 1320
 GTTAAACTGG AAAATTAATC CGTAGAGTCC CCATCCCGGT TAGAGAACGA AAATAATAAC 1380
 TGCTGCAAAG GGCTACTGGG CCCACCAATT TTCACCCGTC TCTGCCCCC ATTCAGCTAA 1440
 CCCAGCTCGC AACGGAGAAC C 1461

【図面の簡単な説明】

【図 1】 図 1 は、L I M 1 0 由来の減数分裂特異的なプロモーターの塩基配列を示す図である。

【図 2】 図 2 は、L I M 1 8 由来の減数分裂特異的なプロモーターの塩基配列を示す図である。

【図 3】 図 3 は、植物形質転換用ベクターである、1 2 1 - L U C 及び 2 2 1 - L U C + の構造を示す図である。

【図 4】 図 4 は、図 1 のプロモーターを導入して、各組織のルシフェラーゼ活性を測定した結果を示す図である。

る。

【図 5】 図 5 は、図 2 のプロモーターを導入して、各組織のルシフェラーゼ活性を測定した結果を示す図である。

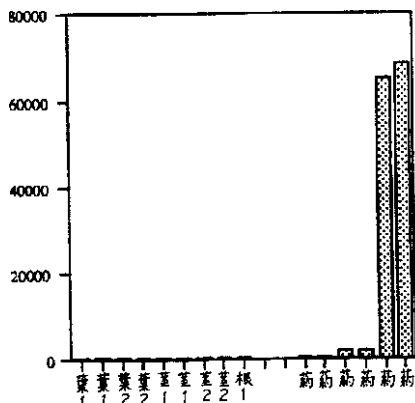
【図 6】 図 6 は、カリフラワーモザイクウイルス 3 5 S プロモーターを導入して、各組織のルシフェラーゼ活性を示した図である。

【図 7】 図 7 は、X - G l u c を基質として用いた組織染色化学的 G U S 染色法により、プロモーター発現の特異性を検出した写真である。

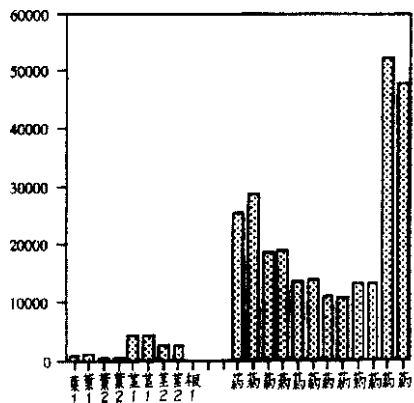
【図1】

10		20		30		40		50		
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
ATGCATGCAC	ATGTAAGTCC	TGCGTACTCA	TATAAAAAAG	TGAACATACA						50
CACGAGTATG	GTTTGGTTCC	ACCTAGTCAT	CGTATATTCC	AGATTTGTCA						100
AACACGATAT	ATTTGCATAC	ATATCCTCCG	AATGTTTGTG	CATATCAAAA						150
AGTACATGIG	TACCACTAAC	AACTATGTGC	ACATAATAAT	GTCAACCTTC						200
ACTTCAACTT	ACAACCCATG	TATGCATACT	TTTTTTTATC	ACTACATGGA						250
CCTATATATA	TAGAAATTTG	AACTAAATAT	CCAGCTTCAT	TAATATTGNT						300
AGCTTAAACAT	GCATCTCTAC	TTCATTATGC	ATCTTGATGT	NCCATTGAT						350
GAAATCTTCC	TACTAATAAA	TCATCACACA	TCTAGCCTCT	TCACCAGAGA						400
GCATCACACA	TCAACAGTCT	TCAAAATTCA	GTGTCCAACA	ACACGGATCT						450
TATTGTGCAT	CAGTTAACAC	CCTGCGTACC	CACTTCACCA	AAGATCATAA						500
CACATTATIG	GCCTCAAAA	TTCAATGCC	AACAACACGA	ATCATGTCGT						550
ACATCAATCA	TGTGCTACAT	CAGTTATCAC	CCCGCGTCT	AGCTGCATCT						600
TCCAAAGGCT	GCTTACGCAC	CCCGCAATGG	TAGAATGATC	AAGCTGGTTG						650
TTCTTATAAG	TGAGTAGAGA	AACACATGAA	TCAGGCTCCA	CAAACACATA						700
CTGTATTTCT	TTTCTTAACG	TCATTTTTTAA	CAAATTATAA	TATTAAAATT						750
TCTCTAAGGT	CAGAGATTAC	CACACATAAA	AAAGTAAATT	TTAGTATCTT						800
TAAACTCATA	TAAAATAGAA	TGGACAAAAT	ATTATAAATC	ATAAGACAAC						850
CAACCAATTC	CACATTATAC	TAAATGAAAT	ATCACAAATA	TGACAAATAA						900
TTAAAAAAA	AAATCGCATG	GTTTTTCAGAA	ATTGGAGGGG	TAAGATAAGA						950
AATAAGTCAT	CCTCAAAATA	CGCGGCGGGG	CACGTGTGAA	TTCATTTTGT						1000
CGGTAGAAAC	ACAGCTCGTT	TTTTACTATG	ACGATACCAA	CCTTACGTAA						1050
TACATTGTT	CCATCAACAT	GATCGGAATT	GACACAGAAA	ACCTCGGTTT						1100
AAATTTTACC	GGTTTCAATC	TGACCCGCTA	GCCGNCCGAA	GCCAGACCTC						1150
TGCCACCCAT	GAAAGCACGA	GAAGCTTCCA	TCCCTTCTTT	GACCTTTTGT						1200
GAAGCATUGA	GACCTCTTCC	CTCAGTCTTT	ATATAAACC	CCAACCCACT						1250
CCCAATTCCA	CCNTCTCCAT	CGAACACCAG	ATAAGTGGAC	CTCAAAGAAA						1300
TCAAGATCC										1309

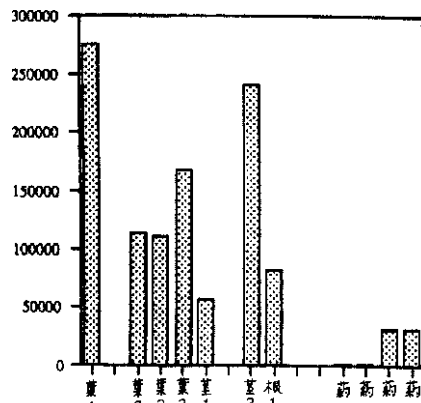
【図4】



【図5】



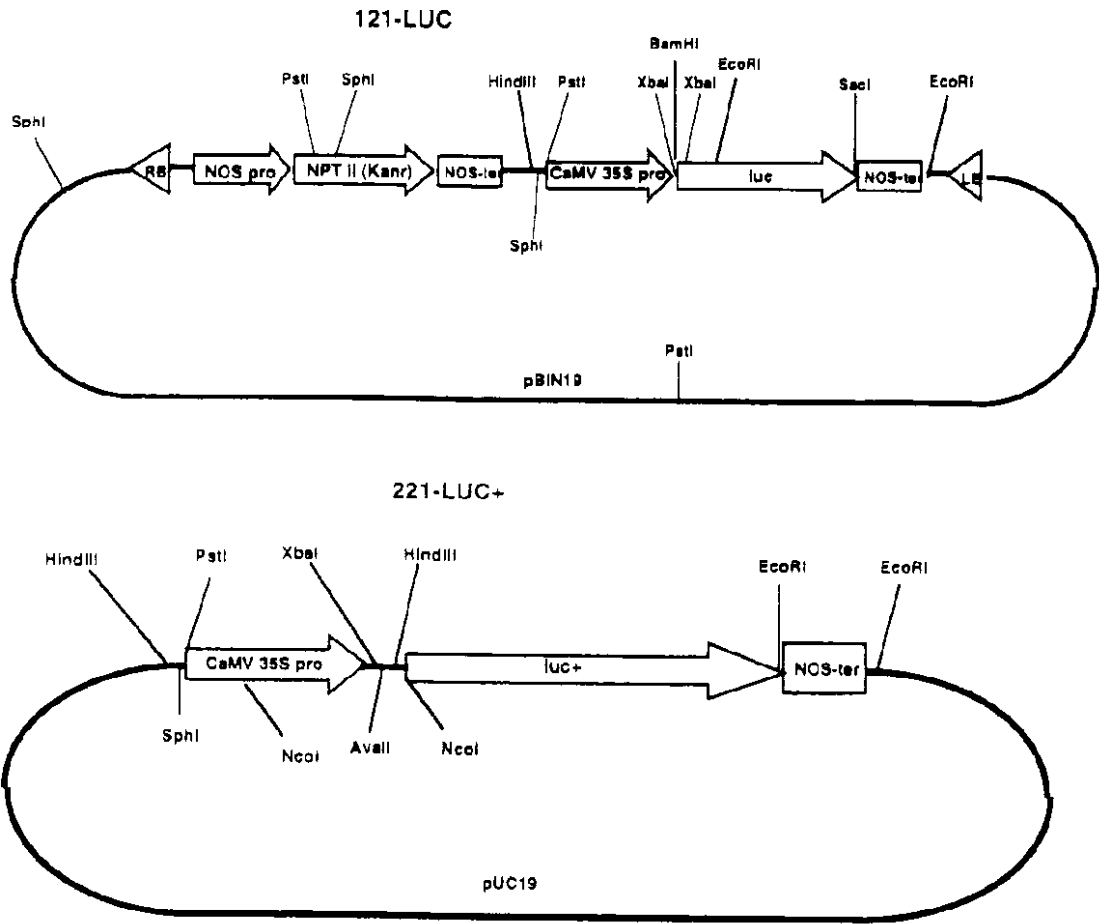
【図6】



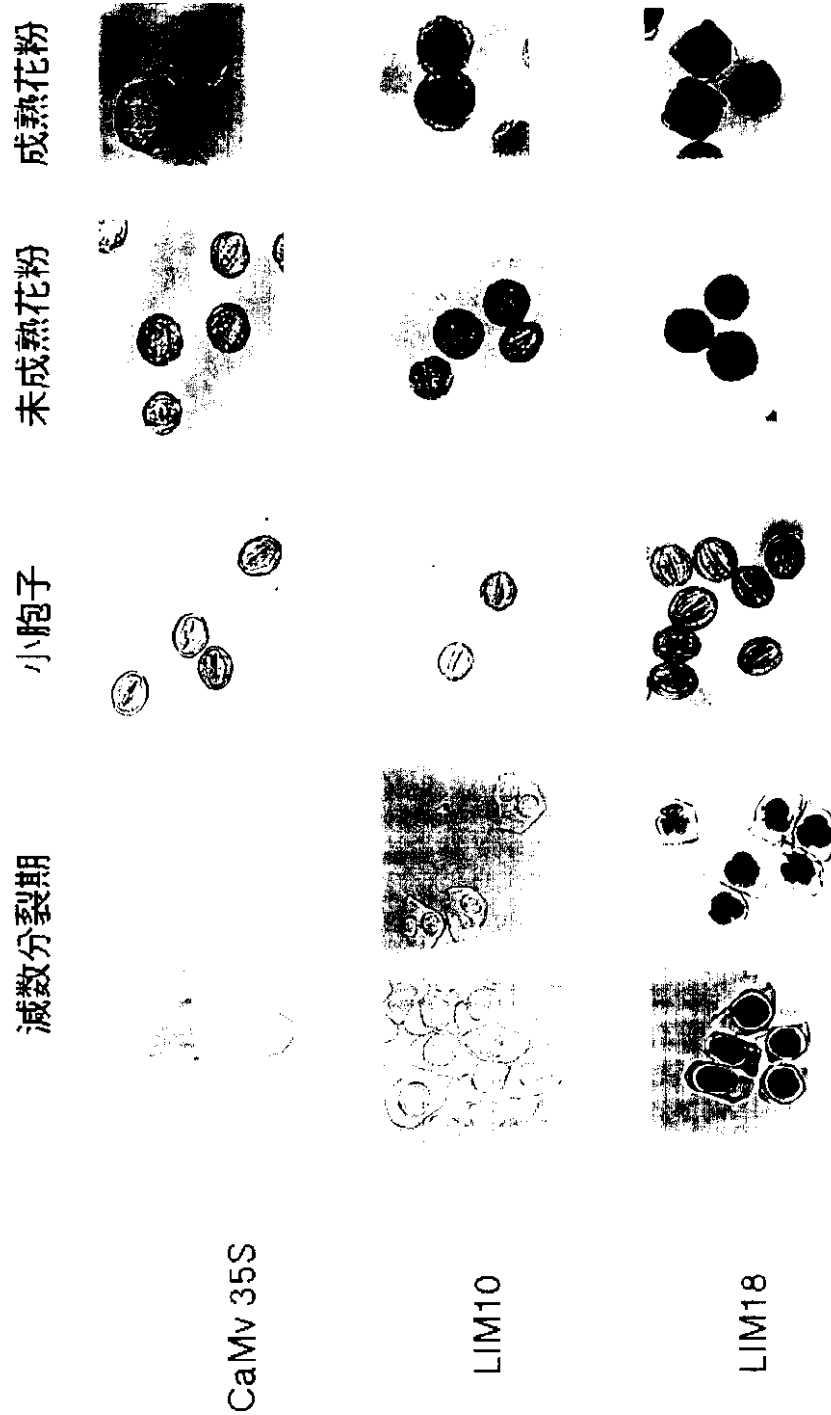
【図2】

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
ATGTACGAAC	TATTGCACAC	TCTTGAGGGC	TCCCTACGCT	GCCTAAGCTA	50
TGTGCTTTCA	CCTTCTCTAC	TCGACATGCA	CTCTCACATT	GGAGGGGTGT	100
CGCAGGGCTC	ATACTCTGGG	CTCCTTCTCA	AAAGGTTTTT	TCCCTCACAG	150
GTTTTCTCTC	ACGTCAACCC	AAGCTCAAAA	ATTGGGGGCC	CAGCCCGCTG	200
AGGATATTTT	TGGGGTCATT	AGTTGTTGAT	GATGAATTAT	TCATTCTTAA	250
AATCTTGTC	TGAATGCTTG	ATTTTTTCAT	CATTTATCTT	ATGTATTTCC	300
TCCAAACTTG	TATTGCTTAT	CATGCACAAA	AGAGTTTAAC	TTACATTAGT	350
GACATCAAGC	AAATACATGG	AATACACGTT	AACAAATGAT	TAAATGTTGG	400
TNATAATTIG	GCACAATTAT	TGTCGGTCA	CCTAGTCATC	TTCTTTTCATG	450
AATCTCCAC	TGATGAGATC	CTCCCTCAAT	GAGTTCATT	TCAAACAAGT	500
TACCATTACC	CGTAGAAGGA	AAAGAGGAAG	AAAAATAAAC	ACGTGATGAT	550
GACCAAAAGT	AATGAAAGAG	AGAACACGAT	AAATGATGTT	CGAGAAAACA	600
ATCCCAAAT	ATATGGATAC	GATATTGAAA	TACTTTATGA	GAAACCCAAA	650
CAAAACAAGC	ATGCACTGAC	ATAGGAATAT	TGTGACTTTT	GTTGTCCTTT	700
GCAAGGTGAT	TGACGATAGA	TCATAATCAA	CATCCTTACA	CTTTACCGTT	750
CGCCCAACAT	CCCTTTGTTT	CTCCTTCCCT	CTTTGGAAGA	TGTTTTCTCG	800
TTATCTTTGC	TACTTTCTCT	ATAAATAGAC	ATCGTATCAT	TTTTGGGGTA	850
AATCATTTTT	TTGTTGTTGA	ATTTTAGCGA	AATTCACCCA	GACCATCCAT	900
GTGCACCACG	ACAAATTTAT	CCCCGAGACA	TTGTGGCATA	AAGTTACTAA	950
TGACTTGATA	GCCTAGTGGT	TGGGACTTGG	ATGGTTATCA	ATGAGGTCTG	1000
TGGTTGAGT	CTCGAAAAC	TACTGGAAAAC	AGCCTCCATT	TAATAAATAG	1050
GAATGCTGGG	TACATTTCTG	TCCCCCGTAA	GCCTGCGCAA	GCGAGATAGG	1100
AATGCTGCGT	ACATTTCTGT	CCCCCGTAAG	CCTGCGCAAG	CGAGAAAATA	1150
CGGATTATCC	ACATTTGGGG	GTAAAATTAA	TCCCTTACAT	TTCTGTCCCC	1200
CGTAAGCCTG	CACAAGCGAG	AAAATACGGA	TTATCCACAT	TGGGGTGTAA	1250
AATTAATCCC	CTACCAACAT	GTTTTGTGTC	AGTCTGCCTA	ACTGGGCCAA	1300
TAATAACCCT	GCAATCCTCT	GTTAAACTGG	AAAATTAATC	CGTAGAGTCC	1350
CCATCCCGGT	TAGAGAACGA	AACTATAAC	TGCTGCAAAG	GGCTACTGGG	1400
CCCACCAATT	TTCACCCGTC	TCTGCCCCCC	ATTCAGCTAA	CCCAGCTCCG	1450
AACGGAGAAC	_C				1461

【図3】



【図7】



フロントページの続き

(72)発明者 高瀬 尚文
 奈良県生駒市高山町8916 - 5 大学宿舍 A
 205

(72)発明者 皆見 政好
 奈良県生駒市高山町8916 - 5 大学院宿舍
 1 - 121

Fターム(参考) 2B030 AA02 AB03 CA17 CA19 CB03
CD02 CD07 CD09 CD14
4B024 AA08 AA20 CA03 DA01 FA02
4B065 AA88X AA88Y AB01 CA53