

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11)特許番号

特許第3488910号  
(P3488910)

(45)発行日 平成16年1月19日(2004.1.19)

(24)登録日 平成15年11月7日(2003.11.7)

(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 R 1:91
C 1 2 N 5/10		1:865
// (C 1 2 N 5/10		C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 R 1:91)		5/00 C

請求項の数6(全17頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000-127767(P2000-127767)  
(22)出願日 平成12年4月27日(2000.4.27)  
(65)公開番号 特開2001-299357(P2001-299357A)  
(43)公開日 平成13年10月30日(2001.10.30)  
審査請求日 平成12年11月7日(2000.11.7)

(73)特許権者 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 新名 惇彦  
奈良県生駒郡斑鳩町瀧田北4-1-4  
(72)発明者 吉田 和哉  
奈良県生駒市高山町8916番地の5 大学  
宿舍D-307  
(72)発明者 仲山 英樹  
奈良県生駒市高山町8916番地の5 学生  
宿舍1-230  
(74)代理人 100072051  
弁理士 杉村 興作  
審査官 北村 弘樹

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 リチウムイオン又はナトリウムイオン排出機能を付与した形質転換植物細胞

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】 出芽酵母ナトリウムイオン排出ポンプ遺伝子であるENA1を植物細胞に導入して、前記植物細胞において前記ENA1がコードするEna1p蛋白質を発現させることにより、前記植物にリチウムイオン又はナトリウムイオン排出機能を付与した形質転換植物細胞。

【請求項2】 前記植物細胞がタバコBY2細胞である、請求項1記載のリチウムイオン又はナトリウムイオン排出機能を付与した形質転換植物細胞。

【請求項3】 請求項1記載のリチウムイオン又はナトリウムイオン排出機能を付与した形質転換植物細胞より得られた植物体。

【請求項4】 出芽酵母ナトリウムイオン排出ポンプ遺伝子であるENA1をベクターへ挿入し、ENA1を挿入したベクターをアグロバクテリウムに導入し、ベクターを導入

したアグロバクテリウムにより植物細胞を感染させる過程により作製される、リチウムイオン又はナトリウムイオン排出機能を付与した形質転換植物細胞の作製方法。

【請求項5】 前記ベクターがバイナリーベクターpMSH2である、請求項4記載のリチウムイオン又はナトリウムイオン排出機能を付与したを付与した形質転換植物細胞の作製方法。

【請求項6】 前記アグロバクテリウムがアグロバクテリウムEHA105株である、請求項4記載のリチウムイオン又はナトリウムイオン排出機能を付与した形質転換植物細胞の作製方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、リチウムイオン又はナトリウムイオン排出機能を付与した形質転換植物細

胞、当該リチウムイオン又はナトリウムイオン排出機能を付与した形質転換植物細胞より得られた植物体、及び当該リチウムイオン又はナトリウムイオン排出機能を付与した形質転換植物細胞の作製方法に関する。

#### 【0002】

【従来の技術】人口の増加や環境の変化より、将来の食糧危機が予想されている。その問題に対応するべく、農業において効率よく作物を生産するための技術開発が求められている。農業において、種々の環境ストレスにより生産量が減少することは大きな問題であり、種々の環境ストレスに強い植物を作出することが求められている。

【0003】農業の効率を考えると、海水並の食塩濃度で生育が可能な植物の作製が求められる。その様な植物の作製が可能となれば海水を灌漑用水として用いることが可能となり、砂漠、塩土での植物栽培の道も開ける。海水並の塩ストレス下での生育できる植物を作製する手段を考える際に、浸透圧ストレスとイオンストレスを分けて解析する必要がある。これまでの耐塩性植物に関する研究は浸透圧ストレスが先行しており、耐塩性植物の分子育種は、浸透圧調節物質であるプロリンやグリシンベタイン等の適合溶質を遺伝子導入により蓄積させる方法により行われてきており、適合溶質の生合成系を導入した分子育種が植物のストレス耐性を向上させる戦略として有効であることが示された。一方、ナトリウムイオン等のイオン毒性に関する研究は遅れていた。塩ストレスに特異的なナトリウムイオンのイオン毒性は、適合溶質では解決できない問題であり、より高度な耐塩性を付与した植物の分子育種には、植物のイオンホメオスタシスを制御する機構について研究を進める必要がある。

【0004】これまでに、植物のイオン輸送に関わる遺伝子が多数単離されてきたが、イオン毒性の原因となっているナトリウムイオンの輸送に関わるものが証明されている遺伝子は少なく、耐塩性を高めるために重要なナトリウムイオン排出に関わるイオン輸送因子は、植物においてはまだ同定されていない。

#### 【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題は、海水並の塩ストレス下で生育可能な植物の作製を可能とする技術を開発することである。即ち、適合溶質を用いた技術は既に存在するので、イオン排出に関する因子を用いた手段により耐塩性を付与した植物を作製することが、本発明において求められている。

#### 【0006】

【課題を解決するための手段】そこで本発明者らは、耐塩性に関与するイオンホメオスタシス制御機構の研究が進んでいる、モデル真核生物である出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) に着目し、酵母の耐塩性に最も重要なナトリウムポンプをコードする遺伝子であるENA1に注目した。当該遺伝子を導入することにより、塩ストレス

に特有なナトリウムイオンの毒性に対する耐性を付与する事による、耐塩性植物の分子育種を試みた。

【0007】出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) のナトリウムポンプ遺伝子であるENA1は、ナトリウムイオン及びリチウムイオンの排出活性が低い野生型株の塩感受性を補う遺伝子として単離され、その塩基配列が知られている (Haro et al., 1991, FEBS Lett, 291, 189-191)。即ち、公開されている全塩基配列情報から、ENA1遺伝子はイントロンを持たない全長3276bpの遺伝子であり、P-type ATPase をコードしていることが明らかにされている。ENA1遺伝子の塩基配列を、配列表の配列番号1に示す。また、ENA1遺伝子を欠失した変異酵母は塩ストレスとアルカリ性pHに感受性となり、ナトリウムイオン及びリチウムイオンの排出活性が低下する事が知られている。このEna1p ATPaseがATP によってインビトロでリン酸化される条件には異なるカチオン間で差がみられず、Na<sup>+</sup> に対するK<sub>m</sub>値は0.2Mより大きかった。それゆえ、Ena-type ATPase は非特異的なアルカリカチオンATPaseであると考えられる。

【0008】菌株によって差はあるが、ENA1遺伝子は、酵母の第IV染色体上に位置する隣接した数個の相同遺伝子群の第一番目の遺伝子であり、隣接した遺伝子は互いに高い相同性を有している (Garcia de Blas et al., 1993, Mol Gen Genet, 236, 363-368; Wieland et al., 1995, EMBO J, 14, 3870-3882)。特に、最初のENA1およびENA2の2遺伝子は、DNA 塩基配列がほとんど同一であり、Ena1p とEna2p の予想されるアミノ酸配列の長さは等しく、全1091アミノ酸配列中で13アミノ酸が異なっているだけであった。しかしながら、ENA1遺伝子とENA2の2遺伝子の発現様式は大きく異なっており、ENA2遺伝子は恒常的に低レベルの発現をしているが、耐塩性に大きな影響を与えておらず、耐塩性に重要な役割を果たしているのはENA1遺伝子のみで、その発現はナトリウムイオンやリチウムイオンの塩ストレスや高pHで特異的に誘導される。このENA1プロモーターの支配下にENA2遺伝子を融合して発現させることにより、Ena2p がEna1p と同様にNa<sup>+</sup> / Li<sup>+</sup> ATPaseとして機能することが示された。

【0009】酵母の耐塩性を左右するENA1遺伝子の発現制御機構については、高pHに応答した信号伝達系については明らかとなっていないが、塩ストレスに応答した2つの信号伝達系が関与することが明らかにされている (Marquez, et al., 1996, FEBS Lett, 382, 89-92)。低塩濃度 (0.1-0.3M NaCl) の条件下では、非特異的な浸透圧ストレスによって活性化されるHOG (high-osmolarity glycerol response)-MAP (Mitogen-activated protein) リン酸化経路によってENA1遺伝子の発現が誘導される。このHOG 経路におけるENA1遺伝子の発現誘導は、非ストレス条件下でENA1遺伝子の発現を抑制しているbZIP (basic region and leucine zipper) 転写遺伝子Sko1p を不活性化することによって行われている。

【0010】高塩濃度(0.6-1M NaCl)の条件下では、カルシウムイオンによって活性化される蛋白質脱リン酸化酵素であるカルシニューリンの経路によって、ENA1遺伝子のナトリウム特異的な発現が誘導される。カルシニューリンによって直接制御されているのかは不明であるが、カルシニューリン経路によるENA1遺伝子の発現に重要なZnフィンガー転写因子Crz1p/Tcn1p/Hal8pが知られている。また、カルシニューリンではなく、カルモジュリンが関与した機構によって、Ena1p ATPaseはカルシウムによって蛋白質レベルで活性化される。その機構として、カルシウム-カルモジュリンがEna1p ATPaseのC末端に存在する自己抑制化ドメインと相互作用することが予想されている。

【0011】これまでに、植物においてはEna-type ATPaseの存在は確認されておらず、いまだに細胞外へナトリウムイオンを排出する機能を有するイオン輸送体は同定されていない。そのため、植物のナトリウムイオン排出機構に関する研究は酵母と比較してかなり遅れている。植物生理学的研究から、植物のナトリウムイオン排出にはNa<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> アンチポーターが関与していることが示唆されているが、その分子機構についてはほとんど明らかになっていない。

【0012】分裂酵母*Schizosaccharomyces pombe*では、Ena-type ATPaseではなく、Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> アンチポーターであるSod2pがナトリウムイオンおよびリチウムイオンの排出に機能し、耐塩性に関与していることが知られている(Jia et al., 1992, EMBO J, 11, 1631-1640)。これまでの知見により、Ena-type ATPaseとNa<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> アンチポーターは置き換え可能であることが判っており、耐塩性を向上させるという意味では、どちらも有効な機能分子であるといえる。しかしながら、*S. cerevisiae*においても、Sod2pと同様なNa<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> アンチポーターNha1pの存在が知られているが、その発現レベルは低く、耐塩性には殆ど関与していない(Prior et al., 1996, FEBS Lett, 387, 89-93)。また、Sod2p/Nha1pは細胞外のpHによってNa<sup>+</sup>およびLi<sup>+</sup>の排出活性が規定されるため、酸性環境でのみしか機能を発揮できないという特徴をもつ。

【0013】よって、機能的にはEna1pとSod2pで同様の効果が期待できるが、外部のpH環境に影響されないEna1pの方が人為的な発現制御が容易であることが予想される。これまでに、植物細胞でNa<sup>+</sup>排出系の機能分子を生成させた例はなく、Ena1pを植物細胞において発現させることは耐塩性植物を作製するという意味で非常に価値がある。そこで、本発明者らは、*S. cerevisiae*のENA1遺伝子をタバコ(*N. tabacum*)細胞へ導入し、タバコ細胞内でEna1pが機能することによって、タバコ細胞のNa<sup>+</sup>およびLi<sup>+</sup>の排出活性が高まって耐塩性が向上し、海水並の塩ストレスにおいても生育が可能となることを証明した。また、Ena1pの様なイオンポンプが生理的に機

能するためには細胞膜に局在化していることが重要であるが、共焦点レーザー顕微鏡による観察により、ENA1遺伝子を導入した細胞において、細胞膜における局在が観察された。

【0014】これまで、ナトリウムイオン排出ポンプ遺伝子を植物細胞に導入する技術により、耐塩性を向上させることは成功しておらず、イオンを細胞外へ排出する手段により耐塩性を付与することは本発明により初めて達成された。本発明においては、幾つか存在する類似のナトリウムイオン排出ポンプ遺伝子のうちENA1を選択したこと、ENA1を発現させる際に適切な方法を採用することにより、本発明は初めて達成された。

【0015】ENA1遺伝子は大腸菌内で全長を単離することが難しく、高発現すると毒性を示す傾向がある。そのため、ENA1遺伝子を導入した大腸菌においては、顕著な生育阻害が認められたり、不活性型のENA1遺伝子が大腸菌内で増幅されたりする。そこで、本発明者らはPCR産物の全長を直接クローニングするのではなく、2つの断片に分けてクローニングしてから、低コピー数のバイナリーベクターpMSH2上で再連結する方法でクローニングを行った。その際に、ENA1遺伝子欠損株変異酵母G19株を用いて、単離したENA1遺伝子が活性を保持していることを確認を行いながら検討を行ったために、ENA1遺伝子を導入した本発明の形質転換植物細胞が得られた。

【0016】また、塩ストレスの検討においてはNaClを用いることが一般的であるが、NaClは高濃度を用いないと毒性を示さないために、カチオン特異的な影響を検討するには適さない。本発明においてはカチオンによる影響を評価する感度を上げるために、より毒性の高いLiClを用いた。また、植物細胞の塩感受性は細胞外のカルシウム濃度が下がるとともに増大することが知られており、植物細胞の培養に用いるMS培地のカルシウム濃度を、通常の3mMから1mMに低下させることにより、感度良く毒性カチオンの影響を検討することが可能となった。

【0017】

【発明の実施の形態】本発明は、パン酵母ナトリウムイオン排出ポンプ遺伝子ENA1をベクターへ挿入し、ENA1が挿入されたベクターをアグロバクテリウムに導入し、ベクターが導入されたアグロバクテリウムにより植物細胞を感染させる過程により作製させる、イオン毒性耐性を付与した形質転換植物細胞である。ナトリウムイオン排出ポンプ遺伝子ENA1を導入してイオン毒性耐性を付与でき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、またタバコ、シロイヌナズナ、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。原理的には、あらゆる植物にENA1遺伝子を導入してイオン毒性を付与することが可能である。形質転換を行う際に、遺伝子を導入する植物の種に応じて本技術分野で一般的に使用されているベク

ター及びアグロバクテリウム菌株を、適宜選択して用いることができる。また、その様に作製したイオン毒性に対する耐性を付与した形質転換植物細胞より得られた植物体、及び形質転換植物細胞を作製する方法も、本発明の範囲内である。本発明を、タバコ培養細胞を用いた実施例で詳細に説明するが、上記の記載及び下記の実施例は本発明を何ら限定するものではない。

#### 【0018】

【実施例】(使用材料)形質転換タバコ培養細胞の作製には、*Nicotiana tabacum* L. cv Bright Yellow 2 (Nagata et al., 1981, Mol Gen Genet, 184, 161-165)を使用した。また、形質転換タバコ植物体の作製には、*N. tabacum* L. cv Petit Habana SR1を使用した。

【0019】融合遺伝子構築の大腸菌宿主として、*Escherichia coli* DH5a (deoR, endA1, gyrA96, hsdR17(rk-mk+), recA1, relA1, supE44, thi-1, D(lacZYA-argFV169), f80dlacZDM15, F-, l-) (Hanahan, 1983, J Mol Biol, 166, 557-580)を使用した。タバコへの遺伝子導入に用いるアグロバクテリウムは、*Agrobacterium tumefaciens* EHA105株 (Hood et al., 1993)を使用した。酵母のナトリウムポンプ遺伝子 (ENA1) 単離のための野生型酵母菌株として *Saccharomyces cerevisiae* W303.1B株 (Mata ade2 his3 leu2 trp1 ura3)を、酵母における ENA1 遺伝子の機能解析には *S. cerevisiae* W303.1B株の4個全てのENA遺伝子群を欠失変異した *S. cerevisiae* G19株 (Mata ade2 his3 leu2 trp1ura3 ena1D::HIS3::ena4D) (Quintero et al., 1996, Plant Cell, 8, 529-537)を使用した。

【0020】融合遺伝子の構築を行うためのベクターとして、pBluescriptII SK- (Stratagene社) および pUC19 (Messing, 1983, Methods Enzymol, 101, 20-78)を使用した。また、形質転換タバコ作製のためのパイナリーベクターとして、pBI101HmB (Akama et al., 1992, Plant Cell Rep, 12, 7-11) および pBI121 (Jefferson et al., 1987, EMBO J, 6, 3901-3907)を使用した。形質転換酵母作製のための発現ベクターとして、pYES2 (Invitrogen社)を使用した。また、形質転換タバコ培養細胞作製のためのパイナリーベクターとして、pMSH1/2 (Kawasaki et al., 1999, Proc Natl Acad Sci U S A, 96, 10922-10926)を使用した。

【0021】(培地及び培養条件)タバコ培養細胞の培養は、Nagataらの方法 (Nagata et al., 1981, Mol Gen Genet, 184, 161-165) に従い、LS (Linsmaier and Skoog) 培地 (Linsmaier and Skoog, 1965, Physiol Plant, 18, 100-127)中のKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>を370 mg/L、thiamine HClを1 mg/Lに増量し、さらにsucroseを3%および2,4-Dを0.2 mg/L添加した改変LS培地で行った。また、タバコ植物体は、MS無機塩 (Murashige and Skoog, 1962, Physiol Plant, 18, 473-497)に3% sucrose、0.3% gellanum (Wako社)を添加したMS基本培

地で栽培した。タバコ植物体は特に断らない限り、25で16 h 明期および8 h暗期で栽培した。

【0022】大腸菌の培養は、LB (Luria-Bertani)培地 (1% trypton, 0.5% yeast extract, 1% NaCl) を使用し、37で行った (Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N Y)。平板培地には、15 g/Lの精製寒天末を加えた。また、必要に応じて抗生物質 (アンピシリン100 mg/L、カナマイシン50 mg/L、ハイグロマイシン20 mg/L)を添加した。

【0023】アグロバクテリウムの培養は、LB培地を使用し、28で行った。平板培地には、15 g/Lの精製寒天末を加えた。また、必要に応じて抗生物質 (カナマイシン100 mg/L、ハイグロマイシン20 mg/L)を添加した。酵母の培養のための基本操作は、Adamsらの方法 (Adams et al., 1997, Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual, 1997 edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY)に従った。酵母の通常培養は、完全培地のYPD培地 (2% glucose, 2% Bacto-peptone (Difco社), 1% yeast extract)を使用し、30で行った。また、pYES2 (マーカー遺伝子はURA3)系のプラスミドを保持した形質転換酵母の選択には、最少培地のSD培地 (2% glucose, 0.67% Bacto-yeast nitrogen base without amino acids (Difco社)) (Adams et al., 1997) に0.5%カザミノ酸 (Bacto-casamino acid; Difco社)、2%硫酸アデニン、および4% L-トリプトファンを添加した培地 (SD-Ura培地)を使用し、30で行った。形質転換酵母におけるpYES2のGAL1プロモーターの下流に挿入したENA1遺伝子の発現誘導には、YPG培地 (2% galactose, 0.6% sucrose, 2% Bacto-peptone, 1% yeast extract)を使用し、30で行った。平板培地には、20 g/Lの精製寒天末を加えた。また、塩ストレスを与える場合は、必要に応じて適量のLiClまたはNaClをYPD培地およびYPG培地に添加した。

【0024】(大腸菌の形質転換)大腸菌のコンピテンセルは、Inoueらの方法 (Inoue et al., 1990, Gene, 96, 23-28)に従い調製した。大腸菌の単一コロニーを5 mLのLB培地に白金耳を用いて植菌し、37で1晩培養した。大腸菌培養液のうち、2 mLを坂口フラスコ内の200 mLのSOB培地 (2% triptone, 0.5% yeast extract, 0.05% NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.0)に植菌し、660 nmにおける濁度が0.4-0.8になるまで25-30、200 rpmで振盪培養した。培養液を氷中で5 min冷却後、遠心分離 (3000 rpm, 10 min, 4)により集菌して上清を捨て、冷却したTBバッファー (10 mM PIPES, 15 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 250 mM KCl, 55 mM MnCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, pH 6.7)を1/3容 (約67 mL)加えて穏やかに懸濁してから、10 min氷中に静置した。遠心分離 (30

00 rpm, 10 min, 4 ) により集菌して上清を捨て、再び冷却したTBバッファーを 16 mL加えて穏やかに懸濁した。続いて7% (約 1.2 mL)となるようにDMSOをゆっくり混ぜながら加えた後、10 min水中に静置した。氷上で 200  $\mu$ L ずつ1.5 mL遠心管に分注し、直ちに液体窒素で凍結させ、-80 で保存した。

【0025】コンピテントセルを氷中で解凍後、コンピテントセルの 1/10 容以下 (1-20  $\mu$ L)のDNA 溶液を加え、氷中に 30 min 静置した。42 に 45-60 s置き、直ちに氷中に戻して 2 min静置した後 800  $\mu$ L の SOC培地 (20 mM グルコースを含む SOB培地) を加え、37 で 1 h振盪培養した。スピンドウンして上清を大部分除き、残った培地に菌体を懸濁して適量の抗生物質を含むLB寒天培地上に広げ、37 で1晩培養した。

【0026】(酵母の形質転換)酵母の形質転換は、Gietzらの酢酸リチウム (LiAc) 法 (Gietz et al., 1992, Nucleic Acids Res, 20, 1425)に従った。酵母の単一コロニーを5 mLの YPD培地に白金耳を用いて植菌し、30 で 1晩培養した。この酵母培養液のうち500  $\mu$ L ずつを 5 mL の YPD培地 2本に移し、600 nmにおける濁度が 0.8になるまで30 で振盪培養した。培養液を 15 mL 遠心管に移し、遠心分離 (1500 rpm, 3 min, 25 ) により集菌して上清を捨て、10 mLの滅菌水に懸濁した。遠心分離 (1500rpm, 3 min, 25 ) し、ペレットを 1.2 mL の滅菌水に懸濁させ1.5 mL遠心管に移した。遠心分離 (3000 rpm, 3 min, 25 ) を行い、ペレットを 1.2 mL の TE/LiAc溶液 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 100 mM lithium acetate (LiAc), pH7.5) に懸濁した。遠心分離 (3000 rpm, 3 min, 25 ) を行い、ペレットを 100  $\mu$ L の TE/LiAc溶液に懸濁した。このうち 50  $\mu$ L を分注し、高い形質転換効率を必要とする場合は 50  $\mu$ g の一本鎖サケ精子キャリアー DNAを添加し、必要量のプラスミド DNAを添加した後に、300  $\mu$ L の PEG 4000 溶液 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 100 mM LiAc, 40% PEG 4000, pH 7.5)を加えた。30 で 30 min 振盪培養した後、42 で 15 min 熱ショックを加えた。細胞懸濁液を 5 sスピンドウンし、1 mLの液体SD-Ura培地に再懸濁し、30 で 30 min 振盪培養した後、平板SD-Ura培地上に塗布し、30 で 2晩培養して形質転換酵母を選抜した。

【0027】(プラスミドDNA の少量精製)大腸菌およびアグロバクテリウムからのプラスミド DNAの少量調製は、BirnboimとDolyのアルカリ抽出法 (Birnboim and Doly, 1979, Nucleic Acids Res, 7, 1513-1523) に従った。抗生物質を含む 5 mL のLB培地で37 、 1晩培養 (アグロバクテリウムの場合は28 、 2晩培養) した菌体を1.5 mL遠心管に移し、遠心分離 (12000 rpm, 1 min, 4 ) により集菌した。この菌体を 100  $\mu$ L の solution I (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8.0)に懸濁した後、200  $\mu$ L の solution II (0.2 N Na

OH, 1% (w/v) SDS) を加えて穏やかに混ぜ、氷中に 5 min静置した。続いて 150  $\mu$ L の solution III (3 M potassium acetate, pH 4.8) を加えてよく混合し、氷中に 15 min 静置した。遠心分離 (15000 rpm, 5 min, 4 ) した後、上清を別のチューブに移し、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行い、TE バッファー (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)に溶解した。また、必要に応じて、RNaseA (10 mg/mL)を加え、37 で 10 min 消化した後、PEG沈殿を行い、TEバッファーに溶解して-20 で保存した。

【0028】酵母からのプラスミド DNAの少量調製は、Hoffmanと Minstonの簡易ガラスビーズ法 (Hoffman and Winston, 1987, Gene, 57, 267-272) に従った。選択培地で30 、 1-2 晩培養した菌体を 1.5 mL 遠心管に移し、遠心分離 (10000 rpm, 10 s, 25 ) により集菌した。この菌体を 200  $\mu$ L の抽出バッファー (2% TritonX-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 1mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0) に懸濁した後、200  $\mu$ L のフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール (25 : 24 : 1, v/v/v) と酸洗浄ガラスビーズを約 0.3 g加え、2 min ボルテックスで激しく攪拌した。遠心分離 (12000 rpm, 1 min, 25 ) して上清を別のチューブに移し、エタノール沈殿を行った後、TEバッファー (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)に溶解した。

【0029】(酵母ENA1遺伝子のゲノムPCR による増幅)酵母のナトリウムポンプをコードした ENA1 遺伝子は、簡易ガラスビーズ法 (Hoffman and Winston, 1987, Gene, 57, 267-272) または Nippon Gene社のISOPLANT DNA isolation kitを用いて調製した *S. cerevisiae* W303.1B株のゲノム DNAを鋳型とし、両端に制限酵素切断部位を付加した ENA1 遺伝子全長 (3276 bp)を特異的に増幅するプライマーセットを用いたゲノムPCR によって増幅した。ここでは、*S. cerevisiae*の第IV染色体 DNAの全塩基配列 (accession no. NC\_001136) には、ENA1 遺伝子が含まれている (Goffeau et al., 1996, Science, 274, 546-567)ことから、これらの公開されている塩基配列情報から ENA1 遺伝子の特異的に増幅する PCRプライマーセットを設計した。実際のゲノム PCRには、全長 25 ntの SacII切断部位を付加したフォワードプライマー ENA1-F (5'-ACCGCGGATGGGCGAAGGAAGACTACT-3') および全長 45nt の SacII切断部位と XhoI 切断部位とを付加したリバースプライマー ENA1-R (5'-ACTCGAGCCGCGGT CATTGTTTAATACCAATATTAACCTT-CTGTAT-3')を使用し、約3.3 kbの ENA1 遺伝子を増幅した。また、ENA1 遺伝子の PCRは、変性反応を94 で 1 min行った後、変性反応を 98 で 20s、アニーリングおよび伸長反応68 で 3 minで 30 サイクル繰り返して行い、最後に伸長反応を72 で10 min行った。そして、得られた増幅 DNA断片の制限酵素処理断片の解析を行い、アガロースゲル電気泳動により増幅 DNA断片が目的のENA1遺伝子であることを確

認した。

【0030】(バイナリープラスミドの構築) 融合遺伝子構築のための基本操作は、Sambrookらの方法(Sambrook et al., 1989)に従った。ゲノムPCRによって増幅した約3.3 kbのENA1遺伝子全長を直接クローニングするのは、エラーPCRの頻度やプラスミドへの連結効率を考慮すると得策ではない。そこで、増幅した約3.3 kbのENA1遺伝子全長をKlenow酵素で平滑化した後、KpnIで切断して約1.2 kbのENA1遺伝子の5'-側のDNA断片(EnaS)と約2.1 kbのENA1遺伝子の3'-側のDNA断片(eNAL)に分断した。まず、EnaS断片をpBluescriptII SK-のSmaI/KpnI部位に挿入し、SKEnaSを構築した。次に、eNAL断片をSacIIで切断した後、BluescriptII SK-のSacII/KpnI部位に挿入し、pSKeNALを構築した。そして、pSKeNALのKpnI/SacI断片をバイナリーベクターpMSH2のKpnI/SacI部位に挿入し、バイナリープラスミドpMSHeNALを構築した。続いて、pSKEnaSのSpeI/KpnI断片をバイナリープラスミドpMSHeNALのSpeI/KpnI部位に挿入し、カリフラワーモザイクウイルス35S(CaMV35S)プロモーターとnosターミネーターの間にENA1遺伝子が挿入されたバイナリープラスミドpMSH2::ENA1を構築した。一方で、酵母用の発現ベクターpYES2をHindIII/EcoRIで切断し、Klenow酵素で平滑化した後に、再連結して不必要な制限酵素切断部位(HindIII, KpnI, SacI, BamHI, EcoRI)を除いた。なお、今後は表記しないが、この不必要な制限酵素切断部位を除いたpYES2を用いた。そして、pYES2のNotI/XhoI部位に、pMSH2::ENA1のNotI/XhoI断片を挿入し、pYES2::ENA1を構築した。そして、酵母のENA1-4遺伝子欠損変異株(*S. cerevisiae* G19株)を用いた機能的相補性試験を行い、ゲノムPCRにより増幅したENA1遺伝子が機能的に発現することを確認した。

【0031】(ENA1-4遺伝子欠損変異株を用いた機能的相補性試験) 酵母においてENA1遺伝子が機能的に発現しているかを調べるために、*S. cerevisiae* G19株(Dena1-4)へpYES2ベクターのGAL1プロモーターの支配下に融合遺伝子を挿入した構築物を導入した形質転換酵母を作製した。そして、YPDまたはSD-Ura液体培地を用いて30℃で2日増殖させた酵母細胞の5倍希釈系列を作製し、必要に応じて20 mM LiClまたは100 mM NaClを添加したYPD平板培地またはYPG平板培地上に希釈した細胞懸濁液を5 µLずつスポットし、30℃で2日(LiClおよびNaClを含まない培地の場合)または5日(LiClおよびNaClを含む培地の場合)の増殖を観察し、*S. cerevisiae* G19株の耐塩性が導入した遺伝子の発現によって相補されるか調べた。

【0032】(タバコ培養細胞のLiCl感受性試験) 塩ストレスとしてNaClを用いた場合は、Na<sup>+</sup>のイオン毒性に加え、高濃度のNaClによる高浸透圧ストレスによりタバコ培養細胞は損傷を受けてしまう。そのため、塩ス

トレスのうち、特にイオン毒性に対する耐性を評価するためには、NaClよりもイオン毒性が数倍強いLiClに対するタバコ培養細胞の耐性を調べることが合理的である。つまり、LiClは低濃度でLi<sup>+</sup>のイオン毒性が評価できるため、高浸透圧ストレスの影響を抑えることができるのである(Serrano, 1996, IntRev Cytol, 165, 1-52)。また、植物の塩ストレス耐性は、培地中のCa<sup>2+</sup>濃度と正の相関関係があり、植物の耐塩性は培地中のCa<sup>2+</sup>濃度が増加するほど向上する(LaHaye and Epstein, 1969, Science, 166, 395-396)。つまり、培地中のCa<sup>2+</sup>濃度を下げることによって、植物の塩ストレス感受性を高めることができるので、高浸透圧ストレスの影響を抑えた低濃度の塩によるイオン毒性の評価が可能となる。よって、塩ストレス下のタバコ培養細胞のイオン毒性に対する耐性を評価するために、様々な濃度のLiClを添加した改変LS培地中のCaCl<sub>2</sub>濃度を低下させた条件でのタバコ培養細胞の生育を調べた。

【0033】(アグロバクテリウムの形質転換) アグロバクテリウム単一コロニーを5 mLのLB培地に植菌し、28℃で1晩振盪培養した。この培養液を、500 mLのLB培地に植菌し、600 nmにおける濁度が0.5になるまで28℃で振盪培養した。培養液を遠心分離(5000 rpm, 10 min, 4℃)により集菌して上清を捨て、菌体を洗浄するため500 mLの滅菌水を加えて懸濁し、再度遠心分離(5000 rpm, 10 min, 4℃)により集菌して上清を捨てた。この操作を2回繰り返した後、沈殿に20 mLの冷却した滅菌10%グリセロール溶液を加えて懸濁し、遠心分離(5000 rpm, 10 min, 4℃)により集菌して上清を捨てた。沈殿に3 mLの冷却した滅菌10%グリセロール溶液を加えて懸濁し、40 µLずつ1.5 mL遠心管に分注して、液体窒素で凍結させてから-80℃で保存した。

【0034】コンピテントセルを氷中で解凍した後、2 µLのDNA溶液を加え、氷冷しておいた1 mmキューベット(Gene PulserR/E. coli Pulser™ Cuvette; BIO-RAD社)に移した。エレクトロポレーター(Gene Pulser; BIO-RAD社)により電気パルス(1.8KV, 25 µF, 200W)を与え、DNAを導入した。1 mLのSOC培地を加えて混合し、1.5 mL遠心管に移した。そのまま28℃で1 h振盪培養した後、スピンドウンして上清を大部分除き、残った培地に菌体を懸濁して適量の抗生物質を含むLB寒天培地上に塗布し、28℃で2晩培養した。

【0035】(タバコ培養細胞の形質転換) タバコ培養細胞の形質転換は、Anの方法(An, 1985, Plant Physiol, 79, 568-570)を基本にした。カナマイシン100 mg/Lを含む5 mLのLB培地で28℃、1晩培養したアグロバクテリウム培養液(pBI系のプラスミドを持つEHA105株)100 µLと、培養4日目のタバコ培養細胞懸濁液8 mLを90 mm深型シャーレに入れてよく混ぜ、25℃で2晩、暗所下で静置して共存培養した。アグロバクテリウムを除くため、シャーレの中の培養液を15 mLの遠心管

に移して遠心 (1000 rpm, 5 min, 4 ) し、上清を取り除いた。新しい改変LS培地を入れて遠心 (1000rpm, 5 min, 4 ) し、細胞を洗浄した。この操作を 4回繰り返す、アグロバクテリウムを除いた培養細胞をカナマイシン100 mg/L (必要に応じて、ハイグロマイシン 20 mg/L)、カルベニシリン250 mg/Lの入った改変 LS 寒天培地にまき、25 で暗黒下に静置して培養した。約 2-3週間後にカルス化した細胞を新しいプレートに移植し、増殖しているクローンを選択した。最後に、カナマイシン100mg/L (必要に応じて、ハイグロマイシン 20 mg/L)、カルベニシリン250 mg/Lを加えた改変LS培地 95 mLに移し、継代培養を行った。

【0036】(ゲノム PCRによる遺伝子導入の確認)タバコ培養細胞およびタバコ植物体のゲノム DNAは、Nippon Gene 社のISOPLANT DNA isolation kitを用いて調製した。形質転換体の遺伝子導入の確認は、調製したゲノムDNA を鋳型とし、ENA1遺伝子全長を特異的に増幅するENA1-FおよびENA1-R のプライマーセットを用いた PCRによって行った。また、PCRは、変性反応を94 で 1 min行った後、変性反応を98 で20 s、アニーリングおよび伸長反応68 で 1 min 30 s で30サイクル繰り返して行い、最後に伸長反応を72 で10 min 行った。

【0037】(タバコ培養細胞からの RNA単離)タバコからの RNA単離は、ATA (aurintricarboxylic acid)法に従った (Gonzalez et al., 1980, Biochemistry, 19, 4299-4303)。タバコ培養細胞またはタバコ植物体組織 (0.1 gFW 程度) をあらかじめ液体窒素を入れておいた乳鉢に入れ、乳棒で粉末状になるまで細胞をすりつぶした。粉碎した細胞を使用直前に 1/1000 容の  $\beta$ -メルカプトエタノールを加えた RNA抽出バッファー (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 5 mM EDTA, 2% (w/v) SDS, 2 mM ATA, 2% TINS (triisopropyl naphthalensulfonic acid sodium salt)) が1 mL入った1.5 mL遠心管に入れ、緩やかに攪拌し、溶液が均一になったら3M KClを140  $\mu$ L 加え混合した。これを氷中で 15 min 以上冷やし、遠心分離 (15000 rpm, 5 min, 4 ) した。上清の約1.1 mLを新しい1.5 mL遠心管に移し、そこへ 10 M LiClを 440  $\mu$ L 加え混合した。これを氷中で 30 min 以上放置後、遠心分離 (15000 rpm, 20 min, 4 ) した。上清を取り除き、沈殿を 300  $\mu$ L の滅菌水に溶解して、フェノール・クロロホルム抽出を 2回、クロロホルム抽出を 1回行った。抽出後の上清に 5M NaClを 40  $\mu$ L、エタノールを 850  $\mu$ L 加えて混合し、 $-20^{\circ}\text{C}$  で 1 h以上放置後、遠心分離 (15000 rpm, 15 min, 4 ) した。上清を取り除き、沈殿を 70%エタノールでリンスし、30  $\mu$ L の滅菌水に溶解した。

【0038】RT-PCRに用いるための RNA単離は、AGPC (acid guanidinium-phenol-chloroform) 法に従った。まず、使用するプラスチック製の器具はオートクレーブ (121  $^{\circ}\text{C}$ , 40 min) により、それ以外の器具は乾熱処理

(180  $^{\circ}\text{C}$ , 8 h)により RNaseを除去した。約0.2 g のタバコ培養細胞を2 mL遠心管に入れ、液体窒素中で凍らせた。これに GTC溶液 (4 M guanidine thiocyanate, 0.5 % sarcosyl, 0.1 M  $\beta$ -mercaptoethanol, 25 mM sodium citrate, pH 7.0)を 0.5  $\mu$ L 入れ、超音波破碎した後 50  $\mu$ L の 2 M酢酸ナトリウムを加えた。さらに、平衡化酸性フェノールを500  $\mu$ L 加え、クロロホルム/ イソアミルアルコール (24:1, v/v)を100  $\mu$ L 加えて、氷上に 15 min以上放置した後に遠心分離 (15000 rpm, 20 min, 4 ) した。上清を新しい1.5 mL遠心管に移し、500  $\mu$ L のイソプロピルアルコールを加えてよく混合し、25 で 10 min 放置した後に遠心分離 (15000 rpm, 10 min, 4 ) した。沈殿を 300  $\mu$ L のGTC 溶液に溶解し、イソプロピルアルコール沈殿を行った後、100  $\mu$ L のDEPC水に溶解した。必要に応じて DNase処理を行い、反応後にフェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行った。

【0039】(DNA プロブの作製)タバコ細胞内でのENA1遺伝子の発現を検討するノザン解析には、0.8 kbのENA1遺伝子の SacI/KpnI断片をプローブとして用いた。また、対照プローブとして、イネのACT1遺伝子を用いた (Sano and Youssefian, 1991)。プローブのラベリングは、TaKaRa社のBca BEST <sup>TM</sup> Labeling Kitを用いて行った。まず、1.5 mL遠心管に鋳型 DNA 25 ngおよび Rando m Plimer液 2  $\mu$ L を加えた後、滅菌水を加えて5  $\mu$ L にした反応液を調製し、95  $^{\circ}\text{C}$ 、3 min 加熱後、氷中で急冷した。これに 10xバッファー、dNTPsを各 2.5  $\mu$ L、( $\gamma$ -<sup>32</sup>P) dCTP (1.85 MBq, 50 mCi) を 5  $\mu$ L 加えた後、滅菌水を加えて 24  $\mu$ L にし、Bca BEST <sup>TM</sup> DNA Polymerase 1  $\mu$ L を加え、55 で10 min保温した後、95 で10 min加熱し、氷中で急冷してハイブリダイゼーションプローブ溶液とした。

【0040】(ノザン解析)ホルマリンアガロース RNA変性ゲル電気泳動を行うため、無菌水79 mL に、アガロース 1.5 g、20x MOPS バッファー (400 mM MOPS, 100 mM sodium acetate, 10 mM EDTA, pH7.0) 5 mL を加え、ゲルを溶解した後、16 mLのホルマリンを加えて混合し、6 mm 厚のサブマリン型電気泳動ゲルを作製した。泳動用緩衝液は、1x MOPSバッファー (20 mM MOPS, 5 mM sodium acetate, 0.5 mM EDTA, pH7.0)を用いた。RNA溶液 (10-20  $\mu$ g の RNAを含む) 6  $\mu$ L、20x MOPS 1  $\mu$ L、ホルマリン 3  $\mu$ L、ホルムアミド 10  $\mu$ L を混合し、500  $\mu$ g/mLエチジウムブロマイドを 1  $\mu$ L 加えた後、70 で 10 min 加熱後、氷中で急冷し、泳動用色素液を 2  $\mu$ L 加え、46 Vで 1 h電気泳動した後、96 Vで 2 h電気泳動した。

【0041】電気泳動で分離した RNAをナイロンメンブレン (Zeta-Probe GT blotting membrane; BIO-RAD社) にトランスファーした。トランスファーバッファーは、20xSSC (3 M NaCl, 0.3 M クエン酸ナトリウム) を用

い、12 h以上行った。プロットしたメンブレンを、2x SSC (0.3 M NaCl, 0.03 Mクエン酸ナトリウム) で洗浄し、湿ったままUVクロスリンク (150 mJoule, GS GENE LINLER? UV Chamber; BIO-RAD 社) した。

【0042】メンブレンおよびプレハイブリダイゼーション液 (50% formamide, 0.12 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(pH7.2), 0.25 M NaCl, 7% (w/v) SDS) を 100 cm<sup>2</sup>のメンブレンに対し 15mLハイブリバック (soft, S-1021; COSMO BIO 社) に入れ、43 °C で 5 min程度プレハイブリダイゼーションを行った。その後、DNAプローブを加えて、43 °C で 16 h 以上ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション終了後、ハイブリバックからメンブレンを、取り出して、洗浄用のトレイに移した。その後、メンブレンを25 °C で 15 min、0.1% (w/v) SDS を含む 2x SSC 中で1回、0.1% (w/v) SDS を含む 0.5x SSC 中で1回、そして 0.1% (w/v) SDS を含む 0.1xSSC 中で1回洗浄し、オートラジオグラフィーを行った。

【0043】(RT-PCR解析) RNA の逆転写反応は、Ampli Taq DNA polymerase kit (Perkin Elmer社) を用い、添付のプロトコールに従って行った。そして、調製したcDNAを鋳型とし、ENA1-F および ENA1-R のプライマーセットを用いた PCRを行った。この PCRは、変性反応を 94 °C で 1 min行った後、変性反応を 98 °C で 20 s、アニーリングおよび伸長反応 68 °C で 3 minで 30 サイクル繰り返しを行い、最後に伸長反応を 72 °C で 10 min 行った。

【0044】(HAエピトープカセットの作製) 全長 9 aa (YPYDVPDYA) の HA (influenza virus hemagglutinin) エピトープ (Wilson et al., 1984) をグリシン (G) リンカーを間に挟んで 3回繰り返した 3HAエピトープカセットを設計し、2組の相補鎖となる 4種類の一本鎖の合成オリゴヌクレオチド (3HA1-U, sense, 5'-TCGAGGGTACCACATACGACGTCCAGACTACGCCGTTACCCATACGA-3'; 3HA1-B, antisense, 5'-CACGTCGTATGGGTAACCGCGTAGTCTGGGACGTCGTATGGGTAACCC-3'; 3HA2-U, sense, 5'-CGT-GCCAGACTACGCCGTTACCCATACGACGTGCCAGACTACGCCGTC-3'; 3HA2-B, antisense, 5'-TCGAGACCGCGTAGTCTGGCACGTCGTATGGGTAACCGCGTAGTCTGG-3') を 2組別々にアニーリングした (3HA1-U/Bおよび 3HA2-U/B)。二本鎖となった 2種類のアニーリング産物を T4 DNA polynucleotide kinase でそれぞれリン酸化した後、これら 2種類の二本鎖オリゴヌクレオチドを混合し、T4 DNA ligase で連結した。目的の 3HA断片を XhoI で切り出した後、pBluescriptII SK- の XhoI 部位に挿入し、3HAエピトープカセットプラスミド pSK::3HA を構築した。そして、塩基配列を決定し、pSK::3HA の挿入 DNA断片が目的の 3HAエピトープカセットであることを確認した。

【0045】(塩基配列の決定) クローニングベクター pBluescriptII SK- へ挿入した DNA断片の塩基配列の決定は、Perkin Elmer 社の DNAシーケンシングキットを

用い、そのプロトコールに従った。キットは、ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit を用いた。

【0046】(HAエピトープ融合 Ena1pの作製) Ena1p の C末端に 3HAエピトープカセットを挿入するために、PCRによって ENA1 遺伝子に変異を導入し、ENA1 遺伝子の終止コドンの直前に SalI 切断部位を、終止コドンの直後に XhoI 切断部位を付加した ENA1S\*X遺伝子を設計した。この PCRは、pYES2::ENA1を鋳型 DNAとし、フォワードプライマーとしては ENA1-F を、リバースプライマーとしては ENA1S\*X-R (5'-CCGCTCGAGTCAGTCGACTGTTTAATACCAATATTAACCTTCTGTATGGATTGTAGTAG-3') を用いて行った。また、PCRは、変性反応を 94 °C で 1 min行った後、変性反応を 98 °C で 20 s、アニーリングおよび伸長反応 68 °C で 3 minで 30 サイクル繰り返しを行い、最後に伸長反応を 72 °C で 10 min行った。そして、約 3.3 kb の ENA1S\*X遺伝子の増幅 DNA断片を得た。次に、ENA1S\*X遺伝子の増幅 DNA断片を KpnI/XhoI で切断し、約 2.1 kb の KpnI/XhoI ENA1S\*X遺伝子部分断片を得た。そして、pYES2::ENA1を KpnI/XhoI で切断して約 2.1 kb の KpnI/XhoI ENA1 遺伝子部分断片を除き、KpnI/XhoI ENA1S\*X遺伝子部分断片と置換することによって、pYES2::ENA1S\*X を構築した。そして、酵母の ENA1-4 遺伝子欠損変異株 (*S. cerevisiae* G19 株) を用いた機能的相補性試験を行い、Ena1pのC末端に SalI 切断部位由来の 2 aa (VD) が付加した Ena1p-VD をコードした ENA1S\*X遺伝子が機能的に発現することを確認した。最後に、pSK::3HA を XhoI で切断して得た約 0.1 kb の XhoI 3HA エピトープカセット遺伝子断片を、pYES2::ENA1S\*Xの SalI 部位に挿入して、pYES2::ENA1-3HAを構築した。そして、pYES2::ENA1-3HAの制限酵素処理断片の解析を行い、アガロースゲル電気泳動により、3HAエピトープカセット遺伝子のコピー数および挿入方向を確認をした。さらに、*S. cerevisiae* G19株を用いた機能的相補性試験を行い、Ena1pのC末端に SalI/XhoI切断部位由来の 4 aa および Gリンカーを間に挟んで 3回繰り返した HA (下線) エピトープの 31 aaを合わせた計 35aa (VEGYDVPDYAGYPYDVPDYAGYPYDVPDYAGLD) を付加した Ena1p-3HAをコードした ENA1-3HA 遺伝子が機能的に発現することを確認した。

【0047】(植物で ENA1-3HA 遺伝子を発現するためのバイナリープラスミドの構築) まず、バイナリーベクター pMSH1/2を HindIIIで切断して再連結することにより、ハイグロマイシンマーカ遺伝子カセットを除去し、バイナリーベクター pMS1/2 を構築した。そして、pYES2::ENA1-3HAの NotI/XhoI ENA1-3HA 遺伝子断片を pMS2 の NotI/XhoI部位に連結し、バイナリープラスミド pMS::ENA1-3HAを構築した。また、対照として、pBI221の XbaI/SacI GUS遺伝子断片を pMS1 の XbaI/SacI部位に連結し、バイナリープラスミド pMS::GUS を構築し

た。

【0048】(酵母細胞からの膜画分の粗調製)ウエスタン解析に用いる酵母細胞の膜画分の粗調製は、基本的に Serranoの方法 (Serrano, 1988, Methods Enzymol, 157, 533-544)に従った。あらかじめ 2mL 遠心管に氷冷した 1 mL の TE バッファー (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)を入れ、その中に平板 YPG培地上で増殖した酵母細胞を適当量懸濁した。遠心分離 (2000 rpm, 3 min, 4 )により集菌して上清を捨て、沈殿した細胞の3倍容の抽出バッファー (5 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, 25 mM DTT, 25 mM Tris-HCl, pH 8.5)に懸濁した。細胞懸濁液と等量のガラスビーズを加え、氷上に 1 min静置した。ポルテックスミキサーの最大スピードでガラスビーズを含む細胞懸濁液を激しく 30 s 攪拌した後、直ちに氷上に戻して 1 min静置した。この操作を15 回繰り返して、細胞を破碎した。まず、ガラスビーズと破碎した細胞の不溶物を除くために遠心分離 (2000 rpm, 10 min, 4 )し、上清を新しい 2 mL 遠心管に氷上で移した。さらに、この上清を遠心分離 (15000 rpm, 20 min, 4 )して、膜画分の沈殿を得た。最後に、この膜画分の沈殿を 20-50  $\mu$ L の抽出バッファーに再懸濁して SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) の試料とした。

【0049】(タバコ培養細胞からの膜画分の粗調製)ウエスタン解析に用いるタバコ培養細胞の膜画分の粗調製は、基本的に Serranoの方法 (Serrano, 1984, Biochem Biophys Res Commun, 121, 735-740)に従った。タバコ培養細胞 (1 gFW 程度) を液体窒素を満した乳鉢に入れ、乳棒で粉末状になるまで細胞をすりつぶした。次に、粉碎した細胞を氷冷した1 mLの抽出バッファー (290 mM sucrose, 25 mM EDTA, 76 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 2 mM PMSF, 250 mM Tris-HCl, pH 8.5)の入った2 mL 遠心管に移し、ポルテックスミキサーの最大スピードで細胞懸濁液を激しく30 s攪拌した後、直ちに氷上に戻して1 min静置した。この操作を 5回繰り返して、破碎した細胞が均一になるように懸濁した。まず、破碎した細胞の不溶物を除くために遠心分離 (2000 rpm, 10 min, 4 )し、上清を新しい2 mL遠心管に氷上で移した。さらに、この上清を遠心分離 (15000 rpm, 20 min, 4 )して、膜画分の沈殿を得た。最後に、この膜画分の沈殿を 20-50  $\mu$ L の抽出バッファーに再懸濁して SDS-PAGE の試料とした。

【0050】(ウエスタン解析) SDS-PAGEは、Laemmliの方法 (Laemmli, 1970, Nature, 227, 680-685)に従った。SDS-PAGEの試料は、等量の 2x サンプルバッファー (4% (w/v) SDS, 20% (w/v) glycerol, 0.05% (w/v) bromophenol blue, 300 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 125 mM Tris-HCl, pH 6.8) と混合し、90  $^{\circ}$ C で 2 min熱処理した。そして、7.5% SDS-ポリアクリルアミドゲルを 2つ作製し、熱処理後の試料を各 SDS-ポリアクリルアミド

ゲルのウェルに同様に注入した。そして、これらの SDS-ポリアクリルアミドゲルを 30 mAの定電流で同時に電気泳動した。泳動後、一方のSDS-ポリアクリルアミドゲルは、CCB (Coomassie Brilliant Blue R-250) 染色を行い、分離したタンパク質を可視化した。そして、もう一方のSDS-ポリアクリルアミドゲルは、ウエスタン解析に用いた。ウエスタン解析は、Towbinらの方法 (Towbin et al., 1979, Proc Natl Acad Sci U S A, 76, 4350-4354)に従った。SDS-PAGE後のゲルを転写バッファー (48 mM Tris-HCl, pH 8.3, 39 mM glycine, 20% methanol, 0.037% SDS)中で 15 min 平衡化した後、セミドライ型の平板転写装置 (NA-1512; Nihon Eido 社) を用いて、転写バッファー中で 1 mA/cm<sup>2</sup> の定電流で 1 h通電し、タンパク質を PVDF メンブレン (Hybond-P; Amersham社) 上に転写した。転写後、メンブレンをTBST (25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.05% Tween 20)で洗い、次にブロッキング溶液 (3 % Skim milk in TBST) に浸して 25 $^{\circ}$ C で 1 hブロッキングを行った。そして、メンブレンを一次抗体 (rat anti-HA High Affinity (clone 3F10), 1:1000; Boehringer Mannheim 社) を添加したブロッキング溶液中で 25 $^{\circ}$ C で 1 h処理した。一次抗体処理したメンブレンをブロッキング溶液中で 5 min洗浄する作業を 3回繰り返した。洗浄後、二次抗体 (goat anti-rat IgG (H+L) alkaline phosphatase conjugate, 1:8000; Promega 社) を添加したブロッキング溶液中で25  $^{\circ}$ C で 1 h処理した。二次抗体処理したメンブレンを TBST で 5 min洗浄する作業を 3回繰り返した。洗浄後、15 mLの AP バッファー (100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) に 100  $\mu$ L の NBT溶液 (0.017% (w/v) nitro blue tetrazolium, 0.23% (v/v) N,N-dimethylformamide) および 50  $\mu$ L の BCIP 溶液 (5% 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate p-toluidine salt in N,N-dimethylformamide) を添加したアルカリフォスファターゼ発色溶液に浸して 1-15 min 反応させ、最後にメンブレンを蒸留水で洗浄した。

【0051】(共焦点レーザー顕微鏡によるタバコ培養細胞の観察)タバコ培養細胞の蛍光抗体染色は、Banjokoと Trelease の方法 (Banjoko and Trelease, 1995, Plant Physiol, 107, 1201-1208)に従った。タバコ培養細胞(細胞容で 250  $\mu$ L 程度) を 2 mL 遠心管に採取し、1 mLの PBS (phosphate-buffered saline; 137 mM NaCl, 8.10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O, 2.68 mM KCl, 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) で洗浄し、遠心分離 (600 rpm, 3 min, 25  $^{\circ}$ C )した。上清を除いた後、1 mL の固定液 (4% formaldehyde (made from paraformaldehyde) in PBS)を加えて細胞を懸濁し、25  $^{\circ}$ C で 1 h静置した。固定した細胞を遠心分離 (600 rpm, 3 min, 25  $^{\circ}$ C )して上清を除いた後、1 mL の PBSを加えて 3回洗浄した。洗浄後、1 mL の酵素液 (0.1% (w/v) pectolyase Y-23 (Seishin Ph

armaceutical社) in PBS) を加えて混合し、30 で 2 h 静置した。遠心分離 (600 rpm, 3 min, 25 ) して上清を除いた後、1 mLの PBSを加えて 3回洗浄した。洗浄後、1.25mLの界面活性剤液 (0.3% Triton X-100 in PBS) を加えて混合し、25 で 15 min 静置して、細胞膜の透過性を高めた。遠心分離 (600 rpm, 3 min, 25 ) して上清を除いた後、1 mLの PBSを加えて 3回洗浄した。洗浄後、1 mLのPBS-BSA (1% BSA in PBS) を加えて混合し、25 で30 min静置した。遠心分離 (600 rpm, 3 min, 25 ) して上清を除いた後、1 mLの一次抗体 (rat anti-HA High Affinity (clone 3F10), 1:200; Boehringer Mannheim社) を添加した PBS-BSAを加えて混合し、25 で 1 h以上静置した。遠心分離 (600 rpm, 3 min, 25 ) して上清を除いた後、1 mLの PBSを加えて 3回以上洗浄した。洗浄後、1 mLの蛍光標識二次抗体 (Alexa Fluor™ 488 goat anti-rat IgG (H+L) conjugate, 1:200; Molecular Probes社) を添加した PBS-BSAを加えて混合し、25 で 1-2 h静置した。遠心分離 (600 rpm, 3 min, 25 ) して上清を除いた後、1 mLの PBSを加えて 3回以上洗浄した。洗浄後、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM510; Zeiss 社) によって細胞を観察した。

【0052】(酵母ENA1遺伝子のゲノムPCRによる単離) 簡易ガラスビーズ法により抽出した酵母 (*S. cerevisiae*)のゲノムDNA を鋳型とし、ENA1遺伝子全長を特異的に増幅するプライマーセットを設計してゲノム PCRを行った。その結果、予想通りの長さである約3.3 kbのENA1遺伝子の増幅断片を得た。そして、ゲノム PCRにより増幅したENA1遺伝子をバイナリーベクター pMSH2の CaMV35Sプロモーターの支配下に挿入したバイナリープラスミド pMSH2::ENA1を構築した(図1)。図1において、Kan<sup>r</sup> はカナマイシン耐性遺伝子を、Hyg<sup>r</sup> はハイグロマイシン耐性遺伝子を、35S-P はカリフラワーモザイクウイルスのプロモーターを、NOS-P はノパリン合成酵素プロモーターを、それぞれ示す。同時に、酵母発現ベクターpYES2の GAL1 プロモーターの支配下にENA1遺伝子を挿入したプラスミド pYES2::ENA1を構築した。そして、pYES2::ENA1を導入した *S. cerevisiae* G19株 (Den1-4)を用いて、塩ストレス感受性を指標とした機能的相補性試験を行い、ゲノム PCRによって単離した ENA1 遺伝子が機能的に発現することを確認した(図2)。図2において、5倍希釈の系列で変異株の生育を検討した。

【0053】(タバコ培養細胞の LiCl 感受性) タバコ培養細胞 (BY2 細胞) における Ena1pの機能を解析するには、塩ストレスが細胞に及ぼす影響のうち、高浸透圧ストレスによる影響を抑えて、イオン毒性が特異的に及ぼす細胞への影響を評価することが重要である。そこで本研究では、BY2細胞のイオン毒性に対する感受性を評価するために、塩ストレスとして、NaClよりイオン毒性が数倍強いLiClを使用することにした。なぜなら、LiCl

は低濃度で細胞に対して毒性を示すので、NaClでは無視できない高浸透圧ストレスの影響を抑えることができるからである (Serrano, 1996, Int Rev Cytol, 165, 1-52)。また、植物細胞外のCa<sup>2+</sup>濃度が低くなると、植物細胞の塩ストレス感受性は増大することが知られている (LaHaye and Epstein, 1969, Science, 166, 395-396)。よって、細胞外部のCa<sup>2+</sup>濃度を低くすることで、より低濃度のLiClでイオン毒性に対する細胞の感受性を評価できると考えられた。そこで、形質転換していない野生型 BY2細胞のLiCl感受性と細胞外のCa<sup>2+</sup>濃度の関係を調べ、BY2細胞がLiCl感受性を示す平板培養条件を検討した。その結果、1 mM CaCl<sub>2</sub>および 20 mM LiClを含んだ改良LS平板培地上で BY2細胞はほとんど増殖できないことが示された(図3)。よって、この培地条件下での増殖を調べることにより BY2細胞における Ena1pの機能を解析できると判断した。

【0054】(酵母 ENA1 遺伝子を導入した形質転換タバコ培養細胞の作製) まず、エレクトロポレーション法により、アグロバクテリウム (*A. tumefaciens* EHA105株)へバイナリープラスミド pMSH2::ENA1を導入し、カナマイシンおよびハイグロマイシンに対して耐性を示す形質転換アグロバクテリウム EHA105/pMSH2::ENA1 を選抜した。続いて、BY2細胞にアグロバクテリウム EHA105/pMSH2::ENA1 を感染させ、ENA1遺伝子を BY2細胞へ導入した。そして、カナマイシン耐性およびハイグロマイシン耐性の表現型を示した形質転換 BY2細胞を 42 クローン選抜した。

【0055】そして、選抜した42クローンを1 mM CaCl<sub>2</sub>および 120 mM LiClを含んだ改良LS平板培地上へ移植して4週間培養し、顕著なLiCl耐性を示すクローンを再選抜した。その結果、全42クローンのうち、顕著なLiCl耐性を示した 2クローン (ENA1-1, -2) を得た(図4A)。対照として、GUS遺伝子を導入した形質転換 BY2細胞50クローンについても、同様に1 mM CaCl<sub>2</sub>および 20 mM LiClを含んだ改良LS平板培地上へ移植して4週間培養したが、顕著なLiCl耐性を示すクローンは得られなかった(図4B)。平板培地上でLiCl耐性を示した 2クローン (ENA1-1, -2) およびLiCl耐性を示さなかった 1クローン (ENA1-3) について、ゲノム PCRによってENA1遺伝子の導入を確認した(図5)。

【0056】(形質転換タバコ培養細胞内での ENA1 遺伝子の発現) まず、得られたENA1クローンについて、ATA法により調製した全 RNAを用いて、ENA1遺伝子の部分配列をプローブとしたノザン解析を行ったが、シグナルを検出することができなかった。このことから、ENA1クローンでのENA1遺伝子の発現量が非常に少ないことが予想された。そこで、AGPC法によりENA1クローンから全RNAを調製し、ENA1遺伝子全長を増幅するプライマーセットを用いた RT-PCR を行った。その結果、得られたENA1クローンにおいて、ENA1遺伝子が発現していることを確

認した(図6)。

【0057】(形質転換タバコ培養細胞の塩ストレス耐性)得られたENA1クローンを液体培養系に移し、塩ストレス下での増殖を調べた。その結果、1 mM CaCl<sub>2</sub>および120 mM LiCl を含んだ改変LS液体培地中で2週間培養すると、対照のGUSクローンは全く増殖しなかったが、選抜したENA1-1クローンは増殖し、塩ストレス耐性を示した(図7)。同様に、1 mM CaCl<sub>2</sub>および200mM NaClを含んだ改変LS液体培地中で2週間培養すると、対照のGUSクローンは全く増殖しなかったが、選抜したENA1-1クローンは増殖し、塩ストレス耐性を示した。ただし、ENA1遺伝子が発現していなかったENA1-2クローンは、LiClストレスの非存在下で継代培養を続けている間に、LiCl耐性を示さなくなった。

【0058】(HAエピトープ融合Ena1pタンパク質の作製)酵母のEna1pがBY2細胞で機能するためには、生成したEna1pがBY2細胞の原形質膜上に局在することが重要である。タンパク質の局在性を調べるための有効な手法として、直接的に目的タンパク質の抗体を作製するのではなく、目的タンパク質に短いポリペプチドからなるエピトープを融合したタンパク質を作製し、目的タンパク質ではなくエピトープに特異的な抗体を利用するエピトープタギングが挙げられる。これまでに、酵母細胞内でEna1pのC末端に1個のHA(hemagglutinin)エピトープを融合したEna1p-HAは、Ena1pと同様にNa<sup>+</sup>/Li<sup>+</sup>-ATPaseとして機能し、原形質膜上に局在することが示されており、Ena1pの解析にHAエピトープが利用できることが明らかにされた(Wieland et al., 1995, EMBO J, 14, 3870-3882)。

【0059】そこで本研究では、BY2細胞内でのEna1pの生成と局在を解析するために、HAエピトープを利用することにした。ENA1クローンにおけるENA1遺伝子の発現解析を行った知見から、BY2細胞内で生成しているEna1pのタンパク質量が少ないことが予想されたので、HAエピトープを融合したEna1pの検出感度を向上させるために、HAエピトープを3回繰り返した3HAエピトープカセットを作製した。そして、Ena1pのC末端に3個のHAエピトープを融合したEna1p-3HAをコードしたENA1-3HA遺伝子を設計した(図8)。図8において、HAカセットの塩基配列及びアミノ酸配列(図8A)、及びEna1pと3個HAの1から13の推定膜貫通ドメイン(図8B)を示す。

【0060】まず、酵母細胞内でEna1p-3HAが生成し、機能しているのかを調べるため、pYES2::ENA1-3HAを構築した(図9)。図9において、GAL1-proはGAL1プロモーターを、CYC1-TTはCYC1転写終結因子を、3HAはトリプルHAカセットを、それぞれ示す。そして、構築したpYES2::ENA1-3HAを*S. cerevisiae* G19株(en1-4)へ導入した。その結果、酵母細胞内でEna1p-3HAは、Ena1pと同様に機能することが示された。さらに、ガラスビ

ーズ法によって、平板YPG培地上で増殖した酵母細胞から膜画分を粗調製し、SDS-PAGEおよびanti-HA抗体によるウエスタン解析を行った。その結果、pYES2::ENA1-3HAを導入したクローンでのみ、酵母細胞内で生成したEna1p-3HAのシグナルが検出された(図10)。図10において、左側にSDS-PAGEの結果を、右側に抗HA抗体を用いたウエスタンプロットの結果を示す。

【0061】(HAエピトープを融合したENA1-3HA遺伝子を導入した形質転換タバコ培養細胞の作製)BY2細胞内におけるEna1p-3HAの生成および局在を調べるため、バイナリープラスミドpMS2::ENA1-3HAを構築した(図11)。図11において、AはHAエピトープをつけたpMS2::ENA1-3HAを、BはコントロールであるGUSを導入したプラスミドを示す。それらのプラスミドを、エレクトロポレーション法により、アグロバクテリウム(*A. tumefaciens* EHA105株)へ導入し、カナマイシンに耐性を示す形質転換アグロバクテリウムEHA105/pMS2::ENA1-3HAを選抜した。続いて、BY2細胞にアグロバクテリウムEHA105/pMS2::ENA1-3HAを感染させ、ENA1-3HA遺伝子をBY2細胞へ導入した。そして、カナマイシン耐性の表現型を示した形質転換BY2細胞を16クローン選抜した。

【0062】さらに、任意に選択した形質転換BY2細胞6クローンから膜画分を粗調製し、SDS-PAGEおよびanti-HA抗体によるウエスタン解析を行った。その結果、ENA1-3HA遺伝子を導入したクローンでのみ、対照のGUS遺伝子を導入したクローンには存在しないBY2細胞内で生成したEna1p-3HAのシグナルが検出された(図12)。図12において、左側にSDS-PAGEの結果を、右側に抗HA抗体を用いたウエスタンプロットの結果を示す。

【0063】(タバコ培養細胞におけるEna1p-3HAの局在性)形質転換BY2細胞内で生成したEna1p-3HAの細胞内局在性を調べるため、間接蛍光抗体法によって形質転換BY2細胞を蛍光抗体染色した。共焦点レーザー顕微鏡を用いて、蛍光抗体染色した形質転換BY2細胞を観察したところ、対照のGUSクローンは全体的に薄く蛍光を発しており、若干核や原形質膜にシグナルが検出されたのに対し、ENA1-3HAクローンでは強い蛍光により原形質膜の輪郭がはっきりと認識できた(図13)。図13においてAはEna1p-3HAを発現させた細胞の共焦点顕微鏡の写真を、BはコントロールであるGUS遺伝子を発現させた細胞の共焦点顕微鏡の写真を示す。また、左側には抗HA抗体により可視化した写真を示す。この結果により、BY2細胞内で生成したEna1p-3HAは原形質膜に局在し、毒性カチオンNa<sup>+</sup>/Li<sup>+</sup>を細胞外へ排出するポンプとして機能していることが示唆された。

【0064】上記の実施例により、タバコ培養細胞で酵母由来のENA1遺伝子が発現し、LiClに対する耐性が付与されたことが示された。これまで通常の植物を海水相当

の3%NaClで生育可能にした例はなかったが、本発明により、タバコ細胞に120mMのLiClに対する耐性が付与された。リチウムイオンより数倍から十倍毒性が低いナトリウムイオンの場合は、500-1000mMに耐性を持つ事が十分期待される。尚、海水のナトリウムイオン濃度は約500mMである。植物に耐塩性を付与するには、ナトリウムイオン耐性と共に浸透圧耐性も必要であるが、浸透圧に関しては植物自身がプロリンの様な浸透圧保護物質を作る能力を有する。また、遺伝子導入により、積極的に適

合溶質を植物につくらせることも可能である。

【0065】

【発明の効果】本発明において、出芽酵母由来のナトリウムイオン排出ポンプ遺伝子であるENA1を導入することにより、イオン毒性耐性を付与した形質転換植物細胞が与えられた。当該形質転換植物細胞は、海水並の塩ストレスで生育が可能である。

【0066】

【配列表】

< 1 1 0 > 出願人氏名：奈良先端科学技術大学院大学長

< 1 2 0 > 発明の名称：リチウムイオン又はナトリウムイオン排出機能を付与した形質転換植物細胞

< 1 6 0 > 配列の数：1

< 2 1 0 > 配列番号：1

< 2 1 1 > 配列の長さ：3 2 7 6

< 2 1 2 > 配列の型：核酸

< 2 1 3 > 起源：Saccharomyces cerevisiae

< 4 0 0 > 配列

ATGGCGAAG GAACTACTAA GGAAAACAAT AATGCAGAAT TCAATGCTTA	50
TCACACGCTG ACTGCAGAAG AAGCCGCTGA ATTCATAGGC ACAAGTCTAA	100
CTGAAGGTTT GACCCAAGAT GAGTTCGTCC ACAGATTGAA AACAGTGGGT	150
GAGAACACAT TGGGTGATGA CACTAAAATT GATTACAAGG CAATGGTCCT	200
CCATCAGGTA TGTAATGCCA TGATCATGGT CCTTCTAATA TCCATGATAA	250
TCTCGTTTGC CATGCATGAT TGGATTACTG GTGGCGTTAT TTCTTTTGTT	300
ATCGCGGTCA ATGTGCTCAT TGGCCTAGTT CAAGAATATA AGGCTACCAA	350
GACAATGAAC TCTTTGAAAA ACTTGAGCTC TCCAATGCT CATGTTATTA	400
GGAACGGGAA AAGTGAGACT ATAACTCAA AAGATGTGGT TCCAGGTGAT	450
ATTTGTCTGG TGAAGGTCGG TGATACTATT CCTGCTGATT TCGGTTAAT	500
TGAAACTAAG AATTTTGATA CTGATGAATC ACTACTGACC GGTGAATCTT	550
TGCCTGTCTC CAAAGACGCC AACTTAGTGT TTGGAAAAGA AGAAGAAACC	600
TCCGTGGGTG ATCGTTTGAA TTTAGCATTT TCTTCATCCG CCGTTGTCAA	650
GGGAAGAGCC AAGGGTATTG TCATCAAGAC AGCTTTGAAT AGTGAAATTG	700
GTAAAATTGC AAAATCTCTA CAAGGTGATT CAGGTCTCAT TTCCCGCGAT	750
CCTAGTAAGT CGTGTTTACA GAATACATGG ATATCTACAA AGAAAGTTAC	800
TGGTGCATTT TTAGGTACAA ATGTCGGTAC GCCCTGCAC AGGAAACTGT	850
CTAAGTTGGC GGTATTGCTT TTCTGGATTG CCGTACTTTT TGCTATCATC	900
GTCATGGCCT CTCAAAGTT TGACGTAGAT AAAAGGGTAG CTATCTATGC	950
CATTTGTGTG GCCCTATCCA TGATTCCCTC TTCATTAGTC GTTGTCTTGA	1000
CCATCACCAT GTCTGTTGGG GCTGCTGTTA TGGTTTCTAG AAACGTTATT	1050
GTAAGAAAAT TAGATTCTCT GGAAGCTTTA GGTGCCGTTA ACGATATCTG	1100
TTCTGACAAG ACCGGTACTC TTACACAGGG TAAAATGTTA GCGAGGCAAA	1150
TTTGGATCCC TCGCTTTGGT ACCATAACTA TCTCGAATTC TGATGACCCC	1200
TTTAATCCCA ATGAGGGCAA CGTGAGTTTG ATTCCAAGGT TTTCACCTTA	1250
CGAATATTCT CATAATGAGG ATGGTGACGT TGGTATTCTC CAGAATTTCA	1300
AGGATCGCCT ATACGAAAAA GATTTACCAG AAGATATTGA CATGGATCTA	1350
TTTCAAAAAT GGCTCGAAAC CGCCACTTTG GCTAACATTG CTAATGTTTT	1400
CAAAGATGAC GCAACTGACT GTTGAAAAGC TCATGGTGAC CCAACAGAAA	1450
TTGCGATTCA AGTGTTTGCT ACTAAGATGG ACTTGCCCTA CAATGCCCTT	1500
ACCGGTGAGA AATCGACTAA TCAAAGTAAT GAGAATGACC AATCCTCTCT	1550
TTCACAACAC AATGAGAAGC CTGGCAGTGC ACAATTGCAA CATATTGCTG	1600

AATTCCCATT CGACTCAACT GTGAAGCGAA TGTCATCTGT CTAACAAC 1650  
 AATCACAACG AACATATAA TATTTATGGC AAGGGTGCTT TCGAAAGCAT 1700  
 CATCAGTTGT TGCAGTTCTT GGTATGGTAA GGATGGTGA AAAATCACAC 1750  
 CATTGACCGA TTGTGATGTC GAAACGATAA GGAAAAATGT TTACAGTCTA 1800  
 TCAAATGAGG GTTTAAGAGT CTTGGGTTTT GCCTCCAAAT CTTTCACTAA 1850  
 AGATCAAGTG AATGACGATC AATTGAAAAA CATTACTTCA AACAGGGCCA 1900  
 CCGCAGAAAG TGATTTAGTT TTCCTAGGGT TGATTGGTAT TTACGATCCA 1950  
 CCCAGAAATG AGACTGCCGG TGCAGTCAAG AAGTTTCACC AAGCTGGTAT 2000  
 TAACGTTTAT ATGTTAACTG GGGACTTTGT GGGTACAGCA AAGGCTATCG 2050  
 CTCAGGAGGT TGGCATCTTA CCCACCAATT TGTACCATTA CTCCAAGAG 2100  
 ATTGTTGACA GTATGGTCAT GACCGGATCT CAGTTTGACG GACTAAGTGA 2150  
 GGAGGAAGTG GACGATTTGC CCGTCTTACC TTTAGTTATT GCACGTTGCT 2200  
 CTCCGCAGAG TAAGGTGAGA ATGATCGAAG CTTTACACCG TAGGAAGAAG 2250  
 TTCTGCACAA TGACAGGTGA CGGTGTTAAC GATTCTCCAT CTCTAAAAAT 2300  
 GGCCAAATGTT GGTATTGCAA TGGGTATTAA TGGTTCAGAT GTTTCCAAAG 2350  
 AAGCGTCTGA TATTGTTCTA AGCGATGACA ATTTTGTCTC TATTTTGAAT 2400  
 GCTGTGCAAG AAGGTCGTAG GATGACGGAT AACATTGAGA AGTTTGTCTC 2450  
 ACAATTATTG GCAGAAAAATG TTGCTCAGGC TTTGTATTG ATCATTGGTT 2500  
 TAGTATTGAG AGATGAGAAC GGAAAAATCAG TATTTCCCTT ATCACCAGTG 2550  
 GAAGTATTGT GGATTATTGT CGTCACCTCT TGTTCCTGCT CTATGGGGCT 2600  
 AGGTCTAGAA AAGGCTGCTC CAGATTTGAT GGATAGACCT CCTCATGATT 2650  
 CAGAGGTTGG TATTTTCACG TGGGAGGTTA TTATAGATAC ATTTGCATAT 2700  
 GGGATTATAA TGACAGGGTC CTGTATGGCT TCATTTACTG GATCACTGTA 2750  
 TGAATAAAT AGTGGTAGAT TGGGGCACGA TTGTGATGGC ACCTATAACA 2800  
 GCAGTTGTCG TGATGTTTAT AGATCACGTT CTGCGGCTTT CGCAACCATG 2850  
 ACGTGGTGCG CTTTGATTCT GGCTTGGGAA GTGGTTGACA TGAGAAGATC 2900  
 CTTTTCAGA ATGCATCCAG AACTGACAG CCCAGTCAAG GAATTTTCA 2950  
 GAAGCATTTG GGGAAACCAG TTTTGTCTT GGTCAATCAT TTTTGGATT 3000  
 GTGTCAGCCT TCCCCTCGT CTATATCCG GTTATTAATG ATAAAGTGTT 3050  
 TTTGCATAAA CCAATTGGTG CTGAATGGGG TCTCGCCATT GCATTCACAA 3100  
 TTGATTCTG GATAGGTGCT GAACTTTACA AGTGTGGAAA GAGGCGCTAT 3150  
 TTCAAACCTC AGAGAGCGCA CAACCCGGAG AATGATTTGG AGAGTAACAA 3200  
 TAAGCGCGAT CCATTCGAAG CGTATAGTAC TTCTACTACA ATCCATACAG 3250  
 AAGTTAATAT TGGTATTAAT CAATGA 3276

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、ENA1の機能的相補性試験を示す写真である。

【図2】 図2は、バイナリープラスミドpMSH2::ENA1の構築を示す模式図である。

【図3】 図3は、1mM及び3mMのCaCl<sub>2</sub>の存在下での、タバコ培養細胞のLiCl耐性を示す写真である。

【図4】 図4は、LiCl耐性を示すENA1クローンの選抜を示す写真である。

【図5】 図5は、ゲノムPCRによる、ENA1クローンの確認を示すアガロースゲル電気泳動の写真である。

【図6】 図6は、RT-PCRによる、ENA1クローンの確認を示すアガロースゲル電気泳動の写真である。

【図7】 図7は、1mMのCaCl<sub>2</sub>及び120mMのCaCl<sub>2</sub>を含む改変LS培地中における、ENA1を導入したタバコ細胞

の生育を示す写真である。

【図8】 図8は、3HAエピトープカセットの構成を示す図である。

【図9】 図9は、pYES2::ENA1-3HAプラスミドの構築を示す模式図である。

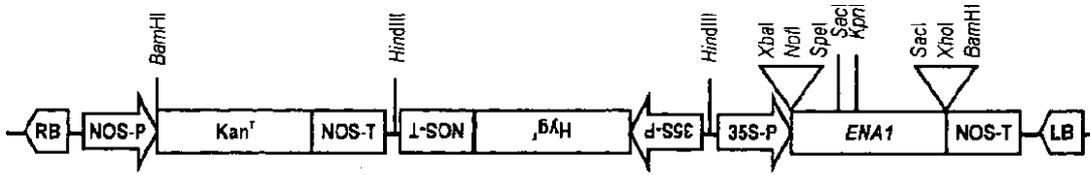
【図10】 図10は、酵母細胞の膜画分においてEna1p-3HA融合蛋白質の存在を示す、SDS-PAGE及びプロテインゲルの写真である。

【図11】 図11は、pMS2::ENA1-3HAプラスミドと、コントロールであるpMS1::GUSの構築を示す模式図である。

【図12】 図12は、形質転換したBY2細胞の膜画分においてEna1p-3HA融合蛋白質の存在を示す、SDS-PAGE及びプロテインゲルの写真である。

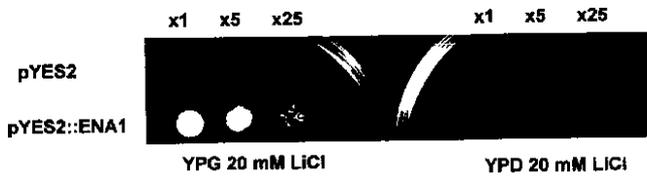
【図13】 図13は、BY2細胞におけるEna1pの局在を示す、共焦点レーザー顕微鏡の写真である。

【図1】

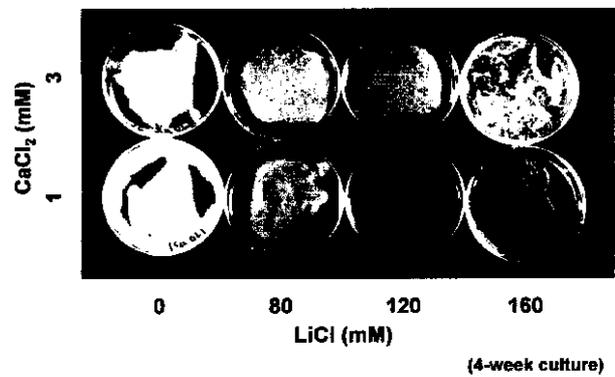


### pMSH2::ENA1

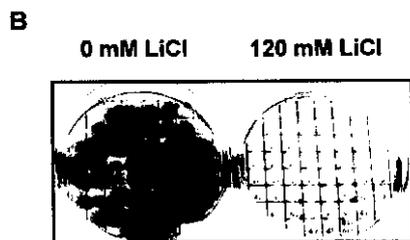
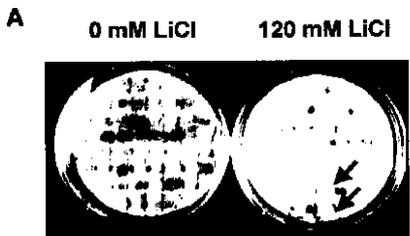
【図2】



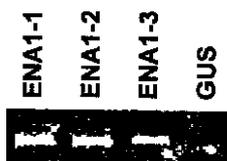
【図3】



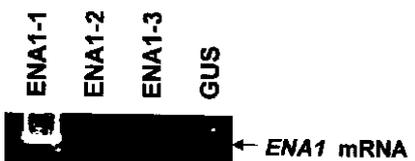
【図4】



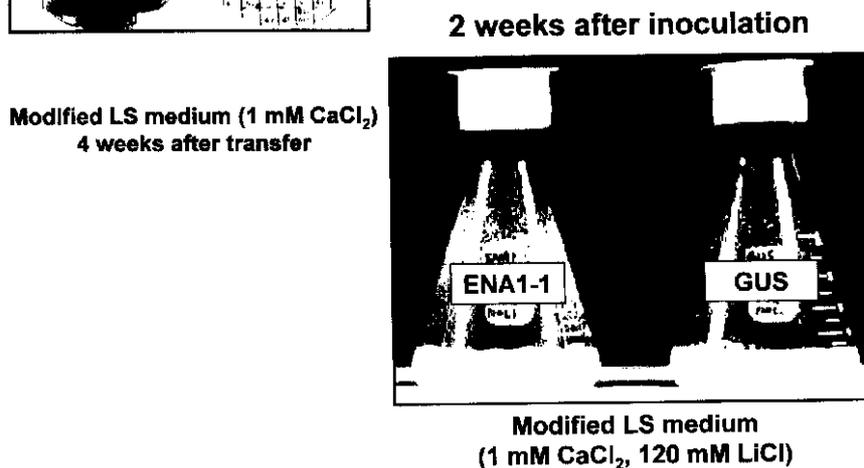
【図5】



【図6】

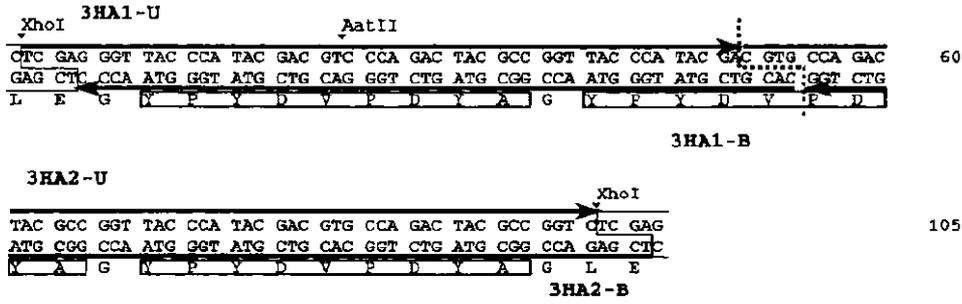


【図7】

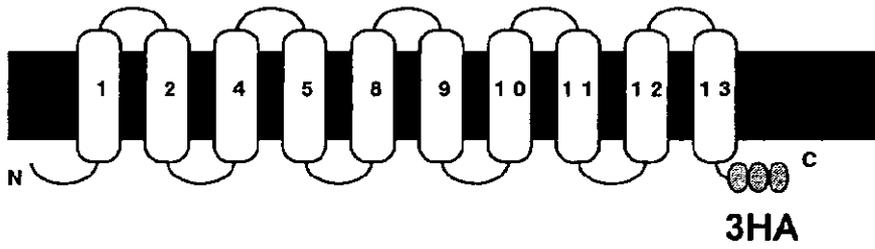


【図8】

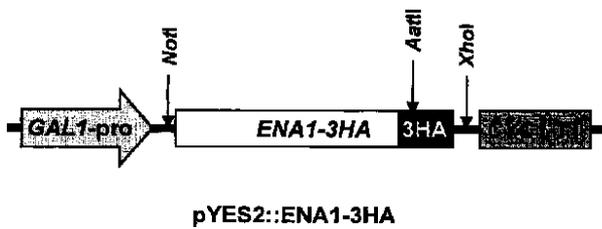
A



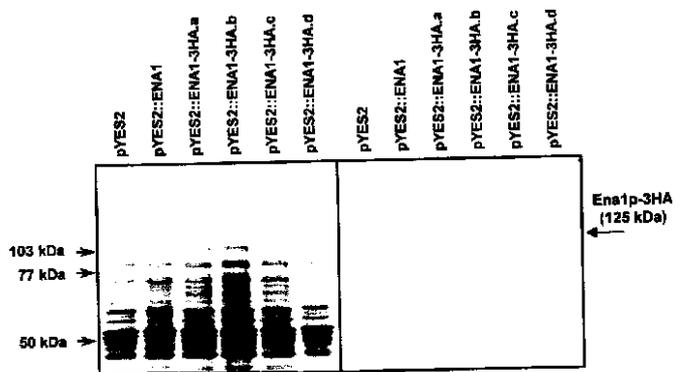
B



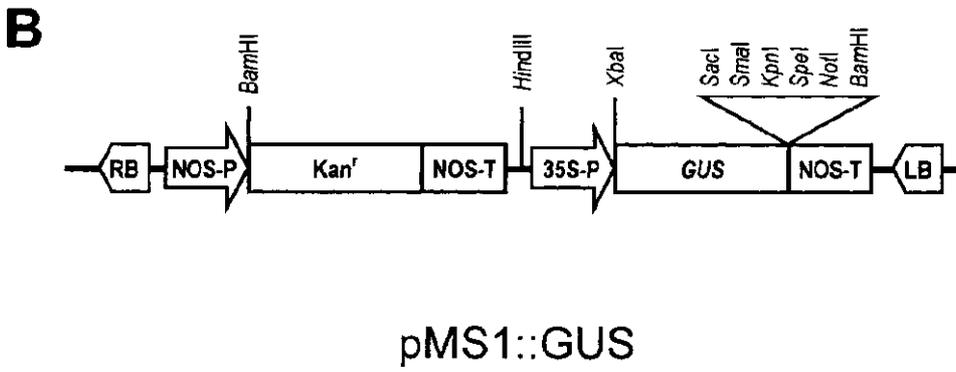
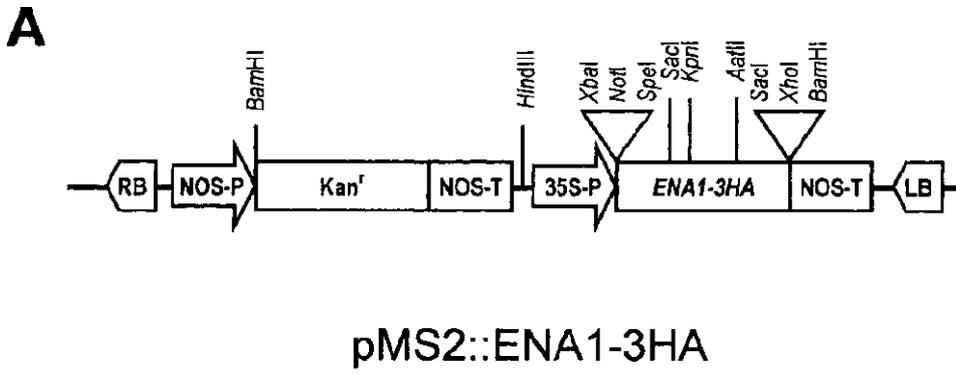
【図9】



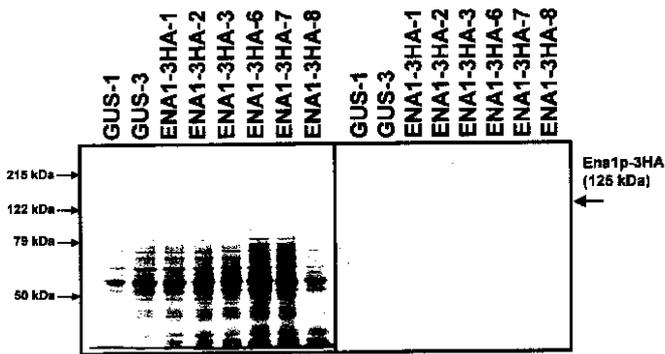
【図10】



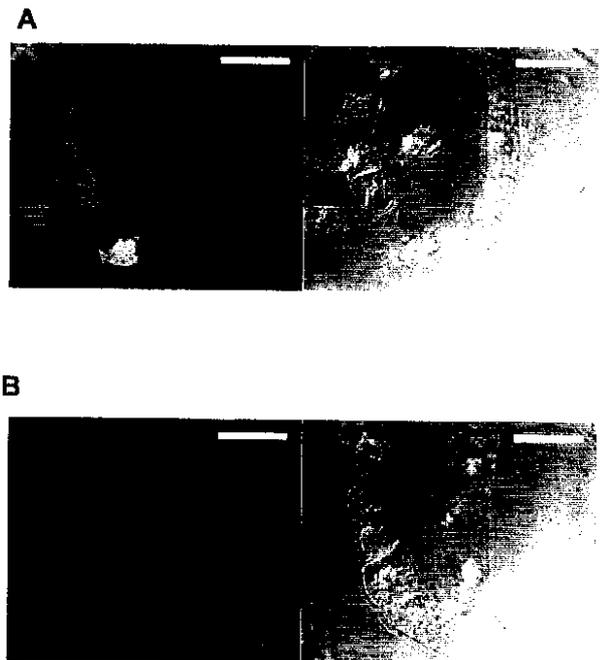
【図11】



【図12】



【図13】



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.7	識別記号	F I
(C 1 2 N 15/09	Z N A	
C 1 2 R 1:865)		

(56)参考文献 特開2000 - 50874 ( J P , A )  
 特開2000 - 157287 ( J P , A )  
 特表 平 5 - 500900 ( J P , A )  
 国際公開01 / 033945 ( W O , A 1 )  
 F E B S L e t t e r s , 1991年,  
 V o l . 291 , N o . 2 , p . 189 -  
 191  
 P r o c . N a t l . A c a d .  
 S c i . U S A , 1999年 , V o l .  
 96 , p . 1480 - 1485  
 P r o c . N a t l . A c a d .  
 S c i . U S A , 1992年 , V o l .  
 89 , p . 1775 - 1779

(58)調査した分野(Int.Cl.7, D B名)  
 C12N 15/00 - 15/90  
 C12N 5/00 - 5/14  
 A01H 1/00,5/00  
 J S T P l u s ( J O I S )  
 B I O S I S / W P I ( D I A L O G )  
 P u b M e d