

(19)日本国特許庁 (J P)

(12)特許公報 (B 2)

(11)特許番号

特許第3331367号

(P 3 3 3 1 3 6 7)

(45)発行日 平成14年10月7日(2002.10.7)

(24)登録日 平成14年7月26日(2002.7.26)

(51)Int.Cl.⁷

識別記号

F I

A01H 5/00

A01H 5/00

A

1/00

1/00

A

C07K 14/415

C07K 14/415

C12N 5/10

C12N 5/00

C

請求項の数 8 (全14頁)

(21)出願番号 特願平10 - 8056

(22)出願日 平成10年1月19日(1998.1.19)

(65)公開番号 特開平10 - 309142

(43)公開日 平成10年11月24日(1998.11.24)

審査請求日 平成10年1月30日(1998.1.30)

審査番号 平11 - 9638

審査請求日 平成11年6月14日(1999.6.14)

(31)優先権主張番号 特願平9 - 56743

(32)優先日 平成9年3月11日(1997.3.11)

(33)優先権主張国 日本 (J P)

(73)特許権者 501167644
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 大橋 祐子
茨城県つくば市観音台2丁目1-2 農
林水産省 農業生物資源研究所内

(72)発明者 光原 一朗
茨城県つくば市観音台2丁目1-2 農
林水産省 農業生物資源研究所内

(72)発明者 カマル エイ . マリク
茨城県つくば市観音台2丁目1-2 農
林水産省 農業生物資源研究所内

(74)代理人 100078282
弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】細胞死抑制遺伝子が導入されたストレス抵抗性植物およびその作出方法

1

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】細胞死抑制遺伝子が導入されたストレス抵抗性植物であって、ここで該細胞死抑制遺伝子が B c 1 - 2 ファミリーに属する遺伝子であって、細胞死抑制活性を有するペプチドをコードする遺伝子である、ストレス抵抗性植物。

【請求項2】前記細胞死抑制遺伝子が線虫の c e d - 9 遺伝子である、請求項1に記載のストレス抵抗性植物。

【請求項3】前記細胞死抑制遺伝子がヒト b c 1 - x 遺伝子である、請求項1に記載のストレス抵抗性植物。

【請求項4】前記ストレスが UV である、請求項1ないし3のいずれかの項に記載のストレス抵抗性植物。

【請求項5】前記ストレスがスーパーオキシド発生型

2

除草剤である、請求項1ないし3のいずれかの項に記載のストレス抵抗性植物。

【請求項6】前記ストレスが塩ストレスである、請求項1ないし3のいずれかの項に記載のストレス抵抗性植物。

【請求項7】細胞死抑制遺伝子を植物細胞に導入する工程であって、ここで該細胞死抑制遺伝子が B c 1 - 2 ファミリーに属する遺伝子であって、細胞死抑制活性を有するペプチドをコードする遺伝子である、工程；および該遺伝子が導入された植物細胞を植物体に再生する工程を含む、ストレス抵抗性植物の作出方法。

【請求項8】前記細胞死抑制遺伝子が植物発現ベクターに組み込まれている、請求項7に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ストレス抵抗性植物およびその作出方法に関する。さらに詳しくは、細胞死抑制遺伝子を植物に導入することにより、ストレス抵抗性植物を育種することに関する。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】現在、多細胞生物においては、プログラムされた細胞死 (Programmed Cell Death、以下、PCDという) の研究が盛んに行われている。このPCDは、生物の個体発生、恒常性の維持、環境ストレスへの対応などに必須のものであると理解されている。このPCDについては、線虫、ショウジョウバエ、哺乳動物について研究されている (例えば、三浦ら、細胞工学 vol.14 No.2:145-153, (1995))。そして、例えば、線虫においては、いくつかの細胞死遺伝子 (例えば、ced-3、ced-4など) および細胞死抑制遺伝子 (例えば、ced-9など) が明らかになってきた。この細胞死抑制遺伝子は、細胞死遺伝子の活性を負に調節して、ランダムな細胞死を抑制していると考えられている。

【 0 0 0 3 】哺乳動物において発見されたbcl-2遺伝子によりコードされるタンパク質 (Bcl-2タンパク質) は、多くの系統の細胞 (リンパ系、神経系、生殖系、および上皮系の細胞) において細胞死を抑制する活性を示すタンパク質である。これまでに、さまざまな処理により誘導される細胞死が、Bcl-2を過剰発現することによって抑制されることが知られている (例えば、恵口ら、実験医学、vol.13、No.16、18-23 (1995))。

【 0 0 0 4 】近年、多くのBcl-2関連タンパク質およびBcl-2結合タンパク質をコードする遺伝子が報告されており、これらは、Bcl-2ファミリーとして分類されている。Bcl-2ファミリーに属する遺伝子としては、例えば、哺乳動物由来のbcl-2、bax、bcl-xL、bcl-xS、bad、bak、Al、およびMcl-1遺伝子、線虫由来のced-9、ならびにウイルス由来のBHRF1遺伝子 (Epstein-Barr virus由来) およびLMW5-HL遺伝子 (African Swine Fever virus由来) が挙げられる (高山、実験医学、vol.13、No.16、24-31 (1995))。一般に、Bcl-2ファミリーの間の塩基配列レベルでの同一性および類似性は非常に低く、さらにアミノ酸レベルでも低いことが、当該分野において知られている。例えば、Bax とBcl-2との間で、同一性は約21%であり、および類似性は43%である (山本、実験医学別冊、細胞内シグナル伝達、羊土社)。

【 0 0 0 5 】高等植物のPCDに関しては、研究の緒にいたばかりである (福田ら、化学と生物、34:586-594, 1996を参照)。植物は、常に厳しいストレス (例えば、ウイルスや細菌の感染、UVの照射、除草剤による過酸化物の生成など) に曝されており、これに対応するために、例えば、ウイルス感染に対しては、過敏反応を起こし、感染部位周辺細胞を自殺させて感染の拡大を防止するなどのPCDが起こる。この植物のPCDにも、細胞死遺伝子と細胞死抑制遺伝子とが関連していることが考えら

れる。

【 0 0 0 6 】ところで、細胞死抑制遺伝子は、ストレスなどで生じる細胞死に対して、負の調節 (つまり、細胞死を防ぐ) を行うと考えられていることから、ストレスに対して抵抗性を示すと考えられる。従って、植物の育種に際して、細胞死抑制遺伝子を機能させることにより、植物はストレスに対して抵抗性を得ると考えられる。特に、植物に環境ストレスに対する抵抗性を付与することは、農業の分野において重要な課題である。現在、オゾン層が破壊され、その結果、紫外線 (UV-B) の照射を受ける量が10年で約6.8%ずつの割合で増加していることを考えると、植物に対する影響も大きいといわざるを得ない。

【 0 0 0 7 】しかし、細胞死抑制遺伝子を用いて、UVなどの環境ストレスに対して抵抗性を獲得するという研究は全くなされていないのが現状である。

【 0 0 0 8 】

【発明が解決しようとする課題】本発明は上記の問題を解決するためのものであり、その目的とするところは、PCDに関連する遺伝子を植物に導入することにより、種々のストレスに対して抵抗性の植物を提供することである。本発明は、さらに、PCDに関連する遺伝子が導入された、ストレスに対して抵抗性を有する植物を育種する方法を提供する。

【 0 0 0 9 】

【課題を解決するための手段】本発明は、細胞死抑制遺伝子が導入されたストレス抵抗性植物に関する。この細胞死抑制遺伝子は、公知の遺伝子組換え技術により、植物細胞中のDNAに組み込まれて存在する。なお、植物細胞中のDNAとは、染色体のみならず、植物細胞中に含まれる各種オルガネラ (例えば、ミトコンドリア、葉緑体など) に含まれるDNAを含む。

【 0 0 1 0 】好適な実施態様においては、上記の細胞死抑制遺伝子がBcl-2ファミリーに属する遺伝子であって、細胞死抑制活性を有するペプチドをコードする遺伝子である。

【 0 0 1 1 】好適な実施態様においては、上記の細胞死抑制遺伝子が線虫のced-9遺伝子、またはヒトbcl-xL遺伝子である。

【 0 0 1 2 】好適な実施態様においては、上記のストレスがUV、スーパーオキシド発生型除草剤、または塩ストレスである。

【 0 0 1 3 】また、本発明は、細胞死抑制遺伝子を植物細胞に導入する工程、および該遺伝子が導入された植物細胞を植物体に再生する工程を含む、ストレス抵抗性植物の作出方法に関する。

【 0 0 1 4 】好適な実施態様においては、上記の細胞死抑制遺伝子が植物発現ベクターに組み込まれている。

【 0 0 1 5 】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳しく説明する。

【 0 0 1 6 】「細胞死抑制遺伝子」は、PCDに対して抑制的に作用する遺伝子をいい、多細胞生物の遺伝子であれば、植物、動物などの起源を問わない。細胞死抑制遺伝子としては、動物起源のものが好ましい。例えば、細胞死抑制遺伝子は、線虫(例えば、*Caenorhabditis elegans* : *C.elegans*)、ヒトを含む哺乳動物から由来し得る。細胞死抑制遺伝子としては、例えば、Bcl-2ファミリーに属する細胞死抑制遺伝子である、線虫*C.elegans*のced-9遺伝子、哺乳動物(例えば、ヒト、マウス、チキンなど)のbcl-2遺伝子、およびヒトのbcl-xL遺伝子など(三浦ら、上記の文献)が挙げられる。

【 0 0 1 7 】本発明においては、公知の細胞死抑制遺伝子を使用され得る。好ましい細胞死抑制遺伝子には、Bcl-2ファミリーに属する細胞死抑制遺伝子(例えば、ced-9遺伝子およびbcl-xL遺伝子)が含まれる。

【 0 0 1 8 】公知の細胞死抑制遺伝子またはその断片をプローブとして得ることができる、種々の多細胞生物の遺伝子ライブラリー由来の、これらの遺伝子と相同性を有する遺伝子もまた細胞死抑制遺伝子として使用され得る。このような目的で、例えば、植物の遺伝子ライブラリー、線虫遺伝子ライブラリー、およびヒト遺伝子ライブラリーが使用され得る。ライブラリーをスクリーニングするためのストリンジентな条件は、当業者により適宜選択される。ここで、「相同性を有する遺伝子」とは、ある細胞死抑制遺伝子とアミノ酸レベルで比較したとき、特定の領域について保存性が高い遺伝子をいう。保存性が高いとは、例えば、同質アミノ酸を含めたアミノ酸レベルでの相同性が約40%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは80%以上、およびさらに好ましくは90%以上であることをいう。

【 0 0 1 9 】Bcl-2ファミリーに属する遺伝子は、アミノ酸レベルで保存性が高い領域を有する。この保存性が高い領域として、BH1およびBH2領域があり、さらに、N末端側にも保存性が高い領域(BH3領域)が存在し得ることが知られている。これらの領域は、異種(ヒト、マウス、ラット、ニワトリ)のBcl-2ファミリー間でも進化的に保存されている(高山、上記の文献; および太田ら、実験医学、vol.13、No.16、32-37(1995))。このBH1、BH2、およびBH3領域の全てを含むタンパク質は、特に、単独でアポトーシスを抑制し得ることが知られている(高山、上記の文献)。

【 0 0 2 0 】したがって、「Bcl-2ファミリーに属する遺伝子」とは、Bcl-2ファミリーに属する公知の細胞死抑制遺伝子およびこれらと相同性を有する遺伝子をいう。この相同性を有する遺伝子としては、BH1、BH2、およびBH3からなる群から選択される少なくとも1つの領域を含むタンパク質をコードする遺伝子、より好ましくは、BH1、BH2、およびBH3からなる群から選択される少なくとも2つの領域を含むタンパク質をコードする遺伝子、さらにより好ましくはBH1とBH2領域とを含むタンパ

ク質をコードする遺伝子、ならびに最も好ましくは、BH1、BH2、およびBH3領域の全てを含むタンパク質をコードする遺伝子が意図される。

【 0 0 2 1 】このような保存性が高い領域の検索は、目的の遺伝子によりコードされるアミノ酸配列と公知のBcl-2ファミリータンパク質のアミノ酸配列とを、市販のコンピューター解析ソフト(Gene Works (Intelligenetics, Inc.))を使用してアラインメントすることにより容易に行われ得、それによりこれらの領域が同定され得る。

【 0 0 2 2 】得られた遺伝子の細胞死抑制活性は、三浦ら(上記の文献)の文献に記載の方法で確認され得る。具体的には、培地から血清を除くことによって細胞死が誘導されることが知られているRat1細胞(Kumar, S.R., Genes Dev. 8, 1613-1626 (1994))に遺伝子を導入し、組換えRat1細胞において培地から血清を除いた4日後の細胞死の割合が有意に抑制されている場合には、この遺伝子は細胞死抑制活性を有する。得られた遺伝子の細胞死抑制活性はまた、患口ら(上記の文献)の文献に記載の方法によっても確認され得る。具体的には、酸素濃度100ppm以下の低酸素条件(アポトーシスを誘導する条件)下で48時間培養すると約半数の細胞が細胞死を起こすことが知られているラットPheochromocytoma株PC12に、目的の遺伝子を形質転換する。約 10^5 個の細胞を6cmディッシュに巻き込み、低酸素チャンパーに入れ、例えば、BBL GasPac Plus (Becton Dickinson)を用いて低酸素状態にする。酸素濃度が100ppmに下がった時間を0時間として経時的にトリパンブルーにより生存細胞数を定量する。細胞死の割合が有意に抑制されている場合には、この遺伝子は細胞死抑制活性を有する。したがって、「細胞死抑制活性を有する遺伝子」とは、上記の方法またはこれらと同等の方法を用いたとき、その少なくとも1つによって細胞死抑制活性を有することが確認される遺伝子をいう。

【 0 0 2 3 】公知の細胞死抑制遺伝子と相同性を有する遺伝子をスクリーニングするための遺伝子ライブラリーの作製法、プローブとのハイブリダイゼーションに使用するストリンジентな条件、および遺伝子のクローニング法は当業者に周知である。例えば、マニアティスらのMolecular Cloning, A Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989)を参照のこと。

【 0 0 2 4 】ced-9遺伝子は、まず、線虫*C.elegans*から全RNAを単離し、ced-9の全長cDNAをRT-PCRにより単離することによってスクリーニングし得る。プライマーとして、5'-TTGAATTCGAGATGACACGCTGCACGGCGG-3'(配列番号: 1)が好適に用いられ得る。第一鎖cDNAをmRNAから合成し、次いで、配列番号1のプライマーと5'-GGGAATTCGTTACTTCAAGCTGAACATCAT-3'(配列番号: 2)とを用いて、PCRを行い、目的のcDNAが得られる。bcl-xL遺伝子

も、同様にして適切なプライマーを用いることによって、単離され得る。PCRは、市販のキットおよび装置の製造者の指針に基づいて行うか、当業者に周知の方法で行い得る。

【 0 0 2 5 】得られた動物または他の起源由来の細胞死抑制遺伝子は、適切な植物発現ベクターに連結され、植物に導入され得る。細胞死抑制遺伝子はまた、核酸の直接的な取り込みによる形質転換法（例えば、エレクトロポレーション、パーティクルガン、リン酸カルシウム法、およびポリエチレングリコール（PEG）法）を使用して導入され得る。

【 0 0 2 6 】「植物」は、単子葉植物および双子葉植物のいずれも含む。特に好ましい植物としては、タバコ、ピーマン、ナス、メロン、トマト、サツマイモ、キャベツ、ネギ、ブロッコリー、ニンジン、キウリ、柑橘類、白菜、レタス、モモ、イネ、ジャガイモ、オオムギ、コムギおよびリンゴが挙げられる。また、特に他で示さない限り、植物は、植物体、植物器官、植物組織、植物細胞、および種子のいずれをも意味する。植物器官の例としては、根、葉、茎、および花などが挙げられる。植物細胞の例としては、カルスおよび懸濁培養細胞が挙げられる。

【 0 0 2 7 】「植物発現ベクター」は、細胞死抑制遺伝子の発現を調節するプロモーターなどの種々の調節エレメントが宿主植物の細胞中で作動し得る状態で連結されている核酸配列をいう。好適には、植物遺伝子プロモーター、ターミネーター、薬剤耐性遺伝子および、エンハンサーを含み得る。植物発現ベクターのタイプおよび使用される調節エレメントの種類が、宿主細胞に応じて変わり得ることは、当業者に周知の事項である。本発明に用いる植物発現ベクターはさらに T - D N A 領域を有し得る。T - D N A 領域は、特にアグロバクテリウムを用いて植物を形質転換する場合に遺伝子の導入の効率を高める。

【 0 0 2 8 】「植物遺伝子プロモーター」は、植物で発現するプロモーターを意味する。例えば、タバコの感染特異的タンパク質 PR1a のプロモーター（以下、タバコ PR1a プロモーターという）などのある種のストレスにより発現が誘導されるプロモーター、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35S プロモーター、ノパリン合成酵素のプロモーター (P nos) などが挙げられるがこれらに限定されない。

【 0 0 2 9 】「ターミネーター」は、遺伝子のタンパク質をコードする領域の下流に位置し、DNA が mRNA に転写される際の転写の終結、ポリ A 配列の付加に関する配列である。ターミネーターは、mRNA の安定性に関して遺伝子の発現量に影響を及ぼすことが知られている。ターミネーターとしては、CaMV35S ターミネーター、ノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター (T nos)、タバコ PR1a 遺伝子のターミネーターが挙げられるが、これに

限定されない。

【 0 0 3 0 】「薬剤耐性遺伝子」は、形質転換植物の選抜を容易にするものであることが望ましく、カナマイシン耐性を付与するためのネオマイシンフォスフトランスフェレース II (NPT II) 遺伝子、およびハイグロマイシン耐性を付与するためのハイグロマイシンフォスフトランスフェレース遺伝子などが好適に用いられ得る。

【 0 0 3 1 】薬剤耐性遺伝子を発現させるプロモーターの例としては、上記植物遺伝子プロモーター、例えば、E12 プロモーター、タバコ PR1a プロモーター、CaMV35S プロモーター、ノパリン合成プロモーターなどが挙げられるがこれらに限定されない。好適には、構成的に高発現する E12 プロモーターが用いられ得る。この E12 プロモーターは、CaMV35S プロモーターのエンハンサー領域 (En35S : -417 ~ -90) が 2 つタンデムに並び、その下流に CaMV35S プロモーターならびにタバコモザイクウイルスの領域 (Gene 217 : 217, (1987)) の配列を有している (特開平 7-250685 号公報のプラスミド pST10 参照)。この E12 プロモーターは、CaMV35S プロモーターと比較して、10-20 倍活性が高い。

【 0 0 3 2 】「エンハンサー」は、目的遺伝子の発現効率を高めるために用いられ得る。エンハンサーとしては、CaMV35S プロモーター内の上流側の配列を含むエンハンサー領域が好適である。エンハンサーは複数個用いられ得る。

【 0 0 3 3 】植物発現ベクターの構築に用いるベクターとしては、pBI 系のベクター、pUC 系のベクターあるいは pTRA 系のベクターが好適に用いられ得る。

【 0 0 3 4 】pBI 系および pTRA 系のベクターは、アグロバクテリウムを介して植物に目的の遺伝子を導入し得る。pBI 系のバイナリーベクターまたは中間ベクター系が好適に用いられ得る。例えば、pBI121、pBI101、pBI101.2、pBI101.3 などが挙げられる。これらのベクターは、植物に導入され得る領域 (T-領域) の遺伝子と、マーカ遺伝子として植物プロモーターの支配下で発現される NPT 2 遺伝子 (カナマイシン耐性を付与する) とを含む。

【 0 0 3 5 】pUC 系のベクターは、植物に遺伝子を直接導入し得る。例えば、pUC18、pUC19、pUC9 などが挙げられる。

【 0 0 3 6 】本発明の植物発現ベクターは、当業者に周知の遺伝子組換え技術を用いて作製され得る。好適には、上記ベクターのプロモーター下流に動物由来の細胞死抑制遺伝子が組み込まれ得る。

【 0 0 3 7 】植物細胞への植物発現ベクターの導入には、当業者に周知の方法、例えば、アグロバクテリウムを介する方法および直接細胞に導入する方法、が用いられ得る。アグロバクテリウムを介する方法としては、例えば、Nagel らの方法 (FEMS Microbiol. Lett., 67, 325 (1990)) が用いられ得る。この方法は、まず、例えば植

物発現ベクターでエレクトロポレーションによってアグロバクテリウムを形質転換し、次いで、形質転換されたアグロバクテリウムをPlant Molecular Biology Manual (S. B. Gelvin et al., Academic Press Publishers) に記載の方法で植物細胞に導入する方法である。植物発現ベクター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、遺伝子銃法などがある。これらの方法は、当該分野において周知であり、形質転換する植物に適した方法が、当業者により適宜選択され得る。

【0038】植物発現ベクターを導入された細胞は、まずカナマイシン耐性などの薬剤耐性で選択される。次いで、常法により、植物組織、植物器官および/または植物体に再生され得る。さらに、植物体から種子が取得され得る。

【0039】形質転換植物に細胞死抑制遺伝子が導入されたか否かは、プライマーを用いるPCRで確認され得る。例えば、ノパリン合成酵素のターミネーターを含む植物発現ベクターによって線虫ced-9遺伝子を導入した場合には、5'-CCTCTCGTTTACACATCGC-3' (配列番号: 3) を、ヒトbcl-xL遺伝子を導入した場合には、5'-ACAAGGAGATGCAGG-3' (配列番号: 4) を5'側のプライマーとし、そして、ノパリン合成酵素のターミネーターの5'-AGACCGCAACAGGATTCAA-3' (配列番号: 5) を3'側のプライマーとして用い、PCRを行い得る。得られたPCR産物をアガロースゲル上で電気泳動して、コントロールと同じ移動度を示すDNAが増幅され得るか否かにより、目的の遺伝子の存在が確認され得る。

【0040】導入された細胞死抑制遺伝子の発現の確認には、当業者に周知の方法が用いられ得る。この確認は、例えば、ノーザンブロット解析を用いて行い得る。具体的には、植物の葉から全RNAを抽出し、アガロースホルムアルデヒドゲルでの電気泳動の後、適切なメンブランにブロットし、導入遺伝子に対応するDNA、例えば、ced-9もしくはbcl-xLのcDNAまたはその断片をハイブリダイズプローブとして、目的とするmRNAを検出し得る。

【0041】植物における動物または他の起源由来の細胞死抑制遺伝子産物の発現の確認には、当業者に周知の方法(例えば、ウエスタンブロットング)が用いられ得る。例えば、形質転換植物からタンパク質を抽出し、Leammlira、Nature 227:680-685(1970)に記載のように、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)で抽出したタンパク質を分離し、目的とするタンパク質に対する抗体と反応させて、生じるバンドを免疫化学的に検出することによって、その発現が確認され得る。ヒトbcl-xL遺伝子の産物の発現を検出する場合には、葉から抽出したタンパク質をSDS-PAGEで分離し、メンブランに転写した後、ヒトbcl-xLタンパク質に対するモノクローナル抗体とインキュベートする。次いで、例えば、メンブランをアルカリホスファターゼ結合抗ウサギIgG抗体

と反応させて、BCIP(5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate)およびNBT(Nitroblue tetrazolium)を基質として発色させて、遺伝子産物の発現を検出し得る。

【0042】形質転換植物のストレス抵抗性は、UV処理に対する抵抗性、スーパーオキシド発生型除草剤(例えば、パラコート(商品名)(1,1-dimethyl-4,4-bipyridiniumdichloride))処理に対する抵抗性、および/または塩ストレスに対する抵抗性として検出され得る。

【0043】UV照射処理は、代表的には、UV-Bを用いて行い得る。UV-B処理は、東芝UV-Bランプ(東芝FK-208E)を用いて行い得る。水平に位置した二本のUVランプを20cm離れたものを1セットとして、2セット用意する。このUV-Bランプから照射される紫外線の波長は、大部分がUV-B(290-320nm)であり、残りはUV-C(260-280nm)およびUV-A(340-360nm)である。290nmより短い波長は、セルローズジアセテートフィルターでカットし得る。UV-Bと草冠との距離は適切なUV-B照射量となるように調整し得る。UV-B照射は白色光で補足し($100 \mu\text{mol}^{-2} \text{S}^{-1}$ 、16時間照射期間/日)、すべてのUV-B光測定は、白色光の存在下にて測定する。照射強度は、Spectrolinedigital radio meter (Spectronic Corporation, Westbury, NY)で測定し、NIST標準で校正し得る。

【0044】スーパーオキシド発生型除草剤としては、パラコート(商品名)が挙げられる。除草剤処理は、除草剤溶液中に円形に切り取った葉を浸漬し、24時間光照射する。

【0045】UV-B処理は、照射された葉表面の異常光沢または葉のしおれ、さらには枯死が非形質転換株に比べて抑制されているときは、UV-B抵抗性があるとする。また、UV-B処理または除草剤処理後の形質転換植物の葉の色の退色が、非形質転換株に比べて抑制されているときは、UV-B抵抗性または除草剤抵抗性があるとする。

【0046】UV-B処理あるいは除草剤処理効果の別の測定法として、クロロフィル含量測定が挙げられる。一定期間の処理を行い、その直後にN,N-ジメチルホルムアミドでクロロフィルを抽出して、分光光度計で測定する。形質転換株と非形質転換株とのクロロフィル含量を測定して、形質転換株のクロロフィル含量が高ければ、抵抗性があるとする。

【0047】高塩濃度は、対象となる植物の正常な生育を妨げる濃度である。塩ストレスとは、このような高塩濃度の生育環境に植物が曝されることをいう。高塩濃度の範囲は、当業者に周知であり、例えば、0.1Mまたは0.2MのNaCl濃度を有する溶液における耐性が、耐塩性の指標とされる。

【0048】塩ストレスに対する抵抗性は、植物の芽生え、および草丈30~40cmに生育した植物に、食塩水を吸わせるなど高塩濃度を有する環境におき、形質転換植物とコントロールの植物との間の重量の変化および観察され得る形態学的変化(例えば、葉の黄化および白変化の

程度、ならびに離層形成の程度)の差異を比較することにより試験し得る。塩ストレス環境に曝露した後の形質転換植物の、重量の変化および観察され得る形態学的変化が、コントロールの植物に比べて抑制されているときは、形質転換植物は、塩ストレスに対する抵抗性があるとする。

【0049】当業者に明らかなように、形質転換植物におけるストレス抵抗性は、上記の条件と同等な他の条件によっても検出し得る。

【0050】本発明においては、形質転換植物が、UV処理に対する抵抗性、スーパーオキシド発生型除草剤に対する抵抗性、および塩ストレスに対する抵抗性の少なくとも1つについて抵抗性である場合に、ストレス抵抗性植物という。

【0051】

【実施例】以下実施例を挙げて本発明を具体的に説明する。この実施例で使用した制限酵素、プラスミドなどは商業的な供給源から入手可能である。

【0052】(実施例1:植物発現ベクターの調製)バイナリーベクターpBE2113(図1)を植物発現ベクターの出発材料として用いた。このベクターは、特開平7-250685号公報に記載されているように、薬剤耐性遺伝子領域(Pnos、NPTIIおよびTnos)を有するバイナリーベクターpBI121(Clontech社製)を出発材料とし、プロモーター領域配列E12を組み込んだものである。

【0053】(実施例2:動物由来細胞死抑制遺伝子の単離と植物発現ベクターの構築)線虫*C.elegans*から、TRIsol(Life Technologies, Inc)を用いて全RNAを単離した。mRNAから第一鎖cDNAを合成した。次いで、ced-9の全長cDNAを、5'-TTGAATTCGAGATGACACGCTGCACGGCGG-3'(配列番号:1)を用いて、RT-PCRを行って合成した。次に、配列番号1のプライマーを5'側のプライマーとして、および、5'-GGGAATTCGTTACTTCAAGCTGAACATCAT-3'(配列番号:2)を3'側のプライマーとして用い、Pfuポリメラーゼ(Stratagene社製)を用いて、PCRを行った。DNAを94、1.5分間変性させ、55、2.5分間アニールさせ、次いで、72、2分間の伸長反応を行った。このサイクルを25回行った。PCR産物を、pBluscriptのEcoRI部位にクローン化し、プラスミドpM61を得た。

【0054】他方で、ヒトcDNAライブラリー(Clontech社製)から、5'側のプライマーとして、5'-ATGTCTCAGAGCAACCGGGAGCTGGTGGTT-3'(配列番号:6)を、3'側のプ

ライマーとして、5'-TCATTTCCGACTGAAGAGTGAGCCCAGCAG-3'(配列番号:7)を用いて、PCRにより、ヒト*bcl-xL*遺伝子を単離した。PCRの条件は上記と同じである。単離した全長のヒト*bcl-xL* cDNAをpBluscriptのEcoRI部位にクローン化し、プラスミドpM21を得た。pM21のSalI部位、あるいはpM61のHindIII部位をリンカーを接続することによりBglIIIに変え、生じたプラスミドをそれぞれ、pM21-BglおよびpM61-Bglと名付けた。pM21-BglのBglIII-SacIフラグメントまたはpM61-BglのBglIII-SacIフラグメントを単離し、pBE2113のE12の下流にクローン化した。ヒト*bcl-xL*遺伝子を有するベクターをpM65、線虫*ced-9*遺伝子を有するベクターをpM66と命名した。図2に発現ベクターpM65およびpM66を示す。

【0055】(実施例3:発現ベクターのタバコへの導入)

(*Agrobacterium tumefaciens*の形質転換)*Agrobacterium tumefaciens*を250 μg/mlのストレプトマイシンと50 μg/mlのリファンピシンを含む培地中、28℃で培養しNa gelら(上記の文献)の方法に従って、細胞培養液を調製し、発現ベクター(pM65またはpM66)をエレクトロポレーションにより上記細菌に導入した。

【0056】なお、CaMV35SプロモーターにGUS(グルクロニダーゼ)遺伝子を接続したプラスミド(35S-GUS)、およびCaMV35SプロモーターにPOX(イネパーオキシダーゼ)遺伝子(伊藤ら、Plant Cell Reports 13:361-366(1994))を接続したプラスミド(35S-POX)を用いて、同様に形質転換を行い、形質転換効率を比較した。

【0057】(タバコの形質転換)上記方法でプラスミドpM65またはpM66で形質転換された*Agrobacterium*を得、YEB培地(DNA cloning第2巻78頁)で振とう培養した後、滅菌水で20倍に希釈し、タバコ(*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN)の葉片を共存培養した。2~3日後、抗生物質を含む培地で上記細菌を除去し、2週間ごとに選択培地で継代し、形質転換したタバコ細胞を選抜し、常法により再生させた結果、ヒト*bcl-xL*遺伝子(pM65)を有するカナマイシン耐性の20個体、および線虫*ced-9*遺伝子(pM66)を有するカナマイシン耐性の29個体の独立した形質転換個体を得た。また、プラスミド(35S-GUS)では20個体、プラスミド(35S-POX)では、47個体がカナマイシン耐性であった。結果を表1に示す。

【0058】

【表1】

10

20

30

40

	カナマイシン 抵抗性個体数	目的の遺伝子を 有する個体数	割合 (%)
M65形質転換体 (E12Ω-bcl-xL)	20	20	100
M66形質転換体 (E12Ω-ced-9)	29	28	97
コントロール形質転換体 (35S-GUS)	20	14	70
コントロール形質転換体 (35S-POX)	47	34	73

()内は導入遺伝子を示す

【0059】細胞死抑制遺伝子が導入された形質転換体は、非常に高率(97%以上)で目的の遺伝子(bcl-xLまたはced-9)を有していた。この結果は、後述するPCRでも確認された。一方、細胞死抑制遺伝子が導入されていない形質転換体は、70%程度しか目的の遺伝子(GUSまたはPOX)を含んでいなかった。このことは、細胞死抑制遺伝子が導入された細胞は、生存に有利であることを示している。

【0060】(実施例4:PCR法による形質転換株の確認)線虫ced-9遺伝子(pM66)を導入したタバコ形質転換株から常法により全RNAを抽出し、mRNAからcDNAを合成した。次いで、5'-CCTCTTCGTTTACACATCGC-3'(配列番号:3)を、5'側のプライマーとして、そして、ノバリン合成酵素のターミネーターの配列5'-AGACCGCAACAGGATTCAA-3'(配列番号:5)を3'側のプライマーとして用いてRT-PCRを行った。PCR条件は、実施例2と同じであった。得られたPCR産物をアガロースゲル上で電気泳動し、コントロールと同じ移動度を有するDNA断片が増幅され得るか否かを観察した。結果を図3に示す。形質転換株における導入遺伝子の存在が確認された。

【0061】(実施例5:形質転換植物における細胞死抑制遺伝子産物の発現の検出)ヒトbcl-xL遺伝子産物の発現をウエスタンブロットングで確認した。ヒトbcl-xL遺伝子(pM65)を有する形質転換タバコSamsun NNおよび野生型のSamsun NN植物それぞれの葉から採取した直径約7mmの葉片4枚あたり、20μlの125mM Tris-HCl(pH 6.8)(0.1% SDS、20% グリセリン、28mM 2-メルカプトエタノール、10μg/ml プロモフェノールブルーを含む)で磨砕し、16,000rpmで10分間遠心を行い、上清をタンパク質画分として回収した。このタンパク質画分を12.5%のSDS-PAGEにかけ、Immobilion-Pメンブラン(Millipore社製)に転写した後、ヒトbcl-xLタンパク質に対するウサギポリクローナル抗体(MBL社製)とインキュベートした。このメンブランを洗浄し、アルカリホスファターゼ結合抗ウサギIgG抗体(1:1000、KPLラボラトリー社製)と反応させ、BCIPおよびNBTを基質として発色させた。結果を図4に示す。形質転換株におけるヒトbcl-xL

タンパク質の発現が確認された。

【0062】(実施例6:形質転換植物におけるノーザンブロットングによるRNAの検出)ced-9遺伝子の組換え植物での発現をノーザンブロットングにより確認した。常法により、再生したタバコの葉から全RNAを抽出し、アガロースホルムアルデヒドゲルでの電気泳動の後、Hybond-Nメンブラン(Amersham社製)にブロットし、導入遺伝子に対応するDNA、例えば、ced-9もしくはbcl-xLのcDNAをハイブリダイズプローブとして、目的とするmRNAを検出した。結果を図5に示す。形質転換株における導入遺伝子の発現が確認された。

【0063】(実施例7:形質転換植物におけるUV抵抗性の獲得)実施例6の方法によって、細胞死抑制遺伝子の発現が確認された形質転換タバコの中から、ヒトbcl-xL遺伝子を有する品種(M65-21)、および線虫ced-9遺伝子を有する品種(M66-30)を選択し、UV抵抗性の検討を行った。UV照射処理は、東芝UV-Bランプを用いて、上述した条件で行った。

【0064】まず、野生型タバコ株に、フィルターをかけたUV-B、およびフィルターをかけていないUV-Bを照射したところ、フィルターをかけたUV(290-360nm)を照射したときよりも、直接UV(260-360nm)を照射したときの方がUVに対する感受性が高いことがわかり、UV-CがUV-Bの有害な効果を増強すると考えられた。

【0065】フィルターをかけていないUV-Bを用いて、M65-21(bcl-xL)、M66-30(ced-9)および野生株の自殖次世代植物の、播種後4週目の葉、12週目の葉片、および幼若苗を処理した。形質転換タバコおよび野生型タバコ株(コントロール)を10日間、UV-B(25kJ/m²)に曝した。処理の4日目または5日目には、視覚的に何の変化もみられなかった。野生型は7日目あるいは8日目には、しおれ、最終的には枯死したが、形質転換株M65-21(bcl-xL)およびM66-30(ced-9)は変化を示さないか、やや形態的に損傷を受けているように見える程度であった。図6に結果を示す。図6aは、播種後4週目の葉および12週目の葉片を10日間UV-B処理したものである。図6bは、幼若苗を10日間、UV-B照射したものである。こ

20

30

40

50

の結果は、形質転換株はUV-Bに対して抵抗性を獲得していることを示しており、自然界におけるUV照射に対しても抵抗性を獲得することが期待される。

【0066】(実施例8：形質転換植物におけるクロロフィルの分解阻害効果) 実施例7と同様に、フィルターをかけていないUV-Bを用いて、M65-21(bcl-xL)、M66-30(ced-9)および野生株の12週目の葉片を、10日間、UV-B (32kJ/m²) に曝した。UV-B処理後に、N,N-ジメチルホルムアミドを用いて処理葉からクロロフィルを抽出して、Borraら(Biochemica et Biophysica Acta 975:384-394(1989))の方法で測定した。すなわち、クロロフィルaは、式： $13.43 \times (663.8\text{nmにおける吸光度}) - 3.47 \times (646.8\text{nmにおける吸光度})$ で、クロロフィルbは式： $2.9 \times (646.8\text{nmの吸光度}) - 5.38 \times (663.8\text{nmにおける吸光度})$ により算出し、クロロフィルa+bの含量を測定した。さらに、UV-B (126kJ/m²) でも処理を行った。この場合、3日目で葉片が褐色化したので、処理は2日間とした。結果を図7に示す。いずれの処理においても、形質転換株M65-21(bcl-xL)およびM66-30(ced-9)では、クロロフィルが分解されずに残存していた。

【0067】(実施例9：形質転換植物におけるパラコート(商品名)耐性) パラコートは、クロロプラスト中でスーパーオキシドとフリーラジカルを発生する除草剤である。形質転換タバコM65-21(bcl-xL)およびM66-30(ced-9)は、ともに、クロロフィル分解に対して抵抗性を示したので、パラコートに対しても抵抗性を有すると考えられた。そこで、0-100 μMのパラコート溶液中に円形に切り取ったタバコ葉片を浸漬し、24時間光照射し、実施例8と同様にして、クロロフィルを抽出して、クロロフィルaの濃度を測定した。結果を図8に示す。形質転換タバコ株M65-21(bcl-xL)およびM66-30(ced-9)は、共に、パラコートに対して抵抗性を示した。

【0068】(実施例10：形質転換タバコにおける耐塩性の獲得) 細胞死抑制遺伝子の発現が確認された形質転換タバコの中から、ヒトbcl-xLを有するM65-21品種、および線虫ced-9遺伝子を有するM66-30品種を選択し、耐塩性を検討した。

【0069】(A) カナマイシン50 μg/mlを含む寒天培地にM65-21-2(M65-21の自殖次世代)の種子、M65-30-3(M65-30の自殖次世代)の種子、およびコントロールとして35S-GUSの種子を播種した。播種の2ヶ月後の芽生えを寒天培地より注意深く抜きとり、根に付着した寒天を洗浄により取り除いた。次いで、それぞれの芽生えを、2.2mlの水、0.1、0.15、0.20M NaCl溶液を含有する、2mlのエペンドルフチューブ(フタは切り取る)に、根が水溶液中に浸るように1本ずつさしてチューブ立てに並べた。これを透明なアクリル製の箱に入れ、25、3000lux(16時間/日)の光照射下において耐塩性の検定を行った。

【0070】またコントロール植物として、非形質転換

タバコ(野性型タバコ株)をカナマイシンを含まない寒天培地に播種して使用することも行った。

【0071】(1) 経時的に、各処理個体の重量を測定することにより、定量的な耐塩性の評価を行った。図9に結果を示す(グラフは5個体の平均値を表す)。

【0072】水処理(0M)の場合でも、移した1日後に芽ばえ植物の重量は減少したが、これは、芽生え植物を密閉したシャーレ中から外気に出してチューブ培養に移したためと考えられた。その後、水処理の芽生え植物の重量は、ゆるやかに増加する傾向がみられた。

【0073】野性型タバコでは、0.1M NaCl処理により明らかに個体重量が減少し、0.2M NaCl処理ではさらに減少した。

【0074】これに対して、形質転換株M65-21-2(bcl-xL)およびM66-30-3(ced-9)では、0.1M NaCl処理による重量減少はほとんど認められず、0.2M NaCl処理によっても重量の減少程度は、野生型株に比べて抑制された。

【0075】(2) 全く同じ条件で、コントロールとして35S-GUS植物を用いた場合も野生型タバコを用いた場合と同様の結果が得られた。処理3日後の芽ばえの状態を撮影した(図10)。35S-GUS植物では高塩濃度下で植物全体に障害が出ており、葉がしおれ、根の生長が止まったのに対して、形質転換タバコではその障害の受け方がコントロール植物に比べて軽微であった。

【0076】(3) この実験において障害を受けた葉の面積を実体顕微鏡下で観察した。図11に、障害を受けた葉の面積の割合を示すグラフを示す。M65-21植物が0.1M NaClによってほとんど影響を受けなかったことを含めて、これらの形質転換タバコがコントロール植物に比べて、耐塩性を有することも示された(図11)。

【0077】(4) (1)~(3)の実験で用いたものと同じ芽生え(播種2ヶ月後の芽生え)を、カナマイシンを含まない寒天培地に移植した。移植3日後に、試験区においては、培地の最終的なNaCl濃度が0.2MになるようにNaCl水溶液を加え(NaCl処理区)、対照区においては代わりに同容量の水を加えて(NaCl非処理区)、その後の植物の生長の様子を観察した。移植の20日後、NaCl非処理区においては、35S-GUS植物および形質転換タバコは両方とも順調に生育し、緑色の葉を展開した(図12右)。一方、NaCl処理区においては、全体に生育が阻害された(図12左)。

【0078】しかし、NaCl処理区において、形質転換タバコは、コントロールの35S-GUS植物に比べて明らかに塩障害の受け方が少なかった。コントロールの植物の葉は全て黄化し、白変化の兆候が観察されたのに対して、形質転換タバコは、20日間の塩処理にも耐性であり、そして緑色を保っている葉が多く観察された。

【0079】(B) 上記に加えて、パーミキュライトで生育させた、草丈30~40cmのタバコ植物の茎を切断し、

NaCl水溶液を茎から吸収させる方法によっても耐塩性を検定した。さらに処理植物の下位葉に含まれるNa⁺およびCl⁻濃度を定量することにより、耐塩性の機構を解析した。

【0080】鉢植えした、野生型タバコならびに形質転換タバコM65-21-2およびM66-30-3の茎を植物体の下部（根より約7cm上）で切断し、茎切断部を下にして300mlの0.2M NaCl水溶液（または、コントロールとして300mlの水）を入れた500ml三角フラスコにつけて、25、3000lux（16時間/日）に9日間保った。9日後、野生型タバコは、葉の黄化が甚だしく、下位葉が水浸状になって離層が形成されやすく落葉する傾向が観察された。これに比較して、形質転換タバコM65-21-2およびM66-30-3は、外見上明らかに、より健全であり、しかも下位葉の離層形成は進行しなかった（図13）。

【0081】これらの植物から下位葉を採集し、葉柄部を含む全葉を蒸留水と共に磨砕し、そして10,000×gにて、15分間、遠心分離した。得られた上澄液について、そのイオン伝導率およびNa⁺およびCl⁻含量を測定した。

【0082】電気伝導度検出器シマツCDD-6Aを用いて、電気伝導度を測定した。上澄液100μlを検出器に注入し、表示された測定値μS/cmをセル定数（25）で割った値を電気伝導度S（シーメンス）とした。

【0083】Na⁺濃度についてはダイオネクス イオンクロマトグラフDX-100を用いるダイオネクスCS12Aカラムにて、Cl⁻濃度についてはダイオネクス イオンクロマト

グラフ2000 i を用いるダイオネクスAS4Aカラムにて定量した。

【0084】イオン伝導率について解析した結果を表2に示す。NaClの代わりに水を吸収させた植物（コントロール）に比べて、0.2M NaClを吸収させた植物の下位葉は、いずれもより高い濃度の電解質を含んでいた。特に野生型タバコ株SNN（2株）では、水を吸収させた場合に比べて、146%および113%の電解質含量の増加が検出された。これに対して形質転換タバコの下位葉に含まれる電解質含量は、野生型タバコSNNに比べて明らかに少なく、水を吸収させた植物が有する元来の電解質含量に比べて、せいぜい37%から78%増加したのみであった。このことから、形質転換タバコは、吸収したNaClを葉組織から何らかの機構で排出しているか、またはもともとNaClを取り込みにくいことが考えられる。

【0085】さらにNa⁺およびCl⁻濃度を測定した結果、コントロールのSNNタバコにおいては、新たに下位葉に蓄積したNa⁺濃度が、水を吸収させた植物の6～8倍にもなったが、形質転換タバコでは、このNa⁺濃度が、かなり低く抑えられ、特にM66植物においては、水を吸収させた植物の2～3倍にしかならないことが明らかになった（表2）。Cl⁻についてもまた、すべてに対して同様の結果が得られた（データは示さず）。

【0086】
【表2】

植物	タンパク質 (mg/gFW)	Na(ppm)		伝導率 (uS)	
		全	コントロールに対する増加	全	コントロールに対する増加
SNN (-NaCl)	7.6	0.76	—	926	—
SNNa (+NaCl)	13.4	6.55	5.79 (7.6倍)	2,274	1,348 (146%)
SNNb (+NaCl)	16.2	5.48	4.72 (6.2倍)	1,974	1,048 (113%)
M65-21a (+NaCl)	15.8	4.33	3.57 (4.7倍)	1,266	340 (37%)
M65-21b (+NaCl)	13.4	4.34	3.58 (4.7倍)	1,545	619 (67%)
M66-30a (+NaCl)	10.4	2.39	1.63 (2.1倍)	1,373	447 (48%)
M66-30b (+NaCl)	14.6	3.38	2.62 (3.4倍)	1,648	722 (78%)

【0087】これらの結果は、動物の細胞死抑制遺伝子産物を過剰発現しているこれらの植物が、過剰なNa⁺およびCl⁻の蓄積を防ぐことにより、耐塩性を示すことを示唆している。

【0088】(6)耐塩性機構をさらに明らかにするために、M65-21植物の葉の細胞内顆粒を分画遠心分離によって単離し、Bcl-xLタンパク質の局在性を調べた。図14にウェスタンブロット解析による結果を示す。

【0089】これらの結果から、タンパク質レベルでミトコンドリア画分にこのタンパク質の大部分が局在することが明らかになった。

【0090】動物においては、これら細胞死抑制遺伝子産物が、ミトコンドリア膜に存在し、そしてミトコンド

リアの機能障害を防ぐことにより、細胞死を抑制していると考えられている。本実施例で得られた実験結果は、植物においても動物由来の細胞死抑制タンパク質が機能し、UV耐性およびパラコート耐性のみならず耐塩性をも付与することを示している。その機構としては、ミトコンドリアなどの細胞内顆粒のストレス処理による機能障害の保護などが考えられる。

【0091】

【発明の効果】細胞死抑制遺伝子が導入された植物は、UVに対する抵抗性、スーパーオキシド発生型除草剤に対する抵抗性、および塩ストレスに対する抵抗性を獲得し得る。本発明により、種々のストレスに対して抵抗性を有する農業上および育種上有用な植物が提供される。さ

らにストレス抵抗性を植物に付与する方法が提供される。

【 0 0 9 2 】

【配列表】

配列番号： 1

配列

TTGAATTCGA GATGACACGC TGCACGGCGG

30

【 0 0 9 3 】配列番号： 2

配列の長さ： 30

配列の型：核酸

10

配列：

GGGAATTCGT TACTTCAAGC TGAACATCAT

30

【 0 0 9 4 】配列番号： 3

配列の長さ： 20

配列の型：核酸

配列：

CCTCTTCGTT TACACATCGC

20

【 0 0 9 5 】配列番号： 4

配列の長さ： 15

配列の型：核酸

20

配列：

ACAAGGAGAT GCAGG

15

【 0 0 9 6 】配列番号： 5

配列の長さ： 20

配列の型：核酸

配列：

AGACCGGCAA CAGGATTCAA

20

【 0 0 9 7 】配列番号： 6

配列の長さ： 30

配列の型：核酸

30

配列

ATGTCTCAGA GCAACCGGGA GCTGGTGGTT

30

【 0 0 9 8 】配列番号： 7

配列の長さ： 30

配列の型：核酸

配列：

TCATTTCCGA CTGAAGAGTG AGCCCAGCAG

30

【図面の簡単な説明】

【図 1】 出発ベクターpBE2113の構造を示す図である。

40

【図 2】 ヒトbcl-xL遺伝子を有するプラスミド(pM65)および線虫ced-9遺伝子を有するプラスミド(pM66)の模式図である。

【図 3】 形質転換植物(M66)における導入遺伝子の存在を確認したRT-PCRの結果を示す電気泳動写真である。Cはコントロールを示し、そして上部の各番号は形質転換植物の個体番号を示す。

【図 4】 動物の細胞死抑制遺伝子が導入された植物(M65)におけるヒトbcl-xL遺伝子産物の発現を、ウエスタンブロット解析の結果を示す電気泳動写真である。

50

配列の長さ： 30

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：プライマー

トポロジー：直鎖状

配列の種類：プライマー

トポロジー：直鎖状

配列の種類：プライマー

トポロジー：直鎖状

配列の種類：プライマー

トポロジー：直鎖状

配列の種類：プライマー

トポロジー：直鎖状

配列の種類：プライマー

トポロジー：直鎖状

配列の種類：プライマー

抗体として、抗bcl-xL抗体を使用した。Cはコントロールを示し、そして上部の各番号は形質転換植物の個体番号を示す。

【図 5】 形質転換植物(M66)において線虫ced-9遺伝子が発現していることを確認したノーザンブロット解析の結果を示す電気泳動写真である。Cはコントロールを示し、そして上部の各番号は形質転換植物の個体番号を示す。

【図 6】 動物の細胞死抑制遺伝子が導入された植物がUV抵抗性を獲得したことを示す生物の形態を示す写真である。図6aは、4週目の葉および12週目のUV処理した葉片を示し、図6bは、10日間UV-B処理した幼若苗を示す。

【図 7】 動物の細胞死抑制遺伝子が導入された植物の

クロロフィル含量がUV照射後も減少しにくいことを示す図である。

【図 8】 動物の細胞死抑制遺伝子が導入された植物が、パラコート耐性を獲得したことを示す図である。

【図 9】 動物の細胞死抑制遺伝子が導入された植物 (M65-21およびM66-30)、および野生型タバコの塩ストレス下における重量変化を示す図である。

【図 10】 各塩濃度での処理 3 日後の、動物の細胞死抑制遺伝子が導入された植物 (M65-21およびM66-30) および35S-GUS植物の芽生えの状態を示す生物の形態を示す、生物の形態を示す写真である。

【図 11】 動物の細胞死抑制遺伝子が導入された植物 (M65-21およびM66-30)、および35S-GUS植物 (コントロール) の、障害を受けた葉面積の割合を示す図である。

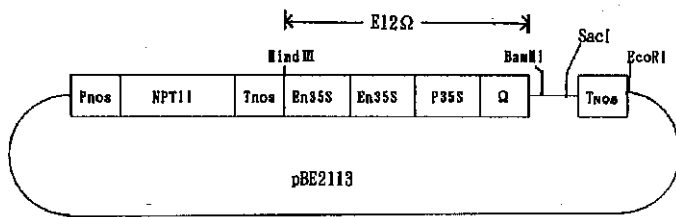
【図 12】 芽生えの移植20日目後の、動物の細胞死抑

制遺伝子が導入された植物 (M65-21およびM66-30) および35S-GUS植物の塩ストレス (0.2M NaCl) 下における状態を示す、生物の形態を示す写真である。コントロールとして、塩の代わりに水を加えたものを用いた。動物の細胞死抑制遺伝子が導入された植物が、耐塩性を獲得したことが示される。

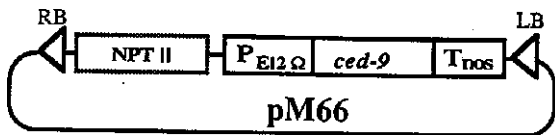
【図 13】 鉢植えした野生型植物 (コントロール) および動物の細胞死抑制遺伝子が導入された植物 (M65-21 およびM66-30) の茎を切断し、0.2M NaClの環境下に置いた、9 日後の各植物の状態を示す、生物の形態を示す写真である。動物の細胞死抑制遺伝子が導入された植物が、耐塩性を獲得したことが示される。

【図 14】 形質転換植物の細胞内における、Bcl-xLタンパク質の局在性を確認した、ウエスタンブロット解析の結果を示す電気泳動写真である。Bcl-xLタンパク質が、ミトコンドリア画分に局在することが示される。

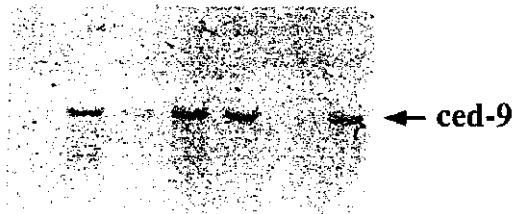
【図 1】



【図 5】



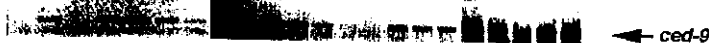
C 5 6 11 18 13 30



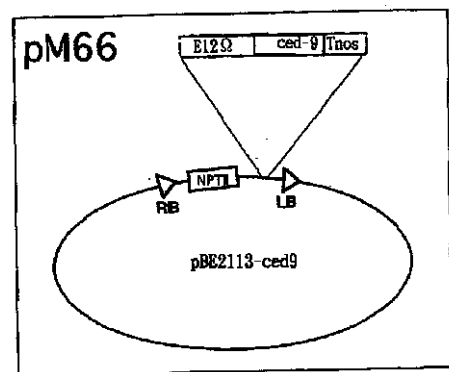
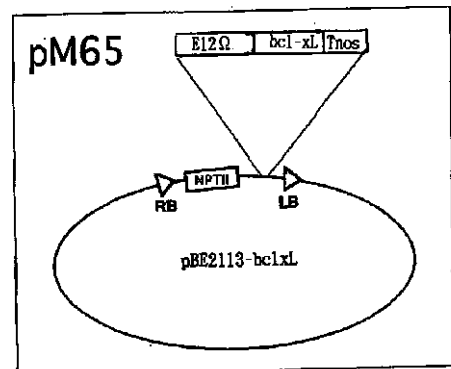
【図 3】

M66植物

C 22 23 30 31 32 33 6 8 9 10 11 12 14 21 25 E 13 15 17 18 19 20



【図 2】

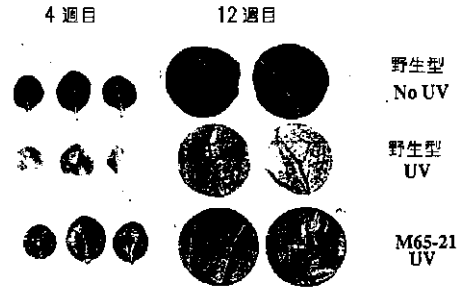
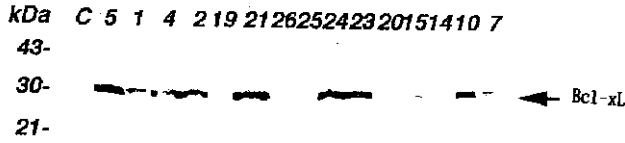


【 図 4 】

【 図 6 】

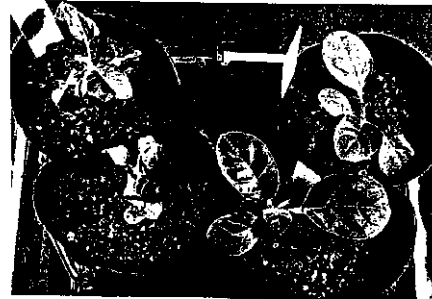
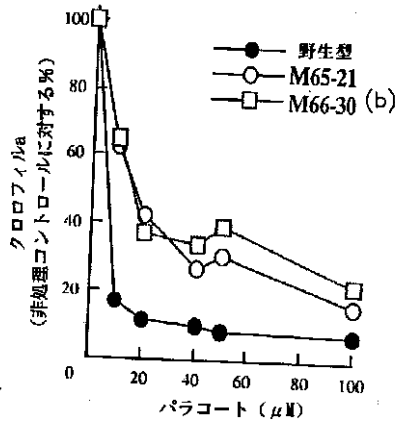
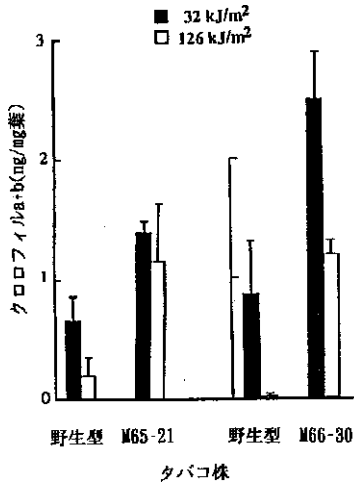
M65植物

(a)

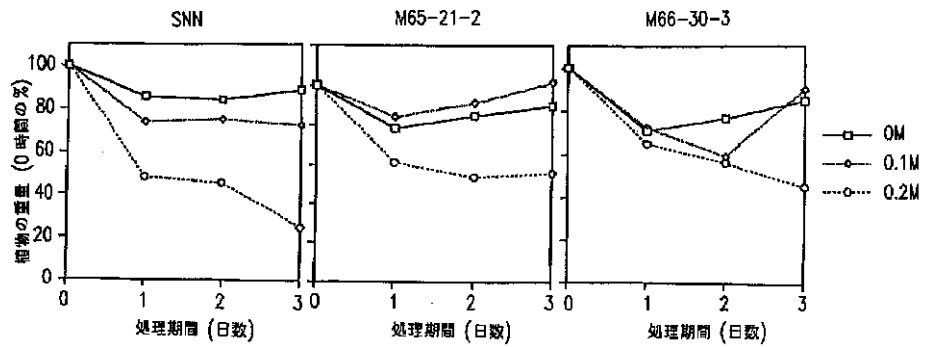


【 図 7 】

【 図 8 】

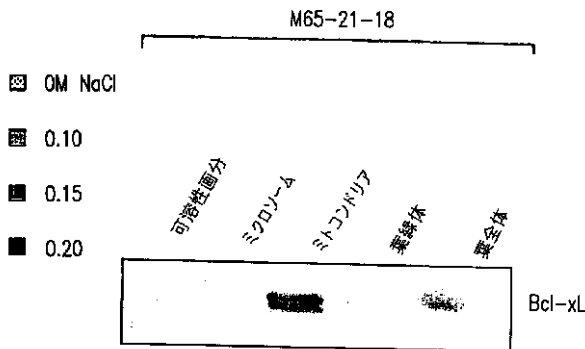
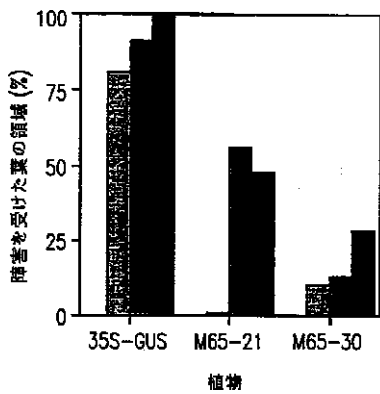


【 図 9 】

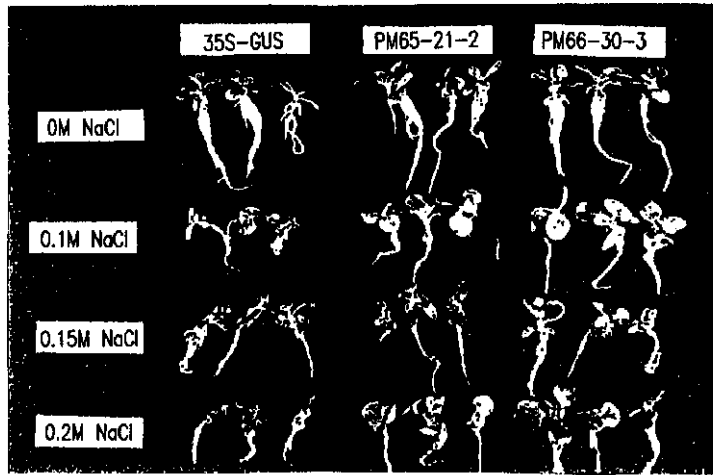


【 図 1 1 】

【 図 1 4 】

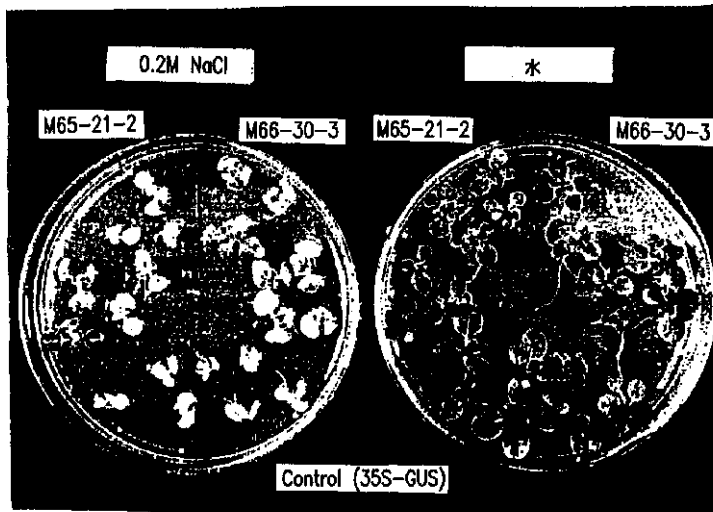


【 図 1 0 】



処理 3 日後

【 図 1 2 】



処理 20 日後

【図 1 3】



M66-30-3

SNN
0.2M NaCl

M65-21-2

処理 9 日後

フロントページの続き

合議体

審判長 眞壽田 順啓

審判官 佐伯 裕子

審判官 斎藤 真由美

(56)参考文献 山本雅編, 実験医学別冊, 「Bio Science 用語ライブラリー 細胞内シグナル伝達 羊土社, p138~139
「化学と生物」Vol. 34, No. 9, 1996, p. 586~594

Theor. Appl. Genet., vol. 85, No. 5, (1993), p. 568~576

Plant. Cell Physiol., Vol. 36, No. 8, (1995), p. 1687~1691

山田武, 大山ハルミ著「アポトーシスの科学」(1994年10月25日 第4刷発行) 講談社(ブルーバックス), 第164頁

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, D B名)

A01H 5/00 A

A01H 1/00 A

C07K 14/415

C12N 5/00 C