

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11)特許番号

特許第3054694号  
(P3054694)

(45)発行日 平成12年6月19日(2000.6.19)

(24)登録日 平成12年4月14日(2000.4.14)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00 Z N A A
A 0 1 H 5/00		A 0 1 H 5/00 A
C 1 2 N 5/10		C 1 2 N 5/00 C
// (C 1 2 N 15/09	Z N A	
C 1 2 R 1:91)		

請求項の数10(全 12 頁)

(21)出願番号 特願平10-65921

(22)出願日 平成10年3月16日(1998.3.16)

(65)公開番号 特開平11-262390

(43)公開日 平成11年9月28日(1999.9.28)

審査請求日 平成11年1月20日(1999.1.20)

特許法第30条第1項適用申請有り 「BOOK OF ABSTRACTS, 5TH INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT MOLECULAR BIOLOGY, 21-27 SEPTEMBER 1997, SINGAPORE」, abstract No. 421に発表

(73)特許権者 591127076

農林水産省農業生物資源研究所長  
茨城県つくば市観音台2丁目1-2

(72)発明者 高辻 博志

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 中川 仁

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

審査官 新見 浩一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 植物の形態を変化させる転写因子の遺伝子およびその利用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の(a)または(b)のDNAを含む遺伝子:

(a) 配列番号1によって示される塩基配列の第90位から第728位までの塩基配列を有するDNA;または  
(b) (a)の塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ(a)と同様に植物の形質を変化させる得る転写因子をコードするDNA。

【請求項2】 以下の(i)または(ii)の転写因子をコードする遺伝子:

(i) 配列番号2によって示されるアミノ酸配列の第1位から第213位までのアミノ酸配列を含む転写因子;または

(ii) アミノ酸配列(i)において、1またはそれ以

上のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ(i)と同様に植物の形質を変化させる得る転写因子。

【請求項3】 以下の(a)または(b)のDNAを含む遺伝子:

(a) 配列番号1によって示される塩基配列の第90位から第728位までの塩基配列を有するDNA;または  
(b) (a)の塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ花の形態、花の着色、植物の大きさ、および枝数からなる群より選択される植物の形質を変化させる得る転写因子をコードするDNA。

【請求項4】 以下の(i)または(ii)の転写因子をコードする遺伝子:

(i) 配列番号2によって示されるアミノ酸配列の第1

位から第213位までのアミノ酸配列を含む転写因子；  
または

(ii) アミノ酸配列(i)において、1またはそれ以上のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ花の形態、花の着色、植物の大きさ、および枝数からなる群より選択される植物の形質を変化させ得る転写因子。

【請求項5】 請求項1から4のいずれか1つに記載の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包含する、植物の形質が変化した植物を作出する方法。

【請求項6】 前記植物が双子葉植物である、請求項5に記載の方法。

【請求項7】 前記植物がナス科植物である、請求項6に記載の方法。

【請求項8】 前記植物がペチュニア属植物である、請求項7に記載の方法。

【請求項9】 前記遺伝子が植物発現ベクターに組み込まれている、請求項5に記載の方法。

【請求項10】 請求項5から9のいずれか1つに記載の方法により作出された、植物の形質が変化した植物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、植物の形質を変化させ得る転写因子をコードする遺伝子およびその利用に関する。本発明は、特に、ペチュニア由来の新規遺伝子であるPetSPL3遺伝子、およびその関連遺伝子、ならびにそれらの利用に関する。

【0002】

【従来の技術】植物の形質、例えば、花の形態形成の制御機構を解明するため、シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)、キンギョソウ(*Antirrhinum majus*)、およびペチュニア(*Petunia hybrida*)などを用いて、分子生物学的および分子遺伝学的に研究が行われている。特に、ペチュニアは、研究材料として好んで使用されている。その理由として、ペチュニアは、園芸植物として価値が高く多種多様な品種が存在すること、形質転換し易いこと、花が大きくて見やすいこと、および遺伝学的な知見の蓄積が豊富であることが挙げられる(高辻博志、「植物の形を決める分子機構」、細胞工学、植物細胞工学シリーズ(秀潤社)、96~106頁)。

【0003】上記の植物の花の器官が変化した突然変異体から、その変異の原因となる遺伝子が単離されている。その結果、花の分化および形態形成の制御には、転写因子が重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。例えば、シロイヌナズナのSUPERMANは、DNA結合ドメインとしてジンクフィンガーモチーフを有する転写因子である。その遺伝子に変異が生じているSUPERMAN変異体では、雄しべの数が著しく増加し、雌しべが退化することが知られている(遺伝、1997年4月号(51巻4

号)、34~38頁)。

【0004】植物の形質の制御に關する新規な転写因子を同定することは、その制御の機構を理解するために重要である。遺伝子工学的手法を用いれば、花の形態形成などを制御する転写因子の遺伝子を植物に導入することができる。遺伝子導入により、従来の交配による手法では得られないか、または得ることが困難である新規な形質を花を有する植物に付与できる可能性がある。このような新規な形質を有する植物は、園芸上の価値が高いと考えられる。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、上記課題の解決を意図するものである。本発明の目的は、植物の形質を変化させ得る転写因子をコードする遺伝子を提供することにある。本発明の他の目的は、遺伝子の導入により植物の形質が変化した植物を作出する方法を提供することにある。本発明のさらなる目的は、植物の形質が変化した植物を提供することにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明は、以下の(a)または(b)のDNAを含む遺伝子に関する：

(a) 配列番号1によって示される塩基配列の第90位から第728位までの塩基配列を有するDNA；または  
(b) (a)の塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ植物の形質を変化させ得る転写因子をコードするDNA。

【0007】本発明はまた、以下の(i)または(ii)の転写因子をコードする遺伝子に関する：

(i) 配列番号2によって示されるアミノ酸配列の第1位から第213位までのアミノ酸配列を含む転写因子；または(ii) アミノ酸配列(i)において、1またはそれ以上のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ植物の形質を変化させ得る転写因子。

【0008】1つの実施態様においては、上記の植物の形質は、花の形態、花の着色、植物の大きさ、および枝数からなる群より選択される。

【0009】本発明はさらに、上記の遺伝子のいずれかを植物細胞に導入する工程、およびこの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、植物の形質が変化した植物を作出する方法に関する。

【0010】1つの実施態様においては、上記の植物は双子葉植物である。好ましくは、双子葉植物はナス科植物であり、より好ましくは、ペチュニア属植物である。

【0011】1つの実施態様においては、上記の遺伝子は植物発現ベクターに組み込まれている。

【0012】本発明はさらに、上記の方法のいずれか1つに記載の方法により作出された、植物の形質が変化した植物に関する。

【0013】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳しく説明する。

【0014】「転写因子」は、遺伝子の調節領域のDNAに結合してmRNAの合成を制御するタンパク質をいう。ある種の転写因子は、そのDNA結合ドメインにジンクフィンガーモチーフと呼ばれる保存性の高いアミノ酸配列を有することが知られている。

【0015】本発明の遺伝子は、植物の形質を変化させ得る転写因子をコードする遺伝子である。この遺伝子は、以下のDNAのいずれかを含み得る：

(a) 配列番号1によって示される塩基配列の第90位から第728位までの塩基配列を有するDNA；および

(b) (a)の塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ植物の形質を変化させ得る転写因子をコードするDNA。

【0016】好ましくは、本発明の遺伝子は(a)のDNAを含み得る。

【0017】本発明の遺伝子はまた、以下の転写因子のいずれかをコードし得る：

(i) 配列番号2によって示されるアミノ酸配列の第1位から第213位までのアミノ酸配列を含む転写因子；および(ii)アミノ酸配列(i)において、1またはそれ以上のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ植物の形質を変化させ得る転写因子。

【0018】好ましくは、本発明の遺伝子は(i)の転写因子をコードし得る。

【0019】本発明において特に好ましい遺伝子は、PetSPL3遺伝子である。この遺伝子のcDNA配列(配列番号1)および推定アミノ酸配列(配列番号2)を図1に示す。

【0020】「植物の形質」の変化とは、植物の形態および着色の少なくとも1つについての任意の変化をいう。具体的には、花の形態、花の着色、および植物の大きさ、および枝数の少なくとも一つについての任意の変化をいう。この変化は、本発明の遺伝子を導入して得られた植物の形質を、遺伝子導入前の植物(野生種または園芸品種)の形質と比較することにより評価される。

【0021】花の形態および/または花の着色の変化は、植物の形質の好ましい変化の例である。以下において、「花」とは、特に指示されない限り花卉のことをいう。

【0022】変化した花の形態としては、個々の花卉の形状の変化によって生じ得る形態(大輪、小輪、鋸歯状咲、丸弁、波状咲など)、花卉の数の変化によって生じ得る形態(八重咲、一重咲など)、および花卉の展開異常によって生じ得る形態(星型など)が挙げられるが、これらに限定されない。

【0023】変化した花の着色としては、白、緋赤、サーモン、ローズ、ピンク、青紫、紫、薄紫、空色、紫紅、および黄白色などの単色、ならびに2色またはそれ

以上の多色模様(例えば、絞り咲、斑紋、覆輪、および花卉の外縁の着色)が挙げられるが、これらに限定されない。

【0024】変化した植物の大きさとしては、矮性および半矮性などが挙げられるが、これらに限定されない。矮性は、好ましくは、遺伝子導入前の植物の標準的な大きさの約1/2以下、より好ましくは約1/3以下の大きさをいう。変化した枝数としては、分枝が挙げられるが、これに限定されない。

【0025】好ましくは、変化した植物の形質は、花卉の展開異常による形態、二色模様、矮性、または分枝であり、より好ましくはその組合せ(例えば、花卉の展開異常による形態と二色模様との組合せ、および/または矮性と分枝との組合せ)である。さらに好ましくは、星型の形態、花卉の外縁の着色、矮性、または分枝であり、さらにより好ましくは、その組合せ(例えば、星型の形態と花卉の外縁の着色との組合せおよび/または矮性と分枝との組合せ)である。

【0026】本発明の遺伝子は、例えば、公知の転写因子の遺伝子によりコードされるアミノ酸配列の保存領域に対応するデジェネレートプライマー対を用いて、植物のゲノミックDNAを鋳型としてPCRを行い、その後、得られた増幅DNA断片をプローブとして用いて同じ植物のゲノミックライブラリーをスクリーニングすることにより単離され得る。そのようなプライマー対の例として、5'-CARGCNYTNGGNGNCAY-3'(配列番号3)または5'-YTNGGNGNCAYATGAAY-3'(配列番号4)と5'-ARNCKNARYTCNARRTC-3'(配列番号5)との組合せが挙げられる。ここで、Nはイノシンであり、RはGまたはAであり、YはCまたはTであり、そしてKはTまたはGである。

【0027】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、当業者に周知の手法で行い得る。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ェントな条件、および遺伝子のクローニング法も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。

【0028】得られた遺伝子の塩基配列は、当該分野で公知のヌクレオチド配列解析法または市販されている自動シーケンサーにより決定し得る。

【0029】本発明の遺伝子は、天然から単離されたものに限定されず、合成ポリヌクレオチドも含み得る。合成ポリヌクレオチドは、例えば、上記のようにして配列決定された遺伝子を、当業者に周知の手法によって改変することにより入手し得る。

【0030】本発明の遺伝子は、当業者に周知の方法を用いて、適切な植物発現ベクターに連結され、公知の遺伝子組換え技術により、植物細胞に導入され得る。導入

された遺伝子は、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。

【0031】「植物」は、単子葉植物および双子葉植物のいずれも含む。好ましい植物は、双子葉植物である。双子葉植物は、離弁花亜綱および合弁花亜綱のいずれも含む。好ましい亜綱は、合弁花亜綱である。合弁花亜綱は、リンドウ目、ナス目、シソ目、アワゴケ目、オオバコ目、キキョウ目、ゴマノハグサ目、アカネ目、マツムシソウ目、およびキク目のいずれも含む。好ましい目は、ナス目である。ナス目は、ナス科、ハゼリソウ科、ハナシノブ科、ネナシカズラ科、およびヒルガオ科のいずれも含む。好ましい科は、ナス科である。ナス科は、ペチュニア属、チョウセンアサガオ属、タバコ属、ナス属、トマト属、トウガラシ属、ホオズキ属、およびクコ属などを含む。好ましい属は、ペチュニア属、チョウセンアサガオ属、およびタバコ属であり、より好ましくは、ペチュニア属である。ペチュニア属は、*P. hybrida* 種、*P. axillaris* 種、*P. inflata* 種、および *P. violacea* 種などを含む。好ましい種は、*P. hybrida* 種である。「植物」は、特に他で示さない限り、花を有する植物体および植物体から得られる種子を意味する。「植物細胞」の例としては、葉および根などの植物器官の細胞、カルスならびに懸濁培養細胞が挙げられる。

【0032】「植物発現ベクター」は、本発明の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。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-DNA領域を有し得る。T-DNA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。

【0033】「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。構成的プロモーター、および花を含む植物体の一部において選択的に発現するプロモーターが好ましい。プロモーターの例としては、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)の35Sプロモーター、およびノバリン合成酵素のプロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。

【0034】「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、およびポリA配列の付加に関与する配列である。ターミネーターは、mRNAの安定性に寄与し、そ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。ターミネーターの例としては、CaMV35Sターミネーター、およびノバリン合成酵素遺伝子のターミネ

ーター (Tnos) が挙げられるが、これらに限定されない。

【0035】「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い。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ラーゼII (NPTII) 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ラーゼ遺伝子などが好適に用いられ得るが、これらに限定されない。

【0036】「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、1つの植物発現ベクターあたり複数個用いられ得る。

【0037】本発明における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。植物発現ベクターの構築には、例えば、pBI系のベクターまたはpUC系のベクターが好適に用いられるが、これらに限定されない。

【0038】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(Microbiol. Lett., 67, 325(1990))が用いられ得る。この方法は、まず、植物発現ベクターで（例えば、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リーフディスク法等の周知の方法により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、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。

【0039】植物発現ベクターを導入された細胞は、例えば、カナマイシン耐性などの薬剤耐性を基準として選択される。選択された細胞は、常法により植物体に再生され得る。

【0040】再生した植物体においては、当業者に周知の手法を用いて、導入された本発明の遺伝子の発現を確認し得る。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、変性アガロースでの電気泳動の後、適切なメンブランにブロットする。このブロットに、導入遺伝子的一部分と相補的な標識したRNAプローブをハイブリダイズさせることにより、本発明の遺伝子のmRNAを検出し得る。

【0041】本発明の植物は、上記の手法によって作出された、植物の形質が変化した形質転換植物である。変

化した植物の形質（すなわち、花の形態、花の着色、植物の大きさ、および/または枝数）は、公知の野生種または園芸品種には存在しない形質であることが好ましい。また、変化した植物の形質は、園芸上価値の高い形質であることが好ましい。さらに、変化した花の形質は、得られた植物の子孫にわたって、安定に保持されることが好ましい。

#### 【0042】

【実施例】以下に実施例を挙げて、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。

【0043】（実施例1：PetSPL3遺伝子の単離）シロイヌナズナのSUPERMAN遺伝子にコードされるタンパク質と、大豆の根粒に特異的に発現するGmN479遺伝子（河内ら、私信）にコードされるタンパク質とを比較した。両タンパク質に共通に存在するアミノ酸配列に基づいてPCRに用いるデジェネレート・プライマーを3種類作成した。遺伝子の5'側から3'側に向かう二つのプライマーの塩基配列は、それぞれ5'-CARGCNYTNGGNGNCAY-3'（プライマー1、アミノ酸配列QALGGHに対応する；配列番号3）および5'-YTNGGNGNCAYATGAAY-3'（プライマー2、アミノ酸配列LGGHMNに対応する；配列番号4）であり、3'側から5'側に向かうプライマーの塩基配列は5'-ARNCKNARYTCNARRTC-3'（プライマー3、アミノ酸配列DLELRLに対応する；配列番号5）である。ここで、Nはイノシンであり、YはCまたはTであり、RはGまたはAであり、そしてKはTまたはGである。

【0044】Boutry, M. and Chua N.H. (1985) EMBO J. 4, 2159-2165に記載の方法に従って抽出したペチュニア (*Petunia hybrida* var. Mitchell) のゲノミックDNAを鋳型とし、プライマー1およびプライマー3を用いて、94 / 10分の後、94 / 30秒、50 / 30秒、72 / 60秒を30サイクルした後、72 / 7分の条件で第一のPCRを行った。さらに第一のPCR産物の一部を鋳型にし、プライマー2およびプライマー3を用いて第二のPCRを行った（反応条件は第一のPCRと同じ）。増幅されたDNA断片をTAクローニングベクター（Invitrogen製）に挿入し、常法に従って大腸菌に導入した。形質転換された大腸菌からプラスミドを抽出し、DNA塩基配列を決定した。その結果、得られたDNA断片においては、SUPERMANおよびGmN479に共通に含まれるジンクフィンガーモチーフの一部がコードされていることがわかった。このDNA断片が由来した遺伝子を、PetSPL3遺伝子と名付けた。なお、この実験において、PetSPL3と類似の塩基配列を含む3つの他のDNA（PetSPL1、2および4遺伝子）の存在が示された。

【0045】上記のPCR増幅されたDNA断片を含むプラスミドから、制限酵素EcoRIを用いてEcoRI-EcoRI断片を切り出した。このDNA断片を、通常のランダムプライム法（Sambrookら(1989)「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」(Cold Spring Harbor Laboratory刊))を用いて[-32P]dCTPで標識して、放射性標識プローブを作製した。この標識プローブを用いて、EMBL3ベクター（Stratagene製）中に作製されたペチュニア (*Petunia hybrida* var. Mitchell) のゲノミックライブラリーをスクリーニングした。得られたクローンに含まれる約3.2kbのゲノムDNA断片を、pBluescriptベクターのXbaIサイトにサブクローニングした（pBS/PetSPL3）。このようにして、ペチュニア由来のPetSPL3遺伝子を単離した。

【0046】（実施例2：PetSPL3遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列の解析）実施例1で得られたpBS/PetSPL3ベクター中の、PetSPL3遺伝子のタンパク質コード領域が含まれる領域（HindIIIおよびXbaIサイトの間）を、さらにpBluescriptベクターにサブクローニングし（pBS/PetSPL3-HX）、DNA塩基配列を決定した（配列番号1）。得られたDNA塩基配列に含まれるオープンリーディングフレームから、タンパク質アミノ酸配列を推定した（配列番号2）。

【0047】塩基配列の解析により、PetSPL3遺伝子の、SUPERMAN遺伝子、PetSPL1遺伝子、PetSPL2、およびPetSPL4遺伝子に対する塩基配列相同性は、それぞれ、29%、37%、25%および23%であることが示された。なお、塩基配列の解析は、各遺伝子のコード領域のみで行った。

【0048】アミノ酸配列解析の結果、PetSPL3はSUPERMANと類似のTFIIIAタイプのジンクフィンガーモチーフを1個含んでいた。このことから、PetSPL3は転写因子であることが推定された。同時にクローニングされたPetSPL1およびPetSPL2は、SUPERMANに対して全アミノ酸配列レベルで35%程度の相同性を示した。これに対して、PetSPL3は、SUPERMANに対して全アミノ酸配列レベルで約20%の相同性であった。

【0049】また、ジンクフィンガーモチーフにおける、PetSPL3のSUPERMANに対するアミノ酸配列相同性（約20%）は、PetSPL1およびPetSPL2のSUPERMANに対する対応する相同性（それぞれ、約38%および約35%）と比較して低いことが示された。表1は、SUPERMANおよび各PetSPLのジンクフィンガーモチーフにおけるアミノ酸配列を比較する。表1はまた、SUPERMANおよび各PetSPLのC末端疎水性領域の比較を示す。

#### 【0050】

#### 【表1】

## Zinc-finger

SUPERMAN	SYTCSFCKREFR <small>SAQALGGHMNVHRRDRARLRL</small> QQSPSSSSTP
PetSPL1	SYTCSFCKREFR <small>SAQALGGHMNVHRRDRARLRL</small> -QSPPRENGT
PetSPL2	SYTCSFCKREFR <small>SAQALGGHMNVHRRDRAILR</small> --QSPPRDINR
PetSPL3	SYECNFCKRGFS <small>NAQALGGHMNIHRKDKAKLKKQKQHQRQ</small> QKP
PetSPL4	FYRCSFCKRGFS <small>NAQALGGHMNIHRKDRAKLREI</small> STDNLNIDQ

## C-terminal hydrophobic region

	*        **        *        *
SUPERMAN	ILRNDEIISLELEIGLINESEQ <small>LDLELRLGFA</small>
PetSPL1	LMKRSEFLRLELGIGMINESKED <small>LDLELRLGYT</small>
PetSPL2	VIKKSEFLRLDLGIGLISESKED <small>LDLELRLGST</small>
PetSPL3	GVSDSRENRLPARNQETTPFYAE <small>LDLELRLGHE</small>
PetSPL4	CGTLDEKPKRQAENNDMQDDSK <small>LDLELRLGPD</small>

【0051】上記の結果から、PetSPL3はSUPERMAN、PetSPL1およびPetSPL2とは別のクラスに属する、新規な転写因子であると推定される。このことは発現パターンの違いからも示された。以下の実施例8および9を参照。

【0052】（実施例3：PetSPL3遺伝子をコードするポリヌクレオチドを含む植物発現ベクターの構築）プラスミドpBI221（Clontechから購入）中のCaMV 35Sプロモーターを含むDNA断片（HindIII-XbaI断片）およびノスターミネーターを含むDNA断片（SacI-EcoRI断片）を順次プラスミドpUCAP（van Engelen, F.A.ら、Transgenic Res. 4: 288-290(1995)）のマルチクローニングサイトに挿入し、pUCAP35Sを作製した。一方、PetSPL3を含むpBS/PetSPL3-HXプラスミドをHindIIIサイト（0位）およびAccIサイト（258位）で切断し、両末端をKlenow酵素を用いて平滑化したのち再び結合させることによって、翻訳開始点上流の258bpのDNA領域を除いた。得られたプラスミドからPetSPL3をコードするDNA断片（KpnI-SacI断片）を切り出して、上記プラスミドpUCAP35SのKpnIおよびSacIサイトの間に挿入した。さらにこの組換えプラスミドをAscIおよびPacIで切断し、PetSPL3をコードするDNA断片を、バイナリーベクターpBINPLUS（van Engelen, F.A.ら、(1995), 前出）のAscIおよびPacIサイトに導入した。

【0053】構築されたPetSPL3遺伝子高発現ベクター（pBIN-35S-PetSPL3）は、図2aに示されるように、CaMV 35Sプロモーター領域（P35S；0.9kb）、本発明のPetSPL3をコードするポリヌクレオチド（PetSPL3；0.8kb）、およびノバリン合成酵素のターミネーター領域（Tnos；0.3kb）を含んで構成されている。図2のPnosは、ノバリン合成酵素のプロモーター領域、NPTIIはネオマイシンホスホトランスフェラーゼII遺伝子を示す。LBおよびRBは、それぞれT-DNA left borderおよびT-DNA right bo

orderを示す。

【0054】（実施例4：PetSPL3遺伝子のペチュニア細胞への導入）

（1）（アグロバクテリウム・チュメファシエンスの形質転換）

アグロバクテリウム・チュメファシエンスLBA4404株（Clontechから購入）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L培地中、28℃で培養した。Nagelら（1990）（前出）の方法に従って、この菌株の細胞懸濁液を調製した。実施例3で構築したPetSPL3遺伝子高発現ベクターを、エレクトロポレーションにより、上記菌株に導入した。

【0055】（2）（PetSPL3をコードするポリヌクレオチドのペチュニア細胞への導入）

上記（1）で得られたアグロバクテリウム・チュメファシエンスLBA4404株を、YEB培地（D.M.Glover編、DNA Cloning, IPL PRESS, 第2巻、78頁）で振とう培養（28℃, 200rpm）した後、滅菌水で20倍に希釈した。この希釈液中で、ペチュニア（*Petunia hybrida* var. Mitchell）の葉片を培養した。2～3日後、カルベニシリンを含む培地で上記細菌を除去し、その後、この葉片を2週間ごとに選択培地で継代培養した。上記PetSPL3遺伝子と共に導入されたpBINPLUS由来のNPTII遺伝子発現によるカナマイシン抵抗性を指標として、形質転換されたペチュニア細胞を選抜した。常法により、形質転換細胞からカルスを誘導した後、植物体に再分化した。

【0056】（実施例5：PetSPL3形質転換植物におけるPetSPL3遺伝子の発現）実施例4で得られたPetSPL3形質転換ペチュニア14個体の葉から、全RNAを抽出した。抽出物10 μgずつを変性アガロース電気泳動によって展開し、常法にしたがってGenescreen plusフィルター（Dupont製）にプロットングした。DIG RNAラベリングキ

ット(Boeringer Mannheim製)を用いて標識したPetSPL3アンチセンスRNAを用い、キットの指示に従ってハイブリダイゼーションおよびフィルターの洗浄を行った。洗浄後、フィルターをXARフィルム(Kodak製)に常温で1時間露光した。図3は、14個体のうちの9個体のPetSPL3遺伝子mRNAを検出した変性アガロースゲル電気泳動像のフルオログラムを示す。これらの結果より、独立の形質転換ペチュニア14個体のうち、3個体が高発現プロモーターによる制御によってPetSPL3mRNAを高レベルに発現していることが示された。

【0057】(実施例6: PetSPL3遺伝子を高レベルに発現する形質転換ペチュニアの表現型) PetSPL3遺伝子を高レベルに発現する3個体の独立の形質転換ペチュニアにおいて、以下のような共通した表現型が観察された。植物体に見られる変化としては、第一に、頂芽優勢が低下した結果、植物が矮化すると共に著しい分枝が起こる(図4、左は野生型ペチュニア、右はPetSPL3形質転換ペチュニアを示す)。葉は小さくなり、アントシアニン色素の蓄積と思われる紫色の着色が随所に見られる(図5、上段は野生型ペチュニアの葉、下段はPetSPL3形質転換ペチュニアの葉を示す)。花に関しては、野生型の花は上から見ると円形に近い形であるのに対して、PetSPL3形質転換体では星型に見える(図6、(a)は野生型ペチュニアの花、(b)および(c)はPetSPL3形質転換ペチュニアの花を示す)。これは花弁の展開異常の結果と推測される。本実験に用いたペチュニアの品種であるMitchellは花弁が白色である。これは、花弁の着色を制御する調節遺伝子an2などの突然変異の結果とされる(Quattrocchio, F., アムステルダム自由大学博士論文(1994))。これに対して、PetSPL3の形質転換体では、花弁の外縁のみに薄い紫色の着色を呈した(図6(c))。

【0058】上記の結果から、PetSPL3形質転換ペチュニアの花の形態および/または着色パターンは、野生種および園芸品種のペチュニアには全く存在しないかまたは極めて珍しいものであることが見出された。遺伝子工学的手法によって植物の花にこのような形質が付与された例は、本発明者らの知る限り存在しない。また、PetSPL3形質転換ペチュニアは、矮性および分枝性であり、これらの形質は園芸上利用価値が高い。

【0059】(実施例7: PetSPL3遺伝子の5'上流領域のポリヌクレオチドをGUSレポーター遺伝子の5'上流に含む植物発現ベクターの構築) 実施例7および8においては、PetSPL3遺伝子のプロモーターおよび遺伝子の発現パターンを解析し、SUPERMAN遺伝子および他のPetSPL3遺伝子との比較を行った。

【0060】PetSPL3遺伝子の翻訳開始点から約70bp上流に存在する配列およびBamHI認識配列を含むプライマー(CTGGATCCCATAGAGAGAGAGAG; 配列異番号6)、およびベクター中の配列に対応するM13 reverseプライマ

ー(GGAAACAGCTATGACCATG; 配列番号7)を用い、上記のプラスミドpBS/PetSPL3を鋳型としてPCRを行い、PetSPL3遺伝子のプロモーター領域を含むと考えられる約2.4kbのDNA断片を増幅した。このDNA断片を、その両末端近傍に存在するXbaIおよびBamHIサイトで切断した。pUCAP(van Engelen, F.A.ら、(1995), 前出)のXbaIおよびEcoRIサイトの間に、pBI221(Clontech社から購入)から切り出した、GUSコード領域およびノパリン合成酵素のターミネーターを含むXbaI-EcoRI断片を挿入して、pUCAPGUSプラスミドを得た。上記で得られたXbaI-BamHI断片を、そのpUCAPGUSプラスミド中の-グルクロニダーゼ(GUS)遺伝子コード領域の上流(XbaIおよびBamHIサイト)に挿入した。このプラスミドから、PetSPL3遺伝子の5'上流領域、GUSコード領域、およびノパリン合成酵素のターミネーター領域を含むDNA断片をAscIおよびPacIで切り出し、実施例3において使用したpBINPLUSのAscIおよびPacIサイトに挿入した。このようにして構築された、プロモーター解析用プラスミド(pBIN-PetSPL3-GUS)の構成を図2bに示す。

【0061】(実施例8: PetSPL3遺伝子の茎での発現パターン) 上記PetSPL3遺伝子の5'上流領域のポリヌクレオチドをGUSレポーター遺伝子の5'上流に含む組換えプラスミドを、実施例3と同様にペチュニア(Petunia hybrida ver. Mitchell)に導入した。得られた形質転換体の若い茎を用いて、常法に従って(村上、大橋、植物細胞工学、14, 281-286, (1992))、X-GUSを基質にしてGUS活性の分布を調べた結果、葉腋に特異的なGUS活性が検出された(図7)。したがって、PetSPL3遺伝子の5'上流部分を含むDNA領域は葉腋に特異的なプロモーター活性を有することがわかり、PetSPL3遺伝子は葉腋に特異的に発現していると推測された。この発現特異性は、SUPERMANの発現特異性(雄しべの原基および胚珠)とは全く異なる。この相違点と、アミノ酸配列の類似性の低さを考え合わせ(実施例2)、PetSPL3はSUPERMANとは別のクラスの新規な転写因子であると結論される。

【0062】

【発明の効果】本発明によれば、植物の形態および着色などを变化させ得る転写因子をコードする遺伝子が提供される。この遺伝子を利用することにより、植物の形質が変化した植物を作出し得る。作出された植物には、野生種および園芸品種には存在しないか極めてまれである形質が付与されるため、園芸上有用である。

【0063】

【配列表】

【0064】

【配列番号: 1】配列の長さ: 887

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直線状

配列の種類: cDNA to mRNA

配列：

TCTACAAGGC AATAACAAGT TATAGTATCA TCTTTCTTTT ATTACCTTTA TAGAACTATC 60  
 ATTTTTCCAC CGTTGACTCT CTCTCTCTA ATG GAA ACT AGT AAA AAT CAG CCG 113  
 Met Glu Thr Ser Lys Asn Gln Pro  
 5  
 TCT GTC TCA GAA AAT GTT GAT CAG CAG AAA GTA GAT AAC TCT TCT TCA 161  
 Ser Val Ser Glu Asn Val Asp Gln Gln Lys Val Asp Asn Ser Ser Ser  
 10 15 20  
 GAT GAA CAA CAA ATT TCA ATT ATC CAA AGC AGC CAT ACT ACT AAA TCC 209  
 Asp Glu Gln Gln Ile Ser Ile Ile Gln Ser Ser His Thr Thr Lys Ser  
 25 30 35 40  
 TAT GAG TGC AAC TTT TGT AAA AGA GGT TTT TCT AAC GCA CAA GCA CTT 257  
 Tyr Glu Cys Asn Phe Cys Lys Arg Gly Phe Ser Asn Ala Gln Ala Leu  
 45 50 55  
 GGT GGC CAC ATG AAT ATC CAT CGT AAG GAC AAG GCC AAA CTC AAA AAA 305  
 Gly Gly His Met Asn Ile His Arg Lys Asp Lys Ala Lys Leu Lys Lys  
 60 65 70  
 CAA AAG CAG CAT CAA CGA CAA CAA AAA CCT ACC TCG GTT TCC AAA GAA 353  
 Gln Lys Gln His Gln Arg Gln Gln Lys Pro Thr Ser Val Ser Lys Glu  
 75 80 85  
 ACC AAC ATG GCT CAC AAT ATC TTG CTA GCG GAT GAT TCT AAC ATC CCT 401  
 Thr Asn Met Ala His Asn Ile Leu Leu Ala Asp Asp Ser Asn Ile Pro  
 90 95 100  
 ACC ACA ATC CCC TTT TTT CCT TCT CTT ACA TCA CCA AAC ACA TCC AAC 449  
 Thr Thr Ile Pro Phe Phe Pro Ser Leu Thr Ser Pro Asn Thr Ser Asn  
 105 110 115 120  
 CCT TTA GGG TTC GTG TCT TCT TGC ACT ACT GCA GAC ACC GTC GGG CAA 497  
 Pro Leu Gly Phe Val Ser Ser Cys Thr Thr Ala Asp Thr Val Gly Gln  
 125 130 135  
 AGA CAG ATT CAA GAT CTA AAC TTA GTC ATG GGT TCA ACT CTT AAC GTT 545  
 Arg Gln Ile Gln Asp Leu Asn Leu Val Met Gly Ser Thr Leu Asn Val  
 140 145 150  
 CTC AGA ATG AAT AGT GTT GAA GCG GGT TCT GTT GAT TCA CGT GAA AAT 593  
 Leu Arg Met Asn Ser Val Glu Ala Gly Ser Val Asp Ser Arg Glu Asn  
 155 160 165  
 AGA TTG CCG GCT AGA AAT CAA GAA ACT ACA CCA TTT TAC GCG GAA TTG 641  
 Arg Leu Pro Ala Arg Asn Gln Glu Thr Thr Pro Phe Tyr Ala Glu Leu  
 170 175 180  
 GAC CTT GAG CTG CGA TTA GGT CAT GAG CCT GCA CCT TCC ACG GAT ATA 689  
 Asp Leu Glu Leu Arg Leu Gly His Glu Pro Ala Pro Ser Thr Asp Ile  
 185 190 195 200  
 TCA TCA GCT AAT TCG GGT TTA GGC ACA AGA AAG TTC TTA TGATTTATTG 738  
 Ser Ser Ala Asn Ser Gly Leu Gly Thr Arg Lys Phe Leu  
 205 210  
 GTACTATTGC TGCTAAATGC TTTTCTTTT TAC  
 TACTGTT TAGGGTTTTT TTGTGACTAT 798  
 GATACTACTT TTGCTACATC TGAATTGTCT TGA  
 ACTCTTT TATTCAGAGT TCTTGGATTT 858  
 TGCTTTGCTT GTTTTAATCT GGCTCTAGA  
 887



【0065】

配列の型：アミノ酸

【配列番号：2】配列の長さ：213

配列の種類：タンパク質

配列：

```

Met  Glu  Thr  Ser  Lys  Asn  Gln  Pro  Ser
Val  Ser  Glu  Asn  Val  Asp  Gln
           5           10          15
Gln Lys Val Asp Asn Ser Ser Ser Asp Glu Gln Gln Ile Ser Ile Ile
           20           25          30
Gln Ser Ser His Thr Thr Lys Ser Tyr Glu Cys Asn Phe Cys Lys Arg
           35           40          45
Gly Phe Ser Asn Ala Gln Ala Leu Gly Gly His Met Asn Ile His Arg
           50           55          60
Lys Asp Lys Ala Lys Leu Lys Lys Gln Lys Gln His Gln Arg Gln Gln
           65           70          75          80
Lys Pro Thr Ser Val Ser Lys Glu Thr Asn Met Ala His Asn Ile Leu
           85           90          95
Leu Ala Asp Asp Ser Asn Ile Pro Thr Thr Ile Pro Phe Phe Pro Ser
           100          105          110
Leu Thr Ser Pro Asn Thr Ser Asn Pro Leu Gly Phe Val Ser Ser Cys
           115          120          125
Thr Thr Ala Asp Thr Val Gly Gln Arg Gln Ile Gln Asp Leu Asn Leu
           130          135          140
Val Met Gly Ser Thr Leu Asn Val Leu Arg Met Asn Ser Val Glu Ala
           145          150          155          160
Gly Ser Val Asp Ser Arg Glu Asn Arg Leu Pro Ala Arg Asn Gln Glu
           165          170          175
Thr Thr Pro Phe Tyr Ala Glu Leu Asp Leu Glu Leu Arg Leu Gly His
           180          185          190
Glu Pro Ala Pro Ser Thr Asp Ile Ser Ser Ala Asn Ser Gly Leu Gly
           195          200          205
Thr Arg Lys Phe Leu
           210

```

【0066】

存在位置：9

【配列番号：3】配列の長さ：18

他の情報：塩基9はイノシン(i)である

配列の型：核酸

配列の特徴

トポロジー：直線状

特徴を表す記号：modified base

配列の種類：プライマー

存在位置：12

配列の特徴

他の情報：塩基12はイノシン(i)である

特徴を表す記号：modified base

配列の特徴

存在位置：6

特徴を表す記号：modified base

他の情報：塩基6はイノシン(i)である

存在位置：15

配列の特徴

他の情報：塩基15はイノシン(i)である

特徴を表す記号：modified base

配列：

C A R G C N Y T N G G N G G N C A Y

18

【0067】

配列の種類：プライマー

【配列番号：4】配列の長さ：18

配列の特徴

配列の型：核酸

特徴を表す記号：modified base

トポロジー：直線状

存在位置：3

他の情報：塩基3はイノシン(i)である

配列の特徴

特徴を表す記号：modified base

存在位置：6

他の情報：塩基6はイノシン(i)である

配列：

YTNGGNGNCAYATGAAY

【0068】

【配列番号：5】配列の長さ：17

配列の型：核酸

トポロジー：直線状

配列の種類：プライマー

配列の特徴

特徴を表す記号：modified base

存在位置：3

他の情報：塩基3はイノシン(i)である

配列：

ARNCKNARYTCNARRTC

【0069】

【配列番号：6】配列の長さ：25

配列の型：核酸

配列：

ACTGGATCCCATTAGAGAGAGAGAG

【0070】

【配列番号：7】配列の長さ：19

配列の型：核酸

配列：

GGAAACAGCTATGACCATG

配列の特徴

特徴を表す記号：modified base

存在位置：9

他の情報：塩基9はイノシン(i)である

18

配列の特徴

特徴を表す記号：modified base

存在位置：6

他の情報：塩基6はイノシン(i)である

配列の特徴

特徴を表す記号：modified base

存在位置：12

他の情報：塩基12はイノシン(i)である

17

トポロジー：直線状

配列の種類：プライマー

25

トポロジー：直線状

配列の種類：プライマー

19

【図面の簡単な説明】

【図1】PetSPL3遺伝子の塩基配列および推定アミノ酸配列を示す。

【図2】(a)PetSPL3遺伝子高発現ベクター(pBIN-35S-PetSPL3)および(b)PetSPL3遺伝子プロモーター解析用ベクター(pBIN-PetSPL3-GUS)の概略を示す。

【図3】PetSPL3形質転換ペチュニアにおいてPetSPL3遺伝子のmRNAを検出した変性アガロースゲル電気泳動像のフルオログラムを示す。

【図4】(左)野生型ペチュニアの植物体と(右)PetS

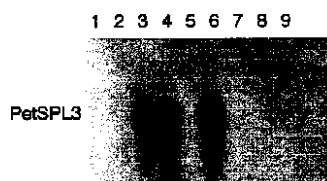
PL3形質転換ペチュニアの植物体を撮影した生物の形態を示す写真を示す。

【図5】(上段)野生型ペチュニアの葉と(下段)PetSPL3形質転換ペチュニアの葉を撮影した生物の形態を示す写真を示す。

【図6】(a)野生型ペチュニアの花と(b)(c)PetSPL3形質転換ペチュニアの花を撮影した生物の形態を示す写真を示す。

【図7】pBIN-PetSPL3-GUSを導入したペチュニアのGUS染色した茎を撮影した生物の形態を示す写真を示す。

【図3】



【図1】

TCTACAAGGC AATAACAAGT TATAGTATCA TCTTCTTTTT ATTACCITTA  
TAGAACTATC ATTTTTCCAC CGTTGACTCT CTCCTCTCTAA TGGAAACTAG  
M E T S  
TAAAAATCAG CCGTCTGTCT CAGAAAATGT TGAATCAGCAG AAAGTAGATA  
K N Q P S V S E N V D Q Q K V D N  
ACTCTTCTTC AGAIGAACAA CAAATTTCAA TTATCCAAAG CAGCCATACT  
S S S D E Q Q I S T I Q S S H T  
ACTBAATOCI ATGAGIGCAA CTTTTGTAAA AGAGSITTTT CTAACGCACA  
T K S Y E C N F C K R G F S N A Q  
AGCACTTGGT GGCACATGA ATATCCATCG TAAGGACAAG GCCAAACTCA  
A L G G H M N I H R A D D K A K L K  
AAAAACAAA GCAGCAICAA CGACAAACAAA AACCTAOCIC GGTTCACAAA  
K Q K Q H Q R Q Q K P T S V S K  
GAAACCAACA TGGCTCACAA TATCTTGCTA GGGATGATT CTAACATCC  
E T N M A H N I L L A D D S N I P  
TACCACAATC CCGTTTTTTC CTCCTCTTAC ATCACCAAAC ACATCCAAC  
T T I P F F P S L T S P N T S N P  
CTTTAGGGTT CGTGICHTCT TGCACCTACTG CAGACACCGT CCGGCAAGA  
L G F V S S C T T A D T V G Q R  
CAGATTCAG ATCTAAACTT AGTCAAGGGT TCAACTCTTA ACGTCTCAG  
Q I Q D L N L V M G S T L N V L R  
AATGAATAGT GTTGAGCGG GTTCTGTGTA TTCAAGTGAA AATAGATTC  
M N S V E A G S V D S R E N R L P  
CGGCTAGAAA TCAAGAACT ACACCAITTT ACGCGAATT GGACCTTGG  
A R N Q E T T P F Y A E L D L E  
CTGGGATTAG GTCATGACC TGCACCTTCC ACGGATATAT CATCAGCTAA  
L R L G H E P A P S T D I S S A N  
TTGGGGTTTA GGCACAAGAA AGTTCITATG AITPATITGGT ACTATTGCTG  
S G L G T R K F L  
CTAAATGCIT TTTCTTTTIA CTACIGTTTA GGGTTTTTIT GIGACTATCA  
TACTACTTIT GCTACATCIG AATGICHTIC AACCTITTTA TICAGAHIC  
TGGATHTIG CTTTCTTGT TTTAATCIGG CTCIAGA

【図4】



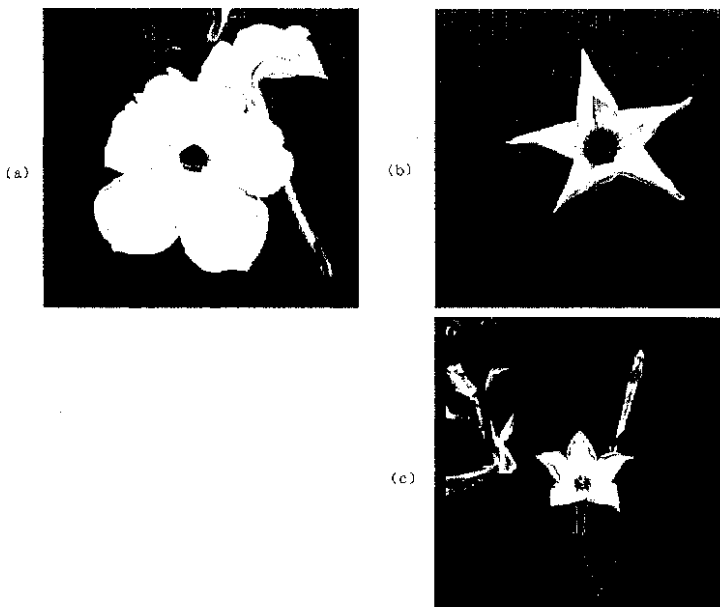
【図5】



【図7】

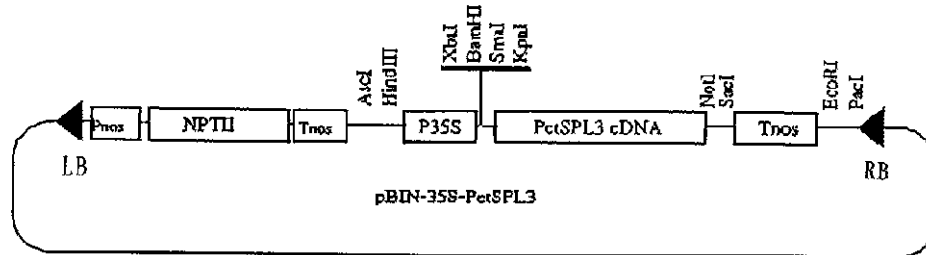


【図6】

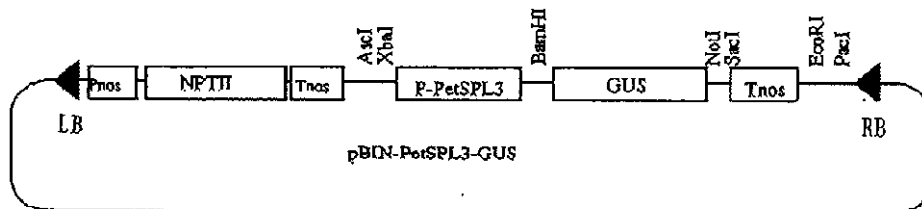


【図2】

(a)



(b)



フロントページの続き

(58)調査した分野(Int.Cl.7, DB名)

C12N 15/29

A01H 5/00

C12N 5/10

SwissProt/PIR/Genes

eq

GenBank/EMBL/DDBJ/G

eneSeq

WPI(DIALOG)

BIOSIS(DIALOG)