

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2010年7月29日(29.07.2010)

PCT

(10) 国際公開番号

WO 2010/084969 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/050843
- (22) 国際出願日: 2010年1月22日(22.01.2010)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2009-013577 2009年1月23日(23.01.2009) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人高知大学 (KOCHI UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒7808520 高知県高知市曙町2丁目5番1号 Kochi (JP). 独立行政法人水産総合研究センター (Fisheries Research Agency) [JP/JP]; 〒2206115 神奈川県横浜市西区みなとみらい2-3-3 クイーンズタワーB 15階 Kanagawa (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 足立 真佐雄 (ADACHI, Masao) [JP/JP]; 〒7808520 高知県高知市曙町2丁目5番1号 国立大学法人高知大学内 Kochi (JP). 長崎 慶三 (NAGASAKI, Keizo) [JP/JP]; 〒7390452 広島県廿日市市丸石2丁目17番5号 独立行政法人水産総合研究センター 瀬戸内海区水産研究所内 Hiroshima (JP). 外丸 裕司 (TOMARU, Yuji) [JP/JP]; 〒7390452 広島県廿日市市丸石2丁目17番5号 独立行政法人水産総合研究センター 瀬戸内海区水産研究所内 Hiroshima (JP).
- (74) 代理人: 植木 久一, 外 (UEKI, Kyuichi et al.); 〒5300003 大阪府大阪市北区堂島2丁目1番16号 フジタ東洋紡ビル9階 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第21条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))



WO 2010/084969 A1

(54) Title: NOVEL PROMOTER FOR USE IN TRANSFORMATION OF ALGAE

(54) 発明の名称: 藻類を形質転換するために用いられる新規プロモーター

(57) Abstract: Disclosed is a transformation technique which is applicable to a wide variety of algae and is highly efficient. Specifically disclosed is a promoter which is characterized by comprising a polynucleotide that constitutes a non-coding region located upstream from a gene encoding a protein involved in the replication of a Cdeb DNA virus, or the like.

(57) 要約: 本発明は、幅広い種の藻類に適用可能である上に、効率の高い形質転換技術を提供することを目的とする。本発明に係るプロモーターは、Cdeb DNAウイルスの複製に関与するタンパク質をコードする遺伝子の upstream に位置する非コード領域を構成するポリヌクレオチド等を有することを特徴とする。

明 細 書

発明の名称：

藻類を形質転換するために用いられる新規プロモーター

技術分野

[0001] 本発明は、藻類を形質転換するために用いられる新規のプロモーター、当該プロモーターを含むベクター、および当該ベクターを用いる藻類の形質転換方法に関するものである。

背景技術

[0002] 恒久的かつ安定的なエネルギー源である太陽光を利用することは、エネルギー対策を考える上で非常に重要である。植物類による光合成は、太陽光エネルギーを最も効率的に化学エネルギーへ変換できる優れたシステムであり、環境中の二酸化炭素や過剰栄養塩を吸収同化する上に、酸素も放出する。よって植物を利用する技術の開発は、エネルギー問題を解決し得るものとして期待されているところである。

[0003] 植物類の中でも藻類は、多量に存在する海水および淡水中に生息することからその量は莫大なものであり、また、著しい光合成能を有する。さらに、藻類の中には不飽和脂肪酸や抗腫瘍化合物などの有用化合物を生産するものがある。また、珪藻類の中には有用な無機物を生産するものがあるので、珪藻類によるバイオミネラルゼーションという技術が注目されている。このように、藻類は有用資源として重要な生物といえる。

[0004] 一般的に、生物を産業で利用する場合には、有用な遺伝子を導入する形質転換技術が用いられる。この形質転換技術は、遺伝子の機能を解明すべく、特定遺伝子をノックアウトしたりその働きを抑制したりするためにも用いられる。

[0005] これまでにも、珪藻や緑藻を中心として藻類の形質転換が行われている。しかし、かかる方法は内在性のプロモーターを分離し、それに遺伝子を結合させて藻類に導入するものであった。それでは、内在性プロモーターの分離

に多大な労力と時間がかかるために、決して効率的なものではなかった。また、藻類、とりわけ海産藻類の形質転換効率自体が極めて低いという問題もある。

[0006] 一方、藻類以外の植物や動物の形質転換では、内在性のプロモーターではなく、ウィルス由来のプロモーターが汎用されている。例えば、アブラナ科植物に感染するカリフラワーモザイクウィルス（CaMV）より分離されたCaMV 35Sプロモーターが、アブラナ科植物に限定されず幅広い植物の形質転換に利用されている。また、動物細胞の形質転換には、サイトメガロウィルス（CMV）より分離されたCMVプロモーターや、シアミンウィルス40（SV40）より分離されたSV40プロモーターが広く利用されている。

[0007] それに対して、藻類の形質転換においては、外来性のウィルスプロモーターが用いられた例はほとんど知られていない。

[0008] 例えば非特許文献1には、CaMV 35Sプロモーターを用いて珪藻*Cyclotella cryptica*を形質転換した実験例が記載されているが、形質転換体は得られなかったとされている。

[0009] 一方、非特許文献2には、CMVプロモーター、CaMV 35Sプロモーターおよびラウス肉腫ウィルス（RSV）プロモーターを用いて珪藻*Phaeodactylum tricornutum*へGUS遺伝子を導入したところ、いずれの場合もGUS（ β -グルクロニダーゼ）が発現したことが記載されている。

[0010] さらに非特許文献3には、CaMV 35Sプロモーターを用いて渦鞭毛藻*Ampidinium*と*Symbiodinium*へGUS遺伝子を導入したところ、GUSが発現したことが記載されている。しかし他文献（非特許文献4）によれば、懸命の努力にもかかわらず、他のグループが渦鞭毛藻類の形質転換に成功したとの報告はされていないとのことである。

先行技術文献

非特許文献

[0011] 非特許文献1：Dunahay, T.G. ら, Journal of Phycology (ジャーナル・オブ

・ファイコロジー), vol. 31, pp. 1004-1012 (1995)

非特許文献2: Sakaue, Kら, *Physiologia plantarum* (フィジオロギア・プランタラム), vol. 133, pp. 59-67 (2008)

非特許文献3: Lohuis, M. R. ら, *The Plant Journal* (ザ・プラント・ジャーナル), vol. 13, pp. 427-435 (1998)

非特許文献4: Walker, T. L. ら, *Journal of Phycology* (ジャーナル・オブ・フィコロジー), vol. 41, pp. 1077-1093 (2005)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0012] 上述したように、その数は極めて少ないものの、カリフラワーモザイクウイルスに由来するCaMV35Sプロモーターなどのウイルスプロモーターを用いて藻類を形質転換した報告例はある。

[0013] しかし、形質転換体が得られなかったり再現性が無いという報告もある。また、本発明者らの知見によれば、他の植物類の形質転換に汎用されているCaMV35Sプロモーターは、藻類に対する適用範囲が極めて狭い。藻類の存在量は莫大であり、また、様々な有用性を秘めた種があることから、形質転換に用いるプロモーターとしては幅広い種の藻類に適用可能であるものが望ましい。さらに、一般的に、藻類、とりわけ海産藻類の形質転換効率は非常に低いことから、高効率な形質転換技術の開発が切望されている。

[0014] そこで本発明が解決すべき課題は、幅広い種の藻類に適用可能である上に、効率の高い形質転換技術を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0015] 本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を行った。その結果、*Chaetoceros debilis* DNAウイルス(CdebDNAV)の複製タンパク質をコードすると考えられる遺伝子の上流に位置するプロモーターが、目(モク)を超える複数の藻類を効率的に形質転換できることを見出して、本発明を完成した。

[0016] 本発明に係る新規プロモーターは、下記(1)~(3)の何れかの塩基配

列を有することを特徴とする。

[0017] (1) C d e b DNA ウィルスの複製に関与するタンパク質をコードする遺伝子上流に位置する非コード領域を構成するポリヌクレオチド

(2) 上記ポリヌクレオチド(1)の1または複数のヌクレオチドが欠失、置換または付加されたポリヌクレオチドであり、且つ任意のタンパク質をコードする遺伝子の発現を藻類細胞内で活性化するポリヌクレオチド

(3) 上記ポリヌクレオチド(1)とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、且つ任意のタンパク質をコードする遺伝子の発現を藻類細胞内で活性化するポリヌクレオチド

[0018] 本発明に係るベクターは、上記新規プロモーター、および任意のタンパク質をコードする遺伝子を含有することを特徴とする。

また、本発明に係る藻類の形質転換方法は、上記ベクターを調製する工程；および、上記ベクターを藻類細胞へ導入する工程；を含むことを特徴とする。

図面の簡単な説明

[0019] [図1]本発明に係るプロモーターを含むプラスミドベクターの構造の一例を示す図である。

[図2]本発明に係るプロモーターを含むプラスミドベクターの構造の一例を示す図である。

[図3]本発明方法により形質転換された藻類細胞等に含まれる導入遺伝子の有無の確認実験の結果を示す電気泳動写真である。

[図4]本発明方法により形質転換された藻類細胞等に含まれる導入遺伝子の有無の確認実験の結果を示す電気泳動写真である。

[図5]本発明に係るプロモーターのCore elementを特定するための実験結果を示すグラフである。当該結果より、C d e b DNA ウィルスの複製に関与するタンパク質をコードする遺伝子上流領域における-72から-33の間の配列中に、Core elementが含まれていることが分かる。

[図6]本発明に係るプロモーターを含むプラスミドベクターの構造の一例を示す図である。

[図7]海産藻類である*C. fusiformis*の形質転換実験の結果を示す写真である。(1)は本発明プロモーターを用いた場合の結果を示し、(2)は本発明プロモーターを用いない場合の結果を示す。

発明を実施するための形態

[0020] 本発明に係る第一のプロモーターは、(1) *C d e b* DNA ウィルスの複製に関与するタンパク質をコードする遺伝子上流に位置する非コード領域を構成するポリヌクレオチド、を有する。

[0021] *C d e b* DNA ウィルスは、珪藻 *Chaetoceros debilis* に感染するウィルスである。これまで藻類、とりわけ海産藻類に対して感染性を示すウィルスの報告例は少なかったが、近年、本発明者らは、ラフィド藻、渦鞭毛藻、珪藻などの藻類から様々なウィルスの分離に成功している。本発明に係る *C d e b* DNA ウィルスは、本発明者らにより分離された海産藻類感染性ウィルスの一つである。

[0022] 複製に関与するタンパク質をコードする遺伝子は、*C d e b* DNA ウィルスの複製に関与するものであり且つ活発に発現するものであれば特に制限されないものとする。

[0023] 本発明において、コード領域とは mRNA を経てタンパク質に翻訳される部分をいうものをいい、非コード領域とはコード領域以外の部分をいう。即ち、非コード領域は、ATG などの開始コドンの上流に位置する部分をいい、mRNA に転写されない部分の他、mRNA に転写はされるがタンパク質には翻訳されない部分を含むものとする。

[0024] 一般的に、プロモーターは、転写の鍵を握る *C o r e e l e m e n t* と、転写を促進または抑制する *R e g u l a t o r y e l e m e n t* を有し、遺伝子を導入する際には、特に *C o r e e l e m e n t* を利用することが重要である。*C o r e e l e m e n t* としては、TATA ボックス、イニシエーターエレメント (*I n r*)、ダウンストリートエレメントなどが知

られており、Regulatory elementとしてはCAATボックスやGATAボックスなどが知られている。本発明者らがCdebDNAウィルスの複製に参与するタンパク質をコードする遺伝子上流域の塩基配列を調べたところ、CAATボックスIである5' -CAAT-3'、GATAボックスである5' -WGATAR-3'（式中、WはAまたはTを示し、RはAまたはGを示す）、およびイニシエーターエレメント（Inr）である5' -YYA₊₁N（A/T）YY-3'（式中、YはCまたはTを示す）が見られた一方で、真核生物などのプロモーターに見られるTATAボックスは見られなかった。よって、上記遺伝子上流配列中に見付かったInrが、羽状目珪藻と中心目珪藻の両方でCore elementとして働き、形質転換が可能になると考えられたが、その一方で、上記Inrと酷似した配列のInrを含む羽状目珪藻内在性プロモーター（CffcpA-1A）を用いると、中心目珪藻を形質転換することができない。結論として、本発明に係るポリヌクレオチド（1）で高い形質転換能を発揮できるのは、少なくともTATAボックスやイニシエーターエレメントなどのためではなく、全く未知の配列がCore elementとして働いている可能性が高いといえる。

[0025] 上記ポリヌクレオチド（1）としては、配列番号1および配列番号5の塩基配列を有するものを挙げることができる。なお、配列番号5の塩基配列は、CdebDNAウィルスの複製に参与するタンパク質をコードする遺伝子上流配列中のInrの約30塩基上流からの約40塩基に相当し、当該配列中には、InrはもとよりCAATボックスやGATAボックスも認められない。

[0026] 本発明に係る第二のプロモーターは、（2）上記ポリヌクレオチド（1）の1または複数のヌクレオチドが欠失、置換または付加されたポリヌクレオチドであり、且つ任意のタンパク質をコードする遺伝子の発現を藻類細胞内で活性化するポリヌクレオチド、である。

[0027] 上記ポリヌクレオチド（2）において、欠失、置換または付加されるヌク

レオチドの数としては、1以上、200以下が好ましく、1以上、100以下がより好ましく、1以上、70以下がさらに好ましく、1以上、30以下がさらに好ましく、1以上、20以下がさらに好ましく、1以上、10以下がさらに好ましく、1以上、5以下が特に好ましい。

[0028] 本発明に係る第三のプロモーターは、(3) 上記ポリヌクレオチド(1) とストリンジントな条件でハイブリダイズし、且つ任意のタンパク質をコードする遺伝子の発現を藻類細胞内で活性化するポリヌクレオチド、である。

[0029] 上記ポリヌクレオチド(3)において、ストリンジントな条件とは、0.1% SDSを含む2×SSC中、65°Cでハイブリダイズさせた後、0.1×SSC-0.1% SDSで2回洗浄することをいう。

[0030] また、上記ポリヌクレオチド(2)および(3)において、任意のタンパク質をコードする遺伝子の発現を藻類細胞内で活性化するポリヌクレオチドとは、藻類細胞内に導入されることによって、その下流に結合された任意のタンパク質をコードする遺伝子を発現させることができるものをいう。

[0031] 上記ポリヌクレオチド(2)および(3)において、上記ポリヌクレオチド(1)との相同性としては、50%以上が好ましく、70%以上がより好ましく、80%以上がさらに好ましく、90%以上がさらに好ましく、95%以上がさらに好ましく、98%以上がさらに好ましく、99%以上が特に好ましい。

[0032] 上記ポリヌクレオチド(1)～(3)は、Cde b DNA ウィルスまたはその変異体の複製に関与するタンパク質をコードする遺伝子上流から分離することができる。但し、化学的に合成してもよい。これらポリヌクレオチド(1)～(3)は、鋳型からPCRにより増幅して用いることができる。

[0033] 本発明に係るベクターは、上記プロモーターと、任意のタンパク質をコードする遺伝子を含有する。

[0034] ベクターの種類は、藻類細胞へ導入され得るものであれば特に制限されず、プラスミドベクター、ウィルスベクターの何れも用いることができる。但

し、藻類、とりわけ海産藻類に感染するウィルスの研究は十分に進んでいるとはいい難いので、好適にはプラスミドベクターを用いる。

[0035] ここで「任意のタンパク質」は特に限定されるものではなく、生産の望まれる有用なタンパク質であればよい。

[0036] 本発明に係るベクターには、一般的なベクターに含まれるその他の配列を含んでいてもよい。かかる配列としては、例えば、本発明ベクターが導入された藻類を特定するための選択マーカー遺伝子や、藻類細胞で働くターミネーターを挙げることができる。

[0037] 本発明ベクターの調製方法としては、常法を用いることができる。例えば、上記各配列とドナーベクターとを制限酵素で切断した後にアニーリングし、DNAリガーゼにより結合させればよい。或いは、クローニング反応を利用した簡便な公知方法により、各配列をベクターにクローニングすることも可能である。

[0038] 本発明に係る藻類の形質転換方法は、上記ベクターを調製する工程；および、上記ベクターを藻類細胞へ導入する工程；を含むことを特徴とする。

[0039] 本発明ベクターの調整方法は、上述したとおり、当業者公知の方法を用いることができる。

[0040] 本発明ベクターの藻類細胞への導入方法としては、パーティクルガン法、ガラスビーズ攪拌法、マイクロインジェクション法、アグロバクテリウム法、酢酸リチウム法、リン酸カルシウム法、プロトプラスト法などの公知方法を用いることができる。但し、海産藻類の場合、塩濃度の高い培地で増殖せしめる必要があるので、エレクトロポレーション法は適切でない。

[0041] 本発明ベクターにより形質転換された藻類細胞は、導入されている選択マーカー遺伝子に応じた選択培地で培養することにより特定することができる。

実施例

[0042] 以下、実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、本発明はもとより下記実施例によって制限を受けるものではなく、前・後記の趣旨に適合し

得る範囲で適当に変更を加えて実施することも勿論可能であり、それらはいずれも本発明の技術的範囲に包含される。

[0043] 実施例 1 本発明に係る C d e b DNA ウィルスプロモーターの分離

(1) 海産藻類に感染するウィルスのゲノム DNA の抽出

Tomaru, Y. ら, Aquatic Microbial Ecology, vol. 50, pp. 103-112 (2008) に記載の方法に従って、中心目珪藻 *Chaetoceros debilis* を宿主とする *Chaetoceros debilis* DNA ウィルス (C d e b DNA V) C d e b DNA V 1 8 株からゲノムを抽出した。

[0044] 具体的には、まず、ウィルス液 (10 mL) を 0.22 μ m フィルター (MILLIPORE 社製, Millex-GS, 孔径: 0.22 μ m) で濾過することにより、藻細胞の破片などを除いた。得られた濾液に 40% ポリエチレングリコール 6000 溶液 (Wako 社製) を最終濃度が 10 w/v % となるように加え、4°C にて一晩静置した。当該液を遠心分離用チューブ (Nalgen 社製, UltraBottle Assemblies) に移し、超遠心分離機 (BECKMAN 社製, Ultracentrifuge L8-70M) を用いて 57,000 \times g、4°C で 1.5 時間遠心分離した後、その上清を除いた。得られた沈殿にリン酸緩衝液 (10 mM リン酸二水素ナトリウム, 10 mM リン酸水素ナトリウム, pH 7.2, 5 mL) を加え混合することによりウィルス粒子を洗浄した。再度、217,000 \times g、4°C で 4 時間遠心分離し、同様に上清を除いた後、得られた沈殿を滅菌した精製水 (Millipore 社製, milliQ (登録商標), 300 μ L) に溶解した。当該溶液を 1.5 mL 容エッペンドルフチューブに移し、プロテイナーゼ K と 10% サルコシルを、それぞれ最終濃度が 1 mg/mL および 1 w/v % となるように加え、55°C にて 1.5 時間インキュベートした。その後、常法を用いてフェノール/クロロホルム処理とクロロホルム処理を行い、得られた上清に、その 10 分 1 量の 3 M 酢酸ナトリウム (pH 4.8) を加え、さらにその 2.5 倍量のエタノールを加えた。当該溶液を -80°C にて 1 時間静置した。その後、微量高速遠心機 (KUBOTA 社製, KUBOTA3740) を用いて 14,000 rpm、4°C で 10

分間遠心分離を行い、得られた沈殿を70%エタノールで洗浄した後、乾燥させた。これを滅菌milliQ水(20 μ L)に溶解してDNA溶液を得た。さらに、上記文献(Tomaru, Y.ら(2008))に記載のCetyl trimethyl ammonium bromide法(CTAB法)を用いて精製した。まず、上記DNA溶液にTEバッファー(10mM Tris-HCl(pH8.0), 1mM EDTA(pH8.0))を加え、その全量を200 μ Lにした。当該DNA溶液にCTAB溶液(1.6M NaCl, 0.1M EDTA, 2w/v% CTAB, 200 μ L)を加え、65 $^{\circ}$ Cにて1時間インキュベートした。当該溶液にクロロホルム(400 μ L)を加え、5分間振とう攪拌した後、前述した微量高速遠心機を用いて14,000rpm、4 $^{\circ}$ Cで10分間遠心分離した。当該溶液に2倍量のエタノールを加え、-80 $^{\circ}$ Cにて1時間静置した。その後、同微量高速遠心機を用いて14,000rpm、4 $^{\circ}$ Cで10分間遠心分離し、得られた沈殿を70%エタノールにより洗浄した後、乾燥させた。当該沈殿を滅菌milliQ水(300 μ L)に溶解し、DNA溶液とした。

[0045] (2) CdebDNAウィルスプロモーターの分離

上記(1)で得たCdebDNAウィルスのゲノムDNAの配列情報を、Blast(DDBJ)を用いてデータベースと比較し、さらにORFinder(NCBI)を用いて、CdebDNAウィルスDNAに含まれるORFを検索し、ウィルスの複製に関係すると考えられるタンパク質をコードする領域を検出した。この配列中の翻訳開始点と思われるATG配列の上流+107から-370の領域を、CdP1L/attB1プライマー(配列番号2)およびCdP1-2R/attB4プライマー(配列番号3)を用いたPCR反応により増幅させた。なお、配列番号2における5~31の塩基配列および配列番号3における5~29の塩基配列は、後述するプラスミドの構築のためのBPクローゼ反応に必要なattB配列を示す。また、得られたCdebDNAウィルスプロモーターの塩基配列を配列番号1に示す。なお、配列番号1に示されているATGは開始コドンであり、プロモ

ーターには含まれない。

[0046] PCR反応の条件を以下に示す。PCR反応液として、10×バッファー（TAKARA社製、5 μ L）、dNTP Mix（TAKARA社製、4 μ L）、Ex Taq（TAKARA社製、0.25 μ L、5 U/ μ L）、Cde b DNAウィルスのゲノムDNA（1 μ L）、および2種のプライマー（10 pmol/ μ L、各5 μ L）を混合し、最後に滅菌milliQ水を全量が50 μ Lとなるように添加混合した。次いで、98.0°Cで10秒間、45.0°Cで30秒間、72.0°Cで60秒間のサイクルを40回繰り返し、最後に72.0°Cで5分間反応させた。

[0047] フラグメントの増幅を確認するために電気泳動を行った。電気泳動には、TAEバッファー（トリス酢酸緩衝液）と、アガロースS（ニッポンジーン社製）1.5%ゲルを用いた。電気泳動用試料として、PCR産物各9 μ Lに10×ローディングバッファー（TAKARA社製）を1 μ Lずつ添加し、混合したものを用いた。また、DNA分子量マーカーとして100 bpラダー（TOYOBO社製、コードNo. DNA-030X、2 μ L）を用い、同時に泳動した。また、Mupid電気泳動槽（ADVANCE社製）を用い、100Vの条件下で約30分間泳動した。泳動終了後、臭化エチジウムを用い、定法（Sambrook and Russell 2001）により染色し、紫外線照射下で写真撮影を行った。

[0048] 実施例2 本発明に係るCde b DNAウィルスプロモーターを含むベクターの調製

(1) 各エンタリークローンプラスミドの調製

上記実施例1で得たCde b DNAウィルスプロモーター、導入遺伝子としてゼオシン耐性遺伝子（ble）（Drocourt, D. ら, Nucleic Acids Research, 18, p. 4009 (1990)）、およびCylindrotheca fusiformisのfcptターミネーター（Poulsen, N. ら, FEBS Journal, 272, pp. 3413-3423 (2005)）がそれぞれ導入されたエンタリークローンプラスミドベクターを、Multisite Gateway（登録商標）Pro Kit（Invitrogen社製）を用いて調

製した。

[0049] 詳しくは、プラスミドの構築のためのクロナーゼ反応に必要な *attB* 配列を有する、上記実施例 1 で得た *CdeB* DNA ウィルスプロモーター溶液を、30%PEG8000/30mM塩化マグネシウム溶液 (*invitrogen*社製) で精製した。即ち、*CdeB* DNA ウィルスプロモーター溶液 (25 μ L) に、滅菌 *milliQ* 水 (75 μ L) を加えて 100 μ L の溶液とした。当該溶液に 30%PEG8000/30mM塩化マグネシウム溶液 (50 μ L) を加えて混合し、微量高速遠心分離機 (KUBOTA社製, KUBOTA3740) を用いて 14,000 rpm で 15 分間遠心分離した。その後、上清を取り除き、得られた沈殿を滅菌 *milliQ* 水 (10 μ L) に溶解した。次に、当該溶液 (50 fmol) とドナーベクター (*invitrogen*社製, *pDONR221P1-P4*, 100 ng/ μ L) を混合し、当該溶液へ滅菌 *milliQ* 水を加えることにより計 8 μ L の混合液とした。なお、当該ドナーベクターは、プラスミドの構築のための *BP* クロナーゼ反応に必要な *attP* 配列を有する。当該混合液へ、さらに *BP* クロナーゼ (商標) II Enzyme Mix (*invitrogen*社製, 2 μ L) を加えて混合し、25°C で 1 時間反応させた。その後、反応液にプロテイナーゼ K (*invitrogen*社製, 1 μ L) を加え、37°C で 10 分間処理した。当該反応液 (2.5 μ L) を、One Shot (登録商標) Mach1 (登録商標) T1^R chemically competent cells (*invitrogen*社製, 25 μ L) に混合し、氷上にて 30 分間静置した。その後、42°C にて 30 秒間ヒートショック処理を行い、直ちに氷上に移し、2 分間静置した。次いで、SOC (*invitrogen*社製, 250 mL) を加え、37°C にて 1.5 時間振とう培養した。培養した菌液 (275 μ L) を、50 μ g/mL カナマイシンを含む LB 寒天培地 (1%トリプトン, 0.5%イーストエキストラクト, 1%NaCl, 1.5%アガー) に塗抹した。当該培地をマルチシェーカーオープン (タイテック社製) 内で 37°C にて一晩 (10 時間程度) 倒置培養した。得られたコロニーは、白金耳を用いて LB 液体培地 (10 mL) に

植菌し、37°Cにて一晩振とう培養した。当該培養液（3 mL）より、Pure Yield Plasmid Miniprep System（Promega社製）を用いて、LRクローナーゼ反応に必要なattL配列を有するCde b DNAウィルスプロモーターが導入されたエンタリークローンプラスミドを抽出した。

[0050] また、プラスミドの構築のためのBPクローナーゼ反応に必要なattB配列を有するゼオシン耐性遺伝子（ble）を上記実施例1と同様に増幅し、上記と同様にしてBPクローナーゼ反応に必要なattP配列を有するドナーベクターであるpDONR221 P4r-P3rへ導入し、LRクローナーゼ反応に必要なattL配列を有する抗生物質耐性遺伝子が導入されたエンタリークローンプラスミドを得た。

[0051] さらに、プラスミドの構築のためのBPクローナーゼ反応に必要なattB配列を有するCylindrotheca fusiformisのfcpターミネーターを上記実施例1と同様に増幅し、上記と同様にしてBPクローナーゼ反応に必要なattP配列を有するドナーベクターであるpDONR221 P3-P2へ導入し、LRクローナーゼ反応に必要なattL配列を有するターミネーターが導入されたエンタリークローンプラスミドを得た。

[0052] （2） ディスティネーションプラスミドの調製

Gateway（登録商標） Vector Conversion System with One Shot（登録商標） ccdB Survival（登録商標） Competent Cells（invitrogen社製）を用いて、pBluescript SK-（Stratagene社製）へLRクローナーゼ反応に必要なattR配列を持つReading Frame Cassetteを組み込むことにより、ディスティネーションプラスミドを調製した。

[0053] まず、pBluescript SK-（2 μg）に対し、制限酵素EcoRI 20U（TOYOBO社製、10U/μL）を用いて、37°Cにて3時間消化した。当該反応液へ常法に従ってエタノールを添加することにより、DNAを沈殿させて回収した。次に、T4DNAポリメラーゼを用いて末端を平滑化した。即ち、回収したDNAへ、10×バッファー（5 μL）、2.5 mM dNTP（TAKARA社製、2 μL）、T4DNAポリメラーゼ（TOYOBO

〇社製, 0.5 U/μL, 1 μL) および滅菌milliQ水 (42 μL) を加え、計50 μLとなるように反応液を調製した。この反応液を12°Cにて15分間インキュベートした。この反応液に滅菌milliQ水 (350 μL) を直ちに加え、常法に従ってフェノール/クロロホルム処理とクロロホルム処理をした後、続いてエタノール沈殿を行ってDNAを回収した。次に、制限酵素にて切断したプラスミドの再環状化を防ぐために、CIAP (TAKARA社製, Calf intestine Alkaline Phosphatase) を用いて、その切断断片の5'末端の脱リン酸処理を行った。平滑化処理を施したDNAに10×CIAPバッファー (5 μL) とCIAP (0.1 U/μL, 1 μL) を加え、滅菌milliQ水により計50 μLになるように反応液を調製した。当該反応液を37°Cにて15分間、続いて56°Cにて15分間インキュベートした後、CIAP (0.1 U/μL, 1 μL) を再び加え、37°Cにて15分間、続いて56°Cにて15分間インキュベートした。当該反応液に、10% SDS溶液 (2.5 μL)、500 mM EDTA溶液 (0.5 μL)、プロテイナーゼK溶液 (20 mg/μL, 0.5 μL) をそれぞれ加えた後、56°Cにて30分間、続いて75°Cにて10分間インキュベートした。その後、常法に従ってフェノール/クロロホルム処理とクロロホルム処理を施した。次に、エタノール沈殿によりDNAを回収し、滅菌milliQ水 (10 μL) に溶解した。

- [0054] 得られた平滑末端を有するpBluescript SK⁻と、Reading Frame Cassette A (Invitrogen社製, RfA) とを混合し、pGEM-T Vector Systems Kit (Promega社製) 添付のT4 DNAリガーゼを用いて連結した。まず、オートクレーブ滅菌した0.2 mL容のPCR用チューブに、2×ラピッドライゲーションバッファー (Promega社製, 5 μL)、pBluescript SK⁻ (100 ng/μL, 0.5 μL)、RfA (5 ng/μL, 2 μL)、T4 DNAリガーゼ (Promega社製, 3 U/μL, 1 μL) および滅菌milliQ水 (1.5 μL) を加え、計10 μLとなるように反応液を調製した。この反応液を室温にて1時間保存し、4°Cにて一晩 (16

時間以上) インキュベートした。このライゲーション溶液 (5 μ L) を ccdB Survival Competent Cells (i n v i t r o g e n 社製, 50 μ L) に混合し、氷上にて30分間静置した。その後、42°Cにて30秒間ヒートショック処理を行い、直ちに氷上に移し、2分間静置した。次いでSOC (250 mL) を加え、37°Cにて1.5時間振とう培養した。培養した菌液 (300 μ L) を、25 μ g/mL クロラムフェニコールおよび50 μ g/mL アンピシリンを含むLB寒天培地に塗抹した。当該培地をマルチシェーカーオーブン内で37°Cにて一晩倒置培養した。

[0055] 得られたコロニーは、白金耳を用いてLB培地 (10 mL) に植菌し、37°Cにて一晩振とう培養した。当該培養液 (3 mL) より、Pure Yield Plasmid Miniprep System (P r o m e g a 社製) を用いて、ディステネーションプラスミドを抽出した。

[0056] (3) エクスプレッションクローンプラスミドベクターの調製

Multisite Gateway Pro Kit (i n v i t r o g e n 社製) を用い、上記実施例2 (1) で得たエントリークローンプラスミドと、上記実施例2 (2) で得たディステネーションプラスミドとの間でLRクロナーゼ反応を行うことにより、プロモーター、抗生物質耐性遺伝子およびターミネーターが連結されたエクスプレッションクローンプラスミドベクターを調製した。

[0057] 具体的には、プロモーター、抗生物質耐性遺伝子、ターミネーターがそれぞれ組み込まれた3種のエントリークローンプラスミド (それぞれ10 fmol) とディステネーションベクター (20 fmol) を混合し、さらに滅菌milliQ水を加えることにより計8 μ Lの混合液を調製した。当該液にLR Clonase II PLUS Enzyme Mix (i n v i t r o g e n 社製, 2 μ L) を加えて混合し、25°Cにて16時間を反応させた。その後、当該反応液にプロテイナーゼK (i n v i t r o g e n 社製, 1 μ L) を加え、37°Cにて10分間処理した。当該反応液 (2.5 μ L) を、One Shot (登録商標) Mach1 (登録商標) T1^R chemically competent cells (i n v i t r o g e n 社製, 25 μ L) に混合し、氷上にて30分間静置した。次いで

4℃にて30秒間ヒートショック処理を行い、直ちに氷上に移して2分間静置した。その後、SOC(250mL)を加え、37℃にて1.5時間振とう培養した。培養した菌液(275μL)を、50μg/mLアンピシリンを含むLB寒天培地に塗抹した。当該培地をマルチシェーカーオーブン内で37℃にて一晩倒置培養した。得られたコロニーを、白金耳を用いてLB培地(10mL)に植菌し、37℃にて一晩振とう培養した。当該培養液(3mL)より、Pure Yield Plasmid Miniprep System(Promega社製)を用いてエクスペクションクロンプラスミドベクターを抽出した。

[0058] (4) DNA配列の確認

目的とするエクスペクションクロンプラスミドベクターが作製されたことを確認するために、Dideoxy法を用いて塩基配列を決定した。

[0059] 上記実施例2(3)にて調製したエクスペクションクロンプラスミドベクター(200ng)を鋳型として用いて、サイクルシーケンシングPCRを行った。その反応条件を以下に示す。反応液(10μL)は、鋳型DNA(100ng/μL, 2μL)、Big Dye Terminator Cycle Sequencing ver. 3.1(Applied Biosystems社製, 0.5μL)、5×シーケンシングバッファー(2μL)、プライマー(1.6pmol/μL, 0.66μL)、滅菌蒸留水(4.84μL)からなる。プライマーは、M13M3プライマー(配列番号4)を用いた。反応条件としては、95℃で5分間加熱した後、96℃で10秒、50℃で5秒、60℃で4分の反応を40サイクル行った。反応後、反応液を1.5mL容のエッペンドルフチューブに移し、3M酢酸ナトリウム(1μL)、99.5%エタノール(25μL)および125mMEDTA溶液(1μL)を加え、指ではじきよく混合させた後、15分間室温で放置した。14,000rpm、4℃で20分間遠心分離後、上清をイエローチップで丁寧に除き、70%エタノール(35μL)を加え、よく混合した。再び、14,000rpm、4℃で10分間遠心分離した後、上清をイエローチップで完全に除去し、蓋を開けたまま室温で10分間放置して沈殿を乾燥させた。

[0060] 乾燥させたペレットにホルムアミド (Applied Biosystems社製, 10 μ L) を加え、高知大学総合研究センター遺伝子実験施設内のABI PRISM (登録商標) 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems社製) を用いて解析した。あらかじめ、遺伝子解析ソフトVector NTI Advance Ver10.0 (Invitrogen社製, <http://www.invitrogen.com/vntigateway>) を用いて、ディスティネーションプラスミドの塩基配列に、プロモーター、抗生物質耐性遺伝子およびターミネーターの塩基配列を組み込むことにより、エクスペクションクロンプラスミドベクターの塩基配列を作成した。次に、このコンピューター上にて作成したエクスペクションクロンプラスミドベクターの塩基配列と、上記の方法により実験的に決定したエクスペクションクロンプラスミドベクターの塩基配列とを、Vector NTI Advance Ver10.0のAlignXを用いてアライメントを行うことにより比較することにより、上記実施例2(3)で調製したエクスペクションクロンプラスミドベクターに目的遺伝子が導入されていることを確認した。

[0061] 得られたエクスペクションクロンプラスミドベクターの構造を図1に示す。

[0062] 実施例3 本発明に係るCde b DNA ウィルスプロモーターを含むベクターの調製

抗生物質耐性遺伝子としてノールセオスリシン耐性遺伝子 (nat) (Krugelら, 1993年) を用い、ターミネーターとしてThalassiosira pseudonana由来のfcpターミネーター (Poulsen, N. ら, Journal of Phycology, 42, pp. 1059-1065 (2006)) を用い、上記実施例2と同様にCde b DNA ウィルスプロモーターを含むベクターを調製した。

[0063] 得られたエクスペクションクロンプラスミドベクターの構造を図2に示す。

[0064] 比較例1~4 従来ウィルスプロモーターを含むベクターの調製

上記実施例2と同様にして、羽状目珪藻の内在性プロモーターを有し、ま

た、抗生物質耐性遺伝子としてゼオシン耐性遺伝子 (ble) とターミネーターとして *Cylindrotheca fusiformis* の fcpターミネーターが導入されたプラスミドベクター (比較例 1)、および、中心目珪藻の内在性プロモーターを有し、また、抗生物質耐性遺伝子としてノールセオスリシン耐性遺伝子 (nat) とターミネーターとして *Thalassiosira pseudonana* 由来の fcpターミネーターが導入されたプラスミドベクター (比較例 2) を調製した。

[0065] また、上記実施例 2 と同様にして、カリフラワーモザイクウイルス由来のプロモーター (CaMVプロモーター) を有し、また、抗生物質耐性遺伝子としてゼオシン耐性遺伝子 (ble) とターミネーターとして *Cylindrotheca fusiformis* の fcpターミネーターが導入されたプラスミドベクター (比較例 3)、および、抗生物質耐性遺伝子としてノールセオスリシン耐性遺伝子 (nat) とターミネーターとして *Thalassiosira pseudonana* 由来の fcpターミネーターが導入されたプラスミドベクター (比較例 4) を調製した。

[0066] 実施例 4 羽状目珪藻の形質転換

上記実施例 2、上記比較例 1 および上記比較例 3 のプラスミドベクターを用い、羽状目珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* を形質転換した。

[0067] 具体的には、各プラスミドベクターを平均粒子径 1.1 μm のタングステン粒子 M17 に付着させた。別途、羽状目珪藻 *P. tricornutum* を 1 プレートあたり 5×10^7 cells を固相培地に塗抹した。パーティクルガン (Bio-Rad 社製, Biolistic PDS-1000/He Particle Delivery System) を用い、上記タングステン粒子を、He ガス圧 1350 psi または 1100 psi で細胞に打ち込んだ。次いで、ゼオシン 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を含む 1.0% 寒天 f/2 培地にて当該細胞を培養した。結果を表 1 に示す。

[0068] また、上記抗生物質含有培地で生育した細胞のコロニーが形質転換していることを、PCR にて確認した。生育した細胞のコロニーを 100 mL の培地を用いて培養し、藻類細胞を回収した後、上記実施例 1 (1) と同様の方法によりゲノム DNA を抽出した。得られたゲノム DNA を鋳型とし、導入した抗生物質耐性遺伝子 (ble) に特異的なプライマーを用いて PCR を行っ

た。PCR反応の条件は、基本的には上記実施例1(2)と同様とし、サイクル数は40サイクル、アニーリング温度は60℃とした。得られた増幅DNAを分析した電気泳動写真を図3に示す。

[0069] 図3中、「M」は分子量マーカーであり、「1」は抗生物質遺伝子(b l e)が導入されたプラスミドベクターのレーン、「2」は*P. tricornutum*野生株のレーン、「3~5」はカリフラワーモザイクウイルス由来のプロモーターと抗生物質遺伝子(b l e)を含むプラスミドベクターで形質転換した株のレーン、「6~8」は本発明に係るプロモーターと抗生物質遺伝子(b l e)を含むプラスミドベクターで形質転換した株のレーンである。

[0070] 実施例5 中心目珪藻の形質転換

上記実施例3、上記比較例2および上記比較例4のプラスミドベクターを用い、上記実施例4と同様にして、中心目珪藻*Chaetoceros* sp. を形質転換した。ただし、細胞を培養する培地には、500 μg/mLノールセオスリシンを添加した。結果を表1に示す。

[0071] [表1]

海産藻類	プロモーター	全細胞数10 ⁸ 当たりの平均形質転換細胞数(n=2)
羽状目珪藻(<i>P.tricornutum</i>)	羽状目珪藻内在性プロモーター	69
中心目珪藻(<i>Chaetoceros</i> sp.)	中心目珪藻内在性プロモーター	1.0
羽状目珪藻(<i>P.tricornutum</i>)	カリフラワーモザイクウイルスプロモーター	8.0
中心目珪藻(<i>Chaetoceros</i> sp.)		0
羽状目珪藻(<i>P.tricornutum</i>)	本発明プロモーター	5.0
中心目珪藻(<i>Chaetoceros</i> sp.)		1.0

[0072] また、上記抗生物質含有培地で生育した細胞のコロニーが形質転換していることを、上記実施例4と同様にしてPCRにて確認した。得られた増幅DNAを分析した電気泳動写真を図4に示す。

[0073] 図4中、「M」は分子量マーカーであり、「1」は抗生物質遺伝子(n a t)が導入されたプラスミドベクターのレーン、「2」は*Chaetoceros* sp. 野生株のレーン、「3~4」は本発明に係るプロモーターと抗生物質遺伝子(n a t)を含むプラスミドベクターで形質転換した株のレーンである。

[0074] 実施例6 本発明に係るプロモーターのCore element領域の

特定

配列番号3のプライマーに加え、配列番号6～9のプライマーを用いた以外は上記実施例1と同様にして、C d e b DNA ウィルスの複製に関係すると考えられるタンパク質をコードする領域の翻訳開始点の上流部位である+107から、-72、-32、-2および+34までの塩基のDNA断片を、それぞれ増幅した。これらのエンタリークローンと、上記実施例3において調製したノールセオスリシン耐性遺伝子 (n a t) を含むエンタリークローンおよびThalassiosira pseudonana由来のf c pターミネーターを含むエンタリークローンを用い、上記実施例2と同様にして、上記各エンタリークローン、n a t およびf c pターミネーターを連結したプラスミドを調製した。これらプラスミドは、図2と同様の構造を有する。これらプラスミドに加え、比較例2のプラスミドと、プロモーターを連結していないプラスミド (p N a t / T p f c p T e r) を用い、上記実施例4と同様の方法により形質転換を行った。結果を図5に示す。

- [0075] 図5のとおり、上記複製タンパク質遺伝子の翻訳開始点の上流部位における+107から-370までの塩基配列 (配列番号1) および+107から-72までの塩基配列をプロモーターとして用いた場合には形質転換できた一方で、+107から-32、-2および+34までの塩基配列をプロモーターとして用いた場合には、形質転換できなかった。かかる結果により、藻類の形質転換に有用なCore elementは、上記複製タンパク質遺伝子の翻訳開始点の上流部位における-72から-33の間の配列 (配列番号5) に存在している可能性が高いと結論付けられた。なお、形質転換が偶然起こっている可能性もあるため、プロモーターを有しないプラスミドでも同様の実験を行ったが、形質転換率は無視できる程度のものであった。また、中心目のプロモーターを用いて同様の実験を行ったところ、本発明プロモーターを用いた場合の方が、形質転換効率は明らかに高かった。

- [0076] 実施例7 本発明プロモーターによる様々な海産藻類の形質転換
本発明のプロモーターが、様々な珪藻種に対して適用か否か確認するため

に、上記実施例と異なる羽状目珪藻である*C. fusiformis*を用いて形質転換を行った。*C d e b* DNA ウィルスの複製に関係すると考えられるタンパク質をコードする領域の翻訳開始点の上流部位である+107から-72までの塩基に加え、ゼオシン耐性遺伝子 (*b l e*) と、*C. fusiformis* の *f c p* 遺伝子由来のターミネーターを組み込んだプラスミド (図6) を用いた。上記実施例4と同様に、プラスミドをタングステン粒子に固定化し、形質転換を行った。対照として、上記プロモーターを組み込まない以外は同様のプラスミド (*p B l e / C f f c p T e r*) を用い、同様の実験を行った。本発明プロモーターを組み込んだプラスミドを用いた場合の珪藻の写真を図7(1)に、本発明プロモーターを組み込んでいないプラスミドを用いた場合の珪藻の写真を図7(2)に示す。

[0077] 図7(2)のとおり、本発明プロモーターを組み込んでいない場合、おそらく形質転換されていないため、抗生物質により珪藻は死滅してしまった。それに対して本発明プロモーターを用いた場合、図7(1)のとおり、珪藻は形質転換されて抗生物質耐性を獲得したため、良好に生存している。このように上記実施例で用いた以外の珪藻も、本発明プロモーターを用いれば、形質転換が可能であることが明らかとなった。

[0078] 実験結果の考察

(1) 形質転換能について

上記実施例4~5の結果のとおり、羽状目珪藻の内在性プロモーターを用いた場合には、羽状目珪藻は良好に形質転換できる一方で、中心目珪藻は全く形質転換できなかった。植物一般の形質転換によく用いられるカリフラワーモザイクウィルスプロモーターの場合でも同様であり、羽状目珪藻は形質転換できたが、中心目珪藻は全く形質転換できていない。

[0079] それに対して、本発明に係るプロモーターを用いた場合には、羽状目珪藻については*P. tricornutum*と*C. fusiformis*の2種、中心目については*Chaetoceros* sp. を形質転換することができた。これら3種の珪藻は、珪藻綱全体の分子系統樹において、それぞれの目の中でも系統的に離れた分類群に属する

ものである。よって、これらの種に適用可能な本発明プロモーターは、様々な珪藻に適用可能と考えられる。

[0080] 以上の結果により、珪藻は羽状目珪藻と中心目珪藻に大きく分類されるところ、従来のプロモーターの特異性が高いのに対して、本発明に係るプロモーターは特異性が低く、様々な珪藻の効率的な形質転換に幅広く用いられ得ることが示された。

[0081] (2) 本発明プロモーターの塩基配列について

一般的に、真核生物のプロモーター領域には、転写を開始させる転写結合因子が結合するコアプロモーター領域と、その上流に位置する遺伝子転写調節領域が存在する。ウィルスプロモーターにおいても同様に、TATAボックス(5'-TATAWAW-3' (式中、WはAまたはTを表す))やイニシエーターエレメント(Inr)といった真核生物のコアプロモーター領域によく見られるモチーフ配列が存在することが知られている。このことを踏まえ、本発明に係る配列番号1のプロモーターの塩基配列をPLACE Signal Scan Search (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>)を用いて解析し、比較した。

[0082] その結果、本発明プロモーターにTATAボックスは見られなかったが、上流領域にCAATボックスIである5'-CAAT-3' (-97~-94)、GATAボックスである5'-WGATAR-3' (-162~-167)、さらにイニシエーターエレメントであると考えられる5'-CCA₊₁TACC-3' (-2~+5)を見出した。

[0083] このイニシエーターエレメントは、哺乳類の5'-YYA₊₁NWYY-3' (Javahery, R. ら, Molecular and Cellular Biology, 14, pp. 116-127 (1994))、卵菌類の5'-YCA₊₁TTY-3' (McLeod, A. ら, Eukaryotic Cell, 3, pp. 91-99 (2004))、ショウジョウバエの5'-TCA₊₁KTY-3' (式中、KはGまたはTを表す) (Purnell, B. A. ら, Genes & Development, 8, pp. 830-842 (1994))、トリコモナスの5'-TCA₊₁YW-3' (Liston, D. R. ら, Molecular and Cellular Biology, 19, pp. 2380-

2388 (1999))、および*C. fusiformis*のプロモーターである *fcpA-1A* 中の 5' -CCA_nTTCC-3' (Poulsen, N. ら, FEBS Journal, 272, p. 3413-3423 (2005)) という *Inr* 配列に類似している。

[0084] これら情報からは、配列番号1のプロモーター中に見出されたイニシエーターエレメントが、*Core element*として羽状目珪藻と中心目珪藻の両方に働き、形質転換できたとも考えられる。しかし、当該イニシエーターエレメントに類似する*C. fusiformis*のプロモーターである *fcpA-1A* を用いても、中心目珪藻を形質転換することはできない。

[0085] よって、本発明に係るポリヌクレオチド(1)が高い形質転換能を示すのは、少なくともTATAボックスやイニシエーターエレメントなどのためではなく、全く未知の配列が*Core element*として働いている可能性が高い。

[0086] (3) 本発明プロモーターの*Core element*について

上記実施例6の結果により、本発明プロモーターの*Core element*は、*CdebDNA*ウィルスの複製に関係すると考えられるタンパク質をコードする領域の-72から-33の間の配列(配列番号5)に存在している可能性が高いと考えられる。配列番号5の配列は、当該複製タンパク質遺伝子上流域に位置するイニシエーターエレメントのおよそ30から70塩基上流側に位置していることから、当該イニシエーターエレメントが*Core element*として機能したとは考え難い。当該配列番号5の配列番号をPLACE Signal Scan Search (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>)で解析したが、既知のモチーフ配列を見出すことはできなかった。よって、本発明プロモーターの*Core element*は、これまで知られていない新規なものであると考えられる。

[0087] 上記の実験結果のとおり、本発明プロモーターを用いれば目を超えて珪藻類を形質転換可能である理由として、配列番号5の配列に含まれる新規な配列が*Core element*として機能したと考えられる。

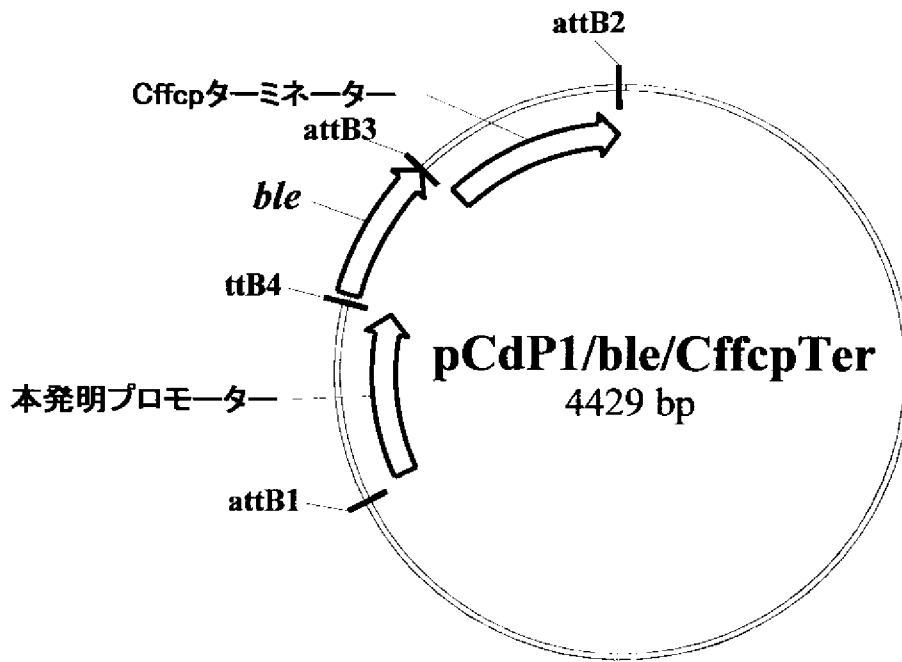
産業上の利用可能性

[0088] 本発明に係るプロモーターを含むベクターを用いれば、様々な種類の藻類を効率的に形質転換し得る。よって本発明を用いれば、高い光合成能を有し、有用物質の産生能を有するなど優れた特性を有する上に、多量に存在するものでありながら、形質転換が難しくこれまで十分にその技術が検討されていなかった藻類を、“目（モク）”などを超えて幅広く且つ効率的に形質転換することが可能となる。

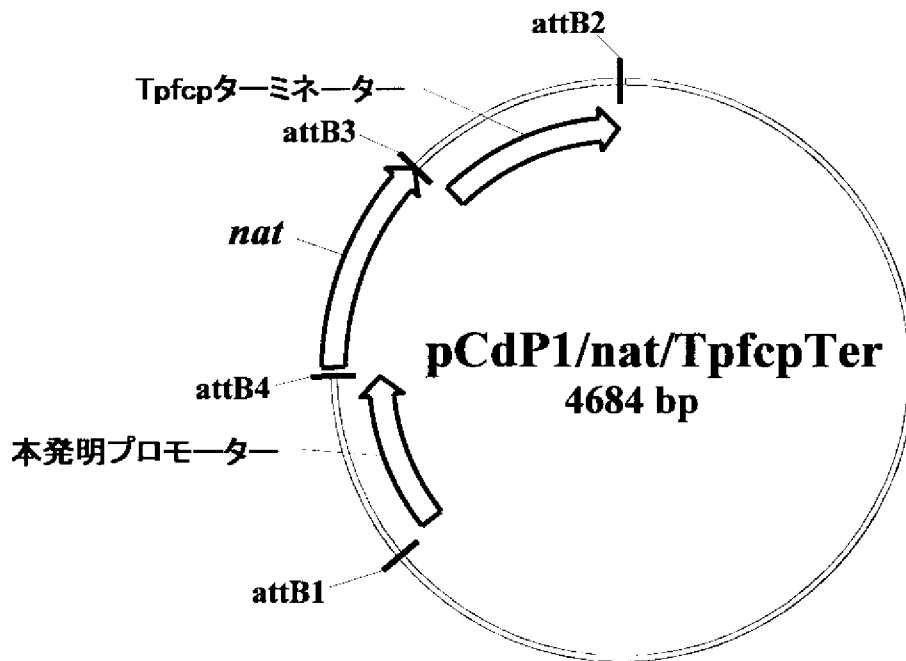
請求の範囲

- [請求項1] 下記(1)～(3)の何れかの構造を有することを特徴とするプロモーター。
- (1) C d e b DNAウィルスの複製に関与するタンパク質をコードする遺伝子上流に位置する非コード領域を構成するポリヌクレオチド
- (2) 上記ポリヌクレオチド(1)の1または複数のヌクレオチドが欠失、置換または付加されたポリヌクレオチドであり、且つ任意のタンパク質をコードする遺伝子の発現を藻類細胞内で活性化するポリヌクレオチド
- (3) 上記ポリヌクレオチド(1)とストリンジントな条件でハイブリダイズし、且つ任意のタンパク質をコードする遺伝子の発現を藻類細胞内で活性化するポリヌクレオチド
- [請求項2] 上記ポリヌクレオチド(1)が配列番号5の塩基配列を有するものである請求項1に記載のプロモーター。
- [請求項3] 上記ポリヌクレオチド(1)が配列番号1の塩基配列を有するものである請求項1に記載のプロモーター。
- [請求項4] 請求項1～3のいずれかに記載のプロモーター、および任意のタンパク質をコードする遺伝子を含有することを特徴とするベクター。
- [請求項5] 請求項4に記載のベクターを調製する工程；および上記ベクターを藻類細胞へ導入する工程；を含むことを特徴とする藻類の形質転換方法。

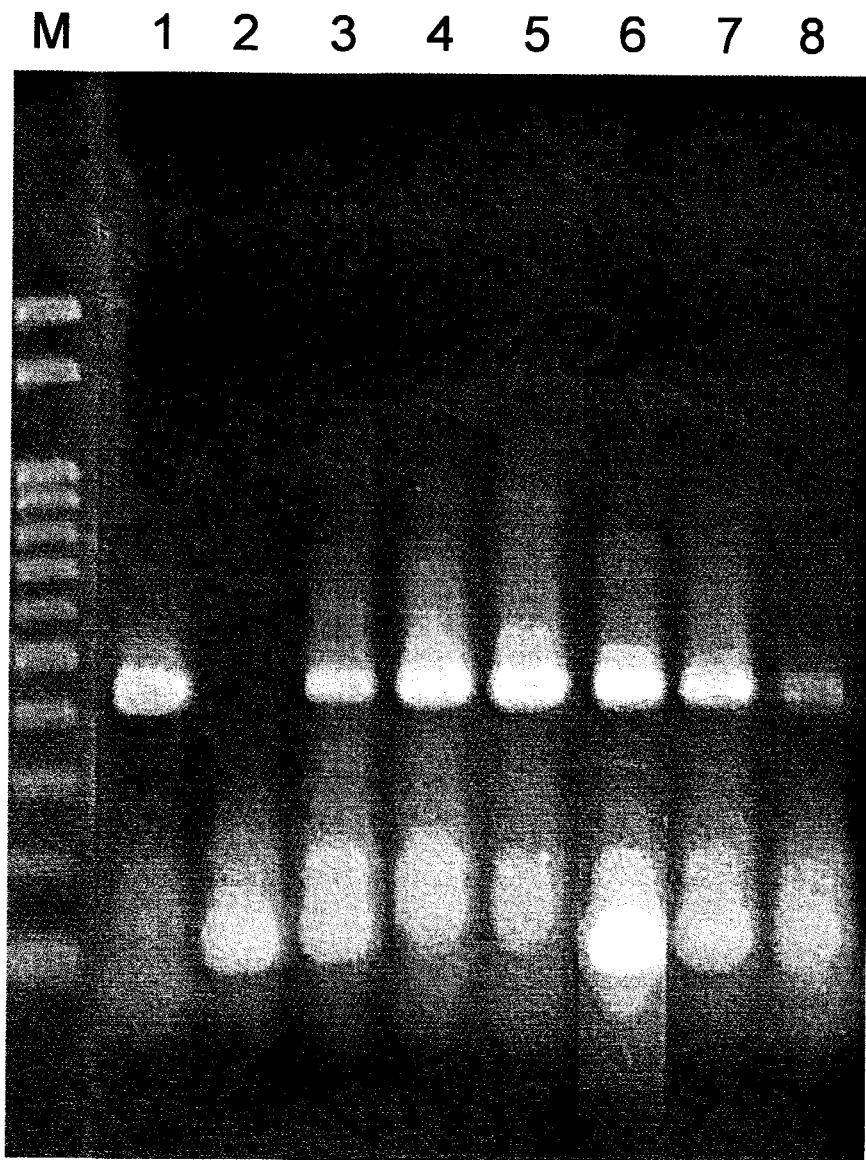
[図1]



[図2]

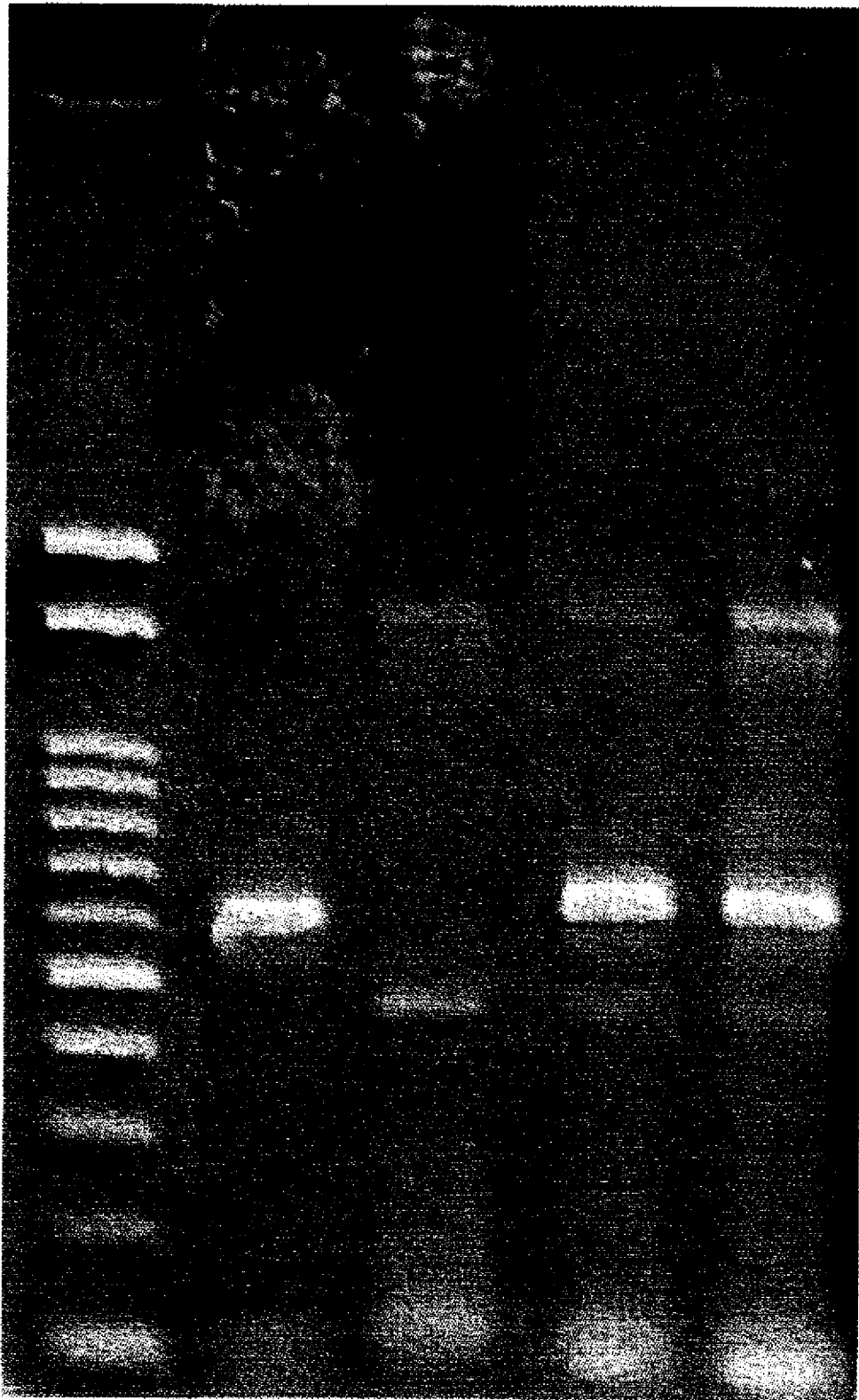


[3]

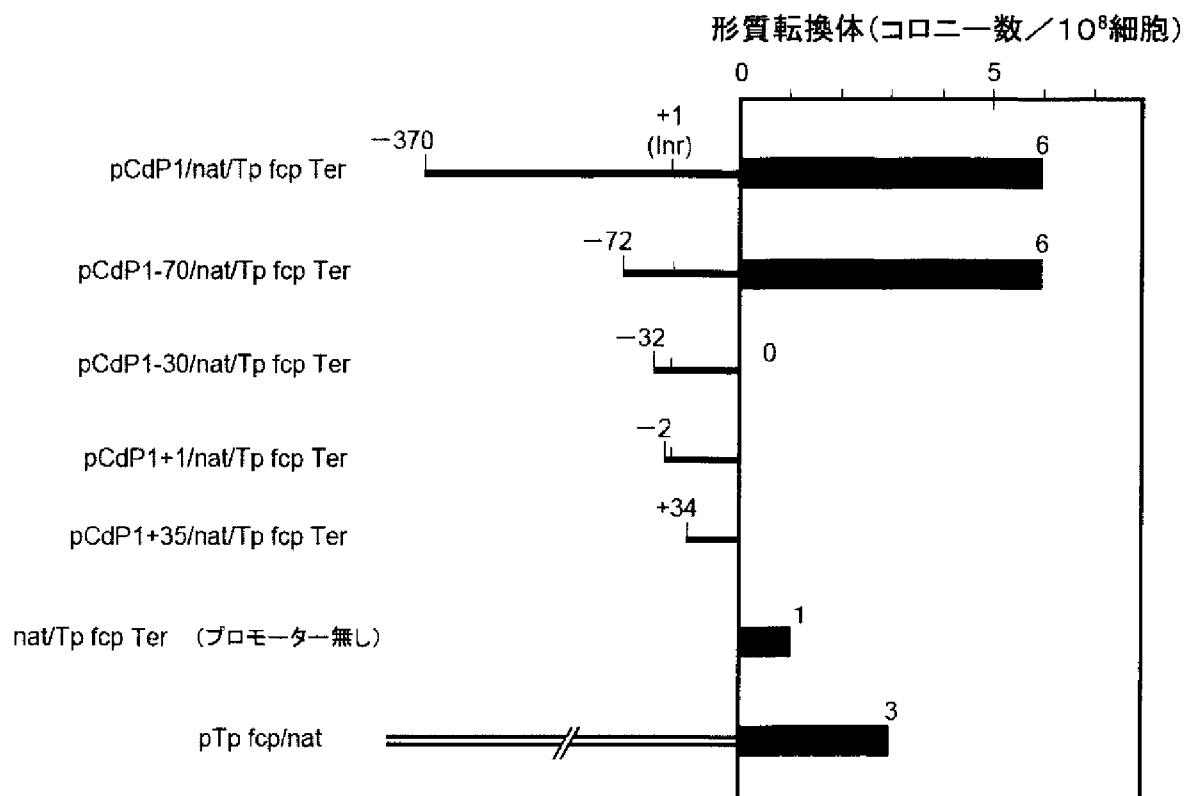


[圖4]

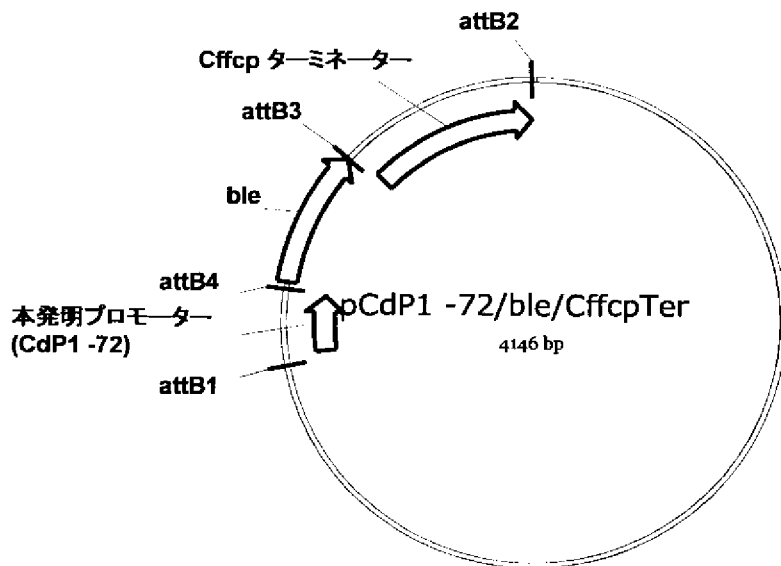
M 1 2 3 4



[図5]



[図6]



[7]

(2)



(1)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/050843

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N15/09(2006.01) i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N15/09		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2010 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2010 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2010		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	TOMARU, Y. et al., Isolation and characterization of a new single-stranded DNA virus infecting the cosmopolitan marine diatom <i>Chaetoceros dehilis</i> . AQUATIC MICROBIAL ECOLOGY (2008) Vol.50 pp.103-112	1-3
Y	Takashi YOSHIDA et al., "Cyanophage Ma-LMM01 no Tensha Chosetsu Ryoiki to sono Kansen Katei ni Okeru Idenshi Tensha Kaiseki", The Japanese Society of Virology Gakujutsu Shukai Program Shoroku-shu (2007), vol.55, page 415	1-3
Y	KANG, M. et al., The regulation activity of <i>Chlorella</i> virus gene 5' upstream sequence in <i>Escherichia coli</i> and eucaryotic alage. Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao (2000) Vol.16 pp.443-446	4,5
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 08 April, 2010 (08.04.10)		Date of mailing of the international search report 20 April, 2010 (20.04.10)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/050843

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MITRA, A. et al., A Chlorella virus gene promoter functions as a strong promoter both in plants and bacteria. Biochem Biophys Res Commun. (1994) Vol.204 pp.187-194	4, 5
Y	JUNG, H.K. et al., Activity of early gene promoters from a Korean Chlorella virus isolate in transformed Chlorella algae. Journal of Microbiology and Biotechnology (2006) Vol.16 pp.952-960	4, 5
P, X	Arisa MIYAKAWA et al., "Sorui Kansensei Virus Promoter o Mochiita Kaisan Keiso no Keishitsu Tenkankei no Kaihatsu", Japanese Society for Marine Biotechnology Taikai Koen Yoshishu (2009.5), vol.12, page 104	1-5

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2010年 日本国実用新案登録公報 1996-2010年 日本国登録実用新案公報 1994-2010年		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	TOMARU, Y. et al., Isolation and characterization of a new single-stranded DNA virus infecting the cosmopolitan marine diatom <i>Chaetoceros dehilis</i> . AQUATIC MICROBIAL ECOLOGY (2008) Vol.50 pp.103-112	1-3
Y	吉田天士 他, シアノファージ Ma-LMM01 の転写調節領域とその感染過程における遺伝子転写解析 日本ウイルス学会学術集会プログラム・抄録集 (2007) Vol.55 p.415	1-3
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 08.04.2010	国際調査報告の発送日 20.04.2010	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 小川 明日香 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4 B 3 8 4 5

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	KANG, M. et al., The regulation activity of Chlorella virus gene 5' upstream sequence in Escherichia coli and eucaryotic alage. Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao (2000) Vol.16 pp.443-446	4,5
Y	MITRA, A. et al., A Chlorella virus gene promoter functions as a strong promoter both in plants and bacteria. Biochem Biophys Res Commun. (1994) Vol.204 pp.187-194	4,5
Y	JUNG, H.K. et al., Activity of early gene promoters from a Korean Chlorella virus isolate in transformed Chlorella algae. Journal of Microbiology and Biotechnology (2006) Vol.16 pp.952-960	4,5
P,X	宮川亜利沙 他, 藻類感染性ウイルスプロモーターを用いた海産珪藻の形質転換系の開発 マリンバイオテクノロジー学会大会講演要旨集 (2009.5) Vol.12 p.104	1-5