

(19)日本国特許庁 (JP)

再公表特許 (A1)

(11)国際公開番号

WO 00 / 5 8 4 5 4

発行日 平成14年7月9日 (2002.7.9)

(43)国際公開日 平成12年10月5日 (2000.10.5)

(51)Int.Cl.⁷

識別記号

FI

C 1 2 N 15/09

C 1 2 N 15/00

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

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 28 頁)

出願番号 特願2000-608735(P2000-608735)
 (21)国際出願番号 PCT/JP99/01551
 (22)国際出願日 平成11年3月26日 (1999.3.26)
 (81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I T, LU, MC, NL, PT, SE), AU, CA, C N, JP, KR, US

(71)出願人 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 肥後 健一
 茨城県つくば市並木2-7-1-103-304
 (72)発明者 岩本 政雄
 茨城県つくば市天久保2-10-8
 (74)代理人 弁理士 山本 秀策

(54)【発明の名称】 薬と花粉で発現するプロモーター配列

(57)【要約】

薬および／または花粉において異種遺伝子を特異的に発現させるための植物発現用カセットが提供される。この発現用カセットは、配列番号1で示される配列、またはその一部を有する配列であって配列番号1の配列と同等のプロモーター活性を有する、イネCatA遺伝子プロモーターを含み、さらに、異種遺伝子がこのプロモーターと発現可能に接続されるように、異種遺伝子を挿入するための部位を含む。異種遺伝子を含む組換えプラスミド、および組換えプラスミドを用いて異種遺伝子を植物に導入する方法もまた提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 葯および / または花粉において異種遺伝子を特異的に発現させるための植物発現用カセットであって：

配列番号 1 で示される配列、またはその一部を有する配列であって配列番号 1 の配列と同等のプロモーター活性を有する、イネ C a t A 遺伝子プロモーター；
および

異種遺伝子が該プロモーターと発現可能に接続されるように、該異種遺伝子を挿入するための部位、
を含む、植物発現用カセット。

【請求項 2】 葯および / または花粉において異種遺伝子を特異的に発現させるための組換えプラスミドであって：

配列番号 1 で示される配列、またはその一部を有する配列であって配列番号 1 の配列と同等のプロモーター活性を有する、イネ C a t A 遺伝子プロモーター；
および

該プロモーターと発現可能に接続された異種遺伝子、
を含む、組換えプラスミド。

【請求項 3】 前記異種遺伝子が、葯および / または花粉の形成を阻害する機能を持つ、請求項 3 に記載の組換えプラスミド。

【請求項 4】 葯および / または花粉における特異的な発現が所望される異種遺伝子を植物に導入する方法であって：

請求項 2 に記載の組換えプラスミドで植物細胞を形質転換する工程；および
該形質転換された植物細胞を再分化させて、植物体を得る工程、
を包含する、方法。

【請求項 5】 前記異種遺伝子が、葯および / または花粉の形成を阻害する機能を持つ、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】 前記植物細胞が単子葉植物細胞である、請求項 4 または 5 に記載の方法。

【請求項 7】 前記植物細胞が双子葉植物細胞である、請求項 4 または 5 に記載の方法。

【 発 明 の 詳 細 な 説 明 】

技 術 分 野

本願発明は、植物遺伝子のプロモーターを用いる、有用植物の育種に関する。さらに詳しくは、イネのカタラーゼ遺伝子A（以下、Cat Aという）のプロモーター遺伝子を用いる有用植物の育種に関する。

背 景 技 術

品種間の交配で生じるF1ハイブリッド（雑種第一代）が両親よりも優れた特性を示すことがあることが知られており、作物の品種改良の方法として従来から注目されていた。イネなどの自家受粉を行う作物においては、この性質を利用するための必要な技術の一つとして、花粉が稔性を持たない雄性不稔系統の作出方法が研究されている。従来は、植物遺伝資源の中から雄性不稔系統を探したり、突然変異を誘発して雄性不稔系統を選抜したりしていたが、実用品種にその遺伝子を導入するのは容易ではなく、利用は限られていた。

最近になって、バイオテクノロジーを利用した方法として、葯および/または花粉で発現するプロモーターにこれらの器官の形成を阻害する機能を持つ遺伝子（例えば、ヌクレアーゼ、プロテアーゼ、グルカナーゼ等をコードする遺伝子）をつなげて植物に導入し、稔性のある花粉形成を阻止する方法が提案されている（例えば、M a r i a n i ら , N a t u r e 3 4 7 : 7 3 7 - 7 4 1 (1 9 9 0) ）。あるいは、葯および/または花粉で発現するプロモーターを利用して、これらの器官の形成時に発現する遺伝子のアンチセンスRNAを転写させたり、これらのmRNAを分解するリボザイムを導入する方法が有望視されている。

葯および/または花粉で発現する遺伝子のプロモーターは、トマト、シロイヌナズナ、トウモロコシなどで数種類が知られている（例えば、T w e l l ら , P l a n t P h y s i o l . 9 1 : 1 2 7 0 - 1 2 7 4 (1 9 8 9) ; P a u l ら , P l a n t M o l e c u l a r B i o l o g y 1 9 : 6 1 1 - 6 2 2 (1 9 9 2) ; G u e r r e r o ら , M o l . G e n . G e n e t . 2 2 4 : 1 6 1 - 1 6 8 (1 9 9 0) ）。しかし、その活性は、実用的に用いられるには低いという問題点がある。さらに、葯および/または花粉の形成を人為的に制御するためには、これらの器官の各発生段階のいずれかで機能するプロモーターを単

離し、それぞれの特徴を明らかにした上で、高い活性を持ったプロモーター含有カセットを作成できれば、非常に有用である。

従って、イネの遺伝子から、活性が高く、実用的にも使用され得る薬および/または花粉用のプロモーターが取得できれば、イネ等の作物を含む有用植物の品種改良に大いに貢献できる。

発明の開示

本願発明は、遺伝子工学的手法による植物の育種に関し、その目的は、薬および/または花粉で高い活性を有する植物遺伝子プロモーターを含有する、植物発現用カセットおよび組換えプラスミド、ならびにその利用方法を提供することにある。

本願発明者らは、イネのカタラーゼ A (C a t A) 遺伝子が薬および花粉で高いプロモーター活性を示すことを見だし、この知見に基づいて本願発明を完成したものである。

本願発明は、薬および/または花粉において異種遺伝子を特異的に発現させるための植物発現用カセットを提供する。この発現用カセットは、配列番号 1 で示される配列、またはその一部を有する配列であって配列番号 1 の配列と同等のプロモーター活性を有する、イネ C a t A 遺伝子プロモーターを含み、さらに、異種遺伝子がこのプロモーターと発現可能に接続されるように、異種遺伝子を挿入するための部位を含む。ここで、配列番号 1 で示される配列は、イネ C a t A 構造遺伝子の 5 ' 上流域および第 1 イントロンを含む配列である。

本願発明はまた、薬および/または花粉において異種遺伝子を特異的に発現させるための組換えプラスミドを提供する。この組換えプラスミドは、配列番号 1 で示される配列、またはその一部を有する配列であって配列番号 1 の配列と同等のプロモーター活性を有する、イネ C a t A 遺伝子プロモーターを含み、さらに、このプロモーターと発現可能に接続された異種遺伝子を含む。

本願発明はさらに、薬および/または花粉における特異的な発現が所望される異種遺伝子を植物に導入する方法を提供する。この方法は、上記の組換えプラスミドで植物細胞を形質転換する工程、および形質転換された植物細胞を再分化させて、植物体を得る工程を包含する。

上記の異種遺伝子は、葯および/または花粉の形成を阻害する機能を持つ遺伝子であり得る。このような遺伝子を上記方法において使用することにより、雄生不稔植物を作製し得る。また、上記方法において、植物細胞は、単子葉植物細胞または双子葉植物細胞のいずれかであり得る。

発明を実施するための最良の形態

本願発明について、以下に、より詳細に説明する。

(イネ C a t A 遺伝子プロモーターの単離)

イネのカタラーゼ A (C a t A) 遺伝子の単離方法、および本願発明のプロモーター領域を含むゲノミック C a t A 遺伝子の塩基配列は、本願発明者らにより日本農芸化学会 1992 年大会講演要旨集：日本農芸化学会誌 66 (3) , 488 (1992)、および H i g o ら , P l a n t M o l e c u l a r B i o l o g y 30 : 505 - 521 (1996) で発表されている。ただし、葯および花粉での C a t A 遺伝子発現の有無、及び形質転換イネの解析については、発表されていない。

イネ C a t A 遺伝子プロモーターは、イネのゲノミックライブラリーからスクリーニングされ得る。米国クローンテック社 (C L O N T E C H L a b o r a t o r i e s I n c . , P a l o A l t o , C A) が市販しているイネのゲノミック DNA ライブラリー (R i c e G e n o m i c L i b r a r y) が用いられ得る。

スクリーニング用のプローブとしては、本願発明者らが単離したイネ C a t A c D N A が用いられ得る。イネ C a t A c D N A の単離方法および塩基配列は、本願発明者らにより既に発表されている (M o r i ら , P l a n t M o l e c u l a r B i o l o g y 18 : 973 - 976 (1992))。

まず、ファージ を用いて作成されたイネゲノミック遺伝子ライブラリーを大腸菌に感染させてプラークを形成させる。このプラークを常法に従って、ニトロセルロース等のメンブレンに移し、標識したスクリーニング用プローブでハイブリダイズさせる。ハイブリダイズ終了後、洗浄し、オートラジオグラフィーにかけ、ハイブリダイズすることが確認されたファージから DNA を調製する。

調製したファージ DNA を、適当な制限酵素を組み合わせで消化し、その消化

物をアガロースゲル電気泳動で分離する。分離したDNA断片をナイロンメンブレンに移して、上記のスクリーニング用プローブをハイブリダイズさせ、シグナルの強さとバンドパターンの相違に基づいて、スクリーニングする。

最もシグナルの強いクローンはC a t A 遺伝子を含み、弱いシグナルのクローンはC a t A に類似しているがC a t A ではない遺伝子を含んでいると考えられる。また、バンドパターンの比較により、遺伝子の一部を欠損したクローンを識別できる。さらに、バンドパターンに基づく各クローンの物理地図を作製することにより、プロモーターを構成すると推定される、構造遺伝子の5'上流域の長さが約1.5Kbp程度あるクローンを特定できる。

以上の様にして、完全なC a t A ゲノミック遺伝子が、単離され得る。

C a t A ゲノミック遺伝子の塩基配列をC a t A c DNA の塩基配列と比較することにより、プロモーター領域が特定され得る。プロモーター配列としては、ゲノミック遺伝子がイントロンを有する場合は、構造遺伝子の5'上流域だけではなく、第1イントロン等の領域をも含み得る。

(G U S 活性の測定によるプロモーター活性部分の特定)

C a t A 遺伝子のプロモーター領域が特定されると、その配列を切り出して、植物発現用ベクターにつなぎ込み得る。つなぎ込まれたプロモーターの活性を評価するために、そのプロモーターの下流にレポーター遺伝子、例えば、適当な酵素をコードする遺伝子を連結したプラスミドを作成し得る。このプラスミドを植物細胞中に導入し、遺伝子の発現を、例えば、酵素活性を測定して、観察する。植物を宿主とする場合には、例えば、p B I 2 2 1 等のようなプラスミドを用いて、 β -グルクロニダーゼ (G U S) の発現を指標として測定するのが一般的であり、本願明細書においても、G U S の発現で測定する方法が適用され得る。

G U S 活性は、J e f f e r s o n らの方法 (E M B O J 6 : 3 9 0 1 - 3 9 0 7 (1 9 8 7)) に基本的に従って測定され得る。すなわち、タンパク質量にして50 μ g 相当のプロトプラスト抽出液と25 μ l の20mM 4 - m e t h y l u m b e l l i f e r r y l g l u c u r o n i d e (4 M U G) 、それに抽出バッファー、さらに植物組織内在性のG U S 様活性を抑制するために100 μ l メタノール (K o s u g i ら , P l a n t S c i e n c e 7 0

: 1 3 3 - 1 4 0 (1 9 9 0)) を加えてから全量を 5 0 0 μ l とし、3 7 でインキュベートする。2 時間後に反応液から 2 0 0 μ l を採取し、0 . 2 M N a 2 C O 3 を 0 . 8 m l 加えて反応を停止させる。蛍光分光光度計により、3 6 5 n m の励起光で 4 5 5 n m の蛍光を測定する。酵素活性を 4 - M U p m o l / m i n / m g p r o t e i n で表示する。

C a t A 遺伝子のプロモーター領域の様々な欠失体、例えば、5 ' 上流側から様々な長さに欠損させた C a t A 遺伝子のプロモーター領域を G U S 遺伝子と融合させたプラスミドを用いてプロモーター活性を測定し、その活性に必須な部分等を特定し得る。このような活性部分の特定のための手法は、当業者には公知である。従って、例えば、C a t A 遺伝子のプロモーター領域に不要な配列を除去して得られる、C a t A 遺伝子のプロモーターと同等の活性を有する配列も本願発明の範囲内にある。

いったん C a t A 遺伝子のプロモーター領域およびその活性部分が特定されると、さらにその配列を改変して、プロモーター活性を高めたり、発現する組織について特異性を変更させることも可能である。例えば、C a t A 遺伝子のプロモーター領域またはその活性部分を一部改変して得られる、改変前と同等の活性を有する配列も本願発明の範囲内にある。

配列番号 1 の配列を有するプロモーター領域は、薬および / または花粉において特異的にその活性を発現する。従って、本願明細書において、プロモーター活性について「同等」であるとは、活性の強度が、少なくとも、基準となるプロモーター領域の活性の強度と同程度であると共に、活性の特異性も、少なくとも、基準となるプロモーター領域の活性の特異性と同程度であることをいう。用語「同等」は、活性の強度および活性の特異性が、基準となるプロモーター領域と比較して、明らかに高い場合を除外する意図ではないことに留意すべきである。「配列番号 1 の配列と同等のプロモーター活性を有する」とは、例えば、本願明細書の下記実施例と同様の条件でプロトプラストにおいて G U S 遺伝子を発現させたとき、その G U S 活性が、配列番号 1 の配列についての G U S 活性の約 5 0 % 以上、好ましくは約 7 0 % 以上、より好ましくは約 9 0 % 以上であり、かつ、薬および / または花粉において特異的にその活性を発現することをいう。

本願明細書において、葯および/または花粉において「特異的に」発現するとは、目的とする遺伝子産物を葯および花粉の少なくとも一方において、同じ植物体の他の組織または器官の少なくとも1種におけるよりも多く発現することをいう。例えば、遺伝子産物を、葯および花粉において、同じ植物体の任意の部位の葉身におけるよりも多く発現することをいう。このような発現の特異性は、本願明細書の下記実施例と同様の条件で形質転換植物を作製することにより評価し得る。

(発現カセットおよび組換えプラスミドの構築およびその利用)

活性が確認された C a t A 遺伝子のプロモーター領域またはその活性部分を有する配列は、適当な植物発現ベクターに組み込まれ得る。この植物発現用ベクターに組み込まれた配列の3'末端側に、適当なリンカー配列、例えばマルチプルクローニングサイトを有するリンカーを導入して、植物宿主に適した発現カセットが作成され得る。従って、本願明細書において「異種遺伝子を挿入するための部位」とは、リンカーまたはリンカーと同様に作用する配列に含まれる部位をいう。この発現カセットには、所望により他の調節エレメントが含まれ得る。例えば、発現効率を向上させるため等の目的で、ターミネーター配列が含まれ得る。このターミネーター配列は、上記マルチプルクローニングサイトを有するリンカー配列を介して、プロモーター配列と結合され得る。

上記植物発現用カセットのプロモーターの3'下流、例えばマルチプルクローニングサイトに、発現が意図される異種遺伝子が発現可能に接続されて、組換えプラスミドを生じる。本願明細書において「異種遺伝子」とは、C a t A 遺伝子以外のイネまたは他の植物において内因性の遺伝子、または植物に対して外来の遺伝子であって、その遺伝子産物の発現が葯および/または花粉において所望される任意の遺伝子をいう。

このようにして生じた組換えプラスミドを用いて、植物細胞が形質転換され得る。植物細胞の形質転換は、アグロバクテリウムを用いる方法、プロトプラストへの電圧ポレーションによる方法など、当業者に公知の任意の方法によって行い得る。例えば、植物細胞のプロトプラストの作成は、K y o z u k a ら、M o l . G e n . G e n e t . 2 0 6 : 4 0 8 - 4 1 3 (1 9 8 7) に記載の方

法に従って行い得る。

形質転換された植物細胞を常法により再分化させて、形質転換された植物組織とし、さらに植物体とすることができる。形質転換のための組換えプラスミドの作成にあたって、C a t A 遺伝子プロモーターは、例えば、細菌と植物の両宿主で発現可能なバイナリーベクターに組み込むことが可能である。このようなバイナリーベクターは当業者に周知である。例えば、アグロバクテリウムの発現系を含む、p B I 系などのベクターを用いると、微生物による植物への感染のシステムを利用し得る。適切な組換えプラスミドを用いることにより、イネ等の単子葉植物およびタバコ等の双子葉植物を含む任意の形質転換可能な植物に目的の異種遺伝子を導入し得る。

上述のように、C a t A 遺伝子プロモーターは、葯および/または花粉において特異的に発現し得る。従って、異種遺伝子として、葯および/または花粉の形成を阻害する機能を持つ遺伝子を利用することにより、雄性不稔植物を作製することができる。本願明細書において「葯および/または花粉の形成を阻害する機能を持つ遺伝子」とは、その遺伝子産物が稔性のある花粉の形成を阻止し得るもの（例えば、ヌクレアーゼ、プロテアーゼ、グルカナーゼ等をコードする遺伝子）と、その遺伝子自体が葯および/または花粉の形成を阻害する機能を示すもの（例えば、葯および/または花粉の形成時に発現する内因性遺伝子のアンチセンスRNA、およびそのような内因性遺伝子を分解し得るリボザイム）とを含んでいる。雄性不稔植物の選抜およびそれを用いる植物の品種改良のための手法は、当業者に周知である。

上記の形質転換植物の作製はまた、雄性不稔以外の形質を植物に付与するためにも利用し得る。例えば、毒性タンパク質をコードする異種遺伝子を用いることにより、花粉を摂食する害虫などの制御を図ることができる。あるいは、栄養素となり得るタンパク質をコードする異種遺伝子を用いることにより、作物の栄養価を高めることができる。葯および/または花粉での特異的な遺伝子発現を利用する、任意の有用植物の作製が、本願発明の範囲内にある。

本願発明により、イネの遺伝子から、葯および/または花粉で活性が高い、実用的なプロモーターの使用が提供される。従って、本願発明は、イネの品種改良

のみならず、他の種々の植物の品種改良に利用され得る。

(実施例)

以下に、実施例に基づいて本願発明を説明するが、本願発明の範囲は、実施例のみに限定されるものではない。

1 . イネ C a t A ゲノミック遺伝子の単離 : ゲノミックライブラリーからのスクリーニング

C a t A c D N A (M o r i r a , (1 9 9 2 ; 前出) の一部を、C a t A ゲノミック遺伝子のクローニングに用いた。C a t A c D N A のクローニングの過程で得られた不完全長 c D N A (全長 1 . 8 k b p のうち、5 ' 非翻訳領域及び若干のコード領域の合計約 0 . 4 5 K b p を欠損する 3 ' 末端側の 1 . 3 5 K b p) を含むラムダファージ (クローン N o . 5 1) のインサート部分を P C R で増幅した。同ファージより D N A を調製してこれをテンプレートとし、プライマーとして g t 1 1 - F o r w a r d P r i m e r 及び g t 1 1 - R e v e r s e P r i m e r (東洋紡) を用いた。生成物をセントリコン - 1 0 0 (A m i c o n) で精製し、濃度を 2 5 n g / 1 0 μ l にして、マルチプライムラベル法 (A m e r s h a m) のプローブとした。

米国クローンテック社 (C L O N T E C H L a b o r a t o r i e s I n c . , P a l o A l t o , C A) から購入したイネのゲノミック D N A ライブラリー (R i c e G e n o m i c L i b r a r y) を用いて C a t A 遺伝子をスクリーニングした。ゲノミックライブラリーを構成するファージ E M B L - 3 を常法に従って、E . c o l i N M 5 3 8 株に感染させ、ファージプラークを形成させた。このファージプラークをナイロンメンブレンに移し、下記の標準的条件で上記プローブとハイブリダイズさせた。なお、プローブは ^{3 2} P で標識した。

ハイブリダイズ溶液 : 6 x S S C - 0 . 1 % S D S , 5 x D e n h a r d t ' s , 1 0 0 m i c r o g r a m / m l S a l m o n s p e r m D N A ; ハイブリダイズ温度 : 6 5 ; ハイブリダイズ時間 : 一晚

次に、メンブレンを、以下の条件で洗浄した。洗浄条件 : 2 x S S C - 0 . 1 % S D S 室温 5 分プラス 3 0 分 ; 1 x S S C - 0 . 1 % S D S ; 6

8 、 1 時間

洗浄後、常法に従って、ナイロンメンブレンをオートラジオグラフィーにかけ、プローブとハイブリダイズしたクローンを検出した。ハイブリダイズすることが確認されたファージからそれぞれDNAを調製した。

上記ファージのDNAをSal IとSca Iなどの2、3種類の制限酵素を組み合わせて消化し、その消化物をアガロースゲル電気泳動で分離した。分離したDNA断片をナイロンメンブレンに移して、上述のCat A cDNA断片をプローブとしてハイブリダイズさせた。ハイブリダイズの条件は上記と同じであり、メンブレン洗浄は以下の条件で行った。洗浄条件：2 x SSC 室温 5 ~ 10分 2回；2 x SSC - 0.1% SDS 65、30分

洗浄後、常法に従って、ナイロンメンブレンをオートラジオグラフィーにかけ、プローブとハイブリダイズしたDNA断片を検出した。

シグナルの強さとバンドのパターンがほぼ同一の、従って同じ構造を持つと推定される一群のクローンと、バンドパターンが一部しか一致しないクローンがある。

シグナルの強さとバンドのパターンがほぼ一致するクローンは、Cat A遺伝子に対応する考えられる。バンドのパターンの一部が欠落しているクローンは、Cat A遺伝子の一部が欠損しているクローンと考えられる。また、シグナルが弱いクローンは、Cat Aに類似した構造を持つ別のカタラーゼ（アイソザイム）の遺伝子と考えられる。

詳細なサザン分析、部分塩基配列の解析、Cat A cDNA塩基配列に基づくPCR解析などから、Cat A cDNAに対応する遺伝子と、その5'上流にプロモーター領域と推定される約1.5Kbpからなる配列を含むクローンEM74/81を得た。

クローンEM74/81の挿入部分をHind III及びEcoRI消化で切り出し、シーケンス解析用のベクターpBluescript II KS+あるいはSK+ (Stratagene, CA)に挿入した。5'側からおよび3'側側から段階的欠損プラスミドを多数作成し、塩基配列決定を行った。4,670bpの配列が決定された。配列番号2にその全配列を示す。

ゲノミック C a t A 遺伝子の塩基配列は、本願発明者らにより発表されている (日本農芸化学会誌 (1992 ; 前出))、および H i g o ら (1996 ; 前出)。国際 DNA 塩基配列データベース D D B J には、図 1 に示したと同じく、H i n d I I I 切断部位から E c o R I 切断部位までの 4 , 6 7 0 塩基の配列を登録した (アクセッション番号 D 2 9 9 6 6)。H i g o ら (1996 ; 前出) には、H i n d I I I 認識配列と E c o R I 認識配列を前後に加えて、4 , 6 7 6 塩基の配列を発表した

2 . C a t A 遺伝子プロモーターを有する組換えプラスミドの作成

上記 1 . で得られた C a t A 遺伝子は、4 , 6 7 0 b p であった。そして、配列番号 2 0 1 , 5 6 0 番目から 1 , 6 0 5 番目に第 1 エクソン、1 , 8 9 4 番目から 2 , 6 9 4 番目に第 2 エクソン、2 , 7 8 1 番目から 3 , 3 8 0 番目に第 3 エクソン、3 , 7 3 0 番目から 4 , 1 1 7 番目に第 4 エクソンが存在すること、および、それぞれのエクソンの間に、第 1 から第 3 イントロンが存在することがわかった。

この配列情報に基づいて、プロモーターと推定される領域を切り出すことができる。

イネ C a t A 遺伝子プロモーターを有するプラスミド、C a t A - G U S - 0 の作製を図 1 に示す。

クローン E M 7 4 / 8 1 を E c o 5 2 I で消化し、平滑末端化処理し、次いで H i n d I I I で消化し、アガロース電気泳動により約 1 . 9 K b p の断片を回収した。クローン E M 7 4 / 8 1 挿入配列の 1 番目から 1 , 9 0 1 番目までの配列を有する断片が得られた。この断片には、第 1 エクソンの上流側の配列、第 1 イントロン、第 2 エクソンの一部が含まれていた。断片の 5 ' 末端側は、H i n d I I I 部位であり、3 ' 末端は平滑末端である。

植物細胞用発現ベクター p B I 2 2 1 (C L O N T E C H L a b o r a t o r i e s I n c , , P a l o A l t o , C A) は、カリフラワーモザイクウイルス (C a M V) 3 5 S プロモーター、 β -グルクロニダーゼ (G U S) コーディング領域およびノパリンシンターゼのターミネーター (N O S - T) を有している。この p B I 2 2 1 を H i n d I I I および S m a I で消化し、大断片を

回収した。この大断片は、p B I 2 2 1 から C a M V の 3 5 S プロモーター領域が削除された断片である。この断片と、上記クローン E M 7 4 / 8 1 挿入配列の 1 番目から 1 9 0 1 番目までの配列を有する断片を連結させ、C a t A - G U S - 0 を作製した。この方法は、C a t A 遺伝子の塩基配列とともに、既に本願発明者によって公表されている (H i g o ら (1 9 9 6 ; 前出)) 。

3 . イネ培養細胞プロトプラストの形質転換と G U S 遺伝子の発現

上記 2 . において得られたプラスミドを、H i g o ら (1 9 9 6 ; 前出) に記載されているように、イネ培養細胞 (O c 細胞) のプロトプラストに導入した。コントロールとして、p B I 2 2 1 を用いた。

イネ培養細胞 (O c 細胞) からのプロトプラスト調製方法、エレクトロポレーションによるプロトプラストの形質転換、およびプロトプラスト抽出液を用いての G U S 遺伝子の発現の測定は、H i g o ら (1 9 9 6 ; 前出) に記載されている方法で実施した。

結果を図 2 に示す。この結果は、C a t A 遺伝子のプロモーターが、コントロールである C a M V の 3 5 S プロモーターの約 1 . 5 倍の高い活性を示した。

4 . 形質転換イネ (T 0 世代) の作成

上記 3 . において、イネ培養細胞 (O c 細胞) プロトプラストで高い活性を持つことが確認された C a t A - G U S - 0 プラスミドを用いて、以下のようにイネを形質転換した。

赤木らの方法 (M o l , G e n . G e n e t . 2 1 5 : 5 0 1 - 5 0 6 (1 9 8 9)) に準じて、イネ (品種 : キヌヒカリ) から懸濁細胞を確立し、次いでこの懸濁細胞を用いてプロトプラストを調製し、エレクトロポレーション法 (T a d a ら , T h e o r . A p p l , G e n e t . 8 0 : 4 7 5 - 4 8 0 (1 9 9 0) に準ずる) でプラスミドを導入し、再分化 (F u j i m u r a ら . , P l a n t T i s s u e C u l t u r e L e t t , 2 : 7 4 - 7 5 (1 9 8 5) に準ずる) させ、G U S 染色により選抜して形質転換イネを得た。詳細を、下記に示す。

1) イネ胚盤からのカルス誘導

1 . 1) 培地を以下のように調製した :

(1) M S 基本培地に 2 p p m 2 , 4 - D、0 . 1 % カゼイン加水分解物、3 % ショ糖を添加し、p H 5 . 5 に調整する。(2) 培地に 1 % 寒天を加え、オートクレーブする。(3) クリーンベンチ内で深型の 9 c m シャーレに分注する(約 4 0 m l / シャーレ)。

1 . 2) 種子の殺菌を以下のように行った :

(1) キヌヒカリの種子を剥皮し、玄米を取り出す。(2) 玄米を 5 0 m L ビーカーに入れ、7 0 % エタノールに 3 0 秒間浸す。(3) 水道水で 3 回すすぐ。(4) 5 % 次亜塩素酸ソーダ (T w e e n 2 0 を数滴添加) で 2 0 分間殺菌する。(5) 滅菌水で 3 回すすぐ。(6) ピンセットを用いて、寒天培地に置床する(9 粒 / 9 c m シャーレ)。(7) 約 3 0 0 l u x、2 6 ° C で約 1 カ月間培養する。

2) サスペンションの確立

2 . 1) 培地を以下のように調製した :

(1) R 2 無機塩と B 5 ビタミンの基本培地に、1 p p m 2 , 4 - D、3 % ショ糖、0 . 3 % カゼイン加水分解物を添加し、p H を 5 . 5 に調整する。(2) 1 0 0 m l 培養フラスコに 2 0 m l の培地を分注、オートクレーブで滅菌する。

2 . 2) サスペンションの確立を以下のように行った :

(1) 完熟種子の胚盤由来のフライブルなカルスを液体培地に移植する。(2) 移植したフラスコを、2 6 ° C、弱光下、8 0 r p m で巡回培養する。(3) 移植後 3 日目に、新鮮な培地に交換する。(4) さらに 4 日間培養を続ける。(5) カルス培養ピペットを用いて、カルスを分散させ、カルス部分のみを移植する。(6) 1 週間毎に新鮮な培地に移植する。

3) プロトプラストへの遺伝子導入

3 . 1) 酵素液を以下のように調製した :

(1) C e l l u l a s e o n o z u k a R S 4 g、M a c e r o z y m e R - 1 0 1 g、C a C l 2 · 2 H 2 O 0 . 5 g、M a n n i t o l 7 . 2 8 g を 1 0 0 m L ビーカーに入れ混和する。水を加え、スターラーで攪拌、溶解する。(2) p H 5 . 5 に調整し、1 0 0 m L にメスアップする。(3) 3

7 で 20 分間放置した後、12000 rpm で 15 分間遠心する。(4) 上清を 10 mL づつ遠心管に分注。パラフィルムでシールし、冷凍保存する。(5) 湯浴で溶解し、濾過滅菌する。

3.2) プロトプラストの単離を以下のように行った：

(1) 培養 4 日目のサスペンションセルを用いる。(2) カルス培養ピペットでサスペンションセルのみを 10 mL の酵素液の入った 100 mL フラスコに移す。(約 10 g) (3) 27 のインキュベータで 5 時間静置する。

3.3) プロトプラストの精製を以下のように行った：

(1) フラスコを軽く廻し、底に沈んだセルを浮遊させる。(2) 浮遊させたセルを素早く 155 μ m のメッシュにデカントする。(3) メッシュを軽く上下させ、酵素液が完全に落ちるのを待つ。(4) 濾過した酵素液を 77 μ m のメッシュにビーカーから直接デカント。(5) メッシュを軽く引き上げ、酵素液を落とす。(6) 濾過した酵素液を、さらに 31 μ m のメッシュにデカント。(7) メッシュを軽く引き上げ、酵素液を落とす。(8) 酵素液をビーカーから遠心管にデカントで移す。(9) 600 rpm で 1 分間遠心。(10) ディスポピペットで上清を新しい遠心管に移す。(11) 900 rpm で 3 分間遠心。上清を捨てる。(12) 0.4 M グルコースを遠心管の壁面に沿って入れ、プロトプラストを懸濁。(13) 900 rpm で 3 分間遠心。上清を捨てる。(14) AA バッファーを遠心管の壁面に沿って入れ、プロトプラストを懸濁。(15) 900 rpm で 3 分間遠心。上清を捨てる。(16) 少量の AA バッファーを壁面を這わせて入れる。(17) 血球計算盤を用いて、プロトプラストをカウントする。(18) プロトプラスト懸濁液の液量を計る。(19) AA バッファーを用いてプロトプラスト密度を 1×10^7 個/mL に調整。ここで、AA バッファーは：35 mM K - A s p a r a t i c a c i d , 5 mM C a - G l u c o n a t e , 5 mM M g - A s p a r a t i c a c i d , 5 mM M E S , 0.4 M m a n n i t o l , pH 5.8 (調整不要) である。

3.4) 遺伝子導入を以下のように行った：

(1) エレクトロポレーション用チャンバーを 70% エタノールで滅菌する。(2) プロトプラスト懸濁液に TE に溶解したプラスミド (1 μ g / μ L) を添

加する。ここで、添加したプラスミドの最終濃度は、HPT2（ハイグロ）が $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ ；CatA-GUS-0が $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ である。ハイグロマイシン選抜用プラスミドHPTの構造は報告されている（Tadara, Theor. Appl. Genet, 80:475-480(1990)）。（3）試験管を氷上に立て、20分間放置する。（4）チャンバーに移す。（5）コンデンサーに充電した電気を放電する。ここで、放電条件は： $880 \mu\text{F}$ 、 $475 \text{V}/\text{cm}$ 、時定数は約 30msec である。（6）10秒以上放置後、遠心管に回収する。（7）室温で20分間放置する。

3.5) プロトプラスト培養を以下のように行った：

(1) 900rpm で3分間遠心。上清を捨てる。(2) c-medを遠心管の壁面に沿って入れ、プロトプラストを懸濁する。c-medで 1×10^6 個/ mL に調整する。c-medは培養後3日目のサスペンションから培地のみを回収し、 12000rpm で浮遊物を除去する。培地 40mL に対して、2,4-D (100ppm)を $200 \mu\text{L}$ 、B5 vitaminsを $400 \mu\text{L}$ 、sucroseを 5.46g 添加し、 $\text{pH} 4.3$ に調整する。冷凍して保存。使用直前に融解、濾過滅菌する。(3) コーティングシャーレ (Falcon #3002) に $750 \mu\text{L}$ を分注する。(4) コンラージ棒を用いてシャーレ全体に拡げる。(5) パラフィルムでシールする。(6) シャーレをタッパウエアに入れる。ここで、乾燥防止のため、水を入れたビーカー等を入れておく。(7) 27、暗所で培養する。

4) 形質転換植物の再生

4.1) 形質転換細胞の選抜・増殖を以下のように行った：

(1) 培養14日後にGI培地を $600 \mu\text{L}$ 添加する。ここで、GI培地は、R2培地に 2ppm 2,4-D、 0.4M グルコースを添加し、 $\text{pH} 4.9$ に調整したものである。(2) ハイグロマイシン耐性カルスを選抜するために、GI培地にハイグロマイシン $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ を添加する。(3) GI培地添加2週間後、増殖してきたカルスをGII寒天培地上に移植する。ここで、GII寒天培地は、R2培地に 2ppm 2,4-D、3%ショ糖を添加し、 $\text{pH} 4.9$ に調整した後、1%寒天を添加し、オートクレーブし、 $9 \text{cm} \times 10 \text{mm}$ シャー

レに 10 mL ずつ分注したものである。

4.2) 形質転換植物の再生を以下のように行った：

(1) N6 無機塩、B5 ビタミン、3% ショ糖、NAA 1 ppm、カイネチン 4 ppm、3% ツルピトール、0.03% カゼイン加水分解物を含む培地の pH を 5.8 に調整し、1.5% 寒天を添加してオートクレーブする。(2) クリーンベンチ内で 90 mm × 20 mm の深型プラスチックシャーレに培地を分注する (40 ~ 50 mL / シャーレ)。(3) 直径が 3 mm 程度に増殖したカルスを寒天培地上に移植する。(4) シャーレ当たり 20 個程度のカルスを置床する。(5) 27 °C、3000 lux の連続光下で培養する。4 週間程度で植物体が再生してくる。(6) 分化培地上で分化した植物体で、シュートの長さが 3 cm 程度に成長したものを根が付いた状態で、マジエンダボックスに移植する。ボックス当たり 9 本のシュートを移植する。培地は、1/2 MS 培地に 1% ショ糖を添加し、pH を 5.8 に調整する。0.15% ゲルライトを添加、加熱溶解後、マジエンダボックスに 50 mL ずつ分注してオートクレーブする。(7) 27 °C、10000 lux 連続光下で培養する。(8) 1 週間程度で、先端が完全に蓋で頭打ちとなる。場合により、培地中の 2 価カチオンが奪われ、培地が液状化することがある。

以上のようにして得られた、再分化した個体 (T0 世代イネ) をポットに移植した。成長した個体の中から、葉を GUS 組織染色し、GUS が発現している個体を選抜した。

形質転換植物の選抜のための GUS 染色は、次の手順で行った：(1) 1 mM X - Gluc, 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), 10% Me - OH の染色液を調製する。(2) (1) の染色液 500 μL を 2 mL のマイクロチューブに分注する。(3) 再生した植物の葉の切片を入れる。(4) 37 °C で 24 時間インキュベート。(5) 70% Et - OH でクロロフィルを除去する。(6) GUS 染色されたイネを選抜する。

このようにして GUS が葉で発現している T0 世代イネ 15 個体を選び、その種子 (T1 世代種子) を採取した。

5. T1 世代イネの PCR による選抜

上記 4 . において得られた 15 系統のうち、10 系統の T1 種子の粕を 1% アンチホルミンで 1 時間処理後、2 日間水道水に浸漬し、粒状培土 (ボンソル 1 号、住友化学) に播種した。幼苗の葉身から I S O P L A N T (ニッポンジーン) を用いて D N A を抽出した。抽出された D N A をテンプレートとして、プライマー F 1 8 1 3 (5 ' - C A T G G C T G G T T G A T T C A G C - 3 ' ; C a t A 第 1 イントロン内の配列) とプライマー R 2 3 6 8 (5 ' - C G T C G G T A A T C A C C A T T C C - 3 ' ; G U S 遺伝子コード領域内の配列) とを用いて P C R を行い、導入した D N A 配列を含んでいるかどうか調べた。D N A ポリメラーゼである A m p l i T a q G o l d (P e r k i n E l m e r) を用いて P C R を行った。反応条件は 9 4 . 1 2 分の処理後、9 4 . 1 分、5 5 . 2 分、7 2 . 3 分の処理を 3 5 サイクル行った。反応液を 1% アガロース中で電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色して紫外線で照射して P C R 産物の有無とそのサイズを調べ、遺伝子が導入されている T1 世代の植物体を選んだ。

導入した G U S 遺伝子が発現しているか確認するために、下記の G U S 組織染色法で T1 植物の葉身の G U S 活性を調べた。

G U S 活性の観察のためのイネの葉身の G U S 組織染色法として、「植物の細胞を観る実験プロトコール：遺伝子発現から細胞内構造・機能まで」；細胞工学分冊植物細胞工学シリーズ 6 2 - 3 ；細胞レベルで G U S 活性を観る方法 (高橋美佐、森川弘道) p p . 7 1 - 7 9 (監修 福田裕穂、西村幹夫、中村研三) に記載の方法をもとに、一部改変した方法で行った。

その手順は次の通り：(1) X - G l u c 溶液 [1 0 0 m M リン酸バッファー (p H 7 . 0)、1 m M X - G l u c、0 . 3 m M フェリシアン化カリウム、0 . 3 m M フェロシアン化カリウム、0 . 2 % T r i t o n - X 1 0 0] を調製する。(2) X - G l u c 溶液 5 0 0 μ L を 2 4 穴タイタープレートの各ウエルに分注する。(3) イネの各組織あるいは切片をウエルに入れ、2 8、1 6 時間処理する。(3) X - G l u c 溶液を除去し、7 0 % エタノールを加えて脱色する。(4) 7 0 % エタノールを除去し、組織・切片を 5 0 % グリセロール溶液に浸す。(5) 顕微鏡あるいは実体顕微鏡で観察する。

T1 世代植物を、葉における G U S 遺伝子の発現の高さによりグループ分けし

、高度に葉で発現している植物から種子（T2世代種子）を採取した。

6 . T 2 種子の播種、形質転換体の P C R による選抜と G U S 組織染色

T 2 形質転換体の物を上述のように処理し、播種した。幼苗の葉身から上述のように D N A を抽出し、P C R を行い、導入した D N A 配列を含んでいるかどうか調べた。調べた T 2 植物のうち約半数が導入した G U S 遺伝子を持つ形質転換体であることがわかった。

また、導入した G U S 遺伝子が発現しているか確認するために、上記の方法で T 2 植物の幼苗の葉身の G U S 活性を調べた。P C R で G U S 遺伝子の存在が確認されたすべての T 2 形質転換体において、葉身での G U S 活性が観察された。葉身で G U S 遺伝子の発現が確認された植物体は引き続き生育させ、開花期に葯を採集して、葯および花粉での G U S 活性を調べた。

結果を図 3 および図 4 に示す。開花期に葯を採集して G U S 活性を調べた結果、葉身よりも高い G U S 活性がみられた。葯および花粉を顕微鏡で観察したところ、葯壁（図 3）および花粉外殻の内部（図 4）が G U S 活性によって青く染色されていた。

産業上の利用可能性

本願発明における C a t A 遺伝子プロモーターは、葯および花粉で非常に高い活性を有している。従って、本願発明は、葯および / または花粉の遺伝子操作による、イネ等の植物の品種改良のために有用である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> DIRECTOR GENERAL OF NATIONAL INSTITUTE OF AGROBIOLOGICAL

<120> PROMOTOR SEQUENCE EXPRESSED IN ANTHOR AND POLLEN

<130> AR010

<140>

<141>

<160> 2

<170> Patent In Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1901

<212> DNA

<213> *Oryza sativa*

<220>

<221> promoter

<222> (1)..(1901)

<400> 1

```

tgtgccacc acagcacacc tatcgttacc atcagcgtgg actaagaaca gaacaatttc 60
tcatcttttg ttctctgaga agtttagacc accaagatat atgctgatga tgcgtgatg 120
agctagctag ttttgcaatt acctatgggt tgcattcaca tcagggtctg tttagttccc 180
aaacaaaatt ttccagcctg ttacatagga tgtttggaca catgcataga gtactaaatg 240
tagaaaaaaa acaattaaac atttcgcctt gaaattacga gacaaatctt ttaagcctaa 300
ttgcgccatg atttgacaat ttggtgctac aataaatatt tgcataaat agattaatta 360
ggcttaataa attcgtcttg cagtttccag accggaatctg taatttatt tatgagatg 420
agctgcttgg atcttccatc acatattcag accgtacctc atctgaaagg ttagtaattt 480
gaactgcgta gtaatgctac aaggtaaatc aatcatcacc atcttgaatt ggttcccttt 540
atagcactag gtaaaaagac aagggtgcat tctggctggg ctgtgttcca taaaggagt 600
tgactgagct agtttagtggc atgaaaaccg gaacaggtga atagtagatg ataaactcag 660
tattacctat tataaacttg aaaactaaat ttatttaaaa ttttaagac tagcaaatga 720
acgtgctcgg caaccgacgg attttaaag atttagtga atttctgat ttgaaattg 780
tatttgcata acataattgc aatcaaacat ccaatagaaa accaaaccac acacaaagat 840
gtatttatgt agcattagaa gatctcacca actctaaatg atggtagatt caccatcacc 900
attaaattct ttatlatagt ataaaaagat ttgtacgaa acacactgtt tatagcttac 960
agtttgagaa acgtgatagt ttatgataaa cgaagggtgt agctgagcca tagctagcta 1020
gcacaaagag caccctgttc ttacagaata attaagcagc ctgaaattaa tctgagaaac 1080
aagaaaagaa atgcagagac gttagctgca actgcaatca tglcaaacct tggccgaccg 1140
atcaagagaa aggggatgag ctaagctacc gatggcagca attcggcgcc gttgaaatca 1200
atcaagagaa tatgatccga tgatctgacc tgatctgacc atggacatgc agtgatgcca 1260
cgcagctagt gagcactgat gaagtgatga cactccatgc atccaatcca ggcaatgcat 1320
gtatttcttt tccacacag aggggtccac atccacctca ccttattctc gtccagttcc 1380
tgggggccc aaccatgac tatggctacc cgggcccacc agtcagtgtg tggcaccggt 1440
ctccggtaag ctacccgggg aggtcagtgc tctcaccacc ctccccttat ataaccttta 1500
ggcagctgtt ctacccgagc aagctggaga gctagcagaa acaaacctct ctactcca 1560
gataccgctt gctgccacta gccactacc atggatcttt gcaaggctag tcactcagt 1620
actagtgaga ctaaatctac ttaattctgt agttaataat tgaggttcca tttagctagt 1680
tgttagatt caagagagag cttaacttct tatagaatat ttggtcatt atcagaatc 1740
tcttgaataa acctagatta tgcactagat tctacgaata tttctttttt agtctcaagc 1800
tcttcaaaac tgcattggct gttgatccag ctagtccatc attaagtata taatttaata 1860
attaattaat agtaatacgt gctaccatg cagttccggc c 1901

```

<210> 2

<211> 4670

<212> DNA

<213> *Oryza sativa*

<400> 2

```

tgtgccacc acagcacacc tatcgttacc atcagcgtgg actaagaaca gaacaatttc 60
tcatcttttg ttctctgaga agtttagacc accaagatat atgctgatga tgcgtgatg 120
agctagctag ttttgcaatt acctatgggt tgcattcaca tcagggtctg tttagttccc 180
aaacaaaatt ttccagcctg ttacatagga tgtttggaca catgcataga gtactaaatg 240
tagaaaaaaa acaattaaac atttcgcctt gaaattacga gacaaatctt ttaagcctaa 300
ttgcgccatg atttgacaat ttggtgctac aataaatatt tgcataaat agattaatta 360
ggcttaataa attcgtcttg cagtttccag accggaatctg taatttatt tatgagatg 420
agctgcttgg atcttccatc acatattcag accgtacctc atctgaaagg ttagtaattt 480
gaactgcgta gtaatgctac aaggtaaatc aatcatcacc atcttgaatt ggttcccttt 540
atagcactag gtaaaaagac aagggtgcat tctggctggg ctgtgttcca taaaggagt 600
tgactgagct agtttagtggc atgaaaaccg gaacaggtga atagtagatg ataaactcag 660
tattacctat tataaacttg aaaactaaat ttatttaaaa ttttaagac tagcaaatga 720

```

```

acgltgctcg caaccgacgg attttaaaag atttatgiga atttcttgat ttagaanaatg 780
tatttgtcaa acataaltgc aatcaaacat ccaatagaaa accaaaccac acacaaagat 840
gtatttaltg agcaitagaa galctcacca actcfaaatg atggtagatt caccatcacc 900
atlaaatctt ttatatagt ataaaaagat ttigtacgaa acacactgtt tatagcttac 960
agtttagaaa acgtgatgt ttalgaataa ggaagggtgt agctgagcca tagctageta 1020
gcacaaagag caccctgttc ttacagaata attaagcagc ctgaaattaa tctgagaaac 1080
aagaagaaa atgcagagac gttagctgca actgcaatca tctcaaacct tggccgaccg 1140
atcaagagaa aggggatgag ctaagctatc gatggcagca attcggcgcc gttgaaatca 1200
atcgaagaga tatgatccga tgaictgac lgatctgacg atggacatgc agttagzca 1260
cgcagctagt gaggactgat gaagtgatga cactccatgc atccaatcca ggcaatgcat 1320
gtatttctct tccacacagag gggggcccac atccaccica ccttatcttc gtcagttcc 1380
tgggggacc ctcaccggg tatggccacc cggggcccac agtcagtggt tggcaccgt 1440
ctccgtaag ctcaccggg aggtcagtc tcccaaccac ctcccgctat ataacctta 1500
ggcaggtctt ctcaccggg aagctggaga gctagcagaa acaaacctct ctcactcca 1560
gatacctgct gctgccacta gccactacc atggaatcct gcaaggctag tcaactcag 1620
actagttaaa ctaaatctac ttaacttgt agttaataat tgaggttca tttagctagt 1680
tgttagatt caagagagag cttacttct tctacgaata ttctttttt agtctcaagc 1800
tcttcaaaa tgcaltggct gttagttcag ctagtctgac attaagtata taatlaatta 1860
atlaaatat agtaalact gctaccatg cagttccggc cgtcagctc gttcgacag 1920
aagacagca cgacgaacgc gggagctccg gtgtggaacc acaaccaggg cgtcagagtg 1980
ggcccccagg gggcagctct cctcggggac taccacctga tggagaaggt gggcacttc 2040
ggccgggagg gcatccggg ggcgtgtct caegcccgc gcgctccgc caagggcttc 2100
ttcagttgca cccacgact caccgacatc acctggcgcg acttctccg gtcgggggg 2160
ggccagacc cgcctactgt cggctctcc acctcaacc acgagcgcg cagccggag 2220
acgatccgg acctcgggg gtctggcgtc aagttctaca cccgggggg caactgggac 2280
ctctcggca acaacttccc cgtctcttc atccggcagc gcaataagtt ccccagctc 2340
atccagcct tcaagccaa cccggctcc catgtccagg agtactggag gztcttcag 2400
ttctgtccc accaccoga gaggctccac acctctctt tctcttca cgcgtcggc 2460
atccccacc attaccgca catggcggc ttcgggtca acactacac ctctgtaac 2520
cgcagcga aggccaggta cgtcaagttc cactggaagc ccactcggc cgtcagctgc 2580
ttgatggag acgaggccac gctcgtcggc ggcaagaacc acagccagc caccaggac 2640
ctctagact ccatcggcg cggcaacttc cccgagtgga agctgtctt ccaggtagt 2700
gatcatccag aatlaacgc ctatacgatc tgagttcga gcccgagta tctctaat 2760
taatttita atactgttag ttagctgacc cggaggaga ggagagttc gacttcgacc 2820
cgtgtgta cccaagaca tggccggagg acgaggtcc gctccggcc gtggggccc 2880
tcttctcaa cggcaactc gacaactct tcaacgaga cggagcagct gctctggcc 2940
cgggctgtt ggtccgggg atctactact cgcagcaaa gatgtcag tgcaggtgt 3000
tccgtctgc gcacacgag cgtacaggg tggggccaaa ctacctgat ctccggtg 3060
acggcccaa gtgcggccac cacaacaacc actagcagc gccaatgac tctatgacc 3120
gggacagga ggtgactac tacccatcc gccacggcc gctccggcc gggccgca 3180
cgccatcat gccggcccc tgggtggga ggaggcaga ggcgagata cacaagcaga 3240
acgactcaa gcagccccg zagaggtaca ggtcgtggc gcggataga caggagagt 3300
tcatcccc ctccggcga gctcggcacc ccaaggtct ccttagctc cggccatct 3360
gggtcaacta ctctccag gtaattcata ccagcaatt agtattact ccaatttgt 3420
ttttatgaca ctactagta agtttgaac iaalcaact catataaaa aaaggagg 3480
agtagttatt agtaatgatt aattgtttt tcttagttaa tccacatgat taaccatg 3540
tttagcaca cagtttatg aatccataga taattatit aatctatit tatatgaa 3600
atataatit aaaccactgt agagaattt aaattaatat gacttaatc ctatlaatt 3660
gcactaatc cggcaaaaa agctattaal ttgcaactac tatgtaatta actatitca 3720
ttcatgcagt gtalagatc gtgggggtg aagattcga ataggctca cgtgaagcca 3780
agcatgtgaa gaaactaagg cacaagaatg catcatctct ttttaatta ttggaglac 3840
accaaccaaa taaggccaga caatgtcaga tgcagcctc tctgtttgc gttggccat 3900
ctttgtatg catctattg ttaattacta gtacatgata lccaagtgt catcagag 3960
gctacagaaa tctgttaata cgataaatta aaagaacca aatggagcc tgcatagtg 4020
taacttaatt aatgtactg cgtattaatg ccactgtcgc atgttgaat actccatca 4080
agagctatit actattaagt attlaatta tcaattcaat ggtctcttt tttttccca 4140
aaccataggt ctatatacga accataicta cgacatcagt ggttlaatta tcatgttga 4200
caccgccaac ttcatacaga aactctact caacatttg tttctccgt atacttaca 4260
tgactttaat tagggaatgt gattgctgt atattgagaa tggtaatat cgtctgact 4320
ttgagttctt tctaattct taaaatcaat ttttaagct agttatatca tgalccagc 4380
cttacataac cttttggagc ggcaatgaaa caactgtgac ccacacagc agtatattca 4440
ttggcgtgga gtgttctgt tggatfana aacgaaata aacaaacct gtttatgga 4500
atgataatta atactagtt ggaatgata ttaattttt ttacttcat tccaaattc 4560
agattaaaca ataaaccatg ttaccggtc taccactat cactactac gttgtcaaa 4620
caaaaatag gtatlaatt tctagcacc tgaagatgc aatcgaatt 4670

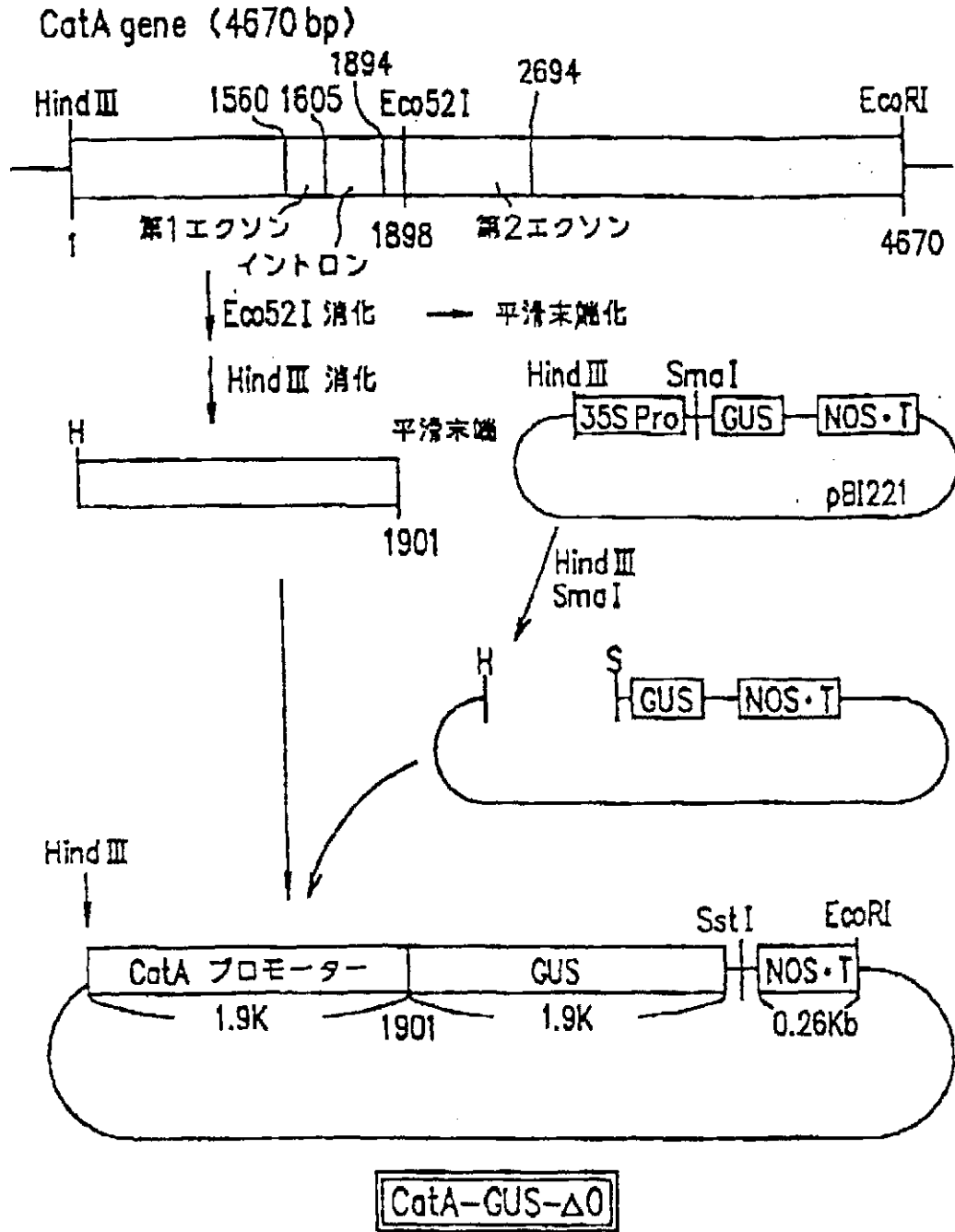
```

【 図面の簡単な説明 】

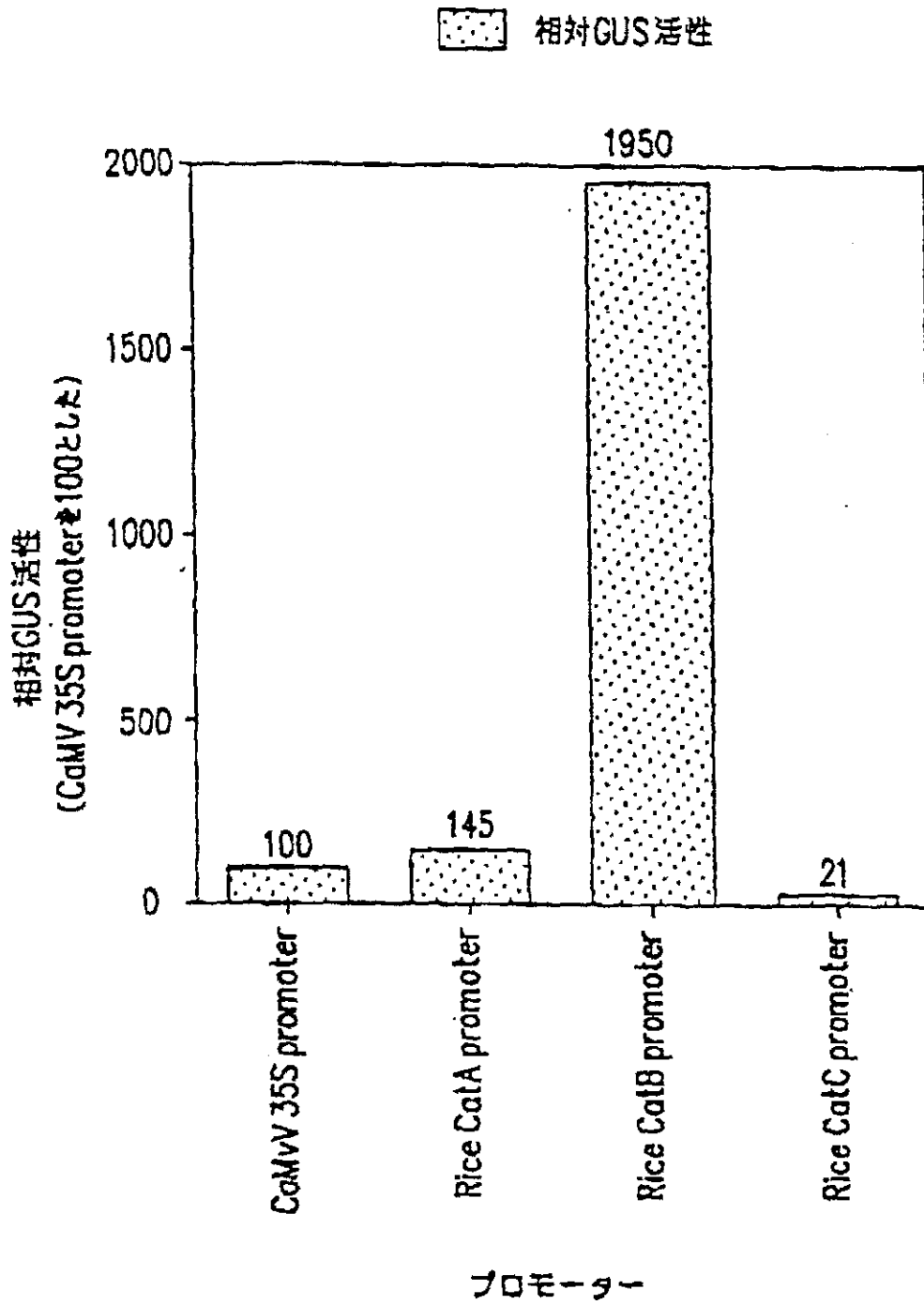
- 図 1 は、プラスミド C a t A - G U S - 0 の作製を示す模式図である。
- 図 2 は、各プロモーターの活性を比較した図である。
- 図 3 は、薬の G U S 組織染色の結果を示す写真である。

図 4 は、花粉の G U S 組織染色の結果を示す写真である。

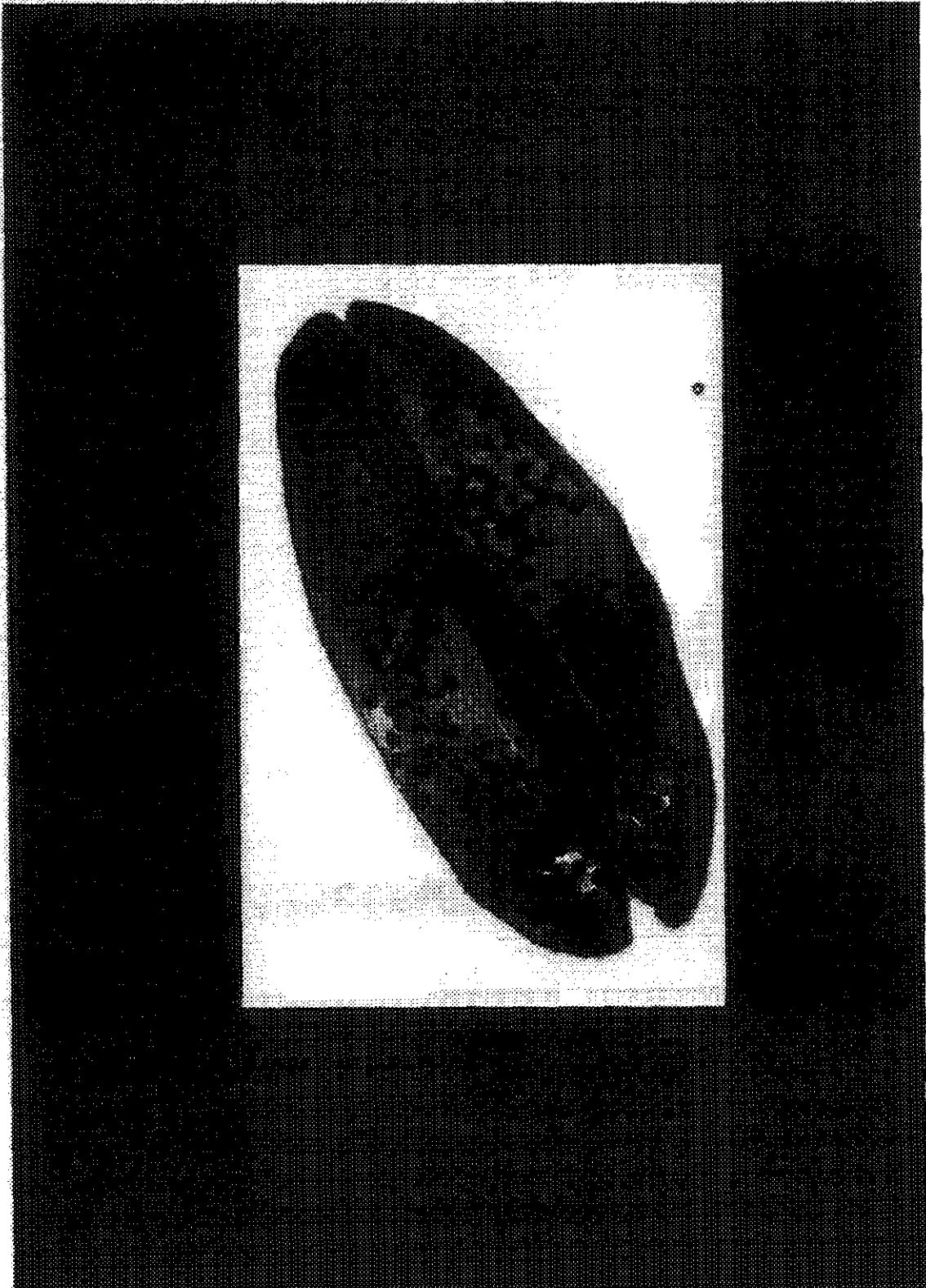
【 図 1 】



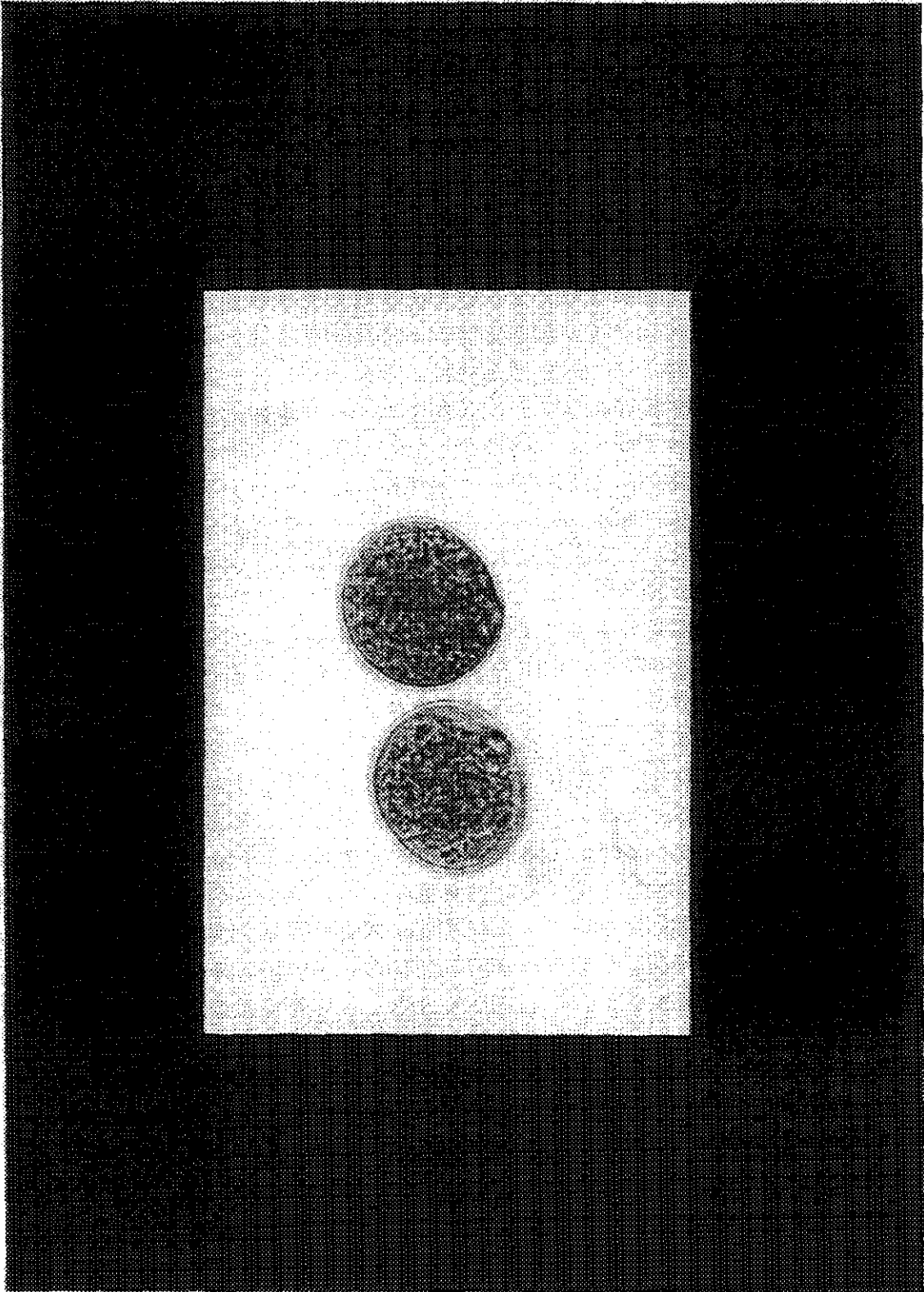
【 図 2 】



【 3 】



【 ㊗ 4 】



【 国 際 調 査 報 告 】

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 99/01551
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ^o C12N15/09, C12N5/04, A01H5/00		
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 ^o C12N15/09, C12N5/04, A01H5/00		
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		
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
CA (STN), BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), GeneBank, EMBL, DDBJ, GenSeq		
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 請求の範囲の番号
Y	JP. 6-504910, A (7' ラント・ジェネティック・システム'・ヌ・ベ'), 9. 6月. 1994 (09. 06. 94), 特許請求の範囲及び実施例参照, & WO, 92/13956, A1 & EP, 573443, A & US, 5639948, A	1-7
Y	HEROMI, HIGO et al., "Cloning and characterization of the rice CatA catalase gene a homologue of the maize Cat3 gene", Plant Molecular Biology, Vol. 30 (3) (1996), p. 505-521, Abstract, Materials and methods, Results及びDiscussion参照	1-7
Y	ROBERT B. GOLDBERG et al., "Induction of male sterility in plants by a chimeric ribonuclease gene", Nature, Vol. 347 (6294) (1990), p. 737-741, whole document参照	1-7
<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		の日後に公表された文献
「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		「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
「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)		「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
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「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
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		「&」 同一パテントファミリー文献
国際調査を完了した日	28. 07. 99	国際調査報告の発送日 10.08.99
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) 坂 崎 恵 美 子 印	4 N 9 4 5 1
		電話番号 03-3581-1101 内線 3488

様式 PCT/ISA/210 (第2ページ) (1998年7月)

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP99/01551

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 請求の範囲の番号
A	JP, 10-51983, A (パナソニック・インターナショナル), 27. 10月. 1998 (27. 10. 98), 特許請求の範囲参照 & WO, 96/17945, A1 & EP, 797675, A & US, 568904, A	1-7

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。

なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。