

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2014-171451  
(P2014-171451A)

(43) 公開日 平成26年9月22日(2014.9.22)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>AO1H 5/00 (2006.01)</b>	AO1H 5/00 ZNAA	2B030
<b>C12N 15/09 (2006.01)</b>	C12N 15/00 A	4B024

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 16 頁)

(21) 出願番号 特願2013-48259 (P2013-48259)  
 (22) 出願日 平成25年3月11日 (2013.3.11)

(出願人による申告) 国等の委託研究の成果に係る特許出願 (平成24年度 独立行政法人科学技術振興機構 研究成果最速展開支援事業に関する委託研究、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願)

(71) 出願人 504136568  
 国立大学法人広島大学  
 広島県東広島市鏡山1丁目3番2号

(74) 代理人 110001427  
 特許業務法人前田特許事務所

(72) 発明者 島田 裕士  
 広島県東広島市鏡山一丁目3番1号 国立大学法人広島大学大学院理学研究科内

(72) 発明者 坂本 敦  
 広島県東広島市鏡山一丁目3番1号 国立大学法人広島大学大学院理学研究科内

Fターム(参考) 2B030 AA02 AB03 AD07 CA14 CB02  
 4B024 AA08 BA79 CA01 DA01 FA02  
 GA11 HA20

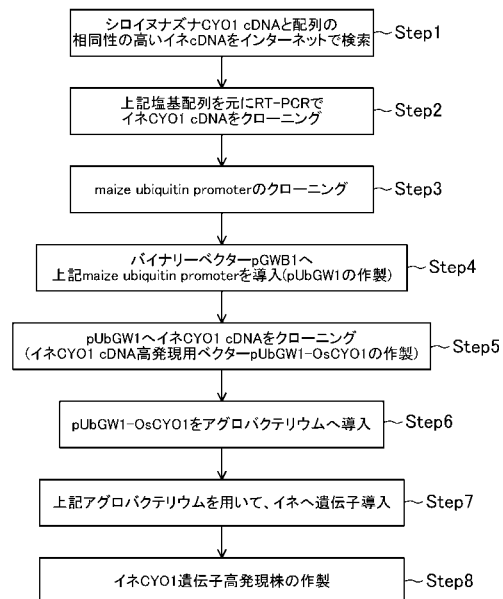
(54) 【発明の名称】 イネ形質転換体及びその作製方法

(57) 【要約】

【課題】収量増加が図られたバイオマス植物及びその作製方法を提供する。

【解決手段】イネ形質転換体には、CY01遺伝子が導入される。導入されるCY01遺伝子としては、例えばイネCY01遺伝子が挙げられる。CY01遺伝子の導入には、アグロバクテリウムを用いることができる。

【選択図】 図2



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

CY01遺伝子が導入されたイネ形質転換体。

**【請求項 2】**

前記CY01遺伝子は、植物のCY01遺伝子を含むことを特徴とする請求項 1 に記載のイネ形質転換体。

**【請求項 3】**

前記CY01遺伝子は、配列番号 3 のイネCY01遺伝子、前記イネCY01遺伝子がコードする配列番号 4 のイネCY01タンパク質と同じ機能を有するタンパク質をコードするバリエーション、又は前記イネCY01タンパク質と同じ機能を有し、アミノ酸配列で 40%以上の相同性を有するタンパク質をコードする遺伝子を含むことを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載のイネ形質転換体。

10

**【請求項 4】**

前記CY01遺伝子は、ユビキチンプロモータの下流に配置されていることを特徴とする請求項 1 ~ 3 のうちいずれか 1 つに記載のイネ形質転換体。

**【請求項 5】**

CY01遺伝子が導入されたアグロバクテリウムを作製するステップと、  
前記アグロバクテリウムをイネに感染させるステップと、  
前記アグロバクテリウムに感染した前記イネのうち、前記CY01遺伝子が発現する株を選抜するステップとを備えているイネ形質転換体の作製方法。

20

**【請求項 6】**

前記CY01遺伝子は、植物のCY01遺伝子を含むことを特徴とする請求項 5 に記載のイネ形質転換体の作製方法。

**【請求項 7】**

前記CY01遺伝子は、配列番号 3 のイネCY01遺伝子、前記イネCY01遺伝子がコードするタンパク質をコードするバリエーション、前記イネCY01タンパク質と同じ機能を有し、アミノ酸配列で 40%以上の相同性を有するタンパク質をコードする遺伝子を含むことを特徴とする請求項 5 又は 6 に記載のイネ形質転換体の作製方法。

**【請求項 8】**

前記アグロバクテリウムを作製するステップは、  
ユビキチンプロモータをバイナリーベクターに導入するステップと、  
前記CY01遺伝子を前記バイナリーベクター内の前記ユビキチンプロモータの下流に導入するステップと、

30

前記ユビキチンプロモータ及び前記イネCY01遺伝子が導入された前記バイナリーベクターを前記アグロバクテリウムに導入するステップとを含んでいることを特徴とする請求項 5 ~ 7 のうちいずれか 1 つに記載のイネ形質転換体の作製方法。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本発明は、イネ形質転換体及びその作製方法に関する。

40

**【背景技術】****【0002】**

近年、地球温暖化の防止を目的として、排出される二酸化炭素の削減が求められており、二酸化炭素を吸収する手段の 1 つとして、二酸化炭素を吸収する植物を用いて、その植物バイオマス植物バイオマスを生産する方法が提案されている。例えば特許文献 1 では、糖生合成に関与する遺伝子構築物の導入により植物バイオマスの増大させることが記載されている。

**【0003】**

特許文献 1 には、植物等を殺虫剤で処理することによって、二酸化炭素の同化を増強し、それによって植物の乾燥バイオマスが増強されることが記載されている。

50

## 【先行技術文献】

## 【特許文献】

## 【0004】

【特許文献1】特表2010-501662号公報

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0005】

特許文献1では、前述のとおり糖合成段階における遺伝子構築物の導入による植物バイオマスの増大を開示している。これに対し、本願発明者らは、吸収した二酸化炭素を同化する作用機構を有する光合成段階に着目して、植物バイオマスの増大を図ることができれば、効果的に植物バイオマスの増大を行うことが可能になるものと考えた。 10

## 【0006】

上記課題に鑑み、本発明は、二酸化炭素を吸収して同化を行う光合成段階に着目して、効果的にバイオマス植物及びその作製方法を提供することを目的とする。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0007】

本発明に係るイネ形質転換体には、CY01遺伝子が導入されている。導入されるCY01遺伝子の例としては、配列番号3のイネCY01遺伝子が挙げられるが、他の植物種のCY01ホモログ（以下単に「植物のCY01遺伝子」と表記する）を導入してもよい。

## 【0008】

また、本発明に係るイネ形質転換体の作製方法は、CY01遺伝子が導入されたアグロバクテリウムを作製するステップと、前記アグロバクテリウムをイネに感染させるステップと、前記アグロバクテリウムに感染した前記イネのうち、導入された前記CY01遺伝子が発現する株を選抜するステップとを備えている。 20

## 【発明の効果】

## 【0009】

本発明に係るイネ形質転換体及びその作製方法によれば、バイオマスの収量を増加しうる。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0010】

【図1】図1は、CY01タンパク質の機能を説明するための図である。

【図2】図2は、本発明に係るイネ形質転換体の作製方法を示す図である。

【図3】図3は、イネにおけるCY01ホモログのcDNAがコードするアミノ酸の配列と、シロイヌナズナCY01タンパク質のアミノ酸配列とを比較した図である。

【図4】図4は、CY01遺伝子に変異があるシロイヌナズナ変異株（CY01変異株；左側）と、イネCY01遺伝子が導入されて表現型が野生型に戻ったシロイヌナズナ変異株（右側）を示す写真図である。

【図5】図5は、CY01遺伝子が導入されたアグロバクテリウムの作製手順を示す図である。

【図6】図6は、光合成活性のパラメータを説明するための図である。 40

【図7】図7は、野生型イネ及びイネ形質転換体における乾燥重量と、CY01遺伝子の転写量とを示す図である。

【図8】図8は、野生型イネ及びイネ形質転換体において、植物湿重量当たりのクロロフィル含量を測定した結果を示す図である。

【図9】図9は、イネ形質転換体における光合成活性の測定結果を示す図である。

## 【発明を実施するための形態】

## 【0011】

- 発明に至る経緯 -

本願発明者は、二酸化炭素の同化を増強し、植物バイオマスの増加を図るため、イネの形質転換体を作製することを企図した。イネに導入する遺伝子を選定するに当たり、本願 50

発明者らは、光合成を増進させることができれば、二酸化炭素の同化を増強し、イネの成長を早めることができるのではないかと考えた。

【0012】

シロイヌナズナのCY01遺伝子(配列番号1;アミノ酸コード領域)は、子葉のみがアルビノで、その後発生する本葉が野生型同様の緑色の表現型を示す変異体の原因遺伝子として同定されている。CY01タンパク質(配列番号2)は、葉緑体に局在するタンパク質であって、図1に示すように、ジスルフィド結合に關与するブ表4ロテインジスルフィドイソメラーゼ(protein disulfide isomerase)活性を有している。同タンパク質の植物体内での機能は完全には解明されていないが、本願発明者らは、このCY01遺伝子が光合成の増進に寄与するのではないかと考え、CY01遺伝子をイネに導入することを企図した。

10

【0013】

- 本発明に係るイネ形質転換体の説明 -

本発明の一例に係るイネ形質転換体には、CY01遺伝子が導入されている。導入されるCY01遺伝子は、イネCY01のcDNA(配列番号3、「OsCY01」とも表記)であることが最も好ましいが、シロイヌナズナCY01遺伝子(cDNA)であってもよく、少なくともシロイヌナズナCY01遺伝子に相当する植物遺伝子であればよい。後述のアグロバクテリウムを用いた遺伝子導入方法を用いる場合、CY01遺伝子はイネの染色体内に導入される。

【0014】

イネ形質転換体において、CY01遺伝子は、CY01遺伝子と共に導入されたユビキチンプロモータ(例えばトウモロコシ由来)の下流に配置されていることが好ましい。この構成によれば、植物体内での遺伝子産物の発現を促進することができる。なお、CY01遺伝子の転写量を増やすために、トウモロコシ以外の植物等由来のユビキチンプロモータ、あるいは、ユビキチンプロモータ以外のプロモータが用いられていてもよい。

20

【0015】

本発明に係るイネ形質転換体では、同じ条件で育成した野生型のイネに比べて背丈が高くなっており、乾燥重量が増加している。特に、本発明に係るイネ形質転換体では、葉身、葉幅とも大きくなっている。また、このイネ形質転換体では、葉身におけるクロロフィル含量が野生型のイネに比べて増加している。本発明に係るイネ形質転換体では、株によってばらつきがあるものの、CY01タンパク質の発現量が野生型イネよりも多くなっており、CY01の発現量と乾燥重量との間には概ね正の相関が見られる。

30

【0016】

また、本発明に係るイネ形質転換体では、光合成(光化学系II)最大量子収率(以下、「Fv/Fm」と表記する)は野生型イネと大きく変化しないが、光合成(光化学系II)実効量子収率(以下、「Y(II)」と表記する)が野生型イネより大きく向上している。ここで、Fv/Fmは、暗所に一定期間置いた後に光合成を行わせることで測定される光合成の最大効率を表し、Y(II)は、光を当て続けたより自然に近い状態で測定される光合成効率を表す。

【0017】

以上のことから、本発明に係るイネ形質転換体では、CY01タンパク質の発現により、光合成活性が上昇しているものと考えられる。従って、本発明に係るイネ形質転換体によれば、従来のイネに比べ多量のバイオマスを生産することができ、より多くの二酸化炭素を吸収することが可能となる。

40

【0018】

- イネ形質転換体(CY01高発現イネ)の作製方法 -

図2は、本発明に係るイネ形質転換体の作製方法を示す図である。

【0019】

まず、最初に、シロイヌナズナCY01のcDNAと配列の相同性の高いイネcDNA配列をインターネット上で検索する(Step1)。cDNA配列の検索は、例えばGenbankのウェブサイトにて行なうことができる。

【0020】

50

本願発明者らがcDNAを検索したところ、シロイヌナズナCY01のcDNAと相同性の高いcDNA配列が見いだされ、その中から最も高い相同性を示すcDNAを選定した（このcDNA（配列番号3）をイネCY01 cDNAと呼ぶ）。cDNAレベルでの両者の相同性は、57.9%であった。図3は、イネCY01 cDNAがコードするアミノ酸の配列（配列番号4）とシロイヌナズナCY01タンパク質のアミノ酸配列（配列番号2）とを比較した図である。両アミノ酸配列の相同性は52.2%であった。

【0021】

次に、Step1で検索されたcDNA配列を利用したRT-PCR（Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction）によってイネCY01のcDNAをクローニングする。

【0022】

具体的には、公知の方法にてイネからRNAを抽出し、RT-PCRを用いてcDNAを作製する。次いで、作製されたcDNAをテンプレートとしてPCRを行う。この際に、上流側（フォワード）のプライマーとして配列番号5のプライマー（OsCY01-ATG）を、下流側（リバース）のプライマーとして配列番号6のプライマー（OsCY01 cDNA3）を用いることができる。続いて、得られたPCR産物を公知の方法でクローニングして塩基配列を確認した後、以後のステップに用いる。次に、得られたcDNAをクローニングする。

【0023】

ここで、得られたcDNAを、CY01遺伝子に変異を有し、子葉が白くなるシロイヌナズナのCY01変異株に導入して、その表現型が野生型に戻るか否かを試験することにより、当該cDNAがイネCY01 cDNAであることを確認してもよい。

【0024】

なお、本願発明者らが、本ステップで得られたcDNAを、アグロバクテリウムを用いた公知の方法により、CY01遺伝子に変異があるシロイヌナズナ変異株（CY01変異株）に導入したところ、白かった子葉が緑色になり、得られたcDNAがイネCY01cDNAであることが確認できた（図4参照）。

【0025】

次に、以下のStep3～Step6（図2参照）を行なうことで、CY01遺伝子が導入されたアグロバクテリウムを作製する。図5は、CY01遺伝子が導入されたアグロバクテリウムの作製手順を示す図である。

【0026】

上記アグロバクテリウムを作製するためには、まず、イネで恒常的且つ高レベルに遺伝子を発現させるユビキチンプロモータのクローニングを行う（図2のStep3）。図5では、ユビキチンプロモータとして、maize（トウモロコシ）のユビキチンプロモータ（図中では「UBIL pro」と表記）を用いる例を示している。

【0027】

本ステップでは、まずユビキチンプロモータが導入されているベクター（例えばpXHb7-SNF1-UBIL）をテンプレートとするPCRにより、ユビキチンプロモータ領域を増幅する。このPCRでは、所望の制限酵素サイトを含むプライマーを用いることで、プロモータ断片の両側に所望の制限酵素サイト（例えばHindIIIサイト等）を導入することができる。

【0028】

次いで、このユビキチンプロモータが導入されたプラスミド（例えばD-TOPO-UBIL）を作製する。ここで、DNAシーケンシングによって、プラスミドに導入されたユビキチンプロモータの塩基配列を確認してもよい。

【0029】

次いで、公知の方法により、バイナリーベクター（例えば後述のpGWB1）に、クローニングされたユビキチンプロモータを導入する（図2のStep4）。具体的には、所望の制限酵素を用いてプラスミド（D-TOPO-UBIL等）から切り出されたユビキチンプロモータ断片と、同じ制限酵素を用いて処理されたバイナリーベクターとを用いてライゲーションを行う。なお、あらかじめプロモータが挿入された市販のバイナリーベクターを用いる場合は、図2のStep3、4を行なう必要はない。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 3 0 】

次に、公知の方法により、上記バイナリーベクター（pUbGW1又はpUbGW4）内の、ユビキチンプロモータの下流に、Step2で得られたイネCY01遺伝子を導入する（Step5）。

## 【 0 0 3 1 】

次に、ユビキチンプロモータ及びイネCY01遺伝子が導入されたバイナリーベクターを公知の方法でアグロバクテリウムに導入する（Step6）。なお、本ステップ以後の手順については、一例として、「改訂3版モデル植物の実験プロトコル」細胞工学別冊（学研メディカル秀潤社刊）に記載された方法を用いることができる。

## 【 0 0 3 2 】

次に、上記バイナリーベクターが導入されたアグロバクテリウムを、イネのカルスに感染させることで、イネCY01遺伝子をイネに導入する（Step7）。

## 【 0 0 3 3 】

次に、アグロバクテリウムが感染したイネのうち、イネCY01遺伝子が高レベル（少なくともCY01遺伝子の発現量が野生型以上）で発現している株を選抜する。これにより、イネCY01遺伝子が高レベルで発現しているイネ形質転換体（イネCY01遺伝子高発現株）を得ることができる（Step8）。

## 【 0 0 3 4 】

なお、以上で説明した形質転換体及びその作製方法は実施形態の一例であって、用いられる植物の種類やCY01遺伝子の由来、用いるプラスミドやPCR用プライマーの選択等は、本発明の趣旨を逸脱しない範囲において適宜変更可能である。例えば、シロイヌナズナのCY01変異株にイネCY01遺伝子を導入すると野生型に戻る（図4参照）から、逆に、イネCY01 cDNAに代えてシロイヌナズナのCY01遺伝子をイネに導入してもバイオマスの増量効果を得ることができると推定できる。

## 【 0 0 3 5 】

また、CY01遺伝子は植物間で比較的塩基配列及びアミノ酸配列が保存されていると考えられることから、シロイヌナズナ以外の植物のCY01遺伝子、又はイネCY01遺伝子がコードするイネCY01タンパク質（配列番号4）と同じ光合成増進機能を有するタンパク質をコードし、イネCY01タンパク質との相同性がアミノ酸配列レベルで少なくとも40%以上、好ましくは50%以上、さらに好ましくは60%以上の遺伝子等をイネに導入してもバイオマスの増量効果を得ることができると考えられる。

## 【 0 0 3 6 】

ここで、表1に、種々の植物及び光合成微生物のCY01ホモログタンパク質（以下、単に「CY01タンパク質」と表記する）とイネCY01タンパク質との相同性を示す。なお、アミノ酸配列の相同性は、インターネット上にある相同性解析ソフト（Blast）を用い、データベースとしてNon-redundant protein sequences (nr)（すなわち、公開されているデータベース全て）を選択した。

## 【 0 0 3 7 】

## 【表1】

種名		Gene ID	相同性
Chlamydomonas	緑藻クラミドモナス	XP_001692505	30.10%
Chlorella	クロレラ	EFN53781	26.50%
Physcomitrella	ヒメツリガネゴケ	XP_001777740	49.10%
Cucumis	キュウリ	XP_004160453	44.20%
Medicago	ウマゴヤシ	XP_003607987	41.60%

## 【 0 0 3 8 】

本願発明者らが検索したところ、表1に示すように、微生物である緑藻クラミドモナス及びクロレラのCY01タンパク質とイネCY01タンパク質との配列の相同性はそれぞれ30 .

1%及び26.5%であり、高等植物の中でイネCY01タンパク質と最も相同性が低いウマゴヤシのCY01タンパク質とイネCY01タンパク質との配列の相同性は41.6%であった。このことから、イネCY01タンパク質との相同性がアミノ酸配列で少なくとも40%以上であるタンパク質をコードする遺伝子をイネに導入することで、イネCY01遺伝子を導入する場合と同様の効果を得ることができると推定できる。

【0039】

また、イネCY01タンパク質とシロイヌナズナのCY01タンパク質との間のアミノ酸配列の相同性は52%であるので、イネに導入される遺伝子は、イネCY01タンパク質との間で配列の相同性が50%以上であるタンパク質をコードしていることがより好ましい。

【0040】

また、上述のCY01遺伝子は、配列番号3のイネCY01 cDNAがコードするタンパク質と同じ機能を有するタンパク質をコードするバリエーションであってもよいし、遺伝子産物が同じ機能を有していれば、イネCY01 cDNAに一部配列を付加、置換及び削除したものであってもよい。

【0041】

また、上記のアグロバクテリウムを用いた遺伝子導入方法に代えて、パーティクルガン法等、他の遺伝子導入方法を用いることも可能である。

【実施例】

【0042】

<イネ形質転換体の作製>

本願発明者らは、上述の方法によってイネCY01のcDNA(配列番号3)をイネ(ジャポニカ種)に導入し、イネCY01遺伝子が高レベルで発現しているイネ形質転換体を複数株得た。

【0043】

-イネ形質転換体の作製-

図2に示すStep2では、イネの植物体をすり潰し、パウダー状にした当該植物体からNucleoSpin(登録商標) RNA II(タカラバイオ社製)を用いてRNAを抽出した。次に、このRNAから、PrimeScript(登録商標) II 1st strand cDNA Synthesis Kit(タカラバイオ社製)及びPCR装置(製品名iCycler、BIORAD社製)を用いたRT-PCRによってcDNAを得た。次いで、このイネcDNAをテンプレートとし、配列番号5及び配列番号6のプライマーを用いてPCRを行なうことで、イネCY01のcDNAを得た。

【0044】

図2に示すStep3では、トウモロコシ由来のユビキチンプロモータを有するベクター(pXHb7-SNFI-UBIL; VIB(Plant Systems Biology)製)をテンプレートとし、フォワードのプライマーとして、配列番号7のUBIL-5を、リバースのプライマーとして配列番号8のUBIL-3を用いたPCRを行った。PCRは、94℃5分間の熱処理を行った後、94℃30秒、55℃30秒、65℃2分を1サイクルとして30サイクル行い、65℃で5分間保持した。得られたPCR産物をベクターに導入し、DNAシーケンシングによって変異が入っていないもの(D-TOPO UBIL)を選択した。

【0045】

また、Step4における、イネCY01 cDNAのイネへの導入には、Gateway(登録商標)システムを用いた。具体的には、パイナリーベクター-pGWB1(島根大学総合科学研究支援センター 中川強教授作製)を制限酵素(HindIII)で処理した後、HindIIIを用いてD-TOPO UBILから切り出されたユビキチンプロモータを、ライゲーション反応によってpGWB1に導入した。ユビキチンプロモータが導入されたpGWB1をpUbGW1と称する。

【0046】

次に、ライゲーション反応後のプラスミドを大腸菌(DB3.1)に導入した後、カナマイシン及びハイグロマイシンを加えた培地内で培養した。次に、コロニーを形成した大腸菌に対し、UBIL-5及びUBIL-3をプライマーとして用いたコロニーPCRを行い、ユビキチンプロモータが導入された大腸菌を選択した。選択された大腸菌をTY培地を用いて増殖させて

10

20

30

40

50

から集菌し、プラスミド (pUbGW1) を抽出した。

【 0 0 4 7 】

次に、Step5では、抽出されたpUbGW1にはイネCY01のcDNA (stopコドンあり) 及びLR酵素 (ライフテクノロジーズジャパン社製) を加え 25 ℃ で一晩反応させた。続いて、反応液にprotein K (ライフテクノロジーズジャパン社製) を加えて 37 ℃、10 分間静置して反応を止めた。

【 0 0 4 8 】

次に、この反応液を用いて大腸菌 (DH5 α) を形質転換し、当該大腸菌をカナマイシン及びハイグロマイシンを含むLBプレート上に植菌して培養した。このLBプレート上に生じたコロニーに対してコロニーPCRを行った後、PCR産物のゲル電気泳動を行うことにより、イネCY01 cDNAが導入されていることを確認した。このPCRには、配列番号 5、6 のプライマーを用いることができる。以上の方法により、pUbGW1においてユビキチンプロモータの下流で且つNos T配列の上流にイネCY01 cDNAが挿入されたベクター (pUbGw1-OsCY01) を得た。

10

【 0 0 4 9 】

次に、Step6~8では、「改訂3版モデル植物の実験プロトコール」細胞工学別冊 (学研メディカル秀潤社刊) に記載された方法を用いてイネCY01 cDNAの発現ベクター (pUbGw1-OsCY01) をイネに導入し。

【 0 0 5 0 】

Step6では、アグロバクテリウムのコンピテントセルを、CaCl<sub>2</sub>を用いた常法により作製し、プラスミドの導入を行った。

20

【 0 0 5 1 】

具体的には、上記発現ベクター (pUbGw1-OsCY01) 100 ngを、氷上で溶解した100 μLのアグロバクテリウム (EHA101株) に加え、穏やかに混和した。次いで、コンピテントセルを 37 ℃ のウォーターバスに移して5分間インキュベートした。

【 0 0 5 2 】

次いで、液体培地を加え、28 ℃ で2~4時間震盪培養した。次に、試料を3000~5000 rpm、4 ℃ で5分間程度遠心分離し、菌体を沈殿させた。菌体を50~100 μLの新しい培地に懸濁した後、カナマイシンを含む寒天培地上にこの菌体を塗布し、至適温度 (28 ℃) で培養した。

30

【 0 0 5 3 】

次に、Step7では、Step6で得られたアグロバクテリウムを用いてイネ (品種名: 日本晴) にイネCY01のcDNAを導入した。

【 0 0 5 4 】

すなわち、まずイネ種子を消毒及び洗浄した後、オーキシンを含むカルス誘導培地 (N6D培地) 上に播種した。29 ℃、明期16時間、光量 200 μmol photons m<sup>-2</sup>S<sup>-1</sup>のチャンパー内で3~4週間程度培養して誘導されたカルスを新しいカルス誘導培地に植え継ぎ、同じ条件で3日程度培養した (カルスの前培養)。一方で、アグロバクテリウム用培地 (AB培地) を用いてStep6で得られたアグロバクテリウムを28 ℃、3日間遮光して前培養した。

40

【 0 0 5 5 】

続いて、前培養されたアグロバクテリウムを感染培地 (AAM培地) に懸濁し、懸濁液の吸光度 (OD<sub>600</sub>) の値を 0.05~0.1 の範囲に調整した。次いで、アグロバクテリウムの懸濁液及び共培養培地 (2N6-AS培地) をカルスに加えることで、アグロバクテリウムをカルスに感染させた。そのまま、カルスを遮光した状態で例えば29 ℃、3日間程度培養した。

【 0 0 5 6 】

次に、カルスを洗浄後、選択培地 (N6D-S培地) 上に置き、チャンパー内で例えば29 ℃、明期16時間、光量 200 μmol photons m<sup>-2</sup>S<sup>-1</sup>の条件で、3週間程度培養した。

【 0 0 5 7 】

50



次いで、カルスを再分化培地（MS-NK培地）上に植え継ぎ、29℃、明期24時間の条件で培養した。この際に、シュートの出現があるカルスや、緑化してきたカルスを新しいMS-NK培地に植え継いだ。次に、再分化し、シュートが伸長してきた個体を生育培地（MS-HF培地）に植え継いだ。その後、再分化した個体を、チャンパー内、29℃、明期24時間、光量200  $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{S}^{-1}$ の条件で生育させた。

【0058】

次に、シュートが十分な大きさになるまで成長したら、2~3日間、29℃、明期16時間、暗期8時間、光量200  $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{S}^{-1}$ の条件下、チャンパー内で馴化させた。次いで、馴化後の個体を土に植え継ぎ、25℃、明期16時間、暗期8時間、最大光量400  $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{S}^{-1}$ の条件下、培養室で生育させた。

10

【0059】

以上の方法により、得られたイネの形質転換体におけるイネCYO1遺伝子の発現量を後述の方法で確認した結果、高いレベルでイネCYO1遺伝子が発現している形質転換体の株1~4が得られた。そこで、これらのイネ形質転換体及び野生型イネについて、種々の評価を行った。ここで、形質転換に用いたイネと同じ種類で、遺伝子導入を行っていないイネを野生型イネとした。

【0060】

<評価方法>

- 植物体の乾燥重量測定 -

培養室において、上記のイネ形質転換体の株1~4と、野生型イネとをそれぞれ6カ月間、25℃、明期16時間、暗期8時間、最大光量400  $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{S}^{-1}$ の条件下、培養室で生育させ、種子ができたことを確認後水やりを止めた。この途中、25℃、最大光量400  $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{S}^{-1}$ の条件下で光条件を明期8時間、暗期16時間、の条件で2週間生育させることでイネの花芽形成を誘導した。水やりを止めて2カ月間放置した後、植物体を回収し、フリーズドライヤー（製品名：FREEZE DRYER (VD-800F)、TAITEC社製）を用いたフリーズドライにより完全に乾燥させてから、当該植物体の重量を測定した。

20

【0061】

- イネCYO1遺伝子の発現量の測定 -

遺伝子の発現量を調べる手段として、本願発明者らは、下記の方法でCYO遺伝子の転写量の解析を行った。

30

【0062】

まず、NucleoSpinRNA II（タカラバイオ社製）のキットを用いてイネからRNAを抽出した。この際に、液体窒素を入れながら乳鉢及び乳棒を用いて植物体をすり潰し、植物体のパウダーからRNAを抽出した。

【0063】

次に、抽出されたRNAを、PrimeScript（登録商標）RT reagent Kit (Perfect Real Time)（タカラバイオ社製）を用いてcDNAに変換した。逆転写反応液は、Primer Script Buffer 2.0  $\mu\text{L}$ 、PrimeScript RT Enzyme Mix 0.5  $\mu\text{L}$ 、OligodT primer 0.5  $\mu\text{L}$ 、Random6mers 0.5  $\mu\text{L}$ 、TotalRNA 6.5  $\mu\text{L}$ を混合して調製され、順に37℃15分、85℃5秒、16℃5分の条件で反応させた。

40

【0064】

得られたcDNAを、Easy Dilution(for Real Time PCR)（タカラバイオ社製）で8倍希釈した後、KAPA SYBR（登録商標）FAST ABI Prism qPCR kit（KAPA BIOSYSTEMS社製）を用いてReal-Time PCRを行った。1つの試料につき2回ずつこのPCRを行った。

【0065】

このReal-TimePCRでは、KAPA Mix 10  $\mu\text{L}$ 、10  $\mu\text{L}$  Primer (Forward) 0.8  $\mu\text{L}$ 、純水4.4  $\mu\text{L}$ 、及び試料のcDNA 4.0  $\mu\text{L}$ を混合し、95℃3分の後、95℃15秒と60℃40秒を1サイクルとして40サイクル処理を繰り返した。ここでは、イネCYO1 cDNAの増幅用プライマーとして、配列番号9のOsQ1-Forwardと、配列番号10のOxQ1-Reverseとを

50

用いた。

【0066】

また、内在性コントロール遺伝子の増幅用プライマーとして、配列番号11のeEF1-Forwardと、配列番号12のeEF1-Reverseとを用いた。このeEF1-ForwardとeEF1-Reverseとは、イネelongation factorをコードするDNAを増幅するためのプライマーである。Real-Time PCR用の装置としては、Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR system (アプライドバイオシステムズ社製)を用いた。

【0067】

- クロロフィルの定量 -

野生型イネ及びイネ形質転換体の株3、4について、以下の方法でクロロフィルの定量を行った。まず、3月齢のイネの葉を一部切り取り、液体窒素を用いて凍結させた。次に、乳鉢に液体窒素を入れ、そこに凍結したイネ葉を加えて乳棒ですり潰した。次に、すり潰された試料の5倍量(試料が100mgの場合は500 $\mu$ L)のタンパク質抽出用バッファを加えて、タッチミキサ(MT-31;大和科学社製)を用いて攪拌した。タンパク質抽出用バッファの組成は、15mM Tris-HCl(pH8.0)、50mM NaCl、10mMEDTA、1% SDSである。

10

【0068】

次に、マイクロ冷却遠心機(3700;久保田製作所製)を用いて試料を10000g(gは重力加速度)、10分間遠心分離した。次いで、上清を新しいチューブへ移し、再び試料を10000g、10分間遠心分離した。

20

【0069】

次に、得られた上清20 $\mu$ Lに100%アセトン80 $\mu$ Lを加えて試料をタッチミキサで攪拌し、4で20000g、10分間遠心分離する。

【0070】

得られた上清を1.5mLチューブに移し、超微量分光光度計(Nano Drop;Thermo Fisher Scientific社製)を用いて663nmと645nmでの吸光度を測定した。バックグラウンドとしては水を使用した。試料中のクロロフィル含量は、下記の式(1)を用いて定量した。

【0071】

$$\text{Chl a} + \text{Chl b} = 20.2A_{645} + 8.02A_{663} \quad \dots (1)$$

30

式(1)において、Chl aはクロロフィルaの濃度、Chl bはクロロフィルbの濃度、 $A_{645}$ は波長が645nmの時の吸光度、 $A_{663}$ は波長が663nmの時の吸光度である。この定量法の詳細は、Arnon, D. I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphe noloxidase in *Bete vulgaris*. Plant Physiol. 24, 1-15.に開示されている。

【0072】

- 光合成活性の測定 -

野生型イネ、及びイネ形質転換体の株3、4について、下記の方法で光合成活性を測定した。測定は、PAM(pulse amplitude modulation)を使用した常法により行った。すなわち、光合成測定装置(製品名JUNIOR-PAM;WALZ社製)を用いて土に植えられた状態の試料の葉にパルス変調された測定光を当て、蛍光を検出した。

40

【0073】

図6は、光合成活性のパラメータを説明するための図である。本実施例では、暗所に置いたイネの葉に測定光を当てた際に観察される蛍光を $F_0$ として測定した。また、暗所で測定光を当てた状態から光合成が飽和する程度の強さのパルス光(図6中の「フラッシュ」)を当てた際に測定された蛍光の最大値を $F_m$ とした。ここで見られる蛍光の上昇は、蛍光の収率の上昇を反映しており、 $F_v = F_m - F_0$ とすると、 $F_v / F_m$ は光化学系IIの最大量子収率を示すパラメータとなる。すなわち、植物において、光化学系IIの量子収率が高い程、原則として $F_v / F_m$ の値は大きくなる。

【0074】

また、暗順応させたイネの葉に励起光を当て続けた状態で飽和パルス光を当て、クロロ

50

フィル a を完全に還元させた状態で得られる蛍光を  $Fm'$  として測定した。 $Fm'$  は、蛍光の収率に影響を与える因子のうち、非光化学消光の影響だけを受ける。また、図 6 に示す  $F$  は、測定光と励起光を当て続けて、測定される蛍光が定常状態になった際の蛍光の測定値である。また、蛍光が定常状態になった後、励起光の照射を停止し、葉のクロロフィル a を完全に酸化させた時の蛍光を  $Fo'$  として測定した。

【 0 0 7 5 】

次に、これらの測定値から、ある励起光照射によって、どれだけ蛍光収率が低下するのかを表すパラメータとして、下式 ( 2 ) を用いて  $qN$  (非光化学消光) を求めた。

【 0 0 7 6 】

$$qN = 1 - (Fm' - Fo') / (Fm - Fo) = 1 - Fv' / Fv \quad \dots (2)$$

ここで、 $Fv' = Fm' - Fo'$  である。 $qN$  は、0 から 1 の間の値をとり、当たった光が熱になる反応が大きい時に値が大きくなる。

【 0 0 7 7 】

また、発明者らは、非光化学消光の指標となるパラメータとして、下式 ( 3 ) を用いて、NPQ も求めた。

【 0 0 7 8 】

$$NPQ = (Fm - Fm') / Fm' \quad \dots (3)$$

NPQ は、 $Fm$  がどれだけ励起光によって消光されて  $Fm'$  になったのかを相対的に示すパラメータである。

【 0 0 7 9 】

次に、下式 ( 4 ) を用いて、光化学消光の指標である  $qP$  を求めた。

【 0 0 8 0 】

$$qP = (Fm' - F) / (Fm' - Fo') \quad \dots (4)$$

$qP$  は 0 から 1 の間の値をとり、クロロフィル a が酸化されているほど大きい値となる。

【 0 0 8 1 】

次いで、下式 ( 5 ) を用いて  $Y(II)$  を求めた。

【 0 0 8 2 】

$$\begin{aligned} Y(II) &= qP \times Fv' / Fm' \\ &= (Fm' - F) / (Fm' - Fo') \times Fv' / Fm' \\ &= (Fm' - F) / Fm' \quad \dots (5) \end{aligned}$$

$Y(II)$  は、上述のように、励起光下での光化学系 II の実効量子効率を表す。

【 0 0 8 3 】

また、 $Y(II)$  と、葉に吸収された光の光量子密度とを含む下式 ( 6 ) を用いて電子伝達速度 (ETR) を求めた。

【 0 0 8 4 】

$$ETR = Y(II) \times PAR \times 0.84 \times 0.5 \quad \dots (6)$$

ここで、PAR は光合成有効放射であり、クロロフィルが吸収できる範囲の波長の光量子束密度 (面積当たりの光量子数; 単位は  $\text{mol quanta m}^{-2}\text{S}^{-1}$ ) である。式 ( 6 ) では、葉の吸収係数として 0.84 を用い、光化学系 I での光吸収量と光化学系 II での光吸収量とはほぼ 1 : 1 であるとした。

【 0 0 8 5 】

< 評価結果 >

野生型イネ及びイネ形質転換体について、乾燥重量を測定した結果を表 2 及び図 7 に示す。表 2 及び図 7 には、野生型イネにおける CY01 遺伝子の転写量を 1 とした場合の、イネ形質転換体の株 1 ~ 4 での CY01 遺伝子の転写量を併せて示す。

【 0 0 8 6 】

10

20

30

40

【表 2】

	乾燥重量 (g)	CY01発現量(相対比)
野生型	60.1	1
高発現イネ(#1)	98.08	6.2
高発現イネ(#2)	86.73	3.8
高発現イネ(#3)	124.6	147.5
高発現イネ(#4)	109.45	129.5

## 【0087】

10

表 2 及び図 7 に示すように、イネ形質転換体におけるイネCY01遺伝子の転写量は、野生型イネに比べて 3.8 倍(株 2)から 147.5 倍(株 3)と、株によるばらつきはあるものの、非常に多くなっていた。また、乾燥重量も株 1~4 の全てで野生型イネより重くなっており、本発明の方法により、野生型イネよりも乾燥重量が増加したイネが得られることが確認できた。また、図 7 に示す結果から、イネCY01遺伝子の転写量が増える程、乾燥重量が重くなる傾向があることを確認できた。なお、株 1~4 では、野生型イネに比べて葉身、葉幅とも大きくなっていた。

## 【0088】

また、表 3 及び図 8 には、イネの湿重量(すなわち、fresh weight)当たりのクロロフィル含量を測定した結果を示す。

20

## 【0089】

## 【表 3】

	クロロフィル含量(μg / 植物湿重量, fresh weight)
野生型	584.964
#3	992.545
#4	874.982

## 【0090】

表 3 及び図 8 に示すように、CY01遺伝子の発現量が多い株 3、4 では、葉のクロロフィル含量が、最大で野生型イネの 170%程度にまで増加することが確認できた。

30

## 【0091】

また、表 4 及び図 9 に、イネ形質転換体の株 3、4 における光合成活性の測定結果を示す。ここでは、野生型イネにおける値を 1 とした場合の各パラメータの値を示している。

## 【0092】

## 【表 4】

CY01高発現イネ	Y(II)	ETR	qP	qN	NPQ	Fv/Fm
#3	1.53	1.53	1.32	0.84	0.64	1.02
#4	1.49	1.48	1.30	0.75	0.54	1.01

40

## 【0093】

表 4 及び図 9 に示すように、株 3、4 において、Fv/Fmの値は野生型イネと同程度であったが、Y(II)の値は野生型イネの 150%程度と大きくなっていることが分かった。このことから、本実施例に係るイネ形質転換体では、光化学系IIの実効量子効率が大幅に増加していることにより、光合成活性が野生型イネよりも増加していることが確認できた。

## 【0094】

以上の結果から、光合成活性が増大することにより、二酸化炭素の吸収及び同化が促進され、植物バイオマスを効果的に増大させられることが示唆された。

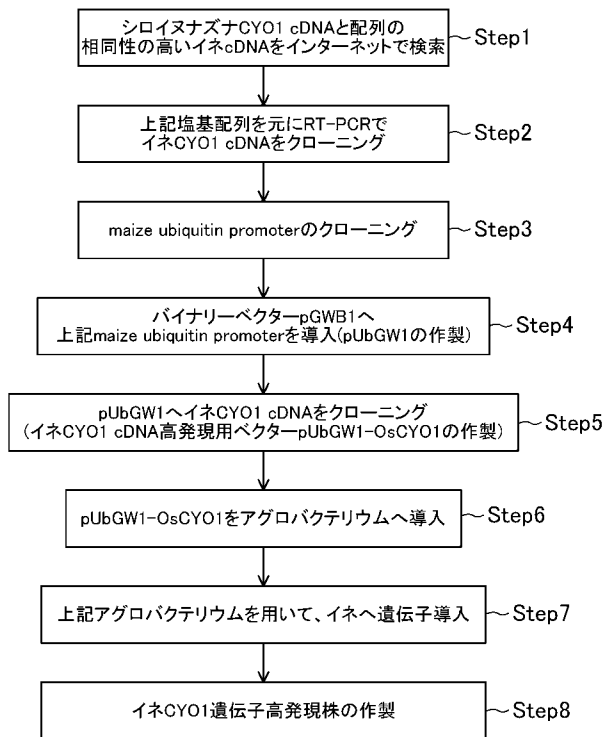
## 【産業上の利用可能性】

50

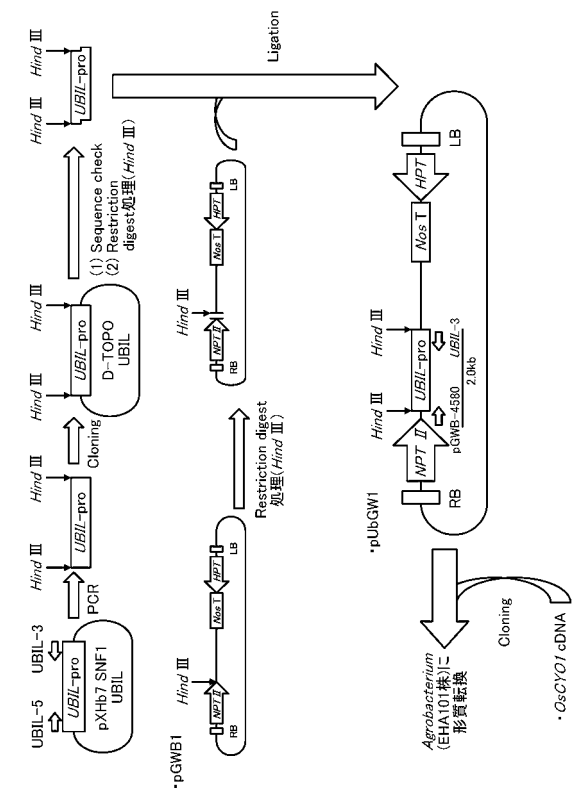
【 0 0 9 5 】

本明細書に開示されたイネ形質転換体及びその作製方法は、植物バイオマスの生産性の向上に有用である。

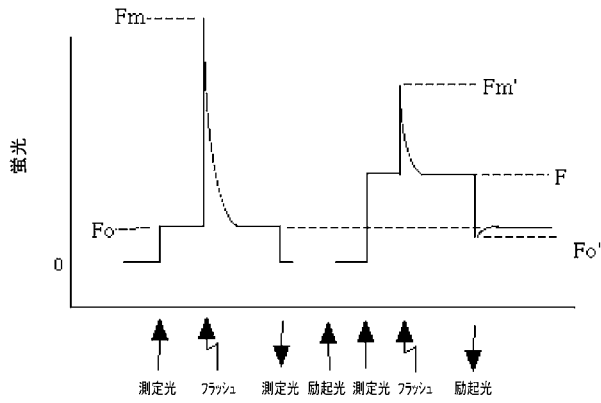
【 図 2 】



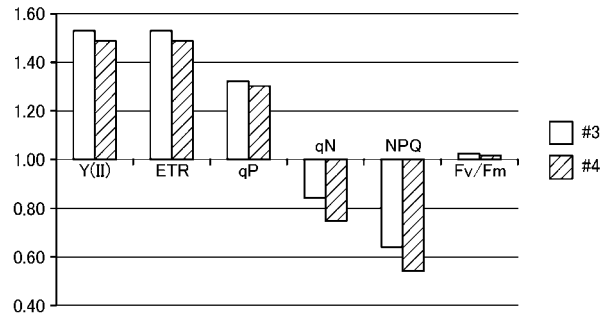
【 図 5 】



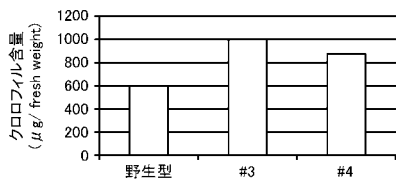
【 図 6 】



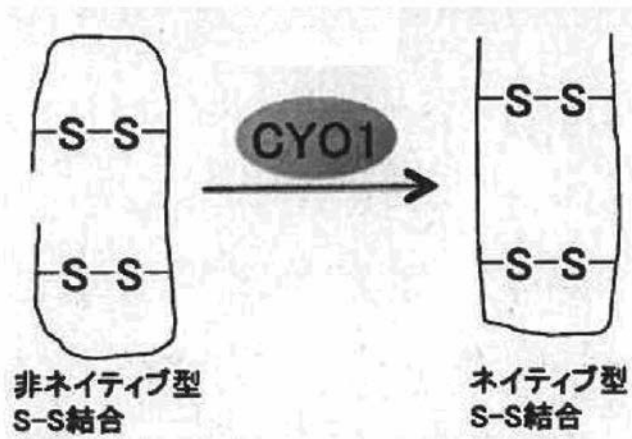
【 図 9 】



【 図 8 】



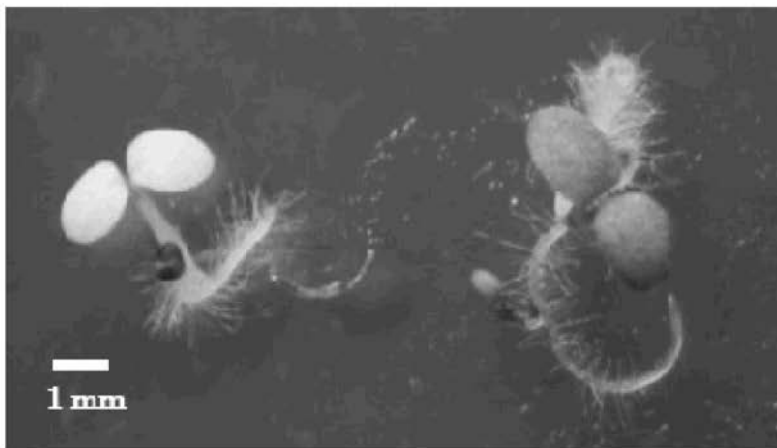
【 図 1 】



【 図 3 】

イネCYO1.seq	1	MTPANPTLLSSPRPNPSLPLPRRARRPHPPAANTTGAASTPDWFRPRAPPDADPSTSG	60
シロイヌナズナCYO1.seq	1	-----MFRLYPNCSLPSHRPLVFLPRLPSRSLRCRAADI-RLGDG	40
イネCYO1.seq	61	GRVA--ARDPGYVRANE-GAEEKKGRGRRRWWDWNSGDRESYLVDVVEPLPLPLTV	117
シロイヌナズナCYO1.seq	41	IRLPREADSTSDTARSQDVSVAAAGNGEGAKWRKRLLNSKSGESYLVDVGDALPLPMTY	100
イネCYO1.seq	118	PDTEPMSREELDRRLSCDVEIEDCKTYSYEWTKKCRSCQGTGLVSYFRKKRETICKCVP	177
シロイヌナズナCYO1.seq	101	PDTSPVSPDVIDRRLQCDPVVEDGREVVYEWTKKCRSCQGSGLVSYFKRKEVICKCIP	160
イネCYO1.seq	178	CAGIGYVRKITFRQDIENMDELNNGKPP	205
シロイヌナズナCYO1.seq	161	CQGIGYVQKITSRTDIEVMEDLDNEPS-	187

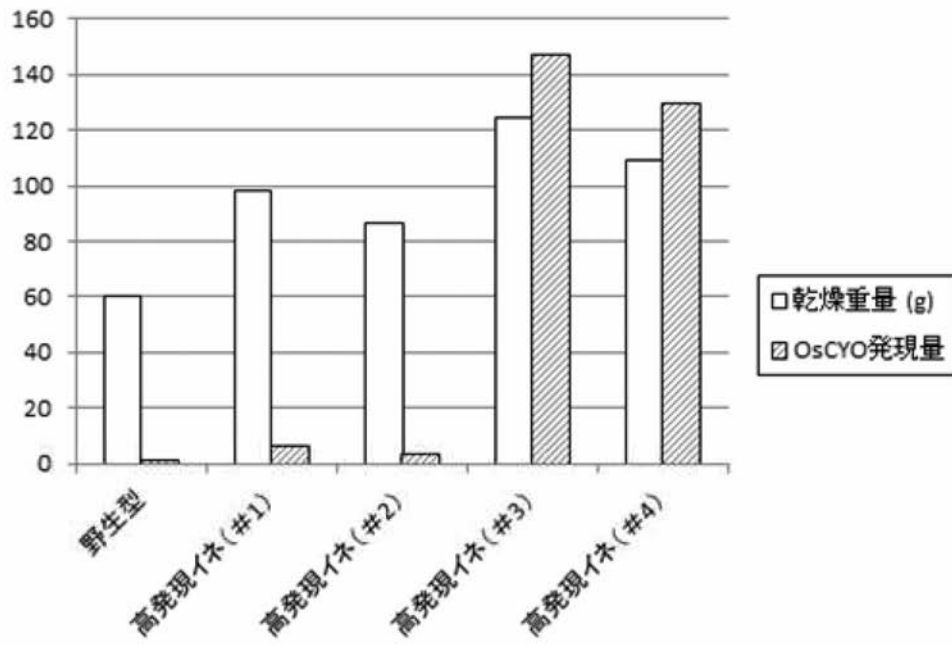
【 図 4 】



*cyo1* mutant

イネCYO1遺伝子を  
導入した*cyo1* mutant

【 図 7 】



【 配列表 】

2014171451000001.app