

(19)日本国特許庁 (J P)

(12)特許公報 (B 2)

(11)特許番号

特許第3200627号

(P 3 2 0 0 6 2 7)

(45)発行日 平成13年 8月20日(2001.8.20)

(24)登録日 平成13年 6月22日(2001.6.22)

| (51) Int.Cl. ⁷ | 識別記号 | F I |
|---------------------------|------|------------------|
| C12N 15/09 | ZNA | C12N 15/00 ZNA A |
| A01H 5/00 | | A01H 5/00 A |
| C12N 5/10 | | C12N 5/00 C |

請求項の数 6 (全11頁)

| | | | |
|----------|--------------------------------------|----------|--|
| (21)出願番号 | 特願平11 - 132706 | (73)特許権者 | 598169457 奈良先端科学技術大学院大学長 奈良県生駒市高山町8916 - 5 |
| (22)出願日 | 平成11年 5月13日(1999.5.13) | (72)発明者 | 平塚 和之 奈良県生駒市高山町8916 - 5 大学宿舍 A 204 |
| (65)公開番号 | 特開2000 - 316582(P 2000 - 316582 A) | (72)発明者 | 堀田 康雄 奈良県生駒市高山町8916 - 5 大学宿舍 B 206 |
| (43)公開日 | 平成12年11月21日(2000.11.21) | (72)発明者 | 高瀬 尚文 奈良県生駒市高山町8916 - 5 大学宿舍 A 205 |
| 審査請求日 | 平成11年 5月13日(1999.5.13) | (74)代理人 | 100059258 弁理士 杉村 暁秀 (外 2名) |
| 前置審査 | | 審査官 | 本間 夏子 |

最終頁に続く

(54)【発明の名称】減数分裂細胞に特異的な植物プロモーター

1

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】 減数分裂細胞に於いて特異的にプロモーター機能を有し、配列表の配列番号 1 記載の、塩基番号 1 - 1 3 0 9 で示される塩基配列からなることを特徴とする、植物プロモーター。

【請求項 2】 減数分裂細胞に於いて特異的にプロモーター機能を有し、配列表の配列番号 2 記載の、塩基番号 1 - 1 4 6 1 で示される塩基配列からなることを特徴とする、植物プロモーター。

【請求項 3】 請求項 1 又は 2 記載の植物プロモーターを挿入した、発現ベクター。

【請求項 4】 請求項 1 又は 2 記載の植物プロモーターを発現ベクターに挿入し、当該発現ベクターを植物細胞に導入して形質転換細胞を得て、当該形質転換細胞から植物種子を得て、当該植物種子から形質転換植物を生産

2

する過程より構成される事を特徴とする、形質転換植物の生産方法。

【請求項 5】 請求項 1 又は 2 記載の植物プロモーターを挿入した、形質転換植物。

【請求項 6】 請求項 5 記載の形質転換植物由来の植物種子。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】本発明は、減数分裂細胞において特異的にプロモーター機能を有する植物プロモーター及びその利用方法に関する。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】プロモーターとは、ゲノム DNA 配列上に存在する、転写 (m R N A 合成) の開始を規定するシグナルである。転写開始点の近傍上流には、転写開始に

10

必要な T A T A ボックスと呼ばれる開始点が存在し、この部位が転写開始点に必要であると考えられている。遺伝子組み換え技術において、目的の遺伝子を人為的に導入し発現させるためには、強力なプロモーターが有用であり、例えばカリフラワーモザイクウイルス (C a M V) の 3 5 S プロモーターは構成的に発現する性質を持ち、これまで頻繁に用いられてきた。

【 0 0 0 3 】しかし、時間的、空間的に極めて限定された遺伝子発現制御が望まれる場合には、組織特異的、時期特異的なプロモーターを使用する必要がある。従来、生殖細胞における特異的な遺伝子発現を司るプロモーター配列として、花粉特異的なプロモーターの報告はあるが、減数分裂期において特異的な発現を示すプロモーターは見出されておらず、減数分裂期に減数分裂特異的に発現するプロモーターの取得とその利用が望まれていた。

【 0 0 0 4 】これまでに、減数分裂に伴って発現する遺伝子のプロモーターとしては、ただ一例のみシロイヌナズナの A t D M C 1 遺伝子の報告があるが (K l i m y u k a n d J o n e s , P l a n t J . 1 1 : 1 - 1 4 (1 9 9 7))、その発現特異性は厳密でなく、根で非常に高い発現レベルを示し、分裂期の体細胞においても発現することが示されている (D o u t r i a u x e t a l . , M o l G e n G e n e t 2 5 7 : 2 8 3 - 9 1 (1 9 9 8))。一方、分裂酵母の減数分裂特異的な遺伝子である m e i 2 のプロモーターを植物細胞において一過的に発現させ、その機能を観察した研究があるが、それらは形質転換植物などを用いておらず、培養細胞における知見であり、組織、器官レベルの知見は全く得られていない (T a b a t a e t a l . , P l a n t S c i 8 9 3 1 - 4 1 (1 9 9 3))。

【 0 0 0 5 】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、高等植物の減数分裂細胞において特異的に発現するプロモーターを提供する事にある。即ち、現在未発見、未開発の減数分裂期に減数分裂細胞でのみ特異的に転写活性化が起こる様なプロモーターを単離し、それを利用した外来遺伝子系を構築することにある。そのような減数分裂特異的なプロモーターが開発されれば、植物の生殖あるいは遺伝子組み換えの人為的制御に関連する基盤技術となりうる。さらに、本発明の目的は、巨大ゲノム生物からのプロモーター配列の単離方法と、それを利用した外来遺伝子の形質転換植物における、組織特異的、時期特異的発現方法を提供する事にある。

【 0 0 0 6 】

【課題を解決するための手段】L I M (l i l y m e s s a g e s I n d u c e d a t M e i o s i s) 遺伝子群は花粉母細胞で発現する遺伝子であり、時期特異性、組織特異性を示す事が知られている (K o b

a y a s h i e t a l . (1 9 9 4) D N A R e s . 1 , 1 5 - 2 6)。そのような特異性を有する遺伝子群の単離と特徴付けは、斉一な減数分裂進行が観察可能なテッポウユリでのみ可能である。従って、L I M 遺伝子群の上流に位置する発現制御領域 (プロモーター) を取得すれば、その特異性を司るプロモーターの特性解明につながると考えられる。また、減数分裂あるいは花粉形成といった現象は、高等植物に保存されていると考えられることから、テッポウユリから単離したプロモーターは他の分類群に属する植物でも同様に時期及び組織特異性を示すことが期待される。以上の知見より、テッポウユリの花粉母細胞より、L I M 遺伝子群の上流に位置するプロモーターを採取した。その結果、ルシフェラーゼ活性測定による転写活性化の評価により、減数分裂期の葯において特異的に転写活性化をもたらす作用が示された。

【 0 0 0 7 】本発明のプロモーターは、植物においては最初の減数分裂特異的なプロモーターである。上述したように、これまでに種々の植物のプロモーターが単離され、それらの発現特異性が調べられてきたが、未だ減数分裂細胞においてのみ特異的に発現するプロモーターは報告がない。本発明の DNA 断片は減数分裂特異的なプロモーターとしての時間的、空間的な発現特異性が極めて厳密であり、その点でも有用であると考えられる。本発明の具体的利用方法としては、雄性不稔植物の作出等があるが、植物の生殖あるいは遺伝的組み換えの、人為的な制御を可能とする基盤技術開発の端緒となることも期待される。

【 0 0 0 8 】

【発明の実施の形態】本発明の減数分裂細胞に特異的な植物プロモーターは、配列表の配列番号 1 及び配列表の配列番号 2 に記載した塩基配列により特定される。遺伝子組み換え技術によれば、基本となる DNA の特定の部位に、当該 DNA の基本的な特性を変化させることなく、あるいはその特性を改善する様に、人為的に変異を起こすことができる。本発明により提供される天然の塩基配列を有する遺伝子、あるいは天然のものとは異なる塩基配列を有する遺伝子に関しても、同様に人為的に挿入、欠失、置換を行うことにより天然の遺伝子と同等のあるいは改善された特性を有するものとするのが可能であり、本発明はそのような変異遺伝子を含むものである。また、本発明で明らかにされた減数分裂細胞に特異的な植物プロモーターは、下記の実験方法により得られた最も長い配列であるが、その一部を欠いた、あるいは置換した植物プロモーターも本発明の範囲である。即ち、本発明の植物プロモーターには、減数細胞に於いて特異的に植物プロモーター機能を有する限り、配列表の配列番号 1 及び配列表の配列番号 2 に記載した塩基配列の一部が欠損、置換若しくは置換された植物プロモーターもまた含有される。

【 0 0 0 9 】また、本発明の植物プロモーターを植物に導入して形質転換を行う方法、当該植物プロモーターを導入した発現ベクター、当該植物プロモーターを植物に導入して得た形質転換した植物、及びそのようにして得た形質転換植物由来の植物種子もまた、本発明の範囲内である。本発明の植物プロモーターを植物に導入することにより、減数分裂を行う生殖細胞において特異的に転写活性化を行う事が可能である。本発明の植物プロモーターを導入する植物の例としては、ユリ、イネ、トウモロコシ、アスパラガス、コムギ等の単子葉植物、またシロイヌナズナ、タバコ、ニンジン、ダイズ、トマト、ジャガイモ等の双子葉植物が挙げられる。形質転換体の作製方法としては、本技術分野において知られている通常の方法を用いる事ができる。本発明において使用可能なベクターはプラスミドベクターであり、例えば実施例で使用した p B I 1 2 1 及び p B I 2 2 1 等が挙げられるが、それらに限定されるものではない。そのようなベクターを、例えばアグロバクテリウム菌に導入して、カルス又は幼植物に感染させることにより、形質転換植物を作製する事が可能であり、更に、そのような形質転換植物に由来する種子を得る事が可能である。本発明の植物プロモーターを植物に導入する形質転換法はアグロバクテリウム法に限定されるものではなく、パーティクルガン法、電気穿孔法等の方法を用いる事も可能である。

【 0 0 1 0 】

【実施例】(DNAの抽出)テッポウユリ花粉母細胞より、フェノール、クロロホルム法によりDNAの抽出を行った。即ち、CTAB法によりムライ等の報告の方法に準じて(Murray, G. C. and Thompson, W. F. (1980) Nucl. Acid Res. 8, 4321-4325)、DNAを抽出した。具体的には、約1から1.5mlの花粉母細胞に海砂と液体窒素を加えて乳鉢と乳棒で良くすりつぶし、3mlの2%CTABを加えさらに十分にホモジェナイズし、それを65で30分間インキュベートした。次に、クロロホルム/イソアミルアルコール(24:1)を3ml加え5分間転倒混和した。それを、ベックマンJA-20ローターで8000rpm、20分間遠心し、上清を得た。それを、約800µlづつ微量遠心チューブに分注し、さらに1%CTABを1ml加えて転倒混和した。室温で1時間静置後、8000rpmで10分間遠心し、沈殿を得た。それに、1MのCsClを600µl加え45に加熱し沈殿を溶解させた。それに100%エタノールを1.2ml加え12000rpmで5分間遠心し沈殿を得た。それを70%エタノールでリンスして、600µlのTE緩衝液に溶解し、さらにRnase処理を行い、フェノール/クロロホルム処理を3回繰り返してエタノール沈殿後、300µlのTEに溶かしDNAを得た。

【 0 0 1 1 】(プライマーの設計)プロモーターを取得

するために、減数分裂特異的な発現を示すLIM10及びLIM18遺伝子のcDNAの塩基配列情報(Kobayashi et al. (1994) DNA Res. 1, 15-26)に基づき設計したプライマーを合成した。使用したプライマーの塩基配列を下記に示す。

10 Pro 1 : ACGCTGGCGACTTCGAGTCGAACCGTCAG (29mer)

10 Pro 2 : GCGGCGAGCAAAGTATCATATTCCTCTCTT (30mer)

10 18 Pro 1 : ATCATTGGCTTGTCACGGGTGCCGGAGATC (30mer)

18 Pro 2 : GGTGCTGAAGTGACGGCCGATCAGCCGC (29mer)

18 Pro 3 : ATGACTCGCGCACTCTCTGGATCGTTCGAG (30mer)

18 Pro 4 : AGTGAGGTGCCCATGGTCTCCGTTGCGAG (30mer)

【 0 0 1 2 】(LIM10プロモーターの取得) 鑄型となるゲノムDNAをBamHIで処理しキットに添付のカセットを付加した後、カセットプライマーC1とプライマー10Pro1を用いてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行った。PCRは、94で5分加熱した後、94で30秒-64で1分-72で2分の反応を30サイクルという条件で行い、反応終了後は4で保存した。さらに、カセットプライマーC2とプライマー10Pro2を用いて、94で5分加熱後、94で30秒-66で1分-72で2分の反応を30サイクル行うという条件でPCRを行い、DNA断片を得た。このDNA断片をノバゲン社製pT7Blue T-vectorに、TA法によりクローニングした。塩基配列の解析を行った結果、LIM10の上流配列である、図1及び配列表の配列番号1記載の塩基配列を得た。

【 0 0 1 3 】(LIM18プロモーターの取得) 鑄型となるゲノムDNAをEcoRIで処理してキットに添付のカセットを付加した後、カセットプライマーC1と18Pro1を用いてPCRを行った。PCRは94で5分加熱後、94で30秒-62で1分-72で2分の反応を30サイクルという条件で行い、反応終了後は4で保存した。さらに、カセットプライマーC2と18Pro2を用いて、94で5分加熱後、94で30秒-62で1分-72で2分の反応を30サイクル行うという条件でPCRを行い、DNA断片を得た。このDNA断片をノバゲン社製pT7Blue T-vectorにTA法によりクローニングし、塩基配列決定を行った。

【 0 0 1 4 】さらに、得られた塩基配列情報に基づき、2種類のプライマー18Pro3および18Pro4を合成し、ゲノムDNAをXhoI処理したキット(宝酒造製LA-PCR™インビトロクローニングキット)に

添付のカセットを付加後、カセットプライマー C 1 と 1 8 P r o 3 を用いて、9 4 °C で 5 分加熱後、9 4 °C で 3 0 秒 - 6 6 °C で 1 分 - 7 2 °C で 2 分の反応を 3 0 サイクルという条件で P C R を行い、反応終了後は 4 °C で保存した。さらに、カセットプライマー C 2 と 1 8 P r o 4 を用いて、9 4 °C で 5 分加熱後、9 4 °C で 3 0 秒 - 6 6 °C で 1 分 - 7 2 °C で 2 分の反応を 3 0 サイクルという条件で P C R を行い、DNA 断片を得た。

【 0 0 1 5 】当該 DNA 断片を宝酒造製 DNA プランティングキットを用いて平滑化し、さらに宝酒造製ポリヌクレオチドキナーゼを用いて 5' 末端をリン酸化した。それを、Sma I で切断し、脱リン酸化処理したストラタジーン社製 p B l u e s c r i p t S K I I + ベクターにクローニングした。塩基配列の決定を行った結果、L I M 1 8 のコード領域の上流配列である、図 2 及び配列表の配列番号 2 記載の塩基配列を得た。

【 0 0 1 6 】(ベクターの構築)配列表の配列番号 1 及び配列番号 2 に示す、本発明の DNA 断片を任意の塩基配列からなる DNA の上流に挿入する事により、減数分裂細胞特異的にその転写産物を発現させることができる。本実施例において、タバコ (*Nicotiana tabacum* cv. S R 1) にホタルルシフェラーゼ遺伝子を導入した。植物形質転換遺伝子ベクターとして良く用いられる p B I 1 2 1 (クロンテック社製) 及び p B I 2 2 1 (クロンテック社製) を改変して作成した植物用ベクター p B I 1 2 1 - L U C と p B I 2 2 1 - L U C + (平塚和之 細胞工学別冊植物細胞工学シリーズ 6 (1 9 9 7)) を用いて、当該 DNA 断片を挿入して作成したプラスミドベクターを構築した。図 3 において、使用した形質転換用ベクターの概要を示した。1 2 1 - L U C の構造を上、2 2 1 - L U C + の構造を下に示す。減数分裂特異的発現のためのプラスミド構築には、図 3 に示す Ca M V 3 5 S p r o の代わりに配列表の配列番号 1 及び配列表の配列番号 2 に示した塩基配列を挿入した。主要な制限酵素切断部位と、N O S ターミネーター (N O S - t e r)、さらにカナマイシン耐性遺伝子 (N O T I I) の位置を示した。

【 0 0 1 7 】(ベクターの導入及び形質転換)アグロバクテリウム菌 (*Agrobacterium tumefaciens* L B A 4 4 0 4) に、エレクトロポレーション法により導入した。それを用いて、リーフディスク法によりタバコを形質転換し、植物体を得た。形質転換植物体より得られた種子をカナマイシンを含む M S 寒天培地に播種し、カナマイシン耐性植物をそのまま、あるいは培養土に移植して生育させ、観察に供試した。

【 0 0 1 8 】(ルシフェラーゼ活性測定)形質転換した植物について転写活性化の指標である、ルシフェラーゼ活性の測定を行った。本発明の当該 DNA 断片をプロモーターとして用いた場合、ルシフェラーゼ活性は、減数分裂期の細胞を多く含む時期の薬に於いて特に高く、そ

他の器官、組織ではルシフェラーゼ活性は極めて低かった。即ち、減数分裂期の細胞を多く含む薬と葉、茎、根などの組織を取り分け、市販のルシフェラーゼ活性測定キットに添付された抽出緩衝液を用いて、添付の手段に従い抽出操作を行い、ベルトールド社製ルミノメーター L B 9 5 0 1 にて 1 0 秒間のフォトンカウンティングを行い、発光活性を比較した。図 4 に、配列表の配列番号 1 記載の塩基配列のプロモーターを導入して各組織のルシフェラーゼ活性を測定した結果を、図 5 に、配列表の配列番号 2 記載の塩基配列のプロモーターを導入して各組織のルシフェラーゼ活性を測定した結果を、図 6 に、対象区として、カリフラワーモザイクウイルス 3 5 S プロモーターを導入して各組織のルシフェラーゼ活性を測定した結果を、それぞれ示す (縦軸: c o u n t / s e c / t u b e)。

【 0 0 1 9 】その結果、配列表の配列番号 1 記載の塩基配列と配列番号 2 記載の塩基配列のプロモーターのどちらを導入した場合においても、葉、茎、根では活性が極めて低く、検出限界以下の活性を示す例がほとんどであるのに対し、薬においてはそれらの数百倍以上の活性が検出された (図 4、図 5)。このことは、当該 DNA 断片が減数分裂期の薬において特異的に転写活性化をもたらす作用があることを示している。また、薬以外の葉、茎、根では転写活性化は全く観察されないことから、当該 DNA 断片がもたらす時間的、空間的な制御は極めて厳密なものであり、その特異性は極めて高いものであることを明瞭に示している。また、対象区として、カリフラワーモザイクウイルス 3 5 S プロモーターを用いた形質転換タバコを用いた場合では、葉、茎、根では極めて高い転写活性化が観察されたが、薬ではそれらの組織よりも、むしろ低い活性を示した (図 6)。

【 0 0 2 0 】(G U S 遺伝子の発現)さらに、当該 DNA 断片のプロモーターとしての作用をより詳細に検討する目的で、ルシフェラーゼ遺伝子のかわりに G U S 遺伝子を用いて、形質転換タバコを作成し、G U S 遺伝子の発現の様子を調べた。G U S 遺伝子発現の検出には、X - G l u c を基質として用いた組織染色化学的染色法 (J e f f e r s o n e t a l . E M B O J . 6 : 3 9 0 1 - 3 9 0 7 (1 9 8 7)) を用いた (図 7)。その結果、減数分裂細胞である花粉母細胞において青緑色の色素の沈着が観察された。このことから、ルシフェラーゼ活性で示された、薬における特異的な発現は、花粉母細胞における特異的な発現に由来することが確かめられた。

【 0 0 2 1 】以上の結果より、当該 DNA 断片をプロモーターとして植物形質転換用のプラスミドベクター DNA に挿入することにより、減数分裂特異的な転写活性を付与することが可能であること、すなわち、減数分裂特異的な遺伝子発現をもたらす作用があることが示された。

【 0 0 2 2 】

【発明の効果】本発明により、減数分裂期の細胞において特異的に作用するプロモーターの、塩基配列が与えら

れた。

【 0 0 2 3 】

【配列表】

< 1 1 0 > 出願人氏名：奈良先端科学技術大学院大学長

< 1 2 0 > 発明の名称：減数分裂細胞に特異的な植物プロモーター

< 1 6 0 > 配列の数：2

< 2 1 0 > 配列番号：1

< 2 1 1 > 配列の長さ：1 3 0 9

< 2 1 2 > 配列の型：核酸

< 2 1 3 > 起源：テッポウユリ花粉母細胞

< 4 0 0 > 配列

```

ATGCATGCAC ATGTAAGTCC TGCCTACTCA TATAAAAAAG TGAACATACA CACGAGTATG 60
GTTTGGCTTC ACCTAGTCAT CGTATATTCC AGATTTGTCA AACACGATAT ATTTGCATAC 120
ATATCCTCCG AATGTTTGTG CATATCAAAA AGTACATGTG TACCACTAAC AACTATGTGC 180
ACATAATAAT GTCAACCTTC ACTTCAACTT ACAACCCATG TATGCATACT TTTTTTATCC 240
ACTACATGGA CCTATATATA TAGAAATTTG AACTAAATAT CCAGCTTCAT TAATATTGTT 300
AGCTTAACAT GCATCTCTAC TTCATTATGC ATCTTGATGT TCCCATTGAT GAAATCTTCC 360
TCACTAATAA TCATCACACA TCTAGCCTCT TCACCAGAGA GCATCACACA TCAACAGTCT 420
TCAAAATTCA GTGTCCAACA ACACGGATCT TATTGTGCAT CAGTTAACAC CCTGCGTACC 480
CACTTCCACA AAGATCATAA CACATTATTG GCCTTCAAAA TTCAATGCCC AACAAACACGA 540
ATCATGTCGT ACATCAATCA TGTCGTACAT CAGTTATCAC CCCGCGTCT AGCTGCATCT 600
TCCAAAGGCT GCTTACGCAC CCCGCAATGG TAGAATGATC AAGTGTTG TTCCTATAAG 660
TGAGTAGAGA AACACATGAA TCAGGCTCCA CAAACACATA CTGTATTCT TTTCTTAACG 720
TCATTTTTAA CAAATTATAA TATTAATAAT TCTCTAAGGT CAGAGATTAC CACACATAAA 780
AAAGTAAATT TTAGTATCTT TAAACTATA TAAATAGAA TGGACAAAAT ATTATAAATC 840
ATAAGACAAC CAACCAATTC CACATTATAC TAAATGAAAT ATCACAAAATA TGACAAATAA 900
TAAAAAATAA AAATCGCATG GTTTTCAGAA ATTGGAGGGG TAAGATAAGA AATAAGTCAT 960
CCTCAAAATA CGCGGCGGGG CACGTGTGAA TTCATTTTGT CGGTAGAAAC ACAGCTCGTT 1020
TTTTACTATG ACGATACCAA CCTTACGTAA TACATTCGTT CCATCAACAT GATCGGAATT 1080
GACACAGAAA ACCTCGGTTC AAATTCACCC GGTTCATTC TCGACCGCTA GCCGGCCGAA 1140
GGCAGACCTC TGCCACCCAT GAAAGCACGA GAAGCTTCCA TCCTCTTCTT GACCCTTTGT 1200
GAAGCATCGA GACCTCTTCC CTCAGTCTTT ATATAAACC CCAACCCACT CCCAATTCCA 1260
CCGTCTCCAT CGAACACCAG ATAAGTGGAC CTCAAAGAAA TCAAGATCC 1309

```

< 2 1 0 > 配列番号：2

< 2 1 1 > 配列の長さ：1 4 6 1

< 2 1 2 > 配列の型：核酸

< 2 1 3 > 起源：テッポウユリ花粉母細胞

< 4 0 0 > 配列

```

ATGTACGAAC TATTGCACAC TCTTGAGGGG TCCCTACGCT GCCTAAGCTA TGTGCTTTCA 60
CCTTCTCTAC TCGACATGCA CTCTCACATT GGAGGGGTGT CGCAGGGCTC ATACTCTGCG 120
CTCCTTCTCA AAAGGTTTTT TCCCTCACAG GTTTCTCTCC ACGTCAACCC AAGCTCAAAA 180
ATTCGGGGCC CAGCCCGCTG AGGATATTTT TGGCGTCATT AGTTGTTGAT GATGAATTAT 240
TCATTCCTAA AATCTTGTC TGAATGCTTG ATTTTTTCAT CATTATCTT ATGTATTTCC 300
TCCAAACTTG TATTGCTTAT CATGCACAAA AGAGTTTAACT TTACATTAGT GACATCAAGC 360
AAATACATGG AATACACGTT AACAAATGAT TAAATGTTGG TTATAATTGT GCACAATTAT 420
TGTCTGGTCA CCTAGTCATC TTCTTTCATG AATCCTCCAC TGATGAGATC CTCCCTCAAT 480
GAGTTCATTC TCAAACAAGT TACCATTACC CGTAGAAGGA AAAGAGGAAG AAAAATAAAC 540
ACGTGATGAT GACCAAAAGT AATGAAAGAG AGAACACGAT AAATGATGTT CGAGAAAACA 600
ATCCCAAAAT ATATGGATAC GATATTGAAA TACTTATTGA GAAACCCAAA CAAAACAAGC 660
ATGCACTGAC ATAGGAATAT TGTGACTTTT GTGTGCCCTT GCAAGGTGAT TGACGATAGA 720

```

```

TCATAATCAA CATCCTTACA CTTTACCGTT CGCCACCAT CCCTTTGTTC CTCCTTCCCT 780
CTTTGGAAGA TGTTTTCTCG TTATCTTTGC TACTTTCCTC ATAAATAGAC ATCGTATCAT 840
TTTTGGCGTA AATCATTTTT TTGTTGTTGA ATTTTAGCGA AATTCACCCA GACCATCCAT 900
GTGCACCACG ACAAATTTAT CCCCAGACA TTGTGGCATA AAGTTACTAA TGACTTGATA 960
GCCTAGTGGT TGGGACTTGG ATGGTTATCA ATGAGGTCTG TGGTTCGAGT CTCGGAAAAC 1020
TACTGGAAAC AGCCTCCATT TAATAAATAG GAATGCTGCG TACATTTCTG TCCCCGTAA 1080
GCCTGCGCAA GCGAGATAGG AATGCTGCGT ACATTTCTGT CCCCCGTAAG CCTGCGCAAG 1140
CGAGAAAATA CGGATTATCC ACATTGGGGC GTAAAATTA TCCCTACAT TTCTGTCCCC 1200
CGTAAGCCTG CACAAGCGAG AAAATACGGA TTATCCACAT TGGGGTGTA AATTAATCCC 1260
CTACCAACAT GTTTTGTGTC AGTCTGCCTA ACTGGGCCAA TAATAACCCT GCAATCCTCT 1320
GTAAACTGG AAAATTAATC CGTAGAGTCC CCATCCCGGT TAGAGAACGA AACTATAAC 1380
TGCTGCAAAG GGCTACTGGG CCCACCAATT TTCACCGTC TCTGCCCCC ATTCAGCTAA 1440
CCCAGCTCGC AACGGAGAAC C 1461

```

【図面の簡単な説明】

【図 1】 図 1 は、L I M 1 0 由来の減数分裂特異的なプロモーターの塩基配列を示す図である。

【図 2】 図 2 は、L I M 1 8 由来の減数分裂特異的なプロモーターの塩基配列を示す図である。

【図 3】 図 3 は、植物形質転換用ベクターである、1 2 1 - L U C 及び 2 2 1 - L U C + の構造を示す図である。

【図 4】 図 4 は、図 1 のプロモーターを導入して、各組織のルシフェラーゼ活性を測定した結果を示す図である。

る。

【図 5】 図 5 は、図 2 のプロモーターを導入して、の各組織のルシフェラーゼ活性を測定した結果を示す図である。

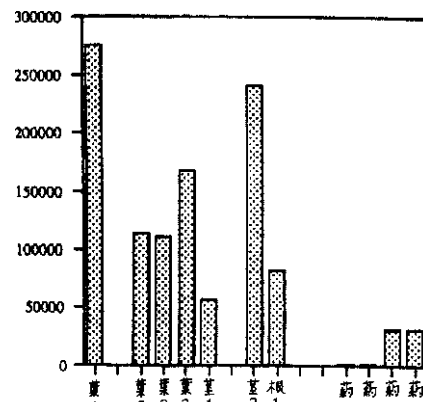
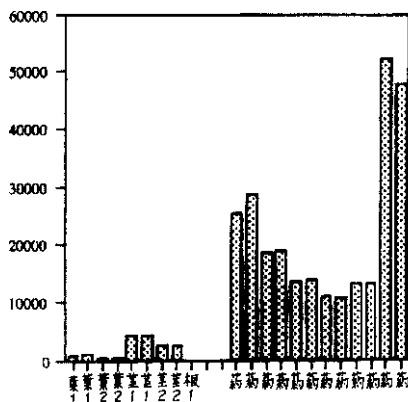
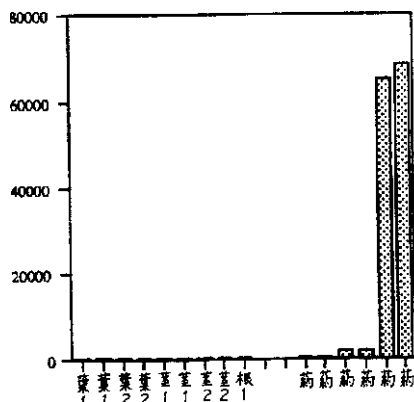
【図 6】 図 6 は、カリフラワーモザイクウイルス 3 5 S プロモーターを導入して、各組織のルシフェラーゼ活性を示した図である。

【図 7】 図 7 は、X - G l u c を基質として用いた組織染色化学的 G U S 染色法により、プロモーター発現の特異性を検出した写真である。

【図 4】

【図 5】

【図 6】



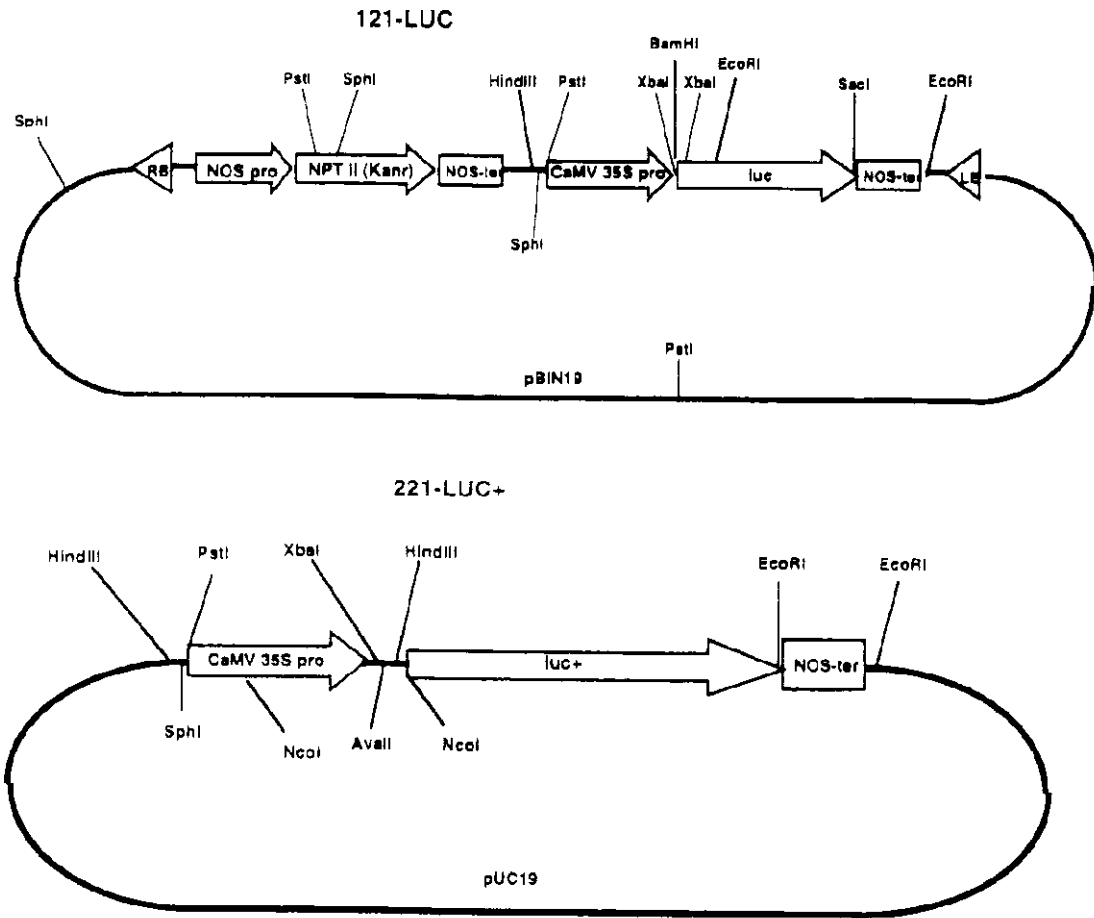
【 図 1 】

| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | |
|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|------|
| 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | |
| ATGCATGCAC | ATGTAAGTCC | TGGTACTCA | TATAAAAAAG | TGAACATACA | 50 |
| CACGAGTATG | GTTTGCTTCC | ACCTAGTCAT | CGTATATTCC | AGATTITGTCA | 100 |
| AACACGATAT | ATTTGCATAC | ATATCCTCCG | AATGTTTTGTG | CATATCAAAA | 150 |
| AGTACATGTG | TACCACTAAC | AACTATGTGC | ACATAATAAT | GTCAACCTTC | 200 |
| ACTTCAACTT | ACAACCCATG | TATGCATACT | TTTTTTFATCC | ACTACATGGA | 250 |
| CCTATATATA | TAGAAATTTG | AACTAAATAT | CCAGCTTCAT | TAATATTGNT | 300 |
| AGCTTAACAT | GCATCTCTAC | TTCATTATGC | ATCTTGATGT | NCCCATTGAT | 350 |
| GAAATCTTCC | TCACTAATAA | TCATCACACA | TCTAGCCTCT | TCACCAGAGA | 400 |
| GCATCACACA | TCAACAGTCT | TCAAAATTCA | GTGTCCAACA | ACACGGATCT | 450 |
| TATTGTGCAT | CAGTTAACAC | CCTGGGTACC | CACITCACCA | AAGATCATAA | 500 |
| CACATTATTG | GCCTTCAAAA | TTCAATGCCC | AACAACAOGA | ATCATGTCTG | 550 |
| ACATCAATCA | TGTCTACAT | CAGTTATCAC | CCCGCTTCT | AGCTGCATCT | 600 |
| TCCAAAGGCT | GCTTACGCAC | CCCGCAATGG | TAGAATGATC | AAGCTGGTTG | 650 |
| TTCTTATAAG | TGAGTAGAGA | AACACATGAA | TCAGGCTCCA | CAAACACATA | 700 |
| CTGTATTTCT | TTTCTTAACG | TCATTTTTAA | CAAATTATAA | TATTTAAAATT | 750 |
| TCTCTAAGGT | CAGAGATTAC | CACACATAAA | AAAGTAAATT | TTAGTATCTT | 800 |
| TAAACTCATA | TAAAATAGAA | TGGACAAAAT | ATTATAAATC | ATAAGACAAC | 850 |
| CAACCAATTC | CACATTATAC | TAAATGAAAT | ATCACAAATA | TGACAAATAA | 900 |
| TTAAAAAATA | AAATCGCATG | GTTTTAGAAA | ATTGGAGGGG | TAAGATAAGA | 950 |
| AATAAGTCAT | CCTCAAAATA | CGCGGGGGG | CACGIGTGAA | TTCATTTTGT | 1000 |
| CGGTAGAAAC | ACAGCTCGTT | TTTTACTATG | ACGATACCAA | CCTTACGTAA | 1050 |
| TACATTCTGTT | CCATCAACAT | GATCGGAATT | GACACAGAAA | ACCTCGGTTT | 1100 |
| AAATTTCAAC | GGTTTCAATC | TGGACCGCTA | GCCGNCGGAA | GGCAGACCTC | 1150 |
| TGCCACCCAT | GAAAGCAOGA | GAAAGCTTCCA | TCCTCTTCTT | GACCCCTTGT | 1200 |
| GAAGCAATCGA | GACCTCTTCC | CTCAGTCTTT | ATATAAACC | CCAACCCACT | 1250 |
| CCCAATTTCCA | CCNTCTCCAT | CGAACACCAG | ATAAGTGGAC | CTCAAAGAAA | 1300 |
| TCAAGATCC | | | | | 1309 |

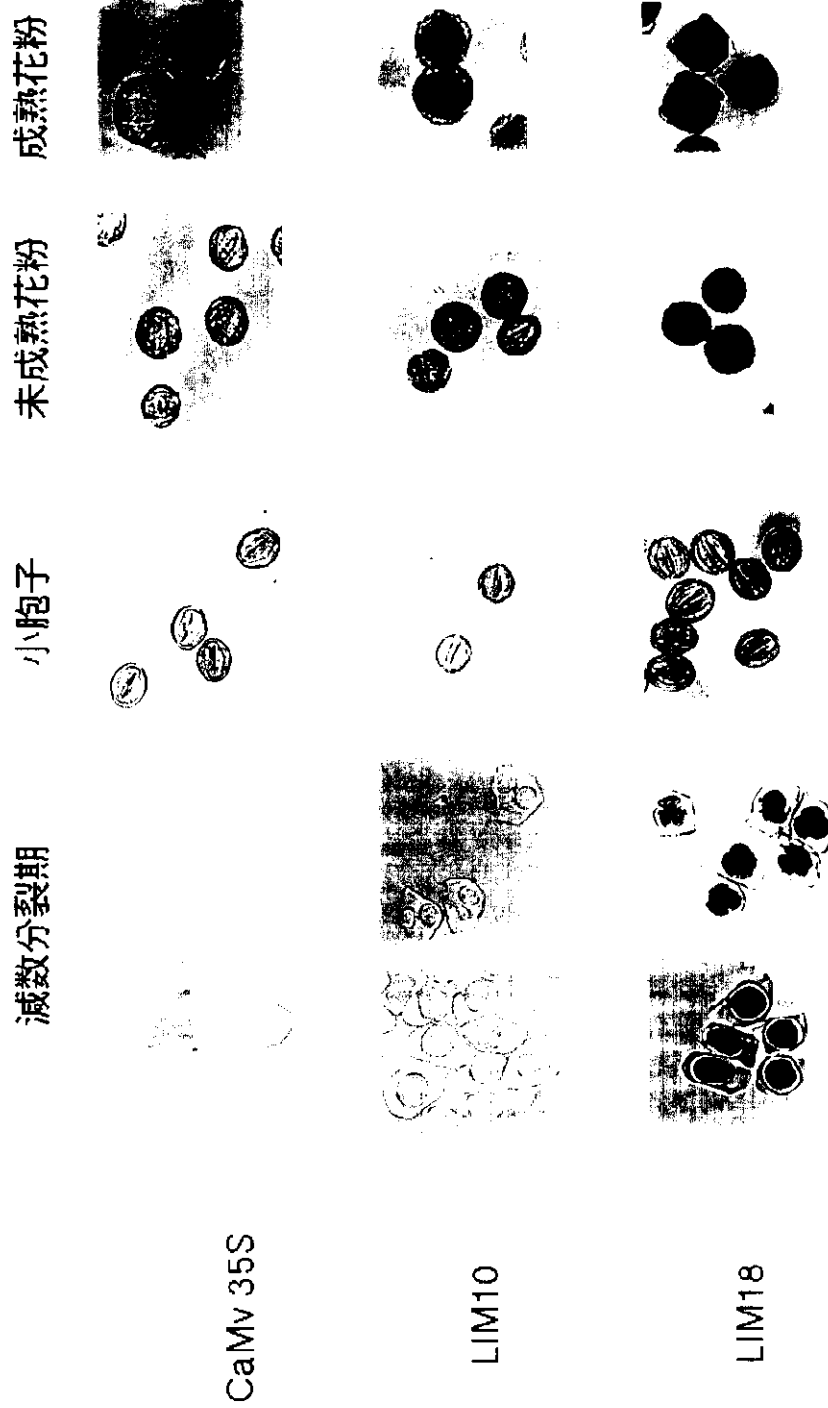
【 図 2 】

| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | |
|--------------|-------------|------------|-------------|------------|------|
| 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | 1234567890 | |
| ATGTAAGAAC | TATTGCACAC | TCTTGAGGGC | TCCCTACGCT | GCCTAAGCTA | 50 |
| TGTGCTTTCA | CCTTCTCTAC | TGGACATGCA | CTCTCACATT | GGAGGGGTGT | 100 |
| CGCAGGGCTC | ATACTCTGGG | CTCCTTCTCA | AAAGGTTTTC | TCCCTCACAG | 150 |
| GTTTCTCTCC | ACGTCAACCC | AAGCTCAAAA | ATTGCGGGCC | CAGCCCGCTG | 200 |
| AGGATATTTT | TGGCGTCATT | AGTTGTTGAT | GATGAATTAT | TCATTCCTAA | 250 |
| AATCTTGICA | TGAATGCTTG | ATTTTTTCAT | CATTTATCTT | ATGTATTTCC | 300 |
| TCCAAACTTG | TATTGCTTAT | CATGCACAAA | AGAGTTTAAC | TTACATTAGT | 350 |
| GACATCAAGC | AAATACATGG | AATACACGTT | AACAAATGAT | TAAATGTTGG | 400 |
| TNATAATTTG | GCACAATTAT | TGTCGGTCA | CCTAGTCATC | TTCTTTCATG | 450 |
| AATCTCCAC | TGATGAGATC | CTCCCTCAAT | GAGTTCATTC | TCAAACAAGT | 500 |
| TACCATTACC | CGTAGAAGGA | AAAGAGGAAG | AAAAATAAAC | ACGTGATGAT | 550 |
| GACCAAAAGT | AATGAAAGAG | AGAACACGAT | AAATGATGTT | CGAGAAAACA | 600 |
| ATCCCAAAT | ATATGGATAC | GATATTGAAA | TACTTATTGA | GAAACCCAAA | 650 |
| CAAAACAAGC | ATGCACTGAC | ATAGGAATAT | TGTGACTTTT | GTGTGCCCTT | 700 |
| GCAAGGTGAT | TGACGATAGA | TCATAATCAA | CATCCTTACA | CTTTACCGTT | 750 |
| CGCCCAACAT | CCCTTTGTTT | CTCCTTCCCT | CTTTGGAAGA | TGTTTTCTCG | 800 |
| TTATCTTTGC | TACTTTCCCT | ATAAATAGAC | ATCGTATCAT | TTTTGGCGTA | 850 |
| AATCATTTTT | TTGTTGTTGA | ATTTTAGCGA | AAFTCACCCA | GACCATCCAT | 900 |
| GTGCACCACG | ACAAATTTTAT | CCCCGAGACA | TTGTGGCATA | AAGTTACTAA | 950 |
| TGACTTGATA | GCCTAGTGGT | TGGGACTTGG | ATGGTTATCA | ATGAGGTCTG | 1000 |
| TGGTTGAGT | CTCGGAAAAC | TACTGGAAAC | AGCCTCCATT | TAATAAATAG | 1050 |
| GAATGCTGGG | TACATTTCTG | TCCCCGTAA | GCCTGGCAA | GCGAGATAGG | 1100 |
| AATGCTGGT | ACATTTCTGT | CCCCCGTAAG | CCTGGCAAG | CGAGAAAATA | 1150 |
| CGGATTATCC | ACATTGGGGC | GTAAAATTAA | TCCCCTACAT | TTCTGTCCCC | 1200 |
| CGTAAGCCTG | CACAAGCGAG | AAAATACCGA | TTATCCACAT | TGGGGTGTAA | 1250 |
| AATTAATCCC | CTACCAACAT | GTTTTGTGTC | AGTCTGCCTA | ACTGGGCCAA | 1300 |
| TAATAACCCT | GCAATCCTCT | GTTAACTGG | AAAATTAAATC | CGTAGAGTCC | 1350 |
| CCATCCCGGT | TAGAGAACGA | AAACTATAAC | TGCTGCAAAG | GGCTACTGGG | 1400 |
| CCCACCAATT | TTACCCCGTC | TCTGCCCCCC | ATTCAGCTAA | CCCAGCTCCG | 1450 |
| AACCGAGAAC_C | | | | | 1461 |

【 図 3 】



【図7】



フロントページの続き

(72)発明者 皆見 政好
奈良県生駒市高山町8916 - 5 大学院宿
舎 1 - 121

(56)参考文献 DNA Res. (1994) Vol.
1, No. 1, p. 15 - 26
Plant Cell Physio
l. (1998) Vol. 39, suppl
1., p. s45

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)
C12N 15/00 - 15/90
BIOSIS (DIALOG)
WPI (DIALOG)
GenBank / EMBL / DDBJ