

(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2006-204299

(P2006-204299A)

(43) 公開日 平成18年8月10日(2006.8.10)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
AO1H 5/00 (2006.01)	AO1H 5/00 ZNAA	2B030
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	4B024
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/00 C	4B063
C12Q 1/02 (2006.01)	C12Q 1/02	4B065
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 A	

審査請求 有 請求項の数 19 O L (全 19 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2006-17744 (P2006-17744)
 (22) 出願日 平成18年1月26日 (2006.1.26)
 (31) 優先権主張番号 10-2005-0007534
 (32) 優先日 平成17年1月27日 (2005.1.27)
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)

(71) 出願人 503434302
 財団法人ソウル大学校産学協力財団
 Seoul National University Industry Foundation
 大韓民国ソウル特別市冠岳区奉天洞山4-2
 San 4-2, Bongchun-dong, Kwanak-gu, Seoul, Korea
 (74) 代理人 100081086
 弁理士 大家 邦久
 (74) 代理人 100117732
 弁理士 小澤 信彦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 環境ストレス抵抗性調節遺伝子を利用した植物の環境ストレス抵抗性増加方法

(57) 【要約】

【課題】本発明は環境ストレス抵抗性調節遺伝子を利用して、植物の環境ストレス抵抗性を増加させる方法を提供する。

【解決手段】シロイヌナズナ由来の環境ストレス抵抗性調節遺伝子を植物に導入し、植物の環境ストレス抵抗性を増加させる方法、環境ストレス抵抗性植物の製造方法及び前記方法により製造された環境ストレス抵抗性植物。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 2 のアミノ酸配列と少なくとも 70% 以上の配列相同性を有するポリペプチド、又は配列番号 2 のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを植物に導入する段階を含むことを特徴とする植物の環境ストレス抵抗性を増加させる方法。

【請求項 2】

前記ポリヌクレオチドが配列番号 1 で表示される塩基配列を有するものである請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記環境ストレスが旱魃によるストレスである請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記環境ストレスが除草剤によるストレスである請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記ポリヌクレオチドの導入は組換えベクターを利用して行う請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記組換えベクターが pBI111L-AIA である請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記組換えベクターの植物への導入は、アグロバクテリウム (*Agrobacterium* sp.) 媒介による方法、粒子銃衝撃法 (particle gun bombardment)、シリコン炭化物ウイスキー法 (Silicon carbide whiskers)、超音波処理法 (sonication)、電気穿孔法 (electroporation) 及び PEG (polyethylene glycol) 沈殿法からなる群から選ばれたいずれか一つを用いる請求項 5 に記載の方法。

【請求項 8】

前記植物は単子葉植物又は双子葉植物である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記単子葉植物が稲、小麦、大麦、竹 (筍)、トウモロコシ、里芋、アスパラガス、玉葱、ニンニク、葱、ニラ、ヒメニラ、長芋及び生姜からなる群から選ばれた請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記双子葉植物がシロイヌナズナ、茄子、煙草、唐辛子、トマト、牛蒡、春菊、チサ、桔梗、ホウレン草、不断草、サツマ芋、セロリ、人参、芹、パセリ、白菜、キャベツ、葉カラシナ、西瓜、真桑瓜、キュウリ、カボチャ、フクベ、苺、大豆、緑豆、インゲン豆、及び豌豆からなる群から選ばれた請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

配列番号 2 のアミノ酸配列と少なくとも 70% 以上の配列相同性を有するポリペプチド、又は配列番号 2 のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを植物に導入する段階を含むことを特徴とする環境ストレス抵抗性植物の製造方法。

【請求項 12】

前記ポリヌクレオチドが配列番号 1 で表示される塩基配列を有するものである請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記環境ストレスが旱魃によるストレスである請求項 11 に記載の方法。

【請求項 14】

前記環境ストレスが除草剤によるストレスである請求項 11 に記載の方法。

【請求項 15】

請求項 11 に記載の方法により製造された環境ストレス抵抗性植物。

【請求項 16】

請求項 15 に記載の植物から由来した植物組織又は種子。

【請求項 17】

10

20

30

40

50

(a) 配列番号2のアミノ酸配列と少なくとも70%以上の配列相同性を有するポリペプチド、又は配列番号2のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、組換え細胞と試験製剤(test sample)を共に培養する段階；及び

(b) 試験製剤と共に培養された組換え細胞より発現されるポリヌクレオチドの発現水準を測定し、これを試験製剤無しに培養された組換え細胞より発現されるポリヌクレオチド水準と比較する段階を含むことを特徴とする植物の環境ストレス抵抗性に影響を及ぼす化合物の同定方法。

【請求項18】

配列番号2のアミノ酸配列と、少なくとも70%以上の配列相同性を有するポリペプチド、又は配列番号2のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをプライマー、又はプローブとして用いて遺伝工学的方法で植物体の環境ストレス抵抗性遺伝子をスクリーニングする方法。

10

【請求項19】

前記遺伝工学的方法がDNAチップ、蛋白質チップ、重合酵素連鎖反応、ノーザンブロット分析、サザンブロット分析、酵素免疫反応及び2-Dゲル分析からなる群より選ばれる請求項18に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は環境ストレス抵抗性調節遺伝子を利用して植物の環境ストレス抵抗性を増加させる方法に関する。

20

【背景技術】

【0002】

環境ストレスは植物の成長を阻害し、多くの重要な農業分野で収穫物の生産性を制限する要素の一つとして作用する。このような環境ストレスの内、代表的な一つの因子として早魘ストレスがある。早魘ストレスは植物細胞内の浸透圧不均衡とイオン不均衡を発生させ、植物の成長と光合成を阻害する。一方、植物はこのような早魘ストレスに対する防御機構を有していて、生育に不適合な環境に置かれるとそれらの形態を調節したり、又は生理的代謝過程を調節することにより、環境に適応して生存しようとする傾向がある。前記植物の早魘抵抗性機構にはABA(abscisic acid)依存性信号伝達経路又はABA非依存性信号伝達経路がある(Finkelstein et al., Plant Cell, 14, S15-S45, 2002; Himmelbach et al., Curr. Opin. Plant Biol., 6, 470-479, 2003; Kuhn and Schroeder, Curr. Opin. Plant Biol., 6: 463-469, 2003)。前記ABAは植物の代表的な早魘関連遺伝子にして、植物の発芽(germination)、栄養生長(vegetative growth)及び孔辺細胞(guard cell)の開閉等とも関連があると知られている。孔辺細胞においてABAの濃度が増加すると細胞の外にカリウムイオン(K^+)及び塩素イオン(Cl^-)のようなイオンが排出され、細胞内のカルシウムイオン(Ca^{2+})が増加するようになる。これにより膨圧(turgor pressure)が減少しながら気孔が閉ざされ、増産が抑制され植物体より水分の損失が最小化される。しかしながら、早魘が持続したりその程度が大きい場合には、植物の発達、成長及び作物の収穫率が減少するようになり、持続的な早魘条件は植物代謝に変異を誘発する。このような代謝変異は結局は植物細胞を死に至らしめる。

30

40

【0003】

従って、このよう早魘ストレスに対して植物が抵抗性を有するようにする為に多くの研究が進められてきた。例えば国際公開第2005/048693パンフレットには植物のCap Binding Protein geneの機能を減少させたり又は抑制することにより、早魘抵抗性が増加された植物の製造方法が開示されており、国際公開第2004/058963パンフレットにはOryzasativa由来のOSISAPI遺伝子で植物を形質転換することにより、早魘抵抗性が増加された植物の製造方法が開示されている。

【0004】

50

一方、植物の成長と発達において、主要制限因子の内、さらに他の一つである除草剤は植物の成長に必要な主要植物酵素又は蛋白質を直接的に阻害し、植物の成長を抑制したり又は枯死させる作用をする。例えば、除草剤グリホサート(glyphosate)は芳香族アミノ酸(aromatic amino acid)の合成に必要な酵素の活性を阻害することにより、植物を破壊する(Fillatti et al., *Biotechnology*, 5: 726-730, 1987)。更に、ホスフィントリシン(phosphinothricin)はグルタミンの合成を阻害し、アトラジン(atrazine)は光合成機構を阻害し、パラコート(paraquat)(1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridylium dichloride)は光の存在下で活性酸素種を多量に生成し植物の細胞損傷を誘発させる。

【0005】

このような除草剤に対する植物の抵抗性を増加させるための方法には、主に、微生物より分離した除草剤抵抗性遺伝子を植物に形質転換する方法が用いられてきた。例えば、ストレプトマイセスハイグロスコピクス(*Streptomyces hygroscopicus*)から分離されたホスフィントリシン除草剤を分解する除草剤抵抗性遺伝子で馬鈴薯、小麦、米、トウモロコシ等を形質転換して、除草剤抵抗性を付与したことがあった。

【0006】

一方、最近では今まで研究してきた環境ストレスに対する防御機構が種特異的であったり、若しくは環境特異的な短点を克服して、より広範囲(broad spectrum)の抵抗性を誘導できる防御機構に対する研究が進められている。

【0007】

【非特許文献1】 Finkelstein et al., *Plant Cell*, 14, S15-S45, 2002

【非特許文献2】 Himmelbach et al., *Curr. Opin. Plant Biol.*, 6, 470-479, 2003

【非特許文献3】 Kuhn and Schroeder, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 6: 463-469, 2003

【特許文献1】 国際公開第2005/048693号パンフレット

【特許文献2】 国際公開第2004/058963号パンフレット

【非特許文献4】 Fillatti et al., *Biotechnology*, 5: 726-730, 1987

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

ここに、本発明者等は多様な環境ストレスに対する植物の抵抗性を増加させる方法の研究をしていた際、塩基配列は公知されているものの、その機能が解明されていないAIA遺伝子を植物に導入する場合、旱魃及び除草剤のような環境ストレスに対する植物の抵抗性を増加させる活性を有していることを解明することにより本発明を完成した。

【0009】

従って、本発明の目的は本発明において、新たにその機能を解明した環境ストレス抵抗性調節遺伝子を利用して、植物の環境ストレス抵抗性を増加させる方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0010】

前記のような目的を達成する為に、本発明は植物の環境ストレス抵抗性を調節し、配列番号2のアミノ酸配列と少なくとも70%以上の配列相同性を有するポリペプチド、又は配列番号2のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを植物に導入する段階を含む植物の環境ストレス抵抗性を増加させる方法を提供する。

さらに、本発明は植物の環境ストレス抵抗性を調節し、配列番号2のアミノ酸配列と少なくとも70%以上の配列相同性を有するポリペプチド、又は配列番号2のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドを植物に導入する段階を含む環境ストレス抵抗性植物の製造方法を提供する。

さらに、本発明は前記方法により製造された環境ストレス抵抗性が増加された植物、前記植物から由来した環境ストレス抵抗性が増加された植物組織又は種子を提供する。

さらに、本発明は配列番号2で表示されるアミノ酸配列と少なくとも70%以上の配列相同性を有するポリペプチド、又は配列番号2で表示されるアミノ酸配列を有するポリペ

チドをコードするポリヌクレオチドの発現に影響を及ぼす物質を同定する方法を提供する。

【0011】

さらに、本発明は配列番号2で表示されるアミノ酸配列と少なくとも70%以上の配列相同性を有するポリペプチド、又は配列番号2で表示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを利用して植物の環境ストレス抵抗性と関連した遺伝子をスクリーニングする方法を提供する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

以下、本発明を詳細に説明する。

10

用語の定義

他の定義がない限り、本発明で用いられるすべての技術的及び科学的用語は当業者等により通常的に理解される同一な意味を有する。下記の参考文献は本発明の明細書に用いられた種々の用語等の一般的な定義を有する技術(skill)の一つを提供する。

Singleton et al., DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY (2nd ed., 1994); THE CAMBRIDGE DICTIONARY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY (Walker ed., 1988); 及びHale & Marham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY.

【0013】

本発明で用いられる用語“環境ストレス”とは、植物の成長又は生産性を低下させる外部的要因を言う。好ましくは、本発明では旱魃又は除草剤によるストレスを言う。本発明で用いられた用語“環境ストレス抵抗性”とは、前記のような環境ストレスによる植物の成長低下又は生産性の低下が抑制されたり遅延される形質のことを言う。

20

【0014】

本発明で用いられる用語“ポリヌクレオチド(polynucleotide)”とは、多数の重合されたヌクレオチド(plurality of polymerized nucleotides)を含む核酸分子を言う。例えば、ポリヌクレオチドはゲノムDNA、RNA、cDNA、PCR産物、クローニングされたDNA、合成DNA又はRNA等の場合もあり得る。好ましくは、前記ポリヌクレオチドはポリペプチド(又は蛋白質)又はこれのドメイン又はこれの単片をコードするヌクレオチド配列を有する。

【0015】

本発明で用いられる用語“ポリペプチド(polypeptide)”は“ペプチド(peptide)又は蛋白質(protein)”と互換性があるように(interchangeably)用いられ、例えば、アミノ酸残基の重合体を言う。

30

【0016】

本発明で用いられる用語“過発現”とは、植物、植物細胞又は植物組織において、本発明に伴うポリヌクレオチド発現水準が野生型植物に比べてさらに高い水準で発現されることを言う。本発明で用いられた用語“野生型(wild type)”とは、遺伝工学的に変形されないか若しくは実験的(experimental sense)に処理されていない植物細胞、種子、植物成分(plant component)、植物組織、植物器官又は全体の植物(whole plant)を言う。

【0017】

本発明で用いられた用語“発現ベクター”とは、本発明に伴うポリヌクレオチド配列が挿入又は導入できる当分野で公知されたプラスミド、ウイルス又はその他の媒介体を意味する。

40

【0018】

本発明で用いられる用語“作動可能に連結(operably linked)”されると言うことは適切な分子が発現調節配列に結合される時、ポリヌクレオチドの発現を可能にする方式で連結されたポリヌクレオチド及び発現調節配列であることもあり得る。

【0019】

本発明で用いられる用語“発現調節配列(expression control sequence)”とは、特定の宿主細胞において、作動可能に連結された核酸配列の発現を調節するDNA配列を意味する。

50

【0020】

本発明者等は、シロイヌナズナより分離されたAP2/ERF系列の機能が、知られていないRAP2.12と呼ばれる公知の遺伝子が、植物の環境ストレス抵抗性を調節する機能のあることを初めて見出した。本発明者等は前記RAP2.12遺伝子をAIA(ABA Inducible AP2/ERF transcription factor)と新たに命名した。

【0021】

本発明者等は前記AIA遺伝子の機能を解明する為に、先ず、野生型シロイヌナズナより分離した総RNAを鋳型にし、既知の塩基配列(GenBank accession no:At1g53910)を基にデザインしたプライマーを用いてRT-PCRを行うことにより、AIA遺伝子のcDNAを製造した(実施例1参照)。前記AIA遺伝子の塩基配列及びアミノ酸配列は配列番号1及び配列番号2にそれぞれ示した通りである。

10

【0022】

本発明者等は前記AIA遺伝子の特性を調査する為に、野生型シロイヌナズナより前記遺伝子の発現パターンをノーザンプロット及びRT-PCRを利用して分析した(実施例2参照)。その結果、前記遺伝子は野生型シロイヌナズナのすべての器官から発現され、特に、葉と根で高く発現されることが分かった(図1参照)。さらに、前記遺伝子は発芽初期及び発芽後期のシロイヌナズナの葉と根ですべて発現されることが分かった。従って、前記遺伝子は植物の大部分の組織に存在しながら、植物の生活周期全般に亘って特定機能を行うものと推定された。

【0023】

ここに、本発明者等は前記遺伝子が植物の環境ストレス抵抗性を調節する活性があるかを調査するため下記のような実験を行った。

20

【0024】

本発明の一実施例では、大部分の早魓抵抗性関連遺伝子等が植物ホルモンであるABAの処理により、誘導される事実からシロイヌナズナにABAを含む種々の植物ホルモンを処理した後、ノーザンプロットを利用してAIA遺伝子の発現程度を分析した(実施例3参照)。その結果、前記遺伝子はABAの処理により誘導されることが確認できた(図3参照)。反面、オキシシン、ジベレリン、ジャスモン酸及びエテフオンのようなホルモンを処理した場合には、AIA遺伝子の発現に大きな影響を与えなかった。これにより前記AIA遺伝子は植物体の早魓抵抗性を調節する機能を行うものと推定された。

30

【0025】

前記のような推定を確証するために、本発明者等はAIA遺伝子を過発現する形質転換体と(実施例4参照)、AIA遺伝子の発現が抑制された同形接合突然変異体を製造し(実施例5参照)、これらの早魓抵抗性程度(実施例6参照)を調査した。

【0026】

その結果、AIA遺伝子が過発現された形質転換体の場合、早魓ストレス下においても大部分が生存するものとして現れた反面、野生型とAIA遺伝子の発現が抑制された突然変異体の場合には、80%以上が枯死するものと現れた(図12参照)。

【0027】

さらには、本発明に伴うAIA遺伝子過発現形質転換体は、野生型シロイヌナズナと突然変異体に比べて時間経過に伴う水分の損失が少ないものとして表れた(図13参照)。

40

【0028】

従って、前記AIA遺伝子は植物の早魓抵抗性を増加させる機能のあることが知れた。

【0029】

さらに、本発明の他の実施例では、AIA遺伝子が植物の除草剤抵抗性と関連があるか否かを確認するために、除草剤の処理に伴うAIA遺伝子過発現形質転換体の葉緑素分解程度を、野生型及びAIA遺伝子発現が抑制された突然変異体の場合と比較して調査した(実施例7参照)。その結果、本発明に伴うAIA遺伝子過発現形質転換体は野生型シロイヌナズナと、AIA遺伝子発現が抑制された突然変異体に比べて除草剤による葉緑素分解が抑制されるものとして表れた(図14及び図15参照)。

50

【0030】

従って、AIA遺伝子は植物の除草剤抵抗性を増加させる機能のあることが分かった。

【0031】

そこで、本発明は前記AIA遺伝子を利用して植物体の環境ストレス抵抗性を増加させる方法を提供する。

【0032】

さらに、本発明は前記AIA遺伝子を利用して環境ストレス抵抗性植物体の製造方法を提供する。

【0033】

前記環境ストレスは旱魃ストレス又は除草剤によるストレスであることが好ましい。前記除草剤はバイピリジウム(bipyridium)塩系列の除草剤であることが好ましく、このような系列の除草剤にはパラコート(paraquat)とダイコート(diquat)等がある。

【0034】

前記にてAIA遺伝子の範疇には、配列番号2で表示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド又は前記ポリペプチドの機能的同等物をコードするポリヌクレオチドを含む。前記“機能的同等物”とは、アミノ酸の付加、置換又は欠失の結果、前記配列番号2で表示されるアミノ酸配列と少なくとも70%以上、好ましくは80%、さらに好ましくは90%以上の配列相同性を有するものにして、配列番号2で表示される蛋白質と実質的に同質の生理活性を示す蛋白質を言う。前記“実質的に同質の生理活性”とは、植物体内で植物の環境ストレス抵抗性を調節する活性を意味する。例えば、前記ポリヌクレオチドが植物で過発現されると環境ストレス抵抗性が増加する活性を言う。本発明に用いられるポリヌクレオチドは、配列番号1で表示される塩基配列を有するポリヌクレオチドが好ましい。

【0035】

従って、本発明は、好ましくは植物の環境ストレス抵抗性を調節し、配列番号2で表示されるアミノ酸配列と少なくとも70%以上の配列相同性を有するポリペプチド、又は配列番号2で表示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを植物に導入する段階を含む植物の環境ストレス抵抗性を増加させる方法を提供する。

【0036】

さらに、本発明は植物の環境ストレス抵抗性を調節し、配列番号2で表示されるアミノ酸配列と少なくとも70%以上の配列相同性を有するポリペプチド、又は配列番号2で表示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを植物に導入する段階を含む環境ストレス抵抗性植物の製造方法を提供する。

【0037】

前記ポリヌクレオチドの植物への導入は、前記ポリヌクレオチドを適切な発現ベクター内に挿入し、これを利用して植物細胞を形質転換することにより行える。さらに、本発明に伴うポリヌクレオチド配列は発現調節配列に作動可能に連結することができ、前記作動可能に連結されたポリヌクレオチド配列と発現調節配列は選別マーカ及び複製開始点(replication origin)を共に含んでいる一つの発現ベクター内に含まれることもあり得る。前記発現調節配列は転写を実施するためのプロモータ、転写を調節するための任意のオペレータ配列、適切なmRNAリボソーム結合部位をコードする配列及び転写並びに解読の終結を調節する配列を含む。前記において、プロモータでは植物体内に挿入遺伝子を過発現させ得るものであれば特に制限されない。前記プロモータの例ではこれに限定はされないものの、CaMVの35S RNA及び19S RNAプロモータ；フィクワトモザイクウイルス(FMV)より由来した、全長転写プロモータ及びTMVのコート蛋白質プロモータが挙げられる。さらに、単子葉植物や木本植物体で遺伝子を過発現するには、ユビキチン(ubiquitin)プロモータが用いられる。植物細胞内に本発明の遺伝子を導入するための適切なベクターはTiプラスミド及び植物ウイルスベクターがある。前記適切なベクターの例ではこれに限定はされないものの、pPZP、pGA及びpCAMBIA系列と同じバイナリベクターを用いるのが好ましい。当業者であれば本発明に伴う遺伝子の核酸配列を導入させるに適切なベクターを選択できる。

10

20

30

40

50

【0038】

本発明の一実施例では CaMV 35SプロモータとNOSターミネータが含まれたPBI121ベクターでGUS遺伝子を除去したベクターpBI111Lに、AIA遺伝子を挿入して製造した組換えベクターpBI111L-AIAが例示されている(図4)。

【0039】

前記組換えベクターの植物への導入は当分野で公知の方法を用いることができる。例えば、これに限定はされないものの、アグロバクテリウム(Agrobacterium sp.)媒介による方法、粒子銃衝撃法(particle gun bombardment)、シリコン炭化物ウイスキー(Silicon carbide whiskers)、超音波処理(sonication)、電気穿孔法(electroporation)及びPEG(Polyethylene glycol)による沈殿法を使用できる。本発明の一実施例ではアグロバクテリウム媒介による方法を用いて、本発明の組換えベクターでシロイヌナズナを形質転換した。

【0040】

さらに、前記において本発明のポリヌクレオチドで植物を形質転換した後、形質転換された植物を選別して再分化することができる。

【0041】

前記形質転換された植物の選別及び再分化は、当業界で公知された方法により行える。例えば、選別マーカーとして抗生剤抵抗性遺伝子を用いた場合、本発明に伴うポリヌクレオチドを導入した植物を抗生剤が含まれた培地で培養し、抗生剤抵抗性を示す植物のみを選択することにより、本発明に伴うポリヌクレオチドが導入された植物を選別できる。さらに、RT-PCR又はサザンブロット分析と同じ遺伝工学的な方法を通じて、植物内に望む遺伝子が挿入されたか否かを追加して確認できる。

【0042】

選別された形質転換した植物の再分化は、当業界で公知された方法によりカルス(callus)の誘導、発根及び土壌醇化の過程を通じて行われる。

【0043】

一方、前記本発明に伴う方法が適用できる植物には、単子葉植物又は双子葉植物が含まれる。前記単子葉植物の例ではこれに限定はされないものの、稲、小麦、大麦、竹(筍)、トウモロコシ、里芋、アスパラガス、玉葱、ニンニク、葱、ニラ、ヒメニラ、長芋、及び生姜がある。双子葉植物の例ではこれに限定されないものの、シロイヌナズナ、茄子、煙草、唐辛子、トマト、牛蒡、春菊、チサ、桔梗、ハウレン草、不断草、サツマ芋、セロリ、人参、芹、パセリ、白菜、キャベツ、葉からし菜、西瓜、真桑瓜、キュウリ、カボチャ、夕顔、苺、大豆、緑豆、インゲン豆及び豌豆がある。好ましくは前記環境ストレス抵抗性植物はシロイヌナズナであることもあり得る。

【0044】

さらに、本発明は前記方法により製造された環境ストレス抵抗性植物を提供する。

より具体的には、本発明に伴う環境ストレス抵抗性植物は配列番号2で表示されるアミノ酸配列と少なくとも70%以上の配列相同性を有するポリペプチド、又は配列番号2で表示される、アミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを植物に導入して形質転換した後、通常的な方法により形質転換された植物を選別し、選別された植物を再分化することにより取得することができる。好ましくはAIA遺伝子が含まれた組換えベクターで形質転換された植物の切片体を、当業界で公知された適切な培地に置床し、適正条件で培養してカルス(callus)の形成を誘導し、新芽が形成されるとホルモン無添加培地に移して培養する。約2週間後前記新芽を発根用培地に移して根を誘導する。根が誘導された後これを土壌に移植して醇化させることにより、環境ストレス抵抗性植物を取得することができる。

【0045】

さらに、本発明は前記の形質転換された植物体より生産される植物組織、又は種子を提供する。前記植物組織又は種子は配列番号2で表示されるアミノ酸配列と少なくとも70%以上の相同性を有するポリペプチド、又は配列番号2で表示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドを含んでいて環境ストレス抵抗性形質を有

することを特徴とする。

【0046】

さらに、本発明は配列番号2で表示されるアミノ酸配列と少なくとも70%以上の配列相同性を有するポリペプチド、又は配列番号2で表示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの発現に影響を及ぼす物質を同定する方法を提供する。具体的に本発明の同定方法は、(a)配列番号2のアミノ酸配列と少なくとも70%以上の配列相同性を有するポリペプチド、又は配列番号2のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、組換え細胞と試験製剤(test sample)を共に培養する段階；及び(b)試験製剤と共に培養された組換え細胞より発現されるポリヌクレオチドの発現水準を測定し、これを試験製剤無しで培養された組換え細胞より発現される水準と比較する段階を含む。前記において、本発明に伴うポリヌクレオチドの発現に影響を及ぼすと言うことは、前記ポリヌクレオチドの発現を促進させ、植物の環境ストレス抵抗性を増加させることが好ましい。試験製剤が本発明のポリヌクレオチドの発現に及ぼす影響は当分野で公知されたノーザンプロット分析、及びウェスタンプロット分析等を通じて測定できる。本発明で“製剤(agent)”又は“試験製剤”(test agent)”とは、任意の物質(substance)、分子(molecule)、元素(element)、化合物(compound)、実在物(entity)、又はこれらの組合せを含む。例えば、これに制限はされないものの、蛋白質、ポリペプチド、小有機物質(small organic molecule)、多糖類(polysaccharide)、ポリヌクレオチド等を含む。さらに、自然産物(natural product)、合成化合物又は化学化合物又は2個以上の物質の組合せであることもあり得る。別に指定されない限り、製剤、物質及び化合物は互換性があるように(interchangeably)使用できる。

【0047】

さらに、本発明に伴う配列番号2で表示されるアミノ酸配列と少なくとも70%以上の配列相同性を有するポリペプチド、又は配列番号2で表示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、公知された遺伝工学的な方法を用いて植物の環境ストレス抵抗性と関連した形質改善及び他の植物体の環境ストレス抵抗性調節遺伝子の探索に有用に利用できる。好ましくは、前記ポリヌクレオチドは配列番号1で表示されるAIA遺伝子であることもあり得、前記ポリヌクレオチドをプライマー又はプローブとして使用し、公知された遺伝工学的な方法で植物体で環境ストレス抵抗性遺伝子をスクリーニングすることができる。前記遺伝工学的な方法には、例えば、これに限定はされないものの、DNAチップ、蛋白質チップ、重合酵素連鎖反応、ノーザンプロット分析、サザンプロット分析、酵素免疫反応及び2-Dゲル分析等を含む多様な方法を使用できる。

【実施例】

【0048】

以下、本発明を下記実施例によりさらに詳しく説明する。

下記実施例は本発明を例示するものにして、本発明の内容がこれに限定されるものではない。

【0049】

実施例1：AIA遺伝子のcDNA合成

AIA遺伝子のcDNAは、シロイヌナズナの葉から分離した総RNAを鋳型にしてRT-PCRを行い製造した。前記総RNAの分離はアールエヌイージープラントキット(RNeasy plant kit, Qiagen)を用いて行い、プライマーは公知された遺伝子配列(GenBank accession no:At1g53910)を基にしてデザインした。より具体的に、RT-PCRは前記にて分離した総RNA500ngを試料にし、下記のプライマーとワンステップRT-PCRキット(Qiagen)を用いて行い、条件は50℃で30分、95℃で15分間反応させ逆転写し、前記逆転写結果取得したcDNAを鋳型にして94℃で30秒、60℃で30秒及び72℃で1分ずつ24回繰返すことによりPCR増幅産物を取得した。

正方向プライマー：AIA-ap3：配列番号3

5'-ATGTGTGGAGCTATAATATCCGAT-3

逆方向プライマー：AIA-jinw：配列番号4

5 -TCAGAAGACTCCTCCAATCATGGAAT- 3

【0050】

実施例2：野生型シロイヌナズナでAIA遺伝子の発現パターン分析

野生型シロイヌナズナの器官別及び発達段階に伴うAIA遺伝子の発現パターンをノーザンブロット及びRT-PCRを用いて分析した。

【0051】

2-1 ノーザンブロット分析

土壌で4週間育てた野生型シロイヌナズナの根、ロゼット葉(rosette)、幹(stem)、莖葉(cauline)、花(flower)及びシリク(silique)からアールエヌイージープラントキット(R Neasy plant kit, Qiagen)を用いて総RNAを分離した。さらに発芽後4日目のシロイヌナズナと、2週間経ったシロイヌナズナの根と葉からそれぞれの総RNAを分離した。ノーザンブロットを行うために、前記にて分離したRNA10 μ gずつをローディングバッファー(ホルムアミド50%、1 \times MOPS、ホルムアルデヒド2,2%)と混合した後、1%ホルムアルデヒドアガロースゲル(formaldehyde agarose gel)にローディングして分離し、20 \times SSCを利用してナイロン膜(Hybond N+ membrane)に移した。前記ナイロン膜を軽く2 \times SSCで洗浄し、200mJエネルギーで架橋させた。安定化されたナイロン膜を前混成化バッファー(prehybridization buffer, 1% BSA, 1mM EDTA(pH8.0)、0.25M Na₂HPO₄(pH7,2)、7%SDS)で3時間処理した後、AIA遺伝子に特異的に表示された探針と65 $^{\circ}$ Cで一晩混成化した。前記探針は前記実施例1で製造したAIA遺伝子のcDNA(配列番号1)を鋳型にして、下記のプライマー(配列番号5及び配列番号6)を用いてAIA遺伝子の3'UTR部分をPCR増幅することにより製造し、[³²P]dCTPを用いて表示した。

10

20

【0052】

正方向プライマー：配列番号5

5 -CGTTGATGCTGGATGTAATGGGTAT-3

逆方向プライマー：配列番号6

5 -CCTGAGTCGTTACAGCATCTTCGTT-3

混成化が完了した後、ナイロン膜を65 $^{\circ}$ Cで2 \times SSCと、0.1% SDSで5分間洗浄した後、X線フィルムに露出させ放射線で感光されたバンドを検出した。

実験の結果、AIA遺伝子は野生型シロイヌナズナの全ての器官で発現されるものとして表れ、特に根と花において、他の器官に比べて相対的に高く発現するものとして表れた(図1)。さらに、AIA遺伝子は発芽後、4日経ったシロイヌナズナと2週間経ったシロイヌナズナの葉と根の全てにおいて発現されるものとして表れた(結果未図示)。前記実験結果からAIA遺伝子は植物の全ての器官に存在しながら、植物の生活周期(life cycle)全般に亘って特定の機能を行うものと推定された。

30

【0053】

2-2 RT-PCR分析

前記実施例2-1において、AIA遺伝子がシロイヌナズナの花に高く発現された結果を基に、シロイヌナズナの花の発達段階に伴うAIA遺伝子の発現パターンをRT-PCRで分析した。この為、土壌で4週間育てた野生型シロイヌナズナの花から発達段階別(受精前5~6日、受精前2~3日、受精期、受精後6~8日及び受精後13~16日)に実施例1と同一な方法で総RNAを分離してRT-PCRを行った。

40

実験の結果、AIA遺伝子は受精前に最も高く発現されるものとして表れ、発達段階が進むにつれてその発現程度が漸次減少するものとして表れた(図2)。

【0054】

実施例3：植物ホルモンの処理に伴うシロイヌナズナ内AIA遺伝子の発現変化

シロイヌナズナをMS培地(MS塩 2.15g, MES 0.5g, スクロース 10g, 0.7%フィットアガー, pH5.7)で2週間育てた後、植物ホルモンのABA、ジャスモン酸(jasmonic acid)及びエテフォン(ethephon)がそれぞれ100 μ Mずつ、さらに、オーキシン(auxin)、ジベレリン酸(gibberellic acid;GA)はそれぞれ10 μ Mが含まれた水溶液をスプレーした。その後、時間別(スプレー後30分、2時間、6時間、10時間及び24時間)にシロイヌナズナの幼植物体

50

(seedling)より前記実施例 2-1 と同一な方法で総RNAを分離し、ノーザンブロットを行った。この際、ABAによりその発現量が増加するものとして知られたKIN2遺伝子を陽性対照群とし用いた。

実験の結果、ABAを処理した場合、2時間後からシロイヌナズナ内AIA遺伝子が初期水準に比べて高く発現されたものの、スプレー後24時間目にはその発現程度が初期水準程度に減少した(図3)。反面、オーキシン、ジベレリン、ジャスモン酸及びエテフオンのようなホルモンを処理した場合には、AIA遺伝子の発現程度が初期水準と大差がなかった(結果未図示)。

一般的に早魓抵抗性関連遺伝子等はABAの処理により誘導されるものと知られている。従って、前記実験結果からAIA遺伝子も植物の早魓抵抗性と関連があるものと推定された

10

【0055】

実施例4：AIA遺伝子を過発現する形質転換体の製造

AIA遺伝子が植物体の環境ストレス抵抗性と関連があるか否かを確認する為、AIA遺伝子が過発現する形質転換体を製造した。

【0056】

4-1 AIA遺伝子を含む組換えベクターの製造

AIA遺伝子を過発現する形質転換体を製造する為に、前記実施例1のAIA遺伝子のcDNAを制限酵素Xba1及びXho1で切断し、CaMV 35SプロモータとNOSターミネータが含まれたベクターであるpBI111Lの同一な場に挿入して組換えベクターpBI111L-AIAを製造した(図4)

20

【0057】

4-2 シロイヌナズナの形質転換

前記実施例 4-1 のAIA遺伝子を含む、組換えベクターをマイクロパルサー(electroporator, Biorad)を利用した電気穿孔法でアグロバクテリウムチュメファシエンスC58C1(*Agrobacterium tumefaciens* C58C1)に導入した。その後、前記アグロバクテリウムチュメファシエンスをカナマイシン(kanamycin)、ゲンタマイシン(gentamycin)及びリファンピシン(rifampicin)の最終濃度がそれぞれ30 μ g/ml, 100 μ g/ml及び100 μ g/mlずつ含まれたYEP培地(培地1リットル当り酵母抽出物10g、ペプトン10g及びNaCl5g含む)で培養して抗生剤抵抗性を示す形質転換体を選抜した。選抜されたアグロバクテリウム菌株を利用してフローラルディップ法(floral dip method)(Clough et al., Plant J., 16(6): 735-743, 1998)で野生型シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana* ecotype Col-0)を形質転換した。つまり、AIA遺伝子を含む組換えベクターが導入されたアグロバクテリウム菌株をカナマイシン、ゲンタマイシン及びリファンピシンが含まれたYEP培地5mlに接種して1日間培養し、500 μ lを採り同一な条件のYEP培地500mlに接種し、600nmで吸光度が2.0以上になるように培養した。培養が完了した後、培養液を遠心分離して沈殿した細胞を収得し、前記細胞をインフィルトレーションバッファ(MS塩 2.2g/L, スクロース 50g/L, MES 0.5g/L, ペンジルアミノヒュリン 0.044M及びSilwet L-77 200 μ l/L, pH5.7)に懸濁した。4週間育てたシロイヌナズナを、この懸濁液に5~7秒間3回浸水させ、ラップで覆い24時間培養した。前記のような方法で形質転換されたシロイヌナズナを継続培養して次世代の種子を収穫した。前記において収穫した種子をカナマイシンが含まれたMS培地に播種して7日間培養することにより、カナマイシン抵抗性を示す植物を9個選抜した。

30

40

【0058】

4-3 形質転換されたシロイヌナズナのRT-PCR

前記実施例 4-2 で選抜された9個のシロイヌナズナを土壌に移して4週間育て、葉(rossette)を採集して前記実施例1と同一な方法で総RNAを分離した後、RT-PCRを行うことによりAIA遺伝子の過発現の可否を調査した。

実験の結果、9個の形質転換体の内6個よりAIA遺伝子のバンドが現れ、この内で11番目の形質転換体のバンドの強度が最も大きいものと現れた(図5)。

【0059】

50

4-4 形質転換されたシロイヌナズナのサザンブロット分析 前記実施例 4-3 でAIA 遺伝子のバンドが検出された6個の形質転換体からゲノムDNAを抽出し、これを利用してサザンブロットを行うことにより、AIA遺伝子が前記形質転換体のゲノム内に挿入されたか否かを分析した。ゲノムDNAを抽出する為に6週経ったT1形質転換体から葉と茎約2gを切除した後、液体窒素を利用して粉碎し、CTABバッファ [2%(w/v) CTAB(cetyltrimethylammonium bromide), 100mM Tris-HCl, pH8.0、20mM EDTA, pH8.0、1.4M NaCl及び1%ポリビニルピロリジン (M.W.40,000)] 10mlに入れ、65 °Cで3時間程放置した。反応終了後同量のクロロホルム(chloroform)を混合し、3000rpmで50分間遠心分離した。上層液を新たなチューブに写し、2/3嵩のイソプロパノール(Iso-propanol)を添加して混合し、12000rpmで5分間遠心分離した。上層液を除去して沈殿物を70%エタノールを利用して洗浄し、TEバッファを利用して1次的にゲノムDNAを抽出した。さらに、残存するRNAを除去するためにRNase A(promega, USA)を最終濃度10µg/mlになるように添加して、37 °Cで30分間培養した後、さらにエタノール抽出法を利用して純粋ゲノムDNAを抽出した。サザンブロットの為に、各形質転換体より取得したゲノムDNAを10µgずつ採り制限酵素EcoRI とPstIで24時間の間切断して0.7%アガロースゲルにローディングした。ローディングが終わったアガロースゲルを変性バッファ(1.5M NaCl, 0.5N NaOH)300mlに浸漬し、30分間軽く混合し、バッファを捨てて2次蒸留水でアガロースゲルを洗浄した。さらに、アガロースゲルを中和バッファ(1M Tris-HCl(pH7.5), 1.5M NaCl)に30分間浸漬し、前記提示したノーザンブロットと同じ方法でサザンブロットを進めた。架橋されたナイロン膜をサザンブロット用前混成化バッファ(1%SDS, 1M NaCl, 10%デキストランソルフェート)を利用して3時間前処理させ、35S CaMVプロモータに特異的な部分を探針として65 °Cで1夜混成化した。前記探針はベクター-pBI111Lに存在する 35S CaMVプロモータを鋳型にして、下記のプライマーを用いてPCRを利用して増幅し [γ -³²P] dCTPを用いて表示した。

正方向プライマー：配列番号7

5'-CTAACTGCATCAAGAACACAGAGAA-3'

逆方向プライマー：配列番号8

5'-AGATATCACATCAATCCACTTGCTT-3'

混成化が完了した後、ナイロン膜を65 °Cで2×SSCと0.1%SDSで5分間洗浄し、X線フィルムに露出させ放射線で感光されたバンドを検出した。

実験の結果、2番、4番及び11番形質転換体の場合、弱いバンドがしばしば表れるものの、強い一つのバンドが表れることが見られた(図6)。従って、AIA遺伝子はシロイヌナズナのゲノムで単一コピー(single-copy)遺伝子として存在することが分かった。

【0060】

実施例5：AIA遺伝子活性が抑制された突然変異体の製造

5-1 同型接合突然変異体の製造

AIA遺伝子が植物の環境ストレス抵抗性と関連があるか否かを確認する為に、AIA遺伝子活性が抑制された同型接合突然変異体を製造した。この為に、AIA遺伝子のプロモータ部分にT-DNAが挿入された種子(Salk-019187)をソーク(<http://signal.salk.edu-bin/tdnaexpress>)から入手した(図7)。前記種子をカナマイシンが含まれたMS培地に播種し、2週間後土壌に移植してさらに2週間育てて葉よりゲノムDNAを分離した。前記ゲノムDNAの分離は次のような方法で行った。シロイヌナズナの葉2枚をE-チューブに入れ、液体窒素を入れてプラスチック探針を利用してチョッピング(chopping)し、ここに、抽出バッファ [100mM Tris-HCl, (pH8.5), 50mM EDTA(pH8.5)及び500mM NaCl] 500µlと20%SDS 35µlを添加し、65 °Cで5分間放置した。これにさらに5M KOAc 130µlを添加して氷に5分間放置し、15000rpmで10分間遠心分離した。取得した上層液を新たなチューブに移し、イソプロパノール(Iso-propanol) 640µlと、3M NaOAc 60µlを添加して-20 °Cで10分間培養し、15000rpmで10分間遠心分離した。DNA沈殿物を70%エタノールで洗浄し、2次蒸留水でゲノムDNAを抽出した。前記のような方法で取得したゲノムDNAを鋳型にして下記のプライマーを用いてPCR増幅した後、取得したPCR増幅産物を電気泳動することにより、T-DNAが挿入された同型接合突然変異体を選抜した。PCR増幅の際用いたプライマーではT-DNA内部位置プラ

イマー-LB、周辺ゲノムに位置した正方向プライマー-LP及び逆方向プライマー-RPを用いた（図7B）。前記にてPCR増幅の条件としては94 で30秒、56 で30秒、72 で2分ずつ35回繰返した。さらに、同一な条件下でT-DNA内部位置プライマーを除外し、ゲノムの正方向プライマーと逆方向プライマーを用いてPCR増幅してこれを電気泳動した。

【0061】

L B プライマー：配列番号 9

5 -GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT -3

L P プライマー：配列番号 10

5 -TGTTAAATATCTGTTCTGCGTTGGC-3

R P プライマー：配列番号 11

5 -AACCAATTCAATCGCTCAAAC-3

10

【0062】

前記のような方法により3種類のプライマーを全て用いて電気泳動すると、野生型の場合には900bp大(LPよりRPまで)の一つのバンドが検出される。同型接合突然変異体の場合には、410+N bp(N=0~300)(RPより300+N個の塩基と、LBよりベクターの左方境界面の110個の塩基)大の一つのバンドが検出され、T-DNAが挿入された全体ゲノムの増幅産物はその大きさが大き過ぎて電気泳動の際検出されない。異型接合突然変異体の場合には、染色体の一筋は野生型と同一で残りの一筋のみにT-DNAが挿入されている為に、900bp大の一つのバンドと410+N bp大のバンドが全て検出される（図8）。

一方、T-DNA内部位置プライマーを除外して、周辺ゲノムに位置した正方向及び逆方向プライマーを用いてPCR増幅した後、電気泳動すると野生型の場合には900bp大の一つバンドが検出されるものの、T-DNAが挿入されたゲノムを有する突然変異体の場合には、増幅産物の大きさが大き過ぎて電気泳動の際検出されない。

20

前記のような方法と原理により、3種類のプライマーを全て用いてPCR増幅して電気泳動した結果、総14個の植物系統の内12個の同型接合突然変異体が選抜された（図9）。

一方、T-DNA内部位置プライマーを除外し、周辺ゲノムに位置したプライマーのみを用いてPCR増幅した産物の電気泳動結果は野生型の場合にのみ900bp大のバンドが検出された（図9）。

前記にて選抜した12個の突然変異体から次世代の種子を収穫し、これをカナマイシンが含まれたMS培地に播種して、カナマイシンに抵抗性を有する突然変異体を最終的に選抜し、これをAIAと命名した（図10）。

30

【0063】

5-2 同型接合突然変異体のAIA遺伝子の発現程度測定

前記 5-1 で選抜した突然変異体(AIA)を土壌で4週間生育させ、葉から総RNAを分離して前記実施例 2-1 と同一な方法でノーザンプロットを行い、AIA遺伝子の発現程度を測定した。

実験の結果、同型接合突然変異体(AIA)のAIA遺伝子の発現程度は野生型に比べて極めて低く表れ、同型接合突然変異体のRNAを野生型に比べて4倍高い濃度で、ローディングする場合に野生型と似た水準の発現程度を示した（図11）。従って、前記同型接合突然変異体でAIA遺伝子の発現が抑制されたことが確認できた。

40

【0064】

実施例6：AIA遺伝子活性が過発現された形質転換体の早魃抵抗性調査AIA遺伝子が植物の早魃抵抗性と関連があるか否かを確認する為に、AIA遺伝子過発現形質転換体の早魃ストレスに伴う生育状態及び増産率を野生型及びAIA遺伝子の発現が抑制された突然変異体の場合と比較調査した。

【0065】

6-1 早魃ストレスに伴う生育状態比較

土壌に野生型シロイヌナズナ、前記実施例 4-2 のAIA遺伝子過発現形質転換体及び前記実施例 5-1 の突然変異体を継続培養して次世代の種子を収穫した。前記それぞれの種子を土壌に100余個ずつ播種し、長日条件（16時間光/8時間暗）で23 で2週間生育さ

50

せた。その後、10日間水の供給を中断して早魘ストレスを加え、水を再供給して2日後の生育状態を観察した。

実験の結果、野生型シロイヌナズナと同型接合突然変異体は80%以上が枯死するものとして表れた。反面、AIA遺伝子過発現形質転換体は大部分が生存するものとして表れた(図12)。

【0066】

6-2 各植物の増産率比較

本発明に伴うAIA遺伝子過発現形質転換体の早魘抵抗性をより具体的に調査する為に、野生型シロイヌナズナ、実施例 4-2 のAIA遺伝子過発現形質転換体及び実施例 5-1 の突然変異体を2週間生育させ、3,4,5番目の葉をそれぞれ切断して、3Mペーパーの上に、葉の裏面(abaxial side)が上にくるようにして、1時間間隔で6時間葉の重さを測定することにより、時間の経過に伴う増産率を比較した。

実験の結果、AIA遺伝子過発現形質転換体は野生型と突然変異体に比べて、水分損失が少ないものとして表れた。つまり、6時間後に前記形質転換体の葉の重さは初期質量の約70%程度を維持するものとして表れた反面、野生型と突然変異体は約50%以下に減少するものとして表れた(図13)。

従って、本発明に伴うAIA遺伝子過発現形質転換体は、野生型やAIA遺伝子の発現が抑制された突然変異体に比べて、増産作用が抑制され早魘ストレスに対する抵抗性が増加することが確認できた。

【0067】

実施例7：AIA遺伝子が過発現された形質転換体の除草剤抵抗性調査

AIA遺伝子が植物の除草剤抵抗性と関連があるか否かを確認する為に、除草剤の処理に伴うAIA遺伝子過発現形質転換体の葉緑素分解程度を野生型及びAIA遺伝子発現が抑制された突然変異体の場合と比較して調査した。

除草剤のパラコート(Paraquat, methyl viologen)6 μ Mを含むMS培地で4週間生育させた野生型シロイヌナズナ、前記実施例 4-2 のAIA遺伝子過発現形質転換体及び前記実施例 5-1 の突然変異体の葉を浮かべて、連続光条件で23℃で72時間培養させた。対照群にはメチルピオロゲンが含まれていないMS培地を用いた。前記メチルピオロゲンは商品名グラモクソンで良く知られている非選択的除草剤にして、葉緑素を有している全ての植物を枯死させるばかりでなく、人体に吸収された場合致命的な問題を引起し得る毒性物質である。

除草剤ストレスによる葉緑素分解程度は下記のような方法により測定した。先ず、前記で培養が完了した各植物体の葉2gを採集し、0.1g CaCO₃と共に、85%のアセトンを少しずつ添加しながら撈り鉢で粉碎し、3000rpmで5分間遠心分離した。上層液を分離した後公知された方法により葉緑素を定量した(Cunniff, P. A. Plant in Official Method of Analysis, vol1, 16th ed., pp26-28, 1995)。

実験の結果、除草剤を含む培地で培養した場合、野生型シロイヌナズナと同型接合突然変異体は対照群に比べて、60%以上の葉緑素が分解される反面、AIA遺伝子過発現形質転換体はこれ等に比べて10~20%程度の損失が少な目なものとして表れた(図14及び15図)。

【産業上の利用可能性】

【0068】

以上、前記実施例を通じて説明した通り、本発明の方法はシロイヌナズナ由来の環境ストレス抵抗性遺伝子を植物に導入することにより、植物の環境ストレス抵抗性を増加できる効果がある。

【図面の簡単な説明】

【0069】

【図1】野生型シロイヌナズナの各器官に伴うAIA遺伝子の発現パターンをノーザンブロットで分析した結果。

【図2】野生型シロイヌナズナの花の発達段階に伴うAIA遺伝子の発現パターンをRT-PCRで分析した結果(M：分子量マーカー，I：花芽形成期(受精前5~6日)，II：受精及び

10

20

30

40

50

開花期 I (受精前 2~3日), III: 受精及び開花期 II (受精期), IV: シリク発達期 (受精後 6~8日), V: シリク完成期 (受精後 13~16日)。

【図 3】植物ホルモン ABA をシロイヌナズナに処理し、時間の経過に伴い AIA 遺伝子の発現パターンをノーザンプロットで分析した結果。

【図 4】本発明に伴う AIA 遺伝子を含む組換えベクターの開裂地図を示した図。

【図 5】本発明に伴う AIA 遺伝子を含む組換えベクターで形質転換されたシロイヌナズナの RT-PCR 分析結果 (W: 野生型シロイヌナズナ, M: 分子量マーカ)。

【図 6】本発明に伴う AIA 遺伝子を含む組換えベクターで形質転換されたシロイヌナズナのノーザンプロット分析結果 (W: 野生型シロイヌナズナ)。

【図 7】AIA 遺伝子のプロモータ部分に挿入される T-DNA の位置を示した図。

10

【図 8】AIA 遺伝子の活性が抑制された同形接合突然変異体の選抜のため、デザインしたプライマー及び前記プライマーにより、増幅される産物の大きさを示した図 (WT: 野生型, HZ: 異型接合突然変異体, HM: 同型接合突然変異体)。

【図 9】PCR を利用して AIA 遺伝子の活性が抑制された同形接合突然変異体を選抜した結果。A: T-DNA 内部位置プライマー、周辺ゲノムに対する正方向プライマー及び逆方向プライマーをすべて用いて PCR 増幅した結果。B: T-DNA 内部位置プライマーを除外して周辺ゲノムに対する正方向プライマー及び逆方向プライマーのみを用いて PCR 増幅した結果。

【図 10】PCR を利用して選抜した AIA 遺伝子の活性が抑制された同型接合突然変異体の次世代の種子を、カナマイシンが含まれた MS 培地で播種してカナマイシンに抵抗性を有する突然変異体を最終的に選抜した結果 (A: 野生型シロイヌナズナ, B: カナマイシンに抵抗性を有する同型接合突然変異体, C: カナマイシンに抵抗性を有する同型接合突然変異体, D: カナマイシンに抵抗性を有する同型接合突然変異体)。

20

【図 11】本発明の方法により選抜された同型接合突然変異体の AIA 遺伝子の発現程度をノーザンプロットで分析した結果 (A: 野生型シロイヌナズナ (RNA ロード量 10 μ g), B: 同型接合突然変異体 (RNA ロード量 10 μ g), C: 同型接合突然変異体 (RNA ロード量 40 μ g))。

【図 12】早魘ストレスに伴う AIA 遺伝子の過発現形質転換体、同型接合突然変異体及び野生型シロイヌナズナの生育状態を比較した写真 (A: 野生型シロイヌナズナ, B: 同型接合突然変異体, C: 過発現形質転換体 1, D: 過発現形質転換体 2)。

【図 13】AIA 遺伝子の過発現形質転換体、同型接合突然変異体及び野生型シロイヌナズナの時間の経過に伴う葉の重さを測定した結果。

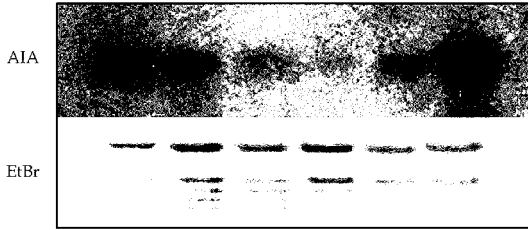
30

【図 14】除草剤の処理に伴う AIA 遺伝子の過発現形質転換体、同型接合突然変異体及び野生型シロイヌナズナの葉緑素分解程度を比較した写真。

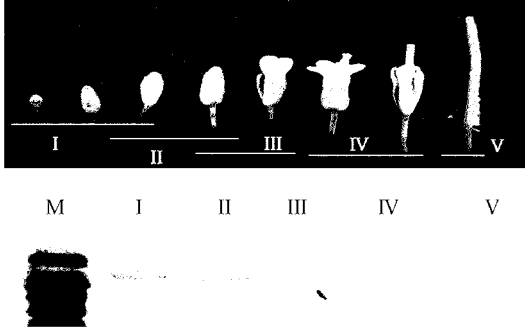
【図 15】除草剤の処理に伴う AIA 遺伝子の過発現形質転換体、同型接合突然変異体及び野生型シロイヌナズナの葉緑素を定量した結果。

【図1】

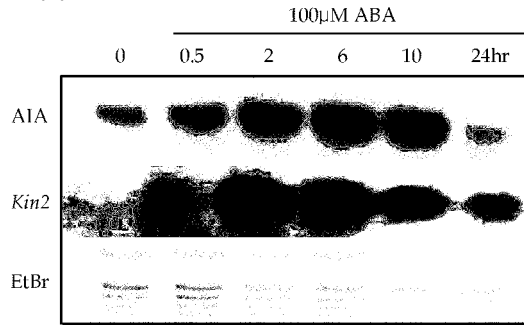
根 ロゼット葉 茎葉 幹 シルク 花



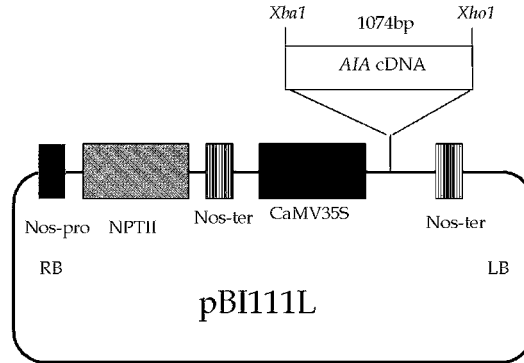
【図2】



【図3】



【図4】



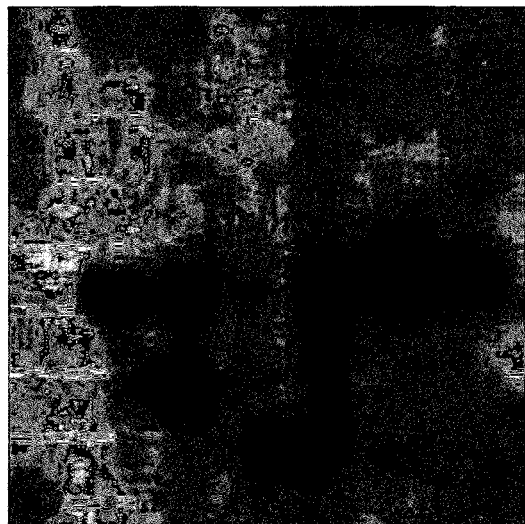
【図5】

W 2 3 4 5 6 11 13 17 20 M

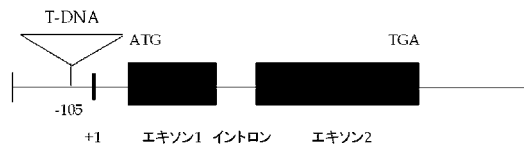


【図6】

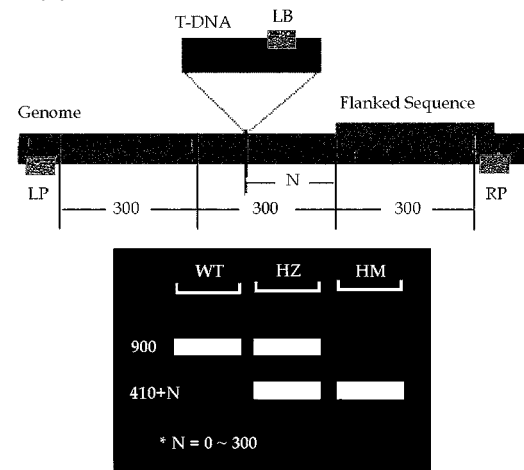
W 2 4 5 6 11 17



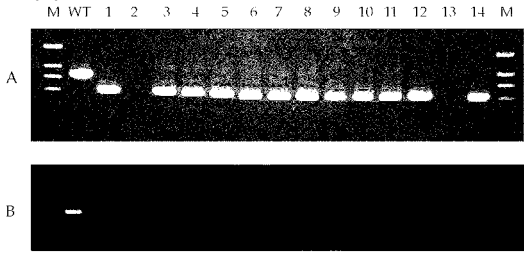
【図7】



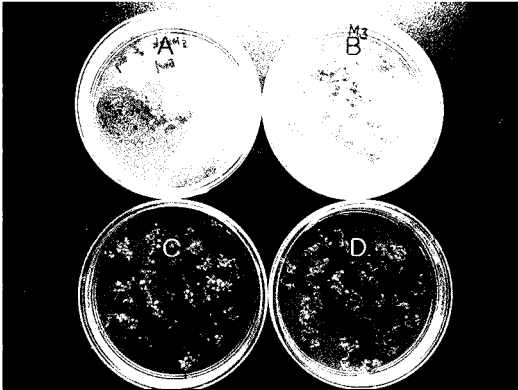
【図8】



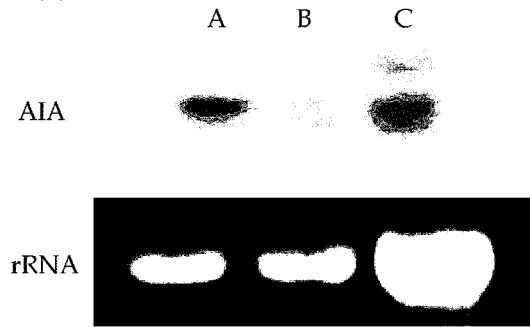
【 図 9 】



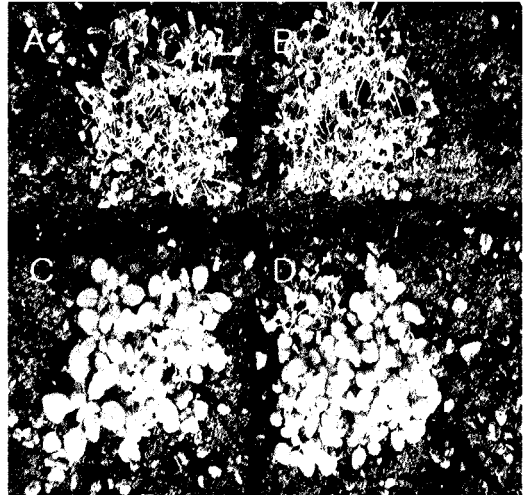
【 図 10 】



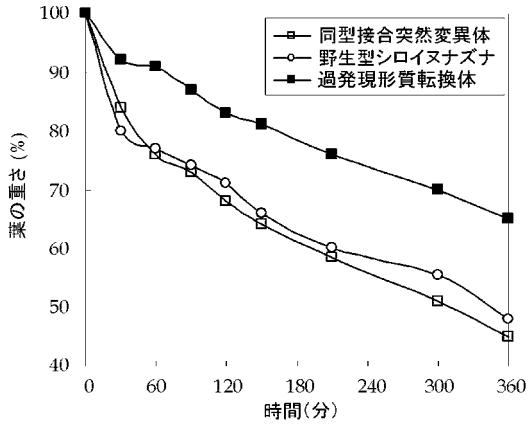
【 図 11 】



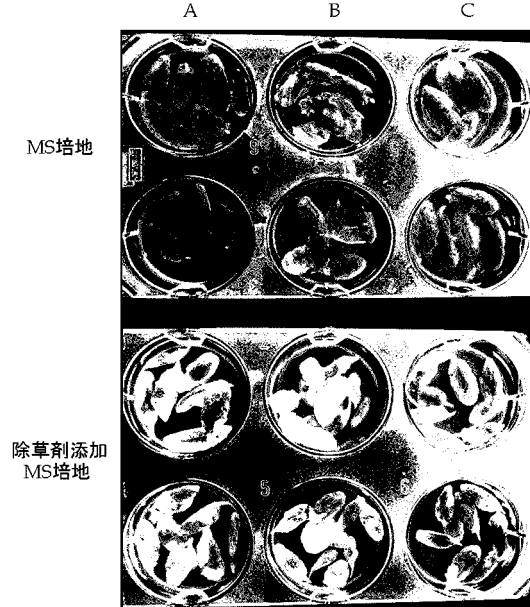
【 図 12 】



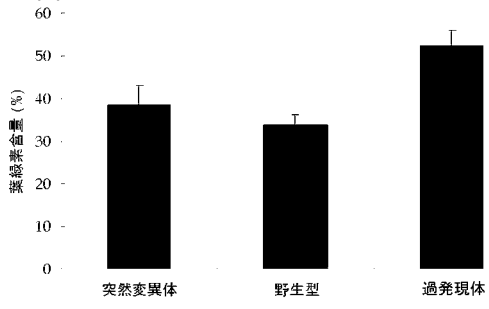
【 図 13 】



【 図 14 】



【 図 1 5 】



【 配列表 】

[2006204299000001.app](#)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/53 (2006.01)		G 0 1 N 33/53	M	
G 0 1 N 37/00 (2006.01)		G 0 1 N 37/00	1 0 2	

(74)代理人 100121050

弁理士 林 篤史

(72)発明者 金 敏均

大韓民国ソウル特別市冠岳区奉天5洞 冠岳ドリーム・タウン・アパート# 1 3 0 - 1 2 0 4

(72)発明者 鄭 晋旭

大韓民国ソウル特別市冠岳区新林本洞 ウースン・アート・ビラ# A - 2 0 2

F ターム(参考) 2B030 AA02 AB02 AD04 CA17 CB02

4B024 AA08 BA80 CA04 DA01 DA05 EA04 FA01 GA11 GA14 HA12

4B063 QA08 QQ04 QQ42 QR55 QR59 QR62 QR73 QR78 QR80 QR82

QS24 QS25 QS34

4B065 AA89X AA89Y AB01 AC20 BA03 CA24 CA53

专利名称(译)	使用环境胁迫抗性调节基因增加植物的环境胁迫抗性的方法		
公开(公告)号	JP2006204299A	公开(公告)日	2006-08-10
申请号	JP2006017744	申请日	2006-01-26
[标]申请(专利权)人(译)	首尔大学校产学协力团		
申请(专利权)人(译)	基金会的首尔国立大学产学合作基金会		
[标]发明人	金敏均 郑晋旭		
发明人	金 敏均 郑 晋旭		
IPC分类号	A01H5/00 C12N15/09 C12N5/10 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/53 G01N37/00		
CPC分类号	C12N15/8273		
FI分类号	A01H5/00.ZNA.A C12N15/00.A C12N5/00.C C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/53.M G01N37/00.102 A01H5/00.AZN.A A01H6/04 A01H6/06 A01H6/10 A01H6/12 A01H6/14 A01H6/20 A01H6/26 A01H6/46 C12N15/82.152.P C12N15/82.152.Z C12N5/00.103 C12N5/10		
F-TERM分类号	2B030/AA02 2B030/AB02 2B030/AD04 2B030/CA17 2B030/CB02 4B024/AA08 4B024/BA80 4B024 /CA04 4B024/DA01 4B024/DA05 4B024/EA04 4B024/FA01 4B024/GA11 4B024/GA14 4B024/HA12 4B063/QA08 4B063/QQ04 4B063/QQ42 4B063/QR55 4B063/QR59 4B063/QR62 4B063/QR73 4B063 /QR78 4B063/QR80 4B063/QR82 4B063/QS24 4B063/QS25 4B063/QS34 4B065/AA89X 4B065 /AA89Y 4B065/AB01 4B065/AC20 4B065/BA03 4B065/CA24 4B065/CA53		
代理人(译)	大家 邦久 小泽信彦 林淳		
优先权	1020050007534 2005-01-27 KR		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种利用环境胁迫抗性调节基因增加植物对环境的抗逆性的方法。 解决方案：将来自拟南芥的环境胁迫抗性调节基因导入植物中以增加植物的环境胁迫抗性的方法，产生耐环境胁迫的植物的方法和通过该方法产生的耐环境胁迫的植物。 【选择图】无

【图 4】

