

明 細 書

発明の名称：

ヤトロファ由来のPPATをコードするポリヌクレオチドおよびその利用

技術分野

[0001] 本発明は、ヤトロファ (*Jatropha*) 属の新規な遺伝子であるホスホパンテインアデニリルトランスフェラーゼ (Phosphopantetheine Adenylyltransferase: 以下「PPAT」という) をコードするポリヌクレオチドおよびその利用に関し、特に生育が增強されたストレス耐性ヤトロファ作出のためのその利用に関する。

背景技術

[0002] ヤトロファ・クルカス (*Jatropha curcas*) は非食用ヤトロファ油を製造することができるため、バイオディーゼル燃料生産のための生物資源として注目を集めている。また、ヤトロファは、水分や無機栄養について、他の作物の生育不適地でも栽培できる植物として知られており、半乾燥地の有効利用と緑化のために非常に有益であると考えられている。一方、ヤトロファ属植物は、荒地で育つものの、結実回数も年1回、実のサイズもパームよりかなり小さいため、自然栽培による油脂の生産効率は高くない。このような理由から、生産性の高いヤトロファの開発が求められている。

[0003] ヤトロファ油の生産性効率の改善方法の1つとしては、例えば特許文献1に提案されているように、種子の油含有量を増大させるべく、アセチルCoAカルボキシラーゼ (ACCアーゼ) を過剰発現可能に形質転換する方法がある。

[0004] 一方、ヤトロファ自体の生育増強の観点から、水不足等の環境下でも高い生育性を確保できるような環境ストレス耐性の付与が考えられる。

[0005] 環境ストレス耐性遺伝子組換え植物としては、乾燥ストレス等の環境ストレスに対して適応または応答できるように、ストレス応答シグナル伝達強度、機構を改変したもの、耐性に関与するタンパク質分子 (環境ストレスに

答するタンパク質)を過剰生産するように改良する方法などが考えられる。

[0006] 例えば、非特許文献1は、シロイヌナズナにおける乾燥ストレス耐性の制御機構について、NF-YA5転写因子が、ABA依存性で、乾燥ストレスにより強く誘導されること、NF-YA5を過剰発現させた形質転換シロイヌナズナが、野生型シロイヌナズナよりも乾燥ストレスに対する耐性に優れていたことを報告している。

[0007] ここで、アブシジン酸 (ABA) とは、種子休眠、気孔の開閉、浸透圧ストレス耐性にかかわる植物ホルモンであり、ストレス応答性遺伝子群の発現にはABAが深く関与することが知られている。

[0008] また、環境ストレス耐性シロイヌナズナを作製する方法として、特許文献2に、環境ストレスにより発現されるストレス応答性タンパク質をコードする遺伝子上流に存在するシスエレメントに結合して転写を活性化する転写因子 (ストレス応答性転写因子) の制御下にある遺伝子群の活性化作用を利用する方法が提案されている。具体的には、ストレス応答性転写因子であるDREB/CBFの発現を誘導するシグナル伝達因子をコードする新規な遺伝子として、SRK2C遺伝子を開示するとともに、このSRK2C遺伝子を過剰発現するように形質転換したシロイヌナズナが、給水停止後も、コントロールに対して優位に高い生存率を示したことを開示している。

[0009] さらに、非特許文献2には、トウモロコシNF-YB因子を同定し、これを用いて形質転換したトウモロコシが、野生型と比べて、水不足条件下での生産性が高かったことが報告されている。

[0010] また、非特許文献3には、シロイヌナズナについて、ホスホパンテインアデニリルトランスフェラーゼ (PPAT) をコードする遺伝子を破壊した個体 (ppat-1変異株) の栄養生育および種子収量が著しく低下すること (図2)、逆にPPATの過剰発現個体 (OE株) では、野生型と比べて、塩類耐性、浸透圧 (マンニトールを用いた試験) 耐性の増強効果が得られ、野生型よりも生育が促進されたこと (図3および4) が報告されている。

[0011] ここでいうPPATは、AtCoaDとも略称され、補酵素Aの生合成に関与する酵

素である。補酵素Aは、図1に示すようにパントテン酸から生合成され、PPATは4'-ホスホパンテテインとデホスホ補酵素Aの交換反応を触媒する。補酵素Aは、パントテン酸、アデノシン二リン酸および2-チオキシエタンアミンから構成され、化学式 $C_{21}H_{36}P_3N_7O_{16}S$ で表わされる。末端のチオール基に様々な化合物のアシル基がチオエステル結合することによって、種々の代謝反応に関与している。代表的には、原核生物から真核生物の細胞において共通して機能する、TCA回路に関わる補酵素である。

先行技術文献

特許文献

[0012] 特許文献1：特表2009-536029号公報

特許文献2：特開2005-253395号公報

非特許文献

[0013] 非特許文献1：Wen-Xue Li et al., "The Arabidopsis NFYA5 Transcription Factor Is Regulated Transcriptionally and Posttranscriptionally to Promote Drought Resistance", The Plant Cell, Vol.20:2238-2251 (2008)

非特許文献2：Donald E. Nelson et al., "Plant nuclear factor Y(NF-Y)B subunits confer drought tolerance and lead to improved corn yields on water-limited acres", PNAS, vol.104, No.42, 16450-16455 (2007)

非特許文献3：Rubio S. et al., "The coenzyme A biosynthetic enzyme phosphopantetheine adenylyltransferase plays a crucial role in plant growth, salt/osmotic stress resistance, and seed lipid storage." Plant Physiol., 148:546-556 (2008)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0014] 植物の生育、環境ストレスに対するシグナル伝達経路のメカニズムは複雑

であることから、生産性、環境ストレス耐性に優れた植物の作出についても、上記のように、種々の形質転換方法が提案されている。しかしながら、ヤトロファに関しては、ストレスにかかわる制御タンパク質、耐性にかかわる機能タンパク質などは明らかにされていないのが現状であり、生育性に優れた形質転換ヤトロファについての情報も見当たらない。

[0015] 本発明が解決しようとする課題は、生育性に優れたストレス耐性ヤトロファを作出することにある、そのために野生型ヤトロファを生育性に優れたストレス耐性に形質転換させることのできる遺伝子等を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0016] その課題を解決するために、本発明者らは、ヤトロファを生育性に優れたストレス耐性に形質転換するための遺伝子について検討した結果、補酵素A生合成にかかわる酵素の1つであるヤトロファのホスホパンテテインアデニリルトランスフェラーゼ (PPAT) をコードするポリヌクレオチドを単離、同定することに成功し、本発明を完成した。すなわち、本発明は、以下の通りである。

[0017] [1] 以下のポリヌクレオチドから選択される、単離されたポリヌクレオチド。

(a) 配列番号2で示される塩基配列を有するポリヌクレオチド；

(b) (a) のポリヌクレオチドの塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を有し、(a) のポリヌクレオチドがコードするポリペプチドのストレス耐性をそのコードするポリペプチドが維持している、ポリヌクレオチド。

[0018] [2] 配列番号2で示される塩基配列を有する、[1]記載のポリヌクレオチド。

[3] 以下のポリペプチドから選択される、単離されたPPATポリペプチド。

(a) 配列番号1で示されるアミノ酸配列を有する、ポリペプチド；

(b) (a) のポリペプチドのアミノ酸配列と90%以上の同一性を有する

アミノ酸配列を有し、（a）のポリペプチドのストレス耐性をそのポリペプチドが維持している、ポリペプチド。

[0019] [4] 配列番号1で示されるアミノ酸配列を有する、[3]記載のPPATポリペプチド。

[0020] [5] [3] または [4] 記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

[6] [1]、[2] または [5] 記載のポリヌクレオチドが組み入れられた、ヤトロファ植物体形質転換用ベクター。

[0021] [7] [6] 記載のベクターを含む形質転換体。

[8] [6] 記載のベクターを用いて形質転換されたヤトロファ植物体であって、野生型と比べて、PPATポリペプチドを過剰発現できるストレス耐性形質転換ヤトロファ。

[0022] [9] [8] 記載のストレス耐性形質転換ヤトロファから収穫される種子。

[10] [9] 記載の種子を圧搾して精製することによる、ヤトロファ油の製造方法。

[0023] [11] [10] 記載の製造方法で製造されうる、ヤトロファ油。

発明の効果

[0024] 本発明に係るポリヌクレオチドを用いてヤトロファを形質転換した場合、その形質転換ヤトロファは本発明のヤトロファ由来のPPATポリペプチドまたはそれと同等のポリペプチドを発現させることができる。これらポリペプチドによって補酵素Aの生合成が促進されて、同形質転換ヤトロファの代謝機能・生育性が増強され、例えばストレス耐性を顕著に向上させることができる。

図面の簡単な説明

[0025] [図1]植物（シロイヌナズナ）における、パントテン酸から補酵素Aを生合成する経路を示す図（Kupke T et al., “4-Phosphopantetheine and Coenzyme A Biosynthesis in Plants” J. Biol. Chem., 278:38229-38237

(2003) より転載) である。

[図2]実施例におけるJcPPAT c D N Aのゲル電気泳動の結果を示す写真である。

[図3]ヤトロファゲノムとP C R法によって増幅されるJcPPAT遺伝子の関係を示す図である。

[図4]pGWB11プラスミドの遺伝子マップ (Nakagawa et al., “Development of Series of Gateway Binary Vectors, pGWBs, for Realizing Efficient Construction of Fusion Genes for Plant Transformation”, Journal of Bioscience and Bioengineering, Vol.104 (2007), No.1, p.38を参照) である。

発明を実施するための形態

[0026] [JcPPATポリペプチドおよびそれをコードするJcPPAT遺伝子]

本発明に係る単離された新規なヤトロファ遺伝子は、ヤトロファのホスホパンテテインアデニリルトランスフェラーゼ (PPAT) をコードするポリヌクレオチドである。具体的には、(a) 配列番号2で示される塩基配列を有するポリヌクレオチド；および(b) (a) のポリヌクレオチドの塩基配列と90%以上の相同性を有する塩基配列を有し、(a) のポリヌクレオチドがコードするPPATポリペプチドのストレス耐性をそのコードするポリペプチドが維持している、ポリヌクレオチドが、本発明に含まれる(以下、これらを合わせて「JcPPAT遺伝子」等という)。(b) のポリヌクレオチドの塩基配列は、(a) のポリヌクレオチドの塩基配列と好ましくは95%以上の相同性を有し、さらに好ましくは98%以上の相同性を有し、特に好ましくは99%以上の相同性を有する。

[0027] 上記本発明のPPATポリペプチドには、例えば(a) 配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；および(b) (a) のポリペプチドのアミノ酸配列と90%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有し、(a) のポリペプチドのストレス耐性をそのポリペプチドが維持している、ポリペプチドが含まれる(以下、これらを合わせて「JcPPAT」という)。(b) のポ

リペプチドは、(a) のポリペプチドのアミノ酸配列と好ましくは95%以上の相同性を有し、さらに好ましくは98%以上の相同性を有し、特に好ましくは99%以上の相同性を有する。本発明の遺伝子の塩基配列には、上記(a) および(b) のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも含まれる。

[0028] 本発明に係るJcPPAT遺伝子は、好ましくは配列番号1で示されるアミノ酸配列をコードするものが挙げられ、さらに配列番号2で示される塩基配列を有するポリヌクレオチドが、ヤトロファゲノムに由来することから、形質転換ヤトロファ作出のために好ましい。

[0029] 本発明のJcPPAT遺伝子の調製方法は特に限定されないが、例えばヤトロファ由来のPPAT遺伝子に該当する配列番号2のDNAは、ヤトロファmRNAから、下記プライマーセット(配列番号3および4)を用いてRT-PCR反応を行うことにより、目的とするポリヌクレオチド(PPATをコードするcDNA)のPCR産物として得ることができる。また、JcPPAT遺伝子は、常法に従って得ることができ、例えば配列番号2のDNA等の所定の塩基を置換させ、欠失させ、または付加させることで、人工的に合成することもできる。

[0030] [化1]

フォワードプライマー: 5' - AAAAAGCAGGCTCAAAAATGGCGTTATTAGACGAATCTATGGTTAAT -3'

リバースプライマー: 5' - AGAAAGCTGGGTATGCTACTTCTTGTGTTTTTCACCTTCTCGG -3'

[0031] mRNAの調製は、通常行われる手法により行うことができる。例えば、凍結した植物体を乳鉢などで摩砕後、得られた摩砕物から、グリオキザール法、グアニジンチオシアネート塩化セシウム法、塩化リチウム-尿素法、プロテイナーゼK-デオキシリボヌクレアーゼ法などにより、粗RNA画分を抽出調製すればよい。また、市販のキットを用いてもよい。

[0032] 原料となる植物体の組織は特に限定されず、成熟過程における種子あるいは発芽時の種子であってもよく、成葉であってもよく、その他、茎などを用いてもよい。これらのうち、種子貯蔵脂質代謝によるエネルギー生産が活発

な発芽中の種子からは、より多量のPPAT mRNAを得ることができる。種子発芽時には、大量のエネルギーが必要となるため、種子に貯蔵されていた脂質代謝にあたりPPAT活性が増強されるためと考えられる。また、成熟過程にある種子においても、脂質蓄積のためにPPAT活性が増強されると考えられるので、PPAT mRNAを効率よく得ることができると考えられる。ただし、種子のように、組織に多量の油脂が含まれているような場合、粉碎物を精製した後、RNA抽出を行うことが好ましい。

[0033] 得られたPCR産物の塩基配列の決定、確認は、従来より公知の手法、例えば、マキシムーギルバートの化学修飾法、またはM13ファージを用いるジデオキシヌクレオチド鎖終結法等の公知手法により行えばよい。

〔ストレス耐性形質転換ヤトロファの作出〕

本発明のストレス耐性形質転換ヤトロファは、上記で調製されるJcPPAT遺伝子を発現または発現調節のためのプロモータと作動可能に連結した発現カセットを、野生型ヤトロファに遺伝子導入することにより作製される。

[0034] 本発明が対象とするヤトロファの種類は特に限定せず、ヤトロファ・クルカス (*Jatropha curcus*)、ヤトロファ・ポタグリカ (*Jatropha potagurica*)、ヤトロファ・ムルチフィダ (*Jatropha multifida*)、ヤトロファ・ベルランディエリ (*Jatropha berlandieri*)、ヤトロファ・インテゲリマ (*Jatropha integerrima*) などを用いることができる。これらのうち、油脂含有量が多いという点から、ヤトロファ・クルカスが好ましく用いられる。

[0035] 遺伝子導入方法は、プロトプラスト同士を融合させる方法、電気穿孔法、遺伝子ショットガン法等の細胞に直接的にDNAを導入する方法；アグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) や *R. rhizogenes* を利用して間接的に導入する方法のいずれの方法により行ってもよいが、好ましくはアグロバクテリウムを用いる方法である。以下、アグロバクテリウムを用いる形質転換方法について説明する。

[0036] アグロバクテリウムは植物病細菌で、LB（レフトボーダー）とRB（ライトボーダー）に挟まれた領域（T-DNA（Transferred DNA）領域）

を切り出して宿主ゲノムに挿入することができるT！プラスミドをもって、このT-DNA領域内に、導入しようとする遺伝子、すなわちJcPAtc DNAを組み込んだプラスミドを有するアグロバクテリウムを、宿主植物へ感染させると、T-DNA領域が切り出されて、vir領域にコードされているタンパク質群と複合体を形成して植物細胞内に侵入し、さらに宿主ゲノムに挿入することができる。

[0037] アグロバクテリウムを用いる形質転換方法としては、バイナリーベクター法が好ましい。バイナリーベクター法とは、T！プラスミドのT-DNAを欠落させたプラスミド (pAL4404など) とは別に、T-DNA領域のボーダー (LBおよびRB) を有するプラスミドのT-DNA領域に目的の外来遺伝子を組み込んだプラスミドをアグロバクテリウムに導入して植物に感染させることにより、目的遺伝子を植物ゲノムに挿入する方法である。

[0038] バイナリーベクター法を利用した、形質転換ヤトロファの作出に用いられる発現カセットは、T-DNA領域に、上記本発明に係るJcPAt遺伝子、および当該ヌクレオチド発現のためのプロモータ、リーカー遺伝子、レポータ遺伝子を含んでいる。

[0039] プロモータとしては、35Sカリフラワーモザイクウイルスプロモータ、ノバリンシタターゼ (NOS) プロモータ、および β フゼオリン、チピン、ユビキチンなどの他の胚乳特異的プロモータが挙げられる。

[0040] 選択リーカー遺伝子としては、抗生物質または除草剤のような選択剤に対する抵抗性を付与する遺伝子が用いられる。具体的には、カナマイシン耐性遺伝子、パロモイシンB耐性遺伝子、またはグルコシネートおよびグリフォセートのような除草剤に対する抵抗性遺伝子などが挙げられる。形質転換体を視覚的に同定できる選択リーカー、例えば、ルシフェラーゼ、または緑色蛍光タンパク質 (GFP) のような発色または蛍光タンパク質を発現する遺伝子または種々の発色体基質が知られている β グルクロニダーゼまたはGUSを発現する遺伝子も利用することができる。このような選択リーカーは、レポータ遺伝子としても利用できる。

[0041] 必要に応じて、さらにエンハンサー、ターミネータ、タグなどを含んでもよい。エンハンサーは、目的遺伝子の発現効率を高めるために用いられ、CaMV35Sプロモーター内の上流側の配列を含むエンハンサー領域などが挙げられる。ターミネータとしては、プロモータにより転写された遺伝子の転写を終結できる配列であればよく、例えば、ノパリン合成酵素（NOS）遺伝子のターミネータ、オクトビン合成酵素（OCS）、CaMV35SRNA遺伝子のターミネータが挙げられる。

[0042] バイナリーベクター法によるヤトロファの形質転換に用いるバイナリーベクターとしては、上記発現カセットをT-DNA領域に含むもので、具体的には、pBI系、pPZP系、pSMA系、pGWB系などの市販ベクターに上記発現カセットを組み入れたものを用いることができる。特に、Gateway（登録商標）のクローニングシステムが適用可能な植物形質転換用バイナリーベクターが好ましく、このようなベクターとしては、pGWB系ベクターが挙げられる。このpGWB系ベクターは、プロモータとしてカリフラワーモザイクウィルス（CaMV）35Sプロモータ；選択マーカー遺伝子としては、ハイグロマイシン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子；レポータとして β -グルクロニダーゼ（GUS）、緑色蛍光タンパク質（GFP）、ルシフェラーゼ（LUC）、黄色蛍光タンパク質（YFP）、シアン蛍光タンパク質（CFP）；タグとして、6xHis、FLAG、3xHA、4xMyc、GST、T7-エピトープを用いて、目的遺伝子およびレポータが作動可能に連結されている。さらにN末端、C末端の双方に融合できるように、レポータ、タグをコードする配列がある。

[0043] Gateway（登録商標）クローニングシステムとは、Gateway（登録商標）シグナル（att）を用いることによって、発現ベクターの構築を容易にしたものである。attP1、attP2配列を有するドナーベクターと目的遺伝子の両端にattB1およびattB2配列を付加したものとの間で反応（BP反応）させることにより、目的遺伝子が組み込まれたエントリーベクター（両端にattL1、attL2配列を有する）を作製し、次いで、このエントリーベクターと発現に必要なプロモータが組み込まれたデスティネーションベクター（attR1およびattR2配

列を付加)と組みかえ反応(LR反応)することにより、目的遺伝子が挿入されたベクター(発現ベクター)を作製する方法である。

[0044] 従って、まず、クローニングしたJcPPAT cDNAを、ドナーベクターとの間でBP反応させることによりドナーベクターに組み入れたエントリーベクターを調製し、次いでこのエントリーベクターとデスティネーションベクター(pGWB)とをLR反応させることにより、目的とするDNA(JcPPAT遺伝子)が組み入れられた発現ベクターを作製することができる。

[0045] Gateway(登録商標)バイナリーベクター(pGWB)を用いた植物形質転換用発現カセットの構築については、Nakagawa et al., "Development of Series of Gateway Binary Vectors, pGWBs, for Realizing Efficient Construction of Fusion Genes for Plant Transformation", Journal of Bioscience and Bioengineering, Vol.104, No.1, 34-41 (2007)に詳述されている。

[0046] 以上のようにして作成した発現ベクター(植物形質転換用ベクター)は、大腸菌中で増幅させることができる。増幅した形質転換用ベクターは、エレクトロポレーション法等により、アグロバクテリウムに導入すればよい。このようにして発現ベクターを導入したアグロバクテリウムを、ヤトロファの形質転換に用いる。

[0047] 植物形質転換用ベクターを搭載したアグロバクテリウムの感染によるヤトロファへのJcPPAT遺伝子の導入は、リーフディスク法などの公知の方法を用いて行うことができる。

[0048] 具体的には、アグロバクテリウムをMS培地に懸濁した感染用菌液を調製し、この菌液に宿主となるヤトロファの一部(好ましくは子葉のカット片、以下「ヤトロファ葉片」という)とを3日間程度共培養する。共培養に先立って、ヤトロファの葉片を、MS培地に2日間程度浸漬し、さらにはソニケーションしておくことが好ましい。これにより導入効率を高くすることができる。さらにまた、アグロバクテリウム菌の懸濁液に砂を加えた状態で振動を与えるSandvortex法は、アグロバクテリウムの感染力が高まり、好ましい

[0049] 共培養培地としては、MS培地などに、3-インドール酪酸(1BA)、

6-ベンジルアミノグリシン(BA)などの植物ホルモンを添加した培地が用

いられる。

[0050] 共培養後、ヤトロファ葉片を洗浄し、選択培地(形質転換用ベクターの発

現カセットで用いられた選択マーカー遺伝子に対応する抗生物質を含有)に

移して、インキュベートした後、葉片に形成されたカルスを切り取り、選択

培地に移して、さらに、形質転換されたヤトロファ(組換え細胞)のスクリ

ーニングを行う。

[0051] 選択培地としては、選択用物質となる抗生物質(カナマイシン、ハイグロ

マイシン)を、前培養に用いた培地(MS培地など)に添加し、さらに植物

ホルモンとして、1BA、BAなどを含有したものが好ましく用いられる。

[0052] 次に、選抜したカルスをRoot induction(R1)培地、MS培地などの培

地に移して、発根させ、植物体へ再分化させる。再分化誘導は、培地におけ

るオーキシンやサイトカイニン等の植物生育調節物質、炭素源等の各種成分

の種類や量、光、温度等を適切に設定することにより行うことができる。

[形質転換ヤトロファ]

本発明の形質転換ヤトロファでは、細胞における種々の代謝反応に関与す

る補酵素Aの合成反応に関与する酵素の1つであるPPATをコードするJcPPAT

遺伝子を野生型と比べて多量に有しているので、PPATを過剰発現することが

でき、さらに、野生型と比べて補酵素Aの合成が促進されと考えられる。

上述の非特許文献3に開示されているように、シロイヌナズナにおいて、PPA

Tの過剰発現個体(OE)は、補酵素Aの濃度が野生型に比べて増大し、塩類

耐性、浸透圧(マニトールを用いた試験)耐性の増強効果が得られたこと

、さらに植物の生育が増強されていたことが報告されている(図2~4)。

本発明の形質転換ヤトロファについても同様に、PPATの過剰発現により、補

酵素A濃度を増大させ、ひいては塩類、浸透圧、乾燥ストレス耐性、生育の

強化促進効果が期待できる。ひいては、種子の収獲量増大も期待できる。

[0053] さらに、非特許文献3では、PPATの過剰発現株では種子の油量含量が30

～50%増加し、脂肪酸組成にも変化が見られたことが報告されている。従って、本発明の形質転換ヤトロファにおいても、種子の油量含量が増加し、

野生株と異なる脂肪酸組成をもつ果実をもつことが期待される。

[0054] なお、本発明の形質転換植物体は、形質転換処理を施した「T1世代」の

ほか、その植物の種子から得られた後代である「T2世代」、薬剤選抜ある

いはサザン法等による解析により形質転換であることが判明した「T2世代

」植物の花を自家受粉して得られる次世代（T3世代）などの後代植物もふ

くまれる。

[ヤトロファ油の製造]

ヤトロファ油は本発明の形質転換ヤトロファから収穫される種子から、常

法に従って製造することができる。例えば、種子を圧搾して原料油を得て、

その原料油をフイルターでろ過することで、バイオディーゼルとして使用し

うるヤトロファ油を製造することができる。ヤトロファ油をさらに精製した

い場合は、例えば蒸留により精製することもでき、また特開2010-209

177号公報に記載された方法でホルボールエステルを除去することもでき

る。

実施例

[0055] 本発明を実施するための形態を実施例により説明する。下記実施例は、本

発明の範囲を限定するものではない。

[ヤトロファにおけるPPATコードDNAの単離および同定]

(1) ヤトロファにおけるPPATコードDNA

かずさDNA研究所と大阪大学が住友電気工業株式会社の寄付の下で進め

ていた、ヤトロファゲノムプロジェクトにおいて解読されたヤトロファのゲ

ノム情報（コンテナク地図）に基づき、シロイヌナズナPPAT（At2g18250）と

相同性を示す遺伝子をTBLASTN検索した。なお、シロイヌナズナのPPATの遺伝

子情報は、Arabidopsis Information Resource

(TAIR) の遺伝子登録情報 (<http://arabidopsis.org/servlets/TairObject?>

type=locus&name=AT2G18250) を参照した。その結果、ヤトロファのゲノム DNA 配列上 (Contig 948.1、Contig 6725.1) に 1 クローンの PPAT をコードする遺伝子配列が存在することが推測された。

(2) ヤトロファ全 RNA の調製

日光種苗株式会社より購入したタイ系統ヤトロファ (*Jatropha curcas*) の発芽 4 日目の種子を用いた。殻を剥いたヤトロファ種子を 70% エタノールおよび次亜塩素酸ナトリウムにより表面滅菌後、1/2 MS 培地上に置き、30℃、16 時間/8 時間の明暗周期の下、4 日間培養し、発芽させた。発芽中の種子 1 粒 (約 1 g) から、Concert™ Plant RNA Reagent (Invitrogen) を用い、全 RNA を含むサンプルを調製した。調整したサンプルには多量の油脂分が含まれていたために、これを除去するため RNeasy ミニカラム (QIAGEN) により RNA サンプルを精製して全 RNA を得た。

[0056] また、上記ヤトロファの種子を生育させて得られた成葉 (1 g) から、Concert™ Plant RNA Reagent (Invitrogen) を用い、全 RNA を含むサンプルを調製した。

(3) ヤトロファ PPAT cDNA のクローニングおよび増幅

(2) で発芽時種子および成葉夫々から調製した全 RNA を、夫々鋳型として、Reverse Transcription System (Promega) を用いた AMV 逆転写酵素による、cDNA の合成を行なった。プライマーにはシステム添付の Oligo(dT)₁₅ を用いた。

[0057] ゲノム DNA 配列上に存在が推測された PPAT をコードする候補遺伝子を増幅するため、上記で調製したヤトロファ cDNA を鋳型として、下記プライマーセット (配列番号 3 および 4) を用いて、PCR 反応を行うことにより、目的とする JcPPAT cDNA を増幅した。

[0058] [化2]

フォワードプライマー: 5' - AAAAAGCAGGCTCAAAAATGGCGTTATTAGACGAATCTATGGTTAAT -3'

リバースプライマー: 5' - AGAAAGCTGGGTATGCTACTTCTTGTCTTTTTCACCTTCTCGG -3'

[0059] 具体的には、下記 PCR 用反応液に、(1) で調製したヤトロファ cDNA

A溶液 1 μ l を加えて全量 20 μ l として、以下の条件で PCR 反応を行った。

[0060] 94℃、2分間保持した後、[94℃、15秒→55℃、30秒→68℃、3分]を40回繰り返し、次いで、4℃まで冷却した。PCRに用いた反応液は、下記の通りである。

0.4 Unit KOD-plus-ポリメラーゼ (東洋紡)

1 x KOD-plus-緩衝液 (東洋紡)

0.2 mM dNTPs (東洋紡)

1 mM MgSO₄ (東洋紡)

1 μ M フォワードプライマー (配列番号3)

1 μ M リバースプライマー (配列番号4)

反応終了後、増幅により得られたJcPPAT cDNAをアガロース電気泳動で確認した。電気泳動の結果を図2に示す。Sは、発芽時の種子から調製したJcPPAT cDNAサンプルであり、Lは成葉から調製したJcPPAT cDNAサンプルであり、Nはネガティブコントロールである。JcPPAT cDNAであると思われる400～500 bp付近にバンドが確認できた。発芽時種子のcDNAサンプルのバンドは、成葉のcDNAサンプルのバンドと比べて濃かった。このことから、発芽時の種子では、種子に貯蔵された脂質代謝を活発に行う必要があり、大量のエネルギーを要するために、より多くのPPATが発現されているのではないかと推測される。

[植物組み換え用ベクターの作製 (形質転換用プラスミドの構築)]

上記で増幅したcDNAに、Gateway (登録商標) クローニングシステムを適用するに当たり、下記に示すアダプター配列attB1 (配列番号5) およびattB2 (配列番号6) を付加するためにPCR反応を行った。

[0061] [化3]

attB1: 5' - GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT -3'

attB2: 5' - GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT-3'

[0062] PCR反応液としては、下記溶液に、上記PCRで増幅したDNA溶液1

μ l を加えて全量 50 μ l としたものをを用いた。

1 Unit KOD-plus-ポリメラーゼ（東洋紡）

1 x KOD-plus-緩衝液（東洋紡）

0.2 mM dNTPs（東洋紡）

1 μ M attB1_adapter

1 μ M attB2_adapter

PCR 反応の温度サイクルは次の通りである。94℃、1 分間保持した後、[94℃、15 秒→45℃、30 秒→68℃、1 分] を 5 回繰り返し、さらに [94℃、15 秒→55℃、30 秒→68℃、1 分] を 20 回繰り返した後、4℃まで冷却した。反応終了後、PCR 産物をアガロース電気泳動で確認した。

[0063] 得られた PCR 産物の配列を DNA シークエンサーで配列決定した。ポリペプチドコード領域の配列は、配列番号 2 で示される通りであった。なお、ヤトロファゲノム DNA と JcPPAT 遺伝子、PCR 反応に用いたプライマーとの関係は、図 3 のようになる。

[0064] 配列番号 2 で示される DNA を、Invitrogen の Gateway（登録商標）システムのドナーベクター（pDONR221）を用いて、クローニングした。具体的には、PCR により増幅した JcPPAT 遺伝子（attB1 および attB2 を両端に有している）とドナーベクター pDONR221 を混合後、BP クロナーゼ（Invitrogen）を用いて組み替え反応（BP 反応）を行うことにより、エントリーベクターとなる pENTRJcPPAT を得て、これを大腸菌 DH5 α 株に導入した。pDONR221 は、カナマイシン耐性遺伝子をマーカー遺伝子として導入されたものである。

[0065] pENTRJcPPAT プラスミドを大腸菌から抽出し、制限酵素 XhoI（タカラバイオ）により直鎖化したプラスミドベクター（デスティネーションベクター）pGWB11 と混合後、LR クロナーゼ（Invitrogen）を用いて組み替え反応を行った。

[0066] pGWB11 は、図 4 に示すように、プロモータとして 35S プロモータを有し、C 末端に FLAG タグが付加されている。また、HindIII-SacI 間に、35S プ

ロモーターR1-Cmr-ccdB-R2-FLAGが入っている。R1-Cmr-ccdB-R2の部分が、エントリーベクターとのLR反応によりattB1-(PPAT)-attB2に入れ替わることができる。このようにして、植物組み換え用ベクターとなるpGWB11JcPPATを得た。

〔形質転換体の作製〕

(1) 形質転換用アグロバクテリウムの調製

上記組換え用ベクターをエレクトロポレーション法によりアグロバクテリウムに導入し、形質転換した。この形質転換アグロバクテリウムを、YEB液体培地(50mg/lカナマイシン、50mg/lハイグロマイシン添加)で、30℃、2日間振とう培養した後、遠心分離により集菌した。集菌した菌をYEB培地に再懸濁して、感染用菌液を調製した。

(2) ヤトロファの形質転換

宿主となるヤトロファ細胞には、ゲノム抽出に用いたヤトロファと同種のタイ系統ヤトロファ(*Jatropha curcas*)を用いた。このヤトロファの成葉を用いて、リーフディスク法により形質転換を行った。具体的には、まず、宿主となるヤトロファの成葉のカット片(約25mm²、以下「ヤトロファ葉片」という)を、家庭用漂白剤を水道水で10倍に希釈した液で滅菌し、MS基本培地に植物ホルモン(IBA、BA)を添加したPre-conditioning寒天培地上に2日間、25℃で静置する。アグロバクテリウムをMS培地に懸濁した感染用菌液を調製し、この菌液に先のヤトロファ葉片を浸漬し、10分間振とうする。その後、3日間、25℃で遮光環境下で寒天培地上で共培養する。共培養培地としては、Pre-conditioning培地に、アセトシリンゴンを添加したCo-cultivation培地を用いる。

(3) 形質転換ヤトロファのスクリーニング

上記で作製した発現カセットが、ヤトロファの染色体ゲノムに安定して挿入された形質転換体をスクリーニングする。

[0067] 具体的には、共培養後のヤトロファ葉片をセフォタキシムナトリウム水溶液(200mg/l)で洗浄し、形質転換されたヤトロファ(組換え細胞)

のスクリーニングを行う。スクリーニング用抗生物質としてはカナマイシン (20 mg / l) を用いる。まず、Shoot regeneration I (SR-I) 寒天培地に移して、25℃で培養した際にカルスの形成が見られた葉片を、Shoot regeneration II (SR-II) 寒天培地に移す。

[0068] 次に、選抜したカルスをShoot elongation I (SE-I) 寒天培地、Shoot elongation II (SE-II) 寒天培地に移して、不定胚を分化させ、R1 寒天培地において発根を誘導し、再分化したヤトロファ植物 (T1) を得る。

[0069] 使用した培地組成を以下に示す。

<MS 基本培地>

MS 1x, (pH 5.8) 3%

スクロース

ミオイノシトール

チアミン塩酸塩 (pH 5.8) 10 mg / l

寒天

<1 / 2 MS 培地>

MS 0.5x, (pH 5.8) 1.5%

スクロース

ミオイノシトール

チアミン塩酸塩 (pH 5.8) 5 mg / l

寒天

<Pre-conditioning 培地>

MS 基本培地

6-ベンジルアミノプリン (BA) 1 mg / l

3-イソブトール酪酸 (IBA) 0.075 mg / l

<Co-cultivation 培地>

MS 基本培地

6-ベンジルアミノプリン (BA) 1 mg / l

3-インドール酪酸 (IBA) 0.075 mg / l

アセトシリンゴン (AS) 20 mg / l

<SR-I 培地>

MS 基本培地

6-ベンジルアミノプリン (BA) 1 mg / l

3-インドール酪酸 (IBA) 0.075 mg / l

セフォタキシムナトリウム 200 mg / l

カナマイシン 20 mg / l

<SR-II 培地>

MS 基本培地

6-ベンジルアミノプリン (BA) 3 mg / l

3-インドール酪酸 (IBA) 0.5 mg / l

セフォタキシムナトリウム 200 mg / l

カナマイシン 20 mg / l

<SE-I 培地>

MS 基本培地

6-ベンジルアミノプリン (BA) 2 mg / l

セフォタキシムナトリウム 200 mg / l

カナマイシン 20 mg / l

<SE-II 培地>

MS 基本培地

6-ベンジルアミノプリン (BA) 2 mg / l

カナマイシン 20 mg / l

<RI 培地>

MS 基本培地 (1 / 2 濃度のMS)

3-インドール酪酸 (IBA) 0.2 mg / l

(4) JcPPAT 遺伝子発現の確認

スクリーニングにより選択された形質転換体において、PPAT が過剰発現す

ることを確認する。

- [0070] 形質転換細胞（PPATポリペプチドをプロモータによって発現する形質転換双子葉細胞）および、コントロール（野生型ヤトロファの双子葉細胞）を培養した後、mRNAを抽出し、配列番号1に示すヌクレオチドを鋳型としてRT-PCR反応により増幅させ、JcPPATのmRNA量を定量し、コントロールと比較する。

〔形質転換ヤトロファの作出および生育性の確認〕

JcPPAT遺伝子を導入した形質転換カルスから誘導した不定胚を、さらにRI培地に移して発根させ、再分化したヤトロファ植物（T1）を作出する。

- [0071] 作出に際して、発根の根の長さ、葉の面積、補酵素A濃度を測定し、野生型と比較する。

- [0072] また、再分化させて得られた植物体を砂耕栽培し、任意の時点における灌水を中断した後の水不足条件で栽培した際の光合成速度およびクロロフィル蛍光、蒸散速度および、成葉の黄変、巻き上がり、落葉を野生株と比較し、乾燥ストレス耐性を評価する。

産業上の利用可能性

- [0073] 本発明の新規なポリヌクレオチド等は、生育増強ヤトロファ、乾燥ストレス耐性ヤトロファの作出に利用できる。また、種子の脂肪酸含量の増加および脂肪酸組成を改変したヤトロファ品種の作出に利用できる。

請求の範囲

- [請求項1] 以下のポリヌクレオチドから選択される、単離されたポリヌクレオチド。
- (a) 配列番号2で示される塩基配列を有するポリヌクレオチド；
 - (b) (a)のポリヌクレオチドの塩基配列と90%以上の相同性を有する塩基配列を有し、(a)のポリヌクレオチドがコードするポリペプチドのストレス耐性をそのコードするポリペプチドが維持している、ポリヌクレオチド。
- [請求項2] 配列番号2で示される塩基配列を有する、請求項1記載のポリヌクレオチド。
- [請求項3] 以下のポリペプチドから選択される、単離されたPPATポリペプチド。
- (a) 配列番号1で示されるアミノ酸配列を有する、ポリペプチド；
 - (b) (a)のポリペプチドのアミノ酸配列と90%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有し、(a)のポリペプチドのストレス耐性をそのポリペプチドが維持している、ポリペプチド。
- [請求項4] 配列番号1で示されるアミノ酸配列を有する、請求項3記載のPPATポリペプチド。
- [請求項5] 請求項3または4記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。
- [請求項6] 請求項1、2または5記載のポリヌクレオチドが組み入れられた、ヤトロファ植物体形質転換用ベクター。
- [請求項7] 請求項6記載のベクターを含む形質転換体。
- [請求項8] 請求項6記載のベクターを用いて形質転換されたヤトロファ植物体であって、野生型と比べて、PPATポリペプチドを過剰発現できるストレス耐性形質転換ヤトロファ。
- [請求項9] 請求項8記載のストレス耐性形質転換ヤトロファから収穫される種子。

[請求項10] 請求項9記載の種子を圧搾して精製することによる、ヤトロファ油の製造方法。

[請求項11] 請求項10記載の製造方法で製造されうる、ヤトロファ油。