

2005 年第 2 回知的財産翻訳検定

化学分野<生化学>試験問題

問題：

下記明細書の【特許請求の範囲】の【請求項 1】のうち (C)、(D)および (E)を除いた部分（翻訳はセミコロンの終わってください）と、パラグラフ【0007】及び【0034】（見出しを除く）を出願用に翻訳してください。翻訳にあたっては、必要に応じて明細書の他の部分を参照してください。

解答にはパラグラフ番号を忘れずに付記してください。

解答中、℃は **degree C** とし、 μ l はスペルアウトしてください。ギリシャ文字の使用は不可とします。HNO3 の 3 は下付き文字と見なします。解答も HNO3 のままで結構です。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の (A) ~ (E) の何れかの塩基配列からなるホウ素トランスポーター遺伝子。

(A) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列；

(B) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつホウ素トランスポーター活性を有するタンパク質をコードする塩基配列；

(C) 配列番号 1 に示される塩基配列；

(D) 配列番号 1 に示される塩基配列において、1 若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつホウ素トランスポーター活性を有するタンパク質をコードする塩基配列；

(E) 配列番号 1 に示される塩基配列とストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつホウ素トランスポーター活性を有するタンパク質をコードする塩基配列；

Claim:

A boron transporter gene comprising any one of the following base sequences (A) - (E):

(A) a base sequence coding for a protein whose amino acid sequence is represented by SEQ ID NO:2;

(B) a base sequence coding for a protein derived from the protein of (A) by deletion, substitution or addition of one or several amino acids in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:2 and having boron transporter activity;

【0007】

本発明者らは上記課題を解決するため鋭意研究し、シロイヌナズナゲノムに存在する6つのBOR1相同遺伝子のうち、シロイヌナズナにおいて発現しているAt3g62270、At3g06450、At1g15460、At1g74810、At5g25430の5遺伝子の完全長cDNAを取得した。At3g62270、At3g06450、At1g15460について、GAL1プロモーター下流に5'と3'側双方の非翻訳領域を含む完全長cDNAをつないだコンストラクトを構築し、酵母のBOR1相同遺伝子であるYNL275wの破壊株に導入した。酵母の菌体内水溶性ホウ素濃度を測定したが、ベクターコントロールと遺伝子を導入した酵母において有意な差は見られなかった。また、ホウ酸を含む培地における耐性も見られなかった。そこで、5'と3'側双方の非翻訳領域を除いたORF部分のcDNAをGAL1プロモーター下流につないだコンストラクトを構築し、酵母に導入した。ホウ素を含む培地で60分間培養したところ、いずれもベクターコントロールと比較して菌体内水溶性ホウ素濃度の低下が見られた。また、20～80mMのホウ酸を含む固形培地で生育させたところ、At3g06450、At1g15460を発現させた酵母ではベクターコントロールと比べてホウ酸耐性を示した。At1g15460を発現させた酵母ではBOR1を発現させた酵母よりも強い耐性を示した。本発明は上記知見に基づいて完成するに至ったものである。

[0007]

In order to attain the stated object, the present inventors conducted intensive studies and obtained a full-length cDNA for each of At3g62270, At3g06450, At1g15460, At1g74810 and At5g25430, which are among the six BOR1 homologous genes in the *Arabidopsis thaliana* genome and which are expressed in *A. thaliana*. For each of At3g62270, At3g06450 and At1g15460, the inventors made a construct in which a full-length cDNA containing both the 5' and 3' untranslated regions was connected downstream of the GAL1 promoter, and the construct was introduced into a yeast strain in which YNL275w, or the BOR1 homologous gene of yeast, had been disrupted. The inventors measured the concentration of water-soluble boron within the yeast cells, but no significant difference was found between the vector control and the yeast into which the gene had been introduced. Nor was found resistance in a medium containing boric acid. In view of this, the inventors made constructs in which cDNA in the ORF portion having neither the 5' nor 3' untranslated region was connected downstream of the GAL1 promoter and introduced the constructs into yeast. Upon culturing in a boron-containing medium for 60 minutes, each sample was found to have a lower concentration of intracellular water-soluble boron than the vector control. Upon cultivating on solid media containing 20-80 mM of boric acid, the yeast in which At3g06450 and At1g15460 had been expressed showed greater boric acid resistance than the vector control. The yeast in which At1g15460 had been expressed showed greater resistance than the yeast in which BOR1 had been expressed. The present invention has been accomplished on the basis of these findings.

【0034】

[酵母のホウ素濃度の測定]

酵母のホウ素濃度の測定には、SD培地のグルコースをガラクトースに代えた最小培地（SG）を用い、培養は30°Cで行った。2日間培養した酵母1169株の培養液5mlを200mlの培地に加え、対数増殖期になるまで16時間培養した。50mlの培養液を50mlプラスチックチューブに移して3000×gで5分間遠心した。上清を除いた後、20mlの0.1、0.5、1、10mMのホウ酸を含むSG培地（Trisを用いてpH5.5に調整）を菌体に加えて60分間培養した。培養した酵母を遠心し、菌体を氷上で冷やした蒸留水で2回洗浄した。菌体を1mlの蒸留水に懸濁し、チューブに移して30分煮沸した。これを3000×gで20分間遠心し、上清を水溶性ホウ素画分として集めた。菌体に250μlの蒸留水を加え、上清を水溶性ホウ素画分と合わせた。菌体を80°Cで48時間乾燥させ、乾燥重量を測定した。水溶性ホウ素画分サンプルは蒸留水で2.7gに合わせ、0.3mlの50ppb Beを含む0.8NのHNO₃溶液を加えた。サンプルのホウ素濃度は Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry (ICP-MS) (SEIKO, Chiba, Japan) で測定した。実験は3つの独立した形質転換体を用いて行った。

[0034]

The concentration of boron in yeast was measured using a minimal medium (SG), which was the same as the SD medium except that glucose was replaced by galactose; yeast cultivation was effected at 30 degrees C. Following 2-day cultivation, a culture solution (5 ml) of the yeast strain 1169 was added to 200 ml of the medium and cultivation was continued for 16 hours until a logarithmic growth phase was reached. A portion (50 ml) of the cultivated culture solution was transferred into a 50-ml plastic tube and centrifuged for 5 minutes at 3000xg. After removing the supernatant, 20 ml of an SG medium (adjusted to pH 5.5 with Tris) containing 0.1, 0.5, 1 or 10 mM boric acid was added to the cell pellet, which was cultivated for 60 minutes. The cultivated yeast was centrifuged and the cell pellet was washed twice with distilled water cooled on ice. The pellet was suspended in 1 ml of distilled water, transferred into a tube, and boiled for 30 minutes. The cells were then centrifuged for 20 minutes at 3000xg and the supernatant was collected as a water-soluble boron fraction. To the cell pellet, 250 microliters of distilled water was added, and the supernatant was combined with the water-soluble boron fraction. The cells were dried at 80 degrees C for 48 hours and their dry weight was measured. The water-soluble boron fraction sample was combined with distilled water to make a total of 2.7 g, and 0.3 ml of 0.8N HNO₃ solution containing 50 ppb of Be was added. The boron concentration in the sample was measured by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) (SEIKO, Chiba, Japan). The experiment was performed using three independent transformants.