

2005年度知的財産翻訳検定問題【化学／生化学問題】

※解答作成前に必ず下記の注意事項に目を通してください。

【解答にあたっての注意事項】

1. 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(翻訳はセミコロンで終わってください)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。
2. 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。
3. 解答にはパラグラフ番号を忘れずに付記してください。
4. 解答中、℃は degree C とし、 μl 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ェ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；

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、シロイヌナズナにおけるホウ素トランスポーター及びその遺伝子に関する。

【背景技術】

【0002】

ホウ素は高等植物の微量必須元素の一つである(例えば、非特許文献1参照)。ホウ素は毒性も持っており、過剰に摂取すると植物の生育が阻害されたり、動物では急性中毒で死亡したりする。土壌溶液中でホウ素は無電荷の分子状で存在する。そのため比較的容易に溶脱し、農作物において欠乏症が発生しやすい。ホウ素欠乏症による農業上の収量、品質の低下は130品種、日本を含む世界80カ国以上で報告されている(例えば、非特許文献2参照)。また、ホウ素は他の元素と比較して至適濃度範囲が狭いことが知られており、乾燥地での土壌集積や過剰施肥による過剰症の発生も報告されている。

【0003】

最近になり植物におけるホウ素の役割が明らかにされてきた。ホウ素が細胞壁のペクチン質多糖を架橋することが明らかとなり（例えば、非特許文献3参照）、この架橋が植物の生育に必須であることが示された（例えば、非特許文献4参照）。これが植物におけるホウ素の生理機能に関する最初の分子レベルの知見である。その一方で植物体でのホウ素輸送機構には不明な点が多く残されている。ホウ素は長い間、脂質二重膜の受動拡散によって細胞内に入り、蒸散流によって植物体内を輸送されると考えられていた（例えば、非特許文献5参照）。一方、生育に適したホウ素栄養条件は種間や品種間で大きく異なることが知られていた。吸収や転流、利用効率の違いがその原因の可能性として挙げられていたものの、その要因となる分子は不明であった。近年になりチャネルを介した輸送が提唱された（例えば、非特許文献6参照）が、その根拠はアフリカツメガエルの卵母細胞での発現系や膜小胞を用いた *in vitro* の実験にすぎず、実際の植物個体でそれらチャネル分子がホウ素輸送に関与するかは示されていないかった。また、ヒマワリの根の吸収実験から輸送体による能動輸送の存在が示唆された（例えば、非特許文献7参照）ものの、それを担う輸送体の同定には至っていなかった。

【0004】

本発明者らは、生物界で初めて排出型ホウ素トランスポーターBOR1をモデル植物であるシロイヌナズナ

より単離した（例えば、特許文献1参照）。BOR1は低ホウ素栄養条件下で導管への積極的なホウ素輸送を担うと考えられている（例えば、非特許文献8参照）。また、ホウ素輸送を担うトランスポーター

としてBOR1以外には、酵母のYNL275wが知られている（例えば、非特許文献9参照）。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

ホウ素の環境中からの取込みは重要な制御段階であるが、ホウ素輸送を担うトランスポーターはシロイヌナズナのBOR1と酵母のYNL275wしか知られていなかった。植物体におけるホウ素輸送機構を分子レベルで解明し、ホウ素輸送における主要な経路や制限要因を明らかにすることは効率的な施肥方法や育種戦略への知見を与えるものであると考えられる。また、植物体でホウ素輸送に関与する遺伝子を同定することはホウ素欠乏・過剰耐性品種の作出に直接つながると考えられる。本発明の課題は、環境中からのホウ素の取込みや生体内でのホウ素の輸送をより効率良く制御することが可能となる、これまでに知られているトランスポーターとは異なる活性を持つホウ素輸送を司る新たな遺伝子を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【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。

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

上記「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」とは、例えば1～20個、好ましくは1～15個、より好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個の任意の数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を意味する。また、上記「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」とは、例えば1～20個、好ましくは1～15個、より好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個の任意の数の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を意味する。

【0015】

上記「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列」とは、DNA又はRNAなどの核酸をプローブとして使用し、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランクハイブリダイゼーション法、あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られる塩基配列を意味し、具体的には、コロニーあるいはブランク由来のDNAまたは該DNAの断片を固定化したフィルターを用いて、0.7～1.0MのNaCl存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1～2倍程度のSSC溶液（1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mM塩化ナトリウム、15mMクエン酸ナトリウム）を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNAをあげることができる。ハイブリダイゼーションは、Molecular Cloning: A laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989.以後 "モレキュラークローニング第2版"と略す)等に記載されている方法に準じて行うことができる。

【0016】

例えば、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができるDNAとしては、プローブとして使用するDNAの塩基配列と一定以上の相同性を有するDNAが挙げることができ、例えば60%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上、最も好ましくは98%以上の相同性を有するDNAを好適に例示することができる。

【0023】

本発明の組換えベクターとしては、前記本発明の遺伝子を含み、かつホウ素トランスポーターを発現することができる組換えベクターであれば特に制限されず、本発明の組換えベクターは、本発明の遺伝子を発現ベクターに適切にインテグレートすることにより構築することができる。例えば、本発明の遺伝子の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好適に例示することができる。発現ベクターとしては、宿主細胞において自立複製可能であるものや、あるいは宿主細胞の染色体中へ組込み可能であるものが好ましく、また、本発明の

遺伝子を発現できる位置にプロモーター、エンハンサー、ターミネーター等の制御配列を含有しているものを好適に使用することができる。発現ベクターとしては、酵母用発現ベクター、植物細胞用発現ベクター、細菌用発現ベクター、動物細胞用発現ベクター等を用いることができるが、酵母用発現ベクターや植物細胞用発現ベクターを用いた組換えベクターが好ましい。

【0029】

本発明のホウ素トランスポーター遺伝子のスクリーニング方法としては、各種植物、酵母等の遺伝子ライブラリーを用いて、YNL275w遺伝子が欠損し、YNL275wを発現しないYNL275w破壊酵母を形質転換し、得られた形質転換YNL275w破壊酵母をホウ素含有培地で培養し、該形質転換YNL275w破壊酵母のホウ素トランスポーター活性を測定・評価する方法であれば特に制限されるものではなく、ホウ素トランスポーター活性の測定・評価としては、酵母菌体内の水溶性ホウ素濃度の測定・評価を挙げることができる。また、YNL275wの破壊株としては、*Saccharomyces cerevisiae* 1169株 (Winzeler, E. A.; Shoemaker, D. D.; Astromoff, A.; Liang, H.; Anderson, K.; Andre, B.; Bangham, R.; Benito, R.; Boeke, J. D.; Bussey, H.; Chu, A. M.; Connelly, C.; Davis, K.; Dietrich, F.; Dow, S. W.; El Bakkoury, M.; Foury, F.; Friend, S. H.; Gentalen, E.; Giaever, G.; Hegemann, J. H.; Jones, T.; Laub, M.; Liao, H.; Liebundguth, N.; Lockhart, D. J.; Lucau-Danila, A.; Lussier, M.; M'Rabet, N.; Menard, P.; Mittmann, M.; Pai, C.; Rebischung, C.; Revuelta, J. L.; Riles, L.; Roberts, C. J.; Ross-MacDonald, P.; Scherens, B.; Snyder, M.; Sookhai-Mahadeo, S.; Storms, R. K.; Veronneau, S.; Voet, M.; Volckaert, G.; Ward, T. R.; Wysocki, R.; Yen, G. S.; Yu, K. X.; Zimmermann, K.; Philippsen, P.; Johnston, M.; Davis, R. W. (1999) Functional characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* 285: 901-906) を好適に例示することができる。

【0033】

[ホウ素トランスポーター遺伝子を発現する酵母の作製]

pYES2ベクターを用い、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At3g62270、At3g06450、At1g15460の各cDNAをつないだコンストラクトを構築した (pTF485; At3g62270, pTF484; At3g06450, pTF483; At1g15460)。また、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た (pTF524; At3g62270, pTF522; At3g06450, pTF520; At1g15460)。これらのコンストラクトをYNL275wの破壊株である1169株に導入した。コロニーは2% (w/v) グルコース, 20mg/l ヒスチジン, 30mg/l ロイシン, 20mg/l メチオニンを含む最小培地 (SD) (Sherman, F. (1991) *Getting started with yeast. Methods. Enzymol.* 194: 3-21) を用いて選択した。

【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℃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℃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。
