

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B1)

(11) 特許番号

特許第5652799号  
(P5652799)

(45) 発行日 平成27年1月14日(2015.1.14)

(24) 登録日 平成26年11月28日(2014.11.28)

(51) Int.Cl. F I  
**C 1 2 N 15/09 (2006.01)** C 1 2 N 15/00 Z N A A  
**A O 1 H 5/00 (2006.01)** A O 1 H 5/00 A

請求項の数 7 (全 22 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2014-27979 (P2014-27979)</p> <p>(22) 出願日 平成26年2月17日(2014.2.17)</p> <p>審査請求日 平成26年3月19日(2014.3.19)</p> <p>早期審査対象出願</p>	<p>(73) 特許権者 501174550                  独立行政法人国際農林水産業研究センター                  茨城県つくば市大わし1-1</p> <p>(74) 代理人 100091096                  弁理士 平木 祐輔</p> <p>(74) 代理人 100118773                  弁理士 藤田 節</p> <p>(74) 代理人 100111741                  弁理士 田中 夏夫</p> <p>(72) 発明者 許 東河                  茨城県つくば市大わし1番地1 独立行政                  法人国際農林水産業研究センター内</p> <p>(72) 発明者 トウエン ドウ ドウク                  茨城県つくば市大わし1番地1 独立行政                  法人国際農林水産業研究センター内                  最終頁に続く</p>
--	---

(54) 【発明の名称】 ダイズ第3番染色体に座上する耐塩性を制御する遺伝子qNaCl3とその利用法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の(1)および(2)の遺伝子からなる群から選択される遺伝子を塩ストレス耐性を有しない植物に導入することにより、該植物の塩ストレス耐性を向上させる方法：

(1) 以下の(a)~(f)のいずれかのDNAからなる遺伝子；

(a) 配列番号1または3に表される塩基配列からなるDNA；

(b) 配列番号1または3に表される塩基配列からなるDNAに相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>アンチポーター活性を有するタンパク質をコードするDNA；

(c) 配列番号1または3に表される塩基配列と90%以上の配列同一性を有する塩基配列からなり、かつ、Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>アンチポーター活性を有するタンパク質をコードするDNA；

(d) 配列番号1または3に表される塩基配列の縮重異性体からなるDNA；

(e) 配列番号2に表されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA；および

(f) 配列番号2に表されるアミノ酸配列に対して1または数個のアミノ酸が置換、欠失および/または付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であり、かつNa<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>アンチポーター活性を有するタンパク質をコードするDNA；ならびに

(2) 植物の塩ストレス耐性を制御するNa<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>アンチポーター活性を有するタンパク質をコードするqNaCl3遺伝子である、(1)の遺伝子。

【請求項2】

植物が双子葉植物である、請求項1記載の植物の塩ストレス耐性を向上させる方法。

10

20

## 【請求項 3】

植物がダイズである、請求項 1 記載の植物の塩ストレス耐性を向上させる方法。

## 【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法で作製された、塩ストレス耐性が向上した形質転換植物。

## 【請求項 5】

耐塩性を有するダイズを育種する方法であって、配列番号 1 または 3 に表される塩基配列を有する qNaCl3 遺伝子内またはその近傍に位置する DNA マーカーであって qNaCl3 遺伝子の存在の目印となる DNA マーカーの存在を指標に、耐塩性を有するダイズを選抜することを含む方法。

10

## 【請求項 6】

qNaCl3 遺伝子の上流 5.2kb のところに位置する SSR マーカーである SSR25.8 を配列番号 5 の塩基配列からなるプライマーおよび配列番号 6 の塩基配列からなるプライマーのプライマー対を用いて検出し、さらに、qNaCl3 遺伝子の下流 13kb のところに位置する SSR マーカーである SSR55.5 を配列番号 7 の塩基配列からなるプライマーおよび配列番号 8 の塩基配列からなるプライマーのプライマー対を用いて検出する、請求項 5 記載の方法。

## 【請求項 7】

耐塩性を有するダイズを育種する方法であって、qNaCl3 遺伝子のエキソン 3 の下流の配列番号 9 に表される塩基配列からなる約 3.8 kb の挿入断片を有しないダイズを耐塩性を有するダイズとして選抜し育種する方法。

20

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、ダイズにおいて耐塩性を制御する遺伝子およびその利用方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

ダイズは世界の重要なマメ科作物の一つであり、主要なタンパク質および油脂原料として、その利用は多岐にわたる。しかし、ダイズの生産性は、イネやトウモロコシなどイネ科作物に比べると低く、さまざまな環境ストレスの影響により不安定である。塩害は、ダイズの発芽と成長および根粒生成に影響し、収量減少が報告されている。現在、世界の灌漑耕地の約 1/3 の面積が土壌塩性化の影響を受けている。また、地球温暖化に伴い、水不足および不良灌漑により塩類集積地が拡大しつつある。日本においても、2011年3月11日発生した東日本大震災の影響によって海水の流入に起因する塩害が報告されている。対策として、耐塩性ダイズ品種の育成は有力な手段であり、栽培種内の遺伝的変異を利用したダイズ耐塩性の改良が試みられている。現在、ダイズ耐塩性に関する複数の量的遺伝子座 (QTL) が報告され、ダイズ育種に利用できるこれらの QTL に関連する DNA マーカーが特定されつつある (非特許文献 1 ~ 4 を参照)。しかし、いまだ耐塩性 QTL の原因遺伝子の同定や機能解析は十分に進んでおらず、効率的に育種に利用できる状況にはない。

30

## 【先行技術文献】

## 【非特許文献】

## 【0003】

【非特許文献 1】 Lee, G.J. et al. (2004) Theor. Appl. Genet. 109: 1610-1619.

【非特許文献 2】 Hamwih, A. and Xu, D.H. (2008) Breed. Sci. 58: 355-359.

【非特許文献 3】 Chen, H.T. et al. (2008) Aust. J. Agr. Res. 59: 1086-1091

【非特許文献 4】 Hamwih A et al. (2011) Euphytica, 179: 451-459

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0004】

本発明は、ダイズ耐塩性遺伝子 qNaCl3、および該遺伝子がコードするタンパク質を提供する。更に、本発明は、耐塩性植物の作出等の、遺伝子の利用技術を提供することも課題

40

50

とする。これらの課題が解決されることにより、ダイズ耐塩性の発現機構の解明が促進されるばかりでなく、単離した遺伝子を利用した新しい耐塩性品種育成の確立等に大きく寄与することができる。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明者らは、ダイズに由来するqNaCl3遺伝子がダイズの耐塩性の原因遺伝子であることを見出し、qNaCl3遺伝子を塩感受型のダイズ品種で過剰に強く発現させることにより、ダイズの耐塩性が向上し、既存の耐塩性ダイズ品種よりも高い耐塩品種の開発が期待できることを見出した。また、単離したqNaCl3遺伝子のDNA情報に基づいて耐塩性のDNAマーカーを開発し、耐塩性ダイズの育種のDNAマーカーとして利用することもできる。さらに、この遺伝子およびその類似遺伝子を利用することにより、ダイズのみならず他のマメ類作物や穀類作物において、耐塩性を向上した形質転換体を作成し、増収につながる品種開発が可能となる。

【0006】

すなわち、本発明は以下の通りである。

[1] 以下の(a)~(f)のいずれかのDNAからなる遺伝子；

(a) 配列番号1または3に表される塩基配列からなるDNA；

(b) 配列番号1または3に表される塩基配列からなるDNAに相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>アンチポーター活性を有するタンパク質をコードするDNA；

(c) 配列番号1または3に表される塩基配列と90%以上の配列同一性を有する塩基配列からなり、かつ、Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>アンチポーター活性を有するタンパク質をコードするDNA；

(d) 配列番号1または3に表される塩基配列の縮重異性体からなるDNA；

(e) 配列番号2に表されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA；および

(f) 配列番号2に表されるアミノ酸配列に対して1または数個のアミノ酸が置換、欠失および/または付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であり、かつNa<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>アンチポーター活性を有するタンパク質をコードするDNA。

[2] 植物の塩ストレス耐性を制御するNa<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>アンチポーター活性を有するタンパク質をコードするqNaCl3遺伝子である、[1]の遺伝子。

[3] [1]または[2]の遺伝子を含む植物形質転換用ベクター。

[4] [3]の植物形質転換用ベクターで形質転換された塩ストレス耐性が向上した形質転換植物。

[5] 双子葉植物である、[4]の形質転換植物。

[6] ダイズである、[4]の形質転換植物。

[7] [1]または[2]の遺伝子を植物に導入することにより、該植物の塩ストレス耐性を向上させる方法。

[8] 植物が双子葉植物である、[7]の植物の塩ストレス耐性を向上させる方法。

[9] 植物がダイズである、[7]の植物の塩ストレス耐性を向上させる方法。

[10] 耐塩性を有する植物を育種する方法であって、qNaCl3遺伝子内またはその近傍に位置するDNAマーカーの存在を指標に、耐塩性を有する植物を選抜することを含む方法。

[11] DNAマーカーとして、SSRマーカーであるSSR25.8および/またはSSR55.5を用いる[10]の方法。

[12] SSR25.8を配列番号5の塩基配列からなるプライマーおよび配列番号6の塩基配列からなるプライマーのプライマー対を用いて検出し、SSR55.5を配列番号7の塩基配列からなるプライマーおよび配列番号8の塩基配列からなるプライマーのプライマー対を用いて検出する、[11]の方法。

[13] qNaCl3遺伝子を検出するための以下のいずれかのSSRマーカープライマー対：

(i) 配列番号5の塩基配列からなるプライマーおよび配列番号6の塩基配列からなるプライマーのプライマー対；および

(ii) 配列番号7の塩基配列からなるプライマーおよび配列番号8の塩基配列からなるプ

10

20

30

40

50

ライマーのプライマー対。

[14] 耐塩性を有する植物を育種する方法であって、qNaCl3遺伝子のエキソン3の下流の配列番号9に表される塩基配列からなる約3.8 kbの挿入断片を有しない植物を耐塩性を有する植物として選抜し育種する方法。

[15] qNaCl3遺伝子のエキソン3の下流の約3.8 kbの挿入断片を検出するためのプライマー対。

[16] 配列番号10で表される塩基配列からなるプライマーおよび配列番号11で表される塩基配列からなるプライマーからなる、[15]のプライマー対。

【発明の効果】

【0007】

本発明のダイズ由来qNaCl3遺伝子は、植物の塩ストレス耐性（耐塩性）を制御している。qNaCl3遺伝子を塩ストレス耐性を有しないダイズ品種に導入することにより塩ストレス耐性が向上したダイズ品種を得ることができ、塩濃度の高い環境でも高収量でダイズを得ることができる。また、qNaCl3遺伝子をダイズ以外の植物に導入することにより塩ストレス耐性が向上した植物を得ることができる。さらに、qNaCl3遺伝子のDNA情報に基づいて塩ストレス耐性に関するDNAマーカーを開発し、DNAマイクロー選抜育種により塩ストレス耐性が向上したダイズを育種することができる。

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】ダイズ耐塩性の高精度QTL解析により、第3番染色体上にQTL（量的形質遺伝子座）の位置を示す物理地図（図1A）を示す図である。「\*」は、ダイズ第3番染色体上の物理位置（Mb）を示す。

【図2】RT-PCR法を用いて耐塩性系統NILs18-Tと感受性系統NILs18-Sにおける耐塩性候補遺伝子qNaCl3発現解析の結果を示す図である。

【図3A】RACE法により耐塩性系統NILs18-Tから合成したqNaCl3遺伝子の完全長cDNAの塩基配列（配列番号1）を示す図である。

【図3B】qNaCl3遺伝子によってコードされるタンパク質のアミノ酸配列（配列番号2）を示す図である。

【図4A-1】耐塩性系統NILs18-Tにおける耐塩性遺伝子qNaCl3のゲノム塩基配列（配列番号3）を示す図である（図4A-2に続く）。

【図4A-2】耐塩性系統NILs18-Tにおける耐塩性遺伝子qNaCl3のゲノム塩基配列（配列番号3）を示す図である（図4A-1の続き）。

【図4B-1】感受性系統NILs18-Sにおける耐塩性遺伝子qNaCl3のゲノム塩基配列（配列番号4）を示す図である（図4B-2に続く）。

【図4B-2】感受性系統NILs18-Sにおける耐塩性遺伝子qNaCl3のゲノム塩基配列（配列番号4）を示す図である（図4B-1の続き）。

【図4B-3】感受性系統NILs18-Sにおける耐塩性遺伝子qNaCl3のゲノム塩基配列（配列番号4）を示す図である（図4B-2の続き）。

【図5】ダイズ耐塩性系統NILs18-T（図5A）および感受性系統NILs18-S（図5B）のqNaCl3遺伝子の構造を示す図である。

【図6】世界各国に由来する126ダイズ品種・系統（野生ダイズを含む）におけるダイズ耐塩性遺伝子qNaCl3のリアルタイム定量PCR発現量と耐塩性の関係を示す図である。耐塩性評価は、100 mM NaClを含む水耕培養液で行った。耐塩指数は、1（耐塩性弱い）～5（耐塩性強い）の5級に分類してある。

【図7】Na/H+ アンチポーター欠損のイーストミュータント（B31）にqNaCl3遺伝子を導入した形質転換体（qNaCl3 1-5 strain）のNaCl含有培地における生育を示す図である。図中、Nha1はイーストのNa+ /H+ アンチポーター遺伝子を示す。

【図8】qNaCl3遺伝子導入形質転換ダイズ系統（54-1-1, 34-2-7, 20-1-4, 16-1-8）における塩ストレス処理（100 mM NaCl, 24h）後の標的遺伝子の発現解析の結果を示す図である。図8AはRT-PCRによる発現解析の結果を示し、図8BはリアルタイムPCRにより発現量

10

20

30

40

50

の解析の結果を相対的発現レベルで示す。「Kariyutaka」は野生型品種を、「GFP」はKariyutakaの35S:GFP遺伝子形質転換ダイズ系統を、「NILs18-T」と「NILs18-S」はダイズ耐塩性準同質系統の耐塩性系統と感受性系統を示す。

【図9】耐塩性遺伝子qNaCl3導入形質転換ダイズ系統(54-1-1, 34-2-7, 20-1-4, 16-1-8)における100 mM NaCl処理14日後葉身の黄色化程度を示した葉のSPAD値を示す図である。

「\*\*」は、野生型品種Kariyutakaと有意差があること( $P < 0.01$ , t-test)を示す。「Kariyutaka」は野生型を、「GFP」はKariyutakaの35S:GFP遺伝子形質転換ダイズ系統を、「NILs18-T」と「NILs18-S」はダイズ耐塩性準同質系統の耐塩性系統と感受性系統を示す。

【図10】高い耐塩性を示したT2世代の35S:qNaCl3形質転換ダイズ系統20-1-4の生育状況を示す図である。図10の右は、標的遺伝子を導入された35S:qNaCl3形質転換ダイズ系統個体の生育を示し、図10の左は、標的遺伝子を持っていない個体(ヌル)の生育を示す。

10

【図11】DNAマーカー選抜より育成した耐塩性遺伝子qNaCl3の準同質系統における塩害圃場で耐塩性系統(NILs25-T)と感受性系統(NILs25-S)の生育状況(2009)を示す図である。図11の右のダイズは耐塩性系統(NILs25-T)であり、左のダイズは感受性系統(NILs25-S)である。

【図12】DNAマーカー選抜より育成した耐塩性準同質系統における塩害圃場で耐塩性系統(NILs18-T, NILs25-T, NILs72-T)と感受性系統(NILs18-S, NILs25-S, NILs72-S)の地上部総乾物重の比較を示す図である。縦棒は標準偏差(3反復)を示す。また、「Tachiyutaka」と「C01」は、対照品種である。「\*\*」は感受性系統と有意差があること( $P < 0.01$ )を示す。

20

【発明を実施するための形態】

【0009】

以下、本発明を詳細に説明する。

1. 本発明の遺伝子

本発明は、ダイズ(*Glycine max*)の第3染色体に座する塩ストレス耐性を制御する遺伝子qNaCl3である。qNaCl3遺伝子産物は $\text{Na}^+/\text{H}^+$ アンチポーターとして機能する。 $\text{Na}^+/\text{H}^+$ アンチポーターは、生体膜を介して $\text{Na}^+$ と $\text{H}^+$ の対向輸送を行う輸送体であり、細胞内の $\text{Na}^+$ レベル、pH、細胞容量などの調節に関与し、植物においては、塩ストレス時に細胞内に流入した $\text{Na}^+$ の細胞外への排出や液胞への隔離に関与する。

30

【0010】

塩ストレスとは、植物が塩に曝されることをいい、塩ストレス耐性とは、塩に曝された状態でも生育する能力をいい、耐塩性ともいう。塩ストレス耐性がなく、塩感受性の植物は、塩に曝されることにより、葉が黄化したり、枯死する等の塩害症状を示す。

【0011】

qNaCl3遺伝子は、耐塩性ダイズ品種の第3染色体のBARCSOYSSR\_03\_1338とBARCSOYSSR\_03\_1341に挟み込まれる約58.8 kbのゲノム領域からマップベースクローニング(map-based cloning)により同定し、単離することができる。

【0012】

qNaCl3遺伝子は、耐塩性を有するダイズ系統では、5つのエクソンを有するが、耐塩性を失い塩感受性となったダイズ系統では、エクソン3の下流の部分への約3.8 kbの断片の挿入により、遺伝子の機能が失われ、qNaCl3遺伝子は、3つのエクソンからなるように変異する。

40

【0013】

qNaCl3遺伝子は、塩に曝されたときに発現が誘導されるのではなく、常に発現が維持されている。qNaCl3遺伝子の発現が大きいほど、塩ストレス耐性が大きくなる。

【0014】

qNaCl3遺伝子のcDNA塩基配列を配列番号1および図3Aに示し、qNaCl3遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列を配列番号2および図3Bに示す。

【0015】

50

さらに、配列番号3ならびに図4A-1および図4A-2にqNaCl3遺伝子のゲノム塩基配列を示す。図4A-2の配列は図4A-1の配列に続いている。

【0016】

本発明において上記配列番号1または3の塩基配列で表されるDNAは、それぞれのDNAが有する活性またはそれぞれのDNAがコードするタンパク質が有する活性、すなわち塩ストレス耐性またはNa<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>アンチポーター活性を有している限り、塩基配列に変異を有していてもよい。例えば、配列番号1または3で表される塩基配列に相補的な塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA、配列番号1または3で表される塩基配列と、BLAST (Basic Local Alignment Search Tool at the National Center for Biological Information (米国国立生物学情報センターの基本ローカルアラインメント検索ツール))等(例えば、デフォルトすなわち初期設定のパラメータを用いて)を用いて計算したときに、少なくとも85%以上、好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは97%以上の配列同一性を有しているDNA、または前記DNAによりコードされるタンパク質のアミノ酸配列に対して1または複数もしくはは数個(1~10個、好ましくは1~5個、さらに好ましくは1個もしくはは2個)のアミノ酸が置換、欠失および/または付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNAも本発明のDNAに含まれる。さらに、配列番号1または3に表される塩基配列において遺伝暗号の縮重に基づく配列(縮重配列)を含むDNAも包含する。

10

【0017】

本発明のqNaCl3遺伝子に変異を導入するには、Kunkel法や Gapped duplex法などの公知の手法またはこれに準ずる方法により、例えば部位特異的突然変異誘発法を利用した変異導入用キット(例えばMutant-K(TAKARA社製)やMutant-G(TAKARA社製)など)を用いて、あるいは、TAKARA社のLA PCR in vitro Mutagenesis シリーズキットを用いて行うことができる。

20

【0018】

本発明のサイズのqNaCl3遺伝子の配列情報に基づいて、他の種類の植物において配列同一性が高く同様の機能を有するホモログ遺伝子を探索することができる。本発明はサイズのqNaCl3遺伝子のホモログ遺伝子である他の植物種の遺伝子も包含する。例えば、サイズのqNaCl3遺伝子と塩基配列の同一性が高い他種のホモログ遺伝子は、上記の塩基に変異を有する塩基配列からなるqNaCl3遺伝子に含まれる。

30

本発明のqNaCl3遺伝子のcDNAも包含する。

また、上記遺伝子がコードするタンパク質であり、Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>アンチポーター活性を有するタンパク質も包含する。

【0019】

2. 本発明のqNaCl3遺伝子を導入した形質転換植物の作出

遺伝子工学的手法を用いて本発明のqNaCl3遺伝子DNAを植物宿主に導入することにより、塩ストレス耐性を有する形質転換植物を作出することができる。本発明のqNaCl3遺伝子の植物宿主への導入方法としては、アグロバクテリウム感染法等の間接導入法や、エレクトロポレーション法、パーティクルガン法、ポリエチレングリコール法、リポソーム法、マイクロインジェクション法などの直接導入法などが挙げられる。適切な導入方法は当業者ならば、適宜選択することができる。

40

【0020】

例えば、アグロバクテリウム感染法を用いる場合、以下のようにして本発明のqNaCl3遺伝子を導入した形質転換植物を作出することができる。

【0021】

最初に、形質転換用組換えベクターを作製し、次いでアグロバクテリウムにより形質転換を行う。

【0022】

形質転換用組換えベクターは、本発明のqNaCl3遺伝子を含むDNAを適当な制限酵素で切断後、必要に応じて適切なリンカーを連結し、植物細胞用のクローニングベクターに挿入

50

することにより得ることができる。クローニング用ベクターとしては、pBE2113Not、pBI2113Not、pBI2113、pBI101、pBI121、pGA482、pGAH、pBIG等のバイナリーベクター系のプラスミドやpLGV23Neo、pNCAT、pMON200などの中間ベクター系のプラスミドを用いることができる。

#### 【0023】

バイナリーベクター系プラスミドを用いる場合、上記のバイナリーベクターの境界配列(LB,RB)間に、qNaCl3遺伝子を挿入し、この組換えベクターを大腸菌中で増幅する。次いで、増幅した組換えベクターをアグロバクテリウム・チュメファシエンズEHA105、C58、LBA4404、EHA101、C58C1Rif<sup>R</sup>等にエレクトロポレーション法等により導入し、qNaCl3遺伝子を導入したアグロバクテリウムを植物の形質転換に用いればよい。その他、三者接合法(Nucleic Acids Research, 12: 8711(1984))によって本発明のqNaCl3遺伝子を含む形質転換に用いるアグロバクテリウムを調製することができる。すなわち、本発明のqNaCl3遺伝子を含むプラスミドを保有する大腸菌やヘルパープラスミド(例えばpRK2013)を保有する大腸菌とアグロバクテリウムを混合培養し、リファンピシリンおよびカナマイシンを含む培地上で培養することにより形質転換用の接合体アグロバクテリウムを得ることができる。

10

#### 【0024】

植物体内で外来遺伝子である本発明のqNaCl3遺伝子を発現させるためには、qNaCl3遺伝子の前後に植物用のプロモーター、エンハンサー、ターミネーター等を連結することが望ましい。本発明において利用可能なプロモーターとしては、例えばカリフラワーモザイクウイルス(CaMV)由来の35Sプロモーター、トウモロコシのユビキチンプロモーター、ノパリン合成酵素(NOS)遺伝子プロモーター、オクトピン(OCT)合成酵素遺伝子プロモーター等が挙げられる。エンハンサーとしては、ウイルス起源の翻訳エンハンサーや植物起源の翻訳エンハンサーを用いることができる。ウイルス起源の翻訳エンハンサーとしては、例えば、タバコモザイクウイルス、アルファルファモザイクウイルスRNA4、プロモモザイクウイルスRNA3、ポテトウイルスX、タバコエッチウイルス等の配列が挙げられる。また、植物起源の翻訳エンハンサーとして、ダイズの - 1, 3 グルカナーゼ(Glu)由来の配列、タバコのフェレドキシン結合性サブユニット(PsaDb)由来の配列等が挙げられる。ターミネーターとしては、例えばカリフラワーモザイクウイルス由来やノパリン合成酵素遺伝子由来のターミネーター等を用いることができる。但し、プロモーター、エンハンサー、ターミネーターは上記のものに限定されず、植物体内で機能することが知られているものであればいずれも使用することができる。これらのプロモーター、エンハンサー、ターミネーターは、発現させようとする本発明のqNaCl3遺伝子が機能し得るように連結する。

20

30

#### 【0025】

さらに、効率的に目的の形質転換植物を選択するために、選択マーカー遺伝子を用いることが好ましい。選択マーカーとしては、カナマイシン耐性遺伝子(NPTII)、抗生物質ハイグロマイシンに対する抵抗性を植物に付与するハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ(htp)遺伝子およびピアラホス(bialaphos)に対する抵抗性を付与するホスフィノスリシンアセチルトランスフェラーゼ(bar)遺伝子等が挙げられる。本発明の遺伝子および選択マーカー遺伝子は、単一のベクターと一緒に組み込んでも良いし、それぞれ別個のベクターに組み込んだ2種類の組換えDNAを用いてもよい。

40

#### 【0026】

本発明のqNaCl3遺伝子を導入する宿主植物は、植物培養細胞、栽培植物の植物体全体、植物器官(例えば葉、花弁、茎、根、根茎、種子等)、または植物組織(例えば表皮、師部、柔組織、木部、維管束等)のいずれであってもよい。

#### 【0027】

植物種は限定されず、塩ストレス耐性を有しない塩感受性のダイズ、ダイズ以外のマメ類植物や穀類植物が挙げられる。ダイズ以外のマメ類植物としては、限定されないが、アズキ、インゲンマメ、ヒヨコマメ、ラッカセイ、エンドウマメ、ソラマメ等が挙げられる。穀類植物としては、限定されないが、イネ、トウモロコシ、コムギ、オオムギ、ライム

50

ギ、エンバク、ハトムギ、カラスムギ、ソバ、ヒエ、アワ、キビ等が挙げられる。また、双子葉植物、単子葉植物のいずれも用いることができる。塩感受性のダイズにqNaCl3遺伝子を導入し過剰発現させることにより、塩感受性のダイズは塩ストレスに耐性となり、既存の耐塩性ダイズ品種よりも高い耐塩性の品種を開発することができる。また、ダイズのqNaCl3遺伝子またはダイズのqNaCl3遺伝子のホモログ遺伝子である他種植物のqNaCl3遺伝子をダイズ以外のマメ類植物や穀類植物に導入することにより、塩ストレス耐性が向上した形質転換体を得ることができる。

#### 【0028】

植物培養細胞、植物体、植物器官または植物組織を宿主とする場合、本発明の遺伝子は、採取した植物切片にベクターをアグロバクテリウム感染法、パーティクルガン法またはポリエチレングリコール法などで導入し、植物宿主を形質転換することができる。あるいはプロトプラストにエレクトロポレーション法で導入して形質転換植物を作出することもできる。

10

#### 【0029】

植物細胞にqNaCl3遺伝子を導入する場合、得られた形質転換細胞から公知の組織培養法により形質転換体を再生することができる。例えば、「植物細胞培養マニュアル」山田康之編著、講談社サイエンティフィック、1984等の文献に従って植物細胞から植物体を再生することができる。

#### 【0030】

本発明のqNaCl3遺伝子を導入した形質転換植物およびその次世代にqNaCl3遺伝子が組み込まれていることの確認は、これらの細胞および組織から常法に従ってDNAを抽出し、公知のPCR法またはサザン分析を用いて導入したqNaCl3遺伝子を検出することにより行うことができる。

20

#### 【0031】

本発明の形質転換植物体は、形質転換を行い再分化した当代である「T1世代」の他、その植物の自殖や他殖の種子から得られた後代等、T1世代を元にした、あらゆる栽培や育種の手段により得られ得る世代や個体をも包含する。

#### 【0032】

### 3. 形質転換植物の塩ストレスに対する耐性の評価

本発明のqNaCl3遺伝子を導入した形質転換植物の塩ストレスに対する耐性は、例えば、水耕培養液やパーミキュライト、パーライトなどを含む培養土を入れた容器に形質転換植物を植え、塩ストレスを負荷して生育させたときの生存や生育状況を調べることによって評価することができる。例えば、100~200 mM、好ましくは100~150 mMのNaClを含む水耕培養液で、20~35 で1時間~30日、好ましくは10~20日、さらに好ましくは14日おき、塩処理した後に生存率や生育状況を調べることにより評価することができる。この際、耐塩指数（STR）や葉緑素含量（SPAD値）を調べてもよい。耐塩指数は、目視で植物体を観察することにより行い、5級（1~5）に分類することができる。また、葉緑素含量（SPAD値）はSPAD値計測器で測定することができる。葉緑素含量は葉の黄色化程度を示す値である。また、ダイズ等のマメ類植物や穀類植物などの子実を形成する植物の場合、植物を生育し子実を形成させ、子実のでき具合により評価することができる。

30

40

#### 【0033】

本発明のqNaCl3遺伝子を導入した植物は塩ストレス耐性が向上する。

すなわち、例えば、本発明のqNaCl3遺伝子を導入した植物と塩ストレス耐性を有しない塩感受性系統を100~150 mMのNaClを含む水耕培養液で、20~35 で、2~3週間培養した場合、本発明のqNaCl3遺伝子を導入した植物は塩感受性系統に対して、生存率が高くなり、耐塩指数が向上し、葉の葉緑素含量が維持できる。さらに、本発明のqNaCl3遺伝子を導入した植物は塩感受性系統に対して、子実の形成が良くなり、圃場の単位面積当たりの収穫量が向上する。

#### 【0034】

### 4. 耐塩性植物選抜および選抜に用いるためのマーカー

50



本発明は耐塩性植物選抜のためのマーカー、および該マーカーを用いた耐塩性植物の選抜または育種方法も包含する。

【 0 0 3 5 】

これらのマーカーを、少なくともダイズを包含する植物群から選ばれる植物について行う耐塩性の検定、耐塩性に関与するNa<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>アンチポーター遺伝子 (qNaCl3遺伝子) と類似する機能を有する新規遺伝子の探索、ダイズ育種上のDNAマーカーの選抜等に用いることができる。

【 0 0 3 6 】

本発明のqNaCl3遺伝子を有し耐塩性を有している植物は、qNaCl3遺伝子を有する植物と他の植物を交雑し、qNaCl3遺伝子を有する雑種を選抜することにより育種することができる。具体的な選抜育種方法として、例えば、任意の植物系統XとqNaCl3遺伝子を有する植物系統Yを交雑させ雑種を得て、得られた雑種と植物系統Xを戻し交雑し、qNaCl3遺伝子を有する雑種を選抜し、さらに戻し交雑を行う方法が挙げられる。戻し交雑および選抜を数回、好ましくは2 ~ 10回繰り返す行うことが好ましい。このような方法により、qNaCl3遺伝子を有する準同質遺伝子系統を得ることができる。この際、qNaCl3遺伝子を有する植物系統はマーカーを利用して選抜することができる。

【 0 0 3 7 】

耐塩性植物の選抜または育種のためのマーカーは、本発明のqNaCl3遺伝子の存在位置の目印となるDNA配列からなるDNAマーカーであり、qNaCl3遺伝子内に存在するか、qNaCl3遺伝子に隣接するか、あるいは近傍に存在するDNAマーカーを用いればよい。例えば、そのようなDNAマーカーとしてマイクロサテライトマーカーを用いることができ、マイクロサテライトマーカーとしてSSR (単純反復配列) マーカー等が挙げられる。これらのマーカーの存在を指標に選抜した植物個体は、qNaCl3遺伝子を有しており、耐塩性という形質を有している。qNaCl3遺伝子の近傍に位置するDNAマーカーとして、例えば、ダイズ第3染色体上のSSRマーカーであるSatt339、Satt237、Satt255、Sat\_091およびSat\_304 (公知ダイズマーカー、Song et al. (2004) Theor. Appl. Genet., 109: 122-128を参照)等が挙げられる。これらのマーカーは例えば、マーカーに特異的なプライマー対を用いて検出することができる。

【 0 0 3 8 】

また、qNaCl3遺伝子は、BARCSOYSSR\_03\_1338とBARCSOYSSR\_03\_1341に挟み込まれる約58.8 kbのゲノム領域に存在する (図1)。従って、BARCSOYSSR\_03\_1338とBARCSOYSSR\_03\_1341は耐塩性遺伝子の選抜マーカーとしても利用できる。

【 0 0 3 9 】

また、新たに開発したSSRマーカーSSR25.8およびSSR55.5を利用することもでき、以下のSSRマーカープライマーセット (プライマー対) を用いればよい。

(1) qNaCl3遺伝子上流5.2 kbのところの開発したマイクロサテライト (単純反復配列、SSR) マーカー (SSR25.8) のプライマーセット: 5' -TTAAGCACCAGCAAATAGTTC-3' (配列番号5) 及び5' -CGACCAACTATTCATATAC-3' (配列番号6)

(2) qNaCl3遺伝子下流13 kbのところの開発したマイクロサテライト (単純反復配列、SSR) マーカー (SSR55.5) のプライマーセット: 5' -TTGGATAGTAATGTTGTCTTCG-3' (配列番号7) と5' -AAGAAAAGTGATGTGACTTGA-3' (配列番号8)。

【 0 0 4 0 】

上記プライマーセットを用いてダイズの塩耐抗と感受性より抽出したDNAに対してPCRを行うことにより増幅され、明瞭な多型が認められた。この2つまたは1つのSSRマーカーを検出することにより、マーカー耐塩性遺伝子qNaCl3遺伝子の有無を識別することができる。

【 0 0 4 1 】

DNAマーカー選抜による耐塩性ダイズ系統の育種は、例えば、Hamwies et al. (2011) Euphytica, 179: 451-459の記載に従って行うことができる。

【 0 0 4 2 】

10

20

30

40

50

さらに、塩感受性系統では、qNaCl3遺伝子はエキソン3の下流に約3.8 kbの挿入断片があり、遺伝子の機能が失われている(図5)。約3.8 kbの挿入断片の塩基配列を配列番号9に示す。従って、該挿入断片の有無を指標に、ダイズ系統が耐塩性を有しているかを検定することができ、該挿入断片を有していないことを指標にしてqNaCl3遺伝子を有している耐塩性ダイズを選抜育種することが可能である。挿入断片の有無は、挿入断片の一部断片であるオリゴヌクレオチドまたはその相補的配列、或いはストリンジェント条件下でこれらの配列にハイブリダイズし得る配列からなるオリゴヌクレオチドを用いて検出することができる。ここで、ストリンジェントな条件は上記のとおりである。

【0043】

該オリゴヌクレオチドは、プローブまたはプライマーであり、配列番号9の約3.8 kbの挿入配列の配列情報に基づいて設計することができる。具体的には、上記挿入断片の両側の塩基配列に基づいてプライマーを設計し、PCR産物の長さにより、3.8 kbの挿入断片の有無を検出することができる。

【0044】

プローブは、qNaCl3遺伝子の挿入断片の塩基配列又は該塩基配列に相補的な塩基配列、あるいはストリンジェントな条件下でこれらの配列にハイブリダイズし得る配列からなるヌクレオチド断片(好ましくは、DNA断片)からなり、塩基の数は5~50、好ましくは10~30、さらに好ましくは10~25である。該プローブを用いて被験体である植物から得た核酸試料とハイブリダイゼーションを行わせることにより挿入断片の有無を検出することができる。

【0045】

プライマーは、qNaCl3遺伝子の挿入断片の存在を検定することのできるプライマーであり、たとえば、qNaCl3遺伝子の一部を含む配列を有する領域を増幅することのできる配列である。プライマーは、フォワードプライマーとリバースプライマーのプライマー対である。プライマーは、qNaCl3遺伝子の挿入断片の塩基配列又は該塩基配列に相補的な塩基配列或いはストリンジェントな条件下でこれらの配列にハイブリダイズし得る配列からなるヌクレオチド断片(好ましくは、DNA断片)からなり、塩基の数は5~50、好ましくは10~30、さらに好ましくは15~25である。プライマーを用いてPCRにより挿入断片の有無を検出することができる。

【0046】

このようなプライマーとして、例えば、5'-CTCGCAAGTGTCTCACGAA-3'(配列番号10)と5'-TTAGCTCCACCAACCCTTTG-3'(配列番号11)のプライマーセットが挙げられる。

【0047】

本発明は、qNaCl3遺伝子の挿入断片を検出するために用いるプローブ及びプライマー(好ましくは、少なくとも一対のプライマーセット)を包含する。また、プローブを固定化したDNAチップをも包含する。さらに、プローブ、DNAチップ、プライマー等を含むqNaCl3遺伝子の挿入断片を検出するためのキットも包含する。

【実施例】

【0048】

本発明を以下の実施例によって具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

【0049】

実施例1 マップベースクローニング(map-based cloning)によるダイズの第3番染色体に座上する塩ストレス耐性を制御する遺伝子qNaCl3の同定

図1は、ダイズ耐塩性の高精度量的遺伝子座(QTL)解析により、第3番染色体上にQTLの位置を示す物理地図である。ダイズ耐塩性のQTLは図1の58.8 kbのQTL領域に存在し、この58.8 kbの領域からダイズの耐塩性に関与する候補遺伝子をマップベースクローニングにより選定した。

【0050】

これまでダイズ品種FT-Abayara(耐塩性)とC01(感受性)を交配して得られたF7分離

10

20

30

40

50

集団 ( $n = 97$ ) に対して量的形質遺伝子座 (QTL) 解析が行われ、耐塩性QTLがダイズ第3染色体にSSRマーカーSatt255とSat\_091の近傍に座することを明らかにした (Hamwieh et al. (2011) *Euphytica*, 179: 451-459)。次いで、大規模分離集団を用いて、マップベースクローニングにより耐塩性QTL領域の詳細な連鎖解析を行った。具体的には、第3染色体に耐塩性QTLを座する領域にSSRマーカーSatt255とSat\_091がヘテロを示したF<sub>8</sub>世代の個体を自殖し、1,053個体の分離集団からSSRマーカーSatt255とSat\_091間の染色体組換え個体を選抜した。その結果、Satt255とSat\_091の間に生じた14個体の組換え個体を得た。これらの組換え個体をもう一回自殖して14組換え固定系統を獲得した。次いで、Satt255とSat\_091間の新たな15個のSSRマーカーを利用して得た14組換え固定系統を整列化し、各系統の耐塩性の評価結果により耐塩性QTLはBARCSOYSSR\_03\_1338とBARCSOYSSR\_03\_1341に挟み込まれる約58.8 kbのゲノム領域に存在することが明らかとなった (図1)。この候補ゲノム領域の塩基配列に対して遺伝子予測ならびに類似性検索を行ったところ、この領域に7つの推測遺伝子が存在することが分かった (*Nature* (2010) 463: 178-183)。特に推測遺伝子Glyma03g32890とGlyma03g32900は、Sodium/hydrogen exchanger familyに類似した構造を持つ領域が見出され、耐塩性QTLの原因遺伝子と考えられる。続いて、遺伝子発現の解析を行い、その結果、Glyma03g32900はダイズ耐塩性系統と感受性系統間に明確な差を示し、この遺伝子はダイズ耐塩性の候補遺伝子として選定し、qNaCl3と命名した。

10

## 【0051】

## 実施例2 qNaCl3遺伝子の解析

20

ダイズ耐塩性系統NILs18-Tおよび感受性系統NILs18-Sについて、トータルRNAを抽出し、RT-PCRにより、耐塩性候補遺伝子qNaCl3遺伝子の発現解析を行った。

## 【0052】

ダイズ耐塩性系統NILs18-Tおよび感受性系統NILs18-Sは我々がDNAマーカー選抜により育成したものである (Hamwieh et al. (2011) *Euphytica*, 179: 451-459)。NILs18-TとNILs18-Sは、昼温 $25 \pm 2$ 、夜温 $20 \pm 2$ 、日長14時間に水耕法 (1/2濃度Hoagland and Arnon栄養液、pH=6.0-6.5) で栽培した。塩処理は、ダイズの第一本葉展開期 (V1期) から100 mM NaClで塩処理を行った。トータルRNA抽出は、100 mM NaClで1日間と3日間塩処理を行ったダイズ、およびと対照 (0 mM NaCl) のダイズを利用し、Trizol (Invitrogen社) を用いてダイズの根の部分から抽出した。

30

## 【0053】

RT-PCR (Reverse Transcription-PCR) は、PrimeScript™ RT-PCR Kit (TAKARA BIO INC) を用いて行った。用いたprimerは、5' -CCACCAACATGTCACGACTC-3' (配列番号12) と5' -ACCCACGATTGACTAGCAC-3' (配列番号13) であった。ハウスキーピング遺伝子であるアクチン遺伝子はコントロールとし、用いたprimerは、5' -GAGCTATGAATTGCCTGATGG-3' (配列番号14) と5' -CGTTTCATGAATTCCAGTAGC-3' (配列番号15) であった。PCR Program (PTC-100™ programmable Thermal controller MJ-Research Inc) は、95 /30秒、56 /30秒、72 /30秒で25サイクル反応させた後、72 /7分間の伸長反応で行った。反応終了後、1.5%アガロースゲル電気泳動によって増幅断片を確認した。

## 【0054】

40

図2に結果を示す。図2の上のパネルは、qNaCl3遺伝子の発現を示し、下のパネルはハウスキーピング遺伝子であるアクチン遺伝子の発現を示す。図2に示すように、塩に対する耐性系統において、感受性系統に比較してqNaCl3遺伝子は高い発現傾向を示した。また、耐性系統におけるqNaCl3遺伝子の発現量は、100 mM NaCl塩処理と対照 (100 mM NaCl) 間に明確な差が認められない、耐性系統のqNaCl3遺伝子は塩ストレスの誘導性遺伝子ではなく、常に高い発現を維持することが示唆された。

## 【0055】

耐塩性系統であるNILs18-T系統からRACE (rapid amplification of cDNA ends) 法によりqNaCl3遺伝子を単離同定し、cDNAの塩基配列およびqNaCl3遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列を決定した。3' Full RACE は3'-Full RACE Core Set (TAKARA BIO INC)

50

を用い、5' Full RACE-PCRは5'-Full RACE Core Set (TAKARA BIO INC)を用いて行った。cDNA配列を図3 Aおよび図3 Bならびに配列番号1および2に示す。塩基配列は2670bpの長さであり(配列番号1)、アミノ酸配列は811アミノ酸の長さであった(配列番号2)。

【0056】

また、塩耐抗性系統NILs18-Tおよび感受性系統におけるqNaCl3遺伝子領域のゲノム塩基配列を決定した。図4 A及び図4 Bに示しているのは、それぞれの塩基配列である(配列番号3と配列番号4)。なお、図4 A - 1と図4 A - 2および図4 B - 1~図4 B - 3の配列は、それぞれ一続きの連続した配列であり、図4 A - 2の配列は図4 A - 1の配列の続きであり、図4 B - 3の配列は図4 B - 2の、図4 B - 2の配列は図4 B - 1の配列の続きである。

10

【0057】

上述の塩基配列情報に基づいて、qNaCl3遺伝子の構造を解析した。図5に耐塩性系統NILs18-Tおよび感受性系統におけるqNaCl3遺伝子の構造図を示す。図5に示すように、耐塩性系統NILs18-TにおけるqNaCl3遺伝子は5つのエキソンを有するに対し、感受性系統NILs18-Sには3つのエキソンを保有している。その原因は、感受性系統NILs18-Sにはエキソン3の下流の部分の約3.8 kbの挿入によってPolyadenylation現象が起き、遺伝子の機能が失うことが明らかになった。

【0058】

実施例3 126ダイズ品種・系統におけるダイズ耐塩性遺伝子qNaCl3遺伝子の発現解析

20

世界各国に由来する、野生品種を含む126のダイズ品種・系統を入手した。126のダイズ品種・系統はアメリカUSDA National Plant Germplasm System (<http://www.ars-grin.gov/npgs/>)、日本の農業生物資源ジーンバンク ([http://www.gene.affrc.go.jp/index\\_j.php](http://www.gene.affrc.go.jp/index_j.php))、およびナショナルバイオリソースプロジェクト (<http://www.legumebase.brc.miyazaki-u.ac.jp/>) から入手した。

これらの126品種・系統のダイズについて耐塩性評価およびqNaCl3の発現量測定を行った。

【0059】

供試した126のダイズ品種・系統は、昼温 $25 \pm 2$ 、夜温 $20 \pm 2$ 、日長14時間に水耕法(1/2濃度Hoagland and Arnon栄養液、pH=6.0-6.5)で栽培した。塩処理は、ダイズの第一本葉展開期(V1期)から100 mM NaClで塩処理を行った。トータルRNA抽出は、100 mM NaClで1日間塩処理を行ったダイズを利用し、Trizol (Invitrogen社)を用いてダイズの根の部分から抽出し、ダイズ耐性遺伝子qNaCl3遺伝子のリアルタイム定量PCRを行い、発現量を測定した。塩処理約3週間後、各系統の耐塩指数と葉緑素含量(SPAD値)を調査した。耐塩指数(STR)目視で5級(1-5)に分類した。耐塩指数1は最も耐塩性弱いであり、耐塩指数5は最も耐塩性強いである。葉緑素含量はSPAD値として表す計測器SPAD-502 (Konica Minolta社)で測定した。

30

【0060】

耐塩性評価の結果、供試した126ダイズ品種・系統の耐塩性は大きな変異を示した。図6に、126品種・系統におけるqNaCl3のリアルタイム定量PCRで測定した発現量と、耐塩指数(STR)の関係を示した。qNaCl3のリアルタイム定量PCR発現量はqNaCl3遺伝子とアクチン遺伝子の発現量の比で表してある。

40

【0061】

図6に示すように、ダイズのqNaCl3の発現量が大きいほど、耐塩指数が高く、qNaCl3遺伝子の発現量がダイズの耐塩性を左右することが明らかになった。

【0062】

実施例4 qNaCl3遺伝子を導入したイースト形質転換体の作出および評価

Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> アンチポーター遺伝子を欠損しているイーストミュータント(B31)にqNaCl3遺伝子を導入し、形質転換体(qNaCl3 1-5 strain)を作出した。

【0063】

50

該形質転換体を、0~1,000 mM NaCl、10 mM KClを含むpH3.5の培地で培養した。また、該形質転換体を500 mM NaCl、10 mM KClを含むpH3.5~6.5の培地で培養した。また、コントロールとしてqNaCl3を含まないベクターを用いて形質転換したイーストミュータントを用いた。さらに、イーストのNa<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>アンチポーター遺伝子であるNha1遺伝子で形質転換した形質転換体についても培養を行った。

【0064】

図7に結果を示す。図7Aは、NaCl濃度による生育の違いを示し、図7BはpHによる生育の違いを示す。qNaCl3の1~5は5系統の形質転換体のそれぞれの結果を示す。Vectorは、ベクターで形質転換したコントロールの結果を示し、Nha1は、イーストのNa<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>アンチポーター遺伝子であるNha1遺伝子で形質転換した形質転換体の結果を示す。図7には、各培養の結果をシャーレ上の生育状況により示してある。図中、白く見える部分が生育したイーストのコロニーの集まりを示し、白い部分が大きいほど良好に生育したことを示す。

10

【0065】

図7に示すように、qNaCl3遺伝子形質転換体は、培地のNaCl濃度が750 mMでも生育が可能となった。生育は培地のpHが低い時はコントロール (Vector) との差が明らかであったが、中性に近づくと差が認められなくなった。この結果は、qNaCl3遺伝子はNa<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>アンチポーターとして機能することを示す。

【0066】

実施例4において、形質転換体は、<http://genetic.eng.yamaguchi-u.ac.jp/KoboHome/KoboKobo.html>およびKitagawa, T., Hoshida, H. and Akada, R. : *Infect. Immun.*, 75(3), 1393 (2007). に記載の方法に順じて行った。

20

【0067】

具体的には、以下の工程で行った。

1. One-Step Bufferを作る。

60% PEG 667 100 μL

4M LiAc 50 μL

1M DTT 100 μL

D.W. 183 μL

2. 1.5 mLマイクロチューブに50 μLずつOne-Step Bufferを分注。

30

3. YPDプレート培地にo/nで培養したイーストB31系統を20 μL程度掻き取りマイクロチューブのbufferに加えてよく混ぜた後遠心で上清を取り除き、50 μL One-Step Buffer, 5 μL carrier RNA, 5 μL plasmid DNA (pYES2, qNaCl3-pYES2, Nha1-pYES2等)をそれぞれ加えてよく混ぜる。

4. 42 °Cで1.5 hr培養。

5. 100 μLのD.W.を加えて混ぜ、SDプレート培地 (-URAの選択培地) にplating。

6. 30 °C、2-3日培養で形質転換コロニーが出現。

【0068】

また、形質転換体の培養は以下の方法で行った。

SD(-URA)液体培地でo/n培養した形質転換イーストを希釈してOD 600 が1.0になるように希釈し、2.5 μLずつそれぞれの塩濃度、或いはpH条件のSD(-URA)プレート培地に滴下し、30 °Cで培養し、1週間後に写真撮影を行った。

40

【0069】

実施例5 qNaCl3遺伝子導入形質転換ダイズの塩ストレス処理

1. qNaCl3遺伝子発現への影響

qNaCl3遺伝子導入形質転換ダイズT2世代4系統(54-1-1, 34-2-7, 20-1-4, 16-1-8)を作出した。

【0070】

qNaCl3遺伝子導入形質転換ダイズT2世代系統は、以下の方法により作出した。

国内ダイズ品種「カリユタカ」を形質転換体材料として用いた。本品種はダイズ品種の

50

中でも特に培養品種に優れる(Plant Biotechnology 24:533-536)ことから、供試材料に用いた。また、形質転換の方法については既存(Plant Biotechnology 27: 217-220)の方法を用いて行った。まず、種子を1週間程度保湿した密閉容器の中で調湿(吸水含量を上昇させる)した。この種子を一晩浸漬し、吸水させた。その後、種皮を取り除き、メスで裁断し、外植片を準備した。特に、不定芽が誘導できる胚軸の基部においてはメスを用いて小さな傷をつけアグロバクテリウムの感染を促した。遺伝子発現ベクターとして耐塩性遺伝子qNaCl3を35Sプロモーター(カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター)に連結し、さらに選抜マーカーとしてbar(グレフォシネート耐性)遺伝子を含む発現プラスミドベクターを構築した。このベクターをアグロバクテリウムEHA105株に導入した。qNaCl3遺伝子を恒常的に過剰発現させられるようにしたバイナリーベクターを保有するアグロバクテリウムEHA105株を外植片に感染させた。5日間の共存培養後、アグロバクテリウムを洗淨し、グルフォシネートを6 mg/L含むシュート誘導培地で2週間x2回培養した。その後、同濃度のグルフォシネートを含むシュート伸長培地に2週間x4回培養し、その間に十分に伸長したシュートを発根培地へ移植した。発根後、培養土に移植し、約3カ月養成したのちに種子を収穫した。これらの種子を播種し、1,000倍に希釈した除草剤「バスタ」を幼植物体の葉に塗布し、導入遺伝子を保有する個体を選抜した。選抜された個体およびその後代を様々な分析対象の材料として用いた。

#### 【0071】

得られたqNaCl3遺伝子導入形質転換ダイズ系統(54-1-1, 34-2-7, 20-1-4, 16-1-8)を塩ストレス処理(100 mM NaCl, 24h)し、その後ダイズの根よりトータルRNAを抽出し、RT-PCRによりqNaCl3遺伝子の発現解析を行い、さらにリアルタイムPCRによりqNaCl3遺伝子の発現量を解析した。この際、野生型品種であるKariyutaka、Kariyutakaの35S:GFP遺伝子で形質転換したダイズ系統、ならびにダイズ耐塩性準同質系統の耐性系統であるNILs18-Tおよび感受性系統であるNILs18-Sについてもコントロールとして解析を行った。

#### 【0072】

図8に結果を示す。図8中、「Kariyutaka」は野生型品種を、「GFP」はKariyutakaの35S:GFP遺伝子形質転換ダイズ系統を、「NILs18-T」と「NILs18-S」はダイズ耐塩性準同質系統の耐性系統と感受性系統を示す。図8AはRT-PCRによる発現解析の結果を示し、図8BはリアルタイムPCRにより発現量の解析の結果を相対的発現レベルで示す。図8Aに示すように、qNaCl3遺伝子導入形質転換ダイズ系統および耐性系統であるNILs18-T系統において、qNaCl3遺伝子の発現が認められた。また、図8Bに示すように、リアルタイムPCRの解析の結果、形質転換20-1-4系統の平均発現量は、耐性系統NILs18-Tの4.72倍であった。

#### 【0073】

この結果は、目的遺伝子を過剰に発現させるよう構築されている本ベクターを用いることにより、自然変異として存在する遺伝資源をそのまま利用するよりも目的遺伝子を意図的により強く発現させることができることを意味する。加えて、遺伝子の発現をより強くすることで、塩ストレスへの耐性をより強くすることが期待できる。

#### 【0074】

### 2. 形質転換ダイズ系統の耐塩性への影響

形質転換ダイズ系統について、実施例3と同様の方法で、耐塩性を評価し、さらにSPADを測定した。

#### 【0075】

図9に、耐塩遺伝子qNaCl3導入形質転換ダイズ系統(54-1-1, 34-2-7, 20-1-4, 16-1-8)における100 mM NaCl処理14日後葉身の黄色化程度を示した葉のSPAD値を示す。図中、\*は、野生型品種Kariyutakaと有意差があることを示す( $P < 0.01$ , t-test)。また、「Kariyutaka」は野生型品種を、「GFP」はKariyutakaの35S(カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター):GFP遺伝子形質転換ダイズ系統を、「NILs18-T」と「NILs18-S」はダイズ耐塩性準同質系統の耐性系統と感受性系統を示す。

#### 【0076】

図10に14日後の生育状態を示す。図10の右は、標的遺伝子を導入されたq35S:qNa

10

20

30

40

50

Cl3形質転換ダイズ系統個体の生育を示し、図10の左は、標的遺伝子を持っていない個体(ヌル)の生育を示す。図10に示すように、標的遺伝子を導入されたq35S:qNaCl3形質転換ダイズ系統個体で良好な生育が認められた。

【0077】

実施例6 耐塩性遺伝子qNaCl3の準同質系統における塩害圃場での栽培

これまで本発明者らが育成したダイズ耐塩性遺伝子準同質遺伝子系統(Near isogenic lines, NILs)については、NaClを含む培養液の水耕法で苗期の耐塩性評価を行い、耐性遺伝子効果を確認した(Hamwieh et al. (2011) Euphytica, 179: 451-459)。しかしながら、これら系統については他の生育期間(開花期、登熟期)における耐塩性は明らかでなく、また実際の塩ストレス圃場条件下での収量への影響についても明らかになっていない。本研究では、塩ストレス圃場において2009-10年の2年間でダイズの耐塩性準同質遺伝子系統3セット(NILs18, NILs25, NILs72)を栽培し、耐塩性遺伝子の効果を調査した。

10

【0078】

ダイズ耐塩性準同質遺伝子系統3セットのそれぞれの耐塩性系統と感受性系統計6系統(NIL18-S, NIL18-T, NIL25-S, NIL25-T, NIL72-S, NIL72-T)および塩感受性対照品種(Tachiyutaka)を評価した。圃場試験区設計は、乱塊法3反復で行った。栽培密度は株間0.2m、畦間0.8mであった。2009年は6月1日に播種した。塩処理は、7月7日に塩水灌水により塩ストレスを行った。灌漑塩水の濃度は、海水濃度の約1/4(120mM NaCl)であった。2010年は6月4日に播種し、塩処理は7月27日に行った。収穫後、各系統10につき地上部乾物および粒重などの形質を調査した。

20

【0079】

塩水処理により、すべての塩感受性系統は葉の黄化および枯死などのひどい塩害症状を示した。評価した3セットの耐塩性準同質遺伝子系統において耐塩性の対立遺伝子を有する系統(NIL18-T, NIL25-T, NIL72-T)の地上部乾物重と子実重は、いずれも耐塩性の対立遺伝子を持ってない系統(NIL18-S, NIL25-S, NIL72-S)よりも高い値を示した。耐塩性系統の子実重は2年間平均して感受性系統の子実重の4.2倍であり、耐塩性遺伝子の効果を塩害圃場において確認できた。

【0080】

図11に、DNAマーカー選抜より育成した耐塩性遺伝子qNaCl3の準同質系統を、塩害圃場で耐性系統(NILs25-T)と感受性系統(NIL25-S)の生育状況を示す。

30

【0081】

図12に、DNAマーカー選抜より育成した耐塩性準同質系統における塩害圃場で耐塩性系統(NILs18-T, NILs25-T, NILs72-T)と感受系統(NILs18-S, NILs25-S, NILs72-S)の子実重の比較の結果を示す。結果は異なる年に行った2回の試験の結果を示す(それぞれ、図12Aおよび図12B)。縦棒は標準偏差(3反復)を示し、\*\*は、感受性系統と有意差があること( $P < 0.01$ )。TachiyutakaとC01は、対照品種である。

【0082】

実施例7 マーカーを利用した耐塩性ダイズ系統の作出

1. SSRマーカーの利用

40

qNaCl3遺伝子を検出するため、以下のSSRマーカーのプライマーセットを作製した。

(1) qNaCl3遺伝子の上流5.2 kbのところを開発したマイクロサテライト(単純反復配列、SSR)マーカー(SSR25.8)のプライマーセット: 5'-TTAAGCACCAGCAAATAGTTC-3'(配列番号5)及び5'-CGACCAACTATTCATATAC-3'(配列番号6)

(2) qNaCl3遺伝子の下流13 kbのところを開発したマイクロサテライト(単純反復配列、SSR)マーカー(SSR55.5)のプライマーセット: 5'-TTGGATAGTAATGTTGTCTTCG-3'(配列番号7)と5'-AAGAAAAGTGATGTGACTTGA-3'(配列番号8)。

【0083】

この2つのSSRマーカーを用いてダイズの塩耐抗と感受性より抽出したDNAに対してPCRを行うことにより増幅され、明瞭な多型が認められた。上記プライマーセットを用いてこ

50

これらの2つのSSRマーカーの1つまたは2つを検出することにより、マーカー耐塩性遺伝子qNaCl3遺伝子の有無を識別することができた。

【0084】

## 2. 約3.8 kbの挿入断片を検出するマーカーの利用

本発明で獲得した耐塩性および感受性系統のqNaCl3遺伝子の塩基配列より、塩感受性系統では、qNaCl3遺伝子はエキソン3の下流に約3.8 kbの挿入断片があり、遺伝子の機能が失われている(図5)。この変異の有無を検出するため、プライマーセット5'-CTCGCAAGT GTTCTCACGAA-3' (配列番号10)と5'-TTAGCTCCACCAACCCTTTG-3' (配列番号11)を設計し、3.8 kbの挿入断片の有無の検出を行った。このプライマーを用いて、3セットの耐塩性準同質系統および親品種FT-Abayara (耐塩性品種)とC01 (感受性品種)において 10  
検証したところ、すべての耐塩性系統はこの約3.8 kbの挿入断片を有していなかった。これに対して、すべての感受性系統はこの挿入断片を有していることが示された。よって、今回単離したqNaCl3遺伝子の塩基配列情報を利用してダイズ耐塩性の選抜マーカーの作成ができた。プライマーセット5'-CTCGCAAGTGTCTCACGAA-3' (配列番号10)と5'-TTAGCTCCACCAACCCTTTG-3' (配列番号11)は、qNaCl3遺伝子の有無を識別するためのマーカーの一例であり、マーカーを利用することにより強い耐塩性ダイズ系統を作出することができる。

【配列表フリーテキスト】

【0085】

配列番号5~8、10~15 プライマー

20

【要約】

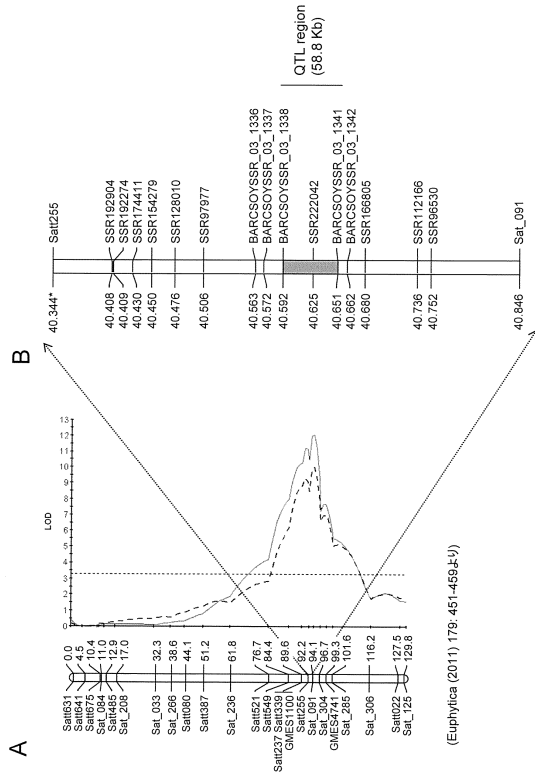
【課題】ダイズ耐塩性遺伝子qNaCl3、該遺伝子のcDNAおよび該遺伝子がコードするタンパク質の提供。

【解決手段】植物の塩ストレス耐性を制御するNa<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> アンチポーター活性を有するタンパク質をコードするqNaCl3遺伝子。

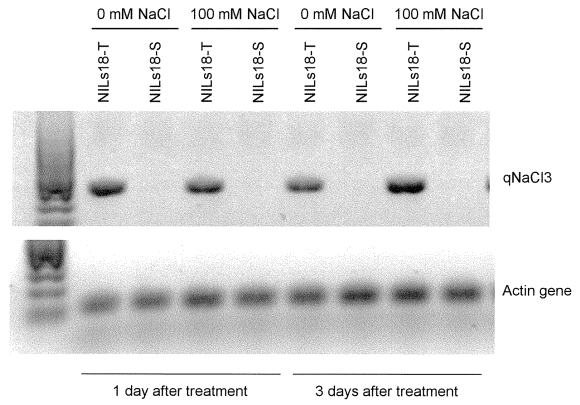
【選択図】なし



【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 A 】

Full length cDNA of the salt tolerance gene designated as *qNaCl3* (2,670 bp)  
 TTTTGTGTTAAATTCCTAAGTAAACACAGCAACAGCACTGAGTCTTTGGCCATGACGTTCAACGGGAGCAC  
 CATCAACAGCGCTCGGAAGGAGCTGGCAGGGGATAATCCCTGAACCAAGCTCTTCTTTGTGATGCTCAA  
 ACCATCTCGTAGTCTCGTAGGCGCACACTCGCTTCTCCCTCAAACCTTTGTCGAACCTAAAGTTGCGCCGA  
 GATATGTTGGAAATTTGTTGGGCTCTGCTATTTGGGCGCAACAGAAATTCATGCAATAGTTCGCCAGCA  
 TGAGCACTACATGCTGGAACTAGTGGCAAGCTTGGGCTTATTTCTATCTTCTGCTGGGCTAGAGCTCG  
 ACTTTGCGCAGATTCGCGGAGCGGCAAGCAAGCTTCAACATCGCGGTGGCGGAAATCCCTCCCTCACTG  
 CGCGTGGAGTAACTTCTTCCAGAGGCACTCGCTGAAACCAACAAACATAGGTAAGTTCAGCACTTC  
 GTGTTCTAGGGGATCTCTGCTCATCACGGCTTCCCTGTGCTCGGCGCATCTTAGCGGAGCTCAAAGCTGAC  
 CACAGCTGTGGGAAACCGCCATGCGGCTGACGCTTCAACGAGCTCGCGTGGGTTTGTGTCCTTGGCTTGGC  
 GTGGCTTGGCTGGCCAGGCAACAAAGAGCTTGTGACATCAATATGGGTGCTTCTTCAAGGATGGCGTTG  
 TTGAGCCATGATGATCTGCTGCGGTTGAGTGAAGCCGTTGCTGCAAGTGTCTCACGAACAGAGCTGTT  
 ACCGAAATCTACATATGTTAACTCTAGCGGAGTAAATGATATCGGGTAAAGTACAGACATGATAGGTTACAT  
 TCAATTTTGGGGGATTTGTTTGGGCTAACGATACCGAAAGTGGGAAATTTGCAAAATAGATGACGAGGAGG  
 ATTGAGGACTCTGCTGCAAGTGTGCTTCCCTGTGCTTGTGCTGCAAGTGGTGTGAAACTGACGTGACTAAGTT  
 ACGAAGCGTGGTGGATTTGGGCTTCTTTGCTGTTACGCTCCACCGAGCGTGGGAAAGATTTTGGAAAGCTT  
 GCGGTGGCGATGATGCTGATGCTGCGGTTGAGAGATCTTCAAGCTTGGAGTGTAAATGAACCAAAAGGGTTG  
 GTGGAGCTAATGCTTCAATATTTGGCAGAGAAAGGCTTAAACAGAGAGTGTAACTAGTAGTACTCA  
 TGCTCTCTTCAACCTTCAATCAACTCAATGCTTGGCCATATACAAACCTCTGATAGTAACTCCGGT  
 TGGCAAAACCGTGGCGCTAACAGATTTGCAAGAAAGCTTCCGATCTTGGCTGATCCATGAGACCTGAGCAAC  
 ATACCTCACTAATCACTGCTGATCAATTTGGGCAACCAATGCTCAAGCTCAAACTCACTGATGCAAC  
 TTACCGAATCACTGATGCTTCTCCATCTTGTGATGTTCAACGAGCTGCAAGAAAGTGTTCCTCTCATCAAC  
 CGAATGAAGAGTGGCAATGCTGAGCAAAATGCCAGAGATCCAGGCTTATGCTGAGTGGGTAAGTACT  
 GTGATCAATTAACATCTATCTCTTATTTGCAACATGACAGAGACATGCAAGCTTGCAGAAAAGAAAGGTG  
 TGGCAATGATATATGCTTCCAAAAGTGGGGAGGAGATGAAGAGTGAAGAGTGAAGAGTGAAGAGTGAAGAG  
 GGTTTGAGGAAAGTCAATCAAGGCTTCAAAATGACGCTGCTGTGCGAGTGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG  
 CCAGAGGTACGAACAAGCTGAGCAAGTGTGCTGCAAGAAAAGAGTGTGATATTTTCAATGCTGAGGAT  
 CAGATGATCGCAAGGTTTGGAGTAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGA  
 CACTTCATACAGAAGTTGGGAGAGGACCAAAATAATCACTCAACATCAACCACTCACTGGGAAAG  
 AAAAGGAGTTGGATGAGGAGCAATAACGAGTTCAAGGTTAAATGGCAGGAGACTGTGGAGTACATTGAAAG  
 AACGCAACCAACATACAGAGGAGTGTATCAATTTGGAAAGCTAAGGATCAGCACTAGTAAATTTGGGAA  
 GCACAACCTGAGCAACCTGTTGCAACAATAGATTTTCTGACGGGAAAGAGCTGGGACCACTGGGAA  
 TCTCTTGTCTTGGGTAACGCAATACCACTTATGCTGCTATACAGGACCGATATTTATAAATTTCAAAG  
 AAAGTAACTGTTAAGCATCAAGGGCCAGAGTGTGATTAAGATGCTATCGAAGACTTAAACCATCA  
 ATGTAAGTATGATGATCAATATGATAAATAATCACTCGGTATAAATGAGCATCTGGGTGACGA  
 TGACAACCTCCCAATCTCAGTGTGATTTTGAACCTCGTAACTCTATATAATACTCTGTTGGACA  
 AAAAAAAAAAAAAAAAAA (配列番号: 1)

【 図 3 B 】

Deduced amino acid sequence of the salt tolerant gene *qNaCl3* (811 aa)

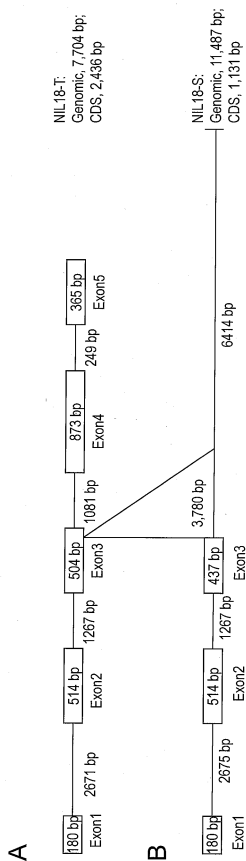
MTFNASTTTASEGAWQDNLNHALPLLIVQTLVVFVSRFLAFLKPK  
 FRQPKVVAEIIIGLPSAIGRNKFMHIVFPWSTMTLESVAFGLL  
 FYLFLVLELDFRTRRSRQAFNIAVAGITLPCAVGVFTLQRAIRSE  
 NHNIGYVQHFVFLVSLTAFVPLARILAEKLLTTRVGETAMAAAAAF  
 NDVAAWVLLALAVLAGQGHKSSLSIWWLFSGMAFVAAMMILVR  
 PVMNRVARKCSHEQDVLPEIYCLTAGVMSGLVTDIMGLHSIFGGF  
 VFGLTIPKGGEFANRMTTRIEDFVSTLFLPLFAASGLKTDVTKLRSVVD  
 WGLLLVSTASVGLKTFVAVMMCMVPVRESLTLGLVLMNTKGLVE  
 LIVLNIQREKVLNDEMFTLVLMAFLTFTTTPIVLAIYKPSRIVNSGQS  
 KPSRLDLDQEKLRILACHGPNIPSLINFVESIRATNMSRLKLVVMQLT  
 ELTDSSSSILMVQRSRKNRPFINRMSKSPMHEQIATFAQYVEGK  
 VTVVHLSISLLSTMHEDICHVAEKKGVAMILPFHKRWGGDEEVT  
 DLGQGLREVNRVQLQNAACSVAVLNRVRRYRVEQPEPVSVAARKR  
 VCFIFGPHDRKVLGLSRMAEHPAIRLLVRFSTSYEVGDEGPKYNSP  
 TSTTNNWEKEKELDEEAVNEFKVKWQETVEYIEKNATNITEVLSIGKA  
 KDHDLVIVGKQLETTMLNIDFRHGNELGPIGLFVSSNGITSSLL  
 VIQDRYFINSNESNLKTSRAESTVIKDAIEEL (配列番号: 2)



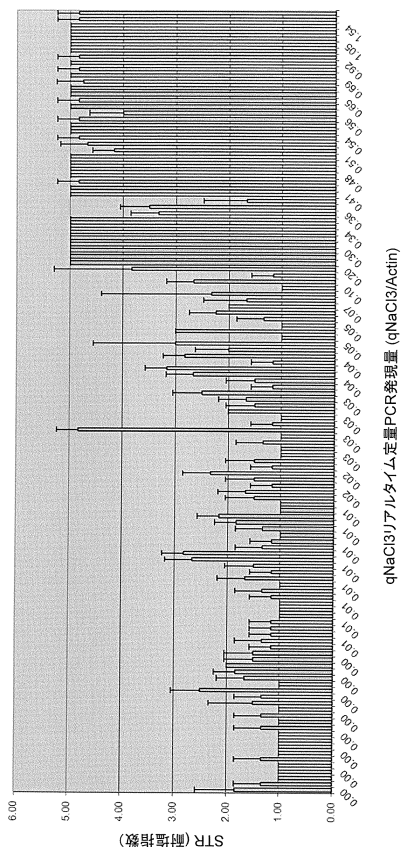
【 図 4 B - 3 】

TTGTGTCACATGATCATTTGACCAAGTAAAGATAACTTTTTAAGCGAAGTAAAGTACTGAGATGCTTTTGTATT  
 TTTTTTTCACCAAACTAATTTCAAAGCATTTTCTTAAACAAAAATACAATGACAAAGAAAATTTTTTCAACAA  
 TCTCATACTAATTTAAAAATTCAGGAAATAAAATATAATAAAAAACATTTTAAATGGAACATAATGCATTCATTTTC  
 ATCCATTAATTTTTCATGCTTACTAGAAAGGAACATCAATCATATGACGACATACATTTTGTATAAACAGAGTCTATT  
 GTAGAAAAGACTATGCAAGGAAAGTGTAAACGCTTTTCTCTCTAAACATTTTCTCTTAAGACTTTGGAAAAA  
 AAAATAAATGAAGAAAAATAATATGAAGAAGTGCACCTCTTGAATTAATAACAATAAGCAGTGAAGAAATTAAT  
 TAATTTGACACACATAAATAATGCATTAATACACAAATGAGCACAAGGAAAAATTAATTAAGGGAAGAAATTAATAG  
 CCTGGTTGAGAGCGTAAACGCTATCTTAGAGAGAAACGCCCCACTGCAAGGTTAAAAATTCGATTTGCGCTCT  
 CTCCCAAGATACGACAACCGTGGTTCGATCGTGTGCGGAAAGGATCCCGAACCTATGACACCAATGCTCTTG  
 CTCTCACAATAATTAAGTTTTGTATAGGAAAAAGAGATAAATTTGGCAGAAAGAACAGAGCTCTCAGTCTATA  
 TCTTAGAAAAAAGAGGAAAGAGATATATATATAGGCATTTTCCAAACAATAATGACCGTTAGAAAATGACCGT  
 TGAACAAACCACTACAGTTGTCACAATAATAACAACTAGTTGACTCATTAAAACAAAATCTTAAGAGAACTCAA  
 AATAAATATTTTATAAAATAGAATTAATATATATATAAATTTAAATTAACACAAAATATTACCAACACATGG  
 TGGCGGTGAGAGATCTTACGCTTGGAGTTAATGAACACCAAGGGTGGTGGAGTAATGTTCTCAATATTTGGC  
 AGAGAGAGAAAGTGAATTTGCTTTACATTTGCTATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT  
 ACGATATCATCATCTAGTCAATGGTAACTTTATACATTAATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT  
 AACATAAATTAACTTTTTAACTTTAACTAATGTCACACTAGTATCTTTTGTGTCACACTAGAGGTGTCACCTA  
 TTTTCATAGACTTTATGAGATAGTACATACACACCAAAATTAACTTTTTCTTTAAAAAATAATAAAGAAATG  
 GCATTTGCATGAATGATGGGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT  
 AAGTGAATTTGCTCTTCAAGATCATCTAGATAAAGATATATTTTTCATATTTAAAGTGAATAAA  
 ACGAAGAAAGTAAACCACTTATCTTATTTAAATTTGAAAGGCTATAATTTAAAGAAAAAATTTAAATACACAA  
 CTTTATATAAAAAACTACATCCACACTTATCAATGTTGGGATAGCTCATCGGTCACAAATTTTCTCATTTCTCA  
 GTAATAAATAACGAAACGCAACGTAATCTTGGAGTAATTTTGCATCAACAGGTTATGAGATACTTTAAGAAAT  
 GATAATGTACAACACCTCTTGTATCAACATTAATCAACGCTTATATAGTGTATTGGACACACTTACTCAAAACA  
 CTTTTTTTTCTTATTTACATCACTACATATGACTTTTTTATTTCAATTTTCTATCCCATCATATTTATAAT  
 ACCTATATTTTTCTCTTTTTTTGTTTCCCTCTGGCTTGAATAGCTTGGTCCACCTTCCCTCTTATATCCAA  
 AATTTAGAATTTCCCAAAATCATTTACAGCTCAGTATTAAGAAATGAGTGAATTTATGTTTAAAGTTTCCACC  
 TTGTTGTTTTTGGGATATATTTGATTAACATAATGTTGGCTAAGCAGGTCTTAACGACGAGATGTTACCATCC  
 TAGTACTATGGCTCTTCCACCCTCATTAACAATCCATAGTCTTGGCCATATACAAACCTCTGATAGTAAAC  
 TCCGTTGCAAAAACCGTGGGCTAACAGATTTGCAAGGAAAGCTTCCGATTTGCGTGCATCCATGGACTGGCA  
 CATACCTCACTAATCAACTCGTGAATCAATTTGGGGCACCACATGACAGACTCAAACTACCTGATGCAACTT  
 CCGAATCACTGATAGCTCTTCCATCTTGTGTTCAACGAGTTCAGCAGTTCGAAAGATGTTTCCCTCATCAACCGA  
 AAGAGTGGCAATGATGAGCAATTTGCCACGACTCCAGCTTATGTTGAATGGTAAAGTACTGTGATCATTT  
 AACATCTATCTCTTATTGTCACAAATGCAAGGACATATGCCAGTTCGAGAAAGAAAGGTGGCAATGATATAT  
 TGCCCTCCCAAAAAGTGGGAGGGAAGTGAAGAGTTCAGCAAGACTAGGCGAGGTTTGGGAAAGTCAATCAA  
 AGGCTGCTTCAAAATGCAAGTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT  
 GACAAGTGTGCTGCAAGGAAAGTGTGCTATTTTCTGTTGACACATGATCGCAAGTGTGGAGTTAGGTA  
 GCAGAAATGGCAGACTCCAGCAATTAGTTGCTTTTAGTGAATTCATCTACACAGAAAGTGGGACGAGGACCC  
 AAATAAATCAACCAATCAACCACTGGGAAAGAAAGGACTTACCTTATGAGAAACAAGTTTCTTATA  
 TCTTTTATCAAAATTTCCAGTCAACCAAAATAAATACGAGTCTTTTTTATTAATCTGGATAACACATTTAACTA  
 TTAATTAATTAAGAAAAAAGGCTGCAAACTCTGTTGTTAATGTTGACGCAATAATAGAACACTTAAGA  
 ATGGAATCTTATCAAGGCGCAGCCTTCTCACAATTTAATCTCATGACAGGAGTGGATGAGGAGCAGTAAACGA  
 GTTCAAGTAAATGGCAGACTGTTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT  
 GGAAGCTAAGGATCAGACTAGTAAATGTTGGGGAAGCAACCTTGAACAACCTTGTGACAACATAGATTTTCT  
 CAGCGAATGAAGACTGGACCTTGGAGATCTTTGCTCTTCCGTAACGCAATACGAGTTCATGCTGCTGAT  
 ACAGACCGATTTGATAAATCAACGAAAGTAACTCGTGAAGCATCAAGGCGGAGACTGCTGATTAAGAGT  
 CTATCGAAGACTTTAA (配列番号: 4)

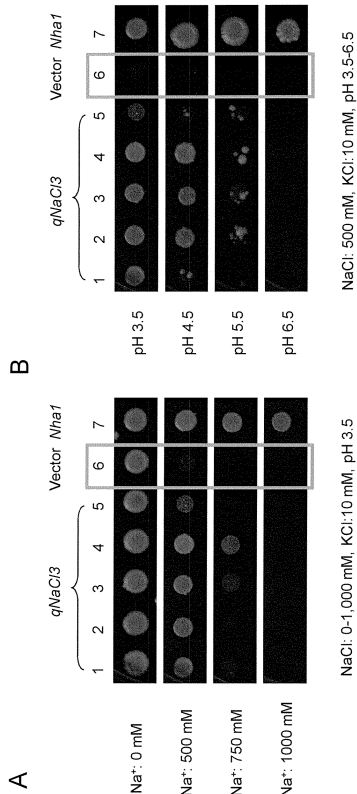
【 図 5 】



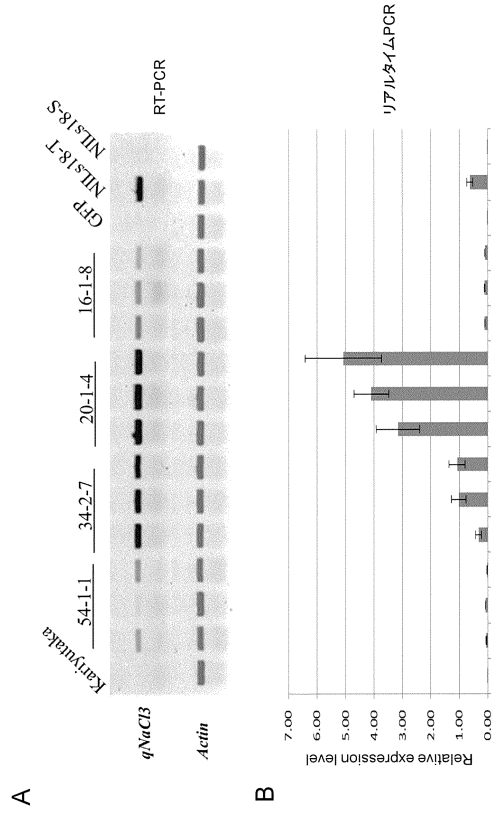
【 図 6 】



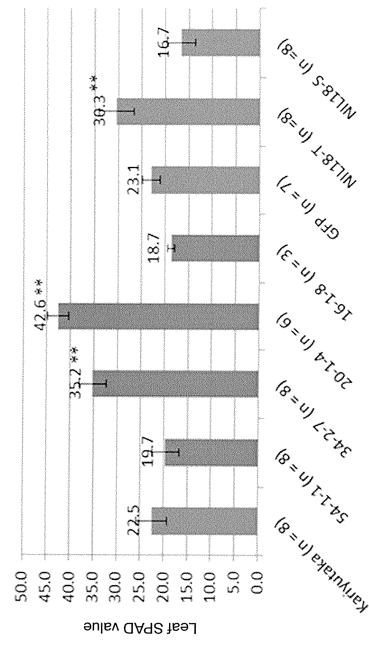
【 図 7 】



【 8 】



【 9 】



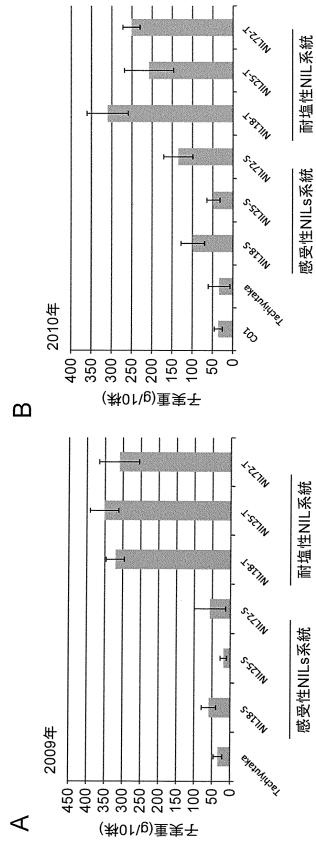
【 10 】



【 11 】



【 図 1 2 】



【 配列表 】

[0005652799000001.app](#)

---

フロントページの続き

- (72)発明者 チェン ホアタウ  
茨城県つくば市大わし1番地1 独立行政法人国際農林水産業研究センター内
- (72)発明者 庄野 真理子  
茨城県つくば市大わし1番地1 独立行政法人国際農林水産業研究センター内
- (72)発明者 山田 哲也  
北海道札幌市北区北9条西9丁目 国立大学法人北海道大学内
- (72)発明者 佐藤 雅志  
宮城県仙台市青葉区片平2丁目1-1 国立大学法人東北大学内

審査官 名和 大輔

- (56)参考文献 Database Uniprot [online], Entry name: I1JPC9\_SOYBN, Accession number: I1JPC9, Integrated into: June 13 2012, retrieved on April 23 2014, retrieved from the Internet:<URL: <http://www.uniprot.org/uniprot/I1JPC9>>  
Nature,2010,463(7278),p.178-83

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90  
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq  
UniProt/GeneSeq  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)