

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5733609号
(P5733609)

(45) 発行日 平成27年6月10日(2015.6.10)

(24) 登録日 平成27年4月24日(2015.4.24)

(51) Int.Cl. F 1
C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 Z N A A

請求項の数 3 (全 18 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2010-547540 (P2010-547540)</p> <p>(86) (22) 出願日 平成22年1月22日 (2010.1.22)</p> <p>(86) 国際出願番号 PCT/JP2010/050843</p> <p>(87) 国際公開番号 W02010/084969</p> <p>(87) 国際公開日 平成22年7月29日 (2010.7.29)</p> <p>審査請求日 平成25年1月18日 (2013.1.18)</p> <p>(31) 優先権主張番号 特願2009-13577 (P2009-13577)</p> <p>(32) 優先日 平成21年1月23日 (2009.1.23)</p> <p>(33) 優先権主張国 日本国(JP)</p> <p>前置審査</p>	<p>(73) 特許権者 504174180 国立大学法人高知大学 高知県高知市曙町二丁目5番1号</p> <p>(73) 特許権者 501168814 国立研究開発法人水産総合研究センター 神奈川県横浜市西区みなとみらい二丁目3番3号</p> <p>(74) 代理人 100075409 弁理士 植木 久一</p> <p>(74) 代理人 100129757 弁理士 植木 久彦</p> <p>(74) 代理人 100115082 弁理士 菅河 忠志</p> <p>(74) 代理人 100125243 弁理士 伊藤 浩彰</p>
---	--

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 藻類を形質転換するために用いられる新規プロモーター

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記(1)~(3)の何れかの構造を有することを特徴とするプロモーター。

(1) 配列番号1または配列番号5の塩基配列を有するポリヌクレオチド

(2) 上記ポリヌクレオチド(1)の1以上、10以下のヌクレオチドが欠失、置換または付加されたポリヌクレオチドであり、且つ任意のタンパク質をコードする遺伝子の発現を藻類細胞内で活性化するポリヌクレオチド

(3) 上記ポリヌクレオチド(1)とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、上記ポリヌクレオチド(1)との相同性が90%以上であり、且つ任意のタンパク質をコードする遺伝子の発現を藻類細胞内で活性化するポリヌクレオチド

【請求項 2】

請求項1に記載のプロモーター、および任意のタンパク質をコードする遺伝子を含有することを特徴とするベクター。

【請求項 3】

請求項2に記載のベクターを調製する工程；および

上記ベクターを藻類細胞へ導入する工程；

を含むことを特徴とする藻類の形質転換方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、藻類を形質転換するために用いられる新規のプロモーター、当該プロモーターを含むベクター、および当該ベクターを用いる藻類の形質転換方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

恒久的かつ安定的なエネルギー源である太陽光を利用することは、エネルギー対策を考える上で非常に重要である。植物類による光合成は、太陽光エネルギーを最も効率的に化学エネルギーへ変換できる優れたシステムであり、環境中の二酸化炭素や過剰栄養塩を吸収同化する上に、酸素も放出する。よって植物を利用する技術の開発は、エネルギー問題を解決し得るものとして期待されているところである。

10

【0003】

植物類の中でも藻類は、多量に存在する海水および淡水中に生息することからその量は莫大なものであり、また、著しい光合成能を有する。さらに、藻類の中には不飽和脂肪酸や抗腫瘍化合物などの有用化合物を生産するものがある。また、珪藻類の中には有用な無機物を生産するものがあるので、珪藻類によるバイオミネラルゼーションという技術が注目されている。このように、藻類は有用資源として重要な生物といえる。

【0004】

一般的に、生物を産業で利用する場合には、有用な遺伝子を導入する形質転換技術が用いられる。この形質転換技術は、遺伝子の機能を解明すべく、特定遺伝子をノックアウトしたりその働きを抑制したりするためにも用いられる。

20

【0005】

これまでも、珪藻や緑藻を中心として藻類の形質転換が行われている。しかし、かかる方法は内在性のプロモーターを分離し、それに遺伝子を結合させて藻類に導入するものであった。それでは、内在性プロモーターの分離に多大な労力と時間がかかるために、決して効率的なものではなかった。また、藻類、とりわけ海産藻類の形質転換効率自体が極めて低いという問題もある。

【0006】

一方、藻類以外の植物や動物の形質転換では、内在性のプロモーターではなく、ウィルス由来のプロモーターが汎用されている。例えば、アブラナ科植物に感染するカリフラワーモザイクウィルス(CaMV)より分離されたCaMV 35Sプロモーターが、アブラナ科植物に限定されず幅広い植物の形質転換に利用されている。また、動物細胞の形質転換には、サイトメガロウィルス(CMV)より分離されたCMVプロモーターや、シアンウィルス40(SV40)より分離されたSV40プロモーターが広く利用されている。

30

【0007】

それに対して、藻類の形質転換においては、外来性のウィルスプロモーターが用いられた例はほとんど知られていない。

【0008】

例えば非特許文献1には、CaMV 35Sプロモーターを用いて珪藻*Cyclotella cryptica*を形質転換した実験例が記載されているが、形質転換体は得られなかったとされている。

40

【0009】

一方、非特許文献2には、CMVプロモーター、CaMV 35Sプロモーターおよびラウス肉腫ウィルス(RSV)プロモーターを用いて珪藻*Phaeodactylum tricorutum*へGUS遺伝子を導入したところ、いずれの場合もGUS(-グルクロニダーゼ)が発現したことが記載されている。

【0010】

さらに非特許文献3には、CaMV 35Sプロモーターを用いて渦鞭毛藻*Amphidinium*と*Symbiodinium*へGUS遺伝子を導入したところ、GUSが発現したことが記載されている。しかし他文献(非特許文献4)によれば、懸命の努力にもかかわらず、他のグループ

50

が渦鞭毛藻類の形質転換に成功したとの報告はされていないとのことである。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献1】 Dunahay, T.G.ら, Journal of Phycology (ジャーナル・オブ・ファイコロジー), vol.31, pp.1004-1012 (1995)

【非特許文献2】 Sakaue, Kら, Physiologia plantarum (フィジオロギア・プランタラム), vol.133, pp.59-67 (2008)

【非特許文献3】 Lohuis, M.R.ら, The Plant Journal (ザ・プラント・ジャーナル), vol.13, pp.427-435 (1998)

【非特許文献4】 Walker, T.L.ら, Journal of Phycology (ジャーナル・オブ・フィコロジー), vol.41, pp.1077-1093 (2005)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

上述したように、その数は極めて少ないものの、カリフラワーモザイクウイルスに由来するCaMV35Sプロモーターなどのウイルスプロモーターを用いて藻類を形質転換した報告例はある。

【0013】

しかし、形質転換体を得られなかったり再現性がないという報告もある。また、本発明者らの知見によれば、他の植物類の形質転換に汎用されているCaMV35Sプロモーターは、藻類に対する適用範囲が極めて狭い。藻類の存在量は莫大であり、また、様々な有用性を秘めた種があることから、形質転換に用いるプロモーターとしては幅広い種の藻類に適用可能であるものが望ましい。さらに、一般的に、藻類、とりわけ海産藻類の形質転換効率は非常に低いことから、高効率な形質転換技術の開発が切望されている。

【0014】

そこで本発明が解決すべき課題は、幅広い種の藻類に適用可能である上に、効率の高い形質転換技術を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0015】

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を行った。その結果、Chaetoceros debilis DNAウイルス(CdebDNAV)の複製タンパク質をコードすると考えられる遺伝子上流に位置するプロモーターが、目(モク)を超える複数の藻類を効率的に形質転換できることを見出して、本発明を完成した。

【0016】

本発明に係る新規プロモーターは、下記(1)~(3)の何れかの塩基配列を有することを特徴とする。

【0017】

(1) CdebDNAウイルスの複製に關与するタンパク質をコードする遺伝子上流に位置する非コード領域を構成するポリヌクレオチド

(2) 上記ポリヌクレオチド(1)の1または複数のヌクレオチドが欠失、置換または付加されたポリヌクレオチドであり、且つ任意のタンパク質をコードする遺伝子の発現を藻類細胞内で活性化するポリヌクレオチド

(3) 上記ポリヌクレオチド(1)とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、且つ任意のタンパク質をコードする遺伝子の発現を藻類細胞内で活性化するポリヌクレオチド

【0018】

本発明に係るベクターは、上記新規プロモーター、および任意のタンパク質をコードする遺伝子を含有することを特徴とする。

また、本発明に係る藻類の形質転換方法は、上記ベクターを調製する工程；および、上

10

20

30

40

50

記ベクターを藻類細胞へ導入する工程；を含むことを特徴とする。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】本発明に係るプロモーターを含むプラスミドベクターの構造の一例を示す図である。

【図2】本発明に係るプロモーターを含むプラスミドベクターの構造の一例を示す図である。

【図3】本発明方法により形質転換された藻類細胞等に含まれる導入遺伝子の有無の確認実験の結果を示す電気泳動写真である。

【図4】本発明方法により形質転換された藻類細胞等に含まれる導入遺伝子の有無の確認実験の結果を示す電気泳動写真である。

【図5】本発明に係るプロモーターのCore elementを特定するための実験結果を示すグラフである。当該結果より、CdebDNAウィルスの複製に関与するタンパク質をコードする遺伝子上流領域における-72から-33の間の配列中に、Core elementが含まれていることが分かる。

【図6】本発明に係るプロモーターを含むプラスミドベクターの構造の一例を示す図である。

【図7】海産藻類である*C. fusiformis*の形質転換実験の結果を示す写真である。(1)は本発明プロモーターを用いた場合の結果を示し、(2)は本発明プロモーターを用いない場合の結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0020】

本発明に係る第一のプロモーターは、(1)CdebDNAウィルスの複製に関与するタンパク質をコードする遺伝子上流に位置する非コード領域を構成するポリヌクレオチド、を有する。

【0021】

CdebDNAウィルスは、珪藻*Chaetoceros debilis*に感染するウィルスである。これまで藻類、とりわけ海産藻類に対して感染性を示すウィルスの報告例は少なかったが、近年、本発明者らは、ラフィド藻、渦鞭毛藻、珪藻などの藻類から様々なウィルスの分離に成功している。本発明に係るCdebDNAウィルスは、本発明者らにより分離された海産藻類感染性ウィルスの一つである。

【0022】

複製に関与するタンパク質をコードする遺伝子は、CdebDNAウィルスの複製に関与するものであり且つ活発に発現するものであれば特に制限されないものとする。

【0023】

本発明において、コード領域とはmRNAを経てタンパク質に翻訳される部分をいうものをいい、非コード領域とはコード領域以外の部分をいう。即ち、非コード領域は、ATGなどの開始コドンの上流に位置する部分をいい、mRNAに転写されない部分の他、mRNAに転写はされるがタンパク質には翻訳されない部分を含むものとする。

【0024】

一般的に、プロモーターは、転写の鍵を握るCore elementと、転写を促進または抑制するRegulatory elementを有し、遺伝子を導入する際には、特にCore elementを利用することが重要である。Core elementとしては、TATAボックス、イニシエーターエレメント(Inr)、ダウンストリートエレメントなどが知られており、Regulatory elementとしてはCAATボックスやGATAボックスなどが知られている。本発明者らがCdebDNAウィルスの複製に関与するタンパク質をコードする遺伝子上流域の塩基配列を調べたところ、CAATボックスIである5'-CAAT-3'、GATAボックスである5'-WGATAR-3'(式中、WはAまたはTを示し、RはAまたはGを示す)、およびイニシエーターエレメント(Inr)である5'-YYA₊₁N(A/T)YY-3'(式中、Y

10

20

30

40

50

はCまたはTを示す)が見られた一方で、真核生物などのプロモーターに見られるTATAボックスは見られなかった。よって、上記遺伝子の上流配列中に見付かったInrが、羽状目珪藻と中心目珪藻の両方でCore elementとして働き、形質転換が可能になると考えられたが、その一方で、上記Inrと酷似した配列のInrを含む羽状目珪藻内在性プロモーター(Cf fcpA-1A)を用いると、中心目珪藻を形質転換することができない。結論として、本発明に係るポリヌクレオチド(1)で高い形質転換能を発揮できるのは、少なくともTATAボックスやイニシエーターエレメントなどのためではなく、全く未知の配列がCore elementとして働いている可能性が高いといえる。

【0025】

上記ポリヌクレオチド(1)としては、配列番号1および配列番号5の塩基配列を有するものを挙げるができる。なお、配列番号5の塩基配列は、CdebDNAウィルスの複製に關与するタンパク質をコードする遺伝子の上流配列中のInrの約30塩基上流からの約40塩基に相当し、当該配列中には、InrはもとよりCAATボックスやGATAボックスも認められない。

【0026】

本発明に係る第二のプロモーターは、(2)上記ポリヌクレオチド(1)の1または複数のヌクレオチドが欠失、置換または付加されたポリヌクレオチドであり、且つ任意のタンパク質をコードする遺伝子の発現を藻類細胞内で活性化するポリヌクレオチド、である。

【0027】

上記ポリヌクレオチド(2)において、欠失、置換または付加されるヌクレオチドの数としては、1以上、200以下が好ましく、1以上、100以下がより好ましく、1以上、70以下がさらに好ましく、1以上、30以下がさらに好ましく、1以上、20以下がさらに好ましく、1以上、10以下がさらに好ましく、1以上、5以下が特に好ましい。

【0028】

本発明に係る第三のプロモーターは、(3)上記ポリヌクレオチド(1)とストリンジエントな条件でハイブリダイズし、且つ任意のタンパク質をコードする遺伝子の発現を藻類細胞内で活性化するポリヌクレオチド、である。

【0029】

上記ポリヌクレオチド(3)において、ストリンジエントな条件とは、0.1% SDSを含む2×SSC中、65℃でハイブリダイズさせた後、0.1×SSC-0.1% SDSで2回洗浄することをいう。

【0030】

また、上記ポリヌクレオチド(2)および(3)において、任意のタンパク質をコードする遺伝子の発現を藻類細胞内で活性化するポリヌクレオチドとは、藻類細胞内に導入されることによって、その下流に結合された任意のタンパク質をコードする遺伝子を発現させることができるものをいう。

【0031】

上記ポリヌクレオチド(2)および(3)において、上記ポリヌクレオチド(1)との相同性としては、50%以上が好ましく、70%以上がより好ましく、80%以上がさらに好ましく、90%以上がさらに好ましく、95%以上がさらに好ましく、98%以上がさらに好ましく、99%以上が特に好ましい。

【0032】

上記ポリヌクレオチド(1)~(3)は、CdebDNAウィルスまたはその変異体の複製に關与するタンパク質をコードする遺伝子の上流から分離することができる。但し、化学的に合成してもよい。これらポリヌクレオチド(1)~(3)は、鋳型からPCRにより増幅して用いることができる。

【0033】

本発明に係るベクターは、上記プロモーターと、任意のタンパク質をコードする遺伝子

10

20

30

40

50

を含有する。

【0034】

ベクターの種類は、藻類細胞へ導入され得るものであれば特に制限されず、プラスミドベクター、ウィルスベクターの何れも用いることができる。但し、藻類、とりわけ海産藻類に感染するウィルスの研究は十分に進んでいるとはいいいないので、好適にはプラスミドベクターを用いる。

【0035】

ここで「任意のタンパク質」は特に限定されるものではなく、生産の望まれる有用なタンパク質であればよい。

【0036】

本発明に係るベクターには、一般的なベクターに含まれるその他の配列を含んでいてもよい。かかる配列としては、例えば、本発明ベクターが導入された藻類を特定するための選択マーカー遺伝子や、藻類細胞で働くターミネーターを挙げることができる。

【0037】

本発明ベクターの調製方法としては、常法を用いることができる。例えば、上記各配列とドナーベクターとを制限酵素で切断した後にアニーリングし、DNAリガーゼにより結合させればよい。或いは、クローナーゼ反応を利用した簡便な公知方法により、各配列をベクターにクローニングすることも可能である。

【0038】

本発明に係る藻類の形質転換方法は、上記ベクターを調製する工程；および、上記ベクターを藻類細胞へ導入する工程；を含むことを特徴とする。

【0039】

本発明ベクターの調整方法は、上述したとおり、当業者公知の方法を用いることができる。

【0040】

本発明ベクターの藻類細胞への導入方法としては、パーティクルガン法、ガラスビーズ攪拌法、マイクロインジェクション法、アグロバクテリウム法、酢酸リチウム法、リン酸カルシウム法、プロトプラスト法などの公知方法を用いることができる。但し、海産藻類の場合、塩濃度の高い培地で増殖せしめる必要があるため、エレクトロポレーション法は適切でない。

【0041】

本発明ベクターにより形質転換された藻類細胞は、導入されている選択マーカー遺伝子に応じた選択培地で培養することにより特定することができる。

【実施例】

【0042】

以下、実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、本発明はもとより下記実施例によって制限を受けるものではなく、前・後記の趣旨に適合し得る範囲で適当に変更を加えて実施することも勿論可能であり、それらはいずれも本発明の技術的範囲に包含される。

【0043】

実施例1 本発明に係るC d e b DNA ウィルスプロモーターの分離

(1) 海産藻類に感染するウィルスのゲノムDNAの抽出

Tomaru, Y.ら, Aquatic Microbial Ecology, vol.50, pp.103-112 (2008)に記載の方法に従って、中心目珪藻Chaetoceros debilisを宿主とするChaetoceros debilis DNA ウィルス(C d e b DNA V) C d e b DNA V 18株からゲノムを抽出した。

【0044】

具体的には、まず、ウィルス液(10 mL)を0.22 μmフィルター(MILLIPORE社製, Millex-GS, 孔径: 0.22 μm)で濾過することにより、藻細胞の破片などを除いた。得られた濾液に40%ポリエチレングリコール6000溶液(Wako社製)を最終濃度が10 w/v%となるように加え、4 にて一晚静置した。当該液を遠心分

10

20

30

40

50

離用チューブ (Nalgen社製, UltraBottle Assemblies) に移し、超遠心分離機 (B E C K M A N社製, Ultracentrifuge L8-70M) を用いて $57,000 \times g$ 、4 で 1.5 時間遠心分離した後、その上清を除いた。得られた沈殿にリン酸緩衝液 (10 mMリン酸二水素ナトリウム, 10 mMリン酸水素ナトリウム, pH 7.2, 5 mL) を加え混合することによりウイルス粒子を洗浄した。再度、 $217,000 \times g$ 、4 で 4 時間遠心分離し、同様に上清を除いた後、得られた沈殿を滅菌した精製水 (Millipore社製, milliQ (登録商標), 300 μ L) に溶解した。当該溶液を 1.5 mL 容エッペンドルフチューブに移し、プロテイナーゼ K と 10% サルコシルを、それぞれ最終濃度が 1 mg/mL および 1 w/v% となるように加え、55 にて 1.5 時間インキュベートした。その後、常法を用いてフェノール/クロロホルム処理とクロロホルム処理を行い、得られた上清に、その 10 分 1 量の 3 M 酢酸ナトリウム (pH 4.8) を加え、さらにその 2.5 倍量のエタノールを加えた。当該溶液を -80 にて 1 時間静置した。その後、微量高速遠心機 (KUBOTA社製, KUBOTA3740) を用いて 14,000 rpm、4 で 10 分間遠心分離を行い、得られた沈殿を 70% エタノールで洗浄した後、乾燥させた。これを滅菌 milliQ 水 (20 μ L) に溶解して DNA 溶液を得た。さらに、上記文献 (Tomaru, Y.ら (2008)) に記載の Cetyl trimethyl ammonium bromide 法 (CTAB 法) を用いて精製した。まず、上記 DNA 溶液に TE バッファー (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0)) を加え、その全量を 200 μ L にした。当該 DNA 溶液に CTAB 溶液 (1.6 M NaCl, 0.1 M EDTA, 2 w/v% CTAB, 200 μ L) を加え、65 にて 1 時間インキュベートした。当該溶液にクロロホルム (400 μ L) を加え、5 分間振とう攪拌した後、前述した微量高速遠心機を用いて 14,000 rpm、4 で 10 分間遠心分離した。当該溶液に 2 倍量のエタノールを加え、-80 にて 1 時間静置した。その後、同微量高速遠心機を用いて 14,000 rpm、4 で 10 分間遠心分離し、得られた沈殿を 70% エタノールにより洗浄した後、乾燥させた。当該沈殿を滅菌 milliQ 水 (300 μ L) に溶解し、DNA 溶液とした。

【0045】

(2) Cdeb DNA ウィルスプロモーターの分離

上記 (1) で得た Cdeb DNA ウィルスのゲノム DNA の配列情報を、Blast (DDBJ) を用いてデータベースと比較し、さらに ORF finder (NCBI) を用いて、Cdeb DNA ウィルス DNA に含まれる ORF を検索し、ウィルスの複製に関係すると考えられるタンパク質をコードする領域を検出した。この配列中の翻訳開始点と思われる ATG 配列の上流 +107 から -370 の領域を、CdP1L/attB1 プライマー (配列番号 2) および CdP1-2R/attB4 プライマー (配列番号 3) を用いた PCR 反応により増幅させた。なお、配列番号 2 における 5~31 の塩基配列および配列番号 3 における 5~29 の塩基配列は、後述するプラスミドの構築のための BP クロナーゼ反応に必要な attB 配列を示す。また、得られた Cdeb DNA ウィルスプロモーターの塩基配列を配列番号 1 に示す。なお、配列番号 1 に示されている ATG は開始コドンであり、プロモーターには含まれない。

【0046】

PCR 反応の条件を以下に示す。PCR 反応液として、10 \times バッファー (Takara社製, 5 μ L)、dNTP Mix (Takara社製, 4 μ L)、Ex Taq (Takara社製, 0.25 μ L, 5 U/ μ L)、Cdeb DNA ウィルスのゲノム DNA (1 μ L)、および 2 種のプライマー (10 pmol/ μ L, 各 5 μ L) を混合し、最後に滅菌 milliQ 水を全量が 50 μ L となるように添加混合した。次いで、98.0 で 10 秒間、45.0 で 30 秒間、72.0 で 60 秒間のサイクルを 40 回繰り返し、最後に 72.0 で 5 分間反応させた。

【0047】

フラグメントの増幅を確認するために電気泳動を行った。電気泳動には、TAE バッファー (トリス酢酸緩衝液) と、アガロース S (ニッポンジーン社製) 1.5% ゲルを用い

10

20

30

40

50

た。電気泳動用試料として、PCR産物各9 μ Lに10 \times ローディングバッファー(TAKARA社製)を1 μ Lずつ添加し、混合したものをを用いた。また、DNA分子量マーカーとして100bpラダー(TOYOBO社製,コードNo. DNA-030X, 2 μ L)を用い、同時に泳動した。また、Mupid電気泳動槽(ADVANCE社製)を用い、100Vの条件下で約30分間泳動した。泳動終了後、臭化エチジウムを用い、定法(Sambrook and Russell 2001)により染色し、紫外線照射下で写真撮影を行った。

【0048】

実施例2 本発明に係るCdebDNAウィルスプロモーターを含むベクターの調製
(1) 各エントリークローンプラスミドの調製

上記実施例1で得たCdebDNAウィルスプロモーター、導入遺伝子としてゼオシン耐性遺伝子(ble)(Drocourt, D.ら, Nucleic Acids Research, 18, p.4009(1990))、およびCylindrotheca fusiformisのfcpターミネーター(Poulsen, N.ら, FEBS Journal, 272, pp.3413-3423(2005))がそれぞれ導入されたエントリークローンプラスミドベクターを、Multisite Gateway(登録商標)Pro Kit(invitrogen社製)を用いて調製した。

【0049】

詳しくは、プラスミドの構築のためのクロナーゼ反応に必要なattB配列を有する、上記実施例1で得たCdebDNAウィルスプロモーター溶液を、30%PEG8000/30mM塩化マグネシウム溶液(invitrogen社製)で精製した。即ち、CdebDNAウィルスプロモーター溶液(25 μ L)に、滅菌milliQ水(75 μ L)を加えて100 μ Lの溶液とした。当該溶液に30%PEG8000/30mM塩化マグネシウム溶液(50 μ L)を加えて混合し、微量高速遠心分離機(KUBOTA社製, KUBOTA3740)を用いて14,000rpmで15分間遠心分離した。その後、上清を取り除き、得られた沈殿を滅菌milliQ水(10 μ L)に溶解した。次に、当該溶液(50fmol)とドナーベクター(invitrogen社製, pDONR221P1-P4, 100ng/ μ L)を混合し、当該溶液へ滅菌milliQ水を加えることにより計8 μ Lの混合液とした。なお、当該ドナーベクターは、プラスミドの構築のためのBPクロナーゼ反応に必要なattP配列を有する。当該混合液へ、さらにBPクロナーゼ(商標)II Enzyme Mix(invitrogen社製, 2 μ L)を加えて混合し、25 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。その後、反応液にプロテイナーゼK(invitrogen社製, 1 μ L)を加え、37 $^{\circ}$ Cで10分間処理した。当該反応液(2.5 μ L)を、One Shot(登録商標)Mach1(登録商標)T1^R chemically competent cells(invitrogen社製, 25 μ L)に混合し、氷上にて30分間静置した。その後、42 $^{\circ}$ Cにて30秒間ヒートショック処理を行い、直ちに氷上に移し、2分間静置した。次いで、SOC(invitrogen社製, 250mL)を加え、37 $^{\circ}$ Cにて1.5時間振とう培養した。培養した菌液(275 μ L)を、50 μ g/mLカナマイシンを含むLB寒天培地(1%トリプトン, 0.5%イーストエクストラクト, 1%NaCl, 1.5%アガー)に塗抹した。当該培地をマルチシェーカーオープン(タイテック社製)内で37 $^{\circ}$ Cにて一晚(10時間程度)倒置培養した。得られたコロニーは、白金耳を用いてLB液体培地(10mL)に植菌し、37 $^{\circ}$ Cにて一晚振とう培養した。当該培養液(3mL)より、Pure Yield Plasmid Miniprep System(Promega社製)を用いて、LRクロナーゼ反応に必要なattL配列を有するCdebDNAウィルスプロモーターが導入されたエントリークローンプラスミドを抽出した。

【0050】

また、プラスミドの構築のためのBPクロナーゼ反応に必要なattB配列を有するゼオシン耐性遺伝子(ble)を上記実施例1と同様に増幅し、上記と同様にしてBPクロナーゼ反応に必要なattP配列を有するドナーベクターであるpDONR221P4rr-P3rへ導入し、LRクロナーゼ反応に必要なattL配列を有する抗生物質耐性遺伝子が導入されたエントリークローンプラスミドを得た。

【0051】

10

20

30

40

50

さらに、プラスミドの構築のためのBPクローゼ反応に必要なattB配列を有するCylindrotheca fusiformisのfcpターミネーターを上記実施例1と同様に増幅し、上記と同様にしてBPクローゼ反応に必要なattP配列を有するドナーベクターであるpDONR221P3-P2へ導入し、LRクローゼ反応に必要なattL配列を有するターミネーターが導入されたエントリークローンプラスミドを得た。

【0052】

(2) ディスティネーションプラスミドの調製

Gateway (登録商標) Vector Conversion System with One Shot (登録商標) ccdB Survival (登録商標) Competent Cells (invitrogen社製) を用いて、pBluescript SK- (Stratagene社製) へLRクローゼ反応に必要なattR配列を持つReading Frame Casetteを組み込むことにより、ディスティネーションプラスミドを調製した。

10

【0053】

まず、pBluescript SK- (2 µg) に対し、制限酵素EcoRI 20U (TOYOBO社製, 10U/µL) を用いて、37℃にて3時間消化した。当該反応液へ常法に従ってエタノールを添加することにより、DNAを沈殿させて回収した。次に、T4DNAポリメラーゼを用いて末端を平滑化した。即ち、回収したDNAへ、10×バッファー (5 µL)、2.5 mM dNTP (TAKARA社製, 2 µL)、T4DNAポリメラーゼ (TOYOBO社製, 0.5 U/µL, 1 µL) および滅菌milliQ水 (42 µL) を加え、計50 µLとなるように反応液を調製した。この反応液を12℃にて15分間インキュベートした。この反応液に滅菌milliQ水 (350 µL) を直ちに加え、常法に従ってフェノール/クロロホルム処理とクロロホルム処理をした後、続いてエタノール沈殿を行ってDNAを回収した。次に、制限酵素にて切断したプラスミドの再環状化を防ぐために、CIAP (Takara社製, Calf intestine Alkaline Phosphatase) を用いて、その切断断片の5'末端の脱リン酸処理を行った。平滑化処理を施したDNAに10×CIAPバッファー (5 µL) とCIAP (0.1 U/µL, 1 µL) を加え、滅菌milliQ水により計50 µLになるように反応液を調製した。当該反応液を37℃にて15分間、続いて56℃にて15分間インキュベートした後、CIAP (0.1 U/µL, 1 µL) を再び加え、37℃にて15分間、続いて56℃にて15分間インキュベートした。当該反応液に、10% SDS溶液 (2.5 µL)、500 mM EDTA溶液 (0.5 µL)、プロテイナーゼK溶液 (20 mg/µL, 0.5 µL) をそれぞれ加えた後、56℃にて30分間、続いて75℃にて10分間インキュベートした。その後、常法に従ってフェノール/クロロホルム処理とクロロホルム処理を施した。次に、エタノール沈殿によりDNAを回収し、滅菌milliQ水 (10 µL) に溶解した。

20

30

【0054】

得られた平滑末端を有するpBluescript SK-と、Reading Frame Casette A (invitrogen社製, RfA) とを混合し、pGEM-T Vector Systems Kit (Promega社製) 添付のT4 DNAリガーゼを用いて連結した。まず、オートクレーブ滅菌した0.2 mL容のPCR用チューブに、2×ラピッドライゲーションバッファー (Promega社製, 5 µL)、pBluescript SK- (100 ng/µL, 0.5 µL)、RfA (5 ng/µL, 2 µL)、T4 DNAリガーゼ (Promega社製, 3 U/µL, 1 µL) および滅菌milliQ水 (1.5 µL) を加え、計10 µLとなるように反応液を調製した。この反応液を室温にて1時間保存し、4℃にて一晩 (16時間以上) インキュベートした。このライゲーション溶液 (5 µL) をccdB Survival Competent Cells (invitrogen社製, 50 µL) に混合し、氷上にて30分間静置した。その後、42℃にて30秒間ヒートショック処理を行い、直ちに氷上に移し、2分間静置した。次いでSOC (250 mL) を加え、37℃にて1.5時間振とう培養した。培養した菌液 (300 µL) を、25 µg/mL クロラムフェニコールおよび50 µg/mL アンピシリンを含むLB寒天培地に塗抹した。当該培地をマルチシェーカーオープン内で37℃にて一晩倒置培養した。

40

50

【0055】

得られたコロニーは、白金耳を用いてLB培地(10 mL)に植菌し、37 にて一晚振とう培養した。当該培養液(3 mL)より、Pure Yield Plasmid Miniprep System (Promega社製)を用いて、ディスティネーションプラスミドを抽出した。

【0056】

(3) エクスプレッションクロンプラスミドベクターの調製

Multisite Gateway Pro Kit (Invitrogen社製)を用い、上記実施例2(1)で得たエントリークロンプラスミドと、上記実施例2(2)で得たディスティネーションプラスミドとの間でLRクローナーゼ反応を行うことにより、プロモーター、抗生物質耐性遺伝子およびターミネーターが連結されたエクスプレッションクロンプラスミドベクターを調製した。

10

【0057】

具体的には、プロモーター、抗生物質耐性遺伝子、ターミネーターがそれぞれ組み込まれた3種のエントリークロンプラスミド(それぞれ10 fmol)とディスティネーションベクター(20 fmol)を混合し、さらに滅菌milliQ水を加えることにより計8 µLの混合液を調製した。当該液にLR Clonase II PLUS Enzyme Mix (Invitrogen社製, 2 µL)を加えて混合し、25 にて16時間を反応させた。その後、当該反応液にプロテイナーゼK (Invitrogen社製, 1 µL)を加え、37 にて10分間処理した。当該反応液(2.5 µL)を、One Shot (登録商標) Mach1 (登録商標) T1^R chemically competent cells (Invitrogen社製, 25 µL)に混合し、氷上にて30分間静置した。次いで42 にて30秒間ヒートショック処理を行い、直ちに氷上に移して2分間静置した。その後、SOC(250 mL)を加え、37 にて1.5時間振とう培養した。培養した菌液(275 µL)を、50 µg/mLアンピシリンを含むLB寒天培地に塗抹した。当該培地をマルチシェーカーオープン内で37 にて一晚倒置培養した。得られたコロニーを、白金耳を用いてLB培地(10 mL)に植菌し、37 にて一晚振とう培養した。当該培養液(3 mL)より、Pure Yield Plasmid Miniprep System (Promega社製)を用いてエクスプレッションクロンプラスミドベクターを抽出した。

20

【0058】

(4) DNA配列の確認

目的とするエクスプレッションクロンプラスミドベクターが作製されたことを確認するために、Dideoxy法を用いて塩基配列を決定した。

30

【0059】

上記実施例2(3)にて調製したエクスプレッションクロンプラスミドベクター(200 ng)を鋳型として用いて、サイクルシークエンシングPCRを行った。その反応条件を以下に示す。反応液(10 µL)は、鋳型DNA(100 ng/µL, 2 µL)、Big Dye Terminator Cycle Sequencing ver. 3.1 (Applied Biosystems社製, 0.5 µL)、5×シークエンシングバッファー(2 µL)、プライマー(1.6 pmol/µL, 0.66 µL)、滅菌蒸留水(4.84 µL)からなる。プライマーは、M13M3プライマー(配列番号4)を用いた。反応条件としては、95 で5分間加熱した後、96 で10秒、50 で5秒、60 で4分の反応を40サイクル行った。反応後、反応液を1.5 mL容のエッペンドルフチューブに移し、3 M酢酸ナトリウム(1 µL)、99.5%エタノール(25 µL)および125 mM EDTA溶液(1 µL)を加え、指ではじきよく混合させた後、15分間室温で放置した。14,000 rpm、4 で20分間遠心分離後、上清をイエローチップで丁寧に除き、70%エタノール(35 µL)を加え、よく混合した。再び、14,000 rpm、4 で10分間遠心分離した後、上清をイエローチップで完全に除去し、蓋を開けたまま室温で10分間放置して沈殿を乾燥させた。

40

【0060】

乾燥させたペレットにホルムアミド(Applied Biosystems社製, 1

50

0 μ L) を加え、高知大学総合研究センター遺伝子実験施設内のABI PRISM (登録商標) 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems社製) を用いて解析した。あらかじめ、遺伝子解析ソフト Vector NTI Advance Ver10.0 (Invitrogen社製, <http://www.invitrogen.com/vntigateway>) を用いて、ディステイナーシオンプラスミドの塩基配列に、プロモーター、抗生物質耐性遺伝子およびターミネーターの塩基配列を組み込むことにより、エクスペクションクローンプラスミドベクターの塩基配列を作成した。次に、このコンピューター上にて作成したエクスペクションクローンプラスミドベクターの塩基配列と、上記の方法により実験的に決定したエクスペクションクローンプラスミドベクターの塩基配列とを、Vector NTI Advance Ver10.0のAlignXを用いてアライメントを行うことにより比較することにより、上記実施例2(3)で調製したエクスペクションクローンプラスミドベクターに目的遺伝子が導入されていることを確認した。

10

【0061】

得られたエクスペクションクローンプラスミドベクターの構造を図1に示す。

【0062】

実施例3 本発明に係るCde b DNA ウィルスプロモーターを含むベクターの調製
抗生物質耐性遺伝子としてノールセオスリシン耐性遺伝子(nat)(Krugelら, 1993年)を用い、ターミネーターとしてThalassiosira pseudonana由来のfcpターミネーター(Poulsen, N.ら, Journal of Phycology, 42, pp.1059-1065(2006))を用い、上記実施例2と同様にCde b DNA ウィルスプロモーターを含むベクターを調製した。

20

【0063】

得られたエクスペクションクローンプラスミドベクターの構造を図2に示す。

【0064】

比較例1~4 従来ウィルスプロモーターを含むベクターの調製

上記実施例2と同様にして、羽状目珪藻の内在性プロモーターを有し、また、抗生物質耐性遺伝子としてゼオシン耐性遺伝子(ble)とターミネーターとしてCylindrotheca fusiformisのfcpターミネーターが導入されたプラスミドベクター(比較例1)、および、中心目珪藻の内在性プロモーターを有し、また、抗生物質耐性遺伝子としてノールセオスリシン耐性遺伝子(nat)とターミネーターとしてThalassiosira pseudonana由来のfcpターミネーターが導入されたプラスミドベクター(比較例2)を調製した。

30

【0065】

また、上記実施例2と同様にして、カリフラワーモザイクウィルス由来のプロモーター(CaMVプロモーター)を有し、また、抗生物質耐性遺伝子としてゼオシン耐性遺伝子(ble)とターミネーターとしてCylindrotheca fusiformisのfcpターミネーターが導入されたプラスミドベクター(比較例3)、および、抗生物質耐性遺伝子としてノールセオスリシン耐性遺伝子(nat)とターミネーターとしてThalassiosira pseudonana由来のfcpターミネーターが導入されたプラスミドベクター(比較例4)を調製した。

【0066】

実施例4 羽状目珪藻の形質転換

上記実施例2、上記比較例1および上記比較例3のプラスミドベクターを用い、羽状目珪藻Phaeodactylum tricornutumを形質転換した。

40

【0067】

具体的には、各プラスミドベクターを平均粒子径 $1.1 \mu\text{m}$ のタングステン粒子M17に付着させた。別途、羽状目珪藻P. tricornutumを1プレートあたり 5×10^7 cellsを固相培地に塗抹した。パーティクルガン(Bio-Rad社製, Biolistic PDS-1000/He Particle Delivery System)を用い、上記タングステン粒子を、Heガス圧1350 psiまたは1100 psiで細胞に打ち込んだ。次いで、ゼオシン $150 \mu\text{g/mL}$ を含む1.0%寒天f/2培地にて当該細胞を培養した。結果を表1に示す。

【0068】

また、上記抗生物質含有培地で生育した細胞のコロニーが形質転換していることを、P

50

PCRにて確認した。生育した細胞のコロニーを100 mLの培地を用いて培養し、藻類細胞を回収した後、上記実施例1(1)と同様の方法によりゲノムDNAを抽出した。得られたゲノムDNAを鋳型とし、導入した抗生物質遺伝子(ble)に特異的なプライマーを用いてPCRを行った。PCR反応の条件は、基本的には上記実施例1(2)と同様とし、サイクル数は40サイクル、アニーリング温度は60とした。得られた増幅DNAを分析した電気泳動写真を図3に示す。

【0069】

図3中、「M」は分子量マーカーであり、「1」は抗生物質遺伝子(ble)が導入されたプラスミドベクターのレーン、「2」は*P. tricornutum*野生株のレーン、「3~5」はカリフラワーモザイクウイルス由来のプロモーターと抗生物質遺伝子(ble)を含むプラスミドベクターで形質転換した株のレーン、「6~8」は本発明に係るプロモーターと抗生物質遺伝子(ble)を含むプラスミドベクターで形質転換した株のレーンである。

10

【0070】

実施例5 中心目珪藻の形質転換

上記実施例3、上記比較例2および上記比較例4のプラスミドベクターを用い、上記実施例4と同様にして、中心目珪藻*Chaetoceros* sp. を形質転換した。ただし、細胞を培養する培地には、500 µg/mLノールセオスリシンを添加した。結果を表1に示す。

【0071】

【表1】

海産藻類	プロモーター	全細胞数10 ⁸ 当たりの平均形質転換細胞数(n=2)
羽状目珪藻(<i>P. tricornutum</i>)	羽状目珪藻内在性プロモーター	69
中心目珪藻(<i>Chaetoceros</i> sp.)	中心目珪藻内在性プロモーター	1.0
羽状目珪藻(<i>P. tricornutum</i>)	カリフラワーモザイクウイルスプロモーター	8.0
中心目珪藻(<i>Chaetoceros</i> sp.)		0
羽状目珪藻(<i>P. tricornutum</i>)	本発明プロモーター	5.0
中心目珪藻(<i>Chaetoceros</i> sp.)		1.0

20

【0072】

また、上記抗生物質含有培地で生育した細胞のコロニーが形質転換していることを、上記実施例4と同様にしてPCRにて確認した。得られた増幅DNAを分析した電気泳動写真を図4に示す。

30

【0073】

図4中、「M」は分子量マーカーであり、「1」は抗生物質遺伝子(nat)が導入されたプラスミドベクターのレーン、「2」は*Chaetoceros* sp. 野生株のレーン、「3~4」は本発明に係るプロモーターと抗生物質遺伝子(nat)を含むプラスミドベクターで形質転換した株のレーンである。

【0074】

実施例6 本発明に係るプロモーターのCore element領域の特定

配列番号3のプライマーに加え、配列番号6~9のプライマーを用いた以外は上記実施例1と同様にして、CdeB DNA ウィルスの複製に関係すると考えられるタンパク質をコードする領域の翻訳開始点の上流部位である+107から、-72、-32、-2および+34までの塩基のDNA断片を、それぞれ増幅した。これらのエントリークローンと、上記実施例3において調製したノールセオスリシン耐性遺伝子(nat)を含むエントリークローンおよび*Thalassiosira pseudonana*由来のfcpターミネーターを含むエントリークローンを用い、上記実施例2と同様にして、上記各エントリークローン、natおよびfcpターミネーターを連結したプラスミドを調製した。これらプラスミドは、図2と同様の構造を有する。これらプラスミドに加え、比較例2のプラスミドと、プロモーターを連結していないプラスミド(pNat/Tpfcpter)を用い、上記実施例4と同様の方法により形質転換を行った。結果を図5に示す。

40

50

【0075】

図5のとおり、上記複製タンパク質遺伝子の翻訳開始点の上流部位における+107から-370までの塩基配列(配列番号1)および+107から-72までの塩基配列をプロモーターとして用いた場合には形質転換できた一方で、+107から-32、-2および+34までの塩基配列をプロモーターとして用いた場合には、形質転換できなかった。かかる結果により、藻類の形質転換に有用なCore elementは、上記複製タンパク質遺伝子の翻訳開始点の上流部位における-72から-33の間の配列(配列番号5)に存在している可能性が高いと結論付けられた。なお、形質転換が偶然起こっている可能性もあるため、プロモーターを有しないプラスミドでも同様の実験を行ったが、形質転換率は無視できる程度のものであった。また、中心目のプロモーターを用いて同様の実験を行ったところ、本発明プロモーターを用いた場合の方が、形質転換効率は明らかに高かった。

10

【0076】

実施例7 本発明プロモーターによる様々な海産藻類の形質転換

本発明のプロモーターが、様々な珪藻種に対して適用か否か確認するために、上記実施例と異なる羽状目珪藻である*C. fusiformis*を用いて形質転換を行った。*Cde bDNA* ウイルスの複製に関係すると考えられるタンパク質をコードする領域の翻訳開始点の上流部位である+107から-72までの塩基に加え、ゼオシン耐性遺伝子(*ble*)と、*C. fusiformis*の*fc p*遺伝子由来のターミネーターを組み込んだプラスミド(図6)を用いた。上記実施例4と同様に、プラスミドをタングステン粒子に固定化し、形質転換を行った。対照として、上記プロモーターを組み込まない以外は同様のプラスミド(*pBle/CffcpTer*)を用い、同様の実験を行った。本発明プロモーターを組み込んだプラスミドを用いた場合の珪藻の写真を図7(1)に、本発明プロモーターを組み込んでいないプラスミドを用いた場合の珪藻の写真を図7(2)に示す。

20

【0077】

図7(2)のとおり、本発明プロモーターを組み込んでいない場合、おそらく形質転換されていないため、抗生物質により珪藻は死滅してしまった。それに対して本発明プロモーターを用いた場合、図7(1)のとおり、珪藻は形質転換されて抗生物質耐性を獲得したため、良好に生存している。このように上記実施例で用いた以外の珪藻も、本発明プロモーターを用いれば、形質転換が可能であることが明らかとなった。

30

【0078】

実験結果の考察

(1) 形質転換能について

上記実施例4~5の結果のとおり、羽状目珪藻の内在性プロモーターを用いた場合には、羽状目珪藻は良好に形質転換できる一方で、中心目珪藻は全く形質転換できなかった。植物一般の形質転換によく用いられるカリフラワーモザイクウイルスプロモーターの場合でも同様であり、羽状目珪藻は形質転換できたが、中心目珪藻は全く形質転換できていない。

【0079】

それに対して、本発明に係るプロモーターを用いた場合には、羽状目珪藻については*P. tricornutum*と*C. fusiformis*の2種、中心目については*Chaetoceros sp.*を形質転換することができた。これら3種の珪藻は、珪藻綱全体の分子系統樹において、それぞれの目の中でも系統的に離れた分類群に属するものである。よって、これらの種に適用可能な本発明プロモーターは、様々な珪藻に適用可能と考えられる。

40

【0080】

以上の結果により、珪藻は羽状目珪藻と中心目珪藻に大きく分類されるところ、従来のプロモーターの特異性が高いのに対して、本発明に係るプロモーターは特異性が低く、様々な珪藻の効率的な形質転換に幅広く用いられ得ることが示された。

【0081】

(2) 本発明プロモーターの塩基配列について

50

一般的に、真核生物のプロモーター領域には、転写を開始させる転写結合因子が結合するコアプロモーター領域と、その上流に位置する遺伝子転写調節領域が存在する。ウイルスプロモーターにおいても同様に、TATAボックス(5'-TATAWAW-3'(式中、WはAまたはTを表す))やイニシエーターエレメント(Inr)といった真核生物のコアプロモーター領域によく見られるモチーフ配列が存在することが知られている。このことを踏まえ、本発明に係る配列番号1のプロモーターの塩基配列をPLACE Signal Scan Search(<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>)を用いて解析し、比較した。

【0082】

その結果、本発明プロモーターにTATAボックスは見られなかったが、上流領域にCAATボックスIである5'-CAAT-3'(-97~-94)、GATAボックスである5'-WGATAR-3'(-162~-167)、さらにイニシエーターエレメントであると考えられる5'-CCA₊₁TACC-3'(-2~+5)を見出した。

10

【0083】

このイニシエーターエレメントは、哺乳類の5'-YYA₊₁NWYY-3'(Javahery, R.ら, Molecular and Cellular Biology, 14, pp. 116-127(1994))、卵菌類の5'-YCA₊₁TTY-3'(McLeod, Aら, Eukaryotic Cell, 3, pp. 91-99(2004))、ショウジョウバエの5'-TCA₊₁KTY-3'(式中、KはGまたはTを表す)(Purnell, B.A.ら, Genes & Development, 8, pp. 830-842(1994))、トリコモナスの5'-TCA₊₁YW-3'(Liston, D.R.ら, Molecular and Cellular Biology, 19, pp. 2380-2388(1999))、およびC. fusiformisのプロモーターであるfcpA-1A中の5'-CCA₊₁TTC-3'(Poulsen, N.ら, FEBS Journal, 272, pp. 3413-3423(2005))というInr配列に類似している。

20

【0084】

これら情報からは、配列番号1のプロモーター中に見出されたイニシエーターエレメントが、Core elementとして羽状目珪藻と中心目珪藻の両方に働き、形質転換できたとも考えられる。しかし、当該イニシエーターエレメントに類似するC. fusiformisのプロモーターであるfcpA-1Aを用いても、中心目珪藻を形質転換することはできない。

【0085】

よって、本発明に係るポリヌクレオチド(1)が高い形質転換能を示すのは、少なくともTATAボックスやイニシエーターエレメントなどのためではなく、全く未知の配列がCore elementとして働いている可能性が高い。

30

【0086】

(3) 本発明プロモーターのCore elementについて

上記実施例6の結果により、本発明プロモーターのCore elementは、Cdb DNAウイルスの複製に関係すると考えられるタンパク質をコードする領域の-72から-33の間の配列(配列番号5)に存在している可能性が高いと考えられる。配列番号5の配列は、当該複製タンパク質遺伝子上流域に位置するイニシエーターエレメントのおよそ30から70塩基上流側に位置していることから、当該イニシエーターエレメントがCore elementとして機能したとは考え難い。当該配列番号5の配列番号をPLACE Signal Scan Search(<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>)で解析したが、既知のモチーフ配列を見出すことはできなかった。よって、本発明プロモーターのCore elementは、これまで知られていない新規なものであると考えられる。

40

【0087】

上記の実験結果のとおり、本発明プロモーターを用いれば目を超えて珪藻類を形質転換可能である理由として、配列番号5の配列に含まれる新規な配列がCore elementとして機能したと考えられる。

【産業上の利用可能性】

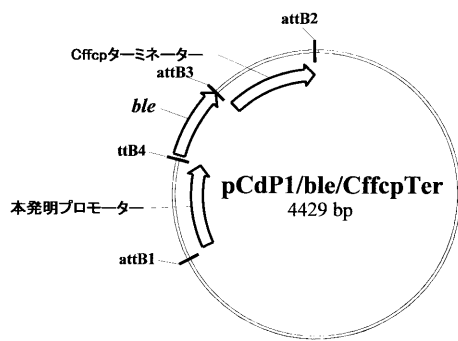
【0088】

本発明に係るプロモーターを含むベクターを用いれば、様々な種類の藻類を効率的に形

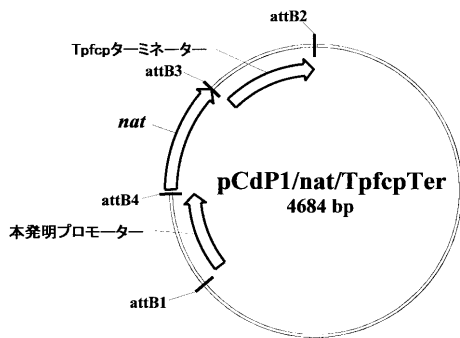
50

質転換し得る。よって本発明を用いれば、高い光合成能を有し、有用物質の産生能を有するなど優れた特性を有する上に、多量に存在するものでありながら、形質転換が難しくこれまで十分にその技術が検討されていなかった藻類を、“目(モク)”などを超えて幅広く且つ効率的に形質転換することが可能となる。

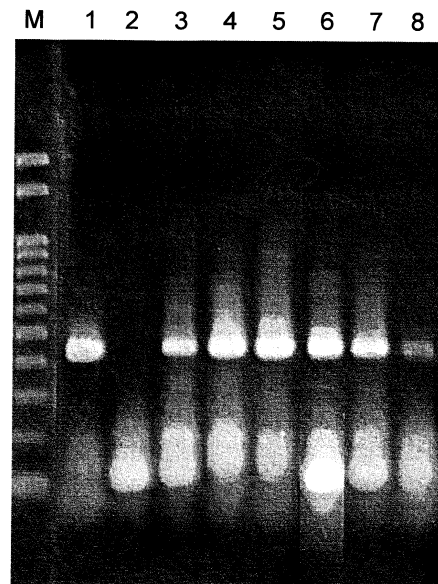
【 図 1 】



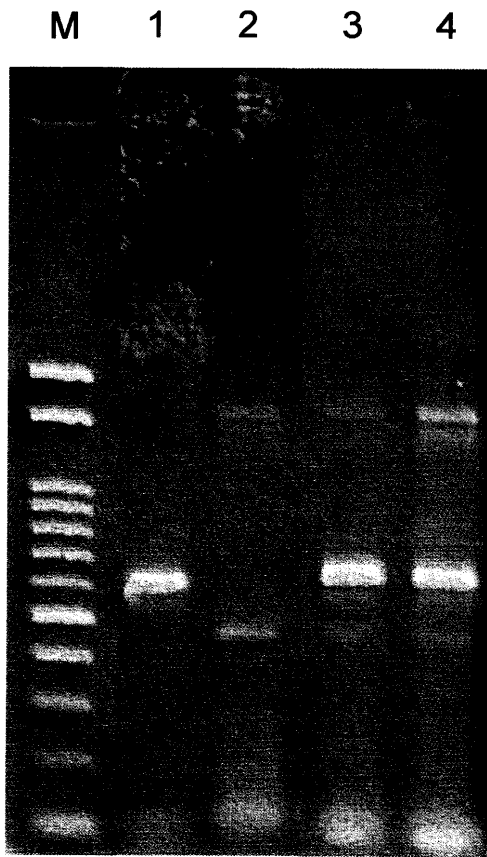
【 図 2 】



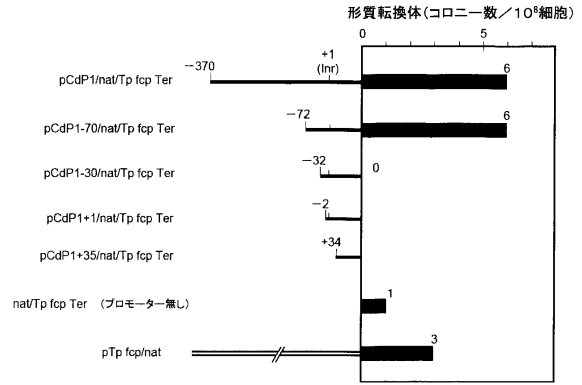
【 図 3 】



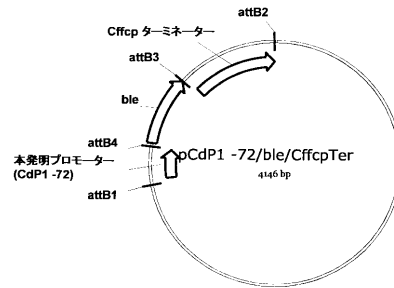
【 図 4 】



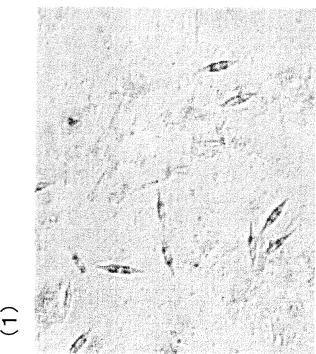
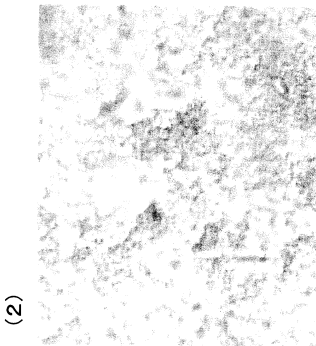
【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】



【配列表】

0005733609000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 足立 真佐雄

高知県高知市曙町2丁目5番1号 国立大学法人高知大学内

(72)発明者 長崎 慶三

広島県廿日市市丸石2丁目17番5号 独立行政法人水産総合研究センター 瀬戸内海区水産研究所内

(72)発明者 外丸 裕司

広島県廿日市市丸石2丁目17番5号 独立行政法人水産総合研究センター 瀬戸内海区水産研究所内

審査官 名和 大輔

(56)参考文献 Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao, 2000年, Vol.16, pp.443-446

Biochem Biophys Res Commun., 1994年, Vol.204, pp.187-194

Journal of Microbiology and Biotechnology, 2006年, Vol.16, pp.952-960

AQUATIC MICROBIAL ECOLOGY, 2008年, Vol.50, pp.103-112

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS(STN)

Thomson Innovation

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq