

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-312540

(P2000-312540A)

(43) 公開日 平成12年11月14日 (2000. 11. 14)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームコード* (参考)
A 0 1 H 5/00		A 0 1 H 5/00	A 2 B 0 3 0
C 1 2 N 5/10		C 1 2 N 5/00	C 4 B 0 2 4
15/09	Z N A	15/00	Z N A A 4 B 0 6 5

審査請求 未請求 請求項の数15 O L (全 11 頁)

(21) 出願番号 特願平11-122628

(22) 出願日 平成11年4月28日 (1999. 4. 28)

(71) 出願人 591245772

北海道

北海道札幌市中央区北3条西6丁目

(71) 出願人 599059232

社団法人北海道てん菜協会

北海道札幌市中央区北2条西3丁目 札幌

第一ビル

(72) 発明者 野村 信史

北海道恵庭市恵み野西6丁目16-3

(72) 発明者 紙谷 元一

北海道夕張郡長沼町東町区

(74) 代理人 100089705

弁理士 社本 一夫 (外5名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 てん菜そう根病抵抗性植物

(57) 【要約】

【課題】 従来から行われているてん菜そう根病の防除対策として、てん菜の栽培環境を改善してポリミキサ菌の活動を抑制し、またはてん菜そう根病に抵抗性の品種を選抜した育種を行っていた。しかし、前者の方法では、どの方法もBNYVVあるいはポリミキサ菌を完全に排除するものではないために、再発の可能性が高く、繰り返し同様の処理を行うことによる経済的損失も過大なものであり、また後者の方法では、BNYVVに対して真性抵抗性でないため、発病の激しい圃場では作付けをすることができないという欠点を有していた。

【解決手段】 本発明は、てん菜そう根病ウィルス (BNYVV) ゲノム由来の遺伝子またはその一部の配列に対応するDNAを植物ゲノム中に発現可能に導入することにより、BNYVVに対する抵抗性を付与した形質転換植物細胞、および該細胞から再分化させたBNYVVに対して抵抗性を有する形質転換植物を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ビートエそ性葉脈黄化ウイルス(BNYV)ゲノム由来の遺伝子またはその一部の配列に対応するDNAまたはこれと実質的に同一なDNAを、植物ゲノム中に発現可能に形質転換することにより、BNYVVに対する抵抗性を付与した、形質転換植物。

【請求項2】 BNYVVゲノム由来の遺伝子またはその一部の配列に対応するDNAが、BNYVVが有するゲノムRNAのうち4.8 kbのRNA分子(RNA-2分子)由来のDNAである、請求項1に記載の形質転換植物。

【請求項3】 RNA-2分子由来のDNAが、RNA-2分子の3'末端側領域由来のDNAである、請求項2に記載の形質転換植物。

【請求項4】 実質的に同一なDNAが、RNA-2分子由来のDNAによりコードされるタンパク質の親水性領域を疎水性アミノ酸により置換したタンパク質をコードするDNAである、請求項1～3のいずれか1項に記載の形質転換植物。

【請求項5】 植物がてん菜である、請求項1～4のいずれか1項に記載の形質転換植物。

【請求項6】 植物がベンタミアナである、請求項1～4のいずれか1項に記載の形質転換植物。

【請求項7】 BNYVVゲノム由来の遺伝子またはその一部の配列に対応するDNAまたはこれと実質的に同一なDNAを、植物細胞ゲノム中に発現可能に形質転換することにより、BNYVVに対する抵抗性を付与した、形質転換植物細胞。

【請求項8】 BNYVVゲノム由来の遺伝子またはその一部の配列に対応するDNAが、RNA-2分子由来のDNAである、請求項7に記載の形質転換植物細胞。

【請求項9】 RNA-2分子由来のDNAが、RNA-2分子の3'末端側領域由来のDNAである、請求項8に記載の形質転換植物細胞。

【請求項10】 実質的に同一なDNAが、RNA-2分子上のDNAによりコードされるタンパク質の親水性領域を疎水性アミノ酸により置換したタンパク質をコードするDNAである、請求項7～9のいずれか1項に記載の形質転換植物。

【請求項11】 植物細胞がてん菜由来である、請求項7～10のいずれか1項に記載の形質転換植物細胞。

【請求項12】 植物細胞がタバコ由来である、請求項7～10のいずれか1項に記載の形質転換植物細胞。

【請求項13】 SEQ ID NO:1に示すヌクレオチド配列の一部由来のDNAまたはこれと実質的に同一なDNAを発現可能に含み、BNYVVに対してウイルス抵抗性を付与する、植物形質転換用ベクター構築物。

【請求項14】 SEQ ID NO:2に示すヌクレオチド配列またはこれと実質的に同一のDNAを、プロモータおよびターミネータの間にセンス方向に含む、請求項11のベクター構築物pM27。

【請求項15】 SEQ ID NO:3に示すヌクレオチド配列またはこれと実質的に同一のDNAを、プロモータおよびターミネータの間にセンス方向に含む、請求項11のベクター構築物pM28。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、てん菜のそう根病の原因ウイルスであるビートエそ性葉脈黄化ウイルス(Beet Necrotic Yellow Vein Virus,以下「BNYVV」と呼ぶ。)に対して抵抗性の植物を作出することに関する。より具体的には、BNYVV由来のDNAで植物細胞を形質転換することにより、BNYVV抵抗性の植物を作出することに関する。さらに具体的には、BNYVVのRNA-2分子由来のDNAで植物細胞を形質転換することにより、BNYVV抵抗性の植物を作出することに関する。本発明はさらに、BNYVV抵抗性の形質を安定的に後代に伝えることができる、BNYVV抵抗性の植物を作出することに関する。

【0002】

【従来の技術】てん菜のそう根病は、ビートエそ性葉脈黄化ウイルス(BNYVV)によって生じるウイルス病である。BNYVVはカビの一種である土壤菌、ポリミキサ・ベータ(Polymyxa betae、以下、「ポリミキサ菌」という)の休眠胞子中に潜伏することにより土壤中に長期間生存することができる。ポリミキサ菌の休眠胞子は、てん菜が栽培される時期になると発芽し、遊走子を生じる。この遊走子中にBNYVVが含まれると、その移動に伴ってウイルスも運搬され、てん菜の細根にBNYVVが感染し、発病に至る。

【0003】BNYVVはポリミキサ菌の休眠胞子中に潜伏するため、一旦BNYVVで汚染されてしまった土壤からこのウイルスを完全に除去することは極めて困難であり、典型的な土壤病として知られている。このウイルス病が発病した場合には、根中糖分が著しく低下するため、日本、ヨーロッパを含む世界各地のてん菜栽培地帯において最も重要な病害の一つとされている。てん菜栽培が盛んな北海道においては道内の約20%の圃場でてん菜そう根病の発生が認められており、さらに汚染拡大が懸念されている。

【0004】従来から行われているてん菜そう根病の防除対策は、てん菜そう根病の発生を早期に発見し、栽培環境を改善してポリミキサ菌の活動を抑制することによりBNYVVの感染を抑制するものであった。例えば、汚染土壤からのポリミキサ菌の蔓延を防止すること、pHの調節によりBNYVV保有ポリミキサ菌の増殖を抑制すること、排水設備などの改良による土壤改良、薬剤処理および熱処理による汚染土壤の殺菌などを行ってきた。しかしながら、どの方法もBNYVVあるいはポリミキサ菌を完全に排除するものではないために、再発の可能性が高く、繰り返し同様の処理を行うことによる経済的損失も過大なものであった。

【0005】一方、てん菜そう根病に抵抗性の品種を選抜した育種が行われ、BNYVVに対する抵抗性品種を導入する試みも行われている。しかしながら、いずれの品種もBNYVVに対して真性抵抗性を持たないため、発病の激しい圃場では作付けをする事ができなかった。

【0006】近年、植物にウイルス抵抗性を付与する育種において、遺伝子組換え技術を用いた育種法（以下、「分子育種法」という）が行われている（細胞工学別冊、植物細胞工学シリーズ8、1997、秀潤社）。従来の育種法では、ある品種に優れた形質を導入するために遺伝的に離れた品種との交配を行うと、不稔性の個体ができる場合が多く、育種が困難であったのに対して、分子育種法では、植物由来の遺伝子に限らずウイルス、細菌、酵母、動物由来の遺伝子など、品種、属を越えて、優れた形質を導入することができる点を特徴とする。てん菜についても同様に遺伝子的に耐病性を導入することができれば、環境改善という確実性の低い方法を行う必要がなくなるため、画期的手法として注目されている。

【0007】ウイルス遺伝子を導入することによりウイルス抵抗性を付与する分子育種法としては、例えば、ウイルス外被タンパク質（CP）遺伝子を導入する方法、弱毒ウイルス株のゲノム遺伝子を用いる方法、サテライトRNAを用いる方法、アンチセンスRNAを用いる方法、ウイルス複製酵素を用いる方法、リボゾーム不活化タンパク質を用いる方法、S-アデノシルホモシステイン水酸化酵素を用いる方法、ウイルスに特異的なモノクローナル抗体を用いる方法、2'5'オリゴアデニル酸合成酵素とリボヌクレアーゼLを用いる方法、二本鎖RNA分解酵素を用いる方法などが従来から知られている。本発明では、BNYVVのいずれかの遺伝子により形質転換することにより、BNYVVに対する抵抗性を付与することについて検討した。

【0008】BNYVVは、外被タンパク質（CP）と5種類の一本鎖RNA分子とからなるウイルスであり、これら的一本鎖RNA分子はその大きさにしたがって、RNA-1（7.1kb）、RNA-2（4.8kb）、RNA-3（1.8kb）、RNA-4（1.5kb）およびRNA-5（1.4kb）と呼ばれている。BNYVVの遺伝子により植物細胞を形質転換するためには、まず、BNYVVが有するこれらのゲノムRNA遺伝子の構造、及び機能について解析することが必要である。本発明者らは、以前に発表した論文において、BNYVVのゲノムRNA分子の詳細な構造について発表した（M. Saito, et al., Arch. Virol., 1996, 141, 2163-2175）。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、CPタンパク質遺伝子およびリードスルータンパク質遺伝子以外のRNA-2分子由来のDNAまたはこれと実質的に同一なDNAを使用した、遺伝子工学的手法によるてん菜の品種改良に関する。より具体的には、本発明は、BNYVVが有する遺伝子の中から抵抗性として機能する可能性のある、CPタンパク質遺伝子およびリードスルータンパク質遺伝子以外

のRNA-2分子由来のDNAを探索し、このDNAまたはこれと実質的に同一なDNAにより、遺伝子組換え技術を用いててん菜を品種改良し、てん菜そう根病抵抗性作物を作出することを目的とする。

【0010】

【課題を解決するための手段】従来から知られる分子育種法の中でも、ウイルスのCPタンパク質遺伝子で形質転換することによりウイルス抵抗性を付与する方法が多く報告されている。そこで、本発明者らは、ビートエソ性葉脈黄化ウイルス（BNYVV）ゲノムにつき種々の研究を行い、そのCPタンパク質遺伝子は、RNA-2分子中の5'末端側領域に存在することを突き止めた（M. Saito, et al., Arch. Virol., 1996, 141, 2163-2175）。そして、RNA-2分子上に存在するCPタンパク質遺伝子を植物に導入することによりBNYVVに対するウイルス抵抗性を付与することを試みた。しかしながら、CPタンパク質遺伝子により形質転換した植物では、ウイルスに対する抵抗性を付与することができなかった。

【0011】そこでさらに、RNA-2分子の詳細な構造解析に基づいて、RNA-2分子中の種々の領域に対応するDNAで形質転換した複数種類の植物を作製した。その結果、RNA-2分子中の3'末端側領域で形質転換した植物がBNYVVウイルス抵抗性を有することを見出し、本発明を完成した。

【0012】したがって、本発明は、ビートエソ性葉脈黄化ウイルス（BNYVV）ゲノム由来の遺伝子またはその一部の配列に対応するDNAを植物ゲノム中に発現可能に形質転換することにより、BNYVVに対する抵抗性を付与した形質転換植物細胞、およびBNYVVに対して抵抗性を有する形質転換植物である。

【0013】本発明においてBNYVVゲノム由来の遺伝子は、好ましくは、BNYVVが有するゲノムRNAのうち4.8 kbのRNA分子（RNA-2分子）由来のDNAである。本発明においてRNA-2分子由来のDNAは、好ましくは、RNA-2分子の3'末端側領域由来のDNAまたはこれと実質的に同一なDNAであり、より好ましくは、センス鎖の該DNAである。

【0014】ここでRNA-2分子由来のDNAとは、RNA-2分子上に存在するいずれか一つの遺伝子またはその一部の配列を有するDNAをいう。RNA-2分子由来のDNAと実質的に同一なDNAとは、RNA-2分子上に存在するいずれか一つの遺伝子またはその一部の配列を置換、欠失、挿入または縮重若しくはそれらの組合せなどにより改変したDNAをいう。本発明で使用するRNA-2分子またはこれと実質的に同一なDNAは、植物にBNYVVウイルス抵抗性を導入することができるものであればいずれであってもよい。例えば、本発明で使用するRNA-2分子由来のDNAと実質的に同一なDNAには、RNA-2分子上に存在する遺伝子またはその一部によりコードされるタンパク質の親水性領域が疎水性アミノ酸に置換されるように核酸配列を改変したDNAを含む。一般的にタンパク質の親水性領域は、タンパ

ク質の高次構造では外側に位置し、ウィルスの感染・伝搬等の過程で重要な役割を果たしていると考えられる。そのため、親水性領域を疎水性アミノ酸に置換することで、ウィルスの感染・伝搬を阻害することができるからである。目的とするタンパク質が2以上の親水性領域を含む場合には、いずれか1つの親水性領域のみを疎水性に改変してもよく、または2以上の親水性領域を同時に疎水性アミノ酸に改変してもよい。

【0015】また、RNA-2分子の3'末端側領域とは、RNA-2分子のうちCPタンパク質遺伝子を除く領域を意味し、より好ましくは、RNA-2分子のうち42kタンパク質、13kタンパク質、15kタンパク質および14kタンパク質をコードする領域（例えば、SEQ ID NO:1の第2130番塩基～第4420番塩基からなる領域）をいい、最も好ましくは、RNA-2分子のうち13kタンパク質および15kタンパク質をコードする領域（例えば、SEQ ID NO:1の第3284番塩基～第4034番塩基からなる領域）をいう。

【0016】以下に、本発明を詳細に説明する。

BNYVVのゲノムRNA-2分子

てん菜そう根病の原因ウィルスであるBNYVVには、その保有するRNA分子の多様性から複数のウィルス株が存在することが知られている。本発明で使用するRNA-2分子は、BNYVVを含むウィルス株であればいずれから単離してもよい。例えば、野外分離株由来のウィルス株を使用できるが、これに限定されない。

【0017】ウィルス溶液を調製するためには、BNYVVを植物細胞または植物体に感染させて増殖させる。この場合にウィルスを増殖させるために使用することができる植物細胞または植物体の例は、てん菜、ツルナ、ペンタミアナ、マクロカルパ、キノア由来の細胞または植物体などである。

【0018】増殖したウィルスからRNA-2分子を回収するには、SDS-フェノール法でRNAを単離し、さらに例えばアガロースゲルまたはポリアクリルアミドゲル上での電気泳動により、約4.8 kbの分子量を示す画分を分離することにより行うことができる。RNA-2分子の単離およびその解析結果の具体例は、SEQ ID NO:1および実施例1に記載する。

【0019】RNA-2分子によりコードされるタンパク質の親水性領域を疎水性アミノ酸で置換するためには、クローニングされたDNAの核酸配列に対して部位特異的変異導入法を用いて、親水性領域に該当する場所に所望の変異を導入することにより行うことができる。タンパク質の親水性領域に該当する場所は、得られた核酸配列からアミノ酸配列を推定し、さらにその推定されたアミノ酸配列から親水性領域を計算により求めることは、当業者であれば容易に行うことができる。疎水性アミノ酸としては、例えば、Ala、Phe、Trp、Ile、Leu、Pro、Metなどの疎水性アミノ酸のいずれを使用してもよい。また、当該アミノ酸が複数のコドンによりコードされる場

合には、アミノ酸ごとにそれら複数のコドンのうちいずれを使用してもよい。このようにして作製した変異を有するタンパク質の例としては、本明細書中に記載する変異タンパク質（ORF4M、SEQ ID NO:4）などがある。

【0020】形質転換ベクターの構築と形質転換体の作製

てん菜にBNYVVに対するウィルス抵抗性を付与するには、RNA-2分子由来のDNAを、植物形質転換用プラスミド中に導入する。使用するプラスミドは、導入するDNAの上流部分に、形質転換された植物細胞中で機能可能なプロモーター配列を有し、下流部分にはターミネーター配列を有するものであることが望ましい。そのような植物形質転換用プラスミドとして、pBI121などを使用することができる。

【0021】作製した形質転換ベクターを使用して、植物細胞または植物体を形質転換する。植物細胞を形質転換するためには、エレクトロポレーション法、アグロバクテリウム法、マイクロインジェクション法、ポリカチオン法などの方法のうちいずれの方法を使用してもよい。形質転換に使用する細胞および形質転換細胞を培養するためには、例えば、BAP（0.25 mg/L）、ブドウ糖（9%）、アガロース（0.6～1.2%）を添加したMS培地、あるいはPGo培地などを使用することができる。形質転換した植物細胞は、アガロースピース法、ナース培養法などの方法により、植物体に再分化させることができる。

【0022】形質転換した植物体は、形質転換した植物細胞を再分化させるか、または植物体を直接形質転換することにより得ることができる。植物体を形質転換するためには、アグロバクテリウム法、パーティクルガン法などの方法のうちいずれの方法を使用してもよい。形質転換した植物体は、そのまま植物体として育成しても、一旦カルス状に脱分化させた後に、再び植物体に分化させてもよい。

【0023】これらの方法を用いることにより、BNYVVに対して抵抗性を有する形質転換植物を作製することができる。このように作製した形質転換植物は、BNYVVに対するウィルス抵抗性を指標として選別する。

【0024】以下に、本発明の実施例を記載するが、これらは本発明の範囲を限定するものではなく、本発明をより具体的に説明するためのものである。

【0025】

【実施例】実施例1：BNYVVが有するRNA分子の配列、構造および推定される機能

ウィルス分離株としては、野外分離株および汁液接種によって選択したウィルス分離株を使用した。ウィルスに感染したツルナの葉に生じた局部病斑をホウ酸緩衝液中で磨砕し、超遠心により得た沈殿を蒸留水に溶解することによりウィルス溶液を得た。このウィルス溶液をさらにSDS-フェノール法により処理してRNAを調製し、さら

にオリゴ (dT) セルロースカラムによって分画する。

【0026】このようにして得られたRNAに対して市販のキット (cDNA合成システム、Amersham) を使用して、GublerおよびHoffmanの方法 (Gubler, U., and Hoffman, B. J., Gene, 1983, 25, 263-269) に従い、あるいは、RT-PCR法により、cDNAを合成する。GublerおよびHoffmanの方法を用いて増幅するためには、オリゴdTプライマーおよびランダムプライマーのほかに、2Cプライマー (5'-CTACCTTCACTCGACAT-3' (SEQ ID NO:5)) を使用した。RT-PCR法を用いて増幅するためには、上流プライマーとして2Aプライマー (5'-TTTAAATTCTAACTATTATC-3' (SEQ ID NO:6)) を、下流プライマーとして2Bプライマーを (5'-ACCCCGTTCCATTTATACCC-3' (SEQ ID NO:7)) を使用した。増幅産物を制限酵素DraI/SpeI、SphIまたはDraI/SphIのいずれかにより処理し、同様な制限酵素により処理されたpUC119にクローニングした。

【0027】次に特異的プライマーを使用して、cDNAに対してPCR法を行うことにより目的とする配列を増幅した。PCRの条件は、当業者が適宜条件を変更し、最適化することができるが、例えば、Taqポリメラーゼ (2.5 U/nit/100 μl) 上流プライマーおよび下流プライマー (各0.4 μM)、塩化マグネシウム (1.5 mM)、dNTP (0.2 mM) を含む緩衝液100 μl中にて、94 °C 1分間、55 °C 1分間、72 °C 2分間を1サイクルとして35サイクル行った。PCR産物はpUC119にクローニングした。

【0028】次いでプラスミド中にクローニングされたRNA??分子を、常法に従ってDNAシーケンサーを使用して、配列決定した。配列決定された結果については、市販のソフトウェアを使用して、推定されるオープンリーディングフレーム (ORF) の位置、ORFによりコードされる推定アミノ酸配列、およびその特徴などについて解析した。

【0029】配列決定の結果、RNA-2分子は4609塩基からなり、6個のORF (ORF1~ORF6) を有することがわかった。BNYVVのRNA??分子から作製されるcDNAの塩基配列は、SEQ ID NO:1に記載する。この配列を詳細に解析した結果、ORF1は外被タンパク質 (CP) (21kDa) をコードし、ORF3のタンパク質 (42kDa) のほぼ中央には、ATP/GTP結合領域とGXGXGKS/Tのヘリカーゼモチーフが存在し、そしてORF6のタンパク質 (14kDa) は、システインに富み、Zincフィンガーモチーフを有することがわかった。

【0030】実施例2：形質転換体の作出

てん菜は、自家不和合性の多殖性作物であり、さらに2年生のため世代が長く、試験植物としては使用しにくいという欠点が存在する。そこで、本発明においてはBNYVVに感受性で取り扱いが容易な実験植物でタバコの一環であるNicotiana benthamianaを利用して試験を行った。

【0031】本発明の形質転換に使用する植物形質転換

ベクターとして、アグロバクテリウムTiプラスミドのT-DNAの両端の左右境界配列を含む植物発現ベクターpBI121を使用した。pBI121を制限酵素BamHIおよびSacIで切断することでGUS遺伝子を取り除き、このBamHI/SacI部位に形質転換に使用する遺伝子のcDNAを挿入した。すなわち、PCRで増幅した遺伝子をBamHIおよびSacIで処理してBamHI/SacI遺伝子断片を作製し、その遺伝子断片を発現ベクターのBamHI/SacI部位にライゲーションした。この結果、ウィルスRNAのcDNAクローンからPCRにより増幅された8種類の非構造タンパク質遺伝子を含む組換え形質転換ベクターを構築した。

【0032】本実施例においては、CPタンパク質遺伝子およびリードスルータンパク質遺伝子以外のRNA-2分子由来のcDNAを、BNYVVに対するウィルス抵抗性付与のための形質転換に使用した。すなわち、ORF3全長を含む形質転換ベクター (pM23)、フレームシフト変異を導入したORF3 (ORF3M) 全長を含む形質転換ベクター (pM24)、ORF4全長を含む形質転換ベクター (pM25)、ORF5全長を含む形質転換ベクター (pM26)、ORF4全長とORF5全長を含む形質転換ベクター (pM27、SEQ ID NO:2)、親水性領域を疎水性アミノ酸で置換したORF4 (ORF4M) 全長とORF5全長を含む形質転換ベクター (pM28、SEQ ID NO:3)、ORF6全長を含む形質転換ベクター (pM21)、およびアンチセンスORF6 (ORF6M) 全長を含む形質転換ベクター (pM22) により形質転換を行った。

【0033】ここでORF4M分子とは、RNA-2分子上に存在する13kタンパク質において、アミノ酸番号51-58に相当するGly Gly Lys Tyr Arg Asp Gly Thrの配列からなる親水性領域をAla Ala Lys Phe Arg Ala ALa Alaの配列からなる疎水性領域で置換したものをコードする核酸配列である。このような核酸配列は、例えばSEQ ID NO:3に記載される配列がある。本発明においては、疎水性アミノ酸としてAlaまたはPheを使用した。これらには限定されない。また、Alaをコードするコドンは4種類、Pheをコードするコドンは2種類あるが、当該アミノ酸配列を規定するためには、これらのコドンのいずれを使用してもよい。

【0034】形質転換する植物体は、培養ビンに0.25% ゲルライトを含むMS培地上で培養した。この培地に70% エタノールと有効塩素濃度1.5%のアンチホルミンで滅菌したN. benthamianaの種子を播き、陽光定温器内 (23 °C、16時間照明) で約1週間培養した後、同じ培地に継代し、約5週間培養することにより無菌植物体を育成した。

【0035】BNYVVのゲノムRNAから作製したcDNA断片を含むアグロバクテリウムを、リーフディスク法によりN. benthamianaの無菌植物体葉片 (5~10mm角) に感染させ、BNYVVの遺伝子を導入した後、遺伝子導入した植物体を再分化させた。

【0036】再分化個体の葉から、SDS-フェノール法に

よりDNAを抽出し、目的とする遺伝子断片が植物体に導入されたことを確認する。植物体由来のDNAに対して、クローニングの際に用いた特異的なプライマーを用いて、PCR法によりウィルス遺伝子を増幅し、アガロースゲル電気泳動してバンドの有無を調べた。その結果、前述した8種類の非構造タンパク質遺伝子を含む形質転換体を作出することができた。

【0037】*N. benthamiana*を形質転換するために使用した形質転換ベクターは、カナマイシン耐性遺伝子を持つことから、植物体がカナマイシン耐性であれば目的とする遺伝子が導入されていると考えられる。そこで、カナマイシン(200 µg/ml)を含むMS培地(0.25%ゲルライトを含む)上で、上述した様に滅菌した*N. benthamiana*の種子を播き、培養することにより、形質転換体を選択した。

【0038】**実施例3：形質転換植物の検定と評価**
 実施例2において作出した形質転換体の自殖次世代(R1世代)についてウィルス抵抗性の程度を検定した。

【0039】形質転換体としては、実施例2に記載したようにカナマイシン含有培地で発芽生育したカナマイシ

*ン耐性個体を接種試験に用いた。対照の非形質転換体として、カナマイシン不含MS培地(0.25%ゲルライトを含む)で同様に培養した無菌植物体を使用した。

【0040】ウィルスの接種、植物の育成は陽光定温器内で実施した。30mlの注射筒または排出管付き試験管に石英砂(20~30メッシュ)を入れ、これに無菌的に培養したタバコ幼苗(播種後約6週間)を移植した。これに培養液(Hoagland & Arnon氏液の改良液、pH7.0)を毎日灌流した。BNYVVのN型系統(RNA-1~RNA-4を含有)を接種したツルナ接種葉からウィルスを部分純化し、OD260=0.3に調整し、形質転換体および非形質転換体(ともに播種後約7週間)の展開葉に汁液接種した。接種後10日ごとに上位葉を採取し、ELISA法によりウィルス感染の有無を調べた。

【0041】遺伝子を導入した8種類の形質転換*N. benthamiana*のうち、pM27とpM28を導入した植物では、一部の系統で非形質転換体と比較してウィルスの移行・増殖が遅延する傾向がみられた(表1)。

【0042】

【表1】

表1：ウィルス接種後におけるウィルス検出頻度

プラスミド	接種後10日	接種後20日	接種後30日
pM21	70.0%	94.0%	100.0%
pM22	36.1%	75.0%	88.9%
pM23	55.6%	94.4%	94.4%
pM24	33.3%	80.0%	100.0%
pM25	33.3%	91.7%	100.0%
pM26	9.1%	68.6%	72.7%
pM27	10.0%	23.3%	40.0%
pM28	16.1%	16.1%	25.8%
非転換体	0.0%	80.0%	100.0%

pM27およびpM28を導入した植物体についてさらに接種試験を行った。その結果、pM27およびpM28を導入した形質転換体の一部で個体の上位葉からウィルスが検出されず(表2、pM27の植物番号1および2)、また非形質転換体

と比較してウィルスの移行が遅かった(表2、pM28の植物番号1~3)。

【0043】

【表2】

表2：pM27、pM28により形質転換した植物体におけるウィルス検出頻度

プラスミド	植物番号	接種後10日	接種後20日	接種後30日
pM27	1	1/12	2/12	2/12
	2	0/12	3/12	3/12
pM28	1	1/12	4/12	7/12
	2	0/12	1/12	4/12
	3	4/12	6/12	7/12
非転換体	3	6/12	12/12	12/12

*ウィルスは、12個体ずつの植物体に感染させた。

pM27およびpM28中にクローニングされたDNAは、RNA-2分子の3'末端側領域の配列を有するDNAであり、詳細な配列はSEQ ID NO:2およびSEQ ID NO:3にそれぞれ記載した。

2株は、1999年4月15日付けで、工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている(寄託番号:FERM P-17369)。

【0045】

【0044】なお、pM27により形質転換した大腸菌NM52

50【効果】本発明で提供する形質転換ベクターpM27および

pM28を用いることにより、植物細胞または植物体を形質
 転換し、BNYVVに対する抵抗性を有する植物細胞または
 植物体を作出することができる。

* 【0046】

【配列表】

*

SEQUENCE LISTING

<110> Hokkaido
 Hokkaido Sugar Beat Co.
 <120> Rhizomania disease resistant plant.
 <130> 980375
 <160> 7

<210> 1
 <211> 4609
 <212> DNA
 <213> Beet necrotic yellow vein virus
 <220>
 <223> Genome
 <300>
 <301> M. Saito, et al.
 <302> Complete nucleotide sequence of the Japanese isolate S of beet ne
 crotic yellow vein virus RNA and comparison with European isolates.
 <303> Archives of Virology
 <304> 141
 <306> 2163-2175
 <308> D84411
 <309> April 12, 1996
 <400> 1

aaattctaac tattatctcc attgaataga attcaccgt ctgttggttc ttattttggt 60
 ctgggggcaa ttttattcag ggccctactt taaatatagg tgcgagtaat aagtagccgc 120
 cgtccagaag aagatagtag taacatgtcg agtgaaggta gatatatgac atggaaggat 180
 atgtcacata ataagtttat gaccgatcga tgggcccgtg tttcggacgt cgtgagtgtt 240
 attaaacaat cgcagtctat ggacttgtcc aaggctgcga atctatctat aattaaact 300
 gctttggcag gattgggctc gggttggact gacaataatc cttttgtgtc cccgatgacc 360
 cgttttccac agacactaac tatgtacggg gcaacttgtt tatatgttaa tctgtctgac 420
 ccagaatttg cgttgataat gactaaggta agtactttaa ctgattcagg gtagcagat 480
 aacgcactct ctaatgtgag tagagatgtg gtgtccggaa ataaagccga atcatccgg 540
 aaaactgctg gcactaatga gaattctgct tatacgtcta ccgttagtct tgcgtggttg 600
 gctcaagctc ttaggcttga ggaattaatg tggactcggg ataagtttga ggaccggttg 660
 aaattacat ggacacctgt tcaaggtaga accagtccac ccggacaata gcaattagct 720
 gctgctcggg tgacggcaca cattcgagcg gcgaagcggg cactattata tcctggtgat 780
 agtcccagat gggttggttg gaaacatttc taccctcctc caccatatga tgtgtacgat 840
 gtgccaccgc tggatattat taacgcaaa ttggctgctg atgatatcgg cgtctctgtt 900
 actcctacac cggcatcctc acatggtcct ccttttgaag tttccgagga agttgagcag 960
 gcaaatagga atagtctatg gctaacagtt ggactgctat tagctgcttt gccagttggg 1020
 attggtgtag ctgcttatca taggaagaag ctccaaagta gattacgtga gttgaagttg 1080
 ctatggggtt ctactggttg gtctggtggt ggtggtggtt ttgacaccga gctgtatatg 1140
 cgtgctacag atactgttag ttgggaacc actctttcag agcatgctgc ttcagctccg 1200
 tcggggttac ggcaccgacc tgctgctact gatagtggac ctcatgaagc gctgccgttc 1260
 gaggtgtggg tgtttgataa tctagctgta gtgtatgatt cgattggtat gaggatttta 1320
 ttttactg ttagagagtt tgttggggtg ttcaacggtg agtttgaagg gcttatagag 1380
 ctgttagagt caccgatga tgatgatggt gtgtatacga atgctcctag agacactgcc 1440

13

14

attgacgcct atgaatctca agaaaactac gaccgtattg atattgaaac tgtcttgcac 1500
 gagaggcgta taaacttgaa aaagttgctt ctftgaagaag cagagctaga acgacgagag 1560
 cgagatatga ctatgattgc tgatgaagaa caaagaacat tgctacatag gttggaaggt 1620
 tctagggttg aagcaactca tgcagttgcc aaagccgaag ctgatgctcg ggcagctgtc 1680
 gctatggctg ctcttgcctc taaggaagct aatgattacg acagtaagat ggcttttgac 1740
 aggtcttgta aagaacagga actgcggtg cgcgaactcg aagtgaatag tatgccgagt 1800
 aaaacagaga ggatgttca cactgggtata caaggtggcg cgcaattggc tggagctatg 1860
 gctgtcggtg ctatgctgag acgtggggct ggttcttctt ctcaaaccgt ttctagtgg 1920
 gctaataatg gttctcgttc gcagagtttg actcgtggtc gtatgcatc acaacctttg 1980
 tcatcggttg gtggttctac tctggtgggtt aataataata ttagtaatac taatcttgtt 2040
 agggctggta atagtctga agtttctgct ggtagatcta ctaatagtgg taatagtaat 2100
 ttttggtcca aattacgtgt tggggaagga tggccaagt acagcgtaga acgggctggc 2160
 acaaggcgcg aaaggcaat cgtgcttcca gcgccccctg cgcctcccgc cggatgactc 2220
 aggatgactg gtcacgtacc catcccagc atattttctc agttattgag aaaacactag 2280
 tagaggatgg gtataaatgg aacggggtaa aacccggaca ttgagattgg ggcaaatgta 2340
 aggaatctgg tgctattgat aattttaggg gtacattaga aggcgagtta ggtaaaaatt 2400
 gtgattgac ttgtaatgct gctgcccgtt aacttgacac attgcaaaag gtgaaaatgt 2460
 catcagattg gactgccaga gttggtattg ttttgggtgc tcttgggtgtt gggaaatcta 2520
 cctcgattaa gaacttatta gacaaatttg gagcaaaaca taaaatgggt ttatgcttac 2580
 ctttttagtca gttgttagaa ggagtgtttg ctggtcgggt ggacactttt ctggttagtg 2640
 atttgttctg taggtccgtg ggatattgaa aatacaacac catgcttgta gatgaggta 2700
 ctggtgtgca tatgtgtgag attttggtag ttgccggaca tttagggtgt aagaacgtga 2760
 tatgttttgg tgatccggcg caagggttaa attataaggc cggttctgcc gtgaactata 2820
 attttccgat tattgctgaa tgttatgcta gtagacggtt cggtaaggcg actgccgac 2880
 tcattaatc cagcaatggt ggtggtaaac ctgtagtcgg taataacgag gtaaggata 2940
 gttggacttt tgaagaacta tgtgggaaga tactagatat gtctactgtt ttggtagcta 3000
 cacgcgaac ccaaaagttt ctattagaag ataataatga gtctattctt tactcggagc 3060
 cccacgggca aacatacagc gttgtcacta tcattttggg agacaggttt gatgatgctg 3120
 ccaatttgcga ccaaatgtt agggctgtct tgttaactag agctcgtaag ggtggatga 3180
 ttaagatggg tcctaacatt gctgccaggt tcaaaaacgg tgattttaat tcacgtggag 3240
 ttagtaagtc ttgaccgga gatacttttt gcgaagatag ataattgcta gggaaataac 3300
 cgctcgaccc aataagaatg tgcctatgt tgttgggtgt tgtgtgtgg ctttcttgt 3360
 attgctggcg ttcatgcagc aaaaacataa gacacattct gggggcgatt acggagccc 3420
 aacattttct aacggtggtt aatacagaga cggtaacaag tcagctgatt ttaatagtaa 3480
 taatcatcgt gcttacgggt gcggtgggtc tggggtagc gttagtagtc gagtcgggca 3540
 gcaactgtt gtgttagcta ttgtgtctgt gttaatagta tcaactgtac aacgattaa 3600
 atctccacca gaacatattt gtaatggtgc ttgtgggtta agtagattta tctaataatg 3660
 tgtgtatat agttgccggt tgtgtgttg ttagcatgtt gtactacca ttttccagca 3720
 acgatgttaa agcgtccagc tatgcccggag cagtttttaa agggagtggt gtatcatgg 3780
 acaggaatc gtttgcctca tttgggagtt gcgatattcc aaagcatgta gccgagcca 3840
 tcaactaagg tgctacaaa gagcacgat ctgatataat ggtaaaaaga ggtgaagtga 3900
 ccgttcgtgt tgtgactctc accgaaactc tttcataat attatctaga ttgtttggtt 3960
 tggcgggtgt tttgttcatg atatgtttaa tgtctatagt ttggttttgg tgcatagat 4020
 aaattgtgtt agaatgagta tgggatgggt agatagtttg tgtgtgtttg ttggtcgggt 4080
 cataactgag ggatctgaaa gtgttgaggg tgtggaacgg ttttccatta agtttagtga 4140
 ctgaaatg ttaccaccg cgggtgactg tgaatatcgt cagttagggt agaagagtg 4200
 tagtttgaag gatgttggtt ggttacattt taatatgtca tgtgtgaaat gctgtcaaaa 4260
 acttaaatgc aagaacaaa ataaaaatca tagtaaacac gtccaaaatg gatatttac 4320
 caaggtcgtt aatttttcca ttttaggtgt ttgcggtgat tgtgtgagt cttttact 4380
 tgcggacgaa aaacatcatg ttattgtcga tctgagggtt taataggggt tattcaagag 4440

15
actatgttta atattaataa tcagggccat gccacaggcc tcctattggg ttgttccgaa 4500
ggttgttggg gtttatattg ctatttggga agtgatttga ttaaggttgc agtgtactga 4560
ctgggtgtga attgtaccag tccatgtagg gtctgttttc agtatattg 4609
<210> 2
<211> 739
<212> DNA
<213> Beet Necrotic Yellow Vein Virus
<220>
<223> Sequence inserted in pM27
<400> 2
atgtctaggg aaataaccgc tcgacccaat aagaatgtgc ctattgttgt tgggtttgt 60
gttgtggcct tctttgtatt gctggcgctc atgcagcaaa aacataagac acattctggg 120
ggcgattacg gagtcccaac attttctaac ggtggtaaat acagagacgg tacaaggcca 180
gctgatttta atagtaataa tcatcgtgct tacgggtgcg gtgggtctgg gggtagcggt 240
agtagtcgag tccggcagca acttgttgtg ttagctattg tgtctgtgtt aatagatca 300
ctgttacaac gattaagatc tccaccagaa catatttcta atggtgcttg tggtaaaagt 360
agatttatct aatattgtgt tgtatatagt tgccggttgt gttgttggta gcatgttga 420
ctcaccattt ttcagcaacg atgttaaagc gtccagctat gcgggagcag tttttaaagg 480
gagtggctgt atcatggaca ggaattcgtt tgctcaattt gggagtgcg atattccaaa 540
gcatgtagcc gagtccatca ctaaggttgc taccaaagag cacgatgctg atataatggt 600
aaaaagaggt gaagtaccg ttcgtgttgt gactctcacc gaaactcttt tcataatatt 660
atctagattg tttggtttgg cgggtgtttt gttcatgata tgtttaatgt ctatagttg 720
gttttgggtg catagataa 739
<210> 3
<211> 739
<212> DNA
<213> Beet Necrotic Yellow Vein Virus
<220>
<221> mutation
<222> (151)...(174)
<223> Sequence inserted in pM28
<400> 3
atgtctaggg aaataaccgc tcgacccaat aagaatgtgc ctattgttgt tgggtttgt 60
gttgtggcct tctttgtatt gctggcgctc atgcagcaaa aacataagac acattctggg 120
ggcgattacg gagtcccaac attttctaac gctgctaaat tcagagctgc agcaaggcca 180
gctgatttta atagtaataa tcatcgtgct tacgggtgcg gtgggtctgg gggtagcggt 240
agtagtcgag tccggcagca acttgttgtg ttagctattg tgtctgtgtt aatagatca 300
ctgttacaac gattaagatc tccaccagaa catatttcta atggtgcttg tggtaaaagt 360
agatttatct aatattgtgt tgtatatagt tgccggttgt gttgttggta gcatgttga 420
ctcaccattt ttcagcaacg atgttaaagc gtccagctat gcgggagcag tttttaaagg 480
gagtggctgt atcatggaca ggaattcgtt tgctcaattt gggagtgcg atattccaaa 540
gcatgtagcc gagtccatca ctaaggttgc taccaaagag cacgatgctg atataatggt 600
aaaaagaggt gaagtaccg ttcgtgttgt gactctcacc gaaactcttt tcataatatt 660
atctagattg tttggtttgg cgggtgtttt gttcatgata tgtttaatgt ctatagttg 720
gttttgggtg catagataa 739
<210> 4
<211> 119
<212> PRT
<213> Beet Necrotic Yellow Vein Virus
<220>

17
 <221> Modified 13k protein encoded by pM28
 <400> 4
 Met Ser Arg Glu Ile Thr Ala Arg Pro Asn Lys Asn Val Pro Ile Val
 1 5 10 15
 Val Gly Val Cys Val Val Ala Phe Phe Val Leu Leu Ala Phe Met Gln
 20 25 30
 Gln Lys His Lys Thr His Ser Gly Gly Asp Tyr Gly Val Pro Thr Phe
 35 40 45
 Ser Asn Ala Ala Lys Phe Arg Ala Ala Ala Arg Ser Ala Asp Phe Asn
 50 55 60
 Ser Asn Asn His Arg Ala Tyr Gly Cys Gly Gly Ser Gly Gly Ser Val
 65 70 75 80
 Ser Ser Arg Val Gly Gln Gln Leu Val Val Leu Ala Ile Val Ser Val
 85 90 95
 Leu Ile Val Ser Leu Leu Gln Arg Leu Arg Ser Pro Pro Glu His Ile
 100 105 110
 Cys Asn Gly Ala Cys Gly Stop
 115
 <210> 5
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Primer for amplification of RNA-2
 <400> 5
 ctaccttcac ? tcgacat 17
 <210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <221> Primer for amplification of RNA-2
 <400> 6
 tttaaattct ? aactattatc 20
 <210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <221> Primer for amplification of RNA-2
 <400> 7
 accccgttcc atttataccc 20

フロントページの続き

(72)発明者 齋藤 美奈子
 北海道札幌市厚別区大谷地東4丁目2-1
 - 801

(72)発明者 木口 忠彦
 北海道夕張郡栗山町中央4丁目116-4-
 301

(72)発明者 楠目 俊三
北海道夕張郡栗山町中央4丁目116 - 3 -
101

(72)発明者 相馬 ちひろ
北海道江別市上江別464 - 11 サラデエス
タ303

Fターム(参考) 2B030 AA02 AB03 AD04 CA06 CA17
CA19 CB02 CD03 CD07 CD09
CD13

4B024 AA08 CA03 CA04 CA06 CA11
DA01 EA04 FA02 FA07 GA11
GA17 HA01

4B065 AA89X AA97Y AB01 AC20
BA02 BA25 CA53