

Gateway 対応バイナリーベクターの開発と 植物分子生物学への応用

木村 哲哉^{1*}・中川 強²

¹ 三重大学大学院生物資源学研究科

² 鳥根大学総合科学研究支援センター

Development of Gateway binary vectors for plant molecular biology

Tetsuya KIMURA^{1*} and Tsuyoshi NAKAGAWA²

¹ Graduate School of Bioresources, Mie University, 1577 kurimamachiya, Tsu, Mie, 514-8507, Japan

² Department of Molecular and Functional Genomics, Center for Integrated Research in Science,
Shimane University, Matsue, 690-8504, Japan

Abstract

Genome sequencing project provided many sequence informations of plant genome. As a result, transgenic technique is essential to reveal gene function in genome wide analyses of plants. *Agrobacterium*-mediated transformation is a major method in plant genetic engineering. Construction of Ti binary vectors is an essential step in that method. Therefore, acceleration of vector construction enhances genome wide analyses of plants. However, Ti binary vectors are large and have many restriction endonuclease recognition sites outside of multi-cloning sequence and have difficulty in subcloning of a target gene in the vector. Gateway cloning technique is known to facilitate gene construction instead of the use of conventional method with restriction enzymes and DNA ligase. Application of Gateway cloning technique for construction of Ti binary vectors realized efficient cloning of target genes into binary vectors. The new Gateway compatible binary vectors (pGWBs and ImpGWBs) comprise a variety of reporters, epitope tags and selective markers that should make them useful for construction of plasmids for *Agrobacterium*-mediated transformation of plants. Also, Multisite Gateway cloning method was applied to construct a novel promoter swapping binary vector R 4 pGWB.

Key Words: binary vector, BP reaction, Gateway cloning, LR reaction, reporter, tag

1. はじめに

遺伝子組換え技術とは何かと問われれば、「試験管内 (*in vitro*) で目的の DNA をハサミの役割をする制限酵素で切り出し、同じ制限酵素で切断したベクター DNA (遺伝子の運び屋) と混ぜて同じ切り口の糊しろで対合させ、糊の役割をする DNA 結合酵素 (リガーゼ) で結合させて組換え

DNA 分子を作り、生物へ導入する」と答えるのが一般的であろう。遺伝子組換え技術が開発されてから今日まで、制限酵素と DNA リガーゼは遺伝子を切り貼りする上で必須の道具であり、研究者は「パズル」のように様々な制限酵素を組み合わせで自分の欲しい遺伝子を目的のベクターへつないでいた。パズルと述べたのは、自分が必要とする遺伝子の内部に切り出しに使用しようとする制限

2009 年 5 月 25 日受理

* For correspondence (e-mail: t-kimura@bio.mie-u.ac.jp)

酵素の認識部位があれば、目的遺伝子が内部で切断されてしまい、全長をベクターへつなげないからである。PCR法の発達で必要な遺伝子を簡単に取り出せるようになった現在も、制限酵素を使って目的遺伝子をベクターへつなぐという基本は変わっていない。一方、DNA塩基配列決定法の進歩によって多くの生物でゲノム配列の決定がなされ、さらにはEST (Expressed sequence tag) やマイクロアレイ法により発現遺伝子の網羅的解析が行われている。しかし、遺伝子解析の速度が飛躍的に向上しても、これらの情報から推察される蛋白質読み取り枠がコードする蛋白質が、実際に細胞内でいつ生産され、細胞内のどこに局在化しているのか解析したり、さらには蛋白質を過剰生産させたり、遺伝子を破壊することで蛋白質の生産を止めたりして分子生物学的に遺伝子機能を解析する必要がある。これを少数の遺伝子にのみ行っているうちは従来の制限酵素による切り出しでもそれほど困難な作業ではないが、ゲノムレベルでの大量解析を行おうとすると、どの制限酵素を組み合わせたらいいかということを考えるだけでも膨大な作業になる。ベクター側にもこれらの制限酵素に対応した認識部位をつける必要が生じる。さらにせっかく作った組換え遺伝子も、異なるベクターに移し替えるときに、移す側のベクターに制限酵素認識部位がないということも生じる。しかし、最近このような手間から研究者を解放してくれる新たな実験手法である Gateway cloning technology が実用化された。原理はラムダファージのゲノムDNAが大腸菌のゲノムへ組み込まれるときにおこる部位特異的組換え反応を応用したものである。この方法が遺伝子組換え時の「糊とハサミ」からの開放と、遺伝子のハイスループットな解析を可能とする技術として注目をあびている。すでに、細菌や酵母、動物細胞などのベクターでは実用化され応用が進んでいる。一方、植物の形質転換においてもっとも多用される *Agrobacterium tumefaciens* を用いた形質転換に使われるバイナリーベクターでもいくつかの研究グループが Gateway 対応のベクターを開発していたが、それらは作製した研究者によってバックボーンとなるバイナリーベクターが異なっていた。そこで著者らは同じベクターをバックボーンとし、統一されたフォーマットで各種解析用のシリーズ

を開発しその有用性を調べるのと同時に、世界中の植物研究者に提供してきた。そこで著者らの開発した植物用の Gateway 対応バイナリーベクターを中心にして解説する。

2. Gateway クローニング技術の基本

Gateway クローニング技術はラムダファージ DNA と大腸菌 DNA の部位特異的組換え反応を応用している^{1,2)}。ファージ DNA が染色体に組み込まれた後、溶菌に関わる遺伝子の発現が抑制された場合、溶原状態となる。ファージの *attP* 配列 (233 bp) と宿主の *attB* (25 bp) という染色体部位間で組換えが起こることで溶原化は成立するが、この反応はインテグラーゼと IHF タンパク質が必要である (図 1)。組換えが起こると *attL* (100 bp) と *attR* 配列 (124 bp) が生じる。逆にラムダファージ DNA が切り出されてファージの増殖と溶菌が始まるときには *attL* と *attR* の間で組換え反応がおこり *attP* 配列と *attB* 配列が生じる。この反応にはエクシジョナーゼとインテグラーゼ、IHF が必要となる。前者の反応を BP 反応、後者の反応を LR 反応と呼ぶ。Gateway クローニングは、この極めて配列特異性の高い反応を *in vitro* でプラスミドの構築に利用する。Gateway クローニングでは、この配列特異性の高さを応用し、塩基配列をわずかずつ変異させて BP 反応、LR 反応の組み合わせを増やし、クローニングの方向性を持たせている点の特徴である。現在のところ *att* 1~*att* 6 までの 6 つの配列が利用可能で、これらを組み合わせることでクローニングの方向性や連結のパターンを増やすことができる。また、BP 反応に必要なタンパク質が BP クロナーゼ、LR 反応に必要なタンパク質が LR クロナーゼとしてインビトロジェン社から販売されている。最近ではより反応効率が高められ -20°C でも保存可能な BP クロナーゼ II, LR クロナーゼ II も市販されている。Gateway クローニングの概略を図 2 に示した。Gateway クローニングではまず目的の遺伝子をもつエントリークローンの作製を行う。エントリークローンの作製にはアダプター PCR を用いて *attB* 配列をつけ、ドナーベクター (pDONR 221) の *attP1-attP2* 間へ BP 反応で組み込んでエントリークローンを作製する方法と、

TOPO 反応を利用した pENTR/D-TOPO ベクターへのクローニング,あるいは従来の制限酵素をもちいてエントリークローンを構築する方法 (pENTR1A) などがある。pENTR D-TOPO では PCR を行う場合は末端に余分な塩基を付加しないタイプのポリメラーゼ (例えば宝酒造の Pyrobest, 東洋紡の KOD など) を使う必要がある。一方, BP 反応や制限酵素であれば A が付加されてもかまわないのでポリメラーゼは何を用い

ても良い。ついでエントリークローンとデスティネーションベクターとの LR 反応によって目的のベクターを構築する。デスティネーションベクターの *attR1-attR2* 間にはネガティブセレクションマーカーの *ccdB* 遺伝子が組み込まれており,未反応のベクターでは形質転換コロニーが形成されないようになっている。*ccdB* 遺伝子は大腸菌 DNAgyrase を阻害するタンパク質 (control of cell death) をコードし,この遺伝子が発現する

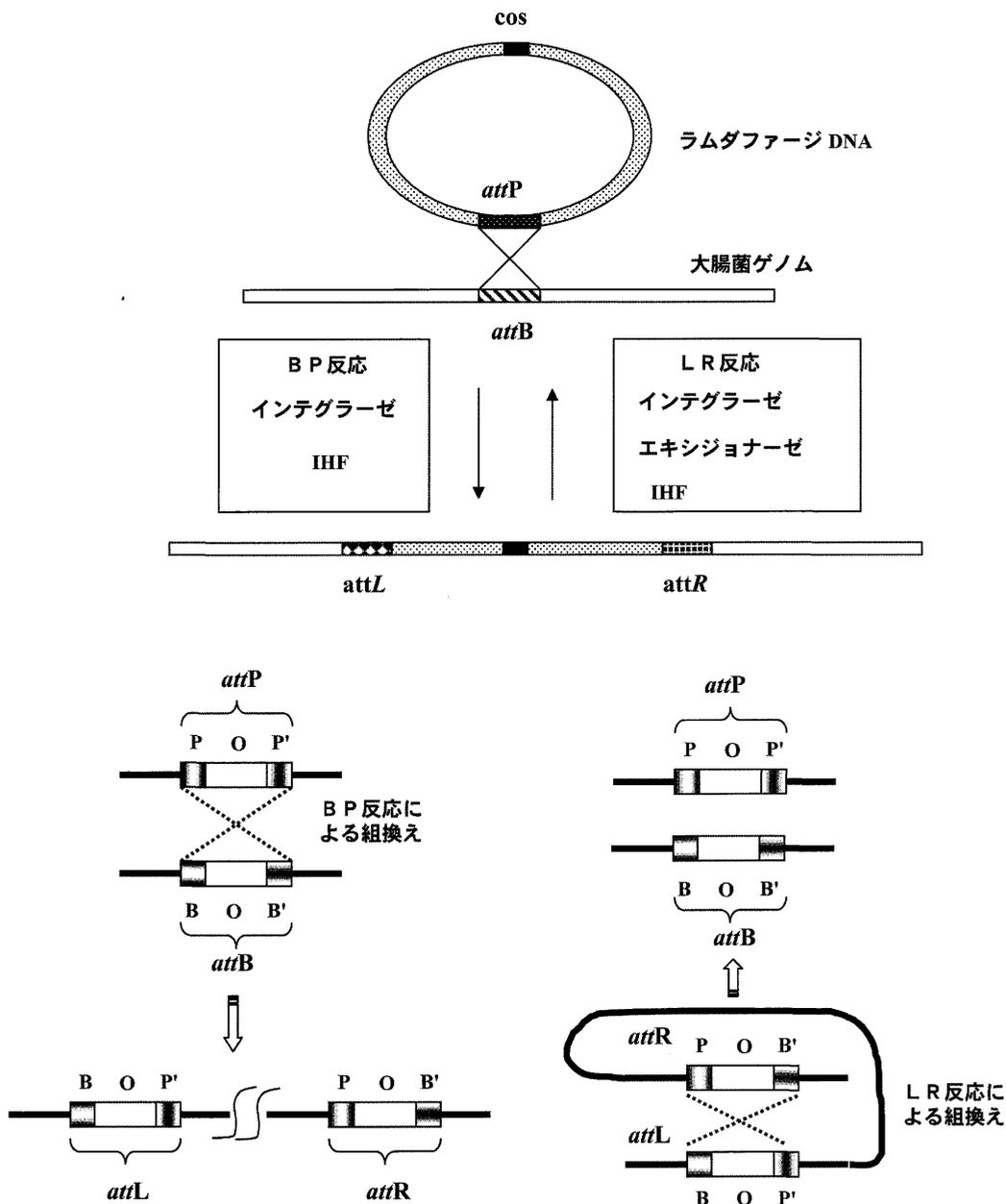


図1. ラムダファージ DNA と大腸菌 DNA の部位特異的組換え反応と BP, LR 反応

P, P' はファージの配列, B, B' は大腸菌の配列を示す。O は 15 bp の相同配列を示す。*attP* と *attB* 配列は相同配列 O を含むが, POP', BOB' の配列特異的な組換えであり, 相同組換えとは異なる。そのためこれらの配列に依存したきわめて特異性が高い組換え反応がおこる。

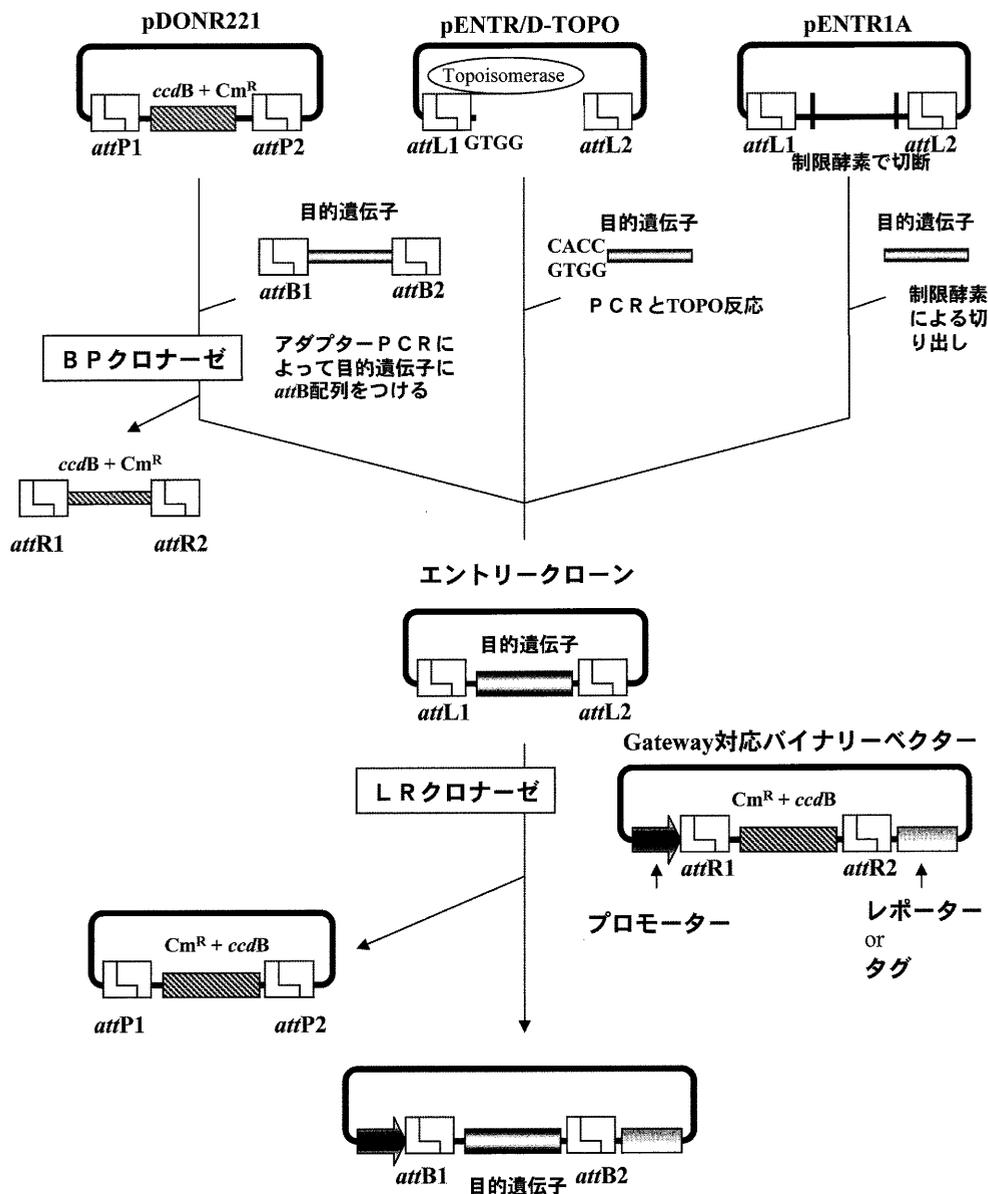


図2. Gateway クローニングの概略

エントリークローンの作製にはBP反応を利用する場合とTOPO反応や制限酵素を使う方法がある。*att*配列をわずかに変異させた*att1*, *att2*を使って配列依存的に特異的組換えを起こさせ目的遺伝子をデスティネーションベクターへ導入する。*ccdB*遺伝子を利用することで目的の組換えプラスミドのみが最終的にコロニーを形成する。

と通常の大腸菌は生育できない。従ってデスティネーションベクターを増幅したり、従来のベクターをデスティネーション化する場合は *gyrase* 変異 *gyrA 462* をもつ大腸菌 (DB 3.1) などを宿主とする必要がある。最終的に得られるクローンは目的の遺伝子両側が *att* 配列の中で最も短い *attB* (25 bp) になっていることがポイントである。それでも制限酵素を用いた場合に比べてクローニングジャンクションが長くなる点に注意が必要である。

もちろん *attB* 配列を介してフレームを合わせれば遺伝子の融合も可能である。また *att* 配列に対するフレームの合わせ方が統一されているため、どのようなデスティネーションベクターに組み込んでも自動的にフレームが合うようになっている。Gateway クローニングの有利な点は、いったんエントリークローンに目的遺伝子をクローニングしてしまえば、どのデスティネーションベクターとでも制限酵素サイトを気にせず組み合わせ可

能で、自由に目的遺伝子をクローニング出来る点にある。例えばある cDNA を大腸菌や酵母さらには動物細胞での発現ベクターに効率よく自由に移し替えることが可能である。

3. 植物形質転換用 Gateway バイナリーベクターの構築

(1) Ti バイナリーベクターと Gateway クローニング

植物の形質転換において最も多用される方法は Ti プラスミドをもつ植物病原菌 *A. tumefaciens* を介する方法である³⁾。この方法は、大腸菌と *A. tumefaciens* 双方で複製可能なシャトルベクター (Ti バイナリーベクター) が用いられる。*A. tumefaciens* が植物に感染すると、Ti プラスミド上の T-DNA 領域が植物細胞へ移行して染色体 DNA に組み込まれる。T-DNA は 25 bp の境界領域に挟まれており、植物ホルモンであるオーキシンとサイトカイニンを合成する遺伝子を含んでいるため、感染した植物細胞はクラウンゴールという腫瘍細胞を形成する。この T-DNA を宿主植物染色体に組み込むには、Ti プラスミド上の別の領域にある *vir* 遺伝子群が必要である。Ti プラスミドと *A. tumefaciens* を利用した植物の形質転換は、T-DNA 上の植物ホルモン合成遺伝子を遺伝子工学的に取り除き、植物での形質転換マーカー遺伝子 (多くはカナマイシン耐性 (*NTPII*) またはハイグロマイシン耐性 (*HPT*) 遺伝子) とマルチクローニング部位を挿入したプラスミドを利用する。このプラスミドには大腸菌でも複製可能な *ori* をのせ、さらに *vir* 遺伝子を別のベクターへ移すことでコンパクトかつ大腸菌を用いての遺伝子構築が可能なるよう改変が行われている。それでも、微生物用などのベクターに比べて全長 10 kb 以上と大きく、さらにベクター上にはクローニングによく利用される制限酵素サイトが複数存在するなど、遺伝子構築上の制約が多かった。そこで、Gateway クローニング技術の導入が考えられた。

現在までに多くの Gateway 対応型のバイナリーベクター (デスティネーションベクター) の構築が報告されている⁴⁾。それらの中には目的遺伝子をカリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35S

プロモーター (P35S) で過剰発現させたり、プロモーター解析のための様々なレポーター遺伝子をもったもの、あるいはタンパク質の局在をみるために C 末や N 末に蛍光タンパクやタグ配列を融合させるものがある⁵⁻⁷⁾。さらには、RNAi による発現抑制のためのヘアピン RNA 発現用ベクター⁶⁾、誘導性プロモーター下流に目的遺伝子をクローニングするベクター⁸⁻¹⁰⁾、Basta 耐性遺伝子をマーカーにしたベクターなどが報告されている¹¹⁾。これらは構築した研究グループが異なるためベクターのバックボーンが異なり、プロモーターの発現強度比較など同じバックボーンのベクターを用いて研究をしたい場合などには不都合であった。そこで著者らは、次に述べるように同じバックボーンのバイナリーベクターを元にして、強力なプロモーターによる過剰発現型、プロモーター解析用レポーター遺伝子を持つタイプからタグをもつタイプ、さらにはプロモーターを交換できるタイプまで様々な用途に使える Gateway バイナリーベクターを構築した。

(2) Gateway binary vector (pGWB) シリーズの構築

著者らは当初、最も広く利用されている Ti バイナリーベクターとして pBI-101 へ P35S: *HPT* マーカー遺伝子を導入したバイナリーベクター pBI-Hm1¹²⁾ を Gateway バイナリーベクター (デスティネーションベクター) 構築のバックボーンに選んだ。このバイナリーベクターは大腸菌中でのコピー数が低くプラスミドの回収量が低いため遺伝子構築時の困難が予想された。そこで、P35S による過剰発現や、レポーター、タグをもつ様々な Gateway カセットを効率よくこのベクターに導入するためまず pUC119 上に *attR1-attR2* カセットを構築してこれをバイナリーベクターへ移し替える方法をとった。そこで出発点となるプラットフォームベクター pUGW2 と pUGW0 を構築した (図 3)。これらはいずれも P35S とノパリン合成酵素遺伝子 (*nos*) ターミネータ (Tnos) カセットをもつ。pUGW2 は C 末端の融合遺伝子構築、pUGW0 は N 末端融合遺伝子構築のためのベクターとして利用した。これらを元にして *Aor51HI* サイト (blunt end) に各種のレポーター遺伝子あるいはタグ遺伝子を PCR

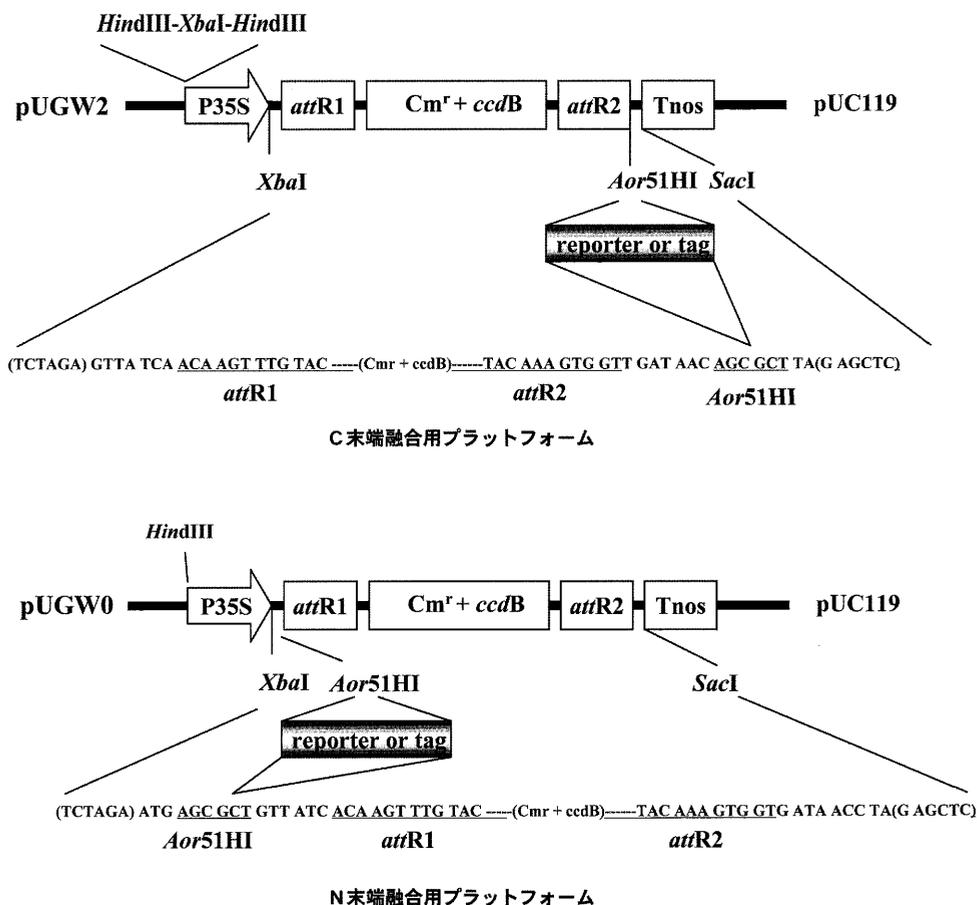


図3. Gateway 対応バイナリーベクター作製を容易にするためのプラットフォームベクター構築

法あるいは合成オリゴ DNA をライゲーションすることで導入した。pUGW2 をベースにした場合、P35S は *XbaI* で切断後、セルフライゲーションすることで簡単に取り除くことができた。このようにして構築した pUGW カセットを Ti バイナリーベクターへ移すことで 36 個のデスティネーションベクター (pGWBs) の構築に成功した。pUGW ベクターはアンピシリン耐性であり、カセットを移す側の Ti バイナリーベクターは大腸菌中ではカナマイシンまたはハイグロマイシン耐性での選抜となるため、カセットが元のベクターへクロニングされてしまう可能性を排除できた。pGWB1 はオリジナルの遺伝子をクロニングするための基本ベクター、pGWB2 は P35S による過剰発現、そして pGWB3 以降はレポーターやタグの融合用ベクターである (図4)。これらのうち代表的なベクターにおけるタグとの融合配列のアミノ酸を図5に示した。

(3) pGWB ベクターの利用と pGWB200 シリーズの追加

pGWB シリーズのうちいくつかのベクターについては実際にトランスジェニック植物を作出して解析を行い有効性を確認した。これらのうち、プロモーター解析用 pGWB3 を用いてシロイヌナズナリン酸トランスポーター遺伝子 (*PHT1*) プロモーターを解析したところ、Gateway を使わない pBI 系ベクターを用いた場合と比較して GUS 活性は低かったが、発現パターンが同じであったことから、pGWB はプロモーター解析に有効であることが示された¹³⁾。発現が弱かったのは GUS の転写開始点と翻訳開始 ATG との距離が *attB* 配列を介することで長くなり、このことが翻訳開始効率あるいは mRNA の安定性に影響を与えたのかもしれない。一般にマーカー遺伝子を P35S で発現させると、同プロモーター上のエンハンサー配列が近隣の遺伝子発現に影響を与え

ることが知られている¹⁴⁾。これはプロモーター解析には問題となることから、我々は *nos* 遺伝子のプロモーター (Pnos) で *HPT* を発現させるマーカー (Pnos: *HPT*) をもつ pGWB203 ベクターを構築し (図 6), 同じ *PHT1* プロモーターを解析したところ, GUS の発現パターンに変化はなかったが GUS 活性は pGWB3 を利用したときの 1/5 であった¹³⁾。このことはプロモーターの解析には pGWB200 シリーズが適していることを示している。*HPT* 遺伝子は大腸菌でも機能するため pBI バイナリーベクターの大腸菌での選抜マーカーはカナマイシンとハイグロマイシンが利用できる。エントリークローンはカナマイシン耐性ベクターを用いる場合が多いため, LR 反応後の形質転換ではハイグロマイシンを利用しなくてはならない。*HPT* 遺伝子は P35S, 今回使用した Pnos (大腸菌用プロモーターと *nos* プロモーターを連結したプロモーター) いずれを用いても大腸菌内で機能し選抜に利用できた。我々の経験では, カナマイシンも同時に培地に加えたほうが正しいクローンを拾える確率が高かったことから, カナマイシンとハイグロマイシン両方を培地に加えている。

(4) 改良型 Gateway バイナリーベクター (ImpGWB) の構築

pGWBs は, Gateway 対応型バイナリーベクターとして有効に機能することが証明されたが, いくつかの欠点も存在した。その一つは大腸菌でのコピー数が少なく回収されるプラスミド量が少ないため制限酵素による解析やシーケンス解析が難しいという点である。また, カナマイシン耐性とハイグロマイシン耐性両方の植物内選抜マーカー

が入っているため, 形質転換植物へさらにもう一度形質転換を行うような実験では別のマーカーを考えなくてはならない点である。そこで, これらの欠点を改善するため大腸菌内でコピー数の多いバイナリーベクター pPZP¹⁵⁾ をバックボーンにした改良型 Gateway バイナリーベクター (ImpGWB) を構築した (図 7)。このベクターは, 植物の抗生物質耐性マーカーとして Pnos 下流に *NPTII* 遺伝子を持つシリーズ (ImpGWB400s) と同プロモーター下流に *HPT* 遺伝子を持つシリーズ (ImpGWB500s) に分けられる。また, 大腸菌や *A. tumefaciens* での選抜マーカーとしてスペクチノマイシン耐性遺伝子 (*spc^r*) が入っており, エントリークローンが持つカナマイシン耐性と選別が可能となっている。このベクターをもちいて LR 反応を行ってみると, pGWB に比べて格段に LR 反応の効率が向上した。pGWB では LR 反応を行う前にベクターを *attR1-attR2* 間の *XhoI* サイトでリニアにしてから反応を行う必要があったが, ImpGWB ではその必要がなかった。実際に植物での形質転換実験も行い, 効率よく組換え体植物を得ることが出来た。この ImpGWB は従来のレポーター, タグに加えてさらに多種類のタグを入れた 86 ものベクターを完成させた¹⁶⁾。これらは多くの研究室に分譲されており, さらに最近の新しい蛍光レポーターを導入した新しいベクターの追加も行いつつある。

(5) 二つの DNA 断片を同時に導入する Gateway バイナリーベクターの構築

組換え遺伝子の構築においては, 複数の遺伝子を連結する必要が生じる場合が多い。例えば, 目

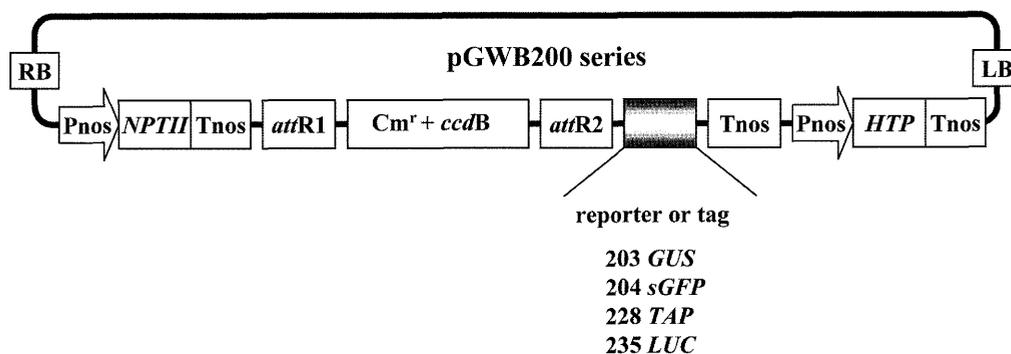
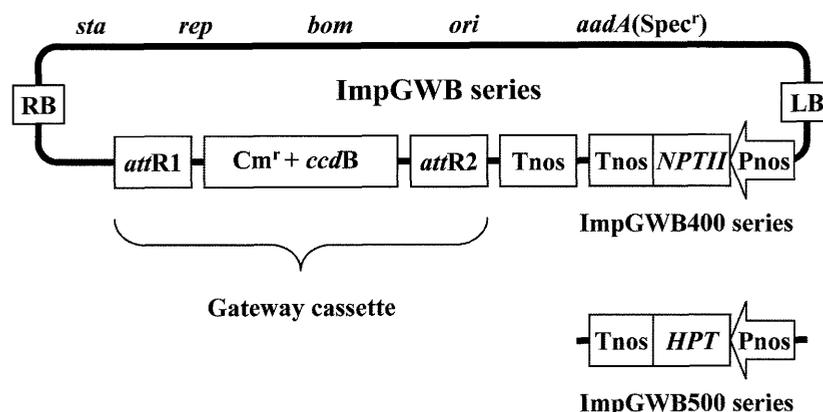


図 6. pGWB200 シリーズのプラスミドマップ



401, 501 Gateway cassette
 402, 502 P35S-Gateway cassette
 402Ω, 502Ω P35Sx2+Ω-Gateway cassette

404-455, 505-555

	sGFP	6xHis	FLAG	3xHA	4xMyc	10xMyc	GST	T 7
発現解析用 (プロモーター なしC末融合)	404	407	410	413	416	419	422	425
	504	507	510	513	516	519	522	525
過剰発現 (C末融合)	405	408	411	414	417	420	423	426
	505	508	511	514	517	520	523	526
過剰発現 (N末融合)	406	409	412	415	418	421	424	427
	506	509	512	515	518	521	524	527
	TAP	GUS	LUC	EYFP	ECFP	G3GFP	mRFP	
発現解析用 (プロモーター なしC末融合)	428	433	435	440	443	450	453	
	528	533	535	540	543	550	553	
過剰発現 (C末融合)	429			441	444	451	454	
	529			541	544	551	554	
過剰発現 (N末融合)				442	445	452	455	
				542	545	552	555	

図7. ImpGWB シリーズのプラスミドマップとレポーター、タグ一覧

的遺伝子を異なるプロモーターで発現させ比較するような場合、制限酵素による従来の方法ではさらなる制約がかかり構築困難が予想される。しかし、Gatewayを使うと制限酵素認識部位を気にすることなく構築が可能となる。BP 反応, LR 反応における配列依存性は極めて厳密であり, *att* 配列をわずかに変異させることで複数の組み合わせが可能となり, 方向性をもってクローニングができることがポイントである。現在までに *att* 1, *att* 2, *att* 3, *att* 4, *att* 5, *att* 6 までの組み合わせがあり, これらを使うことで複数の遺伝子の連結を可能にした報告もされている^{17, 18)}。そこ

で, 我々はこの方法を応用し, さらに既存のデスティネーションベクター ImpGWB を改変してプロモーター交換型のデスティネーションベクター (R4pGWB) (図8) を構築した¹⁹⁾。このベクターは ImpGWB 上の *att*R1 配列を *att*R4 配列に交換して構築したので, ImpGWB 上に構築したのと同じレポーターやタグが利用できる。また, pDONR P4-P1R ベクター上に *att*P1 が逆方向 (*att*P1R) で存在するため, アダプター PCR で増幅したプロモーター断片を BP 反応して出来るエンタリークローンに *att*R1 サイトが生じる。このため以前に構築した *att*L1-*att*L2 タイプの目的

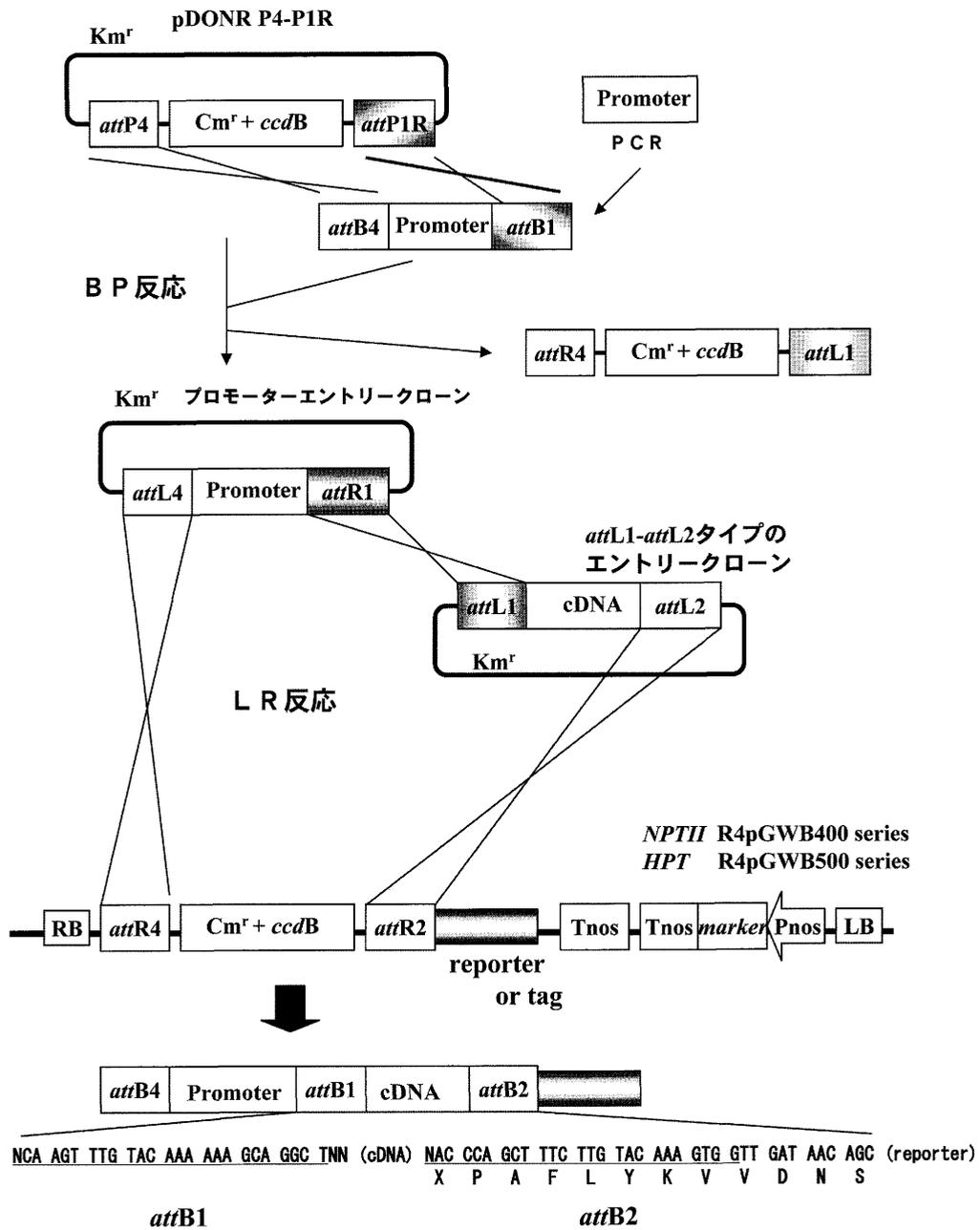


図8. R4pGWB シリーズを利用したプロモーター交換の方法概略

遺伝子エントリークローンも利用可能となっている。このベクターの実証も行い有効性を確認している¹⁹⁾。

4. おわりに

遺伝子組換え技術が確立してから今日まで多くの新しい技術がこの分野の発展を支えてきたが、制限酵素と DNA リガーゼを用いて遺伝子を切り貼りするという方法は変わらなかった。しかし、

Gateway 技術が開発され Gateway 対応プラスミドや遺伝子ライブラリーなどが市販されるに従い、制限酵素という制約に縛られることなく遺伝子の構築が出来る可能性が広がっている。Gateway 技術は特に遺伝子を連結する場合に非常に有効であり、最近応用範囲が広がっている新しい蛍光レポーター遺伝子と目的の遺伝子を融合する場合などにも利用が期待される。また、植物の形質転換用の新しいマーカー遺伝子が報告されており^{20, 21)}、これらを使った Gateway バイナリーベクター構

築も急がれる。遺伝子組換えによる植物体の作出では、複数の遺伝子を同時に導入したい場合がある。Gateway 技術の優れている点は、一度エントリークローンを作ったら、これを利用してデスティネーションベクターを自由に変えて発現ベクターを構築出来ることにある。Gateway の利点を生かした遺伝子の多重連結方法の開発も行われつつある²²⁾。

謝 辞

本稿で紹介した研究の一部は日本学術振興会の科学研究費補助金により行われた。本稿寄稿の機会を与えていただきました田口寛先生に御礼申し上げます。

和文要約

近年のゲノムプロジェクトによって多くの植物ゲノムの配列が明らかになりつつある。この情報によって、各種遺伝子の発現パターンやプロテオーム解析による遺伝子のゲノムワイドな解析がすすめられている。しかし、最終的に遺伝子の機能を解析するには、レポーター遺伝子やタグなどを使った組換え植物体での発現解析、局在性解析や遺伝子ノックアウトなどの研究が不可欠である。このような網羅的解析にはハイスループットな遺伝子操作技術が必須である。植物の形質転換ではアグロバクテリウムをもちいた方法が主流であるが、このとき使用される Ti バイナリーベクターは分子量が大きく、また、多くの制限酵素認識部位がマルチクローニングサイト以外にも多く存在しており、目的遺伝子のクローニングには困難を伴う。そこで、最近注目されている制限酵素を利用しない Gateway クローニング技術を応用したバイナリーベクターの構築がいくつかの研究室から報告されている。本稿では、著者らが同じバイナリーベクターから遺伝子クローニング、レポーター解析、タグ融合解析用に開発した pGWB と ImpGWB について解説した。また、Gateway 多重連結の技術を応用したプロモーター交換型バイナリーベクター R4pGWB についても述べた。今後はさらに多くの遺伝子を連結できるベクターの開発が望まれる。

引用文献

- 1) HARTLEY, J. L., TEMPLE, G. F. and BRASCH, M. A. (2000) DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Res.* **10**: 1788-1795.
- 2) WALHOUT, A. J., TEMPLE, G. F., BRASCH, M. A., HARTLEY, J. L., LORSON, M. A., van den HEUVEL, S. and VIDAL, M. (2000) GATEWAY recombinational cloning: application to the cloning of large numbers of open reading frames or ORFeomes. *Methods Enzymol.* **328**:14 575-592.
- 3) BEVAN, M. (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res.* **12**: 8711-8721.
- 4) KARIMI, M., DEPICKER, A. and HILSON, P. (2007) Recombinational cloning with plant gateway vectors. *Plant Physiol.* **145**: 1144-1154.
- 5) KARIMI, M., INZE, D. and DEPICKER, A. (2002) GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.* **7**: 193-195.
- 6) CURTIS, M. D. and GROSSNIKLAUS, U. (2003) A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiol.* **133**: 462-469.
- 7) BRAND, L., HORLER, M., NUESCH, E., VASSALLI, S., BARRELL, P., YANG, W., JEFFERSON, R. A., GROSSNIKLAUS, U. and CURTIS, M. D. (2006) A versatile and reliable two-component system for tissuespecific gene induction in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **141**: 1194-1204.
- 8) HELLIWELL, C. and WATERHOUSE, P. (2003) Constructs and methods for high-throughput gene silencing in plants. *Methods* **30**: 289-295.
- 9) HILSON, P., ALLEMEERSCH, J., ALTMANN, T., AUBOURG, S., AVON, A., BEYNON, J. and BHALERAO, R. P., BITTON, F., CABOCHE, M., CANNOT, B., CHARDAKOV, V., COGNET-HOLLIGER, C., COLOT, V., CROWE, M., DARIMONT, C., DURINCK, S., EICKHOFF, H., de LONGEVIALLE, A. F., FARMER, E. E., GRANT, M., KUIPER, M. T., LEHRACH, H., LEON, C., LEYVA, A., LUNDEBERG, J., LURIN, C., MOREAU, Y., NIETFELD, W., PAZ-ARES, J., REYMOND, P., ROUZE, P., SANDBERG, G., SEGURA, M. D., SERIZET, C., TABRETT, A., TACONNAT, L., THAREAU, V., VAN HUMMELEN, P., VERCRUYSE, S., VUYLSTEKE, M., WEINGARTNER, M., WEISBEEK, P. J., WIRTA, V., WITTINK, F. R., ZABEAU, M. and SMALL, I. (2004) Versatile gene-specific sequence tags for *Arabidopsis* functional

- genomics:transcript profiling and reverse genetics applications. *Genome Res.* **14**: 2176-2189.
- 10) MIKI, D. and SHIMAMOTO, K. (2004) Simple RNAi vectors for stable and transient suppression of gene function in rice. *Plant Cell Physiol.* **45**: 490-495.
 - 11) EARLEY, K. W., HAAG, J. R., PONTES, O., OPPER, K., JUEHNE, T., SONG, K. and PIKAARD, C. S. (2006) Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *Plant J.* **45**: 616-629.
 - 12) MITA, S., SUZUKI-FUJII, K. and NAKAMURA, K. (1995) Sugar-inducible expression of a gene for β -amylase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **107**: 895-904.
 - 13) NAKAGAWA, T., KUROSE, T., HINO, T., TANAKA, K., KAWAMUKAI, M., NIWA, Y., TOYOOKA, K., MATSUOKA, K., JINBO, T. and KIMURA, T. (2007) Development of series of Gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J. Biosci. Bioeng.* **104**: 31-41.
 - 14) ZHENG, X., DENG, W., LUO, K., DUAN, H., CHEN, Y., McAVOY, R., SONG, S., PEI, Y. and LI, Y. (2007) The cauliflower mosaic virus (CaMV) 35 S promoter sequence alters the level and patterns of activity of adjacent tissue- and organ-specific gene promoters. *Plant Cell Rep.* **26**: 1195-1203.
 - 15) HAJDUKIEWICZ, P., SVAB, Z. and MALIGA, P. (1994) The small, versatile *pPZP* family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. *Plant Mol. Biol.* **25**: 989-994.
 - 16) NAKAGAWA, T., SUZUKI, T., MURATA, S., NAKAMURA, S., HINO, T., MAEO, K., TABATA, R., KAWAI, T., TANAKA, K., NIWA, Y., WATANABE, Y., NAKAMURA, K., KIMURA, T. and ISHIGURO, S. (2007) Improved Gateway binary vectors: high-performance vectors for creation of fusion constructs in transgenic analysis of plants. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**: 2095-2100.
 - 17) SASAKI, Y., SONE, T., YOSHIDA, S., YAHATA, K., HOTTA, J., CHESNUT, J. D., HONDA, T. and IMAMOTO, F. (2004) Evidence for high specificity and efficiency of multiple recombination signals in mixed DNA cloning by the Multisite Gateway system. *J. Biotechnol.* **107**: 233-243.
 - 18) KARIMI, M., BLEYS, A., VANDERHAEGHEN, R. and HILSON, P. (2007) Building blocks for plant gene assembly. *Plant Physiol.* **145**: 1183-1191.
 - 19) NAKAGAWA, T., NAKAMURA, S., TANAKA, K., KAWAMUKAI, M., SUZUKI, T., NAKAMURA, K., KIMURA, T. and ISHIGURO, S. (2008) Development of R4 gateway binary vectors (R4pGWB) enabling high-throughput promoter swapping for plant research. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **72**: 624-629.
 - 20) KAWAI, K., KAKU, K., IZAWA, N., SHIMIZU, T., FUKUDA, A. and TANAKA, Y. (2007) A novel mutant acetolactate synthase gene from rice cells, which confers resistance to ALS13 inhibiting herbicides. *J. Pestic. Sci.* **32**: 89-98.
 - 21) KOIZUMI, N. and IWATA, Y. (2008) Construction of a binary vector for transformation of *Arabidopsis thaliana* with a new selection marker. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **72**: 3041-3043.
 - 22) CHEN, Q. J., ZHOU, H. M., CHEN, J. and WANG, X. C. (2006) A Gateway-based platform for multigene plant transformation. *Plant Mol. Biol.* **62**: 927-936.