

(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

特開平11 - 253164

(43)公開日 平成11年(1999) 9月21日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	F I		
C12N 15/09	ZNA	C12N 15/00	ZNA	A
A01H 1/00		A01H 1/00		A
C12N 5/10		C12N 9/50		
9/50		C12N 5/00		C
//(C12N 15/09	ZNA			

審査請求 有 請求項の数 7 O L (全23頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平10 - 60158

(22)出願日 平成10年(1998) 3月11日

特許法第30条第 1 項適用申請有り 平成 9 年11月15日
第20回日本分子生物学会年会準備委員会発行の「第20回
日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集」に発表

(71)出願人 591127076

農林水産省農業生物資源研究所長
茨城県つくば市観音台 2 丁目 1 - 2

(72)発明者 大橋 祐子

茨城県つくば市観音台 2 丁目 1 - 2 農林
水産省 農業生物資源研究所内

(72)発明者 瀬尾 茂美

茨城県つくば市観音台 2 丁目 1 - 2 農林
水産省 農業生物資源研究所内

(74)代理人 弁理士 山本 秀策

(54)【発明の名称】細胞死を調節する方法

(57)【要約】

【課題】 細胞死を調節すること

【解決手段】 タバコDS9遺伝子などの細胞死調節遺伝子を単離し、植物発現ベクターに組み込み、これらの遺伝子を植物で発現させることにより、細胞死の調節が可能な植物を取得した。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 植物において細胞死を調節する方法であって、

DS9もしくはそのホモログをコードする遺伝子、またはその一部を含むポリヌクレオチドで、植物細胞を形質転換する工程；および該形質転換した植物細胞を再分化させて、植物を得る工程、を包含し、

ここで、該DS9もしくはそのホモログは、ATP依存性Zn型メタロプロテアーゼであり、該ポリヌクレオチドは、該植物細胞中でATP依存性Zn型メタロプロテアーゼの産生を減少または増大させ、それによって該植物中の細胞の細胞死が促進、または抑制される、方法。

【請求項 2】 前記ポリヌクレオチドが前記DS9もしくはそのホモログをコードする遺伝子、またはその一部をアンチセンスで含み、前記植物中の細胞の細胞死が促進される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】 植物に環境ストレスに対する抵抗性を付与する方法であって、

DS9もしくはそのホモログをコードする遺伝子、またはその一部を含むポリヌクレオチドで、植物細胞を形質転換する工程；および、

該形質転換した植物細胞を再分化させて、植物を得る工程、を包含し、

ここで、該DS9もしくはそのホモログは、ATP依存性Zn型メタロプロテアーゼであり、該ポリヌクレオチドは、該植物細胞中でATP依存性Zn型メタロプロテアーゼの産生を減少または増大させる、方法。

【請求項 4】 前記環境ストレスが病原体感染である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】 前記ポリヌクレオチドが前記DS9もしくはそのホモログをコードする遺伝子、またはその一部をアンチセンスで含む、請求項 3 または 4 に記載の方法。

【請求項 6】 前記ホモログが、DS9に対して、ATPase 領域において約70%以上の相同性を有する、請求項 3 または 4 に記載の方法。

【請求項 7】 DS9またはそのホモログをコードする遺伝子の選択的な阻害剤をスクリーニングする方法であって、

該DS9またはそのホモログをコードする遺伝子を有する植物細胞に、阻害剤候補物質を導入する工程；および、該植物細胞において該DS9またはそのホモログの産生が選択的に減少したか否かを同定する工程、を包含し、

ここで、該DS9もしくはそのホモログは、ATP依存性Zn型メタロプロテアーゼである、方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、細胞死を調節する方法に関する。さらに詳しくは、細胞死調節遺伝子の発現レベルを調節することにより、様々な環境ストレスに対して、植物に抵抗性を付与する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】植物は、病原体（例えば、ウイルス、細菌、糸状菌およびウイロイド）に感染すると、1) 病原体が全身に広がって、増殖することにより病気になるか、または、2) 感染部位に病原体を封じ込め、全身への広がりを抑えることにより病原体に対して抵抗性になるかのいずれかの反応を示す。病原体に対する植物の後者のような反応は、超過敏反応 (hypersensitive response、HR) と呼ばれる。この反応においては、感染した部位に局所的な細胞死が生じ、壊死病斑が形成されることが知られている。このような病原体感染に伴う壊死病斑形成は植物の典型的な抵抗性反応であり、プログラム細胞死と考えられる。しかし、その分子機構はほとんど解っていない。

【0003】HRは、全ての植物において生じるわけではない。植物において、感染した病原体に由来する病原性遺伝子の産物を認識する遺伝子が、内因的に存在する場合に生じる。このような遺伝子が存在しない場合、HRは生じず、植物は病原体感染に対して非抵抗性である。

【0004】タバコモザイクウイルス (TMV) 感染に対するタバコのHRは、従来から植物のHRを研究するために用いられてきたモデル系である。

【0005】N遺伝子は、TMVの感染によるHR (すなわち、細胞死) に関与する細胞死調節遺伝子の1つである。TMV感染に対して、N遺伝子を有するタバコ (NNタバコ) はHRを生じるが、N遺伝子を有さないタバコ (nnタバコ) はHRを生じない (Holmes, *Phytopathology* 28, 553, (1938)) ことが報告されている。NNタバコのHRは、24 以下の温度においてのみ生じ、28 以上では生じない。それゆえ、N遺伝子および温度条件の両方が、TMVに感染した細胞におけるHRの誘発に必須であると考えられてきた。

【0006】しかし、本発明者らの研究により、アクチノマシシンD (AMD) および熱 (50、2分) で処理した場合、通常はHRを生じない30 の温度条件下でも、NNタバコにおいて、TMV感染に対するHRが誘発されることが見出された。さらに、TMV感染に対するHRは、AMDおよび熱での同様な処理によって、N遺伝子を有さないnnタバコにおいても誘発された。これらにより、TMV感染に対する細胞死が、N遺伝子の存在および非存在、ならびに温度とは無関係に生じ得ることが明らかになった (ShimomuraおよびOhashi, *Virology*, 43, 531, (1971); OhashiおよびShimomura, *Virology*, 48, 601 (1972))。AMDは核におけるDNA依存性のRNAを阻害することが知られている。従って、植物において新規な細胞調節遺伝子が存在し、その転写および引き続くタンパク質合成の抑制によりHRが誘発される可能性が示された。

【0007】このような細胞死調節遺伝子が同定されれば、その発現レベルをコントロールすることにより、植物細胞死を調節 (促進または抑制) することが可能であ

ると考えられる。特に、細胞死を調節することにより、環境ストレスに対する抵抗性を植物に付与することは、農業の分野において重要な課題である。

【 0 0 0 8 】しかし、このような細胞死調節遺伝子はこれまでに同定されておらず、発現レベルを調節して細胞死を促進または抑制することにより、環境ストレスに対して抵抗性を付与するという研究は、全くなされていないのが現状である。

【 0 0 0 9 】

【発明が解決しようとする課題】本発明は上記の問題を解決するためのものであり、その目的とするところは、細胞死調節遺伝子の発現レベルを調節して、細胞死を促進または抑制する方法を提供することにある。また、本発明は、細胞死を調節することにより、環境ストレス（例えば、病害体感染）に対して抵抗性が付与された植物を作出する方法を提供する。さらに、本発明は、細胞死調節遺伝子の選択的な阻害剤をスクリーニングする方法を提供する。

【 0 0 1 0 】

【課題を解決するための手段】本発明は、DS9もしくはそのホモログをコードする遺伝子、または、その一部を含むポリヌクレオチドで植物細胞を形質転換する工程、および上記の形質転換した植物細胞を再分化させて植物を得る工程、を包含する、植物において細胞死を調節する方法に関する。上記のDS9もしくはそのホモログはATP依存性Zn型メタロプロテアーゼであり、上記のポリヌクレオチドは、植物細胞中でATP依存性Zn型メタロプロテアーゼの産生を減少または増大させ、それによって植物中の細胞の細胞死が促進、または抑制される。DS9もしくはそのホモログをコードする遺伝子、またはその一部を含むポリヌクレオチドは、公知の遺伝子組換え技術により、植物細胞中の核内のDNAに組み込まれて存在する。なお、ポリヌクレオチドは、ヌクレオチドの重合体を意味し、特定の鎖長に限定されない。

【 0 0 1 1 】1つの実施態様においては、上記のポリヌクレオチドは、上記のDS9もしくはそのホモログをコードする遺伝子、またはその一部をアンチセンスで含み、上記の植物中の細胞の細胞死が促進される。

【 0 0 1 2 】本発明はまた、DS9もしくはそのホモログをコードする遺伝子、またはその一部を含むポリヌクレオチドで植物細胞を形質転換する工程、および上記の形質転換した植物細胞を再分化させて植物を得る工程を包含する、植物に環境ストレスに対する抵抗性を付与する方法に関する。ここで、上記のDS9もしくはそのホモログは、ATP依存性Zn型メタロプロテアーゼであり、上記

のポリヌクレオチドは、植物細胞中でATP依存性Zn型メタロプロテアーゼの産生を減少または増大させる。

【 0 0 1 3 】1つの実施態様においては、上記の環境ストレスは、病原体感染である。

【 0 0 1 4 】1つの実施態様においては、上記のポリヌクレオチドは、上記のDS9もしくはそのホモログをコードする遺伝子、またはその一部をアンチセンスで含む。

【 0 0 1 5 】1つの実施態様においては、上記のホモログが、DS9に対して、ATPase領域において約70%以上の相同性を有する。

【 0 0 1 6 】さらに、本発明は、DS9もしくはそのホモログをコードする遺伝子を有する発現系に、阻害剤候補物質を導入する工程、および、上記の発現系においてDS9またはそのホモログの産生が選択的に減少したか否かを同定する工程、を包含する、DS9もしくはそのホモログをコードする遺伝子の選択的な阻害剤をスクリーニングする方法に関する。ここで、上記のDS9もしくはそのホモログは、ATP依存性Zn型メタロプロテアーゼである。

【 0 0 1 7 】

【発明の実施の形態】本発明者らは、高等植物から新たに単離したATP依存性Zn型メタロプロテアーゼの1種であるDS9およびそのホモログが、細胞死を調節する因子であることを解明した。この調節は、例えば、環境ストレス下においてDS9またはそのホモログの産生が抑制されることにより、植物細胞における細胞死が誘発されることで行われる。本発明は、この新規な知見に基づいて完成された。

【 0 0 1 8 】本発明者らは、タバコにおいてHRが生じる際に特異的に発現する6つのクローンを単離した。単離したクローンの1つを「DS9遺伝子」と名付け、その全塩基配列を決定した。

【 0 0 1 9 】DS9遺伝子がコードする推定のアミノ酸配列について、ホモロジー検索を行った。その結果、ATP依存性Zn型メタロプロテアーゼである、大腸菌のFtsH、酵母のOsd1p、シロイヌナズナのArFtsH、およびレッドペーパーのPftfのアミノ酸配列と、それぞれ、40%、30%、79%および42%の相同性を示した。特に、ATPaseに特有の保存性領域において相同性が高かった。表1は、本発明におけるDS9と、大腸菌のFtsH、酵母のOsd1p、シロイヌナズナのArFtsH、およびレッドペーパーのPftfとの間のアミノ酸配列を比較した表である。各アミノ酸は1文字表記で表している。

【 0 0 2 0 】

【表1】

Walker モチーフ A										
DS9	KNPDKYTALG	AKIPKGCLLV	GPPGTPKTLT	ARAVAGEAGV	PFFSQAASEF	VELFVGVGAS	332			
ArFtsH	RE.SRFQK	G.V.M	K.I.K	TISG.D	M	231				
FtsH	D.T.E.S	G.L.V.T	T	D.FMSG	D.VY	360				
Osd1p	K.ERF.V	R.V	K.I	ISG	M	309				
Pftf										

Walker モチーフ B										
DS9	RVRDLFEKAK	SKAPCIVFLD	EIDAVGRQRG	AGMGGGNDER	EQTINQLLTE	MDGFSGNSGV	392			
ArFtsH	M.Q	KA.I	L.H	M.V	E.E.I	401				
FtsH	I.AQ.R	R.A.I	L.I.GKRN	P--KDQAYA	K.L.V	291				
Osd1p	K	EN	V	T.I	L	417				
Pftf						369				

SRH										
DS9	IVLAAATNRPD	VLDSALLRPG	RFDRQVTVDR	PDVAGRIKIL	QVHSRGKALA	KDVDFEKIAR	452			
ArFtsH	I	P	V.GL	R.EQ	K.M.RVP	P.I.AAI	461			
FtsH	IIG.F.E	A.K	KV.N.L	R.AD	KH.MKKIT	DN.PTI	351			
Osd1p	V.A	I	S.V	IK.TE	K.AGN.KFD	S.SL.V.M	477			
Pftf							429			

DS9	RTPGFTGADL	QNLMEAAAIL	AARRELKEIS	KNEISDALER	IIAGPEKKNA	VVSEKKKLV	512			
ArFtsH	G.S	A.V	LF	DV	MV.FEK.KDK	MM.A.RRSM	521			
FtsH	G.LS.E	A.V.Q.VY	CQKNAVSD	MSHFEW.KDK	LM.A.R.TM	LTDAARKAT	411			
Osd1p	S	A.L	G.GKTA.A	SK.D.SID	V.M.-GTV	MTDGKS.S.V	537			
Pftf							488			

Zn-結合モチーフ

DS9	AYHEAAHALV	GALMPEYDPV	PKISII PRGQ	AGGLTFFAPS	EERLESGLYS	RSYLENQMAV	572			
ArFtsH	G	A	A	L.V	L.E	GDAISA	581			
FtsH	G.II	R.V.H	H.VT	R	QK	S.IST	468			
Osd1p	F.G	IM	AKYTNGAT.L	YKAT.L	L.I	QL.E	594			
Pftf	Y.VG	IC	TLT.GH	Q.VTL	K.W.I.A	DDPTLI	545			

【0021】DS9には、他のATP依存性Zn型メタロプロテアーゼと同様に、N末端側の膜を貫通すると考えられる疎水性領域（表中「WalkerモチーフA」および「WalkerモチーフB」で示す）、および中央部のATPase領域（「SRH」で示す）、ならびにC末端側のZn²⁺結合モチーフが存在した（図1）。また、大腸菌において組換え発現したDS9は、実際にATPase活性を示した（図2）。これらのことは、本発明におけるDS9が、ATP依存性Zn型メタロプロテアーゼであることを示している。

【0022】DS9遺伝子のHR誘発時における挙動を解析した結果、DS9遺伝子は、HRが生じるまでの間に、転写レベルおよび翻訳産物であるタンパク質の両方において抑制されていることが示された（図3および図4）。TMV感染したNNタバコの葉においては、30 から20 への温度シフト後1時間以内に、その転写レベルおよびタンパク質が減少した。一方、模似感染した葉においては、DS9遺伝子の転写レベルおよびタンパク質量は一定であった（実施例4および6を参照）。また、HRを誘発することが知られているアクチノマイシン（AMD）および熱ショック（HS）処理を行うと、DS9のタンパク質が劇的に減少した（実施例7を参照）。

【0023】上記実験結果に基づいて、本発明者らは、DS9が植物において細胞死を調節する機能を有する因子であることを確認し、その利用方法を開発するために、さらに種々の実験を行った。その結果、以下のことを見出した。

【0024】1) 壊死病斑形成の誘導における各種プロテアーゼ阻害剤の効果を試験した結果、メタロプロテアーゼ阻害剤を用いた場合においてのみ、TMV感染タバコにおいて細胞死が誘導されたこと。

【0025】2) DS9が葉緑体に局在すること。

【0026】3) HRを生じるための条件とされている温度にシフトしなくても、メタロプロテアーゼ阻害および葉緑体の機能の低下のいずれの場合においてもHRが誘発されること。

【0027】4) HR誘発における葉緑体の機能の低下は、DS9タンパク質の減少と相関すること。

【0028】5) アンチセンス方向でDS9遺伝子を導入して、DS9遺伝子の転写レベルおよびタンパク質量が減少された植物においては、細胞死が促進されること。このアンチセンス植物は、病害抵抗性を獲得したこと。

【0029】6) センス方向でDS9遺伝子を導入してDS9遺伝子の転写レベルおよびタンパク質量が増加された植物においては、細胞死が抑制されること。このセンス植物は、スーパーオキシド発生型除草剤に対して、耐性を獲得したこと。

【0030】DS9ホモログであるFtsHは細菌由来である。DS9が細菌起源とされる葉緑体において見出されたことは、その起源を考える上で興味深い。DS9のホモログであるArFtsHもまた、葉緑体に局在することが報告されている（Lindahlら、The Journal of Biological Chemistry. vol 271, pp29329-29334 (1996)）。従って、DS9ホモログが、全般に葉緑体で機能している可能性が示唆される。また、植物中で、DS9およびそのホモログは、同じく細菌起源と考えられるミトコンドリアにおいても機能をしていることが想定される。実際、酵母ミトコンドリアでは、未会合のチトクロームCオキシダーゼのサブユニット2の分解にFtsHホモログが関与することが示されている（Nakai, Tら、Mol.Cell.Biol., 15, 44 41-4452 (1995)）。

【 0 0 3 1 】哺乳動物において、アポトーシスがミトコンドリアにおける電子伝達系の阻害による膜電位の低下によって引き起こされること、およびこの膜電位の低下が細胞死抑制遺伝子産物であるBcl-2などにより阻害されることが報告されている (Zamzami, N.ら, Exp. Med., 182, 367-377 (1995))。また、哺乳動物において、ミトコンドリアにおける電子伝達系が首尾良く機能しない場合に細胞死が生じることは、Kripperら (The Journal of Biological Chemistry, 271, 21629, (1996)) およびQuillet-Maryら (The Journal of Biological Chemistry, 272, 21388, (1997)) によっても報告されている。一方、葉緑体において、ある種のプロテアーゼが働くことにより、その恒常性が維持されていることが報告されている (Zatch Adam, Plant Molecular Biology 32:773-783, 1996)。

【 0 0 3 2 】これらを考慮すれば、本発明において調節される細胞死の機構は、下記のように説明することができる。もっともこれは、本発明の方法の範囲が、以下の機構によって限定または束縛されることを意図するものではない。

【 0 0 3 3 】メタロプロテアーゼであるDS9またはそのホモログは、未会合タンパク質または異常タンパク質などを分解することによって、葉緑体およびミトコンドリアの恒常性を維持している。環境ストレス下に植物がおかされると、葉緑体およびミトコンドリア中のDS9もしくはそのホモログをコードする遺伝子の転写が抑制され、翻訳産物のタンパク質レベル (すなわち活性レベル) が低下した組織が現れる。これらの組織では、本発明者により示されたように細胞死が誘導される。葉緑体およびミトコンドリアにおいて未会合タンパク質もしくは異常タンパク質などが増加し、そしてこれらが蓄積されて、葉緑体およびミトコンドリアの機能 (ATPまたはNADPH生産) の低下が引き起こされる。光合成の場である葉緑体においては、この機能の低下により光エネルギーが首尾良く葉緑体の中で処理されなくなり、その結果、活性酸素が植物細胞内に発生する。このような細胞内の恒常性の崩壊 (電子伝達系の崩壊およびそれによる活性酸素の蓄積) が生じることにより、細胞は最終的に死に至る。DS9もしくはそのホモログはこれらの不要なタンパク質を分解することによって細胞を死から救い、恒常性を維持させるために機能していると考えられる。

【 0 0 3 4 】従って、種々の要因により、同様な細胞死の機構は、植物細胞に限らず、真核細胞全般において存在する可能性が予想される。

【 0 0 3 5 】以下、本発明を詳しく説明する。

【 0 0 3 6 】本発明者らは、上述のように、その発現レベルに応じて、細胞死を促進または抑制する、細胞死調節遺伝子の機能を解明し、これに基づいて本発明を完成させた。

【 0 0 3 7 】本発明は、細胞死調節遺伝子の発現レベル

を調節して、細胞死を促進または抑制する方法を提供する。本発明は、さらに、細胞死を調節することにより、環境ストレスに対して抵抗性が付与された植物を作出する方法を提供する。

【 0 0 3 8 】本明細書において、「細胞死調節遺伝子」とは、その発現レベルに応じて、細胞死を促進または抑制する遺伝子をいう。DS9およびそのホモログをコードする遺伝子、ならびにその一部は、本発明において意図される細胞死調節遺伝子である。

10 【 0 0 3 9 】遺伝子についての「発現」とは、DNAのmRNAへの転写をいう。mRNAへの転写の程度を発現レベルとして示す。従って、転写が抑制される場合は発現レベルが減少されることを、および転写が促進される場合は発現レベルが増大されることをいう。

【 0 0 4 0 】「DS9」は、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を有するATP依存性Zn型メタロプロテアーゼである。「ATP依存性Zn型メタロプロテアーゼ」とは、その酵素作用のためにATPを必要とし、活性中心に 2 価の金属イオン (代表的には Zn^{2+}) を含むプロテアーゼをいう。この酵素は、そのアミノ酸配列において、N末端側に 1 つ以上の疎水性領域、C末端側に金属イオン結合領域 (代表的には Zn^{2+} 結合領域)、その中間にATPase領域を有する。代表的には、N末端側に 2 つの疎水性領域を有し、そしてC末端側に Zn^{2+} 結合領域を有する。

【 0 0 4 1 】「DS9のホモログ」とは、DS9と同様のATP依存性メタロプロテアーゼであって、DS9と比較して、全アミノ酸配列について少なくとも約30%以上、好ましくは約40%以上の相同性を有し、さらにATPase領域のアミノ酸配列について少なくとも約60%以上、好ましくは約70%以上の相同性を有するタンパク質をいう。このよ

30 うなホモログとしては、大腸菌のFtsH、酵母のOsd1p、シロイヌナズナのArFtsH、およびレッドペーパーのPftfが挙げられる。

【 0 0 4 2 】DS9およびそのホモログをコードする天然由来の遺伝子を単離する方法としては、例えば、mRNA量の変化を示す遺伝子をクローニングするのに有効なディファレンシャルスクリーニングを用い得る。ディファレンシャルスクリーニングを行うための遺伝子ライブラリーの作製法、プローブとのハイブリダイゼーションに使用するストリンジェントな条件、および遺伝子のクローニング法は当業者に周知である。例えば、マニアティスらのMolecular Cloning, A Laboratory Manual、第 2 版、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989) を参照。

40 【 0 0 4 3 】新規なDS9のホモログをコードする遺伝子もまた、細胞死調節遺伝子として使用され得る。このような新規遺伝子は、DS9もしくは公知のそのホモログをコードする遺伝子、またはその断片をプローブとして、種々の生物の遺伝子ライブラリーから得ることができ

50 る。例えば、植物の遺伝子ライブラリー、大腸菌遺伝子

ライブラリー、および酵母遺伝子ライブラリーが使用され得る。ライブラリーをスクリーニングするためのストリンジентな条件は、当業者により適宜選択される。

【 0 0 4 4 】得られた遺伝子によりコードされるアミノ酸配列が、DS9のホモログであるか否かは、得られた遺伝子にコードされるアミノ酸配列とDS9のアミノ酸配列とを、市販のコンピューター解析ソフト（例えば、Gene Works (IntelliGenetics, Inc.)）を使用してアラインメントし、両者の相同性を調べることにより、容易に決定され得る。

【 0 0 4 5 】DS9もしくはそのホモログをコードする遺伝子（以下、必要に応じて「DS9関連遺伝子」という）、またはその一部としては、天然由来の遺伝子だけでなく、人工的に合成した遺伝子またはその一部も用い得る。

【 0 0 4 6 】「その一部」とは、DS9またはそのホモログの細胞死調節機能を再現するのに十分な程度の長さを有する本発明における遺伝子の断片をいう。

【 0 0 4 7 】アンチセンスでDS9関連遺伝子を導入する場合における「その一部」は、植物内において、その一部から産生されるアンチセンスRNAが、センス鎖からなるmRNAの翻訳を阻害するのに十分な相補性および長さを有する断片をいう。断片は、当該植物中に存在する内因性のDS9関連遺伝子の相補的な領域と、塩基配列レベルで代表的には50%、好ましくは80%、より好ましくは90%、さらにより好ましくは95%以上の同一性（センス鎖として）を有する。断片の長さは、代表的には約20ヌクレオチド以上であり、好ましくは約50ヌクレオチド以上、より好ましくは約100ヌクレオチド以上、さらにより好ましくは200ヌクレオチドである。

【 0 0 4 8 】センスでDS9関連遺伝子を導入する場合における「その一部」とは、発現産物であるDS9またはそのホモログがメタロプロテアーゼ活性を有するに十分な領域をコードする配列を含む、当該遺伝子の断片をいう。この断片は、好ましくは、メタロプロテアーゼの金属イオン結合領域およびATPase領域をコードし、より好ましくは、目的のオルガネラに存在するための領域をさらにコードする。

【 0 0 4 9 】DS9関連遺伝子、またはその一部は、細胞死調節の目的に応じて、センスまたはアンチセンスで、適切な植物発現ベクターに組み込まれて植物に導入され得る。DS9関連遺伝子またはその一部をアンチセンスで導入する場合、代表的には、細胞死が促進される。DS9関連遺伝子またはその一部をセンスで導入する場合、代表的には、細胞死が抑制される。もっとも、導入遺伝子の発現レベルの程度に応じてコサプレッションが生じ得ることは、当該分野において周知の事項である。コサプレッションは、導入遺伝子のmRNAが過剰に産生される結果、導入遺伝子およびその相同遺伝子である内因性遺伝子の発現レベルが、両方とも抑制されることにより導か

れ得る現象である。コサプレッションが生じると、DS9関連遺伝子の発現レベルが抑制されて、細胞死が促進され得る。

【 0 0 5 0 】当業者に明らかなように、コサプレッションにより本発明の効果が得られる場合には、上記の「その一部」は、メタロプロテアーゼ活性を有するに十分な領域をコードする必要はなく、アンチセンスの場合における「その一部」の定義が援用される。

【 0 0 5 1 】本願発明の方法が適用される「植物」は、10 単子葉植物および双子葉植物のいずれも含む。特に好ましい植物としては、タバコ、ピーマン、ナス、メロン、トマト、サツマイモ、キャベツ、ネギ、ブロッコリー、ニンジン、キウリ、柑橘類、白菜、レタス、モモ、イネ、ジャガイモ、オオムギ、コムギおよびリンゴが挙げられる。また、特に他で示さない限り、植物は、植物体、植物器官、植物組織、植物細胞、および種子のいずれをも意味する。植物器官の例としては、根、葉、茎、および花などが挙げられる。植物細胞の例としては、カルスおよび懸濁培養細胞が挙げられる。

【 0 0 5 2 】本発明の方法に用い得る細胞死調節遺伝子が、20 対象となる植物と同一種または近縁の種（例えば、同一の属、または同一の科に分類される種）に由来することは、好ましい態様であり得るが、必ずしも必要ではない。

【 0 0 5 3 】本発明に用いられる「ポリヌクレオチド」は、DS9感染遺伝子またはその一部、および所望の形質転換を達成するために必要な任意の付加的配列を有する。代表的には植物発現ベクターである。

【 0 0 5 4 】「植物発現ベクター」とは、目的の遺伝子の30 発現レベルを調節するプロモーターなどの種々の調節エレメントが、宿主植物細胞中で作動し得る状態で連結されている核酸配列の組換え構築物をいう。好適には、植物プロモーター、ターミネーター、薬剤耐性遺伝子などのマーカー遺伝子、およびエンハンサーを含み得る。より好適には、複製起点を含み得る。植物発現ベクターのタイプおよび使用される調節エレメントの好適な種類が、宿主細胞に応じて変わり得ることは、当業者に周知の事項である。

【 0 0 5 5 】当業者は、本発明の実施にあたって、プロ40 モーター、エンハンサーなどの調節エレメントを適宜選択することにより、細胞死の程度を調節し得る。

【 0 0 5 6 】本発明に用いる植物発現ベクターはさらにT-DNA領域を有し得る。T-DNA領域は、特にアグロバクテリウムを用いて植物を形質転換する場合に遺伝子の導入の効率を高める。

【 0 0 5 7 】「植物プロモーター」とは、植物細胞において機能し得るプロモーターをいう。例えば、タバコの感染特異的タンパク質PR-1のプロモーター（以下、タバコPR-1プロモーターという）、熱ショックにより誘導されるプロモーターなどの、ある種のストレスにより発現

が誘導されるプロモーター、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)35Sプロモーター、ノパリン合成酵素のプロモーター (Pnos) のような恒常的なプロモーターなどが挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 5 8 】 「ターミネーター」は、遺伝子のタンパク質をコードする領域の下流に位置し、DNAがmRNAに転写される際の転写の終結、ポリA配列の付加に参与する配列である。ターミネーターは、mRNAの安定性に關して遺伝子の発現レベルに影響を及ぼすことが知られている。ターミネーターの例としては、CaMV35Sターミネーター、ノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター (Tnos) 、タバコPR-1遺伝子のターミネーターが挙げられるが、これに限定されない。

【 0 0 5 9 】 「薬剤耐性遺伝子」は、形質転換植物の選抜を容易にする遺伝子であることが望ましい。カナマイシン耐性を付与するためのネオマイシンフォスフトランスフェレースII (NPTII) 遺伝子、およびハイグロマイシン耐性を付与するためのハイグロマイシンフォスフトランスフェレース遺伝子などが好適に用いられ得る。

【 0 0 6 0 】 薬剤耐性遺伝子を発現させるプロモーターの例としては、上記植物プロモーター、例えば、タバコPR-1プロモーター、CaMV35Sプロモーター、ノパリン合成酵素プロモーターなどが挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 6 1 】 「エンハンサー」は、目的遺伝子の発現効率を高めるために用いられ得る。エンハンサーとしては、CaMV35Sプロモーター内の上流側の配列を含むエンハンサー領域が好適である。エンハンサーは、1つの目的遺伝子について複数個用いられ得る。

【 0 0 6 2 】 植物発現ベクターの構築に用いるベクターとしては、pBI系のベクター、pUC系のベクターあるいはpTRA系のベクターが好適に用いられ得る。

【 0 0 6 3 】 pBI系およびpTRA系のベクターは、アグロバクテリウムを介して植物に目的の遺伝子を導入し得る。pBI系のバイナリーベクターまたは中間ベクター系が好適に用いられ得る。例えば、pBI121、pBI101、pBI101.2、pBI101.3などが挙げられる。これらのベクターは、植物に導入され得る領域 (T-DNA領域) の遺伝子と、マーカー遺伝子として植物プロモーターの支配下で発現されるNPTII遺伝子 (カナマイシン耐性を付与する) とを含む。

【 0 0 6 4 】 pUC系のベクターは、植物に遺伝子を直接導入し得る。例えば、pUC18、pUC19、pUC9などが挙げられる。

【 0 0 6 5 】 本発明の植物発現ベクターは、当業者に周知の遺伝子組換え技術を用いて作製され得る。好適には、上記ベクターのプロモーター下流にDS9関連遺伝子、またはその一部が、センスまたはアンチセンスで組み込まれる。

【 0 0 6 6 】 植物細胞への植物発現ベクターの導入に

は、当業者に周知の方法、例えば、アグロバクテリウムを介する方法および直接細胞に導入する方法が用いられ得る。アグロバクテリウムを介する方法としては、例えば、Nagelらの方法 (*Micriobiol.Lett.*, 67, 325 (1990)) が用いられ得る。この方法では、まず、例えば植物発現ベクターでエレクトロポレーションによってアグロバクテリウムを形質転換し、次いで、形質転換されたアグロバクテリウムをPlant Molecular Biology Manual (S. B. Gelvinら、Academic Press Publishers) に記載の方法で植物細胞に導入する方法である。植物発現ベクターを直接細胞に導入する方法としては、エレクトロポレーション法、遺伝子銃法その他、リン酸カルシウム法およびポリエチレングリコール (PEG) 法などがある。これらの方法は、当該分野において周知であり、形質転換する植物に適した方法が、当業者により適宜選択され得る。

【 0 0 6 7 】 植物発現ベクターを導入することにより形質転換した細胞は、まずカナマイシン耐性などの薬剤耐性を指標として選択される。次いで、常法により、植物組織、植物器官および/または植物体に再分化される。さらに、再生された植物体から種子が取得され得る。このようにして、細胞死調節遺伝子を細胞内に有する植物が得られる。

【 0 0 6 8 】 得られた植物において、DS9関連遺伝子、またはその一部が発現することにより、植物中の細胞の細胞死が促進または抑制され得る。

【 0 0 6 9 】 DS9またはそのホモログの産生 (すなわち、メタロプロテアーゼの産生) が減少された植物においては、通常、細胞死が促進される。細胞死を起こす傾向が適度に強められた植物においては、ある種の環境ストレスに対する抵抗性、特に、病斑形成による病害抵抗性が示され得る。これは主として、局所的な細胞死が促進されて感染領域で増殖する病原体が封じ込められることにより、感染部位の広がりが阻止されることによると考えられる。もともと天然の植物においても、病原体感染を受けた部位の細胞ではDS9のmRNAやタンパク質が減少するので、その部位のみが細胞死を起こし得る。DS9またはそのホモログの産生が減少するように作出された形質転換植物においては、病原体感染細胞はさらに死にやすくなり、その結果感染細胞の細胞死の反応が促進される (すなわち、抵抗性になる) 。

【 0 0 7 0 】 DS9またはそのホモログの産生が増大された植物においては、通常、細胞死が抑制される。細胞死を起こす傾向が適度に弱められた植物においても、様々な環境ストレスに対する抵抗性が示され得る。環境ストレス下に植物が曝されると、内因性のDS9関連遺伝子が不活性化されて、それによりオルガネラの恒常性が維持できなくなり、植物細胞中に有害な活性酸素が生じ得る。本発明の方法により、DS9またはそのホモログの産生が増大されてメタロプロテアーゼの活性値が上昇することにより、オルガネラ (例えば、ミトコンドリアおよび

葉緑体)の恒常性維持機能が向上する結果、活性酸素の発生が低くおさえられて細胞死が抑制されると考えられる。

【0071】本明細書において、「環境ストレス」とは、自然界で植物が受け得る、その生育を妨げる任意のストレスをいう。環境ストレスの例としては、病原体感染、強光、低温、凍結、乾燥、高温、高塩濃度、UV照射、オゾン、および除草剤などが挙げられる。

【0072】環境ストレスに対しての「抵抗性の付与」とは、植物に新たな抵抗性を付与すること、または既に

10 抵抗性を有する植物のその抵抗性を増強することをいう。

【0073】「病原体感染」とは、植物の病原因子による感染をいい、ウイルス、ウイロイド、糸状菌および細菌による感染を含む。

【0074】環境ストレスに対する抵抗性の有無は、植物がある環境ストレス下におかれた場合の、形質転換植物とコントロール植物との間に観察され得る差異を評価することにより、確認できる。

【0075】例えば、病原体感染に対する形質転換植物の病害抵抗性は、病原体(例えば、TMVなどのウイルス、およびキュウリ立ち枯れ病菌(Rhizoctonia solani)などの糸状菌)感染における、形質転換植物とコントロール植物との間の形態学的変化の差異として評価される。例えば、病原体感染後の形質転換植物において観察され得る病斑の程度が、コントロール植物に比べて有意に抑制されている場合は、その形質転換植物には抵抗性が付与されている。

【0076】本発明に従って病原体感染に対する抵抗性が付与された形質転換植物には、TMVに対する抵抗性およびキュウリ立ち枯れ病菌に対する抵抗性の少なくとも1つについて抵抗性である植物が含まれる。

【0077】除草剤に対する形質転換植物の抵抗性は、例えば、スーパーオキシド発生型除草剤(例えば、パラコート(商品名)(1,1-dimethyl-4,4-bipyridinium dichloride)などの公知の除草剤処理に対する抵抗性として評価される。例えば、除草剤処理後の形質転換植物において、クロロフィルaおよびbの分解の程度が、コントロール植物に比べて有意に抑制されている場合は、その形質転換植物は抵抗性が付与されている。

【0078】上述のように、(DS9に代表される)ATP依存性Zn型メタロプロテアーゼによる細胞死の調節は、植物に限らず直接生物全般においてその生体機能に深く関与していることが示唆される。従って、DS9関連遺伝子の選択的な阻害剤は、生体機能の選択的な抑制のための手段として重要であり得る。例えば、このような阻害剤は、農薬および医薬の候補物質として利用される。

【0079】DS9関連遺伝子の選択的な阻害剤のスクリーニングは、DS9関連遺伝子を有する植物細胞に、阻害剤候補物質を導入して、上記の植物細胞においてDS9ま

たはそのホモログの産生が選択的に減少したか否かを同定することにより行われる。このスクリーニングの方法を実施するための条件は、当業者により適宜選択される。スクリーニングは、例えば、N遺伝子を有さないタバコにTMVを接種した後に阻害候補物質で処理した場合に、TMV感染部に壊死病斑が形成されるかどうかを試験することにより行われる。処理葉片のみにいてTMV感染部に壊死病斑が形成され、かつTMV感染していない処理葉片においては有意な形態学的変化が認められない場合には、この阻害剤候補物質はDS9関連遺伝子に対して

20 選択的であるとする。

【0080】例えば、スクリーニングに使用する植物細胞は、任意の形態の植物中に存在する。好ましくは、遊離の植物細胞として、インピトロで用いられる。植物細胞は、好ましくは、DS9関連遺伝子を内因性の遺伝子として有する。阻害剤候補物質は、タンパク質、核酸、糖、脂質などを含むが、これらに限定されない。植物細胞への導入のために、当業者は阻害剤の種類に応じて、適切な送達手段を選択し得る。

【0081】阻害候補物質で処理した植物細胞においてDS9またはそのホモログの産生が減少したか否かは、当業者に周知の方法により適宜同定され得る。例えば、ウェスタンブロット解析により、阻害候補物質で処理した植物細胞と未処理の植物細胞との間の、DS9またはそのホモログのタンパク質量を比較することにより、容易に決定され得る。DS9およびそのホモログの産生が有意に減少した場合、その候補物質は、DS9関連遺伝子の阻害剤であると考えられる。

【0082】

30 【実施例】以下実施例を挙げて本発明を具体的に説明する。この実施例で使用した制限酵素、プラスミドなどは商業的な供給源から入手可能である。

【0083】(実施例1: DS-9遺伝子の単離) N. tabacum cv. Samsun NNおよびSamsun nnを、温度を調節した温室において、25℃、16時間の日長下、120 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ の強度にて生長させた。TMVのOM株(農水省生物研ジーンバンク)をこの実施例において使用した。温度シフトアッセイのために、タバコの葉を、葉の上部表皮と、10mMリン酸緩衝液(pH7.0)中の十分な濃度のウイルス懸濁物とを穏やかに擦り合わせ、Carborundum(600番、Kishida Chemicals, Osaka, Japan)を湿らして、30分間室温に保ち、ウイルスの侵入を可能にすることによりTMVを接種した。感染した葉を水で洗浄してCarborundumを除去した後、それらを含む透明なプラスチックボックスを、30℃で、24時間の日長下、60 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ の強度にて維持したインキュベーターに移した。48時間インキュベーションした後、20℃、60 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ の光強度で維持したインキュベーターに移した。20℃および30℃

40 両方のインキュベーションの間、湿らせたティッシュペーパーで覆うことにより、葉柄に水を与えた。

50

【 0 0 8 4 】ディファレンシャルスクリーニングを、Seoら(Science, vol.270, 1995)に記載されるように行った。簡単には、TMV (10 µg/ml) で感染し、30 から20 に温度シフトした3時間後または52時間後に採集した葉からポリ(A)+RNAを単離した。これらのポリ(A)+RNAから、放射標識した1本鎖cDNAプローブを2種類(プラスプローブ(温度シフト3時間後のポリ(A)+RNAから調製)およびマイナスプローブ(温度シフト52時間後のポリ(A)+RNAから調製))合成した。次いで、プラスプローブの合成について使用したポリ(A)+RNAから常法により調製したcDNAライブラリーに対して、これらの2種類のプローブを用いて、ディファレンシャルスクリーニングを行った。その結果、6つのクローンがプラスプローブにのみハイブリダイズすることが見出された。1つのcDNAをDS9と名付けた。このcDNAを、製造業者(Stratagene)の使用説明書にしたがって、R408ヘルパーファージで切り出し、そして再び環化させてpBluescript SKファージミドベクターにサブクロニングした。

【 0 0 8 5 】DS9の両方の鎖を、373A型 DNAシーケンサー(Applied Biosystems)を用いてダイデオキシシチエンターミネーション法により配列決定した。核酸およびアミノ酸配列を、GENE WORKSソフトウェアシステム(IntelliGenetics)を用いて解析した。

【 0 0 8 6 】DS9 cDNAによりコードされるアミノ酸配列は、ATP依存性Zn型メタロプロテアーゼである、大腸菌のFtsH、酵母のOsd1p、シロイヌナズナのArFtsH、およびレッドペーパーのPftfのアミノ酸配列と、それぞれ、40%、30%、79%および42%の相同性を示し、特にATPaseの保存性領域において高かった。DS9は、他のATP依存性Zn型メタロプロテアーゼと同様に、N末端側の膜を貫通すると考えられる疎水性領域、および中央部のATPase領域、C末端側のZn²⁺結合モチーフが存在した(図1)。

【 0 0 8 7 】(実施例2:細菌における組換えGST-DS9タンパク質の発現) GST-DS9融合遺伝子を作製するために、DS9コード領域(配列表の配列番号411~2240)を、プライマー: 5'-ACGTGGATCCTTGAATGCTGTGAAAAAGGGTA-3'および5'-ACGTGAATCTTATGCCTATTTCTCTTGCATC-3'を用いてPCRにより増幅した。BamHI-EcoRI断片をpGEX-2T(Pharmacia; Smith および Johnson, Gene, 67, 31(1988))のBamHI部位およびEcoRI部位にサブクロニングして、GSTタンパク質のC末端に融合した。得られた構築物(pGEX-DS9)をGST領域とDS9領域との間の接合部位周辺を配列決定して、それぞれのコード領域がインフレームで接合されていることを確認した。ほとんど全てのGST-DS9融合遺伝子がE.coliにおいて不溶性タンパク質として産生されたので、タンパク質を以下の手順のようにして不溶性画分から精製した。pGEX-DS9を、0.4mM IPTGとともに、12時間インキュベートすることによりE.coli株 JM109(Stratagene)において発現させた。細胞をペ

レット化し、洗浄し、そして緩衝液A(20mM Tris-HCl, pH 8.0, 30mM NaCl, 10mM EDTA, 2mM フェニルメタンスルホニルフルオリド(PMSF))中に懸濁した。10分の1容量のリゾチーム(緩衝液A中の20mg/ml)を加えた後、懸濁液を1時間氷上でインキュベートし、そして大腸菌を超音波により破碎した。不溶性画分を6,000×g、10分間、4での遠心分離により回収し、緩衝液B(20mM Tris-HCl, pH7.5, 30mM NaCl)で3回洗浄した。次いで、不溶性画分を8,000×g、10分間、4での遠心分離により回収し、そして10mM EDTA(pH8.0)中に再懸濁した。最終濃度が6.22Mになるように、8M グアニジン-HCl(pH8.3)を添加した後、溶解物を、12,000×g、30分間、4での遠心分離に供した。上清を、最初に緩衝液C(2Mグアニジン-HCl, 0.2mM EDTA, pH 8.0, 5mM -メルカプトエタノール)に対して2時間、4にて透析し、次いで、緩衝液D(20mM Tris-HCl, pH 7.5, 100mMNaCl, 0.5mM EDTA, 5mM EDTA, 5mM -メルカプトエタノール)に対して4時間以上、4にて透析した。100,000×g、30分間、4での遠心分離による回収後、SmithおよびJohnsonら(前出の文献)の方法に従って、グルタチオン-アガロースビーズを用いる親和精製に供した。タンパク質濃度は、Coomassie dye-based protein assay kit(Bio-Rad)により決定した。

【 0 0 8 8 】(実施例3:ATPase活性のアッセイ)DS9がATPase活性を有するか否かを調べるために、37でArmonら(The Journal of Biological Chemistry, 265, 20723(1990))により記載されるようにATPase活性の測定を行った。ATP加水分解をアッセイするための、25 µlの反応混合物以下の成分を含んだ: 50mM Tris-HCl(pH 7.6), 5mM MgCl₂, 2mM ジチオスレイトール(DTT), 1mM ATP, 1mM [-32P]ATP(約148TBq/mmol; ICN Biochemicals Inc.)および6 µg/ml GST-DS9タンパク質を含んだ。放射活性を、チェレンコフ放射によって常法により測定した。

【 0 0 8 9 】結果を図2に示す。大腸菌内で発現させた組換えDS9タンパク質は、ATPase活性を有することが示された。

【 0 0 9 0 】(実施例4:TMV感染NNタバコにおける温度シフト後のDS9転写レベルの変動)TMV感染NNタバコにおける温度シフト後のDS9の転写レベルの変動を調べるために、ノザン解析を行った。

【 0 0 9 1 】タバコ(N. tabacum cv. Samsun NN)の葉を、実施例1に記載のようにTMVで感染し、30で40時間培養した後、20への温度シフトを行った。また、TMVで感染せず、傷のみをつけたタバコの葉をコントロールとして用いた(模倣)。

【 0 0 9 2 】20に温度シフトした後、0、1、3、4、8および24時間目の葉を回収し、全RNAを、Seoら(前出の文献)の方法に従ってそれぞれ調製した。

【 0 0 9 3 】DS9 cDNAについてはcDNAの3'非コード領

域に対応する部分DNA断片を、プローブとして用いた。

【0094】感染時特異的に発現する酸性タンパク質PR-1をコードするcDNAおよび塩基性タンパク質PR-1をコードするcDNAを、コントロールプローブとして用いた。酸性タンパク質PR-1をコードするcDNAプローブは、Matsuoから(Plant Physiology, 85, 942 (1987))に従い、プライマーA、5'-TACTAATTGAAACGACCTACGTCC-3';プライマーB、5'-ATAATAATATCTGATCATACATCAAGC-3'を用いて常法によりPCRを行って合成した。また、塩基性PR-1タンパク質(Eyalら、Plant Molecular Biology 19, 589 (1992))をコードするcDNAは、報告されている配列データから設計した合成プライマー(プライマーA、5'-ATCCCTTTGATTCCAAGGTTGG-3';プライマーB、5'-CAAAACACATACATATACACACCTCC-3')を用いて、常法によりPCRを行って合成した。

【0095】ノザンハイブリダイゼーションを、Seoら(前出の文献)に記載されるように行った。各プロットをXARフィルム(Kodak)に、Intensifying Screen(Kodak)を用いて、-80℃にて48時間、露光した。DS9転写産物の相対的な強度をNIH Image 1.61(National Institute of Health)プログラムを用いて決定した。

【0096】結果を図3に示す。HRが生じるまでの間に、DS9遺伝子の転写が抑制されていることが見出された。TMV感染した葉においては、30℃から20℃への温度シフト後1時間以内に、DS9 mRNAの発現レベルが減少した。さらに、温度シフト後8時間目には、DS9 mRNAの発現は検出されなかった。一方、模似感染した葉は、DS9遺伝子の転写は一定であり、抑制されなかった。

【0097】(実施例5:抗DS9タンパク質抗体の産生)抗体産生のために、2匹のウサギに、実施例2で得た組換えタンパク質(400µg/ウサギ)を腹腔内注射した。7日間の間にさらに3回の注射を行った(各100µg/ウサギ)。抗血清を、最後の注射の2週間後に得、そして免疫グロブリン画分をProtein A-sepharoseカラム(Pharmacia)におけるクロマトグラフィーにより精製した。抗DS9抗体を含有する画分を、PBS(20mM KH₂PO₄, 140mM NaCl, pH7.4)に対して透析した。抗体を、画分化したE.coliの全タンパク質を含むイムノプロットに対する、DS9タンパク質との交差反応性について試験した。

【0098】(実施例6:TMV感染NNタバコにおける温度シフト後のDS9タンパク質量の変動)TMV感染NNタバコにおける温度シフト後のDS9タンパク質量の変動を調べるために、ウエスタンブロッティングを行った。

【0099】タバコ(N. tabacum cv. Samsun NN)の葉を、実施例1に記載のようにTMVで感染し、30℃で40時間培養した後、20℃への温度シフトを行った。また、TMVで感染せず、傷のみをつけたものをコントロールとして用いた(模似)。

【0100】20℃に温度シフトした後、0、3、4、6

時間目(模似については、0および6時間目)、の葉を回収した。回収した葉から常法により得たタンパク質サンプルを、8% SDS-ポリアクリルアミドゲルにより分離し、そして25mM Tris、192mMグリシン、および20%メタノールを含有する溶液中で、Immobilon membrane(Millipore)に移した。TBST(20mM Tris-HCl, pH7.5, 150mM NaCl)中の2%BSAでブロッキングした後、メンブレンを実施例5で調製した抗DS9抗体(1:3000希釈)とともに1時間、インキュベートした。メンブレンを0.05%Tween20を含むTBSで大量に洗浄し、そしてアルカリホスファターゼ結合ヤギ抗ウサギIgG(OrganonTeknika Corp., Durham)(1:2000希釈)とともに、30分間、インキュベートした。反応を基質としてテトラゾリウム-5-ブromo-4-クロロ-3-インドリルリン酸の加水分解により可視化した。DS9タンパク質の相対的な強度をNIH Image 1.61(National Institute of Health)プログラムを用いて決定した。

【0101】結果を図4に示す。20℃への温度シフト後、4および6時間目で、TMV感染した葉におけるDS9のタンパク質量は、それぞれ、78%および62%まで減少した。DS9タンパク質量はHR進行時に特異的に減少することが示された。

【0102】(実施例7:AMDおよび熱処理後のTMV感染NNタバコにおける、DS9の転写レベルおよびタンパク質の変動)試薬処理の前に、タバコの葉を分離してTMV(リン酸緩衝液(pH7.0)中の8µg/ml)で接種するか、または模似(緩衝液のみ)接種し、30℃で、40時間、インキュベートした。インキュベーション後、葉の葉柄を0.5mlの阻害剤溶液を含有するバイアルにおいて、AMD処理については、AMD(Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA)を、10%(v/v)メタノール水溶液として使用した。溶液を葉柄から吸収させ、そして1時間以内に滅菌水をバイアルに加えた。熱処理については、50℃で2分間処理することにより、TMV感染NNタバコに熱ショックを与えた。次いで処理した葉を、それぞれ、30℃にてさらにインキュベートした。ノザン解析およびウエスタンブロット解析は、実施例4および6に記載の方法と同様に行った。また、水処理したもののコントロールとして用いた。

【0103】結果を図5に示す。HRを誘発することが知られているAMDおよび熱処理により、TMV感染NNタバコのDS9の転写レベルおよびタンパク質量が非常に減少されることが示された。

【0104】(実施例8:壊死病斑形成の誘導における各種プロテアーゼ阻害剤の効果)セリンプロテアーゼ阻害剤としてAPMSF、Aprotininおよび3,4-Dを、システインプロテアーゼ阻害剤としてE-64を、メタロプロテアーゼ阻害剤としてEDTAを、ならびにセリン/システインプロテアーゼ阻害剤としてロイペプチンを用いた。各阻害剤は、以下のように調製した。

【 0 1 0 5 】 EDTA (Wako Pure Chemicals. Ind. (Osaka, Japan)) は、 NaOH で pH8.0 に調製した水性溶液として使用した。

【 0 1 0 6 】 E-64 は、 メタノール/水 (1:1, v/v) 中の 50mM E-64 (Boehringer Mannheim, Germany) をストック溶液として使用し、続いて水中で希釈して示した濃度にした。

【 0 1 0 7 】 3,4-D は、 ジメチルスルホキシド中の 50mM 3,4-D (Boehringer Mannheim, Germany) をストック溶液として使用し、続いて水中で希釈して示した濃度にした。

【 0 1 0 8 】 ロイペプチンおよび APMSPI は、 水溶液として使用した。

【 0 1 0 9 】 この実施例において、 EDTA は、 1 mM、 10mM および 50mM の濃度で使用し、他の阻害剤は、 0.01mM、 0.1mM および 1 mM の濃度で使用した。

【 0 1 1 0 】 試薬処理の前に、 タバコの葉を分離して TMV (リン酸緩衝液 (pH7.0) 中の 8 μg/ml) で接種するか、または模似 (緩衝液のみ) 接種し、 30 で、 40 時間、 インキュベートした。 インキュベーション後、葉柄を 0.5ml の阻害剤溶液を含有するバイアルにおいた。溶液を葉柄から吸収させ、そして 1 時間以内に滅菌水をバイアルに加えた。次いで処理した葉を、 30 にて、さらに インキュベートした。結果を表 2 に示す。

【 0 1 1 1 】

【表 2】

壊死病斑形成の誘導における各種プロテアーゼ阻害剤の効果

阻害剤	阻害剤の種類	タバコ品種	
		NN	nn
APMSF	セリンプロテアーゼ	-a	-
アプロチニン	セリンプロテアーゼ	-	-
3,4-D	セリンプロテアーゼ	-	-
E-64	システインプロテアーゼ	-	-
EDTA	メタロプロテアーゼ	+b	+
ロイペプチン	セリン/システイン プロテアーゼ	-	-

EDTA は 1 mM、 10 mM、 50 mM の濃度で使用
他の阻害剤は 0.01 mM、 0.1 mM、 1 mM の濃度で使用
a、壊死病斑は誘導されなかった
b、壊死病斑が誘導された

【 0 1 1 2 】 EDTA で処理した場合に、壊死病斑が誘導された。さらに、 N 遺伝子を保持しない nn タバコにおいて、同様の病斑形成が観察された。また、他の各種プロテアーゼ阻害剤を用いた場合、壊死病斑は観察されなかった。これらの結果から、 DS9 タンパク質を含む少なくとも植物のメタロプロテアーゼ活性が阻害されると、細胞死が誘導されることが示される。

【 0 1 1 3 】 (実施例 9 : DS9 の細胞内の局在場所) (9 - 1) 免疫電子顕微鏡による実験

免疫電子顕微鏡研究を、葉を 1 × 1 mm 片に切断し、そして減圧条件下、カコジル酸ナトリウム (pH7.4) 中の 0.1 % グルタルアルデヒドおよび 4 % パラホルムアルデヒドで固定した以外は、基本的には、 Suzuki および Kataoka (Journal of Histochemistry, 40, 379 (1992))、ならびに Tomoyasu ら (Journal of Bacteriology, 175, 1352 (1993)) に記載されるように行った。次いで、 -20 で LR W

hite 樹脂 (The London Resin Co., London) 中に包埋した組織を超ミクロトームで切断した。切片を抗 DS9 抗体 (1:250 希釈) とともに インキュベートし、次いで 10nm 金結合ヤギ抗ウサギ IgG (1:100 希釈、 Biocell Research Laboratories, Cardiff) と、 30 分間、 37 で反応させた。免疫標識化した後、切片を酢酸ウラニルで染色した。

【 0 1 1 4 】 細胞化学的コントロールとして、標本を前血清 (非免疫ウサギ IgG) とともに インキュベートするか、または標識化プロセスを省略した一次抗体とともに インキュベートした。極薄の凍結切片を用いる免疫電子顕微鏡のために、 Tokuyasu (Histochemical Journal, 21, 163, 1989) に記載される方法を用いて、固定化した組織のいくつかの小片に、 20% ポリビニルピロリドン (分子量 10,000 : Sigma) および 1.6M スクロースの混合物をを侵入させ、液体プロパン中で凍結させた。そし

40

50

て、これを低温切片化 (cryo-sectioned) した。上述の LR White で包埋したサンプルについてと同じ手順によりイムノゴールド標識し、そしてポリビニルアルコール (分子量 10,000 ; Sigma) で吸着染色させた。サンプルを、透過型電子顕微鏡 (H-7100、Hitachi, Japan) により観察した。

【 0 1 1 5 】 (9 - 2) 金粒子の画像化による実験電子顕微鏡写真のネガを平盤型スキャナー (GT-9000、Epson; 1800dpi) により数値化し、そしてTIFFフォーマットに保存した。コントラストを増強するために、Fukui (Theoretical and Applied Genetics, 72, 27 (1986)) の方法に従って、数値化した画像をAdobe Photoshop ver.3.0 (Adobe Systems, Incorp.) により標準化した。核、葉緑体、ミトコンドリア、およびミクロソームの境界を各電子顕微鏡写真についてトレースし、そしてオルガネラの面積を数値化して計算した。次いで、金粒子の数をオルガネラのそれぞれについて視覚的にカウントした。

【 0 1 1 6 】 これらの結果から、DS9 が葉緑体に局在して存在することが示された (図 6 を参照)。

【 0 1 1 7 】 (実施例 1 0 : EDTA および DCMU 処置による HR の誘発) メタロプロテアーゼ阻害剤である EDTA、および光化学系 II (PSII) における電子伝達の阻害剤である DCMU (3-(3,4-ジクロロフェニル)-1,1-ジメチルウレア) (DCMU (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA)) を用いて、実施例 8 に記載のように、NNタバコおよびnnタバコを用いて、阻害剤処理を行った。EDTA は実施例 8 に記載のように調製し、および DCMU はメタノール溶液として調製した。阻害剤の濃度は、EDTA および DCMU について、それぞれ、5 mM および 100 mM であった。処理した葉を、30 にて、さらにインキュベートした後、壊死病斑の形成、HR タンパク質のマーカー遺伝子である PR-1 タンパク質の発現、および HR のマーカーとして知られているサリチル酸の蓄積を調べた。PR 遺伝子の発現については、実施例 4 に記載のようにノザン解析を行った。また、サリチル酸の定量については、以下のように行った。

【 0 1 1 8 】 遊離サリチル酸を、Malamy ら (The Plant Cell, 4, 359 (1992)) により記載されるようにして、抽出および定量した。HPLC 分析を、40 に維持した μ Bondasphere、5- μ m C-18 (3.9mm x 15cm) カラムに対して行った。Isocratic 分離を、20mM 酢酸ナトリウム (pH 5.0) 中の 23% (v/v) メタノールを用いて行った。蛍光検出を、Model RF-550A (Shimadzu, Japan) を用いて 1 m / 分で行った。全てのデータを、loss について補正した。結果を図 7、8 および 9 に示す。NNタバコおよびnnタバコの両方において、EDTA および DCMU の両方が、それぞれ、HR を誘発し、メタロプロテアーゼの阻害および葉緑体の機能の低下により、HR が誘発されることが示された。

【 0 1 1 9 】 (実施例 1 1 : HR 誘発時の葉緑体の機能) HR 誘発時に葉緑体の機能の低下を、PSII 活性を指標にして測定した。

【 0 1 2 0 】 クロロフィル蛍光導入の動力学を pulse amplitude modulation fluorimeter (PAM-2000, Heinz Walz, Germany) を用いて測定した。TMV 感染は、実施例 1 に記載のように行った。葉サンプルを葉表面に対して 60 の角度に保ち、そして葉の半分を化学光 ($600 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$) に曝露した。蛍光導入の動力学を、Data Acquisition Software (DA-2000, Heinz Walz) をインストールした携帯用コンピューターに記録した。結果を図 1 0 に示す。TMV で感染した NN タバコの葉における PSII 活性は、30 での培養のみでは低下しなかった。しかし、20 に温度シフトした後 4 時間目から、PSII 活性は低下し始めた。この時間は DS9 タンパク質量が減少する時間に一致する。この結果から、葉緑体の機能の低下は、DS9 タンパク質量の減少と相関することが示された。

【 0 1 2 1 】 (実施例 1 2 : トランスジェニック植物の作出) DS9 コード領域 (配列番号 1 の 21 ~ 2240 位) を、プライマー A、5'-ACTATGGCCAATCTCTCTCTC-3' およびプライマー B、5'-TTATGCCTATTTCTCTGCATC-3' を用いて PCR により増幅した。

【 0 1 2 2 】 センス構築物については、プライマー A および B の 5' 末端それぞれに BamHI および SacI 部位を連結した。アンチセンス構築物については、プライマー A および B の 5' 末端それぞれに SacI および BamHI 部位を連結した。

【 0 1 2 3 】 PCR 産物を、DNA 配列決定により確認した。この PCR 産物を BamHI および SacI で消化し、次いで、CaMV 35S プロモーターに対してセンス方向およびアンチセンス方向に、予め BamHI および SacI で消化したバイナリーベクター pBI121 (Clontech) に連結した。センスおよびアンチセンス DS9 発現構築物を、Agrobacterium tumefaciens LBA4404 (Ooms ら、Gene, 14, 33 (1981)) にエレクトロポレーション (Wen-Jun および Forde、Nucleic Acid Research, 17, 8385 (1989)) により導入した。Samsun NN タバコの形質転換を、葉片共存培養法 (Horsch ら、Science, 227, 1229 (1985)) により行った。葉片を、細菌溶液中に浸し、次いで、ナフタレン酢酸 ($100 \mu\text{g}/\text{L}$) およびベンゾアミノプリン ($1\text{mg}/\text{L}$) を含有するインキュベーション培地 (3% スクロース および B5 ビタミンを有する Murashige-Skoog (MS) 基本培地) に、2 日間、25 、白色蛍光灯の連続的な照射下、 $120 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ の強度でおいだ。次いで、この葉片を 500mg/ml カルベニシリンをさらに含有した上述のインキュベーション培地に移した。2 日後、葉片を選択培地 ($500 \mu\text{g}/\text{ml}$ カルベニシリン および $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ カナマイシンを含有するインキュベーション培地) に移した。センス DS9 遺伝子を発現する形質転換体の作出については、葉片を含むプレートに 25 、16 時間の日長下、 $120 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ の強度でイン

キュベートした。アンチセンスDS9遺伝子を発現する形質転換体の作出については、インキュベーションを、25、24時間の日長下、 $10 \mu E/m^2/s$ の強度で行った。カナマイシンを含有する培地中で形成されたシュートを、ホルモンを減少させた選択培地に移した。根形成後、植物を土の入ったポットに移した。

【0124】(実施例13：トランスジェニック植物における細胞死調節の解析)

(TMV感染)実施例12により得られた、DS9 cDNAをセンスまたはアンチセンスで発現させたトランスジェニックタバコの自殖次世代の系統(センス植物; S1、S4、S5、S6、S9; アンチセンス植物; A9、A12)を用いて、実施例6に記載のようにウエスタンブロット解析を行い、タンパク質量を調べた(図11)。また、各系統を実施例1に記載のようにTMVで感染し、感染に対する病斑の大きさの変化を観察した(図12および13)。いずれの実験も、コントロールとして野生型タバコを用いた。

【0125】野生型タバコの2倍のDS9タンパク質を有するセンス系統(S6)では、壊死病斑の大きさが野生型の2倍に達した。一方、野生型タバコの半分のタンパク質を有するアンチセンス系統(A9)では、壊死病斑の大きさ(すなわち、細胞死)は、野生型の約半分であった。壊死病斑が小さいことは、細胞死が速やかに生じ(すなわち、促進され)、感染した菌の広がりを阻止していることを示す。この結果から、DS9タンパク質が少ない細胞においては、細胞死が促進され、タンパク質量が多い細胞においては、細胞死が抑制されることが示された。また、DS9 cDNAをアンチセンスで発現させたトランスジェニックタバコは、TMV感染に対する抵抗性が增强されたことが明らかである。

【0126】(キュウリ立ち枯れ病菌感染)カナマイシン $50 \mu g/ml$ を含む寒天培地に、A9(実施例12により得られた、DS9cDNAをアンチセンスで発現させたトランスジェニックタバコ)の自殖次世代の系統の種子、およびコントロールとして35S-GUSを導入したタバコの種子を、MS寒天培地(Murashige, T. およびSkoog, F. (1962) A reversed medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15巻 473-497頁を参照)を含む直径9 cmのシャーレに播種した。キュウリ苗立ち枯れ病菌をPDA培地(39g/l Bacto(登録商標)Poteto Dextrose Agar)で5日間、25で前培養した。次いで、播種の7日目の芽生え、それぞれ30個体に、前培養により得られる菌そうを3 mm角に切

配列:

AACACCTTCC AAAAATAGTT ATG GCC AAT TCT CTC CTC TCT TCC AAC TTC 50

Met Ala Asn Ser Leu Leu Ser Ser Asn Phe

5

10

ATG GGT TCT CAA ATC TTT GTC TCT CCT CCC ACC CCT AAA ACA ACA AAG 98

り取り、シャーレ当たり1片を寒天上に置くことにより、菌を接種して、これを25 に保温した。接種後7日目に緑色を示して生存している個体を抵抗性植物体とした。結果を図14に示す。7日目の生存率は、A9植物が63%(30個体中の19個体)およびコントロール植物が0%(30個体中の0個体)であった。

【0127】DS9 cDNAをアンチセンスで発現させたトランスジェニックタバコは、キュウリ立ち枯れ病菌に対して抵抗性を示した。

10 【0128】(実施例14：トランスジェニック植物におけるパラコート(商品名)耐性)パラコートは、クロロプラスト中でスーパーオキシドを発生する除草剤である。S4トランスジェニック植物(実施例12により得られたDS9 cDNAをセンスで発現させたトランスジェニックタバコ)および野生型タバコ(コントロール)を、温室において生長させた。次いで、0、10、および20 μM のパラコート溶液中に円形に切り取ったタバコ葉片を浸漬し、25、5000 luxにて45時間処理した。結果を図15に示す。野生型タバコでは、10 μM の濃度におけるパラコート処理において、重度の白変化が生じたのに対して、S4トランスジェニック植物では、20 μM の濃度におけるパラコート処理後も緑色を示し、葉緑体の分解が顕著に抑制された。

20 【0129】DS9 cDNAをセンスで発現させたトランスジェニックタバコは、パラコートに対して抵抗性を示した。

【0130】

【発明の効果】本発明により、細胞死調節遺伝子の発現レベルを調節することにより細胞死を調節する方法が提供される。さらに、細胞死を調節することにより、様々な環境ストレスに対して、植物に抵抗性を付与する方法が提供され、農業上および育種上有用な植物が作出され得る。また、DS9関連遺伝子の選択的な阻害剤をスクリーニングする方法が提供される。

【0131】

【配列表】

【0132】

【配列番号：1】

配列の長さ：2446

40 配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

	25		26	
Met Gly Ser Gln Ile Phe Val Ser Pro Pro Thr Pro Lys Thr Thr Lys				
	15		20	25
TAT TTC CAT TTT CAC TCC AAA AGA AAG TCT TTA ATC CCT CAA TCA ATT				146
Tyr Phe His Phe His Ser Lys Arg Lys Ser Leu Ile Pro Gln Ser Ile				
	30		35	40
CTC AAC AAA AAA CCC AAT TCA GAT AAT TCA AAG AAT ATT CCT TCA AAA				194
Leu Asn Lys Lys Pro Asn Ser Asp Asn Ser Lys Asn Ile Pro Ser Lys				
	45		50	55
GCT GCT TTA GCT GCT TTA CTC TTT TCT TCA ATC ACT CCA CAT GCC TAT				242
Ala Ala Leu Ala Ala Leu Leu Phe Ser Ser Ile Thr Pro His Ala Tyr				
	60		65	70
GCT CTT GAT AAT ACT ACC CCT ACA GTA CCA ACC CCT CAA GTG ATT CAA				290
Ala Leu Asp Asn Thr Thr Pro Thr Val Pro Thr Pro Gln Val Ile Gln				
	75		80	85
GCT GAA GCA GCC AAT CCC ACC ACT TCA AAT CCA TTC TCT CAA AAT ATA				338
Ala Glu Ala Ala Asn Pro Thr Thr Ser Asn Pro Phe Ser Gln Asn Ile				
	95		100	105
ATC TTG AAT GCT CCA AAG CCT CAA GCA CAG ACC AAT CCT GAA CTT CCA				386
Ile Leu Asn Ala Pro Lys Pro Gln Ala Gln Thr Asn Pro Glu Leu Pro				
	110		115	120
GAA GTT TCT CAA TGG AGA TAC AGT GAA TTC TTG AAT GCT GTG AAA AAG				434
Glu Val Ser Gln Trp Arg Tyr Ser Glu Phe Leu Asn Ala Val Lys Lys				
	125		130	135
GGT AAA GTT GAA AGG GTC CGA TTC AGT AAA GAC GGA TCT GCC CTC CTG				482
Gly Lys Val Glu Arg Val Arg Phe Ser Lys Asp Gly Ser Ala Leu Leu				
	140		145	150
CTT ACT GCT GTT GAT GGC CGT AGA GCT ACT GTA ACT GTG CCT AAT GAC				530
Leu Thr Ala Val Asp Gly Arg Arg Ala Thr Val Thr Val Pro Asn Asp				
	155		160	165
CCG GAT TTA ATT GAC ATT TTG GCT ATG AAT GGT GTT GAT ATA TCA GTT				578
Pro Asp Leu Ile Asp Ile Leu Ala Met Asn Gly Val Asp Ile Ser Val				
	175		180	185
TCT GAA GGT GAT TCT GCT GGT AAT GGG TTG TTT AAT TTA ATT GGA AAT				626
Ser Glu Gly Asp Ser Ala Gly Asn Gly Leu Phe Asn Leu Ile Gly Asn				
	190		195	200
TTA TTC CCT TTT ATT GCT TTT GCT GGA TTG TTC TAT CTT TTC CAG AGA				674
Leu Phe Pro Phe Ile Ala Phe Ala Gly Leu Phe Tyr Leu Phe Gln Arg				
	205		210	215
TCT CAA GGT GGG CCT GGT GGG CCA GGT GGG CTT GGT GGC CCC ATG GAT				722
Ser Gln Gly Gly Pro Gly Gly Pro Gly Gly Leu Gly Gly Pro Met Asp				
	220		225	230
TTT GGT AGG TCA AAG TCA AAG TTT CAA GAA GTT CCT GAA ACT GGA GTG				770
Phe Gly Arg Ser Lys Ser Lys Phe Gln Glu Val Pro Glu Thr Gly Val				
	235		240	245
ACT TTT GCT GAT GTT GCT GGT GCT GAT CAA GCT AAA TTG GAG TTA CAA				818
Thr Phe Ala Asp Val Ala Gly Ala Asp Gln Ala Lys Leu Glu Leu Gln				
	255		260	265
GAA GTG GTT GAT TTT TTA AAG AAT CCT GAT AAG TAT ACT GCT TTA GGT				866

27 28

Glu Val Val Asp Phe Leu Lys Asn Pro Asp Lys Tyr Thr Ala Leu Gly
 270 275 280

GCT AAA ATA CCA AAA GGG TGT CTT TTG GTG GGA CCA CCT GGT ACA GGA 914
 Ala Lys Ile Pro Lys Gly Cys Leu Leu Val Gly Pro Pro Gly Thr Gly
 285 290 295

AAG ACA CTT TTG GCT AGA GCA GTT GCT GGT GAA GCT GGT GTA CCA TTT 962
 Lys Thr Leu Leu Ala Arg Ala Val Ala Gly Glu Ala Gly Val Pro Phe

300 305 310

TTC TCA TGT GCA GCA TCA GAG TTT GTT GAG TTG TTT GTT GGT GTT GGA 1010
 Phe Ser Cys Ala Ala Ser Glu Phe Val Glu Leu Phe Val Gly Val Gly
 315 320 325 330

GCT TCT AGA GTG AGG GAT TTG TTC GAG AAG GCG AAG TCG AAA GCG CCT 1058
 Ala Ser Arg Val Arg Asp Leu Phe Glu Lys Ala Lys Ser Lys Ala Pro
 335 340 345

TGC ATT GTG TTT ATT GAT GAG ATT GAT GCT GTG GGG AGG CAG AGA GGT 1106
 Cys Ile Val Phe Ile Asp Glu Ile Asp Ala Val Gly Arg Gln Arg Gly
 350 355 360

GCA GGA ATG GGA GGT GGG AAT GAT GAG AGA GAG CAG ACT ATT AAT CAA 1154
 Ala Gly Met Gly Gly Gly Asn Asp Glu Arg Glu Gln Thr Ile Asn Gln
 365 370 375

CTC TTG ACT GAA ATG GAT GGG TTT TCT GGA AAT AGT GGA GTA ATT GTT 1202
 Leu Leu Thr Glu Met Asp Gly Phe Ser Gly Asn Ser Gly Val Ile Val
 380 385 390

TTG GCT GCA ACC AAT AGG CCT GAT GTT CTT GAT TCT GCA TTG TTG AGA 1250
 Leu Ala Ala Thr Asn Arg Pro Asp Val Leu Asp Ser Ala Leu Leu Arg
 395 400 405 410

CCT GGG AGG TTC GAT CGA CAA GTG ACT GTC GAC AGG CCT GAT GTT GCT 1298
 Pro Gly Arg Phe Asp Arg Gln Val Thr Val Asp Arg Pro Asp Val Ala
 415 420 425

GGT AGA ATC AAG ATT CTT CAG GTG CAT TCT AGA GGA AAG GCC CTT GCA 1346
 Gly Arg Ile Lys Ile Leu Gln Val His Ser Arg Gly Lys Ala Leu Ala
 430 435 440

AAG GAT GTG GAC TTT GAG AAG ATT GCC AGG AGA ACA CCG GGT TTC ACT 1394
 Lys Asp Val Asp Phe Glu Lys Ile Ala Arg Arg Thr Pro Gly Phe Thr
 445 450 455

GGT GCA GAT TTG CAA AAC TTG ATG AAT GAA GCA GCG ATC CTT GCA GCT 1442

Gly Ala Asp Leu Gln Asn Leu Met Asn Glu Ala Ala Ile Leu Ala Ala
 460 465 470

AGG CGT GAA CTA AAG GAA ATA AGT AAA AAT GAG ATA TCT GAT GCT TTG 1490
 Arg Arg Glu Leu Lys Glu Ile Ser Lys Asn Glu Ile Ser Asp Ala Leu
 475 480 485 490

GAG AGG ATA ATT GCT GGA CCG GAG AAG AAA AAT GCT GTT GTC TCA GAG 1538
 Glu Arg Ile Ile Ala Gly Pro Glu Lys Lys Asn Ala Val Val Ser Glu
 495 500 505

GAG AAG AAG AAG CTG GTA GCT TAT CAT GAG GCC GCC CAT GCC TTG GTT 1586
 Glu Lys Lys Lys Leu Val Ala Tyr His Glu Ala Ala His Ala Leu Val

29 30

510 515 520

GGT GCA CTT ATG CCC GAG TAT GAT CCT GTT CCC AAG ATA TCT ATT ATT 1634
 Gly Ala Leu Met Pro Glu Tyr Asp Pro Val Pro Lys Ile Ser Ile Ile

525 530 535

CCT CGG GGC CAA GCT GGT GGT CTT ACC TTC TTT GCC CCT AGC GAA GAA 1682
 Pro Arg Gly Gln Ala Gly Gly Leu Thr Phe Phe Ala Pro Ser Glu Glu

540 545 550

AGA CTT GAG TCG GGC TTG TAC AGC AGG AGC TAC CTA GAG AAT CAA ATG 1730
 Arg Leu Glu Ser Gly Leu Tyr Ser Arg Ser Tyr Leu Glu Asn Gln Met

555 560 565 570

GCA GTT GCA CTT GGT GGA AGG GTT GCT GAG GAG GTT ATT TTT GGA CAA 1778
 Ala Val Ala Leu Gly Gly Arg Val Ala Glu Glu Val Ile Phe Gly Gln

575 580 585

GAC AAC GTA ACA ACT GGG GCA TCT AAC GAT TTC ATG CTT GTT TCA CGA 1826
 Asp Asn Val Thr Thr Gly Ala Ser Asn Asp Phe Met Leu Val Ser Arg

590 595 600

GTG GCA AGG CAG ATG GTT GAG AGA TTA GGG TTC ACC ACA AAG ATC GGA 1874
 Val Ala Arg Gln Met Val Glu Arg Leu Gly Phe Thr Thr Lys Ile Gly

605 610 615

CAG GTT GCC ATT GGA GGA GGT GGA GGA AAT CCT TTC CTA GGT CAA CAG 1922
 Gln Val Ala Ile Gly Gly Gly Gly Gly Asn Pro Phe Leu Gly Gln Gln

620 625 630

ATG TCA ACC CAG AAA GAC TAC TCC ATG GCA ACA GCC GAT GTG GTT GAT 1970
 Met Ser Thr Gln Lys Asp Tyr Ser Met Ala Thr Ala Asp Val Val Asp

635 640 645 650

GCT GAA GTA AGG GAA TTG GTT GAA AGA GCA TAT GAA AGG GCA ACA CAG 2018
 Ala Glu Val Arg Glu Leu Val Glu Arg Ala Tyr Glu Arg Ala Thr Gln

655 660 665

ATT ATC ACA ACA CAC ATT GAC ATC CTA CAC AAG CTT GCT CAG CTG TTG 2066
 Ile Ile Thr Thr His Ile Asp Ile Leu His Lys Leu Ala Gln Leu Leu

670 675 680

ATA GAG AAA GAA ACT GTT GAT GGT GAA GAG TTC ATG AGC CTT TTC ATC 2114
 Ile Glu Lys Glu Thr Val Asp Gly Glu Glu Phe Met Ser Leu Phe Ile

685 690 695

GAT GGC AAG GCC GAG CTA TAC ATT TCT TGG GTC TCT AAG GAG GAG GAT 2162
 Asp Gly Lys Ala Glu Leu Tyr Ile Ser Trp Val Ser Lys Glu Glu Asp

700 705 710 714

TAGTTTCTGG CTTAACAAGA CTTGATGTAT CTGGTGGTTG AGAGTGGTAA ATTGCTGATG 2222
 CAAGAGAAAT AGGCATAATA CATAGTGCTT TAGACTGAAG AAATTGCATT GCAGAACCAA 2282
 CATTCTTCTC CATAAGTTTG GCCACTTGCC TTTCTGTACC ATCACTTGAC CACTTTTCCC 2342
 AGGCTGGTTG GTTATTTCCA ACTTCACTGC TCTCTTCCTA AATAAGACAA GCCACAAAAA 2402
 GGGATAAATT ATTAATTGAT AGGTTGGACA ATTCTGCAAA AAAA 2446

【 0 1 3 3 】
 【 配列番号 : 2 】
 配列の長さ : 714

配列の型 : アミノ酸
 トポロジー : 直鎖状
 配列の種類 : タンパク質

配列 :

Met Ala Asn Ser Leu Leu Ser Ser Asn Phe Met Gly Ser Gln Ile Phe

31	32
Val Ser Pro Pro Thr Pro Lys Thr Thr Lys Tyr Phe His Phe His Ser	
20	25 30
Lys Arg Lys Ser Leu Ile Pro Gln Ser Ile Leu Asn Lys Lys Pro Asn	
35	40 45
Ser Asp Asn Ser Lys Asn Ile Pro Ser Lys Ala Ala Leu Ala Ala Leu	
50	55 60
Leu Phe Ser Ser Ile Thr Pro His Ala Tyr Ala Leu Asp Asn Thr Thr	
65	70 75 80
Pro Thr Val Pro Thr Pro Gln Val Ile Gln Ala Glu Ala Ala Asn Pro	
85	90 95
Thr Thr Ser Asn Pro Phe Ser Gln Asn Ile Ile Leu Asn Ala Pro Lys	
100	105 110
Pro Gln Ala Gln Thr Asn Pro Glu Leu Pro Glu Val Ser Gln Trp Arg	
115	120 125
Tyr Ser Glu Phe Leu Asn Ala Val Lys Lys Gly Lys Val Glu Arg Val	
130	135 140
Arg Phe Ser Lys Asp Gly Ser Ala Leu Leu Leu Thr Ala Val Asp Gly	
145	150 155 160
Arg Arg Ala Thr Val Thr Val Pro Asn Asp Pro Asp Leu Ile Asp Ile	
165	170 175
Leu Ala Met Asn Gly Val Asp Ile Ser Val Ser Glu Gly Asp Ser Ala	
180	185 190
Gly Asn Gly Leu Phe Asn Leu Ile Gly Asn Leu Phe Pro Phe Ile Ala	
195	200 205
Phe Ala Gly Leu Phe Tyr Leu Phe Gln Arg Ser Gln Gly Gly Pro Gly	
210	215 220
Gly Pro Gly Gly Leu Gly Gly Pro Met Asp Phe Gly Arg Ser Lys Ser	
225	230 235 240
Lys Phe Gln Glu Val Pro Glu Thr Gly Val Thr Phe Ala Asp Val Ala	
245	250 255
Gly Ala Asp Gln Ala Lys Leu Glu Leu Gln Glu Val Val Asp Phe Leu	
260	265 270
Lys Asn Pro Asp Lys Tyr Thr Ala Leu Gly Ala Lys Ile Pro Lys Gly	
275	280 285
Cys Leu Leu Val Gly Pro Pro Gly Thr Gly Lys Thr Leu Leu Ala Arg	
290	295 300
Ala Val Ala Gly Glu Ala Gly Val Pro Phe Phe Ser Cys Ala Ala Ser	
305	310 315 320
Glu Phe Val Glu Leu Phe Val Gly Val Gly Ala Ser Arg Val Arg Asp	
325	330 335
Leu Phe Glu Lys Ala Lys Ser Lys Ala Pro Cys Ile Val Phe Ile Asp	
340	345 350
Glu Ile Asp Ala Val Gly Arg Gln Arg Gly Ala Gly Met Gly Gly Gly	
355	360 365
Asn Asp Glu Arg Glu Gln Thr Ile Asn Gln Leu Leu Thr Glu Met Asp	
370	375 380
Gly Phe Ser Gly Asn Ser Gly Val Ile Val Leu Ala Ala Thr Asn Arg	
385	390 395 400

33
 Pro Asp Val Leu Asp Ser Ala Leu Leu Arg Pro Gly Arg Phe Asp Arg
 405 410 415
 Gln Val Thr Val Asp Arg Pro Asp Val Ala Gly Arg Ile Lys Ile Leu
 420 425 430
 Gln Val His Ser Arg Gly Lys Ala Leu Ala Lys Asp Val Asp Phe Glu
 435 440 445
 Lys Ile Ala Arg Arg Thr Pro Gly Phe Thr Gly Ala Asp Leu Gln Asn

 450 455 460
 Leu Met Asn Glu Ala Ala Ile Leu Ala Ala Arg Arg Glu Leu Lys Glu
 465 470 475 480
 Ile Ser Lys Asn Glu Ile Ser Asp Ala Leu Glu Arg Ile Ile Ala Gly
 485 490 495
 Pro Glu Lys Lys Asn Ala Val Val Ser Glu Glu Lys Lys Lys Leu Val
 500 505 510
 Ala Tyr His Glu Ala Ala His Ala Leu Val Gly Ala Leu Met Pro Glu
 515 520 525
 Tyr Asp Pro Val Pro Lys Ile Ser Ile Ile Pro Arg Gly Gln Ala Gly
 530 535 540
 Gly Leu Thr Phe Phe Ala Pro Ser Glu Glu Arg Leu Glu Ser Gly Leu
 545 550 555 560
 Tyr Ser Arg Ser Tyr Leu Glu Asn Gln Met Ala Val Ala Leu Gly Gly
 565 570 575
 Arg Val Ala Glu Glu Val Ile Phe Gly Gln Asp Asn Val Thr Thr Gly
 580 585 590
 Ala Ser Asn Asp Phe Met Leu Val Ser Arg Val Ala Arg Gln Met Val
 595 600 605
 Glu Arg Leu Gly Phe Thr Thr Lys Ile Gly Gln Val Ala Ile Gly Gly
 610 615 620
 Gly Gly Gly Asn Pro Phe Leu Gly Gln Gln Met Ser Thr Gln Lys Asp
 625 630 635 640
 Tyr Ser Met Ala Thr Ala Asp Val Val Asp Ala Glu Val Arg Glu Leu
 645 650 655
 Val Glu Arg Ala Tyr Glu Arg Ala Thr Gln Ile Ile Thr Thr His Ile
 660 665 670
 Asp Ile Leu His Lys Leu Ala Gln Leu Leu Ile Glu Lys Glu Thr Val
 675 680 685

 40
 Asp Gly Glu Glu Phe Met Ser Leu Phe Ile Asp Gly Lys Ala Glu Leu
 690 695 700
 Tyr Ile Ser Trp Val Ser Lys Glu Glu Asp
 705 710 714

【図面の簡単な説明】

【図 1】 DS9 と他の ATP 依存性 Zn 型メタロプロテアーゼとの構造比較を示す模式図である。DS9 は、他の ATP 依存性 Zn 型メタロプロテアーゼと同様に、N 末端側の膜を貫通すると考えられる疎水性領域、および中央部の ATPase 領域、ならびに C 末端側の Zn²⁺ 結合モチーフが存在し

た。

【図 2】 GST-DS9 融合タンパク質の Mg²⁺ 依存性の ATPase 活性を示す図である。

【図 3】 TMV 感染 NN タバコにおける、30 から 20 への温度シフト後の DS9 の転写の変動を示したノザン解析の結果を示す電気泳動写真である。変動のコントロール

として、傷をつけたのみの葉（模似）を用いた。発現のコントロールとしてrRNAを用いた。そしてHRの指標を示すコントロールとして感染時特異的に発現するPR-1を用いた。また、上部の各数字は30 から20 への温度シフト後の時間を示す。

【図4】 TMV感染NNタバコにおける、30 から20 への温度シフト後のDS9タンパク質量の変動を示したウエスタンブロット解析の結果を示す電気泳動写真である。変動のコントロールとして、傷をつけたのみの葉（模似）を用いた。抗体として、抗DS9抗体を用いた。また、上部の各数字は30 から20 への温度シフト後の時間を示す。また、下部の各数字は、模似の感染後0時間目のタンパク質量を100%としたときの、各時間におけるタンパク質量を示す。

【図5】 AMDおよび熱処理後のTMV感染NNタバコにおける、DS9の転写レベルおよびタンパク質の変動を示したノザン解析およびウエスタンブロット解析の結果を示す電気泳動写真である。

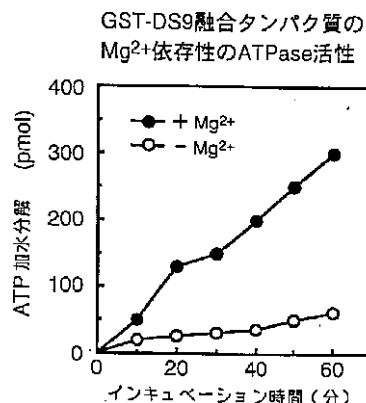
【図6】 DS9が葉緑体に局在して存在することが示す電子顕微鏡写真である。図6 Aは、抗DS9抗体および10nm金粒子結合抗ウサギIgGで処理した葉肉細胞におけるDS9タンパク質の局在を示す電子顕微鏡写真である。横棒は1 μmを示す。図6 Bは、図6 Aの高倍率の電子顕微鏡写真である。横棒は0.1 μmを示す。図6 Cは、前血清（コントロール）および10nmの金粒子結合抗ウサギIgGで処理した葉肉細胞の電子顕微鏡写真である。横棒は0.1 μmを示す。図6 Dは、抗DS9抗体および10nm金粒子結合抗ウサギIgGで処理した葉肉細胞の凍結切片におけるDS9タンパク質の局在を示す電子顕微鏡写真である。横棒は0.1 μmを示す。

【図7】 TMV感染タバコ（NNおよびnn）を、30 で40時間培養し、メタロプロテイン阻害剤（EDTA）および葉緑体電子伝達系阻害剤（DCMU）処理して、さらに30 で培養した24時間後の壊死病斑の程度を示す生物の形態を示す写真である。

【図1】



【図2】



10
20
30

【図8】 TMV感染タバコ（NNおよびnn）を、30 で40時間培養し、メタロプロテイン阻害剤（EDTA）および葉緑体電子伝達系阻害剤（DCMU）処理して、さらに30 で培養した24時間後のPR-1の発現レベルの程度を示したノザン解析の結果を示す電気泳動写真である。

【図9】 TMV感染タバコ（NNおよびnn）を、30 で40時間培養し、メタロプロテイン阻害剤（EDTA）および葉緑体電子伝達系阻害剤（DCMU）処理して、さらに30 で培養した24時間後のサリチル酸量を示す図である。

【図10】 HR誘発時に葉緑体の機能が低下することを、PSII活性を指標にして測定した図である。

【図11】 DS9遺伝子を、センス（S）およびアンチセンス（A）で導入したトランスジェニックタバコにおけるDS9タンパク質量を示すウエスタンブロット解析の結果を示す電気泳動写真である。抗体として抗DS9抗体を用いた。タンパク質量のコントロールとして、野生型タバコを用いた。

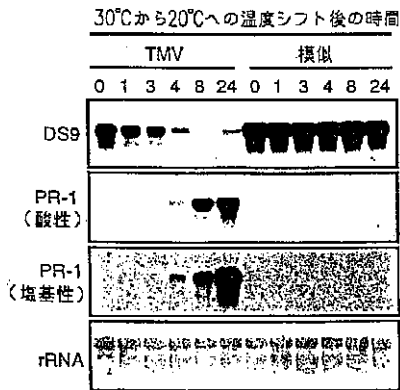
【図12】 DS9遺伝子を、センス（S）およびアンチセンス（A）で導入したトランスジェニックタバコにおけるTMV接種5日後の壊死病斑の直径を示すグラフである。コントロールとして、野生型タバコを用いた。

【図13】 DS9遺伝子を、センス（S）およびアンチセンス（A）で導入したトランスジェニックタバコ（A9およびS6）における、TMV感染後5日目の壊死病斑形成の程度を示す生物の形態を示す写真である。壊死病斑形成の程度のコントロールとして、野生型タバコを用いた。

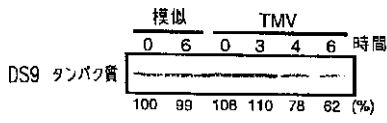
【図14】 DS9遺伝子を、アンチセンスで導入したトランスジェニックタバコ（A9）における、キュウリ立ち枯れ病菌感染後7日目の生物の形態を示す写真である。コントロールとして、35S-GUSを導入したトランスジェニックタバコを用いた。

【図15】 DS9遺伝子を、センスで導入したトランスジェニックタバコ（S4）における、パラコート処理後の生物の形態を示す写真である。コントロールとして、野生型タバコ（WT）を用いた。

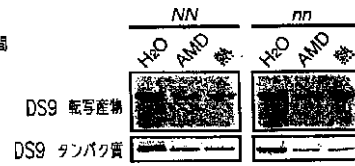
【 図 3 】



【 図 4 】



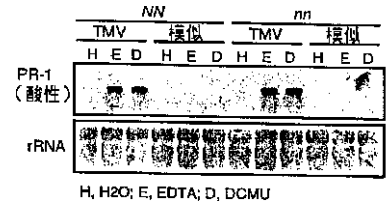
【 図 5 】



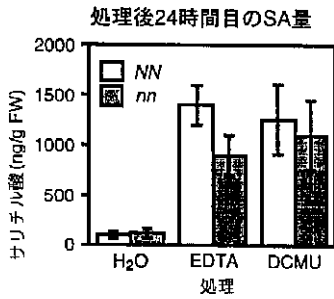
【 図 6 】



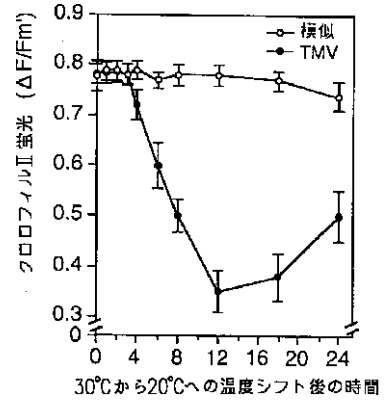
【 図 8 】



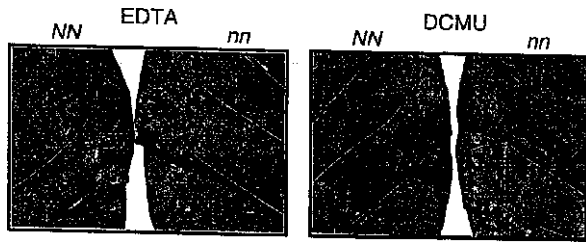
【 図 9 】



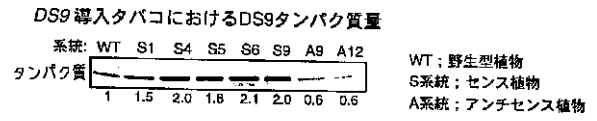
【 図 10 】



【 図 7 】

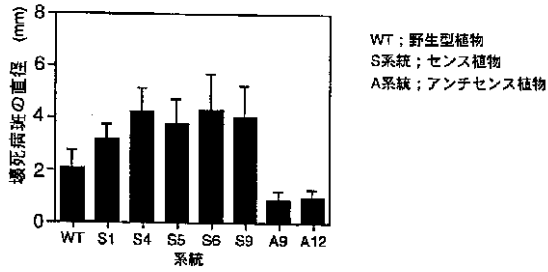


【 図 1 1 】

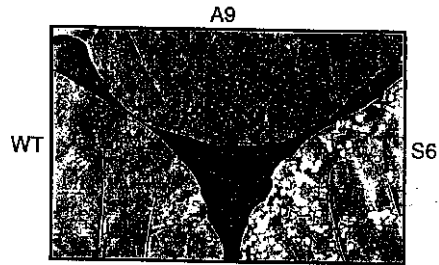


【 図 1 2 】

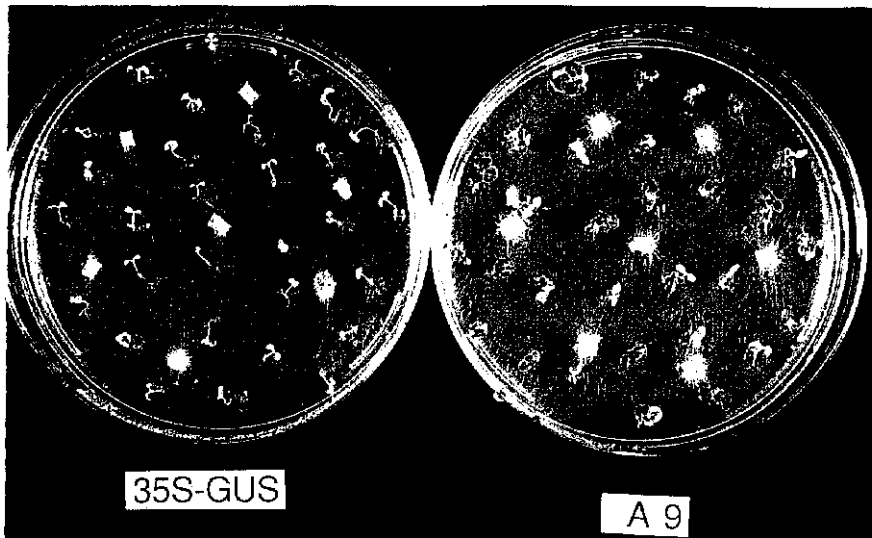
TMV接種5日後のDS9 導入タバコにおける壊死病斑の直径



【 図 1 3 】

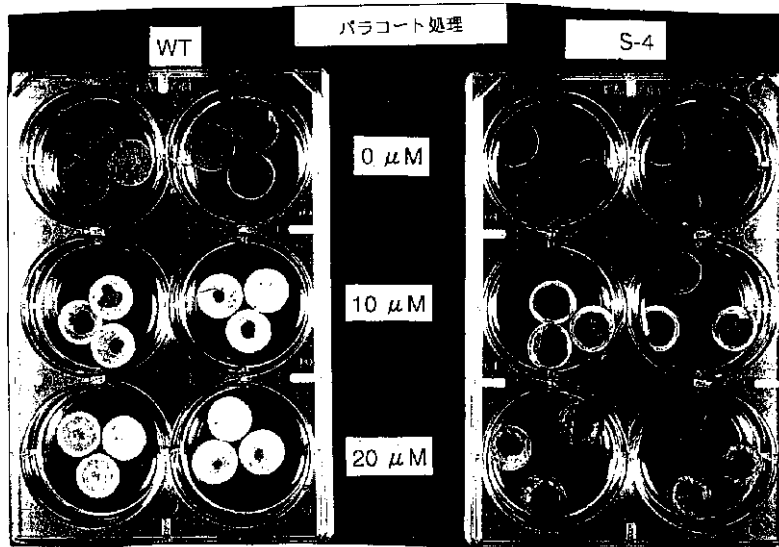


【 図 1 4 】



処理 7 日後

【図 1 5】



【手続補正書】

【提出日】平成 1 1 年 6 月 2 9 日

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】請求項 7

【補正方法】変更

【補正内容】

【請求項 7】 DS9 またはそのホモログをコードする細胞死調節遺伝子の選択的な阻害剤をスクリーニングする方法であって、

該 DS9 またはそのホモログをコードする細胞死調節遺伝子を有する植物細胞に、阻害剤候補物質を導入する工程；および、

該植物細胞において該 DS9 またはそのホモログの産生が選択的に減少したか否かを同定する工程、を包含し、ここで、該 DS9 もしくはそのホモログは、ATP 依存性 Zn 型メタロプロテアーゼである、方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 0 6

【補正方法】変更

【補正内容】

【0 0 0 6】しかし、本発明者らの研究により、アクチノマシジン D (AMD) および熱 (50、2 分) で処理した場合、通常は HR を生じない 30 の温度条件下でも、NN タ

バコにおいて、TMV 感染に対する HR が誘発されることが見出された。さらに、TMV 感染に対する HR は、AMD および熱での同様な処理によって、N 遺伝子を有さない Inn タバコにおいても誘発された。これらにより、TMV 感染に対する細胞死が、N 遺伝子の存在および非存在、ならびに温度とは無関係に生じ得ることが明らかになった (Shimomura および Ohashi, Virology, 43, 531, (1971); Ohashi および Shimomura, Virology, 48, 601 (1972))。AMD は核における DNA 依存性の RNA 合成を阻害することが知られている。従って、植物において新規な細胞調節遺伝子が存在し、その転写および引き続くタンパク質合成の抑制により HR が誘発される可能性が示された。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 7 8

【補正方法】変更

【補正内容】

【0 0 7 8】上述のように、(DS9 に代表される) ATP 依存性 Zn 型メタロプロテアーゼによる細胞死の調節は、植物に限らず真核生物全般においてその生体機能に深く関与していることが示唆される。従って、DS9 関連遺伝子の選択的な阻害剤は、生体機能の選択的な抑制のための手段として重要であり得る。例えば、このような阻害剤は、農薬および医薬の候補物質として利用される。

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	F I
C 1 2 R 1:91)		
(C 1 2 N 5/10		
C 1 2 R 1:91)		