

(19)日本国特許庁 (JP)

# 再公表特許 (A1)

(11)国際公開番号

## WO 00 / 3 7 6 4 4

発行日 平成14年4月9日 (2002.4.9)

(43)国際公開日 平成12年6月29日 (2000.6.29)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	FI
C 1 2 N 15/09	ZNA	C 1 2 N 15/00 ZNAA
A 0 1 H 5/00		A 0 1 H 5/00 A
C 0 7 K 14/415		C 0 7 K 14/415
16/16		16/16
C 1 2 N 5/10		C 1 2 P 21/02 C

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 40 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2000-589698(P2000-589698)	(71)出願人	独立行政法人農業生物資源研究所 茨城県つくば市観音台2丁目1-2
(21)国際出願番号	PCT/JP99/07224	(72)発明者	福田 篤徳 茨城県つくば市観音台2-1-2 独立行政法人農業生物資源研究所内
(22)国際出願日	平成11年12月22日 (1999.12.22)	(72)発明者	田中 喜之 茨城県つくば市観音台2-1-2 独立行政法人農業生物資源研究所内
(31)優先権主張番号	特願平10-365604	(74)代理人	弁理士 清水 初志 (外1名)
(32)優先日	平成10年12月22日 (1998.12.22)		
(33)優先権主張国	日本 (JP)		
(81)指定国	EP(CH, DE, FR, GB, IT, NL), AU, CA, CN, JP, KR, US		

(54)【発明の名称】 ナトリウム／プロトン対向輸送体遺伝子

(57)【要約】

イネのNa<sup>+</sup> / H<sup>+</sup> 対向輸送体遺伝子をクローニングすることに成功した。単離した遺伝子やこれと機能的に同等な遺伝子を利用して、耐塩性植物の作出を行うことが可能である。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 下記 ( a ) または ( b ) に記載の D N A。

( a ) 配列番号 : 2 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする D N A。

( b ) 配列番号 : 1 に記載の塩基配列のコード領域を含む D N A。

【請求項 2】 単子葉植物由来の  $N a^{+} / H^{+}$  対向輸送体をコードする下記 ( a ) または ( b ) に記載の D N A。

( a ) 配列番号 : 2 に記載のアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および / または付加したアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする D N A。

( b ) 配列番号 : 1 に記載の塩基配列からなる D N A とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする D N A。

【請求項 3】 単子葉植物がイネ科植物である、請求項 2 に記載の D N A。

【請求項 4】 請求項 1 または 2 に記載の D N A を含むベクター。

【請求項 5】 請求項 1 若しくは 2 に記載の D N A または請求項 5 に記載のベクターを保持する形質転換細胞。

【請求項 6】 植物細胞である、請求項 5 に記載の形質転換細胞。

【請求項 7】 請求項 1 または 2 に記載の D N A によりコードされるタンパク質。

【請求項 8】 請求項 5 に記載の形質転換細胞細胞を培養し、該細胞またはその培養上清から発現させたタンパク質を回収する工程を含む、請求項 7 に記載のタンパク質の製造方法。

【請求項 9】 請求項 6 に記載の形質転換細胞を含む形質転換植物体。

【請求項 10】 単子葉植物である、請求項 9 に記載の形質転換植物体。

【請求項 11】 イネ科植物である、請求項 10 に記載の形質転換植物体。

【請求項 12】 イネである、請求項 11 に記載の形質転換植物体。

【請求項 13】 請求項 9 から 12 のいずれかに記載の形質転換植物体の子孫またはクローンである、形質転換植物体。

【請求項 14】 請求項 9 から 13 のいずれかに記載の形質転換植物体の繁殖材

料。

【請求項 1 5】 請求項 7 に記載のタンパク質に結合する抗体。

【請求項 1 6】 配列番号： 1 に記載の DNA とハイブリダイズする、少なくとも 1 5 ヌクレオチドの鎖長を有する核酸分子。

## 【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、植物由来の新規な  $\text{Na}^+ / \text{H}^+$  対向輸送体、該輸送体によりコードされる DNA、並びにそれらの製造および用途に関する。

背景技術

植物の耐塩性は農業および環境保全上重要な問題である。現在、地球上の約 3 分の 1 は乾燥地に属しているといわれ、現在も耕地や緑地の砂漠化が進んでいることから、その割合は将来増加することが予想される。2050 年には世界人口が現在の 1.5 倍以上になるといわれ、食糧問題はますます深刻化することを考えると、耕作不適地、特に乾燥地でも育つ作物品種や栽培技術の開発は緊急を要する課題である。そこで、乾燥地の農業において問題となっているのは、土壌における塩分集積の問題である。乾燥気候下では、蒸発散量が降水量を上回るため、排水が不完全な状態で灌漑を続けた場合、塩分を含んだ地下水位の上昇が促進されて塩分が地表に析出するため、土壌における多量な塩分集積に結びつく。その結果耕作が不能になる例は、チグリス - ユーフラテス文明の滅亡を代表に太古の昔から知られており、現在でも未だ問題になることが多い。以上のことから、作物の耐塩性を高めることは、乾燥地や塩分集積地の農業を進める上で重要な課題となっている（但野利秋（1983）化学と生物 21, 439 - 445 作物の耐塩性とその機構； 内山泰孝（1988）化学と生物 26, 650 - 659 塩性環境の農業利用）。

植物に対する塩ストレスを考える場合、2 種類のストレス、つまり浸透圧ストレスとイオンストレスが問題になる。浸透圧ストレスとは、植物を取り囲む環境が高い濃度の塩分のため高浸透圧となり、植物の水分吸収の妨げになると同時に植物体から水を奪う結果となることから、乾燥ストレスと同じ作用をするストレスである。植物にはこの浸透圧ストレスを回避する機構が存在することが知られており、その中心的働きをするのがイオン（ $\text{K}^+$ 、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{Cl}^-$ 、有機酸など）や適合溶質と呼ばれる物質である。適合溶質とは、細胞内に高濃度蓄積されても種々の代謝系を乱さず酵素活性を阻害しない糖、アミノ酸の一種プロリン、四級アンモニウム化合物のグリシンベタインなどのことを指し、植物はこれらを細

胞内に蓄積して外界との浸透圧バランスをとっている（石谷学，荒川圭太，高部鉄子（1990）植物の化学調節25，149 - 162植物耐塩性の分子機構）。

イオンストレスについては、植物の回避機構についてほとんど研究が進んでいない。過剰な $\text{Na}^+$ が植物の細胞内に吸収されると、細胞内の酵素反応が阻害され代謝障害が起こる（間籐徹（1997）植物の化学調節32，198 - 206植物の耐塩性メカニズム）。そのため、細胞内に蓄積した $\text{Na}^+$ を細胞外に排出したり、液胞などの細胞内器官に隔離する必要がある。その中心的な働きをすることを考えられているのが $\text{Na}^+ / \text{H}^+$ 対向輸送体（ナトリウム/プロトン対向輸送体）である。植物の $\text{Na}^+ / \text{H}^+$ 対向輸送体は、細胞質膜や液胞膜に存在すると考えられ、 $\text{H}^+$ を輸送する $\text{H}^+$ ポンプ（ $\text{H}^+ - \text{ATPase}$ や $\text{H}^+ - \text{PPase}$ ）によって形成される生体膜を介したpH勾配をエネルギー源として利用して、細胞質に存在する $\text{Na}^+$ を細胞外や液胞内に輸送する。また、高塩処理を受けた植物は、細胞質内の $\text{K}^+ / \text{Na}^+$ 比率を高く保たねばならず、 $\text{Na}^+ / \text{H}^+$ 対向輸送体によって液胞に $\text{Na}^+$ を蓄積することにより、外界との浸透圧バランスをとるとも考えられている。

細胞質膜に局在する $\text{Na}^+ / \text{H}^+$ 対向輸送体については、動物、酵母、細菌などでよく調べられている。動物細胞の細胞質膜では、細胞内の $\text{H}^+$ バランスをとるために、 $\text{Na}^+ / \text{K}^+ - \text{ATPase}$ によって形成された膜内外の $\text{Na}^+$ 濃度勾配を利用して $\text{Na}^+ / \text{H}^+$ 対向輸送体が $\text{H}^+$ を輸送する。このため、この対向輸送体は、細胞内のpH調整、細胞容量のコントロール、細胞質膜を介した $\text{Na}^+$ 輸送などに強く関与していると考えられている（Orlowski, J. and Grinstein, S. (1997) J. Biol. Chem. 272, 22373 - 22376; Aronson, P. S. (1985) Ann. Rev. Physiol. 47, 545 - 560）。動物では、 $\text{Na}^+ / \text{H}^+$ 対向輸送体は様々な細胞に存在し、6種類のアイソフォーム（NHE1 - 6）が報告されている（Orlowski, J. and Grinstein, S. (1997) J. Biol. Chem. 272, 22373 - 22376）。酵母では、まず分裂酵母（Schizosaccharomyces pombe）でN

$\text{Na}^+$  輸送と耐塩性に関連した遺伝子としてクローニングされ ( *sod2* ) ( Ji  
a , Z . P . , McCullough , N . , Martel , R . , Hemmi  
ngsen , S . and Young , P . G . ( 1992 ) EMBO J . 1  
1 : 1631 - 1640 )、これと高い相同性を持つ遺伝子が出芽酵母 ( *Sa  
ccharomyces cerevisiae* ) や *Zygosaccharo  
myces rouxii* で見つかっている ( それぞれ NHA1、ZSOD2 と  
名付けられている ) ( Prior , C . et al . ( 1996 ) FEBS L  
etter 387 , 89 - 93 ; Watanabe , Y . et al . ( 1  
995 ) Yeast 11 , 829 - 838 )。大腸菌では、異なった2種類の  
 $\text{Na}^+ / \text{H}^+$  対向輸送体遺伝子 ( *nhaA*、*nhaB* ) が単離されており ( Ka  
rpel , R . et al . ( 1988 ) J . Biol . Chem . 263 , 1  
0408 - 10410 ; Pinner , E . et al . ( 1994 ) J . B  
iol . Chem . 269 , 26274 - 26279 )、それぞれ  $\text{Na}^+$  輸送と  
耐塩性に強く関与している。植物では、藻類などで活性が調べられている ( Ka  
tz , A . et al . ( 1989 ) Biochim . Biophys . Acta  
983 : 9 - 14 )。

一方、液胞膜に局在しているものについては植物のみから活性についての報告  
があるにすぎない。液胞膜の  $\text{Na}^+ / \text{H}^+$  対向輸送体は、塩濃度の高い環境に生  
育する塩生植物 ( Matoh , T . et al . ( 1989 ) Plant Ph  
ysiol . 89 : 180 - 183 ; Hassidim , M . et al .  
( 1990 ) 94 : 1795 - 1801 ; Barkla , B . J . et a  
l . ( 1995 ) Plant Physiol . 109 : 549 - 556 ) や  
オオムギやテンサイなどの耐塩性の高い中生植物 ( Hassidim , M . et  
al . ( 1990 ) 94 : 1795 - 1801 ; Blumwald , E .  
et al . ( 1987 ) Plant Physiol . 85 : 30 ~ 33 ;  
Garbarino , J . and DuPont , F . M . ( 1988 ) Pl  
ant Physiol . 86 : 231 - 236 ; Garbarino , J  
. and DuPont , F . M . ( 1989 ) Plant Physiol .  
89 : 1 - 4 ; Staal , M . et al . ( 1991 ) Physiol .

Plant . 82 : 179 - 184 ) において耐塩性と結びつけて現在まで調べられている。以上のことは、 $\text{Na}^+ / \text{H}^+$  対向輸送体と植物の耐塩性が密接な関係にあることを示している。液胞膜の $\text{Na}^+ / \text{H}^+$  対向輸送体の性質についてはいくつか報告がある。その輸送体活性の $\text{Na}^+$  に対する $K_m$ 値は約 $10\text{ mM}$ であり、哺乳類の細胞質膜のものと似ている ( Blumwald , E . et al . ( 1987 ) Plant Physiol . 85 : 30 - 33 ; Garbarino , J . and DuPont , F . M . ( 1988 ) Plant Physiol . 86 : 231 - 236 ; Orłowski , J . ( 1993 ) J . Biol . Chem . 268 : 16369 - 16377 ) 。また、 $\text{Na}^+$  輸送体の特異的阻害剤であるアミロライドやアミロライド誘導体は、それらの対向輸送体両方を競合的に阻害することが知られている ( Blumwald , E . et al . ( 1987 ) Plant Physiol . 85 : 30 - 33 ; Orłowski , J . ( 1993 ) J . Biol . Chem . 268 : 16369 - 16377 ; Tse , C . M . et al . ( 1993 ) J . Biol . Chem . 268 : 11917 - 11924 ; Fukuda , A . et al . ( 1998 ) Plant Cell Physiol . 39 : 196 - 201 ) 。これらのことは、植物の液胞膜の $\text{Na}^+ / \text{H}^+$  対向輸送体の性質が哺乳類の細胞質膜のものと類似していることを示唆している。以上のように、植物の $\text{Na}^+ / \text{H}^+$  対向輸送体の活性については様々な報告があるが、その本体、つまり遺伝子やタンパク質については、今まで様々な試みがなされてきたが、その解析は遅れていた ( Katz , A . et al . ( 1989 ) Biochim . Biophys . Acta 983 : 9 - 14 ; Barkla , B . and Blumwald , E . ( 1991 ) Proc . Natl . Acad . Sci . USA 88 : 11177 - 11181 ; Katz , A . , Kleymann , T . R . , and Pick , U . ( 1994 ) Biochemistry 33 : 2389 - 2393 ) 。

最近になり、アラビドプシスにおいて既知の $\text{Na}^+ / \text{H}^+$  対向輸送体のアミノ酸配列と相同性を有するタンパク質をコードすると予想される遺伝子がクローニングされたが、その機能については解明されていない ( M . P . Apsse et

al., (1998) Final Programme and Book of Abstracts "11th International Workshop on Plant Membrane Biology", Springer; C.P. Darley et al., (1998) Final Programme and Book of Abstracts "11th International Workshop on Plant Membrane Biology", Springer)。

植物において単離された $\text{Na}^+ / \text{H}^+$ 対向輸送体遺伝子は、上記の双子葉植物であるアラビドプシスの例にとどまり、産業上有用な農作物であるイネやトウモロコシなどを含む単子葉植物については、いまだ遺伝子の単離は報告されていない。

#### 発明の開示

重要な農作物の中でも、特にイネは耐塩性の低い作物であり、耐塩性の高い作物であるオオムギが250 mMの $\text{NaCl}$ で生長が半分に抑えられるのに対し、イネは150 mMで同じ阻害を受ける。Garbarino等は、オオムギでは根の液胞に $\text{Na}^+$ を蓄積することで茎葉への $\text{Na}^+$ の流れを抑えて耐塩性を高めているのではないかと報告している(Garbarino, J. and DuPont, F.M. (1988) Plant Physiol. 86: 231-236)。これを裏付ける結果として、オオムギ根の液胞膜の $\text{Na}^+ / \text{H}^+$ 対向輸送活性は塩処理によって上昇し、イネよりはるかに高い活性をもつことが分かっている(Garbarino, J. and DuPont, F.M. (1988) Plant Physiol. 86: 231-236; Fukuda, A., Yazaki, Y., Ishikawa, T., Koike, S., and Tanaka, Y. (1998) Plant Cell Physiol. 39: 196-201)。

一方、イネにおいては塩処理により活性は上昇しない(Fukuda, A., Yazaki, Y., Ishikawa, T., Koike, S., and Tanaka, Y. (1998) Plant Cell Physiol. 39: 196-201)。さらに、イネにおける根から茎葉への $\text{Na}^+$ 輸送は、同じ



イネ科の植物である耐塩性の高いヨシより高いことが分かっているため ( M a t s u s h i t a , N . a n d M a t o h , T . ( 1 9 9 1 ) P h y s i o l . P l a n t . 8 3 : 1 7 0 - 1 7 6 )、根の液胞膜の  $N a^{+} / H^{+}$  対向輸送活性の強さがイネの耐塩性に強く関係している可能性がある。これらの報告は、イネ根の  $N a^{+} / H^{+}$  対向輸送活性を高めることが、イネの耐塩性を高め得る可能性を示唆している。このためイネの  $N a^{+} / H^{+}$  対向輸送体活性を高め得る遺伝子の単離が強く望まれていた。

本発明は、このような状況に鑑みてなされたなされたものであり、その目的は、単子葉植物、好ましくはイネ由来の  $N a^{+} / H^{+}$  対向輸送体および該輸送体をコードする D N A、並びにそれらの製造および用途を提供することにある。本発明は、本発明の D N A の好ましい用途として、耐塩性植物体の作出のための該遺伝子の利用を提供する。

本発明者らは、出芽酵母の  $N a^{+} / H^{+}$  対向輸送体 ( N H X 1 ) 遺伝子とホモロジーがある塩基配列を G e n e B a n k の高等植物のデータベースから解析し、イネの花序由来の c D N A クローンを同定した。この配列をプローブとして用いて、イネ c D N A ライブラリーをスクリーニングし、イネの  $N a^{+} / H^{+}$  対向輸送体をコードすると予想される、「 O s N H X 1 」と命名された新規遺伝子の全長をクローニングすることに成功した。

単離された O s N H X 1 c D N A は約 2 . 3 k b であり、5 3 5 アミノ酸からなるタンパク質をコードしていると予想される ( 図 1 )。アミノ酸の疎水性解析の結果、該タンパク質には 1 2 の膜貫通領域が検出された ( 図 2 )。

O s N H X 1 から予想されるアミノ酸配列は、N H X 1 や哺乳類の  $N a^{+} / H^{+}$  対向輸送体 ( N H E ) のアミノ酸配列と有意な相同性が検出された ( 表 1 )。特に、イオン輸送に関係していると思われる膜貫通領域で高い相同性が見られた ( 図 3 )。

現在まで報告されている種々の  $N a^{+} / H^{+}$  対向輸送体について系統樹を作成すると、出芽酵母の N H X 1、哺乳類の N H E 6、O s N H X 1 の 3 つがクラスターをつくることが判明した ( 図 4 )。N H X 1 は後期エンドソームで発現しているという報告があり ( N a s s , R . a n d R a o , R . ( 1 9 9 8 ) J .

B i o l . C h e m . 2 7 3 : 2 1 0 5 4 - 2 1 0 6 0 )、また、N H E 6 も細胞内で発現していることが示唆されている ( N u m a t a , M . , P e t r e c c a , K . , L a k e , N . , a n d O r l o w s k i ( 1 9 9 8 ) J . , J . B i o l . C h e m . 2 7 3 : 6 9 5 1 - 6 9 5 9 ) ことから、本発明の O s N H X 1 は、液胞などの細胞内器官で発現し、液胞膜への  $N a^{+}$  輸送に重要な働きをしていると考えられる。

本発明者等は、さらに、アグロバクテリウム法を利用して、単離した O s N H X 1 遺伝子をイネカルスに導入し、これを再分化させてトランスジェニック植物体を得ることに成功した。

本発明は、単子葉植物由来の新規な  $N a^{+} / H^{+}$  対向輸送体および該輸送体をコードする D N A、並びにそれらの製造および用途、特に耐塩性植物の作出のための用途に関し、より具体的には、

1 . 下記 ( a ) または ( b ) に記載の D N A、

( a ) 配列番号 : 2 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする D N A。

( b ) 配列番号 : 1 に記載の塩基配列のコード領域を含む D N A。

2 . 単子葉植物由来の  $N a^{+} / H^{+}$  対向輸送体をコードする下記 ( a ) または ( b ) に記載の D N A、

( a ) 配列番号 : 2 に記載のアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および / または付加したアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする D N A。

( b ) 配列番号 : 1 に記載の塩基配列からなる D N A とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする D N A。

3 . 単子葉植物がイネ科植物である、( 2 ) に記載の D N A、

4 . ( 1 ) または ( 2 ) に記載の D N A を含むベクター、

5 . ( 1 ) 若しくは ( 2 ) に記載の D N A または ( 5 ) に記載のベクターを保持する形質転換細胞、

6 . 植物細胞である、( 5 ) に記載の形質転換細胞、

7 . ( 1 ) または ( 2 ) に記載の D N A によりコードされるタンパク質、

8 . ( 5 ) に記載の形質転換細胞細胞を培養し、該細胞またはその培養上清から発現させたタンパク質を回収する工程を含む、( 7 ) に記載のタンパク質の製造方法、

9 . ( 6 ) に記載の形質転換細胞を含む形質転換植物体、

1 0 . 単子葉植物である、( 9 ) に記載の形質転換植物体、

1 1 . イネ科植物である、( 1 0 ) に記載の形質転換植物体、

1 2 . イネである、( 1 1 ) に記載の形質転換植物体、

1 3 ( 9 ) から ( 1 2 ) のいずれかに記載の形質転換植物体の子孫またはクローンである、形質転換植物体、

1 4 . ( 9 ) から ( 1 3 ) のいずれかに記載の形質転換植物体の繁殖材料、

1 5 . ( 7 ) に記載のタンパク質に結合する抗体、

1 6 . 配列番号 : 1 に記載の DNA とハイブリダイズする、少なくとも 1 5 ヌクレオチドの鎖長を有する核酸分子、を提供するものである。

本発明は、単子葉植物由来の新規な  $\text{Na}^+ / \text{H}^+$  対向輸送体および該輸送体をコードする DNA を提供する。本発明者等により単離されたイネ由来の  $\text{Na}^+ / \text{H}^+$  対向輸送体「OsNHX1」をコードする cDNA の塩基配列を配列番号 : 1 に、該 cDNA がコードするタンパク質のアミノ酸配列を配列番号 : 2 に示す。

「OsNHX1」遺伝子は、既知の複数の  $\text{Na}^+ / \text{H}^+$  対向輸送体のアミノ酸配列と有意な相同性を有しており、特にイオン輸送に関連する部分において高い相同性が認められた。この事実は、「OsNHX1」タンパク質が、イネにおける  $\text{Na}^+$  輸送に重要な役割を果たしていることを示唆する。植物の  $\text{Na}^+ / \text{H}^+$  対向輸送体は、高塩ストレス下においては、植物体内の浸透圧のバランスの確保に関与していることが考えられている。従って、「OsNHX1」遺伝子は、特に、植物の耐塩性品種の作出などへの応用が可能であると考えられる。

本発明には、「OsNHX1」タンパク質のみならず、これと同等の機能を有するタンパク質も含まれる。本発明において「「OsNHX1」タンパク質と同等の機能を有する」とは、対象となるタンパク質が  $\text{Na}^+ / \text{H}^+$  対向輸送体として機能することを指す。 $\text{Na}^+ / \text{H}^+$  対向輸送体活性は、例えば、単離した生体

膜小胞内外に  $H^+$  - A T P a s e によって形成させた  $H^+$  濃度勾配をアクリジンオレンジの蛍光消光によってモニターし、 $N a^+$  添加による生体膜小胞内からの  $H^+$  の排出を蛍光の回復として測定することができる ( F u k u d a , A . , Y a z a k i , Y . , I s h i k a w a , T . , K o i k e , S . , a n d T a n a k a , Y . ( 1 9 9 8 ) P l a n t C e l l P h y s i o l . 3 9 : 1 9 6 - 2 0 1 . ) ) 。

「 O s N H X 1 」タンパク質と同等な機能を有するタンパク質の1つの態様は、「 O s N H X 1 」タンパク質のアミノ酸配列 ( 配列番号 : 2 ) において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および若しくは付加したアミノ酸配列を有し、「 O s N H X 1 」タンパク質と同等な機能を有する変異タンパク質である。このようなタンパク質は、例えば、以下の方法により調製することが可能である。当業者によく知られた方法としては、例えば、「 O s N H X 1 」タンパク質のアミノ酸に変異を導入する方法が挙げられる。即ち、当業者であれば、例えば、タンパク質の活性を高めるなどの目的で、部位特異的変異導入法 ( s i t e - d i r e c t e d m u t a g e n e s i s 法 ) ( K r a m e r , W . & F r i t z , H . - J . O l i g o n u c l e o t i d e - d i r e c t e d c o n s t r u c y i o n o f m u t a g e n e s i s v i a g a p p e d d u p l e x D N A . M e t h o d s i n E n z y m o l o g y , 1 5 4 : 3 5 0 - 3 6 7 , 1 9 8 7 ) などを利用して、「 O s N H X 1 」タンパク質 ( 配列番号 : 2 ) 中のアミノ酸配列を改変し、「 O s N H X 1 」タンパク質と同等の機能を有する改変タンパク質を調製することが可能である。また、アミノ酸の変異は自然界において生じることもある。本発明のタンパク質には、このように人工的であると天然由来であるとを問わず、天然型の「 O s N H X 1 」タンパク質のアミノ酸配列 ( 配列番号 : 2 ) において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、もしくは付加したアミノ酸配列を有し、該タンパク質と同等の機能を有するタンパク質が含まれる。タンパク質におけるアミノ酸の改変部位および改変個数は、改変後のタンパク質が天然型の「 O s N H X 1 」タンパク質と同等の機能を有する限り、特に制限はない。アミノ酸の改変は、一般的には、100アミノ酸以内であり、好ましくは50アミノ酸以内であり、さらに好ま

しくは20アミノ酸以内であり、さらに好ましくは5アミノ酸以内である。

また、「O s N H X 1」タンパク質と同等な機能を有するタンパク質の他の態様は、「O s N H X 1」タンパク質をコードするDNA（配列番号：1）とハイブリダイズする単子葉植物由来のDNAがコードするタンパク質であって、「O s N H X 1」タンパク質と同等な機能を有するタンパク質である。このようなタンパク質を調製するために、当業者によく知られた他の方法としては、ハイブリダイゼーション技術（Southern, E. M. : Journal of Molecular Biology, Vol. 98, 503, 1975.）やポリメラーゼ連鎖反応（PCR）技術（Saiki, R. K. et al. Science, vol. 230, 1350-1354, 1985、Saiki, R. K. et al. Science, vol. 239, 487-491, 1988）が挙げられる。即ち、当業者にとっては、「O s N H X 1」遺伝子の塩基配列（配列番号：1）もしくはその一部をプローブとして、また「O s N H X 1」遺伝子の塩基配列（配列番号：1）に特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドをプライマーとして、イネ若しくは他の単子葉植物から「O s N H X 1」遺伝子と高い相同性を有するDNAを単離し、該DNAから「O s N H X 1」タンパク質と同等の機能を有するタンパク質を得ることは通常行いうることである。このようにハイブリダイズ技術やPCR技術により単離しうる「O s N H X 1」タンパク質と同等の機能を有する単子葉植物由来のタンパク質もまた本発明のタンパク質に含まれる。

ハイブリダイズ技術やPCR技術により遺伝子を単離するための植物としては、単子葉植物、好ましくはイネ科植物が挙げられる。イネ科植物としては、例えば、イネ以外に、オオムギ（Hordeum vulgare）、コムギ（Triticum aestivum）、トウモロコシ（Zea mays）などが挙げられるが、これらに制限されない。

上記の技術を利用して、「O s N H X 1」タンパク質と同等な機能を有するタンパク質をコードするDNAを単離する方法としては、例えば、以下のような方法が挙げられるが、これらに限られない。例えば、<sup>32</sup>P等でラベルしたプローブ（例えば、配列番号：1に記載の塩基配列からなるDNAまたはその一部）を

用いて、単子葉植物から調製した cDNA あるいはゲノミックライブラリーを用いたハイブリダイゼーションを行う。<sup>3 2</sup> P でラベルしたプローブを用いたハイブリダイゼーションの条件は、ハイブリダイゼーション溶液 ( 50 % formamide , 5 x SSPE , 2 x Denhard ' s solution , 0 . 1 % ( w / v ) SDS , and 100 µg / ml of herring sperm DNA ( Sambrook J , Fritsch EF , Maniatis T ( 1989 ) Molecular cloning : A Laboratory Manual ( Cold Spring Harbor Lab . , Cold Spring Harbor , NY ) , 2nd Ed . ) ) を用いて緩やかな条件では 25 ( formamide を含まない ) 、通常の条件では 42 で行う。プレハイブリダイゼーションは少なくとも 1 時間以上行い、ハイブリダイゼーションの時間を 24 時間で行う。ハイブリダイゼーションを行ったフィルターの洗浄は、緩やかな条件 ( 低ストリンジェントな条件 ) では 25 ( 洗浄用溶液 : 2 x SSC , 0 . 1 % SDS ) 、通常の条件では 42 ( 洗浄用溶液 : 2 x SSC , 0 . 1 % SDS ) 、厳しい条件 ( 高ストリンジェントな条件 ) では 56 ( 洗浄用溶液 : 0 . 1 x SSC , 0 . 1 % SDS ) で行う。

これにより単離された DNA がコードするタンパク質が「 O s N H X 1 」タンパク質と同等の機能を有す場合、通常、「 O s N H X 1 」タンパク質とアミノ酸配列において高い相同性を有する。高い相同性とは、少なくとも 60 % 以上の相同性、好ましくは 80 % 以上の相同性、さらに好ましくは 85 % 以上の相同性、さらに好ましくは 90 % 以上の相同性を指す。アミノ酸配列の相同性は、例えば、GENETYX ソフトウェア ( ソフトウェア開発株式会社 ) のホモロジー解析プログラム ( Lipman , D . J . and Pearson , W . R . ( 1985 ) Science 227 , 1435 - 1441 ) により算出することができる。

本発明のタンパク質は、当業者に公知の方法により、組み換えタンパク質として、また天然のタンパク質として調製することができる。組み換えタンパク質は、後述するが、例えば、本発明のタンパク質をコードする DNA を適当な発現ベ

クターに挿入し、該ベクターを適当な細胞に導入し、該形質転換細胞から精製することにより調製することが可能である。また、天然のタンパク質は、例えば、調製した組み換えタンパク質若しくはその部分ペプチドを適当な免疫動物に免疫することにより調製した抗体を結合したアフィニティーカラムに、本発明のタンパク質を発現している細胞（例えば、イネ細胞）などから調製した抽出液を接触させて、該カラムに結合するタンパク質を精製することにより調製することができる。

また、本発明は、上記本発明のタンパク質をコードするDNAを提供する。本発明のDNAは、本発明のタンパク質をコードし得るものであれば特に制限はなく、ゲノムDNA、cDNAおよび化学合成DNAなどが含まれる。本発明のDNAに含まれる「O s N H X 1」cDNAの塩基配列を配列番号：1に示す。

ゲノムDNAおよびcDNAの調製は、当業者にとって常套手段を利用して行うことが可能である。例えば、ゲノムDNAは、本発明の遺伝子の塩基配列情報から適当なプライマー対を設計してPCRを行い、得られる増幅DNA断片をプローブとして用いてゲノミックライブラリーをスクリーニングすることによって単離することができる。また、例えば、同様にしてcDNAライブラリーからcDNAを単離することができる。

本発明のDNAは、例えば、組み換えタンパク質の調製や耐塩性の形質転換植物体の作出などに利用することが可能である。組み換えタンパク質を調製する場合には、通常、本発明のタンパク質をコードするDNAを適当な発現ベクターに挿入し、該ベクターを適当な細胞に導入し、形質転換細胞を培養して発現させたタンパク質を精製する。

組み換えタンパク質は、例えば、本発明のタンパク質をコードするDNAが挿入されたベクターを、エレクトロポレーション法やリン酸カルシウム法などの公知の遺伝子導入法を利用して、大腸菌等のバクテリア、酵母、昆虫細胞、哺乳動物細胞などに導入し、これら細胞内で組み換えタンパク質を発現させて調製することができる。宿主細胞内で発現させた組み換えタンパク質は、当業者に公知の方法により精製することが可能である。例えば、大腸菌ではpGEX (Pharmacia)などの発現ベクターを用いてグルタチオンS-トランスフェラーゼ

( G S T ) との融合タンパク質として発現させ、グルタチオンカラムを用いて精製することができる ( 大野茂男 , 西村善文 ( 1 9 9 7 ) 細胞工学別冊タンパク実験プロトコール , 秀潤社 ) 。

また、本発明の D N A を利用して形質転換植物体を作製する場合には、本発明のタンパク質をコードする D N A を適当なベクターに挿入して、これを植物細胞に導入し、これにより得られた形質転換植物細胞を再生させる。植物細胞への植物発現ベクターの導入には、植物細胞の種類に応じて、例えば、アグロバクテリウムを介する方法や直接細胞に導入する方法を用いることが可能である。アグロバクテリウムを介する方法としては、例えば、N a g e l らの方法 ( M i c r o b i o l . L e t t . 6 7 , 3 2 5 ( 1 9 9 0 ) ) やイネの場合 R a i n e r i らの方法 ( B I O / T E C H N O L O G Y 8 , 3 3 - 3 8 ( 1 9 9 0 ) ) が用いられる。これらの方法は、植物発現ベクター ( p U C 系のベクターなど。例えば、p C A M B I A ベクター ( M e d i c a l R e s e a r c h C o u n c i l ) など ) を用いてアグロバクテリウムを形質転換し、形質転換されたアグロバクテリウムをリーフディスク法やカルス法等によって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、パーティクルガン法、リン酸カルシウム法、及びポリエチレングリコール法などが挙げられる。

ベクターを挿入する植物細胞としては、特に制限はないが、単子葉植物、好ましくはイネ科植物の細胞である。イネ科植物としては、イネ以外に、例えばトウモロコシなどが挙げられる。なお、本発明の「植物細胞」には、種々の形態の植物細胞、例えば、懸濁培養細胞、プロトプラスト、葉の切片、カルスなどが含まれる。

ベクターを挿入したトランスジェニック植物細胞からトランスジェニック植物体の再生には、植物の種類に応じて、例えば、カルスの再分化法 ( K y o z u k a , J . a n d S h i m a m o t o , K . ( 1 9 9 1 ) P l a n t T i s s u e C u l t u r e M a n u a l . K l u w e r A c a d e m i c P u b l i s h e r s , p p B 1 , 1 - 1 6 、 T o k i , S . ( 1 9 9 7 ) P l a n t M o l e c u l a r B i o l o g y 1 5 , 1 6 - 2 1 ) やプロトプラ



ストを用いた再分化法 ( S h i m a m o t o , K . e t a l . ( 1 9 8 9 ) N a t u r e 3 3 8 , 2 7 4 - 2 7 6 ; K y o z u k a , J . e t a l . ( 1 9 8 7 ) M o l . G e n . G e n e t . 2 0 6 , 4 0 8 - 4 1 3 ) などが用いられ得る。

これにより作出されたトランスジェニック植物体は、野生型植物体と比較して高い  $N a ^ + / H ^ +$  対向輸送体活性を示し、これにより耐塩性が付与されることが考えられる。また、一旦、ゲノム内に本発明の DNA が導入された形質転換植物体を得られれば、該植物体から有性生殖または無性生殖により子孫を得ることが可能である。また、該植物体やその子孫あるいはクローンから繁殖材料 ( 例えば、種子、果実、切穂、塊茎、塊根、株、カルス、プロトプラスト等 ) を得て、それらを基に該植物体を量産することも可能である。本発明には、本発明の DNA が導入された植物細胞、該細胞を含む植物体、該植物体の子孫およびクローン、並びに該植物体、その子孫、およびクローンの繁殖材料が含まれる。

このような野生型植物体と比較した高い  $N a ^ + / H ^ +$  対向輸送体活性は、 $N a ^ + / H ^ +$  対向輸送体の高発現 ( 量的変化 ) によって達成しても、より高い活性を有する  $N a ^ + / H ^ +$  対向輸送体の発現 ( 質的变化 ) によって達成しても、これら双方であってもよい。

また、本発明は、上記本発明のタンパク質に結合する抗体を提供する。本発明の抗体には、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体が含まれる。抗体の作製は、当業者に公知の方法、例えば、H a r l o w らの方法 ( H a r l o w , E . a n d L a n e , D . ( 1 9 8 8 ) A n t i b o d i e s : A l a b o r a t o r y m a n u a l . C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y , C o l d S p r i n g H a r b o r , N e w Y o r k ) を用いることができる。ポリクローナル抗体は、ウサギに大腸菌などで合成させた融合タンパク質や合成ペプチドを抗原として注射し、得られた抗血清をアフィニティーカラムにかけて抗体を精製することで得られる。モノクローナル抗体は、マウスやラットに抗原を注射し、ハイブリドーマを調製してクローニングを行い、得られた抗体をアフィニティーカラムにかけることで得られる。

また、本発明は、本発明のタンパク質をコードする DNA とハイブリダイズす

る、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有する核酸分子を提供する。このような核酸分子は、例えば、本発明のタンパク質をコードするDNAを検出または単離するためのプローブとして、また増幅するためのプライマーとして利用することが可能である。このような核酸分子は、好ましくは本発明のタンパク質をコードするDNAと特異的にハイブリダイズする。ここで「特異的にハイブリダイズする」とは、通常のハイブリダイゼーション条件下、好ましくはストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、本発明のタンパク質をコードするDNAとハイブリダイズし、他のタンパク質をコードするDNAとハイブリダイズしないことを指す。

また、このような核酸分子は本発明のタンパク質の発現を抑制するアンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム等として利用することも可能である。アンチセンスオリゴヌクレオチドとしては、それらの誘導体や修飾体を使用することができる。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、タンパク質の発現を抑制し得る限り、DNAまたはmRNAの所定の領域を構成するヌクレオチドに対し完全に相補的である必要はなく、1又は複数個のヌクレオチドのミスマッチが存在していてもよい。本発明のタンパク質の発現を抑制するアンチセンスオリゴヌクレオチドやリボザイムは、本発明のタンパク質の機能を解析するための非常に有用なツールとなる。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

##### [ 実施例 1 ] イネ $\text{Na}^+ / \text{H}^+$ 対向輸送体遺伝子のクローニング

出芽酵母で得られた  $\text{Na}^+ / \text{H}^+$  対向輸送体 (NHX1) とホモロジーがあるシーケンスを Gene Bank の高等植物のデータベースから解析し、イネの花序由来の cDNA クローンを同定した。そのクローンから予想されるアミノ酸配列は、NHX1 と 37% のホモロジーがあった。得られた cDNA クローンは全長の塩基配列が挿入されていないことが予想されたので、その cDNA クローンをプローブとして、イネ (O r y z a s a t i v a L . c v N i p p o n b a r e ) 幼植物の根から調製した mRNA を鋳型にして合成した cDNA ライ

ブラリーから、全長が挿入された cDNA クローンの選抜を試みた。

イネは、一晚浸水させ、栄養塩類溶液 ( 0.5 mM  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  , 1 mM  $\text{KNO}_3$  , 0.5 mM  $\text{MgSO}_4$  , 12.5  $\mu\text{M}$  Fe-EDTA , 1 mM  $\text{CaCl}_2$  , micronutrients ) を用いて水耕栽培した。昼 ( 光度 40  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ) 14 時間 30' 、夜 10 時間 25' 、湿度 75% の栽培条件で 7 日間栽培した。

cDNA ライブラリーは、イネ幼植物の根からポリ (A<sup>+</sup>) RNA を調製し、5 から 25% のスクロース密度勾配遠心によってサイズ分画を行い、比較的大きいポリ (A<sup>+</sup>) RNA を含む分画から構築した ( Tanaka , Y. et al . ( 1989 ) Plant Physiol . 90 , 1403 - 1407 ) 。サイズ分画を行ったポリ (A<sup>+</sup>) RNA は、Gubler と Hoffman の方法 ( Gubler , U. and Hoffman , B. J . ( 1983 ) Gene 25 , 263 - 269 ) によってオリゴ dT をプライマーとして 2 本鎖 cDNA を合成し、Asahi pack GS710 カラム ( Asahi Chemical Industry Co. Ltd . , Tokyo ; 2.5 X 50 cm ) を用いて高速液体クロマトグラフィー ( Tosoh , Tokyo , model CCPD ) によってサイズ分画を行った。2 kb 以上の cDNA を gt11 の Eco RI サイトに挿入した。

構築した cDNA ライブラリーをもつ フェージを用い、NHX1 とホモロジーのある cDNA クローンをプローブとしてブランクハイブリダイゼーションを行った。シグナルのあったブランクの中から、ベクターに挿入された cDNA が最も長いものを選び、切り出した cDNA を pBluescript ( KS+ ) ベクター ( Stratagene 社 ) に挿入してクローニングを行った。得られた cDNA クローンが全長であることの確認は、そのクローンをプローブとして、イネ植物体から抽出した RNA を用いたノーザンハイブリダイゼーションによって得られたシグナルのサイズによって確認した。単離された遺伝子 ( OsNHX1 と称する ) 全長が挿入された cDNA クローンの全塩基配列を決定した ( 図 1 ) 。

[ 実施例 2 ] OsNHX1 遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列の解析

全長は2330塩基対、5'非翻訳領域は296塩基対、翻訳領域は1608塩基対、3'非翻訳領域は426塩基対であった。OsNHX1がコードしているタンパク質は535アミノ酸と予想され、分子量の計算値は59,070であった。予想されるアミノ酸配列は、59%の疎水性、22%の中性、19%の親水性アミノ酸から成り、疎水性の高いタンパク質であることが考えられた。KyteとDoolittleの方法(Kyte, J. and Doolittle, R. F. (1982) J. Mol. Biol. 157, 105-132)による疎水性解析の結果を図2に示す。TMpred program(Hofmann, K. and Stoffel, W. (1993) Biol. Chem. Hoppe-Seyler 374, 166)による解析によって、12回膜貫通領域を検出した。

OsNHX1から予想されるアミノ酸配列は、NHX1や哺乳類のNa<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>対向輸送体(NHE)のアミノ酸配列と有意な相同性が検出された(表1;表中、NHX1は酵母[S. cerevisiae]由来、NHE6はヒト由来、NHE1~4はラット由来である。また、表中の数値の算出には、GENETYX(ver.10)ソフトウェア(ソフトウェア開発株式会社)のホモロジー解析プログラムを用いた(Lipman, D. J. and Pearson, W. R. (1985) Science 227, 1435-1441)。特に、イオン輸送に関係していると思われる膜貫通領域で高い相同性が見られた(図3)。OsNHX1のアミノ酸部分配列である<sup>8</sup> LFFIYLLPPI<sup>9</sup>の領域は、NHX1やNHEでも非常によく保存されており、真核生物のNa<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>対向輸送体を阻害するアミロライドの結合部位と考えられている(Counillon, L. et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 4508-4512)(図3A)。また、真核生物のNa<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>対向輸送体では、6番目と7番目の膜貫通領域がよく保存されており、Na<sup>+</sup>とH<sup>+</sup>の輸送に重要な働きをしていると考えられている(Orlowski, J. and Grinstein, S. (1997) J. Biol. Chem. 272, 22373-22376)が、OsNHX1の5番目と6番目の膜貫通領域はこれらの領域と相同性が高かった(図3B)。以上のことは、OsNHX

1 がコードするタンパク質が  $\text{Na}^+ / \text{H}^+$  対向輸送活性を持つことを示唆している。

表 1

OsNHX1 と他の $\text{Na}^+ / \text{H}^+$ 対向輸送体とのアミノ酸配列の相同性 (%)							
	OsNHX1	NHX1	NHE6	NHE1	NHE2	MHE3	NHE4
OsNHX1	100	29.5	33.0	30.1	29.4	26.7	27.7
NHX1		100	36.1	28.6	29.1	29.3	32.0
NHE6			100	31.9	29.1	31.8	28.6
NHE1				100	48.9	37.1	45.5
NHE2					100	44.7	66.0
NHE3						100	44.6
NHE4							100

現在まで報告されている種々の  $\text{Na}^+ / \text{H}^+$  対向輸送体、すなわち、哺乳類の NHE、出芽酵母 (*S. cerevisiae*) の NHX1 および NHA1、分裂酵母 (*S. pombe*) の細胞質膜で発現していると思われる Sod2、酵母 (*Zygosaccharomyces rouxii*) の ZSod2、大腸菌 (*E. coli*) の NhaA および NhaB、及び OsNHX1 ( 図中「OsNHX1」と表記 ) について NJ 法により系統樹を作成すると、NHX1、NHE6、OsNHX1 の 3 つがクラスターをつくることが判明した ( 図 4 )。NHX1 が後期エンドソームで発現しているという報告があり ( Nass, R. and Rao, R. ( 1998 ) J. Biol. Chem. 273 : 21054 - 21060 )、また、NHE6 も細胞内で発現していることが示唆されている ( Numata, M., Petrecca, K., Lake, N., and Orłowski, J., J. Biol. Chem. 273 : 6951 - 6959 )。

これらのことから、OsNHX1が液胞などの細胞内器官で発現し、これら器官においてNa<sup>+</sup>輸送に重要な働きをしていると考えられる。

[実施例3] イネNa<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>対向輸送体遺伝子を発現する形質転換イネの作出

pBluescript KS+(STRATAGENE社)のBamHIサイトに挿入したOsNHX1をKpnIとNotIにより切り出し、Ti-plasmid由来でカナマイシンとハイグロマイシン耐性遺伝子を導入したpMSH1(高発現用)およびpMSH2(発現抑制用)ベクター(pMSH1については、Kawasaki, T. et al., (1999) Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A. 96, 10922-10926. pMSH2はpMSH1のマルチクローニングサイトが逆向きになったもの)のカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター下流に挿入した。構築したベクターを用いて、アグロバクテリウム(Agrobacterium tumefaciens)によりイネカルスを形質転換した。カルスは種子から誘導し、アグロバクテリウム感染後の選抜をハイグロマイシンで行った。選抜したカルスを再分化させ、形質転換植物体を得た。なお、形質転換および再分化は土岐の方法(Tokii, S. (1997) Plant Molecular Biology 15, 16-21)に基本的に従って行なった。

#### 産業上の利用の可能性

本発明において、単離されたNa<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>対向輸送体遺伝子は、植物体内で発現させることにより、該植物体に塩耐性を付与することができると考えられる。このため、例えば、イネなど有用農作物に導入することにより耐塩性を向上させ、乾燥地等においても塩害を受けず、農作物の収穫量を増大させる上で大いに貢献しうる。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> National Research Institute of Agrobiological Resources

<120> Sodium/proton exchanger genes

<130> MOA-006PCT

<140> JP 1998-365604

<141> 1998-12-22

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 2330

<212> DNA

<213> *Oryza sativa*

<220>

<221> CDS

<222> (297)..(1901)

<400> 1

gagaagagag ttttgttagcg agctcgcgcg aatgcaagc caaccgagag aggtctcgat 60

accaaatecc gatttctcaa cctgaatecc ccccccacgt tctctgttcc aatctgttcg 120

tctgcgaate gaattctttg ttttttttcc tctaatttta cgggaattg tcgaattagg 180

cattcaccaa cgagcaagag gggagtggat tggttggtta aagctccgca tcttgcggcg 240

gaaatctcgc tctcttctct gcggtgggtg gccggagaag tcgcccggcg tgaggc atg 299

Met

1

ggg atg gag gtg gcg gcg gcg cgg ctg ggg gct ctg tac acg acc tcc 347

Gly Met Glu Val Ala Ala Ala Arg Leu Gly Ala Leu Tyr Thr Thr Ser

5

10

15

gac tac gcg teg gtg gtg tcc atc aac ctg ttc gtc gcg ctg ctc tgc 395

Asp Tyr Ala Ser Val Val Ser Ile Asn Leu Phe Val Ala Leu Leu Cys

20

25

30

gcc tgc atc gtc ctc ggc cac ctc ctc gag gag aat cgc tgg gtc aat 443

Ala Cys Ile Val Leu Gly His Leu Leu Glu Glu Asn Arg Trp Val Asn

35

40

45

gag tcc atc acc gcg ctc atc atc ggg ctc tgc acc gcc gtg gtg atc 491





tgc aca ttg cag gtc ctc aat cag gat gag aca ccc ttt ttg tac agt 827  
 Cys Thr Leu Gln Val Leu Asn Gln Asp Glu Thr Pro Phe Leu Tyr Ser  
                   165                                  170                                  175

ctg gta ttc ggt gaa ggt gtt gtg aac gat gct aca tca att gtg ctt 875  
 Leu Val Phe Gly Glu Gly Val Val Asn Asp Ala Thr Ser Ile Val Leu  
                   180                                  185                                  190

ttc aac gca cta cag aac ttt gat ctt gtc cac ata gat gcg gct gtc 923  
 Phe Asn Ala Leu Gln Asn Phe Asp Leu Val His Ile Asp Ala Ala Val  
                   195                                  200                                  205

gtt ctg aaa ttc ttg ggg aac ttc ttt tat tta ttt ttg tcg agc acc 971  
 Val Leu Lys Phe Leu Gly Asn Phe Phe Tyr Leu Phe Leu Ser Ser Thr  
                   210                                  215                                  220                                  225

ttc ctt gga gta ttt gct gga ttg ctc agt gca tac ata atc aag aag 1019  
 Phe Leu Gly Val Phe Ala Gly Leu Leu Ser Ala Tyr Ile Ile Lys Lys  
                                   230                                  235                                  240

cta tac att gga agg cat tct act gac cgt gag gtt gcc ctt atg atg 1067  
 Leu Tyr Ile Gly Arg His Ser Thr Asp Arg Glu Val Ala Leu Met Met  
                                   245                                  250                                  255

etc atg get tac ctt tca tat atg ctg gct gag ttg cta gat ttg agc 1115

Leu Met Ala Tyr Leu Ser Tyr Met Leu Ala Glu Leu Leu Asp Leu Ser  
                   260                                  265                                  270

ggc att ctc acc gta ttc ttc tgt ggt att gta atg tca cat tac act 1163  
 Gly Ile Leu Thr Val Phe Phe Cys Gly Ile Val Met Ser His Tyr Thr  
                   275                                  280                                  285

tgg cat aac gtc aca gag agt tca aga gtt aca aca aag cac gca ttt 1211  
 Trp His Asn Val Thr Glu Ser Ser Arg Val Thr Thr Lys His Ala Phe  
 290                                  295                                  300                                  305

gca act ctg tcc ttc att gct gag act ttt ctc ttc ctg tat gtt ggg 1259  
 Ala Thr Leu Ser Phe Ile Ala Glu Thr Phe Leu Phe Leu Tyr Val Gly  
                                   310                                  315                                  320

atg gat gca ttg gat att gaa aaa tgg gag ttt gcc agt gac aga cct 1307  
 Met Asp Ala Leu Asp Ile Glu Lys Trp Glu Phe Ala Ser Asp Arg Pro  
                   325                                  330                                  335

ggc aaa tcc att ggg ata agc tca att ttg cta gga ttg gtt ctg att 1355  
 Gly Lys Ser Ile Gly Ile Ser Ser Ile Leu Leu Gly Leu Val Leu Ile  
                   340                                  345                                  350

gga aga gct gct ttt gta ttc ccg ctg tgg ttc ttg tgg aac cta aca 1403  
 Gly Arg Ala Ala Phe Val Phe Pro Leu Ser Phe Leu Ser Asn Leu Thr  
                   355                                  360                                  365

aag aag gca ccg aat gaa aaa ata acc tgg aga cag caa gtt gta ata 1451  
 Lys Lys Ala Pro Asn Glu Lys Ile Thr Trp Arg Gln Gln Val Val Ile  
 370 375 380 385

tgg tgg gct ggg ctg atg aga gga gct gtg tgg att gct ctt gct tac 1499  
 Trp Trp Ala Gly Leu Met Arg Gly Ala Val Ser Ile Ala Leu Ala Tyr  
 390 395 400

aat aag ttt aca aga tct ggc cat act cag ctg cac ggc aat gca ata 1547  
 Asn Lys Phe Thr Arg Ser Gly His Thr Gln Leu His Gly Asn Ala Ile  
 405 410 415

atg atc acc agc acc atc act gtc gtt ctt ttt agc act atg gta ttt 1595  
 Met Ile Thr Ser Thr Ile Thr Val Val Leu Phe Ser Thr Met Val Phe  
 420 425 430

ggg atg atg aca aag cca ttg atc agg ctg ctg cta ccg gcc tca ggc 1643  
 Gly Met Met Thr Lys Pro Leu Ile Arg Leu Leu Leu Pro Ala Ser Gly  
 435 440 445

cat cct gtc acc tct gag cct tca tca cca aag tcc ctg cat tct cct 1691  
 His Pro Val Thr Ser Glu Pro Ser Ser Pro Lys Ser Leu His Ser Pro  
 450 455 460 465

ctc ctg aca agc atg caa ggt tct gac ctc gag agt aca acc aac att 1739



gtaaattttg tagattaaca gcccatttg tacctgtcta ccacttttag ttggcgggtg 2231

ttctttecta gttgccacce tgcattgtaa atgaaattct ccgcaaaaat agatttgtgt 2291

gtataataat ttgcttggg tgaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2330

<210> 2

<211> 535

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 2

Met Gly Met Glu Val Ala Ala Ala Arg Leu Gly Ala Leu Tyr Thr Thr

1 5 10 15

Ser Asp Tyr Ala Ser Val Val Ser Ile Asn Leu Phe Val Ala Leu Leu

20 25 30

Cys Ala Cys Ile Val Leu Gly His Leu Leu Glu Glu Asn Arg Trp Val

35 40 45

Asn Glu Ser Ile Thr Ala Leu Ile Ile Gly Leu Cys Thr Gly Val Val

50 55 60



Val Val Leu Lys Phe Leu Gly Asn Phe Phe Tyr Leu Phe Leu Ser Ser  
 210 215 220

Thr Phe Leu Gly Val Phe Ala Gly Leu Leu Ser Ala Tyr Ile Ile Lys  
 225 230 235 240

Lys Leu Tyr Ile Gly Arg His Ser Thr Asp Arg Glu Val Ala Leu Met  
 245 250 255

Met Leu Met Ala Tyr Leu Ser Tyr Met Leu Ala Glu Leu Leu Asp Leu  
 260 265 270

Ser Gly Ile Leu Thr Val Phe Phe Cys Gly Ile Val Met Ser His Tyr  
 275 280 285

Thr Trp His Asn Val Thr Glu Ser Ser Arg Val Thr Thr Lys His Ala  
 290 295 300

Phe Ala Thr Leu Ser Phe Ile Ala Glu Thr Phe Leu Phe Leu Tyr Val  
 305 310 315 320

Gly Met Asp Ala Leu Asp Ile Glu Lys Trp Glu Phe Ala Ser Asp Arg  
 325 330 335

Pro Gly Lys Ser Ile Gly Ile Ser Ser Ile Leu Leu Gly Leu Val Leu



	340		345		350
Ile Gly Arg Ala Ala Phe Val Phe Pro Leu Ser Phe Leu Ser Asn Leu					
	355		360		365
Thr Lys Lys Ala Pro Asn Glu Lys Ile Thr Trp Arg Gln Gln Val Val					
	370		375		380
Ile Trp Trp Ala Gly Leu Met Arg Gly Ala Val Ser Ile Ala Leu Ala					
385		390		395	400
Tyr Asn Lys Phe Thr Arg Ser Gly His Thr Gln Leu His Gly Asn Ala					
		405		410	415
Ile Met Ile Thr Ser Thr Ile Thr Val Val Leu Phe Ser Thr Met Val					
	420		425		430
Phe Gly Met Met Thr Lys Pro Leu Ile Arg Leu Leu Leu Pro Ala Ser					
	435		440		445
Gly His Pro Val Thr Ser Glu Pro Ser Ser Pro Lys Ser Leu His Ser					
	450		455		460
Pro Leu Leu Thr Ser Met Gln Gly Ser Asp Leu Glu Ser Thr Thr Asn					
465		470		475	480

Ile Val Arg Pro Ser Ser Leu Arg Met Leu Leu Thr Lys Pro Thr His  
 485 490 495

Thr Val His Tyr Tyr Trp Arg Lys Phe Asp Asp Ala Leu Met Arg Pro  
 500 505 510

Met Phe Gly Gly Arg Gly Phe Val Pro Phe Ser Pro Gly Ser Pro Thr  
 515 520 525

Glu Gln Ser His Gly Gly Arg  
 530 535

【図面の簡単な説明】

図 1 は、イネの  $\text{Na}^+ / \text{H}^+$  対向輸送体 ( *OsNHX1* ) cDNA の塩基配列、および予想されるアミノ酸配列を示す図である。アミノ酸配列は一文字表記で表した。

図 2 は、*OsNHX1* タンパク質のアミノ酸の疎水性プロットを示す図である。横軸はアミノ酸残基、縦軸は疎水度を示す。予想される膜貫通領域をボックス内の数字で示した。

図 3 は、*OsNHX1* と他の  $\text{Na}^+ / \text{H}^+$  対向輸送体とのアミノ酸配列の比較を示す図である。膜貫通領域 ( M3 ~ M6 ) を配列の上部に示した。全てのアミノ酸が同一の場合は「\*」を、類似したアミノ酸の場合は、類似度が高い順に「:」または「.」をアミノ酸の下部に示した。A のボックスは  $\text{Na}^+$  輸送体の特異的阻害剤アミロライドの結合部位を表し、B のボックスは哺乳類の  $\text{Na}^+ / \text{H}^+$  対向輸送体において相同性が高い部位を表す。

図 4 は、ClustalX ( Thompson, J. D. et al., ( 1994 ) *Nucleic Acids Research*, 22 : 4673 - 4680 ) ( 最近隣 ( NJ ) 法 ) を用いた  $\text{Na}^+ / \text{H}^+$  対向輸送体の系統発生的解析の結果を示す図である。



【 3 】

A

	M3	M4	
OsNHX1	FSEDLFFIYLLPPIIFNAGFQVKKKQFFRNFM	TITLFGAVGTMISFFTISIAAIAIFSRM	138
NHX1	FNSSYFFNVLLPPIILNSGYELNQVNFNMLSILIFAIPGTFISAVVIGIILYIWTFLG		179
NHE6	FDPEVFFNILLPPIIFYAGYSLKRRHFFRNLSILAYAFGLTAISCFVIGSIMYGCVTLM		205
NHE1	LQSDVFFFLFLLPPIILDAGYFLPLRQFTENLGTILIFAVVGTLWNAFFLGGLLYAVCLVG		219
NHE2	MKTDVFFFLYLLPPIVLDAGYFMPTRPFFENLGTIFWYAVVGTLWNSIGIGLSLFGICQIE		80
NHE3	LTPTLFFFYLLPPIVLDAGYFMPNRLFFGNLGTILLYAVIGTIWNAATTGLSLYGVFLSG		166
NHE4	MDSSEYFLYLLPPIVLESYFMPTRPFFENIGSILWAGLGALINAFGIGLSLYFICQIK		184

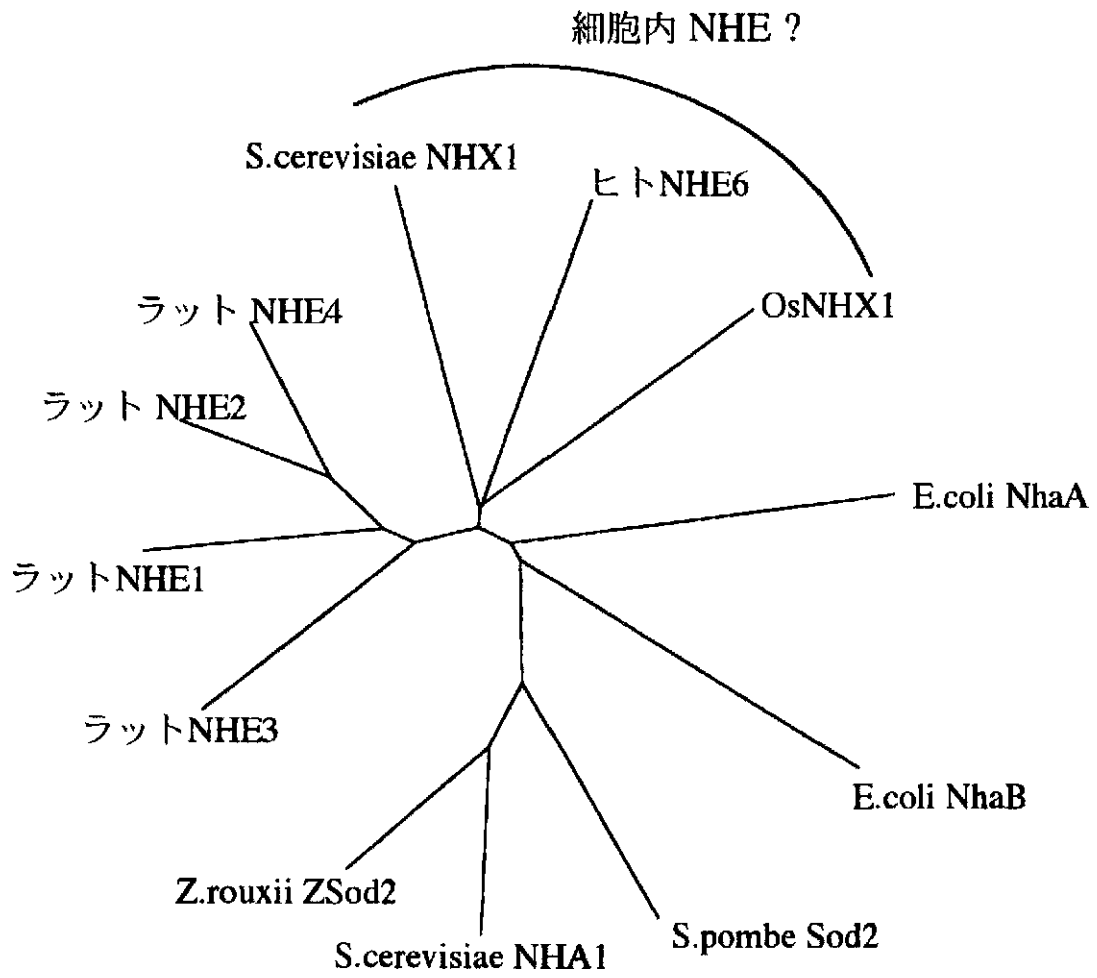
:    : \*    \*\*\*\*\*: : \* :    \*    \* : \*    : .    \* :    .

B


	M5	M6	
OsNHX1	---NIGTLDVG---DFLAIGAFSATDSVCTLQVLNQDET	-PFLYSLVFGEGVVDATSIV	192
NHX1	----LESIDISFADAMSVGATLSATDPVTILSIFNAYKVDPKLYTIIFGESLLNDAISIV		235
NHE6	KVTGQLAGDFYFTDCLLFGAIVSATDPVTVLAIFHELQVDVELYALLFGESVLNDAVAIV		265
NHE1	---GEQINNIGLLDTLLFGSIIISAVDPVAVLAVFEEIHINELLHILVFGESLLNDAVTVV		276
NHE2	---AFGLSDITLLCNLLFGSLISAVDPVAVLAVFENIHVNEQLYILVFGESLLNDAVTVV		137
NHE3	---LMGELKIGLLDFLLFGSLIAAVDPVAVLAVFEEVHVNEVLFIIIVFGESLLNDAVTVV		223
NHE4	---AFGLGDINLLCNLLFGSLISAVDPVAVLAVFEEARVNEQLYMMIFGEALLNDGISVV		241

. . . : : \* : : \* . \* \*    \* : : .    \* . : : \* \* : : \* \* : : \*

【 図 4 】



## 【 国 際 調 査 報 告 】

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP99/07224	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))			
Int. Cl <sup>7</sup> C12N15/29, 5/14, C07K14/415, 16/16, C12P21/02, C12Q1/68, A01H5/00			
B. 調査を行った分野			
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))			
Int. Cl <sup>7</sup> C12N15/00-15/90			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用了用語)			
GENBANK/EMBL/DDBJ/GENESEQ SWISSPROT/PIR/GENESEQ BIOSIS (DIALOG), WPI (QUESTEL)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
P, X	Biochimica et Biophysica Acta, 1446(1-2), p. 149-155, 1999 July 7, Atsunori Fukuda et al., "Molecular cloning and expression of the Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> exchanger gene in <i>Oryza sativa</i> "	1-16	
P, X	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96(4), p. 1480-1485, 1999 Feb. 16 Gaxiola, R. A. et al., "The <i>Arabidopsis thaliana</i> proton transporters, AtNhx1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast"	1-16	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー		の日の後に公表された文献	
「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの		「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)		「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの	
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」 同一パテントファミリー文献	
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願			
国際調査を完了した日	28. 03. 00	国際調査報告の発送日	11.04.00
国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官 (権限のある職員)	4 B	9 8 3 8
日本国特許庁 (ISA/JP)	内田 俊生		
郵便番号 100-8915	電話番号 03-3581-1101	内線 3448	
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号			

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 9 9 / 0 7 2 2 4
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	WO, 99/47679, A2 (BLUMWALD EDUARDO) 23. 9月. 1999 (23. 09. 99) 全文, 第1-8図 & AU, 9928214, A	1-16
A	J. Biol. Chem., 273, p. 6951-6959, 1998 March 20 Numata M. et al., "Identification of a mitochondrial Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> exchanger"	1-16
A	J. Biol. Chem., 267(13), p. 9331-9339, 1992 May 5 Orlowski J. et al., "Molecular cloning of putative members of the Na/H exchanger gene family. cDNA cloning, deduced amino acid sequence, and mRNA tissue expression of the rat Na/H exchanger NHE-1 and two structurally related proteins."	1-16
A	J. Biol. Chem., 267, p. 9340-9346, 1992 May 5 Tse C. M., et al., "Cloning and sequencing of a rabbit cDNA encoding an intestinal and kidney-specific Na(+)/H(+) exchanger isoform (NHE-3)"	1-16
A	Plant and Cell Physiology, 39(2), p. 196-201, 1998 Feb. Fukuda Atsunori et al., "Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiporter in tonoplast vesicles from rice roots"	1-16
X	GENBANK accession No. C91832 1998 Apr. 20 Sasaki T. et al., "Rice cDNA from panicle"	16

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	
C 1 2 P 21/02		C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 N 5/00	C

(注)この公表は、国際事務局(W I P O)により国際公開された公報を基に作成したものである。

なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。