

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号  
特開2000-312531  
(P2000-312531A)

(43) 公開日 平成12年11月14日 (2000.11.14)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード* (参考)
A 0 1 G 7/00	6 0 4	A 0 1 G 7/00	6 0 4 Z
A 0 1 H 5/00		A 0 1 H 5/00	A
A 0 1 N 37/02		A 0 1 N 37/02	
C 1 2 N 9/02		C 1 2 N 9/02	
15/09	Z N A	15/00	Z N A A
		審査請求 有	請求項の数19 O L (全 12 頁)

(21) 出願番号 特願2000-36153(P2000-36153)

(22) 出願日 平成12年2月15日 (2000.2.15)

(31) 優先権主張番号 特願平11-56776

(32) 優先日 平成11年3月4日 (1999.3.4)

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

特許法第30条第1項適用申請有り 1999年10月1日 植物化学調節学会第34回大会準備委員会発行の「植物化学調節学会第34回大会研究発表記録集」に発表

(71) 出願人 598169457

奈良先端科学技術大学院大学長  
奈良県生駒市高山町8916-5

(72) 発明者 小林 昭雄

大阪府豊中市上野坂1-10-22

(72) 発明者 福崎 英一郎

大阪府吹田市佐竹台4-4-2

(72) 発明者 磯貝 彰

奈良県生駒市高山町8916-5 大学宿舎B  
-204

(74) 代理人 100059258

弁理士 杉村 暁秀 (外2名)

(54) 【発明の名称】 植物の成長を促進させる方法

(57) 【要約】

【課題】 食糧を増産するために、植物の成長を促進させるための、簡便な方法を開発する。

【解決手段】 本発明により、低分子有機酸である蟻酸を投与して光酸化障害を回避させることにより、植物の成長を促進させる方法が提供された。また、蟻酸の投与により発現が誘導されて、蟻酸塩の代謝に関与する蟻酸デヒドロゲナーゼのアミノ酸配列及び当該酵素をコード化する塩基配列が提供された。更に、メタノールにより光酸化障害を回避させ、植物の成長を促進させる方法が提供された。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 植物に低分子有機酸又はその塩を投与する事による、植物の成長を促進させる方法。

【請求項 2】 成長促進作用が、低分子有機酸又はその塩の投与により、光酸化障害を回避させることによる、請求項 1 記載の植物の成長を促進させる方法。

【請求項 3】 前記低分子有機酸又はその塩が蟻酸又はその塩である、請求項 1 記載の植物の成長を促進させる方法。

【請求項 4】 蟻酸の塩が、蟻酸カリウム、蟻酸ナトリウム及び蟻酸アンモニウムより成る群より選択された、請求項 3 記載の植物の成長を促進させる方法。

【請求項 5】 蟻酸又はその塩の投与により、蟻酸デヒドロゲナーゼの酵素活性を誘導して植物の成長を促進させる、請求項 3 記載の植物の成長促進方法。

【請求項 6】 低分子有機酸又はその塩を配合した、植物収量増加剤。

【請求項 7】 低分子有機酸が蟻酸又はその塩である、請求項 6 記載の植物収量増加剤。

【請求項 8】 蟻酸又はその塩の濃度を 125 ppm になるように調整した、請求項 7 記載の植物収量増加剤。

【請求項 9】 蟻酸又はその塩を含有し、pH が 5.5 - 8.0 である、請求項 7 記載の植物収量増加剤。

【請求項 10】 蟻酸の塩が、蟻酸カリウム、蟻酸ナトリウム及び蟻酸アンモニウムより成る群より選択された、請求項 7 記載の植物収量増加剤。

【請求項 11】 以下の (a) または (b) に示すアミノ酸配列からなることを特徴とし、イネ蟻酸デヒドロゲナーゼに由来する、ポリペプチド。

(a) 配列表の配列番号 1 に示す、アミノ酸番号 1 - 376 で示されるアミノ酸配列からなることを特徴とする、ポリペプチド。

(b) (a) の一部が欠損、置換若しくは付加され、蟻酸を基質として二酸化炭素を生成する作用を有する、ポリペプチド。

【請求項 12】 以下の (a) または (b) に示す塩基配列からなることを特徴とし、イネ蟻酸デヒドロゲナーゼに由来する、DNA フラグメント。

(a) 配列表の配列番号 2 に示す、塩基番号 1 - 1450 で示される塩基配列からなることを特徴とする、DNA フラグメント。

(b) (a) の一部が欠損、置換若しくは付加され、請求項 11 記載のポリペプチドをコード化する、DNA フラグメント。

【請求項 13】 請求項 12 記載の DNA フラグメントを植物に導入して、植物中でイネ蟻酸デヒドロゲナーゼを過剰発現させる事によって植物を成長させる、植物の成長促進方法。

【請求項 14】 請求項 12 記載の DNA フラグメントを植物に導入して、植物中でイネ蟻酸デヒドロゲナーゼ

を過剰発現させた、形質転換植物。

【請求項 15】 植物に低分子アルコールを投与する事により、植物の成長を促進させる方法。

【請求項 16】 前記低分子アルコールがメタノールである、請求項 15 記載の方法。

【請求項 17】 成長促進作用が、低分子アルコールの投与により、光酸化障害を回避させることによる、請求項 15 記載の植物の成長を促進させる方法。

【請求項 18】 メタノールを配合した、植物収量増加剤。

【請求項 19】 メタノールの濃度を 50 mM になるように調整した、請求項 18 記載の植物収量増加剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、低分子有機酸である蟻酸を投与して光酸化障害を回避させる事により、植物の成長を促進させる方法に関する。更に、本発明はメタノールを投与して光酸化障害を回避させる事により、植物の成長を促進させる方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】現在、世界的な人口の増加より食糧の増産が求められているが、植物の生育及び代謝は様々な周囲の環境条件に影響を受ける事が知られている。そのような影響の一つに、強光、乾燥条件下において気孔の閉鎖により二酸化炭素の取り込みが低下することによる、光酸化傷害と呼ばれる現象が知られている。二酸化炭素が欠乏する事により、光合成系が獲得したエネルギーが過剰となり、植物の防衛機能の容量を超えた活性酸素が生成して、光酸化傷害を引き起こす事が判っている。そのような光酸化傷害は植物の成長を抑制するため、光酸化傷害を防止する方法が求められていた。従来、酸化的障害に対する改善方法として、活性酸素の消去能力を付与した遺伝子組み換え植物を用いる方法が行われていた。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】しかし、そのような組み換え植物の作成には時間を要し、またその対象となる植物は限定されている、という問題があった。そこで、簡便かつ汎用性のある光酸化障害の防止方法を開発する事が求められていた。光酸化障害を防止する事により、植物の成長を促進する事が可能である。

## 【0004】

【課題を解決するための手段】これまでの知見により、植物においてメタノールはホルムアルデヒド、蟻酸を中間体として代謝され、二酸化炭素に変換され得る事が判っていた。そこで本発明者らは、イネ、タバコ及びインゲンを用いて、低分子量の有機酸である蟻酸を投与したところ、光酸化障害が回避されるという現象を見出した。更に、そのような作用を有する蟻酸がイネの成長に及ぼす影響を検討したところ、イネの成長促進に有効で

ある事を見出した。また、蟻酸を代謝して二酸化炭素を生成する酵素である蟻酸デヒドロゲナーゼ(FDH)の活性が、蟻酸の投与時に誘導される現象を示して、イネ由来の蟻酸デヒドロゲナーゼ(FDH)のアミノ酸配列及び当該酵素をコード化する塩基配列を決定した。FDH遺伝子を導入する事によっても、光酸化障害の防止が可能である。

【0005】更に、本発明者らは、イネ、タバコ及びインゲンを用いて、低分子アルコールであるメタノールを投与したところ、やはり光酸化障害が回避されるという現象を見出した。そのような作用を有するメタノールは、植物の成長促進に有効である。

【0006】

【実施例】(実験に使用した植物体)

(1)イネ

イネ種子(*Oryza sativa* L. 品種:ヒノヒカリ)を用いた。当該植物をパーミキュライトに対して播種して、 $150 \mu\text{mol quanta/m}^2 \cdot \text{s}$ の条件で16:8時間の長日条件において生育させたものを使用した。2週間から4週間の間の植物体の、健全な葉を用いて実験を行った。

(2)タバコ

タバコ(*Nicotina tabacum* L. 品種:SR1)を用いた。当該植物を同様にパーミキュライトに対して播種し、これを $150 \mu\text{mol quanta/m}^2 \cdot \text{s}$ の条件において生育させたものを使用した。4週間から6週間の植物体の、健全な葉を使用して実験を行った。

(3)インゲン

インゲン豆(*Phaseolus vulgaris* L. 品種:ツルナシインゲン)を用いた。当該植物を同様にパーミキュライトに対して播種し、これを $150 \mu\text{mol quanta/m}^2 \cdot \text{s}$ の条件において生育させたものを使用した。2週間から4週間の植物体の、健全な葉を使用して実験を行った。

【0007】(試験物質の投与方法)上記の植物体をイネの場合は葉柄部分を含む形で切除し、これを試験管に入れた10mlの試験溶液につけ込み、 $150 \mu\text{mol quanta/m}^2 \cdot \text{s}$ 、25の条件で30分間インキュベートする事により、試験溶液の投与を行った。投与終了後、このイネの葉を直径35mmのチャンバー内に設置できるように切断して、酸素発生速度( $\mu\text{mol O}_2/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ )の評価を行った。なお、イネ以外の植物体の場合には、あらかじめ直径35mmのリーフディスクを調製して、これをシャーレに入れた10mlの試験溶液の中に入れて、上記イネの場合と同じ条件で試験溶液の投与を行った。投与終了後、リーフディスクの水分をとり、チャンバー内に設置して、光合成能の評価を行った。尚、試験溶液は10mMのカリウムフوسفエートバッファー(pH7)中に任意の濃度の試験物質

を溶解して、これを用いた。試験物質としては蟻酸カリウム、蟻酸ナトリウム及び蟻酸アンモニウムを用いた。

【0008】(酸素発生速度の測定による光合成能の評価)酸素発生速度の測定はクラーク型の酸素電極を用いて行った。測定装置として、キュベット(LD2/2型)、酸素電極制御装置(CB1-D3型)及び光源(LS-2型、ハンサテック社製)を用いた。この装置におけるキュベットのチャンバー(測定室)は、直径35mmで容積5mlの密閉可能なチャンバーと酸素電極の組合せにより構成されており、上面が透明であるため、上面から任意の光量を照射する事が可能である。これに上記の蟻酸投与後の植物体を入れ、密閉した。これに対してハロゲンランプを光源として照射し、5%二酸化炭素を含む空気下で、発生する酸素速度を測定した。特に記述しない場合は赤色フィルターおよび減衰フィルターを用いることで、 $253 \mu\text{mol quanta/m}^2 \cdot \text{s}$ に調製した光にて測定を行った。なお、得られた値を測定した葉面積で割ることにより、酸素発生速度を算出した。

【0009】(光酸化傷害の条件)上記の様に光合成速度を測定した後、チャンバーに二酸化炭素を含まない空気を入れて、 $1600 \mu\text{mol quanta/m}^2 \cdot \text{s}$ の光を一定時間照射する事により、二酸化炭素不足条件による光酸化傷害を誘導した。また、この処理を行った後に酸素発生速度を測定する事により、光酸化傷害による光合成能抑制の評価を行った。

【0010】(光酸化傷害に蟻酸塩が及ぼす影響)イネの光酸化傷害に対して、蟻酸の各種塩が及ぼす影響について検討した。その結果、図1に示すように、二酸化炭素の非存在下においては、8分の強光の照射により酸素発生速度は約30%まで低下していた。一方、2mMの蟻酸カリウムを添加したものにおいては、活性を90%程度保持していた。その様な保護効果は蟻酸カリウムにおいて最も顕著であり、2mMの種々の蟻酸塩の比較においては、蟻酸カリウム>蟻酸ナトリウム>蟻酸アンモニウムの順番であった。また、蟻酸塩がイネの光酸化傷害に対して及ぼす保護効果の経時変化について検討した。光酸化傷害の処理時間を長くしていくと(2分、4分)、図2に示すように光合成能が経時的に低下するが、2mMの蟻酸カリウムを添加したサンプルでは光合成能の低下が抑制された。

【0011】更に、イネの光酸化障害後の光合成能の光強度依存性について検討した。その結果、図3に示すように、光強度が弱い時点における傾きは変わらず、光強度が強い条件下において、光合成能の低下が蟻酸塩の添加により抑制された結果となった。この結果より、蟻酸塩の添加により、カルビンサイクルの酵素系が保護されている可能性がある。また、イネの光酸化傷害に対する、蟻酸カリウムによる抑制効果の濃度依存性について検討した。その結果、図4に示すように、蟻酸カリウム

濃度2 mM及び4 mMにおいて、光酸化傷害に対する最大の保護効果が認められた。

【0012】インゲン及びタバコについても、光酸化傷害に対して蟻酸塩が及ぼす影響を検討した。その結果、インゲン及びタバコにおいても、2 mMの蟻酸カリウムを投与する事により、光酸化傷害による酸素発生速度の低下が抑制される事が明らかとなった。図5にインゲンにおける結果を、図6にタバコにおける結果を示す。

【0013】(クロロフィル蛍光測定)光化学系の健全さを評価する目的で、上記と同様の条件下において光酸化障害を与えたイネの、光化学系中心のクロロフィル由来の蛍光について、測定を行った。測定は、WALZ社製のクロロフィルフルオロメーター(PAM101:エミッター及び検出器、PAM103:光パルス発生)を使用した。励起光:100 KHz、インテンシティー:5。飽和光:900 msの条件において、光酸化障害前後の蛍光について測定して、 $F_v / F_m$ について測定した。尚、植物の生育方法、蟻酸の投与条件、試料の調製方法等は、酸素発生量の測定の場合と同様に行った。蛍光測定の結果、2 mMの蟻酸塩の添加により、光酸化障害時における、光化学系の障害が回避されている事が示唆された(図7)。

【0014】(植物生育試験)そのような蟻酸塩の添加が、植物の生育に対して及ぼす影響を検討した。イネの種子を殺菌して、1/2 MS塩、0.1%ゲランガム及び種々の濃度の蟻酸ナトリウムを添加した培地を入れたガラス試験管(130 mm x 40 mm I.D.)に播種した。1 Nの水酸化ナトリウムにより、培地のpHが6.0になるように調製して、オートクレーブにより培地の滅菌を行った。播種したイネは、25°Cで16/8時間の長日条件において、 $40 \mu\text{mol quanta} / \text{m}^2 \cdot \text{s}$ の光強度で生育を行った。この条件で2週間生育を行った後に、地上高及び湿重量について測定を行う事により、生育量の検討を行った。

【0015】そのようにして測定を行ったイネの生育に対して、蟻酸塩が及ぼす影響について検討を行った。種々の濃度の蟻酸ナトリウムの効果について検討を行ったところ、湿重量(図8)及び地上高(図9)共に、125 ppmの蟻酸ナトリウム添加により、約25%の生育量の増加が認められた。その様な生育促進効果は、1000 ppmの蟻酸ナトリウム存在下において消失した。試料数を30として、得られた平均値の差について学生t検定を行った結果、1%未満の危険率で有意差が認められた。この結果より、蟻酸ナトリウムを125 ppm含有して、pHを7に調整した製剤は、植物の成長促進に有効である。有効成分である蟻酸は、通常のリン酸肥料、チッソ肥料等に添加する事が可能であり、また例えば「ハイボネックス」等の市販の肥料に添加する事も可能である。

【0016】(植物体への蟻酸の取り込み)蟻酸の代謝

を確認する目的で、植物生育試験の項において述べた条件下、25°Cで2週間培養を行ったイネを使用して、植物体への蟻酸の取り込みを検討した。5株を収穫して水で洗浄した後に、1.4 mMの蟻酸ナトリウムを2.5 ml添加して、明条件( $40 \mu\text{mol quanta} / \text{m}^2 \cdot \text{s}$ )において25°Cでインキュベートを行った。その溶液を、各時間において25 µlサンプリングして、溶液中の蟻酸濃度を吸光度法により定量した。その結果、速やかな蟻酸の取り込みが観察され、48時間後においては溶液中の蟻酸濃度は検出限界以下となった。図10に、3回の独立した実験の平均値として結果を示す。植物体の存在なしには、蟻酸の減少は観察されなかった(コントロール)事から、蟻酸は植物体に吸収されたと考えら得る。

【0017】(蟻酸投与による、二酸化炭素の生成)蟻酸の代謝により生成した二酸化炭素の量を、上記と同様に25°Cで2週間培養したイネ植物体を使用して測定した。1.4 mMの $[^{12}\text{C}]$ 又は $[^{13}\text{C}]$ 蟻酸ナトリウム(pH7)が5 ml入ったガラス容器をゴムセプタムで密閉して、暗条件において、25°Cでインキュベートを行った。各時間において25 µlをサンプリングして、上清中の二酸化炭素濃度について、ガスクロマトグラフィーマススペクトロメトリー(GC-MS)により分析を行った。その結果、図11に示す様に、 $[^{13}\text{C}]$ 又は $[^{12}\text{C}]$ の蟻酸ナトリウムを添加した系から、全体の二酸化炭素量に対して、それぞれ9%(図11A)及び1%(図11B)の $[^{13}\text{C}] \text{CO}_2$ が検出された。天然における $^{13}\text{C}$ の存在比は約1%であることから、この $[^{13}\text{C}] \text{CO}_2$ 量の増加は、添加した蟻酸に由来する事が推察された。この結果より、蟻酸を二酸化炭素に変換する酵素である蟻酸デヒドロゲナーゼ(FDH)等、何らかの機構がイネにおいて存在している事が考えられた。

【0018】(蟻酸デヒドロゲナーゼ活性の測定)そこで、蟻酸の投与によるFDHの活性の変化を検討した。1.4 mMの蟻酸存在下又は非存在下でイネを25°Cで2週間培養した後、イネ地上部と地下部(根部)に分離して、それぞれ部分より粗酵素液を調製して、1.5 mg/mlの酵素溶液を調製してFDHの活性測定を行った。FDH活性の測定は、 $[^{13}\text{C}]$ 蟻酸を基質として用いて、上清中の $[^{13}\text{C}] \text{CO}_2$ をGC-MSを用いて検出する事により行った。その結果、蟻酸を添加して培養を行ったイネの根部において、FDH活性は無添加群と比較して約2倍となっており、酵素活性の増大が観察された(図12)。

【0019】(RNAの単離)全RNAの単離については、以下の様に行った。ノザン分析に用いる場合には上記の条件において培養したイネの葉及び根から、イソゲンRNA精製キット(ニッポンジェーン)を用いて全RNAを単離した。cDNAを調製する場合においては、プラントRNAキット(QIAGEN)を用いて、全R

NAを単離した。これをDNA分解酵素処理を行った後に、オリゴ(dT)12-18プライマー(GIBCO BRL)を用いて逆転写を行い、cDNAを調製した。

【0020】(FDHをコード化するcDNAのクローニング)ジャガイモ由来のFDHの配列との相同性から、DDBJよりイネのcDNAクローンを三種類選抜した(DDBJ accession nos. D23989、D23770及びD48722)。このcDNAクローンをアラインメントした結果から、これらのcDNA配列は970塩基対よりなるFDHホモログの部分配列を構成している事が推測された。そこで、イネのcDNAからこの部分配列をPCRを用いてクローニングした。次にこの配列を用いて、FDH遺伝子の全長を、3'及び5'-Full RACE core Set(宝バイオメディカルズ)を用いて単離した。

【0021】(塩基配列の決定及び配列の解析)PCR産物を、PCR2.1(インビトロゲン)又はpUC18(宝バイオメディカルズ)にサブクローニングした。クローニングした配列は、M13プライマーを使用して、シーケンシングキット(ダイターミネーターサイクルシーケンシングレディーリアクションキット、パーキンエルマー)を用いて、DNAシーケンサー(ABI 310、アプライドバイオシステムズ)を用いてシーケンス解析を行った。その結果、当該遺伝子は1450塩基対の読み枠を有する塩基配列よりなる事が示された(配列表:配列番号2)。配列解析ソフトであるジェネティック・マック(ジェネティックインフォメーションプロセッシングソフトウェア)を使用して、当該配列の解析を行った結果、FDHの予想されるアミノ酸配列は376塩基対より成り(配列表:配列番号1)、分子量は41.2kDa、等電点は7.39であると算出された。また、このアミノ酸配列と他の植物由来の既知FDH配列との相同性を比較した結果、イネ(*C. sativa*)FDHのアミノ酸配列は、ジャガイモ(*S. tuberosum*:82.7%)及びオオムギ(*H. vulgare*:91.7%)と高い相同性を示し、蟻酸結合サイト(282)及びNAD結合サイト(189-223)が高度に保存されていることが明らかとなった(図13)。イネFDHのアミノ酸配列及び当該アミノ酸配列をコード化する塩基配列が決定された事から、配列表2に示す遺伝子を導入する事によっても、光酸化障害に対する耐性が増加する可能性が考えられる。

【0022】(大腸菌内におけるcDNAの発現)上記においてクローニングをした遺伝子から予想されるアミノ酸配列は、既知のFDHと高い相同性を示した。このことからこの配列はFDHをコードしていると予想されたことから、この配列の機能について確認するためにこのcDNAを大腸菌中に発現させた。大腸菌中における発現させるためのプラスミド調製は、pUC18プラス

ミドの切断物に目的断片を挿入することにより調製した。断片の調製は制限酵素部位をもつプライマーを使用したPCRにより増幅して、制限酵素処理をしたものを挿入した。プライマーにはそれぞれ、EcoRIサイトとBamHIサイトを持つものを2組使用して、その配列の挿入方向をセンスとアンチセンスの2種類となるように、2種類の挿入断片を用意した。センスオリエンテーションのためには、5'-cggaatcatggcgatgtggaggcg3'(順方向)、5'cgggatccttactggtactggc-3'(逆方向)そしてアンチセンスオリエンテーション(Reverse)のためには、5'-cgggatccatggcgatgtggaggcg-3'(順方向)、5'-cggaattcttactggtactggctcgcgagc-3'(逆方向)を用いて、開始または終了コドンに、EcoRIサイトとBamHIサイトをpUC18プラスミドに導入した。クローニングした配列の挿入はM13プライマーを使用して、ジデオキシ法によるシーケンスを行い確認した。

【0023】調製したプラスミドを大腸菌JM109に形質転換して、これを50mlのLB培地(50mg/mlのアンピシリンを含む)を用いて、660nmにおける吸光度が3.0になるまで、通常より低い20で好氣的に培養して、その後0.2mMのIPTGで、20で6時間タンパク質の発現誘導を行った。集菌した後に水で洗浄して、2mlの10mM SPB(pH7.0)、100mM NaCl、0.5%トライトンX-100、2mM DTTに再懸濁した。得られた菌体を超音波破碎して、15000gで15分間遠心した上清より粗酵素液を調製して、活性測定を行った。その結果、大腸菌の内在性のFDHは報告にあったとおり、NADHを補酵素とはしないため、実際の測定において、活性を示さなかった。また断片の挿入向きが、センスのものについてのみ活性を示すことが明らかとなった。このことから、この配列はNAD依存的なFDHであることが強く示唆された。

【0024】(蟻酸の投与によるFDH遺伝子の発現量の変化)イネにおいて蟻酸の投与により活性の増加がみられたことから、今回単離したFDH遺伝子について、その発現量の解析を行った。酵素活性測定を行った場合と同様に、蟻酸の添加及び無添加において培養を行い、地上部、地下部(根部)に分けてRNAを調製してノザン解析を行った。調製した全RNAは各レーンにつき40µgアプライして、1%アガロースゲル(2.2Mのフォルムアルデヒドを含有)において電気泳動を行い、その20xSSCを用いてハイボンドN+(アマシャム)にキャピラリーブロットングした。ハイブリダイゼーションはAlkPhosDIRECT(アマシャム)に従って行い、検出はCDP-Star(アマシャム)を用いて行った。プローブとして用いるDNAは、PCRで増幅したFDH cDNA(読み枠1130塩基対)を用いた。その結果、蟻酸を投与して全処理を行

ったイネの地下部においては、発現が顕著に増大していることが明らかとなった(図14)。

【0025】既に述べた様に、イネを含むいくつかの植物種においては、メタノールをホルムアルデヒド、蟻酸を中間体とする段階的な酸化により、二酸化炭素へと変換する経路が存在することが知られている。そこで本発明者らは、低分子量アルコールであるメタノールも光障害抑制に有効ではないかと考えて検討を行った。実験に使用した植物体、試験物質の投与方法、酸素発生速度の測定による光合成能の評価、光酸化障害及びクロロフィル蛍光測定については、蟻酸の場合と同様に行った。

【0026】(イネの光合成能に対するメタノールの効果)酸素発生速度の分析を行うことにより、光合成能に対するメタノールの影響を検討した。その結果、コントロールにおいて酸素発生速度が30%程度にまで低下した場合においても、メタノールを添加した際には70%程度、蟻酸塩を添加した際には60%程度の光合成活性が残存する事が観察された(図15)。また、イネの酸化障害後の光合成能の光強度依存性について、酸素発生速度により検討を行った(図16)。その結果、図16に見られる様に、特に強い光強度の条件下において、メタノールにより光酸化障害を回避されることが示唆された。

【0027】(イネのクロロフィル蛍光分析に対するメ

タノールの効果)更に、イネのサンプルを用いて、種々の濃度のメタノールの存在下においてクロロフィル蛍光分析を行ったところ、2.5mM及び50mMのメタノール添加により、光酸化障害によるFv/Fmの低下が有意に軽減されることが明らかとなった(図17)。

【0028】(タバコ及びインゲンのクロロフィル蛍光分析に対するメタノールの効果)また、タバコ(図18)及びインゲン(図19)についても、メタノールの添加による効果を検討した。クロロフィル蛍光分析を行ったところ、2mMの蟻酸を投与した場合と同様に、100mMのメタノール添加の効果が認められた。即ち、光酸化障害時における光化学系の障害が、メタノールにより有意に軽減されている事が示唆された。

【0029】

【発明の効果】本発明により、低分子有機酸である蟻酸を投与して光酸化障害を回避させることにより、植物の成長を促進させる方法が与えられた。更に、蟻酸塩の投与により発現が誘導されて、蟻酸の代謝に関する蟻酸デヒドロゲナーゼのアミノ酸配列及び当該酵素をコード化する塩基配列が与えられた。また、メタノールにより光酸化障害を回避させ、植物の成長を促進させる方法が与えられた。

【0030】

【配列表】

<110> 出願人氏名：奈良先端科学技術大学院大学長

<120> 発明の名称：植物の成長を促進させる方法

<160> 配列の数：2

<210> 配列番号：1

<211> 配列の長さ：376

<212> 配列の型：アミノ酸

<213> 起源：イネ蟻酸デヒドロゲナーゼ

<400> 配列

```
MAMWRAAAGH LLGRALGSRA AHTSAGSKKI VGVFYKGG EYADKNPNFVGC VEGALGIREW 60
LESKGHHYIV TDDKEGLNSE LEKHIEDMHV LITTPFHPAY VSAERIKKAK NLELLLTAGI 120
GSDHIDLPA AAGLTVAEV TGSNTVSVAE DELMRILILL RNFLPGYQQV VHGEWNVAGI 180
AYRAYDLEGG TVGTGAGRI GRLLLQRLKP FNCNLLYHDR LKIDPELEKE IGAKYEEDLD 240
AMLPKCDVIV INTPLTEKTR GMFNKERIAK MKKGVIVVNN ARGAIMXTQA VADACSSGQV 300
AGYGGDVWFP QPAPKGPWR YMPNHAMTPH ISGTTIDAQL RYAAGVKDML DRYFKGEDFP 360
VQNYIVKEGQ LASQYQ 376
```

<210> 配列番号：2

<211> 配列の長さ：1450

<212> 配列の型：核酸

<213> 起源：イネ蟻酸デヒドロゲナーゼ

<400> 配列

```
cgagtcggct gactgatcg attccatcac tctctctctc tgcctgctc gcggttgctg 60
tgcgttcgct tcgcgatttc tcctcctcct cctgggatca tggcgatgtg gaggcgggcg 120
gcggggcattc ttctcgccg cgcgctcggc tccagggccg cgcacacatc agcaggcagc 180
aagaagatcg tgggtgtgtt ctacaagggc ggcgagtacg ccgacaagaa tccaacttc 240
gtcggctgctg tggaggcgcg tctcggcatc cgcaatggc ttgagtccaa ggggcatcac 300
tacattgtca ccgacgacaa ggaggggcta aacagcgagc tggagaagca cattgaggat 360
```

```

atgcatgtct tgatcaccac ccctttccac ccagcctatg ttagcgcaga aaggatcaag 420
aaggcaaaga acctcgagct gcttctcaca gctgggattg ggtcagatca tattgatctg 480
ccagcagctg ctgcagcagg tttaactgtg gcagaggtta ccggaagtaa cactgtgtcg 540
gtggcagaag atgagctcat gcgcattttg attttgctca ggaacttctt gcccggtat 600
cagcaggttg ttcattgtga atggaatgtt gctggcattg cctatagggc ttatgatctt 660
gaaggaaaaa ctgtggggac tgttggggct ggtcgtattg gcaggctctt acttcagcgt 720
cttaagccct ttaactgcaa cctgtgttac catgacagac taaaattga ccagaactt 780
gagaaagaaa ttggggccaa atatgaagag gatctcgatg ctatgcttcc aaagtgtgat 840
gtcattgtga tcaatacacc tcttacagag aaaacaagag gtatgtttaa taaagaagaa 900
attgcaaaga tgaagaaagg tgtaatcatt gtgaataatg ctcgaggagc aatcatggnt 960
accagggcg ttgcagacgc ttgctctagt ggtcaagttg caggctatgg tggatgtgc 1020
tggttcccc aaccagcacc aaaggtcca ccctggcgtt acatgcctaa tcatgcatg 1080
accctcata tctctgggac tacaattgat gcacagctga gatacgcagc aggagttaag 1140
gacatgctgg acaggtactt caaaggggaa gacttccggg tgcagaacta catcgtcaag 1200
gaaggtcagc tcgcagacca gtaccagtaa taacccttcc ttgtgtgttg ggtgtccatc 1260
ctgtggccac cttcccgag ttaaggggaa cagagnttcg ggtagggacc aaaacaactt 1320
gtgttgtgtg tgttgcctga gtgttccctg agaaactatt ggacaccgga aataatggat 1380
gcctgcatg gcaacatggt ctccaagaa taaaagccc tcgattaaa cagtacaaaa 1440
aaaaaaaaa                                     1450

```

【図面の簡単な説明】

【図 1】 図 1 は、イネの光酸化障害に対して、種々の蟻酸塩が及ぼす影響を示す図である。

【図 2】 図 2 は、イネの光酸化障害に対する、蟻酸カリウムによる抑制の経時変化を示す図である。

【図 3】 図 3 は、光酸化障害後の、種々の光強度におけるイネの光合成能に対する、蟻酸の影響を示す図である。

【図 4】 図 4 は、イネの光酸化障害に対する、蟻酸カリウムによる抑制の濃度依存性を示す図である。

【図 5】 図 5 はインゲンの光酸化障害の、蟻酸塩による抑制作用を示す図である。

【図 6】 図 6 は、タバコの光酸化障害の、蟻酸塩による抑制作用を示す図である。

【図 7】 図 7 は、イネの光酸化障害時の、蛍光分析を示す図である。

【図 8】 図 8 は、蟻酸ナトリウムがイネの湿重量に対して及ぼす影響を示す図である。

【図 9】 図 9 は、蟻酸ナトリウムがイネの地上高に対して及ぼす影響を示す図である。

【図 10】 図 10 は、イネにおける、蟻酸の取り込みの経時変化を示す図である。

【図 11】 図 11 は、イネにおける、蟻酸由来の二酸

化炭素生成の経時変化を示す図である。

【図 12】 図 12 は、イネの地上部と地下部における、蟻酸デヒドロゲナーゼ活性を示す図である。

【図 13】 図 13 は、イネの蟻酸デヒドロゲナーゼのアミノ酸配列を、ジャガイモ及びオオムギの蟻酸デヒドロゲナーゼのアミノ酸配列と比較した図である。

【図 14】 図 14 は、蟻酸の投与による F D H 遺伝子の発現量の変化を示す、ノザンプロテイングの写真である。

【図 15】 図 15 は、イネの光酸化障害に対して、メタノール及び蟻酸が及ぼす影響を示す図である。

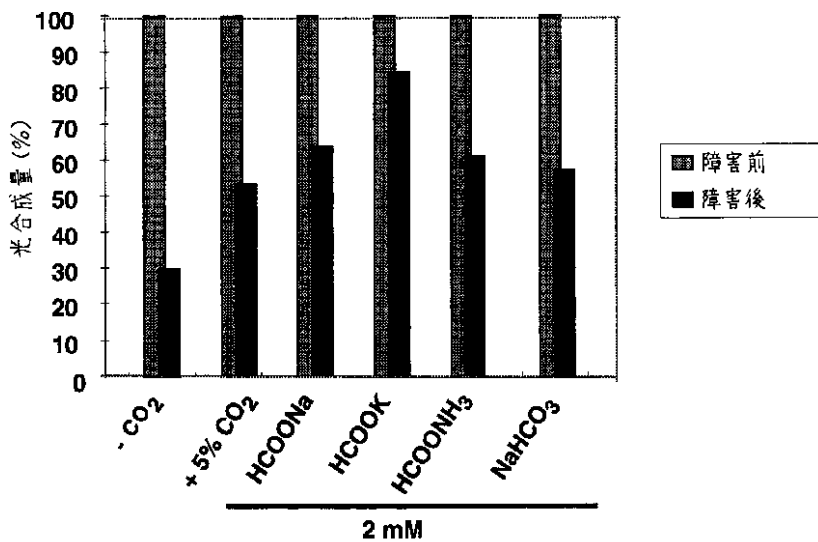
【図 16】 図 16 は、光酸化障害後の、種々の光強度におけるイネの光合成能に対する、メタノールの影響を示す図である。

【図 17】 図 17 は、イネの光障害の蛍光分析における、メタノール濃度の影響を検討した結果である。

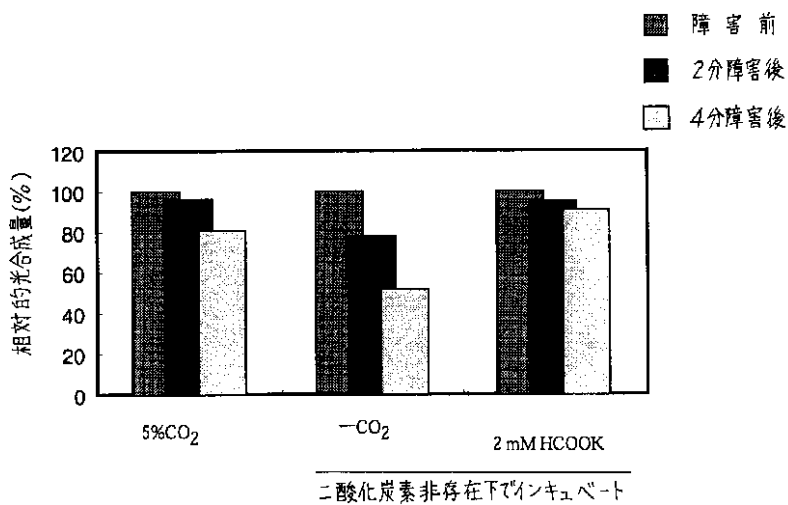
【図 18】 図 18 は、タバコの光障害の蛍光分析における、メタノール及び蟻酸の影響を検討した結果である。

【図 19】 図 19 は、インゲンの光障害の蛍光分析における、メタノール及び蟻酸の影響を検討した結果である。

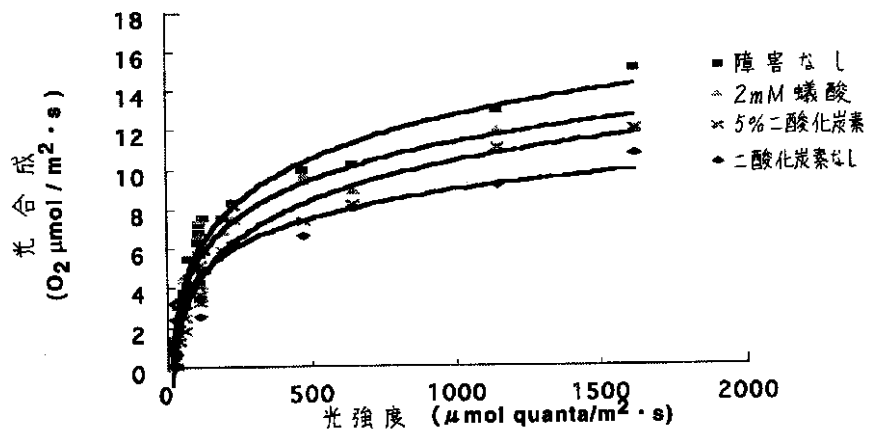
【図1】



【図2】

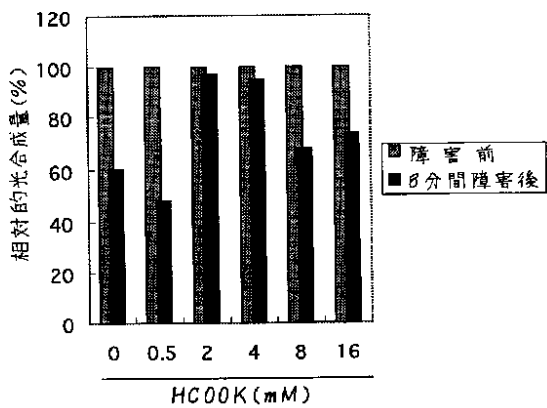


【図3】

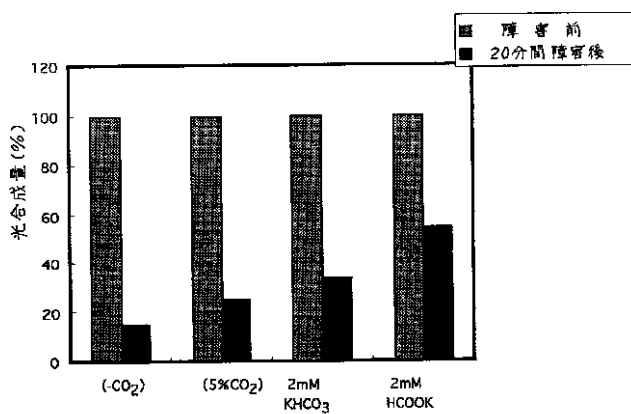




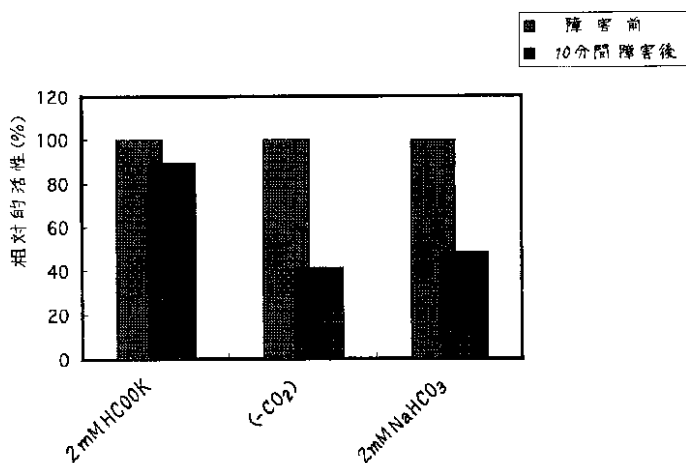
【図4】



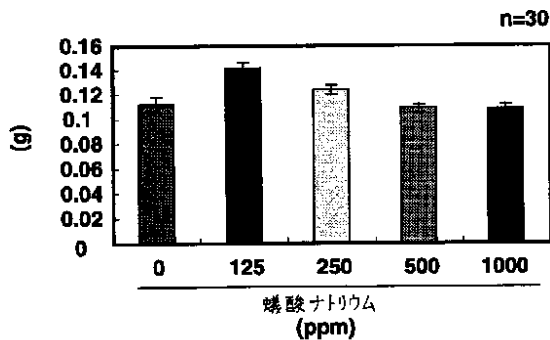
【図5】



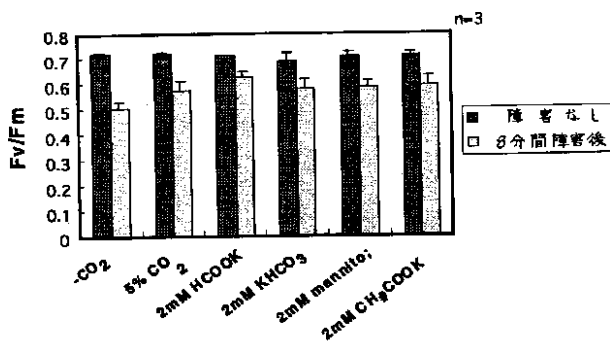
【図6】



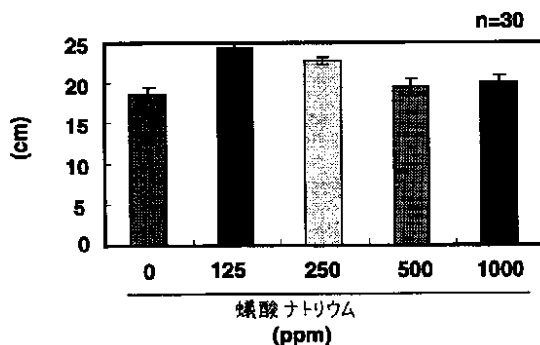
【図8】



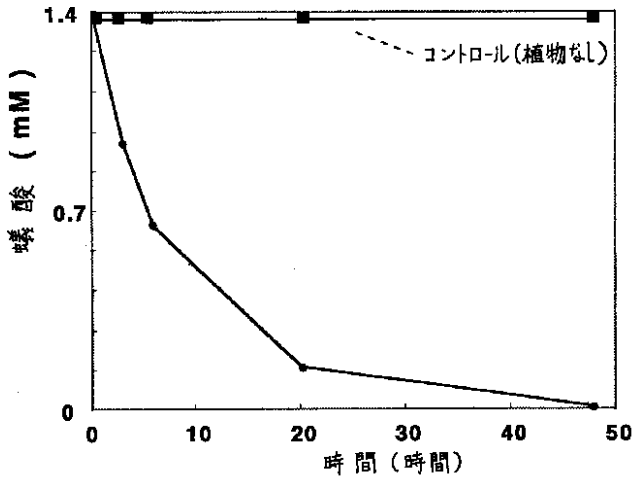
【図7】



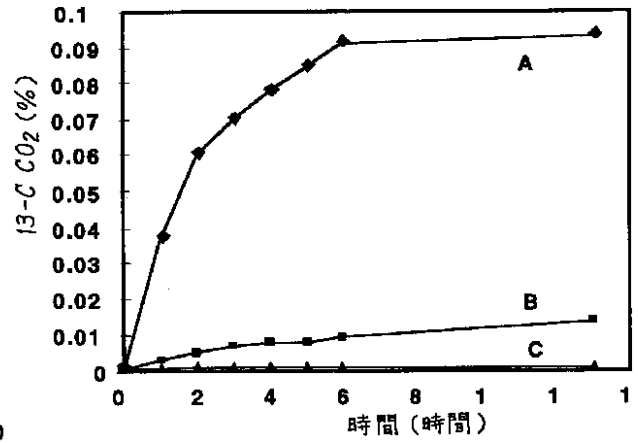
【図9】



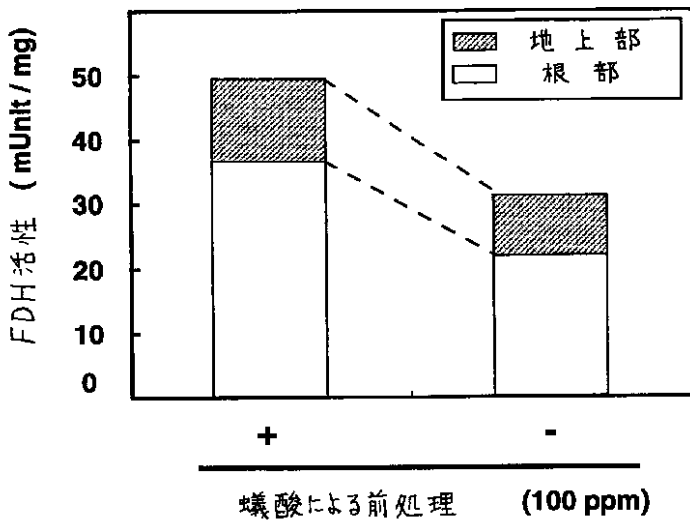
【図10】



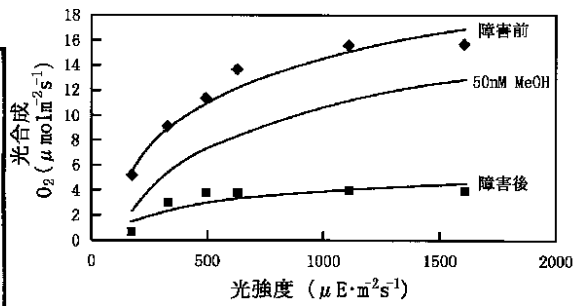
【図11】



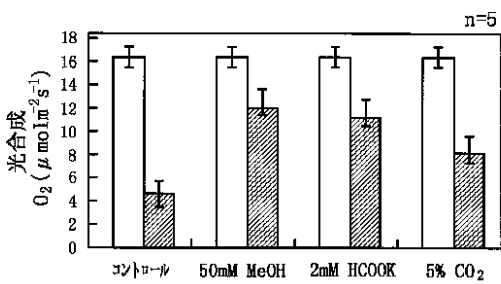
【図12】



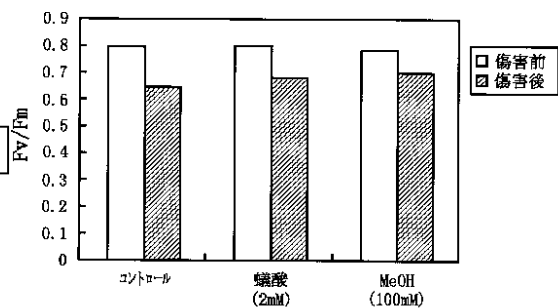
【図16】



【図15】



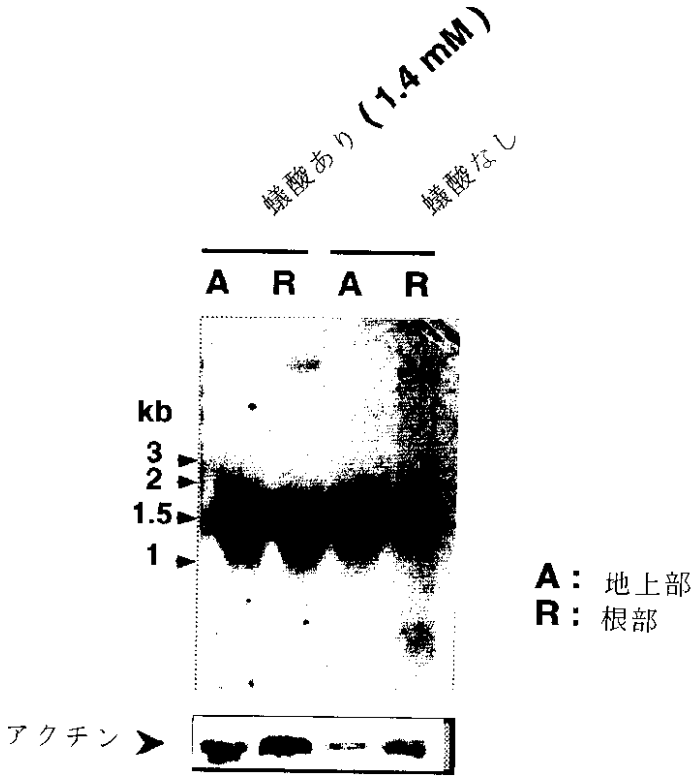
【図18】



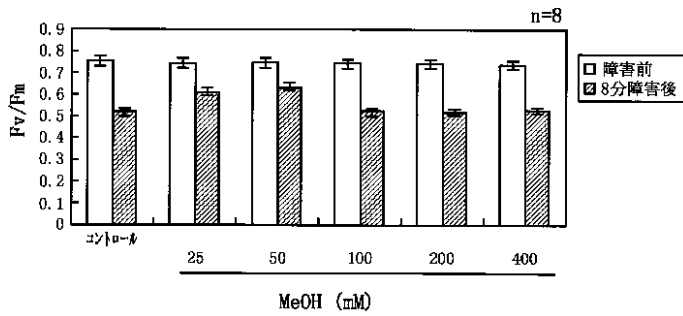
<i>O. sativa</i>	1 --- MAMWRAAAGHILGRIALGSRRAAHTSAGSKKIVGVVFKGGEYADKNPNFVGCVEGALGI	57
<i>H. vulgare</i>	1 -- MAMWRAAAGHILGRIALGSRRAAHTSAGSKKIVGVVFKGGEYADKNPNFVGCVEGALGI	58
<i>S. tuberosum</i>	1 MSYVASTAAARATSPSLVHTRELDASPGRKIVGVVVKANENVAEMPNFVGCVAENALGI	60
<i>O. sativa</i>	58 REWLESKGHHYIVTDDAEGINSELEKHIEDMHVLIITPFFHAYVSAERIKKAKNLELLLL	117
<i>H. vulgare</i>	59 EDWLESKGHHYIVTDDAEGINSELEKHIEDMHVLIITPFFHAYVSAERIKKAKNLELLLL	118
<i>S. tuberosum</i>	61 REWLESKGHHYIVTDDAEGINSELEKHIEDMHVLIITPFFHAYVSAERIKKAKNLELLLL	120
<i>O. sativa</i>	118 AGIGSDHIDLPAARAAAGLIVAEVTGSNTVSVAEDELMLRILLLRNFLPGYDQVWHGEWNV	177
<i>H. vulgare</i>	119 AGIGSDHIDLPAARAAAGLIVAEVTGSNTVSVAEDELMLRILLLRNFLPGYDQVWHGEWNV	178
<i>S. tuberosum</i>	121 AGIGSDHIDLPAARAAAGLIVAEVTGSNTVSVAEDELMLRILLLRNFLPGYDQVWHGEWNV	180
<i>O. sativa</i>	178 AGLYRAYDLECAVAVGAGPVGRLVORLIMVYKRNKLLNNTLQVADPELEKELGAKYEE	237
<i>H. vulgare</i>	179 AGIAHRAVDLECAVAVGAGPVGRLVORLIMVYKRNKLLNNTLQVADPELEKELGAKYEE	238
<i>S. tuberosum</i>	181 AIAHRAVDLECAVAVGAGPVGRLVORLIMVYKRNKLLNNTLQVADPELEKELGAKYEE	240
<i>O. sativa</i>	238 DLDAMLKCDIVINTPLTEKTRGMFKERIAKMKKGVIVVNMARAIIMXTQAVAIACSS	297
<i>H. vulgare</i>	239 DLDAMLKCDIVINTPLTEKTRGMFKERIAKMKKGVIVVNMARAIIMXTQAVAIACSS	298
<i>S. tuberosum</i>	241 DLDAMLKCDIVINTPLTEKTRGMFKERIAKMKKGVIVVNMARAIIMXTQAVAIACSS	300
<i>O. sativa</i>	298 LGVAGYGGDVWFPOPAPGPPWRYMNPNHAMTPHISGTTIDAQLRYAAGVKDMLDRYFKGE	357
<i>H. vulgare</i>	299 GHIAGYGGDVWFPOPAPKDPWRYMNPNHAMTPHISGTTIDAQLRYAAGVKDMLDRYFKGE	358
<i>S. tuberosum</i>	301 GHIAGYGGDVWFPOPAPKDPWRYMNPNOAMTPHISGTTIDAQLRYAAGVKDMLDRYFKGE	360
<i>O. sativa</i>	358 DFVQNYIVKESQLASQYQ*	377
<i>H. vulgare</i>	359 SEPVENYIVKEGELASQYK**	379
<i>S. tuberosum</i>	361 DFVAENYIVKOGELAP	376

【 図 1 3 】

【図14】



【図17】



【図19】

