

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3890402号  
(P3890402)

(45) 発行日 平成19年3月7日(2007.3.7)

(24) 登録日 平成18年12月15日(2006.12.15)

(51) Int. Cl.	F I
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A
<b>A O 1 H 5/00 (2006.01)</b>	A O 1 H 5/00 A
<b>A O 1 H 1/00 (2006.01)</b>	A O 1 H 1/00 A

請求項の数 6 (全 23 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2001-126682 (P2001-126682)</p> <p>(22) 出願日 平成13年4月24日 (2001.4.24)</p> <p>(65) 公開番号 特開2002-315582 (P2002-315582A)</p> <p>(43) 公開日 平成14年10月29日 (2002.10.29)</p> <p>審査請求日 平成15年6月18日 (2003.6.18)</p> <p>特許法第30条第1項適用 2001年3月21日 日本植物生理学会2001年度年会準備委員会発行の「日本植物生理学会2001年度年会および第41回シンポジウム講演要旨集」に発表</p> <p>前置審査</p>	<p>(73) 特許権者 501167644 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</p> <p>(74) 代理人 100104673 弁理士 南條 博道</p> <p>(72) 発明者 門脇 光一 茨城県つくば市吾妻3-19-1 2-201</p> <p>(72) 発明者 島田 浩章 千葉県柏市つくしが丘3丁目25番4号</p> <p>審査官 植原 克典</p>
---	---

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 イネ師部における新規タンパク質およびその遺伝子

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号7の塩基配列からなる、師部特異的発現に関するプロモーター。

【請求項2】

配列番号8の塩基配列からなる、師部特異的発現に関するプロモーター。

【請求項3】

異種タンパク質を師部特異的に生産するトランスジェニック植物であって、配列番号7または8の塩基配列からなるプロモーター、および該プロモーターに発現可能に結合された該異種タンパク質をコードするDNAを含むベクターを得る工程；および得られたベクターを植物に導入する工程、を含む方法によって得られる、トランスジェニック植物。

10

【請求項4】

前記植物が、イネである、請求項3に記載のトランスジェニック植物。

【請求項5】

異種タンパク質を植物の師部に特異的に生産させる方法であって、配列番号7または8の塩基配列からなるプロモーター、および該プロモーターに発現可能に結合された該異種タンパク質をコードするDNAを含むベクターを得る工程；および得られたベクターを該植物に導入してトランスジェニック植物を得る工程を含む、方法。

【請求項6】

前記植物が、イネである、請求項5に記載の方法。

20

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 【発明の属する技術分野】

本発明は、 $Ca^{2+}$  /リン脂質結合ドメインを有し、そして好ましくはカボチャCmPP16タンパク質と少なくとも約50%のアミノ酸相同性を有する、イネ師部タンパク質、およびそれをコードするDNAに関する。

## 【0002】

## 【従来の技術】

植物は、長距離輸送のための維管束において、2つの相補的な導管：木部および師部を使用している。例えば、イネの維管束は、並立維管束であり、そして師部および木部からなる。また、カボチャの場合、維管束は、両立維管束であり、そして内部および外部師部、形成層、および木部から構成されている。維管束の構造および生理学的位置は、植物種によってかなり異なっており、葉の師部への溶質輸送の経路およびメカニズムが、構造によって異なることが示唆されている（OparkaおよびTurgeon, *Plant Cell*, 11, 739-750 (1999)）。被子植物において、師部は、主として2つの細胞タイプである師部要素（SE）およびその関連の伴細胞（CC）から構成され、タンパク質、mRNA、アミノ酸、および巨大分子を、組織および器官に送達するための進化した長距離輸送システムとして機能する（Jorgensenら, *Science*, 279, 1486-1487 (1998)）。CCには多くのミトコンドリアおよび遊離のリボソームが存在し、これらはCCの細胞質が異常に高い密度である原因であり、これによってCCと師部の他の細胞とが区別される。逆に、SEは、同化転座について非常に特殊化されており、核、液胞、リボソーム、およびゴルジ体のようなほとんどの細胞内構造およびオルガネラは、師部要素発達中に分解されている（Sjolund, *Plant Cell*, 9, 1137-1146 (1997)）。

## 【0003】

SEおよびCCは、多くの分枝した原形質連絡によって連結される。約200の可溶性タンパク質のうちいくつかは師部で同定されており、これらのタンパク質は、連結する原形質連絡によってSEに入ると考えられている（Xoconostle-Cazaresら, *Science*, 283, 94-98 (1999)）。さらに、原形質連絡は、タンパク質ならびに内因性RNA分子のような他の微小および巨大分子の長距離転座流への送達を媒介する。マイクロインジェクション実験によって、多くの師部タンパク質が、原形質連絡によるそれ自体の輸送を媒介する能力を有するという直接的な証拠が提供されている。このようなタンパク質の共通の特徴は、1kDaから20kDaを超える値までの原形質連絡のサイズ排除を増加させる能力を有することである。しかし、SEにおける師部タンパク質の機能または役割および巨大分子往来のメカニズムは、全く理解されていない。

## 【0004】

また、近年、ウイルス移動タンパク質に類似するタンパク質CmPP16の遺伝子がXoconostle-Cazaresら（Xoconostle-Cazaresら, (1999), 前出）によってカボチャ中で同定されている。CmPP16メッセンジャーRNAは、茎の師部組織に存在するが、タンパク質はSE中に限定される。また、CmPP16が細胞間を移動しそしてRNA輸送を媒介することが明らかになっている。これは、RNA分子が師部を介して植物全体を循環し、そのためRNAに基づく情報のスーパーハイウェイがあることを示唆している。

## 【0005】

## 【発明が解決しようとする課題】

高等植物において、師部は、進化した長距離輸送システムに役割を果たすが、どの種類のタンパク質が、師部組織においてタンパク質およびポリヌクレオチドのような巨大分子の移行に関与するかは、ほとんど明らかにされていない。そのため、上記のような種々の植物種で発現されるウイルスMPに関連する師部タンパク質の機能または役割の解明が望まれている。

## 【0006】

## 【課題を解決するための手段】

10

20

30

40

50

そこで、本発明では、組織構造において双子葉性のカボチャとは異なる単子葉性のイネを材料として使用し、ウイルスMPに関連する師部タンパク質について鋭意検討を行った。その結果、ウイルスMPと相同性のある新規な師部タンパク質遺伝子、さらにカボチャCmPP16遺伝子と相同性のある新規な師部タンパク質遺伝子を単離し、発現させることに成功した。

【0007】

すなわち、本発明は、Ca<sup>2+</sup>/リン脂質結合ドメインを有する、イネ師部タンパク質を提供する。

【0008】

好ましい実施態様では、CmPP16タンパク質と少なくとも約50%のアミノ酸相同性を有する、イネ師部タンパク質を提供する。このイネ師部タンパク質は、より好ましくは、カボチャCmPP16タンパク質と少なくとも約56%、さらに好ましくは少なくとも約58%のアミノ酸相同性を有する。

10

【0009】

好ましい実施態様では、上記イネ師部タンパク質は、配列番号2のアミノ酸配列を有する。

【0010】

好ましい実施態様では、上記のイネ師部タンパク質において少なくとも1つのアミノ酸の置換、挿入、または欠失を有する。

【0011】

好ましい実施態様では、上記イネ師部タンパク質は、配列番号4のアミノ酸配列を有する。

20

【0012】

好ましい実施態様では、上記のイネ師部タンパク質において少なくとも1つのアミノ酸の置換、挿入、または欠失を有する。

【0013】

本発明はまた、上記のいずれかに記載のイネ師部タンパク質をコードする、DNAを提供する。

【0014】

好ましい実施態様では、上記DNAは、配列番号1の塩基配列を含む。

30

【0015】

好ましい実施態様では、上記DNAは、配列番号3の塩基配列を含む。

【0016】

好ましい実施態様では、上記DNAは、配列番号5の塩基配列を含む。

【0017】

本発明はまた、配列番号7の塩基配列を含む、プロモーターを提供する。

【0018】

本発明はさらに、配列番号8の塩基配列を含む、プロモーターを提供する。

【0019】

なお、本発明のプロモーターは、遺伝子発現に関する機能に変更を生じさせない限り、塩基配列の置換、挿入、または欠失を有するプロモーターも含む。

40

【0020】

本発明は、上記のいずれかのイネ師部タンパク質を、師部特異的に発現するように形質転換された、トランスジェニック植物を提供する。

【0021】

好ましい実施態様では、上記トランスジェニック植物は、イネ、サトウキビ、トウモロコシ、およびメロンからなる群より選択される。

【0022】

本発明はまた、上記トランスジェニック植物を用いて、上記のいずれかのイネ師部タンパク質を製造する方法を提供する。

50

## 【 0 0 2 3 】

本発明は、異種タンパク質を師部特異的に生産するトランスジェニック植物であって、師部特異的発現に関与するプロモーター、および該プロモーターに発現可能に結合された該異種タンパク質をコードするDNAを含むベクターを得る工程；および得られたベクターを植物に導入する工程、を含む方法によって得られる、トランスジェニック植物を提供する。

## 【 0 0 2 4 】

好ましい実施態様では、上記ベクターは、さらに、上記のいずれかのイネ師部タンパク質をコードするDNAの全部または一部を含む。

## 【 0 0 2 5 】

さらに好ましい実施態様では、上記のいずれかのイネ師部タンパク質をコードするDNAの全部または一部は、上記異種タンパク質をコードするDNAと、融合タンパク質を発現するように結合されている。

## 【 0 0 2 6 】

好ましい実施態様では、上記師部特異的発現に関与するプロモーターは、配列番号7または8の塩基配列を含むプロモーターである。

## 【 0 0 2 7 】

好ましい実施態様では、上記植物は、イネ、サトウキビ、トウモロコシ、およびメロンからなる群より選択される。

## 【 0 0 2 8 】

好ましい実施態様では、上記異種タンパク質は、師部から師管へ分泌される。

## 【 0 0 2 9 】

本発明の別の局面では、異種タンパク質を植物の師部に特異的に生産させる方法であって、  
師部特異的発現に関与するプロモーター、および該プロモーターに発現可能に結合された該タンパク質をコードするDNAを含むベクターを得る工程；および  
得られたベクターを該植物に導入してトランスジェニック植物を得る工程  
を含む、方法を提供する。

## 【 0 0 3 0 】

好ましい実施態様では、上記ベクターは、さらに、上記のいずれかのイネ師部タンパク質をコードするDNAの全部または一部を含む。

## 【 0 0 3 1 】

さらに好ましい実施態様では、上記のいずれかのイネ師部タンパク質をコードするDNAの全部または一部は、上記異種タンパク質をコードするDNAと、融合タンパク質を発現するように結合されている。

## 【 0 0 3 2 】

好ましい実施態様では、上記師部特異的発現に関与するプロモーターは、配列番号7または8の塩基配列を含むプロモーターである。

## 【 0 0 3 3 】

好ましい実施態様では、上記植物は、イネ、サトウキビ、トウモロコシ、およびメロンからなる群より選択される。

## 【 0 0 3 4 】

好ましい実施態様では、上記異種タンパク質は、師部から師管へ分泌される。

## 【 0 0 3 5 】

## 【 発明の実施の形態 】

本明細書において、「CmPP16」とは、レッドクローバー壊死モザイクウイルス(RCNMV)に対する抗血清と交差反応し、カボチャ師部汁液から最初に同定され、RCNMVのウイルス移動タンパク質(MP)とある程度の配列類似性を有し、そしてCa<sup>2+</sup>/リン脂質結合ドメインを含むタンパク質をいう(Xoconostle-Cazaresら, (1999), 前出)。CmPP16のmRNAは、カボチャの茎の師部組織に存在するが、生産されたタン

10

20

30

40

50

パク質はSE中に限定される。また、CmPP16は、細胞間を移動しそしてRNA輸送を媒介するという役割を果たすと考えられている。ここで、「ウイルス移動タンパク質(MP)」とは、植物ウイルスが発現するタンパク質であって、原形質連絡と相互作用して、MPとウイルスの核酸との複合体の細胞間輸送を媒介する能力を有するタンパク質をいう。

#### 【0036】

本明細書において、「Ca<sup>2+</sup> /リン脂質結合ドメイン」とは、プロテインキナーゼCファミリーに存在するCa<sup>2+</sup> /リン脂質結合性(依存性)のC2ドメインをいう(Kopkaら, Plant Mol. Biol., 36, 627-637 (1998))。

#### 【0037】

本明細書において、「イネ師部タンパク質」とは、イネの師部に特異的に発現するタンパク質をいう。特に、「本発明のイネ師部タンパク質」という場合は、「RPP16タンパク質」または「RPP17タンパク質」およびそれらの誘導体をいう。なお、「誘導体」とは、タンパク質の機能に影響を及ぼさなければ、このアミノ酸配列において少なくとも1つのアミノ酸の置換、挿入、または欠失を有しているタンパク質をいう。本明細書では、単に「RPP16タンパク質」または「RPP17タンパク質」という場合、それらの誘導体が含まれ得る。

#### 【0038】

本明細書において、「RPP16タンパク質」とは、Ca<sup>2+</sup> /リン脂質結合ドメインを有し、そして好ましくはカボチャCmPP16タンパク質と少なくとも約50%のアミノ酸相同性を有する、約16kDaの推定分子量を有するイネ師部タンパク質をいう。代表的には、CmPP16タンパク質と56%の相同性を有し、そして配列番号2のアミノ酸配列を有する、推定分子量15.9kDaのタンパク質が挙げられる(RPP16-1と命名)。RPP16-1の推定等電点(pI)は4.06であり、酸性タンパク質である。タンパク質の機能に影響を及ぼさなければ、このアミノ酸配列において少なくとも1つのアミノ酸の置換、挿入、または欠失を有していてもよい。また、RPP16タンパク質は、「Rpp16-1遺伝子」と命名される塩基配列から発現され、この遺伝子は、例えば、配列番号1の塩基配列であり得る。

#### 【0039】

本明細書において、「RPP17タンパク質」とは、Ca<sup>2+</sup> /リン脂質結合ドメインを有し、そして好ましくはカボチャCmPP16タンパク質と少なくとも約50%のアミノ酸相同性を有する、約17kDaの推定分子量を有するイネ師部タンパク質をいう。代表的には、配列番号4のアミノ酸配列を有するRPP17-1(推定分子量17.7kDa)および配列番号6のアミノ酸配列を有するRPP17-2(推定分子量17.4kDa)が挙げられ、これらはCmPP16タンパク質と58%の相同性を有する。RPP17-1およびRPP17-2の推定pIは、それぞれ6.05および6.26であり、これらのタンパク質は中性タンパク質である。タンパク質の機能に影響を及ぼさなければ、これらのアミノ酸配列において少なくとも1つのアミノ酸の置換、挿入、または欠失を有していてもよい。なお、RPP17-2は、RPP17-1から3アミノ酸が欠失したタンパク質である。また、RPP17-1およびRPP17-2は、それぞれ「Rpp17-1遺伝子」および「Rpp17-2遺伝子」と命名される遺伝子から発現され、これらの遺伝子は、例えば、それぞれ配列番号3および配列番号5の塩基配列であり得る。

#### 【0040】

本明細書において、「RPP16プロモーター」および「RPP17プロモーター」とは、それぞれ、単離したRPP16タンパク質およびRPP17タンパク質の上流にある、プロモーター領域をいう。代表的には、それぞれ、配列番号7および配列番号8で示される塩基配列を有する。「RPP16プロモーター」は、RPP16タンパク質を、根では枝根に、茎では伴細胞(CC)および師部柔細胞に、および葉では伴細胞に特異的に発現するように、厳密に調節する。一方、「RPP17プロモーター」は、RPP17タンパク質を、根では枝根に、茎では伴細胞(CC)および師部柔細胞に、および葉では伴細胞

10

20

30

40

50

、師部柔組織、および葉肉細胞に特異的に発現するように調節する。なお、本発明のプロモーターは、遺伝子発現に関する機能に変更を生じさせない限り、塩基配列の置換、挿入、または欠失を有するプロモーターも含む。また、本発明のプロモーターは、R P P 1 6 タンパク質およびR P P 1 7 タンパク質のみを師部特異的に発現させるだけでなく、その制御下に発現可能に結合された異種物質をコードするDNAについても師部特異的に発現させ得る。

#### 【0041】

本発明においては、ウイルスMPに関連する師部タンパク質C m P P 1 6 と相同なタンパク質が存在しそして種々の植物種において発現されることを検討するために、両立維管束を有するカボチャとは異なって、並立維管束を有するイネを材料として使用した。また、分子生物学的実験手法（DNAの電気泳動、電気泳動したDNAをゲルから回収する方法、制限酵素消化、PCR、DNAの放射標識、ハイブリダイゼーション、塩基配列決定など）が用いられるが、これらの手法としては、例えば、Sambrookら、A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York (1989)に記載されているような、当業者が通常用いる手法が採用される。種々の生化学、免疫学、植物組織学などの手法も、特に記載がないかぎり、当業者が通常用いる手法が用いられる。

10

#### 【0042】

C m P P 1 6 遺伝子に対する類似性検索は、適切なデータベースを用いて行われ得、例えば、本発明の場合は、イネで発現した配列タグ（EST）データベースにおいてBLASTサーチを使用して行い得る。また、得られる推定アミノ酸配列を有するR P P 1 6 タンパク質およびR P P 1 7 タンパク質に対するコンピュータサーチも、現在利用可能な種々の配列データベースを用いて行われ得る。さらに、系統発生分析を、現在利用可能な種々の方法に従って系統樹を作成して行ってもよい。

20

#### 【0043】

タンパク質構造については、例えば、フリーソフト `swiss prot` を使用して分析し得る。これによって得られるC m P P 1 6 - 1、C m P P 1 6 - 2、R P P 1 7 - 1、およびR P P 1 7 - 2の推定等電点（pI）から、これらのタンパク質が推定の中性タンパク質であり、一方、R P P 1 6 - 1の推定pIから、これが推定の酸性タンパク質であることがわかる。タンパク質特性とともに系統発生分析の結果から、R P P 1 6 - 1タンパク質は新規のタンパク質であり、R P P 1 7 タンパク質（R P P 1 7 - 1およびR P P 1 7 - 2）はカボチャC m P P 1 6 タンパク質の進化対応物と考えられる。

30

#### 【0044】

R P P 1 6 タンパク質およびR P P 1 7 タンパク質は、種々の細胞で発現させることができる。適切な細胞としては、細菌、酵母、昆虫、植物、動物などの細胞が挙げられる。特に、大腸菌、酵母、イネ・タバコなどの植物が好ましい。

#### 【0045】

R p p 1 6 遺伝子およびR p p 1 7 遺伝子をこれらの細胞で発現させる際、当業者が通常用いる種々の方法で検出可能なタンパク質との融合タンパク質として発現させることもできる。検出可能なタンパク質としては、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、グリーンフルオレセントプロテイン（GFP）などが挙げられる。特に、植物においてインサイチュでR p p 1 6 遺伝子およびR p p 1 7 遺伝子を発現させる場合は、植物に内在活性の見られないリポーター遺伝子を使用してもよい。植物への遺伝子導入のリポーター遺伝子としては、例えば、 $\beta$ -グルクロニダーゼ（GUS）をコードするg u s A 遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子などが挙げられる。

40

#### 【0046】

また、R P P 1 6 タンパク質およびR P P 1 7 タンパク質と融合され得るタンパク質は、上記のような検出可能なタンパク質に限定されず、師部特異的に発現させることを目的とする任意の異種タンパク質であってもよい。

#### 【0047】

50

トランスジェニック植物の作成は、例えば、R P P 1 6 タンパク質またはR P P 1 7 タンパク質を発現させるイネの場合、以下のように行われる。まず、R P P 1 6 タンパク質またはR P P 1 7 タンパク質の推定プロモーター領域を含むゲノム配列を、ブランクハイブリダイゼーションによってスクリーニングする。R P P 1 6 またはR P P 1 7 のオープンリーディングフレーム ( O R F ) の上流領域は、プローブとしてそれぞれのc D N A クローンをを用いて、イネゲノムライブラリーをスクリーニングすることによって得られ得る。それぞれのランキング配列の推定プロモーター領域を、例えば、それぞれp B I 1 2 1 のベクターにサブクローニングする。各構築物を、例えば、エレクトロポレーション法またはAgrobacterium tumefaciensのT - D N A 由来ベクターを使用してイネに導入して、R P P 1 6 タンパク質またはR P P 1 7 タンパク質を発現するトランスジェニックイネ植物が得られ得る。得られたトランスジェニックイネ植物は、例えば、ハイグロマイシン含有培地で選択され、そしてイネゲノムへの遺伝子の導入は、g u s A 遺伝子を指標としてP C R 法またはサザン法によって確認できる。R P P 1 6 および/またはR P P 1 7 タンパク質を発現するトランスジェニック植物は、イネ以外に、種々の植物で作成可能であり、例えば、サトウキビ、トウモロコシ、およびメロンが好ましい。

10

## 【 0 0 4 8 】

また、R P P 1 6 プロモーターまたはR P P 1 7 プロモーターの制御下に発現可能に結合された異種タンパク質をコードするD N A を利用して、師部特異的に異種タンパク質を発現するトランスジェニック植物を作成することもできる。この異種タンパク質は、単独で、あるいはR P P 1 6 またはR P P 1 7 タンパク質全体または一部との融合タンパク質として発現され得る。あるいは、R P P 1 6 またはR P P 1 7 タンパク質と別に発現されるが、発現後にこれらのタンパク質と相互作用するように発現されてもよい。

20

## 【 0 0 4 9 】

本発明により得られるR P P 1 6 タンパク質およびR P P 1 7 タンパク質は、M P に類似の構造を有し、師部特異的に発現し、その発現はそれぞれのプロモーターによって厳密に調節されている。そのため、これらのタンパク質の遺伝子および/またはその制御領域を利用して、トランスジェニック植物を作成し、その師部で異種物質を生産させ、その物質を師管へ輸送するという技術を開発することが可能である。例えば、師部において、産業価値のある物質を生産させることに加え、植物に耐病性または耐虫性を与える物質を生産させ、この物質を師管という長距離輸送経路を使用して植物全体に行き渡らせることが可能である。また、環境に負の影響を与える物質 ( 重金属、環境ホルモンなど ) の結合タンパク質を生産させ、環境浄化植物を育成できる。

30

## 【 0 0 5 0 】

## 【 実施例 】

以下、実施例によって本発明を詳細に説明するが、これらは本発明を限定することを意図するものではない。

## 【 0 0 5 1 】

( 実施例 1 : イネからの新しいウイルスM P 様遺伝子の同定 )

イネ植物 ( *Oryza sativa* L. cvs Nipponbare ) を、温室で28℃にて生育した。イネ若葉から、イネc D N A を、Kadowakiら ( Kadowakiら, EMBO J., 15, 6652-6661 (1996) ) に記載の手順によって抽出した。

40

## 【 0 0 5 2 】

c D N A のスクリーニングのために、C m P P 1 6 c D N A に対する類似性検索を、イネで発現した配列タグ ( E S T ) データベースにおいてB L A S Tサーチを使用して行い、そして2つのクラスの部分配列をピックアップした。2つのイネE S T クローンR 0 3 7 4 およびE 6 1 1 8 7 ( それぞれD D B J 登録番号A U 0 3 1 6 6 3 およびC 7 4 9 5 5 ) のインサートD N A 全長を、プローブとして使用した。これらのハイブリダイゼーションプローブを、増強された化学発光直接核酸標識システム ( Amersham Pharmacia ) を使用して標識し、続いてハイブリダイゼーション分析を行った。

## 【 0 0 5 3 】

50

その結果、3種のクローンを、cDNAライブラリーから得た。得られたクローンのDNA配列を、蛍光染料プライマー(PE Biosystems)を使用してジデオキシチェンターミネーション法によって決定した。これらのうちの1つは、配列番号1に示すヌクレオチド配列であり、15.9 kDaの推定分子量を有する144アミノ酸残基をコードするオープンリーディングフレーム(ORF)を含んでいた。これを、16 kDa イネ師部タンパク質(RPP16-1)と命名した(配列番号2)。他の2つのクローン(それぞれ配列番号3および配列番号5)は非常に類似しており、配列番号3に対して配列番号5は、ORF配列内でわずかに9個のヌクレオチド欠失があったにすぎなかった。2つのクローンに含まれるORFは、17.7 kDaの推定分子量を有する159アミノ酸残基、および17.4 kDaの推定分子量を有する156アミノ酸残基をコードし、それぞれRPP17-1およびRPP17-2(それぞれ、配列番号4および配列番号6)と命名した。

#### 【0054】

次に、遺伝子コピー数を検討するために、サザンブロット分析を、以下のように行った。イネゲノムDNA(5 µg)を、BamHI、EcoRI、EcoRV、およびHindIIIで切断し、そして0.8%アガロースゲルによる電気泳動に供した。これらをアルカリ変性後にナイロンメンブランにトランスファーした。ハイブリダイゼーションプローブは、それぞれRpp16-1 cDNAおよびRpp17-1または2のcDNAについての、cDNAの全体領域に対応するDIG標識したPCRフラグメントであった。ハイブリダイゼーションおよび洗浄を、Ausubelら(Ausubelら, (1987) Current Protocols in Molecular Biology, New York: Wiley)に記載のように行った。フィルターをX線フィルム(富士フィルム)に曝露した。ハイブリダイズしたバンドを、製造業者の指示書に記載のよう化学発光反応によって可視化した。その結果、単一バンドを観察し、これは、Rpp16遺伝子およびRpp17遺伝子がイネゲノムにおいて単一コピー遺伝子であることを強く示唆した(データは示さず)。この結果はまた、Rpp17-1遺伝子およびRpp17-2遺伝子の間の9個の塩基配列の差が、オルタナティブスプライシング事象に由来することを示唆する。

#### 【0055】

(実施例2: タンパク質RPP16-1、RPP17-1、およびRPP17-2の特徴づけ)

カボチャCmPP16-1およびCmPP16-2の推定アミノ酸配列(これらはcDNA(Xoconostle-Cazaresら, (1999), 前出)から推定)、レッドクローバー壊死モザイクウイルスの移動タンパク質(RCNMVのMP)の推定アミノ酸配列(これはcDNA(DDJB登録番号P10838)から推定)と、イネRPP16、RPP17-1、ならびにRPP17-2の推定アミノ酸配列(これらはRpp16-1、Rpp17-1、およびRpp17-2のcDNAからそれぞれ推定)とのアラインメントを図1に示す。同一アミノ酸を反転によって示し、そして類似のアミノ酸に影をつけた。プロテインキナーゼC様Ca<sup>2+</sup>/リン脂質結合(C2)ドメインを、濃い線で示し、C2ドメインの3つのサブドメイン(A、B、C)を、白の長方形で示した。配列の右の数字は、各タンパク質のアミノ酸位置を示す。

#### 【0056】

RPP16タンパク質およびRPP17タンパク質の推定アミノ酸配列は、互いに57%の類似性を共有し、そして両方のタンパク質ともRCNMVのMPに局所的な相同性を有していた。Rpp16遺伝子およびRpp17遺伝子からの推定アミノ酸配列は、カボチャCmPP16に対してそれぞれ56%および58%の類似性を示した。図1から明らかのように、モチーフサーチによれば、これらのタンパク質の保存的領域は、単一のCa<sup>2+</sup>/リン脂質結合(C2)ドメイン(Kopkaら, (1998), 前出)を含んでいる。

#### 【0057】

次いで、タンパク質RPP16-1、RPP17-1、およびRPP17-2についてのコンピュータサーチを、登録された配列データに対して行った。類似性のある配列として、Arabidopsis Thaliana(シロイヌナズナ)[DDJB登録番号CAB75905、AA

10

20

30

40

50



F 3 4 8 6 0 ]、chickpea (ヒヨコマメ) [ D D J B 登録番号 A J 0 1 2 6 9 2 ]、および Zea mays (トウモロコシ) [ D D J B 登録番号 U 6 4 4 3 7、A F 1 5 2 6 0 1 ]からの配列を、データベースからピックアップできた。しかし、これらの機能は知られていない。

#### 【 0 0 5 8 】

さらに、R P P 1 6 タンパク質および R P P 1 7 タンパク質についての系統樹を、P A U P \* 4 . 0 b 4 a ( Swofford, (1998) PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods), version 4. Sunderland, MA: Sinauer Associates) を使用する Neighbor-Joining Method クラスタリング方法 ( Saitou および Nei, Mol. Biol. Evol., 4, 406-425 (1987) ) に従って作成し、ブートストラップ値を、10,000 反復試験区について得た。得られるタンパク質系統発生図を図 2 に示す。枝の数字は、枝を支持するパーセンテージである。イネタンパク質の名称を四角で囲んで示した。結果は、R P P 1 7 タンパク質が、配列アラインメントにおいて、R P P 1 6 タンパク質よりもカボチャ C m P P 1 6 タンパク質とより密接に関連することを示唆する。

10

#### 【 0 0 5 9 】

R P P 1 6 - 1、R P P 1 7 - 1、および R P P 1 7 - 2 のタンパク質の構造を、s w i s s p r o t を使用して分析した。C m P P 1 6 - 1、C m P P 1 6 - 2、R P P 1 7 - 1、および R P P 1 7 - 2 の推定等電点 ( p I ) は、それぞれ 6 . 1 7、5 . 6 6、6 . 0 5、および 6 . 2 6 であり、これは、これらのタンパク質が推定の中性タンパク質であることを示す。一方、R P P 1 6 - 1 の推定 p I は 4 . 0 6 であり、R P P 1 6 - 1 が推定の酸性タンパク質であることを示す。タンパク質特性だけでなく系統発生分析の結果も、カボチャ C m P P 1 6 タンパク質の進化的対応物が R P P 1 7 タンパク質であることを示した。

20

#### 【 0 0 6 0 】

( 実施例 3 : タンパク質発現の免疫学的検討 )

R P P 1 6 および R P P 1 7 タンパク質の発現を、免疫学的検出によって検討した。

#### 【 0 0 6 1 】

まず、イネ R P P 1 6 および R P P 1 7 タンパク質に対する抗血清を、以下のように調製した。R P P 1 6 - 1 および R P P 1 7 - 1 の一部 ( それぞれ、アミノ酸位置 ; 配列番号 2 の 3 9 位 ~ 1 4 4 位 および アミノ酸位置 ; 配列番号 4 の 4 3 位 ~ 1 5 9 位 ) に対応する c D N A を、P C R によって増幅し、G S T 遺伝子を含む p G E X 4 T - 3 ベクター ( Amersham Pharmacia Biotech ) にライゲートし、そしてそれぞれ E . c o l i J M 1 0 9 に形質転換した。G S T / R P P 1 6 および G S T / R P P 1 7 の各融合タンパク質を、1 m M I P T G の添加によって誘導した。各精製した融合タンパク質を、2 週間隔で 6 回ウサギに注射した。抗血清を、C N B r 活性化セファロース 4 B カラムを使用するアフィニティー精製によって精製した。抗 R P P 1 6 抗血清および抗 R P P 1 7 抗血清を用いて、R P P 1 6 - 1 タンパク質および R P P 1 7 - 1 タンパク質の発現をウエスタンブロット分析によって検出した。結果を、それぞれ図 3 の ( a ) および ( b ) に示す。

30

#### 【 0 0 6 2 】

図 3 において、矢印は、それぞれ ( a ) 抗 R P P 1 6 抗血清と反応した 3 0 k D ペプチド および ( b ) 抗 R P P 1 7 抗血清と反応した 1 7 k D ペプチドを示す。約 3 0 k D a の分子量を有するペプチドを、抗 R P P 1 6 抗血清を使用してイネ総タンパク質の可溶性画分で検出した ( 図 3 ( a ) )。また、R P P 1 7 - 1 に対する免疫学的検出は、不溶性抽出物中に 1 7 k D a のタンパク質の存在を示した ( 図 3 ( b ) )。また、これらのタンパク質は、以下に示すように、別の植物にも普遍的に存在することが示された ( 図 3 ( c ) および ( d ) )。

40

#### 【 0 0 6 3 】

次に、イネ、サトウキビ、オオムギ、アズキ、アラビドプシス、メロン、およびタバコの各植物の葉を、5 容量の抽出緩衝液 ( 1 0 0 m M T r i s - H C l ( p H 7 . 5 ) ; 2 m M E D T A ; 5 m M 2 - メルカプトエタノール ; 1 0 % グリセロール ) 中で微細粉

50

末に粉碎し、15,000rpmで30分間4にて遠心分離し、そして上清を収集した(S1画分)。ペレット画分を、等容量の緩衝液(50mM Tris-HCl(pH 7.5); 2mM EDTA; 5mM 2-メルカプトエタノール; 10%グリセロール; 50mM KCl; 0.2% Triton X-100)に再懸濁した。続いて、チューブを4にて30分間回転し、そして15,000rpmで30分間4にて遠心分離し、そして上清を収集した(S2画分)。ペレット画分もまた、SDS-PAGEランニング緩衝液に懸濁した(不溶性画分)。各タンパク質を、12%SDS-PAGEによって分離し、そしてImmobilion PVDfメンブラン(Millipore, 日本)にトランスファーした。水溶性可溶性画分(S1)、Triton X-100可溶性画分(S2)、および不溶性画分(M)からの葉タンパク質を調製した。さらにイネ(レーン1); オオムギ(レーン2); サトウキビ(レーン3); アラビドプシス(レーン4); メロン(レーン5); アズキ(レーン6); およびタバコ(レーン7)のそれぞれについても、SDS-PAGEによって分離し、(a)および(c)については抗RPP16抗血清、ならびに(b)および(d)については抗RPP17抗血清を用いてウエスタンブロット分析を行った。

10

#### 【0064】

その結果、各植物の葉の可溶性画分(S1またはS2)において、イネのRPP16と類似の構造を有するタンパク質を、サトウキビ、オオムギ、アズキ、メロン、およびアラビドプシスで検出した(図3(c))。しかし、免疫学的分析で検出した可溶性の30kDaペプチドは、RPP16-1のcDNA配列から推定した15.9kDaの質量よりも14kDa大きかった。さらに、E. coliのRPP16-1産物(アミノ酸位置: 配列番号2の39位~144位; Asp: 9.52%; Glu: 12.38%)も、11.5kDaタンパク質として示され、推定されたよりも5.5kDa大きかった(データは示さず)。SDS-PAGEにおいて、酸性アミノ酸含量の高いタンパク質は、実際の分子量よりも遅く移動し、そのため、SDS-PAGEによる見かけの分子量が顕著に大きくなることが報告されている(Takanoら, Biochemistry, 27, 1964-1972 (1988))。したがって、多くの酸性アミノ酸残基を有するRPP16-1タンパク質(Asp: 8.33%; Glu: 11.11%)は、SDS-PAGEにおいて実際の分子サイズよりも大きいタンパク質として検出されていると考えられる。これらの結果は、タンパク質プロットによって検出されるバンドが、Rpp16-1遺伝子の翻訳産物であることを強く示唆する。

20

30

#### 【0065】

RPP17タンパク質と類似の分子量を有するタンパク質もまた、サトウキビ、オオムギ、タバコ、メロン、およびアラビドプシスの葉の不溶性画分で検出した(図3(d))。この結果は、RPP17タンパク質が、膜結合タンパク質であることを示唆する。

#### 【0066】

これらの結果は、RPP16タンパク質およびRPP17タンパク質またはそのホモログが、高等植物全体を通して保存されることを示す。さらに、RPP16タンパク質およびRPP17タンパク質は、タンパク質ゲル分析において全く異なるタンパク質特性を示すので、細胞内局在化の点で大きく異なるタンパク質である。

#### 【0067】

(実施例4: Rpp16-gusAおよびRpp17-gusAを発現するトランスジェニック植物の生産およびインサイチュGUS染色)

RPP16-1タンパク質およびRPP17-1タンパク質のそれぞれの推定プロモーター領域を含むゲノム配列を、ブランクハイブリダイゼーションによってスクリーニングした。RPP16-1タンパク質およびRPP17-1タンパク質のORFの上流領域は、 $2 \times 10^5$  ブランクのイネゲノムライブラリーを、プローブとしてそれぞれのcDNAクローンでスクリーニングすることによって得た。1.4kbのRPP16プロモーター領域(配列番号7)および2kbのRPP17プロモーター領域(配列番号8: RPP17-1およびRPP17-2に共通の配列)を、それぞれpCAMBIA1301のgusA遺伝子上流にインフレームでサブクローニングした。これらを、PCRによって増幅

40

50

し、そして p C A M V I A 1 3 0 1 プラスミド中の g u s A 遺伝子の上流にライゲートした。得られたプラスミドは、Agrobacterium tumefaciens の T - D N A 由来ベクターであり、これを Agrobacterium tumefaciens EHA105 株 ( Z E N E C A M O G E N ) に導入した。トランスジェニックイネ植物 ( Oryza sativa cvs Nipponbare ) を、Toki ( Toki, Plant Mol. Biol. Rep., 15, 16-21 (1997) ) に記載のようにアグロバクテリウム媒介形質転換によって作成した。トランスジェニックイネ植物を、ハイグロマイシン含有培地で選択し、そしてイネゲノムへの g u s A 遺伝子の導入を、P C R によって確認した。40 以上の独立したトランスジェニック系統を、各構築物について得た。

【 0 0 6 8 】

G U S 遺伝子発現の分析は、G U S 活性の蛍光分析 ( Jefferson, Plant Mol. Biol. Rep., 5, 387-405 (1987) ) によって行った。トランスジェニック R p p 1 6 - g u s A および R p p 1 7 - g u s A 植物の根、茎、および葉では、いずれも G U S 活性が認められ、G U S が発現していることを確認した。なお、G U S 活性は、イネ植物の非形質転換体では検出されなかった。

10

【 0 0 6 9 】

G U S 遺伝子発現の組織化学的分析については、G U S 染色によって以下のように行った。まず、葉、茎、および根のセグメントを、マイクロスライサーによって 30 μ m の薄横断面の切片にし、次いで 0 . 5 m M X - G l u c ( 5 - ブロモ - 4 - クロロ - 3 - インドリル - D - グルクロン酸 ) および 5 % メタノールを含む 50 m M リン酸ナトリウム緩衝液 ( p H 7 . 0 ) 中で 2 ~ 2 4 時間 3 7 ° C にてインキュベートした。インキュベーション後、試料をエタノールで澄明にした。

20

【 0 0 7 0 】

結果の写真を図 4 に示す。( a )、( b )、( c )、および ( d ) の写真は、それぞれ R p p 1 6 - g u s A 発現植物の葉の横断面、その拡大写真、茎の横断面、および根の横断面である。( e )、( f )、および ( g ) の写真は、それぞれ R p p 1 7 - g u s A 発現植物の葉、茎、および根の横断面である。略号は、B R : 枝根 ; C R : 冠根 ; P h : 師部組織 ; および T V B : 横走維管束を示す。

【 0 0 7 1 】

根では、R p p 1 6 - g u s A および R p p 1 7 - g u s A 植物においては、根で G U S 染色が認められたが、冠根よりも枝根において G U S 染色が著しかった。発現パターンを詳細に観察するために、マイクロスライサーによって根の組織切片を調製した。R p p 1 6 - g u s A および R p p 1 7 - g u s A の両方とも、G U S 染色が枝根の維管束組織で観察された。一方、R p p 1 6 - g u s A および R p p 1 7 - g u s A 植物からの皮層、表皮、および外皮層においては、G U S 染色は観察されなかった。

30

【 0 0 7 2 】

茎では、R p p 1 6 - g u s A および R p p 1 7 - g u s A の発現は、小および大維管束、特に師部および木部柔組織においてのみ検出された。

【 0 0 7 3 】

R p p 1 6 - g u s A 植物の葉身および葉鞘における G U S 染色を検討した。葉組織切片を、マイクロスライサーによって葉身および葉鞘から調製し、G U S 染色を、縦走維管束および横走維管束で観察した。G U S 染色は、大維管束の C C でおよび小維管束でのみ観察され、染色から 8 時間目までは他の細胞タイプでは観察されなかった。G U S 染色は、24 時間後には、C C においてならびに維管束鞘に続く柔組織および葉肉細胞において検出された。この結果は、G U S 酵素は C C で発現されるが、徐々にそれに続くアポプラスト、柔組織、および葉肉細胞に放出されるようにみえること、すなわち、柔組織および葉肉細胞で観察される G U S 染色が、G U S 反応産物の拡散の結果であることを示す。この結果はまた、C C 特異的発現が、R P P 1 6 プロモーター領域によって厳密に調節されることも示す。

40

【 0 0 7 4 】

R p p 1 7 - g u s A 植物の葉身および葉鞘では、G U S 染色は、2 ~ 2 4 時間後に、C

50

C、柔組織、および葉肉細胞で検出されるが、GUS染色は、特にCCおよび葉肉細胞で優先的に検出された。

【0075】

以上の結果から、gusA発現を制御するRPP16プロモーターおよびRPP17プロモーターが、根および茎において類似の発現パターンを示すことがわかった。また、Rpp16遺伝子およびRpp17遺伝子の発現パターンが、根および茎では同じであるが、葉身および葉鞘では異なることが示唆された。

【0076】

【発明の効果】

本発明により、ウイルス移動タンパク質(MP)に類似の構造を有する2種のタンパク質がイネに存在し;一方はカボチャCmPP16タンパク質と少なくとも約50%の相同性を有するRPP17タンパク質であり、そして他方はウイルスMP様のカボチャCmPP16タンパク質と少なくとも約50%の相同性を有する新規なタンパク質であるRPP16タンパク質であることが明らかになった。これらのタンパク質は、MPに類似の構造を有し、師部特異的に発現し、その発現はそれぞれのプロモーターによって厳密に調節されている。そのため、これらのタンパク質の遺伝子およびその制御領域を利用して、師部で物質を生産させ、師管へ輸送するという技術を開発することが可能である。例えば、師部において、有用タンパク質を生産させたり、あるいは植物に耐病性または耐虫性を与える物質を生産させ、この物質を師管という長距離輸送経路を使用して植物全体に行き渡らせることが可能である。また、環境に負の影響を与える物質(重金属、環境ホルモンなど)の結合タンパク質を生産させ、環境浄化植物を育成できる。

【0077】

【配列表】

10

20

## SEQUENCE LISTING

<110> Director General of National Institute of Agrobiological Science

<120> Novel proteins in phloem of rice and genes thereof

<130> P101N07031

<160> 8

<210> 1

<211> 432

10

<212> DNA

<213> *Oryza sativa* L.cvs Nipponbare

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (432)

<400> 1

atg gtg cag ggg acg ctc gag gtg ctg ctc gtc gga gcc aag ggc ctc	48	20
Met Val Gln Gly Thr Leu Glu Val Leu Leu Val Gly Ala Lys Gly Leu		
1 5 10 15		
gag aac acc gac tac ctg tgc aac atg gac ccg tac gcg gtt ctc aaa	96	
Glu Asn Thr Asp Trp Leu Cys Asn Met Asp Pro Trp Ala Val Leu Lys		
20 25 30		
tgc cgc tcg cag gag cag aag agc agc gtt gcg tca ggt aaa gga tct	144	
Cys Arg Ser Gln Glu Gln Lys Ser Ser Val Ala Ser Gly Lys Gly Ser		30
35 40 45		
gac cct gaa tgg aac gaa acc ttt atg ttc agc gtc act cac aac gct	192	
Asp Pro Glu Trp Asn Glu Thr Phe Met Phe Ser Val Thr His Asn Ala		
50 55 60		
aca gag ctc atc atc aag ttg atg gac agt gac agt ggc acg gat gat	240	
Thr Glu Leu Ile Ile Lys Leu Met Asp Ser Asp Ser Gly Thr Asp Asp		
65 70 75 80		40
gat ttt gtt gga gaa gca acg att tct ttg gaa gca atc tat aca gaa	288	

Asp Phe Val Gly Glu Ala Thr Ile Ser Leu Glu Ala Ile Trp Thr Glu	
85 90 95	
gga agc ata ccc cca act gtt tat aat gtt gtg aaa gaa gaa gaa tac	336
Gly Ser Ile Pro Pro Thr Val Trp Asn Val Val Lys Glu Glu Glu Trp	
100 105 110	
cgt gga gaa atc aaa gtg ggc ctg acg ttc act cca gag gat gat cgc	384
Arg Gly Glu Ile Lys Val Gly Leu Thr Phe Thr Pro Glu Asp Asp Arg	10
115 120 125	
gat cgg ggt tta tct gag gaa gac att ggt gga tgg aag cag tca tct	432
Asp Arg Gly Leu Ser Glu Glu Asp Ile Gly Gly Trp Lys Gln Ser Ser	
130 135 140	
<210> 2	
<211> 144	
<212> PRT	20
<213> <i>Oryza sativa</i> L.cvs Nipponbare	
<400> 2	
Met Val Gln Gly Thr Leu Glu Val Leu Leu Val Gly Ala Lys Gly Leu	
1 5 10 15	
Glu Asn Thr Asp Trp Leu Cys Asn Met Asp Pro Trp Ala Val Leu Lys	
20 25 30	
Cys Arg Ser Gln Glu Gln Lys Ser Ser Val Ala Ser Gly Lys Gly Ser	30
35 40 45	
Asp Pro Glu Trp Asn Glu Thr Phe Met Phe Ser Val Thr His Asn Ala	
50 55 60	
Thr Glu Leu Ile Ile Lys Leu Met Asp Ser Asp Ser Gly Thr Asp Asp	
65 70 75 80	
Asp Phe Val Gly Glu Ala Thr Ile Ser Leu Glu Ala Ile Trp Thr Glu	
85 90 95	40
Gly Ser Ile Pro Pro Thr Val Trp Asn Val Val Lys Glu Glu Glu Trp	

	100		105		110	
Arg Gly Glu Ile Lys Val Gly Leu Thr Phe Thr Pro Glu Asp Asp Arg						
	115		120		125	
Asp Arg Gly Leu Ser Glu Glu Asp Ile Gly Gly Trp Lys Gln Ser Ser						
	130		135		140	

<210> 3

<211> 477

10

<212> DNA

<213> *Oryza sativa* L.cvs Nipponbare

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(477)

<400> 3

atg gcg ggg agc ggt gtc ctg gag gtg cat ctc gtc gac gcc aag ggc 48 20

Met Ala Gly Ser Gly Val Leu Glu Val His Leu Val Asp Ala Lys Gly

1 5 10 15

ctc acc ggc aac gac ttc cta ggt gag ata ggc aag ata gac ccg tac 96

Leu Thr Gly Asn Asp Phe Leu Gly Glu Ile Gly Lys Ile Asp Pro Trp

20 25 30

gtg gtg gtg cag tac cgg agc cag gag cgc aag agc agc gtc gcc aga 144

Val Val Val Gln Trp Arg Ser Gln Glu Arg Lys Ser Ser Val Ala Arg

35 40 45

gat caa ggg aag aac ccg agc tgg aac gag gtg ttc aag ttc cag atc 192

Asp Gln Gly Lys Asn Pro Ser Trp Asn Glu Val Phe Lys Phe Gln Ile

50 55 60

aac tcc acg gcg gcg acc ggg cag cac aag ctc ttt ctg cgg ctc atg 240

Asn Ser Thr Ala Ala Thr Gly Gln His Lys Leu Phe Leu Arg Leu Met

65 70 75 80

40

gac cac gac acc ttc tca cgg gac gac ttc ctc ggc gaa gca acg atc 288

Asp His Asp Thr Phe Ser Arg Asp Asp Phe Leu Gly Glu Ala Thr Ile	
85 90 95	
aac gtg act gac ctg atc agc tta ggc atg gag cac ggc aca tgg gag	336
Asn Val Thr Asp Leu Ile Ser Leu Gly Met Glu His Gly Thr Trp Glu	
100 105 110	
atg agc gaa tcc aag cac cgg gtc gtc ctc gcg gac aaa aca tac cac	384
Met Ser Glu Ser Lys His Arg Val Val Leu Ala Asp Lys Thr Trp His	10
115 120 125	
ggc gag atc aga gtc agc ctc acg ttc acg gct tct gca aag gct caa	432
Gly Glu Ile Arg Val Ser Leu Thr Phe Thr Ala Ser Ala Lys Ala Gln	
130 135 140	
gac cac gca gaa cag gtt gga gga tgg gcg cac agc ttt cgt cag	477
Asp His Ala Glu Gln Val Gly Gly Trp Ala His Ser Phe Arg Gln	
145 150 155	20
<210> 4	
<211> 159	
<212> PRT	
<213> <i>Oryza sativa</i> L. cvs Nipponbare	
<400> 4	
Met Ala Gly Ser Gly Val Leu Glu Val His Leu Val Asp Ala Lys Gly	
1 5 10 15	30
Leu Thr Gly Asn Asp Phe Leu Gly Glu Ile Gly Lys Ile Asp Pro Trp	
20 25 30	
Val Val Val Gln Trp Arg Ser Gln Glu Arg Lys Ser Ser Val Ala Arg	
35 40 45	
Asp Gln Gly Lys Asn Pro Ser Trp Asn Glu Val Phe Lys Phe Gln Ile	
50 55 60	
Asn Ser Thr Ala Ala Thr Gly Gln His Lys Leu Phe Leu Arg Leu Met	40
65 70 75 80	



Asp His Asp Thr Phe Ser Arg Asp Asp Phe Leu Gly Glu Ala Thr Ile		
	85	90
Asn Val Thr Asp Leu Ile Ser Leu Gly Met Glu His Gly Thr Trp Glu		
	100	105
Met Ser Glu Ser Lys His Arg Val Val Leu Ala Asp Lys Thr Trp His		
	115	120
Gly Glu Ile Arg Val Ser Leu Thr Phe Thr Ala Ser Ala Lys Ala Gln		
	130	135
Asp His Ala Glu Gln Val Gly Gly Trp Ala His Ser Phe Arg Gln		
	145	150
<210> 5		
<211> 468		
<212> DNA		
<213> <i>Oryza sativa</i> L. cvs Nipponbare		20
<220>		
<221> CDS		
<222> (1)... (468)		
<400> 5		
atg gcg ggg agc ggt gtc ctg gag gtg cat ctc gtc gac gcc aag ggc		48
Met Ala Gly Ser Gly Val Leu Glu Val His Leu Val Asp Ala Lys Gly		
1	5	10
ctc acc ggc aac gac ttc cta ggc aag ata gac ccg tac gtg gtg gtg		96
Leu Thr Gly Asn Asp Phe Leu Gly Lys Ile Asp Pro Trp Val Val Val		
	20	25
cag tac cgg agc cag gag cgc aag agc agc gtc gcc aga gat caa ggg		144
Gln Trp Arg Ser Gln Glu Arg Lys Ser Ser Val Ala Arg Asp Gln Gly		
	35	40
aag aac ccg agc tgg aac gag gtg ttc aag ttc cag atc aac tcc acg		192
Lys Asn Pro Ser Trp Asn Glu Val Phe Lys Phe Gln Ile Asn Ser Thr		40

50	55	60		
gcg gcg acc ggg cag cac aag ctc ttt ctg cgg ctc atg gac cac gac			240	
Ala Ala Thr Gly Gln His Lys Leu Phe Leu Arg Leu Met Asp His Asp				
65	70	75	80	
acc ttc tca cgg gac gac ttc ctc ggc gaa gca acg atc aac gtg act			288	
Thr Phe Ser Arg Asp Asp Phe Leu Gly Glu Ala Thr Ile Asn Val Thr				
	85	90	95	10
gac ctg atc agc tta ggc atg gag cac ggc aca tgg gag atg agc gaa			336	
Asp Leu Ile Ser Leu Gly Met Glu His Gly Thr Trp Glu Met Ser Glu				
	100	105	110	
tcc aag cac cgg gtc gtc ctc gcg gac aaa aca tac cac ggc gag atc			384	
Ser Lys His Arg Val Val Leu Ala Asp Lys Thr Trp His Gly Glu Ile				
	115	120	125	
aga gtc agc ctc acg ttc acg gct tet gca aag gct caa gac cac gca			432	20
Arg Val Ser Leu Thr Phe Thr Ala Ser Ala Lys Ala Gln Asp His Ala				
	130	135	140	
gaa cag gtt gga gga tgg gcg cac agc ttt cgt cag			468	
Glu Gln Val Gly Gly Trp Ala His Ser Phe Arg Gln				
145	150	155		
<210> 6				
<211> 156				30
<212> PRT				
<213> <i>Oryza sativa</i> L.cvs Nipponbare				
<400> 6				
Met Ala Gly Ser Gly Val Leu Glu Val His Leu Val Asp Ala Lys Gly				
1	5	10	15	
Leu Thr Gly Asn Asp Phe Leu Gly Lys Ile Asp Pro Trp Val Val Val				
	20	25	30	40
Gln Trp Arg Ser Gln Glu Arg Lys Ser Ser Val Ala Arg Asp Gln Gly				

	35		40		45										
Lys	Asn	Pro	Ser	Trp	Asn	Glu	Val	Phe	Lys	Phe	Gln	Ile	Asn	Ser	Thr
	50					55					60				
Ala	Ala	Thr	Gly	Gln	His	Lys	Leu	Phe	Leu	Arg	Leu	Met	Asp	His	Asp
	65				70					75				80	
Thr	Phe	Ser	Arg	Asp	Asp	Phe	Leu	Gly	Glu	Ala	Thr	Ile	Asn	Val	Thr
				85					90					95	
Asp	Leu	Ile	Ser	Leu	Gly	Met	Glu	His	Gly	Thr	Trp	Glu	Met	Ser	Glu
		100				105							110		
Ser	Lys	His	Arg	Val	Val	Leu	Ala	Asp	Lys	Thr	Trp	His	Gly	Glu	Ile
		115				120						125			
Arg	Val	Ser	Leu	Thr	Phe	Thr	Ala	Ser	Ala	Lys	Ala	Gln	Asp	His	Ala
	130					135						140			
Glu	Gln	Val	Gly	Gly	Trp	Ala	His	Ser	Phe	Arg	Gln				
145					150						155				

<210> 7

<211> 1288

<212> DNA

<213> *Oryza sativa* L.cvs Nipponbare

<220>

<221> promotor

<222> (1)... (1288)

<400> 7

ggccgccgtc	cgcgccaaac	ccaccacggc	tgacattct	ctgtccccgt	caccgctgc	60
ctaccacitc	tecccttcgc	ccgtggcacc	tccagcccgc	ccccacgtcg	ccctcctcc	120
gccgtcggct	ctccaccctt	teccctcccc	teccctcact	atcccccttt	tgaacgtaaa	180
aatgagatta	caatactagt	tgtctcctag	tattttatat	agtaaattcg	tcatgcaata	240
aatttggact	tttcaaaatg	tttgtaaata	tagccattat	aaaaattaat	acaaatgtat	300
ggatagttag	aaaatattac	taaaatatag	gtggatatga	tatagagggt	gtaatataga	360

10

20

30

40

t gatctattg gagtgaagaa gaatatagag tgggaatctt ttttagatga ccacctaaat 420  
 aaggatatag atgatcaaat aaggatgctc taagcctcta actagtgtat ggctaacctt 480  
 ttigtactta aagcatatta gtttcgiga cgigtatgca atgggcacat ttttgctaaa 540  
 tgaaacatc tetactatcg ccatctgact tgaatatat gatatgtgca cctcaaatcc 600  
 aatggactca tatatcaatg acccagcta gacgacaaac ttaacccttt gccaatgatc 660  
 acttctatca gtcaaaatgt tgaatttaca agggcttggc ccatttgata ttttttaaag 720  
 ttgttggccc atttgatctg gtgacaacgc cacgigtatca tcagagtgtc ctattttcac 780 10  
 tattttgcta atgcctaacg tgggtcgcg cgtcggagcc agctactgga gcgcacgcgcg 840  
 ataatgtgca cgccgacacg tccacacgca tggtagcga ggctgtgccc tccaattccg 900  
 tgcaccatcc cgacgggtacc gcacggcagc gccacgggtg agatcggctc tgcittttcg 960  
 cccgcgaaac cggcgggaga agacaccctc tctcctctc ctcctctcc tgcctcact 1020  
 catccaccag ctggggcgac gacgcaccgc ccgcggcgca ttgacttgcg cacgttacgc 1080  
 tgtcgtcgtt tccccctacc acgccaccct caigtctcgg gggggaggcg aacgcgtccc 1140  
 gcgagtccca cggcccacct caactcctat aaaaactgcg ttcggattgg atctcgcctt 1200 20  
 ctgccttctt ggtcaaatgt ttgcctaata agcatcgatc gaaggcgagg ccagccagcc 1260  
 agccggggcg ccgggggagc tggggaag 1288

<210> 8

<211> 1572

<212> DNA

<213> *Oryza sativa* L. cvs Nipponbare

<220>

<221> promotor

<222> (1)... (1572)

<400> 8

ttttcggcaa ttagaatttc ggaatctatg ctgatttgt cgagctcagt tctcaggat 60  
 cttgacatgt gaattctctg tctgcttca ttttctctg tctgaggatt tcaacttttg 120  
 gattactgcg acactgatcc atgctttgtt cttaattag ttatgtgttg cgcgagctat 180  
 cgacttcaaa ataatatgct tttttttgt gatcgactga tcgcatata cctgtacgta 240 40  
 atgtgagacg aaaccactat tcaattttgc agctgacgtt gtgatgttga tgcctgatgg 300

tgctctactg ctctgtttcc tgcgttcccg aaaaatactg ctctgttaat ctgtttccag	360	
cgtaaattaa aacaaacggc caatgataat cgtttttaat tttttggccg agtcaacaca	420	
gactcacagt atgtcaacaa ctgatgtcag tacaccggti ctttgitatt atgacacatc	480	
actgtcaiga aaaccacctg ataggttaac aatcagaacc aagcagttc tgattctgag	540	
accattctt cagaaatctg gaaattctac cgatatctat ctgacctgact atctctatct	600	
cgatctctgc caggattgtt ctgtcgaact aatggttgta cgcaaatctg tctccctact	660	
gcagtctcag tccaagticc ctctttgatg attcttcgaa ctatctcgct agattgggac	720	10
tcgctcattt agccgaggaa acacgcttag cagcaagact cgatcagctc cgatcctcac	780	
gttgaagcga tgaaaaaaaaa tcacctcgaa ttcgatccag gcggcgagac gtgaccaa	840	
cacgtacaag tctctctcga acagacctgg ttgtttaaac tactaattct aaactgcaga	900	
gggtcagaga gaaagatctg acgaaacttg tactgtctaat catgcaataa gcatgtgtta	960	
atgccaggac gattcactgg ggaaggaatc acaccgtggg catgctgttg actagcggaa	1020	
taataccact gatttaagta gggctatata ttgatata gcataactgc taactgccag	1080	
ttgctagtc ctcttcggct ctccagctg ggagtcgaaa caaacaaaag agccgtctgt	1140	20
aagcacgtcc aagtaattaa attagtactg agtagtaatc cctaagctaa aaatatggcc	1200	
agttgtagct gacagctagg agtaagagat gggcaagtag agagtataga gaggaaggag	1260	
agaggaagca atatgggaga acagtatga agcctcgaac cggctcgggt cagccaact	1320	
caaccacgta gaaacgtgcg ggtttacacg gtggcgaccg ctccaatgt gcgggagctt	1380	
tgactggicc ccagccagct cgcctataaa cgcgcgcacg ctcgagccag ctaccacggc	1440	
atctgcttga gtiggagcaa cacaccaaga aggccagaga gattcagaga actacaccga	1500	
gaaggcgaga ttgtttgcgt ggttggtaat ttggccggcc ttgatcgatc gagcggagaa	1560	30
gagaagagaa ag	1572	

【図面の簡単な説明】

【図1】カボチャCmPP16およびレッドクローバー壊死モザイクウイルスの移動タンパク質とイネRPP16-1タンパク質、RPP17-1タンパク質、およびRPP17-2タンパク質とのアラインメントを示す図である。

【図2】イネRPP16-1タンパク質、RPP17-1タンパク質、RPP17-2タンパク質、および関連配列の系統発生分析の結果を示す図である。

【図3】RPP16タンパク質およびRPP17タンパク質の電気泳動によるタンパク質プロット分析の結果を示す写真である。 40

【図4】Rpp16-gusAおよびRpp17-gusA植物のGUS組織化学的検出の結果を示す写真である。

【 1 】

```

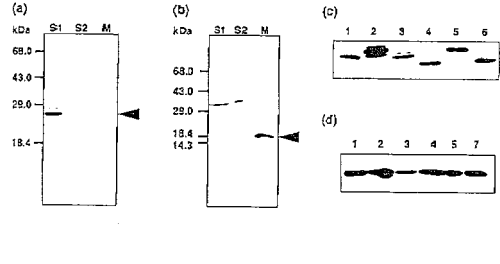
RPP16-1  MV-DGDLVLLVVGARGLENTDNTGN---MDPIAVLKCORSDFNSSVLSGKQSD 49
RPP17-1  WSGGVLEVLLVDARGLKGNDFAGEIGRIDPTVVVQYRSQERKSSVARDQGN 53
RPP17-2  WSGGVLEVLLVDARGLKGNDFAGEIGRIDPTVVVQYRSQERKSSVARDQGN 50
CmPP16-1  WSGGVLEVLLVDARGLKGNDFAGEIGRIDPTVVVQYRSQERKSSVARDQGN 50
CmPP16-2  WSGGVLEVLLVDARGLKGNDFAGEIGRIDPTVVVQYRSQERKSSVARDQGN 50
RCNMV-MP  32 SCVSRPLII 40 237 VFNQGLPSKULLLVKCGT

RPP16-1  PSNNEVFRQIN---SVTHNATEFLLKLLDSDSGDDDFVGEATTI---SLEGLIYT 95
RPP17-1  PSNNEVFRQIN---SVTHNATEFLLKLLDSDSGDDDFVGEATTI---SLEGLIYT 106
RPP17-2  PSNNEVFRQIN---SVTHNATEFLLKLLDSDSGDDDFVGEATTI---SLEGLIYT 103
CmPP16-1  PSNNEVFRQIN---SVTHNATEFLLKLLDSDSGDDDFVGEATTI---SLEGLIYT 103
CmPP16-2  PSNNEVFRQIN---SVTHNATEFLLKLLDSDSGDDDFVGEATTI---SLEGLIYT 103
RCNMV-MP  68RTTLLPSLEPSSGSSGLSM 275 134 W

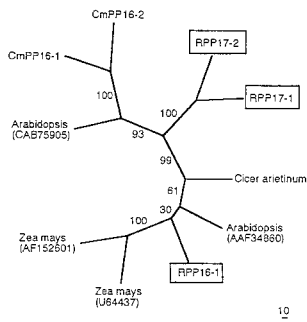
RPP16-1  E-G--SIS-PTVYNWKEEERGLIRVGLTFPEDDRDRGLSEEDIGGWKQSS 144
RPP17-1  EHGTEWMSSESHRVVLADKTYHGEIRVSVLTFASAKAQDHAEQVGGWHSFRQ 159
RPP17-2  EHGTEWMSSESHRVVLADKTYHGEIRVSVLTFASAKAQDHAEQVGGWHSFRQ 156
CmPP16-1  RKGSSEMPRMYVLLAKIHFHGEIEVGVSEKLGQGGGGCGGCPYHEN 150
CmPP16-2  RKGSSEMPRMYVLLAKIHFHGEIEVGVSEKLGQGGGGCGGCPYHEN 138
RCNMV-MP  RITNTGLTRKSYARCL151174EIEVGVY179

```

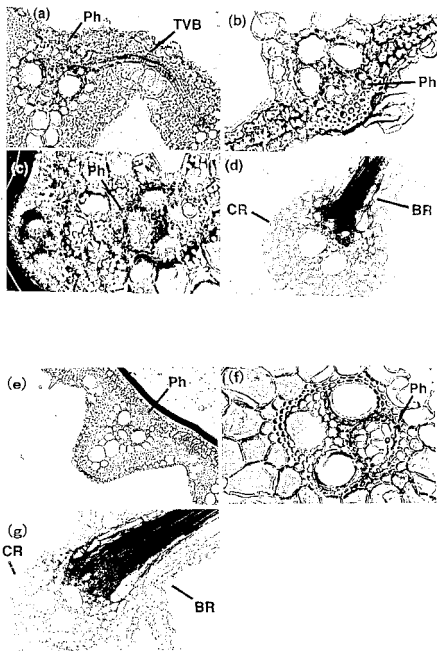
【 3 】



【 2 】



【 4 】



フロントページの続き

(56)参考文献 Science , 1 9 9 9 年 , Vol .283(5398) , p.94-98  
Plant Cell Physiology , 2 0 0 2 年 , Vol.43(6) , p.668-674

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)  
C12N 15/00-15/90  
PubMed