

(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2002 - 315582**

( P 2 0 0 2 - 3 1 5 5 8 2 A )

(43)公開日 平成14年10月29日(2002.10.29)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード <sup>*</sup>	(参考)
C12N 15/09	ZNA	A01H 5/00	A	2B030
A01H 5/00		C07K 14/415		4B024
C07K 14/415		C12N 15/00	ZNA	A 4B065
C12N 5/10		5/00	C	4H045

審査請求 未請求 請求項の数27 O L (全18頁)

(21)出願番号 特願2001 - 126682( P 2001 - 126682)

(22)出願日 平成13年 4 月24日(2001.4.24)

特許法第30条第 1 項適用申請有り 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

(71)出願人 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

(72)発明者 門脇 光一

茨城県つくば市吾妻 3 - 19 - 1 2 - 201

(74)代理人 100104673

弁理士 南條 博道

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)【要約】

【課題】 ウイルス移動タンパク質に関連する師部タンパク質の機能または役割を検討すること。

【解決手段】 イネから、C a<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、新規な2種の師部タンパク質を得た。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】  $Ca^{2+}$  / リン脂質結合ドメインを有する、イネ師部タンパク質。

【請求項 2】 さらに、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、請求項 1 に記載のイネ師部タンパク質。

【請求項 3】 配列番号 2 のアミノ酸配列を有する、請求項 2 に記載のイネ師部タンパク質。

【請求項 4】 請求項 3 に記載の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、請求項 2 に記載のイネ師部タンパク質。

【請求項 5】 配列番号 4 のアミノ酸配列を有する、請求項 2 に記載のイネ師部タンパク質。

【請求項 6】 請求項 5 に記載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、請求項 2 に記載のイネ師部タンパク質。

【請求項 7】 請求項 1 から 6 のいずれかの項に記載のイネ師部タンパク質をコードする、DNA。

【請求項 8】 配列番号 1 の塩基配列を含む、請求項 7 に記載の DNA。

【請求項 9】 配列番号 3 の塩基配列を含む、請求項 7 に記載の DNA。

【請求項 10】 配列番号 5 の塩基配列を含む、請求項 7 に記載の DNA。

【請求項 11】 配列番号 7 の塩基配列を含む、プロモーター。

【請求項 12】 配列番号 8 の塩基配列を含む、プロモーター。

【請求項 13】 請求項 1 から 6 のいずれかの項に記載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。

【請求項 14】 前記トランスジェニック植物が、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、請求項 13 に記載のトランスジェニック植物。

【請求項 15】 請求項 13 または 14 に記載のトランスジェニック植物を用いて、請求項 1 から 6 のいずれかの項に記載のイネ師部タンパク質を製造する方法。

【請求項 16】 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。

【請求項 17】 前記ベクターが、さらに、請求項 7 から 10 のいずれかの項に記載の DNA の全部または一部を含む、請求項 16 に記載のトランスジェニック植物。

【請求項 18】 前記請求項 7 から 10 のいずれかの項に記載の DNA の全部または一部が、前記異種タンパク

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、請求項 16 または 17 に記載のトランスジェニック植物。

【請求項 19】 前記プロモーターが、請求項 11 または 12 に記載のプロモーターである、請求項 16 から 18 のいずれかの項に記載のトランスジェニック植物。

【請求項 20】 前記植物が、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、請求項 16 から 19 のいずれかの項に記載のトランスジェニック植物。

【請求項 21】 前記異種タンパク質が、前記師部から師管へ分泌される、請求項 16 から 20 のいずれかの項に記載のトランスジェニック植物。

【請求項 22】 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 23】 前記ベクターが、さらに、請求項 7 から 10 のいずれかの項に記載の DNA の全部または一部を含む、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】 前記請求項 7 から 10 のいずれかの項に記載の DNA の全部または一部が、前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、請求項 22 または 23 に記載のトランスジェニック植物。

【請求項 25】 前記プロモーターが、請求項 11 または 12 に記載のプロモーターである、請求項 22 から 24 のいずれかの項に記載の方法。

【請求項 26】 前記植物が、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、請求項 22 から 25 のいずれかの項に記載の方法。

【請求項 27】 前記異種タンパク質が、前記師部から師管へ分泌される、請求項 22 から 26 のいずれかの項に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、 $Ca^{2+}$  / 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の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、1 kDa から 20 kDa 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】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。

【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。

【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。

【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。

【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。

【0023】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。

【0024】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。

【0025】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。

【0026】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。

【0027】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。

【0028】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。

【0029】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。

【0030】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。

【0031】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。

【0032】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。

【0033】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。

【0034】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。

【0035】

【発明の実施の形態】本明細書において、「CmPP16」とは、レ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

10

20

30

40

50

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、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、RPP16タンパク質およびRPP17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CmPP16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, N

ew 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。

【0042】CmPP16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RPP16タンパク質およびRPP17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。

【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CmPP16-1、CmPP16-2、RPP17-1、およびRPP17-2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、RPP16-1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、RPP16-1タンパク質は新規のタンパク質であり、RPP17タンパク質(RPP17-1およびRPP17-2)はカボチャCmPP16タンパク質の進化対応物と考えられる。

【0044】RPP16タンパク質およびRPP17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】Rpp16遺伝子およびRpp17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、グリーンフルオロセントプロテイン(GFP)などが挙げられる。特に、植物においてインサイチュでRpp16遺伝子およびRpp17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gusA遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子などが挙げられる。

【0046】また、RPP16タンパク質およびRPP17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】トランスジェニック植物の作成は、例えば、RPP16タンパク質またはRPP17タンパク質を発現させるイネの場合、以下に行われる。まず、RPP16タンパク質またはRPP17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。RPP16またはRPP17のオープンリーディングフレーム(ORF)の上流領域は、プローブとしてそれぞれのcDNA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pBI121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-DNA由来ベクターを使用してイネに導入して、RPP16タンパク質またはRPP17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、gusA遺伝子を指標としてPCR法またはサザン法によって確認できる。RPP16および/またはRPP17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。

【0048】また、RPP16プロモーターまたはRPP17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DNA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RPP16またはRPP17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、RPP16またはRPP17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。

【0049】本発明により得られるRPP16タンパク質およびRPP17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/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。

【0050】

【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。

【0051】(実施例1:イネからの新しいウイルスMP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cDNA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。

【0052】cDNAのスクリーニングために、CmP16cDNAに対する類似性検索を、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、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ESTクローンR0374およびE61187(それぞれDDBJ登録番号AU031663およびC74955)のインサートDNA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。

【0053】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ー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、15.9kDa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、16kDa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、17.7kDaの推定分子量を有する159アミノ酸残基、および17.4kDa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、サザンプロット分析を、以下に行った。イネゲノムDNA(5μg)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Rpp16-1cDNA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

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に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、R p p 1 6 遺伝子およびR p p 1 7 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、R p p 1 7 - 1 遺伝子およびR p p 1 7 - 2 遺伝子の間の9個の塩基配列の差が、オルタナティブ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R P P 1 6 - 1、R P P 1 7 - 1、およびR P P 1 7 - 2の特徴づけ）カボチャC m P P 1 6 - 1およびC m P P 1 6 - 2の推定アミノ酸配列（これらはc D N A（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（R C N M VのM P）の推定アミノ酸配列（これはc D N A（D D J B登録番号P 1 0 8 3 8）から推定）と、イネR P P 1 6、R P P 1 7 - 1、ならびにR P P 1 7 - 2の推定アミノ酸配列（これらはR p p 1 6 - 1、R p p 1 7 - 1、およびR p p 1 7 - 2のc D N A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C a<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】R P P 1 6 タンパク質およびR P P 1 7 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R C N M VのM Pに局所的な相同性を有していた。R p p 1 6 遺伝子およびR p p 1 7 遺伝子からの推定アミノ酸配列は、カボチャC m P P 1 6 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C a<sup>2+</sup>/リン脂質結合（C2）ドメイン（Kopk aら、(1998), 前出）を含んでいる。

【0057】次いで、タンパク質R P P 1 6 - 1、R P P 1 7 - 1、およびR P P 1 7 - 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）[ D D J B登録番号C A B 7 5 9 0 5、A A F 3 4 8 6 0 ]、chickpea（ヒヨコマメ）[ D D J B登録番号A J O 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。

【0058】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。

【0059】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、swiss prot 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（pI）は、それぞれ6.17、5.66、6.05、および6.26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pIは4.06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。

【0060】（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。

【0061】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39位～144位およびアミノ酸位置；配列番号4の43位～159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、1mM 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。

【0062】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30kDペプチドおよび(b)抗R P P 1 7 抗血清と反応した17kDペプチドを示す。約30kDa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17kDa

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))。

【0063】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(100mM Tris-HCl(pH7.5); 2mM EDTA; 5mM 2-メルカプトエタノール; 10%グリセロール)中で微細粉末に粉碎し、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(pH7.5); 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 P VDF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。

【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量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、タンパク質ブ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。

【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、 $2 \times 10^5$  プラー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遺伝子の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によって増幅し、そしてpCAMBIA1301プラスミド中のgusA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-DNA由来ベクターであり、これをAgrobacterium tumefaciens EHA105株(ZENEGA MOGEN)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gusA遺伝子の導入を、PCR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。

【0068】GUS遺伝子発現の分析は、GUS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Rpp16-gusAおよびRpp17-gusA植物の根、茎、および葉では、いずれもGUS活性が認めら



れ、GUSが発現していることを確認した。なお、GUS活性は、イネ植物の非形質転換体では検出されなかった。

【0069】GUS遺伝子発現の組織化学的分析については、GUS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 μmの薄横断面の切片にし、次いで0.5 mM X-Gluc (5-プロモ-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 mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)中で2~24時間37 °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清にした。

【0070】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Rpp16-gusA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Rpp17-gusA発現植物の葉、茎、および根の横断面である。略号は、BR:枝根; CR:冠根; Ph:師部組織; およびTVB:横走維管束を示す。

【0071】根では、Rpp16-gusAおよびRpp17-gusA植物においては、根でGUS染色が認められたが、冠根よりも枝根においてGUS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。Rpp16-gusAおよびRpp17-gusAの両方とも、GUS染色が枝根の維管束組織で観察された。一方、Rpp16-gusAおよびRpp17-gusA植物からの皮層、表皮、および外皮層においては、GUS染色は観察されなかった。

【0072】茎では、Rpp16-gusAおよびRpp17-gusA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。

【0073】Rpp16-gusA植物の葉身および葉鞘におけるGUS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、GUS染色を、縦走維管束および横走維管束で観察した。GUS染色は、大維管束のCC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。GUS染色は、24時間後には、CC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

胞において検出された。この結果は、GUS酵素はCC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GUS染色が、GUS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、CC特異的発現が、RPP16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。

【0074】Rpp17-gusA植物の葉身および葉鞘では、GUS染色は、2~24時間後に、CC、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CmP16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CmP16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】

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

<212> DNA

<213> Oryza sativa L.cvs Nipponbare



19  
 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  
 <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  
 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  
 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  
 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  
 <210> 4  
 <211> 159  
 <212> PRT  
 <213> Oryza sativa 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  
 Leu Thr Gly Asn Asp Phe Leu Gly Glu Ile Gly Lys Ile Asp Pro Trp

21	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	
65					70					75				80		
Asp	His	Asp	Thr	Phe	Ser	Arg	Asp	Asp	Phe	Leu	Gly	Glu	Ala	Thr	Ile	
				85					90					95		
Asn	Val	Thr	Asp	Leu	Ile	Ser	Leu	Gly	Met	Glu	His	Gly	Thr	Trp	Glu	
			100					105					110			
Met	Ser	Glu	Ser	Lys	His	Arg	Val	Val	Leu	Ala	Asp	Lys	Thr	Trp	His	
		115					120					125				
Gly	Glu	Ile	Arg	Val	Ser	Leu	Thr	Phe	Thr	Ala	Ser	Ala	Lys	Ala	Gln	
		130				135						140				
Asp	His	Ala	Glu	Gln	Val	Gly	Gly	Trp	Ala	His	Ser	Phe	Arg	Gln		
145					150						155					
<210>	5															
<211>	468															
<212>	DNA															
<213>	Oryza sativa L.cvs Nipponbare															
<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					15		
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					30		
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					45		
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	
		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	
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	tct	gca	aag	gct	caa	gac	cac	gca	432

23 24

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  
 <212> PRT  
 <213> Oryza sativa 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

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

ggccgcccgtc cgcgccaac ccaccacggc tgcaccttct ctgtccccgt caccgcctgc 60  
 ctaccacttc tccccttcgc ccgtggcacc tccagcccgc ccccacgtcg cccctcctcc 120  
 gccgtcggct ctccaccct tcccttcccc tcccctcatc attccccttt tgaacgtaaa 180  
 aatgagatta caatactagt tgtctcctag tattttatat agtaaattcg tcatgcaata 240  
 aatttggact tttcaaaatg ttgtaaata tagcattat aaaaattaat acaaatgtat 300  
 ggatagttag aaaatattac taaaatata gtaggatga tatagagggt gtaatataga 360  
 tgatctattg gagtgaagaa gaatatagag tgggaatctt ttttagatga ccacctaaat 420  
 aaggatatag atgatcaaat aaggatgctc taagcctcta actagtgtat ggctaacttt 480  
 tttgtactta aagcatatta gtgttcgtga cgtgtatgca atgggcacat ttttgctaaa 540  
 tgaaaacatc tctactatcg ccatctgact tcgaatatat gatagtgtca cctcaaatcc 600  
 aatggactca tatatcaatg acccagtta gacgacaac ttaacccttt gccaatgatc 660  
 acttctatca gtcaaatgt tgaatttaca agggcttggc ccatttgata ttttttaaag 720

25		26	
tgtttggccc	atftgatctg	gtgacaacgc	cacgtgatca
tatftttgcta	atgcctaacg	tccgtcgccc	cgctggagcc
ataatgtgca	cgccgacacg	tccacacgca	tggtgacgaa
tgaccatcc	cgacggtacc	gcacggcagc	gcccacggtg
cccgcgaaac	cggcgggaga	agacaccctc	tcctccctct
catccaccag	cctggggcag	gacgcaccgc	ccgcggcgca
tgtcgtcgtt	tccccctacc	acgccacctc	catgttccgg
gcgagtccca	cgccccacct	caactcctat	aaaaactgcg
ctcgttctct	ggtcaaatg	ttcgtaata	agcatcgatc
agccggggcg	ccgggggagc	tggggaag	
<210>	8		
<211>	1572		
<212>	DNA		
<213>	Oryza sativa L.cvs Nipponbare		
<220>			
<221>	promotor		
<222>	(1)...(1572)		
<400>	8		
ttttcggcaa	ttagaatttc	ggaatctatg	ctagatttgt
cttgacatgt	gaattctctg	tctgctttca	tttttctctg
gattactgcg	acactgatcc	atgctttggt	ctttaattag
cgacttcaaa	ataatatgct	tttttttgt	gatcgactga
atgtgagacg	aaaccactat	tcaattttgc	agctgacggt
tgctctactg	ctctgtttcc	tgcgttcccc	aaaaactgct
cgtaaatata	aacaaacggc	caatgataat	cgtttttaat
gactcacagt	atgtcaaca	ctgatgtcag	tacaccggtt
actgtcatga	aaaccacctg	ataggttaac	aatcagaacc
accatttctt	cagaaatctg	gaaatcttac	cgatatctat
cgatctcgtc	caggattgtt	cttgcgaact	aatggttgta
gcagtctcag	tccaagtttc	ctctttgatg	attcttcgaa
tcgcgcatth	agccgaggaa	acacgcttag	cagcaagact
gttgaagcga	tgaaaaaaaaa	tcacctgaa	ttcgatccag
cacgtacaag	tcgtcgtcga	acagacctgg	ttgttttaac
gggtcagaga	gaaagatcgt	acgaaacttg	tactgctaata
atgccaggac	gattcactgg	ggaaggaatc	acaccgtggg
taataccact	gatttaagta	gggtcatata	ttgatataata
ttgctagtgc	ctcttcggct	cttccagctg	ggagtgcgaa
aagcacgtcc	aagtaattaa	attagtacgt	agtagtaata
agttgtagct	gacagctagg	agtaagagat	gggcaagtag
agaggaagca	atatgggaga	acagtagtga	agcctcgaac
caaccacgta	gaaacgtgcg	ggtttacacg	gtggcgaccg
tgactggtcc	ccagccagct	cgccataaaa	cgcgcgacg
atctgcttga	gttggagcaa	cacaccaaga	aggccagaga
gaagggcaga	ttgtttgcgt	ggttggtaat	ttggccggcc
gagaagagaa	ag		

【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。

s A 植物の G U S 組織化学的検出の結果を示す写真である。

【図4】 Rpp16 - gusA および Rpp17 - gu

【図1】

```

RPP16-1  MV--QGTLEVLVYGAKGLENLDYLCN---MDPYAVLKCRSQEQKSSVASGKGS  49
RPP17-1  MAGSGVLEVHLVDAKGLTGNDLGEIGKIDPYVVVQYRSQERKSSVARDQCKN  53
RPP17-2  MAGSGVLEVHLVDAKGLTGNDL---GKIDPYVVVQYRSQERKSSVARDQCKN  50
CmPP16-1 M-GMGLEEVHLISGKGLQADL-N-KPIDPYAEINFKGOERMASKVAKNACPN  50
CmPP16-2 M-GMGLEEVHLISGKGLQADL-N-KPIDPYAEINFKGOERMASKVAKNACPN  50
RCNMV-MP 32 SCVSEAPLI  40                               237 VPNOGRESKVLKQKGGT

```

```

RPP16-1  PEWNETFMF----SVTHNATEDLTKLMDSDSCTDDDFVGEATI---SLEAAYT  95
RPP17-1  PSWNEVFKQINSTAAEGQHGLFELRLMDHDTFSRDDFVGEATINVIDLISLGM  106
RPP17-2  PSWNEVFKQINSTAAEGQHGLFELRLMDHDTFSRDDFVGEATINVIDLISLGM  103
CmPP16-1 PLWDEKFKFLAEYPGSGGDFHLEKVMDEHDAIDGDDYKGLVKIDVKNLAEQV  103
CmPP16-2 PLWNEKFKFLVEYPGSGGDFHLEKVMDEHDAIDGDDYKGLVKIDVKNLAEQV  103
RCNMV-MP GSKETKRPSPLEPSSGSSSGLSM  275                               134 U

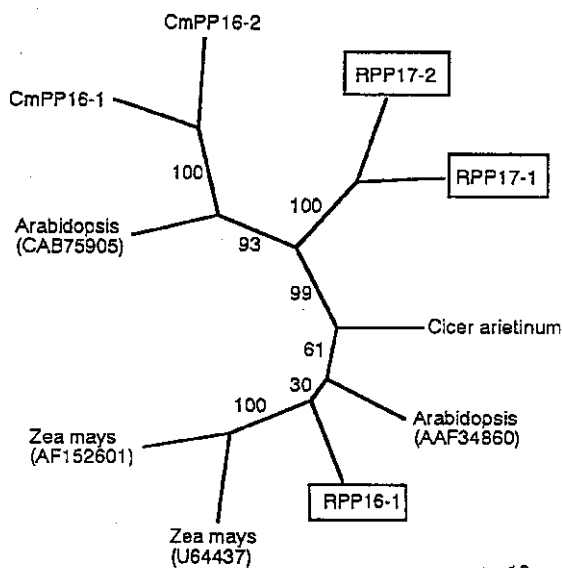
```

```

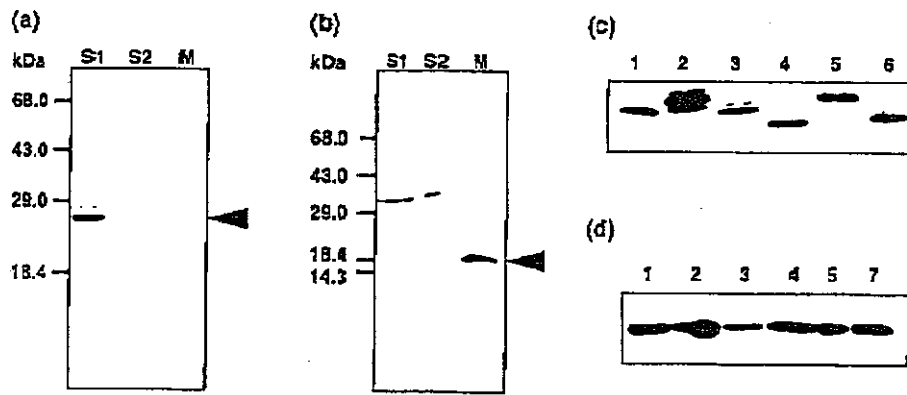
RPP16-1  E-G--SIP-PTVYNVVKEEYKGEIKVGLTFTPEDDRDRGLSEEDIQGNKQSS  144
RPP17-1  EHGHWEMSESKEHRVVLADKTYKGEIRVSLTFTASAKAQDHAEQVGGWAHSFRQ  159
RPP17-2  EHGHWEMSESKEHRVVLADKTYKGEIRVSLTFTASAKAQDHAEQVGGWAHSFRQ  156
CmPP16-1 RKCKSEMPFRMYHVLAKIHFYKGEIEVGVSTFKLOGGGCGGCYPHEN  150
CmPP16-2 RKQWSELPFRMYQVLAHKIYFKGEIEVGVVFFQROG  138
RCNMV-MP RITNIGLETKKSYARCH151174EEVGY179

```

【図2】

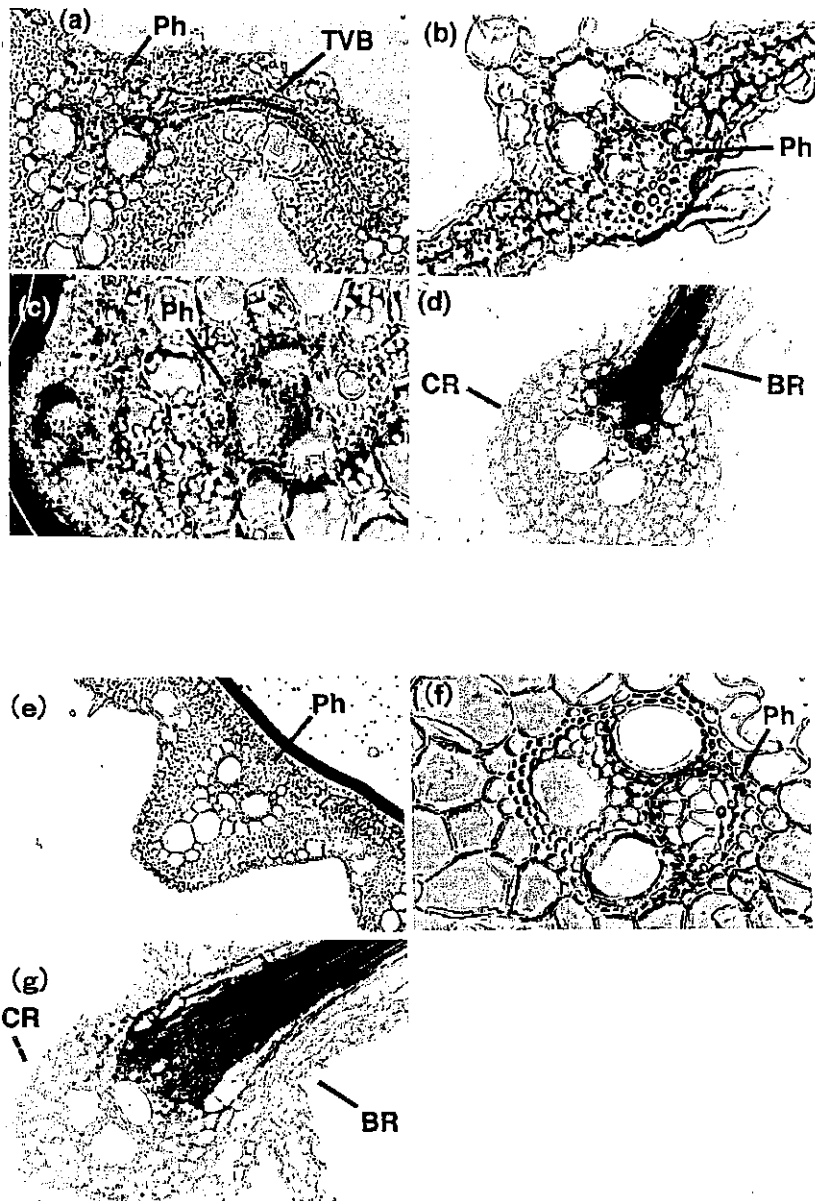


【 図 3 】





【図4】



フロントページの続き

(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

F ターム(参考) 2B030 AB03 CA15 CA17 CA19  
4B024 AA08 AA11 BA79 BA80 CA04  
CA07 CA09 DA01 DA05 DA06  
EA04 FA02 GA11 GA27 HA11  
HA13 HA14 HA20  
4B065 AA11X AA26X AA88X AA88Y  
AB01 AC14 BA02 BA24 CA24  
CA46 CA53  
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10  
BA41 CA31 EA05 EA50 FA71  
FA74