

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード [*] (参考)
C12N 15/09	ZNA	A01H 1/00	A 2B030
A01H 1/00		5/00	A 4B024
5/00		C12N 15/00	A 4B065
C12N 5/10		5/00	C

審査請求 有 請求項の数 9 O L (全14頁)

(21)出願番号 特願2002 - 121275(P 2002 - 121275)

(22)出願日 平成14年4月23日(2002.4.23)

特許法第30条第1項適用申請有り 2001年11月26日 発行の「第24回日本分子生物学会年会 プログラム・講演要旨集」に発表

(71)出願人 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

(71)出願人 396020800

科学技術振興事業団
埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(72)発明者 小松 節子

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

(74)代理人 100102978

弁理士 清水 初志 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】低温ストレスに応答するCRTintP遺伝子およびその利用

(57)【要約】

【課題】 カルレティキュリン(CRT)と相互作用するタンパク質をコードする遺伝子を単離・同定し、該遺伝子およびその利用方法を提供することを課題とする。より具体的には、CRTintP遺伝子、該遺伝子を有する形質転換植物体、および、該形質転換植物体の製造方法を提供することを課題とする。

【解決手段】 酵母ツーハイブリッド法を利用して、CRTと相互作用する遺伝子群を検出した。その結果、CRTと相互作用するタンパク質(CRTintPと命名)をコードする遺伝子が特異的に検出された。さらに、CRTintPをコードする完全長cDNAを単離し、該CRTintPをコードする遺伝子は、新規遺伝子であることを見出した。また、低温ストレス下のイネ葉身におけるCRT遺伝子及びCRTintP遺伝子の発現は、低温ストレス後に顕著に上昇することが明らかになった。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 下記 (a) ~ (d) のいずれかに記載の DNA。

(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 DNA。

(b) 配列番号： 1 に記載の塩基配列のコード領域を含む DNA。

(c) 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 DNA。

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

【請求項 2】 植物において低温ストレスにตอบสนองして発現する、請求項 1 に記載の DNA。

【請求項 3】 請求項 1 または 2 に記載の DNA を含むベクター。

【請求項 4】 請求項 1 または 2 に記載の DNA を発現可能に保持する形質転換植物細胞。

【請求項 5】 さらに、カルレティキュリンをコードする DNA で形質転換された、請求項 4 に記載の形質転換植物細胞。

【請求項 6】 請求項 4 または 5 に記載の形質転換植物細胞を含む形質転換植物体。

【請求項 7】 請求項 6 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 8】 請求項 6 または 7 に記載の形質転換植物体の繁殖材料。

【請求項 9】 請求項 6 に記載の形質転換植物体の製造方法であって、(a) 請求項 1 または 2 に記載の DNA、または (b) 請求項 1 または 2 に記載の DNA およびカルレティキュリンをコードする DNA を植物細胞に導入し、該植物細胞から植物体を再生させる工程を含む方法。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】本発明は、低温ストレスにตอบสนองする CRTintP 遺伝子およびその利用に関する。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】植物は通常の生育温度（植物種によって異なる）の範囲以外では、生育障害や生殖障害を起こし、種の保存にとって極めて不利な状況（強いストレスがかかっている状況）に置かれる。そのため、高温ストレスや低温ストレスに対して、植物は特定の遺伝子発現を誘導してストレスに対応する仕組みを有している（佐藤直樹，組織培養，19：357 1993；Thowashou M，Adv. Genet.，28：99 1990）。低温ストレスに対しては、（Koga-ban Y，Abe M，Kitagawa Y，Plant Cell Physiol.，32：901-905 1991）などの例に見られるように、低温ストレスがかかってから数日後に遺伝子発現が誘導されるなど、ストレス応答に時間がかかる例が多

い。

【 0 0 0 3 】細胞質カルシウムは、動物や植物において、多くの内在性シグナル、または、環境性シグナルのためのセカンドメッセンジャーとして認識されている。植物においては、細胞質カルシウムの上昇は、オーキシンやアブジジン酸のようなホルモン、低温ストレスや機械的ストレスのような非生物性の環境シグナル、共生生物や病原体の認識に關与する生物性のシグナルによって引き起こされる。

10 【 0 0 0 4 】カルシウム結合タンパク質であるカルレティキュリン (CRT) は、細胞接着、細胞内カルシウムのホメオスタシスの維持、タンパク質フォールディング、環境ストレス応答に關与する多機能調節因子として動物では働いている (Kwor MS, Park CS, Choi K, Ahnn J, Kim JI, Eom SH, Kaujman SJ, Song WK, Mol. Biol. Cell 11: 1433-14443 2000)。すでに、CRP55、Calregulin、HACBP、ERP60、CALBP および CaBP3 は全て CRT であると確認されている。また、イネの CRTI は、クローニングされており、イネカルススの再分化率の抑制及びイネの茎葉伸長制御に關与していることが知られている (Li Z, Komatsu S, Eur. J. Biochem., 267: 737-745 2002)。しかしながら、その作用の分子機構は不明な点が多い。

【 0 0 0 5 】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、その目的は、CRT と相互作用するタンパク質をコードする遺伝子を単離・同定し、該遺伝子およびその利用方法を提供することにある。より具体的には、CRTintP 遺伝子、該遺伝子を有する形質転換植物体、および、該形質転換植物体の製造方法を提供することを目的とする。

【 0 0 0 6 】

【課題を解決するための手段】CRT は他のタンパク質と相互作用して機能を発現することが知られているため (Corbett EF, Oikawa K, Francois P, Tessier OC, Kay C, Bergeron JJ, Thomas DY, Krause KH, Michalak M, J. Biol. Chem., 274: 6203-6211 1999)、酵母のツーハイブリッド法 (Fields, Song, Nature, 340: 245-246 1989) を用いて、CRT と相互作用するタンパク質の遺伝子の単離を試みた。具体的には、イネ培養細胞由来 cDNA ライブラリーを用いたツーハイブリッド法を行ない、2 回の実験群において対照と比較した。その結果、CRT と相互作用するタンパク質 (CRTintP と命名) をコードする遺伝子が特異的に検出された。さらに、CRTintP をコードする完全長 cDNA を単離し、該 CRTintP をコードする遺伝子は、新規遺伝子であることを見出した。また、低温ストレス下のイネ葉身における CRT 遺伝子及び CRTintP 遺伝子の発現を解析した結果、CRT 遺伝子及び CRTintP 遺伝子は、共に低温ストレス 15 分後に顕著に発現し、30 分で既にピークに達していることが明らかになっ

た。

【0007】即ち、本発明は、〔1〕下記(a)～(d)のいずれかに記載のDNA、(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DNA、(b)配列番号：1に記載の塩基配列のコード領域を含むDNA、(c)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DNA、(d)配列番号：1に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA、〔2〕植物において低温ストレスに反応して発現する、〔1〕に記載のDNA、〔3〕〔1〕または〔2〕に記載のDNAを含むベクター、〔4〕〔1〕または〔2〕に記載のDNAを発現可能に保持する形質転換植物細胞、〔5〕さらに、カルレティキュリンをコードするDNAで形質転換された、〔4〕に記載の形質転換植物細胞、〔6〕〔4〕または〔5〕に記載の形質転換植物細胞を含む形質転換植物体、〔7〕〔6〕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、〔8〕〔6〕または〔7〕に記載の形質転換植物体の繁殖材料、〔9〕〔6〕に記載の形質転換植物体の製造方法であって、(a)〔1〕または〔2〕に記載のDNA、または(b)〔1〕または〔2〕に記載のDNAおよびカルレティキュリンをコードするDNAを植物細胞に導入し、該植物細胞から植物体を再生させる工程を含む方法、を提供するものである。

【0008】

【発明の実施の形態】本発明は、CRTintPをコードするDNAを提供する。該DNAは、好ましくは植物において低温ストレスに反応して発現する性質を有する。

【0009】本発明のDNAが由来する植物としては、特に制限はなく、イネ、ダイズ、ソバ、野菜、根菜、果菜、果実類などが例示できる。

【0010】また、本発明においては、ある温度からその温度より低い温度に植物を移行させることで、低温ストレスを与えることができる。例えば、幼苗期(発芽後2週間)のイネの植物体あるいはセグメントを室温から5℃へ移行させる処理を経時的(例えば、2分～48時間)に行うことで、植物に低温ストレスを与えることができるが、この方法に限定されるものではない。

【0011】本発明のCRTintPをコードするDNAとしては、例えば配列番号：1に記載の塩基配列のコード領域を含むDNAや配列番号：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DNAが挙げられる。

【0012】また、本発明は、配列番号：2に記載のCRTintPと構造的に類似しており、CRT(カルレティキュリン)と相互作用するタンパク質をコードするDNAを包含する。このようなDNAは、好ましくは植物において低温ストレスに反応して発現する性質を有する。

【0013】あるDNAがCRTと相互作用するタンパク質を

コードするか否かは、当業者に周知の方法で検証することができる。例えば、酵母のツーハイブリッド法、免疫沈澱法、アフィニティークラム法、プロテインチップ法、センサー法などが挙げられる。

【0014】また、あるDNAが低温ストレスに反応して発現するタンパク質をコードするか否かは、例えば、被検DNAが導入された植物において、低温ストレス依存に該タンパク質または該タンパク質をコードするmRNAが誘導されるか否かで検証することができる。

10 【0015】このようなDNAには、例えば、配列番号：2に記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および/または挿入されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする変異体、誘導体、アリル、バリエーションおよびホモログが含まれる。

【0016】アミノ酸配列が改変されたタンパク質をコードするDNAを調製するための当業者によく知られた方法としては、例えば、site-directed mutagenesis法(Kramer W, Fritz H-J, Methods Enzymol 154: 350 1987)が挙げられる。また、自然界においても、塩基配列の変異によりコードするタンパク質のアミノ酸配列が変異することは起こり得る。このように、CRTintPのアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、および/または挿入されたアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNAであっても、天然型のCRTintP(配列番号：2)と同等の機能を有するタンパク質をコードする限りは、本発明のDNAに含まれる。また、たとえ塩基配列が変異していても、その変異がタンパク質中のアミノ酸の変異を伴わないこと(縮重変異)があるが、このような縮重変異体も本発明のDNAに

30 含まれる。
【0017】配列番号：2に記載のCRTintPと機能的に同等なタンパク質をコードするDNA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 EM, J. Mol. Biol., 98: 503 1975)やポリメラーゼ連鎖反応(PCR)技術(Saiki RK, et al., Science, 230: 1350 1985; Saiki R K, et al., Science, 239: 487 1988)を利用する方法が挙げられる。すなわち、CRTintP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、
40 またCRTintP遺伝子(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、イネや他の植物からCRTintP遺伝子と高い相同性を有するDNAを単離することは、当業者にとって通常行い得ることである。このように、ハイブリダイゼーション技術やPCR技術によって単離し得るCRTintPと同等の機能を有するタンパク質をコードするDNAもまた、本発明のDNAに含まれる。

【0018】このようなDNAを単離するためには、好ましくはストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーション反応を行う。本発明においてストリンジェントなハ

イブリダイゼーション条件とは、6M 尿素、0.4% SDS、0.5×SSCの条件またはこれと同等のストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件を指す。よりストリンジェンシーの高い条件、例えば、6M 尿素、0.4% SDS、0.1×SSCの条件下では、より相同性の高いDNAを単離できることが期待される。高い相同性とは、アミノ酸配列全体で少なくとも50%以上、好ましくは70%以上、さらに好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の配列の同一性を指す。

【0019】アミノ酸配列や塩基配列の同一性は、カーリンおよびアルチュールによるアルゴリズムBLAST (Karlin S, Altschul SF, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 2264-2268 1990 ; Karlin S, Altschul SF, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 5873-5877 1993)を用いて決定できる。BLASTのアルゴリズムに基づいたBLASTNやBLASTXと呼ばれるプログラムが開発されている (Altschul SF, et al., J. Mol. Biol., 215: 403 1990)。BLASTNを用いて塩基配列を解析する場合は、パラメーターは、例えばscore=100、wordlength=12とする。また、BLASTXを用いてアミノ酸配列を解析する場合は、パラメーターは、例えばscore=50、wordlength=3とする。BLASTとGapped BLASTプログラムを用いる場合は、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。

【0020】本発明のCRTintPをコードするDNAには、ゲノムDNA、cDNAおよび化学合成DNAが含まれる。ゲノムDNAおよびcDNAの調製は、当業者にとって常套手段により行うことが可能である。ゲノムDNAは、例えば、CRTintP遺伝子を有するイネ品種からゲノムDNAを抽出し、ゲノミックライブラリー(ベクターとしては、例えば、プラスミド、ファージ、コスミド、BAC、PACなどが利用できる)を作製し、これを展開して、本発明のDNA(例えば、配列番号: 1)を基に調製したプローブを用いてコロニーハイブリダイゼーションあるいはブランクハイブリダイゼーションを行うことで調製できる。また、本発明のDNA(例えば、配列番号: 1)に特異的なプライマーを作製し、これを利用したPCRを行って調製することも可能である。cDNAは、例えば、CRTintP遺伝子を有するイネ品種から抽出したmRNAを基にcDNAを合成し、これを ZAPなどのベクターに挿入してcDNAライブラリーを作製し、これを展開して、上記と同様にコロニーハイブリダイゼーションあるいはブランクハイブリダイゼーションを行うことで、またPCRを行うことにより調製できる。

【0021】また、本発明において、CRTintPをコードするDNAは、CRTと相互作用するタンパク質をコードするDNAとして同定された。一方、CRTをコードするDNAを用いることで、植物に矮化形質を付与できること、さらに、植物に低温ストレス応答性の形質を付与できること

が知られている。よって、本発明のDNAは、このような有用なDNAを単離するためのツールになりうる。

【0022】また、CRTintPは、イネカサの再分化率の抑制及びイネの茎葉伸長制御に關与しているCRTと相互作用する。よって、CRTintPもまた、植物細胞の再分化率や植物の茎葉伸長を制御している可能性がある。本発明のDNAは、再分化率が改変された植物細胞や茎葉伸長が改変された形質転換植物体を作出することにも利用できると思われる。

10 【0023】本発明において、CRTintPをコードするDNAとCRTをコードするDNAはともに、低温ストレスに应答することが見出された。よって、本発明のDNAとCRTをコードするDNAはともに、低温に耐性を示す形質転換植物体を作出することに利用できる。

【0024】本発明において、形質転換植物体を作製するには、本発明のDNA、または、本発明のDNAおよびCRTをコードするDNAが挿入されたベクター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。

20 【0025】本発明において、植物細胞が由来する植物としては、特に制限はない。また、植物細胞の形質転換に用いられるベクターは、該細胞内で挿入遺伝子を発現させることが可能なものであれば特に制限はない。例えば、植物細胞内で恒常的に遺伝子を発現させるためのプロモーター(例えば、カリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーター)を有するベクターや、外的な刺激により誘導的に活性化されるプロモーターを有するベクターを用いることもできる。ここで言う「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。

30 【0026】植物細胞へのベクターの導入には、ポリエチレングリコール法、電気穿孔法(エレクトロポレーション法)、アグロバクテリウムを介する方法、パーティクルガン法など、当業者に公知の種々の方法を用いることができる。アグロバクテリウムを介する方法においては、例えば、超迅速単子葉形質転換性(特許第3141084号)を用いることが可能である。また、パーティクルガン法においては、例えば、バイオラッド社のものを用いることが可能である。形質転換植物細胞からの植物体の再生は、植物細胞の種類に応じて当業者に公知の方法で行うことが可能である(Toki S, et al., Plant Physiol., 100: 1503 1995)。

40 【0027】例えば、イネにおいて形質転換植物体を作出する手法については、ポリエチレングリコールを用いてプロトプラストへ遺伝子導入し、植物体(インド型イネ品種が適している)を再生させる方法(Datta SK: In Gene Transfer To Plants (Potrykus I and Spangenberg, Eds) pp.66-74 1995)、電気パルスによりプロトプラストへ遺伝子導入し、植物体(日本型イネ品種が適している)を再生させる方法(Toki S, et al., Plan

t Physiol., 100: 1503 1992)、パーティクルガン法により細胞へ遺伝子を直接導入し、植物体を再生させる方法 (Christou P, et al., Biotechnology 9: 957 1991)、およびアグロバクテリウムを介して遺伝子を細胞へ導入し、植物体を再生させる方法 (Hiei Y, et al., Plant J., 6: 271 1994)など、いくつかの技術が既に確立し、本願発明の技術分野において広く用いられている。本発明においては、これらの方法を好適に用いることができる。なお、パーティクルガン法により遺伝子を導入する細胞は、例えば、タバコBY-2細胞が挙げられる。タバコBY-2細胞は、例えば細胞バンク等から容易に得ることができる。

【 0 0 2 8 】ゲノム内に本発明のDNAが導入された形質転換植物体がいっただん得られれば、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できる。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、プロトプラストなど) 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、または、本発明のDNAおよびCRTをコードする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、ならびに該植物体、その子孫、およびクローンの繁殖材料が含まれる。

【 0 0 2 9 】このようにして作出された植物体は、野生型植物体と比較して、低温に耐性となっていると考えられる。よって、本発明の手法は、寒冷地などで農作物 (好ましくは有用農作物) を収穫する上で非常に有益である。また、本発明の形質転換植物体を、本発明のDNAがコードするタンパク質の製造に利用することも可能で

ある。製造されたタンパク質は、植物の矮化や低温ストレス応答などに関与するCRTおよびCRTをコードするDNAを単離するために有用である。

【 0 0 3 0 】

【実施例】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] CRTはイネカルスの再分化率の抑制及びイネの茎葉伸長制御に関与しているが、その作用の分子機構は不明な点が多い。その分子機構解明を目的に、酵母ツーハイブリッド法 (Fields, Song, Nature, 340: 245-246 1989) を利用して、CRTと相互作用する遺伝子群を検出した (表 1)。具体的には、イネ培養細胞由来cDNAライブラリーを用いたツーハイブリッド法を行ない、2回の実験群において対照と比較した。その結果、CRTと結合するクローンの数は、実験 1 においては7個、実験 2 においては15個が得られた。これら22個について、遺伝子解析を行ったところ、全て同じRNA由来であることが明らかとなった。本発明者らは、CRTと相互作用するタンパク質をCRTintPと命名した。一方、対照として培養細胞で発現していない遺伝子であるルビスコアクチベース (RuBisCO activase) を用いてツーハイブリッドを行ったところ、CTRintPは結合しなかった。CRTと相互作用する残るクローンは、実験 1 においては無く、実験 2 においては6クローン得られた。残る6クローンはCTRintPをコードせず、それぞれ違うRNA由来と考えられるが機能未知であった。

【 0 0 3 1 】

【表 1】

	対照 (ルビスコアクチベース)	CRT #1	CRT #2
CRTintP	0	7	15
その他	23	0	6
総計(個)	23	7	21

【 0 0 3 2 】 [実施例 2] 検出されたCRTに結合する遺伝子について、2回の実験群において対照と比較して、多く重複して検出された遺伝子の部分配列を元に、cDNAライブラリー (イネ葉身由来のものを使用) をスクリーニングした結果、CRTintPの完全長cDNAを単離した。その結果、CRTintP遺伝子は3401塩基で966アミノ酸をコードする遺伝子 (配列番号: 1) であり、DDBJ等のデータベ

ースには登録されておらず新規遺伝子であった。また、該遺伝子は、分子量約11万ダルトンのタンパク質をコードすることが判明した。

【 0 0 3 3 】

[実施例 3] CRTintP遺伝子のゲノム中に存在する数を確認するために、[⁻³²P]dCTPで標識したCRTintP cDNA由来の2300塩基対のDNAプローブを用いて、42 の条件下でハイブリダイゼーションを行い、サザン

プロットティングを行ったところ、CRTintP遺伝子はイネゲノム中に1コピー存在することが明らかとなった(図1)。

【0034】[実施例4]パーティクルガン法により、GFP融合CRTintPをタバコBY-2細胞に導入し、GFP融合CRTintPの細胞内局在を検討した。具体的には、5 μ gのDNA(GFP融合CRTintPをカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターで発現させる構築)を3mgの金粒子にまぶして、1100psiの気圧で打ち込んだ結果、対照の細胞では蛍光を発しないが、GFP-CRTintP遺伝子を導入した細胞においては、緑色の蛍光を発していた。図2に示すように、発光部分の細胞における局在を観察すると、核内において発光していた。以上の結果から、CRTintPは核内に存在することが明らかとなった。

【0035】[実施例5]CRTintPの組織特異性を検討するために、葉鞘、葉、根の組織からRNAを抽出し以下の条件で、ノザンプロットティングを行った。具体的には、RNAを1.2%の変性アガロースゲルで電気泳動を行い、CRTintPのcDNA由来の2300塩基対のDNAプローブを用いた。DNAプローブは³²Pで標識を行い、ULTRA hybを用いて42度で一晩ハイブリダイゼーションを行った。その結果、CRTintP遺伝子は葉身でもっとも顕著に発現していることが明らかとなった(図3)。

【0036】[実施例6]CRT及びCRTintPの低温ストレスに対する応答性を検討するために、イネ(日本晴)を低温処理(25から5に移行し、その時の湿度は75%)してから毎時間ごとの試料(20個体からアトランダムに3回の繰り返しで試料を取る)を用いてノザンプロットティングを行った。その結果、CRTとCRTintP共に、低温ストレス条件下、15分から顕著に遺伝子発現が増加し、30分でピークに達し、その後徐々に減少していた(図4)。

10 【0037】以上の結果から、CRT遺伝子と共にCRTintP遺伝子も低温ストレスに対して約30分後には顕著に遺伝子発現が誘導することが明らかとなった。このことから、これらの遺伝子を植物体に導入して過剰発現させることにより、形質転換体に低温耐性を付与できることが想定される。

【0038】

【発明の効果】本発明者らによって、CRTintPをコードするDNAが提供された。該DNAは、CRTをコードするDNAの単離に使用できるだけでなく、低温ストレス作用の育種

20 素材を開発することができる。

【0039】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> National Institute of Agrobiological Sciences

Japan Science and Technology Corporation

<120> The cold stress induced CRTintP gene and use thereof

<130> MOA-X0201

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 3401

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<220>

<221> CDS

<222> (296)..(3196)

<400> 1

gagttctcac ttctcacaca actcgcaacc ctaataaagc gcaaaaaagg aaaaagaaaa 60
atgccacgga aaaaatcctc gctgcccccc atcgggcagg agcaaccgcc gcatcggccc 120
ccgatccggt cgccgcccgc tctcggccgg ttcatccgcc gcttgccaac ccctccgctc 180
ccagcaacc tagtccccca ccccaacgcc gccgccagct cagctcgctt cgcgcggggc 240
cgagccgact ctctacttgt ggcctcggcg gctcgggccc tctccggatt ccacg atg 298

Met

1

tct gaa gat gcg tct gtc ggg gcc agc agt tca aca gta aaa gct ggc 346

11											12												
Ser	Glu	Asp	Ala	Ser	Val	Gly	Ala	Ser	Ser	Ser	Thr	Val	Lys	Ala	Gly								
					5						10						15						
gat	gat	cca	gag	gct	acc	att	gag	atc	aac	atc	aaa	acc	ctg	gat	tca	394							
Asp	Asp	Pro	Glu	Ala	Thr	Ile	Glu	Ile	Asn	Ile	Lys	Thr	Leu	Asp	Ser								
					20						25						30						
caa	gtt	cat	aag	ctc	cgt	gtt	aag	aag	aat	gta	cct	gtt	ctg	gtc	ctt	442							
Gln	Val	His	Lys	Leu	Arg	Val	Lys	Lys	Asn	Val	Pro	Val	Leu	Val	Leu								
					35						40						45						
aaa	gag	aag	ata	gta	gag	gca	acc	ggg	gtt	cct	gtg	gac	caa	cag	cgg	490							
Lys	Glu	Lys	Ile	Val	Glu	Ala	Thr	Gly	Val	Pro	Val	Asp	Gln	Gln	Arg								
					50						55						60						65
ttg	att	ttt	aga	gga	aga	gtc	tta	aag	gac	gat	cac	ctg	cta	tca	gaa	538							
Leu	Ile	Phe	Arg	Gly	Arg	Val	Leu	Lys	Asp	Asp	His	Leu	Leu	Ser	Glu								
					70						75						80						
tat	cat	ttg	gaa	gat	ggg	tac	aca	ttg	cat	ttg	gtt	gct	cgg	cgt	gca	586							
Tyr	His	Leu	Glu	Asp	Gly	Tyr	Thr	Leu	His	Leu	Val	Ala	Arg	Arg	Ala								
					85						90						95						
gct	gct	gaa	ggc	caa	cat	tct	tct	ggt	act	tct	gat	gaa	aac	acc	cat	634							
Ala	Ala	Glu	Gly	Gln	His	Ser	Ser	Gly	Thr	Ser	Asp	Glu	Asn	Thr	His								
					100						105						110						
gct	aat	gtt	aat	gtt	gct	gga	aat	gga	ctg	tta	gga	gat	atc	tcc	agg	682							
Ala	Asn	Val	Asn	Val	Ala	Gly	Asn	Gly	Leu	Leu	Gly	Asp	Ile	Ser	Arg								
					115						120						125						
agt	gtt	cgg	gat	atc	ctt	ggc	tcc	cta	ggt	ctt	gcg	acg	cct	ggt	ggc	730							
Ser	Val	Arg	Asp	Ile	Leu	Gly	Ser	Leu	Gly	Leu	Ala	Thr	Pro	Gly	Gly								
					130						135						140						145
atg	aca	aac	act	aca	ttt	tcg	gtg	cct	tta	acc	act	gca	cca	aaa	ggg	778							
Met	Thr	Asn	Thr	Thr	Phe	Ser	Val	Pro	Leu	Thr	Thr	Ala	Pro	Lys	Gly								
					150						155						160						
gcc	aat	aat	gtc	aat	gga	aga	act	caa	cca	ggg	aat	cat	gca	caa	cca	826							
Ala	Asn	Asn	Val	Asn	Gly	Arg	Thr	Gln	Pro	Gly	Asn	His	Ala	Gln	Pro								
					165						170						175						
ggg	ttt	tca	att	ctg	aat	cat	caa	atc	caa	gta	tca	caa	cta	caa	cca	874							
Gly	Phe	Ser	Ile	Leu	Asn	His	Gln	Ile	Gln	Val	Ser	Gln	Leu	Gln	Pro								
					180						185						190						
gca	ggc	tct	att	cct	cgc	aac	atg	gtt	att	cct	gat	tct	ctc	aca	act	922							
Ala	Gly	Ser	Ile	Pro	Arg	Asn	Met	Val	Ile	Pro	Asp	Ser	Leu	Thr	Thr								
					195						200						205						
ctt	ttg	gag	tat	atc	aac	cgc	atg	gat	caa	gta	cta	cag	aat	aac	ggc	970							
Leu	Leu	Glu	Tyr	Ile	Asn	Arg	Met	Asp	Gln	Val	Leu	Gln	Asn	Asn	Gly								
					210						215						220						225
aca	cca	tct	gtt	gat	aca	aat	acc	cag	cag	cca	cca	aga	tcg	gat	gat	1018							
Thr	Pro	Ser	Val	Asp	Thr	Asn	Thr	Gln	Gln	Pro	Pro	Arg	Ser	Asp	Asp								
					230						235						240						
gct	tat	cta	aat	caa	aga	ttt	cca	agt	cct	gag	gtt	ctg	gtg	tca	gtc	1066							
Ala	Tyr	Leu	Asn	Gln	Arg	Phe	Pro	Ser	Pro	Glu	Val	Leu	Val	Ser	Val								
					245						250						255						
att	gaa	aga	gcc	caa	caa	ctt	ctt	ggt	ggc	agt	gct	gct	tct	gct	ctt	1114							

13	14
Ile Glu Arg Ala Gln Gln Leu Leu Gly Gly Ser Ala Ala Ser Ala Leu	
260	270
tca cat ctc gca caa cca atc cag aga gat tct ggc acc agt gat gca	1162
Ser His Leu Ala Gln Pro Ile Gln Arg Asp Ser Gly Thr Ser Asp Ala	
275	285
tct ata cgt agc cag atc cag aat gaa tca gct cag ctg gga gta gca	1210
Ser Ile Arg Ser Gln Ile Gln Asn Glu Ser Ala Gln Leu Gly Val Ala	
290	300
atg cag cat ttg ggt gca atg ttt ttg gag ctt ggt cga aca atg atg	1258
Met Gln His Leu Gly Ala Met Phe Leu Glu Leu Gly Arg Thr Met Met	
310	315
atg ctt cgg atg ggg cca tcc cct gct gat gct ttt gtc aat gct gga	1306
Met Leu Arg Met Gly Pro Ser Pro Ala Asp Ala Phe Val Asn Ala Gly	
325	330
tct tct gtt tat ata aac tct gca gga ccg aat cca atc atg gtt cag	1354
Ser Ser Val Tyr Ile Asn Ser Ala Gly Pro Asn Pro Ile Met Val Gln	
340	345
cca tct ttt caa aat act cct cct ttt gga gtt tcg agc ata cca gtc	1402
Pro Ser Phe Gln Asn Thr Pro Pro Phe Gly Val Ser Ser Ile Pro Val	
355	360
ctc ggt gga att tct ggt gcc ttt ggt att gtt gat cct tct cgt aca	1450
Leu Gly Gly Ile Ser Gly Ala Phe Gly Ile Val Asp Pro Ser Arg Thr	
370	375
tct gct gtc aat acc cat ggt act tct aca aca agt ggg tca tct gct	1498
Ser Ala Val Asn Thr His Gly Thr Ser Thr Thr Ser Gly Ser Ser Ala	
390	395
ggg atg acc act gct tct gca ggc gct gtc aat gaa ggt cgt caa aat	1546
Gly Met Thr Thr Ala Ser Ala Gly Ala Val Asn Glu Gly Arg Gln Asn	
405	410
gtg gaa aga act caa gga ggt aac cca tct gct acc tca atg cat gga	1594
Val Glu Arg Thr Gln Gly Gly Asn Pro Ser Ala Thr Ser Met His Gly	
420	425
ttg cca gca agg aca gtt att gcg gct att cct gca cgg tcc acg gct	1642
Leu Pro Ala Arg Thr Val Ile Ala Ala Ile Pro Ala Arg Ser Thr Ala	
435	440
gag gct cca aac cat gtc ctg agt gtt atc ctg cct gtt caa gtg agg	1690
Glu Ala Pro Asn His Val Leu Ser Val Ile Leu Pro Val Gln Val Arg	
450	455
agt caa gta gca atg cct aat caa tca aca gtt tct caa ggt tct cag	1738
Ser Gln Val Ala Met Pro Asn Gln Ser Thr Val Ser Gln Gly Ser Gln	
470	475
act gca gtg ggc ggt gga tct caa cca caa gcc tct gta ggt ggt gtt	1786
Thr Ala Val Gly Gly Gly Ser Gln Pro Gln Ala Ser Val Gly Gly Val	
485	490
gct agc att cct tct ata gtg gca cag gta act gca caa gta gcc aat	1834
Ala Ser Ile Pro Ser Ile Val Ala Gln Val Thr Ala Gln Val Ala Asn	
500	505
gca ttg agt gca aat caa caa ggc cag gtt tca tca tct gcg cag aac	1882
Ala Leu Ser Ala Asn Gln Gln Gly Gln Val Ser Ser Ser Ala Gln Asn	
515	520
	525

17	18		
aat ctg ttg tcc aat gta gca gag caa aca ggc atg ggt tcc gca ggt	2698		
Asn Leu Leu Ser Asn Val Ala Glu Gln Thr Gly Met Gly Ser Ala Gly			
790	800		
gat ttg aga aac atg gtg gaa gag tgt gca cag agc cct gca ata atg	2746		
Asp Leu Arg Asn Met Val Glu Glu Cys Ala Gln Ser Pro Ala Ile Met			
805	815		
gat act atg agt aat tta gtc caa aat gtg gat ggg tca gga aga ggt	2794		
Asp Thr Met Ser Asn Leu Val Gln Asn Val Asp Gly Ser Gly Arg Gly			
820	830		
caa ggt ggc att gac ttg tct aga atg atg cag caa atg atg cct gtt	2842		
Gln Gly Gly Ile Asp Leu Ser Arg Met Met Gln Gln Met Met Pro Val			
835	845		
gta tcc caa gtt ctt ggt gga gct ggg gct cgt cct gct ggt aca aat	2890		
Val Ser Gln Val Leu Gly Gly Ala Gly Ala Arg Pro Ala Gly Thr Asn			
850	865		
agt gga caa tcc aga ttg cag cct cgg cgc agt gac atg aga gtg gat	2938		
Ser Gly Gln Ser Arg Leu Gln Pro Arg Arg Ser Asp Met Arg Val Asp			
870	880		
gat gct tca gat tat gga aat tct cag att gat cta cac caa gct cgt	2986		
Asp Ala Ser Asp Tyr Gly Asn Ser Gln Ile Asp Leu His Gln Ala Arg			
885	895		
gaa cac att gag caa cat gac tcc ccc agg gat atc ttc ggt gcg gtc	3034		
Glu His Ile Glu Gln His Asp Ser Pro Arg Asp Ile Phe Gly Ala Val			
900	910		
ctc gaa act gct gca cag gct tat ggt gaa gat gag agt att gag gac	3082		
Leu Glu Thr Ala Ala Gln Ala Tyr Gly Glu Asp Glu Ser Ile Glu Asp			
915	925		
atg ctt gaa gag ctt gtc agt gac cca gaa ctt aca gat gac tac ctg	3130		
Met Leu Glu Glu Leu Val Ser Asp Pro Glu Leu Thr Asp Asp Tyr Leu			
930	945		
aaa ctt ctg ctc caa caa gtt cgc cag agg ata cag tcg gca tct caa	3178		
Lys Leu Leu Leu Gln Gln Val Arg Gln Arg Ile Gln Ser Ala Ser Gln			
950	960		
tcc ggg aac cag tct tga gtttatatt tataagttga aaatggacag	3226		
Ser Gly Asn Gln Ser			
965			
aaccagtggt ttggtttggt ggtcatgatt aggcgcctcc gtggatgtac atgtgccgtg	3286		
ttctctaatt ttggcctcag agatgatgtt tacaccaccc actgcacttg cttaaagt	3346		
tttacagatt ttgttagtgg tacatagcta tcatcaagag ctttagattt cgtgg	3401		
<210> 2			
<211> 966			
<212> PRT			
<213> Oryza sativa			
<400> 2			
Met Ser Glu Asp Ala Ser Val Gly Ala Ser Ser Ser Thr Val Lys Ala			
1	5	10	15
Gly Asp Asp Pro Glu Ala Thr Ile Glu Ile Asn Ile Lys Thr Leu Asp			
20	25	30	
Ser Gln Val His Lys Leu Arg Val Lys Lys Asn Val Pro Val Leu Val			
35	40	45	

19
 Leu Lys Glu Lys Ile Val Glu Ala Thr Gly Val Pro Val Asp Gln Gln
 50 55 60
 Arg Leu Ile Phe Arg Gly Arg Val Leu Lys Asp Asp His Leu Leu Ser
 65 70 75 80
 Glu Tyr His Leu Glu Asp Gly Tyr Thr Leu His Leu Val Ala Arg Arg
 85 90 95
 Ala Ala Ala Glu Gly Gln His Ser Ser Gly Thr Ser Asp Glu Asn Thr
 100 105 110
 His Ala Asn Val Asn Val Ala Gly Asn Gly Leu Leu Gly Asp Ile Ser
 115 120 125
 Arg Ser Val Arg Asp Ile Leu Gly Ser Leu Gly Leu Ala Thr Pro Gly
 130 135 140
 Gly Met Thr Asn Thr Thr Phe Ser Val Pro Leu Thr Thr Ala Pro Lys
 145 150 155 160
 Gly Ala Asn Asn Val Asn Gly Arg Thr Gln Pro Gly Asn His Ala Gln
 165 170 175
 Pro Gly Phe Ser Ile Leu Asn His Gln Ile Gln Val Ser Gln Leu Gln
 180 185 190
 Pro Ala Gly Ser Ile Pro Arg Asn Met Val Ile Pro Asp Ser Leu Thr
 195 200 205

 Thr Leu Leu Glu Tyr Ile Asn Arg Met Asp Gln Val Leu Gln Asn Asn
 210 215 220
 Gly Thr Pro Ser Val Asp Thr Asn Thr Gln Gln Pro Pro Arg Ser Asp
 225 230 235 240
 Asp Ala Tyr Leu Asn Gln Arg Phe Pro Ser Pro Glu Val Leu Val Ser
 245 250 255
 Val Ile Glu Arg Ala Gln Gln Leu Leu Gly Gly Ser Ala Ala Ser Ala
 260 265 270
 Leu Ser His Leu Ala Gln Pro Ile Gln Arg Asp Ser Gly Thr Ser Asp
 275 280 285
 Ala Ser Ile Arg Ser Gln Ile Gln Asn Glu Ser Ala Gln Leu Gly Val
 290 295 300
 Ala Met Gln His Leu Gly Ala Met Phe Leu Glu Leu Gly Arg Thr Met
 305 310 315 320
 Met Met Leu Arg Met Gly Pro Ser Pro Ala Asp Ala Phe Val Asn Ala
 325 330 335
 Gly Ser Ser Val Tyr Ile Asn Ser Ala Gly Pro Asn Pro Ile Met Val
 340 345 350
 Gln Pro Ser Phe Gln Asn Thr Pro Pro Phe Gly Val Ser Ser Ile Pro
 355 360 365

 Val Leu Gly Gly Ile Ser Gly Ala Phe Gly Ile Val Asp Pro Ser Arg
 370 375 380
 Thr Ser Ala Val Asn Thr His Gly Thr Ser Thr Thr Ser Gly Ser Ser
 385 390 395 400
 Ala Gly Met Thr Thr Ala Ser Ala Gly Ala Val Asn Glu Gly Arg Gln
 405 410 415
 Asn Val Glu Arg Thr Gln Gly Gly Asn Pro Ser Ala Thr Ser Met His
 420 425 430

21

22

Gly Leu Pro Ala Arg Thr Val Ile Ala Ala Ile Pro Ala Arg Ser Thr
 435 440 445
 Ala Glu Ala Pro Asn His Val Leu Ser Val Ile Leu Pro Val Gln Val
 450 455 460
 Arg Ser Gln Val Ala Met Pro Asn Gln Ser Thr Val Ser Gln Gly Ser
 465 470 475 480
 Gln Thr Ala Val Gly Gly Gly Ser Gln Pro Gln Ala Ser Val Gly Gly
 485 490 495
 Val Ala Ser Ile Pro Ser Ile Val Ala Gln Val Thr Ala Gln Val Ala
 500 505 510
 Asn Ala Leu Ser Ala Asn Gln Gln Gly Gln Val Ser Ser Ser Ala Gln
 515 520 525
 Asn Thr Val Asp Gln Gly Ser Arg Ser Val Thr Thr Asn Gly Val Asp
 530 535 540
 Asn Val Asp Ser Leu Val Ser Ala Ser Thr Gln Leu Gln Asn Glu Leu
 545 550 555 560
 Ser Asp Ser Asn Asn Gly Arg Thr Ser Leu Asn Ala Gln Ser Leu Val
 565 570 575
 Ala Gly Ala Gly Ile Ser Pro Ser Asn Thr Ser Asp Pro Asn Leu Ala
 580 585 590
 Ser Glu Asp Ser Ser Thr Glu Asn Ala Pro Asn Ile Gly Ser Ile Gln
 595 600 605
 Gln His Pro Glu Met Glu Gly Ile His Ala Asp Asn Val Arg Lys Pro
 610 615 620
 Ser Glu Glu Ser Thr Thr Ala Asn Leu Val Gly Gln Ile Thr Thr Thr
 625 630 635 640
 Cys Thr Asp Asp Ile Ser Val Asn Arg Ser Ala Glu Asn Ser Ser Gln
 645 650 655
 Lys Asn Ile Pro Leu Asp Gly Val Ser Ala Gln Ser Ile Lys Pro Ser
 660 665 670

 Ala Ser Ser Arg Ser Glu Pro Val Gly Leu Gly Gly Gly Leu Gln Pro
 675 680 685
 Lys Arg Arg Ser Arg Thr Ala Lys Pro Pro Gly Ser Ser Ser Asp Thr
 690 695 700
 Gly Glu Val Val Asn Ser Ser Arg Ile Ser Asn Ser Gln Asn Ala Val
 705 710 715 720
 Ser Met Gly Gln Gln Val Leu Gln Ala Leu Ala Ser Gln Asn Thr Asn
 725 730 735
 Val Asn Arg Ser His Val Thr Asp Ser Pro Leu Pro Ser Thr Thr Ser
 740 745 750
 Gln Phe Ser Gly Gly Met Pro Pro Arg Arg Gln Gly Gly Glu Gly Gln
 755 760 765
 Val Asp Phe Gly Ser Met Ile Ser Ser Val Leu Asn Asn Pro Ala Phe
 770 775 780
 Gly Asn Leu Leu Ser Asn Val Ala Glu Gln Thr Gly Met Gly Ser Ala
 785 790 795 800
 Gly Asp Leu Arg Asn Met Val Glu Glu Cys Ala Gln Ser Pro Ala Ile
 805 810 815

23
 Met Asp Thr Met Ser Asn Leu Val Gln Asn Val Asp Gly Ser Gly Arg
 820 825 830

Gly Gln Gly Gly Ile Asp Leu Ser Arg Met Met Gln Gln Met Met Pro
 835 840 845

Val Val Ser Gln Val Leu Gly Gly Ala Gly Ala Arg Pro Ala Gly Thr
 850 855 860

Asn Ser Gly Gln Ser Arg Leu Gln Pro Arg Arg Ser Asp Met Arg Val
 865 870 875 880

Asp Asp Ala Ser Asp Tyr Gly Asn Ser Gln Ile Asp Leu His Gln Ala
 885 890 895

Arg Glu His Ile Glu Gln His Asp Ser Pro Arg Asp Ile Phe Gly Ala
 900 905 910

Val Leu Glu Thr Ala Ala Gln Ala Tyr Gly Glu Asp Glu Ser Ile Glu
 915 920 925

Asp Met Leu Glu Glu Leu Val Ser Asp Pro Glu Leu Thr Asp Asp Tyr
 930 935 940

Leu Lys Leu Leu Leu Gln Gln Val Arg Gln Arg Ile Gln Ser Ala Ser
 945 950 955 960

Gln Ser Gly Asn Gln Ser
 965

24

【図面の簡単な説明】

【図1】 CRTintP遺伝子のサザンブロッティングの結果を示す写真である。

【図2】 GFP融合CRTintPベクターの構造を示す図およびGFP融合CRTintPの細胞内局在を示す写真である。図におけるsGFP (S65T) はベクターの名前を示す。また、写

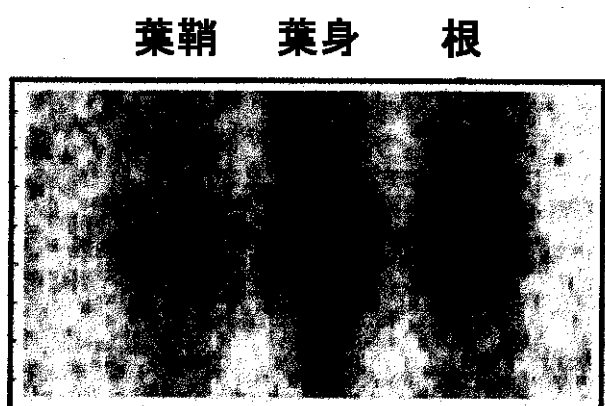
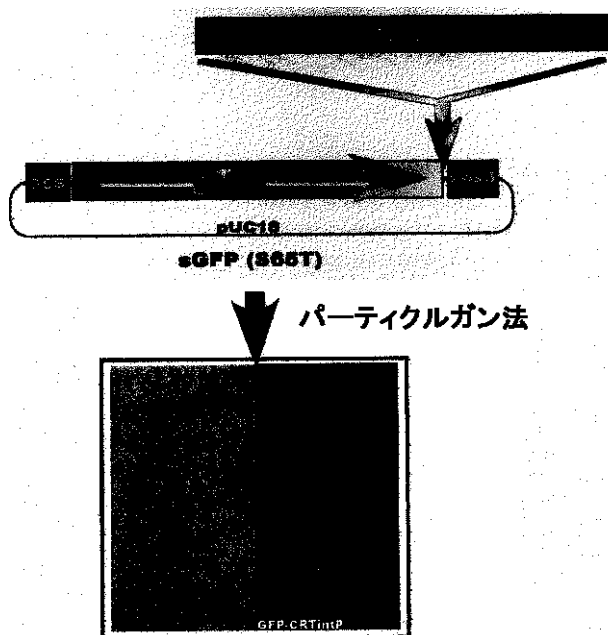
真中のCONは対照を意味する。

【図3】 CRTintP遺伝子の組織特異性を示す写真である。

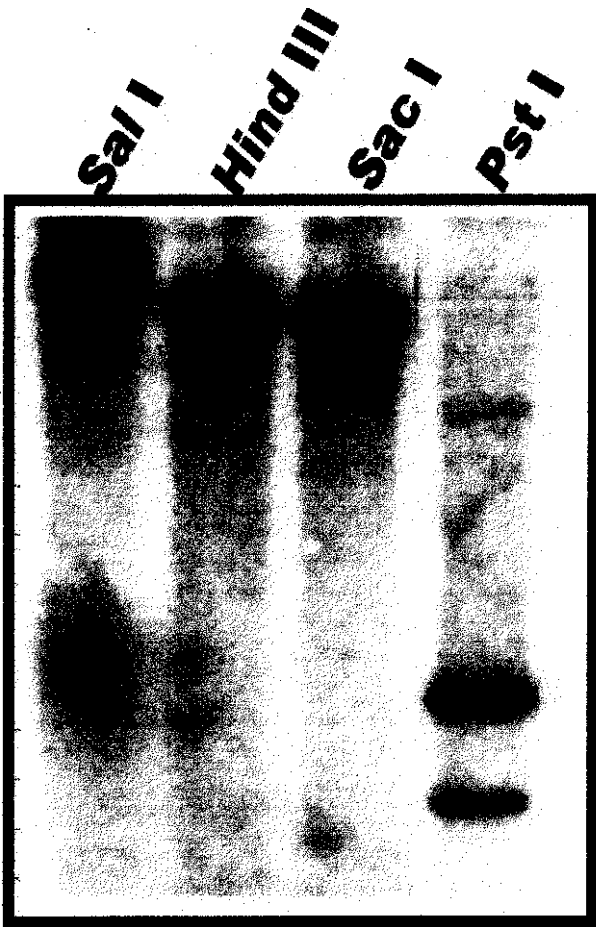
【図4】 CRT遺伝子及びCRTintP遺伝子の低温ストレスに対する応答性を示す写真である。

【図2】

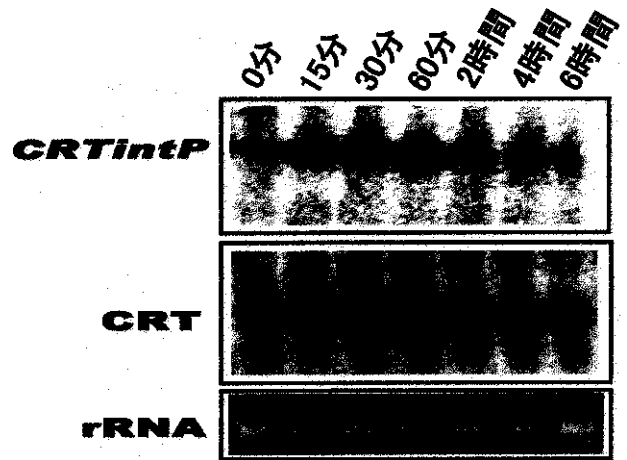
【図3】



【図1】



【図4】



フロントページの続き

(72)発明者 シャルマ アルン
 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

(72)発明者 橋本 純治
 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

(72)発明者 坂口 謙吾
 千葉県野田市山崎2641 東京理科大学内
 Fターム(参考) 2B030 AD04 CA15 CA17 CA19
 4B024 AA08 CA01 DA01 GA11 GA17
 HA20
 4B065 AA88X AA89Y AB01 AC03
 BA02 BD50 CA24 CA53