

(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 - 369688

(P 2 0 0 2 - 3 6 9 6 8 8 A)

(43)公開日 平成14年12月24日(2002.12.24)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード [*] (参考)
C12N 15/09	ZNA	C12Q 1/68	A 4B024
C12Q 1/68		G01N 33/10	4B063
G01N 33/10		C12N 15/00	ZNA A

審査請求 有 請求項の数 5 O L (全15頁)

(21)出願番号	特願2001 - 154200(P 2001 - 154200)	(71)出願人	501203344 独立行政法人 農業技術研究機構 茨城県つくば市観音台 3 - 1 - 1
(22)出願日	平成13年 5 月23日(2001.5.23)	(72)発明者	佐藤 宏之 茨城県つくば市竹園 3 - 15 106 - 406
		(72)発明者	鈴木 保宏 茨城県つくば市並木 2 - 122 - 204
		(72)発明者	井辺 時雄 茨城県つくば市松代 5 - 9 612 - 2
		(74)代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔 (外 1 名)

最終頁に続く

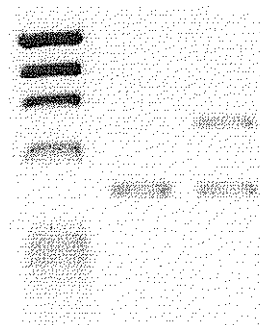
(54)【発明の名称】低アミロース米品種ミルクークイーン及び同系統品種に特異的なDNA断片、プライマー及び品種識別方法

(57)【要約】

【課題】 低アミロース米品種ミルクークイーン及び同系統品種に特異的なDNA断片、プライマー及び品種識別方法の提供。

【解決手段】 低アミロース米品種ミルクークイーンに存在し、うるち米他品種に存在しない特異的塩基を含むDNA断片。

マ-カ- K M



←741bp

←469bp

【特許請求の範囲】

【請求項1】 低アミロース米品種ミルキークイーンに存在し、うるち米他品種に存在しない特異的塩基を含むDNA断片。

【請求項2】 特異的塩基が、低アミロース米品種ミルキークイーンのアミロース合成酵素wx-1(t)遺伝子の第4エクソン中のコドン158及び/又は第5エクソン中のコドン191である請求項1記載のDNA断片。

【請求項3】 低アミロース米品種ミルキークイーンに存在し、うるち米他品種に存在しない特異的塩基を含むDNA断片をPCRにより特異的に増幅することが可能な、低アミロース米品種ミルキークイーン及び同系統品種とうるち米他品種を識別し得るプライマー。

【請求項4】 低アミロース米品種ミルキークイーンに存在し、うるち米他品種に存在しない特異的塩基を含むDNA断片の有無によって、低アミロース米品種ミルキークイーン及び同系統品種であるか否かを識別する方法。

【請求項5】 低アミロース米品種ミルキークイーン及び同系統品種とうるち米他品種を識別し得るプライマーを用い、識別対象の米のDNAに対してPCRを行い、得られる反応産物を分析することによって、低アミロース米品種ミルキークイーン及び同系統品種であるか否かを識別する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、低アミロース米品種ミルキークイーン及び同系統品種に特異的なDNA断片、プライマー及び品種識別方法に関する。

【0002】

【従来の技術】米は胚乳デンプンを構成するアミロースとアミロペクチンの含有割合によって「もち米」と「うるち米」に大別される。「もち米」ではデンプンがアミロペクチンのみで構成されているが、「うるち米」のデンプンは約20%のアミロースと約80%のアミロペクチンから構成されており、米の胚乳デンプンに占めるアミロース成分の割合、すなわちアミロース含量は、デンプン粒結合型のアミロース合成酵素をコードする構造遺伝子であるwx座の対立遺伝子によって決定される。wx座は、胚乳デンプンのもち性及びうるち性を支配し、うるち性遺伝子(Wx)がもち性遺伝子(wx)遺伝子に対して優性である。この米のアミロース含量は、炊飯米の食味の良否に影響を与える重要な形質である。

【0003】粘りの強い良食味米は、胚乳のアミロース含量を低減させることによって得ることができるので、近年、各種研究機関において、種々の低アミロース米品種が育成され、その作付面積は現在増加傾向にある。低アミロース米品種とは、通常のうるち米品種よりもアミロース含量が低い品種のことであり、具体的には、アミロース含量が0以上～15%未満の品種である。低アミロース品種としては、例えば、「コシヒカリ」に受精卵メ

チルニトロソウレア(MNU)処理を行い、アミロース含量に着目して選抜、育成された品種「ミルキークイーン」、低アミロース系統「74WX2N-1」に「レイメイ」を交配して育成された品種「スノーパール」、低アミロース由来系統「永系84271」に「キタアケ」を交配し、薬培養によって得られた植物体から選抜して育成された品種「彩」、低アミロース系統「探系2021」に「ニシホマレ」を交配して育成された「柔小町」、「研系2078」に「北陸127号」を交配して育成された品種「ソフト158」などがある。

【0004】これら低アミロース米品種を通常のうるち米品種と識別する方法としては、1)低アミロース米品種の種子胚乳が白濁することに基づいた肉眼による識別法と、2)胚乳のアミロース含量を測定する方法の2つがある。しかしながら、胚乳の白濁度及びアミロース含量は、産地、生産年、栽培法及び収穫物の乾燥方法等によって変動するため、前記した2方法で低アミロース米品種と通常のうるち米品種の仕分けを確実に行うのは困難である。

【0005】一方、遺伝子に着目した低アミロース米品種の識別方法が開発され、特定品種奥羽344号(現在の品種名はスノーパール)及び同品種と系譜が同じ品種をDNA配列に基づいて識別する方法が知られている(特開平12-201679号公報)。しかしながら、この方法は、奥羽344号を含む同系統における特異的な塩基配列に基づいた品種判別方法であるため、奥羽344号及び同系統品種と他品種とを識別することは可能であっても、奥羽344号以外の他系統の低アミロース米を識別することはできない。

【0006】現在、米の品種等の農産物検査において、各品種に対する確実な検査方法の確立が望まれているが、未だ、低アミロース米品種のうち、ミルキークイーン及び同系統品種を他の低アミロース米及び通常のうるち米品種と識別する方法は報告されていない。このため、ミルキークイーン及び同系統品種の識別方法を確立するためには、前記の遺伝子に着目した低アミロース米品種の識別方法と同様に、ミルキークイーンに特異的な遺伝子を特定し、それに基づいた識別方法を開発する必要がある。しかしながら、ミルキークイーンはコシヒカリにMNU処理して育成された品種であるため、両者が非常に類似した特性及び遺伝子を有しており、ミルキークイーンとコシヒカリとの遺伝上の差異を明確にしなければ、ミルキークイーン及び同系統品種のみを特異的かつ効率的に他品種と識別することが困難であるため、コシヒカリと同品種の差別化が求められている。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、低アミロース米品種ミルキークイーン及び同系統品種に特異的なDNA断片、プライマー及び品種識別方法を提供することを目的とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、前記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、低アミロース米品種ミルキークイーンが保有するDNA塩基配列に着目し、ミルキークイーン及び同系統品種に特異的なDNA配列を見出し、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は、低アミロース米品種ミルキークイーンに存在し、うるち米他品種に存在しない特異的塩基を含むDNA断片である。

【0009】また、本発明は、低アミロース米品種ミルキークイーンに存在し、うるち米他品種に存在しない特異的塩基を含むDNA断片をPCRにより特異的に増幅することが可能な、低アミロース米品種ミルキークイーン及び同系統品種とうるち米他品種を識別し得るプライマーである。

【0010】さらに、低アミロース米品種ミルキークイーン及び同系統品種とうるち米他品種を識別し得るプライマーを用い、識別対象の米のDNAに対してPCRを行い、得られる反応産物を分析することによって、低アミロース米品種ミルキークイーン及び同系統品種であるか否かを識別する方法である。

【0011】

【本発明の実施形態】本発明の低アミロース米品種ミルキークイーン及び同系統品種の識別方法についてさらに詳細に説明する。本発明において識別の対象となる低アミロース米品種は、ミルキークイーン及び同系統品種である。本発明における低アミロース米品種ミルキークイーンは、1998年5月に第6385号として品種登録されている、コシヒカリに受精卵メチルトロソウレア処理を行い、変異第2代でアミロース含量に着目した個体選抜を行って育成されたアミロース含量が通常のうるち米よりも低い品種である。具体的には、アミロース含量がコシヒカリの3/5程度の約10%である品種である。ここで、品種とは、重要な形質に係る特性の全部又は一部によって他の植物体の集合と区別することができ、かつ、その特性の全部を保持しつつ繁殖させることができる一の植物体の集合を意味する。

【0012】また、同系統品種とは、ミルキークイーンを交配親に用いて育成され得る品種のことを意味する。例えば、ミルキークイーンの食味をそのままに栽培特性を改良した新系統「越南d190号」、「上育436号」等がある。一方、うるち米他品種とは、上記のミルキークイーン及び同系統品種以外の品種を意味し、通常のコシヒカリ等のうるち米、並びに、ミルキークイーン及び同系統品種以外の低アミロース米を含む。

【0013】品種識別対象となる米のDNAの採取源としては特に限定されるものではなく、植物体のいずれの組織からも抽出できるが、例えば、穂、葉、根、種子、精米、玄米、さらに炊飯米等からも抽出することができる。遺伝子を調製する方法としては、当業者に利用可能なものであればいずれの方法（例えば、CTAB法）をも利

用できる。本発明の品種識別には、低アミロース米品種ミルキークイーンにおけるアミロース合成酵素をコードする遺伝子の塩基配列と、通常のうるち米のアミロース合成酵素をコードする遺伝子の塩基配列の相違を利用する。

【0014】コシヒカリ等の通常のうるち米品種は、wx座に優性のうるち遺伝子Wxを保有していることが知られている（文献：奥野(1995)「米の科学」竹生新治郎編朝倉書店P61-76）。一方、ミルキークイーンは、低アミロース性は、wx座の劣性遺伝子wx-1(t)によって支配されていることがわかった。この低アミロース米品種ミルキークイーンは、wx-1(t)の全塩基配列は、配列番号5に示すとおりである。wx-1(t)とWxのDNA配列を比較すると相違する特異的塩基はわずかに2塩基である。第1相違塩基は、Wxの第4エクソン中のコドン158部位のGがミルキークイーンではAであり、そのアミノ酸はアルギニンがヒスチジンに変化している。また、第2相違DNAは、Wxの第5エクソン中のコドン191部位のTがwx-1(t)ではCであり、そのアミノ酸はチロシンがヒスチジンに変化している。

【0015】本発明では、前記の低アミロース米品種ミルキークイーン及び同系統品種とうるち米他品種を識別し得るプライマーを用い、識別対象の米のDNAに対してPCRを行い、得られる反応産物を分析することによって、低アミロース米品種ミルキークイーン及び同系統品種であるか否かを識別することができる。

【0016】本発明のPCRに用いるプライマーは、低アミロース米品種ミルキークイーンに存在し、通常のうるち米品種に存在しない特異的塩基を含むDNA断片をPCRにより増幅することが可能な、低アミロース米品種ミルキークイーン及び同系統品種とうるち米他品種を識別し得るプライマーであれば任意に設計することができる。具体的には、前記DNA断片を増幅し得るプライマーを用いることができ、1)第1相違塩基のみを含むDNA配列を増幅し得るプライマー、2)第2相違塩基のみを含むDNA配列を増幅し得るプライマー、3)第1相違塩基及び第2相違塩基の両方を含むDNA配列を増幅し得るプライマー等が含まれる。これらプライマーは、通常の化学合成により得ることができ、その位置は適宜設定可能であるが、相違塩基を含むプライマーが好ましく、そのうち、変異遺伝子の検出感度を増すために、3'末端を識別目的の前記相違塩基となるように設計するのがさらに好ましい。また、そのサイズは20~30mer程度が適当である。なお、これらのプライマーのうち、1)のプライマーは、第1相違塩基部位と第2相違塩基部位が近接しているため、後述する電気泳動を行う際に支障をきたす可能性があり、また、2)のプライマーは、第2相違塩基部位付近のGC含量及びTm値の関係から、3'末端を識別目的にあわせて設計するのが難しいことから、3)のプライマーを利用するのが好適である。なお、3)の第1相違塩基及び第2

相違塩基の両方を含むDNA配列を増幅し得るプライマーとしては次のプライマーセットがある。

W1: 5' -GGTGAGGTTTTTCCATTGCTACAAGCA-3' (配列番号1)

W2: 5' -GCCCTGGTAGGAGATGTTGTGGAT-3' (配列番号2)

【0018】また、プライマーは、上記の低アミロース米品種ミルキークイーン wx-1(t) に特異的なDNAマーカを増幅し得るプライマーだけでなく、うるち米他品種と低アミロース米品種ミルキークイーン wx-1(t) とに共通なDNA領域を増幅し得るプライマーとを組み合わせ

W3: 5' -CAAGTACGACGCAACCACGGTAAG-3' (配列番号3)

W4: 5' -GGTGGACTAGACGATCTGGTTCAA-3' (配列番号4)

【0020】低アミロース米品種ミルキークイーンに存在し、うるち米他品種に存在しない特異的な塩基を含むDNAの検出は、基本的に前述のW1及びW2のプライマーセットのみの使用でも可能であるが、PCRの機種や反応条件によっては、うるち米他品種においてもW1及びW2のプライマーセットによる薄いバンドが得られることもあるので、うるち米他品種と低アミロース米品種ミルキークイーン wx-1(t) とに共通なDNA領域を増幅し得るW3及びW4などのプライマーセットを用いて対照区を設定することによって、PCR反応の成否を更に精度よく確認することができる。

【0021】PCRの反応工程は、熱変性: 93~95 で30~60秒、アニーリング: 60~70 で30~60秒、伸長反応: 72 で60~300秒で行う。好ましくは、熱変性: 94 で60秒、アニーリング: 69 で60秒、伸長反応: 72 で120秒を1サイクルとし、これを25~35回、好ましくは28~30回行う。

【0022】次に、このPCRによって得られた反応産物は、電気泳動及び分光光度計によって分析することができるが、このうち、電気泳動が好ましい。電気泳動分析は常法によって行えばよい。例えば、アガロースまたはポリアクリルアミドのゲル中で電圧をかけて電気泳動し、分離したDNAパターンを分析する。前記W1及びW2のプライマーを用いてPCRを行った場合、電気泳動分析により、wx-1(t) を保有するミルキークイーン及び同系統品種では741bpのバンドが出現するが、同遺伝子を保有しないコシヒカリ等の通常のうるち米品種ではバンドは出現しない。また、前記W1~W4のプライマーを用いてPCRを行った場合、wx-1(t) を保有するミルキークイーン及び同系統品種では741bpと469bpの2本のバンドが出現するが、同遺伝子を保有しないコシヒカリ等の通常のうるち米品種では741bpのバンドは出現せず、469bpの1本のバンドのみが出現する。

【0023】

【実施例】以下に実施例を示し、本発明を具体的に説明

W1: 5' -GGTGAGGTTTTTCCATTGCTACAAGCA-3' (配列番号1)

W2: 5' -GCCCTGGTAGGAGATGTTGTGGAT-3' (配列番号2)

W3: 5' -CAAGTACGACGCAACCACGGTAAG-3' (配列番号3)

W4: 5' -GGTGGACTAGACGATCTGGTTCAA-3' (配列番号4)

【0017】

て用いることができる。一例として、次のプライマーセットを上記W1及びW2と組みあわせて用いることができる。

【0019】

するが、本発明はこれらに限定されるものではない。
【実施例1】 wx-1(t) 遺伝子及びWx遺伝子のDNA配列の決定ミルキークイーン及び比較品種であるコシヒカリの出穂14日後の穂からそれぞれRNAを抽出した。抽出にはQiagen社のRNeasy plant mini kitを使用した。得られたRNAは、タカラ(株)のHigh fidelity RT-PCRキットを用いた逆転写反応に供し、wx-1(t) 及びWx遺伝子の全長cDNAをそれぞれ得た。

20 【0024】逆転写反応に必要な機材には、タカラ(株)のPCR Thermal cycler MPを用いた。次に、得られたcDNAをそれぞれNovagen社のプラスミドベクターpT-7 blue-Tvectorに組み込み、シークエンスプライマーを用いた塩基配列の決定操作を行った。塩基配列の決定にはABI社の377オートシークエンサーを用いて解析を行った。その結果、塩基配列wx-1(t) (配列番号5) 及び対応するアミノ酸配列(配列番号6)、並びに塩基配列Wx(配列番号7) 及び対応するアミノ酸配列(配列番号8) が得られた。これらのDNA配列を比較したところ、
30 両配列の相違はわずか2塩基であることが判明した。すなわち、wx-1(t) はこの相違部位にAとCを保有し、一方、WxはGとTを保有することが分かった(図1)。

【0025】【実施例2】 wx-1(t) 遺伝子に特異的なDNA配列を利用した品種識別法

(1) プライマー

PCRを用いた品種識別を行うため、以下の4つのプライマーを設計した。すなわち、W1及びW2は、ミルキークイーン及び同系統品種が保有するwx-1(t) 遺伝子に特異的な部位を増幅可能なプライマーであり、PCRにより741bpの増幅産物が得られる。なお、W1はwx-1(t) に特異的な第1相違塩基「A」を末端に含んでいるプライマーである。また、W3及びW4は、ミルキークイーン及び同系統品種とコシヒカリ等の通常のうるち米品種に共通の部位を増幅可能なプライマーであり、PCRにより469bpの増幅産物が得られる。

【0026】

【 0 0 2 7 】 (2)PCR
 パーキンエルマー社のAmplitaq 2.5U、Amplitaq に付属の10×Buffer 5μl、2mM dNTP 5μl、50ng DNA、W1、W2、W3及びW4プライマー各20pmolを含む最終容量50μlの反応液を調製した。PCR反応に必要な機材には前記したタカラ(株)のPCR Thermal cycler MPを用い、94 で1分間反応後、94 で1分間、69 で1分間及び72 で2分間の一連の反応を28回繰り返し、最後に72 で4分間反応させた。

【 0 0 2 8 】 (3)電気泳動分析
 反応液を5μl採り、0.8%アガロースゲルにローディングし、100Vで40分間電気泳動を行った。DNA分子量マーカーとしては、x174/HaeIIIを用いた。得られた結果を図2に示す。

【 0 0 2 9 】 ミルキークイーンにおいては、W1、W2、W3

及びW4の4つのプライマーの配列が全てwx-1(t)遺伝子の塩基配列に含まれるため、PCRにより741bpと469bpの2つのバンドが増幅した。一方、コシヒカリ等の通常のうるち米品種においては、W1プライマーのみ配列がWx遺伝子の塩基配列と異なり、PCRにより741bpのバンドは増幅せず469bpのバンドのみが増幅した。

【 0 0 3 0 】

【発明の効果】以上のことから、本発明の低アミロース米品種ミルキークイーン及び同系統品種と通常のうるち米品種を識別し得るプライマーを用いてPCRにより増幅したバンドを確認することによって、ミルキークイーン及び同系統品種とコシヒカリ等の通常のうるち米品種とを識別することが可能である。

【 0 0 3 1 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> National Agricultural Research Organization
 <120> DNA fragment, primer and discrimination of Milky Queen of low amylose content of endosperm starches in rice
 <130> P01-0172
 <160> 8
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic DNA
 <400> 1
 ggtgaggttt ttccattgct acaagca 27
 <210> 2
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic DNA
 <400> 2
 gccctggtag gagatggtgt ggat 24
 <210> 3
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic DNA
 <400> 3
 caagtacgac gcaaccacgg taag 24
 <210> 4
 <211> 25

9
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic DNA
 <400> 4
 ggtggactag acgatctggg ttcaa 25

<210> 5
 <211> 1937
 <212> DNA
 <213> Oryza sativa
 <220>
 <221> CDS
 <222> (25)..(1851)
 <400> 5
 cacagcaaca gctagacaac cacc atg tcg gct ctc acc acg tcc cag ctc 51
 Met Ser Ala Leu Thr Thr Ser Gln Leu
 1 5
 gcc acc tcg gcc acc ggc ttc ggc atc gcc gac agg tcg gcg ccg tcg 99
 Ala Thr Ser Ala Thr Gly Phe Gly Ile Ala Asp Arg Ser Ala Pro Ser
 10 15 20 25
 tcg ctg ctc cgc cac ggg ttc cag ggc ctc aag ccc cgc agc ccc gcc 147
 Ser Leu Leu Arg His Gly Phe Gln Gly Leu Lys Pro Arg Ser Pro Ala
 30 35 40
 ggc ggc gac gcg acg tcg ctc agc gtg acg acc agc gcg cgc gcg acg 195
 Gly Gly Asp Ala Thr Ser Leu Ser Val Thr Thr Ser Ala Arg Ala Thr
 45 50 55
 ccc aag cag cag cgg tcg gtg cag cgt ggc agc cgg agg ttc ccc tcc 243
 Pro Lys Gln Gln Arg Ser Val Gln Arg Gly Ser Arg Arg Phe Pro Ser
 60 65 70
 gtc gtc gtg tac gcc acc ggc gcc ggc atg aac gtc gtg ttc gtc ggc 291
 Val Val Val Tyr Ala Thr Gly Ala Gly Met Asn Val Val Phe Val Gly
 75 80 85
 gcc gag atg gcc ccc tgg agc aag acc ggc ggc ctc ggt gac gtc ctc 339
 Ala Glu Met Ala Pro Trp Ser Lys Thr Gly Gly Leu Gly Asp Val Leu
 90 95 100 105
 ggt ggc ctc ccc cct gcc atg gct gcg aat ggc cac agg gtc atg gtg 387
 Gly Gly Leu Pro Pro Ala Met Ala Ala Asn Gly His Arg Val Met Val
 110 115 120
 atc tct cct cgg tac gac cag tac aag gac gct tgg gat acc agc gtt 435
 Ile Ser Pro Arg Tyr Asp Gln Tyr Lys Asp Ala Trp Asp Thr Ser Val
 125 130 135
 gtg gct gag atc aag gtt gca gac agg tac gag agg gtg agg ttt ttc 483
 Val Ala Glu Ile Lys Val Ala Asp Arg Tyr Glu Arg Val Arg Phe Phe
 140 145 150
 cat tgc tac aag cat gga gtc gac cgt gtg ttc atc gac cat ccg tca 531
 His Cys Tyr Lys His Gly Val Asp Arg Val Phe Ile Asp His Pro Ser
 155 160 165
 ttc ctg gag aag gtt tgg gga aag acc ggt gag aag atc tac gga cct 579
 Phe Leu Glu Lys Val Trp Gly Lys Thr Gly Glu Lys Ile Tyr Gly Pro

11	12		
170	185		
gac act gga gtt gat cac aaa gac aac cag atg cgt ttc agc ctt ctt	627		
Asp Thr Gly Val Asp His Lys Asp Asn Gln Met Arg Phe Ser Leu Leu			
190	200		
tgc cag gca gca ctc gag gct cct agg atc cta aac ctc aac aac aac	675		
Cys Gln Ala Ala Leu Glu Ala Pro Arg Ile Leu Asn Leu Asn Asn Asn			
205	210	215	
cca tac ttc aaa gga act tat ggt gag gat gtt gtg ttc gtc tgc aac	723		
Pro Tyr Phe Lys Gly Thr Tyr Gly Glu Asp Val Val Phe Val Cys Asn			
220	225	230	
gac tgg cac act ggc cca ctg gcg agc tac ctg aag aac aac tac cag	771		
Asp Trp His Thr Gly Pro Leu Ala Ser Tyr Leu Lys Asn Asn Tyr Gln			
235	240	245	
ccc aat ggc atc tac agg aat gca aag gtt gct ttc tgc atc cac aac	819		
Pro Asn Gly Ile Tyr Arg Asn Ala Lys Val Ala Phe Cys Ile His Asn			
250	255	260	265
atc tcc tac cag ggc cgt ttc gct ttc gag gat tac cct gag ctg aac	867		
Ile Ser Tyr Gln Gly Arg Phe Ala Phe Glu Asp Tyr Pro Glu Leu Asn			
270	275	280	
ctc tcc gag agg ttc agg tca tcc ttc gat ttc atc gac ggg tat gac	915		
Leu Ser Glu Arg Phe Arg Ser Ser Phe Asp Phe Ile Asp Gly Tyr Asp			
285	290	295	
acg ccg gtg gag ggc agg aag atc aac tgg atg aag gcc gga atc ctg	963		
Thr Pro Val Glu Gly Arg Lys Ile Asn Trp Met Lys Ala Gly Ile Leu			
300	305	310	
gaa gcc gac agg gtg ctc acc gtg agc ccg tac tac gcc gag gag ctc	1011		
Glu Ala Asp Arg Val Leu Thr Val Ser Pro Tyr Tyr Ala Glu Glu Leu			
315	320	325	
atc tcc ggc atc gcc agg gga tgc gag ctc gac aac atc atg cgg ctc	1059		
Ile Ser Gly Ile Ala Arg Gly Cys Glu Leu Asp Asn Ile Met Arg Leu			
330	335	340	345
acc ggc atc acc ggc atc gtc aac ggc atg gac gtc agc gag tgg gat	1107		
Thr Gly Ile Thr Gly Ile Val Asn Gly Met Asp Val Ser Glu Trp Asp			
350	355	360	
cct agc aag gac aag tac atc acc gcc aag tac gac gca acc acg gca	1155		
Pro Ser Lys Asp Lys Tyr Ile Thr Ala Lys Tyr Asp Ala Thr Thr Ala			
365	370	375	
atc gag gcg aag gcg ctg aac aag gag gcg ttg cag gcg gag gcg ggt	1203		
Ile Glu Ala Lys Ala Leu Asn Lys Glu Ala Leu Gln Ala Glu Ala Gly			
380	385	390	
ctt ccg gtc gac agg aaa atc cca ctg atc gcg ttc atc ggc agg ctg	1251		
Leu Pro Val Asp Arg Lys Ile Pro Leu Ile Ala Phe Ile Gly Arg Leu			
395	400	405	
gag gaa cag aag ggc cct gac gtc atg gcc gcc gcc atc ccg gag ctc	1299		
Glu Glu Gln Lys Gly Pro Asp Val Met Ala Ala Ala Ile Pro Glu Leu			
410	415	420	425
atg cag gag gac gtc cag atc gtt ctt ctg ggt act gga aag aag aag	1347		
Met Gln Glu Asp Val Gln Ile Val Leu Leu Gly Thr Gly Lys Lys Lys			
430	435	440	

13	14
ttc gag aag ctg ctc aag agc atg gag gag aag tat ccg ggc aag gtg	1395
Phe Glu Lys Leu Leu Lys Ser Met Glu Glu Lys Tyr Pro Gly Lys Val	
445	450
agg gcc gtg gtg aag ttc aac gcg ccg ctt gct cat ctc atc atg gcc	1443
Arg Ala Val Val Lys Phe Asn Ala Pro Leu Ala His Leu Ile Met Ala	
460	470
gga gcc gac gtg ctc gcc gtc ccc agc cgc ttc gag ccc tgt gga ctc	1491
Gly Ala Asp Val Leu Ala Val Pro Ser Arg Phe Glu Pro Cys Gly Leu	
475	480
atc cag ctg cag ggg atg aga tac gga acg ccc tgt gct tgc gcg tcc	1539
Ile Gln Leu Gln Gly Met Arg Tyr Gly Thr Pro Cys Ala Cys Ala Ser	
490	495
acc ggt ggg ctc gtg gac acg gtc atc gaa ggc aag act ggt ttc cac	1587
Thr Gly Gly Leu Val Asp Thr Val Ile Glu Gly Lys Thr Gly Phe His	
510	515
atg ggc cgt ctc agc gtc gac tgc aag gtg gtg gag cca agc gac gtg	1635
Met Gly Arg Leu Ser Val Asp Cys Lys Val Val Glu Pro Ser Asp Val	
525	530
aag aag gtg gcg gcc acc ctg aag cgc gcc atc aag gtc gtc ggc acg	1683
Lys Lys Val Ala Ala Thr Leu Lys Arg Ala Ile Lys Val Val Gly Thr	
540	545
ccg gcg tac gag gag atg gtc agg aac tgc atg aac cag gac ctc tcc	1731
Pro Ala Tyr Glu Glu Met Val Arg Asn Cys Met Asn Gln Asp Leu Ser	
555	560
tgg aag ggg cct gcg aag aac tgg gag aat gtg ctc ctg ggc ctg ggc	1779
Trp Lys Gly Pro Ala Lys Asn Trp Glu Asn Val Leu Leu Gly Leu Gly	
570	575
gtc gcc ggc agc gcg ccg ggg atc gaa ggc gac gag atc gcg ccg ctc	1827
Val Ala Gly Ser Ala Pro Gly Ile Glu Gly Asp Glu Ile Ala Pro Leu	
590	595
gcc aag gag aac gtg gct gct cct tgaagagcct gagatctaca tatggagtga	1881
Ala Lys Glu Asn Val Ala Ala Pro	
605	
ttaattaata tagcagtata tggatgagag acgaatgaac cagtggaatc ggatcc	1937
<210> 6	
<211> 609	
<212> PRT	
<213> Oryza sativa	
<400> 6	
Met Ser Ala Leu Thr Thr Ser Gln Leu Ala Thr Ser Ala Thr Gly Phe	
1	5
Gly Ile Ala Asp Arg Ser Ala Pro Ser Ser Leu Leu Arg His Gly Phe	
20	25
Gln Gly Leu Lys Pro Arg Ser Pro Ala Gly Gly Asp Ala Thr Ser Leu	
35	40
Ser Val Thr Thr Ser Ala Arg Ala Thr Pro Lys Gln Gln Arg Ser Val	
50	55
Gln Arg Gly Ser Arg Arg Phe Pro Ser Val Val Val Tyr Ala Thr Gly	
65	70
Ala Gly Met Asn Val Val Phe Val Gly Ala Glu Met Ala Pro Trp Ser	
75	80

17	18
Pro Ser Arg Phe Glu Pro Cys Gly Leu Ile Gln Leu Gln Gly Met Arg	
485	490
Tyr Gly Thr Pro Cys Ala Cys Ala Ser Thr Gly Gly Leu Val Asp Thr	
500	505
Val Ile Glu Gly Lys Thr Gly Phe His Met Gly Arg Leu Ser Val Asp	
515	520
Cys Lys Val Val Glu Pro Ser Asp Val Lys Lys Val Ala Ala Thr Leu	
530	535
Lys Arg Ala Ile Lys Val Val Gly Thr Pro Ala Tyr Glu Glu Met Val	
545	550
Arg Asn Cys Met Asn Gln Asp Leu Ser Trp Lys Gly Pro Ala Lys Asn	
565	570
Trp Glu Asn Val Leu Leu Gly Leu Gly Val Ala Gly Ser Ala Pro Gly	
580	585
Ile Glu Gly Asp Glu Ile Ala Pro Leu Ala Lys Glu Asn Val Ala Ala	
595	600

Pro

<210> 7

<211> 1937

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<220>

<221> CDS

<222> (25)..(1851)

<400> 7

cacagcaaca gctagacaac cacc atg tcg gct ctc acc acg tcc cag ctc	51
Met Ser Ala Leu Thr Thr Ser Gln Leu	
1	5
gcc acc tcg gcc acc ggc ttc ggc atc gcc gac agg tcg gcg ccg tcg	99
Ala Thr Ser Ala Thr Gly Phe Gly Ile Ala Asp Arg Ser Ala Pro Ser	
10	15
tcg ctg ctc cgc cac ggg ttc cag ggc ctc aag ccc cgc agc ccc gcc	147
Ser Leu Leu Arg His Gly Phe Gln Gly Leu Lys Pro Arg Ser Pro Ala	
30	35
ggc ggc gac gcg acg tcg ctc agc gtg acg acc agc gcg cgc gcg acg	195
Gly Gly Asp Ala Thr Ser Leu Ser Val Thr Thr Ser Ala Arg Ala Thr	
45	50
ccc aag cag cag cgg tcg gtg cag cgt ggc agc cgg agg ttc ccc tcc	243
Pro Lys Gln Gln Arg Ser Val Gln Arg Gly Ser Arg Arg Phe Pro Ser	
60	65
gtc gtc gtg tac gcc acc ggc gcc ggc atg aac gtc gtg ttc gtc ggc	291
Val Val Val Tyr Ala Thr Gly Ala Gly Met Asn Val Val Phe Val Gly	
75	80
ggc gag atg gcc ccc tgg agc aag acc ggc ggc ctc ggt gac gtc ctc	339
Ala Glu Met Ala Pro Trp Ser Lys Thr Gly Gly Leu Gly Asp Val Leu	
90	95
ggt ggc ctc ccc cct gcc atg gct gcg aat ggc cac agg gtc atg gtg	387
Gly Gly Leu Pro Pro Ala Met Ala Ala Asn Gly His Arg Val Met Val	

19		20	
	110	115	120
atc tct cct cgg tac gac cag tac aag gac gct tgg gat acc agc gtt			435
Ile Ser Pro Arg Tyr Asp Gln Tyr Lys Asp Ala Trp Asp Thr Ser Val			
	125	130	135
gtg gct gag atc aag gtt gca gac agg tac gag agg gtg agg ttt ttc			483
Val Ala Glu Ile Lys Val Ala Asp Arg Tyr Glu Arg Val Arg Phe Phe			
	140	145	150
cat tgc tac aag cgt gga gtc gac cgt gtg ttc atc gac cat ccg tca			531
His Cys Tyr Lys Arg Gly Val Asp Arg Val Phe Ile Asp His Pro Ser			
	155	160	165
ttc ctg gag aag gtt tgg gga aag acc ggt gag aag atc tac gga cct			579
Phe Leu Glu Lys Val Trp Gly Lys Thr Gly Glu Lys Ile Tyr Gly Pro			
170	175	180	185
gac act gga gtt gat tac aaa gac aac cag atg cgt ttc agc ctt ctt			627
Asp Thr Gly Val Asp Tyr Lys Asp Asn Gln Met Arg Phe Ser Leu Leu			
	190	195	200
tgc cag gca gca ctc gag gct cct agg atc cta aac ctc aac aac aac			675
Cys Gln Ala Ala Leu Glu Ala Pro Arg Ile Leu Asn Leu Asn Asn Asn			
	205	210	215
cca tac ttc aaa gga act tat ggt gag gat gtt gtg ttc gtc tgc aac			723
Pro Tyr Phe Lys Gly Thr Tyr Gly Glu Asp Val Val Phe Val Cys Asn			
	220	225	230
gac tgg cac act ggc cca ctg gcg agc tac ctg aag aac aac tac cag			771
Asp Trp His Thr Gly Pro Leu Ala Ser Tyr Leu Lys Asn Asn Tyr Gln			
	235	240	245
ccc aat ggc atc tac agg aat gca aag gtt gct ttc tgc atc cac aac			819
Pro Asn Gly Ile Tyr Arg Asn Ala Lys Val Ala Phe Cys Ile His Asn			
250	255	260	265
atc tcc tac cag ggc cgt ttc gct ttc gag gat tac cct gag ctg aac			867
Ile Ser Tyr Gln Gly Arg Phe Ala Phe Glu Asp Tyr Pro Glu Leu Asn			
	270	275	280
ctc tcc gag agg ttc agg tca tcc ttc gat ttc atc gac ggg tat gac			915
Leu Ser Glu Arg Phe Arg Ser Ser Phe Asp Phe Ile Asp Gly Tyr Asp			
	285	290	295
acg ccg gtg gag ggc agg aag atc aac tgg atg aag gcc gga atc ctg			963
Thr Pro Val Glu Gly Arg Lys Ile Asn Trp Met Lys Ala Gly Ile Leu			
	300	305	310
gaa gcc gac agg gtg ctc acc gtg agc ccg tac tac gcc gag gag ctc			1011
Glu Ala Asp Arg Val Leu Thr Val Ser Pro Tyr Tyr Ala Glu Glu Leu			
	315	320	325
atc tcc ggc atc gcc agg gga tgc gag ctc gac aac atc atg cgg ctc			1059
Ile Ser Gly Ile Ala Arg Gly Cys Glu Leu Asp Asn Ile Met Arg Leu			
330	335	340	345
acc ggc atc acc ggc atc gtc aac ggc atg gac gtc agc gag tgg gat			1107
Thr Gly Ile Thr Gly Ile Val Asn Gly Met Asp Val Ser Glu Trp Asp			
	350	355	360
cct agc aag gac aag tac atc acc gcc aag tac gac gca acc acg gca			1155
Pro Ser Lys Asp Lys Tyr Ile Thr Ala Lys Tyr Asp Ala Thr Thr Ala			
	365	370	375
atc gag gcg aag gcg ctg aac aag gag gcg ttg cag gcg gag gcg ggt			1203

21	22
Ile Glu Ala Lys Ala Leu Asn Lys Glu Ala Leu Gln Ala Glu Ala Gly	
380	385 390
ctt ccg gtc gac agg aaa atc cca ctg atc gcg ttc atc ggc agg ctg	1251
Leu Pro Val Asp Arg Lys Ile Pro Leu Ile Ala Phe Ile Gly Arg Leu	
395	400 405
gag gaa cag aag ggc cct gac gtc atg gcc gcc gcc atc ccg gag ctc	1299
Glu Glu Gln Lys Gly Pro Asp Val Met Ala Ala Ala Ile Pro Glu Leu	
410	415 420 425
atg cag gag gac gtc cag atc gtt ctt ctg ggt act gga aag aag aag	1347
Met Gln Glu Asp Val Gln Ile Val Leu Leu Gly Thr Gly Lys Lys Lys	
430	435 440
ttc gag aag ctg ctc aag agc atg gag gag aag tat ccg ggc aag gtg	1395
Phe Glu Lys Leu Leu Lys Ser Met Glu Glu Lys Tyr Pro Gly Lys Val	
445	450 455
agg gcc gtg gtg aag ttc aac gcg ccg ctt gct cat ctc atc atg gcc	1443
Arg Ala Val Val Lys Phe Asn Ala Pro Leu Ala His Leu Ile Met Ala	
460	465 470
gga gcc gac gtg ctc gcc gtc ccc agc cgc ttc gag ccc tgt gga ctc	1491
Gly Ala Asp Val Leu Ala Val Pro Ser Arg Phe Glu Pro Cys Gly Leu	
475	480 485
atc cag ctg cag ggg atg aga tac gga acg ccc tgt gct tgc gcg tcc	1539
Ile Gln Leu Gln Gly Met Arg Tyr Gly Thr Pro Cys Ala Cys Ala Ser	
490	495 500 505
acc ggt ggg ctc gtg gac acg gtc atc gaa ggc aag act ggt ttc cac	1587
Thr Gly Gly Leu Val Asp Thr Val Ile Glu Gly Lys Thr Gly Phe His	
510	515 520
atg ggc cgt ctc agc gtc gac tgc aag gtg gtg gag cca agc gac gtg	1635
Met Gly Arg Leu Ser Val Asp Cys Lys Val Val Glu Pro Ser Asp Val	
525	530 535
aag aag gtg gcg gcc acc ctg aag cgc gcc atc aag gtc gtc ggc acg	1683
Lys Lys Val Ala Ala Thr Leu Lys Arg Ala Ile Lys Val Val Gly Thr	
540	545 550
ccg gcg tac gag gag atg gtc agg aac tgc atg aac cag gac ctc tcc	1731
Pro Ala Tyr Glu Glu Met Val Arg Asn Cys Met Asn Gln Asp Leu Ser	
555	560 565
tgg aag ggg cct gcg aag aac tgg gag aat gtg ctc ctg ggc ctg ggc	1779
Trp Lys Gly Pro Ala Lys Asn Trp Glu Asn Val Leu Leu Gly Leu Gly	
570	575 580 585
gtc gcc ggc agc gcg ccg ggg atc gaa ggc gac gag atc gcg ccg ctc	1827
Val Ala Gly Ser Ala Pro Gly Ile Glu Gly Asp Glu Ile Ala Pro Leu	
590	595 600
gcc aag gag aac gtg gct gct cct tgaagagcct gagatctaca tatggagtga	1881
Ala Lys Glu Asn Val Ala Ala Pro	
605	
ttaattaata tagcagtata tggatgagag acgaatgaac cagtgaatc ggatcc	1937
<210> 8	
<211> 609	
<212> PRT	
<213> Oryza sativa	

23

24

<400> 8

Met Ser Ala Leu Thr Thr Ser Gln Leu Ala Thr Ser Ala Thr Gly Phe
 1 5 10 15
 Gly Ile Ala Asp Arg Ser Ala Pro Ser Ser Leu Leu Arg His Gly Phe
 20 25 30
 Gln Gly Leu Lys Pro Arg Ser Pro Ala Gly Gly Asp Ala Thr Ser Leu
 35 40 45
 Ser Val Thr Thr Ser Ala Arg Ala Thr Pro Lys Gln Gln Arg Ser Val
 50 55 60
 Gln Arg Gly Ser Arg Arg Phe Pro Ser Val Val Val Tyr Ala Thr Gly
 65 70 75 80
 Ala Gly Met Asn Val Val Phe Val Gly Ala Glu Met Ala Pro Trp Ser
 85 90 95
 Lys Thr Gly Gly Leu Gly Asp Val Leu Gly Gly Leu Pro Pro Ala Met
 100 105 110
 Ala Ala Asn Gly His Arg Val Met Val Ile Ser Pro Arg Tyr Asp Gln
 115 120 125
 Tyr Lys Asp Ala Trp Asp Thr Ser Val Val Ala Glu Ile Lys Val Ala
 130 135 140
 Asp Arg Tyr Glu Arg Val Arg Phe Phe His Cys Tyr Lys Arg Gly Val
 145 150 155 160
 Asp Arg Val Phe Ile Asp His Pro Ser Phe Leu Glu Lys Val Trp Gly
 165 170 175
 Lys Thr Gly Glu Lys Ile Tyr Gly Pro Asp Thr Gly Val Asp Tyr Lys
 180 185 190
 Asp Asn Gln Met Arg Phe Ser Leu Leu Cys Gln Ala Ala Leu Glu Ala
 195 200 205
 Pro Arg Ile Leu Asn Leu Asn Asn Pro Tyr Phe Lys Gly Thr Tyr
 210 215 220
 Gly Glu Asp Val Val Phe Val Cys Asn Asp Trp His Thr Gly Pro Leu
 225 230 235 240
 Ala Ser Tyr Leu Lys Asn Asn Tyr Gln Pro Asn Gly Ile Tyr Arg Asn
 245 250 255
 Ala Lys Val Ala Phe Cys Ile His Asn Ile Ser Tyr Gln Gly Arg Phe
 260 265 270
 Ala Phe Glu Asp Tyr Pro Glu Leu Asn Leu Ser Glu Arg Phe Arg Ser
 275 280 285

 Ser Phe Asp Phe Ile Asp Gly Tyr Asp Thr Pro Val Glu Gly Arg Lys
 290 295 300
 Ile Asn Trp Met Lys Ala Gly Ile Leu Glu Ala Asp Arg Val Leu Thr
 305 310 315 320
 Val Ser Pro Tyr Tyr Ala Glu Glu Leu Ile Ser Gly Ile Ala Arg Gly
 325 330 335
 Cys Glu Leu Asp Asn Ile Met Arg Leu Thr Gly Ile Thr Gly Ile Val
 340 345 350
 Asn Gly Met Asp Val Ser Glu Trp Asp Pro Ser Lys Asp Lys Tyr Ile
 355 360 365
 Thr Ala Lys Tyr Asp Ala Thr Thr Ala Ile Glu Ala Lys Ala Leu Asn
 370 375 380

25 26

Lys Glu Ala Leu Gln Ala Glu Ala Gly Leu Pro Val Asp Arg Lys Ile
 385 390 395 400

Pro Leu Ile Ala Phe Ile Gly Arg Leu Glu Glu Gln Lys Gly Pro Asp
 405 410 415

Val Met Ala Ala Ala Ile Pro Glu Leu Met Gln Glu Asp Val Gln Ile
 420 425 430

Val Leu Leu Gly Thr Gly Lys Lys Lys Phe Glu Lys Leu Leu Lys Ser
 435 440 445

Met Glu Glu Lys Tyr Pro Gly Lys Val Arg Ala Val Val Lys Phe Asn
 450 455 460

Ala Pro Leu Ala His Leu Ile Met Ala Gly Ala Asp Val Leu Ala Val
 465 470 475 480

Pro Ser Arg Phe Glu Pro Cys Gly Leu Ile Gln Leu Gln Gly Met Arg
 485 490 495

Tyr Gly Thr Pro Cys Ala Cys Ala Ser Thr Gly Gly Leu Val Asp Thr
 500 505 510

Val Ile Glu Gly Lys Thr Gly Phe His Met Gly Arg Leu Ser Val Asp
 515 520 525

Cys Lys Val Val Glu Pro Ser Asp Val Lys Lys Val Ala Ala Thr Leu
 530 535 540

Lys Arg Ala Ile Lys Val Val Gly Thr Pro Ala Tyr Glu Glu Met Val
 545 550 555 560

Arg Asn Cys Met Asn Gln Asp Leu Ser Trp Lys Gly Pro Ala Lys Asn
 565 570 575

Trp Glu Asn Val Leu Leu Gly Leu Gly Val Ala Gly Ser Ala Pro Gly
 580 585 590

Ile Glu Gly Asp Glu Ile Ala Pro Leu Ala Lys Glu Asn Val Ala Ala
 595 600 605

Pro

【 0 0 3 2 】

【 配列表フリーテキスト 】

配列番号 1 : 合成DNA

配列番号 2 : 合成DNA

配列番号 3 : 合成DNA

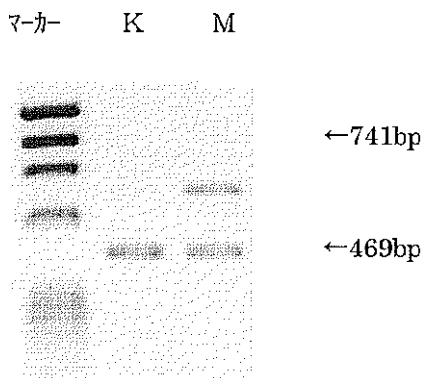
配列番号 4 : 合成DNA

【 図面の簡単な説明 】

30 【 図 1 】 wx-1(t)遺伝子に特異的なDNA配列を検出し得るプライマー、W1 ~ W4の配置図及び品種識別の原理を示す図である。

【 図 2 】 wx-1(t)遺伝子に特異的なDNA配列を検出し得るプライマーの一例を用いたPCR反応結果を示す図である。図中、Kはコシヒカリ、Mはミルキークイーンを示す。また、マーカーは x174/HaeIIIである。

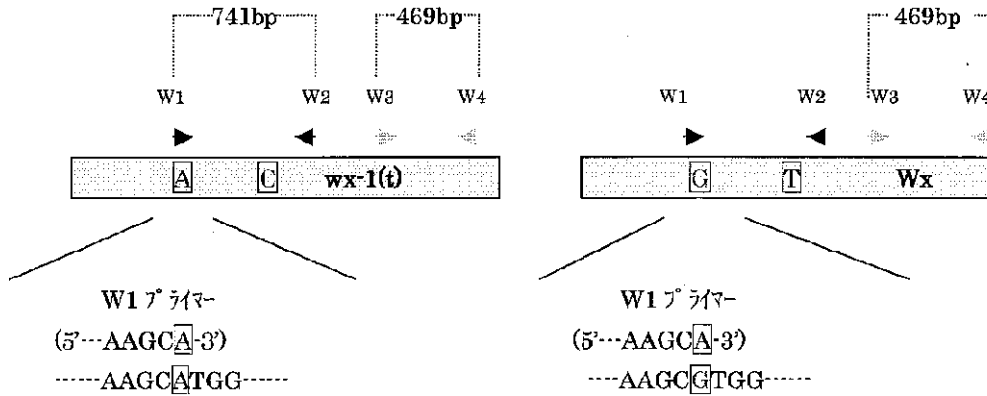
【 図 2 】



【 図 1 】

(ミルキークイーン の wx-1(t) 遺伝子)

(コシヒカリ等の普通のうるち米品種の Wx 遺伝子)



フロントページの続き

(72)発明者 坂井 真
 青森県十和田市大字相坂字相坂188 - 1
 県公舎

Fターム(参考) 4B024 AA05 AA07 AA11 CA01 CA20
 HA20
 4B063 QA20 QQ04 QQ42 QR32 QR62
 QS16 QS25