

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4982727号
(P4982727)

(45) 発行日 平成24年7月25日(2012.7.25)

(24) 登録日 平成24年5月11日(2012.5.11)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 Q 1/02	(2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 Q 1/68	(2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A

請求項の数 1 (全 47 頁)

(21) 出願番号	特願2003-561313 (P2003-561313)	(73) 特許権者	501167644
(86) (22) 出願日	平成14年12月20日 (2002.12.20)		独立行政法人農業生物資源研究所
(86) 国際出願番号	PCT/JP2002/013376		茨城県つくば市観音台2丁目1-2
(87) 国際公開番号	W02003/054192	(74) 代理人	100102978
(87) 国際公開日	平成15年7月3日 (2003.7.3)		弁理士 清水 初志
審査請求日	平成17年7月8日 (2005.7.8)	(74) 代理人	100128048
審査番号	不服2008-29622 (P2008-29622/J1)		弁理士 新見 浩一
審査請求日	平成20年11月20日 (2008.11.20)	(72) 発明者	南 栄一
(31) 優先権主張番号	特願2001-388993 (P2001-388993)		茨城県つくば市並木4-920-203
(32) 優先日	平成13年12月21日 (2001.12.21)	(72) 発明者	渋谷 直人
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		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	デイ ロバート ビー.
			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
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 植物培養細胞を用いたジベレリン応答性遺伝子の同定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

イネの培養細胞において被験遺伝子のジベレリン応答性の有無を評価する方法であって、

(a) オーキシンを含む培地で培養したイネの培養細胞を、オーキシンを含まない培地で2時間前培養する工程、

(b) 工程 (a) で前培養した細胞を、該オーキシンを含まない培地でジベレリンと接触させる工程、

(c) ジベレリンが接触されたイネの培養細胞における被験遺伝子の発現を測定する工程、

を含み、上記被験遺伝子の発現が、ジベレリンを接触させない場合と比べ変化している場合に、被験遺伝子がジベレリン応答性を有すると判定される方法。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、植物培養細胞を用いたジベレリン応答性遺伝子の同定方法およびスクリーニング方法、並びに、植物培養細胞を用いて、被験遺伝子のジベレリン応答性の有無を評価する方法に関する。

背景技術

ジベレリンは、植物ホルモンの一種で、植物の発芽、伸長成長、花芽形成等のライフサイクルに重要な役割をもつ。よって、ジベレリンに応答性を示す遺伝子は、上記の発芽、伸

長成長、花芽形成等が修飾された組み換え作物の作製などへの応用が期待されている。これまで、ジベレリンによって発現が誘導される遺伝子としては、発芽種子におけるデンプン分解酵素（アミラーゼ）遺伝子、オオムギGamyb（アミラーゼ遺伝子の転写調節因子）、イネOsCa-atpase（ Ca_2^+ ATPase）、イネUBC（Ubiquitin-conjugating enzyme）、オートムギAspk10（ribosomal protein kinase）、イネOs-Exp2 and 4（expansin; a cell wall protein）、イネcycOs1, 2（mitotic cyclin）、イネcdc2Os-2（cdc2 homologue）、イネR2（cdc2 activating kinase）、イネRPA1（replication protein A1）、キュウリCHRC（carotenoid associate protein）、アラビドプシスGASA1およびGASA4、並びに、キュウリCRG16が報告されている（山口信次郎、植物ホルモンのシグナル伝達、植物細胞工学シリーズ10、福田裕穂、町田泰則、神谷勇治、服部束穂 監修、1998年、p97-106）。また、イネexpansin geneのうち、OsEXPB3、OsEXPB4、OsEXPB6、およびOsEXPB11の四種類がジベレリンによって誘導されることが報告されている（Lee, Y. and Kende, H. Plant Physiology, 2001, 645-654.）。さらに、ジベレリンによって発現が抑制される遺伝子としては、ジベレリン生合成に關与する遺伝子、オートムギAspk9（MAP kinase）、アズキAB-ACO1（ACC oxidase）、アラビドプシスGA4（gibberellin 3beta-hydroxylase）、および、アラビドプシスAt2301（GA5; gibberellin 20-oxidase）が報告されている（山口信次郎、植物ホルモンのシグナル伝達、植物細胞工学シリーズ10、福田裕穂、町田泰則、神谷勇治、服部束穂 監修、1998年、p97-106）。

これら遺伝子は、すべて、植物体またはその切片を利用して、ジベレリン応答性が同定されたものである。しかしながら、植物体またはその切片は不均一な細胞から構成されており、また、扱いにくいいため、これらを利用して、ジベレリン応答性遺伝子を網羅的かつ簡便に同定し、単離することは困難であった。

発明の開示

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、ジベレリン応答性遺伝子を網羅的かつ簡便に同定し、単離することが可能な方法を提供することにある。

これまで、培養細胞がジベレリンに反応するとは、当業者においては全く考えられていなかった。しかし、ジベレリン反応性遺伝子を網羅的かつ簡便に同定し、単離するには、均一で扱いやすい培養細胞が好適である。このような培養細胞の利点に鑑み、本発明者は、あえて、培養細胞を利用してジベレリン反応性遺伝子を同定・単離する方法の開発を試みた。具体的には、本発明者は、まず、イネの懸濁培養細胞にジベレリンの一つGA3を処理することで、遺伝子発現の変化が検出されるか否かを検討した。しかしながら、遺伝子発現の変化は検出されなかった。培養細胞の培地には細胞の分裂能を維持するために植物によって代謝されにくいオーキシンが含まれている。そこで、本発明者は、オーキシンがジベレリンの作用を抑制している可能性を考え、次に、培養細胞をオーキシンを含まない培地であらかじめ培養した後、遺伝子発現の変化が検出されるか否かの検討を行った。その結果、驚くべきことに、いくつかの遺伝子について、ジベレリン処理後、短時間で、発現の変化が検出されることが判明した。

ジベレリンはentジベラン骨格をもつ化合物の総称であるが、これらの遺伝子発現誘導には活性型ジベレリンのみが有効であった。このことは、これらの遺伝子の発現誘導がジベレリンの受容体を介したシグナル伝達を介するものであることを強く示唆していた。また、タンパク質リン酸化酵素阻害剤、およびタンパク質脱リン酸化酵素阻害剤を用いた解析結果から、遺伝子発現に至るシグナル伝達過程ではタンパク質リン酸化酵素、およびタンパク質脱リン酸化酵素が関与していることが示唆された。また、このようなジベレリン依存的な遺伝子発現に関し、植物体の緑葉と培養細胞との間に相関が認められた。このこ

10

20

30

40

50

とは、植物体におけるジベレリン応答性遺伝子を、培養細胞を用いて同定し、単離することができることを示すものである。

即ち、本発明者は、世界で初めて植物の培養細胞を用いてジベレリン応答性遺伝子を同定し、単離する方法を開発することに成功し、本発明を完成した。本発明は、より具体的には、

〔1〕以下の(a)～(c)の工程を含む、ジベレリン応答性遺伝子の同定方法、

(a) 植物培養細胞にジベレリンを接触させる工程

(b) ジベレリンが接触された植物培養細胞において、遺伝子の発現を検出する工程

(c) ジベレリンを接触させない場合と比べ発現が変化している遺伝子を同定する工程

〔2〕以下の(a)～(d)の工程を含む、ジベレリン応答性遺伝子のスクリーニング方法、

(a) 植物培養細胞にジベレリンを接触させる工程

(b) ジベレリンが接触された植物培養細胞において、遺伝子の発現を検出する工程

(c) ジベレリンを接触させない場合と比べ発現が変化している遺伝子を同定する工程

(d) 工程(c)で同定された遺伝子を単離する工程

〔3〕被験遺伝子のジベレリン応答性の有無を評価する方法であって、

(a) 植物培養細胞にジベレリンを接触させる工程、

(b) ジベレリンが接触された植物培養細胞における被験遺伝子の発現を測定する工程、
を含み、上記被験遺伝子の発現が、ジベレリンを接触させない場合と比べ変化している場合に、被験遺伝子がジベレリン応答性を有すると判定される方法、

〔4〕オーキシンを含まない培地で培養した植物細胞を用いる、〔1〕～〔3〕にいずれかに記載の方法、

を提供するものである。

本発明においては、植物培養細胞を利用したジベレリン応答性遺伝子の同定方法を提供する。本発明の同定方法においては、まず、植物培養細胞にジベレリンを接触させる。

本発明において「ジベレリン応答性遺伝子」とは、ジベレリンに依存して発現が変化する遺伝子を意味する。ここで、「発現が変化する」とは、発現が増加または減少することを意味する。さらに、発現が増加または減少する場合には、一過的に増加または減少する場合も含まれる。また、発現が減少する場合には、発現が完全に停止する場合も含まれる。

本発明における「ジベレリン」は、*ent*ジベランと称される基本構造を有する四員環ジテルペノイドカルボン酸を意味する。これまでに、GA1、GA3、GA4、GA13、GA17、GA18、GA19、GA20、GA21およびGA22を含む約120個のジベレリンが知られている。本発明におけるジベレリンとしては、上記のジベレリン群を例示できるが、これらに制限されるものではない。

本発明におけるジベレリンは、天然型ジベレリンであれば、所望の植物から、公知の方法で精製することが可能である。また、GA1、GA3およびGA4であれば、和光純薬の市販品(cat #077-04191, 075-02811, 072-02821)を使用できる。また、合成型ジベレリンの調製方法は、当業者らに周知である。

本発明において用いる培養細胞の由来する植物としては、特に限定されず、例えば、穀類、野菜、および果樹等の有用農作物、観葉植物等の鑑賞用植物等が挙げられる。具体的には、該植物として、イネ、トウモロコシ、コムギ、オオムギ、ナタネ、ダイズ、ワタ、トマト、ジャガイモ、キク、バラ、カーネーション、シクラメン等を例示することができる。好ましくは、イネ科植物であり、最も好ましくはイネである。

また、本発明における植物培養細胞の調製方法としては、特に制限はない。例えば、イネ(主として日本晴)では、籾殻を除去した種子(玄米)を、市販のMS培地に2,4D(2,4-dichlorophenoxyacetic acid: 2,4ジクロロフェノキシ酢酸)を2mg/L添加した寒天培地(1%寒天)上で25℃暗黒化で2週間程度保温することでカルスを得、これを2,4D(1mg/L)を含むL培地(N6に類似)液体培地中で継代培養して得ることが可能である。また、細胞は週一回新しい培地に継代し、2500rpmで巡回培養する。上記L培地は、KNO₃: 2830mg/L、

10

20

30

40

50

(NH₄)₂SO₄ : 463 mg / L、CaCl₂ / 2H₂O : 166 mg / L、MgSO₄ / 7H₂O : 185 mg / L、KH₂PO₄ : 400 mg / L、FeSO₄ / 7H₂O : 5.6 mg / L、Na₂ / EDTA : 7.5 mg / L、MnSO₄ / 4H₂O : 4.4 mg / L、ZnSO₄ / 7H₂O : 1.5 mg / L、KI : 0.8 mg / L、H₃BO₃ : 1.6 mg / L、CuSO₄ / 5H₂O : 0.025 mg / L、NaMoO₄ / 2H₂O : 0.25 mg / L、CoCl₂ / 6H₂O : 0.025 mg / L、Nicotinic acid : 0.5 mg / L、Thiamine - HCl : 0.1 mg / L、Pyridoxine - HCl : 0.5 mg / L、myo-inositol : 100 mg / L、Glycine : 2 mg / L、2,4D : 1 mg / Lおよびショ糖 30 g / Lを溶かしてKOHでpHを5.8に調整後、オートクレーブすることで調製することができる。

10

また、植物細胞の培養条件としては、特に制限はなく、所望の植物細胞に適した培養条件を適宜選択することができる。

植物細胞は、遺伝子発現の検出前に、ジベレリンへの応答を阻害する物質を含まない培地で培養する。培地は、好ましくは、オーキシンを含まない培地である。本発明において「オーキシン」とは、植物ホルモンの一種であり、植物の茎の先端で合成され、極性的に移動しながら植物の成長を促進・調節する物質、および、それと同等の活性を示す合成化合物を意味する。本発明におけるオーキシンとしては、特に制限はなく、天然型オーキシンであるインドール酢酸、合成型オーキシンである2,4-ジクロロフェノキシ酢酸、ナフトアレノ酢酸等が例示できる。

ジベレリンの植物培養細胞への接触は、通常、植物培養細胞の培養液にジベレリンを添加することにより行うが、植物培養細胞のジベレリンへの応答を誘導できる限り特に制限はない。

20

本発明の同定方法においては、次いで、ジベレリンが接触された植物培養細胞において、遺伝子の発現を検出する。

本発明における「遺伝子の発現」には、転写および翻訳の双方が含まれる。転写量(mRNA量)を指標にした検出方法としては、例えば、DNAマイクロアレイ法、RNAディスプレイ法等が挙げられるが、これらの方法に限定されない。該DNAマイクロアレイ法では、例えば、細胞より抽出したpoly(A)-RNAをcy5-dCTP存在下逆転写して一本鎖cDNAプローブを作成し、ハイブリダイゼーションの結果をアレイスキャナー(Microarray scanner FLA8000 (Fujifilm))を用いて解析することで遺伝子発現を検出することができる。また、上記のRNAディスプレイ法では、抽出したRNAの逆転写産物を任意のプライマーを用いてPCRで増幅しその産物を比較することで遺伝子発現を検出することができる。

30

また、翻訳量を指標にした検出方法としては、特に制限はなく、例えば、タンパク質を含む画分を定法に従って回収し、該タンパク質の発現をSDS-PAGE、二次元電気泳動法等の電気泳動法で検出する方法が挙げられる。

本発明の同定方法においては、次いで、ジベレリンを接触させない場合(対照)と比べ発現が変化している遺伝子を同定する。特定の遺伝子の発現が、対照と比べ増加している場合には、該遺伝子はジベレリンに反応して発現が誘導される遺伝子として同定される。一方、対照と比べ減少している場合には、該遺伝子はジベレリンに反応して発現が抑制される遺伝子として同定される。

40

本発明は、また、ジベレリン応答性遺伝子のスクリーニング方法を提供する。該スクリーニング方法においては、上記同定方法で同定された遺伝子を単離する。遺伝子の単離方法としては、特に制限はない。例えば、遺伝子発現の検出において、DNAマイクロアレイ法を使用した場合は、誘導されると判定されたスポットに対応するクローンを(ジーンバンク等から)入手することで遺伝子を単離することができる。また、RNAディスプレイ法を使用した場合は、増幅が確認されたバンドをゲルから切り出してPCRで増幅し、クローニング後、ライブラリーをスクリーニングして全長鎖cDNAを得ることができる。単離された遺伝子は、ノーザンハイブリダイゼーション法などを利用して、ジベレリン依存的な発現の誘導を確認することが好ましい。

50

本発明は、さらに、被験遺伝子について、ジベレリン応答性の有無を評価する方法を提供する。

本発明の評価方法においては、まず、植物培養細胞にジベレリンを接触させる。被験遺伝子としては、特に制限はない。ジベレリン応答性の有無を評価したい所望の遺伝子を被験遺伝子とすることができる。用いる植物培養細胞の由来および調製、用いるジベレリン、およびジベレリンの植物培養細胞への接触は、上記本発明の同定方法と同様である。

本発明の評価方法においては、次いで、ジベレリンが接触された植物培養細胞における被験遺伝子の発現を測定する。

被験遺伝子の発現は、本発明の同定方法と同様に、転写レベルで検出しても翻訳レベルで検出してもよい。転写レベルでの検出は、例えば、ジベレリンを接触させた培養細胞から mRNA を定法に従って抽出し、この mRNA に対して、被験遺伝子に対応する mRNA にハイブリダイズするポリヌクレオチドをプローブとしてハイブリダイゼーション反応を行うノーザンハイブリダイゼーション法、また上記のようにして抽出した mRNA を鋳型に、被験遺伝子に対応する mRNA にハイブリダイズする一対のオリゴヌクレオチドをプライマーとしてポリメラーゼ連鎖反応を行う RT-PCR 法を実施することによって行うことができる。

一方、翻訳レベルでの検出は、被験遺伝子によりコードされるタンパク質に対する抗体を用いたウェスタンブロットリング法、二次元電気泳動法によるスポットの出現位置などを利用して行うことができる。検出に用いる抗体は、当業者に公知の方法で調製することができる。

本発明の評価方法においては、次いで、上記被験遺伝子の発現が、ジベレリンを接触させない場合（対照）と比べ変化している場合に、被験遺伝子がジベレリン応答性を有すると判定される。即ち、被験遺伝子の発現が、対照と比べ増加している場合には、該遺伝子はジベレリンに反応して発現が誘導される遺伝子として同定される。一方、被験遺伝子の発現が、対照と比べ減少している場合には、該遺伝子はジベレリンに反応して発現が抑制される遺伝子として同定される。

発明を実施するための最良の形態

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。なお、実施例は、下記の材料および方法に従って実施した。

(1) イネ培養細胞； イネ培養細胞は発芽イネ (*Oryza sativa cv Nipponbare*) 種子より 1 PPM の 2, 4 D (2, 4 - ジクロロフェノキシ酢酸) を含む N6 寒天培地上で誘導し、N6 液体培地で以下のように継代した。週に一度生体積約 1 ml 程度の細胞を 150 ml の N6 培地に植え継いだ。2 週に一度 20 - mesh の金網を通して細胞塊を小さくする操作を行った。ノーザンブロットの RNA 抽出に供する細胞は裏ごししないで 30 ml の培地に植え継いだ細胞を 4 ~ 6 日間振とう培養したものをを用いた。

(2) RNA 抽出； イネ培養細胞および緑葉からの全 RNA 抽出はフェノール SDS 法に従って行った。組織体積の約 10 倍以上のフェノール (水で 90 % 程度飽和させたもの) およびこれと等量の抽出緩衝液 (50 mM Tris-HCl pH 9.0, 1 % SDS, 50 mM NaCl) 存在下ポリトロンホモジェナイザーで組織を磨砕した。遠心分離によって得た水層を繰り返しフェノール抽出した後、0.6 容のイソプロパノールを加えて攪拌し、全核酸を沈殿させた。これを水に溶かした後その 0.25 容の 10 M LiCl を加えて氷冷し高分子 RNA を遠心分離によって回収した。これを 70 % エタノールで洗浄したのち少量の水に溶解させて RNA 標品とした。

(3) 培養細胞および緑葉のジベレリン処理方法； 培養細胞をあらかじめ 2, 4 D を含まない N6 培地で数回洗浄後同じ培地に懸濁し 25 で 2 時間浸透した。ジベレリン (GA3 : エタノール溶液) をそれぞれの終濃度になるように加えて所定時間振とう培養後 RNA 抽出に供した。播種後 3 週間の日本晴植物体にジベレリンをスプレーで噴霧処理したタイムコースを追って 3, 4 葉をサンプリングし、全 RNA を抽出した。エリシター処理はイネ培養細胞に直接エリシター水溶液を投与することにより行った。

(4) ハイブリダイゼーション; ノーザンハイブリダイゼーションのためのRNA変性はグリオキサール法によった。10 µgの全RNA (3.7 µl) に2.7 µlのグリオキサール (終濃度1 M)、1.6 µlのリン酸ナトリウム (pH 7.0、終濃度10 mM)、8 µlのジメチルスルフォキシド (終濃度50%) を加えて50 °Cで1時間保温したのち1.4%アガロース (10 mMリン酸ナトリウム pH 7.0) 中で電気泳動した。泳動後RNAをナイロン膜 (バイオダインA) にブロットし80 °C、2時間処理をしてRNAを膜に固定した。ハイブリダイゼーションは50%フォルムアミド、0.1% SDS、0.1 mg/ml サケ精子DNA、5xSSPE (0.9 M NaCl, 50 mMリン酸ナトリウム, 5 mM EDTA pH 7.4)、5xデンハルト溶液 (0.1% 牛血清アルブミン、0.1% フィコール、0.1% ポリビニルピロリドン) 中で42 °C一昼夜行い、その後0.1xSSC (15 mM NaCl, 1.5 mMクエン酸ナトリウム) で、室温で5分間3回、65 °Cで30分間、2回洗浄した後X線フィルムに露光した。

(5) DNAマイクロアレイ解析; マイクロチップ (<http://cdna01.dna.affrc.go.jp/RMOS/index.html>) はイネゲノムプロジェクトにより1265クローンのイネESTを用いて作成された。エリシター無処理および15分処理した細胞より抽出したpoly(A)-RNAをcy5-dCTP存在下逆転写して一本鎖cDNAプローブを作成し、その結果をアレイスキャナー (Microarray scanner FLA8000 (Fujifilm)) を用いて解析した。

[実施例1]

これまでに、イネイモチ病菌細胞壁の主要成分の一つ、キチンのオリゴマー (N-アセチルキトオリゴ糖) がイネ培養細胞に対して種々の防御反応を低濃度で誘導する、すなわち強力なエリシター (生体防御反応を誘導する物質) として作用することが見出されている (Yamada, A., Shibuya, N., Kodama, O., and Akatsuka, T. Induction of phytoalexin formation in suspension-cultured rice cells by N-acetylchitooligosaccharides. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 1993, 57, 405-409.)。その過程で、これまでも知られていた防御関連酵素遺伝子、PAL、キチナーゼ、グルカナーゼが発現すること (He, D.-Y., Yazaki, Y., Nishizawa, Y., Takai, R., Yamada, K., Sakano, K., Shibuya, N., and Minami, E. Gene activation by cytoplasmic acidification in suspension-cultured rice cells in response to the potent elicitor, N-acetylchitoheptaose. *Mol. Plant-Microbe Int.*, 1998, 12, 1167-1174. Nishizawa, Y., Kawakami, A., Hibi, T., He, D.-Y., Shibuya, N., and Minami, E. Regulation of the chitinase gene expression in suspension-cultured rice cells by N-acetylchitooligosaccharide pathways leading to the activation of elicitor-responsive genes. *Plant Mol. Biol.*, 1999, 39, 907-914.)、これ以外により速いタイムコースでEL2、EL3、EL5という3種の新規な初期遺伝子が発現することを見出されている (Minami, E., Kuchitsu, K., He, D.-Y., Kouchi, H., Midoh, N., Ohtsuki, Y., and Shibuya, N. Two novel genes rapidly and transiently activated in suspension-cultured rice cells by treatment with N-acetylchitoheptaose, a biotic elicitor for phytoalexin production.

10

20

30

40

50

Plant Cell Physiol., 1996, 37, 563-567. Taka
i, R., Hasegawa, K., Kaku, K., Shibuya, N., and
Minami, E. Isolation and analysis of expres
sion mechanisms of a rice gene, EL5, whic
h shows structural similarity to ATL fam
ily from Arabidopsis, in response to N-ac
etylchitooligosaccharide elicitor, Plant
Sci., 2001, 160, 577-583.)。

本発明者は、DNAマイクロアレイでエリシター処理15分でシグナルが有意に増加した
2つのEST(c72495, AU094860)を農林水産ジーンバンクより入手して
全塩基配列を解読し、両者の推定アミノ酸配列について、既知配列との相同性検索を行っ
た。その結果、既知のGRASファミリー遺伝子と相同性を有することが判明した(図1
および図2)。

GRASとは、シロイヌナズナの根および茎の断面構造形成を司る遺伝子であり、転写因
子と推定されている遺伝子(Scarecrow)(Laurenzio, L., D.,
Wysocka-Diller, J., Malamy, J.E., Pysh, L., He
lariutta, Y., Freshour, G., Hahn, M.G., Feldma
nn, K.A., and Benfey, P.N. The SCARECROW ge
ne regulated an asymmetric cell division
that is essential for generating the rad
ial organization of the Arabidopsis root
. Cell, 1996, 86, 423-433.)、アラビドプシスにおいて、ジベレリ
ンのシグナルを負に制御する2種類の遺伝子(GAI、RGA)(Peng, J., Ca
rol, P., Richards, D.E., King, K.E., Cowling, R
. J., Murphy, G.P., and Harberd, N.P. Genes an
d Development, 1997, 11, 3194-3205. Silverst
one, A.L., Ciampaglio, C.N., and Sun, T-P. The
Arabidopsis RGA gene encodes a transcri
ptional regulator repressing the gibbere
llin signal transduction pathway. The Pla
nt Cell, 1998, 10, 155-169.)の頭文字をとって命名された遺伝
子ファミリーである(Pysh, L.D., Wysocka-Diller, J.W.,
Camilleri, C., Bouchez, D., and Benfey, P.N. T
he GRAS gene family in Arabidopsis: seque
nce characterization and basic expressio
n analysis of the SCARECROW-LIKE genes. T
he Plant J, 1999, 18, 111-119.)。GRASファミリーのア
ミノ酸配列は、相同性の低いN末領域、ロイシンヘプタド構造、VHIID領域等によっ
て特徴づけられる。このような構造は動物や微生物では知られておらず、植物に特有の
ものである。

エリシター処理によって誘導された両遺伝子はVHIID領域を有し、C末側のアミノ酸
配列はScarecrowおよびそのファミリーとの間でよく保存されていたが典型的な
ロイシンヘプタド構造は認められなかった。またジベレリンシグナルリプレッサーに特徴
的であり、ジベレリンのシグナルをキャッチする上で重要な働きをしているDELLA配
列(Herberd, N.P., King, K., E., Carol, P., Cowli
ng, R. J., Peng, J., and Richards, D.E. BioEssa
ys, 1998, 20, 1001-1008.)は存在しなかった。以後、C72495
をCIGR1遺伝子(塩基配列を配列番号: 1、アミノ酸配列を配列番号: 2に記す)、
AU94860をCIGR2遺伝子(塩基配列を配列番号: 3、アミノ酸配列を配列番号
: 4に記す)と命名した。ヌクレオチドレベルでの両者の相同性は57%、アミノ酸配列

10

20

30

40

50

レベルでの相同性は40%であった。ゲノミックサザンハイブリダイゼーションの結果、両遺伝子はそれぞれ1コピー存在するものと考えられた(図3)。

図4は両遺伝子産物ならびにこれまでに構造が明らかになったGRASファミリー遺伝子産物の推定分子進化系統を示す。CIGR2遺伝子はCIGR1遺伝子よりもむしろアラビドプシスのAtSCL5に近縁であると考えられた。またジベレリンシグナルリプレッサーは一つのサブファミリーを形成し、InoSGAI(SLR)はCIGR1遺伝子およびCIGR2遺伝子よりもトウモロコシやアラビドプシスのリプレッサーにより近縁であることが示唆された。

[実施例2]

GRASファミリー遺伝子産物は転写調節因子であると考えられているがそれらがどのような遺伝子発現の調節に関わっているかについての知見は得られていない。アラビドプシスのScarecrowは典型的な核移行シグナルをもたないが、N末側にセリン、スレオニン、プロリン、グルタミンが多いこと等の理由から転写因子と推測された。アラビドプシスのジベレリンシグナルリプレッサーの一つ、GAIおよびそれと極めてよく似た遺伝子GR5には核移行シグナル様の配列が存在した(Peng, J., Carol, P., Richards, D.E., King, K.E., Cowling, R.J., Murphy, G.P., and Harberd, N.P. *Genes and Development*, 1997, 11, 3194-3205.)。またもう一つのリプレッサーであるRGAが、GFPとの融合タンパク質を用いた実験で核に局在することが示された(Silverstone, A.L., Ciampaglio, C.N., and Sun, T-P. *The Arabidopsis RGA gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway. The Plant Cell*, 1998, 10, 155-169.)。CIGR1遺伝子およびCIGR2遺伝子についてその細胞内局在性を検討するためこれらの翻訳領域をGFPにin frameで連結したキメラプラスミドをパーティクルガン法によってタマネギ表皮細胞に導入し、融合タンパク質の挙動をGFPの蛍光を指標として追跡したところ、CIGR2・GFP融合タンパク質が細胞核に局在している像が観察された(図5)。またGFP単独ではそのような像は観察されなかったことから、CIGR2遺伝子産物は核に局在すると結論した。

[実施例3]

CIGR1遺伝子およびCIGR2遺伝子はいずれもDNAマイクロアレイ解析によってエリシター応答性遺伝子として同定された。そこでこれらの両遺伝子のエリシター応答性をノーザンブロットハイブリダイゼーション法によって解析した。両遺伝子ともキチン7量体処理5分後にそのmRNA量の顕著な増加が観察されはじめ90分に至るまで発現量は増加し続けた(図6a)。キチンオリゴマーのイネに対するエリシター活性はそのサイズに依存し、7または8量体がもっとも強い活性をもつこと、脱アセチル体であるキトサンオリゴマーは活性が極めて低いことがこれまでの研究により明らかになっている。そこで1~7量体のキチンオリゴマーおよび4, 7量体のキトサンオリゴマーを処理したときのこれら両遺伝子の発現誘導を調べた。両者ともキチンの7量体にもっとも強く応答し、キトサンのオリゴマーには有意な応答を示さなかった(図6b)。

[実施例4]

芦刈ら(Ashikari, M., Wu, J., Yano, M., Sasaki, T., and Yoshimura, A. *Rice gibberellin-insensitive dwarf mutant gene Dwarf 1 encodes the alpha-subunit of GTP-binding protein. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999, 96, 10284-10289.)、藤澤ら(Fujisawa, Y., Kato, T., Ishikawa, A., Kitano, H., Sasaki, T., Asahi, T., and Iwasaki, Y. *Suppression of the heterodimeric G*

10

20

30

40

50

protein causes abnormal morphology, including dwarfism, in rice. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1999, 96, 7575 - 7580.) は独立に、イネわい性変異体 d1 の原因遺伝子 (D1) が 3 量体型 G タンパク質 サブユニットをコードしていることを見いだした。動物細胞においては 3 量体型 G タンパク質は 7 回膜貫通型受容体と共役して細胞外の情報を伝達する重要な役割をもつことが知られている (Neer, E. J. Heterotrimeric G proteins: Organizers of transmembrane signals. 1995, Cell 50, 1011 - 1019.)。

一方、エリシターシグナルの伝達過程においてはこの阻害剤あるいは活性化剤を用いた研究からその関与が示唆されている (Legendre, L., Heinsyein, P. F., and Low, P. S. Evidence for participation of GTP-binding proteins in elicitation of the rapid oxidative burst in cultured soybean cells. J. Biol. Chem. 1992, 267, 20140 - 20147.) がこれらの阻害剤はその特異性が必ずしも明確でないなどの問題点が指摘されており (Ephritikhine, G., Pradier, J.-M., and Guern, J. Complexity of GTP S binding to tobacco plasma membranes. Plant Physiol. Biochem. 1993, 31, 573 - 584.)、D1 遺伝子産物の関与についても明確な結論は得られていない。

塚田らは d1 系統の種子由来のカルスにおけるエリシター応答性諸反応を野生型と詳細に比較し、有意な差が認められないことを示した (Tsukada, K., Ishizaka, M., Fujisawa, Y., Iwasaki, Y., Yamaguchi, T., Minami, E., and Shibuya, N. Rice receptor for chitin oligosaccharide elicitor does not couple to heterotrimeric G-protein: Elicitor responses of suspension cultured rice cells from Daikoku dwarf (d1) mutant lacking a functional G-protein subunit. Physiol. Plantarum, 2002, 116, 373 - 382)。

予備的実験の結果から CIGR1 遺伝子および CIGR2 遺伝子の d1 系統におけるエリシター誘導も野生型と同じタイムコースをたどることを確認した。

一方、上口・田中ら (Ueguchi-Tanaka, M., Fujisawa, Y., Kobayashi, M., Ashikari, M., Iwasaki, Y., Kitano, H., and Matsuoka, M. Rice dwarf mutant d1, which is defective in the subunit of the heterotrimeric G protein, affects gibberellin signal transduction. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2000, 97, 11638 - 11643.) は発芽種子アリュuronにおける アミラーゼの誘導を指標として、ジベレリンのシグナル伝達に D1 遺伝子が関与していることを示した。これより先に Schumacherら (Schumacher, K., Schmitt, T., Rossberg, M., Schmitz, G., and Theres, K. The Lateral suppressor (Ls) gene of tomato encodes a new member of the VHIIID protein family. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1999, 96, 290 - 295.) はトマトの腋芽抑制遺伝子の産物が Scarecrow と同じ遺伝子ファミリーに属することを明らかにし、その形態形成における役割の考察においてこの遺伝子産物とジベレリンとの何らかの相互作用の可能性を指摘した。

10

20

30

40

50

そこでC I G R 1 遺伝子およびC I G R 2 遺伝子についてそのジベレリン応答性を検討した。懸濁培養細胞に活性型ジベレリンの一つG A 3 を処理し、タイムコースを追ってこれら両遺伝子の発現変化を解析したが、処理3時間後まで見る限りでは両遺伝子ともその発現量に有意な変化は認められなかった。培養細胞の培地には細胞の分裂能を維持するために植物によって代謝されにくいオーキシンの一つである2, 4 D が含まれている。これがジベレリンの作用を抑制している可能性が考えられたため、細胞を2, 4 D を含まない培地であらかじめ洗浄した後、同じ培地中で2時間前培養し、G A 3 を処理したところ、処理10分後をピークとする一過的な発現が観察された(図7)。

これまで、ジベレリンシグナル伝達の研究は穀物種子のアリューロン組織におけるアミラーゼの誘導を指標とした解析が中心であり、培養細胞を用いた例は上記の結果が初めてである。そこでジベレリンによるC I G R 1 遺伝子およびC I G R 2 遺伝子の培養細胞での発現を指標としてその応答性をさらに詳細に解析した。

図8はこれら両遺伝子の発現誘導に対するG A 3 の濃度効果をみたものである。両遺伝子とも 10^{-6} MのG A 3 処理によってその発現が誘導されはじめ、 10^{-4} Mでほぼ飽和に達した。Vishnevetskyら(Vishnevetsky, M., Ovadis, M., Itzhaki, H., and Vainstein, A. CHRC, encoding a chromoplast-specific carotenoid-associated protein, is an early gibberellin acid-responsive gene. J. Biol. Chem. 1997, 272, 24747-24750.)はキュウリ花弁色素体のカロチノイド結合タンパク質、CHRCのジベレリンによる誘導には少なくとも 10^{-7} MのG A 3 が必要で、 10^{-4} Mまでほぼ直線的に発現量が増大することを報告しており、材料、遺伝子が異なるがG A 3 の有効濃度に関しては似たような結果となっている。

[実施例 5]

ジベレリンはオーキシンやサイトカイニンと異なり、生理活性ではなくentジベラン骨格をもつ化合物として定義されているため、その活性には大きな差がある。これまで述べてきたC I G R 1 遺伝子およびC I G R 2 遺伝子のG A 3 による発現誘導がその生理活性に基づくものかそれともentジベラン骨格自体にこの両遺伝子を誘導する活性があるのかを調べるために活性型(G A 1、G A 3、G A 4)、不活性型(G A 13、G A 17)のジベレリン(Crozier, A., Kuo, C. C., Durlley, R. C., and Pharis, R. P. The biological activities of 26 gibberellins in nine plant bioassays. Canadian J. Botany 1970, 48, 867-877.)によるこれら両遺伝子の発現誘導を解析した。その結果、両遺伝子とも活性型ジベレリンによってのみその発現が誘導された(図9)。この結果はこれまでに述べてきたジベレリンによるC I G R 1 遺伝子およびC I G R 2 遺伝子の発現誘導がジベレリンの受容体を介したシグナル伝達を介するものであることを強く示唆している。

[実施例 6]

培養細胞はオーキシン存在下で脱分化状態にあると考えられており、葉緑体をもたないために従属栄養条件下で生育するなど、植物体とは組織学的、生理学的に大きく異なるものである。したがってこれまで述べてきたC I G R 1 遺伝子およびC I G R 2 遺伝子のジベレリンによる誘導現象は培養細胞における特殊な現象である可能性が否定できない。そこでイネ緑葉において両遺伝子がジベレリンにどのように応答するかを解析した。播種後3週間のイネの3, 4葉にG A 3 ($50 \mu\text{M}$)をスプレータイムコースを追って全RNAを抽出して両遺伝子の発現量変化を解析した。その結果両遺伝子ともスプレー後30分をピークとする極めて迅速な一過的な発現を示した(図10)。したがって培養細胞における、ジベレリン受容体を介したシグナルは培養細胞特有のものではなく、イネ植物体においても機能していることが強く示唆された。

[実施例 7]

Kuoら(Kuo, A., Cappelluti, S., Cervantes-Cerv

10

20

30

40

50

antes, M., Rodriguez, M., and Bush, D. S. Okadaic acid, a protein phosphatase inhibitor, blocks calcium changes, gene expression and cell death induced by gibberellin in wheat aleurone cells. *The Plant Cell* 1996, 8, 259 - 269.) はコムギアリューロン層における アミラーゼのジベレリンによる誘導がタンパク質脱リン酸化酵素阻害剤の一つであるオカダ酸によって特異的に阻害されることを見いだした。オカダ酸は動物のタンパク質脱リン酸化酵素のうち P P 1、P P 2 B を阻害することが知られている。

一方タンパク質リン酸化酵素阻害剤であるスタウロスポリン、K - 2 5 2 - A はほとんど阻害しなかったことから、ジベレリンから アミラーゼ遺伝子に至るシグナル伝達にはタンパク質リン酸化、特にタンパク質脱リン酸化酵素が重要な関与をしていると推測した。一方、これまでの我々の結果ではエリシター応答性遺伝子の発現誘導は K - 2 5 2 - A の前処理によって強く阻害されることが明らかになっている (He, D. - Y., Yazaki, Y., Nishizawa, Y., Takai, R., Yamada, K., Sakano, K., Shibuya, N., and Minami, E. Gene activation by cytoplasmic acidification in suspension-cultured rice cells in response to the potent elicitor, N-acetylchitohexaose. *Mol. Plant-Microbe Int.* 1998, 12, 1167 - 1174. Nishizawa, Y., Kawakami, A., Hibi, T., He, D. - Y., Shibuya, N., and Minami, E. Regulation of the chitinase gene expression in suspension-cultured rice cells by N-acetylchitooligosaccharides: differences in the signal transduction pathways leading to the activation of elicitor-responsive genes. *Plant Mol. Biol.* 1999, 39, 907 - 914.)。

そこでイネ培養細胞における C I G R 1 遺伝子および C I G R 2 遺伝子のジベレリンおよびエリシターによる誘導における種々の阻害剤の影響を検討した。まず K u o らの結果を参照してオカダ酸を前処理した細胞では両遺伝子のキチン 7 量体による誘導はほとんど阻害されなかったのに対して G A 3 による誘導はほぼ完全に阻害された (図 1 1 B) ことから、イネ培養細胞における C I G R 1 遺伝子および C I G R 2 遺伝子へのジベレリンからのシグナル伝達にはタンパク質脱リン酸化酵素の関与が推定された。つぎにタンパク質リン酸化酵素阻害剤について検討した。受容体型チロシンキナーゼの阻害剤として知られるラベンダスチン A はオカダ酸とほぼ同様の阻害を示し、キチン 7 量体による誘導をほとんど阻害しないのに対し G A 3 による誘導をほぼ完全に阻害した (図 1 1 C)。タンパク質セリン・スレオニンリン酸化酵素、タンパク質チロシンリン酸化酵素のいずれをも阻害するとされる K - 2 5 2 - A は両遺伝子のキチン 7 量体および G A 3 による誘導をほぼ完全に阻害した (図 1 1 D)。

コムギアリューロン層における アミラーゼのジベレリンによる誘導はオカダ酸によって阻害されるが K - 2 5 2 - A によっては阻害されないと報告されている (Kuo, A., Cappelluti, S., Cervantes - Cervantes, M., Rodriguez, M., and Bush, D. S. Okadaic acid, a protein phosphatase inhibitor, blocks calcium changes, gene expression and cell death induced by gibberellin in wheat aleurone cells. *The Plant Cell* 1996, 8, 259 - 269.)

。

10

20

30

40

50

図11の結果は、培養細胞におけるCIGR1遺伝子およびCIGR2遺伝子のジベレリン誘導においてもオカダ酸によって阻害されるタンパク質脱リン酸化酵素の関与のほかに、K-252-A、ラベンダスチンAによって阻害されるタンパク質リン酸化酵素の関与を示唆するものであり、アリュールン層におけるシグナル伝達との共通性、相違点が認められた。また、ジベレリンからのシグナル伝達はキチン7量体からのものとは質的に異なると考えられる。

Richardら(Donald E. Richards, Jinrong Peng, and Nicholas P. Harberd BioEssays vol 22, p 573-577(2000))は、GRASファミリーは後生動物に幅広く見いだされる転写因子、STATに対応するものであるという仮説を提唱している。STATではC末領域には動物の転写因子、STATファミリーに共通したSH2領域に類似した構造が見いだされる。SH2領域のC末端付近に動物のSTATでもよく保存されリン酸化を受けることが知られているチロシン残基、およびこのリン酸化チロシンと静電的に相互作用するとされるアルギニン残基が保存されている。アミノ酸配列のN-末付近はC末側に比べると相同性が低くなっている。これはGRASファミリーに一般的である。CIGR1遺伝子およびCIGR2遺伝子のヌクレオチドレベルでの相同性は57%であった。一方、ゲノミックサザンハイブリダイゼーションの結果これら両遺伝子は1コピーずつ存在するものと推定された(図3)。イネのゲノムDNA 5μgを制限酵素BamHI(B)、EcoRI(E)、HindIII(H)で完全消化し、アガロースゲル電気泳動で分離後、ニトロセルロース膜に転写した。これを³²Pで標識したCIGR1、CIGR2でハイブリダイズしたところcDNAのマップと一致するパターンが得られた。

このことからcDNAの全長鎖はそれぞれ対応する遺伝子産物と特異的にハイブリダイズするものと考えられた。両遺伝子ともジベレリンシグナルの負の制御因子であるGAI/RGAサブファミリーに共通するDELLA配列を有していない。

産業上の利用の可能性

本発明により、ジベレリン応答性遺伝子を網羅的かつ簡便に同定し、単離することが可能となった。また、本発明により、特定の遺伝子がジベレリン応答性を有するか否かを簡便に評価することが可能となった。本発明の方法により同定されたジベレリン応答性遺伝子は、発芽、伸長成長、花芽形成等が修飾された組み換え作物の作製などへの応用が期待される。

【配列表】

10

20

30

SEQUENCE LISTING

<110> National Institute of Agrobiological Sciences

<120> Isolation, characterization and use of two rice genes for
transcriptional factor responsive to oligochitin elicitors and phytoactive
gibberellins 10

<130> MOA-A0108P

<140>

<141>

20

<150> JP 2001-388993

<151> 2001-12-21

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.1

30

<210> 1

<211> 2135

<212> DNA

<213> Oryza sativa L cv Nipponbare

<220>

40

<221> CDS

<222> (137)..(1852)

<400> 1

gcacgagaga gaaccagaga gagagagaga gagagagaga gagagagagg agtgggaagtg 60

10

gatcggggca tcgctgcggc gtcggggctg tgcagatcgg aggaggatcat gaacgactaa 120

tctccgttca tttatt atg gac ttg cac cag tta tta aag tac aga ttg act 172

Met Asp Leu His Gln Leu Leu Lys Tyr Arg Leu Thr

1 5 10

20

ggc gct aac gtt gtg tac gaa att cct aca gag aac aac ttg caa aac 220

Gly Ala Asn Val Val Tyr Glu Ile Pro Thr Glu Asn Asn Leu Gln Asn

15 20 25

tct ccc tgg caa gct aac cca ctg aag tac gag ttc agc gat tcc cca 268

Ser Pro Trp Gln Ala Asn Pro Leu Lys Tyr Glu Phe Ser Asp Ser Pro

30 35 40

30

tac acc cct ctc tct tcc caa ttt gag tgt gac aat ttg tct gct ctt 316

Tyr Thr Pro Leu Ser Ser Gln Phe Glu Cys Asp Asn Leu Ser Ala Leu

45 50 55 60

40

acc aac act cca gat aac cag agc tct aca gaa acc aat tca gcc caa 364

Thr Asn Thr Pro Asp Asn Gln Ser Ser Thr Glu Thr Ile Ser Ala Gln

	65	70	75	
cca atc tcc cca tlg gaa gca gac agc tca tat aga cag gcg ggt att				412
Pro Ile Ser Pro Leu Glu Ala Asp Ser Ser Tyr Arg Gln Ala Gly Ile				
	80	85	90	
				10
ctt ctc cag gag aac att caa gtg gga gct gat ccg ttg tat gct aca				460
Leu Leu Gln Glu Asn Ile Gln Val Gly Ala Asp Pro Leu Tyr Ala Thr				
	95	100	105	
tca aga cat aat atg caa cac gcc tta cgg gag att gag act gtt ctg				508
Ser Arg His Asn Met Gln His Ala Leu Arg Glu Ile Glu Thr Val Leu				20
	110	115	120	
atg gca cct gat aca gat gat gca aca act agc acc aag cat gag ttt				556
Met Ala Pro Asp Thr Asp Asp Ala Thr Thr Ser Thr Lys His Glu Phe				
	125	130	135	140
				30
gag gaa atc aag cct gct cag ctt gtg agg cag cgg tcg aga aca tgg				604
Glu Glu Ile Lys Pro Ala Gln Leu Val Arg Gln Arg Ser Arg Thr Trp				
	145	150	155	
agt cat gaa tca egg cag ccg tta cct gga gtt ggt cgg tca cag ttt				652
Ser His Glu Ser Arg Gln Pro Leu Pro Gly Val Gly Arg Ser Gln Phe				40
	160	165	170	

gca tct ggt gga tac ccc aca gca agc tat gaa ttt cgt cca gag aaa 700

Ala Ser Gly Gly Tyr Pro Thr Ala Ser Tyr Glu Phe Arg Pro Glu Lys

175

180

185

cgg caa agg gag tta agg gaa gac cct cag ata att gtg aag cag cta 748

Arg Gln Arg Glu Leu Arg Glu Asp Pro Gln Ile Ile Val Lys Gln Leu

10

190

195

200

tta acc agg tgt gct gag gct ctg agt gag gac agg aca gag gag ttc 796

Leu Thr Arg Cys Ala Glu Ala Leu Ser Glu Asp Arg Thr Glu Glu Phe

205

210

215

220

20

cat aag ctt gtt cag gag gct cgt gga gtg gtc tca atc aac ggg gaa 844

His Lys Leu Val Gln Glu Ala Arg Gly Val Val Ser Ile Asn Gly Glu

225

230

235

cca atc caa cgt cta ggt gct tac cta ctg gag ggt ttg gtt gct aga 892

Pro Ile Gln Arg Leu Gly Ala Tyr Leu Leu Glu Gly Leu Val Ala Arg

30

240

245

250

cat gga aac tct ggc aca aac atc tac cgt gct ctg aag tgc cgt gag 940

His Gly Asn Ser Gly Thr Asn Ile Tyr Arg Ala Leu Lys Cys Arg Glu

255

260

265

40

cca gag agc aag gag ctc ctg tcc tac atg aga att cta tac aat atc 988

Pro Glu Ser Lys Glu Leu Leu Ser Tyr Met Arg Ile Leu Tyr Asn Ile

270	275	280	
tgc cct tac ttc aag ttt ggc tat atg gca gcc aat ggg gcg att gca			1036
Cys Pro Tyr Phe Lys Phe Gly Tyr Met Ala Ala Asn Gly Ala Ile Ala			
285	290	295	300
			10
gaa gca ttg aga act gag aac aat atc cac ata att gat ttt cag att			1084
Glu Ala Leu Arg Thr Glu Asn Asn Ile His Ile Ile Asp Phe Gln Ile			
	305	310	315
gct caa ggg act caa igg atc aca ctg ata caa gca tta gct gca agg			1132
Ala Gln Gly Thr Gln Trp Ile Thr Leu Ile Gln Ala Leu Ala Ala Arg			20
	320	325	330
cct ggt ggt cct cct cgt gtg egg atc acc ggg ata gat gac cca gtg			1180
Pro Gly Gly Pro Pro Arg Val Arg Ile Thr Gly Ile Asp Asp Pro Val			
	335	340	345
			30
tca gag tat gct cgt ggt gaa ggt ctt gac att gtg ggg aaa atg ttg			1228
Ser Glu Tyr Ala Arg Gly Glu Gly Leu Asp Ile Val Gly Lys Met Leu			
	350	355	360
aaa agc atg tct gaa gaa ttc aaa ata cct ctg gag ttt acg cct ctg			1276
Lys Ser Met Ser Glu Glu Phe Lys Ile Pro Leu Glu Phe Thr Pro Leu			40
365	370	375	380

tct gtc tat gcc aca caa gtc acg aaa gag atg ctt gag atc agg cca	1324	
Ser Val Tyr Ala Thr Gln Val Thr Lys Glu Met Leu Glu Ile Arg Pro		
385	390	395
ggt gaa gca ctg tct gta aac ttc aca ctc cag cta cac cac acc cgg	1372	
Gly Glu Ala Leu Ser Val Asn Phe Thr Leu Gln Leu His His Thr Pro		10
400	405	410
gac gag agc gtg gat gtc aac aac cca cgc gat ggt ctg cta ccg gat	1420	
Asp Glu Ser Val Asp Val Asn Asn Pro Arg Asp Gly Leu Leu Pro Asp		
415	420	425
		20
ggt gaa agg gct gtc ccc gaa ggt gac tac ttt ggt aga gca gga gtc	1468	
Gly Glu Arg Ala Val Pro Glu Gly Asp Tyr Phe Gly Arg Ala Gly Val		
430	435	440
aca cac caa cac aac gcc ttt ctt gat gag gtt tgg gga gac cat gga	1516	
Thr His Gln His Asn Ala Phe Leu Asp Glu Val Trp Gly Asp His Gly		30
445	450	455
460		
gta cta ctc cgc cat gtt cga gtc gat cga ctg cca acc tgc cgc ggg	1564	
Val Leu Leu Arg His Val Arg Val Asp Arg Leu Pro Thr Cys Arg Gly		
465	470	475
		40
aca aca agg aga gga tca gcg tgg agc agc act gcc tgc cca agg cac	1612	
Thr Thr Arg Arg Gly Ser Ala Trp Ser Ser Thr Ala Ser Pro Arg His		

480	485	490	
atc gtc aac atc atc gcc tgc gag ggg aag gac agg gtg gag agg cat			1660
Ile Val Asn Ile Ile Ala Cys Glu Gly Lys Asp Arg Val Glu Arg His			
495	500	505	
gag ctg ctt ggc aag tgg aag tgc agg ctg acc atg gcc ggc ttc agg			1708
Glu Leu Leu Gly Lys Trp Lys Ser Arg Leu Thr Met Ala Gly Phe Arg			
510	515	520	10
cct tac ccg ttg agc tgc tac gtc aac tgc gtg ata agg aag ctt ctc			1756
Pro Tyr Pro Leu Ser Ser Tyr Val Asn Ser Val Ile Arg Lys Leu Leu			20
525	530	535	540
gcc tgc tac tcc gat aaa tac aca tgg gat gag aag gac ggc gcg atg			1804
Ala Cys Tyr Ser Asp Lys Tyr Thr Leu Asp Glu Lys Asp Gly Ala Met			
545	550	555	30
ctt ctc ggc tgg agg agc aga aag ctg ata tct gct tct gcg tgg cac			1852
Leu Leu Gly Trp Arg Ser Arg Lys Leu Ile Ser Ala Ser Ala Trp His			
560	565	570	
tgacagtagt atgttgagaa gaagaaatga tagagagcat atatatacat accgattccc			1912
tggtccaatt tacagaatga tacccttiga tgtaccctca gtttgattga cagcgggigt			1972
			40

tgcccttcatt tatagaccag gatcaaacat tgacattaga tttgtagaga agttgtatga 2032

taataatttc ttggcgattt caatgtatga tgtatccatg gctgccaatag ttaataatat 2092

tccttgcatag tcaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa 2135

10

<210> 2

<211> 572

<212> PRT

<213> Oryza sativa L cv Nipponbare

20

<400> 2

Met Asp Leu His Gln Leu Leu Lys Tyr Arg Leu Thr Gly Ala Asn Val

1 5 10 15

Val Tyr Glu Ile Pro Thr Glu Asn Asn Leu Gln Asn Ser Pro Trp Gln

20 25 30

30

Ala Asn Pro Leu Lys Tyr Glu Phe Ser Asp Ser Pro Tyr Thr Pro Leu

35 40 45

Ser Ser Gln Phe Glu Cys Asp Asn Leu Ser Ala Leu Thr Asn Thr Pro

50 55 60

40

Asp Asn Gln Ser Ser Thr Glu Thr Ile Ser Ala Gln Pro Ile Ser Pro

65	70	75	80	
Leu Glu Ala Asp Ser Ser Tyr Arg Gln Ala Gly Ile Leu Leu Gln Glu				
	85	90	95	
Asn Ile Gln Val Gly Ala Asp Pro Leu Tyr Ala Thr Ser Arg His Asn				10
	100	105	110	
Met Gln His Ala Leu Arg Glu Ile Glu Thr Val Leu Met Ala Pro Asp				
	115	120	125	
Thr Asp Asp Ala Thr Thr Ser Thr Lys His Glu Phe Glu Glu Ile Lys				20
	130	135	140	
Pro Ala Gln Leu Val Arg Gln Arg Ser Arg Thr Trp Ser His Glu Ser				
145	150	155	160	
Arg Gln Pro Leu Pro Gly Val Gly Arg Ser Gln Phe Ala Ser Gly Gly				30
	165	170	175	
Tyr Pro Thr Ala Ser Tyr Glu Phe Arg Pro Glu Lys Arg Gln Arg Glu				
	180	185	190	
Leu Arg Glu Asp Pro Gln Ile Ile Val Lys Gln Leu Leu Thr Arg Cys				40
	195	200	205	

Ala Glu Ala Leu Ser Glu Asp Arg Thr Glu Glu Phe His Lys Leu Val
210 215 220

Gln Glu Ala Arg Gly Val Val Ser Ile Asn Gly Glu Pro Ile Gln Arg
225 230 235 240

Leu Gly Ala Tyr Leu Leu Glu Gly Leu Val Ala Arg His Gly Asn Ser
245 250 255

Gly Thr Asn Ile Tyr Arg Ala Leu Lys Cys Arg Glu Pro Glu Ser Lys
260 265 270

Glu Leu Leu Ser Tyr Met Arg Ile Leu Tyr Asn Ile Cys Pro Tyr Phe
275 280 285

Lys Phe Gly Tyr Met Ala Ala Asn Gly Ala Ile Ala Glu Ala Leu Arg
290 295 300

Thr Glu Asn Asn Ile His Ile Ile Asp Phe Gln Ile Ala Gln Gly Thr
305 310 315 320

Gln Trp Ile Thr Leu Ile Gln Ala Leu Ala Ala Arg Pro Gly Gly Pro
325 330 335

Pro Arg Val Arg Ile Thr Gly Ile Asp Asp Pro Val Ser Glu Tyr Ala
340 345 350

10

20

30

40

Arg Gly Glu Gly Leu Asp Ile Val Gly Lys Met Leu Lys Ser Met Ser

355

360

365

Glu Glu Phe Lys Ile Pro Leu Glu Phe Thr Pro Leu Ser Val Tyr Ala

370

375

380

10

Thr Gln Val Thr Lys Glu Met Leu Glu Ile Arg Pro Gly Glu Ala Leu

385

390

395

400

Ser Val Asn Phe Thr Leu Gln Leu His His Thr Pro Asp Glu Ser Val

405

410

415

20

Asp Val Asn Asn Pro Arg Asp Gly Leu Leu Pro Asp Gly Glu Arg Ala

420

425

430

Val Pro Glu Gly Asp Tyr Phe Gly Arg Ala Gly Val Thr His Gln His

435

440

445

30

Asn Ala Phe Leu Asp Glu Val Trp Gly Asp His Gly Val Leu Leu Arg

450

455

460

His Val Arg Val Asp Arg Leu Pro Thr Cys Arg Gly Thr Thr Arg Arg

465

470

475

480

40

Gly Ser Ala Trp Ser Ser Thr Ala Ser Pro Arg His Ile Val Asn Ile

485

490

495

Ile Ala Cys Glu Gly Lys Asp Arg Val Glu Arg His Glu Leu Leu Gly

500

505

510

Lys Trp Lys Ser Arg Leu Thr Met Ala Gly Phe Arg Pro Tyr Pro Leu

10

515

520

525

Ser Ser Tyr Val Asn Ser Val Ile Arg Lys Leu Leu Ala Cys Tyr Ser

530

535

540

Asp Lys Tyr Thr Leu Asp Glu Lys Asp Gly Ala Met Leu Leu Gly Trp

20

545

550

555

560

Arg Ser Arg Lys Leu Ile Ser Ala Ser Ala Trp His

565

570

30

<210> 3

<211> 2204

<212> DNA

<213> Oryza sativa L cv Nipponbare

40

<220>

<221> CDS

<222> (301)..(1932)

<400> 3

cccgcgtccg cccacgcgtc cgcaccacct gcttcctccg cggctgcgtg cgcgcctcc 60

ccaacccttc gtctccccg ccggccgccc ctgagatccg acgcgcccga gcggagctcg 120

ctgagatttt gttcctgctg gatttctgaa atttactgg aggaactagag atatcaagta 180

10

caccaacaac aaactagiac aaagttttcc ttccagttaa tctgttcctg gatctccttg 240

ccatacgcga agcagtggat actatgcagt aattggttag gaggtcttia ctgaaccata 300

atg gct gat act cca act tcc cga atg att cat ccc ttc agc aat ata 348

20

Met Ala Asp Thr Pro Thr Ser Arg Met Ile His Pro Phe Ser Asn Ile

1 5 10 15

ccg agc caa aac ctg aag cag ttc cag tat tct gat aat cca cag cac 396

Pro Ser Gln Asn Leu Lys Gln Phe Gln Tyr Ser Asp Asn Pro Gln His

20 25 30

30

cct tgc cac cct tat agg gca ccc tea gac acc cac gtt gtg cca cat 444

Pro Cys His Pro Tyr Arg Ala Pro Ser Asp Thr His Val Val Pro His

35 40 45

40

cat tat ggc cta aag tea cat tea ccg gat gct ggt tat gaa agc cag 492

His Tyr Gly Leu Lys Ser His Ser Pro Asp Ala Gly Tyr Glu Ser Gln

50	55	60	
gct act cct aac aag tac aca ttg gac tcc tct gaa ggt gct ggt tgt			540
Ala Thr Pro Asn Lys Tyr Thr Leu Asp Ser Ser Glu Gly Ala Gly Cys			
65	70	75	80
atg aga cat gat tct cct tcc agt caa agt ttc aca acc aga agt ggt			588
Met Arg His Asp Ser Pro Ser Ser Gln Ser Phe Thr Thr Arg Ser Gly			
	85	90	95
agc cct cta tct cag gaa gac agc cac tct gac tcg act gat gga tct			636
Ser Pro Leu Ser Gln Glu Asp Ser His Ser Asp Ser Thr Asp Gly Ser			20
	100	105	110
cct gta ggc gcc tcc tgt gtc act gag gat cct aat gat ctg aag caa			684
Pro Val Gly Ala Ser Cys Val Thr Glu Asp Pro Asn Asp Leu Lys Gln			
	115	120	125
aaa ctg aag gat ctc gag gcc gtt atg ctt ggg cca gac tcg gaa ata			732
Lys Leu Lys Asp Leu Glu Ala Val Met Leu Gly Pro Asp Ser Glu Ile			
	130	135	140
gtc aac agc ctt gag aat tcg gtg gca aac eaa ctt tcc ttg gag ccg			780
Val Asn Ser Leu Glu Asn Ser Val Ala Asn Gln Leu Ser Leu Glu Pro			40
	145	150	155
			160

gag aag tgg gtg cgc atg atg ggc att cct aga ggc aac ttg aaa gag	828	
Glu Lys Trp Val Arg Met Met Gly Ile Pro Arg Gly Asn Leu Lys Glu		
165	170	175
cct ctg att gcc tgt gct aga gct gtg gaa gag aag aat agc ttt gct	876	
Leu Leu Ile Ala Cys Ala Arg Ala Val Glu Glu Lys Asn Ser Phe Ala		10
180	185	190
att gat atg atg att cca gag ctg aga aaa ala gtt tcg gta tct ggt	924	
Ile Asp Met Met Ile Pro Glu Leu Arg Lys Ile Val Ser Val Ser Gly		
195	200	205
		20
gag cca ctt gag agg ttg gga gcc tac atg gta gaa ggg ctt gtt gcc	972	
Glu Pro Leu Glu Arg Leu Gly Ala Tyr Met Val Glu Gly Leu Val Ala		
210	215	220
agg ctt gcc tcc tct ggc att tca atc tac aaa gct ttg aaa tgc aag	1020	
Arg Leu Ala Ser Ser Gly Ile Ser Ile Tyr Lys Ala Leu Lys Cys Lys		30
225	230	235
240		
gaa cca aag agc ict gac ctt ctg tct tac atg cac ttc ctg tat gag	1068	
Glu Pro Lys Ser Ser Asp Leu Leu Ser Tyr Met His Phe Leu Tyr Glu		
245	250	255
		40
gcc tgt ccc tac ttc aag ttt ggg tat atg tcg gca aat ggt gct att	1116	
Ala Cys Pro Tyr Phe Lys Phe Gly Tyr Met Ser Ala Asn Gly Ala Ile		

260	265	270	
gca gag gct gtc aag gga gaa gac agg att cat atc atc gac ttc cat			1164
Ala Glu Ala Val Lys Gly Glu Asp Arg Ile His Ile Ile Asp Phe His			
275	280	285	
atc tct caa ggg gct cag tgg atc tct ctc ctt cag gcc ctt gca gcc			1212
Ile Ser Gln Gly Ala Gln Trp Ile Ser Leu Leu Gln Ala Leu Ala Ala			
290	295	300	10
agg cct ggt gga cca cca act gta agg atc act ggt att gat gac tea			1260
Arg Pro Gly Gly Pro Pro Thr Val Arg Ile Thr Gly Ile Asp Asp Ser			20
305	310	315	320
gtg tea gct tac gca cga ggc ggc ggg eta gag ctg gtc gga agg agg			1308
Val Ser Ala Tyr Ala Arg Gly Gly Gly Leu Glu Leu Val Gly Arg Arg			
325	330	335	30
ctg tcg cac atc gcc agc ctg tgc aag gtg ecc ttt gaa ttc cac cca			1356
Leu Ser His Ile Ala Ser Leu Cys Lys Val Pro Phe Glu Phe His Pro			
340	345	350	
ctt gct atc tcc ggc agc aag gtg gag gca gca cat ctc gga gtc atc			1404
Leu Ala Ile Ser Gly Ser Lys Val Glu Ala Ala His Leu Gly Val Ile			40
355	360	365	

ccc ggg gaa gcc ctc gcc gtg aac ttc acc ctg gag ctg cac cac att	1452	
Pro Gly Glu Ala Leu Ala Val Asn Phe Thr Leu Glu Leu His His Ile		
370 375 380		
cca gac gag tcg gtg agc acg gcg aac cac cgt gac cgc ctc cta agg	1500	
Pro Asp Glu Ser Val Ser Thr Ala Asn His Arg Asp Arg Leu Leu Arg		10
385 390 395 400		
atg gtg aag agc ctg tcg ccg aag gta ctc acc ctg gtg gag atg gag	1548	
Met Val Lys Ser Leu Ser Pro Lys Val Leu Thr Leu Val Glu Met Glu		
405 410 415		20
icc aac acg aac acg gcg cca ttc ccg cag agg ttc gcg gag acg ctg	1596	
Ser Asn Thr Asn Thr Ala Pro Phe Pro Gln Arg Phe Ala Glu Thr Leu		
420 425 430		
gac tac tac acc gcc atc ttc gag tcc atc gac ctg acg ctg ccg agg	1644	
Asp Tyr Tyr Thr Ala Ile Phe Glu Ser Ile Asp Leu Thr Leu Pro Arg		30
435 440 445		
gac gac agg gag agg atc aac atg gag cag cac tgc ctc gcg agg gag	1692	
Asp Asp Arg Glu Arg Ile Asn Met Glu Gln His Cys Leu Ala Arg Glu		
450 455 460		40
atc gtc aac ctc atc gcg tgc gag ggg gag gag agg gcg gag cgg tac	1740	
Ile Val Asn Leu Ile Ala Cys Glu Gly Glu Glu Arg Ala Glu Arg Tyr		

465

470

475

480

gag ccc ttc ggc aag tgg aag gcg cgc ctc acc atg gcc ggg ttc agg 1788

Glu Pro Phe Gly Lys Trp Lys Ala Arg Leu Thr Met Ala Gly Phe Arg

485

490

495

10

ccg tcg ccg ctc agc tcg ctg gtg aac gcc acc atc agg acg ctg ctg 1836

Pro Ser Pro Leu Ser Ser Leu Val Asn Ala Thr Ile Arg Thr Leu Leu

500

505

510

cag agc tac tcg gac aac tac aag ctc gcc gag agg gat ggg gcg ctc 1884

Gln Ser Tyr Ser Asp Asn Tyr Lys Leu Ala Glu Arg Asp Gly Ala Leu

515

520

525

20

tac ctc ggg igg aag agc agg ccc ctg gtg gtc tcg tcg gcg tgg cac 1932

Tyr Leu Gly Trp Lys Ser Arg Pro Leu Val Val Ser Ser Ala Trp His

530

535

540

30

tagcgttgtag actitgigag gigtatctgac gacgaacttc ccttgtaacc atcttggttg 1992

ggggcttttag aaagctatag igatcatgga ctggtaaggg tagctgtaac aatggigtig 2052

taatggtaag gtancggcta gggcctaaact cgaaaatggg caaaatgctg atnaggtgta 2112

40

naagttagt acatgttina nagtatatgt ttcagttttt cttttaaaaa aaaaaaaaaa 2172

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa

2204

<210> 4

<211> 544

<212> PRT

10

<213> Oryza sativa cv Nipponbare

<400> 4

Met Ala Asp Thr Pro Thr Ser Arg Met Ile His Pro Phe Ser Asn Ile

1 5 10 15

20

Pro Ser Gln Asn Leu Lys Gln Phe Gln Tyr Ser Asp Asn Pro Gln His

20 25 30

Pro Cys His Pro Tyr Arg Ala Pro Ser Asp Thr His Val Val Pro His

35 40 45

30

His Tyr Gly Leu Lys Ser His Ser Pro Asp Ala Gly Tyr Glu Ser Gln

50 55 60

Ala Thr Pro Asn Lys Tyr Thr Leu Asp Ser Ser Glu Gly Ala Gly Cys

65 70 75 80

40

Met Arg His Asp Ser Pro Ser Ser Gln Ser Phe Thr Thr Arg Ser Gly

85 90 95

Ser Pro Leu Ser Gln Glu Asp Ser His Ser Asp Ser Thr Asp Gly Ser

100

105

110

Pro Val Gly Ala Ser Cys Val Thr Glu Asp Pro Asn Asp Leu Lys Gln

115

120

125

10

Lys Leu Lys Asp Leu Glu Ala Val Met Leu Gly Pro Asp Ser Glu Ile

130

135

140

Val Asn Ser Leu Glu Asn Ser Val Ala Asn Gln Leu Ser Leu Glu Pro

145

150

155

160

20

Glu Lys Trp Val Arg Met Met Gly Ile Pro Arg Gly Asn Leu Lys Glu

165

170

175

Leu Leu Ile Ala Cys Ala Arg Ala Val Glu Glu Lys Asn Ser Phe Ala

180

185

190

30

Ile Asp Met Met Ile Pro Glu Leu Arg Lys Ile Val Ser Val Ser Gly

195

200

205

Glu Pro Leu Glu Arg Leu Gly Ala Tyr Met Val Glu Gly Leu Val Ala

210

215

220

40

Arg Leu Ala Ser Ser Gly Ile Ser Ile Tyr Lys Ala Leu Lys Cys Lys

225	230	235	240	
Glu Pro Lys Ser Ser Asp Leu Leu Ser Tyr Met His Phe Leu Tyr Glu				
	245	250	255	
Ala Cys Pro Tyr Phe Lys Phe Gly Tyr Met Ser Ala Asn Gly Ala Ile				10
	260	265	270	
Ala Glu Ala Val Lys Gly Glu Asp Arg Ile His Ile Ile Asp Phe His				
	275	280	285	
Ile Ser Gln Gly Ala Gln Trp Ile Ser Leu Leu Gln Ala Leu Ala Ala				20
	290	295	300	
Arg Pro Gly Gly Pro Pro Thr Val Arg Ile Thr Gly Ile Asp Asp Ser				
305	310	315	320	
Val Ser Ala Tyr Ala Arg Gly Gly Gly Leu Glu Leu Val Gly Arg Arg				30
	325	330	335	
Leu Ser His Ile Ala Ser Leu Cys Lys Val Pro Phe Glu Phe His Pro				
	340	345	350	
Leu Ala Ile Ser Gly Ser Lys Val Glu Ala Ala His Leu Gly Val Ile				40
	355	360	365	

Pro Gly Glu Ala Leu Ala Val Asn Phe Thr Leu Glu Leu His His Ile

370

375

380

Pro Asp Glu Ser Val Ser Thr Ala Asn His Arg Asp Arg Leu Leu Arg

385

390

395

400

10

Met Val Lys Ser Leu Ser Pro Lys Val Leu Thr Leu Val Glu Met Glu

405

410

415

Ser Asn Thr Asn Thr Ala Pro Phe Pro Gln Arg Phe Ala Glu Thr Leu

420

425

430

20

Asp Tyr Tyr Thr Ala Ile Phe Glu Ser Ile Asp Leu Thr Leu Pro Arg

435

440

445

Asp Asp Arg Glu Arg Ile Asn Met Glu Gln His Cys Leu Ala Arg Glu

450

455

460

30

Ile Val Asn Leu Ile Ala Cys Glu Gly Glu Glu Arg Ala Glu Arg Tyr

465

470

475

480

Glu Pro Phe Gly Lys Trp Lys Ala Arg Leu Thr Met Ala Gly Phe Arg

485

490

495

40

Pro Ser Pro Leu Ser Ser Leu Val Asn Ala Thr Ile Arg Thr Leu Leu

500

505

510

Gln Ser Tyr Ser Asp Asn Tyr Lys Leu Ala Glu Arg Asp Gly Ala Leu

515

520

525

Tyr Leu Gly Trp Lys Ser Arg Pro Leu Val Val Ser Ser Ala Trp His

530

535

540

10

<210> 5

<211> 625

<212> PRT

<213> *Oryza sativa* L cv Nipponbare

20

<400> 5

Met Lys Arg Glu Tyr Gln Glu Ala Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Ser

1

5

10

15

Ser Ala Asp Met Gly Ser Cys Lys Asp Lys Val Met Ala Gly Ala Ala

20

25

30

30

Gly Glu Glu Glu Asp Val Asp Glu Leu Leu Ala Ala Leu Gly Tyr Lys

35

40

45

Val Arg Ser Ser Asp Met Ala Asp Val Ala Gln Lys Leu Glu Gln Leu

50

55

60

40

Glu Met Ala Met Gly Met Gly Gly Val Ser Ala Pro Gly Ala Ala Asp
65 70 75 80

Asp Gly Phe Val Ser His Leu Ala Thr Asp Thr Val His Tyr Asn Pro
85 90 95

Ser Asp Leu Ser Ser Trp Val Glu Ser Met Leu Ser Glu Leu Asn Ala
100 105 110

Pro Leu Pro Pro Ile Pro Pro Ala Pro Pro Ala Ala Arg His Ala Ser
115 120 125

Thr Ser Ser Thr Val Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Phe Phe Glu Leu
130 135 140

Pro Ala Ala Ala Asp Ser Ser Ser Ser Thr Tyr Ala Leu Arg Pro Ile
145 150 155 160

Ser Leu Pro Val Val Ala Thr Ala Asp Pro Ser Ala Ala Asp Ser Ala
165 170 175

Arg Asp Thr Lys Arg Met Arg Thr Gly Gly Gly Ser Thr Ser Ser Ser
180 185 190

Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu Gly Gly Gly Ala Ser Arg Gly Ser Val
195 200 205

10

20

30

40

Val Glu Ala Ala Pro Pro Ala Thr Gln Gly Ala Ala Ala Ala Asn Ala
 210 215 220

Pro Ala Val Pro Val Val Val Val Asp Thr Gln Glu Ala Gly Ile Arg
 225 230 235 240

Leu Val His Ala Leu Leu Ala Cys Ala Glu Ala Val Gln Gln Glu Asn
 245 250 255

Phe Ala Ala Ala Glu Ala Leu Val Lys Gln Ile Pro Thr Leu Ala Ala
 260 265 270

Ser Gln Gly Gly Ala Met Arg Lys Val Ala Ala Tyr Phe Gly Glu Ala
 275 280 285

Leu Ala Arg Arg Val Tyr Arg Phe Arg Pro Ala Asp Ser Thr Leu Leu
 290 295 300

Asp Ala Ala Phe Ala Asp Leu Leu His Ala His Phe Tyr Glu Ser Cys
 305 310 315 320

Pro Tyr Leu Lys Phe Ala His Phe Thr Ala Asn Gln Ala Ile Leu Glu
 325 330 335

Ala Phe Ala Gly Cys His Arg Val His Val Val Asp Phe Gly Ile Lys

10

20

30

40

340

345

350

Gln Gly Met Gln Trp Pro Ala Leu Leu Gln Ala Leu Ala Leu Arg Pro

355

360

365

Gly Gly Pro Pro Ser Phe Arg Leu Thr Gly Val Gly Pro Pro Gln Pro

10

370

375

380

Asp Glu Thr Asp Ala Leu Gln Gln Val Gly Trp Lys Leu Ala Gln Phe

385

390

395

400

Ala His Thr Ile Arg Val Asp Phe Gln Tyr Arg Gly Leu Val Ala Ala

20

405

410

415

Thr Leu Ala Asp Leu Glu Pro Phe Met Leu Gln Pro Glu Gly Glu Ala

420

425

430

Asp Ala Asn Glu Glu Pro Glu Val Ile Ala Val Asn Ser Val Phe Glu

30

435

440

445

Leu His Arg Leu Leu Ala Gln Pro Gly Ala Leu Glu Lys Val Leu Gly

450

455

460

Thr Val His Ala Val Arg Pro Arg Ile Val Thr Val Val Glu Gln Glu

40

465

470

475

480

Ala Asn His Asn Ser Gly Ser Phe Leu Asp Arg Phe Thr Glu Ser Leu			
	485	490	495
His Tyr Tyr Ser Thr Met Phe Asp Ser Leu Glu Gly Gly Ser Ser Gly			
	500	505	510
			10
Gln Ala Glu Leu Ser Pro Pro Ala Ala Gly Gly Gly Gly Gly Thr Asp			
	515	520	525
Gln Val Met Ser Glu Val Tyr Leu Gly Arg Gln Ile Cys Asn Val Val			
	530	535	540
			20
Ala Cys Glu Gly Ala Glu Arg Thr Glu Arg His Glu Thr Leu Gly Gln			
545	550	555	560
Trp Arg Asn Arg Leu Gly Arg Ala Gly Phe Glu Pro Val His Leu Gly			
	565	570	575
			30
Ser Asn Ala Tyr Lys Gln Ala Ser Thr Leu Leu Ala Leu Phe Ala Gly			
	580	585	590
Gly Asp Gly Tyr Arg Val Glu Glu Lys Glu Gly Cys Leu Thr Leu Gly			
	595	600	605
			40
Trp His Thr Arg Pro Leu Ile Ala Thr Ser Ala Trp Arg Val Ala Ala			
	610	615	620

Ala

625

<210> 6

<211> 427

10

<212> PRT

<213> Lycopersicon esculentum

<400> 6

Leu Gly Ser Phe Gly Ser Ser Ser Ser Gln Ser His Pro His His Asp

20

1 5 10 15

Glu Glu Ser Ser Asp His His Gln Gln Arg Arg Phe Thr Ala Thr Ala

20 25 30

Thr Thr Ile Thr Thr Thr Thr Ile Thr Thr Ser Pro Ala Ile Gln Ile

30

35 40 45

Arg Gln Leu Leu Ile Ser Cys Ala Glu Leu Ile Ser Gln Ser Asp Phe

50 55 60

Ser Ala Ala Lys Arg Leu Leu Thr Ile Leu Ser Thr Asn Ser Ser Pro

40

65 70 75 80

Phe Gly Asp Ser Thr Glu Arg Leu Val His Gln Phe Thr Arg Ala Leu

85

90

95

Ser Leu Arg Leu Asn Arg Tyr Ile Ser Ser Thr Thr Asn His Phe Met

100

105

110

10

Thr Pro Val Glu Thr Thr Pro Thr Asp Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu

115

120

125

Ala Leu Ile Gln Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Asn Gln Val Thr Pro Phe

130

135

140

20

Ile Arg Phe Thr Gln Leu Thr Ala Asn Gln Ala Ile Leu Glu Ala Ile

145

150

155

160

Asn Gly Asn His Gln Ala Ile His Ile Val Asp Phe Asp Ile Asn His

165

170

175

30

Gly Val Gln Trp Pro Pro Leu Met Gln Ala Leu Ala Asp Arg Tyr Pro

180

185

190

Ala Pro Thr Leu Arg Ile Thr Gly Thr Gly Asn Asp Leu Asp Thr Leu

195

200

205

40

Arg Arg Thr Gly Asp Arg Leu Ala Lys Phe Ala His Ser Leu Gly Leu

210	215	220	
Arg Phe Gln Phe His Pro Leu Tyr Ile Ala Asn Asn Asn His Asp His			
225	230	235	240
Asp Glu Asp Pro Ser Ile Ile Ser Ser Ile Val Leu Leu Pro Asp Glu			10
	245	250	255
Thr Leu Ala Ile Asn Cys Val Phe Tyr Leu His Arg Leu Leu Lys Asp			
	260	265	270
Arg Glu Lys Leu Arg Ile Phe Leu His Arg Val Lys Ser Met Asn Pro			20
	275	280	285
Lys Ile Val Thr Ile Ala Glu Lys Glu Ala Asn His Asn His Pro Leu			
	290	295	300
Phe Leu Gln Arg Phe Ile Glu Ala Leu Asp Tyr Tyr Thr Ala Val Phe			30
305	310	315	320
Asp Ser Leu Glu Ala Thr Leu Pro Pro Gly Ser Arg Glu Arg Met Thr			
	325	330	335
Val Glu Gln Val Trp Phe Gly Arg Glu Ile Val Asp Ile Val Ala Met			40
	340	345	350

Glu Gly Asp Lys Arg Lys Glu Arg His Glu Arg Phe Arg Ser Trp Glu

355

360

365

Val Met Leu Arg Ser Cys Gly Phe Ser Asn Val Ala Leu Ser Pro Phe

370

375

380

10

Ala Leu Ser Gln Ala Lys Leu Leu Leu Arg Leu His Tyr Pro Ser Glu

385

390

395

400

Gly Tyr Gln Leu Gly Val Ser Ser Asn Ser Phe Phe Leu Gly Trp Gln

405

410

415

20

Asn Gln Pro Leu Phe Ser Ile Ser Ser Trp Arg

420

425

【図面の簡単な説明】

図1は、C I G R 1 遺伝子およびC I G R 2 遺伝子からコードされるアミノ酸配列とG R A S ファミリーとの比較を示す図である。S L R (O s G A I) はイネジベレリンシグナルリプレッサー（配列番号：5）、T o m a t o L s はトマト腋芽抑制因子（配列番号：6）を示す。4種類全てで保存されているアミノ酸を*で、3種類で保存されているアミノ酸を・で示す。

30

図2は、図1の続きを示す図である。

図3は、C I G R 1 遺伝子およびC I G R 2 遺伝子のゲノミックサザンハイブリダイゼーションの結果を示す写真である。Aは、C I G R 1 遺伝子を示す。Bは、C I G R 2 遺伝子を示す。

図4は、アミノ酸レベルでのC I G R 1 遺伝子およびC I G R 2 遺伝子の進化系統を示す図である。A t S C R はアラビドプシス S c a r e c r o w、A t S C L n は S c a r e c r o w 様遺伝子、A t G R S は A t G A I に類似の機能不明の遺伝子、A t G R A はアラビドプシスのジベレリンシグナルリプレッサー、A t G A I はアラビドプシスのジベレリンシグナルリプレッサー（G R A との機能分担については不明）、O s S L R はイネのジベレリンシグナルリプレッサー、T o m a t o L s はトマトの腋芽抑制因子、アラビドプシスの光シグナル伝達因子、A t S C L 2 1 はアラビドプシスの S c a r e c r o w 様遺伝子（機能不明）、C I G R 2 は本研究で報告したイネ遺伝子、A t s C L 1 3 はアラビドプシスの S c a r e c r o w 様遺伝子（機能不明）、A t S C L 5 はアラビドプシスの S c a r e c r o w 様遺伝子（機能不明）、C I G R 1 は本研究で報告したイネ遺伝子を示す。

40

図5は、C I G R 1 およびC I G R 2 遺伝子の核局在を示す写真である。3 5 S / C I G R 1 / G F P または 3 5 S / C I G R 2 / G F P 融合遺伝子をパーティクルガン法でタマネギ表皮細胞に導入し、レーザー共焦点顕微鏡で観察した。対照として 3 5 S / G F P 融合遺伝子を用いた。a は 3 5 S / G F P、b は 3 5 S / C I G R 1 / G F P、c は 3 5 S

50

/ C I G R 2 / G F P を表す。

図 6 は、C I G R 1 遺伝子および C I G R 2 遺伝子のキチンオリゴマーへの応答性を示す写真である。a は、キチン 7 量体処理による発現のタイムコース (分) を示す。b は、キチンおよびキトサンオリゴマーの誘導活性を示す。

図 7 は、C I G R 1 遺伝子および C I G R 2 遺伝子の G A 3 応答に対する 2 , 4 D の効果を示す写真である。時間は、G A 3 処理後の時間を示す。

図 8 は、C I G R 1 遺伝子および C I G R 2 遺伝子の発現誘導に及ぼす G A 3 の濃度効果を示す図および写真である。a は、各濃度 (単位はモル濃度) の G A 3 を 10 分間処理した後に抽出した全 R N A のノーザンプロットハイブリダイゼーション法による解析結果を示す写真である。b は、イメージアナライザーによる a のシグナルの定量結果を示す図である。四角が C I G R 1 遺伝子、白抜き三角が C I G R 2 遺伝子を示す。

10

図 9 は、ジベレリンの生理活性と遺伝子発現を示す図および写真である。イネ培養細胞に活性型 (G A 1、G A 3、G A 4)、不活性型 (G A 13、G A 17) のジベレリンを 10 分間処理し、全 R N A を抽出した。ノーザンプロットハイブリダイゼーション法で解析した結果を写真で示す。

図 10 は、G A 3 処理後のイネ緑葉における C I G R 1 遺伝子および C I G R 2 遺伝子の発現を示す写真である。イネ植物体に G A 3 をスプレー処理し、タイムコースを追って 3 , 4 葉をサンプリングした。3 , 4 葉より抽出した全 R N A をノーザンプロットハイブリダイゼーション法で解析した。

図 11 は、エリシター応答とジベレリン応答に対するタンパク質リン酸化阻害剤の効果を示す写真である。(A) エリシター応答のポジティブコントロール、(B) オカダ酸 (1 μ M)、(C) ラベンダスチン A (30 μ M)、(D) K - 252 - A (20 μ M) をキチン 7 量体 (G N 7) またはジベレリン (G A 3) 処理 10 分前に投与した。

20

【 図 1 】

図 1

CIGR1aa	1:M-----DLHQL---LKRYLTGANVVEIPT	22
CIGR2aa	1:M-----	1
SLR1 (OsGA1)aa	1:MKREYQEAGSSGGSSADMGCKDKVMAGAGEEEDVDELLAALGYKVRSSDMAD-VAQ	59
Tomato Ls aa	1:M-----	1
CIGR1aa	23:ENNLQNSPWQANPKYEFSDSPYTLSSQFECNDLSALNTNPQSSSTETISAQPI----	78
CIGR2aa	2:-----ADTPTS---RMIHPFSNI PSQNLK-QFYSDNPQHPCHPYRAPSDTHVPHYH---GL	52
SLR1 (OsGA1)aa	60:KLEQLQEMMGWGSAPGAADGDF-VS-HLATDTVHYNPSDLSWVESMLSELNAPLPP	117
Tomato Ls aa	1:-----	1
CIGR1aa	79:SPLEADSSYRQAGILLQENIQVGDPLYATSRHMQHALREIETVLMAPDDATTSTKH	138
CIGR2aa	53:KSHSPDAGYESQATPNKTYLDSSEAGCM---RHDSPPSQSFT-TRSGSPLSQEDSHSDST	109
SLR1 (OsGA1)aa	118:PPAPPAARHASTSSTVTGGGGGFFELPAAADSSSTYALRPI SLPVVATADPSAADSAR	177
Tomato Ls aa	1:-----	1
CIGR1aa	139:EFEEIKPAQLVRQSRRTWSHESRQP---LPGVGRSQFASGGYPTASYE---FRPEKRQRE	192
CIGR2aa	110:DGSPVGCVCATEDPNDLKQL-KOLEAVML-GPDSEI VNSLENSVAN-QLSLEPEKWRM	166
SLR1 (OsGA1)aa	178:DTKWRRTGGSTSSSSSSSLGGGASRGSVVEAAPPATQGA---ANAPAVPVVVD	234
Tomato Ls aa	1:-----LGSFGSSSQSPHHDDEESSDHHQRRFATATTTITTTITTT	43
CIGR1aa	193:LREDPQI VKQLLTRCAEALSEDRTFEFHKLVEARGVYSINCEPI QRLGAYLLEGLVAR	252
CIGR2aa	167:MG PRGNLKELLACARAVEEKNFAIDMI PELRKIVSVSGEPLERLGAVMVEGLVAR	225
SLR1 (OsGA1)aa	235:QEAG RLVHAL-L-ACAEAVQKQENFAAEALVKQ PTLAASQGGAMRKYVAAYFGEALARR	292
Tomato Ls aa	44:SPA-IQIRQ-L-LISCAELISQSDFSAAKRLTL LSTWSSPFGDSTERLWHQFTRALS	100
CIGR1aa	253:HGNSGTNI---YRALCKR---EPESKELLSYMR LYNIC---PYFKFGYMAANGAIAEA	302
CIGR2aa	226:LASSG SI---YKALCK---EPKSDLLSYMHFLYEAC---PYFKFGYMSANGAIAEA	275
SLR1 (OsGA1)aa	293:VYR-----FRP-ADSTLLDAAFADL---LHAHFYE---SC-PYLKFAHFTANQAILEA	337
Tomato Ls	101:LNRYISSTTNHFMTPVETPTDSSSSSLALIQSSYLSLNQVTFPIRFTQLTANQAILEA	160

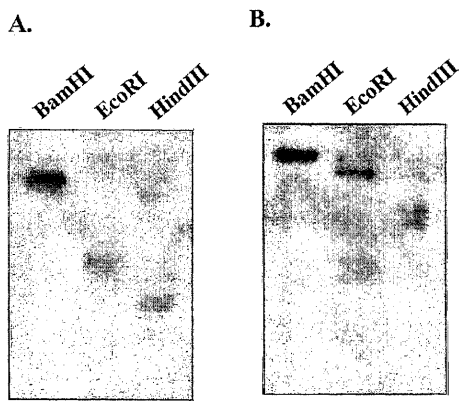
【 図 2 】

図 2

CIGR1aa	303:LRTENNIHI-IDFQIAQGTQWITL QALAAAPCGPPRV-RITGIDDPVSEYARGELDIV	360
CIGR2aa	276:VKGEDRIHI-IDFHI SQGAQWI SLQLAARPCGGPPTV-RITGIDDSVYARGGGLLV	333
SLR1 (OsGA1)aa	338:FAGCHRY-HVVDVFGIKQGMQWALLQALALR-PGGPSPFRLLTGVGPPQDETA---LQQV	393
Tomato Ls aa	161:INGNHQAIHI VDFO NHGQWPLMQALADRYPA-PT-LRITGTGN---DLDT---LRRT	212
CIGR1aa	361:GKMLKSMSEEFKI PLEFTPLSVYATQVTKMELEIRPEGLAVSNVFTL-----Q---LHH	410
CIGR2aa	334:GRRLSHIA SLCKVPEFPHPLAI SGKVEAAHLGV PGEALAVNFTL-----E---LHH	383
SLR1 (OsGA1)aa	394:GNLQAFHTI RVDFQYRGLVAATLA-DLEPFLMQPEGEADANEEPEVIA-VMSVFLHR	451
Tomato Ls aa	213:GDRLAKFAHSLGLRFQFPLI ANNHHDH---EDPSI SSL PDETLAINCVFLYLR	269
CIGR1aa	411:TPDESVDVNNPRDGLL PDGERAVPEGDYFGRAGV-THQHNAF---LDEVWGDHGVLLRHV	466
CIGR2aa	384:IPDESSTANHRDRLRMK SLSPKVLTLVEMESNT-NTPFPQRFQFETLOYTAFESI	442
SLR1 (OsGA1)aa	452:LLAQPGALEKY-LGT7VHVRPRLVTVVEQEAHNNSGSLDRFTRSHYSTMFDSLEGG	510
Tomato Ls aa	270:LLKDRKRLR-IFLHRVKSNNPK VTI AEKEANNHNPFLQRF EALDYTTAVFDSLEA---	326
CIGR1aa	467:RVDRL---PTCRGTRRGSAWS-STASP---RHI VNI ACEGKDRVERHELLGKWKSLTMA	521
CIGR2aa	443:DLT-L-P---RDDRERINMEQHCLA---REI VNI ACEGEERAEYEPFKWIKARLMA	493
SLR1 (OsGA1)aa	511:SQQAELSP-PAAGGGGTDQVMSE-VYLGRQ CNVIVACEGAERTHERETLGNWRNLGRA	568
Tomato Ls aa	327:---TLPP---GSR---ERMTVEQVNFGREI VDI VAMEGDKRKRHERFRSWEVMLRSC	375
CIGR1aa	522:GFRPYPLSSYVNSV RKLLACYSOK---YTLDKDGAMLLGWRSKLI SASAWH---	572
CIGR2aa	494:GFRPSPLSLVNI RTLLQSYSON---YKLAERDGLYLGNKSRPLVSSAWH---	544
SLR1 (OsGA1)aa	569:GPEPHLGSNAYKQASTLLAL-FACGGYRVEEKECCLT LWHYR IATSANRWAAA	625
Tomato Ls aa	376:GFSWVAL-SPFALSQAKLL LRLHYSEGVQLGVSSNSFFLQWQQLPFSI SSWR---	428

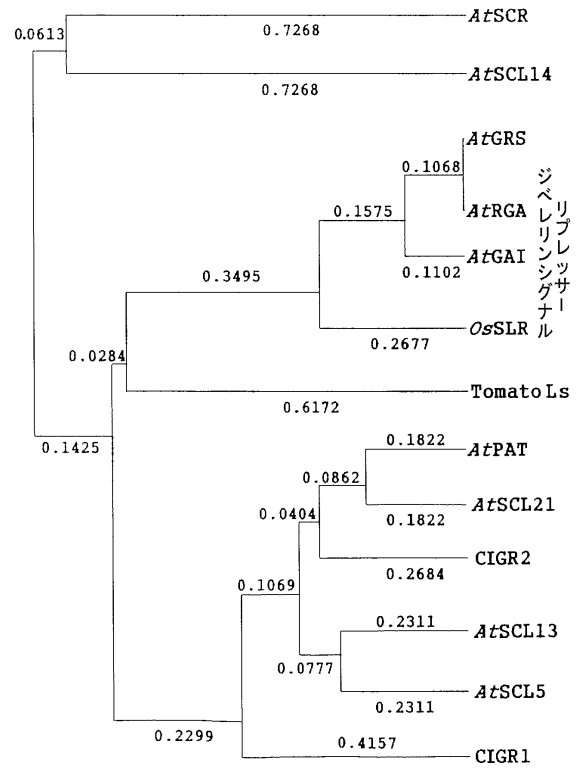
【 図 3 】

図 3



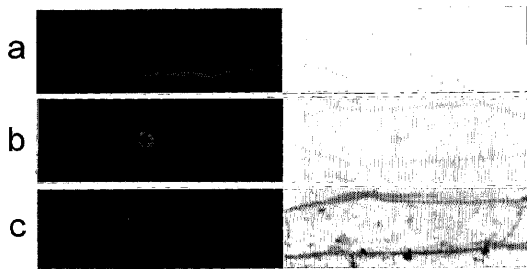
【 図 4 】

図 4



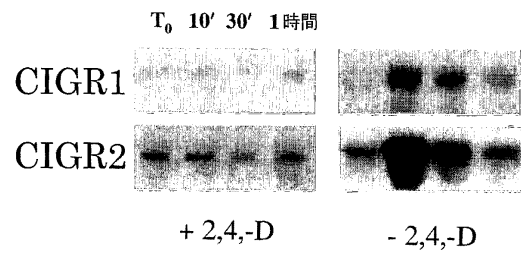
【 図 5 】

図 5



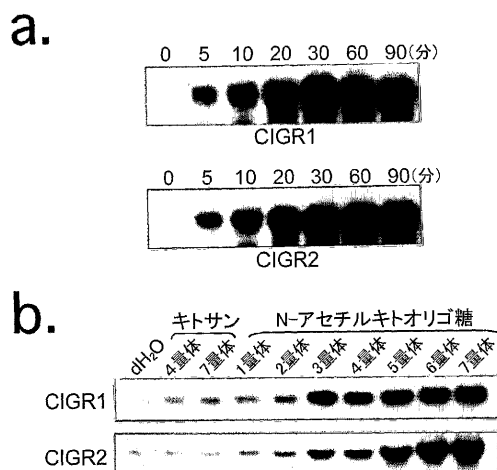
【 図 7 】

図 7



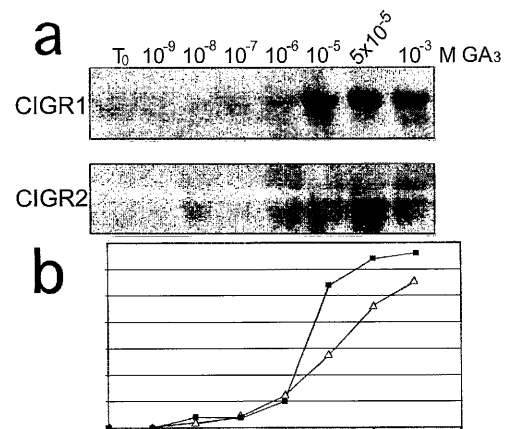
【 図 6 】

図 6



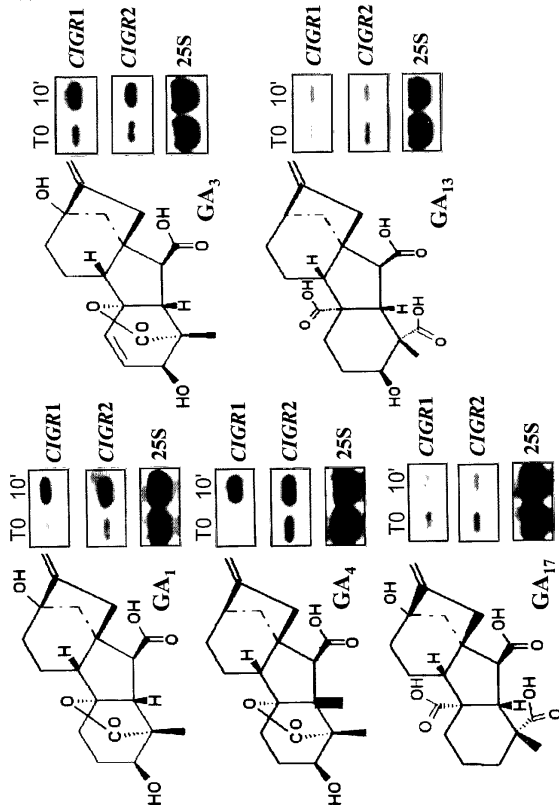
【 図 8 】

図 8



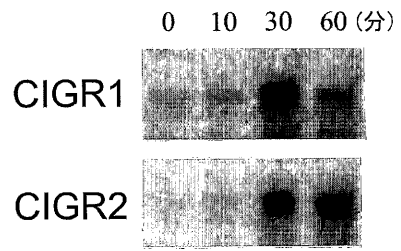
【 9 】

9



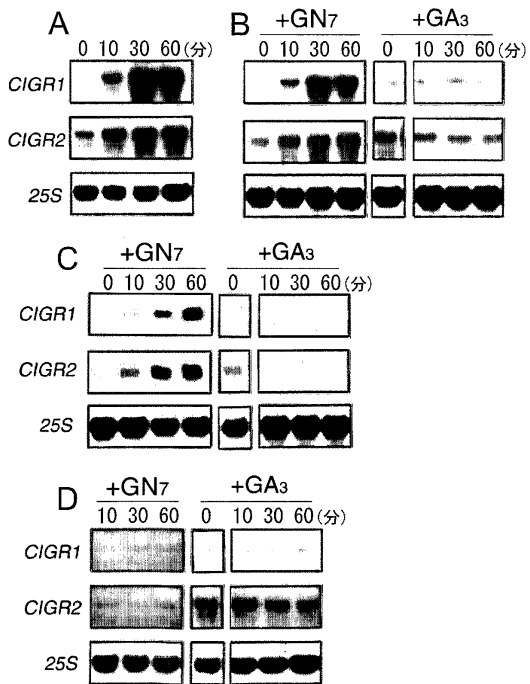
【 10 】

10



【 11 】

11



フロントページの続き

合議体

審判長 平田 和男

審判官 富永 みどり

審判官 六笠 紀子

- (56)参考文献 特開2000-279046(JP,A)
特表2001-511652(JP,A)
Biol. Bull. NTNU., 33(1) (1998) p.1-11
日本作物学会紀事, 40 (1971) p.27-33
日本作物学会紀事, 42 (1973) p.315-321
Plant Cell Physiol., 39 (1998) p.1127-1132
Plant Physiol., 127 (2001.10.) p.645-654
育種・作物学会北海道談話会会報, 31 (1991) p.33
北陸作物学会報, 30 (1995) p.77-79
Japan J. Breed, 36 (1986) p.1-6
植物組織培養, 10 (1993) p.176-179
Science, 160 (1968) p.421-422
Plant Physiol., 95 (1991) p.943-947
Journal of Plant Growth Regulation, 9 (1990)
p.243-246
Plant Physiol., 65 (1980) p.472-477
Plant Cell Physiol., 37 (1996) p.563-567
Plant Mol Biol(1998), Vol.38, No.6, p.1053-1060
Biochim Biophys Acta.(2001 Jul), Vol.1520, No.
.1, p.54-62
J Biol Chem(1997), Vol.272, No.40, p.24747-24750
Plant Cell Physiol.(1996), Vol.37, No.5, p.686-691
Plant Mol Biol(1999), Vol.40, No.4, p.645-657

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N15/09

BIOSIS/WPI(DIALOG)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)