

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-105164  
(P2004-105164A)

(43) 公開日 平成16年4月8日(2004.4.8)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A O 1 H 5/00	A O 1 H 5/00	A
C O 7 K 14/415	C O 7 K 14/415	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 5/00	C

審査請求 有 請求項の数 5 O L (全 17 頁)

(21) 出願番号 特願2003-57426 (P2003-57426)	(71) 出願人 394025980 岡山大学長 岡山県岡山市津島中一丁目1番1号
(22) 出願日 平成15年3月4日(2003.3.4)	
(31) 優先権主張番号 特願2002-217598 (P2002-217598)	(74) 代理人 100072051 弁理士 杉村 興作
(32) 優先日 平成14年7月26日(2002.7.26)	
(33) 優先権主張国 日本国(JP)	
特許法第30条第1項適用申請有り 2002年3月28日~30日 日本植物生理学会主催の「日本植物生理学会2002年度年会」(岡山大学一般教育棟)にて発表	(72) 発明者 松本 英明 岡山県倉敷市大島428-4
	(72) 発明者 佐々木 孝行 岡山県倉敷市笹沖1192-4-108
	(72) 発明者 山本 洋子 岡山県岡山市芳賀5115-18
	(72) 発明者 江崎 文一 岡山県倉敷市羽島684-6-203
	(72) 発明者 且原 真木 岡山県倉敷市中央2丁目20-2-302

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 植物のアルミニウム応答性リンゴ酸輸送体の遺伝子及び当該遺伝子がコードする蛋白質

(57) 【要約】

【課題】植物にアルミニウム応答性リンゴ酸輸送能を付与することができる新規な蛋白質及びそれをコードする遺伝子を提供することが、本発明の課題である。

【解決手段】本発明により、コムギ由来の新規なALMT1-1 遺伝子、及びその遺伝子がコードするALMT1-1 蛋白質が得られた。ALMT1-1 蛋白質は、アルミニウムイオンにより活性化されて、細胞外にリンゴ酸を放出する機能を有する輸送体蛋白質である。リンゴ酸はアルミニウムイオンと錯体を形成してアルミニウムイオンを不活化するために、ALMT1-1 蛋白質は植物のアルミニウム耐性に関与する。よって、ALMT1-1 蛋白質をコードするALMT1-1 遺伝子を用いて、植物にアルミニウムイオン耐性を付与できると考えられる。

【選択図】 なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

以下の ( a ) または ( b ) に示すアミノ酸配列からなることを特徴とする蛋白質。

( a ) 配列表の配列番号 1 に示す、アミノ酸番号 1 - 4 5 9 で示されるアミノ酸配列からなることを特徴とする蛋白質。

( b ) アルミニウムイオンにより活性化されて、細胞外にリンゴ酸を放出する機能を有する、( a ) の一部が欠損、置換若しくは付加された蛋白質。

**【請求項 2】**

請求項 1 記載の蛋白質をコードする遺伝子。

**【請求項 3】**

以下の ( c ) または ( d ) に示す塩基配列からなることを特徴とする遺伝子。

( c ) 配列表の配列番号 2 に示す、塩基番号 1 - 1 5 1 7 で示される塩基配列からなることを特徴とする遺伝子。

( d ) アルミニウムイオンにより活性化されて、細胞外にリンゴ酸を放出する機能を有する蛋白質をコードし、( c ) の一部が欠損、置換若しくは付加された遺伝子。

**【請求項 4】**

請求項 2 又は請求項 3 記載の遺伝子を植物に導入することにより、植物にアルミニウムイオンに対する耐性を付与した、形質転換植物。

**【請求項 5】**

請求項 2 又は請求項 3 記載の遺伝子を植物に導入することにより、植物にアルミニウムイオンに対する耐性を付与する方法。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、植物のアルミニウム応答性リンゴ酸輸送体の新規な遺伝子である A L M T 1 - 1 遺伝子、及び当該遺伝子がコードする A L M T 1 - 1 蛋白質に関する。

**【0002】****【従来技術】**

人口の増加や環境の変化により、将来の食料危機が予想されている。その問題に対応するべく、農業において効率よく作物を生産するための技術開発が求められている。その際に、世界には様々な不良土壌があって植物の生育を阻害していることが問題となる。中でも酸性土壌は農業利用可能地面積の 4 0 % を占め、日本を含め、中国、東南アジア、オーストラリア、北米、南米と世界中に広がっている。従って、食料増産を考える上で、酸性土壌における作物生産性を向上させることは重要である。

**【0003】**

酸性土壌における作物生産性の向上を目指し、コムギ、イネ、オオムギ、トウモロコシなどの主要穀類を中心に、アルミニウム耐性を示す品種選抜と他品種との掛け合わせによる品種改良が行われているが、膨大な時間と手間が必要となる。一方、遺伝子組み換え技術を用いてアルミニウム耐性作物を作出する試みも 1 例報告されている。これは、土壌菌由来のクエン酸合成酵素をタバコ等の作物に形質導入し、過剰につくられたクエン酸を細胞外に放出させクエン酸とアルミニウムイオンとの錯体を形成させることにより、アルミニウム耐性を獲得させるという方法である。しかし、この手法ではアルミニウムイオンの有無に関わらず植物から常にクエン酸が放出され続けるため、作物の生産性を低下させる可能性が高い。また、土壌微生物の遺伝子を導入した作物を食糧や飼料にすることの安全性が問題となる。さらにこの方法の再現性が問題視されている。

**【0004】**

酸性土壌における主たる植物生育阻害因子はアルミニウムイオンであることから、アルミニウム耐性遺伝子の検索が進められ、アルミニウム耐性遺伝子の存在が推定されていた。この遺伝子の発現により、コムギはアルミニウムイオンの刺激によって細胞外にリンゴ酸を放出することができると考えられている。リンゴ酸はアルミニウムイオンと錯体を形成

10

20

30

40

50

してアルミニウムイオンを不活化するために、この遺伝子を有するコムギはアルミニウム耐性となると考えられる。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明はアルミニウム耐性コムギに特異的に発現している遺伝子を世界で初めてクローニングし、その機能がアルミニウムイオンにより活性化され細胞外にリンゴ酸を放出する輸送体蛋白質であることを明らかにするとともに、この遺伝子をイネに形質導入することによりアルミニウム応答性リンゴ酸輸送体が発現することを示したものである。従って、本発明でクローニングしたコムギのアルミニウム応答性リンゴ酸輸送体遺伝子の高発現形質転換体を遺伝子組み換え技術を用いて作成することにより、アルミニウム耐性作物を作出しうる可能性を強く示唆している。

10

【0006】

また本発明は、アルミニウムイオンによって活性化されリンゴ酸を細胞外に放出する輸送体蛋白質をコードするコムギ遺伝子の塩基配列ならびにアミノ酸配列である。この遺伝子をコムギ類およびその他の作物に導入することにより、アルミニウム耐性を付与し、アルミニウム害のみられる酸性土壌における作物生産性の向上が期待できる。農業特に育種分野に有用であり、育種関連産業で利用されると思われる。

【0007】

より特異的には、前記の課題を解決するために、本出願において以下の発明を提供する。本発明は、配列表の配列番号1に示す、アミノ酸番号1 - 459で示されるアミノ酸配列からなることを特徴とする蛋白質である。アルミニウムイオンにより活性化されて、細胞外にリンゴ酸を放出する機能を有し、その一部が欠損、置換若しくは付加された蛋白質もまた本発明の範囲内である。更に当該蛋白質をコードする遺伝子もまた、本発明の範囲内である。

20

【0008】

更に本発明は、配列表の配列番号2に示す、塩基番号1 - 1517で示される塩基配列からなることを特徴とする遺伝子である。細胞外にリンゴ酸を放出する機能を有する蛋白質をコードし、その一部が欠損、置換若しくは付加された遺伝子もまた、本発明の範囲内である。

【0009】

更に、上記の遺伝子を植物に導入することにより、植物にアルミニウム耐性を付与した形質転換植物もまた、本発明の範囲内である。なお更に本発明は、上記の遺伝子を植物に導入することにより、植物にアルミニウム耐性を付与する方法もまた、本発明の範囲内である。

30

【0010】

【発明の実施の形態】

コムギでは、アルミニウムイオンが存在する時にのみ根からリンゴ酸を放出し、リンゴ酸とアルミニウムイオンとの錯体形成によりアルミニウムを不活性化し、アルミニウム耐性を獲得するとともに酸性土壌耐性を示すことが強く示唆されていた。さらにこのアルミニウム耐性機構は単一の優勢遺伝子座(Alt1)によって制御されており、この遺伝子座に関する準同質系統株も作出されていた。

40

【0011】

下記の実施例において示す様に、アルミニウム感受性が異なる準同質遺伝子系統のコムギ(ET8, ES8)を用いたサブトラクション法により、アルミニウム感受性系統(ES8)に比較してアルミニウム耐性系統(ES8)で強く発現している遺伝子(cDNA)をクローニングし、その遺伝子が以下に述べるように、アルミニウムにより活性化されるリンゴ酸輸送体であることが示され、ALMT1 (alminium-triggered malate transporter)と命名した。ALMT1 遺伝子の発現部位は根端特異的であり、アルミニウムイオンの刺激に依存したリンゴ酸放出部位と一致した。アルミニウム耐性系統と感受性系統において遺伝子の塩基配列は6塩基異

50

なり、アミノ酸に関して2残基異なっており、それぞれをALMT1-1, ALMT1-2とした。アフリカツメガエル卵母細胞にALMT1-1 遺伝子の転写産物を導入しALMT1-1 蛋白質を発現させたのち、電気生理学手法を用いてALMT1-1 蛋白質がアルミニウムイオンによって特異的に活性化されるリンゴ酸輸送体であることを証明した。

#### 【0012】

さらにALMT1-1 遺伝子をイネに形質導入した結果、ALMT1-1 の形質転換イネにおいてのみアルミニウムイオン特異的にリンゴ酸放出が起こることが示された。以上、クローニングしたALMT1-1 遺伝子は、アルミニウムイオンの刺激によって活性化されリンゴ酸を放出する新規の輸送体蛋白質をコードしており、コムギのアルミニウム耐性遺伝子(Alt1)と同一である可能性が極めて高いこと、この遺伝子をイネに形質導入することによりアルミニウム応答性リンゴ酸輸送体が発現することが示された。

10

#### 【0013】

本発明であるアルミニウム応答性のリンゴ酸輸送体をコードするALMT1-1 遺伝子(図1)を形質転換用のプラスミドベクターに導入した。本発明ではハイグロマイシン耐性遺伝子を組み込んだベクターのpIG121-Hm を用い、カリフラワーモザイクウイルスの35S プロモーターの下流にALMT1-1 遺伝子の翻訳領域をつないだプラスミドを構築し、これをアグロバクテリウム菌EHA101に導入した。このアグロバクテリウムをイネ(日本晴)のカルス細胞に感染させて、ハイグロマイシン耐性カルスを選抜した後、再分化をおこさせ形質転換体を得た。形質転換体では図2に示すアミノ酸配列を持つALMT1-1 遺伝子産物が生合成されることになる。35S プロモーターの下流につないだALMT1-1 遺伝子は植物全体で発現しているものと思われるが、実際、ALMT1-1 遺伝子の発現を根及び葉の両方で確認した。

20

#### 【0014】

非形質転換イネ(日本晴)とALMT1-1 遺伝子を導入した形質転換イネの根部を、各々無機塩培地に浸し、さらに0.1mM の塩化アルミニウムを添加した条件としない条件で保温し、培養液中に放出されたリンゴ酸量を比較した。その結果、形質転換イネの根にアルミニウムを添加した場合においてのみ、リンゴ酸放出が観察された。アルミニウム処理をしない形質転換イネや、非形質転換イネの根では、リンゴ酸放出は見られなかった。

30

#### 【0015】

アルミニウム耐性コムギ品種の幼植物の根においてアルミニウムイオンの存在下で放出されるリンゴ酸量は、植物体あたり1時間に4~8nmolと報告されている。ALMT1-1 遺伝子の形質転換イネの根からアルミニウムに依存して放出されるリンゴ酸量も同程度であった。

#### 【0016】

ALMT1-1 遺伝子をアルミニウム感受性のコムギ品種に形質導入し、ALMT1-1 遺伝子の高発現形質転換体を作成すれば、形質転換体はアルミニウムイオンが存在する場合にのみリンゴ酸を放出し、アルミニウム耐性ひいては酸性土壌耐性を示す可能性が高い。また、ALMT1-1 遺伝子産物はそれ自身が単独でアルミニウムイオンにより活性化されるリンゴ酸輸送体を形成することから、他のアルミニウム感受性の植物種に形質導入した場合でも、同様の機構でアルミニウム耐性を示すことが期待される。

40

#### 【0017】

形質導入する遺伝子を35S プロモーターの下流で発現させる場合、導入遺伝子は常に発現状態にある。アルミニウム耐性植物を作出するためにクエン酸合成酵素遺伝子を導入した例でも35S プロモーターを使用しており、この場合形質転換体は常にクエン酸を合成し放出し続けることになり、植物への負担は大きい。しかし、本発明のALMT1-1 遺伝子を導入する方法では、ALMT1-1 遺伝子は常に発現状態にあり、ALMT1-1 遺伝子産物のリンゴ酸輸送体はアルミニウムイオンの攻撃に常に備えているものの不活性型であり、アルミニウムイオンが存在する時にのみ活性化されリンゴ酸を放出

50

する。従って、植物体への負担が少ない。

【0018】

本発明のALMT1-1蛋白質は、上述したように、アルミニウムイオンにより活性化されて、細胞外にリンゴ酸を放出する機能を有する輸送体蛋白質である。放出されたリンゴ酸とアルミニウムイオンとの間に錯体が形成されるので、本発明の植物のALMT1-1蛋白質はアルミニウム耐性に関与している可能性が高い。

【0019】

本願明細書において、配列番号1に示すアミノ酸配列の一部が欠失、置換若しくは付加された蛋白質とは、配列番号1に示すアミノ酸配列において、20個以下、好ましくは10個以下、更に好ましくは5個以下のアミノ酸が置換された蛋白質である。また、その様な蛋白質と配列番号1に示すアミノ酸配列とは、95%以上、好ましくは97%以上、更に好ましくは99%以上の相同性を有する。その様な蛋白質も、アルミニウムイオンにより活性化されて、細胞外にリンゴ酸を放出する機能を有する限り、本発明の範囲内である。

10

【0020】

更に本発明のALMT1-1遺伝子は、上述したように、アルミニウムイオンにより活性化されて、細胞外にリンゴ酸を放出する機能を有する輸送体蛋白質である上記のALMT1-1蛋白質をコードしている。

【0021】

遺伝子組み換え技術によれば、基本となるDNAの特定の部位に、当該DNAの基本的な特性を変化させることなく、あるいはその特性を改善する様に、人為的に変異を起こすことができる。本発明により提供される天然の塩基配列を有する遺伝子、あるいは天然のものとは異なる塩基配列を有する遺伝子に関しても、同様に人為的に挿入、欠失、置換を行う事により、天然の遺伝子と同等のあるいは改善された特性を有するものとする事が可能であり、本発明はそのような変異遺伝子を含むものである。

20

【0022】

即ち、配列表の配列番号2に示す遺伝子の一部が欠失、置換若しくは付加された遺伝子とは、配列番号2に示す塩基配列において、20個以下、好ましくは10個以下、更に好ましくは5個以下の塩基が置換された遺伝子である。また、その様な遺伝子と配列番号2に示す塩基配列とは、95%以上、好ましくは97%以上、更に好ましくは99%以上の相同性を有する。その様な遺伝子も、アルミニウムイオンにより活性化されて、細胞外にリンゴ酸を放出する機能を有する蛋白質をコードする限り本発明の範囲内である。また、その様な遺伝子はストリンジェントな条件下で配列表の配列番号2に示す遺伝子とハイブリッドを形成する。

30

【0023】

ハイブリダイゼーションの条件については当業者が適宜選択をすることができるが、具体的には以下の操作によってハイブリダイゼーションを行うことができる。試験すべきDNAまたはRNA分子を転写した膜と標識したプローブを、適用なハイブリダイゼーションバッファー中でハイブリダイズさせる。ハイブリダイゼーションバッファーの組成は、例えば、5×SSC、0.1重量% N-ラウロイルサルコシン、0.02重量%のSDS、2重量%の核酸ハイブリダイゼーション用ブロッキング試薬及び50%フォルムアミドから成る。核酸ハイブリダイゼーション用ブロッキング試薬としては、一例として、0.1Mマレイン酸と0.15M塩化ナトリウムからなる緩衝液(pH7.5)に市販の核酸ハイブリダイゼーション用ブロッキング試薬を10%になるように溶解したものを使用することができる。20×SSCは、3M塩化ナトリウム、0.3Mクエン酸溶液であり、SSCは、より好ましくは、3~6×SSC、更に好ましくは4~5×SSCの濃度で使用する。

40

【0024】

ハイブリダイゼーションの温度は、40~80、より好ましくは50~70、更に好ましくは55~65の範囲であり、数時間から一晩のインキュベーションを行った後、洗浄バッファーで洗浄する。洗浄の温度は、好ましくは室温、より好ましくはハイブリダ

50

イゼーション時の温度である。洗浄バッファの組成は  $6 \times \text{SSC} + 0.1$  重量% SDS 溶液、より好ましくは  $4 \times \text{SSC} + 0.1$  重量% SDS 溶液、更に好ましくは  $2 \times \text{SSC} + 0.1$  重量% SDS 溶液、更に好ましくは  $1 \times \text{SSC} + 0.1$  重量% SDS 溶液、最も好ましくは  $0.1 \times \text{SSC} + 0.1$  重量% SDS 溶液である。このような洗浄バッファで膜を洗浄し、プローブがハイブリダイズした DNA 分子または RNA 分子をプローブに用いた標識を利用して識別することができる。

#### 【0025】

本発明の ALMT1-1 遺伝子は、アルミニウムイオンにより活性化されて、細胞外にリンゴ酸を放出する機能を有する輸送体蛋白質である上記の ALMT1-1 蛋白質をコードする遺伝子であり、アルミニウムにより活性化されるリンゴ酸放出機能は植物のアルミニウムイオン耐性遺伝子に強く連鎖しているために、当該遺伝子を植物に導入する事により、アルミニウムイオンに対する耐性を付与する可能性が極めて高い。下記の実施例において単子葉植物ではイネ、双子葉植物ではタバコの形質転換体を作成しているが、本発明の ALMT1 遺伝子を導入する植物の例としては、イネ、コムギ、オオムギ、トウモロコシ、アスパラガス、ソルガム等の単子葉植物、またハウレンソウ、ニンジン、ダイズ、トマト、ジャガイモ、タバコ、ワタ、ビート、シロイヌナズナ等の双子葉植物が挙げられる。しかし、形質転換を行う対象の植物はそれらの植物に限定されるものではなく、種々の植物において形質転換体を作成することができる。

#### 【0026】

形質転換体の作製方法としては、本技術分野において知られている通常の方法を用いる事ができる。導入された遺伝子を活性化するために下記の実施例においては、本技術分野で汎用されているカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターを、形質導入すべき本発明の遺伝子の upstream に配置している。導入された外来遺伝子を十分に発現させるためには、多くの場合には何らかのプロモーターが必要とされるが、カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターに限定されるものではなく、本技術分野において汎用されている他のプロモーターを用いることも可能である。その例にはイネアクチン 1 (Rice actin 1) プロモーター、トウモロコシユビキチン (Maize ubiquitin) プロモーター等があり、これらのプロモーターは単子葉植物で高発現させる目的に汎用されている。

#### 【0027】

また、本発明において使用可能なベクターには例えばバイナリーベクターがあり、下記の実施例において使用した pIG121-Hm は最も好ましい。その他のバイナリーベクターには例えば pBI121 及び pBI221 等が挙げられるが、それらに限定されるものではない。そのようなベクターを、例えばアグロバクテリウム菌に導入して、カルス又は幼植物に感染させることにより、形質転換植物を作製する事が可能であり、更に、そのような形質転換植物に由来する種子を得る事が可能である。また、本発明の植物遺伝子を植物に導入する形質転換法は、アグロバクテリウム法に限定されるものではなく、パーティクルガン法、電気穿孔法等の、本技術分野において公知の種々の方法を用いる事も可能である。

#### 【0028】

##### 【実施例】

本発明者らは、アルミニウム感受性系統 (ES8) では発現せず、アルミニウム耐性系統 (ET8) において発現している cDNA を単離するために、サブトラクティブ・ハイブリダイゼーションを行った。ET8 から得た 288 の候補クローンの中の 1 つのクローンが、ジゴキシゲニン (DIG) でラベルされた ET8 の mRNA 集団由来の cDNA とハイブリダイズしたが、ES8 の mRNA 集団とはハイブリダイズしなかった。クローンの配列に基づいてプライマーを設計し、完全長の cDNA を得るために RACE (rapid amplification of cDNA ends) - PCR を行った。ポリ (A) <sup>+</sup> テイルを除き、完全長の cDNA は 1517 塩基対の核酸の長さの cDNA を示した。遺伝子の推定アミノ酸配列は、49.7 kDa の予想分子量

10

20

30

40

50

を有する、459個の残基から構成されていた。得られた遺伝子(cDNA)の配列を図1に、それから得られた推定アミノ酸配列を図2に示す。

#### 【0029】

図3は、ET8由来のALMT1-1遺伝子がコードする蛋白質の推定アミノ酸配列の疎水性プロファイルを示す。アミノ酸配列の疎水性は6個から8個の推定膜貫通領域を示しており、その産物は膜蛋白質であることを示唆している(図3)。このプロットは10残基のムービングウィンドウを用いて作成された(Kyte and Doolittleパラメーター)。図3において、プロット上の丸印は、ET8系統とES8系統の間において異なっているアミノ酸残基の位置を示す。プロット上の線は、抗血清を構築するための抗原に用いたペプチド断片を示す。

10

#### 【0030】

蛋白質データベース(BLAST search, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)を検索したところ、この遺伝子の産物はシロイヌナズナとイネにおける仮想的な蛋白質のアミノ酸配列と、31から43%の相同性を有するを見いだした。動物又は微生物との相同性は報告されていなかった。

#### 【0031】

図4は、コムギにおけるALMT1遺伝子発現のノーザンプロット解析を示す。ノーザンプロット解析により、クローン化された遺伝子の転写産物は、ES8と比較して、ET8においてより量が多いことが示された(図4)。10 $\mu$ gの全RNAをアガロースゲル電気泳動によって分離し、rRNAを検出するために、エチジウムブロマイドによって染色した。図4Aは、アルミニウム耐性品種の根端における特異的なALMT1遺伝子の発現を示す。図4Bは、アルミニウム処理がALMT1のmRNAレベルに及ぼす影響を示す。

20

#### 【0032】

遺伝子の発現はET8の根端(5mm)において特異的に検出され(図4A)、その知見は、アルミニウムによって引き起こされたリンゴ酸放出とアニオン輸送体活性が、アルミニウム耐性品種の根端において特異的に観察されたという過去の知見と一致していた。遺伝子は根端において構成的に発現し、いずれの系統においてもアルミニウムによって促進されなかった(図4B)。遺伝子の構成的な高い発現はアルミニウム耐性コムギ品種アトラス66においても観察されたが、アルミニウム感受性品種スカウト66においては観察されなかった(図4B)。クローン化された遺伝子をALMT1と命名した。

30

#### 【0033】

アルミニウム耐性(ET8及びアトラス66)品種とアルミニウム感受性(ES8及びスカウト66)品種からのRT-PCRによって、cDNA断片の読み枠を増幅した。遺伝子特異的なプライマーを用いてアドヴァンテージGC2 PCRキット(クロンテック)によりPCRを行った。これら2つのアルミニウム耐性品種由来のALMT1遺伝子の塩基配列(ALMT1-1)は完全に一致した。同様に、2つのアルミニウム感受性品種由来のALMT1遺伝子のDNA配列(ALMT1-2)もまた一致していた。しかしながら、ALMT1-1配列とALMT1-2配列は、6つの塩基(2つのアミノ酸残基)において異なっていた。図5は、ET8由来のALMT1-1遺伝子の塩基配列と、ES8由来のALMT1アレル(ALMT1-2)の部分ヌクレオチドとその推定アミノ酸配列において、配列の異なった部分を示している。下線と二重下線は、ET8とES8系統の間で観察された、異なったヌクレオチドとアミノ酸残基をそれぞれ示している。

40

#### 【0034】

アフリカツメガエル卵母細胞を用い、二電極膜電位固定法によって、ALMT1-1蛋白質はリンゴ酸輸送体であるかどうかの検討を行った。ALMT1-1のcRNAとリンゴ酸を注入した卵母細胞の電気生理学的特性を、アルミニウムの存在下又は非存在下の溶液中で測定した(図6)。図6において、リンゴ酸を注入した(又はクエン酸を注入した)ALMT1-1-cRNA発現卵母細胞において、電流-電圧曲線を測定した。

50

## 【0035】

cRNAとリンゴ酸の両者を注入した卵母細胞においてのみ、アルミニウムは有意に高い内向き電流を引き起した(図6における“cRNA リンゴ酸 + Al”、黒丸)。しかし、cRNAとクエン酸の両者を注入した場合を含めて、他の処理においては内向き電流は引き起こされなかった。これらの結果は、ALMT1-1はアルミニウムにより引き起こされるリンゴ酸透過輸送体をコードしていることを示唆している。アルミニウムにより引き起こされる内向き電流の経時変化を、固定した電圧(-100mV)において記録した。リンゴ酸が注入されてALMT1-1を発現している卵母細胞は、アルミニウムによって増幅された電流の促進を示したが、ランタンにおいてはその現象は見られなかった。

10

## 【0036】

図7に、リンゴ酸を注入してALMT1-1を発現した卵母細胞における、内向き電流の経時変化を示す。内向き電流はアルミニウムに暴露して約1分後に増加し始めて、アルミニウムに4から5分間暴露した後に最小値に達した(図7)。過去の研究においても、根端におけるアルミニウム暴露とリンゴ酸放出の間に、又はコムギのプロトプラストにおける内向き電流の活性化の間に、5から30分間の遅延が見られた。その遅延は、輸送体活性化に何らかの中間段階が関与していることを示唆している可能性もある。

## 【0037】

植物におけるALMT1-1遺伝子の輸送体機能を確認するために、パーティクルガン法によって、ALMT1-1遺伝子による形質転換コムギの作成を試みた。しかしながら、コムギにおける形質転換頻度は一般的に低く、その試みは成功しなかった。その代わりに、アグロバクテリウムにより仲介された形質転換方法によって、イネ植物をALMT1-1遺伝子で形質転換することに成功した。カリフラワーモザイクウイルス35S(CaMV35S)プロモーターに連結させたALMT1-1遺伝子を導入するために、pIG121-Hmベクターを用いた。そのプラスミドを、イネ品種である日本晴の種子から誘導したカルスに導入した。ハイグロマイシン選抜によって、21個の推定形質転換系統(T0)が得られた。全ての形質転換体のゲノムにALMT1-1は挿入されており、その配列に特異的なプライマーを用いたPCRによってそれを確認した。ALMT1-1のmRNAを最大量発現している形質転換体を、T1世代における更なる解析に使用した。

20

30

## 【0038】

導入されたALMT1-1遺伝子の発現をノーザンブロット解析によって試験した(図8)。図8において、形質転換体と非形質転換体における、根と葉におけるALMT1-1のmRNAのレベルを示す。形質転換系統において、根と葉の両者におけるALMT1-1の有意な発現が構成的に示されたが、非形質転換体ではそれは見られなかった。アルミニウム処理は発現レベルには影響しなかった。

## 【0039】

図9は、形質転換体と非形質転換体の根と葉から調製したマイクロゾーム膜画分における、ALMT1-1蛋白質のウエスタンブロット解析を示す。矢印は、ALMT1-1蛋白質の位置(45kDa)を示す。ALMT1-1蛋白質のポリペプチド断片に対する抗体を用いたウエスタンブロット解析によって、形質転換体の根及び葉から調製したマイクロゾームの膜画分中にその蛋白質は見い出されたが、非形質転換体のその画分中には見出されなかった(図9)。ALMT1-1蛋白質の大きさは45kDaであり、その大きさはALMT1-1遺伝子の推定されたアミノ酸配列の分子量(49.7kDa)より小さかった。

40

## 【0040】

図10は、形質転換体からのアルミニウム依存性のリンゴ酸放出を示す。幼植物の根を100μMの塩化アルミニウムの存在下又は非存在下で、栄養溶液(pH4.5)中で処理した。この形質転換体において、アルミニウムは根からのリンゴ酸放出を引き起こしたが、非形質転換体においては引き起こさなかった(図10)。同様のアルミニウム処

50



理は、形質転換体のクエン酸放出は引き起こさなかった。暴露してから24時間後まで、3価イオン（ランタン及び鉄イオン）によってリンゴ酸放出を誘導することはなかった。これらの結果は、コムギのALMT1-1遺伝子はイネにおいて優性に発現し、アルミニウムによって引き起こされる根からのリンゴ酸放出を制御していることを示唆している。

#### 【0041】

植物アニオン輸送体をコードしていると推定される遺伝子（例えば塩素イオンチャネル）は、ほんの僅かしか報告されていない。本発明において、ALMT1-1はアルミニウムによりゲートの開閉が制御されるリンゴ酸透過性輸送体をコードしていることを強く示唆する、いくつかの証拠が得られた。

10

#### 【0042】

更に、準同質コムギ系統である、ET8とES8の間に観察されたALMT1の塩基配列が相違していること（図5）は、ALMT1は少なくとも2つのアレルより構成されていることを示唆している。更に、ALMT1-1遺伝子が、アルミニウムによって活性化されるリンゴ酸放出と、アルミニウム耐性の表現型をET8において制御している優性遺伝子である、Alt1遺伝子自身であることも強く示唆している。ALMT1-1輸送体はアルミニウムによって活性化されるがランタンによっては活性化されない。それは、アニオン輸送体を介した、ETの根とETの根の細胞のプロトプラストからのリンゴ酸の放出は、アルミニウムによって活性化されるがランタンによっては活性化されない、という過去の報告と一致していた。アルミニウムはアニオン輸送体をいかに活性化するかということについて、説明するために3つのモデルが提唱されているが、アフリカツメガエルから得られた本発明の知見は、アルミニウムはアニオン輸送体蛋白質と直接に相互作用して、その開口を引き起こすことを強く示唆している。

20

#### 【0043】

いくつかの研究グループが、有機酸生合成の鍵となる酵素をコードしている遺伝子によって植物を形質転換することにより、アルミニウム耐性の形質転換植物を作成することを試みてきた。緑膿菌由来のクエン酸合成酵素を構成的に発現している形質転換タバコ系統は、根からのクエン酸の構成的な放出によるアルミニウム耐性を示したが、他の研究グループはその知見を再現することはできなかった。ニンジン細胞由来のミトコンドリアのクエン酸合成酵素遺伝子を発現している形質転換シロイヌナズナは、構成的にクエン酸の放出を促進し、その結果アルミニウムに僅かに耐性になるという表現型を示した。

30

#### 【0044】

一方、ALMT1-1遺伝子を有する形質転換イネにおいては、アルミニウムによって活性化されるリンゴ酸透過性輸送体は構成的に発現していたが、リンゴ酸放出はアルミニウムによってのみ引き起こされた（図6-図10）。 $100 \mu\text{M AlCl}_3$ 処理によって、形質転換したイネから放出されたリンゴ酸の量は、 $180 \pm 25 \text{ nmol 幼植物}^{-1} 24 \text{ 時間}^{-1}$ （平均 $\pm$ SE,  $n=6$ ）であった（図10）。この値は、アルミニウム耐性コムギ遺伝子型（ET）における値と匹敵していた。そこで、アルミニウムによりゲートの開閉が制御されるリンゴ酸透過性輸送体は、アルミニウム耐性の形質転換作物を作成するために最も適した特異的な候補である。

40

#### 【0045】

更に、双子葉植物であるタバコの形質転換体を作製した。タバコ培養細胞（*Nicotiana glauca* cv. Samsun, 細胞株SL）の形質転換はアグロバクテリウムによる方法を用いて行った。カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターに連結させたALMT1-1遺伝子を、バイナリーベクターのpIG121-Hmを改変して組み込んだ。このプラスミドをアグロバクテリウム・ツメファシエンズ（EHA101株）を介してタバコ培養細胞に導入した。コントロールとしては、pIG121-HmよりGUS遺伝子を除いたものを除いたものを同様に遺伝子に導入し、これをコントロール細胞とした。形質転換体の選別は抗生物質のカナマイシン（ $200 \text{ mg/liter}$ ）を含む改変Murashige-Skoog（MS）寒天培地で行った

50

。

## 【0046】

タバコ培養細胞のアルミニウム処理は、3 mM 塩化カルシウムと3%蔗糖を含む単純なカルシウム培地 (pH 4.5) に培養細胞を150 mg 湿重量/10 ml になるよう懸濁し、各濃度のアルミニウムを添加した後、暗所25℃で18時間の浸透培養 (100 rpm) をすることにより行った。その後、細胞を増殖用の改変MS培地に再懸濁し、一定期間培養した後に湿重量を測定し、アルミニウムを添加せずに処理した細胞の湿重量に対するアルミニウムを添加して処理した細胞の湿重量の割合で増殖能を定量化した。

## 【0047】

導入されたALMT1-1 遺伝子の発現量をノーザンブロット解析によって解析した (図11)。試験した3つのALMT1-1 形質転換細胞株 (#3, #5, #4) と、ベクター形質転換細胞株 (ALMT1-1 遺伝子を含まないバイナリーベクターのみを導入した形質転換細胞株: コントロール細胞株) におけるALMT1 mRNAのレベルを示す。ALMT1-1 形質転換細胞株では高い遺伝子発現が示され、ベクター形質転換株では発現のないことが確認された。

## 【0048】

ALMT1-1 遺伝子を導入した形質転換細胞株と形質転換用バイナリーベクターのみを導入したベクター形質転換細胞株を用意し、それぞれを0, 50, 100  $\mu$ M AlCl<sub>3</sub> を含むカルシウム培地 (pH 4.5) 中で18時間処理した。その後、培地中に放出されたリンゴ酸濃度を測定し、また細胞をアルミニウムを含まない栄養培地に再懸濁し、8日間培養後の湿重量を測定し、アルミニウムを添加せずに処理した細胞の湿重量に対するアルミニウム処理した細胞の湿重量の比から増殖能を求めた。アルミニウム処理なしの細胞の湿重量は、ALMT1-1 形質転換細胞株で134.8  $\pm$  2.2 mg/ml (n=5)、ベクター形質転換細胞株で127.9  $\pm$  2.6 mg/ml (n=5) であった。

## 【0049】

ALMT1-1 遺伝子導入の形質転換体 (図11) の中で最も発現量の高かったALMT1-1 形質転換細胞株 (#4) と、コントロールとして形質転換用バイナリーベクターのみを導入したベクター形質転換細胞株において、アルミニウム処理18時間後の細胞からカルシウム培地中に放出されるリンゴ酸量を示す (図12)。ALMT1-1 形質転換細胞株ではアルミニウムの濃度に応じて放出されたリンゴ酸量が多くなった。しかし、ベクター形質転換細胞株ではアルミニウムに反応したリンゴ酸放出はみられなかった。

## 【0050】

これら細胞株のアルミニウム処理後の増殖能を比較した結果、ALMT1-1 形質転換細胞株においてアルミニウム濃度を50, 100  $\mu$ M と高くするにつれ増殖率は低下するものの、ベクター形質転換細胞株よりも高い増殖率を維持していた (図12)。特に、100  $\mu$ M のアルミニウム処理ではALMT1-1 形質転換細胞株はベクター形質転換細胞株の3倍の増殖能を示した。

## 【0051】

双子葉植物であるタバコの培養細胞にALMT1-1 遺伝子を導入した結果、ALMT1-1 形質転換体においてアルミニウム依存的に高いリンゴ酸放出が見られたことから、ALMT1-1 遺伝子は双子葉植物においても機能することが示された。さらに、ALMT1-1 形質転換細胞株がアルミニウム耐性を獲得したことから、ALMT1-1 遺伝子がアルミニウム耐性遺伝子であることが確認された。

## 【0052】

## 【発明の効果】

本発明により、コムギ由来の新規なALMT1-1 遺伝子、及びその遺伝子がコードするALMT1-1 蛋白質が得られた。ALMT1-1 蛋白質は、アルミニウムイオンにより活性化されて、細胞外にリンゴ酸を放出する機能を有する輸送体蛋白質である。リンゴ酸はアルミニウムイオンと錯体を形成してアルミニウムイオンを不活化するために、

A L M T 1 - 1 蛋白質は植物のアルミニウム耐性に関与する。よって、A L M T 1 - 1 蛋白質をコードする A L M T 1 - 1 遺伝子を用いて、植物にアルミニウムイオン耐性を付与することができると考えられる。

【 0 0 5 3 】

【 配 列 表 】

<110> President of Okayama University

<120> A gene of aluminium-triggered malate transporter of a plant and a protein encoded by the gene

<160> 2

<210> 1

<211> 459

<212> PRT

<213> Wheat (ET8 line) seed

<400> 1

Met Asp Ile Asp His Gly Arg Glu Ser Asp Gly Glu Met Val Gly Thr	16
Ile Ala Ser Cys Gly Leu Leu Leu His Ser Leu Leu Ala Gly Leu Gly	32
Arg Arg Ala Ala Gly Phe Ala Arg Lys Val Gly Gly Ala Ala Arg Glu	48
Asp Pro Arg Arg Val Ala His Ser Leu Lys Val Gly Leu Ala Leu Ala	64
Leu Val Ser Val Val Tyr Phe Val Thr Pro Leu Phe Asn Gly Leu Gly	80
Val Ser Ala Ile Trp Ala Val Leu Thr Val Val Val Val Met Glu Tyr	96
Thr Val Gly Ala Thr Leu Ser Lys Gly Leu Asn Arg Ala Leu Ala Thr	112
Leu Val Ala Gly Cys Ile Ala Val Gly Ala His Gln Leu Ala Glu Leu	128
Ala Glu Arg Cys Gly Asp Gln Gly Glu Pro Ile Met Leu Thr Val Leu	144
Val Phe Phe Val Ala Ser Ala Ala Thr Phe Leu Arg Phe Ile Pro Glu	160
Ile Lys Ala Lys Tyr Asp Tyr Gly Val Thr Ile Phe Ile Leu Thr Phe	176
Gly Leu Val Ala Val Ser Ser Tyr Arg Val Glu Glu Leu Ile Gln Leu	192
Ala His Gln Arg Phe Tyr Thr Ile Ala Val Gly Val Phe Ile Cys Leu	208
Cys Thr Thr Val Phe Leu Phe Pro Val Trp Ala Gly Glu Asp Val His	224
Lys Leu Ala Ser Gly Asn Leu Asp Lys Leu Ala Gln Phe Ile Glu Gly	240
Met Glu Phe Asn Cys Phe Gly Glu Asn Ser Val Ala Asn Asn Phe Gly	256
Gly Lys Asp Phe Pro Gln Met His Lys Ser Val Leu Asn Ser Lys Ala	272
Thr Glu Asp Ser Leu Cys Thr Phe Ala Lys Trp Glu Pro Arg His Gly	288
Gln Phe Arg Phe Arg His Pro Trp Ser Gln Tyr Gln Lys Leu Gly Thr	304
Leu Cys Arg Gln Cys Ala Ser Ser Met Glu Ala Leu Ala Ser Tyr Val	320

10

20

30

40

Ile Thr Thr Ser Lys Thr Gln Cys Pro Ala Ala Ala Asn Pro Glu Leu 336  
 Ser Cys Lys Val Arg Lys Thr Cys Gly Glu Met Ser Leu His Ser Ser 352  
 Lys Val Leu Arg Asp Leu Ala Met Ala Thr Arg Thr Met Thr Val Pro 358  
 Ser Pro Val Asn Ile Thr Met Ala Thr Ala Val Lys Ala Ala Glu Ser 384  
 Leu Arg Ser Glu Leu Ala Glu Asn Thr Ala Leu Leu Gln Val Met His 400  
 Val Ala Val Thr Ala Thr Leu Leu Ala Asp Leu Val Asp Arg Val Lys 416  
 Glu Ile Ala Glu Cys Val Asp Val Leu Ala Arg Leu Ala His Phe Lys 432  
 Asn Pro Glu Asp Thr Lys Asn Val Val Val Ser Thr Val Ser Arg Gly 448  
 Ile Asp Glu Pro Leu Pro Asp Val Val Ile Leu 459

10

(210) 2

(211) 1517

(212) DNA

(213) Wheat (ET8 line) seed

(400) 2

GGCATTGCAT CTGCCATGGA TATTGATCAC GGCAGAGAGA GCGACGGCGA GATGGTGGGC 60  
 ACCATCGCCA GCTGCGGGCT GCTGCTCCAC TCGCTTCTCG CCGGGCTCGG GCGTCGCGCC 120  
 GCCGGGTTCG CCCGGAAGGT GGGCGGCGCC GCGCGGGAGG ACCCGAGGCG GGTGGCGCAC 180  
 TCGCTCAAAG TCGGCCTGGC GCTCGCGCTG GTGTCCGTCG TCTACTTCGT CACGCCGCTC 240  
 TTCAACGGCC TCGGGGTGTC CGCGATATGG GCCGTGCTCA CCGTCGTCGT CGTCATGGAG 300  
 TACACCGTCG GTGCCACGCT GAGTAAAGGC TTGAACAGAG CCTTGGCGAC GTTGGTGGCT 360  
 GGCTGCATCG CCGTCGGAGC TCATCAGTTA GCTGAATTAG CTGAACGCTG TGGTGATCAG 420  
 GGAGAGCCCA TAATGCTTAC CGTGCTCGTC TTCTTCGTAG CGTCAGCGGC GACGTTCTTG 480  
 CGTTTCATCC CGGAGATCAA GGCCAAGTAC GACTACGGCG TGACCATCTT CATACTGACC 540  
 TTCGGTCTGG TGGCCGTGTC GAGCTACAGA GTGGAGGAGC TCATCCAGCT CGCGCACCAG 600  
 CGTTTCTACA CCATAGCCGT CGGCGTCTTC ATCTGCCTCT GCACCACCGT CTTCTCTTC 660  
 CCCGTCTGGG CCGGAGAGGA CGTCCACAAG CTCGCCTCCG GCAACCTCGA CAAACTCGCT 720  
 CAGTTCATTG AAGGAATGGA ATTCAACTGC TTTGGCGAAA ACAGTGTTCG AAATAATTTT 780  
 GGGGGAAAAG ATTTCCCCCA AATGCACAAG AGCGTCCTTA ATTCGAAGGC CACTGAGGAC 840  
 TCTTTGTGCA CCTTTGCCAA ATGGGAGCCT CGTCATGGCC AGTTCAGATT TCGACACCCA 900

20

30

40

TGGAGTCAAT ACCAGAAGCT GGGAACTCTT TGTCGCCAAT GTGCGTCTTC TATGGAGGCT 960  
 CTTGCTTCAT ATGTCATCAC AACCTCAAAA ACCCAGTGCC CTGCTGCAGC CAACCCTGAG 1020  
 CTATCATGTA AGGTTGCGAAA AACATGTGGC GAAATGAGCT TGCATTCCTC CAAGGTGCTT 1080  
 AGGGATCTCG CAATGGCAAC TCGAACAATG ACTGTGCCGT CTCCAGTGAA TATCACCATG 1140  
 GCTACAGCCG TGAAAGCAGC GGAAAGCCTC AGAAGCGAGC TTGCAGAGAA CACGGCTCTG 1200  
 TTGCAAGTGA TGCATGTGGC CGTCACCGCA ACACTTCTTG CGGACTTGGT TGATAGGGTG 1260  
 AAGGAAATCG CGGAATGTGT TGATGTCCTA GCAAGACTGG CGCACTTTAA GAACCCCGAG 1320  
 GACACAAAAA ATGTCGTTGT TAGTACCGTG AGTCGAGGGA TAGACGAACC TTTGCCTGAC 1380  
 GTGGTTATTT TGTAATCTT CAAAACATTG GTAGACTATA TGGTGAAGAA CATGGTAGTA 1440  
 CTATAGTAGT ACTATGTATC GATACTGGAG GGTCTTGTAT TGGTTGATTT TGATTTATTA 1500  
 CTGCTGAGAC ATGTTGG 1517

10

【図面の簡単な説明】

【図 1】図 1 は、ALMT1-1 遺伝子の (cDNA) の塩基配列を示す図である。

【図 2】図 2 は、ALMT1-1 蛋白質のアミノ酸配列を示す図である。

20

【図 3】図 3 は、ET8 由来の ALMT1-1 遺伝子がコードする蛋白質の推定アミノ酸配列の疎水性プロファイルを示す図である。

【図 4】図 4 は、コムギにおける ALMT1 遺伝子発現のノーザンプロット解析を示す写真である。

【図 5】図 5 は、ALMT1-1 遺伝子の塩基配列と ALMT1-2 遺伝子の塩基配列との相違、及びそれらの推定アミノ酸配列における相違を示す図である。

【図 6】図 6 は、ALMT1-1 蛋白質を発現させたアフリカツメガエル卵母細胞における、電流 - 電圧曲線をアルミニウム存在下と非存在下において示すグラフである。

【図 7】図 7 は、ALMT1-1 蛋白質を発現させたアフリカツメガエル卵母細胞における内向き電流の経時変化を示すグラフである。

30

【図 8】図 8 は、イネの形質転換体と非形質転換体における、根と葉における ALMT1-1 遺伝子の発現レベルを示す、ノーザンプロットの写真である。

【図 9】図 9 は、イネの形質転換体と非形質転換体における、根と葉における ALMT1-1 蛋白質の発現レベルを示す、ウエスタンプロットの写真である。

【図 10】図 10 は、イネの形質転換体と非形質転換体からのアルミニウム依存性のリンゴ酸放出を示すグラフである。

【図 11】図 11 は、タバコ培養細胞の ALMT1-1 形質転換細胞株とベクター形質転換細胞株における遺伝子発現レベルを示す、ノーザンプロットの写真である。

【図 12】図 12 は、タバコ培養細胞の ALMT1-1 形質転換細胞株とベクター形質転換細胞株におけるリンゴ酸放出量を示すグラフである。

40

【図 13】図 13 は、タバコ培養細胞の ALMT1-1 形質転換細胞株とベクター形質転換細胞株における増殖能を示すグラフである。

【 図 1 】

```

GGGATTGCATCTGCCATGGATATTGATCAGCGCAGAGAGAGCGACGGCGGAGATGGTGGCCACCATCGCCA
GCTCGGGGCTGCTGCTCCACTCGCTTCTCGCCGGGCTCGGGCGTCGCGCCCGCGGGTTCGCCCGGAAGGT
GGGCGCGCCCGCGCGGAGGACCGAGGCGGGTGGCGCACTCGCTCAAAGTCGGCCTGGCGCTCGCGGTG
GTGTCGGTCTACTTCTGTCACGCGCGTCTTCAACGCGCTCGGGGTGTCGCGGATATGGCGCGTCTCA
CGTCTGCTGTCATGGAGTACACGCGTGGTCCACGCTGAGTAAAGGCTTGAACAGAGCGTTGGCGAC
GTTGGTGGCTGGCTGCATCGCGCTCGGAGCTCATCAGTTAGCTGAATTAGCTGAACGCTGTGGTATCAG
GGAGAGCCATAAGTCTACGGTCTCTTCTTCTGAGCGTCAGCGGCGACGTTCTTGGCTTATCC
CGGAGTCAAGGCCAAGTACGACTACGCGGTGACCATCTTCTACTGACCTTGGTCTGGTGGCGGTGTC
GAGCTACAGAGTGGAGAGCTATCCAGCTCGCGACCGCGTCTACACCATAGCGTCGGCGTCTTC
ATCTGCTCTGCACACCGCTTCTCTTCCCGTCTGGCGCGAGAGGAGCTCCACAAGCTCGCGCTCGG
GCACCTCGACAAACTCGCTCAGTTCATTGAAGGAATGGAATCAACTGCTTGGCGAAACAGTGTTCG
AAATAATTTGGGGAAAGATTTCCCCAAATGCACAAGAGCGTCTTAATCGAAGGCCACTGAGGAC
TCTTTGTCACCTTTCGCAATGGGAGCCTCGTATGGCCAGTTCAGATTCGACACCCATGGAGTCAAT
ACCAGAAGCTGGAACTCTTTGTGGCAATGTCGCTTCTTATGGAGGCTCTTCTCATATGTCATCAC
AACCTCAAAAACCCAGTGCCTGCTGCAGCCAACTGAGCTATCATGTAAAGTTCGAAAAACATGTGGC
GAAATGAGCTTGCATTCTCCAGGTGCTTAGGGATCTGCAATGGCACTCGAACAATGACTGTCCGT
CTCCAGTGAATACCCATGGCTACAGCGTGAAGCAGCGGAAAGCGTCCAGAGCGAGCTTGAGAGAA
CACGGCTCTGTGCAAGTGCATGATGGCGTCCCGCAACACTCTTGGCGACTTGGTGTAGGGGTG
AAGAAATCGCGAATGTGTTGATGCTCAGCAAGCTGGCGACTTAAAGAACCCGAGGACACAAAA
ATGCTGTTGTTAGTACCGTGGTGGGATAGCGAACCTTTCGCTGACGTGGTATTTTGTAAATCTT
CAAAAACATTGGTAGACTATATGGTGAAGAACATGGTAGTACTATAGTAGTACTATGATCGATACTGGAG
GGTCTGTATTGGTATTGTTGATTTACTGCTGAGACATGTTGG

```

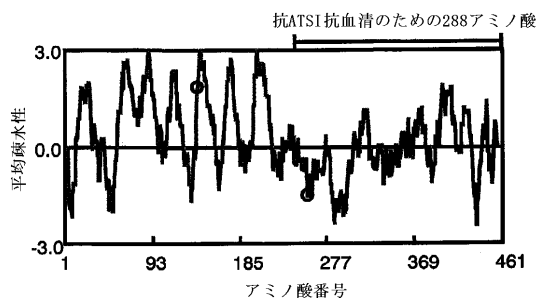
【 図 2 】

```

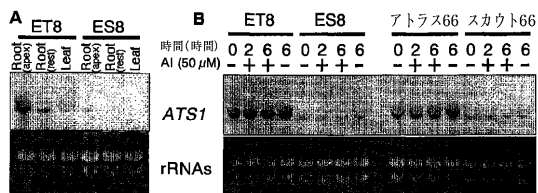
MDIDHGRESDEMGVGTIASCGLLHSLLAGLRRAAGFARKVGGAAAREPPRR
VAHSLKVGLALALVSVVYFVTPFNGLGVSIAWAVLTVVVVMEYTVGATLSKG
LNRALATLVAGCIAVGAHQLAELAERCQDQGEPIMLTVLVFFVASAATFLRPIEI
KAKYDYGVYTFILFTGLVAVSSYRVEELIQLAHQRFYTIAGVGFICLCTTVFLFPV
WAGEDVHKLASGNLDKLAQFIEGMEFNCFGENSVANNFGKDFPQMHKSVLN
SKATEDSLCTFAKWEPRHGQFRFRHPWSQYKQLGTLRCQASSMEALASYVIT
TSKTQCPAAANPELSCKVRKTCGEMSLHSSKVLRLDIAMATRTMTVPSPVNTIM
ATAVKA AESLRSELAENTALLQVMHVAVTATLLADLVDRVKEIAECVDVLARLA
HFKNPEDTKNVVSTVSRGIDEPLDPIVIL

```

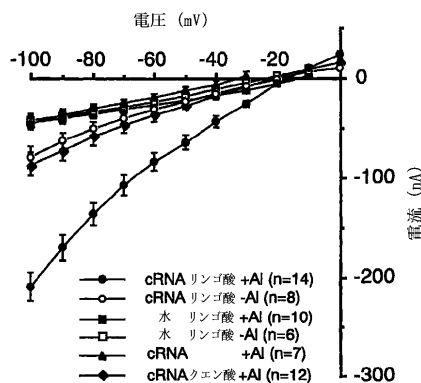
【 図 3 】



【 図 4 】



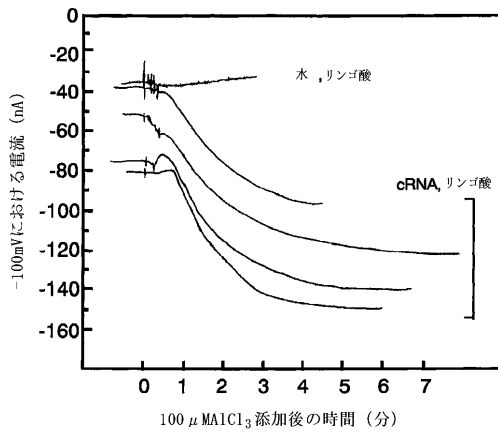
【 図 6 】



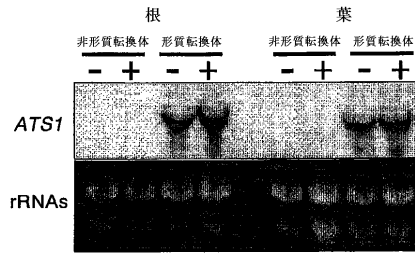
【 図 5 】

ET8	G E P I M L T V	143	W S Q Y	299
ES8	G E P I V L T V	144	W S Q Y	312
ET8	G K D E P Q M H	264	V V S T	444
ES8	G K D S P Q M H	267	V V S T	444

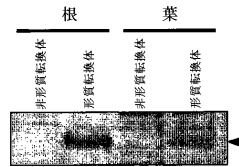
【 図 7 】



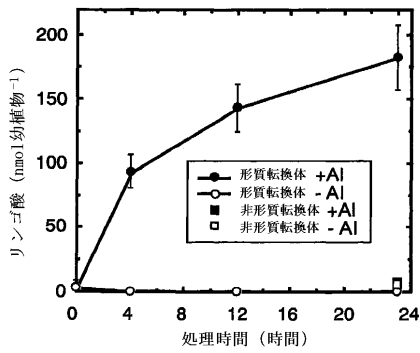
【 図 8 】



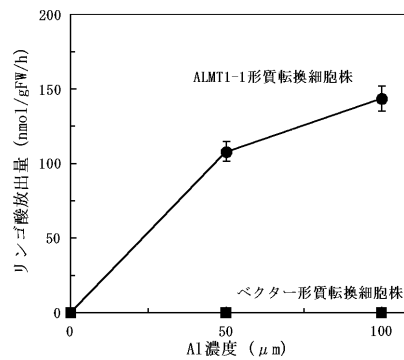
【 図 9 】



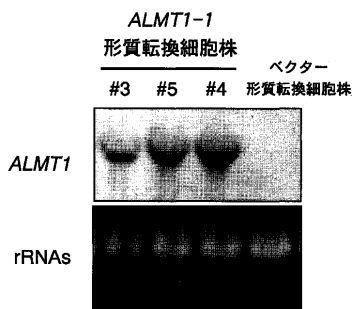
【 図 10 】



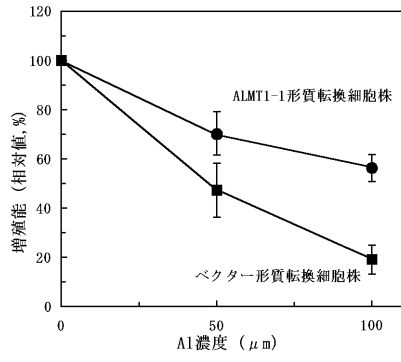
【 図 12 】



【 図 11 】



【 図 1 3 】





---

フロントページの続き

Fターム(参考) 2B030 AA02 AB04 AD05 CA17 CB02  
4B024 AA08 BA80 CA04 DA01 EA04 GA11 HA14  
4B065 AA11X AA89X AA89Y AB01 BA02 CA24 CA53  
4H045 AA10 BA10 CA32 EA05 FA74