

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11)特許番号

特許第3520328号
(P3520328)

(45)発行日 平成16年4月19日(2004.4.19)

(24)登録日 平成16年2月13日(2004.2.13)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I
C 1 2 N 15/09	Z N A	A 0 1 H 5/00 A
A 0 1 H 5/00		C 1 2 N 9/00
C 1 2 N 5/10		C 1 2 R 1:91
9/00		C 1 2 N 15/00 Z N A A
// (C 1 2 N 5/10		5/00 C

請求項の数 8 (全 13 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000-307149(P2000-307149)

(22)出願日 平成12年10月6日(2000.10.6)

(65)公開番号 特開2002-112785(P2002-112785A)

(43)公開日 平成14年4月16日(2002.4.16)

審査請求日 平成12年10月6日(2000.10.6)

(73)特許権者 598169457
奈良先端科学技術大学院大学長
奈良県生駒市高山町8916-5

(72)発明者 佐野 浩
奈良県生駒市鹿ノ台西2-7-15

(72)発明者 草野 友延
奈良県奈良市富雄元町2-7-12-203

(72)発明者 小泉 望
奈良県生駒市高山町8916-5 C505

(74)代理人 100072051
弁理士 杉村 興作

審査官 長井 啓子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 コーヒー属植物のテオプロミン合成酵素ポリペプチド及び当該ポリペプチドをコードする遺伝子

(57)【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、ポリペプチド。

(a) 配列表の配列番号1に示す、アミノ酸番号1-378で示されるアミノ酸配列からなることを特徴とする、ポリペプチド。

(b) 7-メチルキサンチンを基質としてテオプロミンを生成する活性を有し、(a)のアミノ酸の一部が欠失、置換若しくは付加された、ポリペプチド。

【請求項2】 請求項1記載のポリペプチドをコードする、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1-1298で示される塩基配列からなることを特徴とする、遺伝子。

子。

(d) 7-メチルキサンチンを基質としてテオプロミンを生成する活性を有するポリペプチドをコードし、(c)の塩基配列の一部が欠失、置換若しくは付加された、遺伝子。

【請求項4】 請求項2又は3記載の遺伝子の発現を抑制することにより、テオプロミンの生合成量が低下した、形質転換植物。

【請求項5】 請求項4記載の形質転換植物より採取した種子。

【請求項6】 請求項2又は3記載の遺伝子を導入することにより、テオプロミンの生合成量が増加した、形質転換植物。

【請求項7】 請求項6記載の形質転換植物より採取した種子。

【請求項8】 請求項2又3記載の遺伝子の発現を抑制することにより、テオプロミンの生合成量が低下した形質転換植物を作製する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、テオプロミン合成酵素のポリペプチド及び当該酵素をコードする遺伝子に関する。

【0002】

【従来の技術】コーヒーは、世界の至るところで愛好されている飲料であり、その有用性は非常に大きい。一方、コーヒーに含まれているカフェインは、コーヒーを過剰に摂取した場合に害を及ぼす原因となる物質である。カフェインはキサンチン誘導体の一種であり、キサンチン誘導体にはカフェインの他にテオフィリン、テオプロミンが含まれる。これらキサンチン誘導体は、ホスホジエステラーゼを阻害してcAMP量を増加させる事により、中枢興奮作用及び循環機能の亢進作用を有する事が知られている。キサンチン誘導体が有するこのような作用は、適量の摂取では精神の高揚など有用に働くが、上述した様に過剰量では有害となるために、カフェインレスコーヒーが世の中で広く求められていた。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】カフェインレスコーヒーを得るためにカフェインの生合成を人為的に抑制する目的で、キサンチン誘導体の生合成に関する遺伝子の採取が試みられてきた。図1 (Advances in Botanical Research, Vol.30, Academic Press (1999) p149より掲載) に、コーヒー属植物におけるカフェイン生合成の経路を示す。図1において、実線の矢印はカフェイン合成の主要経路を、点線の矢印はカフェイン合成のマイナーな経路を、それぞれ示す。図1の2段目に示される様に、キサンチンから7-メチルキサンチン、テオプロミンを経由してカフェインを生成する生合成経路が知られており、この経路はコーヒー属植物におけるカフェイン生合成の主要経路である。このカフェインの主要生合成経路の後半は3段階のN-メチル化反応であり、これらのN-メチル化反応はS-アデノシルメチオニン依存性の反応である事が知られている。7-メチルキサンチンからパラキサンチンを経由してカフェインを生合成する経路(図1の3段目)も存在しているが、この経路の寄与は大きなものではない。7-メチルキサンチンを合成する最初のメチル化反応については、当該反応を担う酵素の遺伝子が採取され、既に報告されている(国際公開番号 WO 97/35960)。しかし、第2段階、第3段階のメチル化反応に関する遺伝子は、まだ知られていなかった。効率的かつ確実に、カフェインの生合成経路を操作するには、カフェイン生合成に関する酵素の遺伝子について、より多くの知見を得る必要がある。

【0004】

【課題を解決するための手段】そこで、本発明者らはカフェインの生合成において、テオプロミンの生合成を担っている第2段階のメチル化反応に関する酵素に注目し、当該酵素をコードする遺伝子の採取を行った。当該酵素は7-メチルキサンチンからテオプロミンを生合成する反応を触媒する酵素であるために、当該酵素の遺伝子の発現を抑制すると、テオプロミンの生合成が抑制される。カフェインの生合成経路において、テオプロミンのN-メチル化反応によりカフェインが生成するために、テオプロミンの生合成が抑制されると、カフェインの生合成もまた抑制される。上述した様に、テオプロミンとカフェインとは共にキサンチン誘導体として類似の薬理作用を有するために、テオプロミンとカフェインの両者の生合成を同時に操作できる酵素の遺伝子を採用する事には大きな意義がある。即ち、第3段階のメチル化反応に関する、カフェインの最終的な生合成に関する酵素をコードする遺伝子を採用してその発現を抑制すると、カフェインの生合成は抑制されるがテオプロミン量は減少せず、代謝が抑制される為に逆にテオプロミンが蓄積されると考えられる。よってテオプロミンがカフェインと類似の薬理活性を有している事を考えると、テオプロミン合成酵素の遺伝子を採用した本発明の効果は大きいと考えられる。

【0005】

【発明の実施の形態】本発明は、配列表の配列番号2に示す、塩基番号1-1298で示される塩基配列からなることを特徴とする、コーヒーアラビカ(Coffea arabica)由来のテオプロミン合成酵素遺伝子である。テオプロミン合成酵素は上述したように、コーヒー属植物において、7-メチルキサンチンを基質としてテオプロミンを合成する、メチル化反応を触媒する酵素である。配列表の配列番号2記載の塩基配列で示される遺伝子は、そのようなテオプロミン合成酵素をコードする遺伝子である。

【0006】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。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10個以下、好ましくは7個以下、更に好ましくは3個以下の塩基が欠失、置換若しくは付加された配列を有する遺伝子である。また、そのような遺伝子は、配列表の配列番号1に示す遺伝子と90%以上、好ましくは95%以上、更に好ましく

は99%以上の相同性を有する。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。その様な遺伝子も、7-メチルキサンチンを基質としてテオプロミンを生合成する、テオプロミン合成酵素の特徴を有するポリペプチドをコードする限り、本発明の範囲内である。

【0007】更に本発明は、配列表の配列番号1に示す、アミノ酸番号1-378で示されるアミノ酸配列からなることを特徴とする、コーヒーアラビカ (*Coffea arabica*) 由来のテオプロミン合成酵素のポリペプチドである。配列番号1に示すポリペプチドの一部が欠失、置換若しくは付加されたポリペプチドとは、配列番号1に示すアミノ酸配列において10個以下、好ましくは7個以下、更に好ましくは3個以下のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加された配列を有するポリペプチドである。また、その様なポリペプチドは、配列表の配列番号1に示すポリペプチドと90%以上、好ましくは95%以上、更に好ましくは99%以上の相同性を有する。その様なポリペプチドも、7-メチルキサンチンを基質としてテオプロミンを合成するというテオプロミン合成酵素の特徴を有する限り、本発明の範囲内である。尚、配列表の配列番号3、配列番号5、配列番号7に示すポリペプチドは、コーヒーアラビカ (*Coffea arabica*) から得られ、配列表の配列番号1のアミノ酸配列と80%の相同性を有するポリペプチドである。これら3つのポリペプチドは、配列表の配列番号1と高い相同性を有しているにも関わらず、テオプロミン合成酵素活性を示さなかった。

【0008】配列表の配列番号2記載のテオプロミン合成酵素遺伝子の発現を抑制し、テオプロミンの生合成量を低下させた形質転換植物もまた、本発明の範囲内である。本発明のテオプロミン合成酵素遺伝子は、上述した様にコーヒーアラビカのテオプロミン生合成に関与する酵素をコードする遺伝子である。よって本発明の遺伝子の発現を抑制することにより、植物においてテオプロミンの生合成を抑制して、植物においてテオプロミンとカフェインの含量を低下させることが可能である。本発明のテオプロミン合成酵素遺伝子の発現を抑制する植物としては、コーヒーアラビカ (*Coffea arabica*)、コーヒーカネフォラ (*Coffea canephora*)、コーヒーリベリカ (*Coffea liberica*) 及びコーヒーデウェブレ (*Coffea dewevrei*) 等のコーヒー属植物が挙げられる。

【0009】それらの植物において、本発明の遺伝子の発現を抑制する事により、テオプロミンとカフェインの生合成を抑制することができる。遺伝子の発現を抑制する手段として、本発明の遺伝子のアンチセンス遺伝子を導入する方法を用いることができる。アンチセンス遺伝子とは、ある遺伝子を構成しているDNAの転写産物であるmRNAと、相補的な塩基配列を発現する遺伝子である。

アンチセンス遺伝子の転写産物は、本来のmRNAと相補性を有するために、アンチセンス遺伝子は翻訳段階で遺伝子発現を抑制する。この技術を利用することにより、テオプロミン合成酵素遺伝子の発現を抑制することが可能である。

【0010】その他にも、遺伝子発現抑制の方法がいくつか知られている。目的遺伝子の遺伝子破壊により、目的遺伝子の発現を抑制する事ができる。また、植物においては、センス遺伝子を導入して過剰発現しても遺伝子干渉現象により目的遺伝子の発現が抑制される、というコサプレッション技術(トランススイッチ技術)が知られており、その様な方法を用いても目的遺伝子の発現を抑制することができる。また、二本鎖RNAを用いるDouble-stranded RNA interference (RNAi)法が遺伝子発現の抑制に有効であることが、近年言われてきている(Chiu-Fen Chuang et al. PNAS (2000) vol.97,4985-4990)。二本鎖RNAは配列特異的に遺伝子発現を抑えるということが、線虫やショウジョウバエを中心に明らかにされてきた。この様な二本鎖RNAを用いる方法がRNAi法であり、本方法が線虫やショウジョウバエのみならず、シロイヌナズナ等の植物でも有効であることが最近示されてきている。RNAi法により遺伝子発現が抑制される機構はまだ知られていないが、本法は上記のアンチセンス法に比べて効率良く遺伝子発現を抑制することができると言われている。

【0011】ところで、カフェイン、テオプロミン等のプリンアルカロイドは、昆虫忌避作用があり、それが植物にとってのプリンアルカロイドの意義であると考えられている。そこで、本発明の遺伝子を導入してテオプロミンの生合成を促進させる事により、昆虫忌避活性を有する植物体を作製することができる。本発明の酵素が、7-メチルキサンチンを基質としてテオプロミンを生合成する活性を担っていることを考えると、前述の7-メチルキサンチンを合成する酵素の遺伝子(国際公開番号WO 97/35960)と共に本発明の遺伝子を植物に導入することは、特に有効であると思われる。7-メチルキサンチンを合成する酵素の活性が促進されると、本発明の酵素の基質が増加して、目的産物であるテオプロミンの蓄積が期待される。

【0012】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。本発明において使用可能なベクターはプラスミドベクターであり、例えばpBI121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。本発明者らは特開2000-245485において、コーヒー属植物の胚発生カルスをアグロバクテリウムツメファシエンスEHA101に感染させるこ

とにより、高い効率で形質転換できる方法を報告しており、特開2000-245485 に記載した形質転換方法は特に有用であると思われる。

【0013】

【実施例】(PCRによる増幅) 一对のディジェネレート・オリゴヌクレオチド(Forwardプライマー, GGITGYDSIDSIGGICCAAYAC; Reverseプライマー, ARIYKIYRTRRAAISWICCIIGG)を、TCS1(Kato et al 2000, GenBank accession no. AB031280)と2つのシロイヌナズナの機能未知のタンパク質(Z99708及びAC008153)の間で保存された領域に基づいて合成した。これらのオリゴヌクレオチドは、GC(A/S)(A/S)GPNTと、PGSF(H/Y)(G/K)(R/N)LFというアミノ酸配列に、それぞれ相当する。コーヒー・アラビカ(*Coffea arabica*)のcDNA及び上記の1組のプライマーを含む25 µlの反応混合液中で、以下の条件下でPCRを行った。即ち、94 で1分間反応した後、94 で30秒間の変性反応、52 で30秒間のアニーリング、72 で1分間の伸長反応の繰り返しを30サイクル行い、更に72 で7分間の最終伸長反応を行うという条件で、PCRを行った。増幅された約270塩基対のcDNA断片を用いて、cDNAライブラリーのスクリーニングに使用した。

【0014】(cDNAライブラリーの構築および目的cDNAのスクリーニング) コーヒー(*Coffea arabica*)の若い葉から全RNAを抽出し、oligo-dTカラム(Pharmacia)によりmRNAに精製した。ZAPII cDNA synthesis kit(Stratagene)を用いてmRNAからcDNAを合成し、ZAPIIベクターへ導入し、ファージライブラリーを作製した。上記の増幅された断片をプローブにcDNAライブラリーをスクリーニングした。得られたポジティブプラークをランダムに35ヶ選択し、プラスミドに変換した後、物理地図および部分シーケンシングを行ったところ、これらは4つの独立したクローンに帰属することが明らかとなった。

【0015】それぞれの代表であり、もっとも全長cDNAに近いクローン#1、#6、#35および#45につき、その塩基配列を決定した。また、その塩基配列のオープンリーディングフレームによりコードされる、推定アミノ酸配列を決定した。図2に、シーケンシングを行った遺伝子配列を示す。クローン#45について得られたcDNAの塩基配列を、配列表の配列番号2及び図2Dに示す。当該遺伝子のオープンリーディングフレームは塩基番号32-1168であり、その領域によりコードされる推定アミノ酸配列を、配列表の配列番号1に示す。また、クローン#1について得られたcDNAの塩基配列を、配列表の配列番号4及び図2Aに示す。当該遺伝子のオープンリーディングフレームは塩基番号14-1171であり、その領域によりコードされる推定アミノ酸配列を、配列表の配列番号3に示す。また、クローン#6について得られたcDNAの塩基配列を、配列表の配列番号6及び図2Bに示す。当該遺伝子のオープンリー

ディングフレームは塩基番号44-1201であり、その領域によりコードされる推定アミノ酸配列を、配列表の配列番号5に示す。また、クローン#35について得られたcDNAの塩基配列を、配列表の配列番号8及び図2Cに示す。当該遺伝子のオープンリーディングフレームは塩基番号45-1163であり、その領域によりコードされる推定アミノ酸配列を、配列表の配列番号7に示す。以下、クローン#45をMXMT1と、クローン#1をMTL1と、クローン#6をMTL2と、クローン#35をMTL3と、遺伝子をそれぞれ命名した。

【0016】MXMT1、MTL1、MTL2、及びMTL3がコードするアミノ酸配列のアラインメントを比較した結果を、図3に示す。その結果、これら4つの配列の相同性が非常に高い事が示された。これらのポリペプチドの機能を確認するために、対応するクローンの遺伝子を大腸菌で発現させて、酵素活性の確認を行った。

【0017】(GST融合タンパク質の発現) MTL1(クローン#1)、MTL2(クローン#6)、MTL3(クローン#35)およびMXMT1(クローン#45)のオープンリーディングフレームを含む領域をPCR(polymerase chain reaction)で増幅し、それらをpGEX 4T-2ベクター(Pharmacia)へ適宜クローニングし、大腸菌(JM109)を形質転換した。得られた大腸菌をアンピシリンを含むLB液体培地で培養後、OD600が0.5に達した後、終濃度が1mMになるようにIPTG(isopropyl thio-β-D-galactoside)を加え、さらに16で6時間培養した。大腸菌を超音波破碎し、グルタチオン・セファロース4Bを用いてGST(glutathione S-transferase)融合タンパク質として精製した。タンパク質濃度はBradford法により測定した。各GST融合タンパク質(500 ng)をSDS-PAGE(ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動)で分離した後にCBB(クマシーブリリアンドブルー)染色をおこない、精製されたことを確認した。得られたGST融合タンパク質につき、SDS-PAGEにより純度を解析した結果を図4に示す。図4において、レーン1はMTL2由来の融合蛋白質を、レーン2はMTL3由来の融合蛋白質を、レーン3はMXMT1由来の融合蛋白質をそれぞれ示す。その結果、得られた3つの融合蛋白質はほぼ純粋であることが示された。

【0018】(薄層クロマトグラフによる酵素活性の測定) 薄層クロマトグラフ(TLC)により、酵素活性の測定を行った。加藤ら(Plant Physiol., 1996, 98, 629-636)の方法に基づき、酵素活性の測定を行った。具体的には100 µlの反応液(100 mM Tris-HCl (pH7.5)、200 µMの基質(キサンチン、7-メチルキサンチン、テオプロミン、パラキサンチン、テオフォリン)、4 µM ¹⁴C 標識S-アデノシルメチオニン、200 µM MgCl₂、200 ng GST融合タンパク質)を27で2時間反応後、1 mlのクロロホルムで抽出し、クロロホルム層を回収し、スピードバックコンセントレーターでクロロホル

ムをとばした。5 μ l の50%メタノールに溶解後、TLCで展開した(展開溶媒は水:酢酸:n-ブタノール=2:1:4、v/v/v)。展開後、画像解析装置(FujiBAS2000)で放射能シグナルを検出した。キサンチン(X)、7-メチルキサンチン(7-Mx)、テオプロミン(Tb)、パラキサンチン(Px)、テオフォリン(Tp)を基質として、MTL2、MTL3及びMXMT1由来の融合蛋白質の酵素活性を測定した結果を、図5に示す。図5よりMXMT1由来の融合蛋白質は、7-メチルキサンチンを基質としてテオプロミンを合成する強力な活性を有していた。MXMT1由来の融合蛋白質は、パラキサンチンを基質としてカフェインを合成する活性も有していたが、その相対活性は前述の活性の15%であった。一方、MTL2及びMTL3由来の融合蛋白質は、上記の化合物を基質として用いてメチル基転移活性を示すことはなかった。

【0019】(高速液体クロマトグラフによる酵素活性の測定と生産物の同定)高速液体クロマトグラフ(HPLC)により、MXMT1の融合蛋白質の酵素活性の測定と、酵素反応による酵素反応生産物の同定を行った。100 μ lの反応液(100mM Tris-HCl (pH7.5)、200 μ Mの基質(7-メチルキサンチン、パラキサンチン、テオプロミン)、50 μ M S-アデノシルメチオニン、200 μ M MgCl₂、200ng GST融合タンパク質)を27 \times 2時間インキュベート後、1mlのクロロホルムで抽出し、クロロホルム層を回収し、スピードバックコンセントレーターでクロロホルムをとばした。50 μ lの12%アセトニトリルに溶解後、UV検出系を備えたHPLC(Shodex RSpak DS-613 column)で分画した。展開溶媒は12%のアセトニトリルを用い、A254でシグナルを検出した。

【0020】その結果を、図6に示す。図6Aは、MXMT

<110> 出願人氏名: 奈良先端化学技術大学院大学長

<120> 発明の名称: コーヒー属植物のテオプロミン合成酵素ポリペプチド及び当該ポリペプチドをコードする遺伝子

<160> 配列の数: 8

<210> 配列番号: 1

<211> 配列の長さ: 378

<212> 配列の型: アミノ酸

<213> 起源: Coffea arabica

<400> 配列

```
MELQEVLMHMEGEGDTSYAKNASYNLALAKVKPFLEQCIR ELLRANLPNI NKCIKVADLG 60
CASGPNLLT VRDIVQSIDK VGQEEKNELE RPTIQIFLND LFNQDNFNSVF KLLPSFYRKL 120
EKENGRKIGS CLISAMPGSF YGRLFPEESM HFLHSCYSVH WLSQVPSGLV IELGIGANKG 180
SIYSSKGRCP PVQKAYLDQF TKDFTTFLRI HSKELFSRGR MLLTCICKVD EFDEPNPLDL 240
LDMAINDLIV EGGLEEEKLD SFNIPFFTPS AEEVKCIVEE EGSCEILYLE TFKAHYDAAF 300
SIDDDYPVRS HEQIKA EYVA SLIRSVYEPI LASHFGA AIM PDLFHLR LAKH AAKVLHMGKG 360
CYNLLIISLA KKPEKSDV 378
```

<210> 配列番号: 2

<211> 配列の長さ: 1298

<212> 配列の型: 核酸

1の融合蛋白質を、S-アデノシルメチオニンと7-メチルキサンチンを基質と反応させ、その反応産物をHPLCで解析したチャートである。図6Bは、標品としてテオプロミンをHPLCで解析したチャートである。図6Cは、ネガティブコントロールとして、MXMT1の融合蛋白質、S-アデノシルメチオニン、7-メチルキサンチンを混合した後にすぐに反応を止め、その混合液をHPLCで解析したチャートである。図6Dは、標品として、7-メチルキサンチン、テオプロミン、パラキサンチン、カフェインをHPLCで解析したチャートである。図6Eは、S-アデノシルメチオニンと7-メチルキサンチンをMXMT1の融合蛋白質と反応させた反応液に、テオプロミンを添加してHPLCで解析したチャートである。図6Aで検出された反応生成物のピーク位置は、標品として加えたテオプロミンの位置と一致し、また酵素反応液にテオプロミンを添加しても1つのピークしか検出されなかったことから、MXMT1の融合蛋白質の酵素反応により、7-メチルキサンチンを基質としてテオプロミンが生成する事が示された。

【0021】

【発明の効果】本発明により、コーヒーアラビカにおけるテオプロミン合成酵素のポリペプチド及び当該ポリペプチドをコードする遺伝子が与えられた。テオプロミン合成酵素はカフェインの生合成に関与する酵素であり、当該酵素の遺伝子発現を抑制した形質転換植物を作製することにより、カフェインレスコーヒーを得ることができる。

【0022】

【配列表】

< 2 1 3 > 起源 : *Coffea arabica*

< 4 0 0 > 配列

```

AGCAGTCGCA ATTCGATTGT CCTGCATATG AATGGAGCTC CAAGAAGTCC TGCATATGAA 60
TGAAGGTGAA GGCGATACAA GCTACGCCAA GAATGCATCC TACAATCTGG CTCTTGCCAA 120
GGTGAACCT TTCCTTGAAC AATGCATACG AGAATTGTTG CGGGCCAAC TGCCAACAT 180
CAACAAGTGC ATTAAGTTG CGGATTTGGG ATGCGCTTCT GGACCAAACA CACTTTTAAC 240
AGTGCGGGAC ATTGTGCAAA GTATTGACAA AGTTGGCCAG GAAGAGAAGA ATGAATTAGA 300
ACGTCCCACC ATTCAGATTT TTCTGAATGA TCTTTTCCAA AATGATTTC AATCGGTTTT 360
CAAGTTGCTG CCAAGCTTCT ACCGCAAACG CGAGAAAGAA AATGGACGCA AGATAGGATC 420
GTGCCTAATA AGCGCAATGC CTGGCTCTTT CTACGGCAGA CTCTTCCCG AGGAGTCCAT 480
GCATTTTTTG CACTCTTGT ACAGTGTTC TGGTTATCT CAGGTTCCA GCGGTTTGGT 540
GATTGAATTG GGGATTGGTG CAAACAAAGG GAGTATTTAC TCTTCCAAAG GATGTCGTCC 600
GCCCGTCCAG AAGGCATATT TGGATCAATT TACGAAAGAT TTTACCACAT TTCTAAGGAT 660
TCATTCGAAA GAGTTGTTTT CACGTGGCCG AATGCTCCTT ACCTGCATTT GTAAAGTAGA 720
TGAATTCGAC GAACCGAATC CCCTAGACTT ACTTGACATG GCAATAAACG ACTTGATTGT 780
TGAGGGACTT CTGGAGGAAG AAAAATTGGA TAGTTTCAAT ATTCCATTCT TTACACCTTC 840
AGCAGAAGAA GTAAAGTGCA TAGTTGAGGA GGAAGTTCT TCGCAAATTT TATATCTGGA 900
GACTTTTAAG GCCCATTATG ATGCTGCCTT CTCTATTGAT GATGATTACC CAGTAAGATC 960
CCATGAACAA ATTAAGCAG AGTATGTGGC ATCATTAAAT AGATCAGTTT ACGAACCCAT 1020
CCTCGCAAGT CATTGAGGAG AAGCTATTAT GCCTGACTTA TTCCACAGGC TTGCGAAGCA 1080
TGCAGCAAAG GTTCTCCACA TGGGCAAAGG CTGCTATAAT AATCTTATCA TTTCTCTCGC 1140
CAAAAAGCCA GAGAAGTCAG ACGTGAAAA GTTTGTTTTT AGTTGGTTTT TGTGCCGTTG 1200
GGGTCTTTC GGGTATTGTC GTTTGTATT CGTAATAAAA GTGATGTGCA AGAATAAGAT 1260
ATTTAGTACA ATATTTTCAT AAAAAAAAAA AAAAAAAA 1298

```

< 2 1 0 > 配列番号 : 3

< 2 1 1 > 配列の長さ : 3 8 5

< 2 1 2 > 配列の型 : アミノ酸

< 2 1 3 > 起源 : *Coffea arabica*

< 4 0 0 > 配列

```

MELQEVLMN GGEGEASYAK NSSFNQLVLA KVKPVLEQCV RELLRANLPN INKCIKVADL 60
GCASGPNTLL TVWDTVQSID KVKQEMKNEL ERPTIQVFLT DLFQDNFNSV FMLLPSFYRK 120
LEKENGRKIG SCLIAAMPGS FHGRLFPEES MHFLHSSYSL QFLSQVPSGL VTELGITANK 180
RSIYSSKASP PPVQKAYLDQ FTKDFTTFLR MRSEELLSRG RMLLTICKG DECDGPNTMD 240
LLEMAINDLV AEGRLGEEKL DSFNVPITYA SVEEVKCMVE EEGSFEILYL QTFKLRDAG 300
FSIDDDCQVR SHSPVYSDEH ARAAHVASLI RSVYEPILAS HFGEAIPDI FHRFATNAAK 360
VIRLGKGFYN NLIIISLAKKP EKSDI 385

```

< 2 1 0 > 配列番号 : 4

< 2 1 1 > 配列の長さ : 1 3 6 0

< 2 1 2 > 配列の型 : 核酸

< 2 1 3 > 起源 : *Coffea arabica*

< 4 0 0 > 配列

```

GTCCTGCATA TGAATGGAGC TCCAAGAAGT CCTGCATATG AATGGAGGCG AAGCGAAGC 60
AAGCTACGCC AAGAATTCAT CCTTCAATCA ACTGGTTCTC GCCAAGGTGA AACCTGTCCT 120
TGAACAATGC GTACGGGAAT TGTTGCGGGC CAACTTGCCC AACATCAACA AGTGCAATTA 180
AGTTGCAGAT TTGGGATGCG CTTCCGGACC AAACACACTT TTAACCGTTT GGGACACTGT 240
ACAAAGTATT GACAAAGTTA AGCAAGAAAT GAAGAATGAA TTAGAACGTC CCACCATTCA 300
GGTTTTTCTG ACTGATCTTT TCCAAAATGA TTTCAATTCC GTTTTTCATGC TGCTGCCAAG 360
CTTCTACCGC AAACCTGAGA AAGAAAATGG ACGCAAATAA GGATCGTGCC TAATAGCCGC 420

```

AATGCCTGGC TCTTTCCACG GCAGACTCTT CCCCAGGAG TCCATGCATT TTTTACTACTC 480
 TTCTTACAGT CTTTCAGTTTT TATCCCAGGT TCCCAGCGGT TTGGTGACTG AATTGGGGAT 540
 CACTGCGAAC AAAAGGAGCA TTTACTCTTC CAAAGCAAGT CCTCCGCCG TCCAGAAGGC 600
 ATATTTGGAT CAATTTACGA AAGATTTTAC CACATTTTTA AGGATGCGTT CGGAAGAGTT 660
 GCTTTACAGT GGCCGAATGC TCCTTACTTG CATTTGTAAA GGAGATGAAT GCGACGGCCC 720
 GAATACCATG GACTTACTTG AGATGGCAAT AAACGACTTG GTTGCTGAGG GACGTCTGGG 780
 GGAAGAAAAA TTGGACAGTT TCAATGTTCC AATCTATACA GCTTCAGTAG AAGAAGTAAA 840
 GTGCATGGTT GAGGAGGAAG GTTCTTTTGA AATTTTATAC TTGCAGACTT TTAAGCTCCG 900
 TTATGATGCT GGCTTCTCTA TTGATGATGA TTGCCAAGTA AGATCCCAT TCCAGTATA 960
 CAGCGATGAA CATGCTAGAG CAGCGCATGT GGCATCATT ATTAGATCAG TTTACGAACC 1020
 CATCCTAGCA AGTCATTTTG GAGAAGCTAT TATACCTGAC ATATTCCACA GTTTTCGGAC 1080
 GAATGCAGCA AAGGTTATCC GCTTGGGCAA AGGCTTCTAT AATAATCTTA TCATTTCTCT 1140
 TGCCAAAAAA CCAGAGAAGT CAGACATATA AAAGCTTGT TTTAGTTGGT TTTTGTGTTA 1200
 TGGGTTGTTT TCTGATACGG GGAAGGATT CAGTCCGTT GGGGTTCTAT CCGAGTATTG 1260
 TACTTTTTAT ATTATTAGTT GGTGTATAAT TATTATGTTA CATTGTTATA TTCGTAATAA 1320
 AAGTGACGTA CAAAAATAA ATATTTTCAT AAAAAAAAAA 1360

< 2 1 0 > 配列番号 : 5

< 2 1 1 > 配列の長さ : 3 8 5

< 2 1 2 > 配列の型 : アミノ酸

< 2 1 3 > 起源 : *Coffea arabica*

< 4 0 0 > 配列

MELQEVLMHNM GEGDASYAK NSSFNQLVLA KVKPVLEQCV GELLRANLPN INKCIKVADL 60
 GCASGPNTLL TVRDIQSID KVRQEMKNEL ERPTIQVFLT DLFQNDFNSV FMLLPsfYRK 120
 LEKENGKIG SCLIAAMPGS FHGRLFPEES MHFLHSSYSL QFLSQVPSGL VTELGITANK 180
 RSIYSSKASP PPVQKAYLDQ FTKDFTTFLR IRSEELLSRG RMLLTICKG DEFDPNTMD 240
 LLEMAINDLV VEGHLEEKL DSNVPIYAA SVEELKIVE EEGSFEILYL ETFKLRDAG 300
 FSIDDDCQVR SHSPEYSDEH ARAAHVASLL RSVYEPILAN HFGEAIPDI FHRFATNAAK 360
 VIRLGKGFYN NLIISLAKKP EKSDI 385

< 2 1 0 > 配列番号 : 6

< 2 1 1 > 配列の長さ : 1 3 0 4

< 2 1 2 > 配列の型 : 核酸

< 2 1 3 > 起源 : *Coffea arabica*

< 4 0 0 > 配列

TTTAGCAGTC CCAATTCGAT TTATGTACAA GTCCTGCATA TGAATGGAGC TCCAAGAAGT 60
 CCTGCATATG AATGGAGCGC AAGGCGATGC AAGCTACGCC AAGAATTCAT CCTTCAATCA 120
 ACTGGTTCTC GCCAAGGTGA AACCTGTCCT TGAACAATGC GTAGGGGAAT TGTTGCGGGC 180
 CAACTTGCCC AACATCAACA AGTGCATTAA AGTTGCGGAT TTGGGATGCG CTTCGGGACC 240
 AAACACACTT TTAACAGTTC GGGACATTGT ACAAAGTATT GACAAAGTTA GGCAAGAAAT 300
 GAAGAATGAA TTAGAACGTC CCACCATTCA GGTTTTTCTG ACTGATCTTT TCCAAAATGA 360
 TTTCAATTCG GTTTTTATGT TGCTGCCAAG TTTCTACCGC AAACCTTGAGA AAGAAAATGG 420
 ACGCAAGATA GGATCGTGCC TAATAGCCGC AATGCCTGGC TCTTTCCACG GCAGACTCTT 480
 CCCCAGGAG TCAATGCATT TTTTACTACTC TTCTTACAGT CTTCAATTTT TATCCCAGGT 540
 TCCCAGCGGT TTGGTGACTG AATTGGGGAT CACTGCGAAC AAAAGGAGCA TTTACTCTTC 600
 CAAAGCAAGT CCTCCGCCG TCCAGAAGGC ATATTTGGAT CAATTTACGA AAGATTTTAC 660
 CACATTTTTA AGGATTGCTT CGGAAGAGTT GCTTTCACGC GGCCGAATGC TCCTTACTTG 720
 CATTTGCAAA GGAGATGAAT TCGACGGCCC GAATACCATG GACTTACTTG AGATGGCAAT 780
 AAACGACTTG GTTGTGAGG GACATCTGGA GGAAGAAAAA TTGGACAGTT TCAATGTTCC 840
 AATCTATGCA GCTTCAGTAG AAGAATTA AATGATGTTA GAGGAGGAAG GTTCTTTTGA 900

AATTTTGTAC TTGGAGACTT TTAAGCTCCG TTATGATGCT GGCTTCTCTA TTGATGATGA 960
 TTGCCAAGTA AGATCCCATT CCCCAGAATA CAGCGATGAA CATGCTAGAG CAGCGCATGT 1020
 GGCATCATT CTTAGATCAG TTTACGAACC CATCCTCGCA AATCATTTTG GAGAAGCTAT 1080
 TATACCTGAC ATATTCCACA GGTTCGCGAC GAATGCAGCA AAGTTATCC GCTTGGGCAA 1140
 AGGCTTCTAT AATAATCTTA TCATTCTCT TGCCAAAAA CCAGAGAAGT CAGACATATA 1200
 AAAGCTTGT TATAGTTGGT TTTTGTGCTA TGGTTTGT TCTGATACGG GGAAAGGATT 1260
 TAGTGCGGT GGGTTCAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAA 1304

< 2 1 0 > 配列番号 : 7

< 2 1 1 > 配列の長さ : 3 7 2

< 2 1 2 > 配列の型 : アミノ酸

< 2 1 3 > 起源 : *Coffea arabica*

< 4 0 0 > 配列

MELQEVLRMN GEGDTSYAK NSAYNQLVLA KVKPVLEQCV RELLRANLPN INKCIKVADL 60
 GCASGPNTLL TVRDIQSID KVGQEKNEL ERPTIQIFLN DLPNDFNSV FKLLPSFYRK 120
 LEKENGRIKIG SCLIGAMPGS FYSRLFPEES MHFLHSCYCL QWLSQVPSGL VTELGISTNK 180
 GSIYSSKASR LPVQKAYLDQ FTKDFTTFLR IHSEELFSHG RMLLTICKG VELDARNAID 240
 LLEMAINDLV VEGHLEEKL DSFNLPVYIP SAEVKIVE EEGSFEILYL ETFKVLVDAG 300
 FSIDDEHIKA EYVASSRAV YEPILASHFG EAIIPDIFHR FAKHAAKVLV LGKGFYNNLI 360
 ISLAKKPEKS DV 372

< 2 1 0 > 配列番号 : 8

< 2 1 1 > 配列の長さ : 1 3 1 6

< 2 1 2 > 配列の型 : 核酸

< 2 1 3 > 起源 : *Coffea arabica*

< 4 0 0 > 配列

CTTTGGCAGT CCCAATTTGA TTTATGTACA AGTCCTGCAT ATGAATGGAG CTCCAAGAAG 60
 TCCTGCGGAT GAATGGAGGC GAAGGCGATA CAAGCTACGC CAAGAATTCA GCCTACAATC 120
 AACTGGTTCT CGCCAAGGTG AAACCTGTCC TTGAACAATG CGTACGGGAA TTGTTGCGGG 180
 CCAACTTGCC CAACATCAAC AAGTGCATTA AAGTTGCGGA TTTGGGATGC GCTTCTGGAC 240
 CAAACACACT TTTAACAGTT CGGGACATTG TCCAAAGTAT TGACAAAGTT GGCCAGGAAA 300
 AGAAGAATGA ATTAGAACGT CCCACCATTG AGATTTTTCT GAATGATCTT TTCCCAAATG 360
 ATTTCAATTC GGTTTTCAAG TTGCTGCCAA GCTTCTACCG CAAACTTGAG AAAGAAAATG 420
 GACGCAAAAT AGGATCGTGC CTAATAGGGG CAATGCCCGG CTCTTTCTAC AGCAGACTCT 480
 TCCCGAGGA GTCCATGCAT TTTTACTACT CTTGTTACTG TCTTCAATGG TTATCTCAGG 540
 TTCTAGCGG TTTGGTGACT GAATTGGGGA TCAGTACGAA CAAAGGGAGC ATTTACTCTT 600
 CCAAAGCAAG TCGTCTGCCC GTCCAGAAGG CATATTTGGA TCAATTTACG AAAGATTTTA 660
 CCACATTTCT AAGGATTCAT TCGGAAGAGT TGTTTTACA TGGCCGAATG CTCCTTACTT 720
 GCATTTGTAA AGGAGTTGAA TTAGACGCCG GGAATGCCAT AGACTTACTT GAGATGGCAA 780
 TAAACGACTT GGTGTTGAG GGACATCTGG AGGAAGAAAA ATGGGATAGT TTCAATCTTC 840
 CAGTCTATAT ACCTTCAGCA GAAGAAGTAA AGTGCATAGT TGAGGAGGAA GGTCTTTTGG 900
 AAATTTTATA CCTGGAGACT TTTAAGGTCC TTTACGATGC TGGCTTCTCT ATTGACGATG 960
 AACATATTA AGCAGAGTAT GTTGCATCTT CCGTTAGAGC AGTTTACGAA CCCATCTCTG 1020
 CAAGTCATTT TGGAGAAGCT ATTATACCTG ACATATTCCA CAGGTTTGGC AAGCATGCAG 1080
 CAAAGGTTCT CCCCTTGGGC AAAGGCTTCT ATAATAATCT TATCATTCT CTGCCAAAA 1140
 AGCCAGAGAA GTCAGACGTG TAAAAGTTTG TTTTGTGTT GGGGAAAGGA ATAAGTCCG 1200
 TTGGGGTCT TTCGGTATT GTGCTTTTTA TATTATATTG TTTTGTATCC GTAATAAAG 1260
 TGGTGTGTA GAATAAGATA TTTGACATAT ATTATTTTCA AAAAAAAAAA AAAAAA 1316

T 【図面の簡単な説明】

【図 1】図 1 は、カフェイン生合成の経路を示す図であ

る。

【図 2】図 2 は、MTL1、MTL2、MTL3及びMXMT1 より得た

cDNAの塩基配列を示す図である。

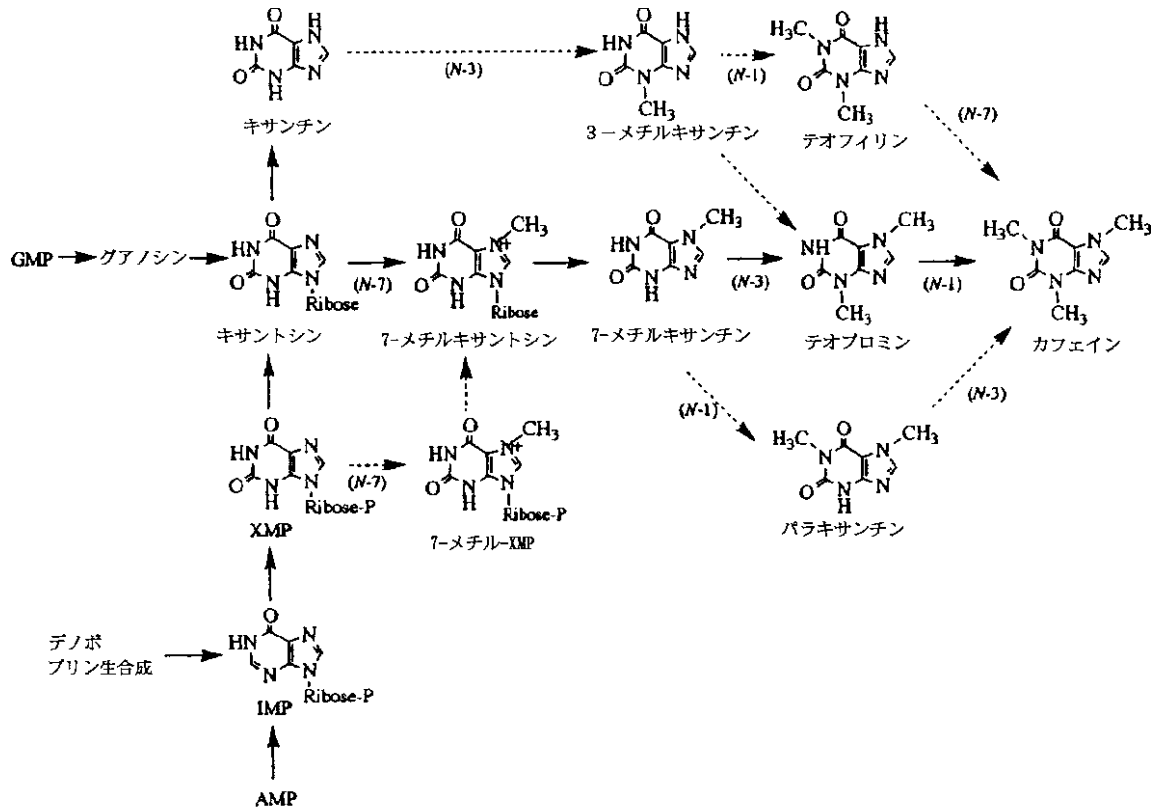
【図3】図3は、MXMT1、MTL2及びMTL3より得たアミノ酸配列のアラインメントを示す図である。

【図4】図4は、MTL2、MTL3及びMXMT1より得た融合蛋白質をSDS-PAGEで解析した結果を示す写真である。

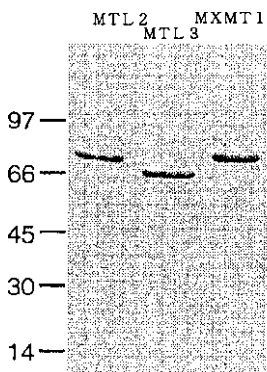
【図5】図5は、MTL2、MTL3及びMXMT1より得た融合蛋白質の酵素活性を、TLCで解析した結果を示す写真である。

【図6】図6は、MXMT1より得た融合蛋白質の酵素反応生成物をHPLCで同定した結果を示すチャートである。

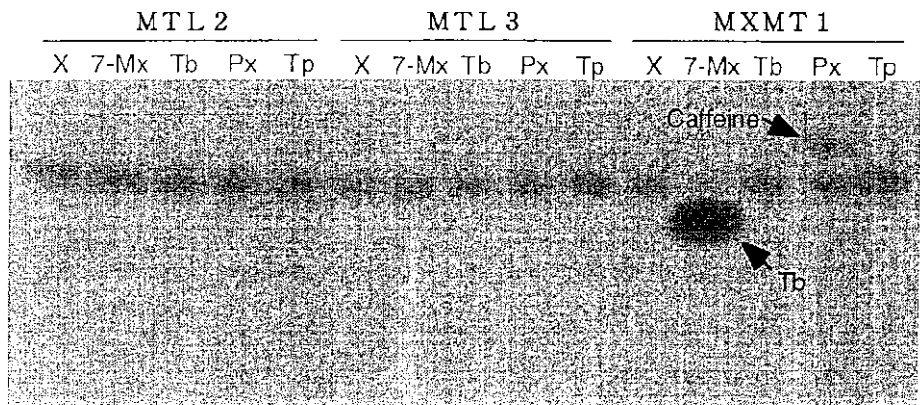
【図1】



【図4】



【図5】



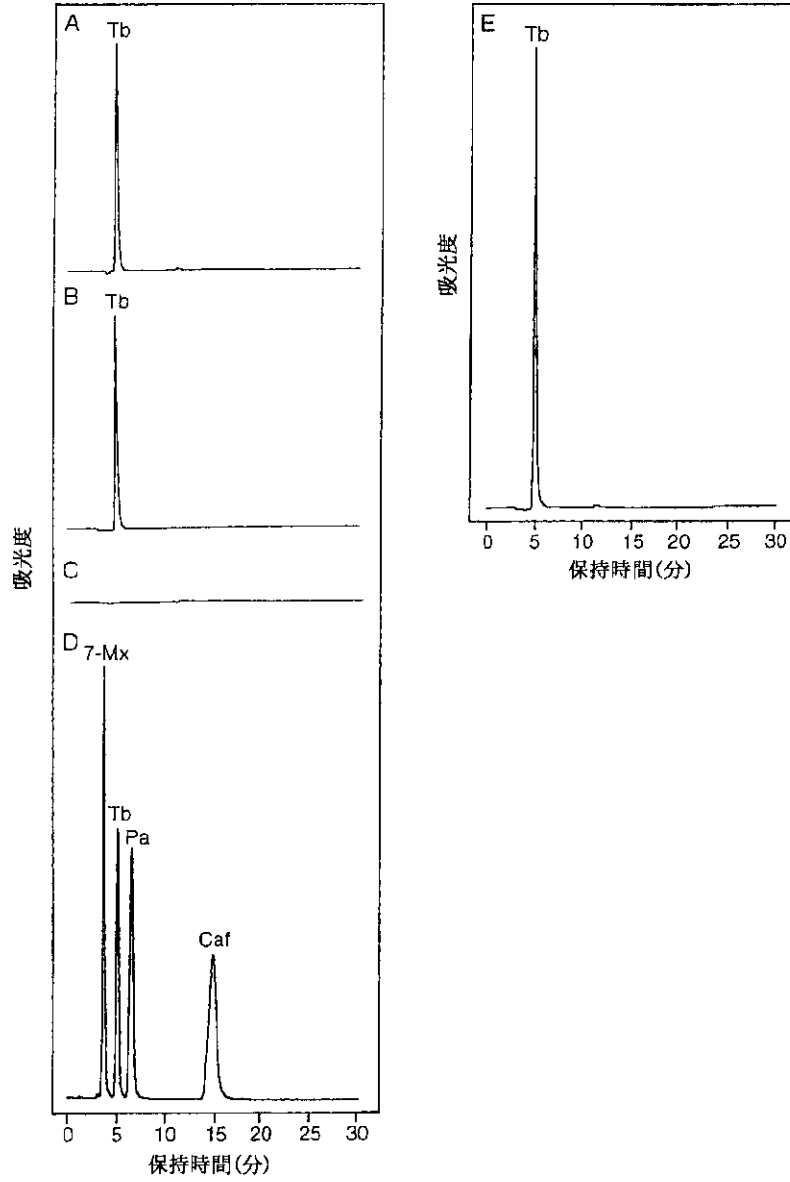
【図2】

A	
GTCTGCATA TGAATGGAGC TCCAAGAAGT CCTGCATATG AATGGAGGCG AAGGCGAAGC AAGCTACGCC AAGAATTCAT CCTTCAATCA	90
ACTGTTCTCC GECAGGTGA AACCTGTCTT YGAACAATGC GTACGGGAAT TGTTGCGGGC CAACTTGCCT ACATCAACA AGTGCATTA	180
AGTTGCAGAT TTGGGATGG CTTCGGACC AAACACACTT TTAACCGTIT GGGACACTGT ACAGAGTATT GACAAAAGTTA AGCAAGAAAT	270
GAAGAATGA TTAGAACGTC CCACCATTC A GTTTTTCTG ACTGATCTTT TCCAAGATGA TTTCATTCG GTTTTCATGC TGCTGCCAAG	360
ETTTACCCGC AACCTTGAGA AAGAAAATGG ACGCAAAATA GGATCGTGGC TAATAGCCGC AATGCTGTGC TCTTCCAGC GCAGACTCTT	450
CCCCGAGGAG TCCATGCAIT TTTTACACTC TTTTACAGT CTTCAGITTT TATCCAGGT TCCCAGCGGT TTGGTGACTG AATTGGGGAT	540
CACTGCGAAC AAAAGGAGCA TTTACTTTC CAAGCAAGT CCTCCGCGCC TCCAGAACGC ATATTGGAT CAATTACGA AAGATTTTAC	630
CACATTTTTA AAGATGGTT CGGAAGATT GCTTTCAGT GCGCGAATGC TCTTACTTGG CATTGTAAA GGAGATGAAT GCGAGCGGCC	720
GAATACCTAG GACTTACTTG AGATGGCAAT AAAGCACTTG GTTCTGAGG GACTCTGGG GGAAGAAAAA TTGCAGACTT TCAATGTCC	810
AATCTATACA GCTTCAGTAG AAGAAGTAAA GTGCATGCTT GAGGAGGAG GTCTTTTGA AATTTTATAC TTGCAGACTT TTAAGCTCG	900
TTATGATGCT GGCTTCTCTA TTGATGATGA TTGCCAATA AGATCCCATT CCCCAGTATA CAGCGATGAA CATGCTAGAG CAGCGCATGT	990
GGCATCATTA ATTAGATCAG TTTACGAACC CATCTTAGCA AGTCATTTG GAGAAGCTAT TATACCTGAC ATATTCACA GGTTTGCGAC	1080
GAATGCGACA AAGGTTATCC GCTTGGGCAA AGGCTTCTAT AATAACTTAA TCAATTTCTC TGCCAAAAA CCAGAGAAGT CAGACATATA	1170
AAAGCTTGT TTAGTTGGT TTTTGGTTA TGGGTGTIT TCTGATACGG GGAAGGATT CAGTGGGTT GGGGTTCTAT CCGGATATTG	1260
TACTTTTTAT ATTTATTAGT GGTGTATAA TATTATGTTA CATTGTATA TTCTTAATAA AAGTGACGTA CAAAAATAA ATATTTTCAT	1350
AAAAAAAAA	1360
B	
TTTAGCAGTC CCAATTCGAT TTAGTACAA GTCTGCATA TGAATGGAGC TCCAAGAAGT CCTGCATATG AATGGAGGCG AAGGCGATGC	90
AAGCTACGCC AAGAATTEAT CCTCAATCA ACTGGTCTC GCCAAGGTGA AACCTGTCTT TGAACAATGC GTAGGGGAAT TGTTCGGGCG	180
CAACTTGCCT AACATCAACA AGTGCATTA AGTTGCGGAT TTGGGATGCG CTTCGGGACC AAACACACTT TTAACAGTTC GGGCATTTGT	270
ACAAAAGTAT GACAAAAGTTA GCGAAGAAAT GAAGAATGAA TTAGAAGGTC CCACCATTC A GTTTTTCTG ACTGATCTTT TCCAAGATGA	360
TTTTCAATTC GTTTTCATGT TGTGCGCAAG TTTCTAECGC AAACCTTGAA AAGAAAATGG ACGCAAGATA GGATGTGCC TAATAGCCGC	450
AATGCTTGGC TCTTTCAGC GCAGACTCTT CCGCAGGAG TCAATGCAIT TTTTACACTC TTTTACAGT CTTCATTTT TATCCAGGT	540
TCCCAGCGGT TTGGTGACTG AATTGGGGAT CACTGCGAAC AAAAGGAGCA TTTACTTCTC CAAGCAAGT CCTCCGCGCC TCCAGAAGGC	630
ATATTTGGAT CAATTTAGCA AAGATTTTAC CACATTTTAA AGGATTCGTT CCGAAGACTT GCTTTCAGC GCGCGAATGC TCTTACTTGG	720
CATTTGCAAA GGAGATGAAT TGCAGCGCCC GAATCACTAG GACTTACTTG AGATGGCAAT AAACGACTTG GTTGTGAGG GACATCTGGA	810
GGAAGAAAAA TTGGCAGTT TCAATGTTC AACCTATGCA GCTTCACTAG AAGAATTA A GTGATAGTT GAGGAGGAG GTTCTTTTGA	900
AAATTTGTAC TTGGGACTT TTAAGCTCCG TTAGATGCTT GCTTCTCTA TTGATGATGA TTGCCAATA AGATCCCAT TCCCAAGATA	990
CAGCGATGAA CATGCTAGAG CAGCGCATGT GGCATCATTA CTAGATCAG TTTACGAACC CATCTCGCA AATCAATTTG GAGAAGCTAT	1080
TATACCTGAC ATATTCACA GGTTCGGAC GAATCGACA AAGGTTATCC GCTTGGGCAA AGGCTTCTAT AATAACTTAA TCAATTTCTC	1170
TGCCAAAAA CCAGAGAGT CAGACATATA AAAGCTGTT TTAGTTGGT TTTTGTGCTA TGTGTTGTT TCTGATACGG GGAAGGAGTT	1260
TAGTGGGTT GGGGTTCAA AAAAAAAA AAAAAAAA AAAA	1360
C	
CTTTGGCAGT CCAATTTGA TTTATGTACA AGTCTGCAT ATGAATGGAG CTCGAAGAAG TCTTGGGAT GAATGGAGGC GAAGGCGATA	90
CAAGCTACGC CAAGAATTC A GCTTACAATC AACCTGTCTT CGCCAAGGTG AACCTGTCTT TTGAACAATG CGTAGGGGAA TGTTCGGGCG	180
CGAATCTGCC CAACATCAAC AAGTGCATTA AAGTTGCGGA TTGGGATGCG GCYCTTGGAC CAACACACTT TTAACAGTTC CCGGACATTTG	270
TCCAAGTAT TTGACAAGTTA GCGCAGGAAA AAGAAGATGA ATTAGAAGCT CCGCACTTC AGATTTTCTT GAATGATCTT TTCCCAATG	360
ATTTCAATTC GGTTTTCAAG TTGCTGCCAA GCTTCAECGC CAACCTTGAG AAGAAAATGG GAGCGAAAT AGGATGTGCC CTAATAGGGC	450
CAATGCCGCG CTCTTCTAC AGCAGACTCT TCCCCGAGGA GTCCATGCAT TTTTCACT CTGTACTG TCTTCAATGG TTAGTCAAG	540
TTCTAGCGG TTTGGTACT GAATGGGGGA TCAATGACAA CAAGGGGAGC ATTTACTTCT CGAAACAGAG TGTCTGCC CCGCAGAAG	630
CTCATTTTGA TCAATTTACG AAGATTTTAA CAGATTTCT AAGGATTCAT TCGGAAGAGT TGTTTTACA TGCGCGAATG CTTCTTACTT	720
GCATTTGTA AAGACTTGA TTAGAGCCCC GGAATGCCAT AGACTTACTT GAGATGGCAA TAAACGACTT GGTGTGAG GGCATCTGG	810
AGGAAGAAA ATTTGATAG TCAATCTTC CAGTCTATAT ACCCTCAGCA GAAGAAGTAA AGTGCATAGY TGAGAGGAAA GGTCTTTTGG	900
AAATTTTATA CCTGGAGACT TTTAAGGTC TTTACGATGC TGCTTCTCT ATTGACGATG AACATATTA AAGCAGATAT GTTGATCTT	990
CGTTAGAGC AGTTTACGAA CCGATCTCCG CAAGCTATT TGGAGAAGCT ATTATACCTG ACATATTECA CAGGTTTGGC AAGCATGCG	1080
CAAGGTTCT CCCCCTGGGC AAAGGCTTCT AATAAATCT TATCATTTCT CTGCCAAAA AGCCAGAGAA GTACAGACTG TAAAAGTTTG	1170
TTTTTGTGTT GGGGAAGGGA ATAAGTCCGC TTGGGGGCTT TCCGGGTATT GTGCTTTTAA TATYATATT TTTTGTATCC GTAATAAAG	1260
TGTTGTGTAA GAATAAGATA TTTGACATAT ATTTTTTCA AAAAAAAA AAAAAA	1316
D	
AGCAGTCGCA ATTCGATTGT CCTGCATATG AATGGAGGTC CAAGAAGTCC TGCATATGAA TGAAGGTGAA GGGCATAA GCTACGCCAA	96
GAATGEATCC TACAATCTGG CTCTTGCCAA GGTGAAACCT TTCTTGAAC AATGCATACG AGAATTTGTT GCGGCCAACT TGCCCAACAT	186
CAACAAATGC ATTAAGATGG EGGATTTGGG ATGCGCTTCT GGACCAACA CACTTTTAA CAGTCCGGGAC ATTTGCAAAA GTATTGACAA	276
AGTTGGCCAG GAAGAGAGA ATGAATTTGA ACGTCCCACT ATTCAGATT TTTGAAATGA TCTTTTCAA AATGATTTCA ATTCGGTITT	366
CAAGTTGCTG CCAAGCTTCT ACCGCAAACT CGAAGAAAGAA AATGACGCA AGATAGGACT GTGCCAATA AGCCCAATGC CTGGCTCTTT	456
CTACGGCAGA CTCTTCCCG AGGAGTCCAT GCAATTTTGG CACTCTTGT ACAGTGTTC A TTGTTATCT CAGGTTTCCA GCGGTTTGGT	546
GATTTGAATT GGGATTTGGT CAACAAGAG GAGTATTAC TCTTCAAAG GATGTCTGCC CCCCCTCCAG AAGGCAATTT TGGATCAATT	636
TACGAAGAT ATTTACCACAT TTCTAAGSAT TCAATGCAAA GAGTTGTTTT CACTGGCCG AATGCTCCTT ACCTGCATTT GTAAGTAGA	726
TGATTTGCAAT GAACCAATC CCTTAGACTT ACTTGCATG GCAATAAACG ACTTGTATTG TGAAGGACTT CTGGAGGAG AAAAATTTGA	816
TAGTTTCAAT ATTCATTTCT TTACACTTTC AGCAGAAGAA GTAAAAGTGA TAGTTGAGGA GGAAGGTTCT TCGGAAATTT TATYCTGGA	906
GACTTTTAA GCGCATTTAG ATGCTGCTT CTCTATTGAT GATGATTACC CAGTAAGACT CCAATGAACA ATTAAGAGC AGTATGTGGC	996
ATCATTAATT AGATCAGTTT ACGAACCAT CCTGCAAGT CATTTTGGAG AAGCTATTAT CCTGACTT TTTCCAGGCG TTGCGAACA	1086
TGCGCAAGAG GTTCTCCACA TGCGCAAGG CTGCTATAAT AATCTTATCA TTTCTCTGC CAAAAAGCCA GAGAAGTCCG ACGTGTAAA	1176
GTTTGTTTT AGTTGGTTTT TGTCGGTTG GGGTCTTTC GGGTATTGTC GTTTGTATT CTAATAAAA GTAGTGTGA AGAATAAGAT	1266
ATTTAGTACA ATATTTTCAT AAAAAAAA AAAAAAAA	1298

【図3】

MXMT1	MELQEVLFHMEGEGDTSYAKNASYN-LALAKVKPFLEQCIRELLRANLEN	49
MTL1G::EA::S:F:Q:V::V::V::	50
MTL2G::A::S:F:Q:V::V::VG::	50
MTL3R::G::SA::Q:V::V::V::	50
MXMT1	INKCIKVADLGCASGENTLLIVPDTVQSIDKVGQPEKNELERPTIQIFLN	99
MTL1W:T::K::M::V::T	100
MTL2R::M::V::T	100
MTL3K::	100
MXMT1	DLFQDFNSVFKILLPSFYRKLEKNGRKGISCLISAMPGSFYGRLPPEES	149
MTL1M::A::H::	150
MTL2M::A::H::	150
MTL3	..P::S::	150
MXMT1	MHFLHSCYSVHMLSQVPSGLVTELGI GANKGSTYSSKGRPPVQKAYLDQ	199
MTL1S::LQF::T::T::R::ASP::	200
MTL2S::LQF::T::T::R::ASP::	200
MTL3CLQ::T::ST::AS:L::	200
MXMT1	FIKDFTFIRIHSKELFSRGMLLCTCKVDEFDEPNPLDLLMAINLI	249
MTL1MR:E:L::G:C:G:TM::E::V	250
MTL2R:E:L::G:C:G:TM::E::V	250
MTL3E::H::GE:L:AR:AI::E::V	250
MXMT1	VEGLLEEKLDSENIPEFFIPSAEEVKCIVEEGSCCELLYLEDFYAHYDAA	299
MTL1	A::R:G::V:IY:A:V::M::F::Q::LR::G	300
MTL2	..H::V:IYAA:V:L::F::LR::G	300
MTL3	..H::L:VYI::F::VL::G	300
MXMT1	FSIDDYPVRSH-----BQIKAEVVASLIRSVYEPILASHFGQADMPDL	343
MTL1CQ::SPVYSD:HAR:AH::I:I	350
MTL2CQ::SPEYSD:HAR:AH::L::N::I:I	350
MTL3EH-----SV:A::I:I	337
MXMT1	FHRLAKHAQVLFHMKGCYNNLIISLAKKPERSDV	378
MTL1	..F:TN::IRL::F::I	385
MTL2	..F:TN::IRL::F::I	385
MTL3	..F::FL::F::	372

【図6】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7

C 1 2 R 1:91)

(C 1 2 N 9/00

C 1 2 R 1:91)

識別記号

F I

(56)参考文献 KATO, M. et al., NATURE, vol.406, pp. 956 - 957 (31 AUG.2000)
SUZUKI, T. et al., Biochem. J. vol.146, pp.187 - 196 (1975)
MAZZAFERA, P. et al., Phytochemistry, vol.37(6), pp.1577 - 1584 (1994)
KATO, M. et al., Plant Physiology, vol.120, pp.579 - 586 (1999)
OGAWA, M. et al., J. Biol. Chem., vol. 276(11), pp.8213 - 8218 (2001)

(58)調査した分野(Int.Cl.7, DB名)

C12N 15/09 ZNA
SwissProt/PIR/GenSeq
GenBank/EMBL/DDBJ/GenSeq
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)