

(19)日本国特許庁 ( J P )

# (12) 公開特許公報 ( A )

(11)特許出願公開番号

## 特開2000 - 189172

( P 2 0 0 0 - 1 8 9 1 7 2 A )

(43)公開日 平成12年7月11日(2000.7.11)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード <sup>*</sup>	(参考)
C12N 15/09	ZNA	C12N 15/00	ZNA	A
A01H 1/00		A01H 1/00		A
5/00		5/00		A
C07K 14/415		C07K 14/415		
C12N 5/10		C12P 21/02		C

審査請求 有 請求項の数 6 O L (全14頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平11 - 232678	(71)出願人	391012442 京都大学長 京都府京都市左京区吉田本町36の1番地
(22)出願日	平成11年8月19日(1999.8.19)	(72)発明者	古澤 巖 京都府京都市左京区高野東開町1 - 23 東 大路高野第三住宅36 - 303
(31)優先権主張番号	特願平10 - 301810	(72)発明者	石川 雅之 北海道札幌市手稲区前田2条4丁目3 - 1 - 803
(32)優先日	平成10年10月23日(1998.10.23)	(74)代理人	100059258 弁理士 杉村 暁秀 (外2名)
(33)優先権主張国	日本 ( J P )		

(54)【発明の名称】植物ウイルスの増殖に必須の宿主因子遺伝子

(57)【要約】

【課題】 植物にウイルス抵抗性を付与するための、有効かつ安全な遺伝子を提供する。

【解決手段】 本発明により、配列表の配列番号2に示すTOM1遺伝子、及び当該遺伝子がコードする配列表の配列番号1に示すTOM1蛋白質が提供された。更に、本発明により、配列表の配列番号4に示すTOM3遺伝子、及び当該遺伝子がコードする配列表の配列番号3に示す当該遺伝子がコードするTOM3蛋白質が提供された。TOM1遺伝子及びTOM3遺伝子はシロイヌナズナ由来の遺伝子であり、タバコモザイクウイルスの増殖に必須な蛋白質をコードするため、当該遺伝子を改変することによりウイルス耐性を有する植物を作成できる。

## 【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 - 291 で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。

( b ) タバコモザイクウイルスの増殖に必要な宿主由来因子であり、( a ) の一部が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなることを特徴とする、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、請求項 2 記載の遺伝子。

( c ) 配列表の配列番号 2 に示す、塩基番号 1 - 876 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 ) ( c ) の一部が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなることを特徴とする、遺伝子。

【請求項 4】 請求項 2 又は請求項 3 記載の遺伝子の発現が抑制され、アルファ様ウイルス耐性を付与された、形質転換植物。

【請求項 5】 請求項 2 又は請求項 3 記載の遺伝子のドミナントネガティブ変異遺伝子が導入され、アルファ様ウイルス耐性を付与された、形質転換植物。

【請求項 6】 以下の ( e ) または ( f ) 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。

( e ) 配列表の配列番号 3 に示す、アミノ酸番号 1 - 303 で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。

( f ) タバコモザイクウイルスの増殖に必要な宿主由来因子であり、( e ) の一部が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなることを特徴とする、ポリペプチド。

【請求項 7】 請求項 6 記載のポリペプチドをコードする、遺伝子。

【請求項 8】 以下の ( g ) または ( h ) に示す塩基配列からなることを特徴とする、請求項 7 記載の遺伝子。

( g ) 配列表の配列番号 4 に示す、塩基番号 1 - 912 で示される塩基配列からなることを特徴とする、遺伝子。

( h ) ( g ) の一部が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなることを特徴とする、遺伝子。

【請求項 9】 請求項 7 又は請求項 8 記載の遺伝子の発現が抑制され、アルファ様ウイルス耐性を付与された、形質転換植物。

【請求項 10】 請求項 7 又は請求項 8 記載の遺伝子のドミナントネガティブ変異遺伝子が導入され、アルファ様ウイルス耐性を付与された、形質転換植物。

【請求項 11】 以下の ( i ) または ( j ) 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。

( i ) 配列表の配列番号 1 に示す、アミノ酸番号 1 - 291 で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。

( j ) タバコモザイクウイルスの増殖に必要な宿主由来因子であり、( i ) の一部が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなることを特徴とする、ポリペプチド。

10 【請求項 12】 請求項 11 記載のポリペプチドをコードする、遺伝子。

【請求項 13】 以下の ( k ) または ( l ) 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。

( k ) 配列表の配列番号 3 に示す、アミノ酸番号 1 - 303 で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。

( l ) タバコモザイクウイルスの増殖に必要な宿主由来因子であり、( k ) の一部が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなることを特徴とする、ポリペプチド。

20 【請求項 14】 請求項 13 記載のポリペプチドをコードする、遺伝子。

【請求項 15】 請求項 12 及び請求項 14 記載の遺伝子の発現が共に抑制され、アルファ様ウイルス耐性を付与された、形質転換植物。

【請求項 16】 請求項 12 記載の遺伝子のドミナントネガティブ変異遺伝子、及び請求項 14 記載の遺伝子のドミナントネガティブ変異遺伝子が共に導入され、アルファ様ウイルス耐性を付与された、形質転換植物。

## 【発明の詳細な説明】

30 【0001】

【発明が属する技術分野】本発明は、植物ウイルスの増殖に必須な宿主遺伝子であるシロイヌナズナ TOM1 遺伝子又はシロイヌナズナ TOM3 遺伝子を用いた、ウイルス耐性植物体の作出方法に関する。

【0002】

【従来の技術】ウイルスの複製蛋白質あるいはウイルス関連 RNA と特異的に相互作用し、ウイルスの複製に関する宿主蛋白質が存在するのではないか、という可能性がこれまでの研究で指摘されてきた。しかし、過去に植物からウイルスの増殖に必須の宿主遺伝子が、単離・同定された例は存在しなかった。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】従来、過敏性反応を介して植物にウイルス抵抗性を付与する、という技術が用いられてきた。その利用にあたり、抵抗性が他種植物に導入できないこと、少数のウイルスにしか有効でないこと、抵抗性を打ち破るウイルス変異株が出現しやすいことが問題となってきた。

40 【0004】一方、ウイルスゲノムの一部を植物で発現させることにより、ウイルス耐性を付与する方法が最近

実用化されているが、その利用にあたっては、抵抗性が少数のウイルスにしか有効でないこと、組み換えによる新規ウイルス出現の危険性があることが問題となっていた。

【 0 0 0 5 】

【課題を解決するための手段】本発明において、植物ウイルスの増殖に必須の蛋白質をコードする遺伝子であるシロイヌナズナ遺伝子TOM1、及びやはり植物ウイルスの増殖に必須の蛋白質をコードする遺伝子であるシロイヌナズナ遺伝子TOM3をクローニングした。TOM1遺伝子又はTOM3遺伝子の発現制御や改変により、ウイルス抵抗性を付与することが可能である。

【 0 0 0 6 】これまでの抗ウイルス戦略において、ウイルス耐性はウイルスの種類によって決まっており、普遍性がない。今回のターゲット遺伝子であるシロイヌナズナTOM1遺伝子は、ウイルスが植物内で増殖するために必須な植物遺伝子であり、他種植物にもTOM1と相同な遺伝子が存在すること、他の動植物アルファ様ウイルスもTOM1に類似した宿主遺伝子産物を使って増殖していることが予想される。従って、TOM1あるいはその類似遺伝子の操作によるウイルス耐性生物の作出は、広範囲の生物種の種々のアルファ様ウイルスに適用できる可能性があり、汎用性が期待できる。また、この方法は宿主植物—ウイルスに一般的にみられる相互作用を断ち切ることで、抵抗性を打破するウイルスが出現しにくいと予想される。

【 0 0 0 7 】

【発明の実施の形態】本発明者らは、タバコモザイクウイルスの感染によるウイルス外被蛋白質の増加が抑制され、ウイルス感染時においてウイルス外被蛋白質の増加が抑制されたシロイヌナズナ変異株を作成した。その変異株よりポシショナルクローニングによりウイルスの増殖に必須の遺伝子であるTOM1遺伝子を得てその塩基配列を解析し、当該遺伝子がコードするTOM1蛋白質のアミノ酸配列解析を行った。また、上記tom1変異株を更に処理することにより、tom1変異株において残存しているタバコモザイクウイルスの増殖が完全に消失したシロイヌナズナ変異株を作成し、やはりウイルスの増殖に必須の遺伝子であるTOM3遺伝子を得てその塩基配列を解析し、当該遺伝子がコードするTOM3蛋白質のアミノ酸配列解析を行った。本発明の抗ウイルス戦略は宿主遺伝子の操作のみによるので、遺伝子組み換えにより、新規ウイルスが出現する危険性はない。以上のように、本遺伝子を利用した抗ウイルス戦略は、有効かつ安全であることが予想され、農学、医学分野において大いに活用される可能性がある。

【 0 0 0 8 】本発明のTOM1遺伝子は、配列表の配列番号2に記載した塩基配列により特定される。またTOM1遺伝子がコードするポリペプチドであるTOM1蛋白質は、配列表の配列番号1に記載したアミノ酸配列により特定され

る。また、本発明のTOM3遺伝子は、配列表の配列番号4に記載した塩基配列により特定される。またTOM3遺伝子がコードするポリペプチドであるTOM3蛋白質は、配列表の配列番号3に記載したアミノ酸配列により特定される。上述したように、TOM1遺伝子及びTOM3遺伝子はシロイヌナズナ由来の遺伝子であり、TOM1蛋白質及びTOM3蛋白質はタバコモザイクウイルスの増殖に必須の植物因子である。そのため、本発明の遺伝子の発現を制御したり、改変する事により、植物にウイルス抵抗性を付与することが可能であり、そのような目的に本発明の遺伝子を利用する事ができる。例えば、TOM1遺伝子又はTOM3遺伝子、若しくは両遺伝子のアンチセンスRNA を利用する方法、導入したTOM1遺伝子又はTOM3遺伝子、若しくは両遺伝子によるコサプレッションを利用することにより、遺伝子の発現を制御する方法がある。又はウイルスとの相互作用はできても増殖をサポートできない変異蛋白質をコードするtom1遺伝子又はtom3遺伝子、若しくは両者を導入する事により発現するドミナントネガティブ効果を利用する事で、植物にウイルス抵抗性を付与することが可能である。

【 0 0 0 9 】多くのアミノ酸については、それをコードするDNA の塩基配列は複数存在する。本発明で明らかにされたTOM1蛋白質及びTOM3蛋白質のアミノ酸配列をコードする遺伝子の場合にも、そのDNA の塩基配列として、天然の遺伝子の塩基配列以外にも、多数の塩基配列が存在する可能性がある。しかし、本発明の遺伝子は、天然のDNA 塩基配列のみに限定されるものではなく、本発明により明らかにされたTOM1蛋白質及びTOM3蛋白質のアミノ酸配列をコードする、他のDNA 塩基配列を含むものである。

【 0 0 1 0 】また、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 がコードする蛋白質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、置換を行うこと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。

【 0 0 1 1 】また、本発明の遺伝子を植物に導入して形質転換した植物も本発明の範囲内である。本発明の遺伝子を導入する対象として適している植物の例として、イネ、オオムギ、コムギ、トウモロコシ等の種々の単子葉植物、またナス、トマト、ジャガイモ等の種々の双子葉植物が挙げられる。本発明の遺伝子を導入する方法の例としては、本技術分野で通常用いられている種々の方法を用いる事が可能である。即ち、アグロバクテリウム法、プロトプラスト法、PEG法、エレクトロポレーション法、パーティクルガン法、マイクロインジェクション

ン法等が挙げられる。以下の実施例により、本発明を更に詳細に説明するが、本発明は上述した例又は以下の実施例に限定されるものではなく、本発明の技術分野における通常の変更をすることができる。

#### 【 0 0 1 2 】

【実施例】(TOM1のマップベースクローニング)以前の研究により、tom1変異は第4染色体長腕のDNAマーカー-JGB9近傍にマップされた[K. Ohshima et al., Virology 243, 472 (1998)]. tom1変異をさらに詳細にマップするため、発明者は、DNAマーカー g3883とT18ISXの間で染色体組み換えを起こした株を、野生型エコタイプ Col-0とtom1-3変異株(エコタイプWS由来)の交配から得られた約3,000株のF2植物から選抜した(図1のA)。そのような組み換え体が246株得られ、図1に示したDNAマーカーとTOM1遺伝子座の間での組み換えが調べられた。

【 0 0 1 3 】TOM1遺伝子のマッピングとポジショナルクローニングを図1に示す。

(図1のA)第4染色体TOM1遺伝子座近傍の遺伝子地図。白ぬき四角はCAPSマーカーを示す。数字はマーカーの相対位置と、そのマーカーとTOM1座の間で起きた染色体組み換えの数を示す。

(図1のB)と(図1のC)それぞれESSA II BACクローンとMitsui P1クローンによるコンティグ(図1のD)TOM1遺伝子座近傍の物理地図。縦線はEcoRI部位を示す。白ぬき四角と数字は(図1のA)と同様。矢印はTOM1 mRNAの向きと位置を表す。矢印中白抜き部分はイントロンを示す。

(図1のE)T-DNAによるコンティグP1クローン8C3または5F6由来のT-DNAクローンを互いに重複し、TOM1遺伝子座をカバーするように並べた。これらのT-DNAはtom1-1変異植物に形質転換され、tom1-1変異の相補能が検定された。各T-DNAクローンの右側にタバコモザイクウイルス(TMV)増殖形質の相補をチェックした形質転換ラインの合計数に対する形質が相補されたラインの数の比を示した。

(図1のF)tom1変異の相補とT-DNAの共分離T-DNAクローン1001により形質転換されたtom1変異株由来のT2植物にTMV-Cgを接種した。接種して2週間後、植物体から全蛋白質を調製し、SDS-PAGEで分離し、クマシーブリリアントブルーで染色した[上のパネル; M. Ishikawa, F. Obata, T. Kumagai, T. Ohno, Mol. Gen. Genet. 230, 33(1991)]。さらに、それぞれのT2植物からDNAを抽出し、特異的プライマーセット(NPTII配列をポリメラーゼ連鎖反応(PCR)で増幅するのには、プライマー(5'-CTATGACTGGGCACAACAGACAATC-3')と(5'-GCGATAGAA GCGCATGCGCT-3')を用いた)を用いたPCRによってNPTII遺伝子の配列を増幅し、アガロースゲル電気泳動とエチジウムブロマイド染色により解析した(下のパネル)。TMV-Cg-CPとPCRで増幅されたNPTII遺伝子由来

のDNA断片の位置を示した。

【 0 0 1 4 】エコタイプ Col-0とWSの間でXbaI断片長多型を与えるCAPSマーカーT18ISX(図1のA)はP1クローン78E9のエンドプローブ(図1のC)がエコタイプ Col-0とWSの間でXbaI断片長多型を与えるという知見と、ESSA II BACコンティグ(図1のB)の塩基配列データ[http://muntjac.mips.biochem.mpg.de/arabi/bac/]をもとにして構築した。T18ISXのプライマー配列は、T18ISXF(5'-CTGAGAATGTTTATCCCAGCTG-3')とT18ISXR(5'-GTAATGCTTGAATCTCTTGATATC-3')である。PCRマーカーg3883とJGB9についてはArabidopsis thaliana Data base (AtDB)[http://genome-www.stanford.edu/Arabidopsis/lsd1\_CAPS.html]に述べられている。シロイヌナズナtom1-3変異株はFeldmannらにより構築されたT-DNA挿入ライブラリー[K.A. Feldmann and M. D. Marks, Mol. Gen. Genet. 208, 1 (1987)]からTMV-Cgの外被蛋白質(CP)の蓄積が低下する変異株として単離された。tom1-3植物はシロイヌナズナtom1-1あるいはtom1-2変異株と同様のTMV-Cg CPの蓄積パターンを示し、遺伝解析により原因変異がTOM1遺伝子座内にあることが示された。tom1-3変異は挿入T-DNAとはリンクしていなかった。TOM1遺伝子座のファインマッピングはtom1-3変異株を用いて以下のように行った: tom1-3(エコタイプWS由来)とシロイヌナズナエコタイプ Col-0の交配により得られたF2植物それぞれの各1枚の葉からNaOH抽出法[H. Wang, M. Qi, A. J. Cutler, Nucleic Acids Res. 21, 4153 (1993)]によりDNAを調製した。次いでそれぞれのF2植物についてマーカーg3883とT18ISXのジェノタイプを調べ、3103株のF2植物からそれら2つのマーカー間で染色体組み換えのあった246株を選択した。さらに選択されたF2植物それぞれからCTAB抽出法[S. O. Rogers and J. Bendich, Plant Mol. Biol. 5, 69 (1985)]、クロロフォルム抽出、イソプロパノール、塩化マグネシウム沈殿法[T. Yamamoto and M. Horikoshi, Nucleic Acids Res. 23, 3351 (1995)]を併用してDNAを抽出精製した。このDNAを用いてCAPSマーカーJGB9と図1に示したRFLPマーカーのジェノタイプを決定した。RFLPマーカーはP1ゲノミッククローンを制限酵素処理して得た。RFLPマーカーに関する情報は請求に応じて提供する。プローブの調製とサザンハイブリダイゼーションはGene Images Labelling and detection system (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)を用いて行った。F2植物のTMV増殖形質はF3植物におけるTMV-Cg CPの蓄積をIshikawa et al.[M. Ishikawa, F. Obata, T. Kumagai, T. Ohno, Mol. Gen. Genet. 230, 33(1991).]に述べられた方法でSDS-PAGEにより見積もることにより決定した。

【 0 0 1 5 】この解析により、TOM1遺伝子座は図1のDに示すとおりJGB9マーカーを含む22 kbpの領域にマップされた。この領域は互いに重複するP1ゲノミックク

ローンでカバーされ(図1のC)、次いで植物形質転換用 T-DNAベクターにサブクローンされた(図1のE)。P1 cloning system を用いて構築されたシロイヌナズナゲノミックライブラリーは Mitsui Plant Biotechnology Research Instituteより供与していただいた。JGB9配列とハイブリダイズするクローンのスクリーニングとクモソームウオーキングは Liu et al. [Y. G. Liu, N. Mitsukawa, A. Vazquez-Tello, R. F. Whittier, Plant Journal 7, 351 (1995)] の方法に従って行った。T-DNA クローン 508と653 はそれぞれ P1 ゲノミッククローン8C3と 5F6を EcoRIで部分分解し、T-DNA ベクター pCLD04541 [http://genome-www.stanford.edu/Arabidopsis/vw/Vol4ii/home.html] にサブクローンすることにより構築した。T-DNA クローン 1001 と X1112はそれぞれ P1 ゲノミッククローン8C3を Sall + ClaIで、あるいは 5F6をXhoIで切断し、pCLD04541 にサブクローンすることにより構築した。

【0016】(導入遺伝子による TMVの増殖効率の回復) T-DNA ベクターにサブクローンされたゲノミック DNAはアグロバクテリウムツメファシエンス (Agrobacterium tumefaciens) を用いた減圧浸潤法により tom1-1 変異株に導入された。T-DNA クローンはエレクトロポレーションにより Agrobacterium tumefaciens C58C1 (pGV2260)に導入され、減圧浸潤法 [N. Bechtold and G. Pelletier, Methods Mol. Biol. 82, 259 (1993)]によるシロイヌナズナの形質転換に用いられた。

【0017】クローン1001とX1112 由来の T-DNAを導入するとT1世代において TMVの増殖効率の回復がみられたが、クローン 653と508 由来の T-DNAの導入によっては回復がみられなかった。調べた限り、TMV の増殖の回復のみられた全ての T2 植物は、T-DNA 中に存在する NPT II 遺伝子をもっていた(図1のF)。TMV-Cg [T. Yamana et al., Virus Genes 16, 173 (1998)] を TMVの増殖検定に用いた。植物の育成、TMV-Cgの感染、TMV-Cg C P 蓄積の SDS-PAGE による検定は Ishikawa et al. [M. Ishikawa, F. Obata, T. Kumagai, T. Ohno, Mol. Genet. 230, 33(1991)] に述べられた方法で行った。形質転換ラインの TMV増殖形質の決定には各 5-8 株の T2 植物を用いた。T2植物における NPTII遺伝子の塩基配列の存在は 1001 と X1112で形質転換され、形質が相補されたそれぞれ 2あるいは 4ラインについて調べた。

【0018】これらの結果は、TOM1遺伝子がクローン 1001 とX1112 に共通した 6 kbpの領域内に位置することを示唆する(図1)。この6 kbp の領域をプローブとしてノザン解析を行うと、非感染の野生型植物由来の全 RNA中に約 1.4 kb の単一の RNAバンドが検出された(データは示さないが、図2と同様;)。シロイヌナズナ全 RNAは凍結植物体から ISOGEN LSキット (Nippon Gene, Tokyo, Japan) を用いて使用説明書に従って抽出精製し

た。ノザンハイブリダイゼーションは Ishikawa et al. [M. Ishikawa, S. Naito, T. Ohno, J. Virol. 67, 5328 (1993)] に述べられた方法で行った。<sup>32</sup>P-標識プローブは Multiprime DNA labelling system (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)を用いて行った。

【0019】tom1 mRNA の発現を示すノザンハイブリダイゼーション解析の結果を図2に示す。パネル上に示した野生型あるいは変異株植物(播種後3~4週のもの)の地上部より全 RNAを抽出し、グリオキサル変性後10%アガロースゲル電気泳動で分離し、ナイロンメンブレンに転写した。同様のメンブレンを2枚用意し、一方を<sup>32</sup>P-標識した TOM1 DNA プローブと、もう一方を<sup>32</sup>P-標識した UBQ5 [E. E. Rogers and F. M. Ausubel, Plant Cell 9, 305 (1997)] DNA プローブとハイブリダイズさせた。TOM1特異的プローブとしては、cDNAクローンを鋳型として PCRで増幅し、ゲル精製したTOM1 ORFに相当する DNA断片を用いた。TOM1および UBQ5 mRNAの位置を左側に示した。サイズマーカーとして用いた CMV RNA 3 (2215ヌクレオチド)とRNA4 (1033ヌクレオチド)の泳動位置を右側に示した。

【0020】tom1-1, tom1-2, tom1-3 変異株植物におけるその 1.4 kb RNA の蓄積レベルは、野生型植物においてより低かった(図2)。これは野生型植物において検出されたバンドがTOM1遺伝子由来のものであることを示唆する。非感染植物においてその RNAが発現していることはTOM1の機能がウイルス感染後極初期に必要なことを示唆する以前の実験結果と合致する [M. Ishikawa, S. Naito, T. Ohno, J. Virol. 67, 5328 (1993)]。

【0021】(TOM1の塩基配列の決定) 6 kbの相補領域とハイブリダイズするcDNAクローンの塩基配列を決定し、EST(expressed sequence tag)およびゲノミック DNAの配列と比較したところ、11エクソンからなる1226ヌクレオチドの配列がmRNA上にあることが明らかになった。

【0022】発明者は、10万個のプラークを含むシロイヌナズナ (Arabidopsis thaliana) 5'-STRETCH cDNA library (Clontech, Palo Alto, CA, USA)をスクリーニングし、T-DNA クローン 1001 と X1112の重複領域とハイブリダイズする cDNA クローンを2個得た。それらのクローンの挿入 DNAは PCRで増幅され、シークエンスされた。cDNA挿入を増幅し、シークエンスするためには2つのオリゴヌクレオチド: 5'-CGCCTCCATCAACAACTTTCTTG-3' and 5'-GTTCTGGTAAAGCGTGGTC-3'を用いた。配列決定には 377型 DNAシークエンサーと BigDye terminator sequencing kit (Perkin Elmer, Applied Biosystems division, Foster city, CA, USA)を用いた。それらの cDNA は互いにオーバーラップし、あわせて 1064ヌクレオチドの領域をカバーした (Genbank # AB016925)。その塩基配列をシロイヌナズナ WU-BLAST2サーチ

[ <http://genome-www2.stanford.edu/cgi-bin/AtDB/nph-blast2atdb> ] にかけて、3つの expressed sequence tag (EST) クローン [T. Newman et al., Plant Physiol. 174, 1241 (1994)] : 120J4T7 (GenBank accession number T43509), 160124T7 (GenBank # T88633) and 119P7T7 (GenBank #T43917) がヒットした。それらの塩基配列を総合して、計 1226ヌクレオチドの領域が同定された。ゲノミックシーケンス (Genbank # AB016924) との比較から、その 1226ヌクレオチドの領域は11個のエクソンからなることが判明した。

【0023】ノザン解析により見積もられた当該mRNAのサイズとポリA鎖の長さを考慮すると、その配列はmRNAのほぼ全長をカバーすると考えられた。そのmRNA配列上には5'末端から第1番目に存在するAUGコドンから開始する876ヌクレオチド(291アミノ酸)からなるオープンリーディングフレーム(ORF)が存在した。解析されたTOM1遺伝子の塩基配列を、配列表の配列番号2に示す。そのORFの上流にはインフレームの終止コドンが存在したので、cDNAとしてクローン化されていないかもしれない領域に存在するAUGコドンから翻訳が始まる可能性は否定された。

【0024】さらに、3つのtom1アミノ酸配列は、そのORFの発現に大きな影響を与えると予想される突然変異を対応するゲノミックDNA上にもっていた：すなわち、tom1-1はイントロン5のスプライシングアクセプター部位に点突然変異を、tom1-2はエクソン2にナンセンス変異を、tom1-3はエクソン4に1塩基挿入によるフレームシフト変異をもっていた(GenBank accession number AB016924とAB016925)。これらの結果はそのORFがTOM1遺伝子産物をコードすることを示している。

【0025】(TOM1蛋白質の構造特性) 推定されたTOM1のアミノ酸配列を配列表の配列番号1及び図3に示す。白ぬき四角と下線はそれぞれPredict-Proteinプログラム[B. Rost, R. Casadio, P. Fariselli, C. Sander, Protein Science 4, 521 (1995). (<http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein/predictprotein.html>)]によって予測された膜貫通領域と細胞内領域を示す。同様の予測結果はSOSUIプログラム[T. Hirokawa, S. Boon-Chieng, S. Mitaku, Bioinformatics 14, 378 (1998). ([http://www.tuat.ac.jp/~mitaku/adv\\_sosui/submit.html](http://www.tuat.ac.jp/~mitaku/adv_sosui/submit.html))]によっても得られた。グリコシレーションを受けると予測されたアスパラギン残基をアスタリスクでマークした。

【0026】導き出されたTOM1蛋白質のアミノ酸配列には数カ所の疎水領域が存在した。蛋白質の膜貫通領域とその方向性を予測するコンピュータープログラム[PHDhtm/PredictProtein:B. Rost, R. Casadio, P. Fariselli, C. Sander, Protein Science4, 521(1995). (<http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein/predictprotein.html>)] ; SOSUI: T. Hirokawa, S. Boon-Chieng, S.

Mitaku, Bioinformatics 14, 378 (1998). ([http://www.tuat.ac.jp/~mitaku/adv\\_sosui/submit.html](http://www.tuat.ac.jp/~mitaku/adv_sosui/submit.html))]によれば、この蛋白質はC末端が細胞質側に露出した7回膜貫通型蛋白質と予測された。細胞外に露出していると予測された領域に位置するアミノ酸28-31と168-171にはN-グリコシレーションを受ける典型的なコンセンサス配列が存在した(図3)。N末端あるいは他の部位にも、明らかなオルガネラターゲットシグナルは見いだされなかった[PSORT: K. Nakai and M. Kanehisa, Genomics, 14, 897 (1992). (<http://cookie.imcb.osaka-u.ac.jp/nakai/psort.html>)]。

【0027】データベースサーチを行った結果、いくつかの内在性膜蛋白質がTOM1蛋白質とアミノ酸配列の類似性をもつものとしてリストアップされた。TOM1蛋白質の予想されたアミノ酸配列と類似性のあるアミノ酸配列を以下のプログラムでデータベースサーチした：BLAST 2.0 [S. F. Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25, 3389 (1997), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>]-これにより7回膜貫通型蛋白質と予想されるヒトのTM7SF1蛋白質[C. Spangenberg, A. Winterpacht, B. U. Zabel, R. W. Lobbert, Genomics 48, 178 (1998)]とTOM1蛋白質のアミノ酸配列が弱い類似性をもつことが示唆された；Fasta3 [W. R. Pearson and D. J. Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85, 2444 (1988), <http://www2.ebi.ac.uk/fasta3/>]-これにより多くの生物のチトクロームbとTOM1蛋白質のアミノ酸配列が弱い類似性をもつことが示唆された；PropSearch [U. Hobohm and C. Sander, J. Mol. Biol. 251, 390 (1995), <http://www.embl-heidelberg.de/prs.html>]はTOM1と類似性のある蛋白質としてサルモネラ・ティフィムリウム(Salmonella typhimurium)の7回膜貫通型蛋白質でニコチンアミドモノヌクレオチドトランスポーターPnuC蛋白質[J. W. Foster, Y. K. Park, T. Fenger, M. P. Spector, J. Bacteriology 172, 4187 (1990)]をもっとも高いスコア(distance=8.41)で、また他のレセプターやトランスポーターを含む膜蛋白質をリストした。この結果は内在性膜蛋白質の構造的類似性を反映するものと考えられる。

【0028】(TOM1蛋白質の機能) プロトプラストを用いた以前の解析から、tom1変異はTMVの1細胞内での増殖を、ゲノミックRNAの最初の脱外被以降の、RNA複製を含むプロセスのどこかで阻害していると予想された[M. Ishikawa, S. Naito, T. Ohno, J. Virol. 67, 5328 (1993)]。TMVを含めて、ほとんどのあるいは全ての高等真核プラス鎖RNAウイルスの複製は、膜に結合した複合体で起こると考えられている[K. W. Buck, Advances in Virus Research 47, 159 (1996); T. A. Osman and K. W. Buck, J. Virol. 70, 6227 (1996)]。

【0029】しかしながら、TMVの複製蛋白質は明らかな膜貫通ドメインも膜への結合を起こさせる修飾を受け

るためのコンセンサスアミノ酸配列ももたない[B. Rost, R. Casadio, P. Fariselli, C. Sander, *Protein Science* 4, 521(1995). (<http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein/predictprotein.html>)]; T. Hirokawa, S. Boon-Chieng, S. Mitaku, *Bioinformatics* 14, 378 (1998) ([http://www.tuat.ac.jp/~mitaku/adv\\_sosui/submit.html](http://www.tuat.ac.jp/~mitaku/adv_sosui/submit.html)); K. Nakai and M. Kanehisa, *Genomics*, 14, 897 (1992) (<http://cookie.imcb.osaka-u.ac.jp/nakai/psort.html>)]。従って、TMV にコードされた複製蛋白質は膜に局在する宿主蛋白質と結合して機能すると考えられる。TOM1蛋白質が TMV RNAの複製に直接寄与するのか、より間接的に複製に影響を与えるのか実験的には示されていないが、一つの可能性として、TOM1は複製複合体を膜に結合させる働きをしているのかもしれない。

【0030】現在までに、いくつかの宿主蛋白質がアルファ様ウイルスの複製に寄与していることが示唆されている：例えば、BMV の複製にはオオムギの翻訳開始因子 3 (eIF3) の p41 サブユニット [R. Quadt et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 1498 (1993)] と出芽酵母の MAB1 MAB2 蛋白質 [M. Ishikawa, J. Diez, M. A. Restrepo-Hartwig, P. Ahlquist, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 13810(1997)23, J. Diez, M. Ishikawa, M. Kaido, P. Ahlquist, 未発表] が、TMVの複製にはトマトの eIF3 の GCD10-関連サブユニット [T. A. Osmann and K. W. Buck, *J. Virol.* 71, 6075 (1997)] が、シンドビスウイルスの複製には蚊の La抗原ホモログ [N. Pardigon and J. H. Strauss, *J. Virol.* 70, 1173 (1996)] が関係していると示唆されている。

【0031】そのなかで、TOM1蛋白質は数少ない内在性膜蛋白質である [B. Rost, R. Casadio, P. Fariselli, C. Sander, *Protein Science* 4, 521(1995). (<http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein/predictprotein.html>), T. Hirokawa, S. Boon-Chieng, S. Mitaku, *Bioinformatics* 14, 378 (1998). ([http://www.tuat.ac.jp/~mitaku/adv\\_sosui/submit.html](http://www.tuat.ac.jp/~mitaku/adv_sosui/submit.html))]。BMV の RNA 合成は小胞体 (ER) 膜上で起こり [M. A. Restrepo-Hartwig and P. Ahlquist, *J. Virol.* 70, 8908 (1996)]、一方、TYMVとアルファモザイクウイルスの RNA 合成は葉緑体外膜の細胞質面で起こる [M. deGraaff, L. C. oscoy, E. M. J. Jaspars, *Virology* 194, 878 (1993); M. Garnier, R. Ramoun and J. M. Bove, *Virology* 104, 374 (1980)]。TMV とアルファウイルスの複製蛋白質はそれぞれ ER とエンドソーム/リソソーム膜上に局在する [M. Heinlein et al., *Plant Cell* 10, 1107 (1998), S. Froshauer, J. Kartenbeck, A. Helenius, *J. Cell Biol.* 107, 2075 (1988)]。しかしながら、後 2 者の RNA 合成の場合は決定されていない。

【0032】従って、近縁のアルファ様ウイルスの間でさえ細胞内における RNA 合成の場合は多岐にわたっている

かもしれない。もしそうなら、ウイルスの複製複合体の膜アンカーもウイルスによってまちまちかもしれない。TMV と近縁のアルファ様ウイルスである CMV や TYMV の複製複合体が TOM1 とは別の分子によって膜に結合しており、そのためにそれらのウイルスが tom1 変異の影響を受けない [M. Ishikawa, F. Obata, T. Kumagai, T. Ohno, *Mol. Gen. Genet.* 230, 33(1991)] という可能性も十分にありうる。

【0033】ところで、TOM1 遺伝子の機能がほぼ完全に失われていると考えられるシロイヌナズナ tom1-1, tom1-2, tom1-3 変異株のいずれにおいても TMV-Cg 株の増殖はゼロにはならない。尚、TMV-Cg を接種して 16 日間育成した植物における外被蛋白質蓄積濃度は野生株の約 1/4 である (図 4 参照)。この事実は、TOM1 遺伝子の機能が TMV の増殖に必須であり tom1 変異株における残存 TMV 増殖能が TOM1 類似遺伝子によって担われている可能性を示唆した。そこで、tom1-1 変異株をさらにエチルメタンスルホン酸で突然変異誘起処理して TMV の増殖がほぼゼロになる JA11 株を得た (図 4)。図 4 は、Col-0 野生株と各変異株に TMV-Cg を接種して、16 日後の非接種上葉の全蛋白質を SDS-PAGE で分画し、クマシーブリリアントブルー染色により外被蛋白質の蓄積を検討した結果である。mock は非接種コントロール植物を、PD114 は tom1-1 変異株を示す。エチルメタンスルホン酸処理は、種子を 0.3% エチルメタンスルホン酸中で 20 で 16 時間処理することにより行った [Kranz, A. R. and Kirchheim, B. (1987) *Genetic resources in Arabidopsis. Arabidopsis Inf. Serv. vol 24, section 4.2, pp 1-7.*]。遺伝解析の結果、JA11 株には tom1 変異に加えて TMV の増殖をさらに低下させる劣性変異 tom3-1 が存在することが示唆された。

【0034】(TOM3 遺伝子の同定) マッピングの結果、tom3-1 変異は第 2 染色体の上部に位置する酵母人工染色体クローン C1C11A4 (インサートサイズ約 520 kbp) 上、RFLP マーカー 7C11L と 11A4R の間に存在することがわかった (図 5)。マッピングは、JA11 株と tom1-3 変異株の交配により得られた F2 ラインのうち、tom1-1 tom3-1 形質を示した 12 ラインにおける各マーカーのジェノタイプを調べることにより行った。第 3 染色体の下に制限酵素断片長多型マーカーと、そのマーカーと tom3 変異との間で生じた組み換えの数を示した。TOM3 遺伝子は 7C11L と 11A4R との間にマップされた。尚、酵母人工染色体クローン C1C11A4 とは、酵母人工染色体ベクターにクローン化されたシロイヌナズナゲノミック DNA 断片であり、そのクローンの挿入 DNA 断片は、図 5 に示したシロイヌナズナの第 2 染色体上部の約 520 kbp の領域に相当する。図 5 において、両端に黒丸のついた線が酵母人工染色体 (YAC) クローンを示す。YAC の横の数字は、YAC インサートの大ききなサイズ (kbp) を示す。

【0035】TOM1 のアミノ酸配列と似た配列の、*expre*

ssed sequence tag(EST)としての登録の有無を、BLASTにより検索した。その結果、EST クローン86D11の配列が TOM1 と似たアミノ酸配列をコードすることを見いだした。さらに 86D11に対応するゲノミック配列が CIC11 A4近傍に位置する bacterial artificial chromosome(BAC) クローンF504上にあることが明らかになった。F504は、YAC と同様に、BAC ベクターにクローン化されたシロイヌナズナゲノミック DNA断片である。F504の挿入 DNA断片は、シロイヌナズナの第2染色体上部、YAC CIC11 A4の挿入 DNA断片近傍に位置する事が知られている。

【0036】このTOM1類似配列が、TOM3と関連をもつものと考えられた。しかし、86D11の配列は短く、mRNAの全体をカバーしている可能性は低いと考えられたため、86D11をプローブとして、プラークハイブリダイゼーション[Ausubel et al. (1994). Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA. 参照]により、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 5'-STRETCH cDNA ライブラリー(Clontech, Palo Alto, CA, USA)をスクリーニングした。その結果、ハイブリダイズするクローンを5個得た。これらのcDNAクローンの挿入 DNAの塩基配列を決定し総合して、mRNAの全長に近いと考えられる1203 bpの配列を得た。得られた cDNA の塩基配列から、対応するmRNAはTOM1蛋白質と類似性をもつ 303アミノ酸の蛋白質をコードすることが明らかとなった。TOM1蛋白質とTOM3蛋白質の推定アミノ酸配列の比較を図6に示す。図6において、同一のアミノ酸残基を2つの点で、類似のアミノ酸残基を1つの点で示す。

【0037】さらに野生株とJA11株のゲノミック DNA間でのTOM1類似配列付近の塩基配列の比較を行った。JA11変異株にはこの蛋白質の発現に致命的な影響を与えると考えられる、45番目のトリプトファンコドン (TGG)か

- < 1 1 0 > 出願人氏名：京都大学長
- < 1 2 0 > 発明の名称：植物ウイルスの増殖に必須の宿主因子遺伝子
- < 1 6 0 > 配列の数：4
- < 2 1 0 > 配列番号：1
- < 2 1 1 > 配列の長さ：291
- < 2 1 2 > 配列の型：アミノ酸
- < 2 1 3 > 起源：Arabidopsis thaliana heynh TOM1
- < 4 0 0 > 配列

Met Thr Asp Ser Gly Leu Met Met Pro Ala Glu Ile Ala Gly Ile Leu 16  
 Thr Thr Ala Ile Thr Ser Trp Trp Asp Asp Val Asn Glu Ser Thr Gln 32  
 Trp Gln Asp Gly Ile Phe Phe Ala Leu Cys Gly Ala Tyr Ala Leu Val 48  
 Ser Ala Val Ala Leu Val Gln Leu Ile Arg Ile Gln Met Arg Val Pro 64  
 Glu Tyr Gly Trp Thr Thr Gln Lys Val Phe His Leu Met Asn Phe Val 80  
 Val Asn Gly Val Arg Ala Val Leu Phe Gly Phe His Met Gln Val Phe 96  
 Leu Val His Pro Lys Ala Leu Cys Trp Val Leu Leu Asp Leu Pro Gly 112  
 Leu Leu Phe Phe Ser Ala Tyr Thr Leu Leu Val Leu Phe Trp Ala Glu 128  
 Ile Tyr His Gln Ala Arg Ser Leu Pro Thr Asp Lys Leu Arg Ile Thr 144  
 Tyr Ile Ser Val Asn Val Ala Val Tyr Leu Ala Gln Ile Gly Ile Trp 160

らナンセンスコドン (TAG)への変化をもたらす変異が存在した。以上の実験結果より、図6に示したオープンリーディングフレームに対応する遺伝子がTOM3であると考えられた。TOM3遺伝子の塩基配列を配列表の配列番号4に、TOM3蛋白質の推定アミノ酸配列を配列表の配列番号3に示す。

【0038】(TOM3遺伝子とTOM1遺伝子との関係) TOM3遺伝子はTOM1遺伝子とアミノ酸配列において50%以上の同一性をもつことから、TMVの増殖においてTOM1蛋白質とパラレルな機能をもつと推測される。また、tom1 tom3 二重突然変異株における TMVの増殖がほとんどゼロなので、TOM1-TOM3により担われる機能は TMVの増殖に必須であると考えられる。しかも、両遺伝子の活性が著しく損なわれるような変異が入っていたにもかかわらず二重突然変異株が生育可能であった。従って、他の植物においてもTOM1類似遺伝子を同時不活化することにより、宿主の生育能を残して TMVにほぼ完全な耐性を付与することができる可能性が示唆された。

【0039】【発明の効果】本発明により、配列表の配列番号2に示すTOM1遺伝子、及び当該遺伝子がコードする配列表の配列番号1に示すTOM1蛋白質が提供された。更に、本発明により、配列表の配列番号4に示すTOM3遺伝子、及び当該遺伝子がコードする配列表の配列番号3に示すTOM3蛋白質が提供された。TOM1遺伝子及びTOM3遺伝子はシロイヌナズナ由来の遺伝子であり、タバコモザイクウイルスの増殖に必須な蛋白質をコードするため、当該遺伝子を改変することによりウイルス耐性を有する植物を作成できる。

【0040】

【配列表】



15

Ala Tyr Ile Trp Val His Asp Asn Ser Thr Val Glu Leu Val Gly Lys 176  
 Ile Phe Ile Ala Val Val Ser Phe Ile Ala Ala Leu Gly Phe Leu Leu 192  
 Tyr Gly Gly Arg Leu Phe Phe Met Leu Arg Arg Phe Pro Ile Glu Ser 208  
 Lys Gly Arg Arg Lys Lys Leu His Glu Val Gly Ser Val Thr Ala Ile 224  
 Cys Phe Thr Cys Phe Leu Ile Arg Cys Val Val Val Ala Val Ser Ala 240  
 Phe Asp Lys Asp Leu Thr Leu Asp Val Leu Asp His Pro Val Leu Asn 256  
 Leu Ile Tyr Tyr Met Val Val Glu Val Leu Pro Ser Ala Leu Val Leu 272  
 Phe Ile Leu Arg Lys Leu Pro Pro Lys Arg Val Ser Ala Gln Tyr His 288  
 Pro Ile Gln 291

&lt; 2 1 0 &gt; 配列番号 : 2

&lt; 2 1 1 &gt; 配列の長さ : 8 7 6

&lt; 2 1 2 &gt; 配列の型 : 核酸

&lt; 2 1 3 &gt; 起源 : Arabidopsis thaliana heyneh TOM1

&lt; 4 0 0 &gt; 配列

ATGACGGATT CGGGTCTAAT GATGCCGGCG GAGATTGCTG GAATTCTAAC CACGGCGATT 60  
 ACGAGTTGGT GGGATGATGT TAATGAGTCA ACTCAGTGGC AAGATGGGAT CTTTTTCGCT 120  
 CTTTGTGGTG CTTATGCTCT TGTTCGCCG GTTGCTCTTG TTCAACTGAT AAGGATCCAA 180  
 ATGAGAGTGC CTGAGTATGG TTGGACTACT CAGAAGGTGT TTCATCTTAT GAACITTTGTC 240  
 GTCAATGGAG TTCGTGCGGT TCTGTTTGA TTTACATGC AAGTATTTCT TGTTTCATCCC 300  
 AAGGCTCTTT GCTGGTACT ATTGGATCTT CCTGGCCTTC TCTTTTTTCTC GGCATACACG 360  
 CTGCTTGTGC TGTCTGGGC AGAGATATAT CACCAGGCTA GAAGCTTACC TACAGATAAG 420  
 CTGCGGATAA CCTATATTTG TGTCACCGTG GCTGTATATT TGGCTCAGAT TGGTATCTGG 480  
 GCATACATCT GGGTACATGA TAACAGCACT GTGGAGTTAG TTGGAAAGAT ATTTATCGCA 540  
 GTTGTGTCTT TCATCGCCGC ATTAGGCTTC TTGCTGTATG GAGGAAGATT GTTTTTCATG 600  
 CTAAGAAGGT TCCCTATCGA GTCAAAGGA AGAAGGAAGA AACTCCACGA GGTGGATCT 660  
 GTGACAGCTA TATGCTTAC CTGCTTCCTC ATAAGATGCG TTGTGGTGGC TGTATCAGCT 720  
 TTTGACAAGG ATTTAACACT TGATGTTCTT GATCATCCGG TTCTGAACTT AATCTACTAT 780  
 ATGGTGGTAG AAGTACTTCC ATCGGCACTA GTCCTCTTCA TTCTCCGAAA GCTACCTCCA 840  
 AAGAGAGTAT CAGCTCAATA CCATCCGATC CAGTAG 876

&lt; 2 1 0 &gt; 配列番号 : 3

&lt; 2 1 1 &gt; 配列の長さ : 3 0 3

&lt; 2 1 2 &gt; 配列の型 : アミノ酸

&lt; 2 1 3 &gt; 起源 : Arabidopsis thaliana heyneh TOM3

&lt; 4 0 0 &gt; 配列

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

Ala Asn Leu Asp Val Leu Asp His Pro Ile Leu Asn Phe Ile Tyr Tyr 272  
 Leu Leu Val Glu Ile Leu Pro Ser Ser Leu Val Leu Phe Ile Leu Arg 288  
 Lys Leu Pro Pro Lys Arg Gly Ile Thr Gln Tyr His Gln Ile Arg 303

< 2 1 0 > 配列番号 : 4

< 2 1 1 > 配列の長さ : 9 1 2

< 2 1 2 > 配列の型 : 核酸

< 2 1 3 > 起源 : Arabidopsis thaliana heyneh TOM3

< 4 0 0 > 配列

ATGAGAATCG GCGGCGTCGA GGTACGAAA TTTGCGTCGG AGATGATGTC GTCGTCGTCT 60  
 TCGTCGGCGG TGGAGATGTT GAATCTCAA GAAGCTTCGA ATGGTGGTC AGACGTAAAC 120  
 GAATCTCCGA TTTGGCAGGA TCGTATCTTC CATGTTCTCG CTGTTCTCTA CGGAATCGTT 180  
 TCCCTCGTTG CTGTGATTCA ACTTGTGAGA ATACAATTGA GAGTTCCTGA ATATGGTTGG 240  
 ACGACGCAAA AGGTCTTTCA CTTTCTCAAT TTCGTTGTTA ATGGAGTTCG TGCTGTGGTG 300  
 TTTGTCTTCA GCGAAATGT TCAGTTTATG CAACCAGAGA TTCTGCAACA TATCTTGCTT 360  
 GATATTCCAA GTCTTGCTTT CTTACCACC TATGCTCTTC TGGTCTTTT CTGGGCTGAA 420  
 ATTTATTATC AGGCGCGTGC AGTATCGACT GATGGACTCA GGCCAAGCTT CTTACAATT 480  
 AATGCAGTTG TATATGTAGT TCAGATTGCT CTATGGTTGG TTTTGTGGTG GAAGCCTGTT 540  
 CGAGTTATGG TAATCCTATC TAAGATGTTT TTTGCAGGTG TTTCATTGTT CGCTGCCCTT 600  
 GGATTTTAC TTTATGGTGG AAGGCTTTTC CTAATGTTGC AACGGTTTCC AGTAGAATCT 660  
 AAAGGGCGGC GCAAAAAGCT GCAAGAGGTT GGTTACGTGA CAACCATATG CTTTACGTGT 720  
 TTCTCATCA GATGTATCAT GATGTGCTTT GCTGCTTTCG ATGAGGGGGC AAACCTTGAT 780  
 GTGTTAGATC ACCCATCCT TAACCTCATA TATTACCTGT TGGTAGAGAT ATTACCCTCC 840  
 TCTCTGGTCC TCTTCATCTT GAGAAAAGCTA CCACCAAAAC GAGGCATTAC ACAATACCAT 900  
 CAGATTCGCT GA 912

【図面の簡単な説明】

【図 1】 図 1 は、TOM1 遺伝子のマッピングおよびポジショナルクローニングを模式的に表す図である。

【図 2】 図 2 は、TOM1 mRNA の発現を示すノザンハイブリダイゼーション解析の結果を表す写真である。

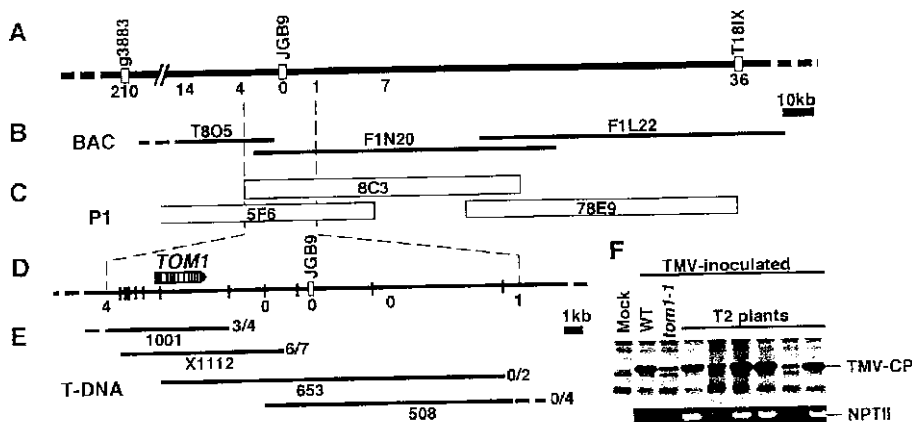
【図 3】 図 3 は、推定された TOM1 蛋白質のアミノ酸配列を表す図である。

【図 4】 図 4 は、各変異株における、TMV-Cg の蓄積を示す写真である。

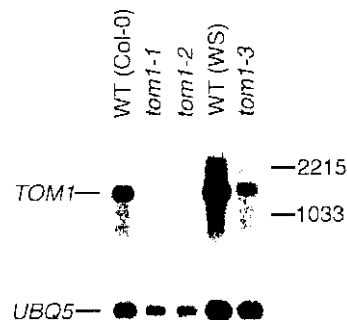
【図 5】 図 5 は、TOM3 遺伝子のマッピングを模式的に表す図である。

【図 6】 図 6 は、TOM1 蛋白質の推定アミノ酸配列と TOM3 蛋白質の推定アミノ酸配列の比較を示す図である。

【図 1】



【図 2】



【 図 3 】

1 MTDSGLMMPA EIAGILTTAI TSWWDDVNES TQWQDGIFFA LCGAYALVSA  
\* I

51 VALVQLIRIQ MRVPEYGMTT OKVFHLMNEV VNGVRAVLFG FHMQVFLVHP  
II

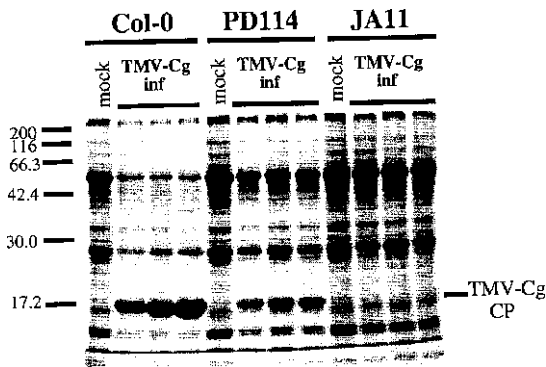
101 KALCWVLLDL PGLLFFSAYT LLVLFWAEIY HQARSLPTDK LRITYISVNV  
III

151 AVYLAQIGIW AYINVHDNST VELVGRKIFIA VVSFIAALGF LLYGGRLEFM  
IV \* V

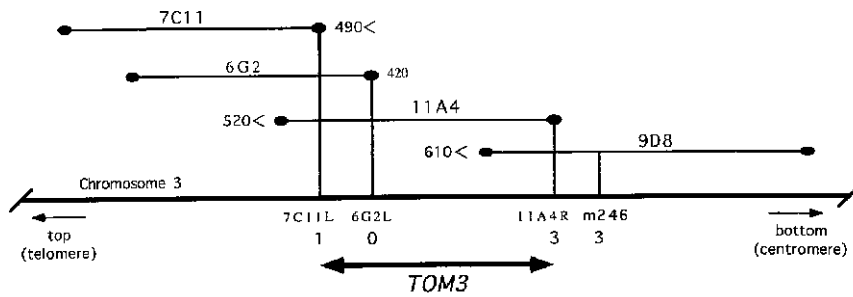
201 LRRFPIESKG RRRKLEHVG S VTAICFTCFI IRCVVAVSA FDKDLTLDVD  
VI

251 DHPVILNLIYY MVVEVLPSAL VLFILRLPPE KRVSQYHPI Q  
VII

【 図 4 】



【 図 5 】



【図 6】

```

      10      20      30      40
TOM1  MTD SGLMMPAEIAGILTTAITS-----WDDVNESTQWQDGIFFALCGAYALV
      : . . . . . : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
TOM3  MRIGGVEVTKFASEMSSSSSSSAVEMLNLKEASNWSDVNESPIWQDRIFHVLAVLYGIV
      10      20      30      40      50      60

      50      60      70      80      90      100
TOM1  SAVALVQLIRIQMRVPEYGTQKVFHLMNFVNVGVRAVLFQFHMVFLVHPKALCWVLE
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
TOM3  SLVAVIQLVRIQLRVPEYGTQKVFHLMNFVNVGVRAVVFVFRNRVQFMQPELLOHILL
      70      80      90      100      110      120

110      120      130      140      150      160
TOM1  DLPGLLFFSAVTLVLFWAETIYHQARSLPTDKLRITYISVMVAVYLAQIGIWAYIWWHDN
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
TOM3  DIPSLAFFTTYALLVLFWAETIYQARAVSTDGLRPSFFITINAVVYVQIALWLVLMKPV
      130      140      150      160      170      180

170      180      190      200      210      220
TOM1  STVELVGKIFIAVVSFIAALGFLLYGGRLFFMLRRFPPIESKGRKKLHEVGSVTAICFTC
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
TOM3  RVMVILSKMFFAGVSLFAALGFLLYGGRLFLMLQRFPPVESKGRKKLQEVGYVTTCFTC
      190      200      210      220      230      240

230      240      250      260      270      280
TOM1  FLIRCVVAVSAFDKDLTLDVLDHPVLNLIYYMVVEVLPSALVLFILRKLPKRVSAQYH
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
TOM3  FLIRCLMCFAAFDEGANLDVLDHPILNFIYLLVEILPSSLVLFILRKLPKRGITQYH
      250      260      270      280      290      300

290
TOM1  PIQ
      : .
TOM3  QIR

```

【手続補正書】

【提出日】平成 11 年 11 月 11 日 ( 1999 . 11 . 11 )

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正内容】

【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 - 291 で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。

( b ) タバコモザイクウイルスの増殖に必要な宿主由来因子であり、( a ) の一部が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなることを特徴とする、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、請求項 2 記載の遺伝子。

( c ) 配列表の配列番号 2 に示す、塩基番号 1 - 876 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 ) ( c ) の一部が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなることを特徴とする、遺伝子。

【請求項 4】請求項 2 又は請求項 3 記載の遺伝子の発現が抑制され、アルファ様ウイルス耐性を付与された、形質転換植物。

【請求項 5】請求項 2 又は請求項 3 記載の遺伝子のドミナントネガティブ変異遺伝子が導入され、アルファ様ウイルス耐性を付与された、形質転換植物。

【請求項 6】以下の ( e ) または ( f ) 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。

( e ) 配列表の配列番号 3 に示す、アミノ酸番号 1 - 303 で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。

( f ) タバコモザイクウイルスの増殖に必要な宿主由来因子であり、( e ) の一部が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなることを特徴とする、ポリペプチド。

【請求項 7】請求項 6 記載のポリペプチドをコードす

る、遺伝子。

【請求項 8】 以下の ( g ) または ( h ) に示す塩基配列からなることを特徴とする、請求項 7 記載の遺伝子。

( g ) 配列表の配列番号 4 に示す、塩基番号 1 - 912 で示される塩基配列からなることを特徴とする、遺伝子。

( h ) ( g ) の一部が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなることを特徴とする、遺伝子。

【請求項 9】 請求項 7 又は請求項 8 記載の遺伝子の発現が抑制され、アルファ様ウイルス耐性を付与された、形質転換植物。

【請求項 10】 請求項 7 又は請求項 8 記載の遺伝子のドミナントネガティブ変異遺伝子が導入され、アルファ様ウイルス耐性を付与された、形質転換植物。

【請求項 11】 請求項 2 及び請求項 7 記載の遺伝子の発現が共に抑制され、アルファ様ウイルス耐性を付与された、形質転換植物。

【請求項 12】 請求項 2 記載の遺伝子のドミナントネガティブ変異遺伝子、及び請求項 7 記載の遺伝子のドミナントネガティブ変異遺伝子が共に導入され、アルファ様ウイルス耐性を付与された、形質転換植物。

【手続補正 2】

【手続補正書】

【提出日】平成 12 年 4 月 13 日 ( 2000 . 4 . 13 )

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正内容】

【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 - 291 で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。

( b ) タバコモザイクウイルスの増殖に必要な宿主由来因子であり、( a ) の一部が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなることを特徴とする、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、請求項 2 記載の遺伝子。

( c ) 配列表の配列番号 2 に示す、塩基番号 1 - 876

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0036

【補正方法】変更

【補正内容】

【0036】この TOM1 類似配列が、TOM3 と関連をもつものと考えられた。しかし、86D11 の配列は短く、mRNA の全体をカバーしている可能性は低いと考えられたため、86D11 をプローブとして、プラークハイブリダイゼーション [Ausubel et al. (1994). Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA. 参照] により、シロイヌナズナ ( Arabidopsis thaliana ) 5'-STRETCH cDNA ライブラリー ( Clontech, Palo Alto, CA, USA ) をスクリーニングした。その結果、ハイブリダイズするクローンを 5 個得た。これらの cDNA クローンの挿入 DNA の塩基配列を決定し総合して、mRNA の全長に近いと考えられる 1203 bp の配列を得た。得られた cDNA の塩基配列から、対応する mRNA は TOM1 蛋白質と類似性をもつ 303 アミノ酸の蛋白質をコードすることが明らかとなった。TOM1 蛋白質と TOM3 蛋白質の推定アミノ酸配列の比較を図 6 に示す。図 6 において、同一のアミノ酸残基を 2 つの点で、類似のアミノ酸残基を 1 つの点で示す。

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 ) ( c ) の一部が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなることを特徴とする、遺伝子。

【請求項 4】 以下の ( e ) または ( f ) 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。

( e ) 配列表の配列番号 3 に示す、アミノ酸番号 1 - 303 で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。

( f ) タバコモザイクウイルスの増殖に必要な宿主由来因子であり、( e ) の一部が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなることを特徴とする、ポリペプチド。

【請求項 5】 請求項 6 記載のポリペプチドをコードする、遺伝子。

【請求項 6】 以下の ( g ) または ( h ) に示す塩基配列からなることを特徴とする、請求項 7 記載の遺伝子。

( g ) 配列表の配列番号 4 に示す、塩基番号 1 - 912 で示される塩基配列からなることを特徴とする、遺伝子。

( h ) ( g ) の一部が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなることを特徴とする、遺伝子。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

// C 1 2 P 21/02

( C 1 2 N 15/09

C 1 2 R 1:91 )

識別記号

Z N A

F I

C 1 2 N 5/00

テ-マコード (参考)

C