

(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2001 - 161365

(P 2 0 0 1 - 1 6 1 3 6 5 A)

(43)公開日 平成13年 6月19日 (2001.6.19)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード [*]	(参考)
C12N 15/09	ZNA	A01H 5/00	A	2B030
A01H 5/00		C07K 14/415		4B024
C07K 14/415		C12P 21/02	C	4B064
C12N 5/10		C12N 15/00	ZNA	A 4B065
C12P 21/02		5/00	C	4H045

審査請求 有 請求項の数 3 O L (全 8 頁)

(21)出願番号 特願平11 - 346387

(22)出願日 平成11年12月 6日 (1999.12.6)

(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

(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

(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

(74)代理人 100059258

弁理士 杉村 暁秀 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】植物ウイルスの増殖に必須の宿主遺伝子 T O M 2 A

(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 TOM2A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 TOM2A蛋白質が提供された。 TOM2A遺伝子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 - 280 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) アルファ様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 - 843 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る事により、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る事により、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】

【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 TOM2A 遺伝子、及び当該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与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、本発明者らによる TOM1 及び TOM3 のみであった (特願平 11 - 232678)。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明の TOM2A を用いた抗ウイルス戦略は、従来育種で用いられてきた抵抗性遺伝子の多くが過敏反応を介してウイルスを封じ込めるのと対照的である。従来の、過敏反応を介したウイルス抵抗性を付与する遺伝子の使用にあたっては、他種の植物に抵抗性を導入できないこと、特定の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。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。

【0004】

【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 TOM2A をクローニングした。TOM2A 遺伝子の発現制御や改変により、植物にウイルス抵抗性を付与することが可能である。

10 【0005】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 TOM2A 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 TOM2A と相同な遺伝子が存在すること、他の植物アルファ様ウイルスも TOM2A 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、TOM2A 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

20 があり、汎用性が期待できる。

【0006】また、この方法のようにウイルスの増殖をサポートする因子を欠損させた場合、その欠損をウイルスゲノム上の変異が補償するのは困難と予想される。つまり、本抗ウイルス戦略はウイルスの変異により打破されにくいであろうと予想される。さらに、上述した TOM1 遺伝子を用いた同様の戦略を併用すれば、より強力なウイルス防除効果が期待できる。最近、ウイルスゲノムの一部を植物で発現させ、ウイルス耐性を付与する方法も実用化している。しかし、この方法の使用にあたって

30 は、生体内での遺伝子組み換えによる新規ウイルスの出現を危惧する声もある。これに対して、本抗ウイルス戦略は宿主遺伝子の操作のみによるのでそのような危険性はない。

【0007】

【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 (TMV) の感染によるウイルス外被蛋白質の蓄積が抑制されたシロイヌナズナ変異株を作成した。その変異株を用いて、遺伝子の変異部位をマッピングし、当該変異を担っている遺伝子のクローニングを行う事により、

40 ウイルスの増殖に必須の遺伝子である TOM2A 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 TOM2A 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。

【0008】本発明の TOM2A 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 TOM2A 遺伝子がコードするポリペプチドである TOM2A 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。上述した通り、TOM2A 遺伝子産物はウイルスの増殖をサポートすると考えられ、当該遺伝子の機能欠損は TMV の増殖抑制をもたらす。

【0009】本発明において、TOM2A ポリペプチドのアミノ酸配列の一部を欠損、置換し、若しくは付加されたポリペプチドとは、配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列と、少なくとも 50%、好ましくは 60% 以上、更に好ましくは 70% 以上のアミノ酸配列の相同性を有するポリペプチドを意味する。また、TOM2A ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする遺伝子の塩基配列の一部欠損、置換し、若しくは付加された塩基配列とは、配列表の配列番号 2 に記載の塩基配列と、少なくとも 50%、好ましくは 60% 以上、更に好ましくは 70% 以上の塩基配列の相同性を有する遺伝子を意味する。

【0010】上述した TOM2A 遺伝子の機能より、遺伝子破壊、アンチセンスサプレッション、あるいはコサプレッションなどの手段を利用して、人為的にシロイヌナズナの TOM2A 遺伝子あるいは他の植物の TOM2A 遺伝子の機能ホモログの発現を抑制することにより、TMV 耐性植物を作製できると期待できる。また、TMV は多くの動植物 (+) 鎖 RNA ウイルス (アルファ様ウイルスと総称される) と基本的な複製機構を共有すると考えられている。下記の実施例で述べるように、tom2a 変異はタバコモザイクウイルス外被蛋白質 (TMV-Cg) の増殖を特異的に抑制した。他のアルファ様ウイルスも TOM2A ファミリーの他のメンバーを使って増殖している可能性があり、TOM2A ファミリーの他のメンバーの不活化により他のアルファ様ウイルスに耐性の植物が作出できる可能性がある。また TOM2A ファミリーメンバー全体を不活化する事により広範なアルファ様ウイルスに耐性の植物を作出できる可能性もある。

【0011】また、TOM2A 遺伝子に変異を与え、ウイルス増殖に対してドミナントネガティブに働くアレルを取得し、その様な遺伝子を植物に導入することにより TMV 耐性を付与する事が可能である。良好なドミナントネガティブ tom2 アレルを取得する事により、そのアレルの導入により種々の植物に広範なアルファ様ウイルスに対する耐性を付与できる可能性もある。

【0012】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 TOM2A 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 TOM2A 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。

【0013】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。

【0014】また、上述した様に、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事ができる。

【実施例】

【0015】(tom2-1 変異のマッピングと TOM2A 遺伝子のクローン化) シロイヌナズナ YS241 株は、速中性子線照射により得られたタバコモザイクウイルス (TMV) の増殖が 1 細胞レベルで抑制される変異株である。遺伝解析の結果、アブラナ科系 TMV Cg 株およびトマト系 TMV L 株の増殖抑制形質は主として劣性変異 tom2-1 に支配されること、YS241 株には tom2-1 に加えて tom2-1 バックグラウンドで TMV-L の増殖を野生株並にまで増加させる優性変異 ttm1 が存在することが明らかになっている。なお、ttm1 は tom2-1 バックグラウンドで TMV-Cg の増殖をわずかに増加させるのみであった。tom2-1 変異は劣性なので、対応する野生型遺伝子 TOM2 の産物は TMV の増殖をサポートすると考えられた (Ohshima et. al. [1998]. Virology 243: 472-481.)。

【0016】TOM2 遺伝子をクローン化するため、以下のようにして tom2-1 変異のマッピングを行った。まず、エコタイプ Columbia 由来の YS241 株と野生型エコタイプ La-0 をかけ合わせて得た F2 植物のうち TMV-Cg の増殖が抑制される株 38 株を選択し、シロイヌナズナ染色体上に散在する制限酵素断片長多型 (RFLP) マーカー m241, m235, m215, m335, m254, m253, m299, m213, m252, m251, m429, m583, m249, m506, m600, m247 の各ジェノタイプを調べた。この結果、tom2-1 変異は第 1 染色体中央部 RFLP マーカー m253 と m299 の間にマップされた。さらに同じ F2 集団を用い、m253 と m299 の間に存在する酵母人工染色体 (YAC) クローンの挿入 DNA 末端をマーカーとしてマッピングを進めたところ、tom2-1

は YAC由来の RFLP マーカー 10D4Rと 19F5Rの間約 250 kb の領域内に存在することが明らかになった (図 1)。次いでこの領域を互いにオーバーラップする P1 ゲノミッククローン群でカバーした。

【0017】一方、速中性子線が高頻度で染色体の転座、逆位、あるいは欠失を誘導することを考慮すると、ttm1は TOM2 遺伝子領域が転座したものである可能性が考えられた。そこで、ttm1をもたない tom2-1 株である B1-113 株と親株の野生型 Columbia gl1 株のゲノミック DNAを、ゲノミックサブトラクション法の変法である representational difference analysis (Lisitsyn et al. [1993]. Science 259: 946-951.) により比較したところ、後者には存在するが、前者には存在しない 1608 bp の HindIII断片 (以下 "RDA 断片" と呼ぶ) が単離された。この RDA断片は、TOM2遺伝子座をカバーする P1 整列クローン群中 N20L と特異的にハイブリダイズした。N20Lより RDA断片周辺の配列をサブクローンし、塩基配列を決定するとともに、周辺 DNA断片をプローブとしてザンハイブリダイゼーションを行ったところ、B1-113株には当該領域に約 20 kbp にわたる欠失が存在することが明らかになった。さらに、ttm1をホモにもつ株ではその欠失領域の配列が大部分存在しており、この部分は転座したと推測された (図 2)。

【0018】この欠失領域には複数個の転写単位が存在したので、それらのうちどれが TOM2 に相当するのかわかるために、欠失をカバーする 20 kbの領域のサブフラグメントをT-DNA-アグロバクテリウム法を用いて tom2-1 株に導入し、変異相補能を検討した。クローン #472 の導入によって TMV-Cg および TMV-Lの増殖が野生株並にまで回復した (図 3)。また、クローン #273 の導入によって TMV-Lの増殖が野生株並にまで回復した (TMV-Cgの増殖はわずかに増加した)。

【0019】以上より、tom2-1変異は #472 上の遺伝子と #273 上の遺伝子の二重突然変異であり、ttm1は、後者が転座した結果生じたものであると考えられた。ここで、#472 上の遺伝子にコードされる遺伝子を TOM2A、#273 上の遺伝子にコードされる遺伝子をTOM2B と命名した。クローン #472 上には単一の転写単位が存在していることがザンハイブリダイゼーションにより示唆された。cDNAクローニングおよび 5', 3' RACE (rapid amplification of cDNA ends) 法により、その転写産物はポリ (A)鎖を除いて 1293 ヌクレオチドの長さを持ち、7 個のエクソンからなることが示唆された。その上には終止コドンも含めて 843ヌクレオチド (280 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 (図 4)。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として同定されてい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。さらに cDNA 中この ORFに相当する配列をカリフラワーモザイクウイルス 35Sプロモーターを用いて B1-

113 株で発現させるとtom2-1変異が相補されたので、この ORFが TOM2A蛋白質をコードすることが示された。なお、B1-113ゲノムにおいて、TOM2A 遺伝子は途中でトランケートしていた。

【0020】(TOM2A遺伝子産物の予想アミノ酸配列) 導き出された TOM2A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/Predict Protein: B. Rost, R. Casadio, P. Fariselli, C. Sander, ProteinScience 4,521 [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]) によれば、この蛋白質はN末端およびC末端が細胞質側に露出した4回膜貫通型蛋白質と予測された (図 4)。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.mcb.osaka-u.ac.jp/nakai/psort.html])。データベースサーチを行った結果、アミノ酸配列の類似性をもつシロイヌナズナ遺伝子が2個 (F16A16.120, F11A3.22) リストアップされた (図 4)。これらの遺伝子は、tom2a 単独変異存在下で許容される TMVの増殖を担っている可能性が考えられる。他にいくつかの内在性膜蛋白質も TOM2A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が、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。

【0021】プロトプラストを用いた以前の解析から、tom2a 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 (Ohshima et al. [1998]. Virology 243: 472-481.)。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 [1996]. Advances in Virus Research 47: 159; T. A. Osman and K. W. Buck [1996]. J. Virol. 70: 6227.)。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。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。TOM2A 蛋白質の機能のメカニズムとして、TOM2A は先に同定された TOM1 と共に、複製複合体を膜に結合させる働きをしている可能性が考えられる。

【0022】

【発明の効果】本発明により、配列表の配列番号 2 に示す TOM2A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 TOM2A蛋白質が提供された。TOM2A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

イクウィ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。

【 0 0 2 3 】

【 配列表 】

< 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遺伝子TOM2A
< 1 6 0 > 配列の数：2
< 2 1 0 > 配列番号：1
< 2 1 1 > 配列の長さ：2 8 0
< 2 1 2 > 配列の型：アミノ酸
< 2 1 3 > 起源：Arabidopsis thaliana heyneh TOM2A
< 4 0 0 > 配列

```
Met Ala Cys Arg Gly Cys Leu Glu Cys Leu Leu Lys Leu Leu Asn 15
Phe Leu Leu Ala Val Ala Gly Leu Gly Met Ile Gly Tyr Gly Ile 30
Tyr Leu Phe Val Glu Tyr Lys Arg Val Thr Asp Asn Ser Val Thr 45
Phe Asp Leu Thr Asn Gly Asp Gln Ser Tyr Val Ser Phe Gly Arg 60
Pro Ile Leu Met Ala Val Ser Leu Ser Ser Asn Ile Phe Asp Asn 75
Leu Pro Lys Ala Trp Phe Ile Tyr Leu Phe Ile Gly Ile Gly Val 90
Ala Leu Phe Val Ile Ser Cys Cys Gly Cys Val Gly Thr Cys Ser 105
Arg Ser Val Cys Cys Leu Ser Cys Tyr Ser Leu Leu Leu Ile Leu 120
Leu Ile Leu Val Glu Leu Gly Phe Ala Ala Phe Ile Phe Phe Asp 135
Asn Ser Trp Arg Asp Glu Leu Pro Ser Asp Arg Thr Gly Asn Phe 150
Asp Thr Ile Tyr Asn Phe Leu Arg Glu Asn Trp Lys Ile Val Arg 165
Trp Val Ala Leu Gly Ala Val Val Phe Glu Ala Leu Leu Phe Leu 180
Leu Ala Leu Met Val Arg Ala Ala Asn Thr Pro Ala Glu Tyr Asp 195
Ser Asp Asp Glu Tyr Leu Ala Pro Arg Gln Gln Ile Arg Gln Pro 210
Phe Ile Asn Arg Gln Ala Ala Pro Val Thr Gly Val Pro Val Ala 225
Pro Thr Leu Asp Gln Arg Pro Ser Arg Ser Asp Pro Trp Ser Ala 240
Arg Met Arg Glu Lys Tyr Gly Leu Asp Thr Ser Glu Phe Thr Tyr 255
Asn Pro Ser Glu Ser His Arg Phe Gln Gln Met Pro Ala Gln Pro 270
Asn Glu Glu Lys Gly Arg Cys Thr Ile Met 280
```

< 2 1 0 > 配列番号：2
< 2 1 1 > 配列の長さ：8 4 3
< 2 1 2 > 配列の型：核酸
< 2 1 3 > 起源：Arabidopsis thaliana heyneh TOM2A
< 4 0 0 > 配列

```
ATGGCTTGTA GAGTTGTTT GGAGTGGTTG TTGAAGTTAC TCAACTTTCT CCTGGCTGTT 60
GCTGGACTTG GCATGATTGG TTATGGTATC TATTTATTCG TTGAGTACAA GAGAGTTACC 120
GATAATTCTG TTACATTCGA TTTGACTAAT GGAGATCAAA GTTACGTTTC GTTTGGGAGG 180
CCTATTCTTA TGGCTGTGTC ACTGTCTTCT AATATCTTTG ACAATCTTCC CAAAGCGTGG 240
TTCATATACT TGTTCAATTGG TATTGGTGTG GCTCTCTTTG TTATTTCTTG CTGTGGCTGT 300
GTTGGTACTT GTTCGAGGAG TGTCTGCTGC TTATCTTGCT ACTCTTCTCT TCTGATCTTG 360
TTGATCTTGG TGGAGCTTGG ATTCGCAGCA TTTATTTTCT TCGATAACAG CTGGAGAGAT 420
GAACCTCCTT CTGACAGGAC TGGAACTTC GATACGATAT ATAATTTTCT TAGAGAGAAC 480
TGGAAGATTG TAAGATGGGT AGCTCTAGGA GCAGTTGTTT TCGAGGCTTT ACTCTTCTTG 540
CTTGCCCTTA TGGTCAGGGC AGCTAATACA CCAGCAGAGT ATGACAGTGA TGATGAATAT 600
CTTGCTCCAA GGCAACAAAT CAGGCAGCCA TTCATCAACC GCCAAGCCGC CCCTGTCACT 660
GGTGTCCCAG TTGCTCCTAC TTTGGACCAA CGCCCAAGCC GCAGTGACCC TTGGAGTGCA 720
CGTATGAGGG AAAAGTATGG GCTTGACACA TCTGAGTTCA CATACAATCC CTCAGAGTCA 780
CACCGTTTCC AGCAAATGCC AGCGCAACCA AACGAAGAAA AGGGCCGATG CACCATCATG 840
TGA 843
```

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、各種RFLPマーカーを用いた TOM2A遺伝子のマッピングを模式的に表した図である。

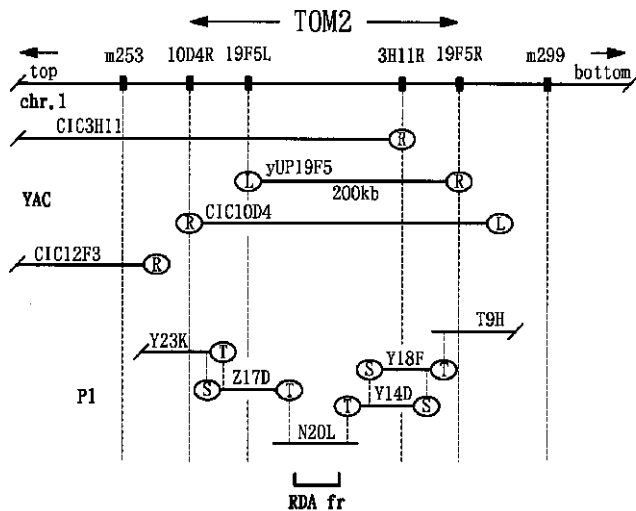
【図2】 図2は、representational difference analysisを用いた TOM2A遺伝子のポジショナルクローニング

を模式的に表した図である。

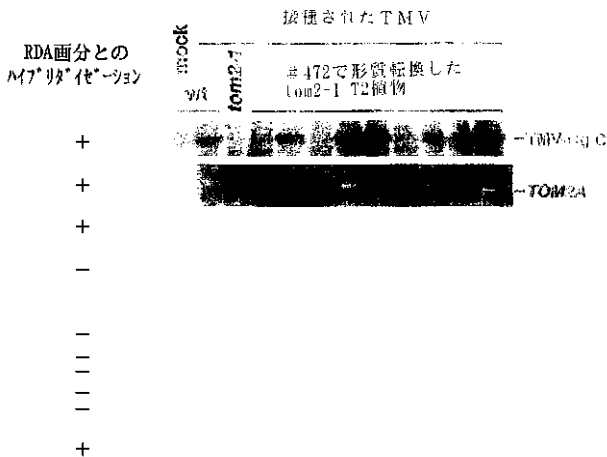
【図3】 図3は、#472導入株における、TMV-Cg外被蛋白質の蓄積を示す写真である。

【図4】 図4は、 TOM2A蛋白質及び TOM2A類似蛋白質の推定アミノ酸配列を表す図である。

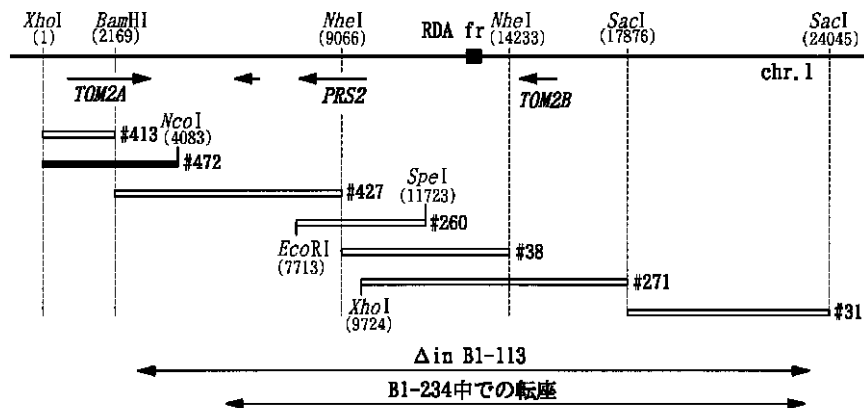
【図1】



【図3】



【図2】



【図4】

TM1

```

F16A16.120 MRHNCCHVSTFASILKILNLFLOAFIGISILLYSIWMLDQYNHHVPVDPPPSQPPAASSPDS
F11A3.22 MRRNCCCHVSTFASTLKLINLNFVOAFIGVSIILYSIWMLHEYSRHLPPVDPSPS---ASS---
TOM2A ---MACRGCLECLLKLINLNFLLAVAGLGMTGYGYLIFVEYKRVTDN-----
          * . : . * : * : * : * * * : * : * : * : * : * : * : * :

```

TM2

```

F16A16.120 SYSFNSIIEINSVSDSLKNPIDFVSGIVLGSGGGDSGFNLRSLDLPAPWFYCFMAIGI
F11A3.22 ----SSGTEIATSVSEPLKNPIDFVASIILGSNGGDHGFNLRSLDLPAPWFYCFMAVGI
TOM2A ----SVTFDLTNGDQSYVSGFRPILMAVSLSSNIFDN-----LPKAWFYLFYFVIGV
          * . : . * : * : * : * * * : * : * : * : * : * : * : * :

```

TM3

```

F16A16.120 LVCIVTIIGFIAAEAINGCCLCFYSILEKTLIIIEAALVGFIVIDRHWEKDLPYDPTGEL
F11A3.22 LVCIVTFIIGFIAAEAINGCCLCFYSILEKTLIIIEAALVAYTIDRHWEKDLPYDPTGEL
TOM2A ALEVLSCCGCYGTCRSRVCCLSCYSLIILLIILLVELGEAAFIIFDNSWRDELPSDRGTNF
          . : . : * . : . : . * : * : * * * * * * : * : * : * : * : * :

```

TM4

```

F16A16.120 NSLRAFIEENIDICKWVGLAVVAVOEESILLAMVLRAMVSPRQSELDEDDFENPMSRAR
F11A3.22 SSLRAFIEENIDICKWVGLAVVAVOEESILLAMVLRAMVSTPKPELDEEDDENPRSRITW
TOM2A DTTYNFLRENWKIVRWVALGAVVSEALFLALMVRAANTP--AEYSDDEYLAPROQIR
          . : . : * : * : * * * : * : * : * : * : * : * : * : * :

```

```

F16A16.120 DNLLGPQANQTS-----SGSSNIDNWRSRIREKYGLINSQ-SHTPSA-----
F11A3.22 DPLLGPQGNQAP-----AGSSKIENWSSRIREKYGLNQSP-PVNPKG-----
TOM2A QPFINRQAAPVTGVPVAPTLDQRPSRSDPWSARMREKYGLDTSEFTYNPSESHRFQOMPA
          . : . : * . . . . * . : * : * : * : * : * * * : * . * :

```

```

F16A16.120 -----
F11A3.22 -----
TOM2A QPNEEKGRCTIM

```

【手続補正書】

【提出日】平成12年5月19日(2000.5.19)

【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1-280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)アルファ様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1-843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。

【手続補正書】

【提出日】平成12年8月11日(2000.8.11)

【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1-280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 - 843 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) タバコモザイクウイルスの増殖に必要な宿主由来因子をコードし、(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。

【手続補正書】

【提出日】平成 12 年 11 月 21 日 (2000.11.21)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0009

【補正方法】変更

【補正内容】

【0009】上述した TOM2A 遺伝子の機能より、遺伝子破壊、アンチセンスサプレッション、あるいはコサプレッションなどの手段を利用して、人為的にシロイヌナズナの TOM2A 遺伝子あるいは他の植物の TOM2A 遺伝子の機能ホモログの発現を抑制することにより、TMV 耐性植物を作製できると期待できる。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0010

【補正方法】変更

【補正内容】

【0010】また、TMV は多くの動植物 (+) 鎖 RNA ウイルス (アルファ様ウイルスと総称される) と基本的な複製機構を共有すると考えられている。下記の実施例で述べるように、tom2a 変異はタバコモザイクウイルス外被蛋白質 (TMV-Cg) の増殖を特異的に抑制した。他のアルファ様ウイルスも TOM2A ファミリーの他のメンバーを使って増殖している可能性があり、TOM2A ファミリーの他のメンバーの不活化により他のアルファ様ウイルスに耐性の植物が作出できる可能性がある。また TOM2A ファミリーメンバー全体を不活化する事により広範なアルファ様ウイルスに耐性の植物を作出できる可能性もある。

フロントページの続き

F ターム(参考) 2B030 AA02 AB03 AD05 CA14
4B024 AA08 BA80 CA03 EA04 GA11
GA25
4B064 AG01 CA11 CA19 CC24 DA11
4B065 AA88X AA88Y AA89X AB01
AC20 BA02 CA24 CA53
4H045 AA10 BA10 CA30 EA05 FA74