

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11)特許番号

特許第3234897号
(P3234897)

(45)発行日 平成13年12月4日(2001.12.4)

(24)登録日 平成13年9月28日(2001.9.28)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	
C 1 2 N 15/09 9/24	Z N A	C 1 2 N 9/24 15/00	Z N A A

請求項の数7(全 7 頁)

(21)出願番号 特願平11-81694
(22)出願日 平成11年3月25日(1999.3.25)
(65)公開番号 特開2000-270866(P2000-270866A)
(43)公開日 平成12年10月3日(2000.10.3)
審査請求日 平成11年3月25日(1999.3.25)

(73)特許権者 591075364
農林水産省北海道農業試験場長
北海道札幌市豊平区羊ヶ丘1番地
(72)発明者 川上 顕
北海道札幌市豊平区羊ヶ丘1番地 農試
宿舍1号棟201号
(72)発明者 寺見 文宏
北海道札幌市豊平区羊ヶ丘1番地 農試
宿舍1号棟304号
(74)代理人 100063565
弁理士 小橋 信淳
審査官 鶴飼 健

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 低温発現型キチナーゼ遺伝子およびその単離方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】 図1に示す配列番号1記載のアミノ酸配列を含むことと、771塩基・256アミノ酸からなり、オオムギキチナーゼ遺伝子と98% (アミノ酸配列レベル)の相同性を持つこととを特徴とする小麦キチナーゼ遺伝子。

【請求項2】 上記小麦キチナーゼ遺伝子は、低温環境下で酵素機能を有し、かつ植物病原菌の細胞壁に含まれるキチンを分解することで病害抵抗性を植物体に付与することを特徴とする請求項1記載の小麦キチナーゼ遺伝子。

【請求項3】 図2に示す配列番号2記載のアミノ酸配列を含むことと、972塩基・323アミノ酸からなり、ライムギキチナーゼ遺伝子と68% (アミノ酸配列レベル)の相同性を持つこととを特徴とする小麦キチナ

ーゼ遺伝子。

【請求項4】 上記小麦キチナーゼ遺伝子は、低温環境下で酵素機能を有し、かつ植物病原菌の細胞壁に含まれるキチンを分解することで病害抵抗性を植物体に付与することを特徴とする請求項3記載の小麦キチナーゼ遺伝子。

【請求項5】 図3に示す配列番号3記載のアミノ酸配列を含むことと、960塩基・319アミノ酸からなり、春播小麦キチナーゼ遺伝子と95% (アミノ酸配列レベル)の相同性を持つこととを特徴とする秋播小麦キチナーゼ遺伝子。

【請求項6】 上記秋播小麦キチナーゼ遺伝子は、低温環境下で酵素機能を有し、かつ植物病原菌の細胞壁に含まれるキチンを分解することで病害抵抗性を植物体に付与することを特徴とする請求項5記載の秋播小麦キチナ

ーゼ遺伝子。

【請求項7】 低温発現型キチナーゼ遺伝子の単離方法であって、

ハードニング（低温順化）による病害抵抗性の向上に関する低温発現型キチナーゼ遺伝子を単離することを目的として、十分にハードニングを施した秋播小麦系統P I 173438（高度雪腐病抵抗性を有する）からmRNAを抽出することと、

上記mRNAをもとにcDNAおよびcDNAライブラリを作製することと、

EMBL / Genebank / DDBJ DNAデータベースによって公開されている数種の植物由来のキチナーゼ遺伝子において高度に保存されている塩基配列部分を参考にして、2種類のキチナーゼ遺伝子の特異的プライ

(Forward) : 5' C - A - C - G - A - G - A - C - C - A - C - N - G -
G - C - G - G - N - T - G - G - G - C (配列番号4)

を有し、

(Reverse) : 5' A - C - N - A - A - T - A - T - C - A - T - C - A -
A - C - G - G - C - G - G (配列番号5)

を有することを特徴とする低温発現型キチナーゼ遺伝子の単離方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、キチナーゼ(chitinase)遺伝子およびその単離方法に関し、詳しくは、低温環境下において植物を加害する雪腐病菌などの好冷性植物病原菌に対して、その抵抗性を植物に付与する機能を持つキチナーゼ遺伝子およびその単離方法に関する。

【0002】

【従来の技術】長期にわたる厳寒積雪地帯では、ムギ類・牧草類などの越冬作物は低温環境下(0以下)または積雪下(0、暗黒下)で長期間の生存を余儀なくされる。この環境下において越冬作物は、好冷性糸状菌である雪腐病菌に犯され、抵抗性の低い作物は枯死してしまう。

【0003】現在の秋播小麦栽培では、根雪前の農薬散布が雪腐病の防除に必須となっているが、根雪開始時期が不確実なため、十分な散布が不可能となる事例が多い。そこで、根雪前の農薬散布を行わなくても済むように、雪腐病に対する十分な抵抗性を持つ品種の育成が望まれている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、従来の交雑に基づいた育種技術では十分な抵抗性をもつ優良品種の育成がなされておらず、また、優良品種の育成には長い年月を要することから、より有効な手段例えば遺伝子工学的な手段による品種の改良が強く求められている。

【0005】本発明者らは、上記した課題を解決するため長期にわたる研究を重ね、その結果、次のような結論

マーを設計することと、

設計された2種類のキチナーゼ遺伝子の特異的プライマーを用いて、上記のcDNAを鋳型にPCR(ポリメラーゼ・チェーン・リアクション)反応を行うことによつて、キチナーゼ遺伝子の断片を増幅し増幅断片を得ることと、

上記の増幅断片をプローブとして、上記のcDNAライブラリをハイブリダイゼーションアッセイによりスクリーニングすることで、遺伝子の全長を含むクローンを単離することと、

を含み、

上記2種類のキチナーゼ遺伝子の特異的プライマーのうち、

一方は、以下の塩基配列

他方は、以下の塩基配列

(配列番号5)

をまとめた。すなわち、雪腐病菌に対する植物体の抵抗性は、秋期から冬期にかけての気温低下に伴う低温順化(以下、ハードニングと称す)により誘導されるが、後述する本発明の3種類のキチナーゼ遺伝子はこのハードニング中に発現が見られ、その翻訳産物が雪腐病菌の細胞壁に含まれるキチンを分解することで病害抵抗性を植物体に付与するということが判った。

【0006】従って本発明の目的は、低温環境下で酵素機能を有し植物体に導入されることで植物に対し病害抵抗性を付与するキチナーゼ遺伝子を提供することにある。

【0007】本発明における他の目的は、低温環境下で酵素機能を有し植物体に導入されることで植物に対し病害抵抗性を付与するキチナーゼ遺伝子の単離方法を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】上記した目的を達成するために本発明は、図1に示す配列番号1記載のアミノ酸配列を含む小麦キチナーゼ遺伝子である。

【0009】図1に示す配列番号1記載のアミノ酸配列を有する上記小麦キチナーゼ遺伝子は、771塩基・256アミノ酸からなり、大麦キチナーゼ遺伝子と98%(アミノ酸配列レベル)の相同性を持つものである。

【0010】また、図1に示す配列番号1記載のアミノ酸配列を有する上記小麦キチナーゼ遺伝子は、低温環境下で酵素機能を有し、かつ植物病原菌の細胞壁に含まれるキチンを分解することで病害抵抗性を植物体に付与するものである。

【0011】そして、上記した目的を達成するために本発明は、図2に示す配列番号2記載のアミノ酸配列を含む小麦キチナーゼ遺伝子である。

【0012】図2に示す配列番号2記載のアミノ酸配列を有する上記小麦キチナーゼ遺伝子は、972塩基・323アミノ酸からなり、ライ麦キチナーゼ遺伝子と68%（アミノ酸配列レベル）の相同性を持つものである。

【0013】また、図2に示す配列番号2記載のアミノ酸配列を有する上記小麦キチナーゼ遺伝子は、低温環境下で酵素機能を有し、かつ植物病原菌の細胞壁に含まれるキチンを分解することで病害抵抗性を植物体に付与するものである。

【0014】さらに、上記した目的を達成するために本発明は、図3に示す配列番号3記載のアミノ酸配列を含む秋播小麦キチナーゼ遺伝子である。

【0015】図3に示す配列番号3記載のアミノ酸配列を有する上記秋播小麦キチナーゼ遺伝子は、960塩基・319アミノ酸からなり、春播小麦キチナーゼ遺伝子と95%（アミノ酸配列レベル）の相同性を持つものである。

【0016】また、図3に示す配列番号3記載のアミノ酸配列を有する上記秋播小麦キチナーゼ遺伝子は、低温環境下で酵素機能を有し、かつ植物病原菌の細胞壁に含まれるキチンを分解することで病害抵抗性を植物体に付与するものである。

【0017】さらに、上記した目的を達成するために本

(Forward) : 5' C - A - C - G - A - G - A - C - C - A - C - N - G -
G - C - G - G - N - T - G - G - G - C (配列番号4)

を有し、

(Reverse) : 5' A - C - N - A - A - T - A - T - C - A - T - C - A -
A - C - G - G - C - G - G (配列番号5)

を有する。

【0019】すなわち、本発明のキチナーゼ遺伝子は、低温発現型キチナーゼ遺伝子である。この低温発現型キチナーゼ遺伝子を作製する方法としては、具体的には下記のようなプロセスによって行われている。

【0020】詳しくは、札幌市の自然条件下で11月22日までハードニング（低温順化）させた高度雪腐病抵抗性を有する秋播小麦PI173438からmRNAを抽出する。そして、該mRNAをもとにcDNAおよびcDNAライブラリーを作製する。

【0021】次いで、EMBL/Genbank/DBJ DNAデータバンクにおいて公開されている数種の植物由来のキチナーゼ遺伝子の塩基配列を詳細に解析し、すべての遺伝子において高度に保存されている塩基配列部分を参考に2種類のキチナーゼ遺伝子の特異的プライマーを設計する。

【0022】設計された2種類のキチナーゼ遺伝子の特異的プライマーを用いて、上記のcDNAを鋳型にPCR（ポリメラーゼ・チェーン・リアクション）反応を行って、キチナーゼ遺伝子の予想された断片（400塩基前後）を増幅し、増幅部分の断片を単離する。

【0023】そして、それぞれの増幅断片をプローブと

発明は、低温発現型キチナーゼ遺伝子の単離方法であって、ハードニング（低温順化）による病害抵抗性の向上に關与する低温発現型キチナーゼ遺伝子を単離することを目的として、十分にハードニングを施した秋播小麦PI173438（高度雪腐病抵抗性を有する）からmRNAを抽出することと、上記mRNAをもとにcDNAおよびcDNAライブラリーを作製することと、EMBL/Genbank/DBJ DNAデータバンクによって公開されている数種の植物由来のキチナーゼ遺伝子において高度に保存されている塩基配列部分を参考に、2種類のキチナーゼ遺伝子の特異的プライマーを設計することと、設計された2種類のキチナーゼ遺伝子の特異的プライマーを用いて、上記のcDNAを鋳型にPCR（ポリメラーゼ・チェーン・リアクション）反応を行うことによって、キチナーゼ遺伝子の断片を増幅し増幅断片を得ることと、上記の増幅断片をプローブとして、上記のcDNAライブラリーをハイブリダイゼーションアッセイによりスクリーニングすることで、遺伝子の全長を含むクローンを単離することと、を特徴とする。

【0018】上記2種類のキチナーゼ遺伝子の特異的プライマーのうち、

一方は、以下の塩基配列

他方は、以下の塩基配列

(配列番号5)

して、上記のcDNAライブラリーをハイブリダイゼーションアッセイによりスクリーニングすることで、遺伝子の全長を含むクローンを単離する。単離したクローンの塩基配列を解析し、小麦では新規なキチナーゼ遺伝子が3種類単離されたことが明かとなる。

【0024】

【実施例】

1) 耐雪性秋播小麦系統PI173438からのcDNA及びcDNAライブラリーの調製

9月下旬にバットに播種し、自然条件下で11月22日までハードニングさせた秋播小麦（*Triticum aestivum* L.）PI173438（高度雪腐病抵抗性を有する）のクラウン部分よりmRNAを常法により抽出した。得られたmRNA 5 µgを用いてcDNA合成キット（STRATAGENE社製）を利用してcDNAを合成した。cDNAの両末端にアダプターを接続後、ZAP Expression vector（STRATAGENE社製）に組み込み、約6x10⁶pfuのcDNAライブラリーを作製した。

【0025】

2) キチナーゼ遺伝子プライマーを用いて、上記のcDNAを鋳型に行われるPCR反応

既知（EMBL/Genbank/DBJ DNAデ

ータバンクにおいて公開されている)のキチナーゼ遺伝子の塩基配列が高度に保存された領域に基づいて合成さ

(Forward) : 5' C - A - C - G - A - G - A - C - C - A - C - N - G - G - C - G - G - N - T - G - G - G - C (配列番号4)

という塩基配列を有するキチナーゼ遺伝子の特異的プライマーと

(Reverse) : 5' A - C - N - A - A - T - A - T - C - A - T - C - A - A - C - G - G - C - G - G (配列番号5)

という塩基配列を有するキチナーゼ遺伝子の特異的プライマーと、を用いて、上記により合成されたcDNAを鋳型にPCR反応を行った。

【0026】上記PCR反応は、50μlの反応系で行われた。日本ジーン社製TaqDNAポリメラーゼ(5units/μl)を1μl、10xポリメラーゼバッファー(MgCl2を含む)を5μl、dNTP液(10mM)を5

れた、

μl、上記の各プライマー(12μM)を2μl、および上記で合成したcDNAを約10ng加えて、反応液全量を蒸留水で50μlとした。PCRの反応条件および反応回数は、以下の表1に示す。

【0027】

【表1】 PCRの反応条件および反応回数

変性	94℃	1分間	1回
変性	94℃	1分間	30回
アニーリング	48℃	1分間	
伸張反応	72℃	1分間	
伸張反応	72℃	2分間	1回

(表1において、「変性」は、DNAの二本鎖をそれぞれ一本鎖に変える反応を意味し、「伸張反応」は、DNA断片の増幅反応を意味し、「30回」は、変性とアニーリングと伸張反応とを含むサイクルを30回にわたり繰り返すことを意味している)

【0028】上記PCR反応の結果、配列番号4の塩基配列を有するプライマーおよび配列番号5の塩基配列を有するプライマーから、予測された長さの断片(400塩基前後)が増幅された。そして、常法に基づき市販の自動シーケンサー(ABI社製、モデル373S)を利用し、得られた増幅断片の塩基配列を決定することで、既知のキチナーゼ遺伝子と高い相同性をもつ新規なキチナーゼ遺伝子の断片であることが確認された。

【0029】

3)本発明のキチナーゼ遺伝子を有するcDNAクローンの単離・塩基配列の決定

上記により得られたcDNAライブラリーのうちおよそ10万クローンをプロットしたフィルターを利用し、上記により得られた新規キチナーゼ遺伝子の断片をラジオアイソトープで標識したプローブを利用してハイブリダイゼーションアッセイを行った。

【0030】ハイブリダイゼーション反応は、50%ホ

ルムアミド、5xSSPE液、5xデンハルト液、0.5%SDS液、0.2mg/mlのサケ精子DNAを加え、42℃の条件下で16時間にわたって行われた。

【0031】その後、上記フィルターに対して、2xSSC液および0.1%SDS液を用いて55℃の条件下で10分間を必要とする洗浄を2回にわたり実施した。洗浄されたフィルターとX線フィルムを利用し、アイソトープでラベルされたプローブと結合した陽性クローンをスクリーニングした。

【0032】このように得られた約45個の陽性クローンについてそれぞれ、ABI社製DNAシーケンサーを用いて塩基配列を決定した。得られた候補クローンの塩基配列の解析から、図1~3に示す配列番号1~3記載のアミノ酸配列を含む3種類の新規キチナーゼ遺伝子がそれぞれ秋播小麦から単離されたことが判った。

【0033】具体的には、単離されたのは、a)771塩基・256アミノ酸からなり、大麦キチナーゼ遺伝子と98%(アミノ酸配列レベル)の相同性を持ち、図1に示す配列番号1記載のアミノ酸配列を含む小麦キチナーゼ遺伝子、b)972塩基・323アミノ酸からなり、ライムギキチナーゼ遺伝子と68%(アミノ酸配列レベル)の相同性を持ち、図2に示す配列番号2記載のアミ

ノ酸配列を含む小麦キチナーゼ遺伝子、c) 960塩基・319アミノ酸からなり、春播コムギキチナーゼと95% (アミノ酸配列レベル) の相同性を持ち、図3に示す配列番号3記載のアミノ酸配列を含む秋播小麦キチナーゼ遺伝子である。

【0034】

【発明の効果】本発明によれば、既知のキチナーゼ遺伝子とアミノ酸配列が異なり、腐雪病に対する高度の抵抗性を有し、小麦では新規なキチナーゼ遺伝子が提供され

る。本発明における3種類のキチナーゼ遺伝子は、低温でのキチン分解能を有することから、上記3種類のキチナーゼ遺伝子のうち何れかを植物体に導入することによって、低温環境下で植物を加害する病原菌に対しても抵抗性を付与することになり、雪腐病菌など好冷性植物病原菌に対して高度の抵抗性を有する植物品種を提供することができる。

【0035】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

< 110 > Tadaoki Inaba, General Manager of Hokkaido National
Agricultural Experiment Station

< 120 > Low Temperature Expression Chitinase cDNA and Method for Their
Isolation

< 130 > 11P97

< 140 > JP 1999/081694

< 141 > 1999-3-25

< 150 > JP 1999/081694

< 151 > 1999-3-25

< 160 > 5

< 210 > 1

< 211 > 256

< 212 > PRT

< 213 > Wheat

< 400 > 1

MARFAALAVC AAALLLAVAA GGAAQGVGS VITRSVYASM LPNRDNLCP ARGFYTYDAF 60
IAAANTFPGF GTTGSADDIK RDLAFFGQT SHETTGGTRG AADQFQWGYC FKEEISKATS 120
PPYYGRGPIQ LTGRSNYDLA GRAIGKDLVS NPDLVSTDAV VSFRTAMFW MTAQGNKPCS 180
HNVALRRWTP TAADTAAGRV PGYGVITNII NGGLECGMGR NDANVDRIGY YTRYCGMLGT 240
ATGGNLDCYT QRNFAS * 256

< 210 > 2

< 211 > 323

< 212 > PRT

< 213 > Wheat

< 400 > 2

MSTLRARCAT AVLAVVLA AA AVTPATAEQC GSQAGGAKCA DCLCCSQFGF CGTTSYDCGP 60
RCQSQCTGCG GGGGGVASIV SRDLFERFLL HRNDAACLAR GFYTYDAFLA AAGAFPAFGT 120
TGDLDTRKRE VAAFFGQTSHT ETTGGWPTAP DGPFSWGYCF KQEQGSPPSY CDQSADWPCA 180
PGKQYYGRGP IQLTHNYNYG PAGRAIGVDL LNNPDLVATD PTVAFKTAIW FWMTTQSNKP 240
SCHDVITGLW TPTARSAAG RVPGYGVITN VINGGIECGM GQNDKVADRI GFYKRYCDIF 300
GIGYGNNLDC YNQLSFVGL AAQ * 323

< 210 > 3

< 211 > 320

< 212 > PRT

< 213 > Wheat

< 400 > 3

MRGVVVVAML AAFAVSAHA EQCGSQAGGA TCPNCLCCSK FGFCGTTSDY CGTGCQSQC 60
GCSGGTPVPV PTPSGGVSS IISQSLFDQM LLHRNDAACL AKGFYNYGAF VAAANSFSGF 120
ATTGSTDVKK REVAFLAQT SHETTGGWPT APDGPYSWG YCFNQERGATS DYCTPSSQWP 180
CAPGKKYFGR GPIQISHNYN YGPAGQAIGT DLLNPNPDLVA SDATVSFKTA LWFWMTPQSP 240

KPSSHDVITG RWSPSGADQA AGRVPGYGV I TNIINGGLEC GRGQDGRVAD RIGFYKRYCD 300
 LLGVSYGDNL DCYNQRPPFA * 320
 < 210 > 4
 < 211 > 23
 < 212 > DNA
 < 213 > Wheat
 < 400 > 4
 5' C-A-C-G-A-G-A-C-C-A-C-N-G-G-C-G-G-N-T-G-G-G-C 23
 < 210 > 5
 < 211 > 20
 < 212 > DNA
 < 213 > Wheat
 < 400 > 5
 5' A-C-N-A-A-T-A-T-C-A-T-C-A-A-C-G-G-C-G-G 20

【図面の簡単な説明】

【図1】配列番号1記載のアミノ酸配列を示す図である。

【図2】配列番号2記載のアミノ酸配列を示す図である。

る。

【図3】配列番号3記載のアミノ酸配列を示す図である。

【図1】

配列番号1

```

      10      20      30      40      50      60
MARFAALAVC AAALLLAVAA GGAAAQVGS VITRSVYASM LPNRDNLCP ARGFYTYDAF
      70      80      90     100     110     120
IAAANTFPGF GTTGSADDIK RDLAFFFQQT SHETTGOTRG AADQFQNGYC FKEEISKATS
     130     140     150     160     170     180
PPYYGRGPIQ LTGRSNYDLA GRAIGKDLYS NPDLVSTDAV VSFRTAMHFW MTAQGNKPSK
     190     200     210     220     230     240
HNVALRRWTP TAADTAAGRV PGYGVITNII NGGLECGMGR NDANVDRIGY YTRYCGMLGT
     250     260     270     280     290     300
ATGGNLDCYT QRNFAS*.....

```

【図2】

配列番号3

```

      10      20      30      40      50      60
MRGVVVVAML AAFAVSAHA EQCGSQAGGA TCPNLCESK FGFCGTTSDY CGTGCQSQC N
      70      80      90     100     110     120
GCSGGTPVPY PTPSGGGVSS IISQSLFDQM LLHRNDAACL AKGFYNYGAF VAAANSFSGF
     130     140     150     160     170     180
ATTGSTDVKK REVA AFLAQT SHETTGGMPT APDGPYSWGY CFNQERGATS DYCTPSSQWP
     190     200     210     220     230     240
CAPGKKYFGR GPIQISHNYN YGPAGQAIGT DLLNNDLVA SDATVSFKTA LWFWMTPQSP
     250     260     270     280     290     300
KPSSHDVITG RWSPSGADQA AGRVPGYGV I TNIINGGLEC GRGQDGRVAD RIGFYKRYCD
     310     320     330     340     350     360
LLGVSYGDNL DCYNQRPPFA*.....

```

【図2】

配列番号2

```

      10      20      30      40      50      60
MSTLRARCAT AVLAVVLA AA AVTPATAEQC GSQAGGAKCA DCLCCSQFGF CGTTSDYCGP
      70      80      90     100     110     120
RCQSQC TGGCG GGGGGVASIV SRDLFERFLL HRNDAACLAR GFYTYDAFLA AAGAFPAPFGT
     130     140     150     160     170     180
TGLDTRKRE VAAFFGQTS H ETTGGWPTAP DGPFSWGYCF KQEQGSPPSY CDQSADWPCA
     190     200     210     220     230     240
PGKQYYGRGP IQLTHNYYNG PAGRAIGVDL LNNPDLVATD PTVAFKTAIN FNMTTQSNKP
     250     260     270     280     290     300
SCHDVITGLW TPTARDSAAG RVPGYGVITN YINGGIECGM GQNDKVADRI GFYKRYCDIF
     310     320     330     340     350     360
GICYGNLDC YNQLSFNVGL AAQ*.....

```

フロントページの続き

(56)参考文献 The Journal of Biological Chemistry, 266 [3] (1991) p. 1564 - 1573
Biosci. Biotech. Biochem., 58 [2] (1994) p. 322 - 329
Biosci. Biotech. Biochem., 57 [11] (1993) p. 1854 - 1861
Plant Science, 103 [2] (1994) p. 177 - 187

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)
C12N 15/09 ZNA
BIOSIS (DIALOG)
JICSTファイル (JOIS)
WPI (DIALOG)
MEDLINE