

(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2003 - 199577

(P 2 0 0 3 - 1 9 9 5 7 7 A)

(43)公開日 平成15年7月15日(2003.7.15)

(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		C12N 9/24	4B024
C12N 5/10		15/00	ZNA A 4B050
// C12N 9/24		5/00	C 4B065

審査請求 有 請求項の数22 O L (全45頁)

(21)出願番号 特願2002 - 947(P 2002 - 947)

(22)出願日 平成14年1月7日(2002.1.7)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成13年7月29日
日本植物細胞分子生物学会発行の「日本植物細胞分子生物学会第19大会・シンポジウム(東京)講演要旨集」に発表

(71)出願人 501203344

独立行政法人農業技術研究機構
茨城県つくば市観音台3 - 1 - 1

(72)発明者 青木 秀之

新潟県上越市稲田1 - 4 - 6 2 - 403

(72)発明者 矢頭 治

新潟県上越市子安1508

(72)発明者 中島 敏彦

新潟県上越市本城町1 - 26 304

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

[最終頁に続く](#)

(54)【発明の名称】リボソーム不活性化タンパク質 (R I P) 遺伝子およびそれを導入したイネ科植物

(57)【要約】 (修正有)

【課題】 種々の病原性生物に対する抵抗性を与える遺伝子、該遺伝子を含む発現カセット、該発現カセットを含むベクター、該ベクターを保持する植物細胞、該植物細胞を再生して得られた植物体を提供し、さらに病原性生物に対して抵抗性の植物を作出する方法を提供すること。

【解決手段】 リボソーム不活性化タンパク質 (R I P) をコードするポリヌクレオチドであって、該ポリヌクレオチドが、(a) 特定の配列の1 ~ 1 3 1 4 位のヌクレオチドを含むポリヌクレオチド; または(b) 該(a) に示すポリヌクレオチドにストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド、である、ポリヌクレオチド。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 リボソーム不活性化タンパク質 (RIP) をコードするポリヌクレオチドであって、該ポリヌクレオチドが、

(a) 配列番号 1 の 146 ~ 955 位のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド ; または (b) 該 (a) に示すポリヌクレオチドにストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド、である、ポリヌクレオチド。

【請求項 2】 前記ポリヌクレオチドが、配列番号 1 の 146 ~ 955 位に記載のヌクレオチド配列、配列番号 3 の 54 ~ 899 位に記載のヌクレオチド配列、配列番号 5 の 35 ~ 877 位に記載のヌクレオチド配列、および配列番号 7 の 37 ~ 843 位に記載のヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 3】 前記ポリヌクレオチドが、配列番号 1 の 146 ~ 955 位に記載のヌクレオチド配列に対して少なくとも 72.5 % の相同性を有し、かつリボソーム不活性化タンパク質活性を有するタンパク質をコードする、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 4】 リボソーム不活性化タンパク質 (RIP) をコードするポリヌクレオチドであって、該ポリヌクレオチドが、

(c) 配列番号 2 の 1 ~ 270 位に記載されるアミノ酸配列を有するイネのリボソーム不活性化タンパク質をコードするポリヌクレオチド ; または (d) (c) に示すアミノ酸配列において 1 つ以上のアミノ酸の挿入、欠失、および/もしくは置換を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドであって、ここで該タンパク質は植物病原性生物の rRNA に対する N - グリコシダーゼ活性を有する、ポリヌクレオチド、である、ポリヌクレオチド。

【請求項 5】 前記タンパク質が、配列番号 2 の 1 ~ 270 位に記載のアミノ酸配列、配列番号 4 の 1 ~ 282 位に記載のアミノ酸配列、配列番号 6 の 1 ~ 281 位に記載のアミノ酸配列、配列番号 8 の 1 ~ 269 位に記載のアミノ酸配列およびそれらのフラグメントからなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 4 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 6】 前記配列番号 2 の 1 ~ 270 位に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも 62 % の相同性を有し、かつ植物病原性生物の rRNA に対する N - グリコシダーゼ活性を有するタンパク質をコードする、請求項 4 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 7】 請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含む、発現カセット。

【請求項 8】 請求項 7 に記載の発現カセットを含む、発現ベクター。

【請求項 9】 請求項 8 に記載のベクターが導入され

た、植物細胞。

【請求項 10】 請求項 9 に記載の植物細胞を再生して得られた、植物。

【請求項 11】 植物病原性生物に対して抵抗性を有する植物を作出するための方法であって、請求項 8 に記載の発現ベクターを植物細胞に導入する工程を包含する、方法。

【請求項 12】 請求項 9 に記載の植物細胞を、前記リボソーム不活性化タンパク質をコードするポリヌクレオチドを発現し、そして植物病原性生物に対して抵抗性を有する植物体に再生する工程をさらに包含する、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】 前記植物病原性生物が、病原性細菌、真菌類、および病原性ウイルスからなる群から選択される、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 14】 前記病原性細菌が、白葉枯病細菌 (*Xanthomonas campestris*) である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】 前記真菌類が、いもち病菌 (*Pyricularia oryzae*) である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 16】 前記抵抗性を有する植物が、少なくとも 2 つの植物病原性生物に対する複合病害抵抗性を示す、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 17】 前記少なくとも 2 つの病原性生物が、真菌類と病原性細菌との組み合わせである、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】 前記少なくとも 2 つの病原性生物が、いもち病菌 (*Pyricularia oryzae*) と白葉枯病細菌 (*Xanthomonas campestris*) との組み合わせである、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 19】 前記植物が、単子葉植物または双子葉植物である、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 20】 前記植物が単子葉植物である、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】 前記単子葉植物がイネ科植物である、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】 前記イネ科植物がイネである、請求項 21 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、植物に病害抵抗性を付与する DNA、この DNA を含む発現カセット、該発現カセットを含むベクター、このベクターを保持する植物細胞、この植物細胞を再生して得られた植物体に関する。

【0002】

【従来の技術】イネは日本を含むアジアの主作物であり、そのためアジア諸国では古くからイネの収量増加の

ための研究を行ってきた。イネの収量を減少させる原因の一つとしては病害が挙げられ、その中でもいもち病 (*Pyricularia oryzae*) と白葉枯病 (*Xanthomonas campestris*) は深刻な被害をもたらす病害として恐れられてきた。いもち病は日本で最も恐れられている病害であり、主に日本の中部から北部にかけて長雨、冷害に伴って発生する。

いもち病菌は糸状菌の一種である。いもち病に冒されたイネは黒色の斑点型病斑を生じ、イネの成長が停止する。

【0003】白葉枯病は細菌病の一種であり、九州から東南アジアにかけて深刻な被害をもたらす病害である。白葉枯病に冒されたイネは白褐色の病斑が葉縁に沿って拡大し、葉全体が枯死する (Ohata, 1989, *Zenkoku Nosonkyoiku Kyokai Co. Ltd. pp. 563*)。

【0004】植物は、病原菌の侵入シグナルを認識すると、植物体を防御するために感染特異的タンパク質 (PRTタンパク質) を誘導発現し、防御応答を行う (Bowles, 1990, *Annu. Rev. Biochem. 59, 873*)。病原菌の感染によって誘導された抗菌性タンパク質は、病原菌に直接作用することによって植物の防御機構に関わっている (VanLoon, 1994, *Plant Mol. Biol. Report. 12, 245*; VanLoon, 1999, *Physiol. Mol. Plant Path. 55, 85*)。また、グルカナーゼやキチナーゼ遺伝子を遺伝子組換えする事によって、植物に病害抵抗性をもたらしたことが報告されている (Nishizawa, 1999, *Kagakuto Sheibutsu 37, 295*)。

【0005】リボソーム不活性化タンパク質 (RIP) は、真核生物の rRNA に対して N-グリコシダーゼ活性を持ち、アデニン残基を特異的に切断する塩基性タンパク質である。RIP は作物を含む植物のほとんど全ての組織で発現しており、植物の病原菌に対して抗菌活性がある (Barbieri, 1993, *Biochim. Biophys. Acta 1154, 237*; Yun, 1997, *Plant Breeding Reviews 14, 39*)。これまでに、オオムギ、コムギ、トウモロコシなどに由来するリボソーム不活性化タンパク質が単離されている (例えば、*J. Biol. Chem. 266 (3): 1564-73 (1991)*; *Plant Mol. Biol. 22 (1): 171-6 (1993)*; *J. Biol. Chem. 266 (34): 23422-7 (1991)*; *Biosci. Biotech. Biochem. (1998) 62 (6): 1152-1156*; および *Plant Physiol. 107 (2), 661-662* を参照のこと)。リボソーム不活性化タンパク質の総説について

は、*Bio/Technology 10: 405-412 (1992)* および *Cellular and Molecular Biology (1996) 42 (4): 461-471* を参照のこと。オオムギから精製された RIP は rRNA に対して特異性を持ち、カビの rRNA に対して哺乳動物の rRNA よりも 10 倍以上の N-グリコシダーゼ活性を持つことが明らかになっている (Endo, 1988, *Biochim. Biophys. Acta 954, 224*)。また、オオムギ RIP は植物の rRNA に対して N-グリコシダーゼ活性を持たないので、RIP は植物の病害抵抗性機構に関与していると推測されている (Taylor, 1994, *Plant J. 5, 827*)。

【0006】この RIP の抗菌性を利用し、これまで RIP 遺伝子の導入によって植物に病害抵抗性を付与させる試みが行われてきた。例えば、オオムギ RIP に創傷誘導性 (wound inducible) プロモーターを用いてタバコに形質転換させた場合では、形質転換個体はタバコ腰折れ病菌 (*Rhizoctonia solani*) に対する病害抵抗性が向上したことが報告されている (Logemann, 1992, *BIO/Technology 10, 305*)。さらに、オオムギのキチナーゼ遺伝子と RIP 遺伝子をともに恒常的に発現する形質転換タバコは、それぞれの遺伝子の単独導入の場合よりも、腰折れ病に対して強い抵抗性を示すことが報告された。これは、溶菌酵素の作用によって、RIP の菌体内への浸透性が高められたためと考えられている (Jach, 1995, *Plant J. 8, 97*)。ヤマゴボウ RIP が導入されたタバコは、タバコモザイクウイルス (TMV) に対する抵抗性が付与された (Moon, 1997, *Mol. Cells 7, 807*)。しかしながら、このように、RIP 遺伝子を単独で導入した研究はタバコ、ジャガイモでしか行われていない。特に、主要作物の中に含まれるイネ科植物において、病害に対する抵抗性を付与する遺伝子が望まれているが、イネ科植物で RIP 遺伝子の発現を強化した場合の病害抵抗性に及ぼす効果は未知である。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、上記の問題を解決するためのものであり、その目的とするところは、種々の病原性生物に対する抵抗性を与える遺伝子、この遺伝子を含む発現カセット、この発現カセットを含むベクター、このベクターを保持する植物細胞、この植物細胞を再生して得られた植物体を提供し、さらに病原性生物に対して抵抗性の植物を作出する方法を提供することである。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、前記課題を解決すべく鋭意努力した結果、イネから 2 種類、ライ麦、エンバクからそれぞれ 1 種類の RIP cDNA を

クローニングした。また、これらの R I P c D N A をアグロバクテリウム形質転換法を用いてイネに形質転換を行い、植物体内で発現させることに成功した。本発明者らは、さらに、この遺伝子の解析を進めた結果、この遺伝子の発現と植物の病害抵抗性ととの間に顕著な相関関係が認められることを見だし、これにより発明を完成させるに至った。

【0009】本発明は、以下のリボソーム不活性化タンパク質 (R I P) をコードするポリヌクレオチドを提供する：

(a) 配列番号 1 の 1 4 6 ~ 9 5 5 位のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド； または (b) 該 (a) に示すポリヌクレオチドにストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド、である、ポリヌクレオチド。

【0010】1つの実施形態において、上記ポリヌクレオチドは、配列番号 1 の 1 4 6 ~ 9 5 5 位に記載のヌクレオチド配列、配列番号 3 の 5 4 ~ 8 9 9 位に記載のヌクレオチド配列、配列番号 5 の 3 5 ~ 8 7 7 位に記載のヌクレオチド配列、および配列番号 7 の 3 7 ~ 8 4 3 位に記載のヌクレオチド配列を含み得る。

【0011】別の実施形態において、上記ポリヌクレオチドは、配列番号 1 の 1 4 6 ~ 9 5 5 位に記載のヌクレオチド配列に対して少なくとも 7 2 . 5 % の相同性を有し、かつリボソーム不活性化タンパク質活性を有するタンパク質をコードし得る。

【0012】本発明はさらに、以下のリボソーム不活性化タンパク質 (R I P) をコードするポリヌクレオチドを提供する：

(c) 配列番号 2 の 1 ~ 2 7 0 位に記載されるアミノ酸配列を有するイネのリボソーム不活性化タンパク質をコードするポリヌクレオチド； または (d) (c) に示すアミノ酸配列において 1 つ以上のアミノ酸の挿入、欠失、およびもしくは置換を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドであって、ここで該タンパク質は植物病原性生物の r R N A に対する N - グリコシダーゼ活性を有する、ポリヌクレオチド。

【0013】1つの実施形態において、上記タンパク質は、配列番号 2 の 1 ~ 2 7 0 位に記載のアミノ酸配列、配列番号 4 の 1 ~ 2 8 2 位に記載のアミノ酸配列、配列番号 6 の 1 ~ 2 8 1 位に記載のアミノ酸配列、配列番号 8 の 1 ~ 2 6 9 位に記載のアミノ酸配列およびそれらのフラグメントを含み得る。

【0014】別の実施形態において、上記タンパク質は、配列番号 2 の 1 ~ 2 7 0 位に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも 6 2 % の相同性を有し、かつ植物病原性生物の r R N A に対する N - グリコシダーゼ活性を有するタンパク質を含み得る。

【0015】本発明はまた、上記ポリヌクレオチドを含む発現カセット、この発現カセットを含む発現ベクタ

一、およびこのベクターが導入された植物細胞を含み得る。

【0016】本発明は、上記植物細胞を再生して得られた植物もまた含み得る。

【0017】本発明は、植物病原性生物に対して抵抗性を有する植物を作出するための方法を提供し、この方法は、上記発現ベクターを植物細胞に導入する工程を包含する。

【0018】1つの実施形態において、上記方法は、上記植物細胞を、リボソーム不活性化タンパク質をコードするポリヌクレオチドを発現し、そして植物病原性生物に対して抵抗性を有する植物体に再生する工程をさらに包含し得る。

【0019】別の実施形態において、上記植物病原性生物は、病原性細菌、真菌類、および病原性ウイルスを含み得る。

【0020】さらに別の実施形態において、上記病原性細菌は、白葉枯病細菌 (*Xanthomonas campestris*) を含み得る。

【0021】さらに別の実施形態において、上記真菌類は、いもち病菌 (*Pyricularia oryzae*) を含み得る。

【0022】なお別の実施形態において、上記抵抗性を有する植物は、少なくとも 2 つの植物病原性生物に対する複合病害抵抗性を示し得る。

【0023】他の実施形態において、上記少なくとも 2 つの病原性生物は、真菌類と病原性細菌との組み合わせを含み得る。

【0024】他の実施形態において、上記少なくとも 2 つの病原性生物は、いもち病菌 (*Pyricularia oryzae*) と白葉枯病細菌 (*Xanthomonas campestris*) との組み合わせを含み得る。

【0025】さらなる実施形態において、上記植物は、単子葉植物または双子葉植物である。

【0026】1つの実施形態において、上記植物は単子葉植物であり得る。別の実施形態において、上記単子葉植物はイネ科植物であり得る。また、このイネ科植物はイネであり得る。

【0027】

【発明の実施の形態】本発明は、植物に病害抵抗性を付与するタンパク質の発見に関する。「病害抵抗性」とは、以下に説明するような病原性生物によって引き起こされる病気を防ぐ、または最小限にとどめる性質をいう。

【0028】本発明のポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質は、エリタター処理またはサリチル酸によって植物においてその発現が誘導され、植物に病害抵抗性を付与し得る。エリタターとは、植物の病害抵抗反応に関与するフィトアレキシン産生を誘導する物質であ

る。サリチル酸は、植物の病害抵抗性を引き起こすシグナル物質の1つである。本発明のポリヌクレオチドは、リボソーム不活性化タンパク質 (RIP) をコードし得る。

【0029】リボソーム不活性化タンパク質 (RIP) は、原核生物/真核生物の rRNA に対して N-グリコシダーゼ活性を持ち、アデニン残基を特異的に切断する塩基性タンパク質である。このタンパク質は、原核生物/真核生物のタンパク質合成を触媒的に著しく不活化し得る。また、このタンパク質は、植物細胞の rRNA に対しては N-グリコシダーゼ活性がほとんどない。

【0030】本発明のリボソーム不活性化タンパク質をコードするポリヌクレオチドはさらに、本発明のリボソーム不活性化タンパク質 (例えば、図1に示したアミノ酸配列を有するリボソーム不活性化タンパク質 (RIP1)) のアミノ酸配列 (配列番号2) またはポリヌクレオチド配列 (配列番号1) に対して実質的な同一性を有する改変体をコードするポリヌクレオチドを含む。本明細書中で使用される場合、本発明のリボソーム不活性化タンパク質のアミノ酸配列またはポリヌクレオチド配列に対して実質的な同一性を有する改変体とは、このタンパク質の N 末端および/または C 末端に対する1つ以上のアミノ酸の欠失 (すなわち、短縮化) または付加; このタンパク質中の1つ以上の部位のアミノ酸の欠失または付加; あるいはこのタンパク質中の1つ以上の部位のアミノ酸の置換によりネイティブタンパク質から誘導されたタンパク質を意図する。

【0031】リボソーム不活性化タンパク質の改変体において、目的のタンパク質の生物学的活性に影響しない適当なアミノ酸置換に関する指針は、Dayhoffら (1987) Atlas of Protein Sequence and Structure (Nat. Biomed. Res. Found. Washington, D.C., これは、参考として本明細書中に援用される) のモデルに見出され得る。保存的置換 (例えば、1つのアミノ酸を同様の特性を有する別のものと交換する置換) が好ましいとされ得る。このような置換としては、疎水性アミノ酸 (Ala, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, Tyr, Val); 親水性アミノ酸 (Arg, Asp, Asn, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Lys, Ser, Thr); 脂肪族側鎖を有するアミノ酸 (Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro); 水酸基含有側鎖を有するアミノ酸 (Ser, Thr, Tyr); 硫黄原子含有側鎖を有するアミノ酸 (Cys, Met); カルボン酸およびアミド含有側鎖を有するアミノ酸 (Asp, Asn, Glu, Gln); 塩基含有側鎖を有するアミノ酸 (Arg, Lys, His); 芳香族含有側鎖を有するアミノ酸 (His, Phe, Tyr, Trp) 同士の置換が挙げられる。

【0032】本明細書中で使用される場合、「1つ以上のアミノ酸の挿入、欠失、および/もしくは置換」とは、本発明で使用され得るポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質が有する機能を発現し得る限りにおいて、任意の数 (1または数個) のアミノ酸が上記アミノ酸配列において欠失、付加、および/もしくは置換していることを意味する。アミノ酸の置換、欠失および/もしくは付加のような改変が活性に与える影響は、改変されるアミノ酸の位置、程度、種類などに依存し得ることは当業者には明らかである。本発明で使用され得るポリヌクレオチドは、そのポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質が有する機能を発現し得る限りにおいて、好ましくは以下のアミノ酸配列同一性を満たす個数で欠失、置換および/もしくは付加された改変体をコードする。

【0033】さらに、本発明で使用される「リボソーム不活性化タンパク質をコードするポリヌクレオチド」とは、縮重異性体をすべて含むものである。ここで、「縮重異性体」とは、縮重コドンにおいてのみ異なっていて、同一のポリペプチドをコードすることのできる遺伝子を意味する。例えば、図1の塩基配列を有する DNA に対して、そのアミノ酸のどれかに対応するコドン、例えば Asn に対応するコドン (AAC) が、これと縮重関係にあるコドン例えば AAT に変わったものを縮重異性体と呼ぶこととする。また、pBluescript SK⁺ (Stratagene) などのプラスミドに組み込まれたリボソーム不活性化タンパク質をコードするポリヌクレオチドを用いても良い。

【0034】本発明のポリヌクレオチドは、病害抵抗性を付与し得る限り、配列表の配列番号2の1位の Met から 270 位の Asn までのアミノ酸配列と、少なくとも 62%、好ましくは 70%、より好ましくは少なくとも 75%、より好ましくは少なくとも 80%、なおより好ましくは少なくとも 90%、なおより好ましくは少なくとも 95%、最も好ましくは少なくとも 99% の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを包含する。

【0035】本発明のポリヌクレオチドは、病害抵抗性を付与し得る限り、配列表の配列番号2の1位の Met から 270 位の Asn までのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列 (好ましくは、配列番号1の146~955 位までに示されるヌクレオチド配列) と、少なくとも 72.5%、好ましくは 75%、より好ましくは少なくとも 80%、より好ましくは少なくとも 85% の配列同一性、なおより好ましくは少なくとも 90% の配列同一性、さらにより好ましくは少なくとも 95% の配列同一性、最も好ましくは少なくとも 99% の配列同一性を有するヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを包含する。

【0036】本発明のポリヌクレオチドの1つの好まし

い実施形態としては、配列番号 4 の 1 ~ 282 位に記載のアミノ酸配列、配列番号 6 の 1 ~ 281 位に記載のアミノ酸配列、配列番号 8 の 1 ~ 269 位に記載のアミノ酸配列またはそれらのフラグメントをコードするポリヌクレオチドが挙げられるが、これらに限定されない。

【0037】本明細書中で使用される場合、「参照配列」とは、配列比較の基準として使用される規定の配列である。参照配列は、記載された配列のサブセットまたは全体であり得る；例えば、全長 cDNA もしくは遺伝子配列のセグメント、または完全 DNA もしくは遺伝子配列としてである。

【0038】本明細書中で使用される場合、「比較ウィンドウ」は、ポリヌクレオチド配列の連続しかつ特定化されたセグメントについて言及し、ここで比較ウィンドウにおけるポリヌクレオチド配列は、2 つの配列の最適なアラインメントのために、参照配列（これは、付加または欠失を含まない）と比較して、付加または欠失（すなわち、ギャップ）を含み得る。一般的に、比較ウィンドウは、少なくとも 20 の連続するヌクレオチド長であり、そして必要に応じて、30、40、50、100 以上の長さであり得る。当業者は、ポリヌクレオチド配列中にギャップを含むことにより、参照配列に対して高い類似性となることを避けるために、典型的には、ギャップペナルティーを導入し、そしてこれを、一致の数から差し引くことを理解する。

【0039】比較のための配列のアラインメントの方法は、当該分野において周知である。参照配列（本発明の配列）と対象配列との間の最適な全体の整合を決定するための好ましい方法として、例えば、BLAST (Altschul, 1997, Nucleic Acids Res., 25, 3389-3402) を利用した相同性解析が用いられる。配列整列において、参照配列および対象配列は、両方とも DNA 配列である。RNA 配列は、U を T に変換することによって比較され得る。上記の全体的配列整列の結果が、同一性%である。同一性%を算定するために DNA 配列の BLAST 整列において、一般的には、デフォルトパラメーターが使用され得る。

【0040】本明細書中で使用される場合、2 つの核酸配列または 2 つのポリペプチド配列の文脈において「配列同一性」または「同一性」は、特定化された比較ウィンドウにわたって最大に一致するように整列された場合に同一である 2 つの配列中の残基に対して言及される。タンパク質に関して配列同一性%が使用される場合、しばしば、保存的アミノ酸置換によって同一ではない残基位置は異なることが理解される。上述したように、保存的アミノ酸置換では、アミノ酸残基が、類似の化学的特性（例えば、電荷または疎水性）を有する他のアミノ酸残基で置換されるため、分子の機能的特性を変化させない。配列が保存的置換において異なる場合、配列同一性

パーセントは、置換の保存的性質について矯正するように上方に調整され得る。このような保存的置換によって異なる配列は、「配列類似性」または「類似性」を有するといわれる。この調整をするための手段は、当業者には周知である。代表的には、これは、完全なミスマッチではなく、部分的なものとして保存性置換を点数付けすることを含み、それによって配列同一性パーセントを増加させる。従って、例えば、同一のアミノ酸が 1 のスコアを与えられ、そして非保存的置換が 0 のスコアを与えられる場合、保存的置換は、0 と 1 との間のスコアを与えられる。保存的置換の点数付けは、例えば、プログラム PC/GENE (Intelligenetics, Mountain View, California) において実行されるように計算される。

【0041】本明細書中で使用される場合、「配列同一性%」は、比較ウィンドウにわたって最適にアラインされた 2 つの配列を比較することによって決定された値を意味し、ここで比較ウィンドウにおけるポリヌクレオチド配列の一部は、2 つの配列の最適なアラインメントのために、参照配列（これは、付加または欠失を含まない）と比較して、付加または欠失（すなわち、ギャップ）を含み得る。この割合（%）は、同一の核酸塩基またはアミノ酸残基が両方の配列に存在して一致した位置の数を生じる、位置の数を決定すること、一致した位置の数を比較ウィンドウ中の位置の総数で除算すること、およびその結果に 100 をかけて配列同一性のパーセンテージを得ることによって計算される。

【0042】用語、ポリヌクレオチドの「実質的な同一性」は、ポリヌクレオチドが、標準的なパラメーター（例えば、デフォルトパラメーター）を使用して、記載されるかさもなくば公知のアラインメントプログラムの 1 つを用いて参照配列と比較して、少なくとも 70%、好ましくは 80%、より好ましくは少なくとも 85%、より好ましくは少なくとも 90%、および最も好ましくは少なくとも 95% の配列同一性を有する配列を含むことを意味する。当業者は、コドンの縮重、アミノ酸の類似性、リーディングフレームの位置などを考慮に入れることによって、2 つのヌクレオチド配列によってコードされる対応するタンパク質の同一性を決定するために、これらの値が適切に調整され得ることを理解する。これらのために、対応するアミノ酸配列の実質的な同一性は、通常、少なくとも 70%、より好ましくは少なくとも 75%、80%、90%、および最も好ましくは少なくとも 95% の配列同一性を意味する。

【0043】ペプチドの文脈における用語「実質的な同一性」は、ペプチドが、特定化された比較ウィンドウにわたって、参照配列に対して、より好ましくは少なくとも 60% の配列同一性、好ましくは 70%、より好ましくは 80%、より好ましくは 85%、最も好ましくは少なくとも 90% または 95% の配列同一性を有する配列を

含むことを意味する。好ましくは、最適なアラインメントは、Needlemanら(1970) J. Mol. Biol. 48: 443の相同性アラインメントアルゴリズムを使用して行われる。例えば、2つのペプチドが保存的置換によってのみ異なる場合に、ペプチドは、第2のペプチドと実質的に同一である。「実質的に類似の」ペプチドは、同一ではない残基の位置が保存的アミノ酸変化によって異なり得るといふこと以外は、上記に示したような配列同一性を共有する。

【0044】本発明においては、GENETYXソフトウェア(ソフトウェア開発株式会社、東京)を使用することにより、アミノ酸配列/ヌクレオチド配列の同一性または類似性を決定した。しかし、同一性または類似性の%は、使用されるソフトウェアに依存して異なり得ることは当業者により理解される。また、例えば、AおよびBの2つのアミノ酸配列/ヌクレオチド配列を比較する場合、アミノ酸配列/ヌクレオチド配列Aの長さが、アミノ酸配列/ヌクレオチド配列Bの長さと同しくない場合には、Bに対するAの%アミノ酸配列/ヌクレオチド配列同一性は、Aに対するBの%アミノ酸配列/ヌクレオチド配列同一性とは等しくない場合もあることは明らかである。

【0045】本明細書中で使用される場合、病害抵抗性を与えるリボソーム不活性化タンパク質の生物学的に活性な部分をコードするフラグメントは、少なくとも15、25、30、50、100、125、150、175、200、225の連続するアミノ酸、または本発明で使用されるリボソーム不活性化タンパク質の全長タンパク質に存在するアミノ酸の総数まで(例えば、配列番号2の270アミノ酸)をコードする。ハイブリダイゼーションプローブ(例えば、PCRプライマーについて)として用いるための、病害抵抗性を付与するリボソーム不活性化タンパク質のフラグメントは、一般に、病害抵抗性を付与するリボソーム不活性化タンパク質をコードする遺伝子により発現されるタンパク質の生物学的に活性な部分をコードする必要はない。

【0046】イネ以外の他の植物に由来する、病害抵抗性を与えるリボソーム不活性化タンパク質をコードするポリヌクレオチドホモログもまた、本願発明において使用され得る。そのようなポリヌクレオチドホモログは、例えば、公知のリボソーム不活性化タンパク質(例えば、図1に記載されたイネのリボソーム不活性化タンパク質(RIP1))の全長または一部のヌクレオチド配列に基づいて設計したプライマーを用いて、選択した植物のゲノミックDNAを鋳型としてPCRを行い、その後、得られた増幅DNAフラグメントをプローブとして用いて同じ植物のゲノミックDNAまたはcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより単離され得る。このようにして、PCR、ハイブリダイゼーションなどのような方法が、公知のリボソーム不活性化タンパ

ク質(例えば、図1に記載されたイネのリボソーム不活性化タンパク質(RIP1))の配列に対するそれらの配列同一性に基づいてこのような配列を同定するために使用され得る。とりわけ、図1に記載の配列全体に対する、またはそれらのフラグメントに対する、それらの配列同一性に基づいて単離された配列は、本発明によって特に好ましく使用される。

【0047】ハイブリダイゼーション技術において、公知のリボソーム不活性化タンパク質をコードするヌクレオチド配列の全てまたは部分が、選択された生物由来のクローン化されたゲノムDNAフラグメントまたはcDNAフラグメントの集団(すなわち、ゲノムライブラリーまたはcDNAライブラリー)中に存在する他の対応するヌクレオチド配列に選択的にハイブリダイズするプローブとして使用される。このハイブリダイゼーションプローブは、ゲノムDNAフラグメント、cDNAフラグメント、RNAフラグメント、または他のオリゴヌクレオチドであり得、そして検出可能な基(例えば、³²P)または任意の他の検出可能なマーカーで標識され得る。従って、例えば、ハイブリダイゼーションのためのプローブは、本発明の病害抵抗性を付与するリボソーム不活性化タンパク質のヌクレオチド配列に基づいて合成されたオリゴヌクレオチドを標識することによって作製され得る。ハイブリダイゼーションのためのプローブの調製およびcDNAライブラリーおよびゲノムライブラリーの構築の方法は、一般に、当該分野で公知であり、そしてSambrookら(1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York、(これは、本明細書中に参考として援用される))において開示される。

【0048】例えば、本明細書中に示された病害抵抗性を付与するリボソーム不活性化タンパク質をコードするヌクレオチド配列全体、またはそれらの1つ以上の部分が、対応する病害抵抗性を付与するリボソーム不活性化タンパク質の遺伝子配列およびメッセンジャーRNAに特異的にハイブリダイズし得るプローブとして使用され得る。種々の条件下で特異的なハイブリダイゼーションを達成するために、このようなプローブは、病害抵抗性を付与するリボソーム不活性化タンパク質をコードする遺伝子配列間で独特であり、そして好ましくは少なくとも約10ヌクレオチド長、最も好ましくは少なくとも約20ヌクレオチド長である配列を包含する。このようなプローブは、選択された生物から対応する病害抵抗性を付与するリボソーム不活性化タンパク質をコードする遺伝子配列をPCRによって増幅するために使用され得る。PCR増幅の方法は、当該分野で周知である(PCRTechnology: Principles and Applications for DNA A

10
20
30
40
50

mplification, HA Erlich編、Freeman Press、New York、NY (1992); PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications、Innis、Gelmand、Snisky、およびWhite編、Academic Press、San Diego、CA (1990); Mattilaら (1991) Nucleic Acids Res. 19: 4967; Eckert、K. A. およびKunkel、T. A. (1991) PCR Methods and Applications 1: 17; PCR、McPherson、Quirkess、およびTaylor、IRL Press、Oxford、これらは、本明細書中で参考として援用する)。この技術は、所望の生物からさらなるコード配列を単離するために使用され得る。ハイブリダイゼーション技術は、プレート化したDNAライブラリーのハイブリダイゼーションスクリーニングを包含する(ブランクまたはコロニーのいずれか; 例えば、Sambrookら (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Plainview、New York)を参照のこと)。

【0049】このような配列のハイブリダイゼーションは、ストリンジェントな条件下で実施され得る。「ストリンジェントな条件」または「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」とは、プローブが、他の配列に対するよりも、検出可能により大きな程度(例えば、バックグラウンドよりも少なくとも2倍)で、その標的配列に対してハイブリダイズする条件を意図する。ストリンジェントな条件は配列依存性であり、そして異なる環境下で異なる。ハイブリダイゼーションおよび/または洗浄条件のストリンジェンシーを制御することにより、プローブに対して100%相補的である標的配列が同定され得る。あるいは、ストリンジェンシー条件は、より低い程度の類似性が検出され得るように、配列中にいくらか mismatches となることが可能になるように調整され得る。一般に、プローブは、約1000ヌクレオチド長未満であり、好ましくは500ヌクレオチド長未満である。

【0050】代表的には、ストリンジェントな条件は、塩濃度が約1.5M Naイオン未満であり、代表的には約0.01~1.0M Naイオン濃度(または他の塩)(pH7.0から8.3)であり、そして温度が、短いプローブ(例えば、10~50ヌクレオチド)については少なくとも約30であり、そして長いプローブ(例えば、50ヌクレオチドより大きい)については少なくとも約60である条件である。ストリンジェントな条件はまた、脱安定剤(例えば、ホルムアミド)の添

加によって達成され得る。例示的な高ストリンジェントな条件としては、50%ホルムアミド、1M NaCl、1% SDS中の37におけるハイブリダイゼーション、そして60~65における0.1x SSC中の洗浄が挙げられる。例示的な中程度のストリンジェントな条件としては、40~45%ホルムアミド、1M NaCl、1% SDS中の37におけるハイブリダイゼーション、そして55~60における0.5x~1x SSC中の洗浄が挙げられる。例示的な低ストリンジェントな条件としては、30~35%ホルムアミド、1M NaCl、1% SDS(ドデシル硫酸ナトリウム)の緩衝溶液を用いた37におけるハイブリダイゼーション、そして50~55における1x~2x SSC(20x SSC=3.0M NaCl/0.3M クエン酸三ナトリウム)中の洗浄が挙げられる。

【0051】特異性は、代表的には、ハイブリダイゼーション後の洗浄の関数であり、決定的な要因は、最終洗浄溶液のイオン強度および温度である。DNA-DNAハイブリッドについては、 T_m は、MeinkothおよびWahl (1984) Anal. Biochem. 138: 267-284の式: $T_m = 81.5 + 16.6(\log M) + 0.41(\%GC) - 0.61(\%form) - 500/L$ から概算され得; ここでMは、1価カチオンのモル濃度であり、%GCは、DNA中のグアノシンヌクレオチドおよびシトシンヌクレオチドのパーセンテージであり、%formは、ハイブリダイゼーション溶液中のホルムアミドのパーセンテージであり、そしてLは、塩基対中のハイブリッドの長さである。 T_m は、相補的な標的配列の50%が完全に一致するプローブにハイブリダイズする温度(規定されたイオン強度およびpH)である。 T_m は、1%の mismatches につき約1 低下する; 従って、 T_m 、ハイブリダイゼーション、および/または洗浄条件は、所望の同一性の配列にハイブリダイズするために調整され得る。例えば、90%以上の同一性を有する配列が求められる場合、 T_m は、10 低下し得る。一般的に、ストリンジェントな条件は、規定されたイオン強度およびpHでの特定の配列およびその相補物に対する熱融点(T_m)よりも約5 低く選択される。しかし、厳しいストリンジェントな条件は、熱融点(T_m)よりも1、2、3、または4 低いハイブリダイゼーションおよび/または洗浄を利用し得; 中程度のストリンジェントな条件は、熱融点(T_m)よりも6、7、8、9、または10 低いハイブリダイゼーションおよび/または洗浄を利用し得; 低いストリンジェントな条件は、熱融点(T_m)よりも11、12、13、14、15、または20 低いハイブリダイゼーションおよび/または洗浄を利用し得る。この式、ハイブリダイゼーションおよび洗浄組成物、ならびに所望される T_m を使用して、当業者は、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーおよび/または洗

浄溶液におけるバリエーションが固有に記載されることを理解する。所望されるミスマッチの程度が45（水溶液）または32（ホルムアミド溶液）よりも低いT_mを生じる場合、より高い温度が使用され得るようにSSC濃度を増加させることが好ましい。核酸のハイブリダイゼーションについての広範なガイドは、Tijssen(1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - Hybridization with Nucleic Acid Probes*、第1部、第2章(Elsevier, New York); およびAusubelら編(1995) *Current Protocols in Molecular Biology*、第2章(Green Publishing and Wiley-Interscience, New York)に見出される。Sambrookら(1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York)を参照のこと(これらは本明細書中に参考として援用される)。

【0052】本発明で使用され得るポリヌクレオチドは、代表的には、本発明のリボソーム不活性化タンパク質のアミノ酸配列(例えば、配列番号2に記載されるイネのリボソーム不活性化タンパク質(RIP1)のアミノ酸配列)の情報またはそれをコードするヌクレオチド配列情報に従って得られるが、それらの既知の配列情報を基に、化学合成によっても得られ得る。例えば、本発明で使用され得るポリヌクレオチドは、Applied BioSystems(現Perkin Elmer社)のポリヌクレオチド合成機を用いて製造業者によって提供される仕様書に従って合成され得る。

【0053】さらに他の実施形態では、本発明で用いられるリボソーム不活性化タンパク質をコードするポリヌクレオチドを取得する1つの方法としては、核酸合成の手法に従ってそのポリヌクレオチドの少なくとも一部を化学合成し、これをプローブとして使用して、適当なcDNAライブラリー、ゲノムライブラリー、BACクローンライブラリー、PACクローンライブラリー、YACクローンライブラリーなどから、慣用されている方法(例えば、免疫学的方法あるいはハイブリダイゼーション法など)により取得する方法を挙げることができる。上記の方法に用いられるいくつかのプラスミド類、様々な制限酵素やT4DNAリガーゼ、その他の酵素類としては市販のものを使用し得る。また、DNAのクローニング、各プラスミドの構築、宿主の形質転換、形質転換体の培養および培養物からのDNA、RNA等の回収は文献記載の方法(*Molecular Cloning*、第2版(Sambrook, 1989 Cold Sp

ring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York)および*Current Protocols in Molecular Biology*(Ausubel, 1987, John Wiley & Sons))に準じて行い得る。

【0054】さらに別の実施形態では、以下の様にして、リボソーム不活性化タンパク質をコードするDNAを取得することができる。まず、本発明のリボソーム不活性化タンパク質(例えば、図1に記載されるイネのリボソーム不活性化タンパク質)中の2種類のアミノ酸部分配列を選択し、これらのアミノ酸配列のC末端をコードすると考えられるあらゆる塩基の組み合わせのプライマーと上記アミノ酸配列のN末端側をコードすると考えられるあらゆる塩基の組み合わせのプライマーとを作製し、これらをミックスプライマーとして用い、適当なライブラリーおよびRNAを鋳型としてPCR反応(Saiki, 1988, *Science* 239, 487)(例えば、RT-PCR反応(Berchtold, 1989, *Nucl. Acid Res.* 17, 453))を行う。その後、PCR反応生成物の中から、増幅が予想される特定の長さの増幅フラグメントを取り出し、これらの塩基配列を決定する。得られた増幅フラグメントをプローブとしてハイブリダイズさせることにより、上記のライブラリーからリボソーム不活性化タンパク質をコードするポリヌクレオチドを獲得する。

【0055】得られたポリヌクレオチドの塩基配列は、当該分野で公知のヌクレオチド配列解析法マキシム-ギルバート法(Maxam-Gilbert, 1980, *Methods Enzymol.* 65, 499)やジデオキシ法(Messing 1982, *Gene* 19, 269)、または市販されている自動シーケンサーにより決定し得る。

【0056】また、得られたポリヌクレオチドを適切な発現ベクターに挿入すること、そして適切な宿主においてポリペプチドを発現させることによって、コードされるタンパク質を容易に組換え的に発現させ得る。当業者に公知の任意の種々の発現ベクターを用いて、組換えタンパク質を発現させ得る。組換えタンパク質の発現は、取得されたポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換またはトランスフェクトされた任意の適切な宿主細胞において達成され得る。適切な宿主細胞としては、原核生物細胞(例えば、大腸菌)、下等真核生物細胞(例えば、酵母細胞)および高等真核生物細胞などが挙げられる。用いられる宿主細胞としては、植物細胞、E. coli細胞、酵母細胞、哺乳動物の細胞株(例えば、COS細胞またはCHO細胞)、昆虫細胞などが挙げられるが、これらに限定されない。この様式で発現されるポリペプチドは、天然に存在するポリペプチド、天然に存在するポリペプチドの一部、またはそれらの他の改変

体をコードし得る。組換えポリペプチドを分泌する適切な宿主/ベクター系由来の上清は、まず、市販のフィルターを用いて濃縮され得る。次いで、この濃縮物は、タンパク質の性質に応じて、塩析や有機溶媒による沈殿、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、免疫吸着体によるカラムクロマトグラフィー、ゲル濾過、SDS-PAGE、等電点電気泳動などを適宜組み合わせることで行うことが可能である。また、本発明の組換えタンパク質をヒスチジンタグやグルタチオンS-トランスフェラーゼなどの標識との融合タンパク質として発現させた場合には、該標識に対するアフィニティクロマトグラフィーなどにより精製することも可能である。最後に、1回以上の逆相HPLCの工程が用いられ、組換えポリペプチドは、さらに精製され得る。

【0057】上記のように取得されたポリヌクレオチドが、N-グリコシダーゼ活性を有するタンパク質をコードするか否かを、当業者は容易に確認し得る。N-グリコシダーゼ活性は、例えば、Taylor, 1994, Plant J. 5, 827 または Endo, Y.ら、Biochim. Biophys. Acta. 954: 224-226 (1988)に記載の方法を用いて容易に測定され得る。詳細には、取得されたポリヌクレオチドがコードするタンパク質を、上記のように組換え生成することにより獲得し、この組換え生成タンパク質を病原性生物のrRNAと反応させ、電気泳動によってrRNAの分解を確認し得る。

【0058】また、上記のように取得されたポリヌクレオチドが、抗菌活性を有するタンパク質をコードするか否かを、当業者は容易に確認し得る。例えば、タンパク質の抗菌活性を測定する方法としては、阻止円法(佐藤昭二ら、植物病理学実験法、第219-223頁、講談社を参照のこと)が挙げられる。詳細には、取得されたポリヌクレオチドがコードするタンパク質を、上記のように組換え生成することにより獲得し、病原菌胞子などを混合した寒天培地上に、この組換え生成タンパク質を染み込ませた濾紙ディスクを載せて、所定時間培養する。組換え生成タンパク質が、使用された病原菌に対して抗菌性を有している場合、この濾紙の周りに生育阻止円が形成される。さらに、タンパク質濃度に応じて阻止円の大きさを測定することによって、抗菌性の強さを測定し得る。

【0059】本発明のリボソーム不活性化タンパク質をコードするポリヌクレオチドの代表的形態は、プラスミドまたはファージDNAなどの中に構成員の一部としてこのポリヌクレオチドが挿入された形態、並びに、ゲノムDNAの中にこのポリヌクレオチドが挿入された形で微生物またはファージ粒子あるいは植物の中に存在する形態である。本明細書中で使用される微生物の一例として、大腸菌やアグロバクテリウムを挙げることができるが、これらに限定されない。

【0060】本発明のリボソーム不活性化タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、3'-末端側に接して少なくとも1個の停止コドン(例えばTAG)を有することが望ましい。

【0061】さらに本発明のリボソーム不活性化タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、所望により5'-側上流に翻訳フレームと合わせて翻訳開始のメチオニンをコードするATG配列、その5'-側上流および3'-側下流に非翻訳領域として適当な長さの他のポリヌクレオチドが結合しても良い。

【0062】組換えタンパク質を発現させるためのベクターとしては、例えば、植物、酵母細胞に関しては、プラスミドpBI121, pBI101(Clontech)、大腸菌等の細菌細胞に関しては、プラスミドpET Expression system(Stratagene)、pPZP202(Hajdukiewicz, 1994, Plant Mol. Biol. 25, 989)、哺乳動物細胞に関しては、プラスミドpMAM(Clontech)、昆虫細胞に関しては、プラスミドpBacPAK8.9(Clontech)等が挙げられるが、これらに限定されない。

【0063】本発明における使用に有用な発現ベクターとしては、例えば、プラスミドpBI121, pBI221, pBI101(Clontech)、pPZP202(Hajdukiewicz, 1994, Plant Mol. Biol. 25, 989)などが挙げられる。リボソーム不活性化タンパク質をコードするポリヌクレオチドが植物中で安定に発現し得るように、このポリヌクレオチドに、種々のプロモーター、エンハンサー、翻訳開始コドンをコードするDNA(ATG)またはターミネーターを、適宜組み合わせることで付加することが好ましい。

【0064】上記のプロモーターとしては、本発明のタンパク質を恒常的あるいは誘導的に発現させるためのプロモーターが挙げられる。

【0065】恒常的に発現させるためのプロモーターとしては、例えば、ノパリン合成酵素遺伝子のプロモーター(Langridge, 1985, Plant Cell Rep. 4, 355)、カリフラワーモザイクウイルス19S-RNAを生じるプロモーター(Guilliey, 1982, Cell 30, 763)、カリフラワーモザイクウイルス35S-RNAを生じるプロモーター(Odell, 1985, nature 313, 810)、イネのアクチンプロモーター(Zhang, 1991, Plant Cell 3, 1155)、トウモロコシユビキチンプロモーター(Cornejo 1993, Plant mol. Biol. 23, 567)、CaMV35S改良型REXプロモーター(Mitsuhashi, 1996, Plant Cell Physiol. 37, 49)などを用い得る。特に好

ましい実施形態では、CaMV35S改良型REXプロモーターを使用し得る。

【0066】誘導的に発現させるためのプロモーターとしては、例えば、病原性生物の感染や侵入、光、傷害、低温、高温、乾燥、紫外線の照射、特定の化合物の散布などの外因によって発現を誘導することが知られているプロモーターなどが挙げられる。この様なプロモーターの例としては、例えば、光照射によって発現を誘導するリブ羅斯 - 1, 5 - 2リン酸カルボキシラーゼ小サブユニットをコードする遺伝子のプロモーター (Fluhr, 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 2358)、糸状菌・細菌・ウイルスなどの病原性生物の感染や侵入によって発現を誘導するイネキチナーゼ遺伝子のプロモーター (Xu, 1996, Plant Mol. Biol. 30, 387) およびタバコのPRタンパク質をコードする遺伝子のプロモーター (Ohshima, 1990, Plant Cell 2, 95)、低温によって発現を誘導するイネのlip19遺伝子のプロモーター (Aguan, 1993, Mol. Gen. Genet. 240, 1)、高温によって発現を誘導するイネのhsp72, hsp80遺伝子のプロモーター (Van Breusegem, 1994, Planta 193, 57)、乾燥によって発現を誘導するシロイヌナズナのrab16遺伝子のプロモーター (Nundy, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 1406)、紫外線の照射によって発現を誘導するトウモロコシのアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子のプロモーター (Schulze-Lefert, 1989, EMBO J. 8, 651) などが挙げられる。また、上記のイネキチナーゼ遺伝子のプロモーターおよびタバコのPRタンパク質遺伝子のプロモーターは、サリチル酸またはジャスモン酸などの特定の化合物によって、rab16遺伝子のプロモーターは植物ホルモンのアブシジン酸の散布によっても誘導されることが公知である。

【0067】本発明で使用され得るターミネーターとしては、ノバリン合成酵素遺伝子のターミネーター (Depicker, 1982, J. Mol. Appl. Gen. 1, 561)、オクトピン合成酵素遺伝子のターミネーター (Gielen, 1984, EMBO J. 3, 835) などをを用い得る。

【0068】用語「植物」とは、他に特に示さない限り、完全な植物体のみではなく、その植物体を構成する植物細胞、組織、および器官をも含み得る。本明細書中に出てくる植物の構成要素を示す用語 (例えば、根、茎、葉、塊茎、花粉、種子胚、種子、プロトプラスト、カルス、および芽条原基など) は、当業者が通常理解し得る通りの構成物を表す。

【0069】植物細胞および植物体への遺伝子導入法としては、通常公知の方法、例えば「Plant gen

etic transformation and gene expression; a laboratory manual, Draper, Blackwell Scientific Publications, 19」記載の方法を用いて行うことができる。その例としては、生物的方法 (例えば、ウイルスを用いる方法またはアグロバクテリウム (Agrobacterium) を用いる方法 (Hood, 1993, Transgenic Res. 2, 218, Toki S, Plant Mol. Biol. Reporter 15, 16.) など)、物理・化学的方法 (例えば、エレクトロポレーション法 (Tada, 1990, Theor. Appl. Genet. 80, 475)、ポリエチレングリコール法 (Lazzeri, 1991, Theor. Appl. Genet. 81, 437)、パーティクル・ガン法 (sanford, 1987, J. Part. Sci. Tech. 5, 27) など) などが挙げられる。

【0070】ポリヌクレオチド導入に使用するための植物材料としては、導入法などに応じて、葉、茎、根、塊茎、プロトプラスト、カルス、花粉、種子胚、苗条原基などから適当なものを選択し得る。植物細胞としては特に制限はないが、植物体への再分化の系が確立されている、例えば、イネ、トウモロコシ、ジャガイモ、タバコなどの植物細胞が特に好ましい。適当な導入法および植物材料を選択することは、当業者によって容易になされ得る。

【0071】植物培養細胞へポリヌクレオチドを導入する場合、材料として代表的にはプロトプラストを用いて、エレクトロポレーション法、ポリエチレングリコール法などの物理・化学的方法によってポリヌクレオチドの導入が行われる。植物組織へポリヌクレオチドを導入する場合、材料としては葉、茎、根、塊茎、カルス、花粉、種子胚、苗条原基など (好ましくは葉、茎、カルス) を用いて、ウイルスもしくはアグロバクテリウムを用いた生物学的方法またはパーティクルガン法などの物理・化学的方法、好ましくはアグロバクテリウムを用いた生物学的方法によって、ポリヌクレオチドの導入が行われる。

【0072】上記方法により、リボソーム不活性化タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列が導入された植物組織または植物細胞から完全な植物を再分化させるには、このような形質転換植物組織または形質転換植物細胞を、再分化培地またはホルモンフリーのMS培地などにおいて培養すればよい。発根した幼植物体は、土壌に移植して栽培することにより植物体とすることができる。再分化の方法は、使用される植物組織または植物細胞の種類により異なり、適切な再分化方法の選択は、当業者によって容易になされ得る。様々な文献において、各種の植物 (例えば、イネ (Fujimura, 199

5, Plant Tissue Culture Lett. 2, 74)、トウモロコシ(Shillito, 1989, Bio/Technol. 7, 581, Gordon-Kamm, 1990, Plant Cell 2, 603)、ジャガイモ(Visser, 1989, Theor. Appl. Genet. 78, 594)、タバコ(Nagata, 1971, Planta 99, 12)などの再分化の方法が記載されている。

【0073】本発明の方法によって作出された遺伝子組換え植物が、病原性生物に対する抵抗性を有しているか否かは、例えば、Methods for Isolation, Cultivation, Inoculation of Plant Pathogens, Japan Plant Protection Associationに記載されている試験方法により容易に確認し得る。例えば、イネいもち病の場合は、実施例8-1に実質的に記載のように、特定のイネ品種にその品種に罹病性のイネいもち病菌のレースを接種した場合の病斑形成や病斑面積率の程度を、原品種と組換え体とを比較することによって検定することが可能であるが、これに限定されることはない。例えば、イネいもち病の抵抗性検定については、今回の実験で使用した噴霧接種法の他に、イネの葉に接種用パンチで穴を開け、その上にいもち病菌胞子のペーストをのせて感染させるパンチ接種法、針の先にいもち病菌胞子ペーストを付けて葉を突き刺す針接種法が挙げられる。これらの接種法では、病斑は葉の傷口から広がるように発病するので、病斑の伸展長を測定することによって、抵抗性強度の検定を行い得る(例えば、K. Ohataら、Methods for Isolation, Cultivation, Inoculation of Plant Pathogens、第37-41頁、Japan Plant Protection Association(1995)を参照のこと)。また例えば、白葉枯病の場合は、実施例8-2に実質的に記載のような、白葉枯病細菌懸濁液中に抵抗性を検定する植物の組織(例えば、成葉)を浸漬し、病斑の進行距離を測定する方法、または噴霧接種法、針接種法が挙げられる。いずれの方法においても、葉全体の病斑面積率を測定することによって、発病程度を評価する(例えば、K. Ohataら、Methods for Isolation, Cultivation, Inoculation of Plant Pathogens、第37-41頁、Japan Plant Protection Association(1995)を参照のこと)。

【0074】上記のような方法でリボソーム不活性化タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を導入し、発現させることにより、病原性生物に対する抵抗性を付与または増強することができる「植物」としては、病原

性生物に感染するあらゆる植物を挙げることができる。特定の実施形態では、本発明の方法に従って形質転換される植物は、単子葉植物または双子葉植物である。より詳細には、本発明の方法に従って形質転換される植物の例としては、例えば、イネ、トウモロコシ、コムギ、オオムギ、ライムギ、パンコムギ、ジャガイモ、タバコ、ナス、トマトなどが挙げられるが、これらに限定されない。

【0075】本発明の方法に従って得られる植物、またはその植物器官もしくは植物組織が抵抗性を示す「病原性生物」としては、植物に感染可能なあらゆる病原性生物、例えば、真菌類(糸状菌を含む)、細菌、ウイルスなどを挙げることができるが、これらに限定されることはない。

【0076】真菌類としては、イネいもち病菌、イネ紋枯病菌、イネ苗腐病菌、イネ苗立枯病菌、イネばか苗病菌、イネ黄化萎縮病菌、イネごま葉枯病菌、ムギ類さび病類菌、ムギ類うどんこ病菌、ジャガイモ疫病菌、タバコ疫病菌、タバコ灰色かび病菌、タバコ舞病菌、シバ類さび病類菌、立枯病類菌、雪腐病類菌、野菜類の疫病菌、べと病菌、うどんこ病菌、灰色かび病菌、炭そ病菌、苗立枯病菌、根こぶ病菌、カーネーション萎ちょう病菌、キク白さび病菌、ウリ類べと病菌、オオムギ黒穂病菌、ナシ赤星病菌などが挙げられるが、これらに限定されない。

【0077】病原性細菌としては、イネ白葉枯病細菌、イネ苗立枯細菌病細菌、イネもみ枯細菌病細菌、イネゴマ葉枯病細菌、タバコ空洞病細菌、タバコ野火病細菌、各種野菜類の軟腐病細菌、斑点細菌病細菌、青枯病細菌、インゲンマメかさ枯病細菌、核果類かいよう病細菌、クワ縮葉細菌病細菌、アブラナ科植物黒腐病細菌、カンキツかいよう病細菌、トマトかいよう病細菌、ジャガイモ輪腐病細菌、ジャガイモそうか病細菌が挙げられるが、これらに限定されない。

【0078】病原性ウイルスに起因する病害としては、イネ萎縮病ウイルス、イネ縞葉枯病ウイルス、ムギ斑葉モザイクウイルス病ウイルス、タバコモザイク病ウイルス、タバコ輪点ウイルス病ウイルス、タバコ条斑ウイルス病ウイルス、カリフラワーモザイクウイルス病ウイルス、ジャガイモモザイク病ウイルス、ジャガイモ葉巻病ウイルス、ジャガイモXウイルス病ウイルス、ジャガイモYウイルス病ウイルス、キュウリモザイク病ウイルス、キュウリ緑斑モザイク病ウイルス、トマト黄化えそ病ウイルス、ダイズ矮化病ウイルス、エンドウ茎えそ病ウイルス、ビート萎縮病ウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。

【0079】本発明の方法に従って得られる植物が示す「少なくとも2つの病原性生物に対する複合病害抵抗性」とは、真菌類、細菌、ウイルスなどの分類群から選択される少なくとも2つの異なる分類に属する少なくと

も2つの病原性生物に対する抵抗性を意味する。例えば、少なくとも2つの病原性生物に対する抵抗性としては、病原性真菌類と病原性細菌との組み合わせに対する抵抗性、病原性細菌と病原性ウイルスとの組み合わせに対する抵抗性、真菌類と病原性ウイルスとの組み合わせに対する抵抗性などが挙げられる。

【0080】本発明により、植物に導入されたリボソーム不活性化タンパク質をコードするヌクレオチド配列は、植物体から植物体へ種子を媒介として後代へと遺伝され得る。このため、本発明の植物体の花粉あるいは子房から形成される種子においても導入したヌクレオチド配列が存在し、遺伝形質が子孫へと受け継がれ得る。従って、本発明のリボソーム不活性化タンパク質をコードするヌクレオチド配列が導入された植物は、例えば、種子による増殖によって、病原性生物に対する抵抗性が失われることなく、増殖が可能である。また、植物組織細胞を用いた大量培養法や従来から行われている挿木、接木、株分けなどによっても、病害抵抗性が失われることなく、増殖が可能である。このような増殖によって得られた後代または子孫もまた、本発明によって包含される。

【0081】本発明の方法に従って作出された病害抵抗性を有する植物は、各種病原性生物に対する抵抗性を有するために生産性の向上、収量の安定化、品質の向上、農薬使用量の低減化とそれによる生産コストと労働時間の低減化や環境に対する負荷の軽減に効果があると期待される。また、病害抵抗性の性質から、有機栽培農法や農薬使用が困難な発展途上国においても高い収量が確保できると考えられる。また、本発明のリボソーム不活性化タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、病原性生物に対する抵抗性の機能解明、病害抵抗性を誘導するエリシターの誘導体の開発、およびリボソーム不活性化タンパク質に対する抗体を調製するための抗原を作製するために有用である。

【0082】以下、実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例によって限定されるものではない。

【0083】

【実施例】(実施例1. cDNAライブラリーの作製) 本発明のRIP cDNAを単離するためにcDNAライブラリーの作製を試みた。イネ「日本晴」のカルスをエリシター処理したcDNAライブラリーは、農業生物資源研究所より供与された(Minami, 1996, Plant Cell Physiol. 37, 563)。ライ麦、エンバク由来のcDNAライブラリーは、サリチル酸処理を行った葉から単離したmRNAから作製した。

【0084】ライ麦「初春」、エンバク「太豊」種子を育苗箱に播種し、温室内で発芽させた。第3葉まで生育したときに、第3葉を切り取り、0.5mMサリチル酸

の入ったバットにリーフディスクにして浮かべた。3日後、サリチル酸で誘導した葉12枚(1.2g)からRNeasy Plant Mini Kit (Millipore)を用いて、200 μ gの総RNAを調製した。この総RNAからOligotex-dT30<Super>mRNA Purification kit (TAKARA)を用いて17 μ gのmRNAを精製した。このうち10 μ gをcDNAライブラリーの作製に用いた。キットはZAP cDNA Synthesis Kit (Stratagene)を用いた。cDNA合成後、800bp以上のフラグメントを回収し、リンカーを結合させ、Gigapack III Gold (Stratagene)にパッケージを行い、大腸菌XL1 Blue MRF'で増幅させた。作製したライブラリーには、ライ麦、エンバクそれぞれ 1.2×10^5 pfu/ml、 1.1×10^5 pfu/mlのファージが含まれていた。

【0085】(実施例2. イネRIP cDNAに対するプローブの作製とPCR) 既知のRIP遺伝子の塩基配列および翻訳されるアミノ酸配列を独自に解析したところ、RIP遺伝子には塩基配列が保存されている領域が存在することが明らかになった。その共通配列を元にして10個のプライマーを作製した。今回の研究に用いたプライマーはすべてOligoExpress (Amersham Pharmacia)を用いた。

【0086】これらのプライマーを用いて、イネ「日本晴」のカルスをエリシター処理したcDNAライブラリーからPCR反応を行った。0.5 μ lのcDNAライブラリー中の全DNAを31 μ lの蒸留水に溶解し、5 μ lの10 \times PCRバッファー(ロシュ)、8 μ lの2.5mM dNTP、5 μ lの50pmol/ μ l各種プライマー、0.5 μ lのTaqDNAポリメラーゼ(ExpandTM High Fidelity PCR System; ロシュ)を加え、最終量50 μ lとし、以下のようにPCR反応を行った。反応装置はTaKaRa PCR Thermal Cycler 480(宝酒造)を用いた。反応は、1)変性95 $^{\circ}$; 1分、2)再生44 $^{\circ}$; 1分、3)伸長72 $^{\circ}$; 1分の操作を30サイクル繰り返して行った。このPCR反応を2回行い、反応液15 μ lを1.2% TAEアガロースゲルで電気泳動を行った。電気泳動後のゲルを0.5 μ g/mlの臭化エチジウム溶液で10分間染色し、紫外線下で観察して、増幅したフラグメントを全て回収した。回収したフラグメントの塩基配列をDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit(パーキンエルマー・ジャパン)と蛍光自動DNAシーケンサー373A(パーキンエルマー・ジャパン)を用いて決定した。

【0087】この様にして数十のDNA増幅フラグメントの塩基配列を決定した結果、以下のプライマーを用い

てPCRを行ったときに増幅される300bpのDNAフラグメントが、RIPと相同性を持っていることが判明した。

【0088】5'プライマー 5'-GACAACMTSTACYKSGWGGGCTTCA-3'

3'プライマー 5'-CSVGACACSGTSTKGAACCGC-3' (M:A/C, S:C/G, Y:C/T, K:G/T, W:A/T, V:A/C/G)

(実施例3. イネRIP cDNAのクローニング) エリクター処理を行ったイネカルス由来のcDNAライブラリーから、RIP cDNAのスクリーニングを行った。スクリーニングの際の基本的実験操作は、実験書Molecular Cloning第2版(Sambrook, 1989 Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York)およびCurrent Protocols in Molecular Biology (Ausubel, 1987, John Wiley & Sons)に準じて行った。角型シャーレに大腸菌XL1 Blue MRF'で溶菌させた約 2×10^4 個のファージブランクを培養し、ナイロンメンブレン(Hybond-N+, Amersham pharmacia biotech社)にファージを転写した。ファージが転写されたナイロンメンブレンを80℃で2時間ベーキングしてDNAを固定した後、実施例2の方法に基づいて増幅させたDNAフラグメントをプローブとして用いてブランクハイブリダイゼーションを行った(Southern, 1975, J. Mol. Biol. 98, 503)。ブランクハイブリダイゼーションの検出には、AlkPhos Direct (Amersham pharmacia biotech)を用いた。得られたシグナルに対応するブランクをSM溶液に懸濁し、さらに2次スクリーニングを行い、単独の陽性クローンを単離した。このクローンのインサート領域の塩基配列を決定すると、PCR増幅フラグメントの配列を含む既知のRIP遺伝子と類似した塩基配列を持つことが判明した(図1)。このcDNAをRIP1 cDNAと名付けた。さらにRIP1 cDNAをプローブとして用いて、エリクター処理を行ったイネカルス由来のcDNAライブラリーからRIP cDNAのスクリーニングを行った結果、RIP1とは異なる配列を持ったcDNAが単離された(図2)。このcDNAをRIP2 cDNAと名付けた。

【0089】(実施例4)

(実施例4-1. ライムギ、エンバクRIP cDNAのクローニング) 実施例1で作製したライムギ、エンバク由来のcDNAライブラリーからRIP cDNAのスクリーニングを行った。角型シャーレに大腸菌XL1 Blue MRF'で溶菌させた約 2×10^4 個のファージブランクを培養し、ナイロンメンブレン(Hybond-N+, Amersham pharmacia biotech社)にファージを転写した。ファージが転写されたナイロンメンブレンを80℃で2時間ベーキングしてDNAを固定した後、イネRIP1 cDNAをプローブとして用いてブランクハイブリダイゼーションを行った(Southern, 1975, J. Mol. Biol. 98, 503)。ブランクハイブリダイゼーションの検出にはAlkPhos Direct (Amersham pharmacia biotech)を用いた。得られたシグナルに対応するブランクをSM溶液に懸濁し、さらに2次スクリーニングを行い、それぞれ単独の陽性クローンを単離した。これらのクローンのインサート領域の塩基配列を決定すると、イネ科RIPに相同性のある配列を有していた。ライムギ由来のRIP cDNAの塩基配列を図3に、エンバク由来のRIP cDNAの塩基配列を図4に示す。

【0090】(実施例4-2. リボソーム不活性化タンパク質の塩基配列および推定アミノ酸配列における相同性決定) 実施例3および4-1において得られたイネRIP1、RIP2、ライムギRIPおよびエンバクRIPのcDNA、ならびに既知のリボソーム不活性化タンパク質をコードする塩基配列(オオムギRIP: Leah, R.ら, J. Biol. Chem. 266, 1564-1573 (1991); コムギRIP: Habuka, N.ら, Plant Mol. Biol. 22(1): 171-176 (1993); トウモロコシRIP1: Walsh, T.A.ら, J. Biol. Chem. 266, 23422-23427 (1991); およびトウモロコシRIP2: Bass, H.W.ら, Plant Physiol. 107(2): 661-662 (1995))を用いて、GENETYXソフトウェア(ソフトウェア開発株式会社、東京)を使用することにより、塩基配列間および推定アミノ酸配列間の相同性を決定した。塩基配列間および推定アミノ酸配列間の相同性決定の結果を、それぞれ以下の表1および2に示す。

【0091】

【表1】

表1. リボソーム不活性化タンパク質をコードする塩基配列の相同性

	rice RIP1	rice RIP2	Rye	Oat	Barley	Wheat	Maize RIP1	Maize RIP2
rice RIP1		62.3%	62.37%	65.58%	63.54%	62.54%	32.27%	31.05%
rice RIP2			54.17%	54.30%	54.88%	54.11%	31.31%	32.03%
Rye				65.25%	87.90%	91.10%	30.41%	28.86%
Oat					63.48%	62.31%	29.45%	31.68%
Barley						87.19%	30.00%	28.52%
Wheat							28.39%	29.05%
Maize RIP1								88.21%
Maize RIP2								

Program genetyx maximum matching

【0092】

【表2】

表2. リボソーム不活性化タンパク質の推定アミノ酸配列の相同性

	rice RIP1	rice RIP2	Rye	Oat	Barley	Wheat	Maize RIP1	Maize RIP2
rice RIP1		74.66%	72.08%	74.04%	70.61%	82.16%	—	—
rice RIP2			70.13%	68.84%	67.86%	68.72%	—	—
Rye				77.54%	87.67%	93.38%	—	—
Oat					74.2%	76.28%	—	—
Barley						88.36%	—	—
Wheat							—	—
Maize RIP1								%
Maize RIP2								

Program genetyx maximum matching

— : no matching (相同性が低すぎて数値化できない)

(実施例5. RIP遺伝子を発現させる発現ベクターの構築) 実施例1~4の方法でイネから2種類(RIP1, RIP2)、ライムギ、エンバクからそれぞれ1種類(ライムギRIP、エンバクRIP)のRIP cDNAを単離した。これらのRIP cDNAをイネ「ど

んとこい」に遺伝子導入し、イネの中でRIPを発現させるため、発現ベクターを構築した。形質転換用バイナリーベクターは、pPZP202 (Hajdukiewicz, 1994, Plant Mol. Biol. 25, 989)を用いた。発現ベクター作製の際の基本的

実験操作は、実験書Molecular Cloning第2版(Sambrook, 1989 Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York)およびCurrent Protocols in Molecular Biology(Ausubel, 1987, John Wiley & Sons)に準じて行った。形質転換の際に用いたプラスミドは、pBluescriptSK+(Stratagene)を、大腸菌はDH5(東洋紡)を用いた。

【0093】pPZP202をHindII-BamHI(宝酒造)で処理し、Ligation high(東洋紡)を用いてCaMV35S改良型REXプロモーター(Mitsuhara, 1996, Plant Cell Physiol. 37, 49)または松由来のPSIIのクロロフィルa/b結合タンパク質(cab)をコードする遺伝子のプロモーター(cab1プロモーター)(Yamamoto, 1994, Plant Cell Physiol. 35, 773)をライゲーションした。SacI-EcoRI(宝酒造)で処理し、Ligation high(東洋紡)を用いて、NOSターミネーター(Depicker, 1982, J. Mol. Appl. Gen. 1, 561)をライゲーションした。BamHI-KpnI(宝酒造)で処理し、Ligation high(東洋紡)を用いて、それぞれのRIPのcDNAをセンスに組み込んだ。最後にHindII-BamHI(宝酒造)で処理し、Ligation high(東洋紡)を用いて、ハイグロマイシン耐性遺伝子(HPT: hygromycin B phosphotransferase, Gritz, 1983, gene 25, 179)にCaMV35Sプロモーター(Odel, 1985, Nature 313, 810)とNOSターミネーターを連結させた遺伝子を選抜マーカーとして導入した。以上の方法でRIPが高発現する発現ベクターを構築した(図5)。

【0094】(実施例6. RIP遺伝子導入イネ系統の作出)イネ、ライムギ、エンバクのリボソーム不活性化タンパク質(RIP)を高発現させる形質転換植物の作出は、アグロバクテリウムによる方法を用いた(Tokis, Plant Mol. Biol. Reporter 15, 16. Hiei, 1994, Plant J. 6, 271)。アグロバクテリウムの系統は、EHA101(Hood, 1986, J. Bacteriol. 168, 1291)を用いた。

【0095】実施例5で構築した発現ベクターを、エレクトロポレーション法でアグロバクテリウムEHA101に形質転換した。エレクトロポレーション装置はGENE PULSER(登録商標)II(BIO-RAD)を用い、導入条件を200、25μF、2.5

kV、0.2cmキュベットに設定した。エレクトロポレーションを行ったアグロバクテリウムをSOC培地に懸濁し、28℃で2時間振盪培養した。この培養液を20mg/lカナマイシン、100mg/lスペクチノマイシンを含むLBプレート培地(10g/lトリプトン、5g/l酵母エキス、10g/l塩化ナトリウム、水酸化ナトリウムでpH5.8に調整)上に拡散し、増殖した形質転換個体を選抜した。

【0096】遺伝子導入したアグロバクテリウムを水稻品種「どんとこい」種子、または胚盤由来カルス(4週間)に感染させた。「どんとこい」種子から穎を除いて玄米とし、これを70%エタノールで1分間殺菌し、滅菌蒸留水で2回洗浄した。さらに、2.5%次亜塩素酸ナトリウム溶液で40分間殺菌し、滅菌蒸留水で2回洗浄した。この玄米を、カルス誘導培地(30g/lシクロロース、0.3g/lカザミノ酸、2.8g/lプロリン、2mg/l2,4-Dを添加し、pH5.8に調整し、4g/lのゲルライトで固化させたN6培地(Chu, 1974, Sci. Sinica 18, 659))上に置床した。玄米を28℃明所で生育させてカルスを得た。このカルスをアグロバクテリウム感染に用いた。さらにカルス誘導培地に3日間置床した「どんとこい」種子もアグロバクテリウム感染に用いた。

【0097】20mg/lカナマイシン、100mg/lスペクチノマイシンを含むLBプレート培地上に28℃で培養したアグロバクテリウム0.5cm四方をマイクロスパテルでかき取り、10mg/lアセトシリゴンを含むAAM培地(Toriyama, 1985, Plant Sci. 41, 179)に懸濁した。この懸濁液をカルスに注ぎ、2分間浸漬させた。このカルスを水切りした後、10mg/lアセトシリゴンを含むカルス誘導培地上で、28℃で3日間培養した。感染後のカルスを滅菌蒸留水で5回洗浄し、余分なアグロバクテリウムを除去した。

【0098】アグロバクテリウムを除去したカルスを、選抜培地(50mg/lハイグロマイシン、300mg/lカルベニシリンを含むカルス誘導培地)に28℃で2週間培養し、再び同じ培地に移し替え、さらに2週間培養した。その結果、遺伝子組換えされたカルスがハイグロマイシン耐性になり、選抜培地上で増殖した。

【0099】増殖したカルスを50mg/lハイグロマイシン、200mg/lカルベニシリンを含む再分化培地(30g/lシクロロース、30g/lソルビトール、2g/lカザミノ酸、20μg/lNAA、2.2mg/lカイネチンを添加し、pH5.8に調整し、4g/lのゲルライトで固化させたMS培地(Murashige, 1962, Physiol. Plant 15, 473))上に移植した。再分化培地では28℃で2週間の培養を2回行い、再分化個体を選

抜した。

【0100】再分化したイネを鉢上げし、50~100系統の再分化個体(T₀)を隔離温室内で生育させた。これを図6に示す。AおよびBともに、左側が原品種「どんとこい」(WT)であり、右側がリボソーム不活性化タンパク質遺伝子導入系統(それぞれ、RIP26およびRIP52)の生育個体である。生育したRIP遺伝子組換え系統では一部に不稔、矮性化などが生じた。これらの個体は消却し、外見上は原品種とほとんど変わらない個体を耐病性検定に用いた。これらの組換え系統からT₁種子を採種した。なお、これ本実施例以降、代表としてイネRIP1遺伝子組換え系統について例示するが、イネRIP2、ライムギRIP、エンバクRIPでも同等の結果が観察された。

【0101】(実施例7. T₁世代の非組換え個体の除去) 遺伝の法則からT₁種子には組換え個体と非組換え個体が、3:1の割合で混合していることが示唆された。このうち、組換え個体はハイグロマイシンに対して抵抗性を有することが推測された。そこで採種したT₁種子と原品種の「どんとこい」種子を50mg/l ハイグロマイシンを含み、4g/l のゲルライトで固化させたMS培地(Murashige, 1962, *Physiol. Plant* 15, 473)上で発芽させ、28で1週間培養した。培養後のT₁種子および原品種「どんとこい」種子を図7に示す(A:原品種「どんとこい」(WT)、BおよびC:組換え系統(それぞれ、RIP26およびRIP52))。実験に使用したハイグロマイシン濃度において、原品種「どんとこい」種子はすべて、ハイグロマイシンの影響を受けて、発芽後黒変し枯死した(図7A)。T₁種子は正常に生育した個体と枯死した個体に分離した。その比率は約3:1であった(図7BおよびC)。

【0102】以上の結果から、この選抜方法によってT₁世代の非組換え個体を除去できたと考えられる。また後に行ったゲノミックサザン法による分析の結果、正常に生育したT₁個体にはイネ、ライムギ、エンバク由来のRIP遺伝子が導入されていることが確認できた。正常に生育したT₁世代系統をシードリングケースに鉢上げし、4.5葉期になるまで生育させた。

【0103】(実施例8)
(実施例8-1. いもち病菌の接種と耐病性検定) いもち病菌の接種は噴霧接種法を用いた(Yaegashi, 1995, *Methods for Isolation, Cultivation, Inoculation*

on of Plant Pathogens, Japan Plant Protection Association, 37)。

【0104】いもち病菌(*Pyricularia oryzae* Cav.: レース007)を粉末オートミール培地に移植し、26で培養した。菌叢がシャーレ全面を覆った段階で殺菌水を加え、絵筆で培地表面をこすり、気中菌糸を取り除いた。その後シャーレの蓋を外し、近紫外光を照射して孢子形成を行った(Furuta, 1967, *Plant Protection* 21, 160)。

【0105】4.5葉期まで生育した原品種個体と組換え体(T₁)の幼苗に、いもち病菌孢子の懸濁液(孢子数5×10⁸/ml)を噴霧し、接種箱内で26で24時間接種した。接種後の原品種および組換え系統を隔離温室に移動し、病斑を観察した。この噴霧接種検定の結果を、図8(イネRIP1)、14(イネRIP2)、18(ライムギRIP)、および22(エンバクRIP)に示す。図8の写真中、AおよびBともに、左側の植物群が圃場抵抗性強の品種(トドロキワセ)、中央の植物群が圃場抵抗性中の品種(どんとこい)(WT)、右側の植物群がイネRIP1遺伝子組換え系統(それぞれ、RIP26およびRIP52)(いずれも接種3週間後)を示す。図14の写真中、14Aが圃場抵抗性強の品種(トドロキワセ)、14Bが圃場抵抗性中の品種(どんとこい)(WT)、14CがイネRIP2遺伝子組換え系統(いずれも接種3週間後)を示す。図14BおよびCは、それぞれWTおよびRIP2遺伝子組換え系統の拡大写真である。図18の写真中、AおよびBともに、左側の植物群が圃場抵抗性強の品種(トドロキワセ)、中央の植物群が圃場抵抗性中の品種(どんとこい)(WT)、右側の植物群がライムギRIP遺伝子組換え系統(それぞれ、RRIP7およびRRIP26)(いずれも接種3週間後)を示す。図22の写真中、AおよびBともに、左側の植物群が圃場抵抗性強の品種(トドロキワセ)、中央の植物群が圃場抵抗性中の品種(どんとこい)(WT)、右側の植物群がエンバクRIP遺伝子組換え系統(それぞれ、ORIP11およびORIP34)(いずれも接種3週間後)を示す。耐病性検定は病斑の形状の判定と、病斑面積率の測定を行い、以下に示す病斑指数を用いて解析を行った(Asaga, 1981, *J. Cent. Agric. Exp. Stn.* 35, 51)。

【0106】

病斑指数	病状	病斑面積率
0	罹病性病斑が全く認められない	0%
1	罹病性病斑がわずかに認められる	1%
2	罹病性病斑が一見して認められる	2%
3	罹病性病斑が中程度に認められる	5%
4	罹病性病斑が多く認められる	10%

33

- 5 . 罹病性病斑がはなはだしいか、枯死葉がわずかに認められる 20 %
- 6 . 枯死葉が一見して認められる 40 %
- 7 . 枯死葉が中程度に認められる 60 %
- 8 . 枯死葉が多く認められる 80 %
- 9 . 全葉ほとんど枯死 90 %
- 10 . 全茎葉枯死 100 %

34

この耐病性検定の結果を図9、15、19および23に示す。各図において、横軸は接種後日数、縦軸は病斑指数を表す。図9中、黒菱形は組換え体(1-26)、白四角は組換え体(1-49)、黒三角は組換え体(1-52)、白丸は原品種どんとこい(WT)、黒四角はトドロキワセ(T)を示す。図15中、白丸は原品種どんとこい(WT)、黒四角はトドロキワセ(T)、黒菱形は組換え体(RIP2)を示す。図19中、白菱形は原品種どんとこい(WT)、黒四角はトドロキワセ(T)、黒三角は組換え体(RRIP7)および×は組換え体(RRIP26)を示す。図23中、白丸は原品種どんとこい(WT)、黒四角はトドロキワセ(T)、黒三角は組換え体(ORIP11)および×は組換え体(ORIP34)を示す。

【0107】この結果、組換え体では原品種と変わらない罹病性病斑が認められた。また、組換え体の中にももち病の進行が遅延する系統が見つかった。これらの個体はいもち病の罹病性病斑が認められるものの、病斑面積率は非常に小さかった。従って、イネ、ライムギ、エンバク由来のRIP遺伝子組換え系統はいもち病に対して圃場抵抗性型の抵抗性をもたらすことが明らかになった。

【0108】(実施例8-2.白葉枯病菌の接種と耐病性検定)いもち病菌に対して抵抗性が確認されたイネ、ライムギ、エンバク由来のRIP遺伝子組換え系統(T)の成苗に対して白葉枯病の接種検定を行った。白葉枯病菌(*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*:レース3-A)を、馬鈴薯半合成培地(馬鈴薯300g、硝酸カルシウム0.5g、リン酸水素二ナトリウム・12水和物2g、ペプトン5g、シヨ糖15g、寒天20g、蒸留水1l)で増殖させた。試験管の中に蒸留水10mlを入れ、白葉枯病菌0.5cm四方を懸濁させ、接種用の懸濁液を作製した。原品種及びRIP遺伝子組換え系統(T)の成葉の先端を白葉枯病菌の懸濁液に浸したハサミで切り取り、白葉枯病の接種を行った(Tsushima, 1995, *Methods for isolation, Cultivation, Inoculation of Plant Pathogens*, Japan Plant Protection Association, 28)。20日後、葉の先端から白葉枯病が進行した距離を測定することによって、白葉枯病に対する抵抗性を検定した。この結果を図10、16、20および24に示す。図10中、WTは原品種(どんとこい)の

葉であり、RIP1-26およびRIP1-52は、それぞれ組換え系統(T) (接種後20日)の葉である。図16中、WTは原品種(どんとこい)の葉であり、Rice RIP2-30は、組換え系統(T) (接種後20日)の葉である。図20中、WTは原品種(どんとこい)の葉であり、Rye RIP20は、組換え系統(T) (接種後20日)の葉である。図24中、WTは原品種(どんとこい)の葉であり、Oat RIP16は、組換え系統(T) (接種後20日)の葉である。原品種に比べてRIP遺伝子組換え系統(T)は白葉枯病斑の進展が遅れた(図10、16、20および24)。この耐病性検定の結果を図11、17、21および25に示す。図11において、WTは、原品種(どんとこい)、1-20、1-26、1-34および1-52は、RIP1遺伝子組換え系統である。図17において、WTは、原品種(どんとこい)、2-10、2-18、2-30および2-46は、RIP2遺伝子組換え系統である。図21において、WTは、原品種(どんとこい)、Rye4、Rye6、Rye7、Rye8、Rye10、Rye12、Rye14、Rye16、Rye18およびRye20は、ライ麦RIP遺伝子組換え系統である。図25において、WTは、原品種(どんとこい)、Oat1、Oat4、Oat5、Oat10、Oat11、Oat16、Oat22、Oat29、Oat32、Oat33はエンバクRIP遺伝子組換え系統である。これらの結果により、イネ、ライムギ、エンバク由来のRIP遺伝子組換え系統は白葉枯病に対して抵抗性をもたらすことが明らかになった。

【0109】(実施例9.ゲノミックサザン法によるRIP遺伝子導入の確認)原品種及び病害抵抗性が確認されたRIP遺伝子組換え系統(T)の葉身からCTAB(Cetyltrimethylammonium bromide)法(Murray, 1980, *Nucleic Acids Res.* 8, 4321)を用いてゲノミックDNAを抽出した。イネ地上部10gを液体窒素で凍結させた後、乳鉢で粉碎した。粉末状となったイネを1.5×CTAB液(1.5% CTAB, 75mM Tris-HCl pH8.0, 15mM EDTA pH8.0, 1.05M 塩化ナトリウム)と混合し、56℃で20分間軽く浸透してDNAを溶出させた後、クロロホルム抽出を2回行ってタンパク質を除去した。この溶液に1/10容の10% CTAB、1.5容の沈殿溶液(1% CTAB, 50mM Tris-HCl pH8.0, 10mM EDTA pH

8.0)を加えDNAを析出した。このDNAを、1M塩化ナトリウムに溶解し、Ribonuclease AでRNAを分解した後、エタノール沈殿を行ってゲノミックDNAを抽出した。

【0110】抽出したゲノミックDNA(10 μ g)を制限酵素BglII、EcoRV、NdeI、EcoRIで処理し、1.2%アガロースゲルで18時間電気泳動を行った。泳動後のゲルを加水分解液(0.25M HCl溶液)に10分間、アルカリ変性溶液(1.5M NaOH、0.5M NaCl)に30分間浸漬して軽く振盪した。その後、アルカリ転写溶液(0.4M NaOH)を用いてDNAをナイロンメンブレン(Hybrid-N+、Amersham Pharmacia Biotech社)に転写した。ゲノミックDNAが転写されたナイロンメンブレンを80 $^{\circ}$ Cで2時間ベーキングしてDNAを固定した後、それぞれのRIP cDNAをプローブとして用いてゲノミックサザンハイブリダイゼーションを行った(Southern, 1975, J. Mol. Biol. 98, 503)。サザンハイブリダイゼーションの検出には、AlkPhos Direct(Amersham Pharmacia Biotech)を用いた。洗浄条件は、ECL(Enhanced Chemiluminescence)の場合には、0.2 \times SSC濃度の洗浄液を使用し、Alkphos(アルカリホスファターゼ)の場合には、供給業者の推奨するプロトコールに記載された洗浄液を用いて、55~60 $^{\circ}$ Cで洗浄を行った。

【0111】この結果を図12(A~C)に示す。図12A~C中、それぞれ、レーンMは1kb DNA ladder、レーン1はBglII処理、レーン2はEcoRV処理、レーン3はNdeI処理、レーン4はEcoRI処理を示す。

【0112】サザンハイブリダイゼーションの結果、原品種からはRIPプローブとハイブリダイゼーションしたバンドが1つ(イネRIP1、RIP2)もしくは全く確認されなかった(ライムギ、エンバクRIP)のに対し、組換え個体からは1~2本のバンドが検出された。従って、これらの組換え系統には少なくとも1コピーのRIP遺伝子が導入されていることが明らかになった。

【0113】(実施例10. ノーザン法によるRIP mRNA発現の確認)原品種及びRIP遺伝子組換え系統(T₀)の葉身から、CTAB/LiCl法で総RNAを抽出した(Chang, 1993, Plant Mol. Biol. Report 11, 113)。イネ地上部2gを液体窒素で凍結させた後、乳鉢で粉碎した。粉末状となったイネを10容の2 \times CTAB液(2

% CTAB, 100mM Tris-HCl pH 9.5, 20mM EDTA, 1.4M 塩化ナトリウム, 1%メルカプトエタノール)と混合し、60 $^{\circ}$ Cで10分間軽く浸透してRNAを溶出させた後、クロロホルム抽出を2回行ってタンパク質を除去した。この溶液に1/4容の10M 塩化リチウムを加えRNAを析出した。RNAをTE(10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0)に溶解させ、フェノール/クロロホルム抽出処理を行った後、上記方法で塩化リチウム抽出をもう一度行い、総RNAを単離した。

【0114】単離した総RNA(30 μ g)を6.3%ホルムアルデヒドを含む1.2%アガロース変性ゲルで電気泳動し、20 \times SSC(3M 塩化ナトリウム、300mM クエン酸三ナトリウム二水和物)を用いて総RNAをナイロンメンブレン(Hybrid-N+, Amersham Pharmacia Biotech社)に転写した。総RNAが転写されたナイロンメンブレンに、導入したそれぞれのRIP cDNAをプローブとして用いて、ノーザンハイブリダイゼーションを行った(Alwine, 1977, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 5350)。ノーザンハイブリダイゼーションの検出には、AlkPhos Direct(Amersham Pharmacia Biotech)を用いた。

【0115】これらの結果を、図13(A~D)に示す。AおよびCは、総RNA像であり、BおよびDはノーザンハイブリダイゼーション像を示す。A~Dのいずれも、レーンの左から右の順に、M: 1kb DNA ladder、W: 原品種、26および52: それぞれ、イネRIP1遺伝子導入系統を示す。

【0116】ノーザンハイブリダイゼーションの結果、原品種からはRIPプローブとハイブリダイゼーションしたバンドが確認されなかったのに対し、いもち病、白葉枯病に対する抵抗性を示した組換え系統から約1,500bpのバンドが確認できた(図13: 矢印)。従って、これらの組換え系統にはRIP mRNAが発現していることが明らかになった。

【0117】

40 【発明の効果】本発明により、種々の病原性生物に対する抵抗性を与える遺伝子、この遺伝子を含む発現カセット、この発現カセットを含むベクター、このベクターを保持する植物細胞、この植物細胞を再生して得られた植物体が提供され、さらに病原性生物に対して抵抗性の植物を作出する方法が提供される。

【0118】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> National Agricultural Research Foundation

<120> Ribosome-inactivated protein (RIP) gene and a plant

37

38

introducing the same

<130> RIP protein gene

<140> unassigned

<141> 2002-1-7

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1314

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<220>

<221> CDS

<222> (146)..(955)

<400> 1

tttttttctt cttctttgtt tgacggaaca aaaatctcag gcatgatatg atattctgat 60

ctgttcatga gttcatctgt atctcagtgt acatgcattt gcaaagcaaa aattccattt 120

tgttttgact atttgccttc cggcc atg gcg ttg aac ccg ctc ttc acc gtg 172

Met Ala Leu Asn Pro Leu Phe Thr Val

1

5

acg ttc gac gtg agc agc ggc gac aac tac ggc gac ttc atc gcc ggc 220

Thr Phe Asp Val Ser Ser Gly Asp Asn Tyr Gly Asp Phe Ile Ala Gly

10

15

20

25

atc cgc agc agg gtg gcc aac ccg agg cac ttc tcc cgc aac cgc ccc 268

Ile Arg Ser Arg Val Ala Asn Pro Arg His Phe Ser Arg Asn Arg Pro

30

35

40

gtc ctg ccg ccg gtg gag ccg ccg ccg ccg cgc cgc tgg ttc cac 316

Val Leu Pro Pro Val Glu Pro Pro Pro Pro Pro Arg Arg Trp Phe His

45

50

55

gtc gtg ctc cgg gcg tcg ccg acc gcc gcg ctc acg ctc gcc acg cgc 364

Val Val Leu Arg Ala Ser Pro Thr Ala Ala Leu Thr Leu Ala Thr Arg

60

65

70

gcc gac aac ctc tac ctg gag gga ttc cgg agc agc gac ggg agg tgg 412

Ala Asp Asn Leu Tyr Leu Glu Gly Phe Arg Ser Ser Asp Gly Arg Trp

75

80

85

tgg gag ctc acc ccg ggc atc ctc ggc gcc gcc ccc ggc ggc gcc gcc 460

Trp Glu Leu Thr Pro Gly Ile Leu Gly Ala Ala Pro Gly Gly Ala Ala

90

95

100

105

gcc acc tac gtc ggc ttc ggc ggc tcg tac cgc gac ctc ctc ggc gac 508

Ala Thr Tyr Val Gly Phe Gly Gly Ser Tyr Arg Asp Leu Leu Gly Asp

110

115

120

acg gac agg ctc acc gtc gtc acg ctc ggc ccg cag cag atg gcg cag 556

Thr Asp Arg Leu Thr Val Val Thr Leu Gly Pro Gln Gln Met Ala Gln

125

130

135

gcg gtg aac gcg ctc gcc gcg cgc agg ccg gcc gac ctc gcc aac ggc 604

Ala Val Asn Ala Leu Ala Ala Arg Arg Pro Ala Asp Leu Ala Asn Gly

140

145

150

gcg gcg cag cgg cgc gcc atg gac gcg gtg gcg gcg ctg ctc ctg atg 652

Ala Ala Gln Arg Arg Ala Met Asp Ala Val Ala Ala Leu Leu Leu Met

39 40

155 160 165

gtg cac gag gcg acg cgg ttc cag acc gtg tcg agg ctg gtc gcc ggg 700
Val His Glu Ala Thr Arg Phe Gln Thr Val Ser Arg Leu Val Ala Gly
170 175 180 185

ctc atg cac ccc aag gcg gcg agc aag agc ggc gcc atc acc acc gcg 748
Leu Met His Pro Lys Ala Ala Ser Lys Ser Gly Ala Ile Thr Thr Ala
190 195 200

atg agg aag cag gtg aac ggg tgg cag gtc ctc tcg gcg gcc atg ctc 796
Met Arg Lys Gln Val Asn Gly Trp Gln Val Leu Ser Ala Ala Met Leu
205 210 215

ggc acg gac gcg cgg ccg ccg gcg agg ttc gcg ccg ctg agg gac atg 844
Gly Thr Asp Ala Arg Pro Pro Ala Arg Phe Ala Pro Leu Arg Asp Met
220 225 230

ggc gtg gac acg gtg gag gag gcg gcg gcg acg gtg ggg atc ctg ctg 892
Gly Val Asp Thr Val Glu Glu Ala Ala Ala Thr Val Gly Ile Leu Leu
235 240 245

ttc gtc gag gtc ccc ggc ggg atg acg gcg gcg agg gcg ctc cag ctg 940
Phe Val Glu Val Pro Gly Gly Met Thr Ala Ala Arg Ala Leu Gln Leu
250 255 260 265

ttc cac cat ggg aac tagattttga tgcagctgga tttttttctc cttgtttgag 995
Phe His His Gly Asn
270

ccaataaaat gttagatttg tgatggtttt gctatttgat ttgagtagaa atgtagatt 1055
ttgtgtgtat tcggaataaa ttcagcacca tagttttatc tatagctatt ttaattcatg 1115
tgagtactag taagaacaat aacatatacct actctgactg atgcaaccag atagagatta 1175
tacttgttca tactgaaaat ttgttcataa caactttcac aatcttttct cagagatatt 1235
ttgcattcag ataactatgt atacacagga cacatatttc tggatatgaa catccaattg 1295
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1314

<210> 2

<211> 270

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 2

Met Ala Leu Asn Pro Leu Phe Thr Val Thr Phe Asp Val Ser Ser Gly
1 5 10 15

Asp Asn Tyr Gly Asp Phe Ile Ala Gly Ile Arg Ser Arg Val Ala Asn
20 25 30

Pro Arg His Phe Ser Arg Asn Arg Pro Val Leu Pro Pro Val Glu Pro
35 40 45

Pro Pro Pro Pro Arg Arg Trp Phe His Val Val Leu Arg Ala Ser Pro
50 55 60

Thr Ala Ala Leu Thr Leu Ala Thr Arg Ala Asp Asn Leu Tyr Leu Glu
65 70 75 80

Gly Phe Arg Ser Ser Asp Gly Arg Trp Trp Glu Leu Thr Pro Gly Ile
85 90 95

Leu Gly Ala Ala Pro Gly Gly Ala Ala Ala Thr Tyr Val Gly Phe Gly
100 105 110

41
 Gly Ser Tyr Arg Asp Leu Leu Gly Asp Thr Asp Arg Leu Thr Val Val
 115 120 125

Thr Leu Gly Pro Gln Gln Met Ala Gln Ala Val Asn Ala Leu Ala Ala
 130 135 140

Arg Arg Pro Ala Asp Leu Ala Asn Gly Ala Ala Gln Arg Arg Ala Met
 145 150 155 160

Asp Ala Val Ala Ala Leu Leu Leu Met Val His Glu Ala Thr Arg Phe
 165 170 175

Gln Thr Val Ser Arg Leu Val Ala Gly Leu Met His Pro Lys Ala Ala
 180 185 190

Ser Lys Ser Gly Ala Ile Thr Thr Ala Met Arg Lys Gln Val Asn Gly
 195 200 205

Trp Gln Val Leu Ser Ala Ala Met Leu Gly Thr Asp Ala Arg Pro Pro
 210 215 220

Ala Arg Phe Ala Pro Leu Arg Asp Met Gly Val Asp Thr Val Glu Glu
 225 230 235 240

Ala Ala Ala Thr Val Gly Ile Leu Leu Phe Val Glu Val Pro Gly Gly
 245 250 255

Met Thr Ala Ala Arg Ala Leu Gln Leu Phe His His Gly Asn
 260 265 270

<210> 3
 <211> 1300
 <212> DNA
 <213> Oryza sativa
 <220>
 <221> CDS
 <222> (54)..(899)
 <400> 3
 cagcaatcct ctgcttttgt cagttgtagt tcacaacgat cgagcatccg gcc atg 56
 Met
 1
 gcg ttg aac ccg ctg ttc acc gtg acg ttc aac gtg agc ggc agc ggc 104
 Ala Leu Asn Pro Leu Phe Thr Val Thr Phe Asn Val Ser Gly Ser Gly
 5 10 15
 agc gac aac tac ggc gac ttc atc gcc ggc atc cgc aag agg gtg gcc 152
 Ser Asp Asn Tyr Gly Asp Phe Ile Ala Gly Ile Arg Lys Arg Val Ala
 20 25 30
 aac ccg agg cac ttc tcc cac aac cgc ccc gtc ctc ccg ccg gtg gag 200
 Asn Pro Arg His Phe Ser His Asn Arg Pro Val Leu Pro Pro Val Glu
 35 40 45
 ccc gac gtc ccg ccg cgc cgc tgg ttc cac gtc gtg ctc cgg acg cag 248
 Pro Asp Val Pro Pro Arg Arg Trp Phe His Val Val Leu Arg Thr Gln
 50 55 60 65
 acc agc gag ctc acg ctc gcc acg cgc gcc gac aac ctc tac ctg gag 296
 Thr Ser Glu Leu Thr Leu Ala Thr Arg Ala Asp Asn Leu Tyr Leu Glu
 70 75 80
 ggc ttc cgc ggc agc gac ggc acc agc gcg tgg tgg gag ctc acc cgc 344

43	44
Gly Phe Arg Gly Ser Asp Gly Thr Ser Ala Trp Trp Glu Leu Thr Arg	
85	90
ggc ctc atc gcc ggc gcc acc tac ctc ggc ttc ggc ggc tcg tac cgc	95
Gly Leu Ile Ala Gly Ala Thr Tyr Leu Gly Phe Gly Gly Ser Tyr Arg	392
100	105
gag ctc ctc ggg cac acg gac aac atg gtc ggt gtc acg ctc ggc ccg	110
Glu Leu Leu Gly His Thr Asp Asn Met Val Gly Val Thr Leu Gly Pro	440
115	120
cag cag atg acg cag gcc gtg gac acg ctc gcc ggt ctc gcc gcc agc	125
Gln Gln Met Thr Gln Ala Val Asp Thr Leu Ala Gly Leu Ala Ala Ser	488
130	135
ggc ggc ggc gcg gcg cgg caa cgg gcc ggc gag gcg ttg gcg acg ctg	140
Gly Gly Gly Ala Ala Arg Gln Arg Ala Gly Glu Ala Leu Ala Thr Leu	145
150	155
ctc ctg atg gtg aac gaa gcc gtg cgt ttc ctg acc gtg gcg gag ctt	160
Leu Leu Met Val Asn Glu Ala Val Arg Phe Leu Thr Val Ala Glu Leu	584
165	170
175	
gtg ggc ggc ttc atg aac ccc agg gcg gtg agg aag agc ggg acg atc	632
Val Gly Gly Phe Met Asn Pro Arg Ala Val Arg Lys Ser Gly Thr Ile	
180	185
acc gcc gac atg aag gag cag gtg aac ggg tgg aag gtc ttg tcc agg	190
Thr Ala Asp Met Lys Glu Gln Val Asn Gly Trp Lys Val Leu Ser Arg	680
195	200
205	
gcg ctg ctc acc atg gac gcg ctg cag cta gag gac tcc aac tcg gcg	728
Ala Leu Leu Thr Met Asp Ala Leu Gln Leu Glu Asp Ser Asn Ser Ala	
210	215
220	225
tcc aag cac aac aag gtg gat aca aag aag atg gag cag gag aag aag	776
Ser Lys His Asn Lys Val Asp Thr Lys Lys Met Glu Gln Glu Lys Lys	
230	235
240	
gcg tgg gag gcg gcg gag aag ttg gcc gtg gag gcg gcc aag gcg gtg	824
Ala Trp Glu Ala Ala Glu Lys Leu Ala Val Glu Ala Ala Lys Ala Val	
245	250
255	
ggg atc ctg ctg ttc gtc gag aag gtg ccg gcc ggg atg acg aag gcg	872
Gly Ile Leu Leu Phe Val Glu Lys Val Pro Ala Gly Met Thr Lys Ala	
260	265
270	
acg gcg ctt cag ctg ttt cat ggg aac taaagttgct gctgctgcta	919
Thr Ala Leu Gln Leu Phe His Gly Asn	
275	280
gatttcagct tgcttgatcg aacagcaaat caatctgagc gactcgagta aaattgattc	979
tcctccaac ccaaaatata agtattttca gttattaatc tggacaactg cgtgtccaga	1039
tacatagaca aaagtgtta tattttgaga cggttgttat attttgggac ggaggcagta	1099
gttaaatagc ctctatagtg tgatgtaact actatatact cccttcgtcc caaaaaagac	1159
aaacactggt ctccgtgtcc aacgtttgac tgtccgtctt atatgaaatt tttttataa	1219
ttaatatittt cattgttgtt agatgataaa acatgattaa taatttatgt gtgaaaaaaa	1279
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa a	1300

45

46

<211> 282

<212> PRT

<213> *Oryza sativa*

<400> 4

Met Ala Leu Asn Pro Leu Phe Thr Val Thr Phe Asn Val Ser Gly Ser

1 5 10 15

Gly Ser Asp Asn Tyr Gly Asp Phe Ile Ala Gly Ile Arg Lys Arg Val

20 25 30

Ala Asn Pro Arg His Phe Ser His Asn Arg Pro Val Leu Pro Pro Val

35 40 45

Glu Pro Asp Val Pro Pro Arg Arg Trp Phe His Val Val Leu Arg Thr

50 55 60

Gln Thr Ser Glu Leu Thr Leu Ala Thr Arg Ala Asp Asn Leu Tyr Leu

65 70 75 80

Glu Gly Phe Arg Gly Ser Asp Gly Thr Ser Ala Trp Trp Glu Leu Thr

85 90 95

Arg Gly Leu Ile Ala Gly Ala Thr Tyr Leu Gly Phe Gly Gly Ser Tyr

100 105 110

Arg Glu Leu Leu Gly His Thr Asp Asn Met Val Gly Val Thr Leu Gly

115 120 125

Pro Gln Gln Met Thr Gln Ala Val Asp Thr Leu Ala Gly Leu Ala Ala

130 135 140

Ser Gly Gly Gly Ala Ala Arg Gln Arg Ala Gly Glu Ala Leu Ala Thr

145 150 155 160

Leu Leu Leu Met Val Asn Glu Ala Val Arg Phe Leu Thr Val Ala Glu

165 170 175

Leu Val Gly Gly Phe Met Asn Pro Arg Ala Val Arg Lys Ser Gly Thr

180 185 190

Ile Thr Ala Asp Met Lys Glu Gln Val Asn Gly Trp Lys Val Leu Ser

195 200 205

Arg Ala Leu Leu Thr Met Asp Ala Leu Gln Leu Glu Asp Ser Asn Ser

210 215 220

Ala Ser Lys His Asn Lys Val Asp Thr Lys Lys Met Glu Gln Glu Lys

225 230 235 240

Lys Ala Trp Glu Ala Ala Glu Lys Leu Ala Val Glu Ala Ala Lys Ala

245 250 255

Val Gly Ile Leu Leu Phe Val Glu Lys Val Pro Ala Gly Met Thr Lys

260 265 270

Ala Thr Ala Leu Gln Leu Phe His Gly Asn

275 280

<210> 5

<211> 1039

<212> DNA

<213> *Secale cereale*

<220>

<221> CDS

<222> (35)..(877)

47

48

<400> 5

gcttaatagc cagctctcatc ttagcttcat atac atg gcg gca aag atg gcc aag 55
Met Ala Ala Lys Met Ala Lys
1 5
aac gtg gac aag ccg ctc ttc act gcg acg ttc aac gtc cag agc agc 103
Asn Val Asp Lys Pro Leu Phe Thr Ala Thr Phe Asn Val Gln Ser Ser
10 15 20
tcc gcc gac tac gtc acc ttc atc acc ggc atc cgc aac aag ctc ggc 151
Ser Ala Asp Tyr Val Thr Phe Ile Thr Gly Ile Arg Asn Lys Leu Gly
25 30 35
aac ccc cgc cac ttc tcc cac aac cgc ccc gtg ctg ccg ccg atc gag 199
Asn Pro Arg His Phe Ser His Asn Arg Pro Val Leu Pro Pro Ile Glu
40 45 50 55
ccc aag gtc ccg ccg agc cgg tgg ttc cac atc gtg ctc aag aca tcg 247
Pro Lys Val Pro Pro Ser Arg Trp Phe His Ile Val Leu Lys Thr Ser
60 65 70
ccg gcc agc acc ggg ctc acg ctc gcc acc cgc gcc gac aac ctc tac 295
Pro Ala Ser Thr Gly Leu Thr Leu Ala Thr Arg Ala Asp Asn Leu Tyr
75 80 85
tgg gag ggc ttc aag agc agc gac ggc acc tgg tgg gag ctc acc ccc 343
Trp Glu Gly Phe Lys Ser Ser Asp Gly Thr Trp Trp Glu Leu Thr Pro
90 95 100
ggc ctc atc ccc ggc gcc acc tac ctc ggg ttc ggc gcc acc tac cgc 391
Gly Leu Ile Pro Gly Ala Thr Tyr Leu Gly Phe Gly Gly Thr Tyr Arg
105 110 115
gac ctc ctc ggg gac acc gac aag ctg acc aac gtc gct ctc ggc cgg 439
Asp Leu Leu Gly Asp Thr Asp Lys Leu Thr Asn Val Ala Leu Gly Arg
120 125 130 135
cag caa atg gcc gac gcg gtg acc gcg ctc tac ggg cgc acc aag gct 487
Gln Gln Met Ala Asp Ala Val Thr Ala Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Ala
140 145 150
gac aaa acc tcc ggc ccg aag cag cag cag gcg agg gag gcg gtg aca 535
Asp Lys Thr Ser Gly Pro Lys Gln Gln Gln Ala Arg Glu Ala Val Thr
155 160 165
acg ctg ctc ctc atg gtc cac gag gcc acg cgg ttc cag tcc gtg tcg 583
Thr Leu Leu Leu Met Val His Glu Ala Thr Arg Phe Gln Ser Val Ser
170 175 180
gcg ttc gtg gcc ggc ctg ctg cac ccc aag gcg gtg gag aag aag agc 631
Ala Phe Val Ala Gly Leu Leu His Pro Lys Ala Val Glu Lys Lys Ser
185 190 195
ggg aag atc tcc aac gag cta aag gcc cag gtg aac ggg tgg cag gac 679
Gly Lys Ile Ser Asn Glu Leu Lys Ala Gln Val Asn Gly Trp Gln Asp
200 205 210 215
ctg tcc gaa gcg ctg ctg aag acg gac gcg aag ccc ccc gcg ggt aag 727
Leu Ser Glu Ala Leu Leu Lys Thr Asp Ala Lys Pro Pro Ala Gly Lys
220 225 230
ccg cca gcg aag ttc acg ccg atc gag aag atg ggc gtg agg acg gcg 775
Pro Pro Ala Lys Phe Thr Pro Ile Glu Lys Met Gly Val Arg Thr Ala
235 240 245
gag cag gcg gcc gcc acc ctg ggg atc ctg ctg ttc gtc cag gtg ccc 823

49 50
 Glu Gln Ala Ala Ala Thr Leu Gly Ile Leu Leu Phe Val Gln Val Pro
 250 255 260
 ggt ggg atg acg gcg gcc cag gcg ctg gag ctg ttt cat gct agt ggg 871
 Gly Gly Met Thr Ala Ala Gln Ala Leu Glu Leu Phe His Ala Ser Gly
 265 270 275
 ggg aaa taggtagttg tgcaggata tctgcaatgg tattgtataa gtcgaataaa 927
 Gly Lys
 280
 catgtcacag agtgactgaa tgatataaat aaataaacat gtcactgagt gactgaataa 987
 tataaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa ac 1039

<210> 6

<211> 281

<212> PRT

<213> Secale cereale

<400> 6

Met Ala Ala Lys Met Ala Lys Asn Val Asp Lys Pro Leu Phe Thr Ala
 1 5 10 15
 Thr Phe Asn Val Gln Ser Ser Ser Ala Asp Tyr Val Thr Phe Ile Thr
 20 25 30
 Gly Ile Arg Asn Lys Leu Gly Asn Pro Arg His Phe Ser His Asn Arg
 35 40 45
 Pro Val Leu Pro Pro Ile Glu Pro Lys Val Pro Pro Ser Arg Trp Phe
 50 55 60
 His Ile Val Leu Lys Thr Ser Pro Ala Ser Thr Gly Leu Thr Leu Ala
 65 70 75 80
 Thr Arg Ala Asp Asn Leu Tyr Trp Glu Gly Phe Lys Ser Ser Asp Gly
 85 90 95
 Thr Trp Trp Glu Leu Thr Pro Gly Leu Ile Pro Gly Ala Thr Tyr Leu
 100 105 110
 Gly Phe Gly Gly Thr Tyr Arg Asp Leu Leu Gly Asp Thr Asp Lys Leu
 115 120 125
 Thr Asn Val Ala Leu Gly Arg Gln Gln Met Ala Asp Ala Val Thr Ala
 130 135 140
 Leu Tyr Gly Arg Thr Lys Ala Asp Lys Thr Ser Gly Pro Lys Gln Gln
 145 150 155 160
 Gln Ala Arg Glu Ala Val Thr Thr Leu Leu Leu Met Val His Glu Ala
 165 170 175
 Thr Arg Phe Gln Ser Val Ser Ala Phe Val Ala Gly Leu Leu His Pro
 180 185 190
 Lys Ala Val Glu Lys Lys Ser Gly Lys Ile Ser Asn Glu Leu Lys Ala
 195 200 205
 Gln Val Asn Gly Trp Gln Asp Leu Ser Glu Ala Leu Leu Lys Thr Asp
 210 215 220
 Ala Lys Pro Pro Ala Gly Lys Pro Pro Ala Lys Phe Thr Pro Ile Glu
 225 230 235 240
 Lys Met Gly Val Arg Thr Ala Glu Gln Ala Ala Ala Thr Leu Gly Ile
 245 250 255

51	52
Leu Leu Phe Val Gln Val Pro Gly Gly Met Thr Ala Ala Gln Ala Leu	
260	265 270
Glu Leu Phe His Ala Ser Gly Gly Lys	
275	280
<210> 7	
<211> 1015	
<212> DNA	
<213> Avena sativa	
<220>	
<221> CDS	
<222> (37)..(843)	
<400> 7	
attattgtgc gtctcatctt cccatcgatc gatccc atg gct gcg acc aac gtc	54
Met Ala Ala Thr Asn Val	
1 5	
acc acc aac gag ctc ttc acc aag aac ttc gac ctc ggg agc aac gac	102
Thr Thr Asn Glu Leu Phe Thr Lys Asn Phe Asp Leu Gly Ser Asn Asp	
10 15 20	
aac tac ggc agc ctc atc acc agc atc cgc aac gag ctc ggc aac ccg	150
Asn Tyr Gly Ser Leu Ile Thr Ser Ile Arg Asn Glu Leu Gly Asn Pro	
25 30 35	
agg cac ttc tct cac aac cgc ccc gtg ctg ccg ccg gtg gag ccc aac	198
Arg His Phe Ser His Asn Arg Pro Val Leu Pro Pro Val Glu Pro Asn	
40 45 50	
gtc ccg ccg ggc cgg tgg ttc cac atc aag ctc aag gcc ccg gtg acc	246
Val Pro Pro Gly Arg Trp Phe His Ile Lys Leu Lys Ala Pro Val Thr	
55 60 65 70	
ggc gcc gaa ctc aca atc acg acg cgc gcc gac aac ctc tac ctg gag	294
Gly Ala Glu Leu Thr Ile Thr Thr Arg Ala Asp Asn Leu Tyr Leu Glu	
75 80 85	
ggc ttc agg aac agc gac ggc tca tgg tgg gag ctc act cgc ggc ctc	342
Gly Phe Arg Asn Ser Asp Gly Ser Trp Trp Glu Leu Thr Arg Gly Leu	
90 95 100	
atc ccc ggc gcc tcc tac gtg ggc ttc ggc ggc agc tac cgc gac ctc	390
Ile Pro Gly Ala Ser Tyr Val Gly Phe Gly Gly Ser Tyr Arg Asp Leu	
105 110 115	
ctc ggc gac tcg gag aat ttg tct ggc gtc gtc ctc ggc ccg aag aag	438
Leu Gly Asp Ser Glu Asn Leu Ser Gly Val Val Leu Gly Pro Lys Lys	
120 125 130	
atg atc gat gcc gtc aat gtg ctc gcc ggc ctc acc agg gcc gac ctc	486
Met Ile Asp Ala Val Asn Val Leu Ala Gly Leu Thr Arg Ala Asp Leu	
135 140 145 150	
gca tcc agc cag aag cag aag cag gcc aag gac gcg gtg gcg gcg ctg	534
Ala Ser Ser Gln Lys Gln Lys Gln Ala Lys Asp Ala Val Ala Ala Leu	
155 160 165	
ctc ctg atg gtg cac gag gcc aca cgg ttc cag tcc gtg tcg gcg ttc	582
Leu Leu Met Val His Glu Ala Thr Arg Phe Gln Ser Val Ser Ala Phe	
170 175 180	

53	54
gtg gcc gac ttg atg cac ccc aag act ggg gat aag agc ggg acc atc	630
Val Ala Asp Leu Met His Pro Lys Thr Gly Asp Lys Ser Gly Thr Ile	
185	190
acc aag gag atg aaa gcc cag gtg aac ggg tgg cag aac ctg tcc gcg	678
Thr Lys Glu Met Lys Ala Gln Val Asn Gly Trp Gln Asn Leu Ser Ala	
200	205
gcg ctg ctg acg acg gac gcc aag ccg ccg ggg aag ttc acg ccg ttc	726
Ala Leu Leu Thr Thr Asp Ala Lys Pro Pro Gly Lys Phe Thr Pro Phe	
215	220
gag aat atg ggg gtg aat acg gtg gaa cag gcg gcc gcc acg gtg ggg	774
Glu Asn Met Gly Val Asn Thr Val Glu Gln Ala Ala Ala Thr Val Gly	
235	240
atc ctg ctg ttc gtc gag gtg cca ggc ggg ttg act gct gct cag gcg	822
Ile Leu Leu Phe Val Glu Val Pro Gly Gly Leu Thr Ala Ala Gln Ala	
250	255
ctc aag ctg ttt cat ggg aac tagctagcta gactgatgcc tcacgcagcg	873
Leu Lys Leu Phe His Gly Asn	
265	
aataatccta ctactgtaat cactttctat agtctgtaat aatgtactgc aatttgaata	933
aatctgtgtg agagtagtca atcatgaata aagaagtgga tgttcccacc caaaaaaaaa	993
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa	1015

<210> 8

<211> 269

<212> PRT

<213> Avena sativa

<400> 8

Met Ala Ala Thr Asn Val Thr Thr Asn Glu Leu Phe Thr Lys Asn Phe	
1	5
Asp Leu Gly Ser Asn Asp Asn Tyr Gly Ser Leu Ile Thr Ser Ile Arg	
20	25
Asn Glu Leu Gly Asn Pro Arg His Phe Ser His Asn Arg Pro Val Leu	
35	40
Pro Pro Val Glu Pro Asn Val Pro Pro Gly Arg Trp Phe His Ile Lys	
50	55
Leu Lys Ala Pro Val Thr Gly Ala Glu Leu Thr Ile Thr Thr Arg Ala	
65	70
Asp Asn Leu Tyr Leu Glu Gly Phe Arg Asn Ser Asp Gly Ser Trp Trp	
85	90
Glu Leu Thr Arg Gly Leu Ile Pro Gly Ala Ser Tyr Val Gly Phe Gly	
100	105
Gly Ser Tyr Arg Asp Leu Leu Gly Asp Ser Glu Asn Leu Ser Gly Val	
115	120
Val Leu Gly Pro Lys Lys Met Ile Asp Ala Val Asn Val Leu Ala Gly	
130	135
Leu Thr Arg Ala Asp Leu Ala Ser Ser Gln Lys Gln Lys Gln Ala Lys	
145	150
Asp Ala Val Ala Ala Leu Leu Leu Met Val His Glu Ala Thr Arg Phe	
155	160

55
 165 170 175
 Gln Ser Val Ser Ala Phe Val Ala Asp Leu Met His Pro Lys Thr Gly
 180 185 190
 Asp Lys Ser Gly Thr Ile Thr Lys Glu Met Lys Ala Gln Val Asn Gly
 195 200 205
 Trp Gln Asn Leu Ser Ala Ala Leu Leu Thr Thr Asp Ala Lys Pro Pro
 210 215 220
 Gly Lys Phe Thr Pro Phe Glu Asn Met Gly Val Asn Thr Val Glu Gln
 225 230 235 240
 Ala Ala Ala Thr Val Gly Ile Leu Leu Phe Val Glu Val Pro Gly Gly
 245 250 255
 Leu Thr Ala Ala Gln Ala Leu Lys Leu Phe His Gly Asn
 260 265

<210> 9

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 9

gacaacmtst acyksgwggg cttca

25

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 10

csvgacacsg tstkgaacg c

21

【図面の簡単な説明】

【図 1】図 1 は、イネのリボソーム不活性化タンパク質 (RIP1) cDNA の塩基配列及び翻訳されるアミノ酸配列である。

【図 2】図 2 は、イネのリボソーム不活性化タンパク質 (RIP2) cDNA の塩基配列及び翻訳されるアミノ酸配列である。

【図 3】図 3 は、ライムギのリボソーム不活性化タンパク質 (RIP) cDNA の塩基配列及び翻訳されるアミノ酸配列である。

【図 4】図 4 は、エンバクのリボソーム不活性化タンパク質 (RIP) cDNA の塩基配列及び翻訳されるアミノ酸配列である。

【図 5】図 5 は、RIP 遺伝子の発現ベクター (pPZP202) の構築を示す模式図である。

【図 6】図 6 は、RIP 遺伝子組換え系統 (イネ RIP1 組換え系統) の形態を示す生物形態写真である。

【図 7】図 7 は、組換え系統 T₁ 種子のハイグロマイシン選抜 (イネ RIP1 組換え系統) の形態を示す生物形態写真である。

【図 8】図 8 は、いもち病 (レース 007) の噴霧接種検定 (イネ RIP1 組換え系統) の結果を示す生物形態写真である。

40 【図 9】図 9 は、組換え系統のいもち病に対する抵抗性程度 (イネ RIP1 組換え系統) の結果を示すグラフである。

【図 10】図 10 は、白葉枯病の接種検定 (イネ RIP1 組換え系統) の結果を示す生物形態写真である。

【図 11】図 11 は、白葉枯病の接種検定 (イネ RIP1 組換え系統) の結果を示すグラフである。

【図 12】図 12 は、ゲノミックサザン法による導入遺伝子の確認 (イネ RIP1 組換え系統) を示す電気泳動図である。

50 【図 13】図 13 は、ノーザン法による RIP mRNA

の発現調査 (イネ RIP 1 組換え系統) を示す電気泳動図である。

【図 14】図 14 は、いもち病 (レース 007) の噴霧接種検定 (イネ RIP 2 組換え系統) の結果を示す生物形態写真である。

【図 15】図 15 は、組換え系統のいもち病に対する抵抗性程度 (イネ RIP 2 組換え系統) の結果を示すグラフである。

【図 16】図 16 は、白葉枯病の接種検定 (イネ RIP 2 組換え系統) の結果を示す生物形態写真である。

【図 17】図 17 は、白葉枯病の接種検定 (イネ RIP 2 組換え系統) の結果を示すグラフである。

【図 18】図 18 は、いもち病 (レース 007) の噴霧接種検定 (ライムギ RIP 組換え系統) の結果を示す生物形態写真である。

【図 19】図 19 は、組換え系統のいもち病に対する抵

抗性程度 (ライムギ RIP 組換え系統) の結果を示すグラフである。

【図 20】図 20 は、白葉枯病の接種検定 (ライムギ RIP 組換え系統) の結果を示す生物形態写真である。

【図 21】図 21 は、白葉枯病の接種検定 (ライムギ RIP 組換え系統) の結果を示すグラフである。

【図 22】図 22 は、いもち病 (レース 007) の噴霧接種検定 (エンバク RIP 組換え系統) の結果を示す生物形態写真である。

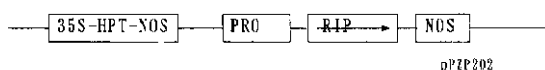
10 【図 23】図 23 は、組換え系統のいもち病に対する抵抗性程度 (エンバク RIP 組換え系統) の結果を示すグラフである。

【図 24】図 24 は、白葉枯病の接種検定 (エンバク RIP 組換え系統) の結果を示す生物形態写真である。

【図 25】図 21 は、白葉枯病の接種検定 (エンバク RIP 組換え系統) の結果を示すグラフである。

【図 5】

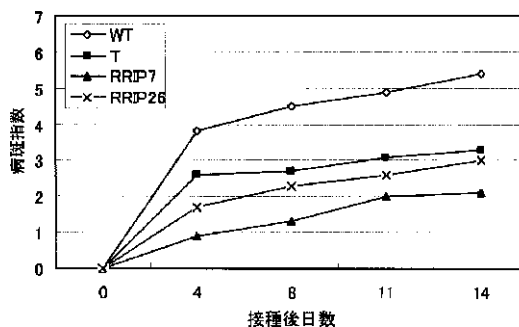
イネ RIP 遺伝子の形質転換ベクター (pPZP202) の構築



RIP: RIP cDNA
 PRO: プロモーター
 (REXφ: 改良型 CaMV 35S プロモーター)
 (cab1: クロロフィル a/b 結合タンパク質プロモーター)
 NOS: NOS ターミネーター
 HPT: ハイグロマイシン耐性遺伝子 (選択マーカー)

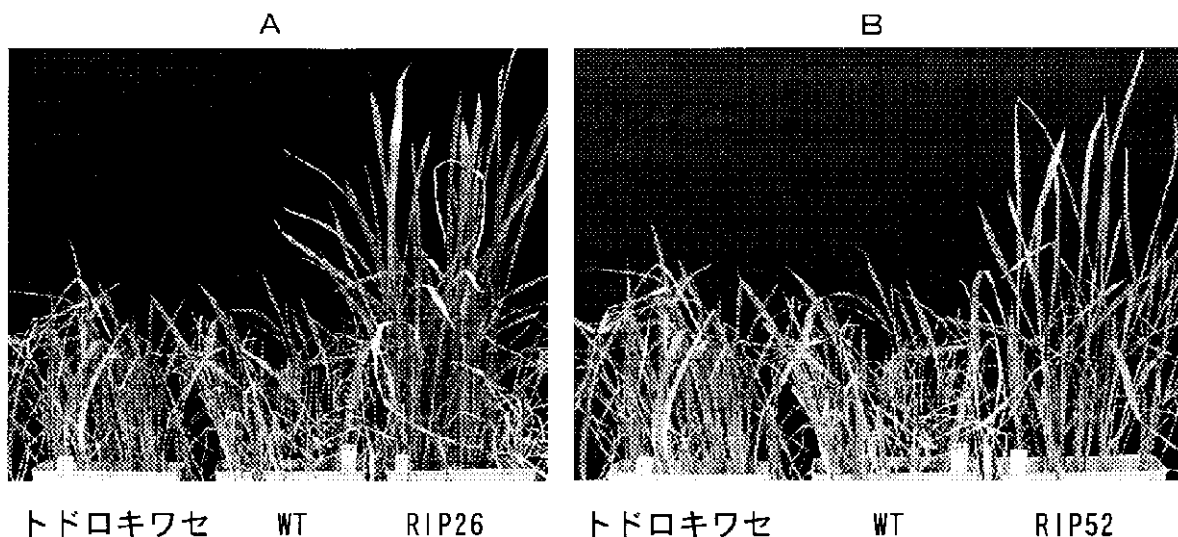
【図 19】

ライ麦 RIP 遺伝子導入系統のいもち病抵抗性程度



【図 8】

いもち病 (レース 007) の噴霧接種検定 (いずれも接種 3 週間後)



【図 1】

イネRIP1 cDNAの塩基配列と翻訳されるアミノ酸配列

```

1   TTTTTTCTTCTCTTTGTTTGACGGAACAAAAATCTCAGGCATGATATG   50
51  ATATTCTGATCTGTTTCATGAGTTCATCTGTATCTCAGTGTACATGCATTT 100
101 GCAAAGCAAAAAATTCATTTTGTGTTTACTATTTTCGGTTCGGGCCATGGC 150
      M A
151 GTTGAACCCGCTTTCACCGTGACGTTGACGCTGAGCAGCGGGGACAAC 200
      L N P L F T V T F D V S S G D N
201 ACGGCGACTTCATCGCCGGCATCCCGCAGCGGTGGCCAACCCGAGGCAC 250
      Y G D F I A G I R S R V A N P R H
251 TTCTCCGGCAACCGCCCGTCTGCCGCGGTGGAGCCCGCCCGCCGCC 300
      F S R N R P V L P P V E P P P P P
301 GCGCGCTGGTTCCACGTCGTGCTCCGGGCGTCCCGGACCGCCGGCTCA 350
      R R W F H V V L R A S P T A A L
351 CGCTGCCACGCGCGCCGACAACCTTACCTGGAGGGATTCCGGAGCAGC 400
      T L A T R A D N L Y L E G F R S S
401 GACGGGAGGTGGTGGGAGCTACCCCGGGCATCCTGGGCGCGCCCGG 450
      D G R W W E L T P G I L G A A P G
451 CGGCGCGCGCCACCTACGTGGGCTTCGGGCGCTCGTACCGCGACCTCC 500
      G A A A T Y V G F G G S Y R D L
501 TCGGCGACACGGACAGGCTCACCGTCGTCACGCTCGGCCCGCAGCAGATG 550
      L G D T D R L T V V T L G P Q Q M
551 GCGCAGGCGGTGAACGGCTCGCCGCGCGCAGGCCGCGCACCTCGCCAA 600
      A Q A V N A L A A R R P A D L A N
601 CGGCGCGCGCGCAGCGCGCCATGGACGGGTGGCGCGCTGCTCCTGA 650
      G A A Q R R A M D A V A A L L L
651 TGGTGCACGAGCGACGCGGTTCCAGACCGTGTGAGGCTGGTCCCGGG 700
      M Y H E A T R F Q T V S R L V A G
701 CTCATGCACCCCAAGGCGGCGAGCAAGAGCGGCGCCATCACCACCGGAT 750
      L M H P K A A S K S G A I T T A M
751 GAGGAAGCAGGTGAACGGGTGGCAGGTCCTCTCGGCGGCCATGCTCGGCA 800
      R K Q V N G W Q V L S A A M L G
801 CGGACGCGCGCGCCCGCGGAGGTTCCGCGCGCTGAGGACATGGGCGTG 850
      T D A R P P A R F A P L R D M G V
851 GACACGGTGGAGGAGGGCGGCGACGGTGGGATCCTGCTGTTCTGTCGA 900
      D T Y E E A A A T Y G I L L F V E
901 GGTCCCCGGGGATGACGGCGGCGAGGGCGCTCCAGCTGTTCCACCATG 950
      V P G G M T A A R A L Q L F H H
951 GGAAGTAGATTTTGATGCAGCTGGATTTTTTCTCCTTGTGTTGAGCCAAT 1000
      G N *
1001 AAAATGTTAGATTTGTGATGGTTTTGCTATTTGATTTGAGTAGAAATGTT 1050
1051 AGATTTTGTGTATTTCGGAATAAATTCAGCACCATAGTTTTATCTATAG 1100
1101 CTATTTTAATTCATGTGAGTACTAGTAAGAACAATAACATATCCTACTCT 1150
1151 GACTGATGCAACCAGATAGAGATTACTTGTTCATACTGAAAATTTGTT 1200
1201 CATAACAACCTTCACAATCTTTCTCAGAGATATTTTGCAATCAGATAAC 1250
1251 TATGTATACACAGGACACATATTTCTGGATATGAACATCCAATTGAAAAA 1300
1301 AAAAAAAAAAAAAA 1314

```

【図2】

イネRIP2 cDNAの塩基配列と翻訳されるアミノ酸配列

```

1   CAGCAATCCTCTGCTTTTGTGTCAGTTGTAGTTCACAACGATCGAGCATCCG   50
51  GCCATGGCGTTGAACCGGCTGTTACCGTGACGTTCAACGTGAGCGGCAG   100
    M A L N P L F T V T F N V S G S
101 CGGCAGCGACAACACTACGGCGACTTCATCGCCGGCATCCGCAAGAGGGTGG   150
    G S D N Y G D F I A G I R K R V
151 CCAACCCGAGGCACCTTCTCCACAACCGCCCGTCTCCGCGCGGTGGAG   200
    A N P R H F S H N R P V L P P V E
201 CCCGACGTCCCGCCGCGCGCTGGTTCACGTCGTGCTCCGGACGCAGAC   250
    P D V P P R R W F H V V L R T Q T
251 CAGCGAGCTCAGCTCGCCACGCGCGCCGACAACCTTACCTGGAGGGCT   300
    S E L T L A T R A D N L Y L E G
301 TCCGCGGCAGCGACCGCACCGCGTGGTGGGAGCTCACCGCGCGCTC   350
    F R G S D G T S A W W E L T R G L
351 ATCGCCGGCGCCACCTACCTCGGCTTCGGCGGCTCGTACCGCGAGCTCCT   400
    I A G A T Y L G F G G S Y R E L L
401 CGGGCACACGGACAACATGGTCGGTGTACGCTCGGCCCGCAGCAGATGA   450
    G H T D N M V G V T L G P Q Q M
451 CGCAGGCCGTGGACACGCTCGCCGGTCTCGCCGCCAGCGCGCGCGCGCG   500
    T Q A V D T L A G L A A S G G G A
501 GCGCGGCAACGGCCCGCGGAGCGTTCGGCAGCCTGCTCCTGATGGTGAA   550
    A R Q R A G E A L A T L L L M V N
551 CGAAGCCGTGCGTTTCCTGACCGTGGCGGAGCTTGTGGCGCGCTTCATGA   600
    E A V R F L T V A E L V G G F M
601 ACCCCAGGGCGGTGAGGAAGAGCGGGACGATCACCGCGACATGAAGGAG   650
    N P R A V R K S G T I T A D M K E
651 CAGGTGAACGGGTGGAAGGTCTTGTCCAGGGCGCTGCTCACCATGGACGC   700
    Q V N G W K V L S R A L L T M D A
701 GCTGCAGCTAGAGGACTCCAACCTCGCGCTCCAAGCACAACAAGGTGGATA   750
    L Q L E D S N S A S K H N K V D
751 CAAAGAAGATGGAGCAGGAGAAGAAGCGTGGGAGCGCGCGGACAAGTTG   800
    T K K M E Q E K K A W E A A E K L
801 GCCGTGGAGGCGGCAAGGCGGTGGGATCCTGCTGTTCCGTCGAGAAGGT   850
    A V E A A K A V G I L L F V E K V
851 GCCGGCGGGATGACGAAGGCGACGGCGCTTCAGCTGTTTCATGGGAACT   900
    P A G M T K A T A L Q L F H G N
901 AAAGTTGCTGCTGCTGGTAGATTTGAGCTTGCTTGATCGAACAGCAAATC   950
    *
951 AATCTGAGCGACTCGAGTAAAATTGATTCTCCCTCCAACCCAAAATATAA   1000
1001 GTATTTTCAGTTATTAATCTGGACAACCTGCGTGTCCAGATACATAGACAA   1050
1051 AAGTTGTTATATTTTGAGACGGTTGTTATATTTGGCAGCGAGGCAGTAG   1100
1101 TTAATAAGCCTCTATAGTGTGATGTAACACTATATACTCCCTTCGTCCC   1150
1151 AAAAAAGACAAACTGGTCTCCGTGTCCAACGTTTGACTGTCCGTCTTA   1200
1201 TATGAAATTTTTTTTATAATTAATATTTTCATTGTTGTTAGATGATAAAA   1250
1251 CATGATTAATAATTTATGTGTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA   1300

```


【図4】

エンバクRIP cDNAの塩基配列と翻訳されるアミノ酸配列

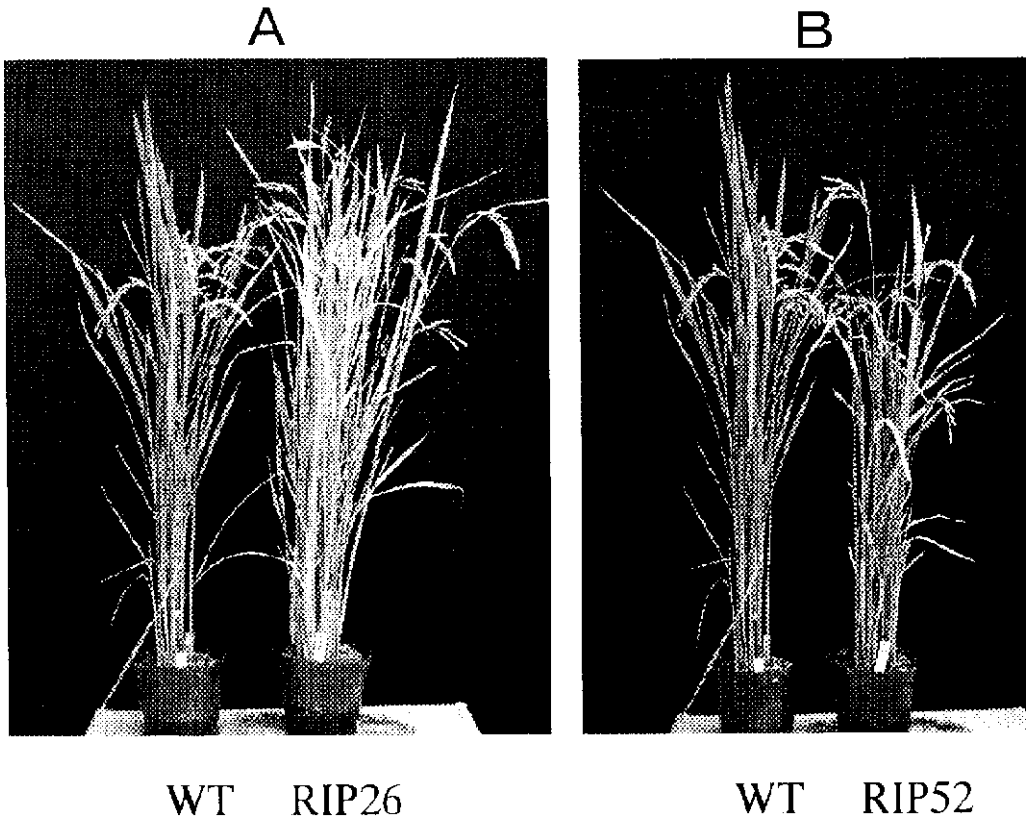
```

1   ATTATTGTCGCTCATCTTCCCATCGATCGATCCCATGGCTGGGACCAA   50
                                     N A A T N
51  CGTCACCACCAACGAGCTCTTACCAAGAACTTCGACCTGGGAGCAAGG   100
    V T T N E L F T K N F D L G S N
101 ACAACTAGGCAGCCTCATCACCAGCATCCGCAACGAGCTGGGCAACCGG   150
    D N Y G S L I T S I R N E L G N P
151 AGGCACTTCTCACAACCGCCCGTGGTCCGCCGGTGGAGCCCAACGT   200
    R H F S H N R P V L P P V E P N V
201 CCCGCCGGCCGGTGGTCCACATCAAGCTCAAGGCCCGGTGACCGGGC   250
    P P G R W F H I K L K A P V T G
251 CCGAACTCACAATCACCACGGCGCGGACAACCTCTACCTGGAGGGCTTC   300
    A E L T I T T R A D N L Y L E G F
301 AGGAACAGCGACGGCTCATGGTGGGAGCTCACTCGGGCTCATCCCCGG   350
    R N S D G S W W E L T R G L I P G
351 CGCCTCCTACGTGGGCTTCGGCGGAGCTACGGCGACCTCCTCGGGGACT   400
    A S Y V G F G G S Y R D L L G D
401 CGGAGAATTTGTCTGCCGTGCTCCTCGGCCGAAGAAGATGATCGATGCC   450
    S E N L S G V V L G P K K M I D A
451 GTCAATGTGCTCGCCGGCCTCACCAGGGCCGACCTCGCATCCAGCCAGAA   500
    V N V L A G L T R A D L A S S Q K
501 GCAGAAGCAGGCCAAGGACGGGTGGCGGCTGCTCCTGATGTTGCACG   550
    Q K Q A K D A V A A L L L M V H
551 AGGCCACACGGTTCAGTCCGTGTCGGCGTTGTTGGCCGACTTGATGCAC   600
    E A T R F Q S V S A F V A D L M H
601 CCCAAGACTGGGATAAGACGGGACCATCACCAAGGAGATGAAAGCCCA   650
    P K T G D K S G T I T K E M K A Q
651 GGTGAACGGGTGGCAGAACCTGTCCGGCGGCTGCTGACGACGGACGCCA   700
    V N G W Q N L S A A L L T T D A
701 AGCCGCCGGGAAGTTCACGCCGTTCGAGAATATGGGGTGAATACGGTG   750
    K P P G K F T P F E N M G V N T V
751 GAACAGGCGGCCGCCAGGTGGGGATCCTGCTGTTGTCGAGGTGCCAGG   800
    E Q A A A T V G I L L F V E V P G
801 CGGGTTGACTGCTGCTCAGGCGCTCAAGTGTTTCATGGGAAGTAGCTAG   850
    G L T A A Q A L K L F H G N *
851 CTAGACTGATGCCTCAGCAGCGAATAATCCTACTACTGTAATCACTTTC   900
901 TATAGTCTGTAATAATGTAAGTCAATTTGAATAAATCTGTGTGAGAGTAG   950
951 TCAATCATGAATAAAGAAGTGGATGTTCCACCCAAAAAAAAAAAAAAAAA   1000
1001 AAAAAAAAAAAAAAAAAA   1015

```

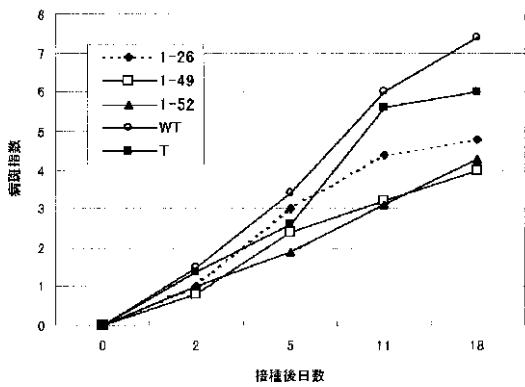
【図6】

原品種およびイネRIP cDNA導入系統の成苗



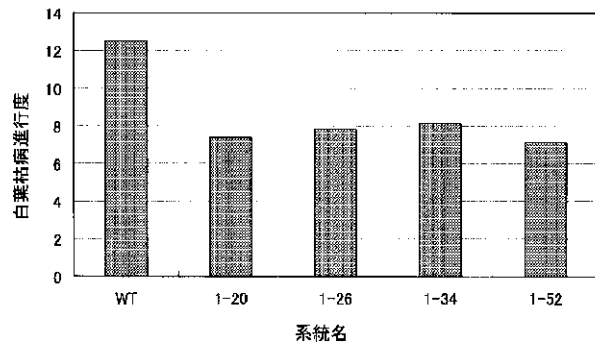
【図9】

イネRIP1遺伝子組換え系統のいもち病抵抗性



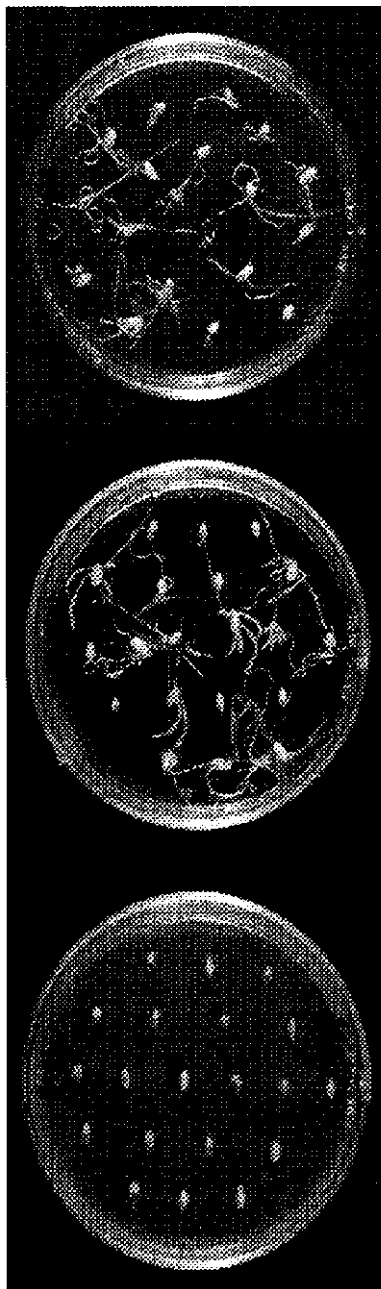
【図11】

RIP1遺伝子組換え系統の白葉枯病接種検定



原品種および組換え系統T₁種子のハイグロマイシン選抜

A: WT B: RIP26 C: RIP52

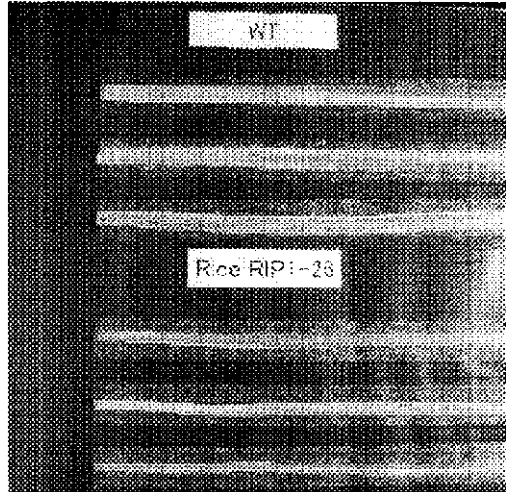


【図7】

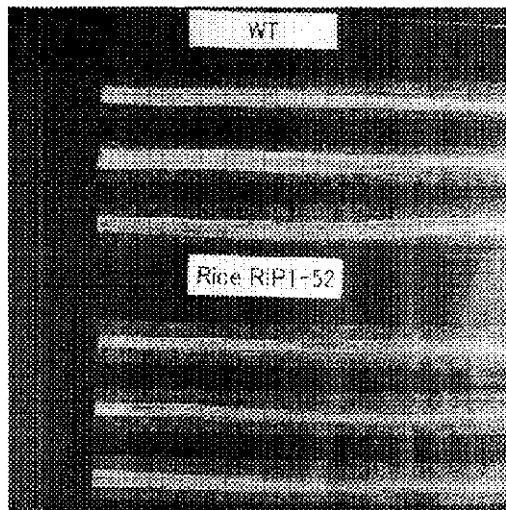
【図10】

イネRIP1組換え系統の白葉枯病接種検定

A

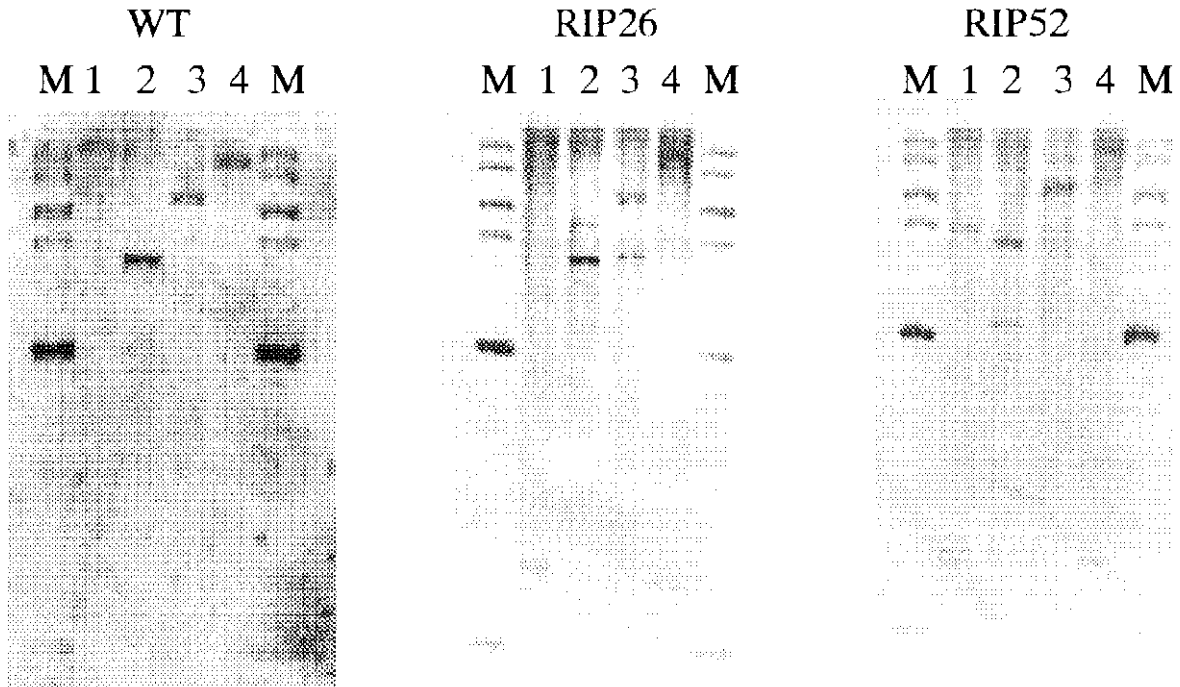


B



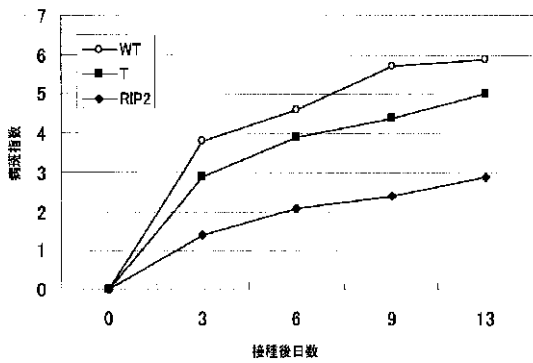
【図12】

ゲノミックサザン法による導入RIP遺伝子の確認



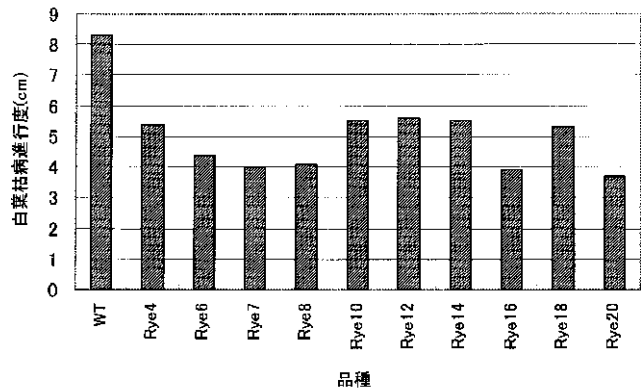
【図15】

RIP2遺伝子導入系統の いもち病抵抗性程度

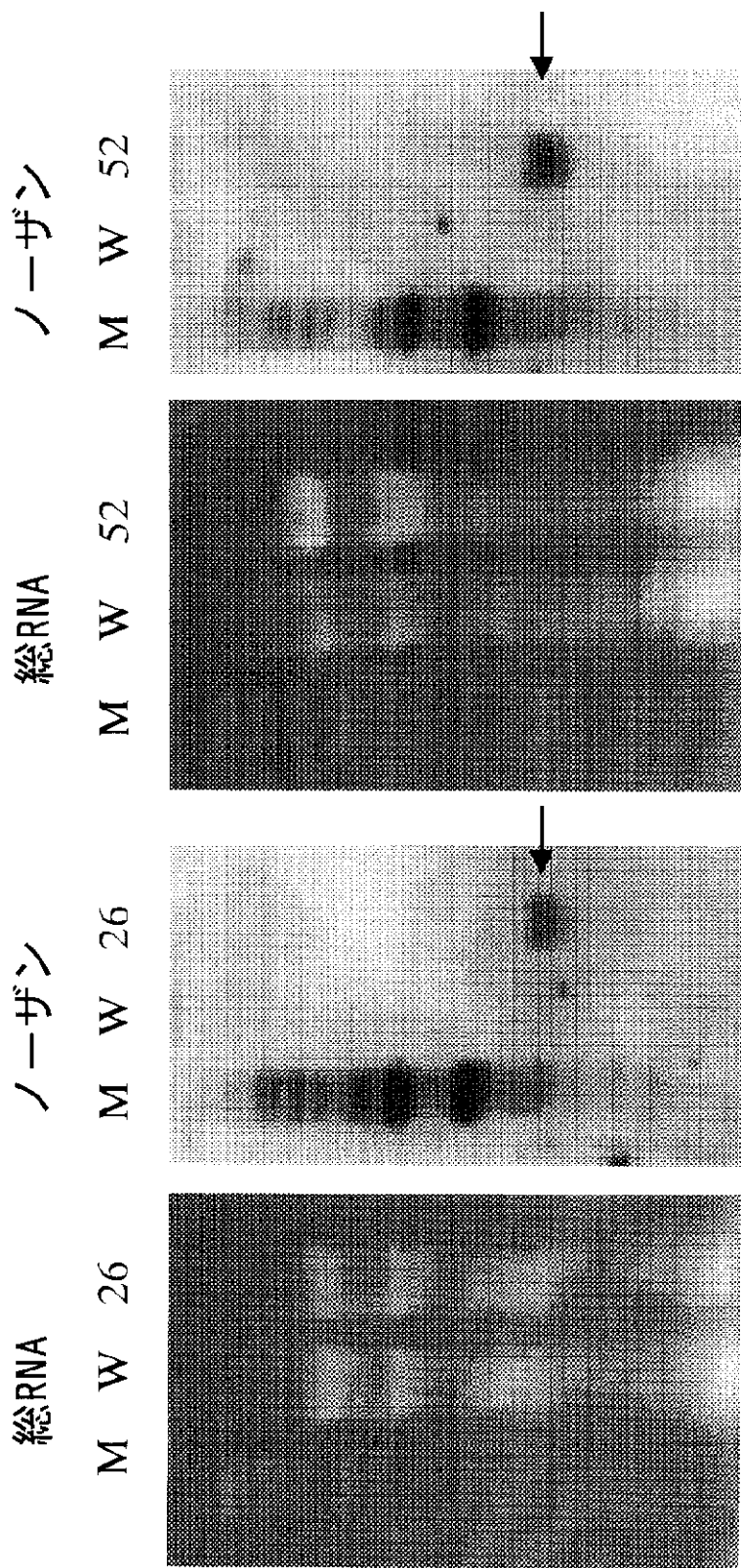


【図21】

ライ麦RIP遺伝子導入系統の白葉枯病接種検定

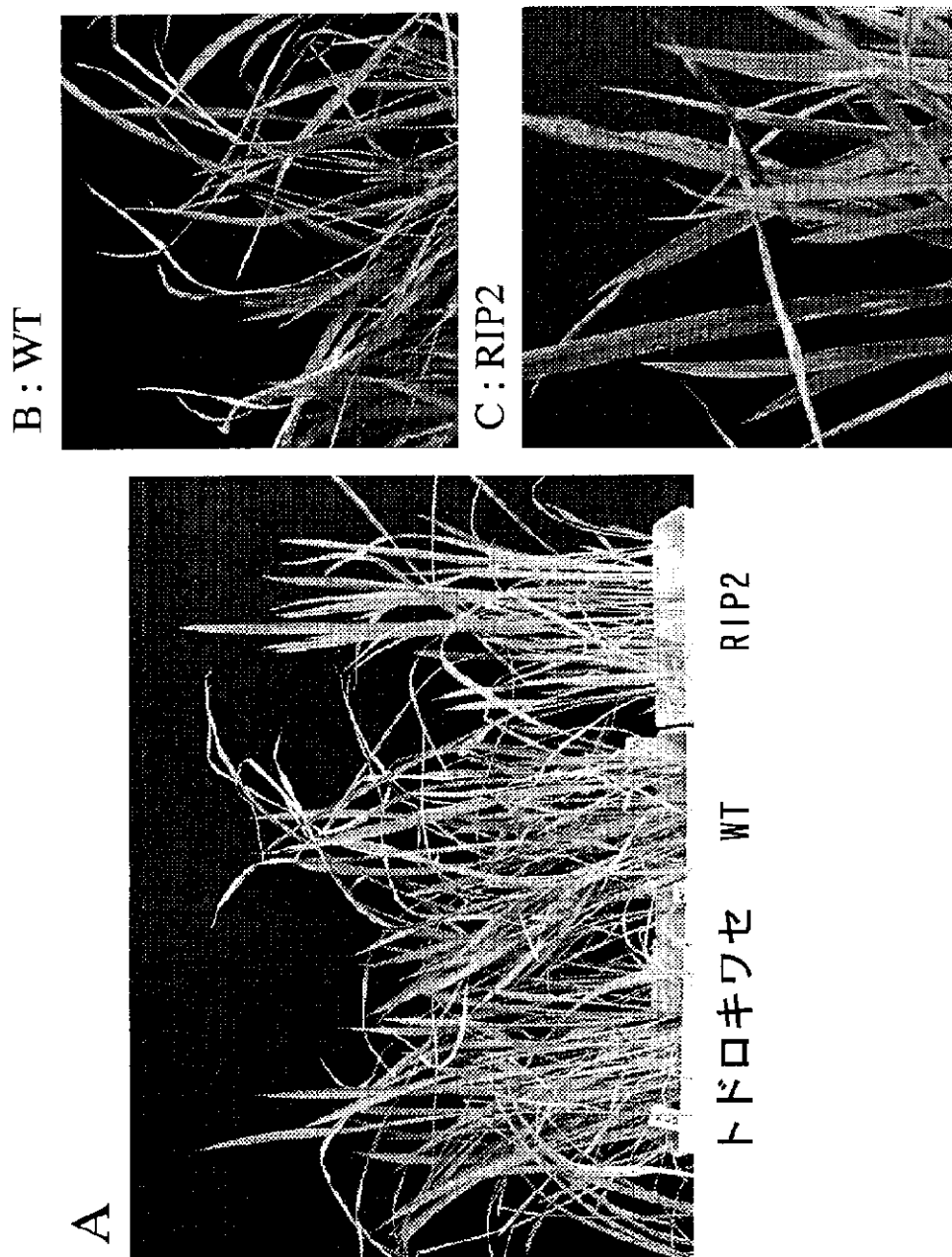


ノーザン法によるイネRIP1 mRNAの発現調査



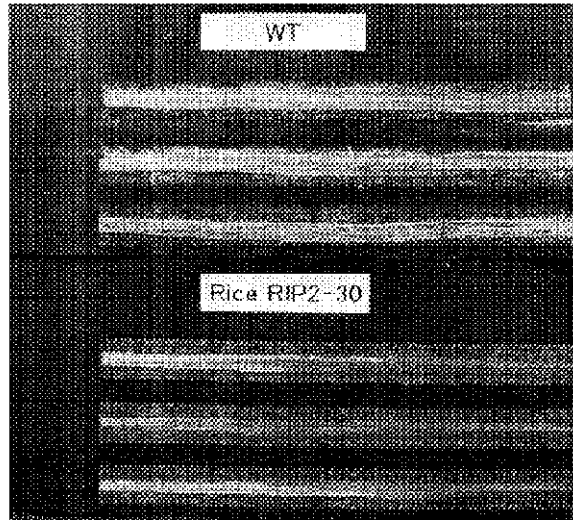
いもち病（レース007）の噴霧接種検定

【図14】



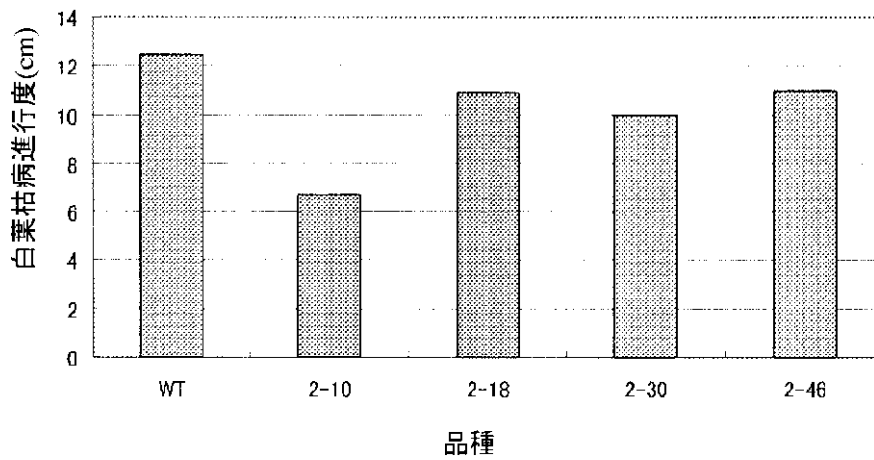
【図16】

RIP2遺伝子導入系統の白葉枯病接種検定



【図17】

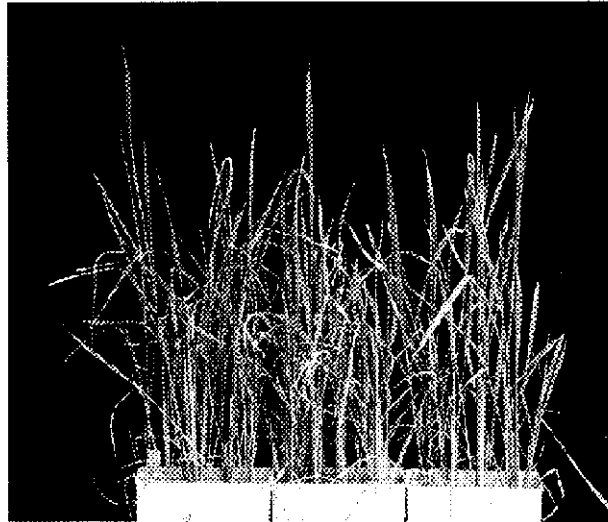
RIP2遺伝子導入系統の白葉枯病接種検定



【図18】

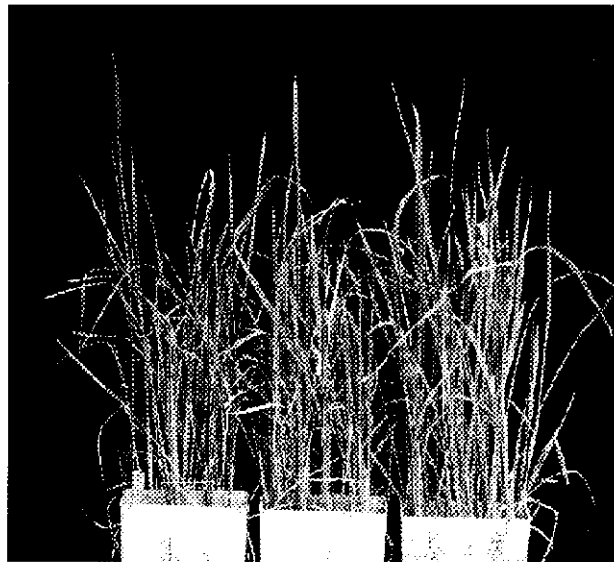
いもち病（レース007）の噴霧接種検定

A



トドロキワセ WT RRIP7

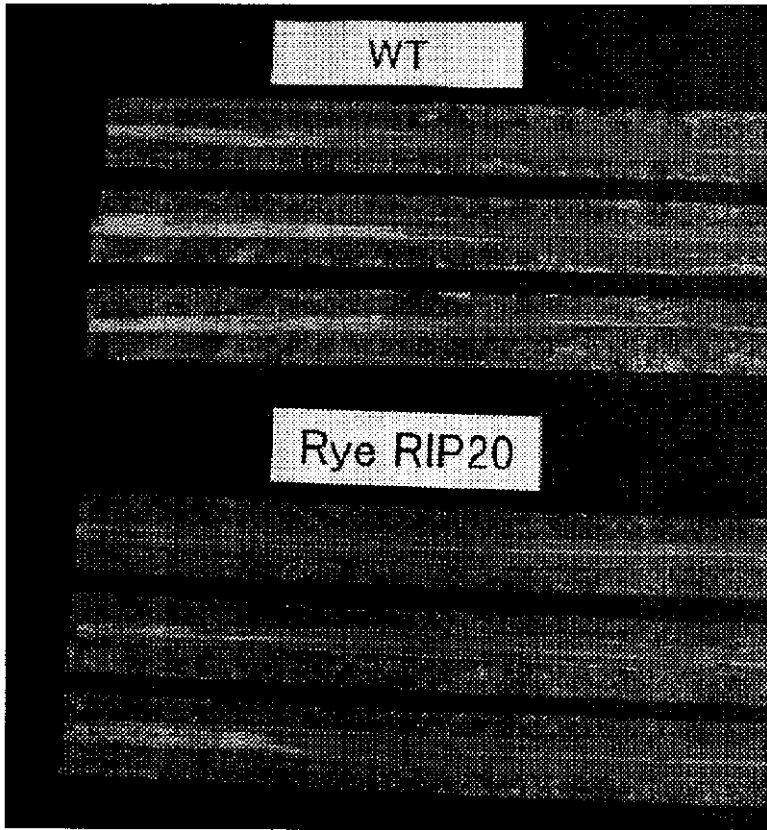
B



トドロキワセ WT RRIP26

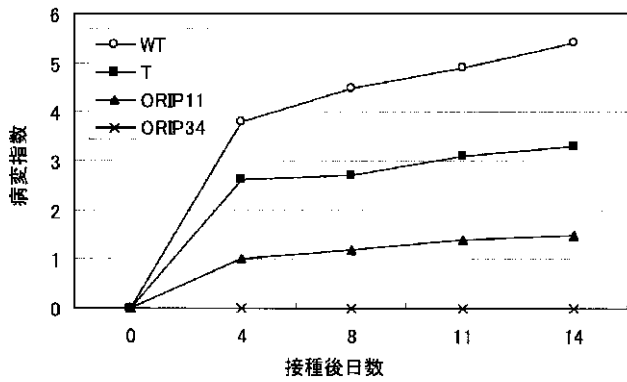
【図20】

ライ麦RIP遺伝子導入系統の白葉枯病接種検定



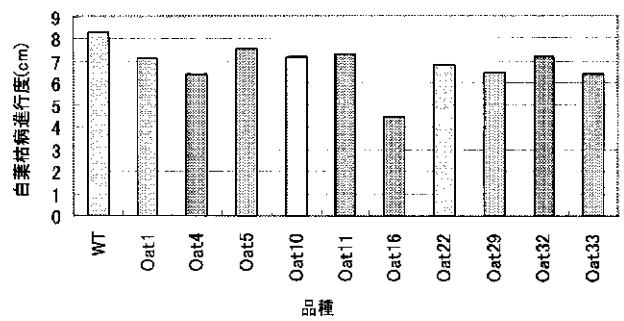
【図23】

エンバクRIP遺伝子導入系統の いもち病抵抗性程度



【図25】

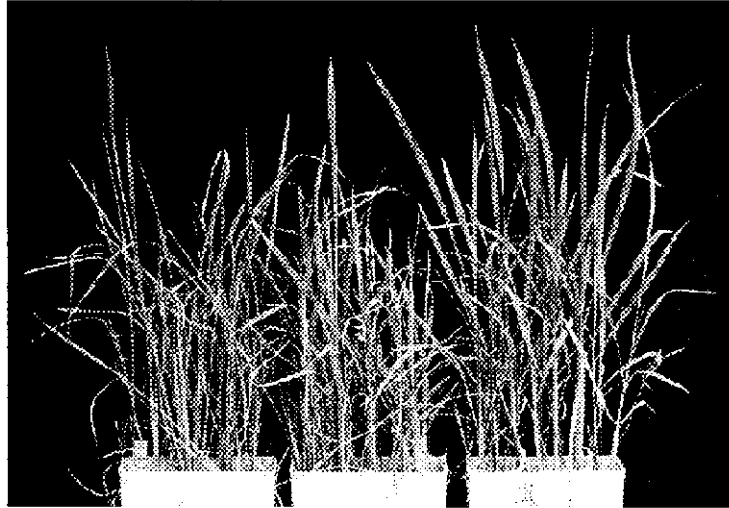
エンバクRIP遺伝子導入系統の白葉枯病接種検定



【図22】

いもち病（レース007）の噴霧接種検定

A



トドロキワセ WT ORIP11

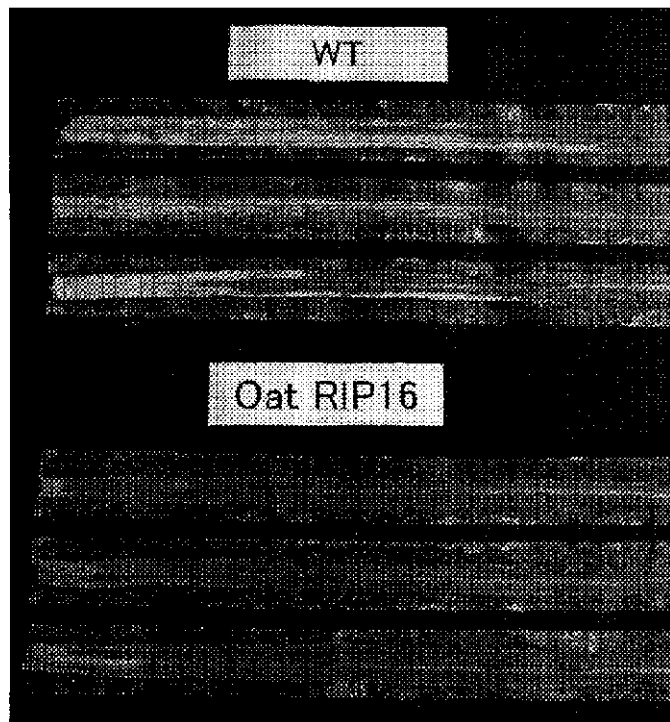
B



トドロキワセ WT ORIP34

【図 24】

エンバクRIP遺伝子導入系統の白葉枯病接種検定



フロントページの続き

(72)発明者 黒田 秧
新潟県上越市南新町 5 - 20 107
(72)発明者 重宗 明子
新潟県上越市本城町 1 - 26 104

Fターム(参考) 2B030 AA00 AB03 AD04 CA15 CA17
CA19
4B024 AA08 BA12 CA01 DA01 GA11
GA17 HA20
4B050 CC03 DD13 EE10 LL10
4B065 AA88X AA88Y AB01 AC14
AC20 BA02 BC50 CA31 CA53