

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3839344号

(P3839344)

(45) 発行日 平成18年11月1日(2006.11.1)

(24) 登録日 平成18年8月11日(2006.8.11)

(51) Int. Cl.	F I		
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A	
A O 1 H 1/00 (2006.01)	A O 1 H 1/00	A	
A O 1 H 5/00 (2006.01)	A O 1 H 5/00	A	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	C	

請求項の数 8 (全 27 頁)

(21) 出願番号	特願2002-121275 (P2002-121275)	(73) 特許権者	501167644
(22) 出願日	平成14年4月23日(2002.4.23)		独立行政法人農業生物資源研究所
(65) 公開番号	特開2003-310267 (P2003-310267A)		茨城県つくば市観音台2丁目1-2
(43) 公開日	平成15年11月5日(2003.11.5)	(73) 特許権者	503360115
審査請求日	平成15年7月1日(2003.7.1)		独立行政法人科学技術振興機構
			埼玉県川口市本町4丁目1番8号
特許法第30条第1項適用	2001年12月10日に	(74) 代理人	100102978
、神奈川県のパシフィコ横浜で開催された第24回日本	分子生物学会年會合においてArun Sharma氏		弁理士 清水 初志
らによって発表された事項(演題番号2P-079)	(対応講演要旨;第24回に本分子生物学会年會プログラム・講演要旨集、494頁、2P-079)	(74) 代理人	100108774
			弁理士 橋本 一憲
		(72) 発明者	小松 節子
			茨城県つくば市観音台2-1-2 独立行政法人農業生物資源研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】低温ストレスに応答するCRTintP遺伝子およびその利用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記(a)~(c)のいずれかに記載のDNA。

(a) 配列番号: 2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA。

(b) 配列番号: 1に記載の塩基配列のコード領域を含むDNA。

(c) 配列番号: 1に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズする植物由来のDNAであって、配列番号: 2に記載のアミノ酸配列と95%以上の同一性を示すアミノ酸配列を有し、低温耐性を付与できる機能を有するタンパク質をコードするDNA。

【請求項2】

請求項1に記載のDNAを含むベクター。

【請求項3】

請求項1に記載のDNAを発現可能に保持する形質転換植物細胞。

【請求項4】

さらに、カルレティキュリンをコードするDNAで形質転換された、請求項3に記載の形質転換植物細胞。

【請求項5】

請求項3または4に記載の形質転換植物細胞を含む形質転換植物体。

【請求項6】

請求項5に記載の形質転換植物体の子孫またはクローンである、形質転換植物体。

【請求項7】

請求項5または6に記載の形質転換植物体の繁殖材料。

【請求項8】

請求項5に記載の形質転換植物体の製造方法であって、

(a) 請求項1に記載のDNA、または

(b) 請求項1に記載のDNAおよびカルレティキュリンをコードするDNA

を植物細胞に導入し、該植物細胞から植物体を再生させる工程を含む方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、低温ストレスに応答するCRTintP遺伝子およびその利用に関する。

【0002】

【従来の技術】

植物は通常の生育温度（植物種によって異なる）の範囲以外では、生育障害や生殖障害を起こし、種の保存にとって極めて不利な状況（強いストレスがかかっている状況）に置かれる。そのため、高温ストレスや低温ストレスに対して、植物は特定の遺伝子発現を誘導してストレスに対応する仕組みを有している（佐藤直樹，組織培養，19：357 1993；T howashou M, Adv. Genet., 28：99 1990）。低温ストレスに対しては、（Koga-ban Y, Abe M, Kitagawa Y, Plant Cell Physiol., 32：901-905 1991）などの例に見られるように、低温ストレスがかかってから数日後に遺伝子発現が誘導されるなど、ストレス応答に時間がかかる例が多い。

【0003】

細胞質カルシウムは、動物や植物において、多くの内在性シグナル、または、環境性シグナルのためのセカンドメッセンジャーとして認識されている。植物においては、細胞質カルシウムの上昇は、オーキシンやアブシジン酸のようなホルモン、低温ストレスや機械的ストレスのような非生物性の環境シグナル、共生生物や病原体の認識に関与する生物性のシグナルによって引き起こされる。

【0004】

カルシウム結合タンパク質であるカルレティキュリン（CRT）は、細胞接着、細胞内カルシウムのホメオスタシスの維持、タンパク質フォールディング、環境ストレス応答に関与する多機能調節因子として動物では働いている（Kwor MS, Park CS, Choi K, Ahnn J, Kim JI, Eom SH, Kauzman SJ, Song WK, Mol. Biol. Cell 11：1433-14443 2000）。すでに、CRP55、Calregulin、HACBP、ERP60、CALBPおよびCaBP3は全てCRTであると確認されている。また、イネのCRTは、クローニングされており、イネカサの再分化率の抑制及びイネの茎葉伸長制御に関与していることが知られている（Li Z, Komatsu S, Eur. J. Biochem., 267：737-745 2002）。しかしながら、その作用の分子機構は不明な点が多い。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、その目的は、CRTと相互作用するタンパク質をコードする遺伝子を単離・同定し、該遺伝子およびその利用方法を提供することにある。より具体的には、CRTintP遺伝子、該遺伝子を有する形質転換植物体、および、該形質転換植物体の製造方法を提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】

CRTは他のタンパク質と相互作用して機能を発現することが知られているため（Corbett E F, Oikawa K, Francois P, Tessier OC, Kay C, Bergeron JJ, Thomas DY, Krause KH, Michalak M, J. Biol. Chem., 274：6203-6211 1999）、酵母のツーハイブリッド法（Fields, Song, Nature, 340：245-246 1989）を用いて、CRTと相互作用するタンパク質の遺伝子の単離を試みた。具体的には、イネ培養細胞由来cDNAライブラリーを用いたツー

10

20

30

40

50

ハイブリッド法を行ない、2回の実験群において対照と比較した。その結果、CRTと相互作用するタンパク質（CRTintPと命名）をコードする遺伝子が特異的に検出された。さらに、CRTintPをコードする完全長cDNAを単離し、該CRTintPをコードする遺伝子は、新規遺伝子であることを見出した。また、低温ストレス下のイネ葉身におけるCRT遺伝子及びCRTintP遺伝子の発現を解析した結果、CRT遺伝子及びCRTintP遺伝子は、共に低温ストレス15分後に顕著に発現し、30分で既にピークに達していることが明らかになった。

【0007】

即ち、本発明は、

〔1〕下記（a）～（d）のいずれかに記載のDNA、

（a）配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA、

10

（b）配列番号：1に記載の塩基配列のコード領域を含むDNA、

（c）配列番号：2に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA、

（d）配列番号：1に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA、

〔2〕植物において低温ストレスにตอบสนองして発現する、〔1〕に記載のDNA、

〔3〕〔1〕または〔2〕に記載のDNAを含むベクター、

〔4〕〔1〕または〔2〕に記載のDNAを発現可能に保持する形質転換植物細胞、

〔5〕さらに、カルレティキュリンをコードするDNAで形質転換された、〔4〕に記載の形質転換植物細胞、

20

〔6〕〔4〕または〔5〕に記載の形質転換植物細胞を含む形質転換植物体、

〔7〕〔6〕に記載の形質転換植物体の子孫またはクローンである、形質転換植物体、

〔8〕〔6〕または〔7〕に記載の形質転換植物体の繁殖材料、

〔9〕〔6〕に記載の形質転換植物体の製造方法であって、

（a）〔1〕または〔2〕に記載のDNA、または

（b）〔1〕または〔2〕に記載のDNAおよびカルレティキュリンをコードするDNA

を植物細胞に導入し、該植物細胞から植物体を再生させる工程を含む方法、

を提供するものである。

【0008】

【発明の実施の形態】

30

本発明は、CRTintPをコードするDNAを提供する。該DNAは、好ましくは植物において低温ストレスにตอบสนองして発現する性質を有する。

【0009】

本発明のDNAが由来する植物としては、特に制限はなく、イネ、ダイズ、ソバ、野菜、根菜、果菜、果実類などが例示できる。

【0010】

また、本発明においては、ある温度からその温度より低い温度に植物を移行させることで、低温ストレスを与えることができる。例えば、幼苗期（発芽後2週間）のイネの植物体あるいはセグメントを室温から5℃へ移行させる処理を経時的（例えば、2分～48時間）に行うことで、植物に低温ストレスを与えることができるが、この方法に限定されるものではない。

40

【0011】

本発明のCRTintPをコードするDNAとしては、例えば配列番号：1に記載の塩基配列のコード領域を含むDNAや配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNAが挙げられる。

【0012】

また、本発明は、配列番号：2に記載のCRTintPと構造的に類似しており、CRT（カルレティキュリン）と相互作用するタンパク質をコードするDNAを包含する。このようなDNAは、好ましくは植物において低温ストレスにตอบสนองして発現する性質を有する。

【0013】

50

あるDNAがCRTと相互作用するタンパク質をコードするか否かは、当業者に周知の方法で検証することができる。例えば、酵母のツーハイブリッド法、免疫沈澱法、アフィニティーカラム法、プロテインチップ法、センサー法などが挙げられる。

【0014】

また、あるDNAが低温ストレスに応答して発現するタンパク質をコードするか否かは、例えば、被検DNAが導入された植物において、低温ストレス依存に該タンパク質または該タンパク質をコードするmRNAが誘導されるか否かで検証することができる。

【0015】

このようなDNAには、例えば、配列番号：2に記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および/または挿入されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする変異体、誘導體、アリル、バリエーションおよびホモログが含まれる。

10

【0016】

アミノ酸配列が改変されたタンパク質をコードするDNAを調製するための当業者によく知られた方法としては、例えば、site-directed mutagenesis法 (Kramer W, Fritz H-J, Methods Enzymol 154: 350 1987) が挙げられる。また、自然界においても、塩基配列の変異によりコードするタンパク質のアミノ酸配列が変異することは起こり得る。このように、CRTintPのアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、および/または挿入されたアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNAであっても、天然型のCRTintP (配列番号：2) と同等の機能を有するタンパク質をコードする限りは、本発明のDNAに含まれる。また、たとえ塩基配列が変異していても、その変異がタンパク質中のアミノ酸の変異を伴わないこと (縮重変異) があるが、このような縮重変異体も本発明のDNAに含まれる。

20

【0017】

配列番号：2に記載のCRTintPと機能的に同等なタンパク質をコードするDNAを調製するために、当業者によく知られた他の方法としては、ハイブリダイゼーション技術 (Southern EM, J. Mol. Biol., 98: 503 1975) やポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 技術 (Saiki RK, et al., Science, 230: 1350 1985 ; Saiki RK, et al., Science, 239: 487 1988) を利用する方法が挙げられる。すなわち、CRTintP遺伝子の塩基配列 (配列番号：1) もしくはその一部をプローブとして、またCRTintP遺伝子 (配列番号：1) に特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドをプライマーとして、イネや他の植物からCRTintP遺伝子と高い相同性を有するDNAを単離することは、当業者にとって通常行い得ることである。このように、ハイブリダイゼーション技術やPCR技術によって単離し得るCRTintPと同等の機能を有するタンパク質をコードするDNAもまた、本発明のDNAに含まれる。

30

【0018】

このようなDNAを単離するためには、好ましくはストリンジेंटな条件下でハイブリダイゼーション反応を行う。本発明においてストリンジेंटなハイブリダイゼーション条件とは、6M 尿素、0.4% SDS、0.5×SSCの条件またはこれと同等のストリンジエンシーのハイブリダイゼーション条件を指す。よりストリンジエンシーの高い条件、例えば、6M 尿素、0.4% SDS、0.1×SSCの条件下では、より相同性の高いDNAを単離できることが期待される。高い相同性とは、アミノ酸配列全体で少なくとも50%以上、好ましくは70%以上、さらに好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の配列の同一性を指す。

40

【0019】

アミノ酸配列や塩基配列の同一性は、カーリンおよびアルチュールによるアルゴリズムBLAST (Karlin S, Altschul SF, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 2264-2268 1990 ; Karlin S, Altschul SF, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 5873-5877 1993) を用いて決定できる。BLASTのアルゴリズムに基づいたBLASTNやBLASTXと呼ばれるプログラムが開発されている (Altschul SF, et al., J. Mol. Biol., 215: 403 1990)。BLASTNを用いて塩基配列を解析する場合は、パラメーターは、例えばscore=100、wordlength=12とする。また、BLASTXを用いてアミノ酸配列を解析する場合は、パラメーターは、例えばscore=50、wordlength=3とする。BLASTとGapped BLASTプログラムを用いる場合は、各ブ

50

プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。

【0020】

本発明のCRTintPをコードするDNAには、ゲノムDNA、cDNAおよび化学合成DNAが含まれる。ゲノムDNAおよびcDNAの調製は、当業者にとって常套手段により行うことが可能である。ゲノムDNAは、例えば、CRTintP遺伝子を有するイネ品種からゲノムDNAを抽出し、ゲノミックライブラリー（ベクターとしては、例えば、プラスミド、ファージ、コスミド、BAC、PACなどが利用できる）を作製し、これを展開して、本発明のDNA（例えば、配列番号：1）を基に調製したプローブを用いてコロニーハイブリダイゼーションあるいはブランクハイブリダイゼーションを行うことで調製できる。また、本発明のDNA（例えば、配列番号：1）に特異的なプライマーを作製し、これを利用したPCRを行って調製することも可能である。cDNAは、例えば、CRTintP遺伝子を有するイネ品種から抽出したmRNAを基にcDNAを合成し、これをZAPなどのベクターに挿入してcDNAライブラリーを作製し、これを展開して、上記と同様にコロニーハイブリダイゼーションあるいはブランクハイブリダイゼーションを行うことで、またPCRを行うことにより調製できる。

10

【0021】

また、本発明において、CRTintPをコードするDNAは、CRTと相互作用するタンパク質をコードするDNAとして同定された。一方、CRTをコードするDNAを用いることで、植物に矮化形質を付与できること、さらに、植物に低温ストレス応答性の形質を付与できることが知られている。よって、本発明のDNAは、このような有用なDNAを単離するためのツールになりうる。

20

【0022】

また、CRTintPは、イネカサの再分化率の抑制及びイネの茎葉伸長制御に関与しているCRTと相互作用する。よって、CRTintPもまた、植物細胞の再分化率や植物の茎葉伸長を制御している可能性がある。本発明のDNAは、再分化率が改変された植物細胞や茎葉伸長が改変された形質転換植物体を作出することにも利用できると考えられる。

【0023】

本発明において、CRTintPをコードするDNAとCRTをコードするDNAはともに、低温ストレスに应答することが見出された。よって、本発明のDNAとCRTをコードするDNAはともに、低温に耐性を示す形質転換植物体を作出することに利用できる。

30

【0024】

本発明において、形質転換植物体を作製するには、本発明のDNA、または、本発明のDNAおよびCRTをコードするDNAが挿入されたベクターを植物細胞に導入し、これにより得られた形質転換植物細胞を再生させる。

【0025】

本発明において、植物細胞が由来する植物としては、特に制限はない。また、植物細胞の形質転換に用いられるベクターは、該細胞内で挿入遺伝子を発現させることが可能なものであれば特に制限はない。例えば、植物細胞内で恒常的に遺伝子を発現させるためのプロモーター（例えば、カリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーター）を有するベクターや、外的な刺激により誘導的に活性化されるプロモーターを有するベクターを用いることもできる。ここで言う「植物細胞」には、種々の形態の植物細胞、例えば、懸濁培養細胞、プロトプラスト、葉の切片、カルスなどが含まれる。

40

【0026】

植物細胞へのベクターの導入には、ポリエチレングリコール法、電気穿孔法（エレクトロポレーション法）、アグロバクテリウムを介する方法、パーティクルガン法など、当業者に公知の種々の方法を用いることができる。アグロバクテリウムを介する方法においては、例えば、超迅速単子葉形質転換性（特許第3141084号）を用いることが可能である。また、パーティクルガン法においては、例えば、バイオラッド社のものを用いることが可能である。形質転換植物細胞からの植物体の再生は、植物細胞の種類に応じて当業者に公知の方法で行うことが可能である（Toki S, et al., Plant Physiol., 100: 1503 1995

50

)。

【0027】

例えば、イネにおいて形質転換植物体を作成する手法については、ポリエチレングリコールを用いてプロトプラストへ遺伝子導入し、植物体（インド型イネ品種が適している）を再生させる方法（Datta SK: In Gene Transfer To Plants (Potrykus I and Spangenberg, Eds) pp.66-74 1995）、電気パルスによりプロトプラストへ遺伝子導入し、植物体（日本型イネ品種が適している）を再生させる方法（Toki S, et al., Plant Physiol., 100: 1503 1992）、パーティクルガン法により細胞へ遺伝子を直接導入し、植物体を再生させる方法（Christou P, et al., Biotechnology 9: 957 1991）、およびアグロバクテリウムを介して遺伝子を細胞へ導入し、植物体を再生させる方法（Hiei Y, et al., Plant J., 6: 271 1994）など、いくつかの技術が既に確立し、本願発明の技術分野において広く用いられている。本発明においては、これらの方法を好適に用いることができる。なお、パーティクルガン法により遺伝子を導入する細胞は、例えば、タバコBY-2細胞が挙げられる。タバコBY-2細胞は、例えば細胞バンク等から容易に得ることができる。

10

【0028】

ゲノム内に本発明のDNAが導入された形質転換植物体があったら得られれば、該植物体から有性生殖または無性生殖により子孫を得ることができる。また、該植物体やその子孫あるいはクローンから繁殖材料（例えば、種子、果実、切穂、塊茎、塊根、株、カルス、プロトプラストなど）を得て、それらを基に該植物体を量産することも可能である。本発明

20

【0029】

このようにして作出された植物体は、野生型植物体と比較して、低温に耐性となっていると考えられる。よって、本発明の手法は、寒冷地などで農作物（好ましくは有用農作物）を収穫する上で非常に有益である。また、本発明の形質転換植物体を、本発明のDNAがコードするタンパク質の製造に利用することも可能である。製造されたタンパク質は、植物の矮化や低温ストレス応答などに関与するCRTおよびCRTをコードするDNAを単離するために有用である。

30

【0030】

【実施例】

以下、本発明を実施例により、さらに具体的に説明するが本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

[実施例1]

CRTはイネカルスの再分化率の抑制及びイネの茎葉伸長制御に関与しているが、その作用の分子機構は不明な点が多い。その分子機構解明を目的に、酵母ツーハイブリッド法（Fields, Song, Nature, 340: 245-246 1989）を利用して、CRTと相互作用する遺伝子群を検出した（表1）。具体的には、イネ培養細胞由来cDNAライブラリーを用いたツーハイブリッド法を行ない、2回の実験群において対照と比較した。その結果、CRTと結合するクローンの数は、実験1においては7個、実験2においては15個が得られた。これら22個について、遺伝子解析を行ったところ、全て同じRNA由来であることが明らかとなった。本発明者らは、CRTと相互作用するタンパク質をCRTintPと命名した。一方、対照として培養細胞で発現していない遺伝子であるルビスコアクチベース（RuBisCO activase）を用いてツーハイブリッドを行ったところ、CTRintPは結合しなかった。CRTと相互作用する残るクローンは、実験1においては無く、実験2においては6クローン得られた。残る6クローンはCTRintPをコードせず、それぞれ違うRNA由来と考えられるが機能未知であった。

40

【0031】

【表1】

	対照 (ルビスコアクチベース)	CRT #1	CRT #2
CRTintP	0	7	15
その他	23	0	6
総計(個)	23	7	21

【0032】

[実施例2]

検出されたCRTに結合する遺伝子について、2回の実験群において対照と比較して、多く重複して検出された遺伝子の部分配列を元に、cDNAライブラリー（イネ葉身由来のものを使用）をスクリーニングした結果、CRTintPの完全長cDNAを単離した。その結果、CRTintP遺伝子は3401塩基で966アミノ酸をコードする遺伝子（配列番号：1）であり、DDBJ等のデータベースには登録されておらず新規遺伝子であった。また、該遺伝子は、分子量約11万ダルトンのタンパク質をコードすることが判明した。

【0033】

[実施例3]

CRTintP遺伝子のゲノム中に存在する数を確認するために、[$-^{32}\text{P}$]dCTPで標識したCRTintP cDNA由来の2300塩基対のDNAプローブを用いて、42 の条件下でハイブリダイゼーションを行い、サザンブロッティングを行ったところ、CRTintP遺伝子はイネゲノム中に1コピー存在することが明らかとなった（図1）。

【0034】

[実施例4]

パーティクルガン法により、GFP融合CRTintPをタバコBY-2細胞に導入し、GFP融合CRTintPの細胞内局在を検討した。具体的には、5 μg のDNA（GFP融合CRTintPをカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターで発現させる構築）を3mgの金粒子にまぶして、1100psiの気圧で打ち込んだ結果、対照の細胞では蛍光を発しないが、GFP-CRTintP遺伝子を導入した細胞においては、緑色の蛍光を発していた。図2に示すように、発光部分の細胞における局在を観察すると、核内において発光していた。以上の結果から、CRTintPは核に存在することが明らかとなった。

【0035】

[実施例5]

CRTintPの組織特異性を検討するために、葉鞘、葉、根の組織からRNAを抽出し以下の条件で、ノザンブロッティングを行った。具体的には、RNAを1.2%の変性アガロースゲルで電気泳動を行い、CRTintPのcDNA由来の2300塩基対のDNAプローブを用いた。DNAプローブは ^{32}P で標識を行い、ULTRA hybを用いて42 で一晩ハイブリダイゼーションを行った。その結果、CRTintP遺伝子は葉身でもっとも顕著に発現していることが明らかとなった（図3）。

【0036】

10

20

30

40

50

[実施例 6]

CRT及びCRTintPの低温ストレスに対する応答性を検討するために、イネ（日本晴）を低温処理（25 から5 に移行し、その時の湿度は75%）してから毎時間ごとの試料（20個体からアトランダムに3回の繰り返しで試料を取る）を用いてノザンプロットングを行った。その結果、CRTとCRTintP共に、低温ストレス条件下、15分から顕著に遺伝子発現が増加し、30分でピークに達し、その後徐々に減少していた（図4）。

【0037】

以上の結果から、CRT遺伝子と共にCRTintP遺伝子も低温ストレスに対して約30分後には顕著に遺伝子発現が誘導することが明らかとなった。このことから、これらの遺伝子を植物体に導入して過剰発現させることにより、形質転換体に低温耐性を付与できることが想定される。

【0038】**【発明の効果】**

本発明者らによって、CRTintPをコードするDNAが提供された。該DNAは、CRTをコードするDNAの単離に使用できるだけでなく、低温ストレス作用の育種素材を開発することができる。

【0039】**【配列表】**

SEQUENCE LISTING

- <110> National Institute of Agrobiological Sciences
 Japan Science and Technology Corporation
- <120> The cold stress induced CRTintP gene and use thereof 10
- <130> MOA-X0201
- <140>
- <141>
- <160> 2 20
- <170> PatentIn Ver. 2.1
- <210> 1
- <211> 3401
- <212> DNA
- <213> Oryza sativa 30
- <220>
- <221> CDS
- <222> (296).. (3196)
- <400> 1
- gatttctcac ttctcacaca actcgcaacc ctaataaagc gcaaaaaagg aaaaagaaaa 60 40

atgccacgg aaaaatctc gctgcccc atcgggcagg agcaaccgcc gcatcggccc	120	
ccgatccggt cgccgccgc tctcggccg ttcacccgcc gcttgccaac ccttcgctc	180	
ccagcaacc tagtccccca ccccaacgcc gccgccagct cagctcgctt cgcgcggggc	240	
gcagccgact cctacttgt ggctcggcg gctcgggccc tctcgggatt ccacg atg	298	10
	Met	
	1	
tct gaa gat gcg tct gtc ggg gcc agc agt tca aca gta aaa gct ggc	346	
Ser Glu Asp Ala Ser Val Gly Ala Ser Ser Ser Thr Val Lys Ala Gly		
5 10 15		20
gat gat cca gag gct acc att gag atc aac atc aaa acc ctg gat tca	394	
Asp Asp Pro Glu Ala Thr Ile Glu Ile Asn Ile Lys Thr Leu Asp Ser		
20 25 30		
caa gtt cat aag ctc cgt gtt aag aag aat gta cct gtt ctg gtc ctt	442	
Gln Val His Lys Leu Arg Val Lys Lys Asn Val Pro Val Leu Val Leu		
35 40 45		30
aaa gag aag ata gta gag gca acc ggg gtt cct gtg gac caa cag cgg	490	
Lys Glu Lys Ile Val Glu Ala Thr Gly Val Pro Val Asp Gln Gln Arg		
50 55 60 65		
ttg att ttt aga gga aga gtc tta aag gac gat cac ctg cta tca gaa	538	
Leu Ile Phe Arg Gly Arg Val Leu Lys Asp Asp His Leu Leu Ser Glu		40
70 75 80		

tat cat ttg gaa gat ggg tac aca ttg cat ttg gtt gct cgg cgt gca	586	
Tyr His Leu Glu Asp Gly Tyr Thr Leu His Leu Val Ala Arg Arg Ala		
85 90 95		
gct gct gaa ggc caa cat tct tct ggt act tct gat gaa aac acc cat	634	
Ala Ala Glu Gly Gln His Ser Ser Gly Thr Ser Asp Glu Asn Thr His		10
100 105 110		
gct aat gtt aat gtt gct gga aat gga ctg tta gga gat atc tcc agg	682	
Ala Asn Val Asn Val Ala Gly Asn Gly Leu Leu Gly Asp Ile Ser Arg		
115 120 125		
agt gtt cgg gat atc ctt ggc tcc cta ggt ctt gcg acg cct ggt ggc	730	20
Ser Val Arg Asp Ile Leu Gly Ser Leu Gly Leu Ala Thr Pro Gly Gly		
130 135 140 145		
atg aca aac act aca ttt tcg gtg cct tta acc act gca cca aaa ggg	778	
Met Thr Asn Thr Thr Phe Ser Val Pro Leu Thr Thr Ala Pro Lys Gly		
150 155 160		30
gcc aat aat gtc aat gga aga act caa cca ggg aat cat gca caa cca	826	
Ala Asn Asn Val Asn Gly Arg Thr Gln Pro Gly Asn His Ala Gln Pro		
165 170 175		
ggg ttt tca att ctg aat cat caa atc caa gta tca caa cta caa cca	874	
Gly Phe Ser Ile Leu Asn His Gln Ile Gln Val Ser Gln Leu Gln Pro		
180 185 190		40

gca ggc tct att cct cgc aac atg gtt att cct gat tct ctc aca act	922	
Ala Gly Ser Ile Pro Arg Asn Met Val Ile Pro Asp Ser Leu Thr Thr		
195	200	205
ctt ttg gag tat atc aac cgc atg gat caa gta cta cag aat aac ggc	970	
Leu Leu Glu Tyr Ile Asn Arg Met Asp Gln Val Leu Gln Asn Asn Gly		
210	215	220
		225
		10
aca cca tct gtt gat aca aat acc cag cag cca cca aga tcg gat gat	1018	
Thr Pro Ser Val Asp Thr Asn Thr Gln Gln Pro Pro Arg Ser Asp Asp		
	230	235
		240
gct tat cta aat caa aga ttt cca agt cct gag gtt ctg gtg tca gtc	1066	
Ala Tyr Leu Asn Gln Arg Phe Pro Ser Pro Glu Val Leu Val Ser Val		
	245	250
		255
		20
att gaa aga gcc caa caa ctt ctt ggt ggc agt gct gct tct gct ctt	1114	
Ile Glu Arg Ala Gln Gln Leu Leu Gly Gly Ser Ala Ala Ser Ala Leu		
	260	265
		270
tca cat ctc gca caa cca atc cag aga gat tct ggc acc agt gat gca	1162	
Ser His Leu Ala Gln Pro Ile Gln Arg Asp Ser Gly Thr Ser Asp Ala		
	275	280
		285
		30
tct ata cgt agc cag atc cag aat gaa tca gct cag ctg gga gta gca	1210	
Ser Ile Arg Ser Gln Ile Gln Asn Glu Ser Ala Gln Leu Gly Val Ala		
290	295	300
		305
		40
atg cag cat ttg ggt gca atg ttt ttg gag ctt ggt cga aca atg atg	1258	

Met Gln His Leu Gly Ala Met Phe Leu Glu Leu Gly Arg Thr Met Met		
	310	315
		320
atg ctt cgg atg ggg cca tcc cct gct gat gct ttt gtc aat gct gga		1306
Met Leu Arg Met Gly Pro Ser Pro Ala Asp Ala Phe Val Asn Ala Gly		
	325	330
		335
tct tct gtt tat ata aac tct gca gga ccg aat cca atc atg gtt cag		1354
Ser Ser Val Tyr Ile Asn Ser Ala Gly Pro Asn Pro Ile Met Val Gln		
	340	345
		350
cca tct ttt caa aat act cct cct ttt gga gtt tcg agc ata cca gtc		1402
Pro Ser Phe Gln Asn Thr Pro Pro Phe Gly Val Ser Ser Ile Pro Val		
	355	360
		365
ctc ggt gga att tct ggt gcc ttt ggt att gtt gat cct tct cgt aca		1450
Leu Gly Gly Ile Ser Gly Ala Phe Gly Ile Val Asp Pro Ser Arg Thr		
	370	375
		380
		385
tct gct gtc aat acc cat ggt act tct aca aca agt ggg tca tct gct		1498
Ser Ala Val Asn Thr His Gly Thr Ser Thr Thr Ser Gly Ser Ser Ala		
	390	395
		400
ggt atg acc act gct tct gca ggc gct gtc aat gaa ggt cgt caa aat		1546
Gly Met Thr Thr Ala Ser Ala Gly Ala Val Asn Glu Gly Arg Gln Asn		
	405	410
		415
gtg gaa aga act caa gga ggt aac cca tct gct acc tca atg cat gga		1594
Val Glu Arg Thr Gln Gly Gly Asn Pro Ser Ala Thr Ser Met His Gly		
		40

420	425	430	
ttg cca gca agg aca gtt att gcg gct att cct gca cgg tcc acg gct			1642
Leu Pro Ala Arg Thr Val Ile Ala Ala Ile Pro Ala Arg Ser Thr Ala			
435	440	445	
gag gct cca aac cat gtc ctg agt gtt atc ctg cct gtt caa gtg agg			1690
Glu Ala Pro Asn His Val Leu Ser Val Ile Leu Pro Val Gln Val Arg			10
450	455	460	465
agt caa gta gca atg cct aat caa tca aca gtt tct caa ggt tct cag			1738
Ser Gln Val Ala Met Pro Asn Gln Ser Thr Val Ser Gln Gly Ser Gln			
470	475	480	
act gca gtg ggc ggt gga tct caa cca caa gcc tct gta ggt ggt gtt			1786
Thr Ala Val Gly Gly Gly Ser Gln Pro Gln Ala Ser Val Gly Gly Val			
485	490	495	
gct agc att cct tct ata gtg gca cag gta act gca caa gta gcc aat			1834
Ala Ser Ile Pro Ser Ile Val Ala Gln Val Thr Ala Gln Val Ala Asn			
500	505	510	30
gca ttg agt gca aat caa caa ggc cag gtt tca tca tct gcg cag aac			1882
Ala Leu Ser Ala Asn Gln Gln Gly Gln Val Ser Ser Ser Ala Gln Asn			
515	520	525	
aca gta gat cag gga tct cgc tcg gtc aca act aat gga gtt gac aat			1930
Thr Val Asp Gln Gly Ser Arg Ser Val Thr Thr Asn Gly Val Asp Asn			40
530	535	540	545

gtg gat tct ctg gta tca gca agt acg caa ctg caa aat gag ctg tca	1978	
Val Asp Ser Leu Val Ser Ala Ser Thr Gln Leu Gln Asn Glu Leu Ser		
550 555 560		
gat tct aac aat gga cgc act tca cta aat gca caa tct ctt gta gct	2026	
Asp Ser Asn Asn Gly Arg Thr Ser Leu Asn Ala Gln Ser Leu Val Ala		10
565 570 575		
gga gca ggt att tct cct tca aac aca tct gat ccc aat tta gca tcg	2074	
Gly Ala Gly Ile Ser Pro Ser Asn Thr Ser Asp Pro Asn Leu Ala Ser		
580 585 590		
gaa gac agc agc act gaa aat gct ccc aac atc ggc agt att caa caa	2122	20
Glu Asp Ser Ser Thr Glu Asn Ala Pro Asn Ile Gly Ser Ile Gln Gln		
595 600 605		
cat cca gag atg gaa ggg atc cat gca gat aat gtc aga aaa cct tct	2170	
His Pro Glu Met Glu Gly Ile His Ala Asp Asn Val Arg Lys Pro Ser		
610 615 620 625		30
gag gaa tca aca aca gcc aac tta gtg ggg cag atc aca acc acc tgt	2218	
Glu Glu Ser Thr Thr Ala Asn Leu Val Gly Gln Ile Thr Thr Thr Cys		
630 635 640		
aca gat gat att tct gtg aac aga tca gca gaa aat tct tca cag aag	2266	
Thr Asp Asp Ile Ser Val Asn Arg Ser Ala Glu Asn Ser Ser Gln Lys		
645 650 655		40

aac att cca ttg gat gga gta tct gca cag tcc att aag cca tct gca 2314
 Asn Ile Pro Leu Asp Gly Val Ser Ala Gln Ser Ile Lys Pro Ser Ala
 660 665 670

agt agt agg tct gaa cca gta ggt ctt ggt gga ggt ttg cag cct aag 2362
 Ser Ser Arg Ser Glu Pro Val Gly Leu Gly Gly Gly Leu Gln Pro Lys
 675 680 685

10

agg cgg agc aga aca gca aag cca cct ggg agt agc agt gat act ggc 2410
 Arg Arg Ser Arg Thr Ala Lys Pro Pro Gly Ser Ser Ser Asp Thr Gly
 690 695 700 705

gaa gtc gtc aat tcc tct cgc atc agc aat agc caa aat gct gtt tca 2458
 Glu Val Val Asn Ser Ser Arg Ile Ser Asn Ser Gln Asn Ala Val Ser
 710 715 720

20

atg ggc cag cag gtt ctg caa gcc ctt gct tct caa aat act aat gta 2506
 Met Gly Gln Gln Val Leu Gln Ala Leu Ala Ser Gln Asn Thr Asn Val
 725 730 735

aac aga agc cat gtt acg gat tct cca ctt cca tcc act act tct cag 2554
 Asn Arg Ser His Val Thr Asp Ser Pro Leu Pro Ser Thr Thr Ser Gln
 740 745 750

30

ttt tct ggt gga atg cct ccg aga aga cag ggt ggt gaa gga caa gtt 2602
 Phe Ser Gly Gly Met Pro Pro Arg Arg Gln Gly Gly Glu Gly Gln Val
 755 760 765

40

gat ttt ggc agt atg ata tcc agt gtg cta aac aac cca gct ttt ggc 2650

Asp Phe Gly Ser Met Ile Ser Ser Val Leu Asn Asn Pro Ala Phe Gly			
770	775	780	785
aat ctg ttg tcc aat gta gca gag caa aca ggc atg ggt tcc gca ggt	2698		
Asn Leu Leu Ser Asn Val Ala Glu Gln Thr Gly Met Gly Ser Ala Gly			
	790	795	800
gat ttg aga aac atg gtg gaa gag tgt gca cag agc cct gca ata atg	2746		10
Asp Leu Arg Asn Met Val Glu Glu Cys Ala Gln Ser Pro Ala Ile Met			
	805	810	815
gat act atg agt aat tta gtc caa aat gtg gat ggg tca gga aga ggt	2794		
Asp Thr Met Ser Asn Leu Val Gln Asn Val Asp Gly Ser Gly Arg Gly			
	820	825	830
caa ggt ggc att gac ttg tct aga atg atg cag caa atg atg cct gtt	2842		
Gln Gly Gly Ile Asp Leu Ser Arg Met Met Gln Gln Met Met Pro Val			
	835	840	845
gta tcc caa gtt ctt ggt gga gct ggg gct cgt cct gct ggt aca aat	2890		
Val Ser Gln Val Leu Gly Gly Ala Gly Ala Arg Pro Ala Gly Thr Asn			30
	850	855	860
agt gga caa tcc aga ttg cag cct cgg cgc agt gac atg aga gtg gat	2938		
Ser Gly Gln Ser Arg Leu Gln Pro Arg Arg Ser Asp Met Arg Val Asp			
	870	875	880
gat gct tca gat tat gga aat tct cag att gat cta cac caa gct cgt	2986		
Asp Ala Ser Asp Tyr Gly Asn Ser Gln Ile Asp Leu His Gln Ala Arg			40

885	890	895		
gaa cac att gag caa cat gac tcc ccc agg gat atc ttc ggt gcg gtc			3034	
Glu His Ile Glu Gln His Asp Ser Pro Arg Asp Ile Phe Gly Ala Val				
900	905	910		
ctc gaa act gct gca cag gct tat ggt gaa gat gag agt att gag gac			3082	10
Leu Glu Thr Ala Ala Gln Ala Tyr Gly Glu Asp Glu Ser Ile Glu Asp				
915	920	925		
atg ctt gaa gag ctt gtc agt gac cca gaa ctt aca gat gac tac ctg			3130	
Met Leu Glu Glu Leu Val Ser Asp Pro Glu Leu Thr Asp Asp Tyr Leu				
930	935	940	945	
20				
aaa ctt ctg ctc caa caa gtt cgc cag agg ata cag tcg gca tct caa			3178	
Lys Leu Leu Leu Gln Gln Val Arg Gln Arg Ile Gln Ser Ala Ser Gln				
950	955	960		
tcc ggg aac cag tct tga gtttatatt tataagtiga aaatggacag			3226	
Ser Gly Asn Gln Ser				
965				30
aaccagtgt ttggtttggt ggtcatgatt aggcgcctcc gtggatgtac atgtgccgtg			3286	
ttctctaatt ttggcctcag agatgatgtt tacaccaccc actgcacttg ctttaaatgt			3346	
tttacagatt ttgtagtgg tacatagcta tcatcaagag ctttagattt cgtgg			3401	40

<210> 2

<211> 966

<212> PRT

<213> *Oryza sativa*

<400> 2

Met Ser Glu Asp Ala Ser Val Gly Ala Ser Ser Ser Thr Val Lys Ala 10
 1 5 10 15

Gly Asp Asp Pro Glu Ala Thr Ile Glu Ile Asn Ile Lys Thr Leu Asp
 20 25 30

Ser Gln Val His Lys Leu Arg Val Lys Lys Asn Val Pro Val Leu Val 20
 35 40 45

Leu Lys Glu Lys Ile Val Glu Ala Thr Gly Val Pro Val Asp Gln Gln
 50 55 60

Arg Leu Ile Phe Arg Gly Arg Val Leu Lys Asp Asp His Leu Leu Ser 30
 65 70 75 80

Glu Tyr His Leu Glu Asp Gly Tyr Thr Leu His Leu Val Ala Arg Arg
 85 90 95

Ala Ala Ala Glu Gly Gln His Ser Ser Gly Thr Ser Asp Glu Asn Thr
 100 105 110

His Ala Asn Val Asn Val Ala Gly Asn Gly Leu Leu Gly Asp Ile Ser 40
 115 120 125

Arg Ser Val Arg Asp Ile Leu Gly Ser Leu Gly Leu Ala Thr Pro Gly
 130 135 140

Gly Met Thr Asn Thr Thr Phe Ser Val Pro Leu Thr Thr Ala Pro Lys
 145 150 155 160

Gly Ala Asn Asn Val Asn Gly Arg Thr Gln Pro Gly Asn His Ala Gln
 165 170 175

Pro Gly Phe Ser Ile Leu Asn His Gln Ile Gln Val Ser Gln Leu Gln
 180 185 190

Pro Ala Gly Ser Ile Pro Arg Asn Met Val Ile Pro Asp Ser Leu Thr
 195 200 205

Thr Leu Leu Glu Tyr Ile Asn Arg Met Asp Gln Val Leu Gln Asn Asn
 210 215 220

Gly Thr Pro Ser Val Asp Thr Asn Thr Gln Gln Pro Pro Arg Ser Asp
 225 230 235 240

Asp Ala Tyr Leu Asn Gln Arg Phe Pro Ser Pro Glu Val Leu Val Ser
 245 250 255

Val Ile Glu Arg Ala Gln Gln Leu Leu Gly Gly Ser Ala Ala Ser Ala
 260 265 270

Leu Ser His Leu Ala Gln Pro Ile Gln Arg Asp Ser Gly Thr Ser Asp

10

20

30

40

275	280	285	
Ala Ser Ile Arg Ser Gln Ile Gln Asn Glu Ser Ala Gln Leu Gly Val			
290	295	300	
Ala Met Gln His Leu Gly Ala Met Phe Leu Glu Leu Gly Arg Thr Met			
305	310	315	10
Met Met Leu Arg Met Gly Pro Ser Pro Ala Asp Ala Phe Val Asn Ala			
	325	330	335
Gly Ser Ser Val Tyr Ile Asn Ser Ala Gly Pro Asn Pro Ile Met Val			
	340	345	350
			20
Gln Pro Ser Phe Gln Asn Thr Pro Pro Phe Gly Val Ser Ser Ile Pro			
	355	360	365
Val Leu Gly Gly Ile Ser Gly Ala Phe Gly Ile Val Asp Pro Ser Arg			
	370	375	380
Thr Ser Ala Val Asn Thr His Gly Thr Ser Thr Thr Ser Gly Ser Ser			
385	390	395	30
Ala Gly Met Thr Thr Ala Ser Ala Gly Ala Val Asn Glu Gly Arg Gln			
	405	410	415
Asn Val Glu Arg Thr Gln Gly Gly Asn Pro Ser Ala Thr Ser Met His			
	420	425	430
			40

Gly Leu Pro Ala Arg Thr Val Ile Ala Ala Ile Pro Ala Arg Ser Thr
 435 440 445

Ala Glu Ala Pro Asn His Val Leu Ser Val Ile Leu Pro Val Gln Val
 450 455 460

Arg Ser Gln Val Ala Met Pro Asn Gln Ser Thr Val Ser Gln Gly Ser
 465 470 475 480

10

Gln Thr Ala Val Gly Gly Gly Ser Gln Pro Gln Ala Ser Val Gly Gly
 485 490 495

Val Ala Ser Ile Pro Ser Ile Val Ala Gln Val Thr Ala Gln Val Ala
 500 505 510

20

Asn Ala Leu Ser Ala Asn Gln Gln Gly Gln Val Ser Ser Ser Ala Gln
 515 520 525

Asn Thr Val Asp Gln Gly Ser Arg Ser Val Thr Thr Asn Gly Val Asp
 530 535 540

30

Asn Val Asp Ser Leu Val Ser Ala Ser Thr Gln Leu Gln Asn Glu Leu
 545 550 555 560

Ser Asp Ser Asn Asn Gly Arg Thr Ser Leu Asn Ala Gln Ser Leu Val
 565 570 575

Ala Gly Ala Gly Ile Ser Pro Ser Asn Thr Ser Asp Pro Asn Leu Ala
 580 585 590

40

Ser Glu Asp Ser Ser Thr Glu Asn Ala Pro Asn Ile Gly Ser Ile Gln
 595 600 605

Gln His Pro Glu Met Glu Gly Ile His Ala Asp Asn Val Arg Lys Pro
 610 615 620

Ser Glu Glu Ser Thr Thr Ala Asn Leu Val Gly Gln Ile Thr Thr Thr
 625 630 635 640

Cys Thr Asp Asp Ile Ser Val Asn Arg Ser Ala Glu Asn Ser Ser Gln
 645 650 655

Lys Asn Ile Pro Leu Asp Gly Val Ser Ala Gln Ser Ile Lys Pro Ser
 660 665 670

Ala Ser Ser Arg Ser Glu Pro Val Gly Leu Gly Gly Gly Leu Gln Pro
 675 680 685

Lys Arg Arg Ser Arg Thr Ala Lys Pro Pro Gly Ser Ser Ser Asp Thr
 690 695 700

Gly Glu Val Val Asn Ser Ser Arg Ile Ser Asn Ser Gln Asn Ala Val
 705 710 715 720

Ser Met Gly Gln Gln Val Leu Gln Ala Leu Ala Ser Gln Asn Thr Asn
 725 730 735

Val Asn Arg Ser His Val Thr Asp Ser Pro Leu Pro Ser Thr Thr Ser

10

20

30

40

Arg Glu His Ile Glu Gln His Asp Ser Pro Arg Asp Ile Phe Gly Ala
 900 905 910

Val Leu Glu Thr Ala Ala Gln Ala Tyr Gly Glu Asp Glu Ser Ile Glu
 915 920 925

Asp Met Leu Glu Glu Leu Val Ser Asp Pro Glu Leu Thr Asp Asp Tyr 10
 930 935 940

Leu Lys Leu Leu Leu Gln Gln Val Arg Gln Arg Ile Gln Ser Ala Ser
 945 950 955 960

Gln Ser Gly Asn Gln Ser 20
 965

【図面の簡単な説明】

【図1】 CRTintP遺伝子のサザンブロッティングの結果を示す写真である。

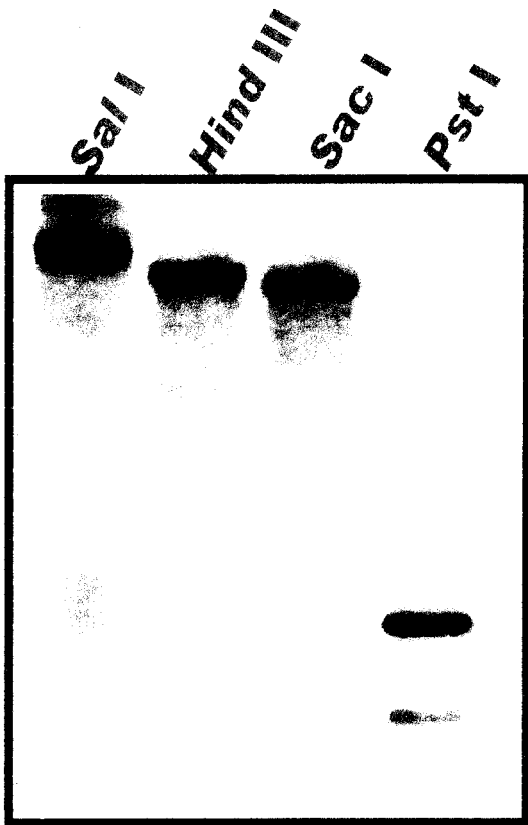
【図2】 GFP融合CRTintPベクターの構造を示す図およびGFP融合CRTintPの細胞内局在を示す写真である。図におけるsGFP (S65T) はベクターの名前を示す。また、写真中のCONは対照を意味する。

【図3】 CRTintP遺伝子の組織特異性を示す写真である。

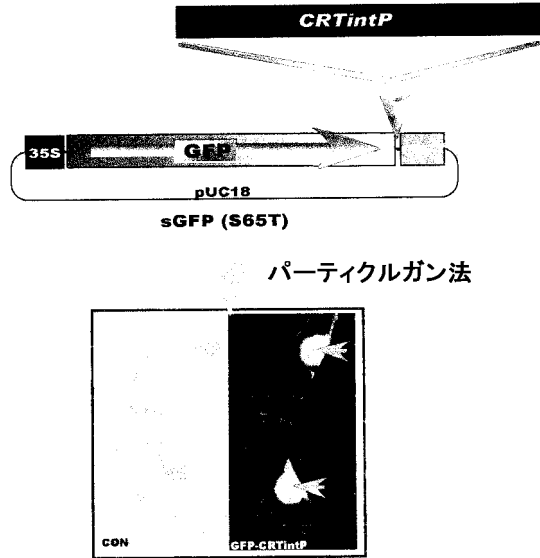
【図4】 CRT遺伝子及びCRTintP遺伝子の低温ストレスに対する応答性を示す写真である

。

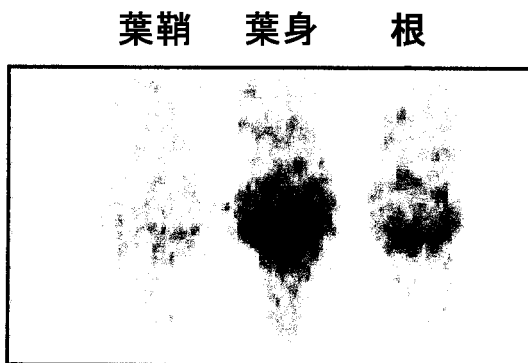
【 図 1 】



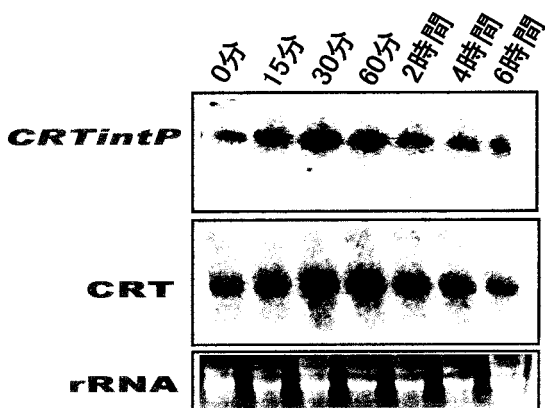
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



フロントページの続き

- (72)発明者 シャルマ アルン
茨城県つくば市観音台 2 1 2 独立行政法人農業生物資源研究所内
- (72)発明者 橋本 純治
茨城県つくば市観音台 2 1 2 独立行政法人農業生物資源研究所内
- (72)発明者 坂口 謙吾
千葉県野田市山崎 2 6 4 1 東京理科大学内

審査官 小暮 道明

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C12N 15/00-90
BIOSIS/WPI (DIALOG)
JMEDPlus(JDream2)
PubMed
SwissProt/PIR/Geneseq
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq