

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4091114号

(P4091114)

(45) 発行日 平成20年5月28日 (2008.5.28)

(24) 登録日 平成20年3月7日 (2008.3.7)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C O 7 K 14/415 (2006.01)

C O 7 K 14/415

A O 1 H 5/00 (2006.01)

A O 1 H 5/00 A

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/00 C

請求項の数 22 (全 40 頁)

(21) 出願番号 特願平9-511773
 (86) (22) 出願日 平成8年9月13日 (1996.9.13)
 (65) 公表番号 特表平11-512289
 (43) 公表日 平成11年10月26日 (1999.10.26)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB1996/002276
 (87) 国際公開番号 W01997/010339
 (87) 国際公開日 平成9年3月20日 (1997.3.20)
 審査請求日 平成15年8月15日 (2003.8.15)
 (31) 優先権主張番号 9518731.6
 (32) 優先日 平成7年9月13日 (1995.9.13)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(73) 特許権者

パイオニア ハイ・ブレッド インターナ
 ショナル, インコーポレイティド
 アメリカ合衆国, アイオワ 50131 -
 1000, ジョンストン, ビーオー ボッ
 クス 1000, ノースウエスト シック
 スティセカンド アベニュー 7100

(74) 代理人

弁理士 青木 篤

(74) 代理人

弁理士 石田 敬

(74) 代理人

弁理士 古賀 哲次

(74) 代理人

弁理士 福本 積

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 開花遺伝子

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下のポリペプチド：

(a) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド；又は

(b) 配列番号 2 において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたア
 ミノ酸配列からなるポリペプチドであって、該ポリペプチドの植物中での発現が該植物の
 頂端分裂組織の花形成へのスイッチングを制御する、
 をコードするヌクレオチド配列を有する核酸単離物。

【請求項 2】

配列番号 1 に示すヌクレオチド配列を有する核酸単離物。

【請求項 3】

配列番号 3 に示すヌクレオチド配列を有する核酸単離物。

【請求項 4】

以下のポリペプチド：

(a) 配列番号 5 に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド；又は

(b) 配列番号 5 において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたア
 ミノ酸配列からなるポリペプチドであって、該ポリペプチドの植物中での発現が該植物の
 頂端分裂組織の花形成へのスイッチングを制御する、
 をコードするヌクレオチド配列を有する核酸単離物。

【請求項 5】

10

20

配列番号 4 に示すヌクレオチド配列を有する核酸単離物。

【請求項 6】

配列番号 4 において

221 位において c が t に；

274 位において g が a に；

307 位において g が a に；若しくは

329 位において g が a に、

置換されたヌクレオチド配列を有する、核酸単離物。

【請求項 7】

前記コード化配列の発現のための調節配列を更に含む請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の核酸単離物。

10

【請求項 8】

前記調節配列が誘導可能プロモーターを含むことを特徴とする請求項 7 に記載の核酸単離物。

【請求項 9】

前記調節配列が、以下のプロモーター：

(a) 配列番号 3 のヌクレオチド 1 ～ 4417 のヌクレオチド配列からなるプロモーター；又は

(b) 配列番号 3 のヌクレオチド 1 ～ 4417 において 1 若しくは数個のヌクレオチドが欠失、置換若しくは付加されたヌクレオチド配列からなるプロモーターであって、植物内で頂端分裂組織特異的発現を促進する、を含む、請求項 7 に記載の核酸単離物。

20

【請求項 10】

植物細胞の形質転換に適し、請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の核酸を含む核酸ベクター。

【請求項 11】

請求項 1 ～ 8 及び 10 のいずれか 1 項に記載の核酸を含む宿主細胞であって、ここで該核酸が前記細胞に対して異種性である、前記宿主細胞。

【請求項 12】

微生物である請求項 11 に記載の宿主細胞。

30

【請求項 13】

植物細胞である請求項 12 に記載の宿主細胞。

【請求項 14】

前記核酸をゲノム内に有する請求項 13 に記載の植物細胞であってここで、該核酸が前記細胞に対して異種性である、前記植物細胞。

【請求項 15】

半数体ゲノム当たり 1 超の前記ヌクレオチド配列を有する請求項 14 に記載の植物細胞。

【請求項 16】

請求項 13 ～ 15 のいずれか 1 項に記載の植物細胞を含む植物。

【請求項 17】

真に人工受粉で作り出さ (breed) ない請求項 16 に記載の植物。

40

【請求項 18】

請求項 16 又は 17 に記載の植物の自殖もしくはハイブリッド子孫、又は種子のような前記植物もしくは子孫のいずれか一部もしくは零余子。

【請求項 19】

請求項 13 ～ 15 のいずれか 1 項に記載の細胞を含む請求項 18 に記載の子孫、一部又は零余子。

【請求項 20】

植物の頂端分裂組織の花形成へのスイッチングを制御する方法であって、前記植物の細胞内で、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の核酸によりコードされる産物の発現を引きお

50

こし又は許容することを含み、ここで、該核酸が前記細胞に対して異種性である、前記方法。

【請求項 2 1】

植物の頂端分裂組織の花形成へのスイッチングを制御する方法であって、前記植物の細胞内で、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の核酸からの転写を引きおし又は許容することを含み、ここで、該核酸が前記細胞に対して異種性である、前記方法。

【請求項 2 2】

トランスジェニック植物の生産における請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の核酸の使用。

【発明の詳細な説明】

10

開花遺伝子

本発明は、開花の遺伝制御に関し、アンチルリヌム (*Antirrhinum*) の *cen* 遺伝子及びアラビドプシス (*Arabidopsis*) の *tf11* 遺伝子のクローニングに基づく。

アリエル (*ariel*) 植物発達に関連する分裂組織には 3 つの主な型：生長 (*vegetative*)、花序及び開形成 (*floral*) がある。アンチルリヌム・マジュス (*Antirrhinum majus*) のような多くの種の頂端の分裂組織は、最初に生長期に入り、頂端の横の細胞が軸のまわりの生長的分裂組織と共に葉の原基になる (Coen, 1991)。開の誘導に基づいて、頂端の分裂組織は花序分裂組織に変わる。花序に一般に関連する特徴は、葉の器官の変化及び節間の長さの変化である。アンチルリヌムの花序は、頂端の分裂組織が無限花序に成長する総状花序又は穂状花序である。開の分裂組織は変化した葉の軸内でおこり、有限で、花の器官原基の 4 つの輪状体又は環帯を作り出す。これにより、頂端の分裂組織は 2 つの別個のアイデンティティ、生長及び次の花序を通り過ぎる。末端に花を形成する種においては、頂端の分裂組織は有限であり、そして最終的に第 3 のアイデンティティ、開の分裂組織のそれになる。重要な発達の問題は、いかにして頂端の分裂組織のアイデンティティが制御されるかを理解することである。

20

アンチルリヌムのセトロラジアルリス (*centroradialis*) (*cen*) 変異体は、最初に、Gatersleben, Germany (Kuckuck and Schick, 1930; Stubbe, 1966) に記載される。*cen* 変異体は、頂端分裂組織が開の分裂組織に変わる前にいくつかの腋生の花を作り出す。これにより、*cen* 植物においては、頂端の分裂組織が 3 つの別個のアイデンティティ：生長、花序及び次の開形成を通り過ぎる。それゆえ *cen* の野生型の役割は頂端分裂組織が開花へ

30

スイッチするのを防ぐことである。アンチルリヌムの *cen* 変異体はいくつかの点で野生型と異なり得る。変異体は末端に花を形成し、その花序を無限花序から有限花序に変化させる。結果として、その構造はより短く、より短木の植物に変化する。ここで枝条は無限花序に成長することができない。約 10 の腋生の花が末端の花の下に作られる。その末端の花の分裂組織はその下の腋生の花より先に発達する。腋生の花と違い、器官数及びそれらの配置 (葉序) は末端の花において極めて種々である。末端の花は通常、放射状に対称であり、ここで全ての花卉は液生の花の腹部の (最も低い) 花卉に似る。

cen に似た変異体である *terminal flower1* (*tf11*) はアラビドプシスにおいて記載されている (Shannon and Meeks-Wagner, 1991; Alvarez ら, 1992)。分裂組織のアンデンティティに影響を与えることに加えて、*tf11* 変異体も早期に開花する。それゆえ、*tf11* 遺伝子の通常の役割は、開花を限害すること及び頂端分裂組織が花形成へスイッチすることを防ぐことである。

40

アラビドプシスにおいて、*tf11* 変異体は、野生型から区別される 2 つの重要な特徴を有し：早期に抽苔し、そして頂端分裂組織は最終的に開形成アイデンティティを獲得し、末端の花の形成を導く (図 1)。典型的には、ロゼットの葉の通常の数約半分が、抽苔の前に形成され、約 1 ～ 5 の末端の花が、花序の頂端の分裂組織が最終的に開形成アイデンティティを獲得する前に作られる。その末端の花の構造はしばしば野生型と異なる。野生型の花は器官の 4 つの輪生体；4 つの最も外部のがく片、6 つのおしべ及び 2 つの心皮の中心輪状体からなる。アラビドプシスの *tf11* 変異体の末端の花において、器官の数はし

50

ばしば種々であり、それらは野生型の輪生の配置と違い、らせん状に生じ得る。2つの型の花の器官から構成されるモザイク器官も見い出すことができる。これらの表現型の効果の全ては、開花時期の著しい変化を除いて、アンチルリヌムのcen変異体においても見い出される。

それゆえこれらの遺伝子両方は頂端分裂組織のアイデンティティーにおいて重要な役割を演ずる。

cenの機能及びそれが機能する分子経路を示すために、その遺伝子を単離するためにトランスポゾン変異誘発プログラムを作った。1992年において、cenの3つの新しい対立遺伝子（cen-663、cen-665及びcen-666）が上手く単離され、そして1の対立遺伝子中のcen表現型に連結されたトランスポゾンが同定された。1994年初期に、このトランスポゾン挿入物の側面にあるDNAは、cen座がクローンされ、cen cDNAの単離及びその発現のキャラクタリゼーションを許容することを示すのに用いられた。CENは、動物の脂質結合性タンパク質のクラスに似ており、枝条頂端において発現される。

本発明は、アンチルリヌムからのcen遺伝子及びアラビドプシス、tf11からの同族体のクローニングに基づく。Broadleyら（Nature 1996, Vol.379, 791~797（cen））及びBradley, Carpenter及びCoen, “Conserved control of inflorescence architecture in Arabidopsis and Antirrhinum”も参照のこと。

本発明の一態様によれば、cen、tf11又は無限（indeterminacy）機能を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸単離物を提供する。当業者は、用語“cen機能”、“tf11機能”及び“無限機能”が開花の時期及び／又はアンチルリヌム又はアラビドプシスの各々cen又はtf11遺伝子に表現型的に似た花形成にスイッチすることからの分裂組織の防止に影響を与える能力をいうことを認めるである。“無限花序機能”とは分裂組織成長を無限に維持する能力をいう。本発明の特定の実施形態は、アンチルリヌム又はアラビドプシス中のcen又はtf11変異体を補足する能力を有し得る。

本発明の種々の態様による核酸はcenもしくはtf11遺伝子の配列を有し得、又は供される配列の突然変異体、変異体、誘導体又は対立遺伝子であり得る。好ましい突然変異体、変異体、誘導体及び対立遺伝子は、野生型遺伝子によりコードされる産物の機能的特徴、特にcenに関して頂端の分裂組織が開形成にスイッチするのを阻害する能力及び／又はtf11に関して開花を阻害／遅延する更なる能力を保持する産物（核酸分子又はポリペプチド）をコードするものである。他の好ましい突然変異体、変異体、誘導体及び対立遺伝子は野生型と比較して開花を促進する産物又は花形成への頂端分裂組織のスイッチングを供し及び／又は促進する配列の遺伝子をコードする。突然変異体、変異体又は誘導体を作り出すための配列の変換は、コードされたポリペプチド産物における1又は複数のアミノ酸の付加、挿入、欠失又は置換を導き得る核酸中の1又は複数のヌクレオチドの1又は複数の付加、挿入、欠失又は置換により得る。もちろん、コードされるアミノ酸配列に差を形成しない核酸の変化も含まれる。

本発明の好ましい実施形態において、核酸分子は図4（a）に示されるアミノ酸をコードするヌクレオチド配列を含む。そのヌクレオチド配列は図4（a）に示されるコード化配列を含み得、又は同じアミノ酸配列をコードするその突然変異体、変異体、誘導体又は対立遺伝子であり得る。

更なる実施形態において、本発明による好ましい核酸分子は図6（a）に示されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含むか、又は同じアミノ酸配列をコードするその突然変異体、変異体、誘導体又は対立遺伝子であり得る。

図に示される配列からの変換又は差を含む配列も、本明細書に議論されるように本発明に用いられ得る。

本発明は、いずれかの供された配列を有する核酸を含むベクター、好ましくは、その核酸配列によりコードされた産物ポリペプチド又は核酸分子が発現され得るベクターも提供する。そのベクターは、好ましくは植物細胞への形質転換に適している。本発明は、前記ベクターで形質転換された宿主細胞、特に植物細胞を更に含む。これにより、本発明による核酸を含む宿主細胞、例えば植物細胞が供される。その細胞内で、その核酸は染色体内に

10

20

30

40

50

組み込まれ得る。半数体ゲノム当たり1を超える異種ヌクレオチド配列が存在し得る。これは、例えば、以下に議論されるように、内在レベルと比較して遺伝子産物の発現を増加させることができる。

本発明による核酸を含むベクターは、特にそのベクターがゲノム内への組換えのための細胞内にその核酸を導入するのに用いられるなら、プロモーターを含む必要はない。

本発明による核酸分子及びベクターは、単離されて及び／又はそれらの天然の環境から、実質的に純粋なもしくは均一な形態で、又は関心の種の核酸もしくは遺伝子もしくは要求される機能を有するポリペプチドをコードする配列以外の源がないもしくは実質的にない状態で供される。本発明による核酸は、cDNA、RNA、ゲノムDNAを含み得、そして全体的又は部分的に合成であり得る。用語“単離物”は、全てのこれらの可能性を含み得る。

本発明は、いずれの開示される核酸配列の発現産物も、適切な宿主細胞中で適切な条件下でそのためのコード化核酸からの発現により発現産物を作る方法も含む。当業者は、十分に、ベクターを作り、組換え遺伝子発現の産物の発現及び回収のためのプロトコルをデザインすることができる。プロモーター配列、ターミネーターフラグメント、ポリアデニル化配列、エンハンサー配列、マーカー遺伝子及び適切な他の配列を含む適切な調節配列を含む適切なベクターを選択し、又は作製することができる。更に詳しくは、例えばMolecular Cloning: a Laboratory Manual: 2nd edition, Sambrookら、1989, Cold Spring Harbor Laboratory Pressを参照のこと。形質転換手順は用いる宿主によるが、公知である。

例えば核酸構成物の調製、変異誘発、配列決定、細胞内へのDNAの導入及び遺伝子発現における核酸の操作、並びにタンパク質の分析のための多くの周知の技術及びプロトコルは、Short Protocols in Molecular Biology, Second Edition, Ausubelら、eds., John Wiley & Sons, 1992に詳細に記載される。Sambrookら及びAusubelらの開示は引用により本明細書に組み込まれる。

例えばそのためのコード化核酸からの発現により組換えにより産生された精製されたタンパク質、又はそのフラグメント、突然変異体又は変異体は、当該技術で標準的な技術を用いて抗体を作るのに用いることができる。抗体の抗原結合フラグメントを含む抗体及びポリペプチドは、更に後に議論される他の種から相同体を同定するのに用いることができる。

抗体を作り出す方法は、タンパク質又はそのフラグメントでの哺乳動物（例えばマウス、ラット、ウサギ、ウマ、ヤギ、ヒツジ又はサル）を免疫化することを含む。抗体は、当該技術で周知である種々の技術のいずれかを用いて、免疫化した動物から得ることができ、好ましくは関心の抗原への抗体の結合を用いてスクリーニングすることができる。例えば、ウェスタンブロットティング技術又は免疫沈降を用いることができる（Armitageら、1992, Nature 357: 80~82）。抗体はポリクローナルでもモノクローナルでもよい。

哺乳動物を免疫化するためのかわりのもの又はそれへの補足物として、適切な結合特異性を有する抗体を、例えばそれらの表面上に機能的イムノグロブリン結合ドメインを示すラムダバクテリオファージ又は繊維状バクテリオファージを用いて、発現されるイムノグロブリン可変ドメインの組換えにより作られたライブラリーから得ることができる；例えばWO 92/01047を参照のこと。

ポリペプチド又はペプチドに対する抗体は、相同なポリペプチド、及び次にコード化遺伝子の同定及び／又は単離に用いることができる。これにより、本発明は、（本明細書に開示される実施形態に従う）要求される機能を有するポリペプチドを同定又は単離する方法であって、CENもしくはTf11ポリペプチド又はそのフラグメントもしくは変異体に結合することができるか又は好ましくはそのポリペプチドに結合特異性を有する、例えば図4又は図6に示されるアミノ酸配列を有する抗体の抗原結合ドメイン（例えば全抗体又はそのフラグメント）を含むポリペプチドで、候補のポリペプチドをスクリーニングすることを含む方法を提供する。前記ポリペプチド又はその突然変異体、変異体又は誘導体に結合し又は好ましくはそれらに特異的である抗体の抗原結合ドメインを含む抗体及びポリペプチドのような特異的に結合するメンバーは、それらの使用及びそれらを用いる方法と共に、本発明の更なる態様を示す。

スクリーニングするための候補のポリペプチドは、例えば関心の植物から得られた核酸を用いて作られた発現ライブラリーの産物であり得、又は天然のソースからの精製過程の産物であり得る。

抗体に結合することが見い出されたポリペプチドは、単離され、次にアミノ酸配列決定にかけられ得る。全体的又は部分的にポリペプチドを配列決定するためにいずれかの適切な技術を用いることができる（例えばポリペプチドのフラグメントを配列決定することができる）。アミノ酸配列情報は、例えば候補の核酸へのハイブリダイゼーションにおけるプローブ又はプライマーとして用いるための1又は複数のオリゴヌクレオチド（例えばオリゴヌクレオチドの縮重したプール）をデザインすることにより、又はコンピューター配列データベースを調査することにより、そのポリペプチドをコードする核酸を得るのに用いることができる。

10

本明細書に供されるヌクレオチド配列情報又はそのいずれか一部は、その発現産物が植物の開花特徴に影響を与える能力についてテストされ得る相同な配列を見い出すためにデータベースにおいて用いることができる。相同体を配列決定し、それらの発現パターンを研究し、そしてそれらの発現を変える効果を検査することにより、同様の機能を行う遺伝子を得ることができる。

本発明の更なる態様は、アンチルリヌム・マジウス以外の植物種からのcen相同体を同定及びクローニングする方法であって、図のいずれかに示されるものから得られたヌクレオチド配列を用いる方法を提供する。本明細書に供されるヌクレオチド配列情報又はそのいずれか一部は、その発現産物が植物分裂組織及び／又は他の開花特徴に影響を与える能力についてテストされ得る相同配列を見い出すためにデータベース調査において用いることができる。これらはcenもしくはtf11機能又は各々の突然変異表現型を補足する能力を有し得る。好ましい実施形態において、用いられる配列は、本明細書に供されるcen及びtf11遺伝子により共有されるものである。核酸ライブラリーは、当業者に公知である技術を用いてスクリーニングされ得、そしてそれにより相同な配列が同定され、次にテストされる。

20

例えば、このような方法は、相同体について調査するために図4及び6の配列間に保存された配列を含むオリゴヌクレオチドを用いることができる。これにより、その発現が植物の開花特徴に影響を与えることができる核酸を得る方法であって、標的／候補核酸への上述のオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド又は核酸分子のハイブリダイゼーションを含む方法を提供する。標的又は候補核酸は、例えば前記核酸を含むことが知られている又はそれを含むと推測される生物から得ることができるゲノム又はcDNAライブラリーを含み得る。成功したハイブリダイゼーションが同定され得、そして更なる研究及び／又は使用のために標的／候補核酸が単離され得る。

30

ハイブリダイゼーションは、核酸をプローブし、（周知の技術に従う）適切なストリンジェント条件下で陽性ハイブリダイゼーションを同定すること及び／又はPCRのような核酸増幅の方法におけるプライマーとしてのオリゴヌクレオチドの使用に関連し得る。プロービングのために、好ましい条件は、更に研究され得る陽性体として同定された少数のハイブリダイゼーションの単純なパターンであるのに十分にストリンジェントであるものである。少い陽性クローンのみが残るまで、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーを次第に増加させることは当該技術で公知である。

40

プロービングのかわりに、なお核酸ハイブリダイゼーションを用いるが、DNA配列を増幅するようデザインされたオリゴヌクレオチドを、PCR反応又は慣用的な手順を用いる核酸の増幅に関する他の方法に用いることができる。例えば、“PCR protocols; A Guide to Methods and Applications”, Eds. Innisら、1990, Academic Press, New Yorkを参照のこと。

プローブ又はPCRプライマーのデザインに用いるのに適した好ましいアミノ酸配列は、開花特徴、特に頂端分裂組織の開花へのスイッチングに影響を与えることができる少なくとも2つのポリペプチド間に（完全に、実質的に又は部分的に）保存された配列、例えば本明細書の図4及び6のアミノ酸配列である。

50

アミノ酸配列情報に基づいて、オリゴヌクレオチドプローブ又はプライマーは、遺伝コードの縮重を考慮してデザインすることができ、そして適切なら、候補核酸からの生物のコードン利用がもたらされる。

好ましくは、例えば核酸増幅に用いるための、本発明によるオリゴヌクレオチドは約10又はそれ未満のコードン（例えば6，7又は8）、即ち長さが約30又はそれ未満のヌクレオチド（例えば18，21又は24）である。

このようなPCR産物が耐性遺伝子に相当するか否かの評価は、種々の方法において行うことができる。このような反応からのPCRバンドは産物の複合混合物を含み得る。個々の産物をクローンすることができ、そして各々個々にスクリーニングすることができる。それは、関心の植物への導入に基づく機能を評価するために形質転換により分析することができる。

10

本発明は、図に供される配列情報（アミノ酸及び／又はヌクレオチド）から得られたヌクレオチド配列を用いて得られるcen又はtf11相同体をコードする核酸にも広げられる。

これにより、アンチルリヌムのcen又はアラビドプシスのtf11の相同体であるアミノ酸配列をコードする核酸分子は本発明の範囲内に含まれる。相同体はヌクレオチド配列及び／又はアミノ酸配列レベルにおいてであり得る。好ましくは、相同体の核酸又はアミノ酸配列、又は突然変異体、対立遺伝子もしくは変異体（上記参照のこと）は、図4又は図6のヌクレオチド配列の配列と、又はそれによりコードされる配列と、好ましくは少なくとも約50%、又は少なくとも約60%、又は少なくとも約70%、又は少なくとも約75%、又は少なくとも約80%の相同性、最も好ましくは少なくとも約90%の相同性で相同性を有し、そしてそのコードされた産物は、cen及び／又はtf11遺伝子と表現型、好ましくは開花への頂端分裂組織のスイッチング及び／又は開花の時間に影響を与える能力を共有する。その影響は、野生型と比較して、上記スイッチング及び／又は開花を促進し又は遅らせることができる、“相同性”とは、機能的用語において、当該技術で標準的であるようなアミノ酸配列の類似性をいうと理解され得る。これにより、例えばa%類似性の数字は、ロイシンからイソロイシンへのような機能的な重要性がほとんどないか又は全くないアミノ酸の差を含むであろう。さもなければ、相同性は、同一性をいうと考慮され得る。

20

例えば、経済的に重要な単子葉植物の作物、例えばコメ及びトウモロコシからの遺伝子相同体が同定され得る。単子葉植物及び双子葉植物中の同じタンパク質をコードする遺伝子は、そのヌクレオチドレベルにおいて比較的ほとんど相同性を示さないが、アミノ酸配列は保存されている。

30

特定の実施形態において、特定の配列の対立遺伝子、変異体、誘導体、突然変異体又は相同体は、少しの全体的相同性しか示さず、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%又は約45%の特定の配列との相同性を示し得る。しかしながら、機能的に重要なドメイン又は領域において、アミノ酸相同性はよりかなり高くなり得る。そのポリペプチドのアミノ酸配列の比較は、機能的に重要なドメイン及び領域、即ち頂端分裂組織のスイッチング及び／又は開花の時期のような植物の開花特徴に影響を与える役割を示す。欠失変異誘発は、例えばポリペプチドの領域の機能及びその役割又は時期のような開花特徴の影響の必要性をテストするのに用いることができる。

また、本発明によれば、そのコードされたポリペプチドの発現の制御のためのプロモーターの作用的制御下で、そのゲノム内に組み込まれた本発明により供されるようなヌクレオチドの配列を有する植物細胞を提供する。本発明の更なる態様は、前記植物を作る方法であって、ヌクレオチドの配列を含むベクターを植物細胞内に導入し、そして該ヌクレオチドの配列をゲノム内に導入するためにベクターと植物細胞ゲノムとの間の組換えを引き起こし又は許容することを含む方法を提供する。

40

本発明は、例えば細胞又はその祖先への核酸の導入の結果として、本発明による核酸を含む植物細胞を含む植物、並びに該植物の自家又はハイブリッド子孫及びいずれかの派生物、並びに前記植物、子孫又は派生物のいずれか一部又は零余子、例えば種子を更に包含する。

特定の実施形態において、本発明による植物は、真に人工受粉で作り出さ（breed true）

50

ないものでもあり得る。安定性、即ち人工受粉で作り出す能力は植物が植物品種権 (Plant Variety Rights) を受けるためのUPOV条約の要求である。

本発明は、頂端分裂組織スイッチング及び／又は植物の開花特徴に影響を与える方法であって、植物の細胞内に、異種のcen又はtf11遺伝子配列（又は議論されるような突然変異体、対立遺伝子、誘導体又は相同体）の発現を含む方法を更に提供する。用語“異種”とは、問題の遺伝子（ヌクレオチドの配列が、遺伝子工学を用いて、即ちヒトの介入により、例えば適切な形質転換技術を用いて、前記植物の細胞又はその祖先に導入される。その遺伝子は、ゲノム外ベクターであり得、又はゲノム内に好ましくは安定に、組み込まれ得る。その異種遺伝子は、内因性の等価の遺伝子、即ち同じ又は類似した機能を通常行うものと置きかわることができ、又はその挿入された配列は、内因性遺伝子に付加することができる。異種遺伝子の導入の利点は、遺伝子発現に影響を与え、それゆえ優先に従って植物表現型に影響を与えることができるために、選択されたプロモーターの制御下で遺伝子の発現を行う能力である。更に、野生型遺伝子の突然変異体、変異体及び誘導体、例えば野生型より高い又は低い活性のものが内在性遺伝子のかわりに用いることができる。

本発明を用いて変えることができる主な特徴は、開花への分裂組織のスイッチ及び開花の時期を制御することである。tf11遺伝子の遺伝子産物の過剰発現は、開花を遅くさせることができ、下降発現は早熟の開花を導き得る。下降制御は、例えば以下に更に議論されるアンチセンス又はセンス制御のような“遺伝子サイレンシング”技術で行うことができる。

この制御の程度は、例えばハイブリッド生産における雄及び雌親系の同調した開花を確実にするのに役立つ。他の使用は、成長する時期を伸ばし又は減少させるために、天候による命令に従う開花を進め又は遅らせることである。同様に、頂端分裂組織の開花へのスイッチングは、cen又はtf11遺伝子産物のレベルに従って遅延され又は促進され得る。cen又はtf11の下降制御に基づく末端の開花表現型への無限成長の転換は、特定の期間で完全に発達し、成熟し及び／又は乾燥する限られた数の果実又は種子の発達を許容し得る。これは、未発達の、熟していない及び／又は乾燥していない果実又は穀物の収集が要求されない場合に有益であり得る。例えば、寒さが落ち込み時期尚早に発達及び成熟過程を停止した時のクロロフィルをまだ含む若い成熟していないカノーラ (canola) 種子は、要求されない緑色である粉碎された油の更なる高価な精製を要求する。

CEN/Tf11を過剰発現する穀物又は果実は、特定の作物の収率を増加させるのに用いることができる。有限から無限又は無限から有限のいずれかの観賞植物種の構造、特に花を変えることは、商業的に価値あるものであり得る。

本発明による核酸は、外部から誘導できる遺伝子プロモーターの制御下におかれ、これにより分裂組織スイッチングの時期及び／又は開花を使用者の制御下におく。誘導可能なプロモーターの使用を以下に記載する。これは、花の形成及び次の種子の形成のような出来事が、切り花又は装飾用植木鉢における、市場の要求に合致するよう時期を合わせることができる点で有利である。鉢の植の開花を遅らせることは、生産者からの売る地点への生産物の輸送のために利用できる期間を長くし、開花期間を長くすることは購入者に明らかに有利である。

プロモーターに適用される“誘導可能”という用語は当業者に十分理解される。本質において、誘導可能なプロモーターの制御下での発現は、適用された刺激に応じて“スイッチオン”され又は増加される。刺激の性質はプロモーター間で種々である。特定の誘導可能プロモーターは、適切な刺激の欠如下で、少い又は検出できないレベルの発現を引き起こす（又は発現を引き起こさない）。他の誘導可能プロモーターは、刺激の欠如下で検出可能な構成的発現を引き起こす。発現のレベルが刺激の欠如下であっても、いずれかの誘導可能プロモーターからの発現は、正確な刺激の存在下で増加する。好ましい状況は、表現型の特徴を変えるのに有効な量による関連ある刺激の適用に基づいて増加する場合である。これにより、そのレベルが極めて低くほぼ要求される表現型をもたらさない（実際、0であり得る）レベルの刺激の欠如下での発現の基底レベルを引き起こす誘導可能（又は“スイッチ可能”）プロモーターを用いることができる。刺激の適用に基づいて、発現は

10

20

30

40

50

、ほぼ要求される表現型をもたらすレベルまで増加（又はスイッチオン）される。
適切なプロモーターは、本質的に全ての植物組織内で高レベルに発現されるカリフラワー
モザイクウイルス35 S (CaMV 35S) 遺伝子プロモーター (Benfeyら、1990a及び1990b) ;
外因性セーフナー (safener) の適用に応じて活性化されるトウモロコシグルタチオン
S-トランスフェラーゼイソホームII (GST-II-27) 遺伝子プロモーター (本発明に好ま
しい) ; 生長頂端分裂組織並びに植物の体内のいくつかの十分に局在化した位置、例えば
根及び枝条内の内篩部、花原基、分枝点内で発現されるカリフラワーmeri5プロモーター
(Medford, 1992; Medfordら、1991) ; 及び花の発達において極めて早期に発現されるア
ラビドプシス・タリアナLEAFYプロモーター (Weigelら、1992) 。

本発明の一態様は、トランスジェニック植物の生産における本発明による核酸の使用であ
る。

選択された遺伝子構成物を細胞内に導入する場合、当業者に公知である特定の考慮が払わ
れなければならない。挿入されるべき核酸は、転写を促進するであろう有効な調節因子を
含む構成物内でアセンブルされるべきである。その構成物をその細胞内に輸送する方法が
利用できなければならない。その構成物が細胞膜内に入った後、内在性の染色体材料への
組込みがおこるか又はおこらないだろう。最終的に、植物を考慮する限り、標的細胞型は
、細胞が全体の植物内に再生され得るようであればならない。

その配列を含むDNAセグメントで形質転換された植物は、植物の遺伝操作について既に知
られている普通の技術によって作ることができる。DNAは、いずれかの適切な技術、例え
ばその天然の遺伝子転移能力を利用するアグロバクテリウムが有するジスアームド (disa
rmed) Ti-プラスミドベクター (EP-A-270355, EP-A-0116718, NAR12 (22) 8711-87215,
1984)、粒子又はマイクロプロジェクトイルボンバードメント (US 5100792, EP-A-44488
2, EP-A-434616)、マイクロインジェクション (WO 92/09696, WO 94/00583, EP 33108
3, EP 175966, Greenら (1987) Plant Tissue and Cell Culture, Academic Press)、エ
レクトロポレーション (EP 290395, WO 8706614 Gelvin Debeyser)、直接的DNA取込みの
他の形態 (DE 4005152, WO 9012096, US 4684611)、リポソーム媒介性DNA取込み (例え
ばFreemanら、Plant Cell Physiol. 29:1353 (1984))、又はボルテキシング法 (例え
ばKindle, PNAS U.S.A. 87:1228 (1990d)) を用いて植物細胞内に形質転換することが
できる。植物細胞の形質転換のための物理的方法は、Oard, 1991, Biotech.Adv. 9:1-11
に報告されている。

アグロバクテリウム形質転換は、双子葉植物種を形質転換するために当業者に広く用いら
れる。現在、ほとんど全ての経済的に関連のある双子葉植物における安定な豊富なトラン
スジェニック植物のルーチンの生産に対する実質的な進展がある (Toriyama, ら. (1988)
) Bio/Technology 6, 1072-1074; Zhang, ら. (1988) Plant Cell Rep. 7, 379-384; Z
hang, ら. (1988) Theor Appl Genet 76, 835-840; Shimamoto, ら. (1989) Nature 33
8, 274-276; Datta, ら. (1990) Bio/Technology 8, 736-740; Christou, ら. (1991)
) Bio/Technology 9, 957-962; Peng, ら. (1991) International Rice Research Insti
tute, Manila, Philippines 563-574; Cao, ら. (1992) Plant Cell Rep. 11, 585-591
; Li, ら. (1993) Plant Cell Rep. 12, 250-255; Rathore, ら. (1993) Plant Molecu
lar Biology 21, 871-884; Fromm, ら. (1990) Bio/Technology 8, 833-839; Gordon-K
amm, ら. (1990) Plant Cell 2, 603-618; D'Halluin, ら. (1992) Plant Cell 4, 149
5-1505; Walters, ら. (1992) Plant Molecular Biology 18, 189-200; Koziel, ら. (1993)
Biotechnology 11, 194-200; Vasil, I.K. (1994) Plant Molecular Biology 25,
925-937; Weeks, ら. (1993) Plant Physiology 102, 1077-1084; Somers, ら. (1992)
) Bio/Technology 10, 1589-1594; WO92/14828)。特に、アグロバクテリウム媒介性の
形質転換は、現在、単子葉植物における非常に有効なかわりの形質転換法としても浮かび
上がっている (Hieiら (1994) The Plant Journal 6, 271~282) 。

豊富なトランスジェニック植物の形成は、穀物、コメ、トウモロコシ、コムギ、オート及
びオオムギにおいて達成されている (Shimamoto, K. (1994) Current Opinion in Biotec
hnology 5, 158-162.; Vasil, ら. (1992) Bio/Technology 10, 667-674; Vainら., 19

10

20

30

40

50

95, *Biotechnology Advances* 13 (4) : 653-671; Vasil, 1996, *Nature Biotechnology* 14 page 702に報告されている)。

マイクロプロジェクティルボンバードメントエレクトロポレーション及び直接的DNA取込みは、アグロバクテリアが効率が悪い場合又は効果がない場合に好ましい。あるいは、形質転換法の効能を増強するために、異なる技術の組合せ、例えば創傷を導くためのアグロバクテリアでコートされた微粒子でのボンバードメント (EP-A-486234) 又はマイクロプロジェクティルボンバードメントの後に、アグロバクテリウムの同時培養 (EP-A-486233) を用いることができる。

形質転換の後、植物は、当該技術で標準的であるように、例えば単一細胞、カルス組織又は葉の円盤状組織から、再生することができる。植物の細胞、組織及び器官からほとんどいずれの植物も全体的に再生することができる。利用できる技術は、Vasilら (*Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Vol I, II及びIII, *Laboratory Procedures and Their Applications*, Academic Press, 1984) 及びWeissback and Weissback (*Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, 1989) に報告される。

形質転換技術の特定の選択は、特定の植物種を形質転換する効能並びに選択された特定の方法で本発明を行う人の経験及び好みにより決定されよう。核酸を植物細胞に導入するための形質転換システムの特定の選択は、本発明に本質的でなく、又は本発明を限定するものでもない。また植物再生のための技術の選択もそうである。

本発明において、過剰発現はセンス方向におけるヌクレオチド配列の導入により達成することができる。これにより、本発明は、植物の開花特徴、例えば分裂組織スイッチングに影響を与える方法であって、前記植物の細胞内の核酸から、本発明による核酸のヌクレオチド配列によりコードされる産物 (ポリペプチド又は核酸) の発現を引きおこし又は許容することを含む方法を提供する。

遺伝子産物ポリペプチドの下降発現は、アンチセンス技術又は“センス制御”を用いて達成することができる。遺伝子発現を下降制御するためのアンチセンス遺伝子又は部分的遺伝子配列の使用は現在、十分に確立されている。二本鎖DNAは、DNAの“アンチセンス”鎖の転写が標的遺伝子の“センス”鎖から転写される通常のmRNAに相補的であるRNAを作り出すように、“逆方向”においてプロモーターの制御下におかれる。その相補的アンチセンスRNA配列は、次に、mRNAに結合して二本鎖を形成し、標的遺伝子からの内在性mRNAのタンパク質への転写を阻害すると考えられる。これが作用の実際の態様であるか否かはまだ不確かである。しかしながら、技術が働くことは確かな事実である。例えば、Rothsteinら、1987 *PNAS USA*, 84: 8439-8443; Smithら、(1988) *Nature* 334, 724-726; Zhangら、(1992) *The Plant Cell* 4, 1575-1588, Englishら、(1996) *The Plant Cell* 8, 179-188を参照のこと。アンチセンス技術は、Bourque (1995) (*Plant Science* 105, 125-149) 及びFlavell (1994) (*PNAS USA* 91, 3490-3496) にも報告されている。

逆方向におけるコード化配列に相当する完全な配列は用いる必要はない。例えば、十分な長さのフラグメントを用いることができる。アンチセンス阻害のレベルを最適化するためにコード化配列の種々の大きさの及び種々の部分からのフラグメントをスクリーニングすることは当業者にとってルーチン的事項である。開始メチオニンATGコドン、及びおそらく該開始コドンの上流に1又は複数のヌクレオチドを含むことが有利であり得る。適切なフラグメントは、約14~23ヌクレオチド、例えば約15, 16又は17ヌクレオチドを有する。これにより、本発明は、植物の開花特徴、例えば分裂組織スイッチングに影響を与える方法であって、前記植物の細胞内での本発明による核酸からのアンチセンス転写を引きおこし又はそれを許容することを含む方法も提供する。

標的遺伝子の付加的複製を標的遺伝子と同じ方向であるセンスで挿入した場合、過剰発現がおこる個体及び標的遺伝子からのタンパク質の下降発現がおこるいくつかを含む特定範囲の表現型が形成される。その挿入された遺伝子が内在性遺伝子の一部だけである場合、そのトランスジェニック集団の下降発現する個体の数は増加する。センス制御、特に下降制御がおこるメカニズムは十分に理解されていない。しかしながら、この技術は、科学及び特許文献にも十分に報告されており、遺伝子制御のためにルーチン的に用いられている

10

20

30

40

50

。例えば、van der Krolら（1990）The Plant Cell 2, 291～299; Napoliら（1990）The Plant Cell 2, 279～289; Zhangら（1992）The Plant Cell 4, 1575～1588を参照のこと。

これにより、本発明は、植物の開花及び／又は分裂組織スイッチング特徴に影響を与える方法であって、開花特徴に影響を与える能力を有するポリペプチドの活性を抑制するために前記植物の細胞内での本発明による核酸からの発現（少くとも転写）を引きおこし又は許容することを含む方法も提供する。ここで、そのポリペプチドの活性は好ましくは、その植物細胞内の下降発現の結果として抑制される。

上述のように、遺伝子の発現パターンは、それを外来プロモーターに融合することによって変えることができる。例えば、国際特許出願WO 93/01294（Imperial Chemical Industries Limited）は、トウモロコシグルタチオン-S-トランスフェラーゼ、isoform II遺伝子（GST-II-27）の27kDサブユニットから単離された化学的に誘導可能な遺伝子プロモーター配列を記載する。形質転換により外因性遺伝子に連結し、植物内に導入された場合に、GST-II-27プロモーターは、外因性遺伝子の発現の外部的制御のための手段を提供する。

GST-II-27遺伝子プロモーターは、成長中の植物に適用することができる特定の化学的化合物によって誘導されることが示されている。そのプロモーターは、単子葉植物及び双子葉植物の両方に機能的である。それゆえそれは、農作物、例えばカノーラ、ヒマワリ、タバコ、テンサイ、ワタ；穀物、例えばコムギ、オオムギ、コメ、トウモロコシ、モロコシ種；果樹、例えばトマト、マンゴー、モモ、リンゴ、西洋ナシ、サクランボ、バナナ、及びメロン；並びに野菜、例えばニンジン、レタス、キャベツ及びタマネギを含む種々の遺伝子に改良された植物において遺伝子発現を制御するのに用いることができる。GST-II-27プロモーターは、根、葉、幹及び再生組織を含む種々の組織に用いるのにも適している。

従って、本発明は、更なる態様において、本発明により供されるヌクレオチド配列に作用的に結合した誘導可能プロモーターを含む遺伝子構成物を提供する。これは、遺伝子の発現の制御を可能にする。本発明は、前記遺伝子構成物で形質転換された植物並びに上述のような構成物の植物細胞内への導入及び／又は適切な刺激、有効な外因性インデューサーの適用による植物細胞内での構成物の発現の誘導を含む方法も提供する。そのプロモーターは、GST-II-27遺伝子プロモーター又はいずれかの他の誘導可能な植物プロモーターであり得る。

センス構成物の正規の場所外の発現は、開花を阻害し、分裂組織を無限成長に変えるのに用いることができる。これは、その収量が特に発現が後に止められる場合に、より長い生長を有することにより増加することができる作物に役立つ。例えばplena/agamousプロモーター下でのcenの限られた発現は、花卉に包まれた無限花序の幹、潜在的に高い飾りついた幹を形成し得る。

アンチセンス又は同時抑制構成物、変異体選択又は遺伝子活性に影響を与える他のメカニズムは、異なる種においてcen及び相同体を阻害し、無限花序頂端分裂組織を花に転化することができる。これは、側生及び“短木様”発達を促進するために、頂部が摘みとられなければならない場合、又はより大きな花又は果実を供するために花の数を制限する場合に作物に役立ち得る。切り花産業は新しい品種を楽しむことができ、他方果樹及び紙木産業は、分枝構造の変化から利益を得ることができる。

議論されるように、tfl1遺伝子は、開花を遅らせる効果も有する。これにより、開花時期に影響を与えるために、センス及びアンチセンス構造の両方を用いることができる。テンサイ及びレタスのような開花を遅らせること、又は開花を促進させることから利益を得る種においては、議論されるように、トランスジェニック体はtfl1又は適切な相同体、変異体もしくは誘導体を用いることができる。

その表現型がcen/tfl1に相補的であり、そしてその逆も可であるflo又はlfyのような他の遺伝子の発現を調節するために、cen及びtfl1遺伝子を用いることができる。

分子及び表現型分析の両方はcen/tfl1とflo/lfyとの間の相互のアンタゴニズムを示す

10

20

30

40

50

。開花の通常のパターンは、これら2つのアンタゴニスト活性間のバランスがいかにして確立されるかによる。このバランスを操作することにより、要求される結果を達成するために異なる方法で開花を制御することができる。cen/tfl1を発現する系の表現型は、遺伝的に（例えばflo/lfy又はその相同体を発現する植物の選択された表現型と、cen/tfl1又はその相同体を発現する植物の選択された表現型を交配することにより）、又は遺伝子転移的に（例えば、flo/lfyと比較してcen/tfl1を誘発するのにより強力な又はより弱いプロモーターを用いる発現カセットを用いることにより）、flo/lfy発現を変えることにより変えることができ、その逆も可である。例えば、延長された生長期でcen/tfl1を過剰発現する植物は、誘導可能プロモーターの制御下でflo/lfy構成物の活性化により花を誘導することができる。

10

予備的分析は、cenがちょうど根の分裂組織より下にある頂端領域にその発現を制限することを示す。それゆえ、cenプロモーターは適切な核酸構成物を用いる頂端への遺伝子の指図された発現に用いることができる。

例えば、cenプロモーターは、花序及び／又は花の分裂組織へスイッチする頂端分裂組織を阻害しそれにより抽苔及び／又は開花を防ぐために、適切な植物毒を発現するのに用いることができる。

この目的のための適切な植物毒は、これらに限定されないが、リボソーム阻害タンパク質（Lordら、（1991）*Seminars in Cell Biol.* 2: 15-22, Stirpe et al.（1992）*Bio/Technology* 10: 405-412）例えばジアンチン（Legnameら、（1991）*Biochem.Biophys. Acta* 1090: 119-122）、ヨウシュヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質（PAP）（Chenら、（1993）*Physiol.Mol.Plant Pathol.* 42: 237-247）、リシンA（Endo及びTsurugi（1988）*J.Biol.Chem.* 263: 8735-8739）、リボヌクレアーゼ、例えばバルナーゼもしくはRNAse T1（Marianiら、（1990）*Nature* 347: 737-741, Mariani et al.（1992）*Nature* 357: 384-387）又はジフテリア毒素A鎖（Thorsnessら、（1991）*Dev.Biol.* 143: 173-184）を含み得る。

20

従って、本発明の更なる態様は、cenプロモーター配列、例えば図4に示されるプロモーター配列、又はその突然変異体、誘導體、変異体、対立遺伝子もしくは相同体、特にcen組織発現パターンに適合し又はそれに類似した組織パターンで組織特異的発現を促進する能力を保持するものを含む核酸単離物を提供する。予測されるプロモーターは、NT4327の図4の上流、おそらく開始コドンの500nt内にある。核酸は、選択されたヌクレオチド配列が発現のための（適切な方向、間隔等を用いる）プロモーターの制御下におかれる遺伝子構成物であり得る。核酸操作及び植物形質転換、及び本発明のこの態様を行うために必要な他の手順のための技術は、cen及びtfl1遺伝子、相同体、突然変異体及び誘導體に関して先に開示される。

30

本発明は、ヌクレオチド1-4417として図4（b）に示されるヌクレオチド配列又は植物内で頂端分裂組織特異的発現を促進するプロモーター能力を供するその突然変異体、対立遺伝子、変異体、誘導體、相同体、もしくはフラグメントを含むプロモーターを含む又はそれから本質的になる核酸単離物を提供する。

そのプロモーターは、要求される組織特異性で遺伝子発現を促進するのに十分な図4（b）に示される配列の1又は複数のフラグメントを含み得る。要求される最小の配列を決定するために、核酸を消化し、次に（テスト配列に作用的に結合したGUSのようなリポーター遺伝子を含む構成物で植物を形質転換することに関する）適切なアッセイを行うために、制限酵素又はヌクレアーゼを用いることができる。本発明の好ましい実施形態は、組織特異的プロモーター活性のために要求される図4（b）に示される最小のヌクレオチド配列を有する核酸単離物を提供する。

40

“プロモーター”とは、下流に（即ち二本鎖DNAのセンス鎖上で3'方向に）作用的に連結されたDNAの転写が開始し得るヌクレオチドの配列を意味する。

“作用的に結合”とは、同じ核酸分子の一部として、転写がプロモーターから開始するための適切な位置及び方向で結合することをいう。プロモーターに作用的に結合したDNAは、そのプロモーターの“転写開始制御下”にある。

50

本発明は、本明細書に供されるプロモーターにおける1又は複数のヌクレオチド付加、挿入、置換及び欠失による、対立遺伝子；突然変異体、変異体又は誘導体であるヌクレオチド配列を有するプロモーターに広げられる。ヌクレオチドを変化させるための核酸の系統的又はランダム変異誘発は、当業者に周知であるいずれかの技術を用いて行うことができる。本発明によるプロモーター配列への1又は複数の変換はプロモーター活性を増加又は減少させることができる。

“プロモーター活性”とは転写を開始する能力をいうために用いられる。プロモーター活性のレベルは、例えばそのプロモーターからの転写により産生されるmRNAの量の測定により又はそのプロモーターからの転写により産生されるmRNAの翻訳により産生されるタンパク質産物の量の測定により定量することができる。発現システム内に存在する特定のmRNAの量は、例えばmRNAとハイブリダイズすることができ、標識される特定のオリゴヌクレオチドを用いて決定することができ、又はポリメラーゼ鎖反応のような特定の増幅反応に用いることができる。リポーター遺伝子の使用は、タンパク質生産を引用することにより、プロモーター活性の測定を容易にする。

本発明の種々の実施形態において、図4(b)に示されるプロモーターの配列の1又は複数のヌクレオチド付加、挿入、欠失又は置換によるフラグメント、突然変異体、対立遺伝子、誘導体又は変異体である配列を有するプロモーターは、示される配列の一方又は両方と少なくとも約60%の相同性、好ましくは少なくとも約70%の相同性、より好ましくは少なくとも約80%の相同性、より好ましくは少なくとも約90%の相同性、より好ましくは少なくとも約95%の相同性を有する。本発明の実施形態による配列は、示される配列又は(DNAは一般に二本鎖であるので)その相補配列の一方又は両方とハイブリダイズすることができる。本発明は、更に、発現されるべきヌクレオチド配列、例えばコード化配列又は(例えばセンス又はアンチセンス制御のための)要求されるRNAをコードする配列に作用的に結合された本発明によるプロモーターを含む又はそれから本質的になる核酸構成物である。その遺伝子は、cenのそれ以外の配列を意味する異種であり得る。一般に、その配列は、発現後に検出されそして好ましくは定量され得るペプチド又はポリペプチド産物に翻訳され得るmRNA内に転写され得る。そのコードされた産物が発現後にアッセイされ得る遺伝子は、“リポーター遺伝子”、即ちプロモーター活性を“レポートする”遺伝子をいう。

更に、本発明の態様として、本発明によるプロモーターを含む核酸を含むベクター構成物及び宿主細胞が供される。宿主細胞は微生物又は植物であり得る。品種又はそうでなくても、前記植物細胞を含む植物も、トランスジェニック植物の生産における前記核酸の使用も本発明により供される。植物内のものであり得る植物細胞のような宿主細胞中でのプロモーターからの発現を引きおこし又はそれを許容する方法は、本発明の更なる態様である。

本明細書に言及される全ての文献は引用により組み込まれる。

本発明を行うための実験研究は、添付の図面を引用して記載されよう。

図1：tf11変異体及び野生型植物の絵

野生型(図1a)において、花序は無限的に成長し、そして花(円)は、無限花序分裂組織の末端(黒ぬりの矢印の頭)から生ずる。tf11植物(図1b)において、花序はしばしば単一の末端の花に置き換わる。

図2：ゲノムDNAプロット

野生型アンチルリヌム祖先系(JI.2 WT)、もとのGatersleben cen対立遺伝子(cen-594)及び変異誘発JI. WT植物及びcen-594間の交配から生じたF1集団において同定された3つの新しいcen対立遺伝子(663, 665及び666)をEcoRIで消化し、プロットし、そしてpJAM2017の隣接領域でプローブした(図3を参照のこと)。cen-594対立遺伝子から生じた変異誘発において生じた野生型F1姉妹細胞(sib)及び野生型復帰変異体(RevT)を同様に処理した。

図3：cen座

図3(a)：cen-663対立遺伝子を有するcenゲノム領域のマッピング。トランスポゾンTam6の挿入部位は、EcoRIがEで、XbaIがXで示される。cen-663を有する植物のcen表現型で

10

20

30

40

50

分離するのに用いられる内部Tam6 Xba I フラグメントは、ゲノムDNA消化物を部分的にのみ切断するEcoR I 部位 (E) に隣接する。これは、cen-663からの6.0kbフラグメントの単離を許容し、pJAM2017としてクローンした。図2のゲノムDNAをプローブするのに用いた2 kb隣接領域 (Acc I, A, EcoR I フラグメントに) は、その座の下より太い線として示される。6.5kb EcoR I 野生型ゲノムフラグメントをpJAM2018としてサブクローンした。7 kbのBamH I, BをpJAM2019としてサブクローンした。これらの野生型クローンの配列決定は、各々中抜きの上流領域に類似する2つの領域を示した。

図3 (b) : cen遺伝子の構造及び配列決定により決定されたトランスポゾン形成対立遺伝子の挿入。エキソンは、コードするものについて黒塗りの、翻訳されないものについて中抜きの四角によって示される。イントロンは水平線により示される。垂直線上の三角は、示される対立遺伝子のトランスポゾン挿入部位を示す。矢印は、転写の方向を示す。

図4

図4 (a) は、5' 及び3' RT-PCR産物からのcen cDNAのヌクレオチド配列並びにゲノム配列との比較を示す。その縮重したアミノ酸配列及び最も長いオープンリーディングフレームを下に示す。

図4 (b) は、cen遺伝子を含む、ゲノム配列を示す。cen cDNA配列は、下側に、予想されるアミノ酸配列で供される。上側は、5' 及び3' 領域並びにイントロンを示す。プロモーター配列が含まれる。

図5 : 動物脂質結合性タンパク質に対するcenの類似性

アンチルリヌムのcenの縮重したタンパク質遺伝子産物 (Cen)、ラットのモルフィンーもしくは脂質-結合タンパク質 (Pbp1) 及びウシホスファチジルエタノールアミン-結合タンパク質 (Pbp) についてのアミノ酸配列 (一文字コード) を示す。

図6 :

図6 (a) は、アラビドプシスESTから得られたtf11 cDNAのヌクレオチド配列、及びその予想されるコードされるアミノ酸配列を示す。すぐ上の塩基で置換した下線の塩基で示されるように、tf11対立遺伝子において点変異を検出した。これらの変異は、コードされたアミノ酸配列における変化：tf11-1においてグリシンをアスパラギン酸に、tf11-11においてグリシンをセリンに、tf11-13においてグルタミン酸をリシンに、そしてtf11-14においてトレオニンでイソロイシンに変化させた。

図6 (b) は、EST cDNAクローン129D7T7を含むアラビドプシスクローンのゲノム配列を示す。EST cDNA配列は、下側に、その予想されるアミノ酸配列で供される。上側は5' 及び3' 領域並びにイントロンを示す。

図7 : cenに類似したアラビドプシス及びコメExpressed Sequence Tags

アラビドプシスクローン (Arab) を完全に配列決定し、そして全長であることを明らかにし、他方、コメクローン (Rice 1946) は3' 末端においてのみ配列決定した。データは、コメクローンがプロセッシングされていない転写物からのcDNAであることも示唆した。それゆえ、ほぼ3' コード化領域のみが転写されて、示される予想されるペプチドを供した。データベースからの別個のコメクローンRice 2918もプロセッシングされていないようであり、それゆえ、cenのエキソン2及び3のそれに似た2つのペプチドa及びbを比較のため翻訳した。

図8 : cen及びtf11の異所発現のためのプラスミド構成物

cen及びtf11オープンリーディングフレームをカリフラワー35Sプロモーターの下流にクローンし、バイナリーベクター (SLJ44024A) 内に挿入して、各々プラスミドpJAM2075 (図8 (a)) 及びpJAM2076 (図8 (b)) を供した。

材料及び方法

植 物

オリジナルのcen対立遺伝子cen-594をGatersleben, Germanyから得た。グロボサ (globosa) 対立遺伝子を含むストックJI.2の誘導体を用いた。このJI.系の植物を15°Cで成長させ、次に15°Cで増殖させたcen-594と交配するのに用いた (Carpenterら、1987)。これら

10

20

30

40

50

の交配からの子孫を成長させ、3つの新しいcen対立遺伝子cen-663, cen-665及びcen-666を得た。各々のファミリーからのこれらのF1植物及び3つの野生型姉妹細胞を切断物として維持した (Carpenter and Coen, 1995)。

DNA及びRNA分析

DNA及びRNA抽出のための方法及びプロット分析を、上述 (Coenら、1986; Coen及びCarpenter, 1988) の通り行った。スクリーニングに用いたTam6フラグメントは、EcoR I 部位により両側に隣接した4kb Xba I フラグメントであった (図3のマッピングを参照のこと: Doyleら、未出版)。Tam6でcen-663内で同定された6.0kb EcoR I フラグメントを、(オリジナルのF1の自殖から得た) ホモ接合cen-663植物からのゲノムDNAを消化し、アガロースゲル電気泳動によりDNAを分画し、そして5~7kbの大きさの画分を電気溶出することにより単離し、これをNACS PREPACカラムを用いてイオン交換クロマトグラフィー (Bethesda Research Laboratories, Inc.) により精製し、そしてKitプロトコルに記載されるようなEcoR I で消化され、ホスファターゼ処理されたラムダgt10 (Amersham cDNA迅速クローニングモジュールラムダgt10コードRPN1713) に連結した。試験管内パッキング (AmershamモジュールN3342) は、約150,000の組換え体のライブラリーを供し、それをTam6プローブを用いてスクリーニングした。6.0kbのEcoR I フラグメントを含む1つの陽性体を、3.6及び2.4kbバンドは種々の量で存在したが、単離し、精製した。その6.0kbフラグメントをBluescriptベクターKS+ (Stratagene) 内にサブクローンしてpJAM2017を供し、そしてマッピングした時、3.6及び2.4kbフラグメントを供する内部EcoR I 部位を示した。これは、6.0kbバンドが、スクリーニングに用いたTam6及び内部Xba I プローブのマッピングから予想されるように、部分的にのみ消化されたことを示唆した。Tam6に隣接する領域 (2kb Acc I - EcoR I フラグメント) を用いてSau3Aで部分的に消化された野生型アンチルリヌムDNAのラムダEMBL4ライブラリーをスクリーニングするのに用いた。約500,000の組換え体から、平均サイズ15~16kbの挿入を有する7のオーバーラップするクローンを単離した。これらのクローンを用いてゲノム領域のマッピングを作製し、異なる対立遺伝子に応じた挿入物の適切な位置を決定した。正確な挿入部位を、両方の方向においてcenに対するオリゴヌクレオチド、及び転置要素のCACTAファミリーに対する保存されたオリゴで、各々の対立遺伝子のゲノムDNA上のPCRを用いて決定した (Doyleら、未出版)。6.5kbのゲノムクローンpJAM2018は全ての対立遺伝子の挿入部位を含んでいたが、野生型アンチルリヌムの若い花序から単離したポリ (A) RNAから作製されたcDNAライブラリーに対してプローブとして用いた場合にいずれのcDNAクローンも同定しなかった (Simonら、1994)。それゆえ、cen-663対立遺伝子に隣接する小さな領域 (約200bp) を、United States Biochemical CorporationからのSequence version 2を用いるジデオキシヌクレオチド法 (Chen及びSeeburg, 1985) により配列決定した。この配列に基づくオリゴを、野生型及びcen変異体の若い花序からの全RNAに基づくRT-PCRについて、可能なオープンリーディングフレームにおいて両方向においてデザインした。これは、対立遺伝子各々において発現されないcen-663内の挿入物に隣接する領域起源のcDNAを同定した。この部分的cencDNAをpJAM2020としてBluescriptベクターKS+にサブクローンした。ゲノムクローン及びcDNAクローンの両方を全体的に配列決定して、イントロン-エキソン境界を決定した。cen mRNAの5'末端をcDNA末端の迅速増幅のための5' RACEのキット (Gibco BRL) を用いて決定した。完全なcen cDNAを、便利な制限酵素部位を用いて異なるRT-PCR産物から作製した。データベース・サーチは、BLASTIN (Altschulら、1990) 及びFASTA (Pearson及びLipman, 1988) を含む。アラビドプシスクローン129D7T7を、Ohio StateのArabidopsis Biological Resource Centerから得て、それは、もとはA. タリアナ変異コロンビア (*A.thaliana* var *Columbia*) から単離し、MSU-DOE, MichiganのNewmanらによって部分的に配列決定されたものであった (受託番号T44654)。コメクローンS1946_1AをSasakiら (National Institution of Agrobiological Resource Rice Genome Resource Project, Ibaraki, Japan) から得て、それは、オリザ・サチバ (*Oryza sativa*) から単離したものであった (受託番号D40166)。コメクローンR2918_1Aの部分的配列はデータベースから得た。クローンされたアラビドプシスのマッピングは開示される通りであった (Schmidtら、1994)。

10

20

30

40

50

in situハイブリッド形成

RNAプローブのジゴキシゲニン標識形成、組織調製及びin situハイブリダイゼーションのための方法は記載される通りである（Bradleyら、1993）。部分的cen cDNAの内部Acc I – Rsa I フラグメントpJAM2020をBluescriptベクターKS+にサブクローンし、T 3 及び T 7 ポリメラーゼを用いるアンチセンス及びセンス制御プローブを作るのに用いた。fflの内部フラグメントをPCRにより作り、pGEM-Tベクター（Promega）にサブクローンしてプラスミドpJAM2045を供し、そしてT 7 及びSP 6 ポリメラーゼを用いてアンチセンス及びセンスプローブを作るのに用いた。

構成物及び形質転換

cen及びtfl1オープンリーディングフレームを単離し、その各々をプラスミドSLJ4D4及びSLJ4KI各々のGUS遺伝子を置換するのに用いた（Jonesら、1992）。CaMV 35Sプロモーター及びocs又はnosターミネーター各々に隣接したcen及びtfl1オープンリーディングフレームを単離し、バイナリーベクターSLJ44024A（Jonesら、1992）にクローンしてpJAM2075及びpJAM2076を供した。アラビドプシスの形質転換を、真空浸透（vacuum infiltration）（Bechtoldら、1993）及び根形質転換（root transtormation）及び再生（Valvekansら、1988）により行った。

結 果

新しいcen対立遺伝子の単離

Gaterslebenから得たオリジナルのcen対立遺伝子（cen-594）の初期の分析は、それはあまり不安定でなく、それゆえトランスポゾン誘導され得ないことを示唆した。更に、それは、John Inne系に存在するものに利用できるプローブからのトランスポゾンの全く異なるアレイを有し得る系内であった。それゆえ、1990年に、特異的タグの試みが、Gatersleben対立遺伝子と交配した15°Cで生長させたトランスポゾン活性John Innes系を用いて作られた。選択された系は、ストックJI.2の誘導体であり、新しいグロボサ（globosa）（glo）対立遺伝子を含んでおり、これは、トランスポゾンはglo領域内でおそらく活性であることを示唆した。初期のマッピングデータはcen及びgloの間の連結を示唆し、この系がcenの近くの活性トランスポゾンのソースを供し得る（Stubbe, 1966）。また、トランスポゾンは連結した部位にジャンプする傾向があるので、cenにおける挿入物の頻度はこの系内に増強することができた（Coenら、1988）。1992年には、約10,000の植物のスクリーンから、cenの3つの新しい対立遺伝子がF 1 形成において上手く単離された。これらの対立遺伝子の生産は、cenが単離されるのを許容する道具である特有のリソースを供した。

野生型及びcen変異体の記載

全てのcen対立遺伝子における早期の開発は野生型；休眠の又は更なる生長枝条を有する葉を生産する生長期を進む頂端分裂組織としてであった。開花に基づいて、野生型及びcen変異体の両方の頂端分裂組織は、それらの軸内に花を有する変化した葉（苞葉）を作り出すようスイッチした。しかしながら、野生型はこの状態を維持したのに対し、cen植物の頂端分裂組織は、いくつかの補助的な花が形成された後に花に変わった（図1）。温室又は制御された環境の条件（16時間の日照時間で20～25°C）において、各々の対立遺伝子の主要な枝条上に約5～20の補助的な花が形成され、そして側生の枝条上にはほとんどなかった。その新しい対立遺伝子は、末端の花の前に形成された補助的な花の数及び頂端の花の形態の両方において変化を示した。頂端の花の特定範囲の対称が、補助的な花のそれに近い形態への放射状の対称から見い出された。

cenのクローニング

cen-663及び3つの野生型F 1 姉妹細胞からのゲノムDNAをEcoR I で消化し、トランスポゾンTam1～Tam8でプローブした。Tam6プローブは、cen-663中に特有に存在し、cen表現型に連結した6.0kbのバンドを供した。cen-663の野生型、ストックJI.2への戻し交雑から、F 2 ファミリーの個体からDNAをプローブすることにより連結を確立した。そのフラグメントを、EcoR I 消化ゲノムcen-663 DNAの5～7 kb画分を単離し、ラムダベクターに連結し、そしてその生じたライブラリーをTam6でスクリーニングすることにより、単離した。陽

性クローンを単離し、そしてその挿入物をBluescriptベクターKS+にサブクローンしてpJAM2017を供した。このクローンをマッピングして、その隣接領域を、異なるcen対立遺伝子及び野生型姉妹細胞に対するプローブとして用いた（図2）。cen-663において、予想される6.0kbのバンド及び種々のレベルの2.5kbバンド（6.0kbフラグメントの誘導体、以下に説明する）を検出し、他方野生型祖先、JI.2は6.5kbのバンドを供した。特異的タグ実験で親として用いたGaterslebenからの対立遺伝子cen-594は、8.1及び2.5kbのバンドを供した。予想される通り、これらの2つのバンドは全てのF1 cen対立遺伝子及びそれらの野生型姉妹細胞中に存在した。しかしながら、各々のcen変異体は6.5kbの先祖野生型バンドを失っていた。cen-665においては、3.4kbの新しいバンドが存在し、他方cen-666及び野生型はいずれの新しいバンドも存在しなかった。cen-666対立遺伝子はホモ接合状態で得られず、未知の大きさの欠失を有するようであった。我々が、ホモ接合のcen-594, cen-663及びcen-665の復帰変異体子孫の分析からのcen座の部分をクローンし、15℃で成長させ、自殖した試験が野生型表現型の復帰変異体子孫を供したことは、これらの対立遺伝子が各々トランスポゾン挿入により引き起こされることを示した。各々の場合の復帰変異体は、それらのヘテロ接合表現型から予想されるように、6.5kbの復帰した野生型バンド及び各々の対立遺伝子の対応する変異体バンドを有した（図2）。

野生型ゲノムライブラリーからのオーバーラップするクローンを単離してcen領域のマッピングを作製するのに用いた（図3a）。野生型6.5kb EcoR I フラグメントをpJAM2018としてクローンし、全体を配列決定した。異なるcen対立遺伝子を引き起こす挿入物を、最初にゲノムDNAプロットによりマッピングした。cen領域へのオリゴヌクレオチドとの組合せにおいて、アンチルリヌム中のトランスポゾンのファミリーのCACTA末端への保存されたオリゴヌクレオチド（オリゴ）を用いて（以下を参照のこと）、示される対立遺伝子を正確にマッピングした（図3b）。異なる挿入物は6.5kb EcoR I フラグメントの右手端がcen機能に重大であることを示した。しかしながら、pJAM2018のこれ及び他の領域を野生型アンチルリヌムの若い花序からのポリ（A）RNAから作られたcDNAライブラリーをプローブするのに用いた場合、ハイブリダイズするクローンは検出されなかった。RNAプロットも同様に不確定的にプローブされたので、約200bpの隣接するcen-663対立遺伝子を配列決定した。この配列及び両方の方向における可能なオープンリーディングフレーム（ORF）に基づくいくつかのオリゴを合成し、野生型アンチルリヌム又はcen変異体、若い花序又は生長枝条及び葉からの全RNAでのRT-PCRに用いた。同じ方向（図3のマッピングにおいて左から右に5'から3'）を示すオリゴのみがPCR産物を供し、これはcen対立遺伝子のRNAから欠如していた。

3' PCR cDNAをpJAM2020としてクローンし、cen mRNAの5'末端を5' RACE-PCRにより決定した。完全な予想されるcDNA及びORFを決定した（図4）。その転写単位は約930bpを含む4つのエキソンからなっていた。ORFは20.3kDaの181アミノ酸タンパク質をコードする能力を有していた。データベースに対する調査は、動物中に存在する脂質結合タンパク質のファミリーに最も類似性を示した（図5）。大きな類似性の領域はそのタンパク質全体を通して広がっており、潜在的なヌクレオチド結合領域は部分的に保存されていた（CEN残基116～132）。これらのタンパク質は、GTP-結合タンパク質とも複合体形成できるが、両方の機能のためのドメインは明らかに定義されなかった。

プローブとしてcen cDNAを用いて、野生型アラビドプシス・タリアナ変種コロンビアのゲノムライブラリーを適度なストリンジェンシーでプローブした。1つの強くハイブリダイズするクローンを単離し、そのプローブに最も似た領域を全体的に配列決定した（図6）。合間に、データベースサーチは、cenに似たアラビドプシスExpressed Sequenced Tags（EST）クローン129D7T7を同定した。アラビドプシスクローンの完全な配列決定は、cenに対して70%同一で、約82%類似した予想されるタンパク質（Arab）を示した（図7）。アラビドプシスEST配列はゲノムクローンと同一であり、イントロン-エキソン構造を測定するのを許容した（図6）。これは、イントロンについて同一の位置でcen遺伝子に極めて似ていた。更なるデータベースサーチは、その部分的配列がcenに似た位置でイントロンを有するようである2つのコメのクローン（S1946_1A及びR2918_1A）を同定した。

これらの配列は、C末端、Rice 1946についてのcenの端と80%の同一性を有する60アミノ酸ペプチド、及びcenのエキソン2及び3と高い類似性を示す2つの予想されるペプチド（Rice 2918a及びb）を予測した（図7）。

cenに対する相同体としてのtfl1の同定

アラビドプシスクローン129D7T7を、染色体5の端に最も近い利用できるRFLP及びYACマーカーを用いてマッピングした。tfl1変異はこの領域をマッピングした。この配列に基づくプライマーを、tfl1の4つの対立遺伝子内の対応するゲノム領域（tfl1-1, tfl1-11, tfl1-13, tfl1-14）を単離するのにPCRで用いた。

異なるtfl1対立遺伝子の配列比較のため、野生型アラビドプシス（Columbia）及びtfl1対立遺伝子-1, -11, -13又は-14を有する植物を長期間、土の上で成長させ、そしてミニブレップ法を用いてゲノムDNAを単離した。凍結しながら葉の組織をホモジナイズし、緩衝液（50nM EDTA、0.1M Tris-HCl、pH 8、1% SDS）を加え、そしてそのサンプルを65℃で2分、解凍した。DNAをフェノール、フェノールクロロホルム、クロロホルムで抽出し、そしてイソプロパノール／酢酸ナトリウムで沈殿させた。エタノールで洗った後、DNAをRNaseを含むTE中に再懸濁した。ATGの上流約160bp及び停止コドンの下流120bpを配列決定するためにオリゴヌクレオチドプライマーをデザインした。PCR人偽結果を避けるために、各々のDNA調製物に基づいて3つの別個のPCRを行い、各々からの1つのPCR産物をpGEM-Tベクター（Promega）にクローンした。約1.3kbの各々のクローンを、ABI Prismシステム（Perkin-Elmer）を用いて配列決定し、いずれか1つの対立遺伝子についての全部で3つのPCR産物中に存在する塩基変換のみを本物であると考えた。

全部で4つの対立遺伝子が、予測されるアラビドプシスタンパク質を破壊するであろう変異を示し、この遺伝子がtfl1であることを証明した。その変換を図6（a）に示し、そして図に示されるように単一ヌクレオチド変異であり、次のアミノ酸変換：tfl1-1—グリシンからアスパラギン酸へ、tfl1-11グリシンからセリンへ、tfl1-13—グルタミン酸からリシンへ、そしてtfl1-14—トレオニンからイソロイシンへ：を生じた。（ヌクレオチドとアミノ酸との両方の変異体配列は各々本発明の態様である）。

cen及びtfl1の発現研究

cen及びtfl1 RNAの時期的及び一組織学的分布を、アンチルリヌム及びアラビドプシス各々の野生型組織に対するtfl1アンチセンスRNA上のジゴキシゲニン標識cenを用いるin situハイブリダイゼーションにより決定した。野生型において、cen及びtfl1は、頂端分裂組織直後の領域における若い花序の枝条頂端において発現される。

アラビドプシスにおけるtfl1及びcenの異所性発現

cen及びtfl1を過剰発現させるために、それらの各々のオープンリーディングフレームをカリフラワー35Sプロモーターの下流にクローンし、バイナリーベクター内に挿入してプラスミドpJAM2075及びpJAM2076を供し（図8）、形質転換のために用いた。35S-cen構成物で1つの形質転換体を得て、これは、抽だい及び開花の遅れ並びに花の葉の多い枝条への転化を示した。35S-tfl1で6つの形質転換体を得、それら全てが花の葉の多い枝条への転化を示した。それらは、特定範囲の開花及び抽だい時期も示し、そして最も厳しい場合、開花は野生型と比較して大きく遅れた（ロゼット葉の通常の数2倍超）。これらの結果を合わせると、cen又はtfl1の異所性発現が開花を遅らせることができることを示す。更に、アラビドプシスの開花時期を変えるアンチルリヌムのcen遺伝子の能力は、これらの遺伝子が広い分類学的距離を横切って機能し得ることを示す。

引用文献

- Altschul, S.F. ら., (1990) J.Mol.Biol. 215; 403-410.
- Alvarez, J. ら., (1992) The Plant J. 2; 103-116.
- Bechtold, N. ら., (1993) R.Acad.Sci., Paris 316 1194-1199.
- Bradley, D. ら., (1993) Cell 72; 85-95.
- Carpenter, R. ら., (1987) Mol.Gen.Genet. 207; 82-89. 10
- Carpenter, R. ら., (1995) Development 121; 19-26.
- Chen, E.Y. ら., (1985) DNA 4; 165-170.
- Coen, E.S. ら., (1991) Annu.Rev.Plant Physiol.
Plant Mol.Biol. 42; 241-279.
- Cone, E.S. ら., (1988) EMBO J. 7; 877-883.
- Cone, E.S. ら., (1989) In Mobile DNA, Berg, D.E. and Howe, M. 20
M.(eds), American Society for Microbiology, Washington.
- Jones, J.D.G. ら., (1992) Trans.Res. 1; 285-297.
- Kukuck, H. ら., (1930) indikt.Abst.-u.vererbungs1., 56; 51-83
- .
- Pearson, W.R. ら., Proc.Natl.Acad.Sci. USA. 85; 2444-2448. 30
- Schmidt, R. ら., (1994) Plant J. 5; 735-744.
- Shannon, S. ら., (1991) The Plant Cell 3; 877-892.
- Simon, R. ら., (1994) Cell 78; 99-107.
- Stubbe, H. (1966)(ed). Genetik und Zytologie von Antirrhinum
L. sect Antirrhinum. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Valvekans, D. ら., (1988) Proc.Natl.Acad.Sci. USA 85; 5536-5 40
540.

SEQUENCE LISTING

<110> PIONEER HI-BRED INTERNATIONAL, INC.

<120> FLOWERING GENES

<130> A985199

10

<140> 9-511773

<141> 1996-09-13

<150> GB9518731.6

<151> 1995-09-13

<160> 6

20

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 929

<212> DNA

<213> Antirrhinum majus

<400> 1

30

aagcaacatc aaaaacagca tcataaatcc ttttactttt gttgcatttt tatcatctta 60

attaagcatt cttctccata taatatagtt atggcagcaa aagtttcatc ggacccgcta 120

gtgataggga gagttatcgg agacgttggt gatcatttta cctcaactgt taaaatgtct 180

gttatattaca actccaacaa ttccatcaag catgtctaca atggccatga gccttttcct 240

40

tccgctgtta ccctacacc tagggttagg gtccatggcg gtgatatgag atcatttttc 300

actctgataa tgacagaccc tgatgttcct ggtcctagtg atccatacct gagggagcac 360

ttgcactgga tagtcacaga tateccaggg accactgatt cctcattcgg caaagaagta	420
gtgagctatg agatgccaag gccgaacata gggatccaca ggtttgtatt tcctctgttc	480
aaacagaaga aaagagggca ggcatgttg agcccaccag tagtgtgcag ggatggattc	540
aacacgagaa aattcacaca ggaaaatgaa ttgggcctcc ctgttgccgc tgtcttcttc	600
aattgccagc gcgaaaccgc tgccagaagg cgttgaacgt actatttatc catatcttat	660
ggctctgcat atatatatat atatatgcta gtactactga tgtatcttca tcagggaaat	720
aaatcatatg tagggtttct ttigcaatga taaagagtc ctagctctgc taccaaaaaa	780
aattgttaga gtggcctttg caagtagtga aaggatatgt gtacgtaata gggaaggaaa	840
agatggagaa atgggaaatt gtgatgtcca ctgtttataa attgatgtaa ttaatttcta	900
tgatatataa ttiggaagtt gtgttgtgc	929

10

20

<210> 2

<211> 181

<212> PRT

<213> Antirrhinum majus

30

<400> 2

Met	Ala	Ala	Lys	Val	Ser	Ser	Asp	Pro	Leu	Val	Ile	Gly	Arg	Val	Ile
1				5					10					15	

Gly	Asp	Val	Val	Asp	His	Phe	Thr	Ser	Thr	Val	Lys	Met	Ser	Val	Ile
			20						25				30		

40

Tyr Asn Ser Asn Asn Ser Ile Lys His Val Tyr Asn Gly His Glu Leu
 35 40 45

Phe Pro Ser Ala Val Thr Ser Thr Pro Arg Val Glu Val His Gly Gly
 50 55 60

Asp Met Arg Ser Phe Phe Thr Leu Ile Met Thr Asp Pro Asp Val Pro
 65 70 75 80

Gly Pro Ser Asp Pro Tyr Leu Arg Glu His Leu His Trp Ile Val Thr
 85 90 95

Asp Ile Pro Gly Thr Thr Asp Ser Ser Phe Gly Lys Glu Val Val Ser
 100 105 110

Tyr Glu Met Pro Arg Pro Asn Ile Gly Ile His Arg Phe Val Phe Leu
 115 120 125

Leu Phe Lys Gln Lys Lys Arg Gly Gln Ala Met Leu Ser Pro Pro Val
 130 135 140

Val Cys Arg Asp Gly Phe Asn Thr Arg Lys Phe Thr Gln Glu Asn Glu
 145 150 155 160

Leu Gly Leu Pro Val Ala Ala Val Phe Phe Asn Cys Gln Arg Glu Thr
 165 170 175

10

20

30

40

Ala Ala Arg Arg Arg
180

<210> 3

<211> 6527

<212> DNA

<213> *Antirrhinum majus*

10

<400> 3

tcatgtaaca tgaaatcact acccttacat gtgtcttggg cagacgaagt ggcctcaatt 60

ctaattgagc aaacatggat aggcaaacga aacaagactt agaagacatt aaatcaattt 120

gctctaagta atgatcgaat ttgaggttaa aggagtgaat tacacttctt tagccaaata 180

20

tcaaattgta ctttttaata ctcaattttt tattcatttg aagactgtga cttctttagt 240

tcttttattg tcttctttct ctgttgatat attactttta ttgaaaacgc tcgttgaata 300

atatgcaaag catatgataa attcataccc ctcatataac cggttgattc taatattttg 360

caagaaggac cacaaccctt agttggtttt tegtittcct ttgtttctg acttccactg 420

30

cccttgtttc aaaatttaac cagacaaga attgggacag ataatttgaa tatttcaatt 480

cagggaaaaa aggaaaataa gaaattacag ctcttcttt tagaatgaat taaagtatta 540

aacaattggt actttgttga aaaactacca catcgttacc gctcttatac catttaaacc 600

caaaccatta attgatattg gaacttttca aaattaatga tgttttaatt gcaacaagta 660

40

atttgctagc attttaatct attttatctt ctatgttact tgtagcaaca caacaccttt 720

tcgtgtgctg ttatcagatt ttgtattctc aattatcgta taaaccgtga agatatgccc 780

ctcgatccac ggtcttaagc tticaattat ttgaatattg gaatctttgt ctcgggttta	840	
tacctgcagc caagatattc tcaatgtgcc attcttgggt gccatttcat ccctaattag	900	
aaattacgaa tttttttttt aaaatttcta gcacggaaag ttgtctgttt tgaaaagacc	960	
aactcgtgta ttttatgcta ttggccaatt agttaatttg tcatttcctt tttttttttg	1020	
taatgtaaat tttagaatat gaaagcacta atgattatga tgaagtaaac acttggttaat	1080	10
tttgattcct tttcttttct ttttaatttt tcagatatgt ttataattat tcattaacat	1140	
ttaattattc ttttactttc tttcccaatt aaacatgaat taagaatgtt attatgttat	1200	
tatgtaaaaa attacaaacg tgcgcatttt tatttctctc tctaagctca tgaatatata	1260	
ataataattt attaacattt aacaaatata tatctgtaga gataaagaaa aaaaagtatt	1320	20
accatcacac atatcatagg aatatgcacc aggatgggtga gaaataataa ggttgaagta	1380	
aagaaagatg acgaaaatga aaagaaaaaa aaaagaaaaa attaaaaaag gagaaattat	1440	
atgagttiagt ttgttaatgc accacttata taacctttta aataaatcat acccctttta	1500	
aaagtgaatg tacaacaccc ttatgaattg gatgaggagt tgttcaagta tggggcattt	1560	30
tattttataat ataatatataa ggagtttcaa ttgaataata tctaataaaa aatattgttg	1620	
ggtgtaaatt tcttgaacga tgatgggtga tctcatactt tttcacaaat atgtatggtc	1680	
acagtttata attatatatc taaacatgta tatgtaaact gaatatggc aaaagtatat	1740	
tgtacggccc aggtataaac ttattatagg gaagataagc atttgttcta ctataacac	1800	40
ccttattcgg ttaaggecca acttgatact ccattgggcc tgaagagatt tcttgaaaag	1860	

cctactaaca ttggggcctt gaggacgagg ttcgagtcct gaatggagaa ttacatgaa 1920
 ccaggatatg taagcgggcc aaaaaggccc aaattaatat aattgatttt attattacta 1980
 agttctatgc agtagttgat ttgttatcat tgtttatcca cgttattaag gattacctga 2040
 gtttatttgt ttctacttc tcattctaata cctgaatttt agaaaaaatg atcctacctc 2100
 acatatgtta agactaaaat ttaatttcta gcaaagttt cgatttattg gaaccagaaa 2160
 gctctttatg tcaatcagca atgagcataa cttcttctc catccaatga ttcataatta 2220
 gatgattaac aaatgattaa gtgcaatatg agtcacgaat catcgagtat tgttccattt 2280
 atttagttat caaattaatc taagcatttc ccccgtcgaa gttcaaatat gtcataattat 2340
 aaacggaatt atgccaccat acaatcttaa tatgtacgac gattctttcg agttgcgaca 2400
 aatagttctt agcactgact taaattaaagg accctctgaa gatatagcag aatattaccg 2460
 tgtgtatata tattattcaa tgaccaaag tgaagctcat taaaatatag aatttaatta 2520
 ccgtgtatat atatatatat atatatatat atatatatat aaccacattc 2580
 atattacgta taacttgtaa atcaaaggtt ggcttaatag tgtaagatcc tattgagttc 2640
 tcacgggtgg atgcgatcta tttagcaaaa cgtcacgaat ttgatcccta gcatgtgcaa 2700
 atttcattgc gtcagtacaa ccatgattcg tgagcaaaaa attgttattt tcgggggtgca 2760
 ctttaaaaat tcgggcagag tgttgagaca taaattgaac ttttgtctt taaaacgata 2820
 ttgccccgtt acgggtgctaa cctaatacta tattttaagt aatcgttica taagtataca 2880
 cgtataagta aaaataatag caaatgagc gtattgagct caccgttttt gaataaaata 2940

10

20

30

40

acaaatttac atcggatgag aaccgcatcg ccgcaggaaa aaagaagggt gaaggagaga	3000
gatacaaata agaagaagca aaagcttgag tatagatact caaggtatag aagtcaagtt	3060
caactagagc aaactattaa gaaattaaat aaagcattag gacttacttc ttatagcaaa	3120
cgaaccctcc cccaccttgc tacattaggg atagctaaaa ctcaaaattt attcccttct	3180
tttcgttgag atgacctctc aactcattgt aaaatgacat gccatcaatt gtggagttcc	3240
ttttatgtat gcgctgatga aaccttcttt atttattctc ctcatataca cacaaatgtc	3300
atgctggaga accttagaac ctccactttt attccttaaa tacaaaagct cataactctt	3360
ttggtagctg caaatgtgca aacagtatcc agaaattcta ttgccccttt ctttacatta	3420
aaaaaggaat tacaaagatg aacatcctca ccctatagaa attaatgggg taatagcaaa	3480
aagtactcga tgttatttct aattggcaaa agaatcactg tgttatttta attagcaaaa	3540
gaaccttgic ttattcggta aatggcaaga aaaaaattgg ctcttagttt ggaactacac	3600
atggtaaatg tgagicttgg ctccctgactt acaaccattt ttgatgattt tccccactct	3660
tccgtaatgc ttcagtgttt taataaaatt agcaaaaaac atccccttgt gtttttatga	3720
aattggcaat aacctccctg tgtttcatat aattggcaat aacccccctct tctatatacg	3780
tttccttcaa tcagatgtat caatttcacg gggttcgagg aagtaagctt aaaaagcata	3840
attttacctg ctattaacgc ccaaaaacaa aatgagaata tgctaattat cgaaaaacac	3900
atgcatgttc tttttttgcc aatcaaaatg acattggggg ttatttgtca attaaaaata	3960
acacgaggct agtttttgtt aatagctcag aaatcaatac ctaattaacc acgcagtatt	4020

10

20

30

40

aattttacat tttatgtgag tgcagagag atataagaag atacataagc gtggcatgtc	4080	
aaatcatctt taataagtat acttcttgct ttgtatatt tttttttcc aaaagaaaaa	4140	
acattcgtcg tagcttgggt gcccgccaga taatgtctaa aaccaatgtg tcatagctag	4200	
atggctgggt ttaccact ttgaaactcc citaattcag tattttaatc aaaattctcc	4260	
tcgcactgca atgatctgcg agttgcttgt agccactata aatatatggg gtttgctatt	4320	10
ccattctaag caacatcaaa aacagcatca taaatccttt tacttttgtt gcatttttat	4380	
catcttaatt aagcattctt ctccatataa tatagttaag gcagcaaaag ttcatcggga	4440	
cccgctagt ataggagag ttatcggaga cgttgttgat catttacct caactgttaa	4500	
aatgtctgtt atttacaact ccaacaattc catcaagcat gtctacaatg gccatgagct	4560	20
cttccctcc gctgtacct ctacacctag ggttgagggt catggtggtg atatgagatc	4620	
atttttcaact ctggtattgt ttactattc tgtgctactt atctcttagg ttaattattg	4680	
tgaactctct ataccctaaa atgaaagata ttttgaacc ttcaatgtaa taagtctac	4740	
atgtgagggt cctatcaaaa ttatctatc aaaattgtgc aatacttttt gtagtggtac	4800	30
tagatatatg tcatgtgtaa atatgataaa tacaagataa aaacttagat actttttct	4860	
ctatccacc atcactgcat gcatggatta aggtcacgcc atacattata tacacatgtc	4920	
gttactctaa tagcgatata tagagtggta acgatttttt ggtacagaaa tggctgtgta	4980	
agttatacag atgttcacaa ccacttaaac ttttcgtagt ttgaggaat gttatttagt	5040	40
gtgtagaata tttaatatct tgaagcaatt aatttgaga gatttactca attagtttgt	5100	

ttgtttcaga taatgacaga cctgatgtt cctggtecta gtgatccata cctgaggag 5160
 cacttgcaact ggtaaataatg ctactttgg aactttcttc acacactaga aaaataacac 5220
 aaaagatcat caagccctaa atttttcctt gcatggagga acatatataa cagggttct 5280
 ttacattga gtaaacaaaa gtcactagcg aaatgtatag ctaaccagtt tatgacaatt 5340
 caagctgttt taatcattct tccaattaat ggccatatat atatatatat atatactccc 5400
 gataaaaaat gaatcttttc aagaaaattt tgtcagctgc aatgattcaa tcagctttct 5460
 tgaaaaatccc ataaaagaaa tgaacaactt gctaattatg catttgatac ttaaagagta 5520
 caagtttaat tatgtcaccg cgctgatata acttgatttg actaactcgc aggatagtca 5580
 cagatatccc aggaccact gattcctcat tcggtatgat taaattttcc ctccacattt 5640
 aaacccaaat acattaataa taatacccaa ataaatattc caccatgact aattaattaa 5700
 taaattgttg caggcaaaga agtagtgagc tatgagatgc caaggccgaa catagggatc 5760
 cacaggtttg tattttctct gticaaacag aagaaaagag ggcaggcgat gttgagccca 5820
 ccagtagtgt gcagggatgg attcaacacg agaaaattca cacaggaaaa tgaattgggc 5880
 ctccctgttg ccgctgtctt cttaattgc cagcgcgaaa ccgctgccag aaggcgttga 5940
 acgtactatt tatccatata ttatggctct gcatatatat atatatatat gctagtacta 6000
 ctgatgtatc ttcatcaggg aaataaatca tatgtagggt ttcttttgca atgataaaga 6060
 gtccctacgt ctgctaccaa aaaaaattgt tagagtggcc ttgcaagta gtgaaaggat 6120
 atgtgtacgt aataggaag gaaaagatgg agaaatggga aattgtgatg tccacttgtt 6180

10

20

30

40

ataaattgat gtaattaatt tctatgatat ataatttgga agttgtgttg tgcaaatttt 6240
 gaaggcgta atttttgaat ggttgcaaaa attattcttt atcttttctt tttaaaacgt 6300
 ggaagcacia tcattaatgt ctctttgttt ggtaaacatt tatgtgtatg tctacaattt 6360
 ttatcgttta ttgtactaa taattttagt ttgaacatg caatgtttga ccttttccta 6420
 tccgattgat catgtgggtt ttgatatta ttctttgaag agtgcttatg ctgttcaggg 6480
 cgaattcgat atcaagctta tcgataccgt cgacctcgag gggggggg 6527

10

<210> 4
 <211> 668
 <212> DNA
 <213> Arabidopsis thaliana

20

<400> 4
 agttaacaaa agaaaatgga gaatatggga actagagtga tagagccatt gataatgggg 60
 agagtggtag gagatgttct tgatttcttc actccaacaa ctaagatgaa tgtagttat 120
 aacaagaagc aagtctccaa tggccatgag ctctttcctt cttctgttcc ctccaagcct 180
 agggttgaga tccatgggtg tgatctcaga tccttcttca ctttgggat gatagacca 240
 gatgttccag gtcttagtga cccctttcta aaagaacacc tgcactggat cgttacaaac 300
 attcccggca caacagatgc tacgtttggc aaagaggtgg tgagctatga attgccaagg 360
 ccaagcatag ggatacatag gtttgtgttt gtctgttca ggcagaagca aagacgtgtt 420
 atctttccta atatcccttc gagagatcac ttcaacactc gtaaatttgc ggtcgagtat 480
 gatcttggtc tccctgtcgc ggccgtcttc tttaacgcac aaagagaaac cgctgcacgc 540

40

aaacgctagt ttcatgattg tcataaactg caaaaatgaa agaagaaaat ttgcatgtaa 600
 tctcatgttt atttgtgttc tgaatttccg tactctgaat aaaaactgcc aaagatgagt 660
 tgaatccg 668

<210> 5 10
 <211> 177
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 5

Met Glu Asn Met Gly Thr Arg Val Ile Glu Pro Leu Ile Met Gly Arg
 1 5 10 15 20

Val Val Gly Asp Val Leu Asp Phe Phe Thr Pro Thr Thr Lys Met Asn
 20 25 30

Val Ser Tyr Asn Lys Lys Gln Val Ser Asn Gly His Glu Leu Phe Pro
 35 40 45 30

Ser Ser Val Ser Ser Lys Pro Arg Val Glu Ile His Gly Gly Asp Leu
 50 55 60

Arg Ser Phe Phe Thr Leu Val Met Ile Asp Pro Asp Val Pro Gly Pro
 65 70 75 80 40

Ser Asp Pro Phe Leu Lys Glu His Leu His Trp Ile Val Thr Asn Ile

85

90

95

Pro Gly Thr Thr Asp Ala Thr Phe Gly Lys Glu Val Val Ser Tyr Glu
 100 105 110

Leu Pro Arg Pro Ser Ile Gly Ile His Arg Phe Val Phe Val Leu Phe 10
 115 120 125

Arg Gln Lys Gln Arg Arg Val Ile Phe Pro Asn Ile Pro Ser Arg Asp
 130 135 140

His Phe Asn Thr Arg Lys Phe Ala Val Glu Tyr Asp Leu Gly Leu Pro 20
 145 150 155 160

Val Ala Ala Val Phe Phe Asn Ala Gln Arg Glu Thr Ala Ala Arg Lys
 165 170 175

Arg 30

<210> 6

<211> 1430

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

40

<400> 6

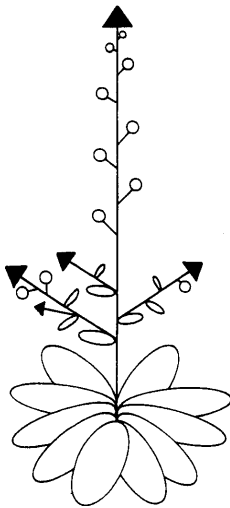
c t t a g t a t t a g a a a t a a t g t a g t t a g t g t a c g t a c a t g t t t g a g a c a g c a a a a a a a t a a 60

a a g a a g a a a g a a a a a g g t t a g t a c a c a t a a t t g g g a a t t a a t g t c t a t t g a t t c t t t t 120

atctttctct ctctctctct aagatggaaa acccctataa atagatgtct cggtcgtctc	180	
tttgtctccc acatcactac aaatctctct tttcctctaa gtttaacaaaa gaaaatggag	240	
aatatgggaa ctagagtgat agagccattg ataatgggga gagtggtagg agatgttctt	300	
gatttcttca ctccaacaac taagatgaat gttagtata acaagaagca agtctccaat	360	
ggccatgagc tctttccttc ttctgtttcc tccaagccta gggttgagat ccatggtggt	420	10
gattctcagat ccttcttcac tttagttaaata aaatatattt aaattatttt ataataatgt	480	
tggttttatt tatattgtgc caaaaaaac catataaac gtctcacttc cttttcctct	540	
tacaagtttt ccatttctaa ctcaataatc ttataaactt gtagcttttag tttttatcat	600	
tcctttttcc agtctttttt ttttaatggg aaaactcaac cgaaatgcaa aacaggtagt	660	20
gatagacca gatgtccag gtccctagta cccctttcta aaagaacacc tgcactggta	720	
cgtttaattt atttattctt tcttttcatt ttgggccccat attccatata cattgcatit	780	
aatcatttc gttataacce taataaagtt ttttttgggt gtaagttata tacatttgag	840	
ttggtaaaag atctccatcg ccatgagttc tcagaacttt ttctgtaaag taataatatt	900	30
agtattgttg aatgtttcaa taggatcggt acaaacattc ccggcacaac agatgctacg	960	
tttgtaagg cctcttcatg aatcttgtaa tttaaatact tatacatata tcatgttata	1020	
tagaaataaa aatatttgca ttgtaataa ggcaaagagg tggtagcta tgaattgcca	1080	
aggccaagca tagggataca taggtttgtg ttgtttctgt tcaggcagaa gcaaagacgt	1140	40
gttatctttc ctaataatccc ttcgagagat cacttcaaca ctctgtaaatt tgcggtcgag	1200	

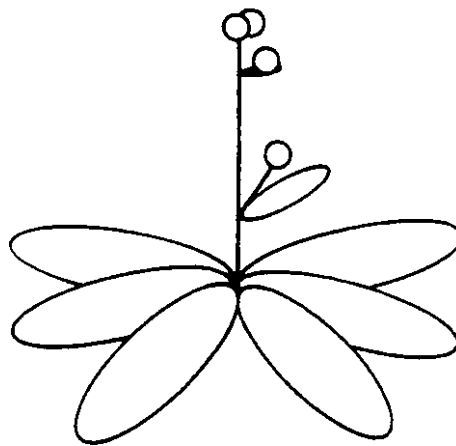
tatgatcttg gtctccctgt cgcggccgtc ttctttaacg cacaaagaga aaccgctgca 1260
 cgcaaacgct agtttcatga ttgtcataaa ctgcaaaaat gaaagaagaa aatttgcattg 1320
 taatctcatg tttatttctg ttctgaattt ccgtactctg aataaaaact gccaaagatg 1380
 agttgaatcc gaaatatcaa ttgagtttac agaagtattg ataacgatct 1430

【図 1 (a)】
Fig.1 (a).



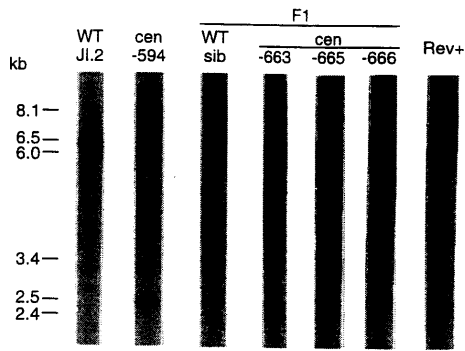
【図 1 (b)】

Fig.1 (b).



【図 2】

Fig.2.



【図 3 (a)】

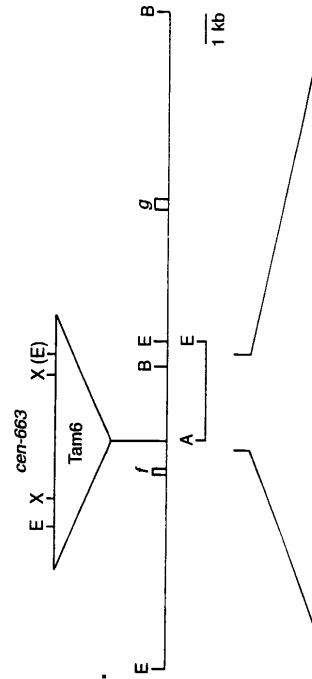


Fig.3 (a).

【図 3 (b)】

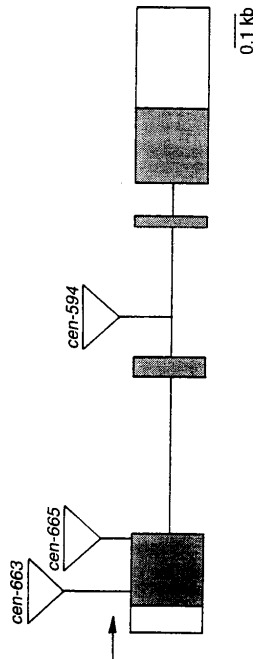


Fig.3 (b).

【図 4 (a)】

Figure 4(a)

```

1  aagcaacatcaaaaacagcattcataaatccctttactttgttgcatatttatcatctta  60
21  attaagcattcttctccatataatatagtttatggcagcaaaagtttcatcggaccogcta  120
    M A A K V S S D P L
121 gtgataggaggaggttatcgagacgtttgttgatcattttacotcaactgttataaatgtct  180
41  V I G R V I G D V V D H F T S T V K H S
181 gttatttacaactccaactccatccatcaagcatgtctacaatggccatgagctctttct  240
61  V I Y N S N N S I K H V Y N G H E L F P
241 tccgtgtttacctctacacctagggttgaggttcattggtgatgatgagatcattttc  300
81  S A V T S T P R V E V H G G D M R S F F
301 actctgataatgacagaccctgatgttccttggtcctagtgcataacctgagggagcac  360
101 T L I M T D P D V P G P S D P Y L R E H
361 ttgactggatagtcacagatatccagggaacctgatccctcattccgcaaaagata  420
121 L H W I V T D I P G T T D S S F G K E V
421 gtgagctatgagatgccaaagccgaacatagggtaccacaggtttgtatitcttctgttc  480
141 V S Y E M P R P N I G I H R F V F L L F
481 aaacagaagaaagaggcagcgatgttgagccaccagtagtgtagggatggattc  540
161 K Q K K R G Q A M L S P P V V C R D G F
541 aacacgagaaattcacacaggaaaatgaattgggcctcctgttgccgctgtcttcttc  600
181 N T R K F T Q E N E L G L P V A A V F F
601 aattgccagcgcaaacccgtgccagaagcggtgaacgtactatttatccatattat  660
201 N C Q R E T A A R R R *
661 ggctctgcataatataatataatataatgtctagtactactgattatcttccagggaaat  720
721 aaatcatatgtagggtttctttttgcaatgataaagagtccttaogtctgctaccaaaaa  780
781 aattgttagagtgccctttgcaagttagtgaaggatatgtgtacgttaataagggaagaa  840
841 agatggagaatgggaattgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt  900
901 tgatatataatttggaagtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt  929

```

【図 4 (b)】

Figure 4(b) Continued

Figure 4(b)

1	TCTGTAAACATGAATCACTACCTTTACATGTGTCTTGGGCAGACGAAGTGGCCTCAATT	60
61	CTAATTGAGCAACATGGATAGGCAACGAAACAAGACTTAGAAGACATTAATCAATT	120
121	GCTCTAAGTATGATOGAATTTGAGGTTAAAGGAGTGAATTACACTCTTTTAGCCAAATA	180
181	TCAAAATTGTACTTTTTTAATCTCAATTTTTTATTCAATTGGAAGACTGTGACTCTTTAGT	240
241	TCTTTATTGTCTCTCTTCTCTGTGATATTAATCTTTTATGAAACGCTCGTTGAATA	300
301	ATATGCAAGCATATGATAAATTCATACCCCTCATATATCCGGTGAATCTTAATATTTG	360
361	CAAGAAGGACCACAACCTTAGTTGGTTTTTGTTTTCTTTTGTTTCTGACTTCCACTG	420
421	CCCTTGTTTCAAAATTTAATCAGCAGAGAATTGGGACAGATAATTTGAATATTTCAATT	480
481	CAGGGAAAAAAGGAAAAATGAAGAAATCAGCTCGTTCTTTTAGAATGAATTAAGATATA	540
541	AACAATTGGTACTTTGTGAAAAAATACCACATCGTACCGCTCTTATACCATTTAAACC	600
601	CAAACCATTAATGATTTTGGAACTTTTCAAAATTAATGAATTTTAATTGCAACAAGTA	660
661	ATTGTAGCATTTTAACTATTTTATCTTCTATGTACTTTGAGCAACACAACCTTT	720
721	TGTGTGCTGTTATCAGATTTTGTATTCTCAATTATCGTATAAACCGTGAAGATATGCCC	780
781	CTCGATCCAGGCTTGAAGCTTCAATTATTGAATATGGAATCTTTGTCTCGGGTTTA	840
841	TACCTGCAGCCAGATATTCTCAATGTGCCATTCTGGTGCCATTCTCATCCCTAATTAG	900
901	AAATTACGAATTTTTTTTTTAAAAATTTCTGACCGGAAGTGTCTGTTTTGAAAGACC	960
961	AACCTGTGATTTTATGCTATTGGCCAAATTAGTTAAATTGTCAATTCCTTTTTTTTTTG	1020
1021	TAATGTAAATTTAGAATATGAAGCACTAATGATTATGATGAAGTAAACACTTGTTAAT	1080
1081	TTTGATTCCTTTCTTTCTTTTAAATATTTTCAGATATGTTATAAATTAATCAATAAT	1140
1141	TTAATTATCTTTTACTTCTCTTCCCATTAAACATGAATTAAGAATGTTATTATGTTAT	1200
1201	TATGTAAAAAATTACAACCTGGCAGTTTTTATTCTCTCTCAAGCTCATGAATATATA	1260

1320	1321	ATAATAATTATTAAACATTTTAAACAATATATATCTGTAGAGATAAAGAAAAAAAGATT	1320
1321	1322	ACCATCACACATATCATAGGAATATGCACACAGGATGGTGAGAAATAATAAGGTTGAAGTA	1380
1381	1382	AAGAAAGATGACGAAAAATGAAAAGAAAAAAAGAAAAAATTAAGAAAGGAGAAATTA	1440
1441	1442	ATGAGTTAGTTTGTGTAATGCACCACTTATATAACCTTTAAATAAATCATACCCCTTTTA	1500
1501	1502	AAAGTGAATGTACACACCCCTTATGAATTTGGATGAGGAGTTGTTCAAGTATGGGGCATT	1560
1561	1562	TATTTATATATATAATATAAAGGAGTTTCAATGGAATAATCTAATGAAATAATTTGTTG	1620
1621	1622	GGTGTAAATTTCTGAAAGATGATGGTGTATCTCATACTTTTTCACAAATATGTATGGTC	1680
1681	1682	ACAGTTTATATATTATATATCTAAACATGTATATGTAAACCTGAATTTGGCAAAAGTATAT	1740
1741	1742	TGTACGGCCACAGTATAAATCTATTATAGGGAAGATAAGCAATTTGTTCTACTATATACC	1800
1801	1802	CCTATTTCGGTTAAGGCCCAACTTGATATCTCAATTTGGGCGCTGAAGAGATTTCCTGAAAG	1860
1861	1862	CCTACTAACATTTGGGGCTTGAGGACGAGGTTGAGTCCCTGAATGGAGAAATTCATAGAA	1920
1921	1922	CCAGGATATGTAAGCGGTCAAAAGGCCCAAAATTAATATAATTGATTTTATATTACTA	1980
1981	1982	AGTCTATGCGAGTAGTTGATTTGTTTATTCATTGTTTATCCAGCTTTAATGAGGATTACCTGA	2040
2041	2042	GTTTATTTGTTTCTACTTCTCATTCTAATCTCGAATTTTAGAAAAAATGATCCTACCTC	2100
2101	2102	ACATATGTTAAGACTAAAATTTAATTTCTAGCAAAAGTTTCGATTTATTGTGAACAGAAA	2160
2161	2162	GCTCTTTATGTCATCAGCAATGAGCATAACTTTCTCTCCATCCAAATGATTCTAATA	2220
2221	2222	GATGATTAAACAAATGATTAAGTGCAATATGAGTCAGGAATCATCGAGTATTGTTCTCTATT	2280
2281	2282	ATTTAGTTATCAAAATTAATCTAAGCATTTCCCCCGCTCGAAGTTCAAAATATGTCATATTAT	2340
2341	2342	AAACGGAATTATGCCACCATCAATCTTAATATGTACGACGATTCTTTCGAGTTGCGACA	2400
2401	2402	AATAGTTCTTAGCACTGACTTAAATTAAGGACCCCTCTGAAGATATAGCAGAATATTACCG	2460
2461	2462	TGTGTATATATATTTCATGACCAAAAGTGAGGCTCATTAAAAATAGAAATTTAATTA	2520

Figure 4(b) Continued

2591. CGGTGATATAATATATATATATATATATATATATATATATATATACCACTTC
2581. ATATTACGTATAACTTGTAAATCAAAGGTGGCTTAATAGTGTAAGATCCTTAGTTGAGTTC
2641. TCACGGGTGGATCGCATCTATTTAGCAAAAACGTACGAATTTGATCCCTAGCATGTGCAA
2701. ATTTCATTGCGTCAGTACAACCATTGATTCGTGAGCAAAAAATGTTATTTCGGGGTGCA
2761. CTTTAAAAAATCGGCAGAGTGTGAGACATAAATTGAACTTTTGTCTTTAAAAACGATA
2821. TTGCCCGTTACGGTGTCACTAATACTATATTTTAAGTAATCGTTTCATAGTATACA
2881. CGTATAAGTAAAAATAATAGCAAAATGAGCGTATTGAGCTCACCGCTTTTGAATAAAATA
2941. ACAAAITTCATCGATGAGAACCAGCATGCGCCAGGAAAAAAGAGGGTGAAGGAGAGA
3001. GATACAAATAGAAGAAGCAAAAGCTTGGATATAGATACTCAAGGTATAGAAGTCAAGTT
3061. CAACTAGAGCAAACTATTAGAAATTAATAAAGCATTAGSACTTACTTCTTAGCAAA
3121. CGAACCTCCCCACCTTGCTACATTAGGAGATAGCTAAAACTCAAATTTATTCCTTCT
3181. TTTGGTGGATGACCTCTCAACTCATTTGTAATAGCATGCCATCAATTGGGGAGTTC
3241. TTTTATGTATGCGCTGATGAACCTTCTTTATTATTCTCTCATATACACAAATGTC
3301. ATGCTGGAGAACTTAGAACCTCCACTTTATTCTCTTAATACAAAAGCTCATAACTCT
3361. TTGGTAGCTGCAAAATGTGCAAAACAGTATCCAGAANTTCTATTGCCCTTCTTTACATTA
3421. AAAAAGGAATTACAAAGATGAACATCCTCACCCATAGAAATTAATGGGATATAGCAA
3481. AAGTACTCGATGTTATTCTTAATTGGCAAAAGAATCACTGTGTTATTTTAATTAGCAAAA
3541. GAACCTTGTCTTATTTCGTAAATGGCAAGAAAAAATTTGGCTTCTAGTTTGGAACTACAC
3601. ATGGTCAATGTGAGTCTTGCTCTGACTACAAACCAATTTTGATGATTTTCCCACCTCT
3661. TCCGTAACTGCTTCAGTGTTTTAATAAAATTAGCAAAAAACATCCCTCTGTGTTTTATGA
3721. AATTGGCAATAACCTCCCTGTGTTTCATATAATTGGCAATAACCCCTCTTCTATAC

Figure 4(b) Continued

3781	TTTCTTCCTCAATCAGATGTATCAATTTCACGGGGTTCAGGAAGTAAGCTTTAAAAAGCA	3840
3841	ATTTTACCTGCTATTACACGCCAAAAACAAAATGAGAATATGCTAATTATCGAAAAACAC	3900
3901	ATGCATGTTCTTTTTTTTGCCAATCAAAATGACATTTGGGGTTTATTGTCAATTAAAAATA	3960
3961	ACACGAGGCTAGTTTTTTGTTAATAGCTCGAGAAATCAATACCTAATTAACACGCGAGTATT	4020
4021	AATTTTACATTTTATGTGAGTGTGAGAGAGATAAAGAGATACATAAGCGTGGCATGTCA	4080
4081	AAATCATCTTTTAATAAGTATACTCTTGCTTTTGTATATTTTTTTTTCCAAAAGAAAA	4140
4141	ACATTGCTGTAGCTTGTTTGCCTGCCACATATATGTCATAAAACCAATGTGTCATAGCTAG	4200
4201	ATGGCTGGGTTTTACCCACTTTGAAATCCCTTAATTCAGTATTTTAATCAAAATTCCTCC	4260
4261	TGCACATGCAATGATGTCGCGAGTGCTGTGTAGCCACTATAAATATATGGGGTTTGCTATT	4320
4321	CCATTCTAagcaacatcaaaaaacagcatcataaatcccttttacttttctgttcgcatttttat	4380
4381	catcttaaataaagcattctctccatataaatatagtttaggcgcaaaagtttcatcgga	4440
1461	M A A K V S S D	1480
4441	cccgctagtgtataggagagatttcgggaagctgttgatcatttttacctcaactgttaa	4500
1481	P L V I G R V I G D V V D H F T S T V K	1500
4501	aatgtctgttattacaacctcaacaattccatcaagcatgtctacaatggccatgagct	4560
1501	M S V I Y I N S N N S I K H V Y N G H E L	1520
4561	ctttctcttcgctgttacctctacaccttaggggtgaggttcctgggtgatgatgc	4620
1521	F P S A V T S T P R V E V H G G D M R S	1540
4621	atttttcactctgGTATTGTTTACTATTCTGTGCTACTTATCTCTTAGGTAAATTATG	4680
1541	F F T L	1560
4681	TGAACCTCTATACCTTAAATGAAAGATATTTTTTGAACCTTCAATGTAATAAGTCTAC	4740
4741	ATGTGAGGTTCCATCAAAATTTATCTATCAAAATGTGCAATACTTTTTGTAGTGTAC	4800
4801	TAGATATATGTCATGTGTAATATGATAAATACAAGATAAAAACCTAGATACTTTTTCT	4860
4861	CTATCCACCCATCATGCTATGCTAGGATTAAAGTCCAGGCCATACATTATATACACATGTC	4920
4921	GTTACTCTAATAGCGATATATAGAGTGGTAACGATTTTTTGGTACGAAATGGTGCTGTA	4980

Figure 4(b) Continued

4981 AGTTATACAGATGTTTCAACCACTTAACTTTTCGTAGTTTGGAGATGTTATTAGT 5040
 5041 GTGTAGAATATTTAATCTTGAAGCAATTAATTTGAGAGATTACTCAATTAGTTGT
 5101 TTGTTTCAGaataatgacagaccctgagttccctggccttagtgatccatcctgaggag 5160
 1701 I M T D P D V P G P S D P Y L R E 1720
 5161 cacttgcaactgGTAAATATGCTTACTTTGGAACCTTCTTACACACTAGAAAAATAACAC 5220
 1721 H L H W 1740
 5221 AAAAGATCATCAAGCCCTAAATTTTCTTGTCAGGAGAACATATATAACAGGATTCT 5280
 5281 TTCACATTGAGTAACAAAAGTCACTAGCGAAATGTATAGCTAACAGTTTATGACAATT 5340
 5341 CAAGCTGTTTAAATCATTCTTCAATTAATGGCCATATATATATATATATATATCTCC 5400
 5401 GATAAAAAATGAATCTTTTCAAGAAAATTTGTTCAGCTGCAATGATTCAATCAGCTTTCT 5460
 5461 TGAATAATCCCATAAAGAAATGAACAACCTTGCTAATTATGCAATTGATACCTAAAGAGTA 5520
 5521 CAAGTTTAAATATGTCACCCCGCTGATATACTTGATTGACTAATCGCAGgtagtca 5580
 1841 I V T 1860
 5581 cagatatccacaggaccactgattcctcattcgGTATGATTAAATTTTCCCTCCACATT 5640
 1861 D I P G T T D S S F G 1880
 5641 AAACCAAAATACATTAATAATAATACCAAAATAAATATCCACCATGACTAATTAATTAA 5700
 5701 TAAATTGTGCAGcaaaagaagtagtgagctatgagatgccaggccgaacataggagtc 5760
 1901 K E V V S Y E M P R P N I G I 1920
 5761 cacagggttgattttctctgttcaaacagaaagaggaggcagcgatgttgagccca 5820
 1921 H R F V F L L F K Q K K R G Q A M L S P 1940
 5821 ccagtagtgctgcaggatgagattcaacacagagaaattcacacaggaatgaattggc 5880
 1941 P V V C R D G F N T R K F T Q E N E L G 1960
 5881 ctccctgttgccgctgtctcttctcaattgccagcgcaaacgctgcaggaaggcgtga 5940
 1961 L P V A A A V F F N C Q R E T A A R R R * 1980
 5941 acgtactatttaccatattcttatggctctgcataatataatataatgctagtacta 6000
 6001 ctgagtgtatcttccacagggaataaatcatatgtagggttctcttgaatgataaaga 6060
 6061 gtccctacgtctgtaccacaaaaaaattgttagagtgcccttgcgaagtagtgaaggat 6120

Figure 4(b) Continued

5100 6121 atgtgtacgtaaatagggaaggaaaagatggagaaatgggaattgtgatgtccactgtgt 6180
 5160 6181 ataaattgatgtaattatctctatgatataataattggaggtgtgtgtgcaAAATTTT 6240
 1720 6241 GAAGGGCTTAATTTTGAATGGTTGCAAAAATTATTCTTTATCTTTCTTTTAAAAAGT 6300
 5220 6301 GGAAGCACAATCAATTAATGCTCTTTGTTTGGTAAACATTATGTTGTATGCTACAAATT 6360
 1740 6361 TTATCGTTTATTTGTAATAATTTTATGTTTGAACATGCAATGTTTGACCTTTTCTTA 6420
 5340 6421 TCCGATTGATCATGTGGTTTTTGTATATTCTTTGAAGAGTGCTTATGCTGTGACGG 6480
 5400 6481 CGAATTCGATATCAAGCTTATCGATACCGTCGACCTCGAGGGGGGGG 6527

【図 5】

57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 448 449 450 451 452 453 454 455 456 457 458 459 460 461 462 463 464 465 466 467 468 469 470 471 472 473 474 475 476 477 478 479 480 481 482 483 484 485 486 487 488 489 490 491 492 493 494 495 496 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510 511 512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522 523 524 525 526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 540 541 542 543 544 545 546 547 548 549 550 551 552 553 554 555 556 557 558 559 560 561 562 563 564 565 566 567 568 569 570 571 572 573 574 575 576 577 578 579 580 581 582 583 584 585 586 587 588 589 590 591 592 593 594 595 596 597 598 599 600 601 602 603 604 605 606 607 608 609 610 611 612 613 614 615 616 617 618 619 620 621 622 623 624 625 626 627 628 629 630 631 632 633 634 635 636 637 638 639 640 641 642 643 644 645 646 647 648 649 650 651 652 653 654 655 656 657 658 659 660 661 662 663 664 665 666 667 668 669 670 671 672 673 674 675 676 677 678 679 680 681 682 683 684 685 686 687 688 689 690 691 692 693 694 695 696 697 698 699 700 701 702 703 704 705 706 707 708 709 710 711 712 713 714 715 716 717 718 719 720 721 722 723 724 725 726 727 728 729 730 731 732 733 734 735 736 737 738 739 740 741 742 743 744 745 746 747 748 749 750 751 752 753 754 755 756 757 758 759 760 761 762 763 764 765 766 767 768 769 770 771 772 773 774 775 776 777 778 779 780 781 782 783 784 785 786 787 788 789 790 791 792 793 794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805 806 807 808 809 810 811 812 813 814 815 816 817 818 819 820 821 822 823 824 825 826 827 828 829 830 831 832 833 834 835 836 837 838 839 840 841 842 843 844 845 846 847 848 849 850 851 852 853 854 855 856 857 858 859 860 861 862 863 864 865 866 867 868 869 870 871 872 873 874 875 876 877 878 879 880 881 882 883 884 885 886 887 888 889 890 891 892 893 894 895 896 897 898 899 900 901 902 903 904 905 906 907 908 909 910 911 912 913 914 915 916 917 918 919 920 921 922 923 924 925 926 927 928 929 930 931 932 933 934 935 936 937 938 939 940 941 942 943 944 945 946 947 948 949 950 951 952 953 954 955 956 957 958 959 960 961 962 963 964 965 966 967 968 969 970 971 972 973 974 975 976 977 978 979 980 981 982 983 984 985 986 987 988 989 990 991 992 993 994 995 996 997 998 999 1000

Figure 5

【図 6 (a)】

Figure 6(a)

agttaacaaagaaa atg gag aat atg gga act aga gtg ata gag 45
 Met Glu Asn Met Gly Thr Arg Val Ile Glu 10
 cca ttg ata atg ggg aga gtg gta gga gat gtt ctt gat ttc ttc 90
 Pro Leu Ile Met Gly Arg Val Val Gly Asp Val Leu Asp Phe Phe 25
 act cca aca act aag atg aat gtt agt tat aac aag aag caa gtc 135
 Thr Pro Thr Thr Lys Met Asn Val Ser Tyr Asn Lys Lys Gln Val 40
 tcc aat ggc cat gag ctc ttt cct tct tct gtt tcc tcc aag cct 180
 Ser Asn Gly His Glu Leu Phe Pro Ser Ser Val Ser Ser Lys Pro 55
 agg gtt gag atc cat ggt ggt gat ctc aga tcc ttc ttc agt ttg 225
 Arg Val Glu Ile His Gly Gly Asp Leu Arg Ser Phe Phe Thr Leu 70
 gtg atg ata gac cca gat gtt cca ggt cct agt gac ccc ttt cta 270
 Val Met Ile Asp Pro Asp Val Pro Gly Pro Ser Asp Pro Phe Leu 85
 a (tfl1-13) a (tfl1-11)
 aaa gaa cac ctg cac tgg atc gtt aca aac att ccc ggc aca aca 315
 Lys Glu His Leu His Trp Ile Val Thr Asn Ile Pro Gly Thr Thr 100
 a (tfl1-1)
 gat gct acg ttt ggc aaa gag gtg gtg agc tat gaa ttg cca agg 360
 Asp Ala Thr Phe Gly Lys Glu Val Val Ser Tyr Glu Leu Pro Arg 115
 cca agc ata ggg ata cat agg ttt gtg ttt gtt ctg ttc agg cag 405
 Pro Ser Ile Gly Ile His Arg Phe Val Phe Val Leu Phe Arg Gln 130
 aag caa aga cgt gtt atc ttt cct aat atc cct tog aga gat cac 450
 Lys Gln Arg Arg Val Ile Phe Pro Asn Ile Pro Ser Arg Asp His 145
 ttc aac act cgt aaa ttt gcg gtc gag tat gat ctt ggt ctc cct 495
 Phe Asn Thr Arg Lys Phe Ala Val Glu Tyr Asp Leu Gly Leu Pro 160
 gtc gcg gcc gtc ttc ttt aac gca caa aga gaa acc gct gca cgc 540
 Val Ala Ala Val Phe Phe Asn Ala Gln Arg Glu Thr Ala Ala Arg 175
 aaa cgc tag ttt cat gat tgt cat aaa ctg caa aaa tga aag aag 585
 Lys Arg * 177
 aaaatttgcagtgaattctcatgtttatttctgttctgaatttccgtactctgaataaaa 644
 actgccaaagatgagttgaatccg 668

Figure 6(b) Continued

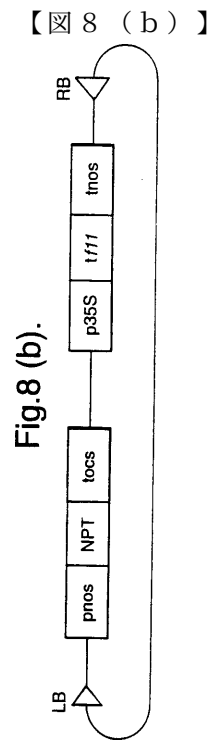
Figure 6(b)

1	cctagattagaataaatgtagtttagtgcacgtatcctgttgtagacagcaaaaaaaataa	60	341		K E V V S Y E L P	360
61	aagaaaagaaaagggttagtcacataaattgggaattaatgtctattgattctttt	120	1081	aggccaagcatagggatacataggtttgtgtttgtcttcaggcgagaagcaaacgct		1140
121	atctttctctctctctctctaagtggaaaaccctcataataagatgtctccggtcgcttc	180	361	R P S I G I H R F V F V L F R Q K Q R R		380
181	tttgtctcccacactcactacaatatctctcttttctcttaagttaacaaaagaaatggag	240	1141	gttatctttctctaataatcccttcgagagatcaactcaaacactcgtaaatttgcggtcgag		1200
61	M E	80	381	V I F P N I P S R D H F N T R K F A V E		400
241	aatatgggaactagagtgatagagccactgataatggggagagtggttaggatgtttt	300	1201	tatgatcttggtctccctctgcggcggtctcttctttaaocgcacaaagagaaccgctgca		1260
81	N M G T R V I E F L I M G R V V G D V L	100	401	Y D L G L P V A A V F P N A Q R E T A A		420
301	gatttcttctactccaacaactaagatgaatgttagttataacaagaagcaagctotccaat	360	1261	cgcaaacgctagtttctgattgttcataaactgcacaaatgaagaagaaaatttgcattg		1320
101	D F F T P T T K M N V S Y N K K Q V S N	120	421	R K R *		440
361	ggccatgagctcttctctctctgttcttctcocaagcctagggttgatgccatgggtgt	420	1321	taatctcatgtttatttgtgttctgaatttccgtactctgaataaaaaactgcacaaagatg		1380
121	G H E L F P S S V S S K P R V E I H G G	140	1381	agttgaatccgAAATATCAATTAGGTTTACAGAAGTATTGTATAACGATCT	1430	
421	gatctcagatccttcttctcctttgGTAAATAAATATATTAAATTATTTTATAATAATGT	480				
141	D L R S F F T L	160				
481	TGGTTTTATTATATTGTGCAAAAAAAACCATAAAAACTCTCACTTCCTTTTCCTCT	540				
601	TACAAGTTTCCATTCTCAACTCAATAATCTTATAAACCTTGAGCTTTAGTTTATCAT	600				
201	TCCTTTTTCAGTCTTTTTTTTTTAATGTGAAACTCAACCGAAATGCAAACAGtgat	660				
	V M	220				
661	gatagaccagatgttccaggtctctagtgaaccttctctaaaagaacacctgcactgGTA	720				
221	I D P D V P G P S D P F L K E H L H W	240				
721	CCTTTAATTATTATCTCTCTTCTCATTTTGGGCCCATATTCCATATACATTGCATT	780				
781	AAATCATTTCTGTATAACCTTAATAAGTTTTTTTTGGGTGAAGTTATATACATTGAG	840				
841	TTGGTCAAAGATCTCCATGCCATGAGTCTCTCAGAACTTTTCTGTAAAGTAATAATTT	900				
901	AGTATTGTGAATGTTCAATAGagatcggttacaaacattccccgcacacagatgctaog	960				
301	I V T N I P G T T D A T	320				
961	tttgGTAAGGCCCTCTTCATGAATCTTGTAATTTAAATACTTATACATATCATGTTATA	1020				
321	F G	340				
1021	TAGAAATAAAAAATTTTGCATTGTAATATAGGcaaaagggtggtagctatgaattgccca	1080				

Figure 7(a) Continued

Figure 7(a)

Concen	50	100	200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	51200	102400	204800	409600	819200	1638400	3276800	6553600	13107200	26214400	52428800	104857600	209715200	419430400	838860800	1677721600	3355443200	6710886400	13421772800	26843545600	53687091200	107374182400	214748364800	429496729600	858993459200	1717986918400	3435973836800	6871947673600	13743895347200	27487790694400	54975581388800	109951162777600	219902325555200	439804651110400	879609302220800	1759218604441600	3518437208883200	7036874417766400	14073748835532800	28147497671065600	56294995342131200	112589990684262400	225179981368524800	450359962737049600	900719925474099200	1801439850948198400	3602879701896396800	7205759403792793600	14411518807585587200	28823037615171174400	57646075230342348800	115292150460684697600	230584300921369395200	461168601842738790400	922337203685477580800	1844674407370955161600	3689348814741910323200	7378697629483820646400	14757395258967641292800	29514790517935282585600	59029581035870565171200	118059162071741130342400	236118324143482260684800	472236648286964521369600	944473296573929042739200	1888946593147858085478400	3777893186295716170956800	7555786372591432341913600	15111572745182864683827200	30223145490365729367654400	60446290980731458735308800	120892581961462917470617600	241785163922925834941235200	483570327845851669882470400	967140655691703339764940800	1934281311383406679529881600	3868562622766813359059763200	7737125245533626718119526400	15474250491067253436239052800	30948500982134506872478105600	61897001964269013744956211200	123794003928538027489912422400	247588007857076054979824844800	495176015714152109959649689600	990352031428304219919299379200	1980704062856608439838598758400	3961408125713216879677197516800	7922816251426433759354395033600	15845632502852867518708790067200	31691265005705735037417580134400	63382530011411470074835160268800	126765060022822940149670320537600	253530120045645880299340641075200	507060240091291760598681282150400	1014120480182583521197362564300800	2028240960365167042394725128601600	4056481920730334084789450257203200	8112963841460668169578900514406400	16225927682921336339157801028812800	32451855365842672678315602057625600	64903710731685345356631204115251200	129807421463370690713262408230502400	259614842926741381426524816461004800	519229685853482762853049632922009600	1038459371706965525706099265844019200	2076918743413931051412198531688038400	4153837486827862102824397063376076800	8307674973655724205648794126752153600	16615349947311448411297588253504307200	33230699894622896822595176507008614400	66461399789245793645190353014017228800	132922799578491587290380706028034470400	265845599156983174580761412056068940800	531691198313966349161522824112137881600	1063382396627932698323045648224275763200	2126764793255865396646091296448551526400	4253529586511730793292182592897103052800	8507059173023461586584365185794206105600	17014118346046923173168730371588412211200	34028236692093846346337460743176824422400	68056473384187692692674921486353648844800	136112946768375385385349842972707297689600	272225893536750770770699685945414595379200	544451787073501541541399371890829190758400	1088903574147003083082798743781658381516800	2177807148294006166165597487563316763033600	4355614296588012332331194975126633526067200	8711228593176024664662389950253267052134400	17422457186352049329324779900506534104268800	348449143727040986586495598010130682
--------	----	-----	-----	-----	-----	------	------	------	-------	-------	-------	--------	--------	--------	--------	---------	---------	---------	----------	----------	----------	-----------	-----------	-----------	-----------	------------	------------	------------	-------------	-------------	-------------	--------------	--------------	--------------	--------------	---------------	---------------	---------------	----------------	----------------	----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	------------------	------------------	------------------	-------------------	-------------------	-------------------	--------------------	--------------------	--------------------	--------------------	---------------------	---------------------	---------------------	----------------------	----------------------	----------------------	-----------------------	-----------------------	-----------------------	-----------------------	------------------------	------------------------	------------------------	-------------------------	-------------------------	-------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	---------------------------	---------------------------	---------------------------	----------------------------	----------------------------	----------------------------	-----------------------------	-----------------------------	-----------------------------	-----------------------------	------------------------------	------------------------------	------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	--------------------------------	--------------------------------	--------------------------------	--------------------------------	---------------------------------	---------------------------------	---------------------------------	----------------------------------	----------------------------------	----------------------------------	-----------------------------------	-----------------------------------	-----------------------------------	------------------------------------	------------------------------------	------------------------------------	------------------------------------	-------------------------------------	-------------------------------------	-------------------------------------	--------------------------------------	--------------------------------------	--------------------------------------	---------------------------------------	---------------------------------------	---------------------------------------	---------------------------------------	--	--	--	---	---	---	--	--	--	--	---	---	---	--	--	--	---	---	---	---	--	--------------------------------------



フロントページの続き

(74)代理人

弁理士 日野 あけみ

(74)代理人

弁理士 越阪部 倫子

(74)代理人

弁理士 西山 雅也

(72)発明者 ブラッドリー, デスモンド, ジョゼフ

イギリス国, ノーフォーク エヌアール2 3 ディーダブリュ, ノリッジ, ウェスト パレード
3 0 エー

(72)発明者 カーペンター, ローズマリー

イギリス国, ノーフォーク エヌアール1 8 9 キュージー, ウィモンダム, ウィックルウッド,
ロー カトリート 3 3

(72)発明者 コーン, エンリコ, サンドロ

イギリス国, ノーフォーク エヌアール4 6 エスジー, ノリッジ, ウエイバーリー ロード 3

審査官 六笠 紀子

(56)参考文献 Development, 1994, Suppl., p.107-116

The Plant Cell, 1991, Vol.3, p.877-892

Trends in Biotechnology, 1991, Vol.9, p.31-37

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

C12N 15/00 - 15/90

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/CA(STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

SwissProt/PIR/Geneseq