



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 20 439 T2 2005.12.29**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 077 255 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 20 439.9**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/JP99/02305**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 918 274.4**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 99/057249**

(86) PCT-Anmeldetag: **30.04.1999**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **11.11.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **21.02.2001**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **22.09.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **29.12.2005**

(51) Int Cl.7: **C12N 15/54**

**C12N 15/82, C12N 9/10, C12N 5/10,  
A01H 5/00**

(30) Unionspriorität:

**13768598 30.04.1998 JP**

(73) Patentinhaber:

**Japan Science and Technology Agency,  
Kawaguchi, Saitama, JP**

(74) Vertreter:

**Rechts- und Patentanwälte Lorenz Seidler Gossel,  
80538 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**DE, ES, FR, GB, IT, NL**

(72) Erfinder:

**MORI, Satoshi, Chiba-ken 275-0026, JP; HIGUCHI,  
Kyoko, Tokyo 113-0032, JP; SUZUKI, Kazuya,  
Tokyo 113-0032, JP; NISHIZAWA, Naoko, Tokyo  
113-0001, JP; NAKANISHI, Hiromi, Tokyo  
113-0032, JP**

(54) Bezeichnung: **NICOTIANAMIN SYNTHASE UND FÜR DIESE KODIERENDES GEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung**

## Fachgebiet

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft eine Nicotianaminsynthase, die am Biosyntheseweg von Mugsäure beteiligt ist, außerdem deren Aminosäuresequenz, ein Gen, das dieselbe codiert, einen Vektor, einen Prozess zur Herstellung des Nicotianamins unter Verwendung derselben, Transformanden, wie z.B. Pflanzen, die durch das Gen transformiert sind, das die Nicotianaminsynthase codiert, als auch einen Antikörper gegen die Nicotianaminsynthase.

## Hintergrund

**[0002]** Gramineen-Pflanzen, die durch Chelatieren des Fe(III) im unlöslichen Zustand im Boden mithilfe der Mugsäure absorbieren und den sogenannten Mechanismus der 2. Strategie zur Fe-Anreicherung anwenden, sekretieren Fe-Chelatoren (Phytosiderophore) aus ihren Wurzeln, um das kaum lösliche Fe in der Rhizosphäre anzulösen (Roemheld, 1987). Die Menge an sekretierten Phytosiderophoren steigt unter Fe-Defizienz-Stress. Die Mugsäure-Familie stellt das einzige bisher bekannte Beispiel von Phytosiderophoren dar (Takagi, 1976). Die Toleranz gegenüber einer Fe-Defizienz in Gramineen wird als von einer bestimmten Menge der Mugsäure-Familie, die von Pflanzen sekretiert wird, abhängig erachtet (Takagi et al. 1984, Roemheld und Marschner 1986, Marschner et al. 1987, Mori et al. 1987, Kawai et al. 1988, Mori et al. 1988, Mihasi und Mori 1989 und Shingh et al. 1993).

**[0003]** Der Biosyntheseweg der Mugsäure in Pflanzen ist in [Fig. 1](#) gezeigt. S-Adenosylmethionin wird aus Methionin durch die S-Adenosylmethioninsynthase synthetisiert. Daraufhin werden drei Moleküle des S-Adenosylmethionins zur Bildung eines Moleküls des Nicotianamins durch die Nicotianaminsynthase kombiniert. Das erzeugte Nicotianamin wird dann zu 3"-Ketosäure durch Nicotianaminaminotransferase umgewandelt und dann 2'-Desoxymugsäure durch die anschließende Wirkung einer Reduktase synthetisiert. Eine weitere Reihe von Hydroxylierungsschritten erzeugt die anderen Mugsäure-Derivate einschließlich der Mugsäure aus der Desoxymugsäure (Mori und Nishizawa 1987, Shojima et al. 1989, Shojima et al. 1990 und Ma und No-moto 1993).

**[0004]** Eine Verbindung in [Fig. 1](#), die Verbindung in der unteren rechten Hälfte, worin R<sub>1</sub> und R<sub>2</sub> Wasserstoff sind und R<sub>3</sub> Hydroxyl ist, ist Mugsäure. Eine Verbindung, worin R<sub>1</sub> Wasserstoff ist und R<sub>2</sub> und R<sub>3</sub> Hydroxyl sind, ist 3-Hydroxymugsäure. Außerdem ist eine Verbindung, worin R<sub>2</sub> Wasserstoff ist und R<sub>1</sub> und R<sub>3</sub> Hydroxyl sind, 3-Epihydroxymugsäure.

**[0005]** Drei S-Adenosylmethioninsynthase-Gene wurden aus Gerstenwurzeln isoliert, doch wurden diese Gene durch eine Fe-Defizienz nicht induziert (Takizawa et al. 1996). Ein Gen, lds3, welches aus der Gerste durch Differentialscreening erhalten wird, wird als ein Gen vermutet, welches Desoxymugsäure durch Hydroxylierung zu Mugsäure umwandelt und das durch eine Fe-Defizienz stark induziert wird (Nakanishi et al. 1993). Weiterhin wurde Nicotianaminaminotransferase aus Fe-defizienten Gerstenwurzeln ausgereinigt und isoliert, und es wurden zwei Nicotianaminaminotransferase-Gene, Naat-A und Naat-B, isoliert (Takahashi et al. 1997). Die Naat-A-Expression wurde in Fe-defizienten Wurzeln induziert.

**[0006]** Die Synthese von Nicotianamin aus S-Adenosylmethionin ist ähnlich der Polyamin-Synthese aus Decarboxy-S-Adenosylmethionin. Im Gegensatz zur Polyaminsynthase katalysiert die Nicotianaminsynthase jedoch eine Kombination aus drei S-Adenosylmethionin-Molekülen und zugleich die Azetidin-Ringbildung ([Fig. 1](#)). Daher handelt es sich bei der Nicotianaminsynthase um einen neuartigen Typ von Enzym. Zuvor haben wir von der teilweisen Ausreinigung von Nicotianaminsynthase aus den Wurzeln der Fe-defizienten Gerste und dem Expressionsmustern der Aktivität berichtet (Higuchi et al. 1994, Higuchi et al. 1995, Kanazawa et al. 1995, Higuchi et al. 1996a und Higuchi et al. 1996b). Da sich Nicotianaminsynthase während der Extraktion und Ausreinigung leicht zersetzt, war es schwierig, ausreichende Mengen für die Aminosäure-Sequenzierung zu reinigen.

**[0007]** Die vorliegende Erfindung ermöglicht die Erzeugung einer Pflanze, insbesondere einer Gramineen-Pflanze, mit einer hochgradigen Toleranz gegenüber einem Fe-Defizienz, als Ergebnis der Isolierung und Aufreinigung einer Nicotianaminsynthase, das Klonieren des Gens dieses Enzyms, das Bestimmen seiner Basensequenz und Aminosäuresequenz und das Verwenden des Enzyms.

## Beschreibung der Erfindung

**[0008]** Die vorliegende Erfindung betrifft ein isoliertes Enzym, das eine Nicotianaminsynthase-Aktivität aufweist und eine Aminosäuresequenz umfasst, ausgewählt aus folgendem:

- (a) SEQ ID NR. 1, oder
- (b) einer Sequenz, die homolog zu SEQ ID NR. 1 ist, vorzugsweise ein Enzym, das aus Gerste stammt (und bevorzugter ein Enzym mit der Aminosäuresequenz der SEQ ID NR. 1, 3, 5, 7, 9, 11 oder 13) oder ein Enzym, das aus *Oryza sativa* stammt (und bevorzugter ein Enzym mit der Aminosäuresequenz der SEQ ID NR. 15) oder ein Enzym, das aus *Arabidopsis* stammt (und bevorzugter ein Enzym der Aminosäuresequenz der SEQ ID NR. 17, 19 oder 21).

**[0009]** Die vorliegende Erfindung stellt außerdem ein Gen bereit, das die Aminosäuresequenz des Enzyms codiert, oder eine Nukleinsäure, die dieses Enzym codiert, welches Nicotianaminsynthase-Aktivität aufweist, wobei die Nukleinsäure eine Sequenz umfasst, ausgewählt aus folgendem:

- (A) SEQ ID NR. 2
- (B) einer Sequenz, die homolog zu SEQ ID NR. 2 ist, vorzugsweise eine Nukleinsäure, die aus Gerste stammt (bevorzugter eine Nukleinsäure mit der Basensequenz der SEQ ID NR. 2, 4, 6, 8, 10, 12 oder 14); oder eine Nukleinsäure, die aus *Oryza sativa* stammt (bevorzugter eine Nukleinsäure mit der Basensequenz der SEQ ID NR. 16) oder eine Nukleinsäure, die aus *Arabidopsis* stammt (bevorzugter eine Nukleinsäure mit der Basensequenz der SEQ ID NR. 18, 20 oder 22) und nicht bevorzugt, dass die Nukleinsäure DNA ist.

**[0010]** Die vorliegende Erfindung stellt außerdem einen Vektor bereit, der eine Nukleinsäure umfasst, wie oben definiert, vorzugsweise eine Expressionsvektor, und einen nichthumanen Transformanden, der durch die Vektoren transformiert ist, worin das Fremdgen vorzugsweise ein Gen mit der Basensequenz der SEQ ID NR. 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder 22 ist.

**[0011]** Bei anderen Aspekten stellt die Erfindung ein Verfahren zur Erzeugung eines Nicotianamins bereit, welches die Verwendung des obigen Transformanden umfasst, eines Antikörpers gegen die Enzyme, wie oben angegeben, vorzugsweise eines polyklonalen Antikörpers oder eines monoklonalen Antikörpers, und ein Verfahren zur Aufreinigung der Nicotianaminsynthase, welches umfasst: die Verwendung eines Thiolprotease-Hemmers, die Verwendung von CHAPS-Puffer, die Verwendung der Ionenaustausch-Chromatographieträger DEAE-Sephacel<sup>®</sup> oder DEAE Sephacel<sup>®</sup>, die Verwendung des hydrophoben Chromatographieträgers TSK-Gel Butyl Toyopearl<sup>®</sup> und die Verwendung des hydrophoben Chromatographieträgers TSK-Gel Ether Toyopearl<sup>®</sup>, wobei der Thiolprotease-Hemmer vorzugsweise E-64 ist.

## Kurze Beschreibung der Zeichnungen

**[0012]** [Fig. 1](#) zeigt den Biosyntheseweg der Mugsäure-Familie.

**[0013]** [Fig. 2](#) zeigt einen Vergleich der Ausreinigung der Nicotianaminsynthase aus Feabhängigen und aus Kontroll-Gerstenwurzeln.

**[0014]** [Fig. 3](#) zeigt die präparative SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, im folgenden bezeichnet als SDS-PAGE) um 30 – 35 kDa. Die horizontalen Balken zeigen die relative Enzymaktivität, wie aus den Gelen nachgewiesen.

**[0015]** [Fig. 4](#) zeigt das Elutionsmuster der Nicotianaminsynthase-Aktivität aus der Gelfiltrationssäule.

**[0016]** Die großen ausgefüllten Kreise (•) zeigen die Enzymaktivität.

**[0017]** [Fig. 5](#) zeigt einen Vergleich mit einer Teilsequenz von sechs Aminosäuren, wie bestimmt anhand von Nicotianaminsynthase, die aus Gerste stammt, und einer ähnlichen Sequenz von Gramineen, wie durch Computerdurchsuche der Datenbank erhalten. Ein identischer Aminosäure-Rest ist in ":" gezeigt.

**[0018]** [Fig. 6](#) zeigt eine HvNAS1-cDNA der vollen Länge und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz. Die unterstrichenen Sequenzen geben die identischen partiellen Aminosäuresequenzen der in obiger [Fig. 5](#) gezeigten Fragmente an. Die Zahlen der Nukleotidsequenzen sind rechts jeder Reihe angegeben. Die Zahlen der Aminosäuren sind links jeder Reihe angegeben.

- [0019] [Fig. 7](#) zeigt einen Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der obigen 7 cDNAs, die aus Gerste erhalten wurden. Sternchen "\*" zeigt identische Aminosäure-Reste in allen Sequenzen auf.
- [0020] [Fig. 8](#) zeigt die Ergebnisse der dünn-schichtchromatographischen (TLC) Analyse der Nicotianaminsynthase-Aktivität, wie aus *E. coli*-Rohextrakt erhalten, die ein Fusionsprotein mit dem Maltose-Bindungsprotein-HvNAS1-exprimiert.
- [0021] [Fig. 9](#) zeigt die Northern-Hybridisationsanalyse von HvNAS1 als einer Sonde.
- [0022] [Fig. 10](#) zeigt die Southern-Hybridisationsanalyse von HvNAS1 als einer Sonde.
- [0023] [Fig. 11](#) zeigt die Western-Blot-Analyse des Rohenzym, wie zum Nachweis der Nicotianaminsynthase-Aktivität verwendet.
- [0024] [Fig. 12](#) zeigt die Western-Blot-Analyse des durch Trichloressigsäure/Aceton extrahierten Gesamtproteins.
- [0025] [Fig. 13](#) zeigt einen Vergleich der Ausreinigung von Nicotianaminsynthase aus Fedefizienter Gerste und Kontroll-Gerste nach DEAE-Sepharose FF.
- [0026] [Fig. 14](#) zeigt einen Vergleich der Ausreinigung von Nicotianaminsynthase aus Fedefizienter Gerste und Kontroll-Gerste nach Ether Toyopearl\* 650M (\* eingetragenes Markenzeichen).
- [0027] [Fig. 15](#) zeigt die Ergebnisse der dünn-schichtchromatographischen (TLC) Analyse der Nicotianaminsynthase-Aktivität, wie aus *E. coli*-Rohextrakt erhalten, die ein Fusionsprotein mit dem Maltose-Bindungsprotein-OsNAS1-exprimiert.
- [0028] [Fig. 16](#) zeigt die Northern-Hybridisationsanalyse von OsNAS1 als einer Sonde.
- [0029] [Fig. 17](#) zeigt die Ergebnisse der dünn-schichtchromatographischen (TLC) Analyse der Nicotianaminsynthase-Aktivität, wie aus *E. coli*-Rohextrakt erhalten, die Fusionsproteine mit dem Maltose-Bindungsprotein-AtNAS1, AtNAS2 oder AtNAS3-exprimiert.
- [0030] [Fig. 18](#) zeigt die Ergebnisse der RT-PCR der Gesamt-RNA, die aus den über dem Boden befindlichen Teilen und den Wurzeln von *Arabidopsis thaliana* extrahiert wurden. Die rechte Gruppe gibt die positive Kontrolle wieder.

#### Beste Ausführungsform der Erfindung

- [0031] Wir haben versucht, Nicotianaminsynthase zu isolieren (Higuchi et al. *Plant & Soil*, Bd. 165, S. 173–179, 1994), doch da Nicotianaminsynthase sich leicht zersetzt und schwer zu isolieren und zu reinigen war, konnten wir keine ausreichenden Mengen an Protein erhalten, um seine partielle Aminosäuresequenz zu bestimmen. Später wurde festgestellt, dass ein Thiolprotease-Hemmer E-64 (im folgenden als E-64 bezeichnet) sehr wirksam im Unterdrücken des Abbaus von Nicotianaminsynthase war (Higuchi et al. *Plant & Soil*, Bd. 178, S. 171–177, 1996a).
- [0032] Bei der vorliegenden Erfindung konnte als Folge des Zerstoßens von gefrorenen Wurzeln zu einem Feinpulver in Flüssig-N<sub>2</sub> und dann schnellen Homogenisierens mit Puffer, der 0,1 mM Thiolprotease-Hemmer E-64 enthielt, das Nicotianaminsynthase-Protein isoliert werden, ebenso wie sein Gen.
- [0033] Ferner gewann das Enzym der vorliegenden Erfindung seine Aktivität durch Entfernen des SDS nach der SDS-PAGE-Behandlung zurück, doch war die Rückgewinnungsrate sehr niedrig (Higuchi et al. *Plant & Soil*, Bd. 165, S. 173–179, 1994). Folglich sollte der Grad der Ausreinigung vor der SDS-PAGE-Behandlung erhöht werden. Daraufhin wurden die säulenchromatographischen Verfahrensweisen weiter verbessert.
- [0034] Wir haben außerdem festgestellt, dass das Enzym der vorliegenden Erfindung relativ hydrophob ist und ein Puffer, der ein mildes oberflächenaktives Mittel, CHAPS, enthielt, die Rückgewinnungsrate erhöhte. Verschiedene Ionenaustauscher-chromatographische Träger wurden getestet, und DEAE-Sepharose FF und DEAE-Sephacel wurden als am wirksamsten befunden. Über TSK-Gel Butyl Toyopearl\* hinaus entfernte auch ein anderer hydrophober chromatographischer Träger, TSK-Gel Ether Toyopearl\* 650M, die Unreinheiten des

30 – 35 kDa wirksam.

**[0035]** Vom Enzym der vorliegenden Erfindung wurde berichtet, dass es das Peptid von 30 – 35 kDa war, dessen Aktivität durch Entfernen des SDS nach der SDS-PAGE-Behandlung wiederhergestellt wurde, wobei die Aktivität als ein breiter Molekulargewichtsbereich von 30 – 35 kDa nachgewiesen wurde (siehe [Fig. 3](#)). [Fig. 3](#) zeigt ein Ergebnis der präparativen SDS-PAGE in den Fraktionen, die eine Enzymaktivität zeigen. SDS-PAGE wurde unter Verwendung von 11% Acrylamid-Flachgelen vorgenommen. Eine Portion des Gels wurde mit Coomassie-Brilliantblau angefärbt und der Rest des Gels mit Cu gefärbt. Das Gel, das Proteine von 30 – 35 kDa Größe enthielt, wurde in sieben Fragmente geschnitten (angegeben durch die kurzen Linien). Die dicken Balken in [Fig. 3](#) zeigen die relativen Enzymaktivitäten an, die aus jedem Gelfragment bestimmt wurden.

**[0036]** Um das Nicotianaminsynthase-Peptid aus den Proteinen mit diesen Molekulargewichten zu identifizieren, wurden die Peptide, die in den Nicotianaminsynthase-Fractionen, ausgereinigt aus Fe-defizienten und Kontroll-Gerstenwurzeln, enthalten waren, unter Anwendung von SDS-PAGE verglichen. Aus jeder Gerstenwurzel von 200 g wurde das vorliegende Enzym gemäß der in nachstehendem Beispiel 3 beschriebenen Methode ausgereinigt.

**[0037]** Die Enzymaktivität der Kontrolle betrug ein Viertel der bei den Fe-defizienten Wurzeln.

**[0038]** Die Peptidzusammensetzung der aktiven Enzymfraktion aus jedem Reinigungsschritt des vorliegenden Enzyms wurde analysiert und mittels SDS-PAGE verglichen, wobei die Ergebnisse in [Fig. 2](#), [Fig. 13](#) und [Fig. 14](#) gezeigt sind. [Fig. 2](#), [Fig. 13](#) und [Fig. 14](#) zeigen einen Vergleich mit der aktiven Fraktion aus dem Reinigungsschritt der Fe-defizienten Gerstenwurzeln von 200 g [in der Figur mit (-) gezeigt] und der aktiven Fraktion aus dem Reinigungsschritt der Kontroll-Gerstenwurzeln von 200 g [in der Figur mit (+) gezeigt]. SDS-PAGE wurde unter Verwendung von 12,5% Acrylamid-Flachgelen durchgeführt (Laemmli, Nature, Bd. 227, S. 680–685, 1970). Die Gele wurden mit Coomassie-Brilliantblau angefärbt. [Fig. 2](#) zeigt einen Schritt vor der DEAE-Sephrose. Die obere Reihe zeigt das Enzym aus Fe-defizienten Gerstenwurzeln, und die untere Reihe zeigt das Enzym aus den Kontrollwurzeln. In jeder Bahn sind Bahnen 1, Rohextrakt, 200 µg Protein; Bahnen 2, nach Butyl Toyopearl((eingetragenes Markenzeichen)) 650M, 100 µg Protein; Bahnen 3, nach Hydroxyapatit, 20 µg Protein; und Bahnen 4, nach Butyl Toyopearl 650M, 15 µg Protein, gezeigt.

**[0039]** [Fig. 13](#) zeigt jede Bahn nach DEAE-Sephrose FF, 25 µg Protein. [Fig. 14](#) zeigt nach Ether Toyopearl\* 650M, wobei im linken Teil die inaktive Fraktion gezeigt ist und im rechten Teil die aktive Fraktion gezeigt ist, wobei 1/25 jeder Fraktion elektrophoretisch behandelt ist.

**[0040]** Als Ergebnis wurde nahezu kein Unterschied sowohl bei Fe-defizienten als auch Kontrollwurzeln vor dem DEAE-Sephrose-Schritt beobachtet (siehe [Fig. 2](#)). Nach dem DEAE-Sephrose-Schritt wurde klar, dass die 30- und 31-kDa-Peptide durch Fe-Defizienz induziert wurden (siehe [Fig. 13](#)). Nach dem Ether Toyopearl\*-Schritt wurde das 31-kDa-Peptid aus der aktiven Fraktion eliminiert. Die 32- und 33-kDa-Peptide wurden durch Fe-Defizienz als neu induziert festgestellt (siehe [Fig. 14](#)). Aktivitäten wurden bei den 32- und 33-kDa-Peptiden nachgewiesen, doch wurde keine Aktivität beim 30-kDa-Peptid festgestellt (siehe [Fig. 3](#)).

**[0041]** Das Molekulargewicht des Enzyms der vorliegenden Erfindung wurde durch Gelfiltration bestimmt.

**[0042]** Das mittels Gelfiltration beurteilte Molekulargewicht der Nicotianaminsynthase betrug berichtetermaßen 40.000 – 50.000 (Higuchi et al. Plant & Soil, Bd. 165, S 173–179, 1994). Dies stimmte allerdings nicht dem durch SDS-PAGE bestimmten Wert überein.

**[0043]** In der vorliegenden Studie erhöhte der Puffer, der CHAPS enthielt, die Auflösung effektiv, und das Molekulargewicht des vorliegenden Enzyms wurde mit 35.000 bewertet (siehe [Fig. 4](#)). Dies entspricht dem mittels SDS-PAGE erhaltenen Wert.

**[0044]** [Fig. 4](#) zeigt das Elutionsmuster der Nicotianaminsynthase aus der Gelfiltrationssäule. Die schwarzen Kreise (•) geben die Enzymaktivität an, und die durchgezogene Linie gibt die Extinktion bei 280 nm an. Die aktive Fraktion wurde nach der Hydroxyapatit-Chromatographie auf eine Sephacryl S300HR-(Pharmacia)-Säule (1,5 cm × 71 cm, 125 ml) aufgebracht, äquilibriert mit Entwicklerpuffer (50 mM Tris, 1 mM EDTA, 0,1 M KCl, 0,05% CHAPS, 0,1 mM p-APMSF und 3 mM DTT, pH 8,0). Die verwendeten Molekulargewichts-Marker waren Thyroglobulin (MR 670.000), γ-Globulin (MR 158.000), Ovalbumin (MR 44.000) und Myoglobin (MR 17.000). Der lineare Fluss betrug 10 cm/Stunde.

**[0045]** Die partielle Aminosäuresequenz wurde aus gereinigter Nicotianaminsynthase bestimmt.

**[0046]** Die oben erläuterten 30-kDa-, 32-kDa- und 33-kDa-Peptide wurden aus 1 kg Fedefizienten Gerstenwurzeln unter Anwendung der hierin in Beispiel 3 beschriebenen Methode ausgereinigt. Diese wurden unter Anwendung der hierin in Beispiel 4 beschriebenen Methode teilweise zerlegt. Obschon 32- und 33-kDa-Peptide nicht vollständig voneinander getrennt werden konnten, könnten diese eine ähnliche Sequenz aufweisen, oder war das 32-kDa-Peptid vermutlich das Abbauprodukt des 33-kDa-Peptids, und beide wurden gemeinsam zerlegt.

**[0047]** Die bestimmten partiellen Aminosäuresequenzen zeigten, dass diese Peptide sehr ähnlich zueinander waren ([Fig. 5](#)). Da außerdem die Molekulargewichte der 33-kDa- und 32-kDa-(1)-Fragmente nahezu unverändert im Vergleich zu vor der Zerlegung waren, könnte diese Sequenz die N-terminale Region des vorliegenden Enzyms sein. Als Ergebnis der Computerdurchsuche der Datenbank wurde ein Gen von unbekannter Funktion mit sehr ähnlicher Sequenz zu diesen Sequenzen gefunden, dass in *Oryza sativa* und *Arabidopsis thaliana* vorliegt. Insbesondere die EST-cDNA-Klone D23792 und D24790 von *Oryza sativa* waren sehr ähnlich bei 80,0% Identität bei einer 33-Aminosäuren-Überlappung bei ersterem und 68,4% Identität bei einer 19-Aminosäuren-Überlappung bei letzterem ([Fig. 5](#)).

**[0048]** [Fig. 5](#) zeigt einen Vergleich mit einer Teilsequenz aus sechs Aminosäuren, wie bei aus Gerste stammender Nicotianaminsynthase bestimmt, und einer ähnlichen Sequenz von Gramineen, wie durch Computerdurchsuche der Datenbank erhalten. Ein identischer Aminosäure-Rest ist in ":" gezeigt. Der durch die Pfeile angegebene Teil der Nukleotidsequenzen wurde für die Sequenzen des bei der PCR verwendeten Primers verwendet.

**[0049]** Das Klonieren der Nukleotidsequenzen der cDNA-Klone, die Nicotianaminsynthase codieren, wurde vorgenommen und bestimmt.

**[0050]** Die PCR-Amplifikation der Gesamt-cDNA, die aus Fe-defizienten Gerstenwurzeln unter Verwendung degenerierter Primer erhalten wurde, wie aus der partiellen Aminosäuresequenz konstruiert, die mittels der zuvor erörterten Methode erhalten worden war, wurde durchgeführt, doch konnte die Ziel-DNA nicht amplifiziert werden. Daraufhin wurden die Primer mit einer einzelnen Nukleotidsequenz (durch Pfeile in [Fig. 5](#) gezeigt) aus Sequenzen von *Oryza sativa*, D23792 und D24790, synthetisiert und die PCR-Amplifikation vorgenommen. Das 205-bp-Fragment wurde mittels PCR unter Verwendung von NF- und NR-Primern amplifiziert und das 274-bp-Fragment mittels PCR unter Verwendung von IF- und IR-Primern amplifiziert, wobei diese die Zielsequenzen enthielten. Eine unter Verwendung von Poly(A)<sup>+</sup> RNA aus Fe-defizienten Gerstenwurzeln hergestellte cDNA-Bank wurde gescreent und 19 positive Klone unter Verwendung der 205-bp-Fragment-Sonde und 88 positive Klone unter Verwendung der 274-bp-Fragment-Sonde erhalten.

**[0051]** Unter den derart erhaltenen Klonen enthielt der als HvNAS1 bezeichnete Klon eine translatierte Region von 985 bp, wobei die davon abgeleitete Aminosäuresequenz ein Rest aus 328 Aminosäuren war mit einem abgeleiteten Molekulargewicht von 35.144. Dies entsprach dem mittels SDS-PAGE und Gelfiltration bestimmten Wert gut. Die partiellen Aminosäuresequenzen der 32-kDa- und 33-kDa-Peptide waren vollständig in HvNAS1 enthalten ([Fig. 6](#)).

**[0052]** [Fig. 6](#) zeigt die HvNAS1-cDNA der vollen Länge und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz. Die unterstrichenen Sequenzen zeigen die identischen partiellen Aminosäuresequenzen der in obiger [Fig. 5](#) gezeigten Fragmente. Die Zahlen der Nukleotidsequenzen sind rechts jeder Reihe angegeben. Die Zahlen der Aminosäuren sind links jeder Reihe angegeben.

**[0053]** Der vorhergesagte pI von 5.2 entsprach dem durch native isoelektrische Fokussierungs-Elektrophorese geschätzten Wert gut. Die sechs anderen Klone als HvNAS1, nämlich HvNAS2, HvNAS3, HvNAS4, HvNAS5, HvNAS6 und HvNAS7, mit sehr ähnlicher Sequenz wurden ebenfalls erhalten (Tabelle 1, [Fig. 7](#)).

**[0054]** [Fig. 7](#) zeigt einen Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der obigen 7 aus Gerste erhaltenen cDNA. Sternchen, "\*" weist auf identische Aminosäure-Reste in allen Sequenzen hin.

**[0055]** Die Nukleotidsequenzen dieser Klone sind in SEQ ID NR. 2 (HvNAS1), SEQ ID NR. 4 (HvNAS2), SEQ ID NR. 6 (HvNAS3), SEQ ID NR. 8 (HvNAS4), SEQ ID NR. 10 (HvNAS5), SEQ ID NR. 12 (HvNAS6) bzw. SEQ ID NR. 14 (HvNAS7) gezeigt. Die Aminosäuresequenzen dieser Aminosäuresequenzen sind in SEQ ID NR. 1 (HvNAS1), SEQ ID NR. 3 (HvNAS12), SEQ ID NR. 5 (HvNAS3), SEQ ID NR. 7 (HvNAS4), SEQ ID NR. 9

(HvNAS5), SEQ ID NR. 11 (HvNAS6) bzw. SEQ ID NR. 13 (HvNAS7) gezeigt.

Tabelle 1 Eigenschaften der nas-Klone

Klon	Zahl der Aminosäure-Reste	Molekulargewicht	pl	Identität zu nas 1 (%)	Identität zu nas 2 (%)	Identität zu nas 4 (%)
HvNAS 1	328	35144	5,20	-		
HvNAS 2	336	35839	5,07	72	-	
HvNAS 3	336	36013	5,47	72	95	
HvNAS 4	330	35396	4,91	73	89	-
HvNAS 5	283	30148	5,22	61	61	59
HvNAS 6	329	35350	5,07	74	89	88
HvNAS 7	330	35244	4,98	70	86	91

**[0056]** Die aus dem 30-kDa-Peptid bestimmten partiellen Aminosäuresequenzen waren alle in HvNAS5 enthalten. Die 5'- und 3'-nicht-translatierten Regionen dieser Klone waren nicht ähnlich zueinander.

**[0057]** D23792 und D24790 ähnlich der Nicotianaminsynthase von *Oryzae sativa* wurden von etwa 80% Identität zu HvNAS1 festgestellt. AC003114 und AB005248 von *Arabidopsis thaliana* wurden von etwa 45% Identität zu HvNAS1 festgestellt.

**[0058]** Das erhaltene HvNAS1-Protein wurde in *E. coli* exprimiert.

**[0059]** Die PCR-Amplifikation von HvNAS1 ORF wurde mit Vektor pMAL-c2 kloniert, um C-terminal mit dem Maltose-Bindungsprotein fusioniertes HvNAS1 zu exprimieren. Die Expression des Fusionsproteins wird durch IPTG stark induziert.

**[0060]** Der Rohextrakt wurde aus dem transformierten *E. coli* erhalten und die Nicotianaminsynthase-Aktivität im Zustand des Fusionsproteins untersucht. Im Rohextrakt aus dem mit lediglich dem Vektor transformierten Stamm konnte die Aktivität nicht nachgewiesen werden, wohingegen im Fall der Insertion von HvNAS1 ORF die Aktivität nachgewiesen wurde. Das Ergebnis ist in [Fig. 8](#) gezeigt.

**[0061]** [Fig. 8](#) zeigt die Ergebnisse der dünnschichtchromatographischen (TLC) Analyse der Nicotianaminsynthase, die aus *E. coli*-Rohextrakt erhalten wurde, welche ein Fusionsprotein mit dem Maltose-Bindungsprotein-HvNAS1-exprimiert. In [Fig. 8](#), Bahn 1: eine standardmäßige Nicotianaminsynthase; Bahn 2: *E. coli*, exprimierend Maltose-Bindungsprotein (SAM); und Bahn 3: *E. coli*, exprimierend mit dem Maltose-Bindungsprotein fusioniertes Protein-HvNAS1.

**[0062]** Die mittels der in untenstehendem Beispiel 7 beschriebenen Methode durchgeführte Northern-Hybridisationsanalyse zeigte, dass dieses Gen in Fe-defizienten Wurzeln stark induziert wurde ([Fig. 9](#)). Dies stimmt mit dem Expressionsmuster der vorliegenden Enzymaktivität überein (Higuchi et al. 1994). [Fig. 9](#) zeigt ein Ergebnis der Northern-Hybridisationsanalyse unter Verwendung von HvNAS1 als einer Sonde. Die Gesamt-RNA wurde aus Gerstenblätter und -Wurzeln nach einwöchiger Fe-defizienter Behandlung und Kontroll-Gerstenblätter und -Wurzeln extrahiert, und in jeder Bahn wurden 5 µg RNA elektrophoretisch behandelt.

**[0063]** Die Southern-Hybridisationsanalyse der Gersten-Genom-DNA wurde gemäß der in untenstehendem Beispiel 8 beschriebenen Methode vorgenommen. Das Schneiden der DNA mit BamHI, EcoRI oder HindIII erzeugte eine Vielzahl von Fragmenten, wobei allerdings keiner der derzeit erhaltenen Klone mit BamHI und EcoRI verdaut werden konnte, weshalb folglich das Nicotianaminsynthase-Gen in multipler Kopienzahl in den Genomen von Gerste und Reis vorliegen könnte ([Fig. 10](#)).

**[0064]** [Fig. 10](#) zeigt die Southern-Hybridisationsanalyse von HvNAS1 als einer Sonde. Genomische DNAs von Gerste und Reis wurden mit BamHI (Bahnen B), EcoRI (Bahnen R) und HindIII (Bahnen H) verdaut, und

10 µg davon wurden in jeder Bahn elektrophoretisch behandelt.

**[0065]** Weiterhin wurden unter Verwendung von Antigen, das mittels der in nachstehendem Beispiel 9 beschriebenen Methode erhalten worden war, eine Western-Blot-Analyse gemäß der in Beispiel 10 beschriebenen Methode vorgenommen. Es wurde festgestellt, dass das vorliegende Enzymprotein während des Vorgangs im Rohextrakt schnell zersetzt wurde, welcher zum Nachweis der vorliegenden Enzymaktivität zubereitet worden war ([Fig. 11](#)). Das Färbungsmuster stimmte mit der Tatsache überein, dass die vorliegende Enzymaktivität in dem breiten Bereich von 30 – 35 kDa gemäß SDS-PAGE nachgewiesen wurde (siehe [Fig. 3](#)).

**[0066]** [Fig. 11](#) zeigt die Western-Blot-Analyse des zum Nachweis der Aktivität verwendeten Rohenzym. SDS-PAGE wurde unter Verwendung von 125% Acrylamid-Flachgel durchgeführt. 100 µg des Proteins wurden elektrophoretisch behandelt.

**[0067]** Der aus denaturiertem Protein gemäß der in nachstehendem Beispiel 10 beschriebenen Methode erhaltene Rohextrakt wurde als nahezu einzige Bande mit 35 – 36 kDa nachgewiesen ([Fig. 12](#)). Dieser Wert stimmt mit dem hergeleiteten Wert aus der Aminosäuresequenz überein.

**[0068]** [Fig. 12](#) zeigt die Western-Blot-Analyse des durch Trichloressigsäure/Aceton extrahierten Gesamtproteins. SDS-PAGE wurde unter Verwendung von 12,5% Acrylamid-Flachgel durchgeführt. 100 µg Protein wurden elektrophoretisch behandelt. 200 µg aus Wurzeln extrahierte Proteine und 500 µg aus Blättern extrahierte Proteine wurden elektrophoretisch behandelt.

**[0069]** Die Western-Blot-Analyse nach zweidimensionaler Elektrophorese ergibt den Nachweis mehrerer Flecken. Dies stimmt mit der Tatsache überein, dass eine Vielzahl von Nicotianaminsynthase-Genen erhalten wird. Alle Flecken waren in Fe-defizienten Wurzeln induziert.

**[0070]** Als Ergebnis dessen, dass die cDNA-Bank aus Fe-defizienter Reisswurzel-Poly(A) + RNA unter Verwendung von Sonden gescreent wurde, die durch Schneiden von HvNAS1 mit Restriktionsenzymen ApaI und XhoI hergestellt wurden, wurden 20 Klone erhalten. Diese Klone wurden in 3 Typen von Klonen entsprechend ihren Sequenzen eingeteilt, von denen lediglich ein Typ ORF der vollen Länge enthielt, welcher als OsNAS1 bezeichnet wurde. Die Nukleotidsequenz von OsNAS ist in SEQ ID NR. 16 gezeigt, und die Aminosäuresequenz ist in SEQ ID NR. 15 gezeigt.

**[0071]** Die PCR-Amplifikation von OsNAS1 ORF wurde mit einem Vektor pMAL-c2 kloniert, um eine C-terminal mit dem Maltose-Bindungsprotein fusionierte Form zu exprimieren. Das Fusionsprotein wird durch IPTG in seiner Expression stark induziert.

**[0072]** Ein Rohextrakt des transformierten E. coli mit dem Fusionsprotein wurde erhalten und die Nicotianaminsynthase-Aktivität im Zustand des Fusionsproteins untersucht. Dieselbe Aktivität wie bei HvNAS1 wurde nachgewiesen. Das Ergebnis ist in [Fig. 15](#) gezeigt. [Fig. 15](#) zeigt die Ergebnisse der dünnenschichtchromatographischen (TLC) Analyse der aus E. coli-Rohextrakt erhaltenen Nicotianaminsynthase, die ein Fusionsprotein mit dem Maltose-Bindungsprotein-OsNAS1-exprimiert. In [Fig. 15](#), Bahn 1: ein standardmäßiges Nicotianamin (NA); Bahn 2: ein Extrakt aus E. coli, das das Fusionsprotein mit dem Maltose-Bindungsprotein-OsNAS1-exprimiert; und Bahn 3: ein Extrakt aus E. coli, das das Fusionsprotein mit dem Maltose-Bindungsprotein-HvNAS1-exprimiert.

**[0073]** Die mittels der in nachstehendem Beispiel 7 beschriebenen Methode durchgeführte Northern-Hybridisationsanalyse ergab, dass im Gegensatz zu Gerste die Expression in Reis durch eine Fe-defiziente Behandlung nicht nur in den Wurzeln, sondern auch in den Blättern induziert wurde ([Fig. 16](#)). [Fig. 16](#) zeigt das Ergebnis der Northern-Hybridisationsanalyse unter Verwendung von OsNAS1 ORF als einer Sonde. Die Gesamt-RNA wurde nach zwei Wochen der Fe-defizienten Behandlung und Kontroll-Reisblättern und -Wurzeln extrahiert, und in jeder Bahn wurden 5 µg RNA elektrophoretisch behandelt.

**[0074]** Die Nukleotidsequenz von Arabidopsis thaliana ähnlich der von HvNAS1, wie durch Computerdurchsuche der Datenbank erhalten, wurde als ein Primer verwendet. Die PCR-Amplifikation der genomischen DNA von Arabidopsis thaliana führte zum Erhalt dreier Nicotianaminsynthase-Gene. Diese wurden als AtNAS1, AtNAS2 und AtNAS3 bezeichnet.

**[0075]** Die Nukleotidsequenzen dieser Gene sind in SEQ ID NR. 18 (AtNAS1), SEQ ID NR. 20 (AtNAS2) und SEQ ID NR. 22 (AtNAS3) gezeigt. Diese Aminosäuresequenzen sind in SEQ ID NR. 17 (AtNAS1), SEQ ID NR.

19 (AtNAS2) und SEQ ID NR. 21 (AtNAS3) gezeigt.

**[0076]** AtNAS1, AtNAS2 und AtNAS3 ORF wurden mit PCR amplifiziert und mit dem Vektor pMAL-c2 kloniert. Es wurde versucht, jeden von ihnen in der C-terminal mit dem Maltose-Bindungsprotein fusionierten Form zu exprimieren. Die Expression des Fusionsproteins wurde durch IPTG stark induziert.

**[0077]** Ein Rohextrakt aus dem transformierten E. coli mit dem Fusionsprotein wurde erhalten und die Nicotianaminsynthase-Aktivität im Zustand des Fusionsproteins untersucht. Die Aktivität wurde nachgewiesen. Das Ergebnis ist in [Fig. 17](#) gezeigt. [Fig. 17](#) zeigt die Ergebnisse der TLC-Analyse der Nicotianaminsynthase-Aktivität, wie aus E. coli-Rohextrakt erhalten, das ein Fusionsprotein mit dem Maltose-Bindungsprotein-AtNAS1-exprimierte. In [Fig. 17](#), Bahnen 1: ein standardmäßiges Nicotianamin (NA) und S-Adenosylmethionin; Bahnen 2: ein Extrakt aus E. coli, das lediglich Maltose-Bindungsprotein exprimiert; Bahnen 3: ein Extrakt aus E. coli, das das Fusionsprotein mit dem Maltose-Bindungsprotein-AtNAS1-exprimiert; Bahnen 4: ein Extrakt aus E. coli, das das Fusionsprotein mit dem Maltose-Bindungsprotein-AtNAS2-exprimiert; und Bahnen 5: ein Extrakt aus E. coli, das das Fusionsprotein mit dem Maltose-Bindungsprotein-AtNAS3-exprimiert.

**[0078]** Eine RT-PCR wurde gemäß der in nachstehendem Beispiel 11 beschriebenen Methode durchgeführt. Es wurde festgestellt, dass AtNAS1 in den Wurzeln und den über dem Boden befindlichen Teilen von *Arabidopsis thaliana* exprimiert wurde, wohingegen AtNAS2 weder in den Wurzeln noch in den über dem Boden gelegenen Teilen exprimiert wurde, und AtNAS3 wurde lediglich in den Wurzeln exprimiert ([Fig. 18](#)). In [Fig. 18](#) zeigt Bahn M den Molekulargewichts-Marker. Die Genexpression erfolgte in den über dem Boden gelegenen Teilen, den Wurzeln und den positiven Kontrollen In der Figur, Bahnen C: AtNAS1 und AtNAS2 ORF der vollen Länge wurden amplifiziert; Bahnen 1: AtNAS1-spezifische Amplifikationsfragmente; Bahnen 2: AtNAS2-spezifische Amplifikationsfragmente; und Bahnen 3: AtNAS3-spezifische Amplifikationsfragmente.

**[0079]** Die Menge an sekretierter Mugsäure wurde auf bis zu 20 mg Mugsäure/g Wurzeln Trockengewicht/Tag erhöht berichtet (Takagi, 1993). Die von den vorliegenden Erfindern nachgewiesene Roh-Nicotianaminsynthase-Aktivität war ausreichend, um dies zu erfüllen. Da die vorliegenden Enzymproteine in mehr als einigen Typen vorhanden sind und ein 30-kDa-Peptid ohne Aktivität vorliegt, kann gemutmaßt werden, dass als Folge der Aggregation dieser Peptide die konstruierte Struktur, die zum Binden mit 3 Molekülen S-Adenosylmethionin bevorzugt ist, eine maximale Aktivität zeigt. Das mittels Gelfiltration bewertete Molekulargewicht betrug 35.000 ([Fig. 4](#)).

**[0080]** Ein Anstieg der Aktivität durch Reaggregation der Untereinheiten wurde bisher nicht beobachtet. Da das Fusionsprotein mit Maltose-Bindungsprotein und Untereinheiten eine Aktivität zeigte, verfolgen wir derzeit den Gedanken, dass das vorliegende Enzym ein Monomer sein könnte. Die Möglichkeit jedoch, dass eine große Aktivität durch Konstruieren eines Multimers entfaltet werden kann, ist nicht komplett von der Hand zu weisen.

**[0081]** Der Reaktionsmechanismus bei der Synthese von Nicotianamin aus S-Adenosylmethionin kann ähnlich einer Methyltransfer-Reaktion unter Verwendung von S-Adenosylmethionin als einem Methyl-Donor und einer Reaktion zur Synthese von Spermidin und Spermin aus decarboxyliertem S-Adenosylmethionin sein. Die gemeinsame katalytische Domäne dieser Enzyme wurde bezüglich der äquivalenten Aminosäure-Konfiguration erörtert, bei der ähnliche Positionen in Strukturen einer höheren Ordnung besetzt sind (Hashimoto et al. 1998 und Schluckebier et al. 1995).

**[0082]** In der Zukunft könnte die katalytische Domäne als Ergebnis eines Vergleichs mit der Nicotianaminsynthase von anderen Pflanzenarten oder der Röntgenkristallographie geklärt werden.

**[0083]** Die Induktion der Nicotianaminsynthase-Aktivität durch Fe-Defizienz stellt ein spezifisches Phänomen bei Gramineen dar und ist für die Massenproduktion der Mugsäure-Familie wesentlich. Bei *Oryza sativa* handelt es sich um eine Pflanze, in der die mengenmäßig geringste Sekretion der Mugsäure-Familie von den wichtigeren Gramineen erfolgt, weshalb sie sehr wenig ausgeprägt hinsichtlich der Fe-Defizienz in Kalkboden ist.

**[0084]** Folglich kann als Ergebnis der Schaffung von *Oryza sativa*-Transformanten mit einer Toleranz gegenüber einer Fe-Defizienz, indem das Nicotianaminsynthase-Gen der vorliegenden Erfindung in Gramineen, insbesondere *Oryza sativa*, eingeführt wird und diese bei Fe-Defizienz eine große Menge davon exprimieren, die Kultivierung von Reis in Kalkboden möglich werden.

**[0085]** Hiervor stellte man sich von Nicotianamin in Gramineen vor, dass es lediglich eine Rolle als ein Vorläufer für die Synthese der Mugsäure-Familie spielt. Da jedoch die vorliegende Erfindung die Erkenntnis gebracht hat, dass das Nicotianaminsynthase-Gen die multiple Genfamilie darstellt, kann es weitere wichtige Rollen in Gramineen spielen.

**[0086]** Bei Pflanzen, denen die Sekretionsfähigkeit der Mugsäure-Familie fehlt, ausgenommen der Gramineen, wurde vorgeschlagen, dass Nicotianamin eine Schlüsselrolle als ein endogener Chelator von zweiwertigen Metallkationen wie  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  und  $\text{Mn}^{2+}$  spielt und dass es zur Homöostase dieser Metalle beiträgt (Stephan et al. 1994). Folglich könnte es dieselbe Rolle in Gramineen spielen.

**[0087]** Die Nicotianaminsynthase-Aktivität wird in Dikotyledonen nicht induziert, weshalb wohl die Expression des Gens der vorliegenden Erfindung durch Fe-Defizienz nicht induziert wird. Wir haben Nicotianaminsynthase-Gene von *Arabidopsis thaliana* kloniert. Die Zusammensetzung der Promoter-Regionen in diesen Genen kann den Mechanismus der Genexpression, wie durch Fe-Defizienz bewirkt, erleuchten, und das Gen der vorliegenden Erfindung kann eine wichtige Funktion nicht nur in Gramineen, sondern auch in Dikotyledonen spielen.

**[0088]** SEQ ID NR. 1 zeigt die Aminosäuresequenz der Nicotianaminsynthase der vorliegenden Erfindung.

**[0089]** Die vorliegende Erfindung umfasst eine Nicotianaminsynthase mit der in SEQ ID NR. 1 gezeigten Aminosäuresequenz. Allerdings ist die vorliegende Erfindung nicht auf die obige Nicotianaminsynthase beschränkt. Die Nicotianaminsynthase der vorliegenden Erfindung enthält, sofern sie nicht ihre Nicotianaminsynthase-Aktivität verliert, die Peptide, in denen ein Teil der Aminosäuresequenz des Peptids, vorzugsweise 50% oder weniger, bevorzugter 30% oder weniger, oder sogar noch bevorzugter 10% oder weniger in den gesamten Aminosäuren, deletiert ist oder durch andere Aminosäuren substituiert ist, oder zu denen weitere Aminosäuren addiert sind oder in denen diese Deletion, Substitution und Addition kombiniert sein kann.

**[0090]** Die für die Nicotianaminsynthase der vorliegenden Erfindung codierende Nukleotidsequenz ist in SEQ ID NR. 2 gezeigt.

**[0091]** Die vorliegende Erfindung umfasst nicht nur ein für Nicotianaminsynthase codierendes Gen, wie in SEQ ID NR. 2 gezeigt, sondern auch die für Nicotianaminsynthase codierenden Gene, die im folgenden genannt werden.

**[0092]** Der Vektor der vorliegenden Erfindung zur Einführung des obigen Gens unterliegt keiner speziellen Beschränkung, weshalb verschiedene Vektoren verwendet werden können. Ein bevorzugter Vektor ist der Expressionsvektor.

**[0093]** Verschiedene Zellen können in bequemer Weise unter Verwendung des rekombinanten Vektors der vorliegenden Erfindung transformiert werden. Die Massenproduktion von Nicotianamid kann unter Verwendung der derart erhaltenen Transformanten vorgenommen werden. Diese Methoden sind einem Fachmann des Gebiets wohlbekannt.

**[0094]** Beispiele für die Wirte zur Einführung des Gens der vorliegenden Erfindung sind Bakterien, Hefen und Zellen. Ein bevorzugter Wirt sind Pflanzen, insbesondere Gramineen.

**[0095]** Die Methode zur Einführung des Gens unterliegt keiner Beschränkung. Diese kann unter Verwendung eines Vektors erfolgen, oder das Gen kann direkt in das Genom eingeführt werden.

**[0096]** Ein Antikörper der vorliegenden Erfindung gegen Nicotianaminsynthase kann in herkömmlicher Weise unter Verwendung der Nicotianaminsynthase der vorliegenden Erfindung erzeugt werden. Der Antikörper kann ein polyklonaler Antikörper oder, wenn erforderlich, ein monoklonaler Antikörper sein.

**[0097]** Weiterhin kann eine selektive Zucht von Pflanzen, vorzugsweise Gramineen, unter Verwendung des Gens der vorliegenden Erfindung vorgenommen werden. Insbesondere kann das Gen der vorliegenden Erfindung zur Verbesserung der Varietäten, die selbst in Fe-defizientem Boden wachsen können, angewendet werden.

## Beispiele

**[0098]** Die folgenden Beispiele sollen zur Veranschaulichung der vorliegenden Erfindung dienen, sind aber nicht als Beschränkung der vorliegenden Erfindung gedacht.

## Beispiel 1. (Präparierung des Pflanzenmaterials)

**[0099]** Gerstensamen (*Hordeum vulgare* L. cv Ehimehadakamugi Nr. 1) wurden auf feuchtem Filterpapier auskeimen gelassen und in eine standardmäßige Wassernährlösung (Mori und Nishizawa, 1987) in einem Glashaushaus bei Umgebungstemperatur unter natürlichem Licht übertragen. Der pH-Wert der Wassernährlösung wurde auf 5,5 mittels 0,5 N HCl täglich eingestellt. Als sich die dritten Blätter entwickelten, wurden die Pflanzen in eine Wasserkulturlösung ohne Fe-Gehalt übertragen. Der pH-Wert wurde auf 7,0 durch 0,5 N NaOH täglich gehalten. Die Kontrollpflanzen wurden ebenfalls in der standardmäßigen Kulturlösung kontinuierlich kultiviert. Die Kulturlösung wurde einmal pro Woche erneuert. Zwei Wochen nach Beginn der Fe-defizienten Behandlung, als sich eine schwere Eisenchlorose auf den 4. und 5. Blättern signifikant zeigte, wurden die Wurzeln geerntet und in Flüssig-N<sub>2</sub> eingefroren und bei -80°C bis zur Verwendung gelagert.

## Beispiel 2. (Assay der Nicotianaminsynthase-Aktivität)

**[0100]** Es wurde die zuvor von den vorliegenden Erfindern berichtete modifizierte Assay-Methode (Higuchi et al. 1996a) angewendet. Die Enzymlösungen wurden mit Reaktionspuffer [50 mM Tris 1 mM EDTA, 3 mM Dithiothreitol (im folgenden bezeichnet als DTT), 10 µM (p-Amidinophenyl)methansulfonylfluorid (im folgenden bezeichnet als p-APMSF) und 10 µM trans-Epoxy succinylleucylamido-(4-guanidino)butan (im folgenden bezeichnet als E-64), pH 8,7] äquilibriert. Der Pufferaustausch wurde unter Verwendung einer Ultrafiltrationseinheit, Ultrafree C3LGC NMWL10000 (Millipore Co.) vorgenommen. Mit <sup>14</sup>C in der Carboxylgruppe markiertes S-Adenosylmethionin (Amersham Inc.) wurde der Enzymlösung bei einer Endkonzentration von 20 µM zugegeben und dies bei 25°C für 15 Minuten gehalten. Die Reaktionsprodukte wurden durch Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel LK6 (Whatman Inc.) unter Verwendung von Entwickler (Phenol : Butanol : Ameisensäure : Wasser = 12 : 3 : 2 : 3) aufgetrennt. Die Radioaktivität der Reaktionsprodukte wurde mittels des Bildanalysegerätes BAAS-2000 (Fuji Film Co.) bestimmt. Der Proteingehalt wurde mittels der Bradford-Methode unter Verwendung des Protein Assay Kit (Bio Rad Inc.) untersucht.

## Beispiel 3 (Ausreinigung der Nicotianaminsynthase)

**[0101]** Die folgenden Vorgänge wurden bei 4°C vorgenommen; E-64 wurde den Nicotianaminsynthase-enthaltenden Fraktionen bei einer Endkonzentration von 10 µM zugegeben.

**[0102]** Die gefrorenen Wurzeln wurden zu einem Feinpulver in Flüssig-N<sub>2</sub> zerstoßen und in einem Haushalts-Entsafter mit 200 ml Extraktionspuffer [0,2 M Tris, 10 mM EDTA, 5 (Vol/Vol) Glycerol, 10 mM DTT, 0,1 mM E-64, 0,1 mM p-APMSF und 5% (Gew/Vol) unlösliches Polyvinylpyrrolidon (PVP), pH 8,0] pro 100 g Wurzeln homogenisiert. Das Homogenat wurde 30 Minuten lang bei 22.500 × g zum Erhalt des Überstands zentrifugiert. Ammoniumsulfat wurde dem Überstand zu einer Endkonzentration von 0,4 M zugegeben und dies 1 Stunde lang stehengelassen. Das Gemisch wurde nochmals 30 Minuten lang bei 22.500 × g zum Erhalt des Überstands zentrifugiert.

**[0103]** Der Überstand wurde auf eine TSK Gel\* Butyl Toyopearl (eingetragenes Markenzeichen) 650M-Säule aufgebracht (10 ml Bettvolumen pro 100 g Wurzeln), mit dem Adsorptionspuffer äquilibriert [20 mM Tris, 1 mM EDTA, 3 mM DTT, 0,4 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und 0,1 mM p-APMSF, pH 8,0] und mit Elutionspuffer eluiert [10 mM Tris, 1 mM EDTA, 3 mM DTT, 0,1 mM p-APMSF, 5% Glycerol und 0,05% 3-[(3-Chloramidopropyl)dimethylammonio]propansulfonsäure (im folgenden bezeichnet als CHAPS), pH 8,0].

**[0104]** KCl wurde der aktiven Fraktion zu einer Endkonzentration von 0,4 M zugegeben, und 1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 8,0) wurde zu einer Endkonzentration von 1 mM KCl zugegeben. Ein Hydroxyapatit-100-350-Mesh (Nacalai Tesque), äquilibriert mit dem Adsorptionspuffer (1 mM K-P, 10 mM KCl, 3 mM DTT und 0,1 mM p-APMSF, pH 8,0) wurde zu 10 ml pro 100 mg Protein zubereitet und die die Nicotianaminsynthase enthaltenden Fraktionen aufgebracht. Die Nicotianaminsynthase wurde ohne Adsorption durchgeleitet. Die durchgeleitete Fraktion wurde auf eine TSK-Gel\* Butyl Toyopearl (eingetragenes Markenzeichen) 650M-Säule aufgebracht (1 ml Bettvolumen pro 10 mg Protein), und die Nicotianaminsynthase wurde in der oben beschriebenen Weise eluiert.

**[0105]** Die aktive Fraktion wurde auf eine DEAE-Sepharose-FF-Säule aufgeladen (5 ml Bettvolumen pro 25 mg Protein, Pharmacia), mit dem Adsorptionspuffer äquilibriert (20 mM Tris, 1 mM EDTA, 3mM DTT, 0,1 mM p-APMSF und 0,05% CHAPS, pH 8,0) und bei schrittweiser Gradientenelution einer Kaliumchloridkonzentration von 0,05 M, 0,1 M, 0,15 M und 0,2 M eluiert. Die Nicotianaminsynthase eluierte bei 0,15 M der KCl-Konzentration.

**[0106]** Die aktive Fraktion wurde auf eine Ether Toyopearl\* 650M-Säule aufgebracht (10 ml Bettvolumen pro 100 Wurzeln), mit Adsorptionspuffer äquilibriert [20 mM Tris, 1 mM EDTA, 3 mM DTT, 1,2 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  und 0,1 mM p-APMSF, pH 8,0]. Die Nicotianaminsynthase wurde nicht adsorbiert und wanderte durch die Säule. Die durchgewanderte Fraktion wurde auf eine TSK-Gel\* Butyl Toyopearl\* 650M-Säule aufgebracht und die die Nicotianaminsynthase enthaltenden Fraktionen eluiert. Die Peptide in der die Nicotianaminsynthase enthaltenden aktiven Fraktionen, welche mittels den obigen säulenchromatographischen Behandlungen gereinigt worden war, wurden durch Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (im folgenden bezeichnet als SDS-PAGE) unter Verwendung von 11% Acrylamid-Flachgelen aufgetrennt. Nach der SDS-PAGE wurde das Gel mit 0,3 M Kupferchlorid angefärbt (Dzandu et al. 1988) und die aufgetrennten Bande ausgeschnitten. Die Gelfragmente wurden mit 0,25 M EDTA/0,25 M Tris (pH 9,0) entfärbt und mit dem Extraktionspuffer (1% SDS, 25 mM Tris und 192 mM Glycin) homogenisiert. Jedes Homogenat wurde mit SDS-freiem Puffer (25 mM Tris und 192 mM Glycin) elektroeluiert und das Peptid rückgewonnen.

#### Beispiel 4. (Bestimmung der partiellen Aminosäuresequenz)

**[0107]** Die isolierte Nicotianaminsynthase wurde mit Cyanogenbromid chemisch verdaut (Gross 1967).

**[0108]** Nach der SDS-PAGE-Behandlung wurde ein 10-faches Volumen an 70% (Vol/Vol) Ameisensäure und 1% (Gew/Vol) Cyanogenbromid den die Nicotianaminsynthase enthaltenden Gelfragmenten hinzugefügt und dies bei 4°C über Nacht zersetzt. Nach Beendigung des Verdaus wurde der flüssige Teil entnommen und in vacuo getrocknet. Die getrocknete Substanz wurde in SDS-PAGE-Probenpuffer gelöst und bei Raumtemperatur über Nacht stehengelassen, dann das verdaute Produkt mittels SDS-PAGE unter Verwendung von 16,5% Acrylamidgel, das Tricin enthielt (Schagger und Jagow, 1987) aufgetrennt. Die Peptide wurden auf eine PVDF-Membran mittels Elektroblothing (Towbin et al. 1979) übertragen und mit Amidoschwarz angefärbt. Die gefärbten Bande wurden ausgeschnitten und die Aminosäuresequenz von der N-terminalen Seite jedes Peptids durch Edman-Abbau im Gasphasen-Sequenzierer (Modell 492A-Proteinsequenzierer, Applied Biosystems Inc.) bestimmt.

#### Beispiel 5. (Klonierung der Nicotianaminsynthase-Gene)

**[0109]** Die PCR-Amplifikation wurde für aus Fe-defizienten Gerstenwurzeln stammender cDNA unter Verwendung von Primern vorgenommen, die auf der Basis der erhaltenen partiellen Aminosäuresequenz synthetisiert wurden. Eine aus der Poly(A)<sup>+</sup>RNA der Fedefizienten Gerstenwurzeln hergestellte pYH23-cDNA-Bank wurde mit den derart erhaltenen DNA-Fragmenten des PCR-Produkts gescreent, welches mit [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP unter Verwendung des Random Primer Kit (Takara Shuzo Co.) als den Primern markiert war. Die isolierten cDNA-Klone wurden mittels des Cycle Sequencing Kits (Shimadzu Bunko Co.) unter Verwendung des Shimadzu DNA-Sequenzierers DSQ-2000L sequenziert.

**[0110]** Die PCR-Amplifikation wurde für die genomische DNA von Arabidopsis thaliana unter Verwendung von Primern durchgeführt, die auf der Basis der Nukleotidsequenzen von AC003114 und AB005245 von Arabidopsis thaliana synthetisiert wurden. Die derart erhaltenen DNA-Fragmente wurden mit dem Cycle Sequencing Kit (Shimadzu Bunko Co.) unter Verwendung des Shimadzu DNA-Sequenzierers DSQ-1000L sequenziert.

**[0111]** Die bestimmte Nukleotidsequenz ist in SEQ ID NR. 2 gezeigt.

#### Beispiel 6. (Expression des NAS1-Proteins in E. coli)

**[0112]** Ein Fragment, in dem die EcoRI-Stelle flussaufwärts des ersten ATG der HvNAS1-cDNA eingeführt wurde und die PstI- und BamHI-Stellen flussabwärts des Stoppcodons der HvNAS1-cDNA eingeführt wurden, wurde mittels PCR amplifiziert. Das derart erhaltene amplifizierte Produkt wurde in das pBluescriptII SK- unter Verwendung der EcoRI-Stelle und der BamHI-Stelle subkloniert und die korrekte Nukleotidsequenz bestätigt. Das Fragment zwischen der EcoRI-Stelle und der PstI-Stelle wurde in pMAL-c2 kloniert, um eine Expression in Form des Fusionierens des HvNAS1 an den C-Terminus des Maltose-Bindungsproteins zu erreichen.

**[0113]** Ein Fragment, in dem die EcoRI-Stelle flussaufwärts des ersten ATG des OsNAS1 eingeführt wurde und die HindIII-Stelle flussabwärts des Stoppcodons des OsNAS1 eingeführt wurde, wurde mittels PCR amplifiziert. Das derart erhaltene amplifizierte Produkt wurde in das pBluescriptII SK- unter Verwendung der EcoRI-Stelle und der HindIII-Stelle subkloniert und die korrekte Nukleotidsequenz bestimmt. Das Fragment zwischen der EcoRI-Stelle und der HindIII-Stelle wurde in pMAL-c2 kloniert, um die Expression in Form des Fusionierens des OsNAS1 an den C-Terminus des Maltose-Bindungsproteins zu erreichen.

**[0114]** Ein Fragment, in dem die EcoRI-Stelle flussaufwärts des ersten ATG von AtNAS1, AtNAS2 und AtNAS3 eingeführt wurde und die XbaI-Stelle flussabwärts des Stoppcodons von AtNAS1, AtNAS2 und AtNAS3 eingeführt wurde, wurde mittels PCR amplifiziert. Die derart erhaltenen amplifizierten Produkte wurden in das pBluescriptII SK- subkloniert, und die korrekten Nukleotidsequenzen wurden bestätigt. Das Fragment zwischen der EcoRI-Stelle und der XbaI-Stelle wurde in pMAL-c2 kloniert, um die Expression in Form des Fusionierens von AtNAS1, AtNAS2 und AtNAS3 jeweils an den C-Terminus der Maltose-Bindungsproteine zu erreichen.

**[0115]** Der E. coli-Stamm XL1-Blue wurde als ein Wirt zum Expressieren des Fusionsproteins verwendet. pMAL-c2-HvNAS bzw. pMAL-c2 wurden in XL1-Blue eingeführt. Die derart erhaltenen rekombinanten Bakterien wurden in LB-Medium, das Ampicillin und Tetracyclin zu jeweils 50 µg/ml enthielt, bei 37°C kultiviert, bis die OD 600 der Kultur 0,5 erreicht hatte. Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) wurde zu einer Endkonzentration von 0,3 mM hinzugefügt und kontinuierlich bei 37°C für 3 Stunden gezüchtet und die Bakterienzellen abgesammelt. Die Zellen wurden in 10 mM Tris-Puffer suspendiert, der 0,2 M NaCl, 1 mM EDTA, 3 mM DTT und 0,1 mM E-64, pH 7,4, enthielt, und mit Flüssigstickstoff eingefroren. Dies wurde in Eiswasser angetaut, und eine Ultraschallbehandlung für 15 Sekunden wurde 10-mal wiederholt. Die Nicotianaminsynthase-Aktivität des derart erhaltenen Rohextrakts wurde gemäß der in Beispiel 2 beschriebenen Methode untersucht und die Enzymaktivität bestätigt.

#### Beispiel 7. (Northern-Hybridisation)

**[0116]** Die Northern-Hybridisation der Gersten-RNA wurde unter Verwendung des DNA-Fragments vorgenommen, welches durch Ausschneiden von HvNAS1-cDNA mit HindIII und NotI präpariert und mit [α-<sup>32</sup>P]dATP als einer Sonde markiert wurde. Die Gesamt-RNA wurde aus Gerste extrahiert (Naito et al. 1988). Die extrahierte RNA wurde mittels 1,4% Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und auf Hybond-N<sup>-</sup>-Membranen (Amersham) aufgeblottet. Die Northern-Hybridisation der Reis-RNA wurde unter Verwendung von OsNAS1 ORF vorgenommen, die mit [α-<sup>32</sup>P]dATP als einer Sonde markiert wurde. Die Gesamt-RNA wurde aus Reis extrahiert. Die extrahierte RNA wurde mittels 1,4% Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und auf Hybond-N<sup>+</sup>-Membranen (Amersham) aufgeblottet. Die Membran wurde mit der Sonde in 0,5 M Church-Phosphatpuffer (Church und Gilbert 1984), 1 mM EDTA, 7% (Gew/Vol) SDS mit 100 µg/ml Lachssperma-DNA bei 65°C über Nacht hybridisiert. Die Membran wurde mit Puffer, der 40 mM Church-Phosphatpuffer und 1% (Gew/Vol) SDS enthielt, bei 65°C für 10 Minuten gewaschen. Anschließend wurde das Waschen nochmals wiederholt und die Membran mit Puffer, der 0,2 × SSPE und 0,1% (Gew/Vol) SDS enthielt, bei 65°C für 10 Minuten gewaschen. Die Radioaktivität wurde unter Verwendung des Bildanalysegerätes BAS-2000 bestimmt.

**[0117]** Die Ergebnisse sind in [Fig. 9](#) und [Fig. 16](#) gezeigt.

#### Beispiel 8. (Southern-Hybridisation)

**[0118]** Die genomische DNA wurde aus den Blättern von Gerste und Reis extrahiert. Der Extrakt wurde mit BamHI, EcoRI oder HindIII verdaut, mit 0,8% (Gew/Vol) Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf Hybond-N<sup>+</sup>-Membranen (Amersham) übertragen. Die Hybridisation wurde gemäß der in Beispiel 7 beschriebenen Methode vorgenommen und die Radioaktivität bestimmt. Das Ergebnis ist in [Fig. 10](#) gezeigt.

#### Beispiel 9. (Herstellung des polyklonalen Antikörpers)

**[0119]** Zwei Ratten wurden unter Verwendung des Antigens immunisiert, das etwa 100 µg isolierte Nicotianaminsynthase enthielt. Das Antigen stellte dieselbe Probe dar, wie zur Bestimmung der partiellen Aminosäuresequenz verwendet. Komplettes Freund-Adjuvans wurde für die erste Immunisierung verwendet, und für die zweite Immunisierung wurde inkomplettes Freund-Adjuvans verwendet. Alle Bestandteile des Bluts wurden gesammelt, nachdem die Ratten viermal immunisiert worden waren, und das erhaltene Serum wurde bei -80°C konserviert.

## Beispiel 10. (Western-Blotting-Analyse)

**[0120]** Das Gesamtprotein wurde unter Verwendung von Trichloressigsäure und Aceton extrahiert (Damerval et al. 1986). Die Pflanzen wurden in Flüssigstickstoff zerstoßen, bis ein Pulver erhalten war, und mit Aceton vermischt, das 0,1% (Vol/Vol) 2-Mercaptoethanol enthielt. Das Protein wurde ausgefällt, indem es bei  $-20^{\circ}\text{C}$  für 1 Stunde stehen durfte, und das Präzipitat wurde durch Zentrifugation bei  $16.000 \times g$  für 30 Minuten abgesammelt. Das Präzipitat wurde in Aceton suspendiert, das 0,1% (Vol/Vol) 2-Mercaptoethanol enthielt, und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  für 1 Stunde stehengelassen, woraufhin das Präzipitat durch Zentrifugation bei  $16.000 \times g$  für 30 Minuten gesammelt wurde. Das Präzipitat wurde in vacuo getrocknet und in Probenpuffer [9,5 M Harnstoff, 2% (Gew/Vol) Triton X-100 und 5% (Vol/Vol)-ME] gelöst, dann bei  $16.000 \times g$  für 10 Minuten zum Erhalt des Überstands zentrifugiert. Die im Überstand enthaltenen Proteine wurden mittels SDS-PAGE oder der denaturierenden zweidimensionalen Elektrophorese (O'Farrell 1975) aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Western-Blotting-Analyse wurde durch Aufbringen des primären Antikörpers, der Anti-Nicotianaminsynthase-Antikörper enthielt, wie in Beispiel 9 präpariert, und des sekundären Antikörpers, der Meerrettich-bindenden Ziege-Anti-Maus-IgG-(H + L)-Antikörper (Wako Pure Chemicals Co.) enthielt, auf die Membran und Färben mit Diaminobenzidin vorgenommen.

**[0121]** Das Ergebnis ist in [Fig. 12](#) gezeigt. Die SDS-PAGE wurde unter Verwendung von 12,5 Acrylamid-Flachgel vorgenommen. 100  $\mu\text{g}$  Protein wurden elektrophoretisch behandelt. Die Proteine aus 200  $\mu\text{g}$  Wurzeln und 500  $\mu\text{g}$  Blättern wurden elektrophoretisch behandelt.

## Beispiel 11. (RT-PCR)

**[0122]** Die Gesamt-RNA wurde aus *Arabidopsis thaliana* extrahiert. Die RT-PCR wurde mit 1  $\mu\text{g}$  RNA als einer Template unter Verwendung des EZ rTth RNA PCR-Kits (Parkin Elmer Inc.) vorgenommen. Spezifische Primer für AtNAS1, AtNAS2 bzw. AtNAS3 wurden verwendet.

**[0123]** Das Ergebnis ist in [Fig. 18](#) gezeigt.

## Industrielle Anwendbarkeit

**[0124]** Verschiedene Zellen werden gemäß der herkömmlichen Methode unter Verwendung der rekombinanten Vektoren der vorliegenden Erfindung transformiert. Die Massenproduktion von Nicotianamin kann unter Verwendung des erhaltenen Transformanden vorgenommen werden. Diese Methoden können gemäß der einem Fachmann des Gebiets bekannten Methode durchgeführt werden.

**[0125]** Eine selektive Züchtung von Pflanzen, vorzugsweise Gramineen, kann ebenfalls unter Verwendung der Gene der vorliegenden Erfindung durchgeführt werden. Insbesondere können die Gene der vorliegenden Erfindung zur Verbesserung der Varietäten, die auf Fe-defizientem Boden wachsen können, angewendet werden.

## SEQUENZLISTE

<110> Japan Science And Technology Corporation

<120> Nicotianaminsynthase, für Nicotianaminsynthase codierende Gene

<130> PA906235

<160> 22

<210> 1

<211> 328

<212> PRT

<213> Hordeum vulgare L.

<400> 1

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

Gly Ala Tyr Asp Val Val Phe Leu Ala Ala Leu Val Gly Met Ala 210  
 Ala Glu Glu Lys Ala Lys Val Ile Ala His Leu Gly Ala His Met 225  
 Val Glu Gly Ala Ser Leu Val Val Arg Ser Ala Arg Pro Arg Gly 240  
 Phe Leu Tyr Pro Ile Val Asp Pro Glu Asp Ile Arg Arg Gly Gly 255  
 Phe Glu Val Leu Ala Val His His Pro Glu Gly Glu Val Ile Asn 270  
 Ser Val Ile Val Ala Arg Lys Ala Val Glu Ala Gln Leu Ser Gly 285  
 Pro Gln Asn Gly Asp Ala His Ala Arg Gly Ala Val Pro Leu Val 300  
 Ser Pro Pro Cys Asn Phe Ser Thr Lys Met Glu Ala Ser Ala Leu 315  
 Glu Lys Ser Glu Glu Leu Thr Ala Lys Glu Leu Ala Phe 328

<210> 2

<211> 1295

<212> DNA

<213> *Hordeum vulgare* L.

<400> 2

10	20	30	40	50	60
GCGTTCAGAG	GCTTCCAGAG	TTCTTCCGGT	CACCAAGAAG	CATTTGATCA	TAACATGGAT
70	80	90	100	110	120
GCCCAGAACA	AGGAGGTCGC	TGCTCTGATC	GAGAAGATCG	CCGGTATCCA	GGCCGCCATC
130	140	150	160	170	180
GCCGAGCTGC	CGTCGCTGAG	CCCGTCCCCC	GAGGTCGACA	GGCTCTTCAC	CGACCTCGTC
190	200	210	220	230	240
ACGGCCTGCG	TCCCGCCGAG	CCCCGTGAC	GTGACGAAGC	TCAGCCCGGA	GCACCAGAGG
250	260	270	280	290	300

## DE 699 20 439 T2 2005.12.29

ATGCGGGAGG CTCTCATCCG CTTGTGCTCC GCCGCCGAGG GGAAGCTCGA GCGGCACTAC  
310 320 330 340 350 360  
GCCGACCTGC TCGCCACCTT CGACAACCCG CTCGACCACC TCGGCCTCTT CCCGTACTAC  
370 380 390 400 410 420  
AGCAACTACG TCAACCTCAG CAGGCTGGAG TACGAGCTCC TGGCGCGCCA CGTGCCGGGG  
430 440 450 460 470 480  
ATCGCGCCGG CGCGCGTCGC CTTGTCGGC TCCGGCCCCG TGGCGTTCAG CTCGCTCGTC  
490 500 510 520 530 540  
CTCGCCGCGC ACCACCTGCC CGAGACCCAG TTCGACAACT ACGACCTGTG CGGCGCGGGC  
550 560 570 580 590 600  
AACGAGCGCG CCAGGAAGCT GTTCGGCGCG ACCGGCGGACG GCGTCGGCGC GCGTATGTCC  
610 620 630 640 650 660  
TTCCACACGG CGGACGTCGC CGACCTCACC CAGGAGCTCG GCGCCTACGA CGTGGTCTTC  
670 680 690 700 710 720  
CTCGCCGCGC TCGTCGGCAT GGCAGCCGAG GAGAAGGCCA AGGTGATTGC CCACCTGGGC  
730 740 750 760 770 780  
GCGCACATGG TGGAGGGGGC GTCCCTGGTC GTGCGGAGCG CACGGCCCCG CGGCTTTCTT  
790 800 810 820 830 840  
TACCCCATTG TCGACCCGGA GGACATCAGG CGGGGTGGGT TCGAGGTGCT GGCCGTGCAC

## DE 699 20 439 T2 2005.12.29

850 860 870 880 890 900  
 CACCCGGAAG GTGAGGTGAT CAACTCTGTC ATCGTCGCCC GTAAGGCCGT CGAAGCGCAG  
  
 910 920 930 940 950 960  
 CTCAGTGGGC CGCAGAACGG AGACGCGCAC GCACGGGGCG CGGTGCCGTT GGTCAGCCCC  
  
 970 980 990 1000 1010 1020  
 CCATGCAACT TCTCCACCAA GATGGAGGCG AGCGCGCTTG AGAAGAGCGA GGAGCTGACC  
  
 1030 1040 1050 1060 1070 1080  
 GCCAAAGAGC TGGCCTTTTG ATTGAAGAGT GCGCGTGGTC ATTCTGTCCG CTGCCGATCGT  
  
 1090 1100 1110 1120 1130 1140  
 GGTAAC TTTC TACTCGTGT GTGTTTTGAT GTTTGTGCCT GTAAGAGTTA TGCTTCCGGC  
  
 1150 1160 1170 1180 1190 1200  
 CTTGTGCTGT TAATTTACAC GCGTTACATG TAGTACTTGT ATTTATACCT GGAATAACGG  
  
 1210 1220 1230 1240 1250 1260  
 TATGTAACAT AAATATTAGT GGGATTTGAA GTGTAATGCT AAATAATAAG AAAACTTGAT  
  
 1270 1280 1290 1300  
 GCAGACATTC AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAA

<210> 3

<211> 335

<212> PRT

<213> *Hordeum vulgare* L.

&lt;400&gt; 3

Met Ala Ala Gln Asn Asn Gln Glu Val Asp Ala Leu Val Glu Lys	15
Ile Thr Gly Leu His Ala Ala Ile Ala Lys Leu Pro Ser Leu Ser	30
Pro Ser Pro Asp Val Asp Ala Leu Phe Thr Glu Leu Val Thr Ala	45
Cys Val Pro Pro Ser Pro Val Asp Val Thr Lys Leu Gly Pro Glu	60
Ala Gln Glu Met Arg Glu Gly Leu Ile Arg Leu Cys Ser Glu Ala	75
Glu Gly Lys Leu Glu Ala His Tyr Ser Asp Met Leu Ala Ala Phe	90
Asp Lys Pro Leu Asp His Leu Gly Met Phe Pro Tyr Tyr Asn Asn	105
Tyr Ile Asn Leu Ser Lys Leu Glu Tyr Glu Leu Leu Ala Arg Tyr	120
Val Pro Gly Gly Tyr Arg Pro Ala Arg Val Ala Phe Ile Gly Ser	135
Gly Pro Leu Pro Phe Ser Ser Phe Val Leu Ala Ala Arg His Leu	150
Pro Asp Thr Met Phe Asp Asn Tyr Asp Leu Cys Gly Ala Ala Asn	165
Asp Arg Ala Ser Lys Leu Phe Arg Ala Asp Arg Asp Val Gly Ala	180
Arg Met Ser Phe His Thr Ala Asp Val Ala Asp Leu Ala Gly Glu	195
Leu Ala Lys Tyr Asp Val Val Phe Leu Ala Ala Leu Val Gly Met	210
Ala Ala Glu Asp Lys Ala Lys Val Ile Ala His Leu Gly Ala His	225
Met Ala Asp Gly Ala Ala Leu Val Val Arg Ser Ala His Gly Ala	240
Arg Gly Phe Leu Tyr Pro Ile Val Asp Pro Gln Asp Ile Gly Arg	255
Gly Gly Phe Glu Val Leu Ala Val Cys His Pro Asp Asp Asp Val	270
Val Asn Ser Val Ile Ile Ala Gln Lys Ser Lys Asp Val His Ala	285
Asp Gly Leu Gly Ser Gly Arg Gly Ala Gly Gly Gln Tyr Ala Arg	300
Gly Thr Val Pro Val Val Ser Pro Pro Cys Arg Phe Gly Glu Met	315
Val Ala Asp Val Thr Gln Asn His Lys Arg Asp Glu Phe Ala Asn	330
Ala Glu Val Ala Phe	335

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 1342

&lt;212&gt; DNA

<213> *Hordeum vulgare* L.

&lt;400&gt; 4

10	20	30	40	50	60
CTCCTGTGCC	TGTCCTGAGG	TACCAAGAAC	ACCAGTGAAA	TGGCTGCCCCA	GAACAACCAG
70	80	90	100	110	120
GAGGTGGATG	CCCTGGTGGA	GAAGATCACC	GGGCTCCATG	CCGCAATCGC	CAAGCTGCCC
130	140	150	160	170	180
TCGCTCAGCC	CATCCCCGGA	CGTCGACGCG	CTCTTCACGG	AGCTGGTCAC	GGCGTGCGTT
190	200	210	220	230	240
CCACCGASTC	CAGTGGACGT	GACCAAGCTC	GGGCCGGAGG	CGCAGGAGAT	GCGGGAGGGC
250	260	270	280	290	300
CTCATCCGCC	TATGCTCCGA	GGCCGAGGGG	AAGCTGGAGG	CGCACTACTC	CGACATGCTC
310	320	330	340	350	360
GCCGCCTTCG	ACAAGCCGCT	GGATCACCTC	GGCATGTTCC	CCTACTACAA	CAACTACATC
370	380	390	400	410	420
AACCTCAGCA	AGCTCGAGTA	CGAGCTCCTG	GCCCCGTACG	TGCCTGGCGG	CTATCGCCCC
430	440	450	460	470	480
GCGCGCGTCG	CGTTCATCGG	CTCCGGCCCC	CTGCCGTTCA	GCTCCTTTGT	CCTGGCCGCG
490	500	510	520	530	540

CGCCACCTGC CCGACACCAT GTTCGACAAC TATGACCTGT GCGGTGCGGC CAACGATCGC

550 560 570 580 590 600

GCCAGCAAGC TCTTCGCGC GGATCGCGAC GTGGGTGCCC GCATGTCGTT CCACACGGCC

610 620 630 640 650 660

GACGTCGCGG ACCTCGCCGG CGAGCTCGCC AAGTACGACG TTGTCTTCCT GGCCGCACTC

670 680 690 700 710 720

GTCGGCATGG CCGCCGAGGA CAAGGCGAAG GTGATCGCGC ACCTCGGCGC ACACATGGCA

730 740 750 760 770 780

GACGGGGCGG CCCTCGTCGT GCGCAGCGCA CACGGAGCGC GCGGGTTCCT GTACCCGATC

790 800 810 820 830 840

GTCGACCCCC AGGACATCGG CCGAGGCGGG TTCGAGGTGC TGGCCGTGTG CCATCCCGAC

850 860 870 880 890 900

GACGACGTGG TGAACTCCGT CATCATCGCA CAGAAGTCCA AGGACGTGCA TGCCGATGGA

910 920 930 940 950 960

CTTGGCAGCG GCGGTGGTGC CGGTGGACAG TACGCGCGGG GCACGGTGCC TGTTGTCAGC

970 980 990 1000 1010 1020

CCCCCGTGCA GGTTCGGCGA GATGGTGGCG GACGTGACCC AGAACCACAA GAGAGACGAG

1030 1040 1050 1060 1070 1080

TTTGCCAACG CCGAAGTGGC CTTTTGATCG TTCGCTGCGA GGGTGTGCAT CCATGATCCA

DE 699 20 439 T2 2005.12.29

```

1090      1100      1110      1120      1130      1140
TCCATACCTC GTTCTGTGAT TGCATCAAGC TTGCAATCGT ATGCATTTC AAGTCACGTGT

1150      1160      1170      1180      1190      1200
TGCTTCTATC CAATAATGTA CGTGTGGTGT TTACACGCCA ATGTCTTGTA GACCTTTGTA

1210      1220      1230      1240      1250      1260
TGTGTACAAG TGAATTTTAA TTCACAAGTA CATATAATGG TCACCATTGA AAAGATGTTT

1270      1280      1290      1300      1310      1320
AGTGTGTGTT TTCCAATATA TGTTTGTGTA AGGTTTCATCA TCTAATAAAA TATGTTTGGA

1330      1340      1350
ACCCAAAAAA AAAAAAAAAA AA

```

<210> 5

<211> 335

<212> PRT

<213> *Hordeum vulgare* L.

<400> 5

```

Met Ala Ala Gln Asn Asn Asn Lys Asp Val Ala Ala Leu Val Glu      15
Lys Ile Thr Gly Leu His Ala Ala Ile Ala Lys Leu Pro Ser Leu      30
Ser Pro Ser Pro Asp Val Asp Ala Leu Phe Thr Glu Leu Val Thr      45
Ala Cys Val Pro Pro Ser Pro Val Asp Val Thr Lys Leu Gly Pro      60
Glu Ala Gln Glu Met Arg Glu Gly Leu Ile Arg Leu Cys Ser Glu      75
Ala Glu Gly Lys Leu Glu Ala His Tyr Ser Asp Met Leu Ala Ala      90
Phe Asp Asn Pro Leu Asp His Leu Gly Ile Phe Pro Tyr Tyr Ser     105

```

Asn Tyr Ile Asn Leu Ser Lys Leu Glu Tyr Glu Leu Leu Ala Arg 120  
 Tyr Val Arg Arg His Arg Pro Ala Arg Val Ala Phe Ile Gly Ser 135  
 Gly Pro Leu Pro Phe Ser Ser Phe Val Leu Ala Ala Arg His Leu 150  
 Pro Asp Thr Met Phe Asp Asn Tyr Asp Leu Cys Gly Ala Ala Asn 165  
 Asp Arg Ala Ser Lys Leu Phe Arg Ala Asp Thr Asp Val Gly Ala 180  
 Arg Met Ser Phe His Thr Ala Asp Val Ala Asp Leu Ala Ser Glu 195  
 Leu Ala Lys Tyr Asp Val Val Phe Leu Ala Ala Leu Val Gly Met 210  
 Ala Ala Glu Asp Lys Ala Lys Val Ile Ala His Leu Gly Ala His 225  
 Met Ala Asp Gly Ala Ala Leu Val Val Arg Ser Ala His Gly Ala 240  
 Arg Gly Phe Leu Tyr Pro Ile Val Asp Pro Gln Asp Ile Gly Arg 255  
 Gly Gly Phe Glu Val Leu Ala Val Cys His Pro Asp Asp Asp Val 270  
 Val Asn Ser Val Ile Ile Ala Gln Lys Ser Lys Glu Val His Ala 285  
 Asp Gly Leu Gly Ser Ala Arg Gly Ala Gly Arg Gln Tyr Ala Arg 300  
 Gly Thr Val Pro Val Val Ser Pro Pro Cys Arg Phe Gly Glu Met 315  
 Val Ala Asp Val Thr Gln Asn His Lys Arg Asp Glu Phe Ala Asn 330  
 Ala Glu Val Ala Phe 335

<210> 6

<211> 1314

<212> DNA

<213> *Hordeum vulgare* L.

<400> 6

	10	20	30	40	50	60
CTACTTCACT	CACACTAGTG	CCCAGAAAGA	AGGCTGCAAT	GGCTGCCAG	AACAACAACA	
	70	80	90	100	110	120
AGGATGTCGC	TGCCCTGGTG	GAGAAGATCA	CCGGGCTCCA	CGCCGCCATC	GCCAAGCTGC	

## DE 699 20 439 T2 2005.12.29

130 140 150 160 170 180  
CGTCGCTCAG CCCATCCCCG GACGTCGACG CGCTCTTCAC CGAGCTGGTC ACGGCGTGCG

190 200 210 220 230 240  
TTCCCCCGAG CCCCCTGGAC GTGACCAAGC TCGGCCCCGA GGCGCAGGAG ATGCGGGAGG

250 260 270 280 290 300  
GCCTCATCCG CCTCTGCTCC GAGGCCGAGG GGAAGCTGGA GGCGCACTAC TCCGACATGC

310 320 330 340 350 360  
TCGCCGCCTT CGACAACCCG CTGGATCACC TCGGCATCTT CCCCTACTAC AGCAACTACA

370 380 390 400 410 420  
TCAACCTCAG CAAGCTGGAG TACGAGCTCC TGGCAGGCTA CGTCCGGCGG CATCGCCCGG

430 440 450 460 470 480  
CCCGCGTCGC GTTCATCGGC TCCGGCCCGC TGCCGTTTAC CTCCTTTGTC CTGGCCGCGC

490 500 510 520 530 540  
GCCACCTGCC CGACACCATG TTTGACAAC ACGACCTTTG CGGCGCGGCC AACGATCGCG

550 560 570 580 590 600  
CCAGCAAGCT CTTCCGCGCG GACACGGACG TGGGTGCCCC CATGTCGTTC CACACGGCCG

610 620 630 640 650 660  
ACGTCGCGGA CCTCGCCAGC GAGCTCGCCA AGTACGACGT CGTCTTCCTG GCCGCGCTCG

670 680 690 700 710 720  
TCGGCATGGC CGCCGAGGAC AAGGCCAAGG TGATCGCGCA CCTCGGCGCA CACATGGCAG

## DE 699 20 439 T2 2005.12.29

730 740 750 760 770 780  
ACGGGGCGGC CCTCGTCGTG CGCAGCGCAC ACGGAGCGCG CGGGTTCCTG TACCCGATTG

790 800 810 820 830 840  
TCGACCCCCA GGACATCGGC CGCGGCGGGT TCGAGGTGCT GGCCGTGTGC CACCCCGACG

850 860 870 880 890 900  
ACGACGTGGT GAACTCCGTC ATCATCGCAC AGAAGTCCAA GGAGGTGCAT GCCGATGGAC

910 920 930 940 950 960  
TTGGCAGCGC GCGTGGTGCC GGTCGACAGT ACGCGCGCGG CACGGTGCCG GTTGTGAGCC

970 980 990 1000 1010 1020  
CCCCGTGCAG GTTCGGTGAG ATGGTGGCGG ATGTGACCCA GAACCACAAG AGAGACGAGT

1030 1040 1050 1060 1070 1080  
TTGCCAACGC CGAAGTGGCC TTTTGATCGA TCGTCGCCAA GGGACAATAA ATGAACGTGG

1090 1100 1110 1120 1130 1140  
ATGTGGTAGG GTAATTTGCC TACCTCGCTG CTTGATCGCT TGCAATATGT GCACATTTTC

1150 1160 1170 1180 1190 1200  
CTACTACCGC TGCTTATGCA TTTCAAGCCA TGTGATGTTG GTATCCAATA AAGTATGTGT

1210 1220 1230 1240 1250 1260  
AGGGTTTACA CGCAAATGTC TTTACACCTT GTACGTGTAA GTGTTGACAA CGATGAATTT

1270 1280 1290 1300 1310 1320

CAGTTCACAA TTAATAAATA GTATAATGGA TTCAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAA

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 329

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Hordeum vulgare L.

&lt;400&gt; 7

Met Asp Gly Gln Ser Glu Glu Val Asp Ala Leu Val Gln Lys Ile	15
Thr Gly Leu His Ala Ala Ile Ala Lys Leu Pro Ser Leu Ser Pro	30
Ser Pro Asp Val Asp Ala Leu Phe Thr Asp Leu Val Thr Ala Cys	45
Val Pro Pro Ser Pro Val Asp Val Thr Lys Leu Ala Pro Glu Ala	60
Glu Ala Met Arg Glu Gly Leu Ile Arg Leu Cys Ser Glu Ala Glu	75
Gly Lys Leu Glu Ala His Tyr Ser Asp Met Leu Ala Ala Phe Asp	90
Asn Pro Leu Asp His Leu Gly Val Phe Pro Tyr Tyr Ser Asn Tyr	105
Ile Asn Leu Ser Lys Leu Glu Tyr Glu Leu Leu Ala Arg Tyr Val	120
Pro Gly Arg His Arg Pro Ala Arg Val Ala Phe Ile Gly Ser Gly	135
Pro Leu Pro Phe Ser Ser Tyr Val Leu Ala Ala Arg His Leu Pro	150
Asp Thr Val Phe Asp Asn Tyr Asp Leu Cys Gly Ala Ala Asn Asp	165
Arg Ala Thr Arg Leu Phe Arg Ala Asp Lys Asp Val Gly Ala Arg	180
Met Ser Phe His Thr Ala Asp Val Ala Asp Leu Thr Asp Glu Leu	195
Ala Thr Tyr Asp Val Val Phe Leu Ala Ala Leu Val Gly Met Ala	210
Ala Glu Asp Lys Ala Lys Val Ile Ala His Leu Gly Ala His Met	225
Ala Asp Gly Ala Ala Leu Val Ala Arg His Gly Ala Arg Gly Phe	240
Leu Tyr Pro Ile Val Asp Pro Gln Asp Ile Gly Arg Gly Gly Phe	255
Glu Val Leu Ala Val Cys His Pro Asp Asp Asp Val Val Asn Ser	270
Val Ile Ile Ala Gln Lys Ser Asn Asp Val His Glu Tyr Gly Leu	285
Gly Ser Gly Arg Gly Gly Arg Tyr Ala Arg Gly Thr Val Val Pro	300

## DE 699 20 439 T2 2005.12.29

Val Val Ser Pro Pro Cys Arg Phe Gly Glu Met Val Ala Asp Val 315  
 Thr Gln Lys Arg Glu Glu Phe Ala Asn Ala Glu Val Ala Phe 329

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 1249

&lt;212&gt; DNA

<213> *Hordeum vulgare* L.

&lt;400&gt; 8

10 20 30 40 50 60  
 CCACTACCGA CTACCGTAGT ACCGTGCCTC AGAGCTCATC ACTGGTCAGG TACCAAGAAG

70 80 90 100 110 120  
 ACATAAAAAT GGACGGCCAG AGCGAGGAGG TCGACGCCCT TGTCAGAAG ATCACCGGCC

130 140 150 160 170 180  
 TCCACGCCGC CATCGCCAAG CTGCCCTCGC TCAGCCCCTC CCCGGACGTC GACGCGCTCT

190 200 210 220 230 240  
 TCACCGACCT GGTCACCGCG TCGGTGCCCC CGAGCCCCGT GGACGTGACC AAGCTCGCCC

250 260 270 280 290 300  
 CGGAGGCGCA GGCGATGCGG GAGGGCCTCA TCCGCCTCTG CTCCGAGGCC GAGGGCAAGC

310 320 330 340 350 360  
 TGGAGGCGCA CTA CTCCGAC ATGCTCGCCG CCTTCGACAA CCCGCTCGAC CACCTCGGCC

370 380 390 400 410 420  
 TCTTCCCCTA CTACAGCAAC TACATCAACC TCAGCAAGCT TGAGTACGAG CTCCTCGCGC

## DE 699 20 439 T2 2005.12.29

430 440 450 460 470 480  
GCTACGTGCC CGGCAGGCAT CGCCCGGCC GCGTCGCCTT CATCGGCTCC GGCCCGCTGC

490 500 510 520 530 540  
CGTTCAGCTC CTACGTCTC GCCGCGCGCC ACCTGCCCGA CACCGTGTT CACAACACTACG

550 560 570 580 590 600  
ACCTGTGCGG CGCGGCCAAC GACCGCGCGA CCAGGCTGTT CCGCGCGGAC AAGGACGTCC

610 620 630 640 650 660  
GCGCCCGCAT GTCGTTCCAC ACCGCCGACC TCGCGGACCT CACCGACGAG CTCGCTACGT

670 680 690 700 710 720  
ACGACGTCTT CTTCCTGGCC GCGCTCGTGG GCATGGCCGC CGAGGACAAG GCCAAGGTGA

730 740 750 760 770 780  
TCGCGCACCT TGGCGCGCAC ATGGCGGACC GGGCGGCCCT CGTTGCGCGG CACGGCGCGC

790 800 810 820 830 840  
GTGGGTTTCT CTACCCGATC GTCGATCCCC AGGACATCGG TCGAGGCGGG TTCGAGGTGC

850 860 870 880 890 900  
TCGCCGTGTG TCACCCCGAC GACGACGTGG TGAACTCCGT CATCATCGCA CAAAAGAGCA

910 920 930 940 950 960  
ACGACGTGCA CGAGTATGGA CTTGGCAGCG GGCCTGGTGG ACGGTACCGG CGAGGCACGG

970 980 990 1000 1010 1020

TGGTGCCGGT GGTCAGCCCA CCCTGCAGGT TCGGCGAGAT GGTGGCAGAC GTGACCCAGA

1030 1040 1050 1060 1070 1080

AGAGAGAGGA GTTTGCCAAC GCGGAAGTGG CCTTCTGATT GCTGCTGAAT CGCTTGTGAT

1090 1100 1110 1120 1130 1140

CGTACGTGGT AATTTTTCTA CTA CTACTCCTCC TCCTACCACC ACCTATCACC TATGTATGCA

1150 1160 1170 1180 1190 1200

TTTCAAGTCC TGTGTTGTTT GTATCCAATA ATGTAAGTGA GATGTTTACA CGCGCAAAAA

1210 1220 1230 1240 1250

AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA

<210> 9

<211> 282

<212> PRT

<213> Hordeum vulgare L.

<400> 9

Met Glu Ala Glu Asn Gly Glu Val Ala Ala Leu Val Glu Lys Ile	15
Thr Gly Leu His Ala Ala Ile Ser Lys Leu Pro Ala Leu Ser Pro	30
Ser Pro Gln Val Asp Ala Leu Phe Thr Glu Leu Val Ala Ala Cys	45
Val Pro Ser Ser Pro Val Asp Val Thr Lys Leu Gly Pro Glu Ala	60
Gln Glu Met Arg Gln Asp Leu Ile Arg Leu Cys Ser Ala Ala Glu	75
Gly Leu Leu Glu Ala His Tyr Ser Asp Met Leu Thr Ala Leu Asp	90
Ser Pro Leu Asp His Leu Gly Arg Phe Pro Tyr Phe Asp Asn Tyr	105
Val Asn Leu Ser Lys Leu Glu His Asp Leu Leu Ala Gly His Val	120

Ala Ala Pro Ala Arg Val Ala Phe Ile Gly Ser Gly Pro Leu Pro 135  
Phe Ser Ser Leu Phe Leu Ala Thr Tyr His Leu Pro Asp Thr Arg 150  
Phe Asp Asn Tyr Asp Arg Cys Ser Val Ala Asn Gly Arg Ala Met 165  
Lys Leu Val Gly Ala Ala Asp Glu Gly Val Arg Ser Arg Met Ala 180  
Phe His Thr Ala Glu Val Thr Asp Leu Thr Ala Glu Leu Gly Ala 195  
Tyr Asp Val Val Phe Leu Ala Ala Leu Val Gly Met Thr Ser Lys 210  
Glu Lys Ala Asp Ala Ile Ala His Leu Gly Lys His Met Ala Asp 225  
Gly Ala Val Leu Val Arg Glu Ala Leu His Gly Ala Arg Ala Phe 240  
Leu Tyr Pro Val Val Glu Leu Asp Asp Val Gly Arg Gly Gly Phe 255  
Gln Val Leu Ala Val His His Pro Ala Gly Asp Glu Val Phe Asn 270  
Ser Phe Ile Val Ala Arg Lys Val Lys Met Ser Ala 282

<210> 10

<211> 1044

<212> DNA

<213> *Hordeum vulgare* L.

<400> 10

10	20	30	40	50	60
GTGACATGGA	GGCCGAAAAC	GGCGAGGTGG	CTGCTCTGGT	CGAGAAGATC	ACCGGTCTCC
70	80	90	100	110	120
ACGCCGCCAT	CTCCAAGCTC	CCGGCACTAA	GCCCGTCTCC	TCAAGTCGAC	GCGCTCTTCA
130	140	150	160	170	180
CCGAGCTGGT	TGCGGCGTGC	GTCCCATCAA	GCCCGGTGGA	CGTGACCAAG	CTCGGCCCGG
190	200	210	220	230	240
AGGCGCAGGA	GATGCGGCAG	GACCTCATCC	GTCTCTGCTC	GGCCGCCGAG	GGGCTGCTCG

## DE 699 20 439 T2 2005.12.29

250	260	270	280	290	300
AGGCGCACTA	CTCCGACATG	CTCACCGCGT	TGGACAGCCC	GCTCGACCAC	CTCGGCCCGCT
310	320	330	340	350	360
TCCCTTACTT	CGACAACCTAC	GTCAACCTCA	GCAAGCTCGA	GCACGATCTT	CTGGCAGGTC
370	380	390	400	410	420
ACGTGGCGGC	CCCGGCCCGC	GTGGCGTTCA	TCGGGTCGGG	GCCACTGCCC	TTCAGCTCGC
430	440	450	460	470	480
TCTTCCTTGC	GACGTACCAC	CTGCCGGACA	CCCGGTTTCGA	CAACTACGAC	CGGTGCAGCC
490	500	510	520	530	540
TGGCGAATGG	CCGGGCGATG	AAGCTGGTCC	GCGCGGCGGA	CGAGGGCGTG	CGATCACGCA
550	560	570	580	590	600
TGGCGTTCCA	CACGGCCGAA	GTCACGGACC	TCACGGCTGA	GCTCGGCGCT	TACGACGTGG
610	620	630	640	650	660
TCTTCCTGGC	CGCGCTCGTG	GGAATGACGT	CCAAGGAGAA	GGCCGACGCC	ATAGCGCACT
670	680	690	700	710	720
TGGGGAAGCA	CATGGCAGAT	GGGGCGGTGC	TCGTGCCGGA	AGCGCTGCAC	GGGGCGCGAG
730	740	750	760	770	780
CGTTCCTGTA	TCCTGTCGTG	GAGCTGGACG	ATGTCGGGCG	TGGTGGGTTC	CAAGTGCTGG
790	800	810	820	830	840

CCGTGCACCA CCCTGCAGGC GATGAGGTGT TCAACTCATT CATAGTTGCC CGGAAGGTGA

850 860 870 880 890 900  
 AAATGAGTGC TTAATAAAG AAAAGGGTGA GCCTGTCTGC TTGTGCAAAT GGTGTCTCAC

910 920 930 940 950 960  
 ATTGATAATA ACCAGATGAT ACCCTGCACA TTGATGGGGG TACTGCAGTA TGTTTCAATG

970 980 990 1000 1010 1020  
 AGGTCTGGTT GTATCAAATA TGAGTATTTG GCTTAATAAT ATCAGCGAAT ATGTTTCGAT

1030 1040 1050  
 TAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAA

<210> 11

<211> 328

<212> PRT

<213> Hordeum vulgare L.

<400> 11

Met Asp Ala Gln Asn Lys Glu Val Asp Ala Leu Val Gln Lys Ile	15
Thr Gly Leu His Ala Ala Ile Ala Lys Leu Pro Ser Leu Ser Pro	30
Ser Pro Asp Val Asp Ala Leu Phe Thr Asp Leu Val Thr Ala Cys	45
Val Pro Pro Ser Pro Val Asp Val Thr Lys Leu Gly Ser Glu Ala	60
Gln Glu Met Arg Glu Gly Leu Ile Arg Leu Cys Ser Glu Ala Glu	75
Gly Lys Leu Glu Ala His Tyr Ser Asp Met Leu Ala Ala Phe Asp	90
Asn Pro Leu Asp His Leu Gly Met Phe Pro Tyr Tyr Ser Asn Tyr	105
Ile Asn Leu Ser Lys Leu Glu Tyr Glu Leu Leu Ala Arg Tyr Val	120
Pro Gly Gly Ile Ala Arg Pro Ala Val Ala Phe Ile Gly Ser Gly	135

Pro Leu Pro Phe Ser Ser Tyr Val Leu Ala Ala Arg His Leu Pro 150  
 Asp Ala Met Phe Asp Asn Tyr Asp Leu Cys Ser Ala Ala Asn Asp 165  
 Arg Ala Ser Lys Leu Phe Arg Ala Asp Lys Asp Val Gly Ala Arg 180  
 Met Ser Phe His Thr Ala Asp Val Ala Asp Leu Thr Arg Glu Leu 195  
 Ala Ala Tyr Asp Val Val Phe Leu Ala Ala Leu Val Gly Met Ala 210  
 Ala Glu Asp Lys Ala Lys Val Ile Pro His Leu Gly Ala His Met 225  
 Ala Asp Gly Ala Ala Leu Val Val Arg Ser Ala Gln Ala Arg Gly 240  
 Phe Leu Tyr Pro Ile Val Asp Pro Gln Asp Ile Gly Arg Gly Gly 255  
 Phe Glu Val Leu Ala Val Cys His Pro Asp Asp Asp Val Val Asn 270  
 Ser Val Ile Ile Ala His Lys Ser Lys Asp Val His Ala Asn Glu 285  
 Arg Pro Asn Gly Arg Gly Gly Gln Tyr Arg Gly Ala Val Pro Val 300  
 Val Ser Pro Pro Cys Arg Phe Gly Glu Met Val Ala Asp Val Thr 315  
 His Lys Arg Glu Glu Phe Thr Asn Ala Glu Val Ala Phe 328

<210> 12

<211> 1352

<212> DNA

<213> *Hordeum vulgare* L.

<400> 12

10 20 30 40 50 60  
 CTCCACTTCG CTCCTGTGCC TCAGGTAGCC ACAACATACA GTATTAAAAT GGATGCCCAG  
 70 80 90 100 110 120  
 AACAAGGAGG TTGATGCCCT GGTCCAGAAG ATCACCGGCC TCCACGCCGC CATCGCCAAG  
 130 140 150 160 170 180  
 CTGCCGTCCC TCAGCCCATC ACCCGACGTC GACGCGCTCT TCACCGACCT GGTCACCGCG

## DE 699 20 439 T2 2005.12.29

190	200	210	220	230	240
TGGGTCCCCC	CGAGCCCCGT	GGACGTGACC	AAGCTCGGGT	CGGAGGCGCA	GGAGATGCGG
250	260	270	280	290	300
GAGGGCCTCA	TCCGCCTCTG	CTCCGAGGCC	GAGGGGAAGC	TGGAGGCGCA	CTACTCCGAC
310	320	330	340	350	360
ATGCTGGCCG	CCTTCGACAA	CCCGCTCGAC	CACCTCGGCA	TGTTCCCCTA	CTACAGCAAC
370	380	390	400	410	420
TACATCAACC	TCAGCAAGCT	GGAGTACGAG	CTCCTGGCGC	GCTACGTGCC	GGGCGGCATC
430	440	450	460	470	480
GCCCGGCCCG	CTGTCCGCTT	CATCGGCTCC	GGCCCCCTGC	CGTTCAGCTC	CTACGTCCCTC
490	500	510	520	530	540
GCCGCTCGCC	ACCTGCCCGA	CGCCATGTTC	GACAACCTACG	ACCTGTGTAG	CGCGGCCAAC
550	560	570	580	590	600
GACCGTGCGA	GCAAGCTGTT	CCGCGCGGAC	AAGGACGTGG	GCGCCCGCAT	GTCTTTCCAC
610	620	630	640	650	660
ACCGCCGACG	TAGCGGACCT	CACCCGCGAG	CTCGCCGCGT	ACGACGTCGT	CTTCCTGGCC
670	680	690	700	710	720
GCGCTCGTGG	GCATGGCTGC	CGAGGACAAG	GCCAAGGTGA	TTCCGCACCT	CGGCGCGCAC
730	740	750	760	770	780

## DE 699 20 439 T2 2005.12.29

ATGGCGGACC GGGCGGCCCT CGTCGTGCGC AGTGCGCAGG CACGTGGGTT CCTCTACCCG  
790 800 810 820 830 840  
ATCGTCGATC CCCAGGACAT CGGTCGAGGC GGGTTTGAGG TGCTGGCCGT GTGTCACCCC  
850 860 870 880 890 900  
GACGATGACC TGGTGA ACTC CGTCATCATC GCACACAAGT CCAAGGACGT GCATGCCAAT  
910 920 930 940 950 960  
GAACGTCCCA ACGGGCGTGG TGGACAGTAC CGGGGCGCGG TACCGGTGGT CAGCCCGCCG  
970 980 990 1000 1010 1020  
TGCAGGTTCG GTGAGATGGT GGC GGACGTG ACCCACAAGA GAGAGGAGTT CACCAACGCG  
1030 1040 1050 1060 1070 1080  
GAAGTGGCCT TCTGATCGTT GCGAGGGAAT GAAAATGAAG GTGGACGTGT GTGGTCAGCA  
1090 1100 1110 1120 1130 1140  
TCCATACGTG GCTGCCTGCT TCATCGCTTG CAATCGTACT ACTACCTACC TATGCAGTTC  
1150 1160 1170 1180 1190 1200  
AAGTCATGTG TTGTCAATGT AAGTGTGATG TTTACACTAG TCTATGAAAG GCAGGGCAGA  
1210 1220 1230 1240 1250 1260  
CGAGGGTAGT GTGCCAAGTA ACAGTGTGTC ATTATAGGTG TAAGTGTGTA GAATAAGACC  
1270 1280 1290 1300 1310 1320  
ATTTTTGTTC ACAAATAGTA TGATGTAATC GGTGTCATAT TCGTATTGAG TACATTTGTC

1330

1340

1350

1360

AAGTTGGTTG CTAACAAAAA AAAAAAAA AA

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 329

&lt;212&gt; PRT

<213> *Hordeum vulgare* L.

&lt;400&gt; 13

Met Asp Ala Gln Ser Lys Glu Val Asp Ala Leu Val Gln Lys Ile	15
Thr Gly Leu His Ala Ala Ile Ala Lys Leu Pro Ser Leu Ser Pro	30
Ser Pro Asp Val Asp Ala Leu Phe Thr Asp Leu Val Thr Ala Cys	45
Val Pro Pro Ser Pro Val Asp Val Thr Lys Leu Ala Pro Glu Ala	60
Gln Ala Met Arg Glu Gly Leu Ile Arg Leu Cys Ser Glu Ala Glu	75
Gly Lys Leu Glu Ala His Tyr Ser Asp Met Leu Ala Ala Phe Asp	90
Asn Pro Leu Asp His Leu Gly Val Phe Pro Tyr Tyr Ser Asn Tyr	105
Ile Asn Leu Ser Lys Leu Glu Tyr Glu Leu Leu Ala Arg Tyr Val	120
Pro Gly Gly Ile Ala Pro Ala Arg Val Ala Phe Ile Gly Ser Gly	135
Pro Leu Pro Phe Ser Ser Tyr Val Leu Ala Ala Arg His Leu Pro	150
Asp Thr Val Phe Asp Asn Tyr Val Pro Val Arg Ala Ala Asn Asp	165
Arg Ala Thr Arg Leu Phe Arg Ala Asp Lys Asp Val Gly Ala Arg	180
Met Ser Phe His Thr Ala Asp Val Ala Asp Leu Thr Asp Glu Leu	195
Ala Thr Tyr Asp Val Val Phe Leu Ala Ala Leu Val Gly Met Ala	210
Ala Glu Asp Lys Gly Gln Gly Asp Pro His Leu Gly Ala His Met	225
Ala Asp Gly Ala Ala Leu Val Arg Ser Ala His Gly Ala Arg Gly	240
Phe Leu Tyr Pro Ile Val Asp Pro Gln Asp Ile Gly Arg Gly Gly	255
Phe Glu Val Leu Ala Val Cys His Pro Asp Asp Asp Val Val Asn	270
Ser Val Ile Ile Ala Gln Lys Ser Lys Asp Met Phe Ala Asn Gly	285

DE 699 20 439 T2 2005.12.29

Pro Arg Asn Gly Cys Gly Gly Arg Tyr Ala Arg Gly Thr Val Pro 300  
 Val Val Ser Pro Pro Cys Arg Phe Gly Glu Met Val Ala Asp Val 315  
 Thr Gln Lys Arg Glu Glu Phe Ala Lys Ala Glu Val Ala Phe 329

<210> 14

<211> 1371

<212> DNA

<213> *Hordeum vulgare* L.

<400> 14

10	20	30	40	50
GGAGCGGNAC	GCGTGCGGGA	GGTGGGCACT	ACCGTAGTAC	CGTGCCCTCAG
60	70	80	90	100
AGCTCATCAC	TGGTCAGGTA	CCAAGAAGAC	ATAAAAATGG	ACGCCCAGAG
110	120	130	140	150
CAAGGAGGTC	GACGCCCTTG	TCCAGAAGAT	CACCGGCCTC	CACGCCGCCA
160	170	180	190	200
TCGCCAAGCT	GCCCTCGCTC	AGCCCGTCCC	CGGACGTCGA	CGCGCTCTTC
210	220	230	240	250
ACCGACCTGG	TCACCGCGTG	CGTGCCCCCG	AGCCCCGTGG	ACGTGACCAA
260	270	280	290	300
GCTCGCCCCG	GAGGCGCAGG	CGATGCGGGA	GGGCCTCATC	CGCCTCTGCT
310	320	330	340	350
CCGAGGCCGA	GGGCAAGCTG	GAGGCGCACT	ACTCCGACAT	GCTCGCCGCC
360	370	380	390	400
TTCGACAACC	CGCTCGACCA	CCTCGGCGTC	TCCCCTACT	ACAGCAACTA
410	420	430	440	450

## DE 699 20 439 T2 2005.12.29

CATCAACCTC	AGCAAGCTCG	AGTACGAGCT	CCTCGCGCGC	TACGTGCCCCG
460	470	480	490	500
GCGGCATCGC	CCCGGCCCGC	GTCGCCTTCA	TCGGCTCCGG	CCCGCTCCCCG
510	520	530	540	550
TTCAGCTCCT	ACGTCCCTCGC	CGCGCGCCAC	CTGCCCGACA	CCGTGTTCGA
560	570	580	590	600
CAACTACGTA	CCTGTGCGCG	CGGCCAACGA	CCGCGCGACC	AGGCTGTTCC
610	620	630	640	650
GCGCGGACAA	GGACGTGCGC	GCCCCGATGT	CGTTCCACAC	CGCCGACGTC
660	670	680	690	700
GCGGACCTCA	CCGACGAGCT	CGCTACGTAC	GACGTGCTCT	TCCTGGCCCG
710	720	730	740	750
GCTCGTGGGC	ATGGCCGCCG	AGGACAAGGG	CCAAGGTGAT	CCGCACCTTG
760	770	780	790	800
GCGCGCACAT	GGCGGACGGG	GCGGCCCTCG	TCCGCAGCGC	GCACGGGGCG
810	820	830	840	850
CGTGGGTTCC	TCTACCCGAT	CGTCGATCCC	CAAGACATTG	GTCGAGGCGG
860	870	880	890	900
GTTGAGGTG	CTCGCCGTGT	GTCACCCCGA	CGACGACGTG	GTGAACTCCG
910	920	930	940	950
TCATCATCGC	GCAGAAGTCT	AAGGACATGT	TTGCCAATGG	ACCTCGCAAC
960	970	980	990	1000
GGGTGTGGTG	GACGGTACGC	GCGAGGCACG	GTGCCGGTGG	TCAGCCCGCC
1010	1020	1030	1040	1050
CTGCAGGTTT	GGCGAGATGG	TGGCAGACGT	GACCCAGAAG	AGAGAGGAGT
1060	1070	1080	1090	1100
TTGCCAAGGC	GGAAGTGGCC	TTCTGATTGC	TGCGAGGTCA	CCATCCGTAT
1110	1120	1130	1140	1150
GCCGCTGCTA	CCTTTCAATA	TCTTGCAATC	GTAGGTGGCG	ATTTTCCTAC

DE 699 20 439 T2 2005.12.29

```

      1160      1170      1180      1190      1200
TCTTGTTACG ACCTTTCAAA TCATATGTTG TTTGTACCCA ATAATGTAAG
      1210      1220      1230      1240      1250
TGTGTTGCTT ACACGCGCAT GTCTTGTTACA CTCGGTCTCT AGAAGGCAGG
      1260      1270      1280      1290      1300
GCAGATCAAG AACTGTGCA AAGGAAAAGA AATGTGTGTT GTTGTAGGTG
      1310      1320      1330      1340      1350
TATGAGTTGG GAGTAAGATG ATTCTAGTTC AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA
      1360      1370      1380
AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA A

```

<210> 15

<211> 332

<212> PRT

<213> *Oryza sativa* L.

<400> 15

```

Met Glu Ala Gln Asn Gln Glu Val Ala Ala Leu Val Glu Lys Ile      15
Ala Gly Leu His Ala Ala Ile Ser Lys Leu Pro Ser Leu Ser Pro      30
Ser Ala Glu Val Asp Ala Leu Phe Thr Asp Leu Val Thr Ala Cys      45
Val Pro Ala Ser Pro Val Asp Val Ala Lys Leu Gly Pro Glu Ala      60
Gln Ala Met Arg Glu Glu Leu Ile Arg Leu Cys Ser Ala Ala Glu      75
Gly His Leu Glu Ala His Tyr Ala Asp Met Leu Ala Ala Phe Asp      90
Asn Pro Leu Asp His Leu Ala Arg Phe Pro Tyr Tyr Gly Asn Tyr     105
Val Asn Leu Ser Lys Leu Glu Tyr Asp Leu Leu Val Arg Tyr Val     120
Pro Gly Ile Ala Pro Thr Arg Val Ala Phe Val Gly Ser Gly Pro     135
Leu Pro Phe Ser Ser Leu Val Leu Ala Ala His His Leu Pro Asp     150

```

Ala Val Phe Asp Asn Tyr Asp Arg Cys Gly Ala Ala Asn Glu Arg 165  
 Ala Arg Arg Leu Phe Arg Gly Ala Asp Glu Gly Leu Gly Ala Arg 180  
 Met Ala Phe His Thr Ala Asp Val Ala Thr Leu Thr Gly Glu Leu 195  
 Gly Ala Tyr Asp Val Val Phe Leu Ala Ala Leu Val Gly Met Ala 210  
 Ala Glu Glu Lys Ala Gly Val Ile Ala His Leu Gly Ala His Met 225  
 Ala Asp Gly Ala Ala Leu Val Val Arg Thr Ala His Gly Ala Arg 240  
 Gly Phe Leu Tyr Pro Ile Val Asp Pro Glu Asp Val Arg Arg Gly 255  
 Gly Phe Asp Val Leu Ala Val Cys His Pro Glu Asp Glu Val Ile 270  
 Asn Ser Val Ile Val Ala Arg Lys Val Gly Ala Ala Ala Ala Ala 285  
 Ala Ala Ala Arg Arg Asp Glu Leu Ala Asp Ser Arg Gly Val Val 300  
 Leu Pro Val Val Gly Pro Pro Ser Thr Cys Cys Lys Val Glu Ala 315  
 Ser Ala Val Glu Lys Ala Glu Glu Phe Ala Ala Asn Lys Glu Leu 330  
 Ser Val\* 345

<210> 16

<211> 1372

<212> DNA

<213> *Oryza sativa* L.

<400> 16

10	20	30	40	50
CTCCATTTGG	TTGTCATTTT	CAACTATAAT	CCACCACAAC	TCGTGCAACA
60	70	80	90	100
TCAGCTCACT	CGTGTTCCCA	ACCGCGACAA	AGCTTCACAG	ATGGAGGCTC
110	120	130	140	150
AGAACCAAGA	GGTCGCTGCC	CTGGTCGAGA	AGATCGCCGG	CCTCCACGCC
160	170	180	190	200

## DE 699 20 439 T2 2005.12.29

GCCATCTCCA	AGCTGCCGTC	GCTGAGCCCA	TCCGCCGAGG	TGGACGCGCT
210	220	230	240	250
CTTCACCGAC	CTCGTCACGG	CGTGCGTCCC	GGCGAGCCCC	GTCGACGTGG
260	270	280	290	300
CCAAGCTCGG	CCCGGAGGCG	CAGGCGATGC	GGGAGGAGCT	CATCCGCCTC
310	320	330	340	350
TGCTCCGCCG	CCGAGGGCCA	CCTCGAGGCG	CACTACGCCG	ACATGCTCGC
360	370	380	390	400
CGCCTTCGAC	AACCCGCTCG	ACCACCTCGC	CCGCTTCCCC	TACTACGGCA
410	420	430	440	450
ACTACGTCAA	CCTGAGCAAG	CTGGAGTACG	ACCTCCTCGT	CCGCTACGTC
460	470	480	490	500
CCCGGCATTG	CCCCACCCCG	CGTCGCCTTC	GTCGGGTCGG	GCCCCGTGCC
510	520	530	540	550
G TTCAGCTCC	CTCGTGCTCG	CTGGGCACCA	CCTGCCGGAC	GCGGTGTTCG
560	570	580	590	600
ACA ACTACGA	CCGGTGCGGC	GCGGCCAACG	AGCGGGCCGAG	GAGGCTGTTC
610	620	630	640	650
CGCGGCGCCG	ACGAGGGCCT	CGGGCGCGCG	ATGGCGTTCC	ACACCGCCGA
660	670	680	690	700
CGTG GCGACC	CTGACGGGGG	AGCTCGGCGC	GTACGACGTC	GTGTTCTGG
710	720	730	740	750
CGGCGCTCGT	GGGCATGGCG	GCCGAGGAGA	AGGCCGGGGT	GATCGCGCAC
760	770	780	790	800
CTGGGCGCGC	ACATGGCGGA	CGGCGCGGCG	CTCGTCGTGC	GGACGGCGCA
810	820	830	840	850
CGGGGCGCGC	GGGTTCCCTGT	ACCCGATCGT	CGATCCCGAG	GACGTCAGGC
860	870	880	890	900
GTGGCGGGTT	CGACGTTCTG	GCGGTGTGCC	ACCCGGAGGA	CGAGGTGATC

## DE 699 20 439 T2 2005.12.29

910	920	930	940	950
AACTCCGTCA	TCGTCGCCCCG	CAAGGTCCGGT	GCCGCCGCCG	CCGCCGCCGC
960	970	980	990	1000
GGCGCGCAGA	GACGAGCTCG	CGGACTCGCG	CGGCGTGGTT	CTGCCGGTGG
1010	1020	1030	1040	1050
TCGGGCCGCC	GTCCACGTGC	TGCAAGGTGG	AGGCGAGCGC	GGTTGAGAAG
1060	1070	1080	1090	1100
GCAGAAGAGT	TTGCCGCCAA	CAAGGAGCTG	TCCGTCTAAC	AGCCGGACGA
1110	1120	1130	1140	1150
TCGAAAGGCG	CACTATATTA	TGGCAATAAA	TCATTTGATT	ATACTTATGC
1160	1170	1180	1190	1200
TGCATTTGCG	AAGCTAAGGT	ATACTATGCA	AGCCATATGT	TTGTGTTTCGT
1210	1220	1230	1240	1250
ACGTGTTGTT	TGGGACGTAC	AGTTGTGTTG	TTGTACGTCG	TGAAGTACTG
1260	1270	1280	1290	1300
AAGTGTTCAC	AGTAGATCAC	AAGTTCACAG	CAATCAATGA	GGACCCCTGTA
1310	1320	1330	1340	1350
AGCCAGTGTA	AACGAGGAAC	ATGCCATCTG	TGTATGACAG	TGAGAAATTA
1360	1370	1380		
TATAAGAAAA	ACATTTTGTG	AC		

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 320

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

&lt;400&gt; 17

Met Ala Cys Gln Asn Asn Leu Val Val Lys Gln Ile Ile Asp Leu

Tyr Asp Gln Ile Ser Lys Leu Lys Ser Leu Lys Pro Ser Lys Asn 30  
 Val Asp Thr Leu Phe Gly Gln Leu Val Ser Thr Cys Leu Pro Thr 45  
 Asp Thr Asn Ile Asp Val Thr Asn Met Cys Glu Glu Val Lys Asp 60  
 Met Arg Ala Asn Leu Ile Lys Leu Cys Gly Glu Ala Glu Gly Tyr 75  
 Leu Glu Gln His Phe Ser Thr Ile Leu Gly Ser Leu Gln Glu Asp 90  
 Gln Asn Pro Leu Asp His Leu His Ile Phe Pro Tyr Tyr Ser Asn 105  
 Tyr Leu Lys Leu Gly Lys Leu Glu Phe Asp Leu Leu Ser Gln His 120  
 Ser Ser His Val Pro Thr Lys Ile Ala Phe Val Gly Ser Gly Pro 135  
 Met Pro Leu Thr Ser Ile Val Leu Ala Lys Phe His Leu Pro Asn 150  
 Thr Thr Phe His Asn Phe Asp Ile Asp Ser His Ala Asn Thr Leu 165  
 Ala Ser Asn Leu Val Ser Arg Asp Pro Asp Leu Ser Lys Arg Met 180  
 Ile Phe His Thr Thr Asp Val Leu Asn Ala Thr Glu Ala Leu Asp 195  
 Gln Tyr Asp Val Val Phe Leu Ala Ala Leu Val Gly Met Asp Lys 210  
 Glu Ser Lys Val Lys Ala Ile Glu His Leu Glu Lys His Met Ala 225  
 Pro Gly Ala Val Leu Met Leu Arg Arg Ala His Ala Leu Arg Ala 240  
 Phe Leu Tyr Pro Ile Val Asp Ser Ser Asp Leu Lys Gly Phe Gln 255  
 Leu Leu Thr Ile Tyr His Pro Thr Asp Asp Val Val Asn Ser Val 270  
 Val Ile Ala Arg Lys Leu Gly Gly Pro Thr Thr Pro Gly Val Asn 285  
 Gly Thr Arg Gly Cys Met Phe Met Pro Cys Asn Cys Ser Lys Ile 300  
 His Ala Ile Met Asn Asn Arg Gly Lys Lys Asn Met Ile Glu Glu 315  
 Phe Ser Thr Ile Glu 320

<210> 18

<211> 963

<212> DNA

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 18

ATGGCTTGCC AAAACAATCT CGTTGTGAAG CAAATCATCG ACTTGTACGA CCAAATCTCA 60

DE 699 20 439 T2 2005.12.29

AAGCTCAAGA GCTTAAAACC TTCCAAAAT GTCGACACTT TGTTCGGACA ACTCGTGTCC	120
ACGTGCTTAC CCACGGATAC AAACATCGAT GTCACAAATA TGTGTGAAGA AGTCAAAGAC	180
ATGAGAGCTA ATCTCATCAA GCTTTGTGGT GAAGCCGAAG GTTATTTGGA GCAACACTTC	240
TCCACAATTT TGGGATCTTT ACAAGAAGAC CAAAACCCAC TTGACCATTT ACACATCTTT	300
CCTTACTACT CCAACTACCT CAAGCTAGGC AAGCTCGAGT TCGATCTCCT GAGCCAACAC	360
TCAAGCCATG TCCCCACCAA GATTGCCTTC GTGGGTTCCG GTCCGATGCC TCTCACATCC	420
ATCGTATTGG CCAAGTTTCA CCTCCCCAAC ACGACGTTCC ACAACTTTGA CATCGACTCA	480
CACGCAAACA CACTCGCTTC AAACCTCGTC TCTCGCGACC CGGACCTCTC AAAACGCATG	540
ATCTTCCACA CAACGGACGT ACTAAACGCA ACCGAAGCCC TTGACCAATA TGACGTCGTT	600
TTCTTAGCGG CGCTTGTAGG GATGGACAAA GAGTCAAAGG TCAAAGCCAT CGAGCACTTG	660
GAGAAACACA TGGCTCCTGG AGCTGTTCTT ATGCTAAGGA GGGCTCATGC TCTCAGAGCT	720
TTCTTATATC CAATCGTTGA CTCGTCTGAT CTCAAAGGCT TTCAACTCTT GACCATCTAT	780
CATCCAACCG ATGACGTGGT TAACTCGGTT GTGATCGCAC GTAAGCTCGG TGGTCCGACC	840
ACGCCCGGGG TTAATGGTAC TCGTGGATGC ATGTTTATGC CTTGTAAGTGT CTCCAAGATT	900
CACGCGATCA TGAACAACCG TGGTAAGAAG AATATGATCG AGGAGTTTAG TACCATCGAG	960
TAA	963

<210> 19

<211> 320

<212> PRT

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 19

Met Ala Cys Gln Asn Asn Leu Val Val Lys Gln Ile Met Asp Leu	15
Tyr Asn Gln Ile Ser Asn Leu Glu Ser Leu Lys Pro Ser Lys Asn	30
Val Asp Thr Leu Phe Arg Gln Leu Val Ser Thr Cys Leu Pro Thr	45
Asp Thr Asn Ile Asp Val Thr Glu Ile His Asp Glu Lys Val Lys	60
Asp Met Arg Ser His Leu Ile Lys Leu Cys Gly Glu Ala Glu Gly	75
Tyr Leu Glu Gln His Phe Ser Ala Ile Leu Gly Ser Phe Glu Asp	90

Asn Pro Leu Asn His Leu His Ile Phe Pro Tyr Tyr Asn Asn Tyr	105
Leu Lys Leu Gly Lys Leu Glu Phe Asp Leu Leu Ser Gln His Thr	120
Thr His Val Pro Thr Lys Val Ala Phe Ile Gly Ser Gly Pro Met	135
Pro Leu Thr Ser Ile Val Leu Ala Lys Phe His Leu Pro Asn Thr	150
Thr Phe His Asn Phe Asp Ile Asp Ser His Ala Asn Thr Leu Ala	165
Ser Asn Leu Val Ser Arg Asp Ser Asp Leu Ser Lys Arg Met Ile	180
Phe His Thr Thr Asp Val Leu Asn Ala Lys Glu Gly Leu Asp Gln	195
Tyr Asp Val Val Phe Leu Ala Ala Leu Val Gly Met Asp Lys Glu	210
Ser Lys Val Lys Ala Ile Glu His Leu Glu Lys His Met Ala Pro	225
Gly Ala Val Val Met Leu Arg Ser Ala His Gly Leu Arg Ala Phe	240
Leu Tyr Pro Ile Val Asp Ser Cys Asp Leu Lys Gly Phe Glu Val	255
Leu Thr Ile Tyr His Pro Ser Asp Asp Val Val Asn Ser Val Val	270
Ile Ala Arg Lys Leu Gly Gly Ser Asn Gly Ala Arg Gly Ser Gln	285
Ile Gly Arg Cys Val Val Met Pro Cys Asn Cys Ser Lys Val His	300
Ala Ile Leu Asn Asn Arg Gly Met Glu Lys Asn Leu Ile Glu Glu	315
Phe Ser Ala Ile Glu	320

<210> 20

<211> 963

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 20

ATGGCTTGCC AAAACAATCT CGTTGTGAAG CAAATCATGG ACTTATACAA CCAAATCTCA	60
AACCTCGAGA GCTTAAAACC ATCCAAGAAT GTCGACACTT TGTCAGACA ACTTGTGTCC	120
ACGTGCTTAC CAACGGACAC GAACATCGAT GTCACAGAGA TACACGATGA AAAAGTCAAA	180
GACATGAGAT CTCATCTCAT CAAGCTTTGT GGTGAAGCCG AAGGTTATTT AGAGCAACAC	240
TTTTCAGCAA TCTTAGGCTC TTTTGAAGAC AACCTCTAA ACCATTTACA CATCTTCCCC	300

TATTACAACA	ACTATCTCAA	ACTAGGCAAA	CTCGAATTCG	ATCTCCTTTC	TCAGCACACA	360
ACCCATGTCC	CGACCAAAGT	CGCCTTTATT	GGTCCGGTC	CGATGCCACT	TACTTCCATC	420
GTCTTGGCCA	AGTTCACCT	CCCCAACACA	ACGTTCCACA	ACTTCGACAT	CGACTCACAC	480
GCCAACACAC	TCGCTTCAA	CCTCGTTTCT	CGTGATTCTG	ACCTTTCCAA	ACGCATGATT	540
TTCCACACAA	CTGATGTATT	AAACGCTAAG	GAGGGGTTAG	ACCAATACGA	TGTTGTTTTC	600
TTGGCAGCTC	TTGTTGGGAT	GGATAAAGAG	TCAAAGGTCA	AAGCTATTGA	GCATTTAGAG	660
AAGCATATGG	CCCCTGGAGC	TGTGGTGATG	CTAAGAAGTG	CTCATGGTCT	TAGAGCTTTC	720
TTGTATCCAA	TCGTTGACTC	TTGTGATCTT	AAAGGGTTTG	AGGTGTAAAC	CATTTATCAT	780
CCGTCTGACG	ACGTGGTTAA	TTCGGTGGTC	ATCGCACGTA	AGCTTGGTGG	TTCAAATGGA	840
GCTCGAGGCA	GCCAGATCGG	ACGGTGTGTG	GTTATGCCTT	GTAATTGCTC	TAAGGTCCAC	900
GCGATCTTGA	ACAATCGTGG	TATGGAGAAG	AATTTGATCG	AGGAGTTTAG	TGCCATCGAG	960
TAA						963

<210> 21

<211> 320

<212> PRT

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 21

Met Gly Cys Gln Asp Glu Gln Leu Val Gln Thr Ile Cys Asp Leu	15
Tyr Glu Lys Ile Ser Lys Leu Glu Ser Leu Lys Pro Ser Glu Asp	30
Val Asn Ile Leu Phe Lys Gln Leu Val Ser Thr Cys Ile Pro Pro	45
Asn Pro Asn Ile Asp Val Thr Lys Met Cys Asp Arg Val Gln Glu	60
Ile Arg Leu Asn Leu Ile Lys Ile Cys Gly Leu Ala Glu Gly His	75
Leu Glu Asn His Phe Ser Ser Ile Leu Thr Ser Tyr Gln Asp Asn	90
Pro Leu His His Leu Asn Ile Phe Pro Tyr Tyr Asn Asn Tyr Leu	105
Lys Leu Gly Lys Leu Glu Phe Asp Leu Leu Glu Gln Asn Leu Asn	120
Gly Phe Val Pro Lys Ser Val Ala Phe Ile Gly Ser Gly Pro Leu	135
Pro Leu Thr Ser Ile Val Leu Ala Ser Phe His Leu Lys Asp Thr	150

Ile Phe His Asn Phe Asp Ile Asp Pro Ser Ala Asn Ser Leu Ala	165
Ser Leu Leu Val Ser Ser Asp Pro Asp Ile Ser Gln Arg Met Phe	180
Phe His Thr Val Asp Ile Met Asp Val Thr Glu Ser Leu Lys Ser	195
Phe Asp Val Val Phe Leu Ala Ala Leu Val Gly Met Asn Lys Glu	210
Glu Lys Val Lys Val Ile Glu His Leu Gln Lys His Met Ala Pro	225
Gly Ala Val Leu Met Leu Arg Ser Ala His Gly Pro Arg Ala Phe	240
Leu Tyr Pro Ile Val Glu Pro Cys Asp Leu Gln Gly Phe Glu Val	255
Leu Ser Ile Tyr His Pro Thr Asp Asp Val Ile Asn Ser Val Val	270
Ile Ser Lys Lys His Pro Val Val Ser Ile Gly Asn Val Gly Gly	285
Pro Asn Ser Cys Leu Leu Lys Pro Cys Asn Cys Ser Lys Thr His	300
Ala Lys Met Asn Lys Asn Met Met Ile Glu Glu Phe Gly Ala Arg	315
Glu Glu Gln Leu Ser	320

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 963

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

&lt;400&gt; 22

ATGGGTTGCC AAGACGAACA ATTGGTGCAA ACAATATGCG ATCTCTACGA AAAGATCTCA	60
AAGCTTGAGA GTCTAAAACC ATCCGAAGAT GTCAACATTC TCTTCAAGCA GCTCGTTTCC	120
ACATGCATAC CACCAAACCC TAACATCGAT GTCACCAAGA TGTGTGACAG AGTCCAAGAG	180
ATTGACTTA ATCTCATCAA GATTTGTGGT CTAGCCGAAG GTCACTTAGA AAACCATTTT	240
TCTTCGATCT TGACCTCTTA CCAAGACAAC CCACTTCATC ATTTAAACAT TTTCCCTTAT	300
TACAACAAC TTTGAAACT CGGAAAGCTC GAGTTCGACC TCCTCGAACA AAACCTAAAT	360
GGCTTTGTCC CAAAGAGTGT GGCTTTCATT GGATCTGGTC CTCTTCCTCT CACTTCCATC	420
GTTCTTGCTT CATTCCATCT CAAAGACACA ATCTTTCACA ACTTTGACAT CGACCCATCA	480
GCGAACTCAC TCGTTTCTCT TCTGGTTTCC TCTGATCCAG ACATCTCTCA ACGCATGTTC	540
TTCCACACCG TTGATATAAT GGACGTGACA GAGAGCTTAA AGAGCTTTGA TGTCGTGTTT	600

CTAGCTGCTC TTGTTGGAAT GAACAAAGAG GAGAAAGTTA AAGTGATCGA GCATCTGCAG	660
AAACACATGG CTCCTGGTGC TGTGCTCATG CTTAGGAGTG CTCATGGTCC GAGAGCGTTT	720
CTTTATCCGA TCGTTGAGCC GTGTGATCTT CAGGGGTTTC AGGTTTTGTC TATTTATCAC	780
CCAACAGATG ATGTTATCAA CTCCGTGGTG ATCTCTAAAA AGCATCCAGT TGTTTCAATT	840
GGGAATGTTG GTGGTCCTAA TTCATGCTTG CTCAAGCCTT GCAACTGTTC CAAGACCCAC	900
GCGAAAATGA ACAAGAACAT GATGATCGAG GAGTTCGGAG CTAGGGAGGA ACAGTTGTCT	960
TAA	963

### Patentansprüche

1. Isoliertes Enzym, das eine Nicotianaminsynthase-Aktivität zeigt, umfassend eine Aminosäuresequenz, gewählt aus:

- (a) SEQ ID NR.1, oder
- (b) eine Sequenz, die homolog zu SEQ ID NR.1 ist.

2. Enzym nach Anspruch 1, wobei das Enzym von Gerste stammt.

3. Enzym nach Anspruch 2, wobei das Enzym die Aminosäuresequenz von SEQ ID NR. 1 aufweist.

4. Enzym nach Anspruch 2, wobei das Enzym die Aminosäuresequenz von SEQ ID NR. 3 aufweist.

5. Enzym nach Anspruch 2, wobei das Enzym die Aminosäuresequenz von SEQ ID NR. 5 aufweist.

6. Enzym nach Anspruch 2, wobei das Enzym die Aminosäuresequenz von SEQ ID NR. 7 aufweist.

7. Enzym nach Anspruch 2, wobei das Enzym die Aminosäuresequenz von SEQ ID NR. 9 aufweist.

8. Enzym nach Anspruch 2, wobei das Enzym die Aminosäuresequenz von SEQ ID NR. 11 aufweist.

9. Enzym nach Anspruch 2, wobei das Enzym die Aminosäuresequenz von SEQ ID NR. 13 aufweist.

10. Enzym nach Anspruch 1, wobei das Enzym von Oryza sativa-Reis stammt.

11. Enzym nach Anspruch 10, wobei das Enzym die Aminosäuresequenz von SEQ ID NR. 15 aufweist.

12. Enzym nach Anspruch 1, wobei das Enzym von Arabidopsis (Ackerschmalwand) stammt.

13. Enzym nach Anspruch 12, wobei das Enzym die Aminosäuresequenz von SEQ ID NR. 17 aufweist.

14. Enzym nach Anspruch 12, wobei das Enzym die Aminosäuresequenz von SEQ ID NR. 19 aufweist.

15. Enzym nach Anspruch 12, wobei das Enzym die Aminosäuresequenz von SEQ ID NR. 21 aufweist.

16. Gen, das für die Aminosäuresequenz des Enzyms nach einem der Ansprüche 1 bis 15 kodiert.

17. Nukleinsäure, die für ein Enzym kodiert, welches eine Nicotianaminsynthase-Aktivität zeigt, wobei die Nukleinsäure eine Sequenz umfasst, gewählt aus:

- (A) SEQ ID NR. 2
- (B) Sequenz, die homolog zu SEQ ID NR. 2 ist.

18. Nukleinsäure nach Anspruch 17, wobei die Nukleinsäure von Gerste stammt.

19. Nukleinsäure nach Anspruch 18, wobei die Nukleinsäure die Basensequenz von SEQ ID NR. 2 aufweist.

20. Nukleinsäure nach Anspruch 18, wobei die Nukleinsäure die Basensequenz von SEQ ID NR. 4 aufweist.
21. Nukleinsäure nach Anspruch 18, wobei die Nukleinsäure die Basensequenz von SEQ ID NR. 6 aufweist.
22. Nukleinsäure nach Anspruch 18, wobei die Nukleinsäure die Basensequenz von SEQ ID NR. 8 aufweist.
23. Nukleinsäure nach Anspruch 18, wobei die Nukleinsäure die Basensequenz von SEQ ID NR. 10 aufweist.
24. Nukleinsäure nach Anspruch 18, wobei die Nukleinsäure die Basensequenz von SEQ ID NR. 12 aufweist.
25. Nukleinsäure nach Anspruch 18, wobei die Nukleinsäure die Basensequenz von SEQ ID NR. 14 aufweist.
26. Nukleinsäure nach Anspruch 17, wobei die Nukleinsäure von *Oryza sativa*-Reis stammt.
27. Nukleinsäure nach Anspruch 26, wobei die Nukleinsäure die Basensequenz von SEQ ID NR. 16 aufweist.
28. Nukleinsäure nach Anspruch 17, wobei die Nukleinsäure von *Arabidopsis* stammt.
29. Nukleinsäure nach Anspruch 28, wobei die Nukleinsäure die Basensequenz von SEQ ID NR. 18 aufweist.
30. Nukleinsäure nach Anspruch 28, wobei die Nukleinsäure die Basensequenz von SEQ ID NR. 20 aufweist.
31. Nukleinsäure nach Anspruch 28, wobei die Nukleinsäure die Basensequenz von SEQ ID NR. 22 aufweist.
32. Nukleinsäure nach Ansprüchen 17 bis 31, wobei die Nukleinsäure DNA ist.
33. Vektor, welcher eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 17 bis 32 umfasst.
34. Vektor nach Anspruch 33, wobei der Vektor ein Expressionsvektor ist.
35. Nicht-humaner Transformand, transformiert durch den Vektor nach Anspruch 33 oder 34.
36. Transformand nach Anspruch 35, welcher ein Fremdgen umfasst, das ein Gen mit der Basensequenz von SEQ ID NR. 2 ist.
37. Transformand nach Anspruch 35, welcher ein Fremdgen umfasst, das ein Gen mit der Basensequenz von SEQ ID NR. 4 ist.
38. Transformand nach Anspruch 35, welcher ein Fremdgen umfasst, das ein Gen mit der Basensequenz von SEQ ID NR. 6 ist.
39. Transformand nach Anspruch 35, welcher ein Fremdgen umfasst, das ein Gen mit der Basensequenz von SEQ ID NR. 8 ist.
40. Transformand nach Anspruch 35, welcher ein Fremdgen umfasst, das ein Gen mit der Basensequenz von SEQ ID NR. 10 ist.
41. Transformand nach Anspruch 35, welcher ein Fremdgen umfasst, das ein Gen mit der Basensequenz von SEQ ID NR. 12 ist.

42. Transformand nach Anspruch 35, welcher ein Fremdgen umfasst, das ein Gen mit der Basensequenz von SEQ ID NR. 14 ist.
43. Transformand nach Anspruch 35, welcher ein Fremdgen umfasst, das ein Gen mit der Basensequenz von SEQ ID NR. 16 ist.
44. Transformand nach Anspruch 35, welcher ein Fremdgen umfasst, das ein Gen mit der Basensequenz von SEQ ID NR. 18 ist.
45. Transformand nach Anspruch 35, welcher ein Fremdgen umfasst, das ein Gen mit der Basensequenz von SEQ ID NR. 20 ist.
46. Transformand nach Anspruch 35, welcher ein Fremdgen umfasst, das ein Gen mit der Basensequenz von SEQ ID NR. 22 ist.
47. Transformand nach einem der Ansprüche 35 bis 46, wobei der Wirt eine Bakterie ist.
48. Verfahren zur Herstellung von Nicotianamin, welches die Verwendung des Transformanden nach einem der Ansprüche 35 bis 47 umfasst.
49. Antikörper gegen ein Enzym nach einem der Ansprüche 1 bis 15.
50. Antikörper nach Anspruch 49, wobei der Antikörper polyklonaler Antikörper ist.
51. Antikörper nach Anspruch 49, wobei der Antikörper monoklonaler Antikörper ist.
52. Verfahren zur Reinigung von Nicotianaminsynthase, welches umfasst:  
die Verwendung von Thiolprotease-Hemmer, die Verwendung von CHAPS-Puffer, die Verwendung der Ionenaustausch-Chromatographieträger DEAE-Sepharose FF<sup>®</sup> oder DEAE-Sephacel<sup>®</sup>, die Verwendung des hydrophoben Chromatographieträgers TSK-Gel Butyl-Toyopearl<sup>®</sup> und die Verwendung des hydrophoben Chromatographieträgers TSK-Gel Ether Toyopearl<sup>®</sup>.
53. Verfahren nach Anspruch 52, wobei der Thiolprotease-Hemmer E-64 ist.

Es folgen 18 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Fig. 1

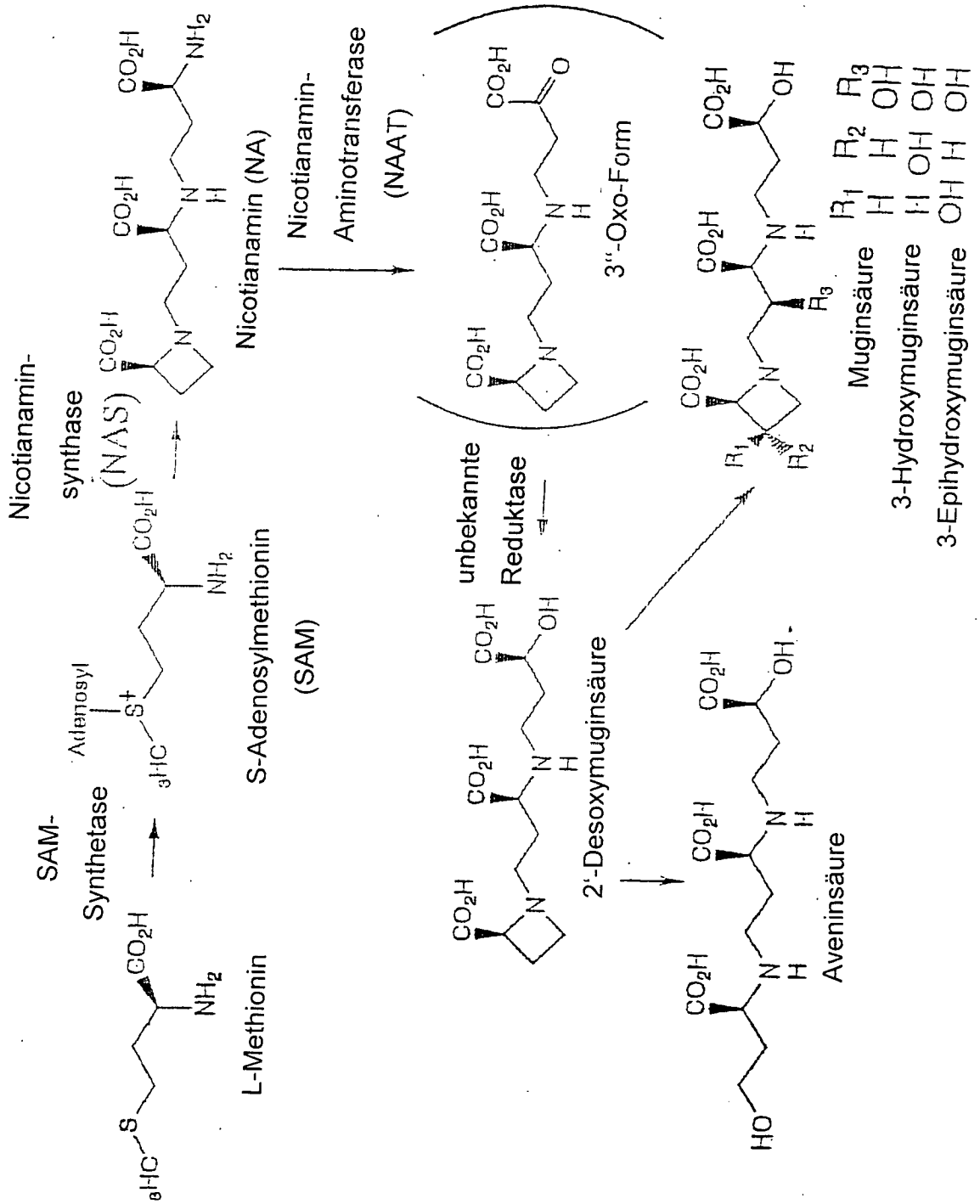


Fig. 2

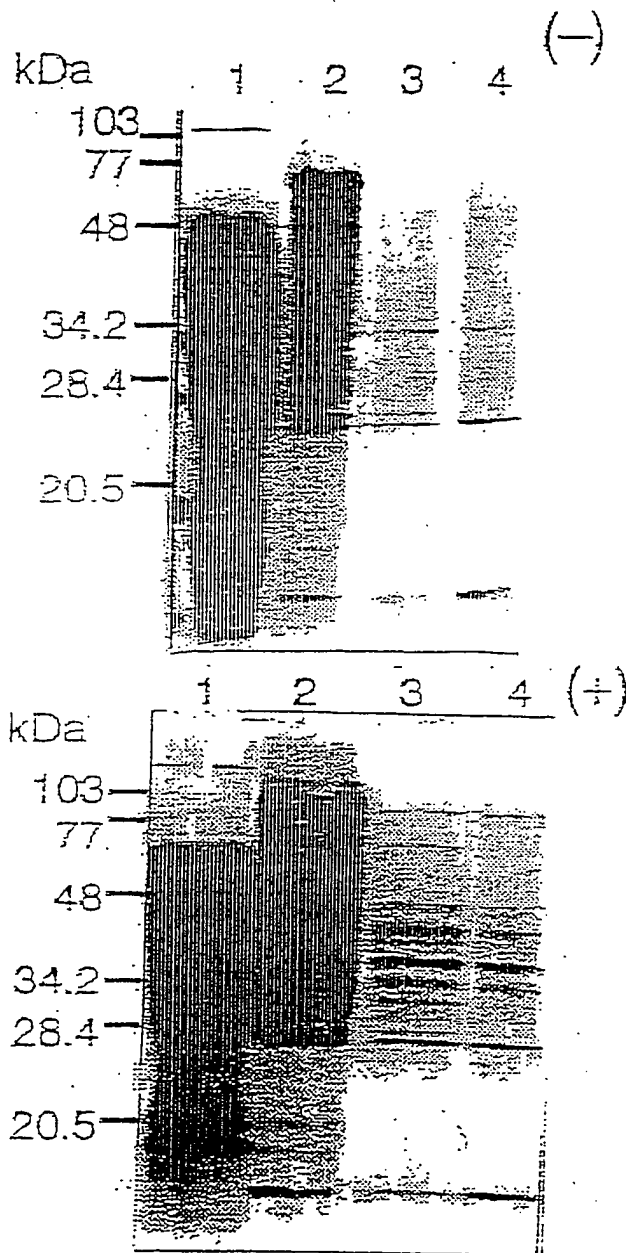


Fig. 3

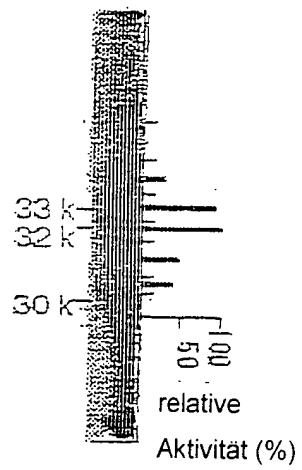


Fig. 4

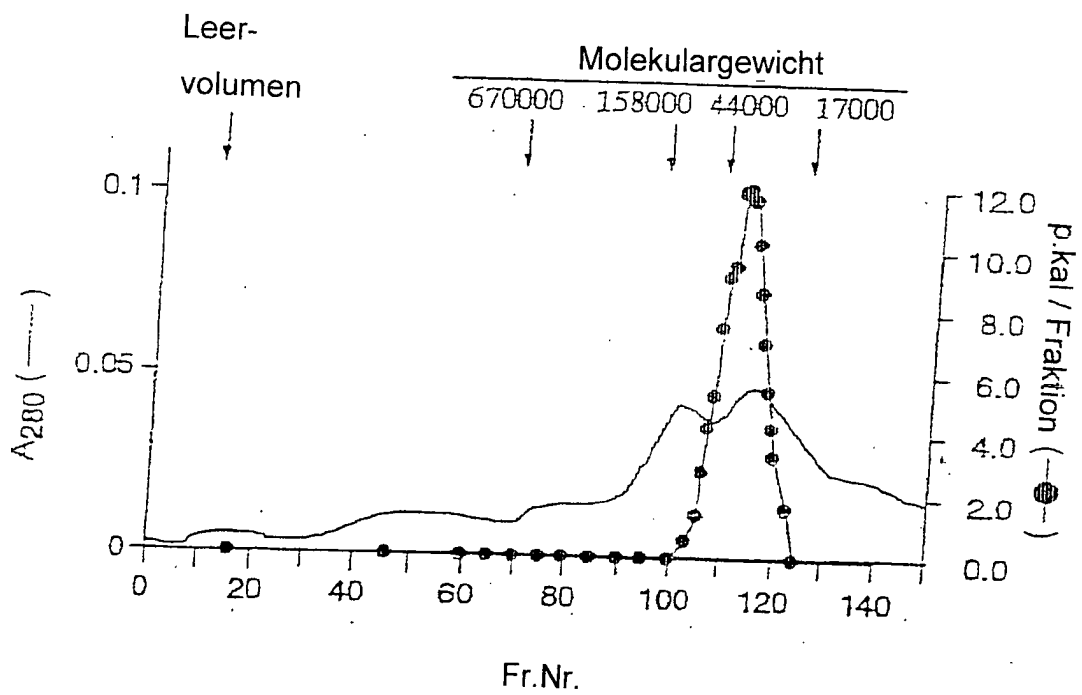




Fig. 6

GCG TTC AGA GGC TTC CAG AGT TCT TCC GGT CAC CAA GAA GCA TTT GAT CAT AAC 54  
 19 ATG GAT GCC CAG AAC AAG GAG GTC GCT GCT CTG ATC GAG AAG ATC GCC GGT ATC 108  
 M D A Q N K E V A A L I E K I A G I  
 37 CAG GCC GCC ATC GCC GAG CTG CCG TCG CTG AGC CCG TCC CCC GAG GTC GAC AGG 162  
 Q A A I A E L P S L S P S P E V D R  
 55 CTC TTC ACC GAC CTC GTC ACG GCC TGC GTC CCG CCG AGC CCC GTC GAC GTG ACG 216  
 L F T D L V T A C V P P S P V D V T  
 73 AAG CTC AGC CCG GAG CAC CAG AAG ATG CCG GAG GCT CTC ATC CGC TTG TGC TCC 270  
 K L S P E H Q R M R E A L I R L C S  
 91 GCC GCC GAG GGG AAG CTC GAG GCG CAC TAC GCC GAC CTG CTC GCC ACC TTC GAC 324  
 A A E G K L E A H Y A D L L A T F D  
 109 AAC CCG CTC GAC CAC CTC GGC CTC TTC CCG TAC TAC AGC AAC TAC GTC AAC CTC 378  
 N P L D H L G L F P Y Y S N Y V N L  
 127 AGC AGG CTG GAG TAC GAG CTC CTG GCG CGC CAC GTG CCG GGC ATC GCG CCG GCG 432  
 S R L E Y E L L A R H V P G I A P A  
 145 CCG GTC GCC TTC GTC GGC TCC GGC CCG CTG CCG TTC AGC TCG CTC GTC CTC GCC 486  
 R V A F V G S G P L P F S S L V L A  
 163 GCG CAC CAC CTG CCC GAG ACC CAG TTC GAC AAC TAC GAC CTG TGC GGC GCG GCC 540  
 A H H L P E T Q F D N Y D L C G A A  
 181 AAC GAG CGC GCC AAG AAG CTG TTC GGC GCG ACG GCG GAC GGC GTC GGC GCG CGT 594  
 N E R A R K L F G A T A D G V G A R  
 199 ATG TCG TTC CAC ACG GCG GAC GTC GCC GAC CTC ACC CAG GAG CTC GGC GCC TAC 648  
 M S F H T A D V A D L T Q E L G A Y  
 217 GAC GTG GTC TTC CTC GCC GCG CTC GTC GGC ATG GCA GCC GAG GAG AAG GCC AAG 702  
 D V V F L A A L V G M A A E E K A K  
 235 GTG ATT GCC CAC CTG GGC GCG CAC ATG GTG GAG GGG GCG TCC CTG GTC GTG CCG 756  
 V I A H L G A H M V E G A S L V V R  
 253 AGC GCA CCG CCC CGC GGC TTT CTT TAC CCC ATT GTC GAC CCG GAG GAC ATC AAG 810  
 S A R P R G F L Y P I V D P E D I R  
 271 CCG GGT GGG TTC GAG GTG CTG GCC GTG CAC CAC CCG GAA GGT GAG GTG ATC AAC 864  
 R G G F E V L A V H H P E G E V I N  
 289 TCT GTC ATC GTC GCC CGT AAG GCC GTC GAA GCG CAG CTC AGT GGG CCG CAG AAC 918  
 S V I V A R K A V E A Q L S G P Q N  
 307 GGA GAC GCG CAC GCA CCG GGC GCG GTG CCG TTG GTC AGC CCG CCA TGC AAC TTC 972  
 G D A H A R G A V P L V S P P C N F  
 325 TCC ACC AAG ATG GAG GCG AGC GCG CTT GAG AAG AGC GAG GAG CTG ACC GCC AAA 1026  
 S T K M E A S A L E K S E E L T A K  
 1080 GAG CTG GCC TTT TGA TTG AAG AGT GCG CGT GGT CAT TCT GTC GCC TGC GAT CGT  
 E L A F \*  
 1134 GGT AAC TTT CCT ACT CGT GTG TGT TTT GAT GTT TGT GCC TGT AAG AGT TAT GCT  
 1188 TCC GGC CTT GTG CTG TTA ATT TAC ACG CGT TAC ATG TAG TAC TTG TAT TTA TAC  
 1242 CTG GAA TAA CCG TAT GTA ACA TAA ATA TTA GTG GGA TTT GAA GTG TAA TGC TAA  
 ATA ATA AGA AAA CTT GAT GCA GAC ATT CAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AA

Fig. 7

```

HvNAS4 MDGQSE - - EVDALVQKITGLHAAIAKLPSPSPDVALFTDLVTACVPPSPVDVTKLAP
HvNAS7 MDAQSK - - EVDALVQKITGLHAAIAKLPSPSPDVALFTDLVTACVPPSPVDVTKLAP
HvNAS6 MDAQNK - - EVDALVQKITGLHAAIAKLPSPSPDVALFTDLVTACVPPSPVDVTKLGS
HvNAS2 MAAQNN - QEVDALVEKITGLHAAIAKLPSPSPDVALFTELVTACVPPSPVDVTKLGP
HvNAS3 MAAQNNKDVAAALVEKITGLHAAIAKLPSPSPDVALFTELVTACVPPSPVDVTKLGP
HvNAS1 MDAQNK - - EVAALIEKIAGIQAAIAELPSPSPVDRLFTDLVTACVPPSPVDVTKLSP
HvNAS5 MEAENG - - EVAALVEKITGLHAAISKLPALSPSPQVDALFTELVAACVPPSPVDVTKLGP
*      * ** ** * *** ** ***** ** *** ** **** *****

HvNAS4 EAQAMREGLIRLCSEAEGKLEAHYSMLAAFDNPLDHLGVFPYYSNYINLSKLEYELLAR
HvNAS7 EAQAMREGLIRLCSEAEGKLEAHYSMLAAFDNPLDHLGVFPYYSNYINLSKLEYELLAR
HvNAS6 EAQEMREGLIRLCSEAEGKLEAHYSMLAAFDNPLDHLGMFPYYSNYINLSKLEYELLAR
HvNAS2 EAQEMREGLIRLCSEAEGKLEAHYSMLAAFDKPLDHLGMFPYYSNYINLSKLEYELLAR
HvNAS3 EAQEMREGLIRLCSEAEGKLEAHYSMLAAFDNPLDHLGIFPYYSNYINLSKLEYELLAR
HvNAS1 EHQRMRREALIRLCSAAEGKLEAHYADLLATFDNPLDHLGLFPYYSNYVNLRLLEYELLAR
HvNAS5 EAQEMRQDLIRLCSAAEGLEAHYSMLTALDSPLDHLGRFPYFDNYVNLKLEHDLLAG
* * ** ***** ** ***** * * * ***** *** ** *** ** ***

HvNAS4 YVPGRHRPARVAFIGSGPLPFSSYVLAARHLPDPTVFDNYDLCGAANDRATRLFRADKD - V
HvNAS7 YVPGGIAPARVAFIGSGPLPFSSYVLAARHLPDPTVFDNYVPVRAANDRATRLFRADKD - V
HvNAS6 YVPGGIARPARVAFIGSGPLPFSSYVLAARHLPDAMFDNYDLCSAANDRASKLFRADKD - V
HvNAS2 YVPGGYRPARVAFIGSGPLPFSSVLAARHLPDPTMFDNYDLCGAANDRASKLFRADRD - V
HvNAS3 YVRR - HRPARVAFIGSGPLPFSSVLAARHLPDPTMFDNYDLCGAANDRASKLFRADTD - V
HvNAS1 HVPG - IAPARVAFVSGPLPFSSVLAHHLPETQFDNYDLCGAANERARKLFGATADGV
HvNAS5 HVAA - - PARVAFIGSGPLPFSSLFLATYHLPDTRFDNYDRCSVANGRAMKLVGAADEGV
*      *** ***** ** *** **** ** ** * * *

HvNAS4 GARMSFHTADVADLTDELATYDVVFLAALVGMAAEDKAKVIAHLGAHMADGAALV - - ARH
HvNAS7 GARMSFHTADVADLTDELATYDVVFLAALVGMAAEDKGGDPHLAGHMADGAALVR - SAH
HvNAS6 GARMSFHTADVADLTRELAAYDVVFLAALVGMAAEDKAKVIPHLAGHMADGAALVV - RSA
HvNAS2 GARMSFHTADVADLAGELAKYDVVFLAALVGMAAEDKAKVIAHLGAHMADGAALVVRSAH
HvNAS3 GARMSFHTADVADLASELAKYDVVFLAALVGMAAEDKAKVIAHLGAHMADGAALVVRSAH
HvNAS1 GARMSFHTADVADLTQELGAYDVVFLAALVGMAAEEKAKVIAHLGAHMVEGASLVV - RSA
HvNAS5 RSRMAFHTAEVDTLTAELGAYDVVFLAALVGMTSKEKADIAHLGKHMADGAVLVREALH
** **** * ** ** ********** * **** ** ** **

HvNAS4 GARGFLYPIVDPQDIGRGGFEVLAVCHPD - DDVNSVIIAQKSNVHEYGLSGR - - GGR
HvNAS7 GARGFLYPIVDPQDIGRGGFEVLAVCHPD - DDVNSVIIAQKSKDMFANGPRNGC - - GGR
HvNAS6 QARGFLYPIVDPQDIGRGGFEVLAVCHPD - DDVNSVIIAHKSKDVHANERPNGR - - GGQ
HvNAS2 GARGFLYPIVDPQDIGRGGFEVLAVCHPD - DDVNSVIIAQKSKDVHADGLSGRGGAGGQ
HvNAS3 GARGFLYPIVDPQDIGRGGFEVLAVCHPD - DDVNSVIIAQKSKDVHADGLSGRGGAGRQ
HvNAS1 RPRGFLYPIVDPEDIRGGFEVLAVHHP - GEVINSVIVARKAVEAQLSGPQNGD - - - - A
HvNAS5 GARAFLYPVVELDDVGRGGFQVLAVHHPAGDEVFNSFIVARKVKMSA - - - - - - - - - -
* **** * * **** **** ** * ** * * *

HvNAS4 YARGTVPVVSPPCRF - EMVADVTD - - KREEFANAEVAF
HvNAS7 YARG - TVPVVSPPCRF - EMVADVTD - - KREEFAEAFAF
HvNAS6 YRGA - - VPVVSPPCRF - EMVADVTH - - KREEFTNAEVAF
HvNAS2 YARG - TVPVVSPPCRF - EMVADVTONHKRDEFANAFAF
HvNAS3 YARG - TVPVVSPPCRF - EMVADVTONHKRDEFANAFAF
HvNAS1 HARG - AVPLVSPPCNFSTKMEASALE - - KSEELTAKELAF
** ***** * * * * * * *
    
```

Fig. 8

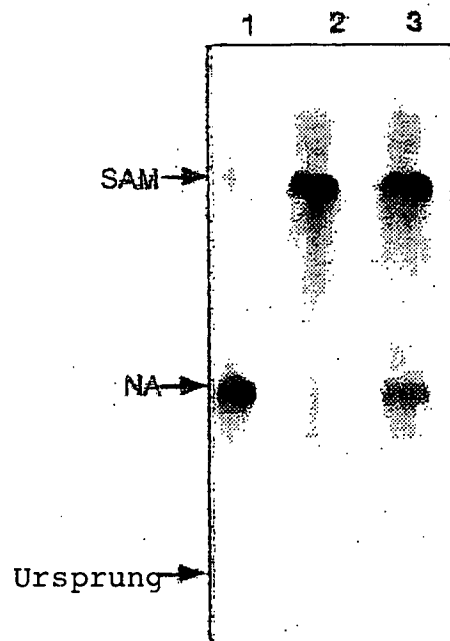


Fig. 9

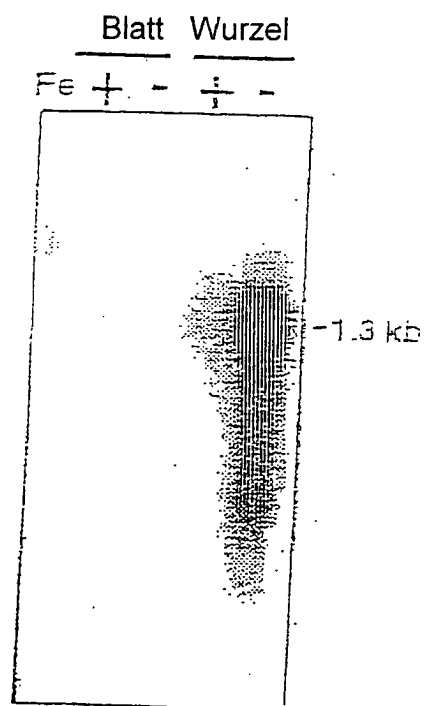


Fig. 10

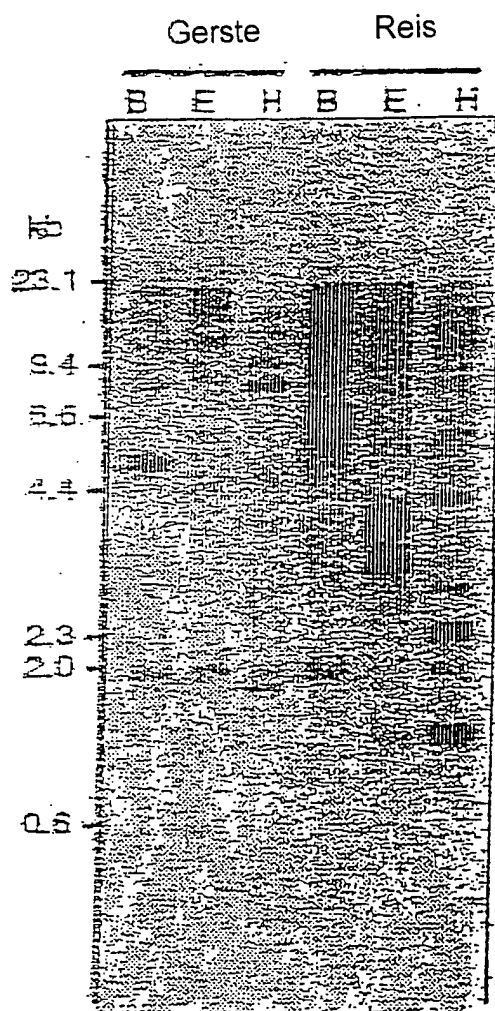


Fig. 11

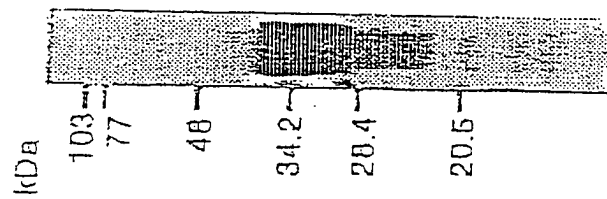


Fig. 12

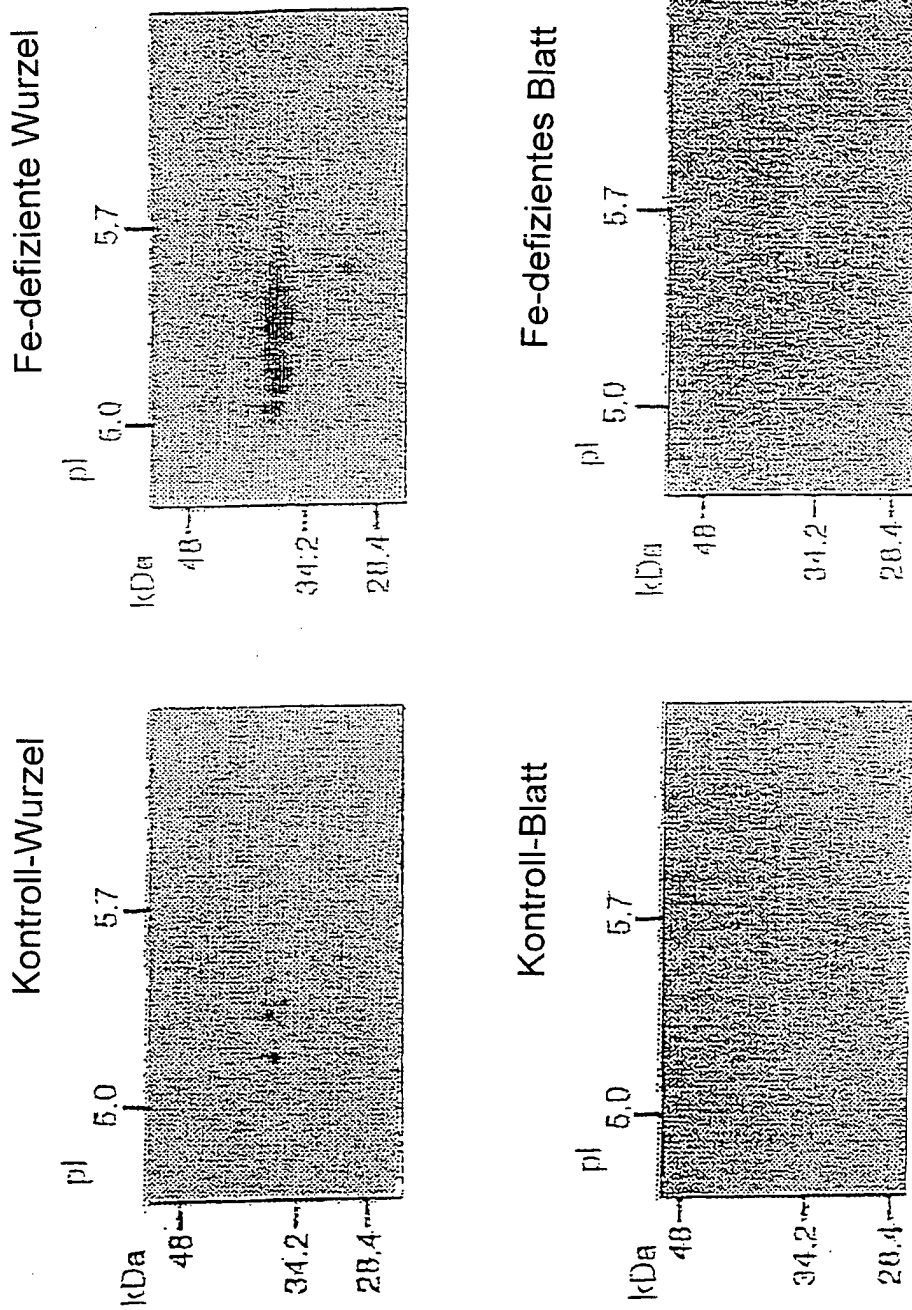


Fig. 13

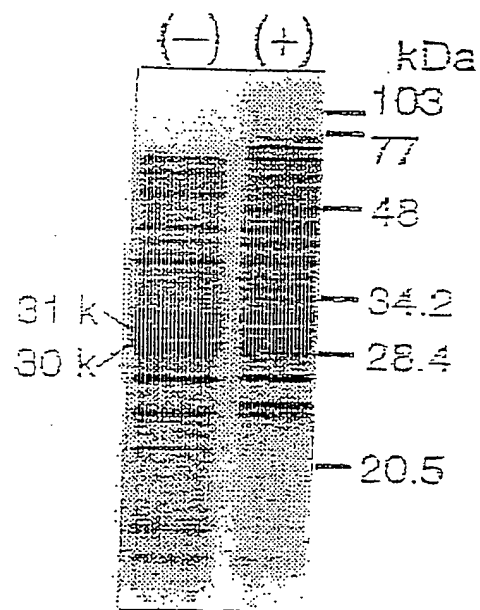


Fig. 14

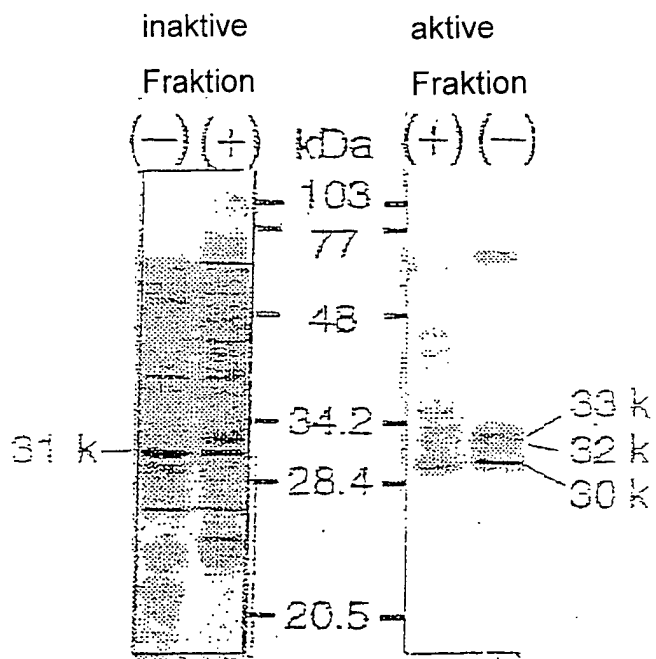


Fig. 15

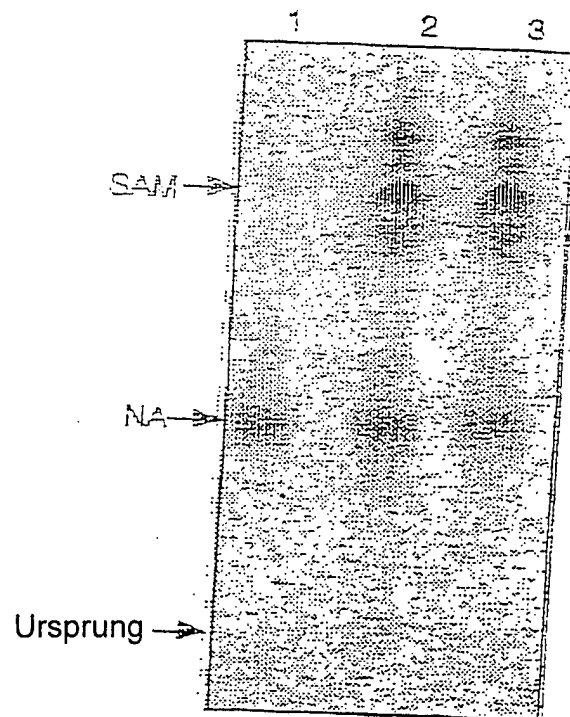


Fig. 16

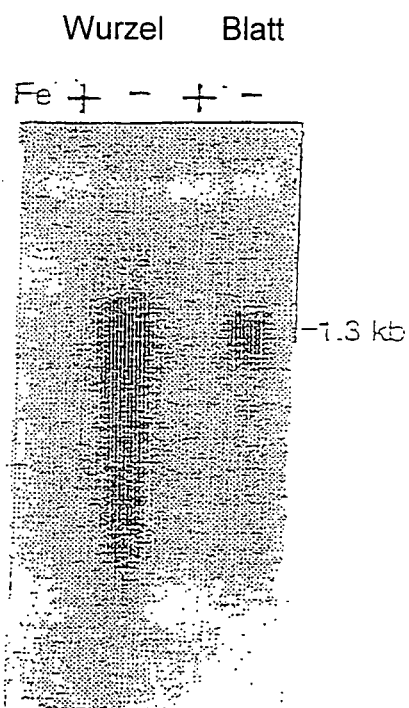


Fig. 17

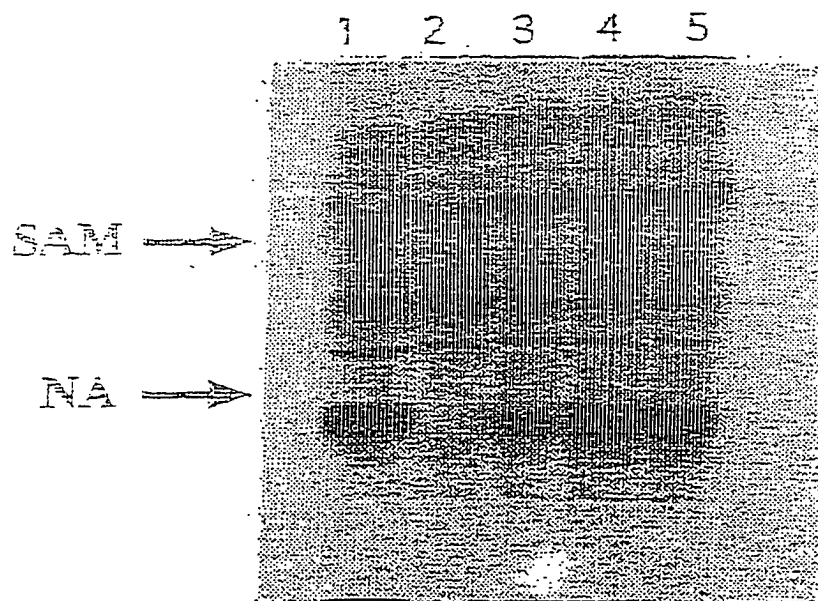


Fig. 18

