(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2004-121122
(P2004-121122A)
(43)公開日　平成16年4月22日(2004.4.22)

(51)Int.Cl.[7]	F I		テーマコード（参考）
C12N 15/09	C12N 15/00	ZNAA	4B024
A01N 65/00	A01N 65/00	Z	4H011
C07K 14/415	C07K 14/415		4H045

審査請求 未請求　請求項の数 9　OL　（全 35 頁）

(21)出願番号　特願2002-291321(P2002-291321)
(22)出願日　平成14年10月3日(2002.10.3)

特許法第３０条第１項適用申請有り

(71)出願人　503360115
独立行政法人　科学技術振興機構
埼玉県川口市本町４丁目１番８号
(72)発明者　町田　千代子
愛知県名古屋市千種区北千種一丁目９－３　ＲＪ－１０３
(72)発明者　岩川　秀和
大阪府枚方市山之上二丁目１５番２２号
(72)発明者　町田　泰則
愛知県名古屋市千種区北千種一丁目９－３　ＲＪ－１０３
(72)発明者　岡田　清孝
京都府京都市伏見区深草南明町５－４７

Ｆターム(参考)　4B024 AA07 AA08 BA80 CA04 DA01 EA01 EA04 GA11 GA17 HA12

最終頁に続く

(54)【発明の名称】植物の葉形成関連タンパク質ＡＳ２、及びそれをコードする遺伝子

(57)【要約】
【課題】本発明は、植物における対称性で平坦な葉の発生、及び葉の葉脈を確立させるための手法を、詳細にはそのための遺伝子を確立することを目的としている。
【解決手段】本発明は、植物細胞の核における特定の遺伝子の転写、対称性で平坦な葉身の発生、及び葉の葉脈の確立を制御している植物の葉形成関連タンパク質ＡＳ２、より詳細には、システインに富むＣ‐モチーフからなるシステイン反復配列及びロイシンジッパー様モチーフを有することを特徴とする植物の葉形成関連タンパク質ＡＳ２、それをコードするＤＮＡ、及びそれを用いた植物の葉の形成を制御するための組成物に関する。
【選択図】　なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
植物の葉形成関連タンパク質ＡＳ２。
【請求項２】
植物細胞の核における特定の遺伝子の転写、対称性で平坦な葉身の発生、及び葉の葉脈の確立を制御している請求項１に記載の植物の葉形成関連タンパク質ＡＳ２。
【請求項３】
システインに富むＣ‐モチーフからなるシステイン反復配列及びロイシンジッパー様モチーフを有することを特徴とする請求項１又は２に記載の植物の葉形成関連タンパク質ＡＳ２。
【請求項４】
植物の葉形成関連タンパク質ＡＳ２が、配列表の配列番号２に記載のアミノ酸配列、又は当該アミノ酸配列中のアミノ酸が置換、挿入、若しくは欠失してもよいアミノ酸配列からなる植物の葉の形成に関連する請求項１～３のいずれかに記載のタンパク質ＡＳ２。
【請求項５】
請求項１～４のいずれかに記載の植物の葉形成関連タンパク質ＡＳ２をコードするＤＮＡ。
【請求項６】
ＤＮＡが、配列表の配列番号１に記載の塩基配列、又は当該塩基配列にストリージェントな条件下でハイブリダイズし得る塩基配列を有するものである請求項５に記載のＤＮＡ。
【請求項７】
請求項１～４に記載のタンパク質ＡＳ２を含有してなる植物の葉の形成を制御するための組成物。
【請求項８】
請求項５又は６に記載のＤＮＡからなる植物の葉の形成を制御するための遺伝子。
【請求項９】
請求項５又は６に記載ＤＮＡを含有してなるベクター。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
【発明の属する技術分野】
本発明は、植物の葉形成関連タンパク質ＡＳ２、詳細には、植物細胞の核における特定の遺伝子の転写、対称性で平坦な葉身の発生、及び葉の葉脈の確立を制御している植物の葉形成関連タンパク質ＡＳ２、より詳細には、システインに富むＣ‐モチーフからなるシステイン反復配列及びロイシンジッパー様モチーフを有することを特徴とする植物の葉形成関連タンパク質ＡＳ２に関する。より具体的には、植物の葉形成関連タンパク質ＡＳ２が、配列表の配列番号２に記載のアミノ酸配列、又は当該アミノ酸配列中のアミノ酸が置換、挿入、若しくは欠失してもよいアミノ酸配列からなる植物の葉の形成に関連するタンパク質ＡＳ２に関する。
また、本発明は、植物の葉形成関連タンパク質ＡＳ２をコードするＤＮＡ、植物の葉形成関連タンパク質ＡＳ２を用いた植物の葉の形成を制御するための組成物、植物の葉形成関連タンパク質ＡＳ２をコードするＤＮＡからなる植物の葉の形成を制御するための遺伝子、及びそれを含有してなるベクターに関する。
【０００２】
【従来の技術】
相対的に平坦な組織である被子植物の葉は、その形状及び複雑さという点で広範囲な多様性を持っているが、その基本構造は、一般に、近位－遠位、内側－外側、及び向軸性－背軸性という３つの軸に基づいて説明することができる（非特許文献１～４参照）。従って、植物は、葉の発生において、３つの軸の確立に関与する一般的なメカニズムを利用していると考えられる。
葉は茎頂のメリステム（ＳＡＭ）から外側器官として発生する。３つの軸のそれぞれに沿

った形状の発達、向軸性－背軸性のアイデンティティ及び葉の全体的な形状に関連する葉の形態の変化と共に種々の突然変異体が単離されてきた。

【０００３】

突然変異の表現型に関与する遺伝子の一部はクローニングされ、性状分析されている（非特許文献５～１２参照）。ｍｙｂ様遺伝子（ＰＨＡＮ）及びホメオボックスを含む転写因子（ＰＨＢとＰＨＶ）をコードしていると思われるキンギョソウのＰＨＡＮＴＡＳＴＩＣＡ（ＰＨＡＮ）、シロイヌナズナのＰＨＡＢＵＬＯＳＡ（ＰＨＢ）、及びシロイヌナズナのＰＨＡＶＯＬＵＴＡ（ＰＨＶ）は、向軸性細胞の運命に関与している。さらに、ＦＩＬＡＭＥＮＴＯＵＳ　ＦＬＯＷＥＲ（ＦＩＬ）、ＹＡＢＢＹ３（ＹＡＢ３）、ＣＲＡＢＳ　ＣＬＡＷ（ＣＲＣ）、及びＫＡＮＡＤＩ（ＫＡＮ）などが挙げられ、これらは葉身における背軸性細胞の運命の仕様に関与している。このような遺伝子における突然変異によって、平坦に広がる葉が、糸状で竿型の構造に変異する。これは、向軸性－背軸性のアイデンティティも歪められているためであり、従って、葉身の側方への発生は、向軸性－背軸性のアイデンティティの遺伝子による決定と一緒になっている可能性があると考えられている。

内側－外側の軸に沿った葉の形状に関しては、多数の植物の葉は一般に、軸としての葉軸に対して明瞭であり、およその左右対称性を示す（非特許文献１３～１７参照）。しかし、この点についてはいくつかの例外も報告されている（非特許文献１８～２０参照）。いずれにしても、このような対称性は葉の形状の複雑さ（例えば、単一又は複合）とは無関係である。

【０００４】

対称性の葉の発生に関与するメカニズムを明らかにするために、本発明者らを含む数組のグループがシロイヌナズナのアシンメトリックリーブズ２（ａｓ２）及びアシンメトリックリーブズ１（ａｓ１）を検討している。そのような突然変異体の表現型は、葉身及び奇形の葉脈系の非対称性という点で極めてよく似ているが、異常は絶対的に同一というわけではない（非特許文献２１～２４参照）。これらの遺伝子の異常は以下のように要約することができる。（１）ａｓ１変異体及びａｓ２変異体の葉は、非対称性の裂片を持ち、両側性に非対称である下向きの巻きを示す。（２）肥厚し、且つ明瞭な主脈を生じることができず、２次葉脈のパターンも非対称性である（非特許文献２３及び２４参照）。（３）試験管内にてフィトクロムを含まない培地で培養した葉の切片は、野生型の葉の切片よりも高い頻度でシュートを再生する（非特許文献２３参照）。（４）例えば、ＫＮＡＴ１、ＫＮＡＴ２、及びＫＮＡＴ６のようなクラスＩｋｎｏｘ遺伝子の転写物が変異体の葉に蓄積する（非特許文献２３参照）。（５）トウモロコシのＲＯＵＧＨ　ＳＨＥＡＴＨ２（ＲＳ２）及びＰＨＡＮの産物に関係するｍｙｂ様転写因子をコードするａｓ１の転写物は、子葉原基及び葉原基における導管組織の周りに蓄積する（非特許文献２１参照）。

【０００５】

以上のように要約された所見は、ａｓ１及びａｓ２が、葉身対称性の発生と同様に、葉の左右対称性の構造的な軸としての顕著な主脈を含む、葉脈システム全体の確立に関与する可能性があることを示唆している（非特許文献２３参照）。それらはまた、おそらくクラスＩｋｎｏｘ遺伝子の発現を抑制することによって、発生上の決定的状況に葉細胞を維持する点で機能している可能性がある。葉脈システムの確立におけるこのような遺伝子の役割は、葉細胞の決定的状況を維持することと高く相関しているが、そのような相関の詳細は明らかにされていない。ａｓ１、ａｓ２及びａｓ１とａｓ２の二重変異植物の異常の類似性によってａｓ１とａｓ２は幾分遺伝的に相互作用しているという提案が導かれている（非特許文献２３参照）。ａｓ１とａｓ２が葉身形成を制御するメカニズムにおいてさらに見識を得るには、ａｓ２遺伝子及びａｓ１遺伝子の両方の性状分析を行うことが極めて重要である。

【０００６】

ａｓ２遺伝子座は、２つのシロイヌナズナのトランスジェニック株＃１４－２２．４．４Ｗ３（Ｔ－１２００）及び＃１４－６８．１．４（Ｔ－１７００）において、ｄＡｃ－Ｉ

－ＲＳとして知られる転移因子の２つの誘導体の間に地図上の位置が決定されたことが、本発明者らにより報告されている（非特許文献２５参照）。しかし、その詳細については報告されていなかった。

【０００７】

【非特許文献１】
Ｓｔｅｅｖｅｓ，Ｔ．Ａ．ａｎｄ Ｓｕｓｓｅｘ，Ｉ．Ｍ（１９８９）Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、

【非特許文献２】
Ｗａｉｔｅｓ，Ｒ．ｅｔ ａｌ．（１９９８）Ｃｅｌｌ ９３：７７９－７８９、

【非特許文献３】
Ｈｕｄｓｏｎ，Ａ．（２０００）Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｐｌａｎｔ Ｐｈｙｓｉｏｌ．Ｐｌａｎｔ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．７：５８１－５８７、

【非特許文献４】
Ｂｙｒｎｅ，Ｍ．，ｅｔ ａｌ．（２００１）Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｐｌａｎｔ．Ｂｉｏｌ．４：３８－４３

【非特許文献５】
Ｈａｋｅ，Ｓ．，ｅｔ ａｌ．（１９８９）ＥＭＢＯ Ｊ．８：１５－２２、

【非特許文献６】
Ｃｏｎｗａｙ，Ｌ．Ｊ．ａｎｄ Ｐｏｅｔｈｉｇ，Ｒ．Ｓ．（１９９７）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９４：１０２０９－１０２１４）、

【非特許文献７】
Ｈｏｆｅｒ，Ｊ．ｅｔ ａｌ．，（１９９７）Ｃｕｒｒ．Ｂｉｏｌ．７：５８１－５８７、

【非特許文献８】
Ｋｉｍ，Ｇ．Ｔ．ｅｔ ａｌ．（１９９８）Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ．１２：２３８１－２３９１、

【非特許文献９】
Ｂｅｒｎａ，Ｇ．，ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，１５２：７２９－７４２、

【非特許文献１０】
Ｓｅｒｒａｎｏ－Ｃａｒｔａｇｅｎａ，Ｊ．，ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｍｏｌ．Ｇｅｎ．Ｇｅｎｅｔ．２６１：７２５－７３９、

【非特許文献１１】
Ｔｉｍｍｅｒｍａｎｓ，Ｍ．Ｃ．，ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２８４：１５１－１５３、

【非特許文献１２】
Ｔｓｉａｎｔｉｓ，Ｍ．，ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２８４：１５４－１５６

【非特許文献１３】
Ｏｇｕｒａ，Ｙ．（１９６２）Ｐｌａｎｔ Ａｎａｔｏｍｙ ａｎｄ Ｍｏｒｐｈｏｌｏｇｙ．ｐｐ．１０２－１３４ Ｙｏｕｋｅｎｄｏ，Ｉｎｃ．，Ｔｏｋｙｏ．、

【非特許文献１４】
Ｈｉｃｋｅｙ、Ｌ．Ｊ．（１９７３）Ａｍｅｒ．Ｊ．ｂｏｔ．６０：１７－３３、

【非特許文献１５】
Ｈｉｃｋｅｙ，Ｌ．Ｊ．（１９７９）Ｉｎ Ａｎａｔｏｍｙ ｏｆ ｔｈｅ Ｄｉｃｏｔｙｌｅｄｏｎｓ．Ｅｄｉｔｅｄ ｂｙ Ｍｅｔｃａｌｆ，Ｃ．Ｒ．ａｎｄ Ｃｈａｌｋ，Ｌ．ｐｐ．２５－３９．Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒ

ｅｓｓ，　Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ、
【非特許文献１６】
Ｓｉｎｈａ、Ｎ．Ｒ．　（１９９９）　Ａｎｎｕ．　Ｒｅｖ．　Ｐｌａｎｔ　Ｐｈｙｓｉｏｌ．　Ｐｌａｎｔ　Ｍｏ；．　ｂｉｏｌ．　５０：４１９－４４６、
【非特許文献１７】
Ｓｅｍｉａｒｔｉ，　Ｅ．，　ｅｔ　ａｌ．　（２００１ａ）Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ　１２８　：１７７１－１７８３
【非特許文献１８】
Ｗｈａｌｅｙ，　Ｗ．Ｇ．　ａｎｄ　Ｗｈａｌｅｙ，　Ｃ．Ｙ．　（１９４２）　Ａｍｅｒ．　Ｊ．　ｂｏｔ．　２９：１０５－１９４，
【非特許文献１９】
Ｌｉｅｕ，　Ｓ．Ｍ．　ａｎｄ　Ｓａｔｔｌｅｒ，　Ｒ．　（１９７６）　Ｃａｎ　Ｊ．　Ｂｏｔ．　５４：２１０８－２１２１、
【非特許文献２０】
Ｄｅｎｇｌｅｒ，　Ｎ．Ｇ．　（１９９９）　Ｉｎｔ．　Ｊ．　Ｐｌａｎｔ　Ｓｃｉ．　１６０：Ｓ６７－Ｓ８０
【非特許文献２１】
Ｂｙｒｎｅ，　Ｍ．Ｅ．　ｅｔ　ａｌ．　（２０００）　Ｎａｔｕｒｅ　４０８：９６４－９７１、
【非特許文献２２】
Ｏｒｉ，　Ｎ．　ｅｔ　ａｌ．　（２０００）　Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ　１２７　：５５２３－５５３２、
【非特許文献２３】
Ｓｅｍｉａｒｔｉ　ｅｔ　ａｌ．　（２００１ａ）、
【非特許文献２４】
Ｓｕｎ，　Ｙ．　ｅｔ　ａｌ．　（２００２）　Ｐｌａｎｔａ　２１４：６９４－７０２
【非特許文献２５】
Ｍａｃｈｉｄａ，　Ｃ．　ｅｔ　ａｌ．　（１９９７）　Ｐｒｏｃ．　Ｎａｔｌ．　Ａｃａｄ．　Ｓｃｉ．　ＵＳＡ　９４：８６７５－８６８０

【０００８】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、植物における対称性で平坦な葉の発生、及び葉の葉脈を確立させるための手法を、詳細にはそのための遺伝子を確立することを目的としている。より詳細には、本発明は、ａｓ２遺伝子を単離し、その性状分析を行うことにより、対称性で平坦な葉の発生及び葉の葉脈の確立を制御する方法を提供し、そのために有用な新たなタンパク質ＡＳ２、及びそれをコードする遺伝子ａｓ２を提供するものである。

【０００９】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、ａｓ２遺伝子を単離し、性状分析を行った。この遺伝子は、Ｃ‐モチーフと命名されたシステイン反復配列及びロイシンジッパー様モチーフを含む新規タンパク質をコードする。データベースの検索では、ＡＳ２は、本発明者らがＡＳ２ファミリーと命名したタンパク質の大きなファミリーに属することが判った。ａｓ２遺伝子の転写物は主として、胚発生中に子葉原基の向軸性ドメインで検出された。ＡＳ２は明瞭な核への局在シグナルを含んではいないが、緑色蛍光タンパクを結合したＡＳ２は植物の核に局在していた。ａｓ２ｃＤＮＡの過剰発現は、トランスジェニック植物のシュートの形成効率に低下を生じた。ａｓ２ｃＤＮＡを過剰発現したトランスジェニックシロイヌナズナは、上向きに巻いた葉を生じ、時には葉身の適当な広がりを持たない竿型の葉を生じた。従って、ＡＳ２は、核における特定の遺伝子の転写、対称性で平坦な葉身の発生、及び葉の葉脈の確立を制御している可能性があることを見出した。

【００１０】

本発明は、植物の葉形成関連タンパク質ＡＳ２に関する。詳細には、植物細胞の核における特定の遺伝子の転写、対称性で平坦な葉身の発生、及び葉の葉脈の確立を制御している植物の葉形成関連タンパク質ＡＳ２、より詳細には、システインに富むＣ‐モチーフからなるシステイン反復配列及びロイシンジッパー様モチーフを有することを特徴とする植物の葉形成関連タンパク質ＡＳ２に関する。より具体的には、植物の葉形成関連タンパク質ＡＳ２が、配列表の配列番号２に記載のアミノ酸配列、又は当該アミノ酸配列中のアミノ酸が置換、挿入、若しくは欠失してもよいアミノ酸配列からなる植物の葉の形成に関連するタンパク質ＡＳ２に関する。

また、本発明は、植物の葉形成関連タンパク質ＡＳ２をコードするＤＮＡ、より詳細にはＤＮＡが、配列表の配列番号１に記載の塩基配列、又は当該塩基配列にストリージェントな条件下でハイブリダイズし得る塩基配列を有するものである植物の葉形成関連タンパク質ＡＳ２をコードするＤＮＡに関する。

さらに、本発明は、植物の葉形成関連タンパク質ＡＳ２を用いた植物の葉の形成を制御するための組成物、植物の葉形成関連タンパク質ＡＳ２をコードするＤＮＡからなる植物の葉の形成を制御するための遺伝子、及びそれを含有してなるベクターに関する。

【００１１】

本発明者らは、２つのシロイヌナズナのトランスジェニック株＃１４－２２．４．４Ｗ３（Ｔ－１２００）及び＃１４－６８．１．４（Ｔ－１７００）において、ａｓ２遺伝子座が、ｄＡｃ－Ｉ－ＲＳとして知られる転移因子の２つの誘導体の間に地図上の位置存在していることを決定していた。これに基づいてａｓ２遺伝子のクローニングを行った。遺伝子地図に基づいたクローニングにおいて、ＢＡＣクローンＦ５Ｉ１４におけるＰＣＲ－ＲＦＬＰマーカー以外に、遺伝的且つ分子マーカーとしてこのような２つのｄＡｃ－Ｉ－ＲＳ因子に着目した。この因子はハイグロマイシン耐性遺伝子を含んでおり、ａｓ２遺伝子座は最終的には、ＢＡＣクローンＦ５Ｉ１４における２つのＰＣＲ－ＲＦＬＰマーカー（マーカー１とマーカー４）の間の３２ｋｂｐの領域であることがわかった。

【００１２】

図１に、シロイヌナズナの第１染色体のゲノムの領域構造、及びゲノム断片による相補性解析の結果を示す（図１Ａ）。図１ＡのＴ－１２００及びＴ－１７００は、ハイグロマイシン耐性（Ｈｙｇ^{r}）遺伝子によるｄＡｃ－Ｉ－ＲＳ転移因子の位置を示す。図１Ｂは、第１染色体におけるａｓ２遺伝子付近の各ＢＡＣクローン（Ｆ５Ｉ１４、Ｆ１Ｅ２２、及びＦ１２Ｐ１９）を示す。ＢＡＣクローンＦ５Ｉ１４の上に４種のマーカーの位置を示し、マーカーの上の番号は、それぞれのマーカーとａｓ２遺伝子座との間での組換え体の数を示す（ほとんどの場合で１０，０００を超える染色体を調べた。）。

本発明者らは、我々はＴ－１２００及びＴ－１７００のハイグロマイシン耐性（Ｈｙｇ^{r}）遺伝子から染色体ウォーキングを開始し、本発明者らが解析のために作成したＲＦＬＰマーカーである、マーカー１、マーカー２、マーカー３及びマーカー４のうちの、ａｓ２遺伝子がマーカー１とマーカー４の間の３２ｋｂｐの領域であることを決定した。

【００１３】

次に、ａｓ２－１変異体のこの領域のＤＮＡのＰＣＲ－ＲＦＬＰ解析を行い、 配列を決定した。ＢＡＣクローンＦ５Ｉ１４のオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）１５に相当するＯＲＦにおいて、１３ｂｐの欠失を見い出した。さらに、本発明者らは、ａｓ２－２、ａｓ２－４、及びａｓ２－５のような利用可能なその他の対立遺伝子がすべてこのＯＲＦにおいて突然変異を持っていることを見い出した（詳細は、後述する図２Ａなどを参照のこと。）。ＯＲＦ１５における突然変異がａｓ２の表現型に関与しているかどうかを確定するために、本発明者らは、ＯＲＦ１５すべてを含んでいる野生型ゲノムのＡｐａＩ－ＨｐａＩ断片（断片Ｉ；６．１６ｋｂ）を、ａｓ２－１遺伝子が変異している植物（ａｓ２－１植物）に導入した。また、ＯＲＦ１５の上流領域を欠く断片ＩＩ、及びＯＲＦ１５の上流領域とＯＲＦ１５の真ん中から断片Ｉの３’末端までを欠く断片ＩＩＩで、ａｓ２－１植物を形質転換した。この結果、断片Ｉのみがａｓ２の表現型を示した。

図１Ｂは、ａｓ２周辺の染色体領域の拡大図及び相補性解析の結果を示すものであり、ａ

ｓ２のｃＤＮＡの構造をゲノム構造の下に示す。相補性解析に用いた制限断片の構造を、Ｉ、ＩＩ、ＩＩＩと表記された水平の線で示す。右側の記号＋及び－はそれぞれ、相当するＤＮＡ断片との相補性試験の正及び負の結果を示す。
ＯＲＦ１５は、３０００Ｄａを超えるタンパク質をコードすることができる断片Ｉにおける唯一のリーディングフレームである。従って、この結果は、ＯＲＦ１５がａｓ２遺伝子に相当することを示している。断片ＩＩがａｓ２の表現型を補完できなかったことは、断片ＩのＡｐａＩとＢｓｕ３６Ｉとの間の領域がａｓ２の発現に必要であることを示していた。

【００１４】

本発明者らは、ＯＲＦ１５に相当するｃＤＮＡクローンを単離した。この塩基配列を配列表の配列番号１に示す。またそのアミノ酸配列を配列番号２に示す。ａｓ２遺伝子のヌクレオチド配列をｃＤＮＡの配列と比較すると、ｍＲＮＡは、５’非翻訳領域にイントロンを２つ含むが、コーディング領域にはイントロンを含まず（図１Ｂ）、さらに、ＡＳ２は、１９９のアミノ酸残基を持つ新規のタンパク質をコードしていた。図２に、ＡＳ２の予想アミノ酸配列を示す。Ｃモチーフにおけるシステインの位置及びロイシンジッパー様配列における疎水性残基の位置は、それぞれ星印（＊）及び点（・）で示す。種々のａｓ２対立遺伝子における突然変異したアミノ酸残基を野生型の配列の上にイタリック体で示す。
また、図３にａｓ２のドメインの構成及び特有の特徴を示す。ボックスの下でブラケットで示す領域はａｓ２ドメインである。灰色のボックスはＣモチーフを示し、縞のあるボックスはロイシンジッパー様配列を表す。ａｓ２－１、ａｓ２－２、ａｓ２－４及びａｓ２－５の突然変異の部位を示す。ボックスの下の数はアミノ酸残基の位置を示す。

【００１５】

ａｓ２－１とａｓ２－２の対立遺伝子は両方とも、ロイシンジッパー様配列をコードする配列の上流の同じ部位に１３ｂｐの欠失を有している。この欠失によって、ＡＳ２のカルボキシル末端（Ｃ－末端）側のほとんどを欠くが、追加の１３アミノ酸残基を含む短いポリペプチドを生じるはずである（図２参照）。ａｓ２－４変異体では、ＡＳ２のＣ－末端側に相当するコーディング領域の真ん中に１ｂｐの欠失があり、これによってＡＳ２のＣ－末端４８アミノ酸残基で新しい６３残基による置き換えを生じるフレームシフト突然変異が起きていた（図２参照）。ａｓ２－５変異体では、タンパク質のアミノ末端（Ｎ－末端）側のコーディング領域で単一のグアニンヌクレオチドがアデニンヌクレオチドで置換されており、これによって、４６位においてグルタミン酸残基によるグリシン残基の置換が生じていた（図２参照）。このグリシン残基は、以下に説明するように、ＡＳ２ファミリーのあらゆるメンバーで保存されている。従って、このグリシン残基はＡＳ２の機能にとって必須である。

【００１６】

次に、ＡＳ２及びその関連タンパク質の構造的な特徴を調べた。
予想されるＡＳ２タンパク質は、８１番目の残基から１０９番目の残基までのロイシンジッパー様配列を含んでおり、それには、６残基の間隔と共に、バリン、イソロイシン及びロイシンのような疎水性アミノ酸残基の５回の反復が含まれていた（図２参照）。データベース検索によれば、ＡＳ２のＮ－末端側は、シロイヌナズナ及びその他の植物種（Ｏｒｙｚａ ｓａｔｉｖａ（イネ）、Ｇｌｙｃｉｎｅ ｍａｘ（ダイズ）、Ｌｙｃｏｐｅｒｓｉｃｏｎ ｅｓｃｕｌｅｎｔｕｍ（トマト）など）の仮説遺伝子及びＥＳＴによってコードされる多数の推定上のＮ－末端側に、アミノ酸配列という点で類似していることが判った（図２Ｂ）。シロイヌナズナの配列に関する公的データベースには、ＡＳ２のＮ－末端側に関係するＮ－末端を持つタンパク質をコードしていると予想されるＯＲＦは少なくとも４１あった。このようなタンパク質のうち、数個は、単にかすかにＡＳ２に関係していると思われる（図４参照）。
図４に示すように、推定上のＡＳ２様タンパク質の比較解析によって、$Cx_2Cx_6Cx_3C$配列（この場合、ｘは保存的でない残基である；Ｃモチーフと命名した）は、データ

ベース検索及びＡＳ２（ＡＳ２の１０位～２４位）で同定された４１の予想タンパク質すべてのＮ－末端側において完全に保存されていることが判った。Ｃモチーフ以外にも、ロイシンジッパー様配列も４１のタンパク質のほとんどで強く保存されていた。ＡＳ２を含む半分を超えるタンパク質が以下のような追加の保存的配列を持っていた：Ｃモチーフの中及び周りにおけるＰＣＡＡＣＫＦＬＲＲＫＣｘｘｘＣＶＦＡＰＹＦＰ、Ｃモチーフとロイシンジッパー様配列との間におけるＦＡｘＶＨＫＶＦＧＡＳＮＶｘＫＬＬ、及びロイシンジッパー様配列の周りにおけるＲｘｘＡＶｘＳＬｘＹＥＡｘＡＲｘＲＤＰＶＹＧＣＶＧｘＩＳｘＬＱｘＱＬ（Ｖ又はＩ）ｘｘＬＱｘｘＬｘｘｘｘｘｘＬ（Ｖ又はＩ）（図４参照）。ＡＳ２のＮ－末端におけるアミノ酸配列の強い保存にもかかわらず、ＡＳ２のＣ－末端領域のアミノ酸配列は、その他のＡＳ２様タンパク質及びデータベースにおけるその他のタンパク質の配列とは異なっていた（図３参照）。

【００１７】

ＡＳ２では、Ｎ－末端配列は、Ｃモチーフとロイシンジッパー様配列を特徴としている。本発明者らは、この特徴的な領域をＡＳ２ドメインと呼び、このドメインを含むタンパク質をＡＳ２ファミリーのメンバーと呼ぶことにした。この命名法によれば、シロイヌナズナのゲノムは、ＡＳ２ファミリーに属するタンパク質をコードする可能性のあるＯＲＦを４２含んでいることになる。図４に示すように、この遺伝子及びＡＳ２に似た４１のタンパク質の推定上の遺伝子に対してａｓ２様遺伝子（ＡＳＬ）という命名を付し、このような遺伝子にそれぞれ１～４１の番号を付けた。このような遺伝子のｃＤＮＡの一部のヌクレオチド配列はジェンバンク（ＧｅｎＢａｎｋ）データベースに提出され、スアイ（Ｓｈｕａｉ　Ｂ．）及びシュプリンガー（Ｓｐｒｉｎｇｅｒ、Ｐ．Ｓ）（２００１年、表２参照）によってＬＯＢ及びＬＢＤと命名された。

【００１８】

図４に、ＡＳ２ファミリーメンバーにおけるＡＳ２ドメインのアミノ酸配列の比較を示す。ＡＳ２ファミリーのメンバー（ＡＳＬと呼ぶ、）の相当する領域の配列と共に、ＡＳ２の８番目から１０９番目の残基を並べる。２０を超えるメンバーで保存されているアミノ酸残基を黒色背景上の白色文字で示す。Ｃモチーフにおけるコンセンサス配列及びロイシンジッパー様配列における疎水性残基は、それぞれ星印（＊）及び点（・）で示す。ファミリーのメンバーすべてで保存されており、ａｓ２－５対立遺伝子で突然変異していたグリシン残基は星印２つ（＊＊）で示す。シロイヌナズナのＡＳ２ファミリーのメンバーは２つのクラス（クラスＩ及びクラスＩＩ）に分割することができる。クラスＩＩの３を超えるメンバーで保存されていたアミノ酸残基を灰色で示す。多の植物における、Ｏ．ｓ．はＯｒｙｚａ　ｓａｔｉｖａ（イネ）を示し、Ｇ．ｍ．はＧｌｙｃｉｎｅ　ｍａｘ（ダイズ）を示し、及びＬ．ｅ．はＬｙｃｏｐｅｒｓｉｃｏｎ　ｅｓｃｕｌｅｎｔｕｍ（トマト）をそれぞれ示す。

【００１９】

これらのＡＳ２ファミリーのメンバーは少なくとも２つのクラス、クラスＩ及びクラスＩＩに分けることができる（図４参照）。クラスＩは、ＡＳ２及び３５のタンパク質（ＡＳＬ１～ＡＳＬ３５）から成り、Ｃモチーフ、ロイシンジッパー様配列及び上記で述べた主要な保存された残基のほとんどを含む。クラスＩＩは６つのタンパク質（ＡＳＬ３６～ＡＳＬ４１）から成る。　このようなタンパク質は、Ｃモチーフ及び不完全なロイシンジッパー様配列を含み、その中では、４番目の疎水性残基が欠損しており、ＡＳ２ドメインにはさらに弱くしか保存されていない。その上、このクラスではクラスＩＩのあらゆるメンバーの間でほとんどのアミノ酸配列が保存されており、各タンパク質において僅かな残基が異なっているに過ぎない。

図５に、検索されたシロイヌナズナのＡＳ２ファミリータンパク質の４２メンバーに関する系統樹を示す。分枝上の数は、ＰｒｏｔＭＬプログラムで計算された、そこにおけるブーツストラップ値を表す。各水平の枝の長さは、概算された進化上の距離に比例するように作製されている。右側の区分は、ＡＳ２ファミリーのメンバーの分類を示す。

図５に示すように、クラスＩＩはクラスＩからは離れて関係しているにすぎないことが系

統樹により裏付けられ、クラスＩのメンバーは、クラスＩａ及びクラスＩｂと命名されたサブクラスにさらに分割することができ、配列の保存性は弱いが、完全なロイシンジッパー様配列を持っていることが示された。

【００２０】

次に、本発明者らは、野生型植物においてａｓ２転写物の蓄積部位を調べた。１２日令の植物の根、子葉、葉、及び茎頂、２８日令の植物の花芽、３５日令の植物のロゼット葉、茎上の葉、花の茎及び長角果からポリ（Ａ）$^{+}$ＲＮＡを精製し、次いで、ＲＮＡ試料でプローブとしてａｓ２のｃＤＮＡを用いたノーザンブロット解析を行った。結果を図６に図面に代わる写真で示す。図６はシロイヌナズナの種々の器官のポリ（Ａ）$^{+}$ＲＮＡのノーザンブロット解析の結果を示す。１２日令植物の根（レーン１）、子葉（レーン２）、葉（レーン３）、及び茎頂（レーン４）、２８日令植物の花芽（レーン５）、及び３５日令植物のロゼット葉（レーン６）、茎上葉（レーン７）、花の茎（レーン８）及び長角果（レーン９）から等量の１．０μｇのポリ（Ａ）$^{+}$ＲＮＡを調製した。同じブロットを対照としてＥφ－チューブリン（ＴＵＢＡ）をプローブとして調べた。右側の数はマーカーＲＮＡ分子の大きさを示す。

ａｓ２の転写物は、花の茎を除いて解析した試料のすべてで検出された（図６参照）。ａｓ２転写物のレベルは、小さな発生途上の葉が含まれる茎頂の試料で最も高かった。このようなデータは、ａｓ２突然変異は、子葉、ロゼット葉、茎上の葉、萼片及び花弁のようなあらゆる葉様の器官における変異体の表現型として明白であるが、茎にはないという以前の観察と一致している（非特許文献２３参照）。しかしながら、ａｓ２転写物は根で検出されたが、ａｓ２植物の根は野生型の根と似ていた。

【００２１】

本発明者らは、プローブとしてａｓ２のｃＤＮＡを用いたインスート（ｉｎ　ｓｉｔｕ）ハイブリダイゼーション法によって胚発生過程におけるａｓ２の発現部位についても調べた。結果を図７に図面に代わる写真で示す。図７は、インスート（ｉｎ　ｓｉｔｕ）ハイブリダイゼーション法によるａｓ２転写物の検出（ａ～ｄ）結果を示す。アンチセンスプローブで得られたａｓ２転写物の分布パターンである。図７の（ａ）は球状ステージ；（ｂ）は三角ステージ；（ｃ）はハート型ステージ；（ｄ）は魚雷型ステージ；（ｅ）は（ａ）～（ｄ）のセンス対照パネルを示す。種皮の真下の細胞層の赤味がかった茶色の着色（白色の星印で示す）は、両方のプローブで生じるのでａｓ２のＲＮＡに特異的ではない。図７の縮尺棒は２０μｍを示す。

球状ステージの胚では、ａｓ２の転写物はすべての細胞で検出された（図７参照）。三角の胚の上部にて膨らみが形成されるにつれて、ａｓ２の転写物は、胚の最上層領域に蓄積した（図７（ｂ）参照）。ハート型ステージから魚雷型ステージまで、子葉原基の向軸性側での原表皮細胞でシグナルを検出した（図７（ｃ）、（ｄ）参照）。ウォーキングースティックステージの後、ａｓ２転写物の蓄積は、特定の領域に明瞭に濃縮されることなく、子葉原基の至るところで検出された（データは示さず）。発芽の後、茎頂のメリステムの周り、葉の原基及び成熟した葉においてインスート（ｉｎ　ｓｉｔｕ）では特異的なハイブリッドの形成のシグナルは検出されなかった。しかしながら、ａｓ２転写物の蓄積は、ノーザンブロットで確認された（図６参照）。

【００２２】

次に、ＡＳ２の核内への局在について調べた。予想されたＡＳ２タンパク質は核内への明瞭な局在シグナル（ＮＬＳ）を含んでいない（図２参照）。

本発明者らは、ＡＳ２が植物細胞の核に局在するかどうかを確定するために、カリフラワーモザイクウイルス（ＣａＭＶ）の３５Ｓプロモータ（３５Ｓ：：ａｓ２：：ＧＦＰ）の制御下での転写とともに、ａｓ２ｃＤＮＡを緑色蛍光タンパク（ＧＦＰ）のＤＮＡに結合した融合コンストラクトを作製した。この融合コンストラクトを粒子衝撃法によってタマネギの上皮細胞に導入し、ＧＦＰによる蛍光をモニターした。結果を図８に図面に代わる写真で示す。図８は、タマネギの上皮細胞におけるａｓ２：：ＧＦＰの細胞小器官の局在をモニターした結果を示す。図８のＡ及びＢは３５Ｓ：：ａｓ２：：ＧＦＰの場合を示し

、図８のＣ及びＤは３５Ｓ：：ＮＬＳ：：ＧＦＰの場合を示し、図８のＥ及びＦは３５Ｓ：：ＧＦＰの場合を示す。それぞれの遺伝子を衝撃によってタマネギの上皮細胞に導入し、導入した組織を２８℃にて１６時間培養した。蛍光顕微鏡下で蛍光をモニターした（左側のパネル（図８のＡ、Ｃ及びＥ）。また、１μｇ／ｍＬのＤＡＰＩで染色した核を右側のパネル（図８のＢ、Ｄ及びＦ）に示す。図８の各縮尺棒は１００μｍを示す。
図８に示すように、ａｓ２－ＧＦＰによる蛍光シグナルは、ＳＶ４０のＮＬＳによって調製されたＮＬＳ－ＧＦＰによる類似のシグナル同様に主として核内にて検出された（図８Ａ、Ｃ）。３５Ｓ：：ＧＦＰのコンストラクトをタマネギ細胞に導入した場合、ＧＦＰによるシグナルは核及び細胞質の双方で検出された（図８Ｅ）。このような結果は、ＡＳ２が核内タンパクであることを示している。

【００２３】
次に、本発明者らは、ＡＳ２を過剰に生産するシロイヌナズナ植物の表現型を調べた。３５Ｓプロモータにａｓ２ｃＤＮＡを結合させ（３５Ｓ：ａｓ２）、ａｓ２を過剰に発現するトランスジェニックのシロイヌナズナ植物を作出した。結果を図９に図面に代わる写真で示す。図９のＡは、空のベクターｐＳＫ１（ａ）及びｐＳＫ３５Ｓ：：ａｓ２（ｂ）により形質転換したＣｏｌ－０由来の根断片をインキュベートし、インキュベートを開始後２１日目に写真撮影した結果を示す。図９Ａの縮尺棒は１０ｍｍを示す。図９のＢは、トランスジェニックしたシロイヌナズナ植物の表現型を示す。図９Ｂの（ａ）は空のベクターｐＳＫ１で形質転換した３５日令の植物の場合を示し、（ｂ）はｐＳＫ３５Ｓ：：ａｓ２で形質転換した３５日令の植物の場合を示し、（ｃ）はｐＳＫ３５Ｓ：：ａｓ２で形質転換した２５日令の植物の場合を示し、（ｄ）は（ｃ）の植物をさらに１５日間成長させた場合を示す。図９Ｂの縮尺棒は１０ｍｍを示す。図９Ｃは、トランスジェニック植物及び野生型植物（Ｃｏｌ－０）におけるａｓ２遺伝子の転写物のＲＴ－ＰＣＲ解析の結果を示す。ＲＴ－ＰＣＲのサイクル数をそれぞれのパネルの右側に示す。増幅したＤＮＡ断片をアガロースゲル上の電気泳動で分画し、臭化エチジウムで染色して視覚化した。レーン１は図９Ｂの（ｄ）に示されるトランスジェニック植物の場合を示し、レーン２は野生型（Ｃｏｌ－０）植物の場合を示す。ａｓ２転写物のオープンリーディングフレームの領域に特異的なプライマーで増幅した産物（ａ；ＯＲＦ）、ａｓ２転写物の３’非翻訳領域に特異的なプライマーで増幅した産物（ｂ；ＵＴＲ）、及びα－チューブリンに対する遺伝子の転写産物に特異的なプライマーで増幅した産物（ｃ；α－ｔｕｂｕｌｉｎ）を示す。
図９Ｄは、それぞれの葉の表現型を示す。（ａ）は典型的な３５日令の野生型Ｃｏｌ－０植物の場合を示し、（ｂ）はａｓ２－１植物の５番目の葉を示す。軽い表現型の変化（ｃ）及び厳しい表現型の変化（ｄ）を示すトランスジェニック植物の典型的な葉を示す。後者の葉の位置は決定することができなかった。図９Ｄの縮尺棒は５ｍｍを示す。

【００２４】
この予備実験のデータは、形質転換したシュート（ｓｈｏｏｔ）を作出するのは困難であることを明示していた（図９Ａ）。従って、本発明者らは先ず、従来の根形質転換法により形質転換されたシュートのおよその作出効率を確定した。
形質転換について、用いた根の数当りの形質転換された緑色カルス、再生されたシュート（ｓｈｏｏｔ）、及び花の茎を伴うシュート（ｓｈｏｏｔ）の数を数えた。結果を次の表１に示す。

【００２５】
【表１】

プラスミド	調査した根の数	緑色カルスの数	シュートの数	茎を伴うシュートの数
pSK1	18	76(4.2)	45(2.5)	22(1.2)
pSK1::35S::AS2	21	31(1.5)	14(0.67)	4(0.19)

【００２６】

表１中のカッコ（）内の数値は、根当たりの形質転換体の平均数を示す。
表１は、３５Ｓ：ａｓ２を根組織に導入した場合の緑色カルスの形成効率は、空のベクタープラスミド、ｐＳＫ１を形質転換に用いた場合よりも低いことを示している。トランスジェニックシュート及び花の茎を伴うシュートの再生効率は、５倍～１０倍低い（表１参照）。
このようなデータは、ａｓ２ｃＤＮＡの過剰発現は、緑色組織における細胞増殖及び／又はシュートの再生に抑制効果を持つことを示した。
ａｓ２ｃＤＮＡを過剰発現する２つのトランスジェニック株を得た。このｃＤＮＡに由来するａｓ２転写物がさらに厳しい表現型を示すトランスジェニック株の１つに蓄積されていることを確認した（図９Ｃ参照）。トランスジェニック植物の１つの株は、軽い矮性の表現型を持ち、上向きに巻いた葉を生じた（図９Ｂの（ｂ）参照）。トランスジェニック植物のもう１つの株は、さらに厳しい異常な表現型を伴っており、植物成長の早期ステージで極めて狭い葉身を持つ葉を生じた（図９Ｂの（ｃ）、及び図９Ｄの（ｃ）参照）。この葉身は広がることができず、竿状の葉を生じた（図９Ｂの（ｄ）、及び図９Ｄの（ｄ）参照）。

【００２７】

以上のことから、ＡＳ２における機能的ドメインを考察した。
ａｓ２遺伝子は、そのＮ－末端側にＣモチーフ（$Cx_2Cx_6Cx_3C$として定義される）及びロイシンジッパー様配列を含み、そのＣ－末端側に明らかに独特な配列を含む１９９のアミノ酸残基の新規タンパク質をコードすると思われる（図２、図３参照）。ロイシンジッパー配列がタンパク質－タンパク質の相互作用に関与することは一般的に受け入れられており、ａｓ２のロイシンジッパー様配列は、ＡＳ２といくつかのそのほかのタンパク質との会合に役割を担っている可能性があると考えられる。そのような相互作用がＡＳ２の作用に必須かも知れない。
Ｃモチーフは本発明で初めて同定されたが、それはむしろ、一般に$Cx_{2\sim3}Cx_nCx_{2\sim3}C$（ｎ＞１２）のコンセンサス配列を持ち、その他の巨大分子との相互作用で機能するジンクフィンガーに似ている（Ｐａｖｌｅｔｉｃｈ，Ｎ．Ｐ．ａｎｄ Ｐａｂｏ，Ｃ．Ｏ．（１９９１）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５２：８０９－８１７、Ｗａｎｇ，Ｊ．Ｈ．ｅｔ ａｌ．（１９９８）Ｉｍｍｕｎｉｔｙ ９：５４３－５５３）。Ｃモチーフもまた、例えば、ＤＮＡやタンパク質、特にＡＳ１のようなその他の巨大分子との会合に関与しているのはありそうなことである。ＡＳ２の機能を完全に解明するには、ＡＳ２が相互作用する分子の同定及び性状分析がさらに必要である。

【００２８】

ＡＳ２のＣ－末端側の配列は、既知のモチーフを含む（図３参照）データベースのどのタンパク質の配列とも異なっている。ａｓ２－４対立遺伝子はこの領域にフレームシフト突然変異を持っていたが、この対立遺伝子による表現型は、他のａｓ２対立遺伝子による表現型に似ているので、Ｃ－末端側は、新しく特徴付けられたＡＳ２ドメインを含むＮ－末端側以外のＡＳ２の機能に必須であると考えられる。

【００２９】

ａｓ１及びａｓ２の双方共、クラスＩｋｎｏｘホメオボックス遺伝子の発現を抑制するが、そのような抑制が直接的に又は間接的にａｓ１及びａｓ２に起因するのかどうかは明らかではない。本発明者らは本発明により、他の未だ同定されていない核内タンパク質との相互作用を介して核におけるクラスＩのｋｎｏｘ遺伝子の抑制に関与するタンパク質に対して予想されるように、ａｓ２：ＧＦＰ融合タンパクが植物細胞の核に局在することを明らかにした（図８参照）。ａｓ１：ＧＦＰ融合タンパクも核内に局在していた（未発表データ）。このような所見は、ａｓ１はａｓ２が核において相互作用する分子の１つであるという仮説に矛盾しない。
ａｓ２ｃＤＮＡの過剰発現によって上向きに巻いた葉及び子葉が誘導された（図９参照）。それに対して、ａｓ２の機能欠損突然変異では、下向きに巻いた葉及び子葉を生じた（非特許文献２３参照）。従って、ａｓ２は、葉身における向軸性ドメインの成長の抑制又

は背軸性ドメインの成長の刺激に関与している。形質転換（図９Ｂ参照）及び胚の子葉原基における向軸性ドメインでのａｓ２の発現（図７参照）の際に、成長抑制効果が認められたことを考慮すれば、ａｓ２は向軸性ドメインの抑制に機能していると推測することができる。そのような抑制が、細胞の増殖又は伸長の阻害を介して成し遂げられるのかどうかを調べるのは興味深いであろう。

分子レベルでのＡＳ２活性の詳細がどうであれ、過剰発現に関する本発明及びａｓ２突然変異の葉に関する以前の研究は、ＡＳ２が葉の対称性と同様に平坦な葉身の拡張に関与していることを示している。葉のドメインの向軸性－背軸性の運命に関与する遺伝子における突然変異は、葉の運命の決定を妨害し、竿型の葉の形成を誘発することが多い。ａｓ２とこのような遺伝子の間に関係があるのかも知れない。このような背景で、ａｓ１の機能がＰＨＡＮの機能に類似するかどうかを調べることが残されているものの、ａｓ１がＰＨＡＮのシロイヌナズナにおけるホモログであることは注目に値する。

【００３０】

次にＡＳＬタンパクの機能について考察してみる。

ＡＳ２様タンパク質のＮ－末端側におけるアミノ酸配列の保存性によって、結果として、このようなタンパク質が、ＡＳ２ファミリーと呼ばれる植物タンパクの新しいファミリーを形成していることを示した。ａｓ２の発現を伴うこのファミリーのメンバーであるシロイヌナズナのタンパク質をＡＳＬ（ＡＳ２様）タンパクと命名した（図４参照）。アミノ酸配列における類似性及びＡＳＬのＡＳ２ドメインの系統樹は、ＡＳＬタンパクが、サブクラス、クラスＩａとクラスＩｂを持つクラスＩ及びクラスＩＩに分割できることを示した（図２、及び図５参照）。

ａｓ２の発現を伴うＡＳ２ファミリーメンバーの機能を同定することが残されたままであるが、ＡＳ２は、対称で、平坦で丸い葉身の形成及び明瞭な主脈を含む葉脈パターンの確立に必要とされる多であることが判明した。さらに、ａｓ２はａｓ１と共に作用して、クラスＩｋｎｏｘホメオボックス遺伝子の発現を抑制する能力を持つ。ＡＳ２ドメインにおける保存的なグリシン残基のグルタミン酸残基による置換は、変異体の表現型を生じるので（図２～図４参照）、ＡＳ２ドメインと同様にこの残基がＡＳ２の機能で重要な役割を担っていることは明らかである。クラスＩａのメンバーの一部はＡＳ２ドメインのアミノ酸配列に強い保存を示すが（例えば、ＡＳＬ１とＡＳＬ２）、ＡＳ２の機能には、Ｎ－末端側ＡＳ２ドメイン以外に独特であるＣ－末端領域が必要とされるので、それらは異なった機能を持つ可能性がある。このような密接に関係するＡＳＬの役割に関する明瞭な見識にはさらなる遺伝的及び分子的実験が必要であろう。

【００３１】

最近、ＡＳＬ４に対する遺伝子に相当するＬＯＢ遺伝子（受入番号ＡＦ４４７８９７）が、通常メリステムと器官原基との境界に発現されるが、ａｓ１では存在せず、ａｓ２でも激減することが提言されたているが、ＬＯＢ遺伝子の発生上の役割が未だ確定されていない。

クラスＩＩを構成する６つのＡＳＬは、クラスＩとは異なる特徴的な構造の特性を持っており（図４参照）、そのアミノ酸配列は互いに極めて類似している。　このような遺伝子の発現が報告された（表２参照）ということは、それらが機能的遺伝子であることを示唆している。従って、クラスＩＩのメンバーはシロイヌナズナの発生途上で異なった役割を担っている可能性があると考えられる。

【００３２】

本発明で報告したヌクレオチド及びアミノ酸の配列に関するジーンバンクの受入番号は以下のとおりである。ＡＳ２（ＡＢ０８０８０２）；及びＢＡＣｓＦ５Ｉ１４（ＡＣ００１２２９）、Ｆ１Ｅ２２（ＡＣ００７２３４）、及びＦ１２Ｐ１９（ＡＣ００９５１３）。シロイヌナズナのＡＳ２ファミリータンパク質のメンバーに関する情報を次の表２に要約する。

【００３３】

【表２】

メンバー	BACコード	遺伝子コード	EST ID	LOB
AS2	F5I14.15	At1g65620	Z33806, Z25656	LBD6
ASL1	MUD21.13	At5g66870		
ASL2	F26B6.31	At2g23660		
ASL3	MGF10.6	At3g27650		LBD25
ASL4	MDC12.5	At5g63090		LOBa
ASL5	T27E13.13	At2g30130		
ASL6	T19E23.11	At1g31320		
ASL7	T17D12.6	At2g28500		
ASL8	F24B9.1	At1g07900		
ASL9	F3O9.33	At1g16530		
ASL10	T9D9.15	At2g30340	AV554524, AV551296, AV538901	LBD13
ASL11	T2P4.18	At2g40470	AI993799, N97300, BE529105	LBD15
ASL12	F9F8.10	At3g11090		
ASL13	MLJ15.5	At3g26660	AV519677, AV565474, AV555285, AV560157, AV556223, AV557695, AV535896, AV564540, AV565846, AV439949, AV561987, AV567074, AV519558	
ASL14	MLJ15.1	At3g26620		
ASL15	MHK10.16	At2g42440		
ASL16	F9D24.100	At3g58190	AV553261, AV544763	LBD29
ASL17	F16D14.15	At2g31310		
ASL18	MHK10.15	At2g42430		LBD16
ASL19	F6N15.4	At4g00220	AI994962, AV563330	LBD30
ASL20	F4L23.41	At2g45420	BE520513, BE521898, BE521897	LBD18
ASL21	F20H23.21	At3g03760		
ASL22	F6N15.25	At4g00210		
ASL23	F4L23.45	At2g45410		
ASL24	K16F4.4	At5g06080		
ASL25	T20E23.110	At3g50510		
ASL26	T12H17.90	At4g22700		
ASL27	MIK22.21	At5g35900		
ASL28	K24A2.3	At3g27940		
ASL29	T23J7.200	At3g47870		
ASL30	MCP4.8	At3g13850		
ASL31	F3N23.18	At1g72980		
ASL32	F9P14.14	At1g06280		
ASL33	T22A15.8	At1g36000		
ASL34	F3P11.11	At2g19510		
ASL35	F6F22.15	At2g19820		
ASL36	T26J14.8	At1g68510	AV559860	LBD42
ASL37	F5A8.2	At1g67100	BE520541, BE520808, BE520344, BE521846, BE524729, BE520809, BE520810	
ASL38	F16B3.18	At3g02550	AV537704, AI996685, AV549715, H76116, AV563797, T42227, AV563144	LBD41
ASL39	K8K14.16	At5g67420	AV525400, AV526154, T41721, AV551431, H36818, F14269, AV550089, T14105, N38449, F14441, AI996949, N65652	LBD37
ASL40	F3A4.20	At3g49940	T76164, Z29130, F13856	
ASL41	F19F18.30	At4g37540	AI994989, R65200	

【００３４】

表２中のＢＡＣコード及び遺伝子コードはＴＡＩＲデータベースから得たものであり、ＥＳＴ　ＩＤはＥＭＢＬデータベースから得たものである。表２の中のいくつかのＡＳＬタンパク質は、ＬＯＢドメイン（ＬＢＤ）タンパク質として既にジーンバンクに提出されたものである。

【００３５】

本発明は、新規な植物の葉形成関連タンパク質ＡＳ２を提供するものである。本発明のタンパク質ＡＳ２は配列表の配列番号２に記載されたアミノ酸配列を有するタンパク質が好ましいがこれに限定されるものではない。本発明のタンパク質は、植物細胞の核における特定の遺伝子の転写、対称性で平坦な葉身の発生、及び葉の葉脈の確立を制御できる機能を有するものであり、タンパク質のアミノ酸配列としてはシステインに富むＣ‐モチーフからなるシステイン反復配列及びロイシンジッパー様モチーフを有することを特徴とするものである。本発明のタンパク質のＣ－モチーフとしては、好ましくは$Cx_2Cx_6Cx_3C$（Ｃはシステインを示し、ｘは任意のアミノ酸を示す。）のアミノ酸配列を有するもの、より具体的なアミノ酸配列としてはＣモチーフの中及び周りにおけるＰＣＡＡＣＫＦＬＲＲＫＣｘｘｘＣＶＦＡＰＹＦＰ（アルファベットはアミノ酸の１文字表記を示し、ｘ

は任意のアミノ酸を示す。）のアミノ酸配列が挙げられる。また、ロイシンジッパー様モチーフとしては、好ましくはＲｘｘＡＶｘＳＬｘＹＥＡｘＡＲｘＲＤＰＶＹＧＣＶＧｘＩＳｘＬＱｘＱＬ（Ｖ又はＩ）ｘｘＬＱｘｘＬｘｘｘｘｘｘＬ（Ｖ又はＩ）（アルファベットはアミノ酸の１文字表記を示し、ｘは任意のアミノ酸を示す。）のアミノ酸配列を例示することができる。さらに、Ｃモチーフとロイシンジッパー様配列との間における好ましいアミノ酸配列としてはＦＡｘＶＨＫＶＦＧＡＳＮＶｘＫＬＬ（アルファベットはアミノ酸の１文字表記を示し、ｘは任意のアミノ酸を示す。）が挙げられ、この中のＧ（グリシン）は必要な配列である。

したがって、例えば、配列表の配列番号２に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質においては、Ｃ－モチーフやロイシンジッパー様モチーフなどやグリシン位置が保存され、植物の葉の形成に関連する機能を有するものである限りにおいては、当該アミノ酸配列中のアミノ酸の１個又は２個以上、好ましくは１～５０個のアミノ酸が任意に置換、挿入、若しくは欠失してもよいアミノ酸配列からなる植物の葉の形成に関連するタンパク質ＡＳ２を提供するものである。本発明の好ましいタンパク質としては前記で説明してきたようなＡＳ２ファミリーに属するアミノ酸配列を有するタンパク質などが挙げられる。

【００３６】

また、本発明は前記した本発明の植物の葉形成関連タンパク質のいずれかをコードするＤＮＡを提供するものである。本発明のＤＮＡは１本鎖であっても２本鎖のものであってもよく、細胞内において前記した本発明の植物の葉形成関連タンパク質ＡＳ２を産生できるものであれよい。また、本発明のＤＮＡは必要によりＲＮＡの形態であってもよい。本発明のＤＮＡの例示として、配列表の配列番号１に記載の塩基配列、又は当該塩基配列にストリージェントな条件下でハイブリダイズし得る塩基配列を有するＤＮＡなどが挙げられる。

本発明のＤＮＡは、ＤＮＡ単独であってもよいが、適当なプラスミドなどからなるベクターに組み込まれたものであってもよい。したがって、本発明は、前記した本発明のＤＮＡを含有してなるベクターを提供するものである。

【００３７】

本発明のタンパク質ＡＳ２は植物、好ましくはシロイロナズナの葉の形成に関連するものであり、正常な葉の形成を制御することができる。従って、本発明は前記した本発明のタンパク質ＡＳ２を含有してなる植物の葉の形成を制御するための組成物、又は制御剤を提供するものである。また、本発明のタンパク質の使用に代えて必要に応じて、前記した本発明のＤＮＡを使用することができる。したがって、本発明は、前記した本発明のＤＮＡからなる植物の葉の形成を制御するための遺伝子、または制御用の組成物、又は制御剤を提供するものである。

【００３８】

【実施例】

次に実施例により本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

なお、以下の実施例において、植物の分析については、種子を土壌に播いて、４℃にて暗所で２日後、２２℃にて１６時間３０００ルクスの白色光照明の条件に植物を移した。植物の日齢は、播種後の日数という観点で提供した。

ａｓ２－５対立遺伝子は、リールシーズ（米国テキサス州、ラウンドロック）から購入したエチルメタンスルホネートで変異誘発したＬｅｒ－０の種子のＭ２集団から単離した。トランスジェニック株、＃１４－２２．４．４Ｗ３（Ｔ－１２００）及び＃１４－６８．１．４（Ｔ－１７００）は、（Ｉ－ＲＳ／ｄＡｃ－Ｉ－ＲＳ）＃１４株から単離した。それらは、ハイグロマイシン　ホスホトランスフェラーゼに対する遺伝子を含む転移ｄＡｃ－Ｉ－ＲＳ因子（受入番号ＡＢ０５５０６４）を持っていた。＃１４－２２．４．４Ｗ３（Ｔ－１２００）及び＃１４－６８．１．４（Ｔ－１７００）の背景は、両者共にＬｅｒエコタイプであった。

【００３９】

実施例１　（ａｓ２遺伝子のクローニング）
減数分裂組換え休止点を作成し、ａｓ２－１突然変異と隣接するトランスポゾンマーカー＃１４－６８．１．４（Ｔ－１７００）及び＃１４－２２．４．４Ｗ３（Ｔ－１２００）との間の組換えをスクリーニングすることによって、ａｓ２遺伝子の近傍で同定した。ハイグロマイシン耐性を示し、ａｓ２－１の表現型を持つ、このような組換え体を用いて、ａｓ２遺伝子に関するＰＣＲ－ＲＦＬＰマーカーの地図上の位置決めを行った。ＰＣＲ－ＲＦＬＰマーカーとして用いた配列に関する情報は、ペンシルベニア大学、ＴＡＩＲウエブサイト（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ．ｏｒｇ／）におけるシロイヌナズナゲノムセンターのウエブサイトから入手し、ＢＡＣクローンＦ５Ｉ１４（ジーンバンク受入番号ＡＣ００１２２９）のＰＣＲ－ＲＦＬＰマーカーのヌクレオチド配列は以下のとおりである：
マーカー１については、
５’－ＴＧＴＡＡＣＴＣＴＴＣＣＧＴＣＣＧＧＴＴＴＧ－３’及び
５’－ＧＣＡＡＡＧＴＣＣＡＴＡＧＡＧＧＡＧＣＡＡＧ－３’、
マーカー２については、
５’－ＴＴＧＧＧＴＴＴＧＣＡＣＣＧＡＡＡＣＴＣＡＧ－３’及び
５’－ＡＧＴＧＡＣＡＧＡＣＡＧＴＧＡＣＣＡＣＡＡＧ－３’、
マーカー３については、
５’－ＴＧＧＴＧＧＧＡＴＧＡＡＡＣＴＴＴＧＴＧＡＧ－３’及び
５’－ＣＴＣＴＣＴＣＴＴＴＣＴＣＡＣＴＣＴＴＣＴＣ－３’、
マーカー４については、
５’－ＡＧＡＡＡＡＣＴＧＣＴＧＴＣＴＴＣＧＧＧＡＣ－３’及び
５’－ＴＣＣＡＡＡＧＣＡＣＴＣＴＣＴＡＧＣＴＴＧＧ－３’
である（図１参照）。
【００４０】
実施例２　（相補性解析）
相補性実験に関する二成分プラスミドを構築するために、６．１６ｋｂｐのＡｐａＩ－ＨｐａＩ断片（図１における断片Ｉ）、４．７５ｋｂｐのＢｓｕ３６Ｉ－ＨｐａＩ断片（図１断片ＩＩ）及び２．２ｋｂｐのＢｓｕ３６Ｉ－ＢｇｌＩＩ断片（図１の断片ＩＩＩ）を、ｐＢＩ１０１（Ｊｅｆｆｅｒｓｏｎ，　Ｒ．Ａ．，　ｅｔ　ａｌ．　（１９８７）ＥＭＢＯ　Ｊ．　６：３９０１－３９０７）に由来し、１’プロモータ：：バー（Ｙｏｓｈｉｏｋａ，　Ｙ．，　ｅｔ　ａｌ．　（２００１）　Ｇｎｅｓｅ．　Ｇｅｎｅｔ．　Ｓｙｓｔ．　７６：１８９－１９８）を含むｐＢＩ－ＢＡＲプラスミドに別々に挿入した。新しく構築したプラスミドをアグロバクテリウム（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｔｕｍｅｆａｃｉｅｎｓ）株、ＧＶ３１０１に導入した。次いで、別に記載するように（Ｃｌｏｕｇｈ，　Ｓ．Ｊ．　ａｎｄ　Ｂｅｎｔ，　Ａ．Ｆ．　（１９９８）　Ｐｌａｎｔ　Ｊ．　１６：７３５－７４３、　Ｇａｌｂｉａｔｉ，Ｍ．，　ｅｔ　ａｌ．　（２０００）　Ｆｕｎｃｔ．　Ｉｎｔｅｇｒ．　Ｇｅｎｏｍｉｃｓ１：２５－３４）、吸引浸潤により植物全体を形質転換した。０．０１％のバスタ（Ｂａｓｔａ）（ドイツ、フランクフルト、ＡｇｒｏＥｖｏ）を含む土壌にてトランスジェニック植物を選抜したが、それは、どの遺伝子型のトランスジェニック植物をサザンブロットで解析したかということである。
【００４１】
実施例３　（ｃＤＮＡのクローニング）
１６日令の植物からポリ（Ａ）$^{+}$ＲＮＡを調製した。逆転写ＰＣＲのために、ｃＤＮＡの第１の鎖は、浜田らの方法（Ｈａｍａｄａ，　Ｓ．，　ｅｔ　ａｌ．　（２０００）　Ｐｌａｎｔ　Ｊ．　２４：９１－１０１）に準じて作成した。次いで、プライマー、
ＯＲＦ１５ＳＦ（５’－ＧＧＧＴＣＧＡＣＡＴＧＧＣＡＴＣＴＴＣＴＴＣＡＡＣＡＡＡＣＴＣＡＣ－３’）及び
ＯＲＦ１５ＮＲ（５’－ＧＧＧＣＧＧＣＣＧＣＴＣＡＡＧＡＣＧＧＡＴＣＡＡＣＡＧＴＡＣＧＧＣ－３’）

によりａｓ２のｃＤＮＡを増幅した。次いで増幅した断片をｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔＳＫ（－）（米国カリフォルニア州、ラホヤのストラタジーン）のＳａｌＴ／ＮｏｔＩ部位に連結し、ヌクレオチドの配列決定によって同一性を確認した。ｃＤＮＡの５’末端配列は、プライマー、ＯＲＦ１５ＭＲ（５’－ＴＡＴＣＴＧＡＡＧＣＴＧＡＣＧＡＡＧＣＴＧＡＴＧ－３’）を伴った５’－ＲＡＣＥ及びアダプタプライマーにより決定した。ｃＤＮＡの３’末端配列は、プライマー、ＯＲＦ１５ＭＦ（５’－ＧＡＴＣＴＣＡＧＣＴＧＴＧＣＴＡＡＡＴＣＴＧＡＧＣ－３’）を伴った３’－ＲＡＣＥ及びアダプタプライマーにより決定した。突然変異対立遺伝子（ａｓ２－１、ａｓ２－２、ａｓ２－４及びａｓ２－５）のヌクレオチド配列は、各変異体のゲノムＤＮＡからａｓ２遺伝子領域を増幅することによって決定した。各変異植物から単離されていたポリ（Ａ）$^{+}$ＲＮＡから得たａｓ２のｃＤＮＡのヌクレオチド配列も決定した。

【００４２】

実施例４　（系統樹解析）

ＴＡＩＲ　ＢＬＡＳＴの２．０バージョンのプログラムを用いて（ｈｔｔｐ：／／ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ．ｏｒｇ／Ｂｌａｓｔ／ｉｎｄｅｘ．ｈｔｍｌ）、ＴＡＩＲでのＡＧＩデータセット（ＡＧＩ、全ゲノムからのタンパク質）からａｓ２に類似したシロイヌナズナの遺伝子を入手した。ゲノムネットブラストＴ２プログラム（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｂｌａｓｔ．ｇｅｎｏｍｅ．ａｄ．ｊｐ／）を用いて、ゲノムネットにおけるデータセットからその他の植物種のａｓ２様遺伝子を入手した。ＣＬＵＳＴＡＬ　Ｗのバージョン１．８（Ｔｈｏｍｐｓｏｎ，　Ｊ．Ｄ．，　ｅｔ　ａｌ．　（１９９４）　Ｎｕｃｌ．　Ａｃｉｄ．　Ｒｅｓ．　２２：４６７３－４６８０）を用いてシロイヌナズナのＡＳ２ファミリーの４２メンバーのＡＳ２ドメインの配列を並べた。最尤（ＭＬ）系統樹の構築のために、部分的再構成検索のために出発系統樹として近隣連結（ＮＪ）系統樹を用いた。ＭＯＬＰＨＹのバージョン２．３ｂ３パッケージにおけるＮＪｄｉｓｔ及びｐｒｏｔＭＬプログラムを用いた（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｉｓｍ．ａｃ．ｊｐ／ｓｏｆｔｗａｒｅ／ｉｓｍｌｉｂ／ｓｏｆｔｏｔｈｅｒ．ｈｔｍ＃ｍｏｌｐｈｙ；Ａｄａｃｈｉ，　Ｊ．　ａｎｄ　Ｈａｓｅｇａｗａ，　Ｍ．　（１９９６）　Ｃｏｍｐｕｔ．　Ｓｃｉ．　Ｍｏｎｏｇｒ．　２８：１－１５０）。ＮＪｄｉｓｔからＮＪ系統樹を得て、ＰｒｏｔＭＬからＭＬ系統樹を得た。

それぞれの分枝の部分的なブートストラップ確率は、ＰｒｏｔＭＬプログラムを用いて概算した（Ｈｉｍｉ，　Ｓ．，　ｅｔ　ａｌ．　（２００１）　Ｊ．　Ｍｏｌ．　Ｅｖｏｌ．　５３：３８７－３９３、　Ｓａｋａｋｉｂａｒａ，　Ｋ．，　ｅｔ　ａｌ．，　（２００１）　Ｍｏｌ．　Ｂｉｏｌ．　Ｅｖｏｌ．　１８：４９１－５０２）。

【００４３】

実施例５　（ＲＮＡのゲルブロット解析）

Ｃｏｌ－０野生型植物の解析のために、１２日令の植物から採取した根、子葉、葉、及び茎頂、２８日令植物から採取した花芽、及び３５日令植物から採取したロゼット葉、茎上葉、花の茎及び長角果を用いた。等量の１．０ｍｇのポリ（Ａ）$^{+}$ＲＮＡを単離し、ノーザンブロットを行った。ａｓ２に対する部分的ｃＤＮＡをプローブとして用いた。

プライマー１（５’－ＧＡＴＣＴＣＡＧＣＴＧＴＧＣＴＡＡＡＴＣ－３’）及び

プライマー２（５’－ＴＣＡＡＧＡＣＧＧＡＴＣＡＡＣＡＧＴＡＣ－３’）

を用いてＰＣＲによりそれを増幅し、ＰＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔＳＫ（－）のＥｃｏＲＶ部位にクローニングした。ヌクレオチドの配列決定によりその同一性を確認した。ＯＲＦのコドン１５１からコドン２００を伸長したプラスミドｐａｓ２ｃ３００をＥｃｏＲＩとＣｌａＩで切断することにより作成された、停止コドンを持つ３００ｂｐの断片をハイプライムＤＮＡラベリングキット（ドイツ、マンハイムのベーリンガーマンハイム）を用いて、製造元の指示書に従って、［α－^{32}Ｐ］ｄＣＴＰで標識した。この標識した断片をプローブとして用いた。

【００４４】

実施例６　（インスート（ｉｎ　ｓｉｔｕ）ハイブリダイゼーション法）

植物の固定、パラフィン包埋及びｉｎ ｓｉｔｕハイブリッド形成のために用いた方法の詳細は、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｇｅｎｅｔｉｃｓ．ｗｉｓｃ．ｅｄｕ／ＣＡＴＧ／ｂａｒｔｏｎ／ｉｎｄｅｘ．ｈｔｍｌで見い出すことができ、中西らの方法（Ｎａｋａｓｈｉｍａ，Ｍ．，ｅｔ ａｌ（１９９８）Ｐｌａｎｔ ｃｅｌｌ Ｐｈｙｓｉｏｌ．３９：６９０－７００）に準じて行った。ミクロトーム（日本の東京のエルマ社）を用いて切片（厚さ８μｍ）を作成した。ＣｌａＩでプラスミドｐａｓ２ｃ３００を線状化した後、Ｔ３ ＲＮＡポリメラーゼによりアンチセンスＲＮＡプローブを作成した。センスＲＮＡプローブは、ＥｃｏＲＩでｐａｓ２ｃ３００を線状化した後、Ｔ７ ＲＮＡポリメラーゼによって作成した。

【００４５】

実施例７ （プラスミドの構築）

ＣａＭＶ ３５Ｓプロモータの下流の二成分ベクターｐＳＫ１（Ｋｏｊｉｍａ，Ｓ．，ｅｔ ａｌ．（１９９９）ＤＮＡ Ｒｅｓ．６：４０７－４１０）のＸｂａＩ及びＮｏｔＩ部位にて開始コドンから停止コドンまで伸長したａｓ２ｃＤＮＡ（６００ｂｐ）の断片を挿入することによってプラスミドｐＳＫ３５Ｓ：：ａｓ２を構築した。ｐＴＨ－２（Ｃｈｉｕ，Ｗ．，ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ｃｕｒｒ．Ｂｉｏｌ．６：３２５－３３０）のＳａｌＩとＮｃｏＩ部位にて、開始コドンから１９９番目のアミノ酸コドンまで伸長したａｓ２ｃＤＮＡ（５９７ｂｐ）断片及び３つのアラニンリンカー配列（５’ＧＣＡＧＣＴＧＣＣ３’）を挿入することによりプラスミドｐ３５Ｓ：：ａｓ２：：ＧＦＰを構築した。３５Ｓ：：ＮＬＳ：：ＧＦＰ及び３５Ｓ：：ＧＦＰを含むプラスミドは西浜らの方法（Ｎｉｓｈｉｈａｍａ，Ｒ．，ｅｔ ａｌ．（２００１）Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ．１５：３５２－３６３）に準じて調製した。

【００４６】

実施例８ （シロイヌナズナの形質転換）

小野内らの方法（Ｏｎｏｕｃｈｉ，Ｈ．，ｅｔ ａｌ．（１９９５）Ｍｏｌ．Ｇｅｎ．Ｇｅｎｅｔ．２４７：６５３－６６０）に準じて、アグロバクテリウムが介在するシロイヌナズナの根外植片の形質転換を行った。ｐＳＫ３５Ｓ：：ａｓ２又はｐＳＫ１（Ｋｏｊｉｍａ ｅｔ ａｌ．（１９９９））を入れたアグロバクテリウムＬＢＡ４４０４／ｐＡＬ４４０４（Ｈｏｅｋｅｍａ，Ａ．，ｅｔ ａｌ．（１９８４）Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ １５８：３８３－３８５）細胞を根外植片と共に培養した。１５ｍｇ／ＬのハイグロマイシンＢ（Ｏｎｏｕｃｈｉ ｅｔ ａｌ．（１９９５））の存在下、シュート誘導培地で形質転換体を選抜した。プラスミドｐＳＫ３５Ｓ：：ａｓ２又はｐＳＫ１を用いてＡ．ｔｕｍｅｆａｃｉｅｎｓ株ＧＶ３１０１を形質転換した。次いで、吸引浸潤により植物全体を形質転換した。１５ｍｇ／ＬのハイグロマイシンＢ及び３００ｍｇ／Ｌのカルベニシリンを含むＭＳ培地でトランスジェニック植物を選抜した。

【００４７】

実施例９ （ａｓ２：：ＧＦＰタンパクの細胞小器官局在）

フォンアミムらの方法（ｖｏｎ Ａｍｉｍ，Ａ．Ｇ．ａｎｄ Ｄｅｎｇ，Ｘ．Ｗ．（１９９４）Ｃｅｌｌ ７９：１０３５－１０４５）に従って、タマネギ球根の上皮層における細胞をｐ３５Ｓ：：ａｓ２：：ＧＦＰ、ｐ３５Ｓ：：ＮＬＳ：：ＧＦＰ又はｐ３５Ｓ：：ＧＦＰで形質転換した。冷却ＣＣＤカメラシステム（アリゾナ州、トゥーソンのフォトメトリクス）を装備した蛍光顕微鏡（ドイツ製、アキシオプラン２）によって蛍光シグナルを記録した。画像の疑似着色及びＧＦＰからのシグナル量と細胞の幅の測定は、ＩＰラボソフトウエアプログラム（バージニア州フェアファックスのスキャナリティクス）により行った。同一の細胞を１μｇ／ｍＬの４’６－ジアミジノ－２－フェニルインドールジヒドロクロリド（ＤＡＰＩ）で染色し、同様に蛍光を記録した。

【００４８】

実施例１０ （逆転写－ポリメラーゼ鎖反応（ＲＴ－ＰＣＲ））

トランスジェニック植物及び野生型の花芽を採取し、直ちに液体窒素中で凍結し、－８０℃に保存した。ポリ（Ａ）$^{+}$ ＲＮＡを精製し、ｃＤＮＡの第１鎖を合成した。α－チュー

ブリンｃＤＮＡ特異的なプライマーによるＤＮＡ断片の均等な増幅を行うために試料の体積を正規化した。次いで、セミアルチらの方法（非特許文献２３参照）によりＰＣＲを行った。内因性ａｓ２の転写物に特異的に由来するＤＮＡ断片を増幅するために、ａｓ２転写物の５’及び３’非翻訳領域においてプライマーセットの設計のための部位を選択したが、それらは両方共、トランスジェニック植物を作出するのに用いたｃＤＮＡには存在しない。プライマー対は以下のとおりである：

α－チューブリンについては、

ｐＵ５１（５’－ＧＧＡＣＡＡＧＣＴＧＧＧＡＴＣＣＡＧＧ－３’）及び

ｐＵ５２（５’－ＣＧＴＣＴＣＣＡＣＣＴＴＣＡＧＣＡＣＣ－３’）、

ａｓ２遺伝子のｃＤＮＡの非翻訳領域については、

ｐＵ７３（５’－ＣＣＣＣＴＣＴＧＡＧＣＡＡＣＡＧＡＡＡＧＣ－３’）及び

ｐＵ７４（５’－ＣＣＡＡＡＡＣＣＣＴＡＡＡＡＴＣＴＣＡＡＧＡＣＧＧ－３’）、

ａｓ２ｃＤＮＡのオープンリーディングフレームの領域については

ｐＵ３２８（５’－ＧＴＧＴＴＴＧＧＡＧＣＡＡＧＴＡＡＣＧＴ－３’）及び

ｐＵ３１５（５’－ＡＡＡＣＣＴＡＧＧＡＧＡＣＧＧＡＴＣＡＡＣＡＧＴＡＣＧＧＣＧ－３’）

である。

【００４９】

【発明の効果】

本発明は、核における特定の遺伝子の転写、対称性で平坦な葉身の発生、及び葉の葉脈の確立を制御している新規なタンパク質ＡＳ２、及びそのファミリーを提供するものである。

本発明の植物の葉形成関連タンパク質ＡＳ２は、アミノ酸配列としてシステインに富むＣ‐モチーフからなるシステイン反復配列、特定の位置でのグリシン、及びロイシンジッパー様モチーフを有することを特徴とするものであり、このような特徴的なアミノ酸配列を有する１群のタンパク質が植物、好ましくはシロイロナズナに存在し、これらのタンパク質が植物の葉形成に関連し、葉の形成を制御していることを本発明は明らかにするものである。したがって、本発明は、これらのタンパク質ＡＳ２からなる植物の葉の形成、成長、保存の制御剤を提供するものである。

【００５０】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

〈110〉 Japan Science and Technology Corporation

〈120〉 AS2 potein for leaf development and gene of coding thereof

〈130〉 PA901995

〈160〉 22

〈170〉 PatentIn version 3.1

〈210〉 1

〈211〉 1055

〈212〉 DNA

〈213〉 Arabidopsis thaliana

〈220〉

〈221〉 CDS

〈222〉 (232)..(831)

〈300〉

〈301〉 Iwakawa,H., Ueno,Y., Semiarti,E., Onouchi,H., Kojima,S., Tsukaya,H., Hasebe,Y., Soma,T., Ikezaki,M., Machida,C. and Machida,Y.

〈302〉 The ASYMMETRIC LEAVES2 gene of Arabidopsis thaliana, required for formation of a symmetric flat leaf lamina, encodes a member of a novel family of proteins characterized by cysteine repeats and a leucine zipper

〈303〉 Plant Cell Physiol.

〈304〉 43

〈305〉 5

〈306〉 467-478

〈307〉 2002-05-15

〈308〉 Gen Bank/AB080802

〈309〉 2002-04-03

〈313〉 (1)..(2)

〈400〉 1

attgatccca tctgttttgt tccctatatt tcgttaatcc atccatacgc attccaacta 60

cacgcttttt gtatgcaacc ccaaatagca gcttaaagaa agcagagagg atcttctttt 120

atttcccctc tgagcaacag aagccattat tcaaagaaag gcttctttaa tttactcgca 180

gggagaggga aaagagaaaa aattgaaaaa ctccattttc aagtcattaa a atg gca 237
Met Ala
1

tct tct tca aca aac tca cca tgc gcc gct tgc aaa ttc ctc cgg cga 285
Ser Ser Ser Thr Asn Ser Pro Cys Ala Ala Cys Lys Phe Leu Arg Arg
5 10 15

aaa tgt caa ccg gaa tgt gta ttc gcg ccc tat ttc cca ccg gac cag 333
Lys Cys Gln Pro Glu Cys Val Phe Ala Pro Tyr Phe Pro Pro Asp Gln
20 25 30

cca caa aaa ttc gca aac gtt cac aaa gtg ttt gga gca agt aac gtg 381
Pro Gln Lys Phe Ala Asn Val His Lys Val Phe Gly Ala Ser Asn Val
35 40 45 50

aca aag ctc ctc aac gag ctt cac cct tca caa cgt gaa gac gca gtg 429
Thr Lys Leu Leu Asn Glu Leu His Pro Ser Gln Arg Glu Asp Ala Val

55 60 65

aac tct ttg gcc tat gaa gcc gac atg cgc ctc cgt gac cct gtc tac 477
Asn Ser Leu Ala Tyr Glu Ala Asp Met Arg Leu Arg Asp Pro Val Tyr
70 75 80

ggc tgc gtc ggc gtc atc tct ctc ctc caa cat cag ctt cgt cag ctt 525
Gly Cys Val Gly Val Ile Ser Leu Leu Gln His Gln Leu Arg Gln Leu
85 90 95

cag ata gat ctc agc tgt gct aaa tct gag ctc tct aag tac caa agc 573
Gln Ile Asp Leu Ser Cys Ala Lys Ser Glu Leu Ser Lys Tyr Gln Ser
100 105 110

ctc ggt atc ctc gcc gcc act cat cag agt ctt ggc atc aac tta ctc 621
Leu Gly Ile Leu Ala Ala Thr His Gln Ser Leu Gly Ile Asn Leu Leu
115 120 125 130

gcc gga gca gca gat gga aca gcc acc gcc gtg aga gac cac tat cac 669
Ala Gly Ala Ala Asp Gly Thr Ala Thr Ala Val Arg Asp His Tyr His
135 140 145

cac cac cag ttt ttt cct aga gaa caa atg ttt ggt ggc ttg gat gtt 717
His His Gln Phe Phe Pro Arg Glu Gln Met Phe Gly Gly Leu Asp Val
150 155 160

ccg gcc ggt aac aac tac gac ggt ggg att ctt gcc att gga cag atc 765
Pro Ala Gly Asn Asn Tyr Asp Gly Gly Ile Leu Ala Ile Gly Gln Ile
165 170 175

act cag ttt cag cag ccg aga gcc gcc gct gga gat gat ggt cgc cgt 813
Thr Gln Phe Gln Gln Pro Arg Ala Ala Ala Gly Asp Asp Gly Arg Arg
180 185 190

act gtt gat ccg tct tga gattttaggg ttttggtggt gttcatcttc 861
Thr Val Asp Pro Ser
195

gtcgatcgct tggtgatgag aaaactataa ttttaagaaa atatttgatg tggaaaacca 921

aaatatttta aacgtatggt acgtctctct taatgacatt aatttcggtt tttattatta 981

ttattactta gatatattat gatagtcact tttgtatttc tttcaaattt tatggacttg 1041

ctctcttaat tgat 1055

〈210〉 2
〈211〉 199
〈212〉 PRT
〈213〉 Arabidopsis thaliana

〈400〉 2

Met Ala Ser Ser Ser Thr Asn Ser Pro Cys Ala Ala Cys Lys Phe Leu
1 5 10 15
Arg Arg Lys Cys Gln Pro Glu Cys Val Phe Ala Pro Tyr Phe Pro Pro
20 25 30

Asp Gln Pro Gln Lys Phe Ala Asn Val His Lys Val Phe Gly Ala Ser
35 40 45
Asn Val Thr Lys Leu Leu Asn Glu Leu His Pro Ser Gln Arg Glu Asp
50 55 60
Ala Val Asn Ser Leu Ala Tyr Glu Ala Asp Met Arg Leu Arg Asp Pro
65 70 75 80
Val Tyr Gly Cys Val Gly Val Ile Ser Leu Leu Gln His Gln Leu Arg
85 90 95
Gln Leu Gln Ile Asp Leu Ser Cys Ala Lys Ser Glu Leu Ser Lys Tyr
100 105 110
Gln Ser Leu Gly Ile Leu Ala Ala Thr His Gln Ser Leu Gly Ile Asn
115 120 125
Leu Leu Ala Gly Ala Ala Asp Gly Thr Ala Thr Ala Val Arg Asp His
130 135 140
Tyr His His His Gln Phe Phe Pro Arg Glu Gln Met Phe Gly Gly Leu
145 150 155 160
Asp Val Pro Ala Gly Asn Asn Tyr Asp Gly Gly Ile Leu Ala Ile Gly
165 170 175
Gln Ile Thr Gln Phe Gln Gln Pro Arg Ala Ala Ala Gly Asp Asp Gly
180 185 190
Arg Arg Thr Val Asp Pro Ser
195

〈210〉 3
〈211〉 22
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence
〈220〉

〈223〉 primer

〈400〉 3
tgtaactctt ccgtccggtt tg 22

〈210〉 4
〈211〉 22
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence
〈220〉
〈223〉 primer

〈400〉 4
gcaaagtcca tagaggagca ag 22

〈210〉 5
〈211〉 22
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence
〈220〉
〈223〉 primer

〈400〉 5
ttgggtttgc accgaaactc ag 22

〈210〉 6

〈211〉 22
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence
〈220〉
〈223〉 primer

〈400〉 6
agtgacagac agtgaccaca ag 22

〈210〉 7
〈211〉 22
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence
〈220〉
〈223〉 primer

〈400〉 7
tggtgggatg aaactttgtg ag 22

〈210〉 8
〈211〉 22
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence
〈220〉
〈223〉 primer

〈400〉 8

ctctctcttt ctcactcttc tc 22

〈210〉 9
〈211〉 22
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence
〈220〉
〈223〉 primer

〈400〉 9
agaaaactgc tgtcttcggg ac 22

〈210〉 10
〈211〉 22
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence
〈220〉
〈223〉 primer

〈400〉 10
tccaaagcac tctctagctt gg 22

〈210〉 11
〈211〉 33
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 primer

〈400〉 11

gggtcgacat ggcatcttct tcaacaaact cac 33

〈210〉 12

〈211〉 33

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 primer

〈400〉 12

gggcggccgc tcaagacgga tcaacagtac ggc 33

〈210〉 13

〈211〉 24

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 primer

〈400〉 13

tatctgaagc tgacgaagct gatg 24

〈210〉 14
〈211〉 24
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence
〈220〉
〈223〉 primer

〈400〉 14
gatctcagct gtgctaaatct gagc 24

〈210〉 15
〈211〉 20
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence
〈220〉
〈223〉 primer

〈400〉 15
gatctcagct gtgctaaatc 20

〈210〉 16
〈211〉 20
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence
〈220〉
〈223〉 primer

〈400〉 16
tcaagacgga tcaacagtac 20

〈210〉 17
〈211〉 19
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence
〈220〉
〈223〉 primer

〈400〉 17
ggacaagctg ggatccagg 19

〈210〉 18
〈211〉 19
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence
〈220〉
〈223〉 primer

〈400〉 18
cgtctccacc ttcagcacc 19

〈210〉 19
〈211〉 21
〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence
〈220〉
〈223〉 primer

〈400〉 19
cccctctgag caacagaaag c 21

〈210〉 20
〈211〉 25
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence
〈220〉
〈223〉 primer

〈400〉 20
ccaaaaccct aaaatctcaa gacgg 25

〈210〉 21
〈211〉 20
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence
〈220〉
〈223〉 primer

〈400〉 21
gtgtttggag caagtaacgt 20

〈210〉 22
〈211〉 30
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence
〈220〉
〈223〉 primer

〈400〉 22
aaacctagga gacggatcaa cagtacggcg 30

【図面の簡単な説明】
【図１】図１は、シロイヌナズナの第１染色体のａｓ２遺伝子座を含むゲノムの領域構造及びゲノム断片による相補性解析の結果を示すものである。図１Ａはシロイヌナズナの第１染色体のゲノムの領域構造を示し、Ｔ－１２００及びＴ－１７００は、ハイグロマイシン耐性（Ｈｙｇｒ）遺伝子によるｄＡｃ－Ｉ－ＲＳ転移因子の位置を示す。図１Ｂは、ＢＡＣクローンＦ５Ｉ１４、その中のマーカー位置を含むａｓ２周辺の染色体領域の拡大図及び相補性解析の結果を示す。ａｓ２ｃＤＮＡの構造をゲノム構造の下に示す。相補性解析に用いた制限断片は、Ｉ、ＩＩ、ＩＩＩと表記された水平の線で示す。右側の記号＋及び－はそれぞれ、相当するＤＮＡ断片との相補性試験の正及び負の結果を示す。
【図２】図２は、本発明のタンパク質ＡＳ２のアミノ酸配列の例を示す。Ｃモチーフにおけるシステインの位置及びロイシンジッパー様配列における疎水性残基の位置は、それぞれ星印（＊）及び点（・）で示す。種々のａｓ２対立遺伝子における突然変異したアミノ酸残基は、野生型配列の上にイタリック体で示す。
【図３】図３は、本発明のタンパク質ＡＳ２のドメインの構成及び特有の特徴を示す。ボックスの下でブラケットで示す領域はＡＳ２ドメインである。灰色のボックス及び縞のあるボックスはそれぞれＣモチーフ及びロイシンジッパー様配列を表す。ａｓ２－１、ａｓ２－２、ａｓ２－４及びａｓ２－５の突然変異の部位を示す。ボックスの下の数はアミノ酸残基の位置を示す。
【図４】図４は、ＡＳ２ファミリーメンバーにおけるＡＳ２ドメインのアミノ酸配列の比較を示す。ＡＳ２ファミリーのメンバーの相当する領域の配列と共に、ＡＳ２の８番目から１０９番目の残基を並べる。２０を超えるメンバーで保存されているアミノ酸残基を黒色背景上の白色文字で示す。Ｃモチーフにおけるコンセンサス配列及びロイシンジッパー様配列における疎水性残基は、それぞれ星印（＊）及び点（・）で示す。ファミリーのメンバーすべてで保存されており、ａｓ２－５対立遺伝子で突然変異していたグリシン残基は星印２つ（＊＊）で示す。シロイヌナズナのＡＳ２ファミリーのメンバーは２つのクラス（クラスＩ及びクラスＩＩ）に分割することができる。クラスＩＩの３を超えるメンバーで保存されていたアミノ酸残基を灰色で示している。その他の植物における、Ｏ．ｓ．はＯｒｙｚａ ｓａｔｉｖａ（イネ）を示し、Ｇ．ｍ．はＧｌｙｃｉｎｅ ｍａｘ（ダイズ）を示し、Ｌ．ｅ．はＬｙｃｏｐｅｒｓｉｃｏｎ ｅｓｃｕｌｅｎｔｕｍ（トマト）を示す。
【図５】図５は、シロイヌナズナのＡＳ２ファミリータンパク質の４２メンバーに関する系統樹を示す。分枝上の数は、ＰｒｏｔＭＬプログラムで計算された、そこにおけるブーツストラップ値を表す。各水平の枝の長さは、概算された進化上の距離に比例するするように表示されている。右側の区分は、ＡＳ２ファミリーのメンバーの分類を示す。

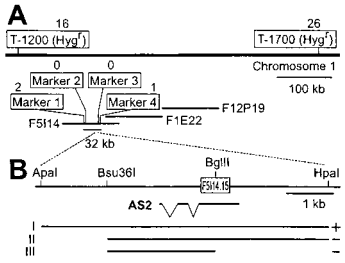
【図６】図６は、シロイヌナズナの種々の器官におけるａｓ２転写物のポリ（Ａ）$^{+}$ＲＮＡのノーザンブロット解析の結果を示す図面に代わる写真である。１２日令植物の根（レーン１）、子葉（レーン２）、葉（レーン３）、及び茎頂（レーン４）、２８日令植物の花芽（レーン５）、及び３５日令植物のロゼット葉（レーン６）、茎上葉（レーン７）、花の茎（レーン８）及び長角果（レーン９）から等量の１．０μｇのポリ（Ａ）$^{+}$ＲＮＡを調製した。同じブロットを対照としてＥφ－チューブリン（ＴＵＢＡ）をプローブとして調べた。右側の数はマーカーＲＮＡ分子の大きさを示す。

【図７】図７は、インスート（ｉｎ　ｓｉｔｕ）ハイブリダイゼーション法によるａｓ２転写物の検出（ａ～ｄ）結果を示す図面に代わる写真である。アンチセンスプローブで得られたａｓ２転写物の分布パターン。（ａ）球状ステージ；（ｂ）三角ステージ；（ｃ）ハート型ステージ；（ｄ）魚雷型ステージ；（ｅ）（ａ）～（ｄ）のセンス対照。種皮の真下の細胞層の赤味がかった茶色の着色（白色の星印で示す）は、両方のプローブで生じるのでａｓ２のＲＮＡに特異的ではない。縮尺棒は２０μｍを示す。

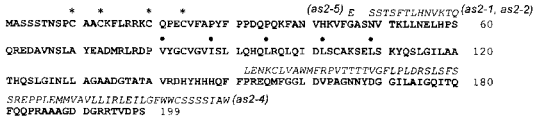
【図８】図８は、タマネギの上皮細胞におけるａｓ２：：ＧＦＰの細胞小器官局在化の結果を示す図面に代わる写真である。３５Ｓ：：ａｓ２：：ＧＦＰ（Ａ、Ｂ）、３５Ｓ：：ＮＬＳ：：ＧＦＰ（Ｃ、Ｄ）及び３５Ｓ：：ＧＦＰ（Ｅ、Ｆ）を衝撃法によりタマネギの上皮細胞に導入し、導入した組織を２８℃にて１６時間培養した。蛍光顕微鏡下で蛍光をモニターした（左側のパネル）。１μｇ／ｍＬのＤＡＰＩで染色した核を右側のパネルに示す。縮尺棒は１００μｍを示す。

【図９】図９は、ａｓ２のｃＤＮＡを過剰発現したトランスジェニックシロイヌナズナのカルス及び植物の表現型、及びａｓ２遺伝子の転写物の蓄積の結果を示す図面に代わる写真である。図９Ａは、空のベクターｐＳＫ１（ａ）及びｐＳＫ３５Ｓ：：ａｓ２（ｂ）による、Ｃｏｌ－０由来の根断片の形質転換の結果を示す。縮尺棒は１０ｍｍを示す。図９Ｂは、トランスジェニックシロイヌナズナ植物の表現型を示す。（ａ）は空のベクターｐＳＫ１で形質転換した３５日令の植物の場合であり、（ｂ）はｐＳＫ３５Ｓ：：ａｓ２で形質転換した３５日令の植物であり、（ｃ）はｐＳＫ３５Ｓ：：ａｓ２で形質転換した２５日令の植物であり、（ｄ）はパネルｃの植物をさらに１５日間成長させたものである。縮尺棒は１０ｍｍを示す。図９Ｃは、トランスジェニック植物及び野生型植物（Ｃｏｌ－０）におけるａｓ２遺伝子の転写物のＲＴ－ＰＣＲ解析の結果を示す。サイクル数をそれぞれパネルの右側に示す。レーン１、パネルＢ（ｄ）に示されるトランスジェニック植物；レーン２、野生型（Ｃｏｌ－０）植物であり、ａｓ２転写物のオープンリーディングフレームの領域に特異的なプライマーで増幅した産物（ａ；ＯＲＦ）、ａｓ２転写物の３’非翻訳領域に特異的なプライマーで増幅した産物（ｂ；ＵＴＲ）、及びα－チューブリンに対する遺伝子の転写産物に特異的なプライマーで増幅した産物（ｃ；α－ｔｕｂｕｌｉｎ）を示す。図９Ｄは、葉の表現型を示す。典型的な３５日令の野生型Ｃｏｌ－０植物（ａ）及びａｓ２－１植物（ｂ）の５番目の葉を示す。軽い表現型の変化（ｃ）及び厳しい表現型の変化（ｄ）を示すトランスジェニック植物の典型的な葉を示す。縮尺棒は５ｍｍを示す。

【図１】



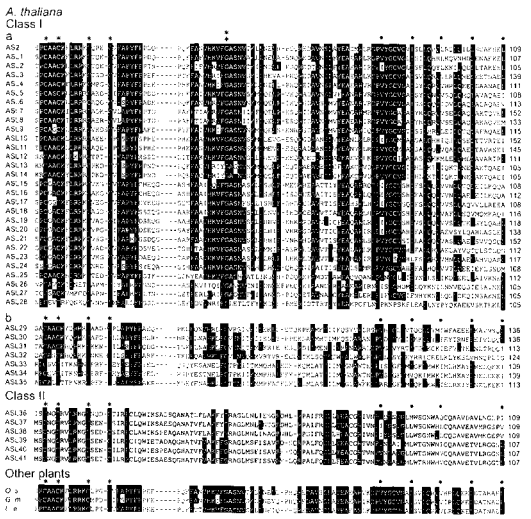
【図２】



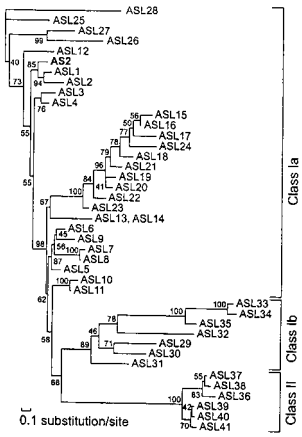
【図３】



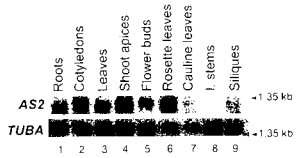
【図４】



【図５】



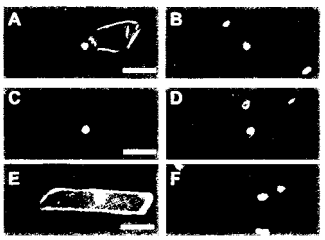
【図６】



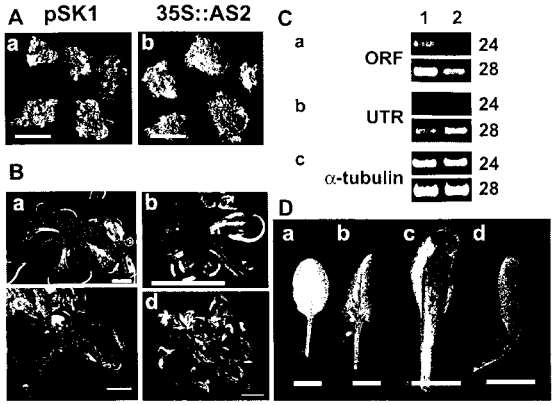
【図７】



【図８】



【図９】


A pSK1
35S::AS2
a
b
B
a
b
d
C
1 2
a
ORF
24
28
b
UTR
24
28
c
α-tubulin
24
28
D
a b c d

フロントページの続き

Ｆターム(参考) 4H011 AB03 BB19 DH11
4H045 AA10 AA30 BA10 CA30 EA05 FA74