

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4782925号
(P4782925)

(45) 発行日 平成23年9月28日 (2011.9.28)

(24) 登録日 平成23年7月15日 (2011.7.15)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 15/113 (2010.01)

C 1 2 N 15/00 G

A O 1 H 5/00 (2006.01)

A O 1 H 5/00 A

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/00 1 O 3

C 1 2 N 9/10 (2006.01)

C 1 2 N 9/10

請求項の数 14 (全 89 頁)

(21) 出願番号 特願2000-560270 (P2000-560270)
 (86) (22) 出願日 平成11年7月12日 (1999.7.12)
 (65) 公表番号 特表2002-520062 (P2002-520062A)
 (43) 公表日 平成14年7月9日 (2002.7.9)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP1999/004940
 (87) 国際公開番号 W02000/004173
 (87) 国際公開日 平成12年1月27日 (2000.1.27)
 審査請求日 平成18年7月12日 (2006.7.12)
 (31) 優先権主張番号 09/118,276
 (32) 優先日 平成10年7月17日 (1998.7.17)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 501018298
 バイエル・バイオサイエンス・エヌ・ヴェー
 ー
 Bayer BioScience N.
 V.
 ベルギー国、ペー-9052 ゲント、テ
 ヒノロヒーパルク 38
 (74) 代理人 100078662
 弁理士 津国 肇
 (74) 代理人 100075225
 弁理士 篠田 文雄
 (72) 発明者 バビーチュク, エレナ
 ベルギー国、ペー-9000 ヘント、ア
 ストリドラーン 361デー

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 真核細胞におけるプログラムされた細胞死を調節する方法及び手段

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ストレス耐性である植物を産生するための方法であって、該方法は、該植物の細胞内にキメラ遺伝子を導入しトランスジェニック植物細胞を得ること、ここで、該キメラ遺伝子は、下記の動作可能に結合されたDNA領域：

(a) 植物発現性プロモーター、

(b) 転写されたときにRNA分子を生じるDNA領域であって、該RNA分子は、内因性PARP遺伝子又はその相補物からの100連続ヌクレオチドのヌクレオチド配列と100%の同一性を有する100連続ヌクレオチドのヌクレオチド配列を含む、及び

(c) 転写終結及びポリアダニル化に関与するDNA領域

を含む、及び、

該トランスジェニック植物細胞から植物を再生すること、

ここで、該ストレスが、化学物質による処理で誘導されるストレス、寒冷ストレス、乾燥ストレス又は熱ストレスから選択される、

を含む方法。

【請求項 2】

該キメラ遺伝子が、下記の動作可能に結合されたDNA領域：

(a) 植物発現性プロモーター、

(b) 転写されたときにRNA分子を生じるDNA領域であって、該RNA分子は、内因性PARP遺伝子の発現を低下させることができ、該RNA分子は、

10

20

- i) 該植物の内因性 P A R P 遺伝子のヌクレオチド配列と 1 0 0 % の同一性を有する 1 0 0 連続ヌクレオチドのヌクレオチド配列を含むセンスヌクレオチド配列、及び
 - ii) 該植物の内因性 P A R P 遺伝子のヌクレオチド配列と 1 0 0 % の同一性を有する 1 0 0 連続ヌクレオチドのヌクレオチド配列を含むアンチセンスヌクレオチド配列、
- を含み、該センスヌクレオチド配列及び該アンチセンスヌクレオチド配列は、二本鎖 R N A 領域内に結合することができ、

(c) 転写終結及びポリアデニル化に関与する D N A 領域を含む、
該トランスジェニック植物細胞から植物を再生することを含む、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

該キメラ遺伝子が、下記の動作可能に結合された D N A 領域：

(a) 植物発現性プロモーター、

(b) 転写されたときに R N A 分子を生じる D N A 領域であって、該 R N A 分子は、内因性 P A R P 遺伝子の発現を低下させることができ、該 R N A 分子は、

- i) 配列番号 2 のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列、配列番号 4 のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列、配列番号 6 のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列及び配列番号 1 1 のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列と 1 0 0 % の同一性を有する 1 0 0 連続ヌクレオチドのヌクレオチド配列を含むセンスヌクレオチド配列、及び

20

- ii) 配列番号 2 のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列、配列番号 4 のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列、配列番号 6 のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列及び配列番号 1 1 のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列の相補物と 1 0 0 % の同一性を有する 1 0 0 連続ヌクレオチドのヌクレオチド配列を含むアンチセンスヌクレオチド配列、
- を含み、該センスヌクレオチド配列及び該アンチセンスヌクレオチド配列は、二本鎖 R N A 領域内に結合することができ、

(c) 転写終結及びポリアデニル化に関与する D N A 領域、
を含む、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 4】

該 R N A 分子が、

- i) 配列番号 1 のヌクレオチド配列、配列番号 3 のヌクレオチド配列、配列番号 5 のヌクレオチド配列及び配列番号 1 0 のヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列と 1 0 0 % の同一性を有する 1 0 0 連続ヌクレオチドのヌクレオチド配列を含むセンスヌクレオチド配列、及び

- ii) 配列番号 1 のヌクレオチド配列、配列番号 3 のヌクレオチド配列、配列番号 5 のヌクレオチド配列及び配列番号 1 0 のヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列の相補物と 1 0 0 % の同一性を有する 1 0 0 連続ヌクレオチドのヌクレオチド配列を含むアンチセンスヌクレオチド配列

40

を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

該植物発現性プロモーターが、構成プロモーターである、請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

さらに、交雑による該キメラ遺伝子を含むより多くの植物を産生する工程を含む、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

該植物が、トウモロコシ、採油用セイヨウアブラナ、アマ、コムギ、イネ科植物、ムラ

50

サキウマゴヤシ、マメ科植物、アブラナ科植物、トマト、レタス、ワタ、イネ、オオムギ、ジャガイモ、タバコ、テンサイ、ヒマワリ、カーネーション、キク、バラ、チューリップからなる群より選択される、請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

コントロールと比較したとき増加したストレス耐性を示すトランスジェニック植物であって、該トランスジェニック植物が、その細胞内に、下記の動作可能に結合された DNA 領域：

(a) 植物発現性プロモーター、

(b) 転写されたときに RNA 分子を生じる DNA 領域であって、該 RNA 分子は、内因性 P A R P 遺伝子の発現を低下させることができ、該 RNA 分子は、

i) 該植物の内因性 P A R P 遺伝子のヌクレオチド配列と 100% の同一性を有する 100 連続ヌクレオチドのヌクレオチド配列を含むセンスヌクレオチド配列、及び

ii) 該植物の内因性 P A R P 遺伝子のヌクレオチド配列と 100% の同一性を有する 100 連続ヌクレオチドのヌクレオチド配列を含むアンチセンスヌクレオチド配列、及び

(c) 転写終結及びポリアデニル化に関与する DNA 領域

を含むキメラ遺伝子を含み、ここで、該ストレスが、化学物質による処理で誘導されるストレス、寒冷ストレス、乾燥ストレス又は熱ストレスから選択される、トランスジェニック植物。

【請求項 9】

該キメラ遺伝子が、下記の動作可能に結合された DNA 領域：

(a) 植物発現性プロモーター、

(b) 転写されたときに RNA 分子を生じる DNA 領域であって、該 RNA 分子は、内因性 P A R P 遺伝子の発現を低下させることができ、該 RNA 分子は、

i) 配列番号 2 のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列、配列番号 4 のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列、配列番号 6 のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列及び配列番号 11 のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列と 100% の同一性を有する 100 連続ヌクレオチドのヌクレオチド配列を含むセンスヌクレオチド配列、及び

ii) 配列番号 2 のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列、配列番号 4 のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列、配列番号 6 のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列及び配列番号 11 のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列の相補物と 100% の同一性を有する 100 連続ヌクレオチドのヌクレオチド配列を含むアンチセンスヌクレオチド配列、

を含み、該センスヌクレオチド配列及び該アンチセンスヌクレオチド配列は、二本鎖 RNA 領域内に結合することができ、

(c) 転写終結及びポリアデニル化に関与する DNA 領域

を含む、請求項 8 に記載のトランスジェニック植物。

【請求項 10】

該 RNA 分子が、

i) 配列番号 1 のヌクレオチド配列、配列番号 3 のヌクレオチド配列、配列番号 5 のヌクレオチド配列及び配列番号 10 のヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列と 100% の同一性を有する 100 連続ヌクレオチドのヌクレオチド配列を含むセンスヌクレオチド配列、及び

ii) 配列番号 1 のヌクレオチド配列、配列番号 3 のヌクレオチド配列、配列番号 5 のヌクレオチド配列及び配列番号 10 のヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列の相補物と 100% の同一性を有する 100 連続ヌクレオチドのヌクレオチド配列を含むアンチセンスヌクレオチド配列

を含む、請求項 9 に記載のトランスジェニック植物。

10

20

30

40

50

【請求項 1 1】

該植物発現性プロモーターが、構成プロモーターである、請求項 8 ～ 1 0 のいずれか 1 項に記載のトランスジェニック植物。

【請求項 1 2】

該植物が、トウモロコシ、採油用セイヨウアブラナ、アマ、コムギ、イネ科植物、ムラサキウマゴヤシ、マメ科植物、アブラナ科植物、トマト、レタス、ワタ、イネ、オオムギ、ジャガイモ、タバコ、テンサイ、ヒマワリ、カーネーション、キク、バラ、チューリップからなる群より選択される、請求項 8 ～ 1 1 のいずれか 1 項に記載のトランスジェニック植物。

【請求項 1 3】

該キメラ遺伝子を含む、請求項 8 ～ 1 2 のいずれか 1 項に記載の植物の種子。

【請求項 1 4】

植物の細胞内にヌクレオチド配列を導入することによってストレス耐性植物を産生するための植物 P A R P 遺伝子又はその相補物のヌクレオチド配列の使用であって、該ヌクレオチド配列又はその相補物が、該植物の内因性 P A R P 遺伝子からの 1 0 0 連続ヌクレオチドと 1 0 0 % の同一性を有する 1 0 0 連続ヌクレオチドのヌクレオチド配列を含み、内因性 P A R P 遺伝子の発現を低下するために用いられることを特徴とする、使用。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

(発明の分野)

本発明は、ポリ (A D P ーリボース) ポリメラーゼ (P A R P) タンパク質、特に P A R P タンパク質突然変異体、又はその部分、及びそれをコードする遺伝子の、プログラムされた細胞死が改変された真核細胞及び生物、特に植物細胞及び植物を生成するための使用に関する。これらの細胞における P A R P タンパク質のレベル若しくは活性の調節によって、細胞、好ましくは選ばれた細胞の少なくとも一部で、プログラムされた細胞死 (P C D) が誘発されるか、又はその逆に、ある生物の細胞、若しくは細胞の少なくとも一部の P C D が阻害されるかのいずれかである、真核細胞及び生物、特に植物細胞及び植物が与えられる。本発明は、そのような遺伝子を発現する、真核細胞及び生物、特に植物細胞及び植物にも関する。

【0 0 0 2】

(関連する技術の記載)

プログラムされた細胞死 (P C D) は、動物・植物双方の選ばれた細胞の、発生過程の際の、又は環境的な合図に応答しての、排除に関連する生理学的な細胞死の過程である〔総説については、Ellis et al., 1991; Pennell & Lamb, 1997を参照されたい〕。P C Dを生じている細胞の崩壊は、形態学的には、細胞質及び核の、しばしば小さく密閉されたパッケージに至る、凝縮、収縮及び分断を伴う〔Cohen, 1993; Wang et al., 1996〕。生化学的には、P C Dは、核 D N A の、オリゴヌクレオソームを表す、一般的には約 5 0 kb のフラグメントへの分断とともに、システインプロテイナーゼ及びエンドヌクレアーゼの誘導を特徴とする。D N A の分断は、細胞の切片における D N A 3 ' ー O H 基の、末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ仲介 d U T P ニック末端標識化 (T U N E L) によって検出することができる〔Gavrieli et al., 1992〕。P C D による細胞死は、壊死とは明確に異なり、後者は、細胞の膨潤、溶解、及び細胞内容の漏出を伴う。

【0 0 0 3】

動物では、P C D は、変態におけるオタマジャクシの尾の細胞、脊椎動物の発生中の指の間の細胞、過剰生産された脊椎動物のニューロン、細胞特化の際の細胞、例えば角質細胞等々のような、望ましくない細胞の排除又は死に関連する。それ以後は適性に機能することができない損傷した細胞も、P C D によって排除され、それらが増殖及び／又は拡散するのが防止される。P C D 又はその欠如は、ヒトにおける数多くの病理学的状態 (エイズ、アルツハイマー病、ハンチントン病、ルーゲーリッグ病、癌) にも関与している。

【0 0 0 4】

植物では、PCDは、例えば、胚の発生の際の胚柄細胞の除去、単子葉類の種子の発芽後の胚柄細胞の排除；種子発芽及び実生成長後の根冠細胞の排除；木部管状要素若しくは毛状突起、又は単性花で发育不全となる花器官の発生に見られるような細胞特化の際の細胞死のような、数多くの発生過程に関与することが立証され、又は考えられている。また、低酸素条件下の根における通気組織の形成、及びある種の植物における葉裂若しくは貫入の形成も、PCDを伴うと思われる。植物における大規模な細胞死は、葉その他の器官の老化の際に発生する。植物における過敏性応答、換言すれば悪性ではない病原体の進入部位に発生して、限定された病変へと導く急速な細胞死は、環境的な合図に応答してのPCDのもう一つの例である。

【0005】

懸濁培養、特に低密度細胞懸濁培養中に死ぬ、動物又は植物細胞も、PCDの特徴性を明らかに示す。

【0006】

PCD又はアポトーシスに関与することが示唆されている酵素は、ポリ（ADP-リボース）ポリメラーゼである。ポリ（ADP-リボース）ポリメラーゼ（PARP）は、ポリ（ADP-リボース）トランスフェラーゼ（ADPRT）（EC2.4.2.30）としても知られていて、脊椎動物、節足動物、軟体動物、粘菌類、双鞭毛藻類、真菌類その他の、酵母を除く下等真核生物を包含する、ほとんどの真核生物に見出される核酵素である。酵素活性は、多数の植物でも立証されている〔Payne et al., 1976；Willmitzer & Wagner, 1982；Chen et al., 1994；O'Farrell, 1995〕。

【0007】

PARPは、 NAD^+ に由来するADP-リボース部分の、主として、標的タンパク質中のグルタミン酸残基のカルボキシル基への転移、及びその後のADP-リボース重合を触媒する。主要標的タンパク質は、PARP自身であるが、ヒストン、高移動度群染色体タンパク質、トポイソメラーゼ、エンドヌクレアーゼ及びDNAポリメラーゼも、この修飾を受けることが示されている。

【0008】

動物のPARPタンパク質は、ほとんどの細胞種に多量に存在する113～120kDaの核タンパク質であって、3個所の主要な機能的ドメイン：すなわち、2個所のジンクフィンガードメインを含む、アミノ末端DNA結合ドメイン、カルボキシル末端の触媒性ドメイン、及び自己修飾される内部ドメインからなる〔de Murcia & Menissier de Murcia, 1994；Kameshita et al., 1984；Lindahl et al., 1995〕。in vitroでの酵素活性は、DNAの一本鎖切断に結合する際に非常に上昇する。in vivo活性は、結果的にDNA切断を生じる条件によって誘導される〔Alvarez-Gonzalez & Althaus, 1989；Ikejima et al., 1990〕。中央ドメインの自己修飾は、明らかに、PARPの負のフィードバック調節として役立つ。

【0009】

植物細胞におけるPARP活性は、標識された NAD^+ から根冠細胞の核への ^3H の取込みを調べることによって、最初に立証された〔Payne et al., 1976；Willmitzer & Wagner, 1982〕。酵素活性は、トウモロコシの若芽からも部分的に精製され、113kDaという見かけ分子量のタンパク質に関連することが見出されて、植物PARPは、動物からの酵素に類似する可能性があることが示唆された〔Chen et al., 1994；O'Farrell, 1995〕。

【0010】

PARPに対応するcDNAは、哺乳動物、ニワトリ、ツメガエル属、昆虫及びカエノラブディチス・エレガンスCaenorhabditis elegansを包含する、いくつかの種から単離されている。Chenら（1994）は、トウモロコシの核におけるPARP活性を報告し、この酵素活性を、トウモロコシの核の抽出物中に存在する約114kDaのタンパク質の存在と結び付けた。O'Farrell（1995）は、トウモロコシから単離されたRNAに対する、（最高度に保存された配列に基づく縮重プライマーを用いた）RT-PCR増幅が、300bpのフラグメントを生じることを報告し、ヒトPARPタンパク質とのアミノ酸レベルでの6

10

20

30

40

50

0 %の同一性を示した。Lepiniecら (1995) は、シロイヌナズナ *Arabidopsis thaliana* から、脊椎動物 PARP の触媒ドメインに酷似する、72 kDa のタンパク質をコードする完全長 cDNA を単離し、クローニングしている。このタンパク質の N 末端ドメインは、脊椎動物からの対応する PARP とのいかなる配列類似性も示さないが、数多くの核タンパク質及び DNA 結合タンパク質の N 末端との類似性を示す、アミノ酸の 4 本の範囲 (A1、A2、B 及び C と命名) で構築される。A1 及び A2 の予測された二次構造は、らせん-ループ-らせん構造であった。

【0011】

Genbank のデータベースは、トウモロコシ *Zea mays* からの 2 種類の配列を有するが、それに対する翻訳産物のアミノ酸配列は、従来の PARP タンパク質 (AJ222589)、又はアラビドプシス属で同定されたような、非慣用的 PARP (AJ222588) のいずれかとの相同性を有する。

10

【0012】

真核細胞における PARP 及びポリ ADP リボシル化の機能は、完全に明らかではない。PARP は、細胞分裂及び細胞分化での DNA の修復、複製及び組換えのような、多数の細胞性過程、又はゲノムの完全性の変化を感知する、シグナリング経路で直接にか、若しくは間接的にかのいずれかで関与しているか、或いは関与すると考えられている。PARP 活性は、細胞の NAD^+ プールを有意に減少させ得ることから、この酵素は、プログラムされた細胞死に決定的な役割を果たす可能性がある [Heller et al., 1995; Zhang et al., 1994]。更に、 NAD^+ 加水分解から得られたニコチンアミド、又はポリ ADP-リボースグリコヒドロラーゼによるポリ ADP-リボースの代謝回転産物は、真核細胞におけるストレス応答シグナルであり得ることが示唆されている。

20

【0013】

植物 PARP の生物学的機能に関して現在入手できる情報は、PARP 阻害剤に関与させる実験から得られていて、タバコにおける相同染色体内組換え率が、3-アミノベンズアミド (3-ABA) の適用後に上昇することから、DNA 損傷の部位での相同組換えの妨害における *in vivo* での役割が示唆される [Puchta et al., 1995]。更に、ヒャクニチソウ属又はキクイモ *Helianthus tuberosum* への PARP 阻害剤、例えば 3-ABA、ニコチンアミド及び 6 (5H)-フェナストリジノンの適用は、管状要素の発生を妨害することが示され [Hawkins & Phillips, 1983; Phillips & Hawkins, 1985; Shoji et al., 1997; Sugiyama et al., 1995]、植物におけるプログラムされた細胞死の例であると見られている。

30

【0014】

PCT 出願の国際公開特許第 97/06267 号公報は、真核細胞、特に植物細胞の形質転換を (質的にか、又は量的に) 改良するための、PARP 阻害剤の使用を記載している。

【0015】

Lazebnikら (1994) は、動物細胞のアポトーシスでの初期の事象である、PARP を切断できる、インターロイキン 1- β 転換酵素に類似する特性を有するプロテアーゼ同定した。

40

【0016】

Kuepperら (1990)、及び Molinetteら (1993) は、トランスフェクションした CV-1 サル細胞又はヒト繊維芽細胞における、46 kDa のヒト PARP DNA 結合ドメイン、及びその様々な突然変異体形態の過剰産生を記載し、これらの細胞における、常在 PARP 活性のトランス優性阻害、及びその結果としての塩基除去 DNA 修復の遮断を立証している。

【0017】

Dingら (1992)、及び Smulsonら (1995) は、哺乳動物細胞におけるアンチセンス RNA 発現による PARP の欠乏を記載し、DNA 鎖切断の結合の遅延、及び 3T3-L1 前脂肪細胞の分化の阻害を観察している。

50

【0018】

Menissier de Murciaら（1997）、及びWangら（1995、1997）は、PARP遺伝子が突然変異したトランスジェニック「ノックアウト」マウスを作り出して、PARPが必須タンパク質ではないことを示している。しかし、PARP欠乏マウスの細胞は、よりDNA損傷に感受性であり、誘導された細胞死のいくつかの面で動物の正常細胞と異なる〔Heller et al., 1995〕。

【0019】

（発明の要約及び目的）

本発明は、真核細胞におけるプログラムされた細胞死を調節する方法であって、ZAPクラスのPARP遺伝子のヌクレオチド配列、及びNAPクラスのPARP遺伝子のヌクレオチド配列を用いて、好ましくは、内因性PARP遺伝子の発現を低下させるか、内因性PARP遺伝子がコードするタンパク質の見かけの活性を低下させるか、又は内因性PARP遺伝子のヌクレオチド配列を変更して、真核細胞のPARP活性全体の機能レベルを低下させることを含む方法を提供する。

10

【0020】

本発明は、第一及び第二のPCD調節キメラ遺伝子を真核細胞、好ましくは植物細胞に導入することを含む、真核細胞におけるプログラムされた細胞死を調節する方法であって、該第一PCD調節キメラ遺伝子が、動作可能に結合されたDNA領域である：真核細胞内で機能的であるプロモーター；転写されたときに、ZAPクラスのPARPタンパク質を含むジンクフィンガーの機能レベルを低下させることができるか、又は発現されたときに、ZAPクラスのPARPタンパク質の機能レベルを低下させる、ペプチド若しくはタンパク質に翻訳されることができるかのいずれかのRNA分子を生じるDNA領域；並びに転写終結及びアデニル化に關与するDNA領域を含み、

20

【0021】

該第二PCD調節キメラ遺伝子が、動作可能に結合されたDNA領域である：該真核細胞内で機能的であるプロモーター；転写されたときに、NAPクラスのPARPタンパク質の機能レベルを低下させることができるか、又は発現されたときに、NAPクラスのPARPタンパク質の機能レベルを低下させる、ペプチド若しくはタンパク質に翻訳されることができるかのいずれかのRNA分子を生じるDNA領域；並びに転写終結及びアデニル化に關与するDNA領域を含み、そして該真核細胞における見かけのPARP活性全体を有意に（好ましくは、見かけのPARP活性全体を、真核細胞における正常な見かけのPARP活性から約75～約90%低下させ、該真核細胞を、プログラムされた細胞死から防護する）か、又はほとんど完全に（好ましくは、見かけのPARP活性全体を、該真核細胞における正常な見かけのPARP活性から約90～約100%低下させ、該真核細胞を、プログラムされた細胞死によって死滅させる）低下させる方法も提供する。

30

【0022】

好ましくは、該第一の転写されるDNA領域、若しくは該第二の転写されるDNA領域、又はその双方は、ZAP若しくはNAPクラスの内因性PARP遺伝子のセンスDNA鎖と75%同一である、少なくとも約100ヌクレオチドのヌクレオチド配列を含み、ZAP若しくはNAPクラスの内因性PARP遺伝子の発現を低下させることができるセンスRNA分子をコードする。

40

【0023】

本発明が提供する、プログラムされた細胞死を調節する代替的な一方法では、該第一の転写されるDNA領域、若しくは該第二の転写されるDNA領域、又はその双方は、ZAP若しくはNAPクラスの内因性PARP遺伝子のセンスDNA鎖の相補体と75%同一である、少なくとも約100ヌクレオチドのヌクレオチド配列を含み、ZAP若しくはNAPクラスの該内因性PARP遺伝子の発現を低下させることができるRNA分子をコードする。

【0024】

本発明が提供する、プログラムされた細胞死を調節する代替的なもう一つの方法では、該

50

第一及び／又は第二の転写されるDNA領域は、ZAP若しくはNAPクラスの内因性PARP遺伝子の転写の結果得られるmRNAと75%同一である、少なくとも約100ヌクレオチドのセンスヌクレオチド配列を含むRNA分子をコードし、該RNA分子は、ZAP若しくはNAPクラスの内因性PARP遺伝子の転写の結果得られる該mRNAの相補体と75%同一である、少なくとも約100ヌクレオチドのアンチセンスヌクレオチド配列を更に含み、該センス及びアンチセンスヌクレオチド配列は、二本鎖RNA領域を形成することができ、かつ該RNA分子は、ZAP若しくはNAPクラスの内因性PARP遺伝子の発現を低下させることができる。

【0025】

本発明が提供する、プログラムされた細胞死を調節する代替的な更に一つの方法では、該第一及び／又は第二の転写されるDNA領域は、ZAP若しくはNAPクラスの内因性PARP遺伝子がコードするPARPタンパク質の見かけの活性を低下させ得る、好ましくは、SEQ ID NO: 4 第1～159番アミノ酸のアミノ酸配列、若しくはSEQ ID NO: 6 第1～138番アミノ酸のアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を含むか、又はSEQ ID NO: 2 第1～370番アミノ酸のアミノ酸配列、SEQ ID NO: 11 第1～98番アミノ酸のアミノ酸配列、又は第1～88番アミノ酸のアミノ酸配列が、SEQ ID NO: 11のアミノ酸配列で置き換えられた、SEQ ID NO: 2 第1～370番アミノ酸のアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を含む、優性ネガティブPARP突然変異体をコードする。

【0026】

該第一及び第二PCD調節キメラ遺伝子、又はその双方のプロモーターは、組織特異的性若しくは誘導可能プロモーター、例えば、真菌応答性プロモーター、線虫応答性プロモーター、薬選択的プロモーター、柱頭選択的プロモーター、裂開帯選択的プロモーターから選ばれるプロモーターであってよい。

【0027】

本発明は、PCD調節キメラ遺伝子を植物細胞に導入することを含む、植物細胞におけるプログラムされた細胞死を調節する方法であって、該PCD調節キメラ遺伝子が、動作可能に結合されたDNA領域である：植物発現性プロモーター；転写されたときに、内因性PARP遺伝子の発現を低下させることができるか、又は発現されたときに、該植物細胞における見かけのPARP活性を低下させるペプチド若しくはタンパク質に翻訳されることができるとのいずれかである、RNA分子を生じるDNA領域；並びに転写終結及びアデニル化に関与するDNA領域を含み、該植物細胞における見かけのPARP活性全体を、該植物細胞における正常な見かけのPARP活性から約75～約100%低下させる方法も提供する。

【0028】

該第一及び第二PCD調節キメラ遺伝子はもとより、該第一及び第二PCD調節キメラ遺伝子を含む真核細胞、特に植物細胞、並びにそのような細胞を含む非ヒト真核生物、とくに植物を提供することは、本発明のもう一つの目的である。

【0029】

PCD調節キメラ遺伝子を植物の細胞に導入することを含む、植物の細胞におけるプログラムされた細胞死を調節する方法であって、該PCD調節キメラ遺伝子が、動作可能に結合されたDNA領域である：植物発現性プロモーター；転写されたときに、ZAPクラスの内因性PARP遺伝子の発現を低下させることができる、RNA分子を生じるDNA領域；並びに転写終結及びアデニル化に関与するDNA領域を含む方法提供することは、本発明のもう一つの目的である。

【0030】

本発明は、PCD調節キメラ遺伝子を植物の細胞に導入することを含む、植物の成長速度を上昇させる方法であって、該PCD調節キメラ遺伝子が、動作可能に結合されたDNA領域である：植物発現性プロモーター；転写されたときに、ZAPクラスの内因性PARP遺伝子の発現を低下させることができる、RNA分子を生じるDNA領域；並びに転写終結及びアデニル化に関与するDNA領域を含む方法にも関する。

【0031】

P C D調節キメラ遺伝子を植物の細胞に導入することを含む、植物のストレス耐性細胞を生成する方法であって、該P C D調節キメラ遺伝子が、動作可能に結合されたD N A領域である：植物発現性プロモーター；転写されたときに、Z A Pクラスの内因性P A R P遺伝子の発現を低下させることができる、R N A分子を生じるD N A領域；並びに転写終結及びアデニル化に関与するD N A領域を含む方法を提供することは、本発明のもう一つの目的である。

【0032】

本発明は、P A R P活性を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列の、植物細胞若しくは植物におけるプログラムされた細胞死を調節するためか、ストレス耐性である植物細胞又は植物を生成するためか、又は植物細胞又は植物の成長速度を上昇させるための用途にも関する。

10

【0033】

(好適実施態様の詳細な説明)

本発明を目的として、用語「植物発現性プロモーター」とは、植物細胞での転写を駆動し得るプロモーターを意味する。これは、植物起源のいかなるプロモーターも包含するが、植物細胞での転写を指令できる非植物起源のいかなるプロモーター、例えば、C a M V 3 5 S又はT-D N A遺伝子プロモーターのような、ウイルス若しくは細菌起源の一定のプロモーターも包含する。

【0034】

20

用語「遺伝子の発現」とは、調節性領域、特にプロモーターの制御下にあるD N A領域が、生物学的に活性である、すなわち別の核酸若しくはタンパク質との相互作用が可能であるか、又は生物学的に活性であるポリペプチド若しくはタンパク質へと翻訳され得るかのいずれかである、R N Aへと転写される過程を意味する。遺伝子は、該遺伝子の発現の最終産物が、生物学的活性R N A、例えばアンチセンスR N A又はリボザイムであるとき、R N Aをコードすると言われる。遺伝子は、該遺伝子の発現の最終産物が、生物学的活性タンパク質又はポリペプチドであるとき、タンパク質をコードすると言われる。

【0035】

用語「遺伝子」とは、適切な調節性領域、例えば植物発現性プロモーターの制御下にある細胞内で、R N A分子（例えばm R N A）へと転写されるD N A（「転写されるD N A領域」）を含む、いかなるD N Aフラグメントも意味する。したがって、遺伝子は、プロモーター、5'リーダー配列、コーディング領域、及びポリアデニル化部位を含む3'領域のような、動作可能に結合されたいくつかのD N Aフラグメントを含んでよい。内因性植物遺伝子は、植物種に天然に見出される遺伝子である。キメラ遺伝子は、植物種に通常は見出されないいかなる遺伝子、或いはこれに代えて、プロモーターが、自然界では、転写されるD N A領域の一部若しくは全部にか、又は該遺伝子の少なくとも一つの別の調節性領域に付随しない、いかなる遺伝子でもある。

30

【0036】

本明細書に用いられる限りで、「含む」は、言及された限りでの、記載された特徴、完全なもの、工程又は構築要素の存在を特定するとして解されるものとするが、一つ又はそれ以上の特徴、完全なもの、段階若しくは構築要素、又はそれらの集まりの存在を排除しない。したがって、例えば、ヌクレオチド又はアミノ酸の配列を含む、核酸又はタンパク質は、実際に引用されたものより多くのヌクレオチド又はアミノ酸を含む、すなわち、より大きい核酸又はタンパク質に包埋されていてよい。機能的又は構造的に定義されたD N A領域を含むキメラ遺伝子は、追加のD N A領域等々を含んでよい。

40

【0037】

本発明は、一方では、真核細胞、特に植物細胞、格別にトウモロコシZea maysの細胞が、大きさ及びアミノ酸配列は異なるが、ともにD N A、特に一本鎖切断を有するD N Aと結合でき、ともにポリA D Pリボシル化活性を有する、機能的に重要な少なくとも二つのP A R Pタンパク質イソ型（クラス）を同時に含むという発見に基づく。他方では、本発明

50

者らは、真核生物、特に植物におけるプログラムされた細胞死は、PARP遺伝子の発現レベルを変更するか、又はコードされるタンパク質の活性を遺伝的に変更することによって調節できること、及びこの目標を達成するには、両遺伝子の発現を変更する必要があるか、又はこれに代えて、両クラスのタンパク質の活性を変更する必要があることを理解している。

【0038】

真核細胞、特に植物細胞が、異なるクラスの遺伝子によってコードされるPARPタンパク質の二つの機能的イソ型を含むことを示す技術の不足が、組換えDNA法による、これらの細胞におけるPARP活性の効率的な調節を妨げてきたことは明らかである。この方法及び手段の様々な実施態様は、説明、実施例及び請求項によって示す。

10

【0039】

したがって、本発明は、真核細胞、好ましくは植物細胞におけるプログラムされた細胞死若しくはアポトーシスの、PARP遺伝子の発現レベルの変更によるか、又は該真核細胞内のPARPタンパク質の活性、若しくは見かけの活性の変更による調節、すなわち増強又は阻害に関する。好都合にも、PARP遺伝子の発現レベル、又はPARPタンパク質の活性は、PARP遺伝子の発現を変更するPCD調節キメラ遺伝子の導入、及び／又はPARPタンパク質の見かけの活性を変更するPCD調節キメラ遺伝子の導入、及び／又は内因性のPARPコーディング遺伝子の変更によって、遺伝的に制御される。

【0040】

本明細書に用いられる限りで、指定された細胞に関する「増強されたPCD」とは、本発明の方法によって誘発され、そのため、本発明の方法によって調節されない正常植物の類似の細胞と比較して、類似の条件下でPCDを蒙る運命にはなかったような細胞の死を意味する。

20

【0041】

指定された細胞に関する「阻害されたPCD」とは、通常は（本発明の方法による干渉なしには）、特定の条件下で、プログラムされた細胞死を蒙るはずであったような細胞又は細胞群の、より大きい画分が、これらの条件下で生存する過程として解されるものとする。

【0042】

したがって、導入されたPCD調節キメラ遺伝子、又は調節された内因性遺伝子の発現は、PARPタンパク質の機能レベルに影響を及ぼし、プログラムされた細胞死に間接的に干渉することになる。PARPタンパク質の機能レベルの程々の低下は、プログラムされた細胞死の阻害、特にプログラムされた細胞死の防止へと導くのに対し、PARPタンパク質の機能レベルの重大な低下は、プログラムされた細胞死の導入へと導く。

30

【0043】

本発明によれば、真核細胞、特に植物細胞におけるプログラムされた細胞死を阻害又は防止するには、PARPタンパク質、及び／又はその活性若しくは見かけの活性の組み合わせたレベルの両方を有意に低下させるが、（PARPに直接又は間接的に支配される）DNA修復が、PARPタンパク質の機能が阻害された細胞が、DNA損傷から回復できないようにしてか、又はそのゲノムの完全性を維持できないようにして阻害されることは回避するのが好ましい。好ましくは、標的細胞内のPARPタンパク質のレベル及び／又は活性を、標的細胞における正常なレベル及び／又は活性から約75%、好ましくは約80%、特に約90%低下させる結果、PARPの正常なレベル及び／又は活性の約25%、好ましくは約20%、特に約10%が標的細胞内に保持されなければならない。更に、PARPタンパク質のレベル及び／又は活性の低下は、標的細胞における正常な活性及び／又はレベルの95%を越えてはならず、好ましくは90%を越えてはならないと考えられる。PARPタンパク質のような特異的タンパク質の含有量を決定する方法は、当業者には周知であり、特異的抗体を用いたそのようなタンパク質の（組織化学的）定量を包含するが、これらに限定されない。PARP活性を定量する方法も、当技術に利用可能であり、上記のTUNELアッセイ（in vivoで）、又はポリ（ADP-リボース）の合成のため

40

50

のCollinge & Althaus (1994) が記載したin vitroアッセイを包含する（実施例を参照されたい）。

【0044】

本発明によれば、また、真核細胞、特に植物細胞にプログラムされた細胞死を誘発するには、DNA修復、及びゲノムの完全性の維持がそれ以後は可能でなくなるように、PARPタンパク質、及び／又はその活性若しくは見かけの活性の組み合わせたレベルの両方を、実質的に低下させ、好ましくはほとんど完全に低下させるのが好ましい。好ましくは、標的細胞内のPARPタンパク質の組み合わせたレベル及び／又は活性を、標的細胞内の正常なレベル及び／又は活性から少なくとも約90%、好ましくは約95%、より好ましくは約99%低下させなければならない、特にPARP活性は、完全に阻害しなければならない。両クラスのPARPタンパク質の機能レベルは、別個に、上記のレベルまで低下させるのが特に好ましい。

10

【0045】

本発明を目的として、PARPタンパク質は、ポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ活性を有し、好ましくはいわゆる「PARPシグニチャー」を含むタンパク質として定義される。PARPシグニチャーは、PARPタンパク質間で高度に保存されたアミノ酸配列であって、Murcia及びMenussier de Murcia (1994) によって、マウスMus musculusのPARPタンパク質からの、第858番アミノ酸から第906番アミノ酸に達するとして定義された。このドメインは、トウモロコシの慣用的なPARPタンパク質の第817～865番のアミノ酸配列(ZAP1; SEQ ID NO: 2)、トウモロコシの慣用的PARPタンパク質の第827～875番のアミノ酸配列(ZAP2; SEQ ID NO: 11)、トウモロコシの非慣用的PARPタンパク質の第500～547番のアミノ酸配列(SEQ ID NO: 4)、シロイヌナズナの非慣用的PARPの第485～532番のアミノ酸配列(SEQ ID NO: 6)に相当する。このアミノ酸配列は、異なる(約90～100%の配列同一性を有する)PARPタンパク質間で高度に保存されている。特に保存されているのは、マウスのPARPタンパク質の第891番のリシンであって(SEQ ID NO: 2の第850番、SEQ ID NO: 11の第861番、SEQ ID NO: 4の第532番、SEQ ID NO: 6の第517番に相当)、PARPタンパク質の触媒活性に関与すると考えられる。特に、マウスのPARPタンパク質の第865、866、893、898及び899番、又は他の配列について相当する位置のアミノ酸が通用する。PARPタンパク質は、N末端のDNA結合ドメイン、及び／又は核局在化シグナル(NLS)を更に含んでもよい。

20

30

【0046】

現在、2クラスのPARPタンパク質が記載されている。本明細書で定義される限りでの第一のクラスは、いわゆる古典的な含ジンクフィンガーPARPタンパク質(ZAP)を含む。これらのタンパク質は、大きさが113～120kDaにわたり、該タンパク質のN末端ドメインに位置する、特に該タンパク質の初めの約355～約375アミノ酸内に位置する、少なくとも一つ、好ましくは二つのジンクフィンガーの存在を更に特徴とする。ジンクフィンガーは、Zn原子を錯化できる配列CxxC_nHxxC(nは、26～30に変動し得る)を有するペプチド配列として定義される。ZAPクラスのPARPタンパク質についてのアミノ酸配列の例は、PIRタンパク質データベース中に、登録番号P18493(ウシBos taurus)、P26466(ヤケイGallus gallus)、P35875(キイロショウジョウバエDrosophila melanogaster)、P09874(ヒトHomo sapiens)、P11103(ハツカネズミMus musculus)、Q08824(マスOncorhynchus masou)、P27008(ドブネズミRattus norvegicus)、Q11208(サルコファガ・ペレグリナSarcophaga peregrina)及びP31669(アフリカツメガエルXenopus laevis)で見出すことができる配列、並びにトウモロコシのZAP1及びZAP2タンパク質の現在同定されている配列(SEQ ID NO: 2/SEQ ID NO: 11)を包含する。

40

【0047】

対応するcDNAのヌクレオチド配列は、EMBLデータベース中に、登録番号D90073(ウシ)、X52690(ニワトリ)、D13806(キイロショウジョウバエ)、

50

M 3 2 7 2 1 (ヒト)、X 1 4 2 0 6 (ハツカネズミ)、D 1 3 8 0 9 (マス)、X 6 5 4 9 6 (ドブネズミ)、D 1 6 4 8 2 (サルコファーガ・ペレグリナ) 及び D 1 4 6 6 7 (アフリカツメガエル) の下に、並びに SEQ ID NO: 1 及び 1 0 (トウモロコシ) に見出すことができる。

【0048】

本明細書で定義される限りでの第二のクラスは、いわゆる非古典的 P A R P タンパク質 (N A P) を含む。これらのタンパク質は、類似しており (7 2 ~ 7 3 kDa)、該タンパク質の N 末端でのジンクフィンガーの不在、及び D N A 結合タンパク質との類似性を有するアミノ酸の範囲を含む N 末端ドメインの存在を更に特徴とする。好ましくは、これらのクラスの P A R P タンパク質は、配列 R G x x x x G x K x x x x x R L (アミノ酸は、標準的な一字コードで表され、x は、いかなるアミノ酸も意味する; SEQ ID NO: 7) を含む約 3 0 ~ 3 2 アミノ酸の少なくとも一つのアミノ酸配列を含む。はるかに好ましくは、これらの P A R P タンパク質は、配列 x L x V x x x R x x L x x R G L x x x G V K x x L V x R L x x A I (SEQ ID NO: 8) (いわゆる A 1 ドメイン) を有する約 3 2 アミノ酸の少なくとも一つのアミノ酸配列、若しくは配列 G M x x x E L x x x A x x R G x x x x G x K K D x x R L x x (SEQ ID NO: 9) (いわゆる A 2 ドメイン) を有する約 3 2 アミノ酸の少なくとも一つのアミノ酸配列、又はその双方を含む。特に、A 1 及び A 2 ドメインは、らせんループ-らせん構造を形成することができる。これらの P A R P タンパク質は、塩基性の「B」ドメイン (約 3 5 ~ 約 5 6 アミノ酸の K / R に富むアミノ酸配列、核に向けてのタンパク質の照準に関与)、及び / 又は酸性の「C」ドメイン (約 3 6 アミノ酸の D / E に富むアミノ酸配列) を更に含んでもよい。N A P クラスのタンパク質配列の例は、シロイヌナズナの A P P タンパク質 (P I R タンパク質データベースから登録番号 Q 1 1 2 0 7 の下に情報が得られる; SEQ ID NO: 6)、及びトウモロコシの N A P タンパク質 (SEQ ID NO: 4) を包含する。対応する c D N A の配列は、E M B L データベース中に、登録番号 Z48243 の下に、及び SEQ ID NO: 3 に見出すことができる。第二のクラスの P A R P タンパク質が、実際に P A R P タンパク質であること、すなわち D N A 依存ポリ (A D P - リボース) 重合を触媒できることは、本発明者らによって立証された (実施例 2 を参照されたい)。

【0049】

本発明者らは、真核細胞、特に植物細胞が、両クラスの P A R P タンパク質をコードする遺伝子を同時に発現することを、更に立証した。

【0050】

本発明を目的として、定義された限りでの両クラスの P A R P タンパク質をコードするその他の遺伝子若しくは c D N A、又はその一部を、他の真核生物の種若しくは変種から、特に他の植物種若しくは変種から単離できることは明らかである。これらの P A R P 遺伝子又は c D N A は、例えば、上記の P A R P 遺伝子若しくは c D N A、又はその一部 (好ましくは、上記の P A R P シグニチャーをコードするヌクレオチド配列を含む、遺伝子フラグメントのような保存された部分) のヌクレオチド配列を有する D N A フラグメントをプローブとして用いる、サザンハイブリダイゼーション (P A R P 遺伝子を単離しようとする種と、プローブを最終的に派生させる種との間の関係に応じた、低厳密度又は高厳密度ハイブリダイゼーションのいずれか) によって、単離することができる。植物遺伝子がコードする P A R P タンパク質の P A R P シグニチャーに相当するヌクレオチド配列は、SEQ ID NO: 1 ヌクレオチド第 2 5 5 8 ~ 2 7 0 4 番のヌクレオチド配列、SEQ ID NO: 3 ヌクレオチド第 1 5 9 5 ~ 1 7 4 7 番のヌクレオチド配列、又は SEQ ID NO: 5 ヌクレオチド第 1 5 7 5 ~ 1 7 2 4 番のヌクレオチド配列である。P A R P 遺伝子のクラス間で区別しなければならないならば、好ましくは、P A R P 遺伝子の、そのクラスに特異的である部分、例えば、触媒ドメインに先行する N 末端ドメイン、又はその一部を用いなければならない。

【0051】

これに代えて、P A R P タンパク質又はその一部をコードする遺伝子若しくは c D N A は、SEQ ID NO: 1 3、SEQ ID NO: 1 4 に示される配列に対応するヌクレオチド配列を有する

縮重プライマー、又はSEQ ID NO: 15～20に示される配列に対応するヌクレオチド配列を有するプライマーのような、適切なプライマーを用いたPCR増幅によって単離することができる。しかし、当業者が、PCRに用いるための代替的オリゴヌクレオチドを設計するか、又はPARP遺伝子のいずれかの、少なくとも20、好ましくは少なくとも約30、特に少なくとも約50の連続するヌクレオチドからなるヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチドを用いて、遺伝子又はその一部をPCR増幅によって単離することができることは、明らかである。

【0052】

これらの手法の組合わせ、又は部分的フラグメント、及び例えばPCR増幅を用いて得られるそのヌクレオチド配列に基づいて、遺伝子若しくはcDNAを単離するために当業者が利用できる、その他の手法（例えばRACE-PCR）を用いて、本発明の方法に用いるのに適するPARP遺伝子又はその一部を単離できることは、明らかである。

10

【0053】

その上、アミノ酸のいくつかが、その他の化学的に類似するアミノ酸と交換された（いわゆる保存的置換）、PARPタンパク質をコードするPARP遺伝子、又は合成PARP遺伝子（天然PARP遺伝子と類似のタンパク質をコードするが、遺伝暗号の縮重に基づいて、異なるヌクレオチド配列を有する）、及びそれらの一部も、本発明の方法に適する。

【0054】

本発明の一面では、真核細胞、特に植物細胞におけるPCDを、これらの真核細胞内のPARPの機能レベルの程々の低下によって阻害する。

20

【0055】

本発明の第一の面の一実施態様では、真核細胞、特に植物細胞内のPARPの機能レベルを、これらの細胞での転写を指令できるプロモーター、好ましくは植物発現性プロモーターと、転写されたときに、両クラスのPARP遺伝子がコードする内因性PARP活性の機能レベルを低下させ得る、生物学的に活性であるRNA分子を生じるDNA領域に動作可能に結合された、機能的3'転写終結及びポリアデニル化領域とを含む、少なくとも一つのPCD調節キメラ遺伝子のこれらの細胞への導入によって低下させる。

【0056】

好適実施態様では、少なくとも二つのそのようなPCD調節キメラ遺伝子を細胞に導入し、それによって、第一のPCD調節キメラ遺伝子がコードする生物学的活性RNAは、NAPクラスの遺伝子がコードする内因性PARP活性の機能レベルを低下させ、かつそれによって、第二のPCD調節キメラ遺伝子がコードする生物学的活性RNAは、ZAPクラスクラスの遺伝子がコードする内因性PARP活性の機能レベルを低下させるため、組み合わせたPARP活性が、適度に低下する。

30

【0057】

特に好適な実施態様では、PCD調節キメラ遺伝子は、内因性PARP遺伝子の発現レベルを低下させることによって、内因性PARP活性の機能レベルを低下させる。このためには、転写されたDNA領域は、翻訳に利用できるNAP及びZAPクラスのPARPタンパク質をコードするmRNAを減少させる生物学的活性RNAをコードする。これは、アンチセンスRNA、共抑制又はリボザイム作用のような手法を通じて達成することができる。

40

【0058】

本明細書に用いられる限りで、「共抑制」とは、RNA蓄積を、配列特異的な方式で、転写及び／又は転写後抑制に付して、内因性相同遺伝子又はトランス遺伝子の発現の抑制を招く過程を意味する。

【0059】

したがって、内因性PARP遺伝子の発現の抑制は、DNA領域に動作可能に結合された強力なプロモーターを含む、トランス遺伝子を導入し、そのために、得られる転写されたRNAが、その発現を抑制しようとするPARP遺伝子の部分の、コードする及び／若し

50

くは転写されるDNA配列（センス）、又は相補体（アンチセンス）と、少なくとも75%、好ましくは少なくとも80%、特に85%、より特に少なくとも90%、特別には少なくとも95%の同一性を有するか、或いは同一である、ヌクレオチド配列を含むセンスRNA若しくはアンチセンスRNAであることによって達成することができる。好ましくは、転写されるDNA領域は、機能的タンパク質をコードしない。特に、転写領域は、タンパク質をコードしない。更に、センス又はアンチセンス領域のヌクレオチド配列は、好ましくは、長さが少なくとも約100ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも約250ヌクレオチド、特に少なくとも約500ヌクレオチドでなければならないが、その発現を低下させようとする遺伝子のコーディング領域の全長にわたってもよい。

【0060】

本発明を目的として、関連する二つのヌクレオチド又はアミノ酸配列の、百分率として表される「配列同一性」とは、最適に整列させた二つの配列中の、比較した位置の数で除した、同一残基を有する位置の数（ $\times 100$ ）を意味する。間隙、すなわち整列させて、一方の配列には存在するが、他方には存在しない位置は、残基が同一でない位置と見なされる。二つの配列の整列は、ウィルバーリッップマンアルゴリズム [Wilbur & Lipmann, 1983] によって、20ヌクレオチド又はアミノ酸というウィンドウサイズ、2アミノ酸という語長、及び4という間隙ペナルティーを用いて実施する。上記の配列の整列を包含する配列データのコンピュータ支援解析及び解釈は、好都合にも、Intelligenetics（登録商標）のSuite（Intelligenetics Inc., CA）というプログラムのような、商業的に入手できるソフトウェアパッケージを用いて実施することができる。

【0061】

当業者には、一つ又はそれ以上のセンス若しくはアンチセンスPCD調節キメラ遺伝子を用いて、本発明の第一の面の目標を達成できることは明らかであると思われる。一つのセンス又はアンチセンスPCD調節キメラ遺伝子を用いたときは、この遺伝子は、両クラスのPARP遺伝子の発現を同時に低下させることが可能でなければならない。これは、例えば、キメラ遺伝子の転写領域を、両クラスの遺伝子の発現が、一つのセンス又はアンチセンスRNAによって調節されるように選ぶ、すなわち両クラスのPARP遺伝子の最高の同一性を有するDNA領域に対応する標的領域を選び、センス及びアンチセンスRNAについて上に記載した条件に合う、両標的領域に対応する転写センス又はアンチセンスDNA領域を組み込むことによって、達成することができる。これに代えて、それぞれ、PARP遺伝子の一方のクラスの発現を調節するのに特異的である種々のセンス又はアンチセンスRNA領域を、一つのPCD調節キメラ遺伝子の一つの転写領域がコードする一つのRNA分子に組み合わせることができる。明らかに、一方のクラスのPARP遺伝子の発現を調節するのに特異的である種々のセンス又はアンチセンスRNA領域は、別個のPCD調節キメラ遺伝子として導入することができる。

【0062】

好適なセンス及びアンチセンスコーディング転写領域は、PARP遺伝子のN末端ドメインから選ばれる少なくとも約100の連続ヌクレオチドの配列に（上記の配列同一性の制約を有して）相当する、好ましくは、SEQ ID NO: 1第113～1189番ヌクレオチドの配列、SEQ ID NO: 3第107～583番ヌクレオチドの配列、SEQ ID NO: 5第131～542番ヌクレオチドの配列、又はSEQ ID NO: 10第81～1180番ヌクレオチドの配列から選ばれる、少なくとも約100の連続ヌクレオチドの配列に相当するヌクレオチド配列に相当する。しかし、PARP遺伝子のN末端ドメインの完全な配列に、又はPARP遺伝子の完全な配列、特にそのタンパク質コーディング領域にさえ相当する配列を含む、センス又はアンチセンスコーディング転写領域を用い得ることは、明らかである。更に好ましいのは、PARP遺伝子のC末端触媒性ドメインから選ばれる、少なくとも約100の連続ヌクレオチドの配列、好ましくは、PARPシグニチャーコーディングヌクレオチド配列、特に上記のPARPシグニチャーコーディングヌクレオチド配列を含む、少なくとも100ヌクレオチドの配列に（上記の配列同一性の制約を有して）相当する、転写センス及びアンチセンスコーディング領域である。やはり、PARP遺伝子のC末端ドメイ

10

20

30

40

50

ンの完全配列に相当する配列を含む、転写センス又はアンチセンスコーディング領域を用い得ることは、明らかである。

【0063】

もう一つの特に好適な実施態様では、PCD調節キメラ遺伝子は、両クラスの内因性PARPの見かけの活性レベルを低下させることによって、内因性PARP活性の機能レベルを低下させる。このためには、転写されるDNA領域は、生物学的活性RNAをコードし、それが、NAP若しくはZAPクラスのPARPタンパク質、又は両者を阻害するタンパク質若しくはペプチド、例えば不活性化抗体又は優性ネガティブPARP突然変異体へと翻訳される。

【0064】

「PARPタンパク質の不活性化抗体」は、PARPタンパク質のいくつかのエピトープ、例えば、ZAP1の第111～118位からのジンクフィンガーIIの部分、又はZAP2の対応するペプチドを対象とするエピトープに少なくとも特異的に結合し、標的タンパク質の活性を阻害する、抗体又はその部分である。

【0065】

本明細書に用いられる限りで、「優性ネガティブPARP突然変異体」は、PARPタンパク質（又はその変化形）、好ましくは、真核標的宿主細胞に内因性であるPARPタンパク質の少なくとも一部を含む、PARP活性を保有せず、該宿主細胞内で発現されたとき、該内因性PARPタンパク質の活性に対して阻害効果を有するタンパク質又はペプチドである。好適な優性ネガティブPARP突然変異体は、機能性DNA結合ドメイン（又はその変化形）を、触媒ドメインなしに含む（例えば、ZAPクラスのPARPの約355～約375アミノ酸のドメインを含むN末端ジンクフィンガー、特に、SEQ ID NO: 2第1～370番アミノ酸のアミノ酸配列を含むDNA結合タンパク質ドメイン、SEQ ID NO: 11第1～98番アミノ酸のアミノ酸配列を含むDNA結合タンパク質ドメイン、若しくは第1～88番アミノ酸のアミノ酸配列が、SEQ ID NO: 11の第1位のアミノ酸から第98位のアミノ酸までのアミノ酸配列で置き換えられた、SEQ ID NO: 2第1～370番アミノ酸のアミノ酸配列を含むDNA結合タンパク質ドメイン、又は例えば、NAPクラスのPARPの約135～約160アミノ酸のN末端DNA結合タンパク質ドメイン、特に、SEQ ID NO: 4第1～159番アミノ酸のアミノ酸配列を含むDNA結合タンパク質ドメイン、若しくはSEQ ID NO: 6第1～138番アミノ酸のアミノ酸配列を含むDNA結合タンパク質ドメイン）か、若しくは機能性触媒ドメインなしに含む（例えば、いわゆるPARPシグニチャーが突然変異した、特にSEQ ID NO: 2の第850位、SEQ ID NO: 4の第532位、SEQ ID NO: 6の第517位の保存されたリシンが突然変異した不活性PARP突然変異体）か、又はそれからなるタンパク質である。好ましくは、優性ネガティブPARP突然変異体は、それらのDNA結合活性を保持しなければならない。優性ネガティブPARP突然変異体は、担体タンパク質、例えばβ-グルクロニダーゼと融合させることができる（SEQ ID NO: 12）。

【0066】

また、1種類又はそれ以上の優性ネガティブPARP突然変異体をコードする一つ若しくはそれ以上のPCD調節遺伝子を用いて、本発明の第一の面の目標を達成することができる。一つのPCD調節キメラ遺伝子を用いたときは、この遺伝子は両クラスのPARP遺伝子の発現を同時に低下させることができなければならない。

【0067】

本発明の第一の面のもう一つの実施態様では、これらの細胞内の内因性PARP遺伝子のヌクレオチド配列を、コードされる突然変異PARPタンパク質が、その活性の約10%を保持するように調節することによって、真核細胞、特に植物細胞におけるPARPの機能レベルを低下させる。内因性PARP遺伝子のそのような調節を達成する方法は、例えば米国特許第5,527,695号明細書に記載された方法によって、内因性PARP遺伝子を突然変異PARP遺伝子と交換するための相同組換えを包含する。好適実施態様では、内因性PARP遺伝子のヌクレオチド配列の、そのような部位指向性調節は、国際公

10

20

30

40

50

開特許第96／22364号公報又は米国特許第5,565,350号明細書に記載のとおり、キメラDNA／RNAオリゴヌクレオチドの導入によって達成される。

【0068】

しかし、植物細胞に関しては、好ましくは、一方のクラスのPARP遺伝子、特にZAPクラスのPARP遺伝子の発現を低下させる活性を有する生物学的活性RNAをコードする、一つのPCD調節キメラ遺伝子の導入は、本発明の第一の面によるこれらの植物細胞内のPARP活性全体の低下、すなわちこれらの植物細胞におけるプログラムされた細胞死を阻害又は予防するのに充分であり得る。

【0069】

本発明のこの実施態様では、PCD調節キメラ遺伝子は、好ましくは、本明細書に述べた基準によれば、内因性PARP遺伝子の一方に対するセンスRNAとして分類する、好ましくは少なくとも100ヌクレオチドの長さの、少なくとも一つのRNA領域を含み、かつ本明細書に述べた基準によれば、内因性PARP遺伝子の一方に対するアンチセンスRNAとして分類する、好ましくは少なくとも100ヌクレオチドの長さの、少なくとも一つの別のRNA領域を含み、そのために、該アンチセンス及びセンスRNA領域が、好ましくは少なくとも約100ヌクレオチドの距離にわたって、二本鎖領域へと組み合わせることが可能な、生物学的活性RNAのコードを有する転写領域を含む。

10

【0070】

一方のクラスのPARPタンパク質、特に、本明細書に記載されたようなZAPクラスのPARPタンパク質の機能又は見かけのレベルを低下させることができる、一つのPCD調節キメラ遺伝子の導入も、本発明の第一の面による、植物細胞におけるPARP活性全体の低下に同様に充分であり得ると予測される。

20

【0071】

本発明の第一の面による、少なくとも一つのPCD調節キメラ遺伝子を含む、植物細胞におけるプログラムされた細胞死の低下又は阻害は、不都合な状態に対する増強された耐性、例えば、化学物質の投与が与えるストレスに対する耐性、寒冷ストレス耐性、病原体及び疫病が与えるストレスに対する耐性、乾燥耐性、熱ストレス耐性等々を生じることができる。

【0072】

本発明のもう一つの面では、真核細胞、好ましくは選ばれた細胞、特に選ばれた植物細胞のプログラムされた死を、PARPの機能レベルの重大な低下、好ましくはDNA修復、又はゲノム完全性の維持がそれ以後不可能となるような、ほとんど完全な低下によって増強する。

30

【0073】

本発明のこの面の一実施態様では、真核細胞、好ましくは植物細胞内のPARPの機能レベルを、これらの細胞での転写を指令できるプロモーター、好ましくは植物発現性プロモーターと、転写されたとき、両クラスのPARP遺伝子がコードする内因性PARP活性の機能レベルを低下させ得る生物学的活性RNA分子を生じる、DNA領域に動作可能に結合された、機能性3'転写終結及びポリアデニル化領域とを含む、少なくとも一つのPCD調節キメラ遺伝子をこれらの細胞に導入することによって、大幅に低下させ、特にほぼ完全に抑止する。

40

【0074】

本発明の第二の面の好適実施態様では、少なくとも二つのそのようなPCD調節キメラ遺伝子を細胞に導入し、それによって、第一のPCD調節キメラ遺伝子がコードする生物学的活性RNAが、NAPクラスの遺伝子がコードする内因性PARP活性の機能レベルを低下させ、かつそれによって、第二のPCD調節キメラ遺伝子がコードする生物学的活性RNAが、ZAPクラスの遺伝子がコードする内因性PARP活性の機能レベルを低下させる結果、組み合わされたPARP活性を大幅に低下させ、特にほぼ完全に除去する。

【0075】

本発明の第一の面について述べたとおり、PCD調節キメラ遺伝子の転写領域は、生物学

50

的活性RNAをコードし、それが、（例えばアンチセンス作用、共抑制、又はリボザイム作用を通じて）内因性PARP遺伝子の発現に干渉することができるか、又は該生物学的活性RNAが、NAP若しくはZAPクラスのPARPタンパク質を阻害できるペプチド若しくはタンパク質、例えば不活性化する抗体、又は優性ネガティブPARP突然変異体に更に翻訳されることができる。

【0076】

本発明の第二の面の特に好適な実施態様では、PCD調節キメラ遺伝子（PCD増強キメラ遺伝子）の転写領域は、本明細書に述べた基準によれば、内因性PARP遺伝子の少なくとも一方に対するセンスRNAとして分類する、（好ましくは少なくとも約100ヌクレオチドの長さの）少なくとも一つのRNA領域と、本明細書に述べた基準によれば、内因性PARP遺伝子の少なくとも一方に対するアンチセンスRNAとして分類する、（好ましくは少なくとも約100ヌクレオチドの長さの）少なくとも一つのRNA領域とを含み、そのために、該アンチセンス及びセンスRNA領域が（好ましくは少なくとも約100ヌクレオチドの距離にわたる）二本鎖領域へと組み合わせることができる、生物学的活性RNAのコードを有する。特に好適な実施態様では、一方は、NAPクラスのPARPタンパク質の機能レベルを低下させるよう照準され、他方は、ZAPクラスのPARPタンパク質の機能レベルを低下させるよう照準された、少なくとも二つのそのようなPCD調節遺伝子を、真核細胞又は生物、好ましくは植物細胞又は植物に導入する。

【0077】

本発明のキメラ性PCD調節遺伝子の転写されるDNA領域に関する、異なる実施態様を様々な組合せで用いて、本発明の目標に到達できることは明らかである。例えば、第一のキメラ性PCD調節遺伝子は、ZAPクラスの内因性PARP遺伝子の発現を低下させるよう設計されたセンスRNAをコードしてよく、一方、第二のキメラ性PCD調節遺伝子は、NAPクラスの内因性PARP遺伝子の発現を低下させるよう設計された優性ネガティブPARP突然変異体をコードしてよい。

【0078】

真核細胞へのPCD調節キメラ遺伝子の導入が、最終的に、これらの細胞での組み合せたPARPの程々に低下したか、又は大幅に低下した機能レベル（すなわち阻害されたPCDのか、又は増強されたPCDの）のいずれを招くことになるかは、これらのPCD調節遺伝子の（転写レベル又は組み合された転写／翻訳レベルのいずれかでの）発現レベルによって決定されることになる。PCD調節遺伝子の発現レベルへの主な寄与因子は、プロモーター領域の選択であるが、他の因子（例えば、これらに限られないが、3'末端の選択、イントロンの存在、転写領域のコドン使用法、mRNAの安定度、翻訳開始部位周辺の共通配列の存在、5'及び3'非翻訳RNA領域の選択、PEST配列の存在、安定に組み込まれたPCD調節遺伝子の挿入部位を囲む染色質構造の影響、導入されたPCD調節遺伝子のコピー数等々）、又はそれらの組合せも、PCD調節遺伝子の最終的な発現レベルに寄与することになる。一般に、組み合されたPARPの機能レベルの程々の低下は、比較的弱いプロモーターを含むPCD調節遺伝子によって達成できるが、組み合されたPARPの機能レベルの大幅な低下は、比較的強いプロモーターを含むPCD調節遺伝子によって達成できると想定することができる。しかし、特定のプロモーターを含むPCD調節遺伝子の発現レベル、及び結果的にはPCDに対するその効果は、既述のとおり、その他の寄与因子との相関として変動することができる。

【0079】

本発明の特定の実施態様を目的として、PCD調節キメラ遺伝子は、構築性プロモーター、又は生物体内、特に植物体内の至るところの細胞型のすべて若しくは大部分で発現されるプロモーター、例えば、T-DNA遺伝子に由来するプロモーター領域、特にアグロバクテリウム属のTi若しくはRiプラスミドのオパイン合成酵素遺伝子（例えばnos、ocsプロモーター）、又はウイルス遺伝子のプロモーター領域（例えばCaMV35Sプロモーター、又はその変種）を含んでよい。

【0080】

随意にか、又は環境的なきっかけに応じて、例えば、外部の刺激、例えば、これらに限られないが、化学的化合物（例えば毒性緩和剤、除草剤、グルココルチコイド）の適用、明条件、非生物学的ストレス（例えば、傷害、重金属、極端な温度、塩分又は乾燥）若しくは生物学的ストレス（例えば、真菌、ウイルス、細菌、昆虫、線虫、マイコプラズマ、及びマイコプラズマ様生物等々を包含する、病原体又は疫病の感染）によって活性化できる、誘導性プロモーターを含ませることによって、P C D調節遺伝子の発現を制御するのが更に好都合であり得る。本発明に適する植物発現性の誘導性プロモーターの例は、線虫誘導性プロモーター（例えば国際公開特許第92/21757号公報に開示されたもの）、真菌誘導性プロモーター（国際公開特許第93/19188号、第96/28561号公報）、デキサメタゾンのようなグルココルチコイドの適用後に誘導できるプロモーター、又はテトラサイクリンの適用後に抑制若しくは活性化されるプロモーター〔Gatz et al., 1988; Weinmann et al., 1994〕である。

10

【0081】

特に本発明の第二の面（すなわち増強されたP C D）に関する、本発明のいくつかの実施態様では、プログラムされた細胞死に対する効果を生物、特に植物の細胞の特定のサブセットに限定するのが好都合又は必要であり、そのため、P C D調節遺伝子は、組織特異的又は細胞型特異的プロモーターを包含し得る。特定の組織又は細胞型で選択的に発現される、適切な植物発現性プロモーターの例は、当業者には公知であり、種子特異的プロモーター（例えば国際公開特許第89/03887号公報）、器官原基特異的プロモーター〔An et al., 1996〕、茎特異的プロモーター〔Keller et al., 1988〕、葉特異的プロモーター〔Hudspeth et al., 1989〕、葉肉特異的プロモーター（例えば、光誘導性のリブローースー1，5ービスリン酸カルボキシラーゼプロモーター）、根特異的プロモーター〔Keller et al., 1989〕、塊茎特異的プロモーター〔Keil et al., 1989〕、維管束組織特異的プロモーター〔Peleman et al., 1989〕、分裂組織特異的プロモーター〔例えば無苗条分裂組織（S T M）遺伝子のプロモーター、Long et al., 1996〕、原基特異的プロモーター〔例えばキンギョソウ属C y c D 3 a遺伝子、Doonan et al., 1998〕、葯特異的プロモーター（国際公開特許第89/10396号、第92/13956号、第92/13957号公報）、柱頭特異的プロモーター（国際公開特許第91/02068号公報）、裂開帯特異的プロモーター（国際公開特許第97/13865号公報）、種子特異的プロモーター（国際公開特許第89/03887号公報）等々を包含するが、これらに限定されない。

20

30

【0082】

好ましくは、本発明のキメラ性P C D調節遺伝子は、植物発現性プロモーター、好ましくは構築性プロモーター、例えばC a M V 3 5 Sプロモーター、又はリブローースー1，5ービスリン酸カルボキシラーゼの小さい副単位をコードする遺伝子のプロモーターのような光誘導性プロモーターにその5'末端で動作可能に結合され、かつ適切な植物転写3'末端形成及びポリアデニル化シグナルにその3'末端で動作可能に結合された、マーカーD N Aを含む、マーカー遺伝子、好ましくはキメラマーカー遺伝子を伴う。マーカーD N Aの選択は、決定的に重要ではなく、適切ないかなるマーカーD N Aを用いることもできることが予測される。例えば、マーカーD N Aは、区別できる「色」を形質転換された植物細胞に与えるタンパク質をコードすることができるか（例えばA 1遺伝子〔Meyer et al., 1987〕又は緑色蛍光タンパク質〔Sheen et al., 1995〕）、除草剤耐性を形質転換された植物細胞に与えることができるか（例えば、ホスフィノトリシンに対する耐性をコードするb a r遺伝子：ヨーロッパ特許第0，242，246号公報）、又は抗生物質耐性を形質転換された細胞に与えることができる（例えばゲンタマイシンに対する耐性をコードするa a c（6'）遺伝子：国際公開特許第94/01560号公報）。

40

【0083】

P C D調節キメラ遺伝子を真核細胞に導入する方法、とくに植物細胞を形質転換する方法は、当技術に周知であり、本発明の方法に決定的に重要ではないと考えられる。形質転換は、一時的にか、又は安定的にかのいずれかに形質転換された（そのために、P C D調節

50

キメラ遺伝子が、細胞のゲノム、特に細胞の核ゲノムに安定的に挿入された)細胞を生じる。

【0084】

真核細胞及び生物、特に植物細胞及び植物におけるプログラムされた細胞死を変更するための、本発明に記載された方法及び手段が、いくつかの重要な用途の可能性を有することは明らかである。本発明の方法及び手段によるPCDの阻害は、国際公開特許第97/06267号公報に記載されたとおり、形質転換の際に細胞、特に植物細胞に賦課されるストレスを救済し、そのため、形質転換効率を高めるのに用いることができる。PCDの阻害も、真核細胞、特に植物細胞の細胞培養を改良するのに用いることができる。本発明の手段及び方法を用いて、特定の細胞型にPCDを誘発することは、細胞毒素の利用を要する方法に用いることができる。PCDは、細胞を死なせる「自然な」方法であることから、本発明のPCD増強性キメラ遺伝子の利用は、細胞溶解へと導くRNアーゼ又はジフテリア毒素のような、その他の細胞毒性遺伝子の利用に優る改良を構築する。その上、標的細胞とは異なる細胞における、PCD増強性遺伝子の低レベルの発現は、これらの細胞におけるPARP活性の大幅な低下に代えて、適度な低下へと導き、こうして、非標的細胞におけるPCDを実際に阻害することになる。

10

【0085】

植物に関しては、PCD増強性キメラ遺伝子の好ましい適用は、

【0086】

1. 単数又は複数のPCD増強性キメラ遺伝子が、国際公開特許第93/19188号又は第96/28561号公報に記載されたような、真菌応答プロモーターを含むことによって、真菌の感染に対して防護された植物の生成；

20

【0087】

2. 単数又は複数のPCD増強性キメラ遺伝子が、国際公開特許第92/21757号公報に開示されたような、線虫誘導性プロモーターを含むことによる、線虫耐性植物の生成；

【0088】

3. 単数又は複数のPCD増強性キメラ遺伝子が、(国際公開特許第89/10396号、第92/13956号及び第92/13957号公報に開示されたような)薬特異のプロモーター、又は(国際公開特許第91/02068号公報に開示されたような)柱頭特異のプロモーターを含むことによる、雄又は雌の不稔植物の生成；

30

【0089】

4. 単数又は複数のPCD増強性キメラ遺伝子が、(国際公開特許第97/13865号公報に開示されたような)裂開帯特異のプロモーターを含むことによる、改良された種子破片の特徴性を有する植物の生成；

を包含するが、これらに限定されない。

【0090】

意外にも、本発明の第一の面によるPCD調節キメラ遺伝子、好ましくは、ZAPクラスのパラップ遺伝子の発現を調節するキメラ遺伝子、特に、転写領域が、本明細書に記載されたような、センス及びアンチセンスRNAを同時に含む、生物学的活性RNAをコードする、ZAPクラスのパラップ遺伝子の発現を調節するキメラ遺伝子の導入の際に、植物のカルス及び植物が、強化された成長を示すことが見出された。

40

【0091】

本発明を特定の作用様式に限定するものではないが、増大した成長は、おそらく、細胞分裂を阻害しているシグナルに対する閾値を上昇させ、こうして、より活発に成長する植物へと導くことによる、プログラムされた細胞死を生じる細胞の数の減少の結果であると考えられる。これらの植物は、本願の別の個所で説明したとおり、よりストレス耐性でもある。

【0092】

したがって、第三の面では、本発明は、本発明の第一の面による少なくとも一つのPCD

50

調節キメラ遺伝子、好ましくは、ZAPクラスのPARP遺伝子の発現を調節するキメラ遺伝子、特に、転写領域が、センス及びアンチセンスRNAを同時に含む生物学的活性RNAのコードを有する、ZAPクラスのPARP遺伝子の発現を調節するキメラ遺伝子を含む、植物細胞、植物組織及び植物の成長、好ましくは栄養成長を増大させる方法にも関する。

【0093】

本発明は、本質的にはすべての植物種及び変種に適用できることは明らかであるが、本発明は、商業的価値を有する植物におけるプログラムされた細胞死を変更するのに特に適すると思われる。本発明を適用できる、特に好ましい植物は、トウモロコシ、採油用セイヨウアブラナ、アマニ、コムギ、イネ科植物、ムラサキウマゴヤシ、マメ科植物、アブラナ科植物、トマト、レタス、ワタ、コメ、オオムギ、パレイショ、タバコ、テンサイ、ヒマワリ、及びカーネーション、キク、バラ、チューリップなどの鑑賞植物である。

10

【0094】

得られる形質転換された植物は、同じ特徴を有する、より形質転換された植物を生産するか、又は本発明の細胞分裂制御キメラ遺伝子を、同じであるか若しくは関連する植物種のその他の変種に導入するための、慣用の育種計画に用いることができる。形質転換された植物から得られた種子は、本発明のPCD調節遺伝子を、安定的なゲノム挿入断片として含有する。

【0095】

下記の非限定的実施例は、アポトーシス制御キメラ遺伝子の構築、及びそのような遺伝子の、真核細胞及び生物におけるプログラムされた細胞死の調節のための用途を説明する。実施例中に別途記載されない限り、すべての組換えDNAの手法は、Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY、並びにAusubel et al. (1994) Current Protocols in Molecular Biology, Current Protocols, USAの第1及び2巻に記載されたとおりの標準的プロトコルに従って実施した。植物の分子的作業の標準的材料及び方法は、BIOS Scientific Publications Ltd. (UK)及びBlackwell Scientific Publications, UKが共同で出版した、R.D.D. CroyによるPlant Molecular Biology Labfax (1993)に記載されている。

20

【0096】

説明及び実施例の全体を通して、下記の配列が参照される：

30

SEQ ID NO: 1 : トウモロコシのZAP遺伝子のDNA配列 (zap1)

SEQ ID NO: 2 : トウモロコシのZAPタンパク質のタンパク質配列 (ZAP1)

SEQ ID NO: 3 : トウモロコシのNAP遺伝子のDNA配列 (nap)

SEQ ID NO: 4 : トウモロコシのNAPタンパク質のタンパク質配列 (NAP)

SEQ ID NO: 5 : シロイヌナズナのNAP遺伝子のDNA配列 (app)

SEQ ID NO: 6 : シロイヌナズナのNAPタンパク質のタンパク質配列 (APP)

SEQ ID NO: 7 : 非慣用的PARPタンパク質のAドメインに対する共通配列

SEQ ID NO: 8 : 非慣用的PARPタンパク質のA1ドメインに対する共通配列

SEQ ID NO: 9 : 非慣用的PARPタンパク質のA2ドメインに対する共通配列

SEQ ID NO: 10 : トウモロコシの第二のZAP遺伝子のDNA配列 (Zap2)

40

SEQ ID NO: 11 : トウモロコシの第二のZAPタンパク質のタンパク質配列 (ZAP2)

SEQ ID NO: 12 : APPのDNA結合ドメインとGUSタンパク質との間の融合タンパク質のアミノ酸配列

SEQ ID NO: 13 : 縮重PCRプライマー

SEQ ID NO: 14 : 縮重PCRプライマー

SEQ ID NO: 15 : PCRプライマー

SEQ ID NO: 16 : PCRプライマー

SEQ ID NO: 17 : PCRプライマー

SEQ ID NO: 18 : PCRプライマー

SEQ ID NO: 19 : PCRプライマー

50

SEQ ID NO: 20 : PCRプライマー

SEQ ID NO: 21 : appプロモーター-gus翻訳融合

【0097】

配列リストのフリーテキスト

下記のフリーテキストを、本願の配列リストの部に用いた：

<223>人工配列の記載：非慣用的PARPタンパク質のAドメイン

<223>人工配列の記載：非慣用的PARPタンパク質のA1ドメイン

<223>人工配列の記載：非慣用的PARPタンパク質のA2ドメイン

<223>人工配列の記載：APPのN末端ドメインとGUSタンパク質との間の融合タンパク質

<223>人工配列の記載：縮重PCRプライマー

<223>人工配列の記載：PCRプライマーとして用いるためのオリゴヌクレオチド

<223>人工配列の記載：β-グルクロニダーゼ遺伝子とのAPPプロモーターの融合

<223>翻訳開始コドン

【0098】

【実施例】

実験の手順

酵母及び細菌の菌株

APPタンパク質の発現には、サッカロミセス・セレビシエ*Saccharomyces cerevisiae*の菌株DY (MATa his3 can1-10 ade2 leu2 trp1 ura3:: (3xSV40 AP1-lacZ) [Kuge & Jones, 1994] を用いた。酵母の形質転換は、Dohmenら (1991) に従って実施した。菌株は、最小SDC培地 (0.67%酵母窒素ベース、0.37%カザアミノ酸、2%グルコース、50mg/lのアデニン、及び40mg/lのトリプトファン) で増殖させた。APP発現の誘導には、SDC中のグルコースを2%ガラクトースに置き換えた。

【0099】

プラスミド操作及びライブラリースクリーニングには、大腸菌*Escherichia coli*の菌株XL-1 (Stratagene, La Jolla, CA) を用い、標準の手順 [Ausubel et al., 1987; Sambrook et al., 1989] に従って実施した。APPタンパク質の発現には、大腸菌BL21 [Studier & Moffat, 1986] を、植物の安定形質転換には、アグロバクター*Agrobacterium tumefaciens* C58C1Rif^R株 (pGV2260) [Dablaere et al., 1985] を、それぞれ

【0100】

ポリ (ADP-リボース) ポリメラーゼ活性のアッセイ

APPの酵素活性は、下記のとおり調製した酵母菌株の全タンパク質抽出物中で検定した。DY (pV8SPA) 又はDY (pYEDP1/8-2) を、旋回振盪機上のSDC培地50ml中で、150rpm、30℃で終夜増殖させた。1,000xgでの遠心分離によって、酵母細胞を採集し、0.1Mリン酸カリウム緩衝液 (pH6.5) 150mlで3回洗浄し、ソルビトール緩衝液 (1.2Mソルビトール、0.12MK₂HPO₄, 0.033Mクエン酸、pH5.9) 5ml中に再懸濁させた。リティカーゼ (Boehringer, Mannheim、ドイツ国) を細胞懸濁液に加えて、30U/mlの最終濃度とし、30℃で1時間、細胞を温置した。次いで、酵母のスフェロプラストを、ソルビトール緩衝液で3回洗浄し、氷冷溶菌緩衝液 (100mMトリスHCl、pH7.5、400mMNaCl、1mMEDTA、10%グリセリン、1mMDTT) 2ml中に再懸濁させた。音波処理の後、溶菌液を、20,000xg、4℃で20分間遠心分離し、上清を、反応緩衝液 (100mMトリスHCl、pH8.0、10mMgCl₂、1mMDTT) で平衡させたEcono-Pack (登録商標) 10DGカラム (Bio-Rad, Richmond, CA) 上で脱塩した。タンパク質のタンパク質分解による分解を抑えるため、溶菌及び反応緩衝液は、50mlあたり1錠のプロテアーゼ阻害剤反応混液 (Boehringer) で強化した。核酸を、NaCl及び硫酸プロタミンを、それぞれ、600mM及び10mg/mlの最終濃度まで加えることによって、全抽出物から取り出した。室温で10分間の温置の後、20,000xg、4℃で15分間の遠心分離によって、沈澱を除去した。上清の緩衝液を

、Econo-Pack 10 D G カラム上でのゲル濾過によって、反応緩衝液と交換した。

【0101】

ポリ (A D P-リボース) の合成のアッセイは、Collinge 及び Althaus (1994) を適応させた。約 500 μg の全酵母タンパク質を、 ^{32}P -N A D⁺ 30 μCi (500 Ci/mmol)、60 μM の最終濃度までの未標識 N A D⁺、及び 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の音波処理したサケ精子 D N A で補強した反応緩衝液中で温置した。室温で 40 分間温置した後、停止緩衝液 (200 mM トリス H C l、pH 7.6、0.1 M N a C l、5 mM E D T A、1% N a⁺-N-ラウロイル-サルコシン、及び 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ プロテインゼン K) 500 μl を加え、反応物を、37°C で終夜温置した。フェノール及びフェノール/クロロホルム抽出の後、0.1 M N a A c (pH 5.2) とともに 2.5 容のエタノールを用いて、重合体を沈澱させた。ペレットを、70% エタノールで洗浄し、乾燥し、70% ホルムアミド、10 mM E D T A、0.01% ブロモフェノールブルー、及び 0.01% キシレンシアノールに溶解した。サンプルを、80°C で 10 分間加熱し、次いで、12% ポリアクリルアミド/6 M 尿素の配列決定用ゲルに装荷した。ゲルを、3 MM 紙 (Whatman International, Maidstone、英国) 上で乾燥し、Kodak X-Omat X 線フィルム (Eastman Kodak, Richmond, NY) に曝露させるか、又は PhosphorImager (登録商標) 445 S I (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) を用いて走査するかのいずれかに付した。

10

【0102】

免疫学的手法

アミノ酸 Met³¹⁰~His⁶³⁷ の A P P ポリペプチドをコードする断端 a p p の c D N A を、大腸菌 B L 2 1 (pET Δ NdeSPA) の 500 ml 培養体を 1 mM イソプロピルー β -D-チオガラクトピラノシドで誘導した後、N 末端の 6 個のヒスチジン残基との翻訳融合として発現させた。A P P ポリペプチドは、製造者 (Qiagen, Chatsworth, CA) のプロトコルに従って、N i²⁺-N T A-アガロースカラムによる (6 M 塩酸グアニジウムの存在下での) 変性条件下のアフィニティークロマトグラフィーによって、ほぼ均質となるまで精製した。P B S に対して透析した後、可溶性及び不溶性 A P P ポリペプチドの混合物を用いて、2羽の New Zealand White 系ウサギを、標準的免疫感作プロトコル [Harlow & Lane, 1988] に従って感作した。ウエスタンブロット分析のため、タンパク質を、変性用 S D S-P A G E によって変化させ [Sambrook et al., 1989; Harlow & Lane, 1988]、Semi-Dry Blotter II (Kem-Em-Tec, Copenhagen, Denmark) を用いて、ニトロセルロース膜 (Hybond-C, Amersham) に移した。

20

30

【0103】

酵母細胞における in situ 抗原定位を、記載されたとおり [Harlow & Lane, 1988] 実施した。酵母スフェロプラスト内の A P P タンパク質を定位するため、抗 A P P 血清を、トリス緩衝生理食塩水-B S A 緩衝液中で 1:3, 000 ~ 1:5, 000 に希釈した。ポリ (A D P-リボース) 重合体を特異的に認識する 10 H モノクローナル抗体 [Ikajima et al., 1990] を、P B S 緩衝液中で 1:100 に希釈して用いた。マウス抗体を、フルオレセイン=イソチオシアナート (F I T C) (Sigma) と結合したヒツジ抗マウス I g G の F (a b')₂ フラグメントを 1:200 の希釈で用いて検出した。ウサギ I g G を、C Y-3 と結合したヒツジ抗ウサギ I g G ヒツジ F (a b')₂ フラグメント (Sigma) を 1:200 の希釈で用いて検出した。D N A の視覚化には、スライドを、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の 4', 6'-ジアミジノー-2-フェニルインドール (D A P I; Sigma) とともに P B S 中で 1 分間温置した。蛍光造影は、Axioskop という表面蛍光顕微鏡 (Zeiss, Jena、ドイツ国) で実施した。F I T C 及び C Y-3 の観察には、それぞれ、23 及び 15 のフィルターキューブを用いた。細胞は、フジカラー 100 スーパープラスフィルムで撮影した。

40

【0104】

植物材料及び組織化学的分析

タバコ *Nicotiana tabacum* の S R 1 系 [Maliga et al., 1975] を用い、アグロバクター C 58 C 1 R i^f 株 (pGV2260; pGCNSPAGUS) との葉盤共培養の手順 [De Block et al., 1987] に従って、安定的な形質転換体を生成した。対照としては、35 S C a M V の制御

50

下での真正GUSタバコSR1系を用いた。appプロモーター-GUS融合の形質転換には、シロイヌナズナの生態型Columbiaをin situ浸透の手順に従って用いた。

【0105】

GUS活性のin situ組織化学的染色のため、植物サンプルを、氷冷90%アセトン中で30分間固定し、0.1MK₂HPO₄ (pH7.8)で洗浄し、次いで、染色緩衝液(0.1MK₂HPO₄, pH7.8、2mMX-Glc、20mMFe³⁺-EDTA)中で37℃で温置した。染色された植物組織は、70%エタノール中で4℃で貯蔵した。必要なときは、フェノール性酸化による組織の褐変を、ラクトフェノールとの温置によって緩和した〔Beeckman & Engler, 1994〕。GUS染色は、Jenalumar光学顕微鏡(Zeiss)下で検査した。植物組織を、フジカラー100スーパープラスフィルムで撮影した。

10

【0106】

その他の方法

プラスミド構築工程は、UBS Biochemicals (Cleveland, OH) が提供するプロトコルに従って実施した、DNA配列決定によって定型的に確認した。核酸ハイブリダイゼーションのための³²P標識化DNAのプロブは、Ready-Prime DNA標識化キット(Amersham)によって合成した。DNA及びRNAハイブリダイゼーション実験のために、Church及びGilbert (1984) の緩衝系(0.25Mリン酸ナトリウム、pH7.2、7%SDS、1%BSA、1mMEDTA)を用いた。ウエスタンブロット分析のために、酵母全タンパク質を、植物組織について記載されたとおりに〔Hurkman & Tanaka, 1986〕、基本的にはフェノールで抽出した。ノーザンブロット分析のためには、全酵母RNAを、記載されたとおりに〔Ausubel et al., 1987〕、熱フェノールで抽出した。RNAは、グリオキサールで変性させた後に、1.5%アガロースゲル上で分離した〔Sambrook et al., 1989〕。Hybond-Nナイロンフィルター(Amersham)を、核酸ブロット分析に用いた。

20

【0107】

実施例1：トウモロコシのPARP相同体をコードする遺伝子の単離

単数又は複数のPARP相同体をコードするトウモロコシcDNAを単離する目的で、二つの取組み方に従った。第一に、トウモロコシcDNAライブラリーを、アラビドプシス属appcDNAから調製したDNAプロブを用いて、低厳密度DNA-DNAハイブリダイゼーション条件下でスクリーニングした。第二に、トウモロコシPARPの部分のPCR増幅を、テンプレートとしての第一鎖cDNA、及び「PARPシグニチャー」の配列に基づいて設計した、すべての公知PARPタンパク質のうちで最も保存されたアミノ酸配列である、二つの縮重プライマーを用いて実施した。

30

【0108】

トウモロコシ(Zea mays L.)、同系繁殖系B734の葉からのλZAP(Stratagene)cDNA。標準の手順〔Sambrook et al., 1989〕に従って、プラーク(500,000)をスクリーニングした。アラビドプシス属のappプロブによるスクリーニングの後、1.4kbpの不完全長cDNAを精製した。appプロブによる最初のcDNAライブラリースクリーニング、及びその後のcDNA末端の5'急速増幅(RACE)PCR分析の後、nap遺伝子、すなわちアラビドプシス属appのトウモロコシの相同体を同定した。5'RACEPCRのために、Marathonキット(Clontech, Palo Alto, CA)、及び1週齢のトウモロコシの若芽の内鞘、外鞘および葉から単離したトウモロコシポリ(A)⁺RNA0.5μgを用いてテンプレートを調製した。PCR増幅のための遺伝子特異的な、入れ子型nestedプライマーは、napプライマーについては5'-GGGACCATGTAGTTTATCTTGACCT-3'(SEQ ID NO:15)及び5'-GACCTCGTACCCCAACTCTCCCAT-3'(SEQ ID NO:16)であった。増幅されたPCR産物を、サブクローニングし、配列決定した。800bpのフラグメントを、nap特異的プライマーで増幅したところ、napcDNAの2,295bp長の配列を再構築するのを可能にした(SEQ ID NO:3)。

40

【0109】

NAPタンパク質は、653アミノ酸長であり(分子質量:~73kDa; SEQ ID NO:4)

50

、A P Pに極めて似ていた（61%の配列同一性、及び69%の類似性）。最も重要なことに、N A Pは、A P Pに一致するN末端の構築を有し（図1 A）、植物におけるA P P様タンパク質の構造への非常に厳格な選別圧力を示唆する。n a p遺伝子は、トウモロコシゲノム内で独特であり（図2 A）、2.4 kbの転写体をコードしていた（図2 C）。

【0110】

「P A R Pシグニチャー」内の非常に高度に保存された領域に基づく縮重プライマーと、テンプレートとしてのトウモロコシからの第一鎖c D N Aとを用いて、310 bpのフラグメントを増幅した。Y = C / T ; R = A / G ; N = A / G / C / Tでの縮重プライマー
5' -CCGAATTCGGNTAYATGTTYGGNAA-3' (SEQ ID NO: 13)、及び
5' -CCGAATTCACNATRTAYTCRTTSTA-3' (SEQ ID NO: 14)

でのP C Rのために、第一鎖のc D N Aを、テンプレートとして用い、トウモロコシの若葉からのポリ(A)⁺RNA 5 µg、及びMu M L V逆転写酵素を用いて合成した。P C R増幅を、100 µlの体積としたTaq D N Aポリメラーゼで、下記の条件を用いて実施した：95℃で1分、45℃で2分、72℃で3分、次いで、95℃で1分、45℃で2分、72℃で3分の38周期、72℃で10分の最終温置。

【0111】

310 bpフラグメントの配列は、同じ領域にわたるヒトP A R Pとの55%の配列同一性、及び64%の配列類似性を示したが、しかし、n a p c D N Aの配列とは異なっていた。3個のz a p c D N Aを、縮重プライマーとのP C Rによって得られた、310 bpフラグメントによるスクリーニング後に同定した。これら3個の精製されたc D N Aは、すべて、同じ3'非コーディング領域を有するため、同じ転写体に由来し；最長クローン（#9）を両鎖について配列決定した（SEQ ID NO: 1）。このc D N Aは、689アミノ酸のP A R P相同ポリペプチドをコードし（SEQ ID NO: 2、分子質量：～109 kDa）、Z A P 1と名付けた（図1 B）。Z A P 1の第一のジンクフィンガーは、第三のシステイン残基を含まないCKSCxxxHASVという配列を有するため、おそらく、非機能性であった。

【0112】

トウモロコシのL G 2 0 8 0系からのz a p転写体の5' R A C E P C R分析（スクリーニングしたc D N Aライブラリーは、同系繁殖系B 7 3 4から作成した）を、下記のz a p特異的プライマー：

5' -AAGTCGACGCGGCCGACACCTAGTGCCAGGTCAG-3' (SEQ ID NO: 17)、及び
5' -ATCTCAATTGTACATTTCTCAGGA-3' (SEQ ID NO: 18)

を用いて、上記のとおり実施した。450 bpのP C R産物が、z a p特異的プライマーによるP C R後に得られた。5'末端での長さの僅かな違いのため独立である、z a p特異的プライマーで生成した8個の5' R A C E P C Rフラグメントを配列決定した。L G 2 0 8 0のトウモロコシ植物体からのすべての転写体に、コーディング領域に追加の配列の挿入が存在し、それがZ A Pタンパク質を11アミノ酸だけ長くしていた（980アミノ酸、分子質量：～110.4 kDa）。Z A P 2のジンクフィンガーIは、標準的であり、CKSCxxxHARCと解釈した（図1 B；SEQ ID NO: 11）。配列の差は、トウモロコシの変種間の差、二つの相同遺伝子の発現、又は交番的スプライシングによると思われる。事実、トウモロコシは、少なくとも二つのz a p遺伝子を有する可能性があり（図2 B）、それらは、3.4～3.5 kbの転写体をコードしている（図2 D）。z a p c D N Aから調製したプローブによるD N Aゲルプロットの実験は、アラビドプシス属に相同遺伝子が存在することを示した。

【0113】

構造上は、Z A Pは、動物からのP A R Pに非常に類似した。二つのジンクフィンガーで構築される、十分に保存されたD N A結合ドメインを保有した（マウスP A R PのD N A結合ドメインとの36%の同一性及び45%の類似性）。下記のジンクフィンガーの配列のみを比較することによって、はるかに高い相同性が示された：マウスの酵素中のAla¹-Phe¹⁶²（44%の同一性、及び54%の類似性）、並びにマウスP A R P中の核局在化シグナル（N L S）から下流のドメインのLeu²³⁷～Ser³⁶⁰（40%の同一性、及び50%の

10

20

30

40

50

類似性)。哺乳動物 P A R P に特徴的な二極性核局在化シグナルが、Z A P 中に同定できなかったのに対し、配列 K R K K は、一極性 N L S に適合した (図 1 B)。推定される自己修飾ドメインは、Z A P には僅かにのみ保存され、マウス P A R P におけるより短かった。Z A P、N A P、A P P 及びマウス P A R P 間の触媒ドメインの相同性の編成を、図 2 に示す。注目すべきことに、Z A P の N A D⁺結合ドメインは、A P P 及び N A P のそれ (それぞれ、40% 及び 42% の配列同一性) より、哺乳動物の酵素 (48% の同一性) に類似したのに対し、A P P 及び N A P は、それらの触媒ドメインで 68% 及び 76% 類似した。

【0114】

実施例 2. 非慣用的 P A R P タンパク質は、DNA 依存性ポリ (A D P-リボース) ポリ
10
メラーゼ活性を有する

A P P は、DNA 依存性ポリ (A D P-リボース) ポリメラーゼである。

N A P クラスの P A R P 様タンパク質の活性を理解するために、(酵母で発現された) A P P タンパク質の、より詳細な研究を実施した。アラビドプシス属 A P P タンパク質の発現及び酵素分析のための生物としての、酵母の選択は、数多くの理由からなされた。真核生物として、サッカロミセス・セレビシエは、他の真核生物の未変性タンパク質の発現に、より十分に適し、他のほとんどの真核細胞とは異なって、内因性 P A R P 活性を保有しない [Lindahl et al., 1995]。

【0115】

完全長 a p p c DNA を、下記のようにして、ガラクトース誘導性酵母プロモーターの制
20
御下で、p Y e D P 1 / 8 - 2 に入れた。完全長 a p p c DNA は、X h o I - E c o R I フラグメントとして、p C 3 [Lepiniec et al., 1995] から切り出した。末端を、DNA ポリメラーゼ I のクレノウフラグメントで充填し、このフラグメントを、酵母発現ベクター p Y e D P 1 / 8 - 2 [Cullin & Pompon, 1988] の Sma I 部位にサブクローニングした。得られた発現ベクター p V 8 S P A (図 4) を、サッカロミセス・セレビシエ D Y 株中に形質転換した。

【0116】

大腸菌での A P P 発現のために、a p p c DNA の完全なコーディング領域を、プライマ
ーの

5' -AGGATCCCATGGCGAACAAGCTCAAAGTGAC-3' (SEQ ID NO: 19)、及び

5' -AGGATCCTTAGTGCTTGTAGTTGAAT-3' (SEQ ID NO: 20)

を用いて、P f u DNA ポリメラーゼ (Stratagene) で P C R 増幅し、BamHI フラグメン
トとして p E T 1 9 b (Novagene, Madison, WI) にサブクローニングして、p E T S P
A を得た。p E T S P A からの大腸菌 B L 2 1 での完全長 A P P の発現は、非常に僅かであ
った。より十分な発現を得るために、p E T S P A を N c o I 及び N d e I、又は S m
a I で消化し、末端を、DNA ポリメラーゼ I のクレノウフラグメントで充填し、次いで
、プラスミドを自己結合させた。得られたプラスミドの p E T Δ N d e S P A 及び p E T
Δ S m a S P A のうち、p E T Δ N d e S P A のみが、大腸菌 B L 2 1 における断端 A P
P ポリペプチド (Met³¹⁰~His⁶³⁷) の十分な発現を与えたにすぎなかった。

【0117】

酵母における A P P の発現を、ノーザン及びウエスタンブロット分析によって確認した (図 4)。p V 8 S P A 中のプロモーターは、細胞をグルコース上で増殖させ、ガラクトース含有培地で抑制したときに、不活性であるため、その発現は、炭素源によって厳しく調節されると予測された。しかし、空ベクターを含有する対照 D Y 株と比較しての、RNA のノーザンブロット分析、及び D Y (p V 8 S P A) 中のタンパク質の免疫ブロット分析は、a p p の mRNA 及び A P P のタンパク質は、グルコース含有培地で増殖させたとき
40
でさえ、酵母中に発現されることを示した (図 4 B、列 2)。グルコース含有培地で観察された発現の特色は、a p p mRNA 及び A P P タンパク質は、双方とも、ガラクトースによる誘導後に検出されたそれより短いことであった (図 4 B の列 2 及び 4 を比較されたい)。より高分子量の A P P ポリペプチド (見かけ上は完全長タンパク質) は、ガラク
50

トース含有培地でのみ検出されたにすぎないが、そのような細胞は、断端mRNA及びタンパク質も発現した。この所見についての最もあり得る説明は、DY (pV8SPA) 株をグルコースで増殖させたとき、発現カセットからの漏出的発現が存在して、転写開始点から200～300bp下流で始まる転写が、ガラクトース誘導後に観察されたということである。この比較的短いmRNAは、おそらく、APPの第1メチオニン (Met¹) に対するコードを保有せず、そのため、翻訳は、Met⁷²で開始される。これは、グルコース又はガラクトースで増殖させた株からの、APPポリペプチドの分子質量の～5kDaという、観察された差 (算出された差は、7.5kDaである) を説明すると思われる。分子質量の差が、ポリ (ADP-リボシル) 化による自己修飾に帰され得るという可能性は、PARP阻害剤、例えば3ABA及びニコチンアミドの存在下での株の増殖によって、排除される (図4B; 列6及び8を列4と比較されたい)。

10

【0118】

ポリ (ADP-リボース) の合成を検出するために、全タンパク質を、異なる条件下で増殖させた酵母菌株から抽出し、放射性標識化NAD⁺の存在下で温置した。in vivoでのポリ (ADP-リボース) の合成、及びAPPのあり得る自己修飾を防ぐため、3ABA、すなわちPARPの可逆的阻害剤の存在下でも菌株を増殖させ、その後、阻害剤は、脱塩の際にタンパク質抽出物から除去した。図5は、ポリ (ADP-リボース) が、ガラクトースで増殖させたDY (pV8SPA) のタンパク質抽出物によって合成されるが (図5A、列1及び2)、空ベクターを有する株によっては合成されないことを示す (図5A、列4)。アラビドプシス属のAPPは、長さが40残基までの重合体を合成することができて (図5A、列1)、放射能の大部分は、10～15量体に取り込まれたことも認めることができる。この所見は、他の著者が検出した重合体の大きさに一致する [Chen et al., 1994]。酵母菌株を3ABAとともに増殖させたときの方が、それなしのときより多くの放射能が重合体に取り込まれたが (図5A、列2と比較した列1) ; その理由は、阻害された培養体から抽出されたAPPが、より少なく自己修飾されたか (自己修飾は、PARPの活性を阻害すると考えられる)、又は標識されたNAD⁺が、阻害されない培養体からの酵素によって、既存重合体の延長に用いられた結果、全体として、より低い比活性を生じたかのいずれかである可能性がある。同じ反応条件下で、ヒトPARPによって、反応緩衝液のみでか、又はDY (pYEDP1/8-2) からの酵母の全タンパク質抽出物の存在下で合成されたポリ (ADP-リボース) は (図5A、それぞれ列5及び6)

20

30

【0119】

ニックDNAによる酵素活性の刺激は、動物からのPARPの周知の特性である [Alvarez-Gonzalez & Althaus, 1989]。そのため、本発明者らは、APPタンパク質の活性が、DNA依存性であるか否かを試験した。ガラクトース増殖DY (pV8SPA) のタンパク質抽出物から、酵母核酸 (DNA、RNA) 及び多少の塩基性タンパク質を除去した後、ポリ (ADP-リボース) の合成を、上昇する濃度の音波処理したサケ精子DNAの存在下で分析した。図5Bに認め得るとおり、反応物中に存在するDNAの量と、³²P-NAD⁺の取込みとの間には、直接的相関が存在した。リン光画像の走査は、40 µg/mlのDNAを含有する反応混合物中の方が、2 µg/mlのDNAのそれより～6倍もの多くの放射能が、ポリ (ADP-リボース) に取り込まれることを示した (図5B、それぞれ列4および2)。重合体の合成は、反応混合物中の3ABAに感受性であった (図5B、列5)。

40

【0120】

APPは核タンパク質である

動物細胞では、PARP活性は、核内に局在する [Schreiber et al., 1992]。APPの細胞内局在は、それが核であるならば、APPが真正の植物PARPであることの、重要な追加的指標を与えることができると思われる。このため、酵母細胞内のAPPポリペプチドの局在を、抗APP抗血清を用いて分析した。ガラクトースで増殖させた酵母細胞内

50

のA P Pポリペプチドは、主として、核内に見出された。この局在は、P A R P阻害剤の培地中の存在に影響されなかった。

【0121】

加えて、本発明者らは、A P Pが、ヒトP A R Pについて報告されたように〔Collinge & Althaus, 1994〕、酵母細胞内で構築的に活性であるか否かを試験した。ここでは、固定した酵母スフェロプラストを、ポリ（A D Pーリボース）重合体の特異的に認識する、モノクローナル抗体10H抗体〔Kawamitsu et al., 1984〕とともに温置した。10H抗体による、陽性の黄色がかった緑色の蛍光シグナルは、核内に局在し、ガラクトースで増殖させたD Y（p V 8 S P A）細胞でのみ観察された。陽性染色は、P A R P阻害剤の3 A B A及びニコチンアミドの存在下で増殖させた細胞では、大幅に減少した。

10

【0122】

植物細胞におけるA P Pの細胞内局在を同定するため、植物の研究で広汎に採用される取組み方、すなわち、タンパク質融合が、トランスジェニック植物又はトランスフェクション細胞内で生じたの値の、問題のタンパク質とレポーター遺伝子との間に形成される融合タンパク質の細胞下位置の検証〔Citovsky et al., 1994; Sakamoto & Nagatani, 1996; Terzaghi et al., 1997; von Arnim & Deng, 1994〕を用いた。G U Sと、A P PポリペプチドのMet¹~Pro⁴⁰⁷に広がる部分との、N末端翻訳性融合を実施した。A P Pと、細菌G U Sとの翻訳性融合は、下記のとおり構築した。プラスミドp E T S P AをS m a Iで切断し、アルカリ性ホスファターゼで処理し、p G U S 1からの平滑末端N c o IーX b a Iフラグメントに結合した（Plant Genetic Systems N.V., Gent、ベルギー国）。結合ミックスを、E c o R I X Lー1中に形質転換し、細胞を、0.1 mMイソプロピルーβーDーチオガラクトピラノシド、40 μg/ml 5ーブロモー4ークロロー3ーインドールーβーDーグルクロニド、及び100 μg/mlアンピシリンで強化した、L B培地上に平板播種した。このようにして、p E T S P A G U Sを、青色のコロニーとして選別した。大腸菌における~110 kDa融合タンパク質の発現は、in situ G U S活性ゲル〔Lee et al., 1995〕によって確認した。A P PーG U S融合体を、C a M Vの35 Sプロモーターの制御下に置き（p E T S P A G U Sからのクレノウ平滑末端化B a m H Iフラグメントを、S m a I消化したp J D 330にサブクローニングした）〔Gallie & Walbot, 1992〕、得られた発現カセットを、X b a Iフラグメントとして、p C G N 1547というバイナリーベクター〔McBride & Summerfelt, 1990〕のX b a I部位にサブクローニングして、p G C N S P A G U Sを得た。最後に、p G C N S P A G U Sを、凍結解凍形質転換の手順によって、アグロバクターC 58 C 1 R i f^R（pGV2260）に導入した。

20

30

【0123】

融合タンパク質の発現は、大腸菌で確認した。35 S C a M Vプロモーターの制御下のキメラc D N Aを、タバコゲノムに安定的に組み込んだ。独立した4種類のトランスジェニックタバコの植物体からの子孫を、in situでの組織化学的染色後に、G U S活性の細胞下分布について解析した〔Jefferson et al., 1987〕。2日齢の若芽では、G U S活性は、子葉及び根で検出できたが、胚軸及び根端では検出できなかった。根組織が透明なため、G U S染色は、根毛及び表皮細胞の核内に明瞭に局限された。加えて、多少の拡散、すなわち他の根細胞の非局在性染色が、特に維管束環沿いに見られた。この非核内G U S染色は、葉の組織では、更に傑出していた。若い真の葉又は子葉は、核の強い青色の染色を示すのに対し、細胞質の多少の拡散染色も存在した。しかし、十分に展開した葉では、G U S染色は、均質になり、C a M V 35 Sプロモーターの制御下でG U Sで形質転換した対照植物に類似したが、後者では、G U Sは、細胞質で発現された。結果的に、より高齢の葉又は子葉は、G U S染色が特定のいかなる細胞区画にも局限されない維管束を除いて、組織化学的に検出できるG U S活性を、實際上全く示さなかった。

40

【0124】

D N AリガーゼIの欠乏は、a p p遺伝子の発現を誘導する動物細胞内のP A R Pは、最も豊富な核タンパク質の一つであり、その活性は、損傷したD N Aに結合した際のタンパク質でのアロステリックな変化によって調節される。本発明

50

者らは、アラビドプシス属における *a p p* 遺伝子が、非常に低レベルの発現を有していて、この遺伝子の転写活性は、*in vivo*での *A P P*機能に不可欠であり得るのを示唆することを見出した。この仮説を検定するため、*D N A*リガーゼ *I*の欠乏によって生じる *in vivo*ゲノム不安定化の際に、*a p p* 遺伝子の発現を調べた。アラビドプシス属 *D N A*リガーゼ *I* 遺伝子における、*T-D N A*挿入突然変異、すなわち *S K 1 B 2*系を、あらかじめ単離した〔Babiyshuk et al., 1997〕。この突然変異は、同型接合状態では致死性であるが、突然変異した対立遺伝子は、配偶子からの正常な伝達を示す。そのため、本発明者らは、突然変異に関して同型接合である細胞は、突然変異した花粉による突然変異胚嚢の受精直後に、細胞周期の *S*期の間の不完全な *D N A*合成のために死ぬものと予測した。

【0125】

*G U S*のコーディング領域を、*A P P*の初めの5アミノ酸、及び *a p p* 5'フランキンギン配列の2kbと枠内融合させた、*a p p*プロモーター-*G U S*翻訳融合を構築した (SEQ ID NO: 21)。この融合タンパク質をコードする遺伝子を、アラビドプシス属へと形質転換した。野生型との2回の戻し交雑の後、*a p p*プロモーター-*G U S*で形質転換した異型接合植物を、アラビドプシス属の *S K 1 B 2*系と交雑した。対照植物、及びリガーゼ突然変異について異型接合である植物の花序を、*G U S*の活性について染色した。加齢の組織でほとんどは検出される、*G U S*染色のパターンは、おそらく *a p p* 遺伝子の発現を反映するが、本発明者らは、調節配列のすべてが、用いた構築体に存在することの確かな証拠は得ていない。このパターンは、突然変異リガーゼ遺伝子を保有しない対照植物と、突然変異について異型接合である植物との花序でも、ともに同じであった。融合タンパク質を有する突然変異植物の胚珠の約4分の1は、*G U S*陽性であった。より精密な顕微鏡検査は、*G U S*陽性の胚珠では、配偶体のみが染色されたにすぎない。対照植物と、突然変異植物との間の唯一の差は、*D N A*リガーゼ遺伝子における突然変異であった。そのため、本発明者らは、*a p p* 遺伝子は、*D N A*切断の蓄積か、又は突然変異した花粉で受精した突然変異胚嚢の死のいずれかのために、誘導されると結論した。胚嚢の *G U S*染色は、受粉後24時間以内にか、又はそのため受精後の非常に早期に出現することが見出された。

【0126】

実施例3. *P C D*調節キメラ遺伝子の構築、及びアグロバクター菌株へのそのような *P C D*調節遺伝子を含む *T-D N A*ベクターの導入

3. 1. *p 3 5 S*:(*dsRNA-APP*)及び *p 3 5 S*:(*dsRNA-ZAP*)遺伝子の構築

標準的組換え *D N A*の手順を用いて、図6 (構築体1及び5)に模式的に描いたとおり、下記の *D N A*領域を動作可能に結合した：

【0127】

p 3 5 S:(*dsRNA-ZAP*)キメラ遺伝子に対して

- ・ *C a M V 3 5 S*プロモーター領域〔Odell et al., 1985〕
- ・ *C a b 2 2*リーダー領域〔Harpster et al., 1988〕
- ・ *Z A P*コーディング *D N A*領域 (ほぼ完全) (ハイブリダイゼーションによって単離された、SEQ ID NO: 10に対するシロイヌナズナ相同体)
- ・ 逆配向の *Z A P 2*コーディング *D N A*領域の5'末端の約500bp
- ・ *C a M V 3 5 S 3'*末端領域〔Mogen et al., 1990〕

【0128】

p 3 5 S:(*dsRNA-APP*)キメラ遺伝子に対して

- ・ *C a M V 3 5 S*プロモーター領域〔Odell et al., 1985〕
- ・ *C a b 2 2*リーダー領域〔Harpster et al., 1988〕
- ・ *A P P*コーディング *D N A*領域 (ほぼ完全) (SEQ ID NO: 5)
- ・ 逆配向の *A P P*コーディング *D N A*領域の5'末端の約500bp
- ・ *C a M V 3 5 S 3'*末端領域〔Mogen et al., 1990〕

【0129】

3. 2. *p N O S*:(*dsRNA-APP*)及び *p N O S*:(*dsRNA-ZAP*)遺伝子の構築

標準的組換え *D N A*の手順を用いて、図6 (構築体2及び6)に模式的に描いたとおり、

下記のDNA領域を動作可能に結合した：

【0130】

pNOS:(dsRNA-ZAP)キメラ遺伝子に対して

- ・NOSプロモーター領域 [Herrera-Estrella et al., 1983]
- ・Cab22リーダー領域 [Harpster et al., 1988]
- ・ZAPコーディングDNA領域（ほぼ完全）（ハイブリダイゼーションによって単離された、SEQ ID NO: 10に対するシロイヌナズナ相同体）
- ・逆配向のZAP2コーディングDNA領域の5'末端の約500bp
- ・CaMV35S3'末端領域 [Mogen et al., 1990]

【0131】

pNOS:(dsRNA-APP)キメラ遺伝子に対して

- ・NOSプロモーター領域 [Herrera-Estrella et al., 1983]
- ・Cab22リーダー領域 [Harpster et al., 1988]
- ・APPコーディングDNA領域（ほぼ完全）（SEQ ID NO: 5）
- ・逆配向のAPPコーディングDNA領域の5'末端の約500bp
- ・CaMV35S3'末端領域 [Mogen et al., 1990]

【0132】

3. 3. pTA29:(dsRNA-APP)及びpTA29:(dsRNA-ZAP)遺伝子の構築
標準的組換えDNAの手順を用いて、図6（構築体3及び7）に模式的に描いたとおり、
下記のDNA領域を動作可能に結合した：

【0133】

pTA29:(dsRNA-ZAP)キメラ遺伝子に対して

- ・TA29プロモーター領域（国際公開特許第89/10396号公報）
- ・Cab22リーダー領域 [Harpster et al., 1988]
- ・ZAPコーディングDNA領域（ほぼ完全）（ハイブリダイゼーションによって単離された、SEQ ID NO: 10に対するシロイヌナズナ相同体）
- ・逆配向のZAP2コーディングDNA領域の5'末端の約500bp
- ・CaMV35S3'末端領域 [Mogen et al., 1990]

【0134】

pTA29:(dsRNA-APP)キメラ遺伝子に対して

- ・TA29プロモーター領域（国際公開特許第89/10396号公報）
- ・Cab22リーダー領域 [Harpster et al., 1988]
- ・APPコーディングDNA領域（ほぼ完全）（SEQ ID NO: 5）
- ・逆配向のAPPコーディングDNA領域の5'末端の約500bp
- ・CaMV35S3'末端領域 [Mogen et al., 1990]

【0135】

3. 4. pNTP303:(dsRNA-APP)及びpNTP303:(dsRNA-ZAP)遺伝子の構築
標準的組換えDNAの手順を用いて、図6（構築体4及び8）に模式的に描いたとおり、
下記のDNA領域を動作可能に結合した：

【0136】

pNTP303:(dsRNA-ZAP)キメラ遺伝子に対して

- ・NPT303プロモーター領域 [Wetering, 1994]
- ・Cab22リーダー領域 [Harpster et al., 1988]
- ・ZAPコーディングDNA領域（ほぼ完全）（ハイブリダイゼーションによって単離された、SEQ ID NO: 10に対するシロイヌナズナ相同体）
- ・逆配向のZAP2コーディングDNA領域の5'末端の約500bp
- ・CaMV35S3'末端領域 [Mogen et al., 1990]

【0137】

pNTP303:(dsRNA-APP)キメラ遺伝子に対して

- ・NPT303プロモーター領域 [Wetering, 1994]

- ・ C a b 2 2 リーダー領域 [Harpster et al., 1988]
- ・ A P P コーディング D N A 領域 (ほぼ完全) (SEQ ID NO: 5)
- ・ 逆配向の A P P コーディング D N A 領域の 5 ' 末端の約 5 0 0 bp
- ・ C a M V 3 5 S 3 ' 末端領域 [Mogen et al., 1990]

【0138】

3. 5. キメラ性マーカー遺伝子の構築

標準的組換え D N A の手順を用いて、図 6 に模式的に描いたとおり、下記の D N A 領域を動作可能に結合した：

【0139】

g a t マーカー遺伝子に対して

- ・ A c t 2 プロモーター領域 [An et al., 1996]
- ・ アミノグリコシド 6 ' - アセチルトランスフェラーゼコーディング D N A (国際公開特許第 9 4 / 2 6 9 1 3 号公報)
- ・ ノパリンシンターゼ遺伝子の 3 ' 末端 [Depicker et al., 1982]

【0140】

b a r マーカー遺伝子に対して

- ・ A c t 2 プロモーター領域 [An et al., 1996]
- ・ ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼコーディング D N A (米国特許第 5 , 6 4 6 , 0 2 4 号明細書)
- ・ ノパリンシンターゼ遺伝子の 3 ' 末端 [Depicker et al., 1982]

【0141】

3. 6. P C D 調節キメラ遺伝子を含む T - D N A ベクターの構築

適切な制限酵素を用いて、3. 1 ~ 3. 5 の下に記載したキメラ性 P C D 調節遺伝子を切り出し、g a t マーカー遺伝子又は b a r マーカー遺伝子のいずれかとともに、p G S V 5 に由来する T - D N A ベクター (国際公開特許第 9 7 / 1 3 8 6 5 号公報) の T - D N A 境界間のポリリンカーに導入した。得られた T - D N A ベクターを、図 6 に模式的に示す。

【0142】

3. 7. アグロバクテリウム属への T - D N A の導入

Walkerpeach 及び Velten (1995) が記載したとおりの電気穿孔法によって、T - D N A ベクターをアグロバクター C 5 8 C 1 R i f 株 (pGV4000) に導入し、スペクチノマイシン及びストレプトマイシンを用いて、形質転換体を選別した。

【0143】

実施例 4. 実施例 3 の T - D N A ベクターによるシロイヌナズナのアグロバクター介在形質転換

アグロバクター菌株を用いて、シロイヌナズナ変種 C 2 4 を、Valvekens ら (1992) が記載したとおりの根の形質転換法を適用して形質転換した。外植片を、それぞれ、d s R N A - A P P 及び d s R N A - Z A P 構築体を含むアグロバクター菌株に同時感染させた。d s R N A - A P P 構築体は、p a c t : b a r 遺伝子と併用した。d s R N A - Z A P 構築体は、p a c t : g a t 遺伝子と併用した。形質転換体を、ホスフィノトリシン耐性について選別した。再生した根付いたトランスジェニック系統を、カナマイシン耐性についてのスクリーニングによって、他の T - D N A の存在について試験した。両 T - D N A を含むトランスジェニック系統を、温室に移した。T 0 トランスジェニック系統の表現型を記録し、T 1 世代は、更に、より詳しく調べた。

【0144】

実施例 5. 実施例 3 の T - D N A ベクターによるセイヨウアブラナ Brassica napus のアグロバクター介在形質転換

アグロバクター菌株を用いて、セイヨウアブラナ変種 N 9 0 - 7 4 0 を、下記の変更を除いて基本的には De Block ら (1989) が記載したとおりの、胚軸形質転換法を適用して形質転換した。

【0145】

－胚軸外植片を、A2培地〔MS、0.5g/lのMes (pH5.7)、1.2%グルコース、0.5%アガロース、1mg/lの2,4-D、0.25mg/lのナフタレン酢酸 (NAA)、及び1mg/lの6-ベンジルアミノプリン (BAP)〕で1日間前培養した。

【0146】

－感染培地A3は、MS、0.5g/lのMes (pH5.7)、1.2%グルコース、0.1mg/lのNAA、0.75mg/lのBAP、及び0.01mg/lのジベレリン酸 (GA3)であった。

【0147】

－選別培地A5Gは、MS、0.5g/lのMes (pH5.7)、1.2%グルコース、40mg/lのアデニン-SO₄、0.5g/lのポリビニルピロリドン (PVP)、0.5%アガロース、0.1mg/lのNAA、0.75mg/lのBAP、0.01mg/lのGA3、250mg/lのカルベニシリン、250mg/lのトリアシリン、5mg/lのAgNO₃に3週間であった。この期間後、選別をA5J培地で継続した (3%ショ糖以外はA5Gと同様)。

【0148】

－再生培地A6は、MS、0.5g/lのMes (pH5.7)、2%ショ糖、40mg/lのアデニン-SO₄、0.5g/lのPVP、0.5%アガロース、0.0025mg/lのBAP、及び250mg/lのトリアシリンであった。

【0149】

－健康な苗条を、根付け培地に移したが、これは、1リットル入り容器中のA9：半濃度のMS、1.5%ショ糖 (pH5.8)、100mg/lのトリアシリン、0.6%寒天であった。MSは、ムラシゲースコーグ培地〔Murashige & Skoog, 1962〕を意味する。

【0150】

d s RNA-A P P及びd s RNA-Z A Pの両T-DNA構築体を同じ植物細胞に導入するには、基本的にはDe Block及びDebrouwer (1991) が記載したとおりの、共形質転換法を適用した。形質転換した植物系統を、ホスフィノトリシン含有培地で選別し、その後、再生した根付いた苗条を、カナマイシン耐性について試験することによって、第二のT-DNAの存在をスクリーニングした。共形質転換の実験では、d s RNA-A P P構築体は、p a c t : b a r遺伝子と併用した。d s RNA-Z A P構築体は、p a c t : g a t遺伝子と併用した。両T-DNAを含むトランスジェニック系統を、温室に移した。T0トランスジェニック系統の表現型を記録し、T1世代は、更に、より詳しく調べた。

【0151】

実施例6. 植物系統の活力を試験するためのin vitroアッセイ

6. 1. セイヨウアブラナについての適応度アッセイ

培地及び反応緩衝液

播種培地：

半濃度のムラシゲースコーグ塩類

2%ショ糖

pH5.8

0.6%寒天

カルス誘導培地：A2S

MS培地、0.5g/lのMes (pH5.8)、3%ショ糖、40mg/lのアデニン-SO₄、1mg/lの2,4-D、0.25mg/lのNAA、1mg/lのBAP

温置培地：

25mMリン酸カリウム緩衝液、pH5.8

2%ショ糖

培地25mlに対して1滴のトゥイーン20

反応緩衝液：

50mMリン酸カリウム緩衝液、pH7.4

10mM2,3,5-トリフェニルテトラゾリウムクロリド (TTC) (=3.35mg/ml

10

20

30

40

50

)

緩衝液 2.5 ml に対して 1 滴のトウイーン 20

【0152】

種子の滅菌、及び苗条の栽培

種子を、70%エタノールに 2 分間浸漬し、次いで、0.1%のトウイーン 20 を含有する次亜塩素酸ナトリウム溶液（約 6%の活性塩素を有する）中で 15 分間表面滅菌した。最後に、種子を、滅菌蒸留水 1 l で洗浄した。播種培地約 7.5 ml を内容する 1 リットル入り容器（Weck）あたり 7 個の種子を入れた。種子を、23℃、及び 16 時間の光周期での $30 \mu\text{Einstein}/\text{秒} \cdot \text{m}^2$ で発芽させた。

実験間の標準化のために、N90-740 系統を常に含めた。

10

【0153】

胚軸外植片の前培養

—播種の 12～14 日後に、胚軸を約 7 mm の分節に切断した。Optilux ペトリ皿（Falcon S1005）1 枚あたり胚軸 25 個。

—胚軸外植片を、A2S 培地にて、23～25℃で 4 日間培養した（ $30 \mu\text{Einstein}/\text{秒} \cdot \text{m}^2$ ）。なお、アッセイを実施するには、1 系統あたり約 150～300 個の胚軸外植片が必要であった。

—胚軸外植片を、温置培地 30 ml を内容する Optilux ペトリ皿（Falcon S1005）に移した。

—暗所にて 24℃で約 20 時間温置した。

20

【0154】

TTC-アッセイ

—150 個の胚軸外植片を、50 ml 入り Falcon 管に移した。

—反応緩衝液（TTC なし）で洗浄。

—管 1 本あたり 25～30 ml の反応緩衝液を加えた。

管 1：TTC 加えず。

*バックグラウンド吸収測定のため。

*1 実験あたり 1 系統で充分。

管 2：10 mM TTC を添加（外植片を水没させなければならないが、減圧浸透はさせない）。

30

—管を上下反転させる。

—暗所にて、26℃で約 1 時間温置（終結反応なし）。

—胚軸を脱イオン水で洗浄。

—水を除去。

—70℃で 30 分間凍結。

—室温で解凍（暗所にて）。

—エタノール（技術用）50 ml を添加。

—還元した TTC-H を 1 時間の振盪によって抽出。

—抽出物の吸光を 485 nm で測定。なお、還元 TTC-H は、安定的でないため、暗中に保ち、できるだけ速やかに O.D._{485} を測定する。

40

$\text{O.D.}_{485}(\text{TTC-H}) = (\text{O.D.}_{485} + \text{TTC}) - (\text{O.D.}_{485} - \text{TTC})$ —異なる無関係の実験のサンプル間の TTC 還元容量の比較は、異なる実験での N90-740 の TTC 還元能力を 100%に設定することによって、実施することができる。

—高い TTC 還元能力の系統は、活力に富むが、低い TTC 還元能力の系統は、弱かった。

【0155】

6.2. アラビドプシス属についての適応度アッセイ

培地及び反応緩衝液

植物培地：

半濃度のムラシゲースコーグ塩類

50

1. 5%ショ糖

pH 5.8

0.6%寒天

オートクレーブで15分

フィルター滅菌した100mg/lのmyo-イノシトールを添加

— 0.5mg/lのピリドキシン

— 0.5mg/lのニコチン酸

— 1mg/lのチアミン

温置培地：

10mMリン酸カリウム緩衝液、pH 5.8

2%ショ糖

培地25mlに対して1滴のトウイーン20

反応緩衝液：

50mMリン酸カリウム緩衝液、pH 7.4

10mM 2, 3, 5-トリフェニルテトラゾリウムクロリド (TTC) (= 3.35mg/ml)

緩衝液25mlに対して1滴のトウイーン20

【0156】

アラビドプシス属の植物体

— アラビドプシス属の種子の滅菌

70%エタノールに2分間。

漂白剤（6%活性塩素）+溶液20mlに対して1滴のトウイーン20に10分間。

滅菌水で5回洗浄。なお、滅菌は、2ml入りエッペンドルフ管中で実施。アラビドプシス属種子は、管底に沈んで、1ml入りピペットによる液体の除去を可能にする。

— アラビドプシス属の植物体の栽培

種子を、±100mlの植物培地を内容する「Falcon格子間組織培養盤」（第3025番）に播種：1種子／格子。

植物体を23℃で栽培、40μEinstein／秒・m²、明16時間—暗8時間で約3週間（植物体は、花芽の形成を開始）。

追記：

＊アッセイを実施するには、1系統あたり約90～110の植物体が必要。

＊較正のための対照系統（C24；Columbia等々）を含む。

【0157】

前温置

—（鋏を用いて）根を切断することによって、アラビドプシス属の若芽を採集。

各若芽を、直ちに、温置培地に入れた（若芽は、水没させなければならないが、減圧浸透はさせない）。

温置培地：「Falcon格子間組織培養盤」（第3025番）中に±150ml。

（a）温置培地：バックグラウンド吸収の定量のため（TTCアッセイを参照されたい）。

（b）温置培地

（c）温置培地+2mMナイアシンアミド

1ペトリ皿あたり30～35の若芽（しかし、すべての系統及び各条件について同量の若芽）。

— 暗中24℃で±20時間温置した。

【0158】

TTCアッセイ

— 若芽を50ml入りFalcon管に移した。

— 反応緩衝液（TTCなし）で洗浄。

— 管1本あたり30～35mlの反応緩衝液を加えた。

10

20

30

40

50

(a) T T C 加えず (バックグラウンド吸収測定のため)。

(b) 及び (c) + 1 0 m M T T C。

(若芽を水没させなければならないが、減圧浸透はさせない)。

— 暗所にて、2 6 °C で約 1 時間温置 (終結反応なし)。

— 胚軸を脱イオン水で洗浄。

— 水を除去。

— − 7 0 °C で 3 0 分間凍結。

— 室温で解凍 (暗所にて)。

— エタノール (技術用) 5 0 m l を添加。

— 還元した T T C − H を 1 時間の振盪によって抽出。

— 抽出物の吸光を 4 8 5 n m で測定。なお、還元 T T C − H は、安定的でないため、暗中に保ち、できるだけ速やかに O . D . ₄₈₅ を測定する。

— 試験系統対対象系統の還元性質の比較 (3 0 ~ 3 5 植物体の集団について)

$O . D ._{485}(TTC-H) = (O . D ._{485} + T T C) - (O . D ._{485} - T T C)$

— 異なる無関係の実験のサンプル間の T T C 還元容量の比較は、異なる実験での対照系統 (C 2 4 ; Columbia 等々) の T T C 還元容量を 1 0 0 % に設定することによって、実施することができる。

— 高い T T C 還元能力の系統は、活力に富むが、低い T T C 還元容量の系統は、弱かった。

— 温置培地へのナイアシンアミドの添加が、より高い T T C 還元容量を招くならば、それは、(C 2 4 及び Columbia について示されたとおり) より低い適応度の指標となる。

【 0 1 5 9 】

実施例 7 . d s R N A − A P P 及び d s R N A − Z A P 構築体とともに含むトランスジェニック系統の表現型解析

タペータム組織又は花粉特異的プロモーターの制御下で d s R N A − A P P 及び d s R N A − Z A P を含む、T 0 系統の花の表現型、及び花粉の生存度 (Alexander 染色 [Alexander, 1969] 及び発芽アッセイ) を記録した。アラビドプシス属については、T 1 世代は、自家受粉によるか、又は植物が雄性不稔ならば、非形質転換野生型植物の花粉を用いた戻し交雑によって得た。セイヨウアブラナについては、T 1 世代は、常に、非形質転換植物の花粉を用いた戻し交雑によって得た。

【 0 1 6 0 】

T 1 種子を、カナマイシン含有培地で発芽させ、その後、耐性植物を、ホスフィノトリシン耐性についてのアンモニウムマルチウエルアッセイ [De Block et al., 1995] によって記録した。両 T − D N A を有する植物の半分を、温室に移して、植物の雄性不稔を記録したが、他の半分は、適応度アッセイによって、植物の活力を定量するのに用いた。

【 0 1 6 1 】

3 5 S 又は N O S プロモーターの制御下で、P C D 調節遺伝子の組合せ (A P P / Z A P) を含む植物については、多数のトランスジェニック系統で、高い活力が観察された。

【 0 1 6 2 】

T A 2 9 の制御下で、P C D 調節遺伝子の組合せ (A P P / Z A P) を含む植物については、多数のトランスジェニック系統で、雄性不稔が観察された。N T P 3 0 3 の制御下で、P C D 調節遺伝子の組合せ (A P P / Z A P) を含む植物については、多数のトランスジェニック系統で、花粉不稔が観察された。

【 0 1 6 3 】

実施例 8 . P C D 調節キメラ遺伝子を含む植物の表現型解析

p 3 5 S : (d s R N A − Z A P) キメラ遺伝子のもう一つの例を、標準的組換え D N A の手順を用いて、下記の D N A 領域を動作可能に結合することによって構築した:

- C a M V 3 5 S 2 プロモーター領域 [Odell et al., 1985]
- C a b 2 2 リーダー領域コーディング D N A [Harpster et al., 1988]
- SEQ ID NO: 1 0 の第 2 7 9 位 ~ 第 1 , 7 2 8 位ヌクレオチドのヌクレオチド配列を有す

10

20

30

40

50

る、HincII部位からSnaBI部位までの、トウモロコシのZAP2コーディングDNA領域・逆配向のHincII部位からEcoRV部位までのZAP2コーディング領域の5'末端(SEQ ID NO: 10の第279位～第792位のヌクレオチドのヌクレオチド配列の相補体を有する)

・CaMV35S3'末端領域 [Mogen et al., 1990]

【0164】

このキメラ遺伝子を、barマーカー遺伝子とともに、pGSV5 (国際公開特許第97/13865号公報に記載された) に由来するT-DNAベクターのT-DNA境界間のポリリンカーに導入し、T-DNAベクターpTYG33を得て、これを、記載のとおり電気穿孔によって、アグロバクテリウム属のC58C1Rif (pGV4000) に導入した。

10

【0165】

pNOS: (dsRNA-ZAP)キメラ遺伝子のもう一つの例を、標準的組換えDNAの手順を用いて、下記のDNA領域を動作可能に結合することによって構築した:

・ノパリンシンターゼプロモーター領域 [Herrera-Estrella et al., 1985]

・Cab22リーダー領域コーディングDNA [Harpster et al., 1988]

・SEQ ID NO: 10の第279位～第1, 728位ヌクレオチドのヌクレオチド配列を有する、HincII部位からSnaBI部位までの、トウモロコシのZAP2コーディングDNA領域・逆配向のHincII部位からEcoRV部位までのZAP2コーディング領域の5'末端(SEQ ID NO: 10の第279位～第792位のヌクレオチドのヌクレオチド配列の相補体を有する)

20

・CaMV35S3'末端領域 [Mogen et al., 1990]

【0166】

このキメラ遺伝子を、barマーカー遺伝子とともに、pGSV5 (国際公開特許第97/18365号公報に記載された) に由来するT-DNAベクターのT-DNA境界間のポリリンカーに導入し、T-DNAベクターpTYG34を得て、これを、記載のとおり電気穿孔によって、アグロバクテリウム属のC58C1Rif (pGV4000) に導入した。

【0167】

p35S: (dsRNA-APP)キメラ遺伝子のもう一つの例を、標準的組換えDNAの手順を用いて、下記のDNA領域を動作可能に結合することによって構築した:

30

・CaMV35S2プロモーター領域 [Odell et al., 1985]

・Cab22リーダー領域コーディングDNA [Harpster et al., 1988]

・SEQ ID NO: 5の第189位～第1, 349位ヌクレオチドのヌクレオチド配列を有する、ScaI部位からSmaI部位までの、シロイヌナズナのAPPコーディングDNA領域

・逆配向のScaI部位からHaeIII部位までのZAP2コーディング領域の5'末端(SEQ ID NO: 5の第189位～第784位のヌクレオチドのヌクレオチド配列の相補体を有する)

・CaMV35S3'末端領域 [Mogen et al., 1990]

【0168】

このキメラ遺伝子を、barマーカー遺伝子とともに、pGSV5 (国際公開特許第97/13865号公報に記載された) に由来するT-DNAベクターのT-DNA境界間のポリリンカーに導入し、T-DNAベクターpTYG29を得て、これを、記載のとおり電気穿孔によって、アグロバクテリウム属のC58C1Rif (pGV4000) に導入した。

40

【0169】

pNOS: (dsRNA-APP)キメラ遺伝子のもう一つの例を、標準的組換えDNAの手順を用いて、下記のDNA領域を動作可能に結合することによって構築した:

・ノパリンシンターゼプロモーター領域 [Herrera-Estrella et al., 1985]

・Cab22リーダー領域コーディングDNA [Harpster et al., 1988]

・SEQ ID NO: 5の第189位～第1, 349位ヌクレオチドのヌクレオチド配列を有する、ScaI部位からSmaI部位までの、シロイヌナズナのAPPコーディングDNA領域

50

- ・逆配向のScaI部位からHaeIII部位までのZAP2コーディング領域の5'末端(SEQ ID NO: 5の第189位～第784位のヌクレオチドのヌクレオチド配列の相補体を有する)
- ・CaMV35S3'末端領域 [Mogen et al., 1990]

【0170】

このキメラ遺伝子を、barマーカー遺伝子とともに、pGSV5 (国際公開特許第97/13865号公報に記載された) に由来するT-DNAベクターのT-DNA境界間のポリリンカーに導入し、T-DNAベクターpTYG30を得て、これを、記載のとおり電気穿孔によって、アグロバクテリウム属のC58C1Rif (pGV4000) に導入した。

【0171】

得られたアグロバクテリウム属の菌株を用いて、異なるPCD調節遺伝子を、セイヨウアブラナ及びシロイヌナズナ (Columbia及びC24) の植物に、実施例4及び5に記載されたとおりに導入した。

【0172】

T0世代の自家受粉によって得られたトランスジェニックシロイヌナズナの植物 (T1世代) を、ホスフィノトリシンを含有する培地で発芽させた。耐性トランスジェニック植物を、更に栽培した。

【0173】

pTYG33におけるようにpNOS:: (dsRNA-ZAP) 構築体を、又はpTYG34におけるようにp35S:: (dsRNA-ZAP) 構築体を含む、トランスジェニックT1植物 (ともにColumbia又はC24に由来) の成長は、PCD調節キメラ遺伝子なしのT-DNAベクターのT-DNAによって形質転換された、対照のトランスジェニック植物より有意に速かった (表1を参照されたい)。

【0174】

アラビドプシス属のT1トランスジェニック植物 (Columbiaから派生) のストレス耐性を、10若しくは50mg/lのいずれかのサリチル酸溶液上の、又は対照用に単にH₂O上の小型の浮水植物によって評価した。ストレス感受性植物は、温置1～2日後に、漂白されたか、又は巻きあがった葉を発生したが、ストレス耐性植物は、少なくとも5日間健全なままであった。やはり、pTYG33におけるようにpNOS:: (dsRNA-ZAP) 構築体を、又はpTYG34におけるようにp35S:: (dsRNA-ZAP) 構築体を含むトランスジェニック植物は、対照トランスジェニック植物より有意にストレス耐性であった (表1を参照されたい)。

【0175】

pTYG29、pTYG30、pTYG33又はpTYG34のdsRNA-ZAP若しくはdsRNA-APP構築体によって形質転換した、セイヨウアブラナから得られたPPT耐性トランスジェニックカルスを、50mg/lのアスピリンを含有する培地で2日間温置した。2日後、カルスの重量を決定し、カルスを、アスピリンなしの培地に移し、更に5日間温置した。5日の期間の終点で、カルスの重量を決定し、重量の増加を、2日の期間の温置後の重量に対する百分率として表した。対照として、PCD調節キメラ遺伝子なしのT-DNAによって形質転換されたトランスジェニックカルスを、2日間の温置の際に全くアスピリンを加えなかった以外は、同じ手順に処した。結果を表2に要約し、PCD調節キメラ遺伝子を含むセイヨウアブラナ細胞が、対照細胞よりストレス耐性であることを示す。

【0176】

【表1】

10

20

30

40

表1 組換え Arabidopsis 植物の評価 (T1世代)

キメラ性PCD調節遺伝子	成長 (Columbia及びC24)	ストレス耐性 (Columbia)
pNOS::(dsRNA-ZAP)	+++	++
p35S::(dsRNA-ZAP)	++	+
pNOS::(dsRNA-APP)	+	+/-
p35S::(dsRNA-APP)	+	-
対照	+	+/- (**)

**シロイヌナズナ Columbia 株は、アスピリンに対する一定程度の自然耐性を有する。

10

【0177】

【表2】

表2 アスピリンでの温置後の組換え Brassica calli の再成長

キメラ性PCD調節遺伝子	重量の増加 (%)
pNOS::(dsRNA-ZAP)	80
p35S::(dsRNA-ZAP)	90
pNOS::(dsRNA-APP)	75
p35S::(dsRNA-APP)	85
対照	70

平均の標準誤差は、<5%である。

20

【0178】

【表3】

REFERENCES

- Alexander (1969) *Stain Technology* **44**, 117
- Alvarez-Gonzalez and Althaus (1989) *Mut. Res.* **218**, 67-74
- An *et al.* (1996) *The Plant Cell* **8**, 15-30
- An *et al.* (1996b) *Plant Journal* **10**, 107-121
- Ausubel *et al.* (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*, Current Protocols, USA.
- Ausubel *et al.* (1987) *Current Protocols in Molecular Biology 1987-1988*. New York: Greene Publishing Associates & Wiley-Interscience 10
- Babiychuk *et al.* (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 12722-12727
- Beeckman and Engler (1994) *Plant Mol. Biol. Rep.* **12**, 37-42.
- Chen *et al.* (1994) *Eur. J. Biochem* **224**, 135-142
- Citovsky *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 3210-3214.
- Cohen (1993) *Immunol. Today* **14**, 126-130
- Collinge and Althaus (1994) *Mol. Gen. Genet.* **245**, 686-693
- Croy (1993) *Plant Molecular Biology Labfax* jointly published by BIOS Scientific Publications Ltd (UK) and Blackwell Scientific Publications, UK. 20
- Cullin and Pompon (1988) *Gene*, **65**, 203-217
- De Block *et al.* (1987) *EMBO J.* **6**, 2513-2518
- De Block *et al.* (1989) *Plant Physiol.* **91**: 694
- De Block and Debrouwer (1991) *Theor. Appl. Genet* **82**, 257-263
- De Block *et al.* (1995) *Planta* **197**, 619-626
- de Murcia and Ménissier de Murcia (1994) *Trends Biochem. Sci.* **19**, 172-176.
- Deblaere *et al.* (1985) *Nucleic Acids Res.* **13**, 4777-4788
- Depicker *et al.* (1982) *J. Mol. App. Gen.* **1**, 561-573
- Ding *et al.* (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 12804-12812 30
- Dohmen *et al.* (1991) *Yeast*, **7**, 691-692
- Doonan *et al.* (1998) in "*Plant Cell Division*" (Francis, Duditz and Inzé, Eds.)Portland Press, London
- Ellis *et al.* (1991) *Annu. Rev. Cell. Biol.* **7**, 663-698
- Gallie and Walbot (1992) *Nucleic Acids Res.* **20**, 4631-4638
- Gatz *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sc. USA* **85**, 1394-1397
- Gavrieli *et al.* (1992) *J. Cell. Biol.* **119**, 493-501

【 0 1 7 9 】

【表 4】

40

Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press

Harpster *et al.* (1988) *Mol. Gen. Genet.* **212**, 182-190.

Hawkins and Phillips (1983) *Plant Sci. Lett.* **32**, 221-224

Heller *et al.* (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 11176-11180

Herrera-Estrella *et al.* (1983) *EMBO J.* **2**, 987

Hudspeth *et al.* (1989) *Plant Mol Biol* **12**, 579-589

Hurkman and Tanaka (1986) *Plant Physiol.* **81**, 802-806

10

Ikajima *et al.* (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 21907-21913

Jefferson *et al.* (1987) *EMBO J.* **6**, 3901-3907

Kameshita *et al.* (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 4770-4776

Kawamitsu *et al.* (1984) *Biochemistry*, **23**, 3771-3777

Keil *et al.* (1989) *EMBO J.* **8**, 1323-1330

Keller *et al.* (1988) *EMBO J.* **7**, 3625-3633

Keller *et al.* (1989) *Genes Devel.* **3**, 1639-1646

Kuepper *et al.* (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 18721-18724

Kuge and Jones (1994) *EMBO J.* **13**, 655-664

20

Lazebnik *et al.* (1994) *Nature* **371**, 346-347

Lee *et al.* (1995) *Plant J.* **8**, 603-612

Lepiniec *et al.* (1995) *FEBS Letters* **364**, 103-108

Lindahl *et al.* (1995) *Trends Biochem. Sci.* **20**, 405-411

Long *et al.* (1996) *Nature*, **379**, 66-69

Maliga *et al.* (1975) *Nature*, **255**, 401-402

McBride and Summerfelt (1990) *Plant Mol. Biol.* **14**, 269-276

Ménissier de Murcia *et al.* (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 7303-7307

Mogen *et al.* (1990) *The Plant Cell* **2**, 1261

30

Molinette *et al.* (1993) *EMBO J.* **12**, 2109-2117

Odell *et al.* (1985) *Nature* **313**, 810

O' Farrel (1995) *Biochimie* **77**, 486-491

Payne *et al.* (1976) *Exp. Cell Res.* **99**, 428-432

Peleman *et al.* (1989) *Gene* **84**, 359-369

Pennell and Lamb (1997) *The Plant Cell* **9**, 1157-1168

Phillips and Hawkins (1985) *J. Exp. Bot.* **36**, 119-128

Puchta *et al.* (1995) *Plant J.* **7**, 203-210

40

【 0 1 8 0 】

【表 5】

- Sakamoto and Nagatani (1996) *Plant J.* **10**, 859-868
- Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Second Edition,
Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY
- Schreiber *et al.* (1992) *EMBO J.* **11**, 3263-3269
- Sheen *et al.* (1995) *The Plant Journal* **8**, 777-784
- Shoji *et al.* (1997) *Plant Cell Physiol.* **38**, 36-43
- Smulson *et al.* (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 119-127
- Studier and Moffat (1986) *J. Mol. Biol.* **189**, 113-130 10
- Sugiyama *et al.* (1995) *J. Plant Res.* **108**, 351-361
- Terzaghi *et al.* (1997) *Plant J.* **11**, 967-982
- Valvekens *et al.* (1988) *PNAS* **85**, 5536
- von Arnim and Deng (1994) *Cell*, **79**, 1035-1045
- Wang *et al.* (1995) *Genes Dev.* **9**, 509-520
- Wang *et al.* (1996) *Plant Cell* **8**, 375-391
- Wang *et al.* (1997) *Genes Dev.* **11**, 2347-2358
- Weimann *et al.* (1994) *Plant J.* **5**, 559-569
- Wetering (1994) PhD thesis, Katholieke Universiteits Nijmegen 20
- Walkerpeach and Velten (1995) In: Gelvin SB, Schilperoort RA, Verma DPS (eds)
Plant Molecular Biology Manual pp B1/1-B1/19. Kluwer Academic Publishers,
Dordrecht
- Wilbur and Lipmann (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 706
- Willmitzer and Wagner (1982) In *ADP-Ribosylation Reactions* (Hayashi, O. and Ueda,
K., eds). New York: Academic Press, pp. 241-252
- Zhang *et al.* (1994) *Science*, **263**, 687-689

30

【図面の簡単な説明】

【図1】 植物ポリ（ADP-リボース）ポリメラーゼの推定されるN末端アミノ酸配列を示す図である。

（A）シロイヌナズナAPP（A.th.APP；EMBL登録番号Z48243；SEQ ID NO: 6）及びトウモロコシ相同NAP（Z.m.NAP；EMBL登録番号AJ222588；SEQ ID NO: 4）に見出されるNAD⁺結合ドメインの上流の配列の整合を示す。示したドメイン区分は、以前に報告されたとおりである〔Lepiniec *et al.*, 1995〕。Bドメインに位置する核局在化シグナル（NLS）を、カッコによって示す。Bドメインの配列は、双子葉植物と単子葉植物との間で非常に良く保存されてはいない。Cドメインは、おそらく、動物のPARPの自己修飾ドメインに、機能上匹敵する。トウモロコシNAPには、不完全反復であるA1及びA2も存在する。反復配列内の内部的に不完全な二重対称性を示すため、アミノ酸残基の特性を、下記のとおり、配列の下に強調した：黒丸、疎水性残基；白丸、グリシン；（+）、正に帯電した残基；（-）、負に帯電した残基；波線、何らかの残基。対称軸は、垂直な矢じりによって示し、矢じりの線は、アミノ酸側鎖の特性の逆向きの反復を有する領域を明示する。

40

（B）マウスPARPとトウモロコシZAPとのDNA結合ドメインと自動触媒ドメインとの整合を示す。トウモロコシZAP1及びZAP2（5' RACE PCRによって発見された部分cDNA）を含むジンクフィンガーを、それぞれ、Z. m. ZAP（EMBL登録番号AJ222589；SEQ ID NO: 2）及びZ. m. ZAP(race)（第1位～第98位アミノ酸のSEQ ID NO: 11）として、またマウスPARPをM.m.ADPRT（Swissprot登録

50

番号 P 1 1 1 0 3) として示す。マウス酵素のジンクフィンガー及び二極性 N L S をカッコによって、Caspase3 切断部位を星印によって、Z A P タンパク質中の推定される N L S を、トウモロコシ配列の下の大文字のカッコによって示す。すべての配列で保存されているアミノ酸残基を、四角で囲み；類似の物理化学的特性を有するアミノ酸残基を、基準としての最上部の配列とともに影を付けた。

【図 2】 マウス P A R P 及び植物 P A R P タンパク質の N A D⁺ 結合ドメインの比較を示す図である。「P A R P シグネチャー」の範囲を、配列の上に示す。名称、及び配列の整合は、図 1 のとおりである。

【図 3】 n a p 及び z a p 遺伝子についての遺伝子コピー数、及び転写体の大きさの見積もりを示す図である。

(A) 及び (B) 示された制限エンドヌクレアーゼで消化し、アガロースゲル電気泳動によって分離し、ブロットし、N A D⁺ 結合ドメインをコードしない、n a p 及び z a p c D N A の 5' ドメインから調製した、放射性標識化 D N A プローブとハイブリダイズさせた、変種 L G 2 0 8 0 のトウモロコシゲノム D N A である。n a p プローブ (A) で得られたハイブリダイゼーションパターンは、単純であり、トウモロコシゲノム中の単一の n a p 遺伝子を示す。ハイブリダイゼーションパターン (B) から認識できるとおり、少なくとも二つの z a p 遺伝子が存在する可能性がある。z a p 及び n a p 遺伝子がコードする転写体の大きさを決定するため、6 日齢の若芽の根 (列 1) 及び苗条 (列 2) から抽出したポリ (A)⁺ R N A 約 1 µg を、グリオキサールによる変性後にアガロースゲル上で分離し、ブロットし、n a p (C) 及び z a p (D) の ³²P 標識化 c D N A とハイブリダイズさせた。λ D N A の ³³P 5' 末端標識化 B s t E I I フラグメントを、分子量マーカーとして、D N A 及び R N A 双方のゲルブロット実験で用い；それらの位置を、各パネルの左に kb で示した。

【図 4】 酵母における A P P 発現の解析を示す図である。

(A) p V 8 S P A 内の発現カセットの模式図である。a p p c D N A の発現は、c y c l 遺伝子 (C Y C 1) の最小 T A T A ボックス含有プロモーター領域と、ガラクトースによるプロモーター活性化を与える g a l 1 0 遺伝子 (G A L 1 0) の上流活性化プロモーター領域とからなる、キメラ酵母プロモーターによって駆動される。下流の調節配列は、ホスホグリセロールキナーゼをコードする遺伝子 (3 P G K) に由来する [Kuge & Jones, 1994]。a p p コーディング領域は、早くから提唱されたとおり [Lepiniec et al., 1995]、推定ドメインにおける区分を有して描かれ；A 1 及び A 2 は、不完全な 27 アミノ酸反復に相当し、その間に、正に荷電したアミノ酸に富み、数多くの D N A 結合タンパク質の D N A 結合ドメインに似た配列 (B ドメイン) がある。B ドメインのアミノ酸配列は、地図の下に示され、N L S として機能し得る、アルギニン及びリシン残基の範囲は、太字で描かれている。メチオニン残基 (M¹、M⁷²) は、翻訳開始コドンとして機能し得るが、地図の上に示される。C ドメインは、グルタミン酸残基に富み、その配列ではなく組成が、動物の P A R P の自己修飾ドメインに似ている。

(B) それぞれ「v e c t o r」及び「a p p」として示した、D Y (p Y e D P 1 / 8 - 2) 及び D Y (p V 8 S P A) 株の免疫ブロット (ウエスタンブロット) 及びノーザンブロット分析である。菌株を、グルコース (G U L)、ガラクトース (G A L)、ガラクトース及び 3 mM 3 A B A (G A L + 3 A B A) を追加した S D C 培地で増殖させた。全 R N A 又は全タンパク質は、同じ培養体から抽出した。全タンパク質 10 µg を、10 % S D S - P A G E 上での電気泳動によって分画し、電気泳動ブロットに付し、抗 A P P 抗血清でプローブした。全 R N A 5 µg を、1.5 % アガロースゲル上での電気泳動によって分画し、ナイロン膜に転写し、a p p c D N A に由来する ³²P 標識化 D N A フラグメントとハイブリダイズさせた。分子量マーカー帯の位置を、キロベース (kb) 及びキロダルトン (kDa) で左に示す。

【図 5】 A P P タンパク質のポリ (A D P - リボース) ポリメラーゼ活性を示す図である。

(A) 全タンパク質抽出物を、2 % ガラクトース (v e c t o r G A L) の S D C で増

10

20

30

40

50

殖させたDY (pY e D P 1 / 8 - 2)、並びに2%グルコース (a p p G L U)、2%ガラクトース (a p p G A L)、又は2%ガラクトース及び3mM 3 A B A (a p p G A L + 3 A B A) のいずれかのSDCで増殖させたDY (p V 8 S P A) から調製した。これらの抽出物におけるポリ (A D P - リボース) の合成を検出するために、サンプルを、 ^{32}P -N A D⁺とともに室温で40分間温置した。2例の対照反応を実施した：精製したヒトP A R P 1 0 0 ngを、反応緩衝液内でのみか (P A R P) (列5)、又はグルコース上で増殖させたDY (p Y e D P 1 / 8 - 2) の培養体から作成したタンパク質抽出物とともに (v e c t o r G L U + P A R P) (列6) のいずれかで温置した。X-0m atというコダックフィルムへの乾燥ゲルの曝露後に得られた、オートラジオグラフを示す。O R i は、配列決定用ゲルの始点に相当する。

10

(B) DY (p V 8 S P A) からのタンパク質抽出物中のDNAによるポリ (A D P - リボース) 合成の刺激を示す。核酸枯渇酵母抽出物に加えた、音波処理したサケ精子DNAの量を、 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で示す。ポリ (A D P - リボース) の合成は、反応の一つに3mMの濃度で加えた3 A B Aによって遮断された (列5)。ポリ (A D P - リボース) の最大の回収を確保するために、グリコーゲン20 μg を、沈澱段階の際の担体として含めたが；これは、認識できるとおり、取り込まれなかった標識の多量の持越を招いた。

【図6】 本発明のPCD調節キメラ遺伝子を含むT-DNAベクターの模式的表現を示す図である。P 3 5 S : C a M V 3 5 Sプロモーター；L : c a b 2 2リーダー；Z A P : Z A PクラスのP A R P遺伝子のコーディング領域；5' Z A P : 逆配向でのZ A PクラスのP A R P遺伝子のコーディング領域のN末端部分；3' 3 5 S : C a M V 3 5 Sの3'末端転写終結シグナル、及びポリアデニル化シグナル；p A C T 2 : アクチン遺伝子のプロモーター領域；p N O S : ノパリンシンターゼ遺伝子プロモーター；g a t : ゲンタマイシンアセチルトランスフェラーゼ；b a r : ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ；3' N O S : ノパリンシンターゼ遺伝子の3'末端転写終結シグナル及びポリアデニル化シグナル；A P P : N A PクラスのP A R P遺伝子のコーディング領域；5' A P P : 逆配向でのN A PクラスのP A R P遺伝子のコーディング領域のN末端部分；L B ; 左T-DNA境界；R B : 右T-DNA境界；p T A 2 9 : タペータム組織特異的プロモーター；p N T P 3 0 3 : 花粉特異的プロモーター。

20

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Plant Genetic Systems, N.V.

<120> Methods and means to modulate programmed cell death in eukaryotic cells

<130> PCDMOD WO1

<140>

<141>

<150> US SN 09/118276

<151> 1998-07-17

<160> 21

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 3211

<212> DNA

<213> Zea mays

<220>

<221> CDS

<222> (113)..(3022)

<400> 1

acctacctga atacctcacc cctaagtgtt ccgcttcttc tctcgccggg cctccaactc 60

catcgaaggg gctagggaga ggagggaacc cgaaccacag caggccggcg ca atg gcg 118
Met Ala

1

gcg ccg cca aag gcg tgg aag gcg gag tat gcc aag tct ggg cgg gcc 166
Ala Pro Pro Lys Ala Trp Lys Ala Glu Tyr Ala Lys Ser Gly Arg Ala

5

10

15

tgc tgc aag tca tgc cgg tcc cct atc gcc aag gac cag ctc cgt ctt 214
Ser Cys Lys Ser Cys Arg Ser Pro Ile Ala Lys Asp Gln Leu Arg Leu

20

25

30

ggc aag atg gtt bag gcg tca cag ttc gac gcc ttc atg ccg atg tgg 262
Gly Lys Met Val Gln Ala Ser Gln Phe Asp Gly Phe Met Pro Met Trp

35

40

45

50

aac cat gcc agc gtt gac gat gtt gaa ggg ata gat gca ctt aga tgg 310

10

20

30

40

Asn His Ala Ser Val Asp Asp Val Glu Gly Ile Asp Ala Leu Arg Trp
 55 60 65
 gat gat caa gag aag ata cga aac tac gtt ggg agt gcc tca gct ggt 358
 Asp Asp Gln Glu Lys Ile Arg Asn Tyr Val Gly Ser Ala Ser Ala Gly
 70 75 80
 aca agt tct aca gct gct cct cct gag aaa tgt aca att gag att gct 406
 Thr Ser Ser Thr Ala Ala Pro Pro Glu Lys Cys Thr Ile Glu Ile Ala
 85 90 95
 cca tct gcc cgt act tca tgt aca cga tgc agt gaa aag att aca aaa 454
 Pro Ser Ala Arg Thr Ser Cys Arg Arg Cys Ser Glu Lys Ile Thr Lys
 100 105 110
 gga tgc gtc cgt cct tca gct aag ctt gag agt gaa ggt ccc aag ggt 502
 Gly Ser Val Arg Leu Ser Ala Lys Leu Glu Ser Glu Gly Pro Lys Gly
 115 120 125 130
 ata cca tgg tat cat gcc aac tgt ttc ttt gag gta tcc ccg tct gca 550
 Ile Pro Trp Tyr His Ala Asn Cys Phe Phe Glu Val Ser Pro Ser Ala
 135 140 145
 act gtt gag aag ttc tca ggc tgg gat act ttg tcc gat gag gat aag 598
 Thr Val Glu Lys Phe Ser Gly Trp Asp Thr Leu Ser Asp Glu Asp Lys
 150 155 160
 aga acc atg ctc gat ctt gtt aaa aaa gat gtt ggc aac aat gaa caa 646
 Arg Thr Met Leu Asp Leu Val Lys Lys Asp Val Gly Asn Asn Glu Gln
 165 170 175
 aat aag ggt tcc aag cgc aag aaa agt gaa aat gat att gat agc tac 694
 Asn Lys Gly Ser Lys Arg Lys Lys Ser Glu Asn Asp Ile Asp Ser Tyr
 180 185 190
 aaa tcc gcc agg tta gat gaa agt aca tct gaa ggt aca gtg cga aac 742
 Lys Ser Ala Arg Leu Asp Glu Ser Thr Ser Glu Gly Thr Val Arg Asn
 195 200 205 210
 aaa ggg caa ctt gta gac cca cgt ggt tcc aat act agt tca gct gat 790
 Lys Gly Gln Leu Val Asp Pro Arg Gly Ser Asn Thr Ser Ser Ala Asp
 215 220 225
 atc caa cta aag ctt aag gag caa agt gac aca ctt tgg aag tta aag 838
 Ile Gln Leu Lys Leu Lys Glu Gln Ser Asp Thr Leu Trp Lys Leu Lys
 230 235 240
 gat gga ctt aag act cat gta tgc gct gct gaa tta agg gat atg ctt 886

10

20

30

40

Asp Gly Leu Lys Thr His Val Ser Ala Ala Gln Leu Arg Asp Met Leu	
245 250 255	
gag gct aat ggg cag gat aca tca gga cca gaa agg cac cta ttg gat	934
Glu Ala Asn Gly Gln Asp Thr Ser Gly Pro Glu Arg His Leu Leu Asp	
260 265 270	
cgc tgt gcg gat gga atg ata ttt gga gcg ctg ggt cct tgc cca gtc	982
Arg Cys Ala Asp Gly Met Ile Phe Gly Ala Leu Gly Pro Cys Pro Val	
275 280 285 290	
tgt gct aat ggc atg tac tat tat aat ggt cag tac caa tgc agt ggt	1030
Cys Ala Asn Gly Met Tyr Tyr Tyr Asn Gly Gln Tyr Gln Cys Ser Gly	10
295 300 305	
aat gtg tca gag tgg tcc aag tgt aca tac tct gcc aca gaa cct gtc	1078
Asn Val Ser Glu Trp Ser Lys Cys Thr Tyr Ser Ala Thr Glu Pro Val	
310 315 320	
cgc gtt aag aag aag tgg caa att cca cat gga aca aag aat gat tac	1126
Arg Val Lys Lys Lys Trp Gln Ile Pro His Gly Thr Lys Asn Asp Tyr	
325 330 335	
ctt atg aag tgg ttc aaa tct cca aag gtt aag aaa cca gag agg gtt	1174
Leu Met Lys Trp Phe Lys Ser Gln Lys Val Lys Lys Pro Glu Arg Val	20
340 345 350	
ctt cca cca atg tca cct gag aaa tct gga agt aaa gca act cag aga	1222
Leu Pro Pro Met Ser Pro Glu Lys Ser Gly Ser Lys Ala Thr Gln Arg	
355 360 365 370	
aca tca ttg ctg tct tct aaa ggg ttg gat aaa tta agg ttt tct gtt	1270
Thr Ser Leu Leu Ser Ser Lys Gly Leu Asp Lys Leu Arg Phe Ser Val	
375 380 385	
gta gga caa tca aaa gaa gca gca aat gag tgg att gag aag ctc aaa	1318
Val Gly Gln Ser Lys Glu Ala Ala Asn Glu Trp Ile Glu Lys Leu Lys	30
390 395 400	
ctt gct ggt gcc aac ttc tat gcc agg gtt gtc aaa gat att gat tgt	1366
Leu Ala Gly Ala Asn Phe Tyr Ala Arg Val Val Lys Asp Ile Asp Cys	
405 410 415	
tta att gca tgt ggt gag ctc gac aat gaa aat gct gaa gtc agg aaa	1414
Leu Ile Ala Cys Gly Glu Leu Asp Asn Glu Asn Ala Glu Val Arg Lys	
420 425 430	
gca agg agg ctg aag ata cca att gta agg gag ggt tac att gga gaa	1462
	40

Ala Arg Arg Leu Lys Ile Pro Ile Val Arg Glu Gly Tyr Ile Gly Glu		
435	440	450
tgt gtt aaa aag aac aaa atg ctg cca ttt gat ttg tat aaa cta gag	1510	
Cys Val Lys Lys Asn Lys Met Leu Pro Phe Asp Leu Tyr Lys Leu Glu		
455	460	465
aat gcc tta gag tcc tca aaa ggc agt act gtc act gtt aaa gtt aag	1558	
Asn Ala Leu Glu Ser Ser Lys Gly Ser Thr Val Thr Val Lys Val Lys		
470	475	480
ggc cga agt gct gtt cat gag tcc tct ggt ttg caa gat act gct cac	1606	10
Gly Arg Ser Ala Val His Glu Ser Ser Gly Leu Gln Asp Thr Ala His		
485	490	495
att ctt gaa gat ggg aaa agc ata tac aat gca acc tta aac atg tct	1654	
Ile Leu Glu Asp Gly Lys Ser Ile Tyr Asn Ala Thr Leu Asn Met Ser		
500	505	510
gac ctg gca cta ggt gtg aac agc tac tat gta ctg cag atc att gaa	1702	
Asp Leu Ala Leu Gly Val Asn Ser Tyr Tyr Val Leu Gln Ile Ile Glu		
515	520	525
cag gat gat ggg tct gag tgc tac gta ttt cgt aag tgg gga cgg gtt	1750	20
Gln Asp Asp Gly Ser Glu Cys Tyr Val Phe Arg Lys Trp Gly Arg Val		
535	540	545
ggg agt gag aaa att gga ggg caa aaa ctg gag gag atg tca aaa act	1798	
Gly Ser Glu Lys Ile Gly Gly Gln Lys Leu Glu Glu Met Ser Lys Thr		
550	555	560
gag gca atc aag gaa ttc aaa aga tta ttt ctt gag aag act gga aac	1846	
Glu Ala Ile Lys Glu Phe Lys Arg Leu Phe Leu Glu Lys Thr Gly Asn		
565	570	575
tca tgg gaa gct tgg gaa tgt aaa acc aat ttt cgg aag cag cct ggg	1894	30
Ser Trp Glu Ala Trp Glu Cys Lys Thr Asn Phe Arg Lys Gln Pro Gly		
580	585	590
aga ttt tac cca ctt gat gtt gat tat ggt gtt aag aaa gca cca aaa	1942	
Arg Phe Tyr Pro Leu Asp Val Asp Tyr Gly Val Lys Lys Ala Pro Lys		
595	600	605
cgg aaa gat atc agt gaa atg aaa agt tct ctt gct cct caa ttg cta	1990	
Arg Lys Asp Ile Ser Glu Met Lys Ser Ser Leu Ala Pro Gln Leu Leu		
615	620	625
gaa ctg atg aag atg ctt ttc aat gtg gag aca tat aga gct gct atg	2038	40

Glu Leu Met Lys Met Leu Phe Asn Val Glu Thr Tyr Arg Ala Ala Met
630 635 640

atg gaa ttt gaa att aat atg tca gaa atg cct ctt ggg aag cta agc 2086
Met Glu Phe Glu Ile Asn Met Ser Glu Met Pro Leu Gly Lys Leu Ser
645 650 655

aag gaa aat att gag aaa gga ttt gaa gca tta act gag ata cag aat 2134
Lys Glu Asn Ile Glu Lys Gly Phe Glu Ala Leu Thr Glu Ile Gln Asn
660 665 670

tta ttg aag gac acc gct gat caa gca ctg gct gtt aga gaa agc tta 2182
Leu Leu Lys Asp Thr Ala Asp Gln Ala Leu Ala Val Arg Glu Ser Leu
675 680 685 690

att gtt gct gcg agc aat cgc ttt ttc act ctt atc cct tct att cat 2230
Ile Val Ala Ala Ser Asn Arg Phe Phe Thr Leu Ile Pro Ser Ile His
695 700 705

cct cat att ata cgg gat gag gat gat ttg atg atc aaa gcg aaa atg 2278
Pro His Ile Ile Arg Asp Glu Asp Asp Leu Met Ile Lys Ala Lys Met
710 715 720

ctt gaa gct ctg cag gat att gaa att gct tca aag ata gtt ggc ttc 2326
Leu Glu Ala Leu Gln Asp Ile Glu Ile Ala Ser Lys Ile Val Gly Phe
725 730 735

gat agc gac agt gat gaa tct ctt gat gat aaa tat atg aaa cct cac 2374
Asp Ser Asp Ser Asp Glu Ser Leu Asp Asp Lys Tyr Met Lys Leu His
740 745 750

tgt gac atc acc ccg ctg gct cac gat agt gaa gat tac aag tta att 2422
Cys Asp Ile Thr Pro Leu Ala His Asp Ser Glu Asp Tyr Lys Leu Ile
755 760 765 770

gag cag tat ctc ctc aac aca cat gct cct act cac aag gac tgg tgg 2470
Glu Gln Tyr Leu Leu Asn Thr His Ala Pro Thr His Lys Asp Trp Ser
775 780 785

ctg gaa ctg gag gaa gtt ttt tca ctt gat cga gat gga gaa ctt aat 2518
Leu Glu Leu Glu Glu Val Phe Ser Leu Asp Arg Asp Gly Glu Leu Asn
790 795 800

aag tac tca aga tat aaa aat aat ctg cat aac aag atg cta tta tgg 2566
Lys Tyr Ser Arg Tyr Lys Asn Asn Leu His Asn Lys Met Leu Leu Trp
805 810 815

cac ggt tca agg ttg acg aat ttt gtg gga att ctt agt caa ggg cta 2614

10

20

30

40

His Gly Ser Arg Leu Thr Asn Phe Val Gly Ile Leu Ser Gln Gly Leu
 820 825 830

 aga att gca cct cct gag gca cct gtt act ggc tat atg ttc ggc aaa 2662
 Arg Ile Ala Pro Pro Glu Ala Pro Val Thr Gly Tyr Met Phe Gly Lys
 835 840 845 850

 ggc ctc tac ttt gca gat cta gta agc aag agc gca caa tac tgt tat 2710
 Gly Leu Tyr Phe Ala Asp Leu Val Ser Lys Ser Ala Gln Tyr Cys Tyr
 855 860 865

 gtg gat agg aat aat cct gta ggt ttg atg ctt ctt tct gag gtt gct 2758
 Val Asp Arg Asn Asn Pro Val Gly Leu Met Leu Leu Ser Glu Val Ala
 870 875 880

 tta gga gac atg tat gaa cta aag aaa gcc acg tcc atg gac aaa cct 2806
 Leu Gly Asp Met Tyr Glu Leu Lys Lys Ala Thr Ser Met Asp Lys Pro
 885 890 895

 cca aga ggg aag cat tcg acc aag gga tta ggc aaa acc gtg cca ctg 2854
 Pro Arg Gly Lys His Ser Thr Lys Gly Leu Gly Lys Thr Val Pro Leu
 900 905 910

 gag tca gag ttt gtg aag tgg agg gat gat gtc gta gtt ccc tgc ggc 2902
 Glu Ser Glu Phe Val Lys Trp Arg Asp Asp Val Val Val Pro Cys Gly
 915 920 925 930

 aag ccg gtg cca tca tca att agg agc tct gaa ctc atg tac aat gag 2950
 Lys Pro Val Pro Ser Ser Ile Arg Ser Ser Glu Leu Met Tyr Asn Glu
 935 940 945

 tac atc gtc tac aac aca tcc cag gtg aag atg cag ttc ttg ctg aag 2998
 Tyr Ile Val Tyr Asn Thr Ser Gln Val Lys Met Gln Phe Leu Leu Lys
 950 955 960

 gtg cgt ttc cat cac aag agg tag ctgggagact aggcaagtag agttggaagg 3052
 Val Arg Phe His His Lys Arg
 965 970

 tagagaagca gagttaggcg atgcctcttt tggtattatt agtaagcctg gcatgtattt 3112

 atgggtgctc gcgcttgatc cattttggta agtgttgctt gggcatcagc gcgaatagca 3172

 ccaatcacac acttttacct aatgacgttt tactgtata 3211

<210> 2

<211> 969

10

20

30

40

<212> PRT

<213> Zea mays

<400> 2

Met Ala Ala Pro Pro Lys Ala Trp Lys Ala Glu Tyr Ala Lys Ser Gly
 1 5 10 15

Arg Ala Ser Cys Lys Ser Cys Arg Ser Pro Ile Ala Lys Asp Gln Leu
 20 25 30

Arg Leu Gly Lys Met Val Gln Ala Ser Gln Phe Asp Gly Phe Met Pro
 35 40 45

Met Trp Asn His Ala Ser Val Asp Asp Val Glu Gly Ile Asp Ala Leu
 50 55 60

Arg Trp Asp Asp Gln Glu Lys Ile Arg Asn Tyr Val Gly Ser Ala Ser
 65 70 75 80

Ala Gly Thr Ser Ser Thr Ala Ala Pro Pro Glu Lys Cys Thr Ile Glu
 85 90 95

Ile Ala Pro Ser Ala Arg Thr Ser Cys Arg Arg Cys Ser Glu Lys Ile
 100 105 110

Thr Lys Gly Ser Val Arg Leu Ser Ala Lys Leu Glu Ser Glu Gly Pro
 115 120 125

Lys Gly Ile Pro Trp Tyr His Ala Asn Cys Phe Phe Glu Val Ser Pro
 130 135 140

Ser Ala Thr Val Glu Lys Phe Ser Gly Trp Asp Thr Leu Ser Asp Glu
 145 150 155 160

Asp Lys Arg Thr Met Leu Asp Leu Val Lys Lys Asp Val Gly Asn Asn
 165 170 175

Glu Gln Asn Lys Gly Ser Lys Arg Lys Lys Ser Glu Asn Asp Ile Asp
 180 185 190

Ser Tyr Lys Ser Ala Arg Leu Asp Glu Ser Thr Ser Glu Gly Thr Val
 195 200 205

Arg Asn Lys Gly Gln Leu Val Asp Pro Arg Gly Ser Asn Thr Ser Ser
 210 215 220

Ala Asp Ile Gln Leu Lys Leu Lys Glu Gln Ser Asp Thr Leu Trp Lys
 225 230 235 240

10

20

30

Leu Lys Asp Gly Leu Lys Thr His Val Ser Ala Ala Glu Leu Arg Asp
 245 250 255
 Met Leu Glu Ala Asn Gly Gln Asp Thr Ser Gly Pro Glu Arg His Leu
 260 265 270
 Leu Asp Arg Cys Ala Asp Gly Met Ile Phe Gly Ala Leu Gly Pro Cys
 275 280 285
 Pro Val Cys Ala Asn Gly Met Tyr Tyr Tyr Asn Gly Gln Tyr Gln Cys
 290 295 300
 Ser Gly Asn Val Ser Glu Trp Ser Lys Cys Thr Tyr Ser Ala Thr Glu
 305 310 315 320
 Pro Val Arg Val Lys Lys Lys Trp Gln Ile Pro His Gly Thr Lys Asn
 325 330 335
 Asp Tyr Leu Met Lys Trp Phe Lys Ser Gln Lys Val Lys Lys Pro Glu
 340 345 350
 Arg Val Leu Pro Pro Met Ser Pro Glu Lys Ser Gly Ser Lys Ala Thr
 355 360 365
 Gln Arg Thr Ser Leu Leu Ser Ser Lys Gly Leu Asp Lys Leu Arg Phe
 370 375 380
 Ser Val Val Gly Gln Ser Lys Glu Ala Ala Asn Glu Trp Ile Glu Lys
 385 390 395 400
 Leu Lys Leu Ala Gly Ala Asn Phe Tyr Ala Arg Val Val Lys Asp Ile
 405 410 415
 Asp Cys Leu Ile Ala Cys Gly Glu Leu Asp Asn Glu Asn Ala Glu Val
 420 425 430
 Arg Lys Ala Arg Arg Leu Lys Ile Pro Ile Val Arg Glu Gly Tyr Ile
 435 440 445
 Gly Glu Cys Val Lys Lys Asn Lys Met Leu Pro Phe Asp Leu Tyr Lys
 450 455 460
 Leu Glu Asn Ala Leu Glu Ser Ser Lys Gly Ser Thr Val Thr Val Lys
 465 470 475 480
 Val Lys Gly Arg Ser Ala Val His Glu Ser Ser Gly Leu Gln Asp Thr
 485 490 495

10

20

30

Ala His Ile Leu Glu Asp Gly Lys Ser Ile Tyr Asn Ala Thr Leu Asn
 500 505 510
 Met Ser Asp Leu Ala Leu Gly Val Asn Ser Tyr Tyr Val Leu Gln Ile
 515 520 525
 Ile Glu Gln Asp Asp Gly Ser Glu Cys Tyr Val Phe Arg Lys Trp Gly
 530 535 540
 Arg Val Gly Ser Glu Lys Ile Gly Gly Gln Lys Leu Glu Glu Met Ser
 545 550 555 560
 Lys Thr Glu Ala Ile Lys Glu Phe Lys Arg Leu Phe Leu Glu Lys Thr
 565 570 575
 Gly Asn Ser Trp Glu Ala Trp Glu Cys Lys Thr Asn Phe Arg Lys Gln
 580 585 590
 Pro Gly Arg Phe Tyr Pro Leu Asp Val Asp Tyr Gly Val Lys Lys Ala
 595 600 605
 Pro Lys Arg Lys Asp Ile Ser Glu Met Lys Ser Ser Leu Ala Pro Gln
 610 615 620
 Leu Leu Glu Leu Met Lys Met Leu Phe Asn Val Glu Thr Tyr Arg Ala
 625 630 635 640
 Ala Met Met Glu Phe Glu Ile Asn Met Ser Glu Met Pro Leu Gly Lys
 645 650 655
 Leu Ser Lys Glu Asn Ile Glu Lys Gly Phe Glu Ala Leu Thr Glu Ile
 660 665 670
 Gln Asn Leu Leu Lys Asp Thr Ala Asp Gln Ala Leu Ala Val Arg Glu
 675 680 685
 Ser Leu Ile Val Ala Ala Ser Asn Arg Phe Phe Thr Leu Ile Pro Ser
 690 695 700
 Ile His Pro His Ile Ile Arg Asp Glu Asp Asp Leu Met Ile Lys Ala
 705 710 715 720
 Lys Met Leu Glu Ala Leu Gln Asp Ile Glu Ile Ala Ser Lys Ile Val
 725 730 735
 Gly Phe Asp Ser Asp Ser Asp Glu Ser Leu Asp Asp Lys Tyr Met Lys
 740 745 750

10

20

30

Leu His Cys Asp Ile Thr Pro Leu Ala His Asp Ser Glu Asp Tyr Lys
755 760 765

Leu Ile Glu Gln Tyr Leu Leu Asn Thr His Ala Pro Thr His Lys Asp
770 775 780

Trp Ser Leu Glu Leu Glu Glu Val Phe Ser Leu Asp Arg Asp Gly Glu
785 790 795 800

Leu Asn Lys Tyr Ser Arg Tyr Lys Asn Asn Leu His Asn Lys Met Leu
805 810 815

Leu Trp His Gly Ser Arg Leu Thr Asn Phe Val Gly Ile Leu Ser Gln
820 825 830

Gly Leu Arg Ile Ala Pro Pro Glu Ala Pro Val Thr Gly Tyr Met Phe
835 840 845

Gly Lys Gly Leu Tyr Phe Ala Asp Leu Val Ser Lys Ser Ala Gln Tyr
850 855 860

Cys Tyr Val Asp Arg Asn Asn Pro Val Gly Leu Met Leu Leu Ser Glu
865 870 875 880

Val Ala Leu Gly Asp Met Tyr Glu Leu Lys Lys Ala Thr Ser Met Asp
885 890 895

Lys Pro Pro Arg Gly Lys His Ser Thr Lys Gly Leu Gly Lys Thr Val
900 905 910

Pro Leu Glu Ser Glu Phe Val Lys Trp Arg Asp Asp Val Val Val Pro
915 920 925

Cys Gly Lys Pro Val Pro Ser Ser Ile Arg Ser Ser Glu Leu Met Tyr
930 935 940

Asn Glu Tyr Ile Val Tyr Asn Thr Ser Gln Val Lys Met Gln Phe Leu
945 950 955 960

Leu Lys Val Arg Phe His His Lys Arg
965

<210> 3

<211> 2295

<212> DNA

<213> Zea mays

10

20

30

<220>

<221> CDS

<222> (107)..(2068)

<400> 3

tgacctgttc catcccgcca gcccttcgc tcccaagacc caaccccact gcccgagacc 60

cccgagcctt ctggaatctt gcgagaaccc caggggcgag gagcag atg tcg gcg 115
Met Ser Ala

1

agg cta cgg gtg gcg gac gtc cgc gcg gag ctt cag cgc cgc gcc ctc 163
Arg Leu Arg Val Ala Asp Val Arg Ala Glu Leu Gln Arg Arg Gly Leu
5 10 15

10

gat gta tcc gcc acc aag cct gct ctc gtg cgg agg ctg gac gcc gca 211
Asp Val Ser Gly Thr Lys Pro Ala Leu Val Arg Arg Leu Asp Ala Ala
20 25 30 35

att tgc gag gcg gag aag gcc gtg gtg gct gct gcg cca acc agt gtg 259
Ile Cys Glu Ala Glu Lys Ala Val Val Ala Ala Ala Pro Thr Ser Val
40 45 50

gca aat ggg tat gac gta gcc gta gat gcc aaa agg aac tgc ggg aat 307
Ala Asn Gly Tyr Asp Val Ala Val Asp Gly Lys Arg Asn Cys Gly Asn
55 60 65

20

aat aag agg aaa agg tcc ggg gat ggg ggt gaa gag gga aac gcc gat 355
Asn Lys Arg Lys Arg Ser Gly Asp Gly Gly Glu Glu Gly Asn Gly Asp
70 75 80

acg tgt aca gat gtg aca aaa cta gag gcc atg agc tat cgt gag ctg 403
Thr Cys Thr Asp Val Thr Lys Leu Glu Gly Met Ser Tyr Arg Glu Leu
85 90 95

cag gga ttg gcc aag gca cgt gga gtt gcg gca aat ggg gcc aag aaa 451
Gln Gly Leu Ala Lys Ala Arg Gly Val Ala Ala Asn Gly Gly Lys Lys
100 105 110 115

30

gat gtt atc cag agg ttg ctc tcg gcg act gct ggt cct gct gca gtt 499
Asp Val Ile Gln Arg Leu Leu Ser Ala Thr Ala Gly Pro Ala Ala Val
120 125 130

gca gat ggt ggt cct ctg gcc gcc aag gaa gtc ata aaa ggt ggt gat 547
Ala Asp Gly Gly Pro Leu Gly Ala Lys Glu Val Ile Lys Gly Gly Asp
135 140 145

gag gag gtt gag gtg aaa aag gag aag atg gtt act gcc acg aag aag 595
 Glu Glu Val Glu Val Lys Lys Glu Lys Met Val Thr Ala Thr Lys Lys
 150 155 160

gga gct gca gtg ctg gat cag cac att ccc gat cac ata aaa gtg aac 643
 Gly Ala Ala Val Leu Asp Gln His Ile Pro Asp His Ile Lys Val Asn
 165 170 175

tat cat gtc ttg caa gtg ggc gat gaa atc tat gat gcc acc ttg aac 691
 Tyr His Val Leu Gln Val Gly Asp Glu Ile Tyr Asp Ala Thr Leu Asn
 180 185 190 195

cag act aat gtt gga gac aac aac aat aag ttc tat atc att caa gtt 739
 Gln Thr Asn Val Gly Asp Asn Asn Asn Lys Phe Tyr Ile Ile Gln Val
 200 205 210

tta gaa tct gat gct ggt gga agc ttt atg gtt tac aat aga tgg gga 787
 Leu Glu Ser Asp Ala Gly Gly Ser Phe Met Val Tyr Asn Arg Trp Gly
 215 220 225

aga gtt ggg gta cga ggt caa gat aaa cta cat ggt ccc tcc cca aca 835
 Arg Val Gly Val Arg Gly Gln Asp Lys Leu His Gly Pro Ser Pro Thr
 230 235 240

cga gac caa gca ata tat gaa ttt gag ggg aag ttc cac aac aaa acc 883
 Arg Asp Gln Ala Ile Tyr Glu Phe Glu Gly Lys Phe His Asn Lys Thr
 245 250 255

aat aat cat tgg tct gat cgc aag aac ttc aaa tgt tat gca aag aaa 931
 Asn Asn His Trp Ser Asp Arg Lys Asn Phe Lys Cys Tyr Ala Lys Lys
 260 265 270 275

tac act tgg ctt gaa atg gat tat ggt gaa act gag aaa gaa ata gag 979
 Tyr Thr Trp Leu Glu Met Asp Tyr Gly Glu Thr Glu Lys Glu Ile Glu
 280 285 290

aaa ggt tcc att act gat cag ata aaa gag aca aaa ctt gaa act aga 1027
 Lys Gly Ser Ile Thr Asp Gln Ile Lys Glu Thr Lys Leu Glu Thr Arg
 295 300 305

att gcg cag ttc ata tcc ctg atc tgc aat att agc atg atg aag caa 1075
 Ile Ala Gln Phe Ile Ser Leu Ile Cys Asn Ile Ser Met Met Lys Gln
 310 315 320

aga atg gtg gaa ata ggt tat aat gct gaa aag ctt ccc ctt gga aag 1123
 Arg Met Val Glu Ile Gly Tyr Asn Ala Glu Lys Leu Pro Leu Gly Lys
 325 330 335

10

20

30

cta agg aaa gct aca ata ctt aag ggt tat cat gtt ttg aaa agg ata 1171
 Leu Arg Lys Ala Thr Ile Leu Lys Gly Tyr His Val Leu Lys Arg Ile
 340 345 350 355

 tcc gat gtt att tca aag gcg gac agg aga cat ctt gag caa ttg act 1219
 Ser Asp Val Ile Ser Lys Ala Asp Arg Arg His Leu Glu Gln Leu Thr
 360 365 370

 ggg gaa ttc tac acc gtg att cct cat gac ttt ggt ttc aga aag atg 1267
 Gly Glu Phe Tyr Thr Val Ile Pro His Asp Phe Gly Phe Arg Lys Met
 375 380 385

 cgt gaa ttt att atc gat act cct cag aaa cta aaa gct aag ttg gag 1315
 Arg Glu Phe Ile Ile Asp Thr Pro Gln Lys Leu Lys Ala Lys Leu Glu
 390 395 400

 atg gtt gaa gcc ctt ggt gag att gaa att gca act aaa ctt ttg gag 1363
 Met Val Glu Ala Leu Gly Glu Ile Glu Ile Ala Thr Lys Leu Leu Glu
 405 410 415

 gat gat tca agt gac cag gat gat ccg ttg tat gct cga tac aag caa 1411
 Asp Asp Ser Ser Asp Gln Asp Asp Pro Leu Tyr Ala Arg Tyr Lys Gln
 420 425 430 435

 ctt cat tgt gat ttc aca cct ctt gaa gct gat tca gat gag tac tct 1459
 Leu His Cys Asp Phe Thr Pro Leu Glu Ala Asp Ser Asp Glu Tyr Ser
 440 445 450

 atg ata aaa tca tat ttg aga aat aca cat gga aaa aca cac tct ggt 1507
 Met Ile Lys Ser Tyr Leu Arg Asn Thr His Gly Lys Thr His Ser Gly
 455 460 465

 tat acg gtg gac ata gtg caa ata ttt aag gtt tca agg cat ggt gaa 1555
 Tyr Thr Val Asp Ile Val Gln Ile Phe Lys Val Ser Arg His Gly Glu
 470 475 480

 aca gag cga ttt caa aaa ttt gct agt aca aga aat agg atg ctt ttg 1603
 Thr Glu Arg Phe Gln Lys Phe Ala Ser Thr Arg Asn Arg Met Leu Leu
 485 490 495

 tgg cat ggt tct cgg ttg agc aac tgg gct ggg atc ctt tct cag ggt 1651
 Trp His Gly Ser Arg Leu Ser Asn Trp Ala Gly Ile Leu Ser Gln Gly
 500 505 510 515

 ctg cga atc gct cct cct gaa gca cct gtt act ggt tac atg ttt ggc 1699
 Leu Arg Ile Ala Pro Pro Glu Ala Pro Val Thr Gly Tyr Met Phe Gly
 520 525 530

10

20

30

aag ggt gtt tac ttt gct gac atg ttt tca aag agt gca aac tat tgc 1747
 Lys Gly Val Tyr Phe Ala Asp Met Phe Ser Lys Ser Ala Asn Tyr Cys
 535 540 545

tac gcc tct gaa gca tgt aga tct gga gta ctg ctt tta tgt gag gtt 1795
 Tyr Ala Ser Glu Ala Cys Arg Ser Gly Val Leu Leu Leu Cys Glu Val
 550 555 560

gca ttg ggc gat atg aat gag cta ctg aat gca gat tac gat gct aat 1843
 Ala Leu Gly Asp Met Asn Glu Leu Leu Asn Ala Asp Tyr Asp Ala Asn
 565 570 575

aac ctg ccc aaa gga aaa tta aga tcc aag gga gtt ggt caa aca gca 1891
 Asn Leu Pro Lys Gly Lys Leu Arg Ser Lys Gly Val Gly Gln Thr Ala
 580 585 590 595

cct aac atg gtc gag tct aag gtc gct gac gat ggt gtt gtt gtt ccc 1939
 Pro Asn Met Val Glu Ser Lys Val Ala Asp Asp Gly Val Val Val Pro
 600 605 610

ctt ggc gaa ccc aaa cag gaa cct tcc aaa agg ggt ggc ttg ctt tat 1987
 Leu Gly Glu Pro Lys Gln Glu Pro Ser Lys Arg Gly Gly Leu Leu Tyr
 615 620 625

aat gag tac ata gtg tac aac gta gac cag ata aga atg cgg tat gtc 2035
 Asn Glu Tyr Ile Val Tyr Asn Val Asp Gln Ile Arg Met Arg Tyr Val
 630 635 640

tta cat gtt aac ttc aat ttc aag aga cgg tag atgttgcaaa gagctgaaac 2088
 Leu His Val Asn Phe Asn Phe Lys Arg Arg
 645 650

tggtgctgag atcttagcag aacatatgtg gacttatagc accaggtgcc ctcagcctca 2148

ttttctgagc aaatttggtg gcctttgcat ttcgattttg gtttcagctt ctgccccat 2208

tgatgattga tactgagtgat atatatgaac cattgataac caccttccat gtacttaagt 2268

ttttttaaca tgtcccatgc ataataa 2295

<210> 4

<211> 653

<212> PRT

<213> Zea mays

<400> 4

Met Ser Ala Arg Leu Arg Val Ala Asp Val Arg Ala Glu Leu Gln Arg

10

20

30

40

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

260	265	270	
Ala Lys Lys Tyr Thr Trp Leu Glu Met Asp Tyr Gly Glu Thr Glu Lys			
275	280	285	
Glu Ile Glu Lys Gly Ser Ile Thr Asp Gln Ile Lys Glu Thr Lys Leu			
290	295	300	
Glu Thr Arg Ile Ala Gln Phe Ile Ser Leu Ile Cys Asn Ile Ser Met			
305	310	315	320
Met Lys Gln Arg Met Val Glu Ile Gly Tyr Asn Ala Glu Lys Leu Pro			10
325	330	335	
Leu Gly Lys Leu Arg Lys Ala Thr Ile Leu Lys Gly Tyr His Val Leu			
340	345	350	
Lys Arg Ile Ser Asp Val Ile Ser Lys Ala Asp Arg Arg His Leu Glu			
355	360	365	
Gln Leu Thr Gly Glu Phe Tyr Thr Val Ile Pro His Asp Phe Gly Phe			
370	375	380	
Arg Lys Met Arg Glu Phe Ile Ile Asp Thr Pro Gln Lys Leu Lys Ala			20
385	390	395	400
Lys Leu Glu Met Val Glu Ala Leu Gly Glu Ile Glu Ile Ala Thr Lys			
405	410	415	
Leu Leu Glu Asp Asp Ser Ser Asp Gln Asp Asp Pro Leu Tyr Ala Arg			
420	425	430	
Tyr Lys Gln Leu His Cys Asp Phe Thr Pro Leu Glu Ala Asp Ser Asp			
435	440	445	
Glu Tyr Ser Met Ile Lys Ser Tyr Leu Arg Asn Thr His Gly Lys Thr			30
450	455	460	
His Ser Gly Tyr Thr Val Asp Ile Val Gln Ile Phe Lys Val Ser Arg			
465	470	475	480
His Gly Glu Thr Glu Arg Phe Gln Lys Phe Ala Ser Thr Arg Asn Arg			
485	490	495	
Met Leu Leu Trp His Gly Ser Arg Leu Ser Asn Trp Ala Gly Ile Leu			
500	505	510	
Ser Gln Gly Leu Arg Ile Ala Pro Pro Glu Ala Pro Val Thr Gly Tyr			40

515	520	525	
Met Phe Gly Lys Gly Val Tyr Phe Ala Asp Met Phe Ser Lys Ser Ala			
530	535	540	
Asn Tyr Cys Tyr Ala Ser Glu Ala Cys Arg Ser Gly Val Leu Leu Leu			
545	550	555	560
Cys Glu Val Ala Leu Gly Asp Met Asn Glu Leu Leu Asn Ala Asp Tyr			
565	570	575	
Asp Ala Asn Asn Leu Pro Lys Gly Lys Leu Arg Ser Lys Gly Val Gly			10
580	585	590	
Gln Thr Ala Pro Asn Met Val Glu Ser Lys Val Ala Asp Asp Gly Val			
595	600	605	
Val Val Pro Leu Gly Glu Pro Lys Gln Glu Pro Ser Lys Arg Gly Gly			
610	615	620	
Leu Leu Tyr Asn Glu Tyr Ile Val Tyr Asn Val Asp Gln Ile Arg Met			
625	630	635	640
Arg Tyr Val Leu His Val Asn Phe Asn Phe Lys Arg Arg			20
645	650		
<210> 5			
<211> 2147			
<212> DNA			
<213> Arabidopsis thaliana			
<220>			
<221> CDS			
<222> (129)..(2042)			
<400> 5			
attgatgaag aagaaaacga agaagaagac ttttcaaattg ctgcgcgaa ctcacttctg 60			
acgaaaacca tacttcttca gtctcattcc ctttcgcgacg aactattctc ctgaagaaga 120			
agacgaaa atg gcg aac aag ctc aaa gtc gac gaa ctc cgt tta aaa ctc 170			
Met Ala Asn Lys Leu Lys Val Asp Glu Leu Arg Leu Lys Leu			
1	5	10	
gcc gag cgt gga ctc agt act act gga gtc aaa gcc gtt ctg gtg gag 218			
Ala Glu Arg Gly Leu Ser Thr Thr Gly Val Lys Ala Val Leu Val Glu			
15	20	25	30
40			

agg ctt gaa gag ggt atc gca gaa gac act aag aag gaa gaa tca aag 266
 Arg Leu Glu Glu Ala Ile Ala Glu Asp Thr Lys Lys Glu Glu Ser Lys
 35 40 45

agc aag agg aaa aga aat tct tct aat gat act tat gaa tcg aac aaa 314
 Ser Lys Arg Lys Arg Asn Ser Ser Asn Asp Thr Tyr Glu Ser Asn Lys
 50 55 60

ttg att gca att ggc gaa ttt cgt ggg atg att gtg aag gaa ttg cgt 362
 Leu Ile Ala Ile Gly Glu Phe Arg Gly Met Ile Val Lys Glu Leu Arg
 65 70 75

gag gaa gct att aag aga ggc tta gat aca aca gga acc aaa aag gat 410
 Glu Glu Ala Ile Lys Arg Gly Leu Asp Thr Thr Gly Thr Lys Lys Asp
 80 85 90

ctt ctt gag agg ttt tgc aat gat gct aat aac gtt tcc aat gca cca 458
 Leu Leu Glu Arg Leu Cys Asn Asp Ala Asn Asn Val Ser Asn Ala Pro
 95 100 105 110

gtc aaa tcc agt aat ggg aca gat gaa gct gaa gat gac aac aat ggc 506
 Val Lys Ser Ser Asn Gly Thr Asp Glu Ala Glu Asp Asp Asn Asn Gly
 115 120 125

ttt gaa gaa gaa aag aaa gaa gag aaa atc gta acc gcg aca aag aag 554
 Phe Glu Glu Glu Lys Lys Glu Glu Lys Ile Val Thr Ala Thr Lys Lys
 130 135 140

ggt gca gcg gtg cta gat cag tgg att cct gat gag aca aag agt cag 602
 Gly Ala Ala Val Leu Asp Gln Trp Ile Pro Asp Glu Ile Lys Ser Gln
 145 150 155

tac cat gtt cta caa agg ggt gat gat gtt tat gat gct atc tta aat 650
 Tyr His Val Leu Gln Arg Gly Asp Asp Val Tyr Asp Ala Ile Leu Asn
 160 165 170

cag aca aat gtc agg gat aat aat aac aag ttc ttt gtc cta caa gtc 698
 Gln Thr Asn Val Arg Asp Asn Asn Asn Lys Phe Phe Val Leu Gln Val
 175 180 185 190

cta gag tcg gat agc aaa aag aca tac atg gtt tac act aga tgg gga 746
 Leu Glu Ser Asp Ser Lys Lys Thr Tyr Met Val Tyr Thr Arg Trp Gly
 195 200 205

aga gtt ggt gtg aaa gga caa agt aag cta gat ggg cct tat gac tca 794
 Arg Val Gly Val Lys Gly Gln Ser Lys Leu Asp Gly Pro Tyr Asp Ser
 210 215 220

10

20

30

tgg gat cgt gcg ata gag ata ttt acc aat aag ttc aat gac aag aca	842
Trp Asp Arg Ala Ile Glu Ile Phe Thr Asn Lys Phe Asn Asp Lys Thr	
225 230 235	
aag aat tat tgg tct gac aga aag gag ttt atc cca cat ccc aag tcc	890
Lys Asn Tyr Trp Ser Asp Arg Lys Glu Phe Ile Pro His Pro Lys Ser	
240 245 250	
tat aca tgg ctc gaa atg gat tac gga aaa gag gaa aat gat tca ccg	938
Tyr Thr Trp Leu Glu Met Asp Tyr Gly Lys Glu Glu Asn Asp Ser Pro	
255 260 265 270	
gtc aat aat gat att ccg agt tca tct tcc gaa gtt aaa cct gaa caa	986
Val Asn Asn Asp Ile Pro Ser Ser Ser Ser Glu Val Lys Pro Glu Gln	
275 280 285	
tca aaa cta gat act cgg gtt gcc aag ttc atc tct ctt ata tgt aat	1034
Ser Lys Leu Asp Thr Arg Val Ala Lys Phe Ile Ser Leu Ile Cys Asn	
290 295 300	
gtc agc atg atg gca cag cat atg atg gaa ata gga tat aac gct aac	1082
Val Ser Met Met Ala Gln His Met Met Glu Ile Gly Tyr Asn Ala Asn	
305 310 315	
aaa ttg cca ctc ggc aag ata agc aag tcc aca att tca aag ggt tat	1130
Lys Leu Pro Leu Gly Lys Ile Ser Lys Ser Thr Ile Ser Lys Gly Tyr	
320 325 330	
gaa gtg ctg aag aga ata tcg gag gtg att gac cgg tat gat aga acg	1178
Glu Val Leu Lys Arg Ile Ser Glu Val Ile Asp Arg Tyr Asp Arg Thr	
335 340 345 350	
agg ctt gag gaa ctg agt gga gag ttc tac aca gtg ata cct cat gat	1226
Arg Leu Glu Glu Leu Ser Gly Glu Phe Tyr Thr Val Ile Pro His Asp	
355 360 365	
ttt ggt ttt aag aaa atg agt cag ttt gtt ata gac act cct caa aag	1274
Phe Gly Phe Lys Lys Met Ser Gln Phe Val Ile Asp Thr Pro Gln Lys	
370 375 380	
ttg aaa cag aaa att gaa atg gtt gaa gca tta ggt gaa att gaa ctc	1322
Leu Lys Gln Lys Ile Glu Met Val Glu Ala Leu Gly Glu Ile Glu Leu	
385 390 395	
gca aca aag ttg ttg tcc gtc gac ccg gga ttg cag gat gat cct tta	1370
Ala Thr Lys Leu Leu Ser Val Asp Pro Gly Leu Gln Asp Asp Pro Leu	
400 405 410	

10

20

30

30

aag ggg atg ttg ttg tac aac gaa tat ata gtc tac aat gtg gaa caa 1994
 Lys Gly Met Leu Leu Tyr Asn Glu Tyr Ile Val Tyr Asn Val Glu Gln
 610 615 620

atc aag atg cgt tat gtg atc caa gtc aaa ttc aac tac aag cac taa 2042
 Ile Lys Met Arg Tyr Val Ile Gln Val Lys Phe Asn Tyr Lys His
 625 630 635

aacttatgta tattagcttt tgaacatcaa ctaattatcc aaaaatcagc gttttattgt 2102

attttctttca aactctttca tctctgattt tgcacggttc actcg 2147

10

<210> 6
 <211> 637
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 6
 Met Ala Asn Lys Leu Lys Val Asp Glu Leu Arg Leu Lys Leu Ala Glu
 1 5 10 15

Arg Gly Leu Ser Thr Thr Gly Val Lys Ala Val Leu Val Glu Arg Leu
 20 25 30

20

Glu Glu Ala Ile Ala Glu Asp Thr Lys Lys Glu Glu Ser Lys Ser Lys
 35 40 45

Arg Lys Arg Asn Ser Ser Asn Asp Thr Tyr Glu Ser Asn Lys Leu Ile
 50 55 60

Ala Ile Gly Glu Phe Arg Gly Met Ile Val Lys Glu Leu Arg Glu Glu
 65 70 75 80

Ala Ile Lys Arg Gly Leu Asp Thr Thr Gly Thr Lys Lys Asp Leu Leu
 85 90 95

30

Glu Arg Leu Cys Asn Asp Ala Asn Asn Val Ser Asn Ala Pro Val Lys
 100 105 110

Ser Ser Asn Gly Thr Asp Glu Ala Glu Asp Asp Asn Asn Gly Phe Glu
 115 120 125

Glu Glu Lys Lys Glu Glu Lys Ile Val Thr Ala Thr Lys Lys Gly Ala
 130 135 140

Ala Val Leu Asp Gln Trp Ile Pro Asp Glu Ile Lys Ser Gln Tyr His

145	150	155	160
Val Leu Gln Arg Gly Asp Asp Val Tyr Asp Ala Ile Leu Asn Gln Thr			
165	170	175	
Asn Val Arg Asp Asn Asn Asn Lys Phe Phe Val Leu Gln Val Leu Glu			
180	185	190	
Ser Asp Ser Lys Lys Thr Tyr Met Val Tyr Thr Arg Trp Gly Arg Val			
195	200	205	
Gly Val Lys Gly Gln Ser Lys Leu Asp Gly Pro Tyr Asp Ser Trp Asp			
210	215	220	
Arg Ala Ile Glu Ile Phe Thr Asn Lys Phe Asn Asp Lys Thr Lys Asn			
225	230	235	240
Tyr Trp Ser Asp Arg Lys Glu Phe Ile Pro His Pro Lys Ser Tyr Thr			
245	250	255	
Trp Leu Glu Met Asp Tyr Gly Lys Glu Glu Asn Asp Ser Pro Val Asn			
260	265	270	
Asn Asp Ile Pro Ser Ser Ser Ser Glu Val Lys Pro Glu Gln Ser Lys			
275	280	285	
Leu Asp Thr Arg Val Ala Lys Phe Ile Ser Leu Ile Cys Asn Val Ser			
290	295	300	
Met Met Ala Gln His Met Met Glu Ile Gly Tyr Asn Ala Asn Lys Leu			
305	310	315	320
Pro Leu Gly Lys Ile Ser Lys Ser Thr Ile Ser Lys Gly Tyr Glu Val			
325	330	335	
Leu Lys Arg Ile Ser Glu Val Ile Asp Arg Tyr Asp Arg Thr Arg Leu			
340	345	350	
Glu Glu Leu Ser Gly Glu Phe Tyr Thr Val Ile Pro His Asp Phe Gly			
355	360	365	
Phe Lys Lys Met Ser Gln Phe Val Ile Asp Thr Pro Gln Lys Leu Lys			
370	375	380	
Gln Lys Ile Glu Met Val Glu Ala Leu Gly Glu Ile Glu Leu Ala Thr			
385	390	395	400
Lys Leu Leu Ser Val Asp Pro Gly Leu Gln Asp Asp Pro Leu Tyr Tyr			

10

20

30

40

405	410	415	
His Tyr Gln Gln Leu Asn Cys Gly Leu Thr Pro Val Gly Asn Asp Ser			
420	425	430	
Glu Glu Phe Ser Met Val Ala Asn Tyr Met Glu Asn Thr His Ala Lys			
435	440	445	
Thr His Ser Gly Tyr Thr Val Glu Ile Ala Gln Leu Phe Arg Ala Ser			
450	455	460	
Arg Ala Val Glu Ala Asp Arg Phe Gln Gln Phe Ser Ser Ser Lys Asn			10
465	470	475	480
Arg Met Leu Leu Trp His Gly Ser Arg Leu Thr Asn Trp Ala Gly Ile			
485	490	495	
Leu Ser Gln Gly Leu Arg Ile Ala Pro Pro Glu Ala Pro Val Thr Gly			
500	505	510	
Tyr Met Phe Gly Lys Gly Val Tyr Phe Ala Asp Met Phe Ser Lys Ser			
515	520	525	
Ala Asn Tyr Cys Tyr Ala Asn Thr Gly Ala Asn Asp Gly Val Leu Leu			20
530	535	540	
Leu Cys Glu Val Ala Leu Gly Asp Met Asn Glu Leu Leu Tyr Ser Asp			
545	550	555	560
Tyr Asn Ala Asp Asn Leu Pro Pro Gly Lys Leu Ser Thr Lys Gly Val			
565	570	575	
Gly Lys Thr Ala Pro Asn Pro Ser Glu Ala Gln Thr Leu Glu Asp Gly			
580	585	590	
Val Val Val Pro Leu Gly Lys Pro Val Glu Arg Ser Cys Ser Lys Gly			30
595	600	605	
Met Leu Leu Tyr Asn Glu Tyr Ile Val Tyr Asn Val Glu Gln Ile Lys			
610	615	620	
Met Arg Tyr Val Ile Gln Val Lys Phe Asn Tyr Lys His			
625	630	635	

<210> 7

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: A domain of
non-conventional PARP proteins

<400> 7

Arg Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Leu
1 5 10 15

<210> 8

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: A1 domain on
non conventional PARP protein

<400> 8

Xaa Leu Xaa Val Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Arg Gly Leu
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Gly Val Lys Xaa Xaa Leu Val Xaa Arg Leu Xaa Xaa Ala
20 25 30

Ile

<210> 9

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: A2 domain of
non-conventional PARP protein

<400> 9

Gly Met Xaa Xaa Xaa Glu Leu Xaa Xaa Xaa Ala Xaa Xaa Arg Gly Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Lys Lys Asp Xaa Xaa Arg Leu Xaa Xaa
20 25 30

10

20

30

<210> 10
 <211> 3212
 <212> DNA
 <213> Zea mays

<220>
 <221> CDS
 <222> (81)..(3020)

<400> 10
 gcttcctctg tcgtccggcc tccaaactcca tcgaaggggc tagggagagg agggaaccgc 60

aaccacagca ggccggcgca atg gcg gcg ccg cca aag gcg tgg aag gcg gag 113
 Met Ala Ala Pro Pro Lys Ala Trp Lys Ala Glu
 1 5 10

tat gcc aag tct ggg cgg gcc tcg tgc aag tca tgc cgg tcc cct atc 161
 Tyr Ala Lys Ser Gly Arg Ala Ser Cys Lys Ser Cys Arg Ser Pro Ile
 15 20 25

gcc aag gac cag ctc cgt ctt ggc aag atg gtt cag gcg tca cag ttc 209
 Ala Lys Asp Gln Leu Arg Leu Gly Lys Met Val Gln Ala Ser Gln Phe
 30 35 40

gac gcc ttc atg ccg atg tgg aac cat gcc agg tgc atc ttc agc aag 257
 Asp Gly Phe Met Pro Met Trp Asn His Ala Arg Cys Ile Phe Ser Lys
 45 50 55

aag aac cag ata aaa tcc gtt gac gat gtt gaa ggg ata gat gca ctt 305
 Lys Asn Gln Ile Lys Ser Val Asp Asp Val Glu Gly Ile Asp Ala Leu
 60 65 70 75

aga tgg gat gat caa gag aag ata cga aac tac gtt ggg agt gcc tca 353
 Arg Trp Asp Asp Gln Glu Lys Ile Arg Asn Tyr Val Gly Ser Ala Ser
 80 85 90

gct ggt aca agt tct aca gct gct cct cct gag aaa tgt aca att gag 401
 Ala Gly Thr Ser Ser Thr Ala Ala Pro Pro Glu Lys Cys Thr Ile Glu
 95 100 105

att gct cca tct gcc cgt act tca tgt aga cga tgc agt gaa aag att 449
 Ile Ala Pro Ser Ala Arg Thr Ser Cys Arg Arg Cys Ser Glu Lys Ile
 110 115 120

aca aaa gga tcg gtc cgt ctt tca gct aag cct gag agt gaa ggt ccc 497
 Thr Lys Gly Ser Val Arg Leu Ser Ala Lys Leu Glu Ser Glu Gly Pro
 125 130 135

10

20

30

aag ggt ata cca tgg tat cat gcc aac tgt ttc ttt gag gta tcc ccg 545
Lys Gly Ile Pro Trp Tyr His Ala Asn Cys Phe Phe Glu Val Ser Pro
140 145 150 155

tct gca act gtt gag aag ttc tca ggc tgg gat act ttg tcc gat gag 593
Ser Ala Thr Val Glu Lys Phe Ser Gly Trp Asp Thr Leu Ser Asp Glu
160 165 170

gat aag aga acc atg ctc gat ctt gtt aaa aaa gat gtt ggc aac aat 641
Asp Lys Arg Thr Met Leu Asp Leu Val Lys Lys Asp Val Gly Asn Asn
175 180 185

gaa caa aat aag ggt tcc aag cgc aag aaa agt gaa aat gat att gat 689
Glu Gln Asn Lys Gly Ser Lys Arg Lys Lys Ser Glu Asn Asp Ile Asp
190 195 200

agc tac aaa tcc gcc agg tta gat gaa agt aca tct gaa ggt aca gtg 737
Ser Tyr Lys Ser Ala Arg Leu Asp Glu Ser Thr Ser Glu Gly Thr Val
205 210 215

cga aac aaa ggg caa ctt gta gac cca cgt ggt tcc aat act agt tca 785
Arg Asn Lys Gly Gln Leu Val Asp Pro Arg Gly Ser Asn Thr Ser Ser
220 225 230 235

gct gat atc caa cta aag ctt aag gag caa agt gac aca ctt tgg aag 833
Ala Asp Ile Gln Leu Lys Leu Lys Glu Gln Ser Asp Thr Leu Trp Lys
240 245 250

tta aag gat gga ctt aag act cat gta tcg gct gct gaa tta agg gat 881
Leu Lys Asp Gly Leu Lys Thr His Val Ser Ala Ala Glu Leu Arg Asp
255 260 265

atg ctt gag gct aat ggg cag gat aca tca gga cca gaa agg cac cta 929
Met Leu Glu Ala Asn Gly Gln Asp Thr Ser Gly Pro Glu Arg His Leu
270 275 280

ttg gat cgc tgt gcg gat gga atg ata ttt gga gcg ctg ggt cct tgc 977
Leu Asp Arg Cys Ala Asp Gly Met Ile Phe Gly Ala Leu Gly Pro Cys
285 290 295

cca gtc tgt gct aat ggc atg tac tat tat aat ggt cag tac caa tgc 1025
Pro Val Cys Ala Asn Gly Met Tyr Tyr Tyr Asn Gly Gln Tyr Gln Cys
300 305 310 315

agt ggt aat gtg tca gag tgg tcc aag tgt aca tac tct gcc aca gaa 1073
Ser Gly Asn Val Ser Glu Trp Ser Lys Cys Thr Tyr Ser Ala Thr Glu
320 325 330

10

20

30

cct gtc cgc gtt aag aag aag tgg caa att cca cat gga aca aag aat 1121
 Pro Val Arg Val Lys Lys Lys Trp Gln Ile Pro His Gly Thr Lys Asn
 335 340 345

gat tac ctt atg aag tgg ttc aaa tct caa aag gtt aag aaa cca gag 1169
 Asp Tyr Leu Met Lys Trp Phe Lys Ser Gln Lys Val Lys Lys Pro Glu
 350 355 360

agg gtt ctt cca cca atg tca cct gag aaa tct gga agt aaa gca act 1217
 Arg Val Leu Pro Pro Met Ser Pro Glu Lys Ser Gly Ser Lys Ala Thr
 365 370 375

cag aga aca tca ttg ctg tct tct aaa ggg ttg gat aaa tta agg ttt 1265
 Gln Arg Thr Ser Leu Leu Ser Ser Lys Gly Leu Asp Lys Leu Arg Phe
 380 385 390 395

tct gtt gta gga caa tca aaa gaa gca gca aat gag tgg att gag aag 1313
 Ser Val Val Gly Gln Ser Lys Glu Ala Ala Asn Glu Trp Ile Glu Lys
 400 405 410

ctc aaa ctt gct ggt gcc aac ttc tat gcc agg gtt gtc aaa gat att 1361
 Leu Lys Leu Ala Gly Ala Asn Phe Tyr Ala Arg Val Val Lys Asp Ile
 415 420 425

gat tgt tta att gca tgt ggt gag ctc gac aat gaa aat gct gaa gtc 1409
 Asp Cys Leu Ile Ala Cys Gly Glu Leu Asp Asn Glu Asn Ala Glu Val
 430 435 440

agg aaa gca agg agg ctg aag ata cca att gta agg gag ggt tac att 1457
 Arg Lys Ala Arg Arg Leu Lys Ile Pro Ile Val Arg Glu Gly Tyr Ile
 445 450 455

gga gaa tgt gtt aaa aag aac aaa atg ctg cca ttt gat ttg tat aaa 1505
 Gly Glu Cys Val Lys Lys Asn Lys Met Leu Pro Phe Asp Leu Tyr Lys
 460 465 470 475

cta gag aat gcc tta gag tcc tca aaa ggc agt act gtc act gtt aaa 1553
 Leu Glu Asn Ala Leu Glu Ser Ser Lys Gly Ser Thr Val Thr Val Lys
 480 485 490

gtt aag ggc cga agt gct gtt cat gag tcc tct ggt ttg caa gat act 1601
 Val Lys Gly Arg Ser Ala Val His Glu Ser Ser Gly Leu Gln Asp Thr
 495 500 505

gct cac att ctt gaa gat ggg aaa agc ata tac aat gca acc tta aac 1649
 Ala His Ile Leu Glu Asp Gly Lys Ser Ile Tyr Asn Ala Thr Leu Asn
 510 515 520

10

20

30

atg tct gac ctg gca cta ggt gtg aac agc tac tat gta ctc cag atc 1697
 Met Ser Asp Leu Ala Leu Gly Val Asn Ser Tyr Tyr Val Leu Gln Ile
 525 530 535

att gaa cag gat gat ggg tct gag tgc tac gta ttt cgt aag tgg gga 1745
 Ile Glu Gln Asp Asp Gly Ser Glu Cys Tyr Val Phe Arg Lys Trp Gly
 540 545 550 555

cgg gtt ggg agt gag aaa att gga ggg caa aaa ctg gag gag atg tca 1793
 Arg Val Gly Ser Glu Lys Ile Gly Gly Gln Lys Leu Glu Glu Met Ser
 560 565 570

aaa act gag gca atc aag gaa ttc aaa aga tta ttt ctt gag aag act 1841
 Lys Thr Glu Ala Ile Lys Glu Phe Lys Arg Leu Phe Leu Glu Lys Thr
 575 580 585

gga aac tca tgg gaa gct tgg gaa tgt aaa acc aat ttt cgg aag cag 1889
 Gly Asn Ser Trp Glu Ala Trp Glu Cys Lys Thr Asn Phe Arg Lys Gln
 590 595 600

cct ggg aga ttt tac cca ctt gat gtt gat tat ggt gtt aag aaa gca 1937
 Pro Gly Arg Phe Tyr Pro Leu Asp Val Asp Tyr Gly Val Lys Lys Ala
 605 610 615

cca aaa cgg aaa gat atc agt gaa atg aaa agt tct ctt gct cct caa 1985
 Pro Lys Arg Lys Asp Ile Ser Glu Met Lys Ser Ser Leu Ala Pro Gln
 620 625 630 635

ttg cta gaa ctc atg aag atg ctt ttc aat gtg gag aca tat aga gct 2033
 Leu Leu Glu Leu Met Lys Met Leu Phe Asn Val Glu Thr Tyr Arg Ala
 640 645 650

gct atg atg gaa ttt gaa att aat atg tca gaa atg cct ctt ggg aag 2081
 Ala Met Met Glu Phe Glu Ile Asn Met Ser Glu Met Pro Leu Gly Lys
 655 660 665

cta agc aag gaa aat att gag aaa gga ttt gaa gca tta act gag ata 2129
 Leu Ser Lys Glu Asn Ile Glu Lys Gly Phe Glu Ala Leu Thr Glu Ile
 670 675 680

cag aat tta ttg aag gac acc gct gat caa gca ctg gct gtt aga gaa 2177
 Gln Asn Leu Leu Lys Asp Thr Ala Asp Gln Ala Leu Ala Val Arg Glu
 685 690 695

agc tta att gtc gct gog agc aat cgc ttt ttc act ctt atc cct tct 2225
 Ser Leu Ile Val Ala Ala Ser Asn Arg Phe Phe Thr Leu Ile Pro Ser
 700 705 710 715

10

20

30

att cat cct cat att ata cgg gat gag gat gat ttg atg atc aaa gcg 2273
 Ile His Pro His Ile Ile Arg Asp Glu Asp Asp Leu Met Ile Lys Ala
 720 725 730

aaa atg ctt gaa gct ctg cag gat att gaa att gct tca aag ata gtt 2321
 Lys Met Leu Glu Ala Leu Gln Asp Ile Glu Ile Ala Ser Lys Ile Val
 735 740 745

ggc ttc gat agc gac agt gat gaa tct ctt gat gat aaa tat atg aaa 2369
 Gly Phe Asp Ser Asp Ser Asp Glu Ser Leu Asp Asp Lys Tyr Met Lys
 750 755 760

ctt cac tgt gac atc acc ccg ctg gct cac gat agt gaa gat tac aag 2417
 Leu His Cys Asp Ile Thr Pro Leu Ala His Asp Ser Glu Asp Tyr Lys
 765 770 775

tta att gag cag tat ctc ctc aac aca cat gct cct act cac aag gac 2465
 Leu Ile Glu Gln Tyr Leu Leu Asn Thr His Ala Pro Thr His Lys Asp
 780 785 790 795

tgg tcg ctg gaa ctg gag gaa gtt ttt tca ctt gat cga gat gga gaa 2513
 Trp Ser Leu Glu Leu Glu Glu Val Phe Ser Leu Asp Arg Asp Gly Glu
 800 805 810

ctt aat aag tac tca aga tat aaa aat aat ctg cat aac aag atg cta 2561
 Leu Asn Lys Tyr Ser Arg Tyr Lys Asn Asn Leu His Asn Lys Met Leu
 815 820 825

tta tgg cac ggt tca agg ttg acg aat ttt gtg gga att ctt agt caa 2609
 Leu Trp His Gly Ser Arg Leu Thr Asn Phe Val Gly Ile Leu Ser Gln
 830 835 840

ggg cta aga att gca cct cct gag gca cct gtt act ggc tat atg ttc 2657
 Gly Leu Arg Ile Ala Pro Pro Glu Ala Pro Val Thr Gly Tyr Met Phe
 845 850 855

ggc aaa ggc ctc tac ttt gca gat cta gta agc aag agc gca caa tac 2705
 Gly Lys Gly Leu Tyr Phe Ala Asp Leu Val Ser Lys Ser Ala Gln Tyr
 860 865 870 875

tgt tat gtg gat agg aat aat cct gta ggt ttg atg ctt ctt tct gag 2753
 Cys Tyr Val Asp Arg Asn Asn Pro Val Gly Leu Met Leu Leu Ser Glu
 880 885 890

gtt gct tta gga gac atg tat gaa cta aag aaa gcc acg tcc atg gac 2801
 Val Ala Leu Gly Asp Met Tyr Glu Leu Lys Lys Ala Thr Ser Met Asp
 895 900 905

10

20

30

aaa cct cca aga ggg aag cat tgg acc aag gga tta ggc aaa acc gtg 2849
 Lys Pro Pro Arg Gly Lys His Ser Thr Lys Gly Leu Gly Lys Thr Val
 910 915 920

cca ctg gag tca gag ttt gtg aag tgg agg gat gat gtc gta gtt ccc 2897
 Pro Leu Glu Ser Glu Phe Val Lys Trp Arg Asp Asp Val Val Val Pro
 925 930 935

tgc ggc aag ccg gtg cca tca tca att agg agc tct gaa ctc atg tac 2945
 Cys Gly Lys Pro Val Pro Ser Ser Ile Arg Ser Ser Glu Leu Met Tyr
 940 945 950 955

aat gag tac atc gtc tac aac aca tcc cag gtg aag atg cag ttc ttg 2993
 Asn Glu Tyr Ile Val Tyr Asn Thr Ser Gln Val Lys Met Gln Phe Leu
 960 965 970

ctg aag gtg cgt ttc cat cac aag agg tagctgggag actaggcaag 3040
 Leu Lys Val Arg Phe His His Lys Arg
 975 980

tagagttaga aggtagagaa gcagagttag gcgatgcctc ttttgggtatt attagtaagc 3100

ctggcatgta tttatgggtg ctgcgccttg atccattttg gtaagtgttg cttgggcctc 3160

agcgcggaata gcaccaatca cacactttta cctaagcagc ttttactgta ta 3212

<210> 11
 <211> 980
 <212> PRT
 <213> Zea mays

<400> 11
 Met Ala Ala Pro Pro Lys Ala Trp Lys Ala Glu Tyr Ala Lys Ser Gly
 1 5 10 15

Arg Ala Ser Cys Lys Ser Cys Arg Ser Pro Ile Ala Lys Asp Gln Leu
 20 25 30

Arg Leu Gly Lys Met Val Gln Ala Ser Gln Phe Asp Gly Phe Met Pro
 35 40 45

Met Trp Asn His Ala Arg Cys Ile Phe Ser Lys Lys Asn Gln Ile Lys
 50 55 60

Ser Val Asp Asp Val Glu Gly Ile Asp Ala Leu Arg Trp Asp Asp Gln
 65 70 75 80

10

20

30

Glu Lys Ile Arg Asn Tyr Val Gly Ser Ala Ser Ala Gly Thr Ser Ser
 85 90 95

Thr Ala Ala Pro Pro Glu Lys Cys Thr Ile Glu Ile Ala Pro Ser Ala
 100 105 110

Arg Thr Ser Cys Arg Arg Cys Ser Glu Lys Ile Thr Lys Gly Ser Val
 115 120 125

Arg Leu Ser Ala Lys Leu Glu Ser Glu Gly Pro Lys Gly Ile Pro Trp
 130 135 140

Tyr His Ala Asn Cys Phe Phe Glu Val Ser Pro Ser Ala Thr Val Glu
 145 150 155 160

Lys Phe Ser Gly Trp Asp Thr Leu Ser Asp Glu Asp Lys Arg Thr Met
 165 170 175

Leu Asp Leu Val Lys Lys Asp Val Gly Asn Asn Glu Gln Asn Lys Gly
 180 185 190

Ser Lys Arg Lys Lys Ser Glu Asn Asp Ile Asp Ser Tyr Lys Ser Ala
 195 200 205

Arg Leu Asp Glu Ser Thr Ser Glu Gly Thr Val Arg Asn Lys Gly Gln
 210 215 220

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

Lys Leu Lys Glu Gln Ser Asp Thr Leu Trp Lys Leu Lys Asp Gly Leu
 245 250 255

Lys Thr His Val Ser Ala Ala Glu Leu Arg Asp Met Leu Glu Ala Asn
 260 265 270

Gly Gln Asp Thr Ser Gly Pro Glu Arg His Leu Leu Asp Arg Cys Ala
 275 280 285

Asp Gly Met Ile Phe Gly Ala Leu Gly Pro Cys Pro Val Cys Ala Asn
 290 295 300

Gly Met Tyr Tyr Tyr Asn Gly Gln Tyr Gln Cys Ser Gly Asn Val Ser
 305 310 315 320

Glu Trp Ser Lys Cys Thr Tyr Ser Ala Thr Glu Pro Val Arg Val Lys
 325 330 335

10

20

30

Lys Lys Trp Gln Ile Pro His Gly Thr Lys Asn Asp Tyr Leu Met Lys
 340 345 350
 Trp Phe Lys Ser Gln Lys Val Lys Lys Pro Glu Arg Val Leu Pro Pro
 355 360 365
 Met Ser Pro Glu Lys Ser Gly Ser Lys Ala Thr Gln Arg Thr Ser Leu
 370 375 380
 Leu Ser Ser Lys Gly Leu Asp Lys Leu Arg Phe Ser Val Val Gly Gln
 385 390 395 400
 Ser Lys Glu Ala Ala Asn Glu Trp Ile Glu Lys Leu Lys Leu Ala Gly
 405 410 415
 Ala Asn Phe Tyr Ala Arg Val Val Lys Asp Ile Asp Cys Leu Ile Ala
 420 425 430
 Cys Gly Glu Leu Asp Asn Glu Asn Ala Glu Val Arg Lys Ala Arg Arg
 435 440 445
 Leu Lys Ile Pro Ile Val Arg Glu Gly Tyr Ile Gly Glu Cys Val Lys
 450 455 460
 Lys Asn Lys Met Leu Pro Phe Asp Leu Tyr Lys Leu Glu Asn Ala Leu
 465 470 475 480
 Glu Ser Ser Lys Gly Ser Thr Val Thr Val Lys Val Lys Gly Arg Ser
 485 490 495
 Ala Val His Glu Ser Ser Gly Leu Gln Asp Thr Ala His Ile Leu Glu
 500 505 510
 Asp Gly Lys Ser Ile Tyr Asn Ala Thr Leu Asn Met Ser Asp Leu Ala
 515 520 525
 Leu Gly Val Asn Ser Tyr Tyr Val Leu Gln Ile Ile Glu Gln Asp Asp
 530 535 540
 Gly Ser Glu Cys Tyr Val Phe Arg Lys Trp Gly Arg Val Gly Ser Glu
 545 550 555 560
 Lys Ile Gly Gly Gln Lys Leu Glu Glu Met Ser Lys Thr Glu Ala Ile
 565 570 575
 Lys Glu Phe Lys Arg Leu Phe Leu Glu Lys Thr Gly Asn Ser Trp Glu
 580 585 590

10

20

30

Ala Trp Glu Cys Lys Thr Asn Phe Arg Lys Gln Pro Gly Arg Phe Tyr
 595 600 605
 Pro Leu Asp Val Asp Tyr Gly Val Lys Lys Ala Pro Lys Arg Lys Asp
 610 615 620
 Ile Ser Glu Met Lys Ser Ser Leu Ala Pro Gln Leu Leu Glu Leu Met
 625 630 635 640
 Lys Met Leu Phe Asn Val Glu Thr Tyr Arg Ala Ala Met Met Glu Phe
 645 650 655
 Glu Ile Asn Met Ser Glu Met Pro Leu Gly Lys Leu Ser Lys Glu Asn
 660 665 670
 Ile Glu Lys Gly Phe Glu Ala Leu Thr Glu Ile Gln Asn Leu Leu Lys
 675 680 685
 Asp Thr Ala Asp Gln Ala Leu Ala Val Arg Glu Ser Leu Ile Val Ala
 690 695 700
 Ala Ser Asn Arg Phe Phe Thr Leu Ile Pro Ser Ile His Pro His Ile
 705 710 715 720
 Ile Arg Asp Glu Asp Asp Leu Met Ile Lys Ala Lys Met Leu Glu Ala
 725 730 735
 Leu Gln Asp Ile Glu Ile Ala Ser Lys Ile Val Gly Phe Asp Ser Asp
 740 745 750
 Ser Asp Glu Ser Leu Asp Asp Lys Tyr Met Lys Leu His Cys Asp Ile
 755 760 765
 Thr Pro Leu Ala His Asp Ser Glu Asp Tyr Lys Leu Ile Glu Gln Tyr
 770 775 780
 Leu Leu Asn Thr His Ala Pro Thr His Lys Asp Trp Ser Leu Glu Leu
 785 790 795 800
 Glu Glu Val Phe Ser Leu Asp Arg Asp Gly Glu Leu Asn Lys Tyr Ser
 805 810 815
 Arg Tyr Lys Asn Asn Leu His Asn Lys Met Leu Leu Trp His Gly Ser
 820 825 830
 Arg Leu Thr Asn Phe Val Gly Ile Leu Ser Gln Gly Leu Arg Ile Ala
 835 840 845

10

20

30

Pro Pro Glu Ala Pro Val Thr Gly Tyr Met Phe Gly Lys Gly Leu Tyr
850 855 860

Phe Ala Asp Leu Val Ser Lys Ser Ala Gln Tyr Cys Tyr Val Asp Arg
865 870 875 880

Asn Asn Pro Val Gly Leu Met Leu Leu Ser Glu Val Ala Leu Gly Asp
885 890 895

Met Tyr Glu Leu Lys Lys Ala Thr Ser Met Asp Lys Pro Pro Arg Gly
900 905 910

Lys His Ser Thr Lys Gly Leu Gly Lys Thr Val Pro Leu Glu Ser Glu
915 920 925

Phe Val Lys Trp Arg Asp Asp Val Val Val Pro Cys Gly Lys Pro Val
930 935 940

Pro Ser Ser Ile Arg Ser Ser Glu Leu Met Tyr Asn Glu Tyr Ile Val
945 950 955 960

Tyr Asn Thr Ser Gln Val Lys Met Gln Phe Leu Leu Lys Val Arg Phe
965 970 975

His His Lys Arg
980

<210> 12
<211> 1010
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: fusion protein
between APP N-terminal domain and GUS protein

<400> 12
Met Ala Asn Lys Leu Lys Val Asp Glu Leu Arg Leu Lys Leu Ala Glu
1 5 10 15

Arg Gly Leu Ser Thr Thr Gly Val Lys Ala Val Leu Val Glu Arg Leu
20 25 30

Glu Glu Ala Ile Ala Glu Asp Thr Lys Lys Glu Glu Ser Lys Ser Lys
35 40 45

Arg Lys Arg Asn Ser Ser Asn Asp Thr Tyr Glu Ser Asn Lys Leu Ile

10

20

30

40

50	55	60	
Ala Ile Gly Glu Phe Arg Gly Met Ile Val Lys Glu Leu Arg Glu Glu			
65	70	75	80
Ala Ile Lys Arg Gly Leu Asp Thr Thr Gly Thr Lys Lys Asp Leu Leu			
85	90	95	
Glu Arg Leu Cys Asn Asp Ala Asn Asn Val Ser Asn Ala Pro Val Lys			
100	105	110	
Ser Ser Asn Gly Thr Asp Glu Ala Glu Asp Asp Asn Asn Gly Phe Glu			10
115	120	125	
Glu Glu Lys Lys Glu Glu Lys Ile Val Thr Ala Thr Lys Lys Gly Ala			
130	135	140	
Ala Val Leu Asp Gln Trp Ile Pro Asp Glu Ile Lys Ser Gln Tyr His			
145	150	155	160
Val Leu Gln Arg Gly Asp Asp Val Tyr Asp Ala Ile Leu Asn Gln Thr			
165	170	175	
Asn Val Arg Asp Asn Asn Asn Lys Phe Phe Val Leu Gln Val Leu Glu			20
180	185	190	
Ser Asp Ser Lys Lys Thr Tyr Met Val Tyr Thr Arg Trp Gly Arg Val			
195	200	205	
Gly Val Lys Gly Gln Ser Lys Leu Asp Gly Pro Tyr Asp Ser Trp Asp			
210	215	220	
Arg Ala Ile Glu Ile Phe Thr Asn Lys Phe Asn Asp Lys Thr Lys Asn			
225	230	235	240
Tyr Trp Ser Asp Arg Lys Glu Phe Ile Pro His Pro Lys Ser Tyr Thr			30
245	250	255	
Trp Leu Glu Met Asp Tyr Gly Lys Glu Glu Asn Asp Ser Pro Val Asn			
260	265	270	
Asn Asp Ile Pro Ser Ser Ser Ser Glu Val Lys Pro Glu Gln Ser Lys			
275	280	285	
Leu Asp Thr Arg Val Ala Lys Phe Ile Ser Leu Ile Cys Asn Val Ser			
290	295	300	
Met Met Ala Gln His Met Met Glu Ile Gly Tyr Asn Ala Asn Lys Leu			40

305 310 315 320
 Pro Leu Gly Lys Ile Ser Lys Ser Thr Ile Ser Lys Gly Tyr Glu Val
 325 330 335
 Leu Lys Arg Ile Ser Glu Val Ile Asp Arg Tyr Asp Arg Thr Arg Leu
 340 345 350
 Glu Glu Leu Ser Gly Glu Phe Tyr Thr Val Ile Pro His Asp Phe Gly
 355 360 365
 Phe Lys Lys Met Ser Gln Phe Val Ile Asp Thr Pro Gln Lys Leu Lys
 370 375 380
 Gln Lys Ile Glu Met Val Glu Ala Leu Gly Glu Ile Glu Leu Ala Thr
 385 390 395 400
 Lys Leu Leu Ser Val Asp Pro Met Val Arg Pro Val Glu Thr Pro Thr
 405 410 415
 Arg Glu Ile Lys Lys Leu Asp Gly Leu Trp Ala Phe Ser Leu Asp Arg
 420 425 430
 Glu Asn Cys Gly Ile Asp Gln Arg Trp Trp Glu Ser Ala Leu Gln Glu
 435 440 445
 Ser Arg Ala Ile Ala Val Pro Gly Ser Phe Asn Asp Gln Phe Ala Asp
 450 455 460
 Ala Asp Ile Arg Asn Tyr Ala Gly Asn Val Trp Tyr Gln Arg Glu Val
 465 470 475 480
 Phe Ile Pro Lys Gly Trp Ala Gly Gln Arg Ile Val Leu Arg Phe Asp
 485 490 495
 Ala Val Thr His Tyr Gly Lys Val Trp Val Asn Asn Gln Glu Val Met
 500 505 510
 Glu His Gln Gly Gly Tyr Thr Pro Phe Glu Ala Asp Val Thr Pro Tyr
 515 520 525
 Val Ile Ala Gly Lys Ser Val Arg Ile Thr Val Cys Val Asn Asn Glu
 530 535 540
 Leu Asn Trp Gln Thr Ile Pro Pro Gly Met Val Ile Thr Asp Glu Asn
 545 550 555 560
 Gly Lys Lys Lys Gln Ser Tyr Phe His Asp Phe Phe Asn Tyr Ala Gly

10

20

30

40

565	570	575	
Ile His Arg Ser Val Met Leu Tyr Thr Thr Pro Asn Thr Trp Val Asp			
580	585	590	
Asp Ile Thr Val Val Thr His Val Ala Gln Asp Cys Asn His Ala Ser			
595	600	605	
Val Asp Trp Gln Val Val Ala Asn Gly Asp Val Ser Val Glu Leu Arg			
610	615	620	
Asp Ala Asp Gln Gln Val Val Ala Thr Gly Gln Gly Thr Ser Gly Thr			10
625	630	635	640
Leu Gln Val Val Asn Pro His Leu Trp Gln Pro Gly Glu Gly Tyr Leu			
645	650	655	
Tyr Glu Leu Cys Val Thr Ala Lys Ser Gln Thr Glu Cys Asp Ile Tyr			
660	665	670	
Pro Leu Arg Val Gly Ile Arg Ser Val Ala Val Lys Gly Glu Gln Phe			
675	680	685	
Leu Ile Asn His Lys Pro Phe Tyr Phe Thr Gly Phe Gly Arg His Glu			20
690	695	700	
Asp Ala Asp Leu Arg Gly Lys Gly Phe Asp Asn Val Leu Met Val His			
705	710	715	720
Asp His Ala Leu Met Asp Trp Ile Gly Ala Asn Ser Tyr Arg Thr Ser			
725	730	735	
His Tyr Pro Tyr Ala Glu Glu Met Leu Asp Trp Ala Asp Glu His Gly			
740	745	750	
Ile Val Val Ile Asp Glu Thr Ala Ala Val Gly Phe Asn Leu Ser Leu			30
755	760	765	
Gly Ile Gly Phe Glu Ala Gly Asn Lys Pro Lys Glu Leu Tyr Ser Glu			
770	775	780	
Glu Ala Val Asn Gly Glu Thr Gln Gln Ala His Leu Gln Ala Ile Lys			
785	790	795	800
Glu Leu Ile Ala Arg Asp Lys Asn His Pro Ser Val Val Met Trp Ser			
805	810	815	
Ile Ala Asn Glu Pro Asp Thr Arg Pro Gln Gly Ala Arg Glu Tyr Phe			40

820	825	830	
Ala Pro Leu Ala Glu Ala Thr Arg Lys Leu Asp Pro Thr Arg Pro Ile			
835	840	845	
Thr Cys Val Asn Val Met Phe Cys Asp Ala His Thr Asp Thr Ile Ser			
850	855	860	
Asp Leu Phe Asp Val Leu Cys Leu Asn Arg Tyr Tyr Gly Trp Tyr Val			
865	870	875	880
Gln Ser Gly Asp Leu Glu Thr Ala Glu Lys Val Leu Glu Lys Glu Leu			10
885	890	895	
Leu Ala Trp Gln Glu Lys Leu His Gln Pro Ile Ile Ile Thr Glu Tyr			
900	905	910	
Gly Val Asp Thr Leu Ala Gly Leu His Ser Met Tyr Thr Asp Met Trp			
915	920	925	
Ser Glu Glu Tyr Gln Cys Ala Trp Leu Asp Met Tyr His Arg Val Phe			
930	935	940	
Asp Arg Val Ser Ala Val Val Gly Glu Gln Val Trp Asn Phe Ala Asp			20
945	950	955	960
Phe Ala Thr Ser Gln Gly Ile Leu Arg Val Gly Gly Asn Lys Lys Gly			
965	970	975	
Ile Phe Thr Arg Asp Arg Lys Pro Lys Ser Ala Ala Phe Leu Leu Gln			
980	985	990	
Lys Arg Trp Thr Gly Met Asn Phe Gly Glu Lys Pro Gln Gln Gly Gly			
995	1000	1005	
Lys Gln			30
1010			

<210> 13

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: degenerated
PCR primer

<400> 13
ccgaattcgg ntayatgtty ggnaa

25

<210> 14
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: degenerated
PCR primer

10

<400> 14
ccgaattcac natrtaytcr ttrta

25

<210> 15
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: oligonucleotide
for use as PCR primer

20

<400> 15
gggaccatgt agtttatctt gacct

25

<210> 16
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide for use in PCR

30

<400> 16
gacctcgtac cccaactctt ccccat

26

<210> 17
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide for use in PCR

<400> 17

aagtcgacgc ggccgccaca cctagtgcca ggtcag

36

<210> 18

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide for use in PCR

<400> 18

atctcaattg tacatctctc agga

24

<210> 19

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide for use in PCR

<400> 19

aggatcccat ggcgaacaag ctcaaagtga c

31

<210> 20

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide for use in PCR

<400> 20

aggatcctta gtgcttgtag ttgaat

26

<210> 21

<211> 4947
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: APP promoter
 fusion with beta-glucuronidase gene

<220>
 <221> promoter
 <222> (1)..(1961)

10

<220>
 <221> misc_signal
 <222> (1962)..(1964)
 <223> translation initiation codon

<400> 21
 ctcgagatag tatatctttt agttactatc attacataag tatatcttaa aaaactaatt 60
 atatgaatta ttagctaac tagatagata atcgtataac caattcatgt tagtatagta 120
 tagtttaagt atgtattttg ggattacaag tgtggttggc atcaagacaa ggatggtgat 180
 agcctttctc tgtaatttgg ttaagaaaa gtttttgcac tttatgtata aacgtgtttt 240
 ttttttataa tttcaaattt caacaaaaaa caattttttt taataatgat tgaccactat 300
 agacaattta aatgataaaa aaaaggggga atttttcaca atgttttggg gattagtcta 360
 gattttttgt ccaaattttc cgattgtaag aattaagaag caatgaacat ttgtgttaag 420
 cttaatgatt tgtactcaca atatctttta aatttaaaat tgtaaccaa aatattctat 480
 atattgtact tgtaatagaa atataaacta ttaaaaaaaa cactttattc atataatata 540
 agttaaaaca tatgtttttt ttagtatgtt ctaatcacac ctattaaaaa aagttgaagc 600
 taaatgagcc aaaaagaaaa ataaagatag gggatgggga caggctgtaa tgttaggcgg 660
 ttggtatatt aactgagaac atgtctgttg gttcgggtcca tctacgccac tcaaccattt 720
 ggctatgttt tcttttttggc ttttgcattt tctctctact tttctctttt ggtcaaaatc 780
 tctatctcgt cttttacatg gcttaccga atgttagttg tcatgtaaat ttgggtatga 840
 aaagatattt tatataaact ttatcgtata ttaatatcgt tatcatctaa ccatttttta 900

20

30

aaactaaact agaaccatcc agttttacaa gagttttttt tttttttttc taactaaata 960
atatttgaag tgtacaatat taacaatata tgggccaaat aatagtggaa accaaatcgt 1020
tagtcccact ttatgatggg cctgttgatt cttatgtctt cttcgttaagt tctgattatg 1080
cagattacgg gctaataaac atgcatgttt agtttttact gtccaagtaa cgaaatttta 1140
tcttttgggt tgttggccca ttccatatat tccaaatgcc aaatccagcc cggctcgaca 1200
cagcactgct cggctcaaca ctcgatgctg gttggtagcc acttaagacc ttggtttgat 1260
taacatgtta cgaataatth gtgtcccttt tcttcaagg agactaatct cttttaataa 1320
aaaagaattg tgtcattagt caacacaagt cctataatcc gtttacgtaa tttgtatgca 1380
cgtccttggg aaagttagta gtggcgtagc ttacagccaa aaactatttg tataattttc 1440
ttcgttaaac aaccagcaaa attttcagaa aatgttctt aaattataaa ttagtagtac 1500
attttaaaac atagagattt tttgtttctt ttaatagaag agttaaacct atgtacaaaa 1560
tttcaactcc ttttcaaagt atttgctgt tactagattt ttaacctttt tttttttatc 1620
tttcatgatt ttctattgct tgccatcatc aatggtagga aataaatact attttaaaaa 1680
ggtcaggggt ggatttaaga atcaatccaa aagtttggg tcttttggag attaaaaagt 1740
tatatgggaa atatccacaa atatgaacga gaacttttgt caaaaaaatt taaaataatt 1800
tttcaaaaag ccttaaagct ttcaagggaa gccatcgatg aagaagaaaa cgaagaagaa 1860
gactcttcaa acgttcgctg gaactcactt ctgacgaaaa ccatacttcc tcagtctcat 1920
tccctttccg acgaactatt ctctgaaga agaagacgaa aatggcgaa aagctcaaag 1980
tcgacatggt ccgtcctgta gaaaccccaa ccgtgaaat caaaaaactc gacggcctgt 2040
gggcattcag tctggatcgc gaaaactgtg gaattgatca gcgttgggtg gaaagcgcgt 2100
tacaagaaag ccgggcaatt gctgtgccag gcagttttta cgatcagttc gccgatgcag 2160
atattcgtaa ttatgcgggc aacgtctggt atcagcgca agtctttata ccgaaagggt 2220
gggcaggcca gcgtatcgtg ctgcgtttcg atgcggtcac tcattacggc aaagtgtggg 2280
tcaataatca ggaagtgatg gagcatcagg gcggctatcc gccatttgaa gccgatgtca 2340

10

20

30

cgccgtatgt tattgccggg aaaagtgtac gtatcacggt ttgtgtgaac aacgaactga 2400
actggcagac tatcccgccg ggaatggtga ttaccgacga aaacggcaag aaaaagcagt 2460
cttacttcca tgattttctt aactatgccg gaatccatcg cagcgtaatg ctctacacca 2520
cgccgaacac ctgggtggac gatatcacg tggtagcga tgtcgcgcaa gactgtaacc 2580
acgcgtctgt tgactggcag gtgggtggca atgggtgatgt cagcgttgaa ctgcgtgatg 2640
cggatcaaca ggtgggttga actggacaag gcactagcgg gactttgcaa gtgggtgaatc 2700
cgcacctctg gcaaccgggt gaagggtatc tctatgaact gtgcgtcaca gccaaaagcc 2760
agacagagtg tgatatctac ccgcttcgcg tcggcatccg gtcagtggca gtgaaggggc 2820
aacagtctct gattaaccac aaaccgttct actttactgg ctttggctgt catgaagatg 2880
cggacttacg tggcaaagga ttcgataacg tgctgatggt gcacgaccac gcattaatgg 2940
actggatttg ggccaactcc taccgtaact cgcattaccc ttacgctgaa gagatgctcg 3000
actgggcaga tgaacatggc atcgtggtga ttgatgaaac tgctgctgtc ggctttaacc 3060
tctctttagg cattggtttc gaagcgggca acaagccgaa agaactgtac agcgaagagg 3120
cagtcaacgg ggaaactcag caagcgcact tacaggcgat taaagagctg atagcgcgtg 3180
acaaaaacca cccaagcgtg gtgatgtgga gtattgcaa cgaaccggat acccgtccgc 3240
aagtgcacgg gaatatctcg ccactggcgg aagcaacgg taaactcgac ccgacgcgtc 3300
cgatcacctg cgtcaatgta atgttctgcg acgctcacac cgataccatc agcgtatctt 3360
ttgatgtgct gtgcctgaac cgttattacg gatgggtatg ccaaagcggc gatttggaag 3420
cggcagagaa ggtactggaa aaagaacttc tggcctggca ggagaaactg catcagccga 3480
ttatcatcac cgaatacggc gtggatacgt tagccgggct gcactcaatg tacaccgaca 3540
tgtggagtga agagtatcag tgtgcatggc tggatatgta tcaccgcgtc tttgatcggc 3600
tcagcgcctg cgtcggtgaa caggtatgga atttcgccga ttttgcgacc tcgcaaggca 3660
tattgcgcgt tggcggtaac aagaaaggga ttttactcgc cgaccgcaa ccgaagtcgg 3720
cggtctttct gctgcaaaaa cgctggactg gcatgaactt cggtgaaaaa ccgcagcagg 3780

10

20

30

gaggcaaaca atgannnnnn gaattgggtcc tgctttaatg agatatgcga gacgcctatg 3840
atcgcgatgat atttgccttc aattctgttg tgcacgttgt aaaaaacctg agcatgtgta 3900
gctcagatcc ttaccgccgg ttccggttca ttctaataaa tatatcaccg gttactatcg 3960
tatttttatg aataatatcc tccgttcaat ttactgattg taccctacta cttatatgta 4020
caatattaaa atgaaaacaa tatattgtgc tgaatagggt tatagcgaca tctatgatag 4080
agcgccacaa taacaaacaa ttgcgtttta ttattacaaa tccaatttta aaaaaagcgg 4140
cagaaccggt caaacctaaa agactgatta cataaatctt attcaaattt caaaaggccc 4200
caggggctag tatctacgac acaccgagcg gcgaactaat aacgttcaact gaagggaact 4260
ccggttcccc gccggcgcgc atgggtgaga ttccctgaag ttgagtattg gccgtccgct 4320
ctaccgaaag ttacgggcac cattcaaccg ggtccagcac ggccggccgg taaccgactt 4380
gctgccccga gaattatgca gcattttttt ggtgtatgtg ggccccaaat gaagtgcagg 4440
tcaaaccttg acagtgcga caaatcgttg ggccgggtcca gggcgaattt tgcgacaaca 4500
tgtcgaggct cagcaggact ctaggagatc cccgggtacc gagctcgaat tcaactggccg 4560
tcgtttttaca acgtcgtgac tgggaaaacc ctggcggttac ccaacttaat cgccttgcat 4620
cacatcccc ttccgccagc tggcgtaata gcgaagaggc ccgcaccgat cgccttccc 4680
aacagttgag cagcctgaat ggcgaatggc gcctgatgag gtattttctc cttacgcac 4740
tgtgcggtat ttacacccgc atatgggtgca ctctcagtac aatctgctct gatgcgcac 4800
agttaagcca gccccgacac ccgccaacac ccgctgacgc gccctgacgg gcttgtctgc 4860
tcccgcatc cgcttacaga caagctgtga ccgtctccgg gagctgcatg tgcagaggc 4920
tttcaccgct atcacgaaa cgcgcga 4947

10

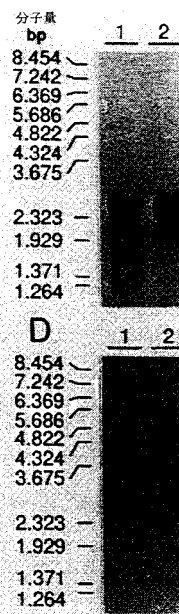
20

30

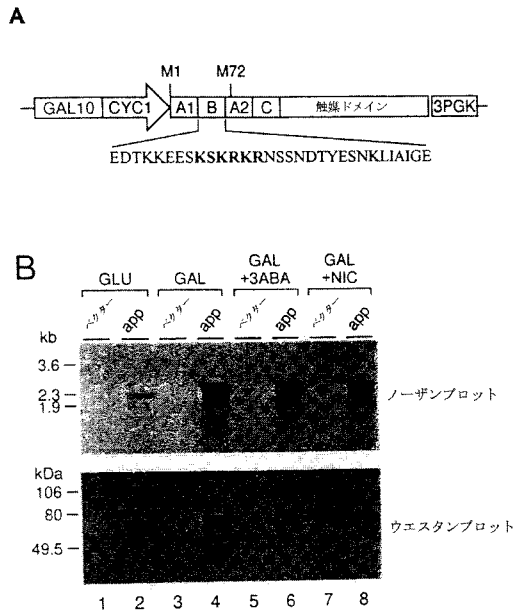
【図 2】



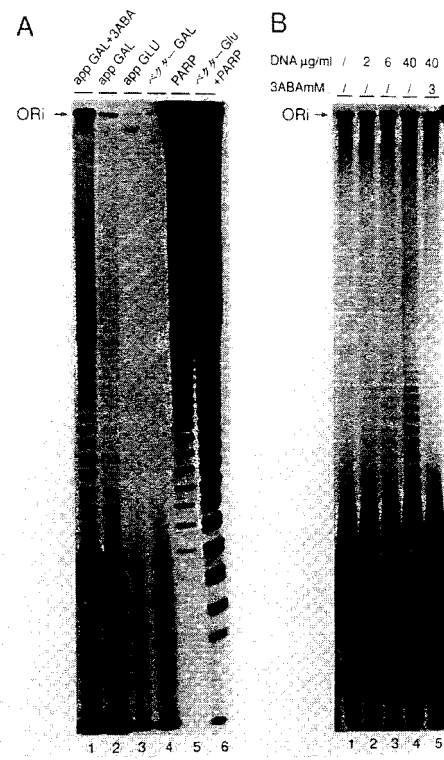
C



【図 4】



【図 5】



【図 6】

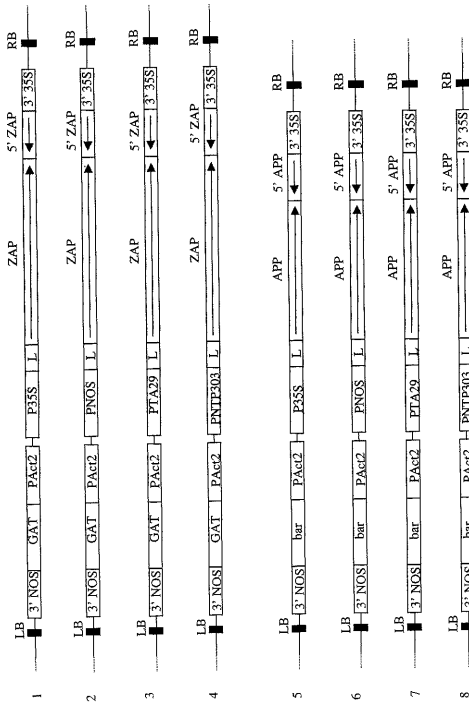


Figure 6

フロントページの続き

- (72)発明者 クシュニール, セルゲイ
ベルギー国、ペー—9 0 0 0 ヘント、アストリドラーン 3 6 1 デー
- (72)発明者 デ・ブロック, マルク
ベルギー国、ペー—9 8 2 0 メレルベーク、アプリコゼンストラート 2 6

審査官 白井 美香保

- (56)参考文献 国際公開第9 7 / 0 0 6 2 6 7 (WO, A 1)
特表平0 8 - 5 1 0 3 8 1 (J P, A)
THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 1 9 9 2 年, vol.267 no.18, pp.12804-12812
Biochimie, 1 9 9 5 年, vol.77, pp.450-455
Annals of Botany, 1 9 9 7 年, vol.79, pp.3-12
FEBS Letters, 1 9 9 5 年, vol.364, pp.103-108
Biochimie, 1 9 9 5 年, vol.77, pp.486-491

- (58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

IPC
C12N 15/00-15/90
DB 名
CA/BIOSIS/MEDLINE(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
PubMed
CiNii
WPI