

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3961570号
(P3961570)

(45) 発行日 平成19年8月22日(2007.8.22)

(24) 登録日 平成19年5月25日(2007.5.25)

(51) Int.C1.

F 1

C 12 N	15/09	(2006.01)	C 12 N	15/00	Z N A A
A O 1 H	5/00	(2006.01)	A O 1 H	5/00	A
C 12 N	5/10	(2006.01)	C 12 N	5/00	C
C 12 N	9/02	(2006.01)	C 12 N	9/02	
C 12 N	9/99	(2006.01)	C 12 N	9/99	

請求項の数 3 (全 141 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平9-531203
(86) (22) 出願日	平成9年2月27日(1997.2.27)
(65) 公表番号	特表2000-506724 (P2000-506724A)
(43) 公表日	平成12年6月6日(2000.6.6)
(86) 國際出願番号	PCT/US1997/003313
(87) 國際公開番号	W01997/032011
(87) 國際公開日	平成9年9月4日(1997.9.4)
審査請求日	平成16年2月25日(2004.2.25)
(31) 優先権主張番号	60/012,705
(32) 優先日	平成8年2月28日(1996.2.28)
(33) 優先権主張国	米国(US)
(31) 優先権主張番号	60/013,612
(32) 優先日	平成8年2月28日(1996.2.28)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	シンジェンタ パーティシペーションズ アクチエンゲゼルシャフト イスラエル、ツエーハー・4058 バーゼル、シュバルツバールトアレー 215
(74) 代理人	弁理士 石田 敏
(74) 代理人	弁理士 鶴田 準一
(74) 代理人	弁理士 福本 積
(74) 代理人	弁理士 中村 和広
(74) 代理人	弁理士 渡邊 陽一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】植物プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼをコードするDNA分子およびその阻害物質耐性突然変異体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

修飾されたプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ(protox)をコードする領域を含むDNA分子であって、未修飾のprotoxは配列番号：2に示すアミノ酸配列を有する植物protoxであり、当該修飾は第1アミノ酸置換および第2アミノ酸置換からなり、

前記第1アミノ酸置換がprotox阻害物質に対する耐性を付与する特性を有し、

前記第2アミノ酸置換が前記第1アミノ酸置換により付与された前記耐性を増強する特性を有し、

前記第1アミノ酸置換が、配列番号：2のアミノ酸位置426位に対応する位置に存在するチロシンのメチオニンによる置換であり、そして

前記第2アミノ酸置換が、配列番号：2のアミノ酸位置305位に存在するセリンのロイシンによる置換である、

ことを特徴とするDNA分子。

【請求項2】

プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ阻害性除草剤に対して寛容であるか又は耐性である植物の製造方法において、

i. 請求項1に記載のDNAにより植物材料を形質転換し、

ii. 前記形質転換された植物材料を選択し、そして

iii. 前記形質転換された植物材料を、形態的に正常な、繁殖可能な、全体植物体に再生する、

ことを含んで成る方法。

【請求項 3】

望ましくない植生の成長を抑制する方法であって、請求項2に記載の方法により得られた植物及び望ましくない植生に、プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ阻害性除草剤を、前記不所望の植生の成長を抑制するのに適当な量で適用することを含んで成る方法。

【発明の詳細な説明】

発明の分野

本発明は一般に、植物酵素プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ（「protox」）に関する。本発明は特に、この酵素をコードするDNA分子およびこの酵素の阻害物質耐性修飾体に関する。本発明はさらに、これらの修飾体に基づく組織培養選択法および除草剤適用法に関する。

10

発明の背景

I. Protox酵素およびそのクロロフィル/ヘム生合成経路への関与

クロロフィルおよびヘムを産生する各生合成経路は、共通する多くの段階を共有している。クロロフィルは、すべての緑色光合成生物の中にある、光を取り入れる色素である。ヘムは、ヘモグロビン、チトクロム、P450混合機能オキシゲナーゼ、ペルオキシダーゼおよびカタラーゼの補助因子であり（例えばLehninger, 「Biochemistry」Worth Publishers, ニューヨーク（1975年）参照）、従つてすべての好気性生物にとって必要な成分である。

クロロフィルおよびヘムの生合成の最終共通段階はプロトポルフィリノーゲンIXのプロトポルフィリンIXへの酸化である。プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ（本明細書では「protox」と呼ぶ）はこの最終の酸化段階を触媒する酵素である（Matinge等, Biochem J. 260: 231 (1989年)）。

20

protox酵素は、酵母サッカロミセス・セレビジエ（E. H. Dailey編「Biosynthesis of Heme and Chlorophyll」マグローヒル：ニューヨーク, 235~285 (1990年)に収載のLabbe-BoisおよびLabbeによる章）、大麦エチオプラスト（etioplast）（JacobsおよびJacobs, Biochem J. 244: 219 (1987年)）およびマウス肝臓（DaileyおよびKarr, Biochem 26: 2697 (1987年)）を含む多くの生体から部分精製または完全精製された。大腸菌（Sasarmann等, Cancer Microbiol. 39: 1155 (1993年)）および枯草菌（Dailey等, J. Biol. Chem. 269: 813 (1994年)）の2種類の原核生物からprotoxをコードする遺伝子を単離した。これらの遺伝子には配列類似性がなく、その予想される蛋白生成物にもアミノ酸配列同一性が全くない。この大腸菌蛋白はおよそ21kDaであり、細胞膜に付随している。枯草菌蛋白は51kDaであり、可溶な細胞質活性体である。

30

また、ヒト（Nishimuraら, J. Biol. Chem. 270 (14) 8076~8080 (1995) 参照）および植物（1995年12月21日に出願され、1995年6月8日にWO95/34659として公開された国際出願第PCT/IB95/00452号）からもProtoxをコードする遺伝子が単離された。

40

II. 除草剤の標的としてのProtox遺伝子

作物に紛れ込んだ雑草や植物などの望ましくない植生を防除するために除草剤を使用することは、ほとんど普遍的な慣行となっている。関連市場は年間10億ドルを超える。この広範な使用にもかかわらず、雑草防除は農業従事者にとって重大かつ費用がかかる問題のまま残されている。

除草剤を有效地に使用するには、しっかりした管理が要求される。例えば、適用の時期および方法と雑草植物発育の段階は、除草剤による十分な雑草防除を行なうには極めて重要である。様々な雑草種が除草剤に耐性であるため、有効な除草剤を作り出すことがますます重要となっている。

残念ながら、土壤中で比較的強い効力と広い雑草スペクトルと速い分解速度を示す除草剤

50

はまた、作物に対しても比較的強い植物毒性を持ち得る。この問題に対処する一解決策は、除草剤に対して耐性または許容性の作物を開発することである。作物を除草剤耐性の雑種または品種にすると、作物損傷の危険を伴わずに除草剤を使用することが可能になる。耐性を高くすると、それまでは作物の除草剤への感受性のため、使用できなかつたり使用が制限（例えば雑草発芽前の使用に、など）されていた、除草剤の作物への適用が可能となる。例えば、Anderson他の米国特許第4,761,373号は、種々のイミダゾリノンまたはスルホンアミド除草剤に対して耐性の植物に関するものである。この耐性は、変更アセトヒドロキシ酸シンターゼ（A H A S）酵素によって付与される。Goodman他の米国特許第4,975,374号は、グルタミンシンセターゼ（G S）を阻害することが知られている除草剤、例えばホスフィノトリシン、メチオニンスルホキシミンなどによる阻害に対して耐性の突然変異体G Sをコードする遺伝子を含む植物細胞および植物に関するものである。Bedbrook他の米国特許第5,013,659号は、植物をスルホニル尿素除草剤による阻害に対して耐性にする突然変異体アセト乳酸シンターゼを発現する植物に関するものである。Somers他の米国特許第5,162,602号は、シクロヘキサンジオンおよびアリールオキシフェノキシプロパン酸の各除草剤による阻害に許容性の植物を開示している。この許容性は、変更アセチル補酵素Aカルボキシル化酵素（A C C a s e）により付与される。

protox酵素は様々な除草化合物の標的の役割を果たす。protoxを阻害する除草剤には、多種多様な構造をもつ分子が含まれる（Duke等, Weed Sci. 39: 465 (1991年) ; Nandihalli等, Pesticide Biochem. Physiol. 43: 193 (1992年) ; Matringe等, FEBS Lett. 245: 35 (1989年) ; YanaseおよびAndoh, Pesticide Biochem. Physiol. 35: 70 (1989年)）。このような除草化合物としては、ジフェニルエーテル{（例えばアシフルオルフェン、即ち5-[2-クロロ-4-(トリフルオロメチル)フェノキシ]2-ニトロbezoxic acid；そのメチルエステル；あるいはオキシフルオルフェン、即ち2-クロロ-1-(3-エトキシ-4-ニトロフェノキシ)-4-(トリフルオロベンゼン)；（オキシジアゾール（例えばオキシジアゾン、即ち3-[2,4-ジクロロ-5-(1-メチルエトキシ)フェニル]-5-(1,1-ジメチルエチル)-1,3,4-オキサジアゾール-2-(3H)-オノン）、環状イミド（例えばS-23142、即ちN-(4-クロロ-2-フルオロ-5-プロパルギルオキシフェニル)-3,4,5,6-テトラヒドロタルイミド；クロロフタリム、即ちN-(4-クロロフェニル-3,4,5,6-テトラヒドロタルイミド）、フェニルピラゾール、（例えばTNPP-エチル、即ちエチル2-[1-(2,3,4-トリクロロフェニル)-4-ニトロピラゾリル-5-オキシ]プロピオネート；M&B 39279）、ピリジン誘導体（例えばLS82-556）、フェノピレートとそのO-フェニルピロリジノ-およびピペリジノカルバメート類似体などがある。これらの化合物の多くは、酵素により触媒される通常の反応を競争的に阻害して、見かけ上、基質類似体の役割を果たす。

典型的には、protoxに対する阻害的影響は約395乃至410nmで励起した後に約622乃至635nmで蛍光測定することによって測定される（例えばJacobsおよびJacobs, Enzyme 28: 206 (1982年) ; Sherman等, Plant Physiol. 97: 280 (1991年) 参照）。この測定法は、プロトポルフィリンIXは蛍光色素であるがプロトポルフィリノーゲンIXは蛍光性ではないという事実に基づいている。

予想されるprotox阻害性除草剤の作用機序には、葉緑体中のプロトポルフィリノーゲンIXの蓄積が関与している。この蓄積は、ペルオキシダーゼ活性によってプロトポルフィリノーゲンIXに酸化されるとプロトポルフィリンIXの細胞質ゾルへの漏出をもたらすと考えられる。プロトポルフィリンIXは、露光すると細胞質ゾル中に一重項酸素を生成し得る。一重項酸素により他の反応性酸素種が生成し、それにより脂質の過酸化と細胞膜の破壊が引き起こされ、迅速な細胞死がもたらされ得る（Lee等, Plant

10

20

30

40

50

Physiol. 102: 881 (1993年)。

すべてのprotox酵素が植物protox酵素を阻害する除草剤に感受性であるわけではない。大腸菌 (Sasarman等, Can. J. Microbiol. 39: 1155 (1993年)) および枯草菌 (Dailey等, J. Biol. Chem. 269: 813 (1994年)) から単離された遺伝子によってコードされるprotox酵素は両方とも、これらの除草効果のある阻害物質に耐性である。さらに、フェニルイミド除草剤 S-23142 に耐性の単細胞の藻類 *Chlamydomonas reinhardtii* の突然変異体が報告されている (Kataoka等, J. Pesticide Sci. 15: 449 (1990年); N. Murata編「Research in Photosynthesis」(第III巻), Kluwer:オランダ, 567~570 (1992年) 収載の Shibata 他の章)。これらの突然変異体の少なくとも 1 つは、突然変異体の選択基準とした除草効果のある阻害物質だけでなく、他の種類の protox 阻害物質に対しても耐性の修飾 protox 活性を持つらしい (Oshio等, Z. Naturforsch. 48c: 339 (1993年); S. Duke編「ACS Symposium on Porphyric Pesticides」, ACS Press:ワシントン (1994年) 収載の Sato 他の章)。また、阻害物質 S-21432 に耐性の突然変異体タバコ細胞株も報告されている (Che等, Z. Naturforsch. 48c: 350 (1993年))。

発明の概要

本発明は、コムギ、ダイズ、ワタ、テンサイ、ナタネ、イネおよびモロコシ (sorghum) 由来のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (protox) 酵素をコードする単離 DNA 分子およびキメラ遺伝子を提供する。このような単離 DNA 分子の配列を配列番号: 9 (コムギ)、11 (ダイズ)、15 (ワタ)、17 (テンサイ)、19 (ナタネ)、21 (イネ) および 23 (モロコシ) に示す。

本発明はまた、非修飾天然植物 protox 酵素を阻害する化合物に耐性の植物プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (protox) 酵素修飾体および、このような阻害物質耐性の植物 protox 酵素をコードする DNA 分子とを提供する。本発明は、植物中に阻害物質耐性の植物 protox 酵素を発現し得るキメラ遺伝子および天然 protox 遺伝子変更体を含む。

阻害物質耐性の植物 protox 酵素をコードする遺伝子は、protox 阻害除草剤に対する耐性を植物全体に付与するために使用することができ、また植物細胞形質転換方法の中の選択マーカーとして使用し得る。従って本発明は、これらの修飾 protox 酵素をコードする、発現可能な遺伝子を含む、植物並びにその子孫、植物組織および植物種子を含む。これらの植物、植物組織および植物種子は、通常は植物中の天然 protox 活性を阻害する量の protox 阻害物質に対して耐性である。特に本発明に含まれる植物としては、protox 阻害性除草剤の潜在的な標的となるもの、具体的にはトウモロコシをはじめ、大麦、コムギ、モロコシ、ライ麦、エンバク、芝生および飼草、キビおよびイネなどの他の穀類作物など、農業経済学上重要な作物がある。また、サトウキビ、ダイズ、ワタ、テンサイ、脂肪種子ナタネおよびタバコなどの他の作物も含まれる。

本発明はさらに、本発明の方法によって予め形質転換された遺伝子組み換え植物あるいはそれらの子孫を起源とする、例えば植物組織、プロトプラスト、細胞、カルス、器官、植物種子、胚芽、花粉、卵細胞、接合子などの植物材料、並びに他の繁殖する材料および植物の一部、例えば花、茎、実、葉、根などを含む、本明細書に提供する植物 protox 酵素の阻害物質耐性体を產生する植物の作出方法に関する。このような植物は、耐性 protox をコードする構造遺伝子により安定して形質転換されるか直接選択技術によって作られ、それによって除草剤耐性株が単離され、特徴が明らかにされ、育成される。さらに、本発明は植物葉緑体内部に protox 遺伝子を発現するための生活組織形成形質転換技術の使用を含む。

本発明はさらに、植物 protox 酵素の阻害物質耐性体をコードする遺伝子の存在を検出し、植物組織中の阻害物質耐性の protox 複写物量を定量するためのプローブおよ

び方法に関する。これらの方は、植物 *protox* 酵素の阻害物質耐性体をコードする遺伝子を含み、かつ／または発現する植物または植物組織を識別またはスクリーンするために使用される。

配列表の説明

配列番号：1：アラビドブシス・タリアナ (*Arabidopsis thaliana*) *protox*-1蛋白配列をコードするDNA

配列番号：2：配列番号：1によってコードされるアラビドブシス *protox*-1アミノ酸配列

配列番号：3：アラビドブシス・タリアナ *protox*-2蛋白配列をコードするDNA

配列番号：4：配列番号：3によってコードされるアラビドブシス *protox*-2アミノ酸配列 10

配列番号：5：トウモロコシ *protox*-1蛋白配列をコードするDNA

配列番号：6：配列番号：5によってコードされるトウモロコシ *protox*-1アミノ酸配列

配列番号：7：トウモロコシ *protox*-2蛋白配列をコードするDNA

配列番号：8：配列番号：7によってコードされるトウモロコシ *protox*-2アミノ酸配列

配列番号：9：コムギ *protox*-1蛋白配列をコードするDNA

配列番号：10：配列番号：9によってコードされるコムギ *protox*-1アミノ酸配列 20

配列番号：11：ダイズ *protox*-1蛋白配列をコードするDNA

配列番号：12：配列番号：11によってコードされるダイズ *protox*-1蛋白

配列番号：13：アラビドブシス・タリアナ *protox*-1遺伝子由来のプロモーター配列

配列番号：14：トウモロコシ *protox*-1遺伝子由来のプロモーター配列

配列番号：15：ワタ *protox*-1蛋白配列をコードするDNA

配列番号：16：配列番号：15によってコードされるワタ *protox*-1アミノ酸配列

配列番号：17：テンサイ *protox*-1蛋白配列をコードするDNA

配列番号：18：配列番号：17によってコードされるテンサイ *protox*-1アミノ酸配列 30

配列番号：19：ナタネ *protox*-1蛋白配列をコードするDNA

配列番号：20：配列番号：19によってコードされるナタネ *protox*-1アミノ酸配列

配列番号：21：イネ *protox*-1蛋白配列をコードするDNA

配列番号：22：配列番号：21によってコードされるイネ *protox*-1アミノ酸配列

配列番号：23：モロコシ *protox*-1蛋白配列をコードするDNA

配列番号：24：配列番号：23によってコードされるモロコシ *protox*-1アミノ酸配列 40

配列番号：25：トウモロコシ *protox*-1イントロン配列

配列番号：26：テンサイ *protox*-1遺伝子由来のプロモーター配列

配列番号：27：P c 1 p __ P 1 a - 色素体 c 1 p P 遺伝子プロモータートップストラップ P C R プライマー

配列番号：28：P c 1 p __ P 1 b - 色素体 c 1 p P 遺伝子プロモーターボトムストラップ P C R プライマー

配列番号：29：P c 1 p __ P 2 b - 色素体 c 1 p P 遺伝子プロモーターボトムストラップ P C R プライマー

配列番号：30：T r p s 1 6 __ P 1 a - 色素体 r p s 1 6 遺伝子トップストラップ P C R プライマー 50

配列番号：31：T r p s 1 6 _ p 1 b - 色素体 r p s 1 6 遺伝子ボトムストランド P C R プライマー

配列番号：32：m i n p s b _ U - プラスチックの p s b A 遺伝子トップストランド P C R プライマー

配列番号：33：m i n p s b _ L - 色素体 p s b A 遺伝子ボトムストランド P C R プライマー

配列番号：34：A P R T X P 1 a - トップストランド P C R プライマー

配列番号：35：A P R T X P 1 b - ボトムストランド P C R プライマー

寄託

下記のベクター分子を以下に示す年月日に米国農業研究部特許培養株保管所北部地域研究センター（N R R L ）（米国イリノイ州ピオリア、ノースユニバーシティーストリート1815）に寄託した。 10

p B l u e s c r i p t SKベクター中のコムギ P r o t o x - 1 a を 1 9 9 6 年 3 月 1 9 日に p W D C - 1 3 (N R R L # B 2 1 5 4 5) として寄託した。

p B l u e s c r i p t SKベクター中のダイズ P r o t o x (S o y b e a n P r o t o x) - 1 を 1 9 9 5 年 1 2 月 1 5 日に p W D C - 1 2 (N R R L # B 2 1 5 1 6) として寄託した。

p B l u e s c r i p t SKベクター中のワタ P r o t o x (C o t t o n P r o t o x) - 1 を 1 9 9 6 年 7 月 1 日に p W D C 1 5 (N R R L # B - 2 1 5 9 4) として寄託した。

p B l u e s c r i p t SKベクター中のテンサイ P r o t o x - 1 を 1 9 9 6 年 7 月 2 9 日に p W D C - 1 6 (N R R L # B 2 1 5 9 5 N) として寄託した。 20

p B l u e s c r i p t SKベクター中のナタネ P r o t o x (R a p e P r o t o x) - 1 を 1 9 9 6 年 8 月 2 3 日に p W D C - 1 7 (N R R L # B - 2 1 6 1 5) として寄託した。

p B l u e s c r i p t SKベクター中のイネ P r o t o x (R i c e P r o t o x) - 1 を 1 9 9 6 年 1 2 月 6 日に p W D C - 1 8 (N R R L # B - 2 1 6 4 8) として寄託した。

p B l u e s c r i p t SKベクター中のモロコシ P r o t o x (S o r g h u m P r o t o x) - 1 を 1 9 9 6 年 1 2 月 6 日に p W D C - 1 9 (N R R L # B 2 1 6 4 9) として寄託した。 30

p M u t - 1 プラスミド中の耐性突然変異体 p A r a C - 2 C y s を 1 9 9 4 年 1 1 月 1 4 日に p W D C - 7 の名称で A g r i c u l t u r a l R e s e a r c h C u l t u r e C o l l e c t i o n に寄託し、寄託名称 N R R L # 2 1 3 3 9 N が与えられた。 アラビドブシス P r o t o x - 1 プロモーターを含む A r a P T 1 P r o を 1 9 9 5 年 1 2 月 1 5 日に p W D C - 1 1 (N R R L # B - 2 1 5 1 5) として寄託した。

トウモロコシ P r o t o x - 1 プロモーターをトウモロコシ P r o t o x - 1 コード配列の残りの部分と融合させたものを含むプラスミドを 1 9 9 6 年 3 月 1 9 日に p W D C - 1 4 (N R R L # B 2 1 5 4 6) として寄託した。

テンサイ P r o t o x - 1 プロモーターを含むプラスミドを 1 9 9 6 年 1 2 月 6 日に p W D C - 2 0 (N R R L # B - 2 1 6 5 0) として寄託した。 40

発明の詳細な説明

1. 植物 P r o t o x コード配列

一態様では、本発明はプロトポルフィリノーゲン I X のプロトポルフィリン I X への酸化を触媒する、コムギ、ダイズ、ワタ、テンサイ、ナタネ、イネおよびモロコシ由来の酵素であるプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ（本明細書では「 p r o t o x 」と称する）をコードする単離 D N A 分子に関する。

コムギ p r o t o x 酵素の D N A コード配列および相当するアミノ酸配列をそれぞれ配列番号：9 および 10 として提供する。ダイズ p r o t o x 酵素の D N A コード配列および相当するアミノ酸配列をそれぞれ配列番号：11 および 12 として提供する。ワタ p r o t o x 酵素の D N A コード配列および相当するアミノ酸配列をそれぞれ配列番号：15 お 50

および 16 として提供する。テンサイ *protox* 酵素の DNA コード配列および相当するアミノ酸配列をそれぞれ配列番号：17 および 18 として提供する。ナタネ *protox* 酵素の DNA コード配列および相当するアミノ酸配列をそれぞれ配列番号：19 および 20 として提供する。イネ *protox* 酵素の DNA コード配列および相当するアミノ酸配列をそれぞれ配列番号：21 および 22 として提供する。モロコシ *protox* 酵素の DNA コード配列および相当するアミノ酸配列をそれぞれ配列番号：23 および 24 として提供する。

以前に単離したアラビドプシス・タリアナおよびトウモロコシ由来の *protox* 酵素の DNA コード配列および相当するアミノ酸配列を本明細書では配列番号：1～4（アラビドプシス）および配列番号：5～8（トウモロコシ）として再掲する。 10

従って、本発明は第1に、コムギ *protox* 酵素、ダイズ *protox* 酵素、ワタ *protox* 酵素、テンサイ *protox* 酵素、ナタネ *protox* 酵素、イネ *protox* 酵素およびモロコシ *protox* 酵素から成る群から選択される真核生物 *protox* を含むプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ（*protox*）をコードする DNA 分子に関する。

本発明の範囲内で好ましいのは、双子葉植物の植物由来のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ（*protox*）酵素をコードする単離 DNA 分子、特に配列番号：11、15、17 および 19 に示したものなどの、ダイズ植物、ワタ植物、テンサイ植物およびナタネ植物由来の単離 DNA 分子である。より好ましいのは、配列番号：11 に示したダイズと配列番号：17 に示したテンサイ由来のものなどのプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ（*protox*）酵素をコードする単離 DNA 分子である。 20

また、好ましいのは单子葉植物由来のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ（*protox*）酵素をコードする単離 DNA 分子、特に配列番号：9、21 および 23 に示したものなどの、コムギ植物、イネ植物およびモロコシ植物由来の単離 DNA 分子である。より好ましいのは、配列番号：9 に示したものなどの、コムギ由来のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ（*protox*）酵素をコードする単離 DNA 分子である。

別の態様では、本発明は双子葉植物由来のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ（*protox*）酵素蛋白質をコードする単離 DNA 分子であって、前記蛋白が配列番号：12、16、18 および 20 から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む単離 DNA 分子に関する。さらに含まれるのは、单子葉植物由来のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ（*protox*）酵素蛋白質をコードする単離 DNA 分子であって、前記蛋白が配列番号：10、22 および 24 から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む単離 DNA 分子である。より好ましいのは、プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ（*protox*）酵素をコードする単離 DNA 分子であって、前記蛋白が配列番号：10 に示したコムギ由来のアミノ酸配列を含む単離された DNA 分子である。より好ましいのは、プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ（*protox*）酵素をコードする単離 DNA 分子であって、前記蛋白が配列番号：12 に示したダイズおよび配列番号：18 に示したテンサイ由来のアミノ酸配列を含む単離 DNA 分子である。 30

本発明によって提供される情報を使用すると、標準の方法を使用して、任意の真核生物由来のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ（*protox*）酵素の配列をコードする DNA が得られる。 40

別の態様では、本発明はコムギ *protox* 酵素をコードし、

(a) 7% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、0.5M NaPO₄ pH 7.0、1 mM EDTA、50 でハイブリダイゼーション

(b) 2 倍濃度 SSC、1% SDS、50 で洗浄

のハイブリダイゼーション条件および洗浄条件下で配列番号：9 のヌクレオチド配列とハイブリダイズするヌクレオチド配列を有する単離 DNA 分子に関する。

別の態様では、本発明はダイズ *protox* 酵素をコードし、

(a) 7% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、0.5M NaPO₄ pH 7.0、1 mM EDTA、50 でハイブリダイゼーション

(b) 2倍濃度SSC、1%SDS、50で洗浄

のハイブリダイゼーション条件および洗浄条件下で配列番号：11のヌクレオチド配列とハイブリダイズするヌクレオチド配列を有する単離DNA分子に関する。

別の態様では、本発明はワタprotox酵素をコードし、

(a) 7%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、0.5M NaPO₄pH 7.0、1mM EDTA、50でハイブリダイゼーション

(b) 2倍濃度SSC、1%SDS、50で洗浄

のハイブリダイゼーション条件および洗浄条件下で配列番号：15のヌクレオチド配列とハイブリダイズするヌクレオチド配列を有する単離DNA分子に関する。

別の態様では、テンサイprotox酵素をコードし、下記のハイブリダイゼーション条件および洗浄条件下で配列番号：17のヌクレオチド配列とハイブリダイズするヌクレオチド配列を有する単離DNA分子に本発明に関する：

(a) 7%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、0.5M NaPO₄pH 7.0、1mM EDTA、50でハイブリダイゼーション

(b) 2倍濃度SSC、1%SDS、50で洗浄

別の態様では、ナタネprotox酵素をコードし、下記のハイブリダイゼーション条件および洗浄条件下で配列番号：19のヌクレオチド配列とハイブリダイズするヌクレオチド配列を有する単離DNA分子に本発明に関する：

(a) 7%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、0.5M NaPO₄pH 7.0、1mM EDTA、50でハイブリダイゼーション

(b) 2倍濃度SSC、1%SDS、50で洗浄

別の態様では、イネprotox酵素をコードし、下記のハイブリダイゼーション条件および洗浄条件下で配列番号：21のヌクレオチド配列とハイブリダイズするヌクレオチド配列を有する単離DNA分子に本発明に関する：

(a) 7%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、0.5M NaPO₄pH 7.0、1mM EDTA、50でハイブリダイゼーション

(b) 2倍濃度SSC、1%SDS、50で洗浄

別の態様では、モロコシprotox酵素をコードし、下記のハイブリダイゼーション条件および洗浄条件下で配列番号：23のヌクレオチド配列とハイブリダイズするヌクレオチド配列を有する単離DNA分子に本発明に関する：

(a) 7%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、0.5M NaPO₄pH 7.0、1mM EDTA、50でハイブリダイゼーション

(b) 2倍濃度SSC、1%SDS、50で洗浄

本発明の教示による単離真核生物protox配列は、任意の所望の目的に適する標準の遺伝子工学技術によって操作される。例えば、protox配列全体あるいはその一部は、protoxをコードする配列およびメッセンジャーRNAと特異的にハイブリダイズし得るプローブとして使用する。様々な条件下で特異的ハイブリダイゼーションを達成するため、このようなプローブには、protoxをコードする配列中で独特であり、好ましくは長さが少なくとも10ヌクレオチド、最も好ましくは長さが少なくとも20のヌクレオチドの配列が含まれる。このようなプローブは、選択した生体由来のprotoxをコードする配列を有名なポリメラーゼチェインリアクション(PCR)法を介して増幅、分析するために使用し得る。この技術は、所望の生体からさらにprotoxコード配列を単離するのに有用であり、あるいは生体中のprotoxをコードする配列の存在を判定する診断分析としても有用であろう。

ハイブリッドの安定に影響する要因は、ハイブリダイゼーションの厳密性を決定する。このような要因の1つは融解温度T_mであり、これはGeorge H. KellerおよびMark M. Manak著「DNA PROBES」Macmillan Publishers社(1993年)の第1章「Molecular Hybridization Technology」8ページ以下に提供される公式によって容易に計算し得る。好ましいハイブリダイゼーション温度は、融解温度の計算値T_mより約25下の範囲

10

20

30

40

50

内であり、好ましくは融解温度の計算値 T_m より約 12 ~ 15 下の範囲内であり、オリゴヌクレオチドの場合は融解温度 T_m より約 5 ~ 10 下の範囲内である。

本発明に含まれるのは、上文に定義した、本発明によるDNA分子とハイブリダイズするDNA分子であるが、好ましくは穏和なストリンジエント条件下で前記DNA分子から入手できる、前記プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ(*protox*)酵素配列の、長さが少なくとも 10 ヌクレオチドの近接部分を含むオリゴヌクレオチドプローブである。本発明はさらに、長さが少なくとも 10 ヌクレオチドの植物 *protox* 遺伝子、あるいはmRNAと特異的にハイブリダイズし得るヌクレオチドプローブの、ポリメラーゼチェインリアクション(PCR)での使用を実施する。

さらに一実施態様では、本発明は、プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ活性をコードする真核生物のDNA配列あるいはそれぞれのmRNAと特異的にハイブリダイズし得るプローブと、本発明によるプローブを使用して真核生物の前記DNA配列を検出する方法とを提供する。

また、ゲノム *protox* 配列の選択的ハイブリダイゼーションに基づいた標準の技術を使用して、選択した生体のゲノム中の天然真核生物 *protox* 遺伝子の位置をマッピングするために *protox* 特異的ハイブリダイゼーションプローブを使用してもよい。これらの技術には、 *protox* プローブ配列内に確認または包含されるDNA多形の確認と、2種類の多形親株雑種の自家受精から得られる *protox* 遺伝子の、他の既知の遺伝子マッピング集団地図位置マーカーを基準とした分離の追跡への、このような多形の使用が含まれるが、これらに限定されない(例えば *Helentjaris* 等, Plant 20 Mol. Biol. 5: 109 (1985 年) . Sommer 等, Biotechniques 12: 82 (1992 年) ; D' Ovidio 等, Plant Mol. Biol. 15: 169 (1990 年) 参照)。

任意の真核生物由来の *protox* 遺伝子をマッピングするためのプローブとしていかなる真核生物の *protox* 配列も有用と考えられる一方で、好ましいプローブは選択した生体とより密接な関係がある生体由来の *protox* 配列であり、最も好ましいプローブは選択した生体由来の *protox* 配列である。このような方法の *protox* 遺伝子のマッピングは植物での育種の目的に特に有用と考えられる。例えば、除草剤耐性を付与する突然変異体 *protox* 遺伝子の遺伝地図位置を知ることによって、参照遺伝地図から隣接するDNAマーカーを識別し得る(例えば *Helentjaris* , Trends Genet 3: 217 (1987 年) 参照)。新しい育種株の中へ除草剤耐性形質を遺伝子移入する間に、戻し交配の各回後に再生する親の中に依然として存在する、 *protox* で結合された隣接染色体DNAの程度をモニターするためにこれらのマーカーを使用し得る。

また、ノーザンプロット分析などの標準の技術を用いて生体中の *protox* mRNA量を定量するために *protox* 特異性のハイブリダイゼーションプローブを使用してもよい。この技術は、神経精神病の徵候および皮膚傷害の両方を特徴とし、 *protox* 活性レベル低下と関係のある、ヒト常染色体優性障害などの特定有害状態に関係する *protox* 発現レベル変化を検出するための診断的測定法として有用であろう(Brenner および Bloomer (New Engl. J. Med. 302: 765 (1980 年))。

本発明のさらなる実施態様は、プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ(*protox*)酵素活性を有する蛋白質をコードするDNA部分を含むDNA分子を産生する方法であつて、

(a) 植物 *protox* 遺伝子またはmRNAと特異的にハイブリダイズし得るヌクレオチドプローブを調製する段階であつて、前記プローブが長さ少なくとも 10 ヌクレオチドの植物由来 *protox* 蛋白をコードする配列の近接部分を含む段階と、

(b) 段階(a)によって調製されたヌクレオチド・プローブを使用して、選択した生体由来のクローン化されたゲノムDNA断片またはゲノムcDNA断片の集団中の他の *protox* コード配列をプローブで探る段階と、

(c) プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ(*protox*)の酵素活性を有する蛋白 50

質をコードするDNA部分を含むDNA分子を単離、増幅する段階とを含む方法である。本発明のさらなる実施態様は、プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ(protox)酵素活性を有する蛋白質をコードするDNA部分を含む、任意の植物からDNA分子を単離する方法であって、

(a) 植物protox遺伝子またはmRNAと特異的にハイブリダイズし得るヌクレオチドプローブを調製する段階であって、前記プローブが長さ少なくとも10ヌクレオチドの植物由来protox蛋白をコードする配列の近接部分を含む段階と、

(b) 段階(a)によって調製されたヌクレオチド・プローブを使用して、選択した生体由来のクローン化されたゲノムDNA断片またはゲノムcDNA断片の集団中の他のprotoxコード配列をプローブで探る段階と、

(c) プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ(protox)の酵素活性を有する蛋白質をコードするDNA部分を含むDNA分子を単離、増幅する段階とを含む方法である。本発明はさらに、プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ(protox)酵素活性を示す蛋白質をコードする、ほぼ純粋なDNA配列を作成する方法であって、

(a) 適切なクローニング・ベクターを使用して適当な原料生体からゲノムライブラリーまたはcDNAライブラリーを調製する段階と、

(b) プローブ分子を備えたライブラリーをハイブリダイズする段階と、

(c) ライブラリーからのDNAクローンに対するプローブのポジティブハイブリダイゼーションを識別する段階であって、クローンがプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ(protox)のアミノ酸配列に相当するヌクレオチド配列を含む可能性がある段階とを含む方法を含む。

本発明はさらに、プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ(protox)酵素活性(方法はそれを含む)を示す蛋白質をコードするほぼ純粋なDNA配列を作成する方法であって、

(a) ゲノムライブラリーまたはcDNAライブラリーからDNA全体を調製する段階と、

(b) プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ(protox)のアミノ酸配列の低縮重部分を示すプライマーによるPCR反応のテンプレートとして段階(a)のDNAを使用する段階と

を含む方法を含む。

本発明のさらなる目的は、プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ(protox)酵素活性の阻害物質を識別する測定法であって、

(a) プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ(protox)およびその基質の最初の試料をインキュベートする段階と、

(b) 段階(a)からのプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ(protox)の阻害されていない反応性を測定する段階と、

(c) プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ(protox)の最初の試料およびその基質を、阻害物質化合物を含む別の試料がある状態でインキュベートする段階と、

(d) 段階(c)からのプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ(protox)酵素の阻害された反応性を測定する段階と、

(e) プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ(protox)酵素の阻害されていない反応性と阻害された反応性とを比較する段階と、

を含む測定法である。

本発明のさらなる目的は、阻害物質耐性のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ(protox)突然変異体を識別する測定法であって、

(a) プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ(protox)酵素の最初の試料およびその基質を、プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ(protox)酵素阻害物質を含む別の試料がある状態でインキュベートする段階と、

(b) 段階(a)由来のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ(protox)酵素の変異させていない反応性を測定する段階と、

10

20

30

40

50

(c) プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (protox) 酵素阻害物質を含む別の試料がある状態で、変異プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (protox) 酵素およびその基質の最初の試料をインキュベートする段階と、

(d) 段階 (c) からの変異プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (protox) 酵素の変異反応性を測定する段階と、

(e) プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (protox) 酵素の変異させていない反応性と変異反応性とを比較する段階とを含む測定法である。

本発明のさらなる目的は、本発明による方法によって得られる protox 酵素阻害物質である。

宿主生体で酵素を組換え產生するには、選択した宿主向けに設計し、組換え產生する宿主に導入する発現カセットに protox コード配列を挿入してもよい。プロモーター、シグナル配列、5' 非翻訳配列および 3' 非翻訳配列、エンハンサーなどの特定の調節配列の選択は、当業者の技能水準の範囲内である。得られた分子は適切な読み枠中で連結した個々の要素を含むが、これを宿主細胞で形質転換し得るベクターに挿入する。蛋白質の組換え產生に適した発現ベクターおよび方法は、大腸菌 (例えば Studier および Moffatt, J. Mol. Biol. 189: 113 (1986 年); Brosius, DNA 8: 759 (1989 年) 参照)、酵母 (例えば Schneider および Gaurante, Meth. Enzymol. 194: 373 (1991 年) 参照) および昆虫細胞 (例えば Luckow および Summers, Bio/Technol. 6: 47 (1988 年) 参照) などの宿主生体に対するものがよく知られている。具体例としては、pBluescript (Stratagene, カリフォルニア州ラホーヤ)、pFLAG (International Biotechnologies 社, コネティカット州ニューヘーヴン)、pTrcHis (Invitrogen, カリフォルニア州ラホーヤ)、バキュロウイルス発現ベクターなどのプラスミドなどで、例えば Autographa californica 核多角体病ウイルス (AcMNPV) のゲノム由来のものなどがある。好ましいバキュロウイルス / 昆虫系は pV11392 / Sf21 細胞 (Invitrogen, カリフォルニア州ラホーヤ) である。

組換え產生した真核生物の protox 酵素は、様々な目的に役立つ。例えば、in vitro で protox に酵素の活性を提供するために使用してもよい。また、それを公知の除草薬であって、それらが protox を阻害するかどうか判定するためにその標的を識別していないものをスクリーンする in vitro 測定法で使用してもよい。このような in vitro 測定法はまた、protox 活性を阻害し、従って除草剤候補である化学薬品を識別するために、より一般的なスクリーンとして使用してもよい。組換え產生した真核生物の protox 酵素はまた、阻害物質耐性の protox 突然変異体を識別する測定法で使用してもよい (1995 年 6 月 8 日に出願され、1995 年 12 月 21 日に WO 95/34659 として公開された国際出願第 PCT/IB95/00452 号参照、その全体を参照により本明細書の一部とする)。別法として、酵素の除草剤抗体と共に新しい阻害性除草剤も合理的に設計するために、組換え產生した protox 酵素と公知の阻害物質との関連性の特徴をさらに明らかにするのにその酵素を使用してもよい。

I I . 阻害物質耐性植物 Protox 酵素

別の態様では、本発明は任意の植物プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (本明細書では「protox」と呼ぶ) 酵素のアミノ酸配列になし得る変更であって、この酵素の阻害物質耐性体を得るために変更を教示する。本発明は、本明細書で教示する変更を有する阻害物質耐性の植物 protox 酵素と、この修飾酵素をコードする DNA 分子と、植物中でこの修飾酵素を発現し得る遺伝子に関する。

従って、本発明は少なくとも 1 つのアミノ酸変更を有する、修飾プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (protox) をコードする単離 DNA 分子であって、前記アミノ酸変更が protox 阻害物質に対する耐性を付与する特性を有する、即ち前記修飾 protox が真核生物の protox を阻害する量の前記除草剤に対して耐性である単離 DNA

10

20

20

30

30

40

50

分子に関する。本明細書で使用する「阻害する」とは、対象除草剤存在しない状態で観察される酵素活性レベルと比較したときの、対象除草剤が存在する状態で観察される酵素活性の低下をいい、ここで低下度(%)は好ましくは少なくとも10%であり、より好ましくは少なくとも50%であり、最も好ましくは少なくとも90%である。

好ましいのは、少なくとも1つのアミノ酸変更を有するコムギprotox酵素、ダイズprotox酵素、ワタprotox酵素、テンサイprotox酵素、ナタネprotox酵素、イネprotox酵素およびモロコシprotox酵素から成る群から選択される真核生物のprotoxを含む修飾プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ(protox)をコードするDNA分子であって、前記修飾protoxが天然protox活性を阻害する量の除草剤に対して耐性であるDNA分子である。

また好ましいのは、植物protoxを含む修飾プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ(protox)をコードするDNA分子であって、配列番号：6のアミノ酸159に相当する位置に生じるシステインが別のアミノ酸と置換され、前記修飾protoxが天然protox活性を阻害する量の除草剤に対して耐性のDNA分子である。特に好ましいのは、前記システインがフェニルアラニンまたはリジンと置換された前記DNA分子であり、最も好ましいのは、前記システインがフェニルアラニンと置換された前記DNA分子である。

また好ましいのは、植物protoxを含む修飾プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ(protox)をコードするDNAであって、配列番号：6のアミノ酸419に相当する位置に生じるイソロイシンが別のアミノ酸と置換され、前記修飾protoxが天然protox活性を阻害する量の除草剤に対して耐性のDNAである。

特に好ましいのは、前記イソロイシンがトレオニン、ヒスチジン、グリシンあるいはアスパラギンと置換されたDNA分子であり、最も好ましくは前記イソロイシンがトレオニンと置換されたDNA分子である。

また好ましいのは、植物protoxを含む修飾プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ(protox)をコードするDNA分子であって、配列番号：6のアミノ酸164に相当する位置に生じるアラニンが別のアミノ酸と置換され、前記修飾protoxが天然protox活性を阻害する量の除草剤に対して耐性のDNA分子である。特に好ましいのは、前記アラニンがトレオニン、ロイシンまたはバリンと置換されたDNA分子である。

また好ましいのは、植物protoxを含む修飾プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ(protox)をコードするDNA分子であって、配列番号：6のアミノ酸165に相当する位置に生じるグリシンが別のアミノ酸と置換され、前記修飾protoxが天然protox活性を阻害する量の除草剤に対して耐性のDNA分子である。特に好ましいのは、前記グリシンがセリンまたはロイシンと置換されたDNA分子である。

また好ましいのは、植物protoxを含む修飾プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ(protox)をコードするDNA分子であって、配列番号：6のアミノ酸370に相当する位置に生じるチロシンが別のアミノ酸と置換され、前記修飾protoxが天然protox活性を阻害する量の除草剤に対して耐性のDNA分子である。特に好ましいのは、前記チロシンがイソロイシンまたはメチオニンと置換されたDNA分子である。

また好ましいのは、植物protoxを含む修飾プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ(protox)をコードするDNA分子であって、配列番号：10のアミノ酸356に相当する位置に生じるバリンが別のアミノ酸と置換され、前記修飾protoxが天然protox活性を阻害する量の除草剤に対して耐性のDNA分子である。特に好ましいのは、前記バリンがロイシンと置換されたDNA分子である。

また好ましいのは、植物protoxを含む修飾プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ(protox)をコードするDNA分子であって、配列番号：10のアミノ酸421に相当する位置に生じるセリンが別のアミノ酸と置換され、前記修飾protoxが天然protox活性を阻害する量の除草剤に対して耐性のDNA分子である。特に好ましいのは、前記セリンがプロリンと置換されたDNA分子である。

また好ましいのは、植物protoxを含む修飾プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ

10

20

30

40

50

(protox)をコードするDNA分子であって、配列番号：10のアミノ酸502に相当する位置に生じるバリンが別のアミノ酸と置換され、前記修飾protoxが天然protox活性を阻害する量の除草剤に対して耐性のDNA分子である。特に好ましいのは、前記バリンがアラニンと置換されたDNA分子である。

また好ましいのは、植物protoxを含む修飾プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ(protox)をコードするDNA分子であって、配列番号：10のアミノ酸211に相当する位置に生じるアラニンが別のアミノ酸と置換され、前記修飾protoxが天然protox活性を阻害する量の除草剤に対して耐性のDNA分子である。特に好ましいのは、前記アラニンがバリンまたはトレオニンと置換されたDNA分子である。

また好ましいのは、植物protoxを含む修飾プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ(protox)をコードするDNA分子であって、配列番号：10のアミノ酸212に相当する位置に生じるグリシンが別のアミノ酸と置換され、前記修飾protoxが天然protox活性を阻害する量の除草剤に対して耐性のDNA分子である。特に好ましいのは、前記グリシンがセリンと置換されたDNA分子である。

また好ましいのは、植物protoxを含む修飾プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ(protox)をコードするDNAであって、配列番号：10のアミノ酸466に相当する位置に生じるイソロイシンが別のアミノ酸と置換され、前記修飾protoxが天然protox活性を阻害する量の除草剤に対して耐性のDNA分子である。特に好ましいのは、前記イソロイシンがトレオニンと置換されたDNA分子である。

また好ましいのは、植物protoxを含む修飾プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ(protox)をコードするDNA分子であって、配列番号：12のアミノ酸369に相当する位置に生じるプロリンが別のアミノ酸と置換され、前記修飾protoxが天然protox活性を阻害する量の除草剤に対して耐性のDNA分子である。特に好ましいのは、前記プロリンがセリンまたはヒスチジンと置換されたDNA分子である。

また好ましいのは、植物protoxを含む修飾プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ(protox)をコードするDNA分子であって、配列番号：12のアミノ酸226に相当する位置に生じるアラニンが別のアミノ酸と置換され、前記修飾protoxが天然protox活性を阻害する量の除草剤に対して耐性のDNA分子である。特に好ましいのは、前記アラニンがトレオニンまたはロイシンと置換されたDNA分子である。

また好ましいのは、植物protoxを含む修飾プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ(protox)をコードするDNA分子であって、配列番号：12のアミノ酸517に相当する位置に生じるバリンが別のアミノ酸と置換され、前記修飾protoxが天然protox活性を阻害する量の除草剤に対して耐性のDNA分子である。特に好ましいのは、前記バリンがアラニンと置換されたDNA分子である。

また好ましいのは、植物protoxを含む修飾プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ(protox)をコードするDNA分子であって、配列番号：12のアミノ酸432に相当する位置に生じるチロシンが別のアミノ酸と置換され、前記修飾protoxが天然protox活性を阻害する量の除草剤に対して耐性のDNA分子である。特に好ましいのは、前記チロシンがロイシンまたはイソロイシンと置換されたDNA分子である。

また好ましいのは、植物protoxを含む修飾プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ(protox)をコードするDNA分子であって、配列番号：16のアミノ酸365に相当する位置に生じるプロリンが別のアミノ酸と置換され、前記修飾protoxが天然protox活性を阻害する量の除草剤に対して耐性のDNA分子である。特に好ましいのは、前記プロリンがセリンと置換されたDNA分子である。

また好ましいのは、植物protoxを含む修飾プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ(protox)をコードするDNA分子であって、配列番号：16のアミノ酸428に相当する位置に生じるチロシンが別のアミノ酸と置換され、前記修飾protoxが天然protox活性を阻害する量の除草剤に対して耐性のDNA分子である。特に好ましいのは、前記チロシンがシステインまたはアルギニンと置換されたDNA分子である。

また好ましいのは、植物protoxを含む修飾プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ(protox)をコードするDNA分子であって、配列番号：16のアミノ酸429に相当する位置に生じるチロシンが別のアミノ酸と置換され、前記修飾protoxが天然protox活性を阻害する量の除草剤に対して耐性のDNA分子である。

(protox)をコードするDNAであって、配列番号：18のアミノ酸449に相当する位置に生じるチロシンが別のアミノ酸と置換され、前記修飾protoxが天然protox活性を阻害する量の除草剤に対して耐性のDNA分子である。特に好ましいのは、前記チロシンがシステイン、ロイシン、イソロイシン、バリンまたはメチオニンと置換されたDNA分子である。

本発明はさらに、第1アミノ酸置換および第2アミノ酸置換を有する植物protoxを含む修飾プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ(protox)をコードするDNA分子であって、前記第1アミノ酸置換がprotox阻害物質に対する耐性を付与する特性を有し、前記第2アミノ酸置換が前記第1アミノ酸置換により付与された前記耐性を増強する特性を有するDNA分子に関する。好ましいのは、植物protoxを含む修飾プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ(protox)をコードするDNA分子であって、前記植物がトウモロコシ、コムギ、ダイズ、ワタ、テンサイ、ナタネ、イネ、モロコシおよびアラビドブシスから成る群から選択されるDNA分子である。より好ましいのは、植物protoxを含む修飾プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ(protox)をコードするDNA分子であって、前記植物がトウモロコシ、コムギ、ダイズ、テンサイおよびアラビドブシスから成る群から選択されるDNA分子である。

好ましいのは、前記第2アミノ酸置換が

- (i) 配列番号：2のアミノ酸305のセリンに相当する位置
- (ii) 配列番号：2のアミノ酸249のトレオニンに相当する位置
- (iii) 配列番号：2のアミノ酸118のプロリンに相当する位置
- (iv) 配列番号：2のアミノ酸425のアスパラギンに相当する位置
- (v) 配列番号：2のアミノ酸498のチロシンに相当する位置から成る群から選択される位置で起きるDNA分子である。

また好ましいのは、前記第1アミノ酸置換が

- (a) 配列番号：6のアミノ酸164のアラニンに相当する位置
- (b) 配列番号：6のアミノ酸165のグリシンに相当する位置
- (c) 配列番号：6のアミノ酸370のチロシンに相当する位置
- (d) 配列番号：6のアミノ酸159のシステインに相当する位置
- (e) 配列番号：6のアミノ酸419のイソロイシンに相当する位置
- (f) 配列番号：10のアミノ酸356のバリンに相当する位置
- (g) 配列番号：10のアミノ酸421のセリンに相当する位置
- (h) 配列番号：10のアミノ酸502のバリンに相当する位置
- (i) 配列番号：10のアミノ酸211のアラニンに相当する位置
- (k) 配列番号：10のアミノ酸212のグリシンに相当する位置
- (I) 配列番号：10のアミノ酸466のイソロイシンに相当する位置
- (m) 配列番号：12のアミノ酸369のプロリンに相当する位置
- (n) 配列番号：12のアミノ酸226のアラニンに相当する位置
- (o) 配列番号：12のアミノ酸432のチロシンに相当する位置
- (p) 配列番号：12のアミノ酸517のバリンに相当する位置
- (q) 配列番号：16のアミノ酸428のチロシンに相当する位置
- (r) 配列番号：16のアミノ酸365のプロリンに相当する位置
- (s) 配列番号：18のアミノ酸449のチロシンに相当する位置から成る群から選択される位置で起きるDNA分子である。

特に好ましいのは、植物protoxを含む修飾プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ(protox)をコードするDNA分子であって、植物protoxが配列番号：2、4、6、8、10、12、16、18、20および22から成る群から選択されるアミノ酸配列を含むDNA分子である。最も好ましいのは、植物protoxを含む修飾プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ(protox)をコードするDNA分子であって、植物protoxが配列番号：2、4、6、8、10、12および18から成る群から選択されるアミノ酸配列を含むDNA分子である。

10

20

30

40

50

より好ましいのは、前記第1アミノ酸置換が

- (a) 配列番号：6のアミノ酸164のアラニンに相当する位置
- (b) 配列番号：6のアミノ酸165のグリシンに相当する位置
- (c) 配列番号：6のアミノ酸370のチロシンに相当する位置
- (d) 配列番号：6のアミノ酸159のシステインに相当する位置
- (e) 配列番号：6のアミノ酸419のイソロイシンに相当する位置

から成る群から選択される位置で起きるDNA分子である。

より好ましいのは、前記第2アミノ酸置換が配列番号：2のアミノ酸305のセリンに相当する位置で起き、前記第1アミノ酸置換が

- (a) 配列番号：6のアミノ酸164のアラニンに相当する位置
- (b) 配列番号：6のアミノ酸370のチロシンに相当する位置

から成る群から選択される位置で起きるDNA分子である。

特に好ましいのは、配列番号：2のアミノ酸305に相当する位置に生じる前記セリンがロイシンと置換されたDNA分子である。

より好ましいのは、DNA分子であって、前記第2アミノ酸置換が配列番号：2のアミノ酸249のトレオニンに相当する位置で起き、前記第1アミノ酸置換が

- (a) 配列番号：6のアミノ酸164のアラニンに相当する位置
- (b) 配列番号：6のアミノ酸370のチロシンに相当する位置

から成る群から選択される位置で起きるDNA分子である。

特に好ましいのは、配列番号：2のアミノ酸249に相当する位置に生じる前記トレオニンがイソロイシンとアラニンから成る群から選択されるアミノ酸と置換されたDNAである。

より好ましいのは、前記第2アミノ酸置換が配列番号：2のアミノ酸118のプロリンに相当する位置で起き、前記第1アミノ酸置換が

- (a) 配列番号：6のアミノ酸164のアラニンに相当する位置
- (b) 配列番号：6のアミノ酸370のチロシンに相当する位置

から成る群から選択される位置で起きるDNA分子である。

特に好ましいのは、配列番号：2のアミノ酸118に相当する位置に生じる前記プロリンがロイシンと置換されたDNA分子である。

より好ましいのは、前記第2アミノ酸置換が配列番号：2のアミノ酸425のアスパラギンに相当する位置で起き、前記第1アミノ酸置換が

- (a) 配列番号：6のアミノ酸164のアラニンに相当する位置
- (b) 配列番号：6のアミノ酸370のチロシンに相当する位置

から成る群から選択される位置で起きるDNA分子である。

特に好ましいのは、配列番号：2のアミノ酸425に相当する位置に生じる前記アスパラギンセリンと置換されたDNA分子である。

より好ましいのは、前記第2アミノ酸置換が配列番号：2のアミノ酸498のチロシンに相当する位置で起き、前記第1アミノ酸置換が

- (a) 配列番号：6のアミノ酸164のアラニンに相当する位置
- (b) 配列番号：6のアミノ酸370のチロシンに相当する位置

から成る群から選択される位置で起きるDNA分子である。

特に好ましいのは、配列番号：2のアミノ酸498に相当する位置に存在する前記チロシンがシステインと置換されたDNA分子である。

より好ましいのは、配列番号：6のアミノ酸370に相当する位置に存在する前記チロシンがシステイン、イソロイシン、ロイシン、トレオニン、バリンおよびメチオニンから成る群から選択されるアミノ酸と置換されたDNA分子である。

特に好ましいのは、配列番号：6のアミノ酸370に相当する位置に存在する前記チロシンがシステイン、イソロイシン、ロイシン、トレオニンおよびメチオニンから成る群から選択されるアミノ酸と置換されたDNA分子である。

より好ましいのは、配列番号：6の残基164に相当する位置に存在する前記アラニンが

10

20

30

40

50

バリン、トレオニン、ロイシン、システインおよびチロシンから成る群から選択されるアミノ酸と置換されたDNA分子である。

より好ましいのは、配列番号：6の残基165に相当する位置に存在する前記グリシンがセリンとロイシンから成る群から選択されるアミノ酸と置換されたDNA分子である。

特に好ましいのは、配列番号：6の残基165に相当する位置に存在する前記グリシンがセリンと置換されたDNA分子である。

より好ましいのは、配列番号：6の残基159に相当する位置に存在する前記システインがフェニルアラニンとリシンから成る群から選択されるアミノ酸と置換されたDNA分子である。

特に好ましいのは、配列番号：6の残基159に相当する位置に存在する前記システインがフェニルアラニンと置換されたDNA分子である。 10

より好ましいのは、配列番号：6の残基419に相当する位置に存在する前記イソロイシンがトレオニン、ヒスチジン、グリシンおよびアスパラギンから成る群から選択されるアミノ酸と置換されたDNA分子である。

特に好ましいのは、配列番号：6の残基419に相当する位置に存在する前記イソロイシンがトレオニンと置換されたDNA分子である。

より好ましいのは、配列番号：10の残基356に相当する位置に存在する前記バリンがロイシンと置換されたDNA分子である。 20

より好ましいのは、配列番号：10の残基421に相当する位置に存在する前記セリンがプロリンと置換されたDNA分子である。

より好ましいのは、配列番号：10の残基502に相当する位置に存在する前記バリンがアラニンと置換されたDNA分子である。

より好ましいのは、配列番号：10の残基466に相当する位置に存在する前記イソロイシンがトレオニンと置換されたDNA分子である。

より好ましいのは、配列番号：10の残基212に相当する位置に存在する前記グリシンがセリンと置換されたDNA分子である。

より好ましいのは、配列番号：10の残基211に相当する位置に存在する前記アラニンがバリンまたはトレオニンと置換されたDNA分子である。

より好ましいのは、配列番号：12の残基369に相当する位置に存在する前記プロリンがセリンまたはヒスチジンと置換されたDNA分子である。 30

より好ましいのは、配列番号：12の残基226に相当する位置に存在する前記アラニンがロイシンまたはトレオニンと置換されたDNA分子である。

より好ましいのは、配列番号：12の残基432に相当する位置に存在する前記チロシンがロイシンまたはイソロイシンと置換されたDNA分子である。

より好ましいのは、配列番号：12の残基517に相当する位置に存在する前記バリンがアラニンと置換されたDNA分子である。

より好ましいのは、配列番号：16の残基428に相当する位置に存在する前記チロシンがシステインまたはアルギニンと置換されたDNA分子である。

より好ましいのは、配列番号：16の残基365に相当する位置に存在する前記プロリンがセリンと置換されたDNA分子である。 40

より好ましいのは、配列番号：18の残基449に相当する位置に存在する前記プロリンがロイシン、イソロイシン、バリンおよびメチオニンから成る群から選択されるアミノ酸と置換されたDNA分子である。

本発明は、発現力セットおよび組換えベクターであって、前記発現力セットがプロモーターを必ず含むが、特に本発明による真核生物由来のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ(protox)酵素をコードするDNA分子と作用可能な状態で連結した植物内活性型プロモーターを含む発現力セットおよび組換えベクターに関する。本発明による発現力セットはさらに、前記DNA分子と作用可能な状態で連結したシグナル配列をさらに含んでもよく、前記シグナル配列が前記DNA分子によりコードされる蛋白質を葉緑体またはミトコンドリアにターゲティングし得る。 50

本発明は、プロモーターを必ず含む発現力セットを含むキメラ遺伝子に関し、特に本発明による真核生物由来のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (protox) 酵素をコードする異種DNA分子と作用可能な状態で連結した植物内活性型プロモーターを含む発現力セットを含むキメラ遺伝子に関する。好ましいのは、DNA分子がアラビドブシス、サトウキビ、ダイズ、大麦、ワタ、タバコ、テンサイ、脂肪種子ナタネ、トウモロコシ、コムギ、モロコシ、ライ麦、エンバク、芝生および飼草、キビ、フォーレージおよびイネから成る群から選択される植物由来のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (protox) 酵素をコードするキメラ遺伝子である。より好ましいのは、DNA分子がダイズ、ワタ、タバコ、テンサイ、脂肪種子ナタネ、トウモロコシ、コムギ、モロコシ、ライ麦、エンバク、芝生、イネから成る群から選択される植物由来のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (protox) 酵素をコードするキメラ遺伝子である。特に好ましいのは、DNA分子がコムギ、ダイズ、ワタ、テンサイ、ナタネ、イネおよびモロコシから成る群から選択される植物由来のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (protox) 酵素をコードするキメラ遺伝子である。最も好ましいのは、DNA分子がダイズ、テンサイおよびコムギから成る群から選択される植物由来のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (protox) 酵素をコードするキメラ遺伝子である。

より好ましいのは、配列番号：10に示す配列を含むコムギprotox、配列番号：12に示す配列を含むダイズprotox、配列番号：16に示す配列を含むワタprotox、配列番号：18に示す配列を含むテンサイprotox、配列番号：20に示す配列を含むナタネprotox、配列番号：22に示す配列を含むイネprotox、および配列番号：24に示す配列を含むモロコシprotoxから成る群から選択されるプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (protox) 酵素をコードする異種DNA分子と作用可能な状態で連結した植物の中で活性なプロモーターを含むキメラ遺伝子である。より好ましいのは、プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (protox) 酵素が配列番号：10に示す配列を含むコムギprotox、配列番号：12に示す配列を含むダイズprotox、および配列番号：18に示す配列を含むテンサイprotoxから成る群から選択されるキメラ遺伝子である。

本明細書に使用する「protox-1」とは、葉緑体protoxをいい、「protox-2」はミトコンドリアprotoxをいう。

特に好ましいのは、DNA分子がprotox-1活性またはprotox-2活性を有するアラビドブシス種由来の蛋白質をコードするキメラ遺伝子であり、好ましくは前記蛋白質が配列番号：2または配列番号：4に示すアミノ酸配列を含むキメラ遺伝子である。特に好ましいのは、DNA分子がprotox-1活性またはprotox-2活性を有するトウモロコシ由来の蛋白質をコードするキメラ遺伝子であり、好ましくは前記蛋白が配列番号：6または配列番号：8に示すアミノ酸配列を含むキメラ遺伝子である。

特に好ましいのは、DNA分子がprotox-1活性を有するコムギ由来の蛋白質をコードするキメラ遺伝子であり、好ましくは前記蛋白が配列番号：10に示すアミノ酸配列を含むキメラ遺伝子である。

特に好ましいのは、DNA分子がprotox-1活性を有するダイズ由来の蛋白質をコードするキメラ遺伝子であり、好ましくは前記蛋白が配列番号：12に示すアミノ酸配列を含むキメラ遺伝子である。

特に好ましいのは、DNA分子がprotox-1活性を有するワタ由来の蛋白質をコードするキメラ遺伝子であり、好ましくは前記蛋白が配列番号：16に示すアミノ酸配列を含むキメラ遺伝子である。

特に好ましいのは、DNA分子がprotox-1活性を有するテンサイ由来の蛋白質をコードするキメラ遺伝子であり、好ましくは前記蛋白が配列番号：18に示すアミノ酸配列を含むキメラ遺伝子である。

特に好ましいのは、DNA分子がprotox-1活性を有するナタネ由来の蛋白質をコードするキメラ遺伝子であり、好ましくは前記蛋白が配列番号：20に示すアミノ酸配列を含むキメラ遺伝子である。

10

20

20

30

40

50

特に好ましいのは、DNA分子がprotox-1活性を有するイネ由来の蛋白質をコードするキメラ遺伝子であり、好ましくは前記蛋白が配列番号：22に示すアミノ酸配列を含むキメラ遺伝子である。

特に好ましいのは、DNA分子がprotox-1活性を有するモロコシ由来の蛋白質をコードするキメラ遺伝子であり、前記蛋白が配列番号：24に示すアミノ酸配列を好ましくは含むキメラ遺伝子である。

本発明はまた、プロモーターを必ず含む発現カセットを含むキメラ遺伝子を実施するが、特に相当する非修飾版の酵素を阻害する量の除草剤に対して耐性の本発明による真核生物由来プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ(protox)酵素をコードするDNA分子と作用可能な状態で連結した植物内活性型プロモーターを含む発現カセットを含むキメラ遺伝子を実施する。10

好ましいのは、DNA分子がアラビドプシス、サトウキビ、ダイズ、大麦、ワタ、タバコ、テンサイ、脂肪種子ナタネ、トウモロコシ、コムギ、モロコシ、ライ麦、エンバク、芝生および飼草、キビ、フォーレージおよびイネから成る群から選択される植物由来のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ(protox)酵素をコードするキメラ遺伝子である。

より好ましいのは、DNA分子がダイズ、ワタ、タバコ、テンサイ、脂肪種子ナタネ、トウモロコシ、コムギ、モロコシ、ライ麦、エンバク、芝生、またイネから成る群から選択される植物由来のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ(protox)酵素をコードするキメラ遺伝子である。20

特に好ましいのは、DNA分子がアラビドプシス、ダイズ、ワタ、テンサイ、脂肪種子ナタネ、トウモロコシ、コムギ、モロコシおよびイネから成る群から選択される植物由来のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ(protox)酵素をコードするキメラ遺伝子である。

本発明に含まれるのは、少なくとも1つのアミノ酸変更を有する真核生物のprotoxを含む修飾プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ(protox)をコードするDNA分子と作用可能な状態で連結した植物内活性型プロモーターを含むキメラ遺伝子であって、前記アミノ酸変更がprotox阻害物質に対する耐性を付与する特性を有するキメラ遺伝子である。

また本発明に含まれるのは、第1アミノ酸置換および第2アミノ酸置換を有する植物protoxを含む修飾プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ(protox)をコードするDNA分子と作用可能な状態で連結した植物内活性型プロモーターを含むキメラ遺伝子であって、前記第1アミノ酸置換はprotox阻害物質に対する耐性を付与する特性を有し、前記第2アミノ酸置換が前記第1アミノ酸置換によって付与された前記耐性を増強する特性を有するキメラ遺伝子である。好ましいのは、前記DNA分子と作用可能な状態で連結したシグナル配列をさらに含む前記キメラ遺伝子であって、前記シグナル配列が前記DNA分子によりコードされる蛋白質を葉緑体またはミトコンドリアにターゲティングし得るキメラ遺伝子である。30

本発明によるキメラ遺伝子はさらに、前記DNA分子と作用可能な状態で連結したシグナル配列をさらに含んでもよく、前記シグナル配列が前記DNA分子によりコードされる蛋白質を葉緑体にターゲティングし得る。40

本発明によるキメラ遺伝子はさらに、前記DNA分子と作用可能な状態で連結したシグナル配列をさらに含んでもよく、前記シグナル配列が前記DNA分子によりコードされる蛋白質をミトコンドリアにターゲティングし得る。

また、本発明に含まれるのは、本明細書で前に述べた、宿主・ゲノムへ安定して組み込まれる任意のDNA配列である。

本発明はさらに、植物プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ(protox)またはその機能的に等価な誘導体を含む組換えDNA分子に関する。

本発明はさらに、前記組換えDNA分子を含む組換えDNAベクターに関する。

本発明のさらなる目的は、本発明によるキメラ遺伝子を含む組換えベクターであって、前50

記ベクターが宿主細胞で安定して形質転換可能な組換えベクターである。

本発明のさらなる目的は、本発明によるキメラ遺伝子を含む組換えベクターであって、前記ベクターが植物、植物種子、植物組織または植物細胞で安定して形質転換可能な組換えベクターである。好ましいのは、本発明によるキメラ遺伝子を含む組換えベクターであって、植物にて安定して形質転換可能な組換えベクターである。このベクターにより安定して形質転換された植物、植物種子、植物組織または植物細胞は、プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (protox) をコードするDNA分子を発現し得る。好ましいのは、組換えベクターであって、前記ベクターにより安定して形質転換された植物、植物種子、植物組織または植物細胞が、相当する非修飾版の酵素を阻害するレベルで除草剤に対して耐性の植物由来のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (protox) をコードするDNA分子を発現可能な組換えベクターである。 10

好ましいのは、配列番号：10に示す配列を含むコムギprotox、配列番号：12に示す配列を含むダイズprotox、配列番号：16に示す配列を含むワタprotox、配列番号：18に示す配列を含むテンサイprotox、配列番号：20に示す配列を含むナタネprotox、配列番号：22に示す配列を含むイネprotoxおよび配列番号：24に示す配列を含むモロコシprotoxから成る群から選択されるプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (protox) をコードする異種DNA分子と作用可能な状態で連結した植物内活性型プロモーターを含むキメラ遺伝子を含む組換えベクターであって、前記ベクターが宿主細胞で安定して形質転換し得る組換えベクターである。

また好ましいのは、第1アミノ酸置換および第2アミノ酸置換を有する植物protoxを含む修飾プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (protox) をコードするDNA分子と作用可能な状態で連結した植物内活性型プロモーターを含むキメラ遺伝子を含む組換えベクターであって、前記第1アミノ酸置換がprotox阻害物質に対する耐性を付与する特性を有し、前記第2アミノ酸置換が前記第1アミノ酸置換により付与された前記耐性を増強する特性を有し、前記ベクターが植物細胞で安定して形質転換可能な組換えベクターである。 20

また、本発明に含まれるのは、本発明によるベクターで安定して形質転換された宿主細胞であって、前記宿主細胞が前記DNA分子を発現可能な宿主細胞である。好ましいのは、植物細胞、細菌細胞、酵母細胞および昆虫細胞から成る群から選択される宿主細胞である。 30

本発明はさらに、許容性が本明細書で教示するようにして阻害物質耐性の修飾protox酵素を発現する遺伝子により付与される、植物中の天然protox活性を阻害する除草剤に許容性の植物およびその子孫、植物組織および植物種子に関する。代表的な植物としては、この除草剤をその通常意図される目的のために適用する任意の植物などである。好ましいのは、農業経済学上重要な作物、即ちアラビドプシス、サトウキビ、ダイズ、大麦、ワタ、タバコ、テンサイ、脂肪種子ナタネ、トウモロコシ、コムギ、モロコシ、ライ麦、エンバク、芝生および飼草、キビ、フォーレージおよびイネ等などの被子植物および裸子植物である。より好ましいのは、農業経済学上重要な作物、即ちアラビドプシス、ワタ、ダイズ、ナタネ、テンサイ、トウモロコシ、イネ、コムギ、大麦、エンバク、ライ麦、モロコシ、キビ、芝生、フォーレージ、芝草などの被子植物および裸子植物である。特に好ましいのは、農業経済学上重要な作物、即ちアラビドプシス、ダイズ、ワタ、テンサイ、脂肪種子ナタネ、トウモロコシ、コムギ、モロコシおよびイネなどの被子植物および裸子植物である。 40

好ましいのは、第1アミノ酸置換および第2アミノ酸置換を有する植物protoxを含む修飾プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (protox) をコードするDNA分子を含む植物であって、前記第1アミノ酸置換がprotox阻害物質に対する耐性を付与する特性を有し、前記第2アミノ酸置換が前記第1アミノ酸置換により付与された前記耐性を増強する特性を有し、前記DNA分子が前記植物中で発現されて天然protox活性を阻害する量の除草剤に対する植物許容性を前記植物に付与する植物である。好ましいのは、前記DNA分子が相当する天然protoxコード配列と置換した植物である。本 50

発明に含まれるのは、前記キメラ遺伝子が天然 *protox* 活性を阻害する量の除草剤に対する前記植物耐性付与する、本発明によるキメラ遺伝子を含む植物およびその子孫である。

本発明に含まれるのは、本発明による少なくとも1つのキメラ遺伝子により安定して形質転換された植物およびその子孫、種子、培養組織を含むトランスジェニック植物組織である。好ましいのは、プロモーターを必ず含むが特に植物組織中で相当する非修飾版の酵素を阻害する量の除草剤に対して耐性のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ(*protox*)酵素をコードするDNA分子と作用可能な状態で連結した植物内活性型プロモーター発現力セットを含む、少なくとも1つのキメラ遺伝子により安定して形質転換された植物、種子および培養組織を含むトランスジェニック植物組織である。

本発明の組換えDNA分子は、技術的に認識された多くの方法によって植物細胞に導入し得る。当業者なら、方法の選択が形質転換の標的とする植物の種類、即ち単子葉植物、双子葉植物などに依存し得ることを理解しよう。植物細胞を形質転換する適切な方法としては、マイクロインジェクション(Crossway等, Biotechniques 4: 320~334(1986年))、エレクトロポレーション(Riggs等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 5602~5606(1986年))、アグロバクテリウムによる形質転換(Hinchee等, Biotechnology 6: 915~921(1988年))、直接遺伝子転移(Paszkowski等, EMBO J: 3. 2717~2722(1984年))、*Agro*acetus社(ウィスコンシン州マディソン)およびDuPont社(デラウェア州ウィルミントン)から市販の装置を使用する弾道粒子加速(例えば、Sanford他の米国特許第4,945,050号、McCabe等, Biotechnology 6: 923~926(1988年)参照)、プロトプラス形質転換/再生法(1994年9月27日にチバ-ガイギー社に対して発行された米国特許第5,350,689号参照)などがある。また、Weissinger等, Annual Rev. Genet. 22: 421~477(1988年); Sanford等, Particulate Science and Technology 5: 27~37(1987年)(タマネギ); Christou等, Plant Physiol. 87: 671~674(1988年)(ダイズ); McCabe等, Bio/Technology 6: 923~926(1988年)(ダイズ); Datta等, Bio/Technology 8: 736~740(1990年)(イネ); Klein等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85: 4305~4309(1988年)(トウモロコシ); Klein等, Bio/Technology 6: 559~563(1988年)(トウモロコシ); Klein等, Plant Physiol. 91: 440~444(1988年)(トウモロコシ); Fromm等, Bio/Technology 8. 833~839(1990年); Gordon-Kamm等, Plant Cell 12: 603~618(1990)(トウモロコシ)も参照のこと。

本発明の範囲に含まれるのは、トランスジェニック植物、特に前記の方法によって形質転換したトランスジェニック稔性植物および無性および/または有性の子孫であって、植物中で天然 *protox* 活性を通常阻害するレベルで除草剤による阻害に対して耐性または少なくとも許容性のものである。また子孫植物としては、親植物とは異なる遺伝的背景をもつ植物であって、戻し交配プログラムから得られ、そのゲノム中に依然として本発明による除草剤抵抗形質を含む植物などがある。なかでも特に好ましいのは、植物中の天然 *protox* 活性を通常阻害する量の除草剤による阻害に対して耐性または少なくとも許容性の雑種植物である。

本発明によるトランスジェニック植物は双子葉植物でも単子葉植物でもよい。好ましいのは、ライグラス属(*Lolium*)、トウモロコシ属(*Zea*)、コムギ属(*Triticum*)、ライコムギ属(*Triticale*)、モロコシ属(*Sorghum*)、サトウキビ属(*Saccharum*)、ブロムグラス属(*Bromus*)、イネ属(*Oryza*)、カラスムギ属(*Avena*)、オオムギ属(*Hordeum*)、ライ麦属(*Sec-*

10

20

30

40

50

ule)、セタリア属(*Setaria*)の各植物を含むイネ科族の单子葉植物である。より好ましいのは、トランスジェニックトウモロコシ、コムギ、大麦、モロコシ、ライ麦、エンバク、芝生および飼草、キビおよびイネである。特に好ましいのは、トウモロコシ、コムギ、モロコシ、ライ麦、エンバク、芝生およびイネである。

双子葉植物の中では、本明細書ではアラビドプシス、ダイズ、ワタ、テンサイ、サトウキビ、脂肪種子ナタネ、タバコおよびヒマワリがより好ましい。

特に好ましいのは、ダイズ、ワタ、タバコ、テンサイおよび脂肪種子ナタネである。

「子孫」(又は後代)(*progeny*)の表現は、「無性的」および「有性的」に産出されたトランスジェニック植物の子孫の両方を含むと理解する。この定義はまた、例えば細胞融合または突然変異体選択などの公知の方法によって入手可能な突然変異体および形質転換体をすべて含むことを意味し、形質転換植物材料のすべての交雑・融合生成物と同様に、依然として最初の形質転換植物特有の特性を示すことを意味する。これはまた、戻し交配プログラムから得られる子孫植物をも含むが、ただし前記子孫植物が依然として本発明による除草剤耐性形質を含む場合に限る。

本発明の別の目的は、トランスジェニック植物の増殖材料に関する。本発明に関しては、トランスジェニック植物の増殖材料を、有性的または無性的に *in vivo* または *in vitro* で繁殖する任意の植物材料と定義する。本発明の範囲内で特に好ましいのは、プロトプラスト、細胞、カルス、組織、器官、種子、胚芽、花粉、卵細胞、接合子、並びにトランスジェニック植物から得られた他の繁殖材料である。

植物の一部、例えば本発明の方法によってあらかじめ形質転換され、従って少なくとも部分的にはトランスジェニック細胞から成るトランスジェニック植物またはその子孫を起源とする花、茎、実、葉、根などもまた本発明の目的である。

本発明のさらなる目的は、本発明の方法によって形質転換され、従って本発明によるDNAによって植物または植物の一部を形質転換することにより植物 *protox* 酵素の阻害物質耐性体を產生するトランスジェニック植物またはその子孫を起源とする植物、プロトプラスト、細胞、カルス、組織、器官、種子、胚芽、花粉、卵細胞、接合子、並びに他の繁殖材料、植物の一部、例えば花、茎、実、葉、根などを產生する方法である。好ましいのは、プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ(*protox*)活性を有する真核生物由来の蛋白質をコードする単離DNA分子を含む宿主細胞を作成する方法であって、本発明による組換えベクター分子により前記宿主細胞を形質転換する段階を含む方法である。さらに好ましいのは、プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ(*protox*)活性を有する真核生物由来の蛋白質をコードする単離DNA分子を含む植物細胞を作成する方法であって、本発明による組換えベクター分子により前記植物細胞を形質転換する段階を含む方法である。好ましいのは、プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ(*protox*)活性を有する真核生物由来の蛋白質をコードする単離DNA分子を含むトランスジェニック親植物のトランスジェニック子孫を產生する方法であって、公知の植物育種技術を要する、本発明による組換えベクター分子によって前記親植物を形質転換する段階と、除草剤を耐性形質を前記トランスジェニック親植物の子孫に移し入れる段階とを含む方法である。

好ましいのは、植物 *protox* 酵素の阻害物質耐性体を產生する植物、植物組織、植物種子および植物の一部を作成する方法であって、植物、植物組織、植物種子および植物の一部が耐性 *protox* 酵素をコードする構造遺伝子により安定して形質転換される方法である。特に好ましいのは、植物、植物組織、植物種子および植物の一部を作成する方法であって、植物、植物組織、植物種子および植物の一部が本発明によるDNAにより安定して形質転換される方法である。とりわけ好ましいのは、植物 *protox* 酵素の阻害物質耐性体を產生する前記の植物、植物組織、植物種子および植物の一部を作成する方法であって、植物、植物組織、植物種子および植物の一部を直接選択技術により調製し、それによって除草剤耐性株を単離し、特徴を明らかにし、育成する方法である。

上述のトランスジェニック種子およびトランスジェニック植物に導入された遺伝的特性は、有性生殖または栄養生長によって伝えられ、こうして子孫植物に維持、伝達され得る。

一般に、前記の維持と伝達は、耕作、播種、収穫などの特定の目的に適するように開発さ

10

20

30

40

50

れた公知の農業の方法を利用する。また、水耕法または温室技術などの専門の方法も適用し得る。成長中の作物は、昆虫または伝染病が引き起こす攻撃および破損、並びに雑草植物による競争に対して脆弱であるため、雑草、植物病害、昆虫、線虫および他の逆の条件をコントロールして収穫量を改善する手段を講じる。これらには、土壤の耕作または雑草および感染植物の除去などの機械的な手段、並びに除草剤、殺菌剤、花粉発育阻止剤、線虫駆除剤、成長調節剤、成熟剤、殺虫剤などの農薬の使用などが含まれる。

本発明によるトランスジェニック植物およびトランスジェニック種子の有利な遺伝的特性は、害虫許容性、除草剤許容性、ストレス許容性、栄養価の改善、収穫量の増大、あるいは倒伏または破碎によって引き起こされる損害を少なくする構造改善などの改善された特性を備えた植物の開発を目的とした植物育種に利用し得る。様々な育種の段階は、交雑株の選択、親株授粉の支配、適切な子孫植物の選択などの明確な人の介在を特徴とする。所望の特性により、様々な育種法が取られる。適切な技術は当技術分野でよく知られており、ハイブリダイゼーション、同系交配、戻し交雑、多株育種、品種混合、種間交雑、異数体技術などが含まれるが、これらに限定されない。ハイブリダイゼーション技術はまた、機械的、化学的または生化学な手段による雄性または雌性の不稔植物を作成するための植物の不稔化を含む。異なる株の花粉によって雄性の不稔植物を他家受粉すると、雄性は不稔であるが雌性は稔性の植物のゲノムに両親株の特性が一様に得されることが確実になる。従って、本発明によるトランスジェニック種子およびトランスジェニック植物は、例えば除草剤または殺虫剤処理などの従来法の有効性を増大させるか、変更されたその遺伝的特性により前記方法を省くことが可能な、改善された植物株の育種に使用し得る。別法として、それらの最適化された遺伝の「設備」により、匹敵する有害な発育条件に耐えられなかつた生産物よりも質のよい収穫生産物をもたらす、改善されたストレス耐性を備えた新しい作物を得ることができる。

種子作出では種子の発芽の質と均質性が最も重要な産物特性であるのに対し、農業従事者によって収穫・販売される種子の発芽の質と均質性は重要ではない。作物を他の作物および雑草の種子が無い状態に保ち、種子伝染性の病害を防除し、よい発芽を備えた種子を生産することは困難なので、純粋な種子の育成、調質およびマーケティングの技術に熟達した種子産生者がかなり広範で明確な種子生産実践規範を開発している。従って、農業従事者が自分の作物から収穫された種子を使用する代わりに特定の品質基準に合った保証された種子を買うことが一般的慣行である。種子として使用される繁殖材料は通例、除草剤、殺虫剤、殺かび剤、殺菌剤、線虫駆除剤、軟体動物駆除剤、あるいはそれらの混合物を含む保護剤コーティングで処理する。通例使用される保護剤コーティングとしては、キャプタン、カルボキシン、サイラム (T M T D)、メタラキシル (A p r o n) およびピリミホスメチル (A c t e l l i c) などの化合物などがある。望むなら、細菌、かびまたは動物の悪疫によって引き起こされる損害からの保護を提供するために、製剤化技術で通例使用されるさらなる担体、界面活性剤または適用促進アジュバントと共にこれらの化合物を製剤化する。保護剤コーティングは、繁殖材料に液体製剤をしみ込ませることによって、あるいは複合の湿性または乾性の製剤でコーティングすることによって適用してもよい。他の適用方法としてはまた、芽または実向けの処理なども可能である。

従って栽培植物用の植物繁殖材料、特に、通例種子処理に使用される種子保護剤でコーティング処理される植物種子を提供することは本発明のさらなる目的である。

本発明によるトランスジェニック植物、トランスジェニック植物材料またはトランスジェニック種子の使用を特徴とする、上で例証された方法などの新しい農業の方法を提供することは本発明のさらなる態様である。本発明に含まれるのは、除草剤に対する耐性を付与する植物中で除草剤標的蛋白の除草剤抗体を発現するのに十分な量の本発明によるキメラ遺伝子を含むトランスジェニック植物またはその子孫を使用する農業の方法である。

本発明の方法によって形質転換した植物から子孫を育種するために、次のような方法を使用し得る。以下の実施例に示すようにして作成したトウモロコシ植物を当技術分野で知られている温室内の植木鉢、あるいは土壤中で育成し、開花させる。成熟した雄穂から花粉を得て、同一植物、同胞植物または任意の望ましいトウモロコシ植物の雌穂への授粉に使

10

20

30

40

50

用する。同様に、同一植物、同胞植物または任意の望ましいトウモロコシ植物から得られた花粉を、形質転換された植物に生じる雌穂に授粉してもよい。この方法によって得られた形質転換子孫は、導入遺伝子の存在および/または付随するDNA(遺伝子型)、あるいは付与された表現型によって、非形質転換子孫と識別される。望ましい形質をもつ任意の植物について通常行なわれているのと同様に、形質転換子孫を自家受粉するか、他の植物と交雑してもよい。同様に、この方法によって作出したタバコまたは他の形質転換植物を、所望の特徴を持つ子孫を産むためのものとして当技術分野で知られている方法で自家受粉するか、交雑してもよい。同様に、当技術分野で知られている方法と本発明の方法との組合せにより作出した他のトランスジェニック生物を、所望の特徴を持つ子孫を産むためのものとして当技術分野で知られている方法で育種してもよい。

10

本発明の阻害物質耐性の修飾protox酵素は、その天然相当物(即ち、直接的な組換えDNA法あるいは間接的な選択育種などを介した人間による操作を受けることなく、植物に天然に生じる阻害物質感受性体)と比較して、少なくとも1つのアミノ酸の置換、追加または欠失を有する。protox酵素の阻害物質耐性体の產生または阻害物質耐性の増強のために変更し得るアミノ酸位置を、表1のアラビドプシス、トウモロコシ、ダイズ、ワタ、テンサイ、ナタネ、イネ、モロコシおよびコムギ由来の植物protox-1配列中に太字で示す。当業者なら、本発明による変更アミノ酸の配列および識別を可能にするために本明細書に示したprotox酵素配列に十分に類似した構造を有する任意の植物protox遺伝子に対して同等の変更を行なって酵素の阻害物質耐性体を生成させ得ることを理解するであろう。このような追加の植物protox遺伝子は、1995年6月8日に出願され、WO95/34659として1995年12月21日に公開された国際出願PCT/IB95/00452に記載された標準的技術を使用して得てもよく、その関連部分を参照により本明細書の一部とする。

20

本明細書で教示した除草剤耐性protoxコード配列をコードするDNA分子は、作物中で最適に発現するように遺伝子組換えしてもよい。これには、対象作物品種で最適に発現させるための抵抗対立遺伝子のコード配列変更が含まれる。特定の作物品種で最適の発現を達成するためにコード配列を変更する方法は、よく知られている(例えば、Perlak等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:3324(1991年); Koziel等, Bio/technol 11:194(1993年)参照)。

30

最適な発現のためのprotoxコード配列の遺伝子組換えにはまた、適切な調節配列(即ち、プロモーター、シグナル配列、転写ターミネーターなど)と作用可能な状態で連結することも含まれる。植物または植物細胞中で機能し得るプロモーター(即ち、植物細胞中のprotoxなどの関連構造遺伝子の発現を制御し得るもの)としては、例えばカリフラワー・モザイク・ウイルス(CaMV)19Sプロモーターまたは35SプロモーターおよびCaMV二重プロモーター;ノバリンシンターゼプロモーター;病原関連(PR)蛋白プロモーター;リブロースビスリン酸カルボキシル化酵素(ssuRUBISCO)プロモーターの小サブユニット、EPA0559603参照のBrassica由来の熱衝撃蛋白プロモーター(hsp80プロモーター)、WO95/14098参照のアラビドプシスアクチンプロモーターおよびSuperMasプロモーター等がある。好ましいプロモーターは高レベルの構成的発現を付与するもの、あるいはより好ましくは、除草剤による損傷に感受性の組織内高レベル特異的発現を付与するものであろう。好ましいプロモーターは、イネ・アクチン・プロモーター(McElroy等, Mol. Gen. Genet. 231:150(1991年))、トウモロコシ・ユビキチン・プロモーター(EP0342926; Taylor等, Plant Cell Rep. 12:491(1993年))、タバコ、アラビドプシスまたはトウモロコシ由来のPR-1プロモーター(Ryals他の米国特許出願第EP-332104および08/181,271を参照、その全体を参照により本明細書の一部とする)などである。当技術分野で認められた方法に従って、プロモーターの強度を操作してprotox発現を増大させるためにプロモーター自身を変更してもよい。

40

発明者はまた、阻害物質耐性のprotoxコード配列として使用するための好まし

50

いプロモーターが天然 *protox* 遺伝子に付随するプロモーター（即ち、*protox* プロモーター；共同所有された本願と同時係属であり本願と同日出願の「Promoters from Oxidase Genes（プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子由来のプロモーター）」という名称の国際出願_____（整理番号 PH / 5 - 20756 / P1 / CGC 1846）参照、その全体を参照により本明細書の一部とする）であることを発見した。アラビドプシス *protox* - 1 遺伝子由来のプロモーター配列を配列番号：13に、トウモロコシ *protox* - 1 遺伝子由来のプロモーター配列を配列番号：14に、テンサイ *protox* - 1 遺伝子を由来のプロモーター配列を配列番号：26に示す。

protox プロモーター自体が阻害物質耐性 *protox* コード配列の発現に適しているため、本明細書で教示した変更は、異種調節配列を備えたキメラ遺伝子を構築する必要のない植物細胞ゲノム中にある天然の 38 *protox* 遺伝子に対して直接行なってよい。このような変更は、同種組換えなどの定方向突然変異誘発技術によって行ない、得られた除草剤抵抗表現型に基づいて選択し得る（例えば、実施例 10, Pazkowsk 等, EMBO J. 7: 4021 ~ 4026 (1988 年)、および米国特許第 5,487,992 号、特に 18 ~ 19 段および実施例 8 参照）。この方法の利点はさらに、天然 *protox* プロモーターを含むことに加え、得られた変更遺伝子が天然遺伝子の一部であるシグナルペプチドまたは輸送ペプチドのコード配列などの他の任意の調節要素をも含むことである。

シグナルペプチドまたは輸送ペプチドは、本発明のキメラ DNA 構築物中の *protox* コード配列と融合させて、所望の活性部位に発現される *protox* 酵素の輸送するようにさせてよい。シグナルペプチドとしては、例えば植物病因関連蛋白と天然に連結したもの、例えば PR - 1、PR - 2 等がある。例えば、Payne 等, Plant Mol. Biol. 11: 89 ~ 94 (1988 年) 参照のこと。輸送ペプチドとしては、例えば Von Heijne 等, Plant Mol. Biol. Rep. 9: 104 ~ 126 (1991 年)、Mazur 等, Plant Physiol. 85: 1110 (1987 年)、Vorst 等, Gene 65: 59 (1988 年) に記載されたものなどの葉緑体輸送ペプチド、Bouttry 等, Nature 328: 340 ~ 342 (1987 年) に記載されたものなどのミトコンドリア輸送ペプチドなどがある。葉緑体とミトコンドリア輸送ペプチドは、ミトコンドリアおよび葉緑体内で典型的に生じる *protox* 酵素活性として本発明で特に有用であると考えられる。葉緑体での *protox* 酵素活性阻害が *protox* 阻害性除草剤の作用の主要な根拠と考えられるため、使用に最も好ましいのは葉緑体輸送ペプチドである (Witkowski および Halling, Plant Physiol. 87: 632 (1988 年)、Lehnen 等, Pestic. Biochem. Physiol. 37: 239 (1990 年)、Duke 等, Weed Sci. 39: 465 (1991 年))。また、コードされる蛋白質の液胞などの様々な細胞区画への局在化をもたらす配列も含まれる。例えば、Neuhau 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10362 ~ 10366 (1991 年) および Chrispeels, Ann. Rev. Plant Physiol. (Plant Mol. Biol.) 42: 21 ~ 53 (1991 年) を参照する。これらの出版物の適切な開示は、その全体を参照により本明細書の一部とする。

本発明のキメラ DNA 構築物は、多数の *protox* 構造遺伝子複製物または多数のプロモーター複製物を含み得る。さらに、この構築物は、マーカーのコード配列とシグナルまたは輸送ペプチドなどの他のペプチドのコード配列とを各々 DNA 分子中の他の機能エレメントを備えた適正な読み枠中に含み得る。このような構築物の調製は、通常レベルの当業者の技能の範囲内である。

有用なマーカーとしては、例えばハイグロマイシン、カナマイシン、G 418、ゲンタマイシン、リンコマイシン、メトトレキサート、グリホサート、ホスフィノトリシンなどに対する耐性などの、除草剤耐性、抗生物質耐性または薬物耐性を提供するペプチドなどがある。これらのマーカーは、本発明のキメラ DNA 構築物で形質転換細胞を非形質転換細

10

20

30

40

50

胞から選択するのに使用し得る。他の有用なマーカーは、可視の反応、例えば発色反応などによって容易に検出し得るペプチド酵素、例えばルシフェラーゼ、-グルクロニダーゼ、-ガラクトシダーゼなどである。

形質転換細胞に選択有利性を与えることにより所望のヌクレオチド配列の組込みが可能な遺伝形質転換細胞のポジティブ選択を、参照によりWO 94/20627として本明細書の一部とする。

各植物細胞中にある数千コピーの環状色素体ゲノムすべてに同種組換えにより遺伝子を挿入する色素体発現によると、核で発現した遺伝子に対する卓越したコピー数の優位を利用して総可溶植物蛋白の10%をこえる発現レベルが可能となる。また、色素体によりコードされる形質が花粉伝達性でないため、色素体発現が望ましく、こうすればトランスジェニック植物の野生同系種への偶発的な導入遺伝子逸出の危険の可能性が回避される。色素体形質転換技術は、米国特許第5,451,513号、第5,545,817号および第5,545,818号（これら全ての全体を参照により本明細書の一部とする）；PCT出願WO 95/16783（その全体を参照により本明細書の一部とする）；McBride等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:7301~7305（1994年）（これも全体を参照により本明細書の一部とする）などに詳細にわたって記載されている。タバコ葉緑体形質転換の基礎技術は、ラトガーズ大学（ニュージャージー州Piscataway）のPal Maliga博士の研究所の中で開発、改善されており、選択可能な抗生物質抵抗マーカーと隣接するクローン化色素体DNA領域による葉組織の粒子ポンバードを伴う。ターゲティング配列と呼ばれる1~1.5kbのブランкиング領域は、色素体ゲノムによる同種組換えを促進し、それによってタバコプラストームの156kbの特定領域の置換または変更が可能になる。最初、スペクチノマイシンおよび/またはストレプトマイシンに対する耐性を付与する、葉緑体16SリボソームRNAおよびrps12遺伝子での点突然変異が形質転換の選択マーカーとして利用された（Svab, Z., Hajdukiewicz, P. およびMaliga, P. (1990年) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 8526~8530、参照により本明細書の一部とする；Staub, J. M およびMaliga, P. (1992年) Plant Cell, 39~45、参照により本明細書の一部とする）。これにより、標的葉のポンバード100回につきおよそ1回の頻度で安定したhomoplasmic形質転換体が得られた。これらのマーカー間にクローン化部位が存在すると、外来遺伝子の導入のための色素体ターゲティングベクターの創製が可能となる（Staub, J. M. およびMaliga, P., EMBO J. 12:601~606 (1993年)、参照により本明細書の一部とする）。劣性リボソームRNAまたはr-蛋白抗生物質耐性遺伝子の優性選択マーカー、即ちスペクチノマイシン解毒酵素アミノグリコシド-3'-アデニルトランスフェラーゼをコードする細菌aadA遺伝子との置換によって形質転換頻度のかなりの上昇が得られた（Svab, Z. およびMaliga, P. (1993年) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 913~917、参照により本明細書の一部とする）。かつてこのマーカーは、緑藻クラミドモナスreinhardtiiの色素体ゲノムの高頻度形質転換に成功裡に使用された（Goldschmidt-Clermont, M. (1991年) Nucleic Acids Res. 19, 4083~4089、参照により本明細書の一部とする）。

従って、本発明にはさらに、天然の、あるいは改変されたコムギ、ダイズ、ワタ、テンサイ、ナタネ、イネまたはモロコシのprotox酵素をコードするDNA分子などの、天然植物protox酵素または修飾植物protox酵素のいずれかをコードする単離DNA分子と作用可能な状態で連結した植物色素体プロモーターを含むキメラ遺伝子が含まれる。特に好ましい植物色素体プロモーターはc1pP遺伝子プロモーターである。

キメラ遺伝子は、好ましくは単離DNA分子と作用可能な状態で連結された、色素体プロモーター由来の5'非翻訳配列（5'UTR）および色素体遺伝子'3'非翻訳配列（3'UTR）をさらに含む。好ましくは、3'UTRは色素体rps16遺伝子3'非翻訳配列である。

10

20

30

40

50

本発明はまた、直ちに上記のキメラ遺伝子並びにこのような色素体形質転換ベクターで形質転換された植物色素体を含む色素体形質転換ベクターであって、前記修飾植物protox酵素が前記植物色素体中で発現される色素体形質転換ベクターをも含む。本発明はまた、修飾植物protox酵素が植物中で発現され、この植物に天然protox活性を阻害する量の除草剤に対する耐性を付与する、この植物色素体を包む植物または植物細胞およびそれらの子孫を含む。

作物を再生成し得る天然遺伝子の作物または植物培養細胞中での定方向突然変異を介して除草剤耐性protox対立遺伝子が得られる場合、除草剤許容性作物を開発するための従来の育種技術を使用して、変更コード配列の遺伝子組換えと植物での形質転換を必要とせずに、それを商品品種へ移行し得る。

別法として、除草剤耐性遺伝子を単離し、最適に発現するように遺伝子組換えを行なった後に所望の品種へ形質転換してもよい。

protox阻害物質に耐性の修飾protoxをコードする遺伝子も植物細胞形質転換法の中で選択マーカーとして使用し得る。例えば、導入遺伝子で形質転換された植物、植物組織または植物細胞も、植物によって発現し得る、修飾protoxをコードする遺伝子によって形質転換し得る。こうして形質転換された細胞を形質転換細胞だけが生存するprotox阻害物質含有培地に移す。選択剤として特に有用と考えられるProtox阻害物質は、ジフェニルエーテル{例えば、アシフルオルフェン、即ち5-[2-クロロ-4-(トリフルオロメチル)フェノキシ]-2-nitrobenzoic acid; そのメチルエステル; またはオキシフルオルフェン、即ち2-クロロ-1-(3-エトキシ-4-ニトロフェノキシ)-4-(トリフルオロベンゼン)}、オキシジアゾール、(例えばオキシジアゾン、3-[2,4-ジクロロ-5-(1-メチルエトキシ)フェニル]-5-(1,1-ジメチルエチル)-1,3,4-オキサジアゾール-2-(3H)-オン)、環状イミド(例えばS-23142、即ちN-(4-クロロ-2-フルオロ-5-プロパルギルオキシフェニル)-3,4,5,6-テトラヒドロフタルイミド; クロロphthalim、即ちN-(4-クロロフェニル-3,4,5,6-テトラヒドロフタルイミド)、フェニルピラゾール、(例えばTNPPエチル、エチル2-[1-(2,3,4-トリクロロフェニル)-4-ニトロピラゾリル-5-オキシ]プロピオネート; M&B 39279)、ピリジン誘導体(例えばLS 82-556)、phenopyl ateとそのO-フェニルピロリジノ-およびピペリジノカルバメート類似体、および国際特許出願WO 92/04827に開示される2環式Triazolones; EP 532146)などである。

この方法は、修飾protoxコード遺伝子で形質転換し得る、任意の植物細胞に適用可能であり、任意の対象導入遺伝子で使用し得る。導入遺伝子およびprotox遺伝子の発現は、植物細胞上で機能する同一プロモーター、あるいは個別のプロモーターによって制御し得る。

本発明の阻害物質耐性の修飾protox酵素は、天然protox活性を阻害する除草剤に対して耐性である。protoxを阻害する除草剤としては、多種多様の構造をもつ分子、即ち(Duke等, Weed Sci. 39: 465 (1991年); Nandi halil等, Pesticide Biochem. Physiol. 43: 193 (1992年); Matringe等, FEBS Lett. 245: 35 (1989年); YanaseおよびAndoh, Pesticide Biochem. Physiol. 35: 70 (1989年))、ジフェニルエーテル{(例えばacifluorifen、即ち5-[2-クロロ-4-(トリフルオロメチル)フェノキシ]-2-ニトロbenzoic acid; そのメチルエステル; あるいはオキシフルオルフェン、即ち2-クロロ-1-(3-エトキシ-4-ニトロフェノキシ)-4-(トリフルオロベンゼン)}、オキシジアゾール(例えばoxidiazon、3-[2,4-ジクロロ-5-(1-メチルエトキシ)フェニル]-5-(1,1-ジメチルエチル)-1,3,4-オキサジアゾール-2-(3H)-オン)、環状イミド(例えばS-23142、即ちN-(4-クロロ-2-フルオロ-5-プロパルギルオキシフェニル)-3,4,5,6-テトラ

10

20

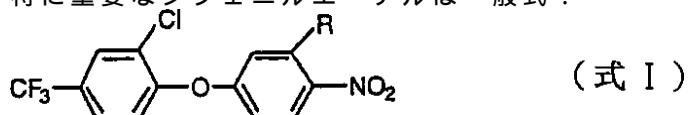
30

40

50

ヒドロフタルイミド；クロロphthalim、即ちN-(4-クロロフェニル-3,4,5,6-テトラヒドロフタルイミド)、フェニルピラゾール、(例えばTNPPエチル、エチル2-[1-(2,3,4-トリクロロフェニル)-4-ニトロピラゾリル-5-オキシ]プロピオネート；M&B 39279)、ピリジン誘導体(例えばLS 82-556)、phenopylateとそのO-フェニルピロリジノ-およびピペリジノカルバメート類似体などがある。

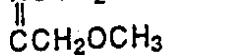
特に重要なジフェニルエーテルは一般式：



10

[式中、Rは-COONa(式II)、-CONHSO₂CH₃(式III)または-COOCH₂COOC₂H₅(式IV; Maigroot等, Brighton Crop Protection Conference-Weeds: 47~51(1989年)参照)と等しい]を有するものである。

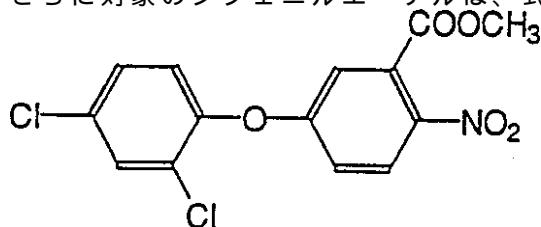
さらに対象のジフェニルエーテルは、Rが



(式IVa; Hayashi等, Brighton Crop Protection Conference-Weeds: 53~58(1989年)参照)と等しいものである。

20

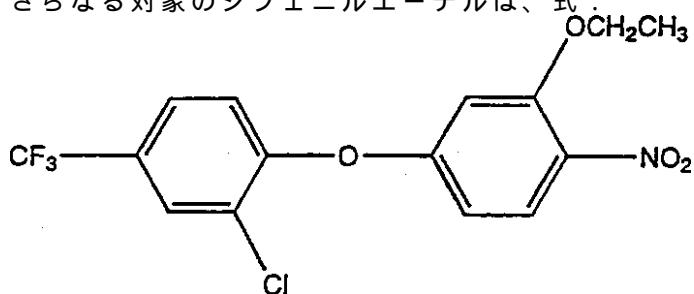
さらに対象のジフェニルエーテルは、式：



(式IVb; ビフェノックス、Dest等, Proc. Northeast Weed Sci. Conf. 27: 31(1973年)参照)を有するものである。

30

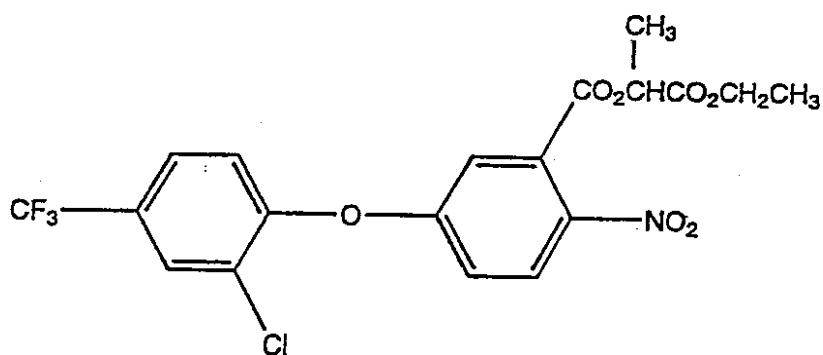
さらなる対象のジフェニルエーテルは、式：



(式IVc; オキシフルオルフェン; YihおよびSwithenbank, J. Agric. Food Chem. 23: 592(1975年)参照)を有するものである。

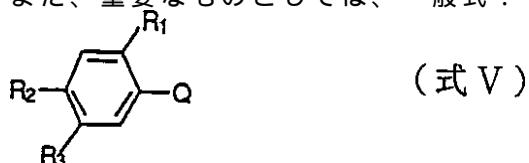
40

また別の対象のジフェニルエーテルは、式：

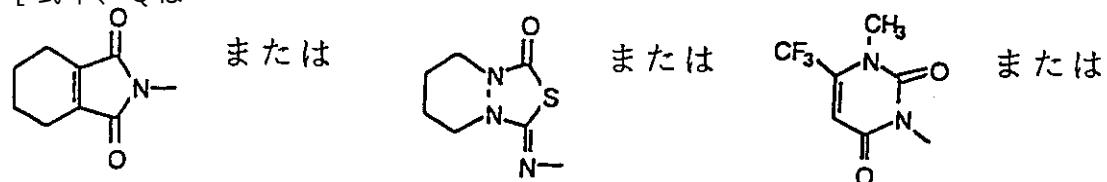


(式IVd; ラクトフェン著, C. Tomlin編「The Pesticide Manual」第10版, British Crop Protection Council, 英国サリー州(1994年)の623頁参照)を有するものである。

また、重要なものとしては、一般式:



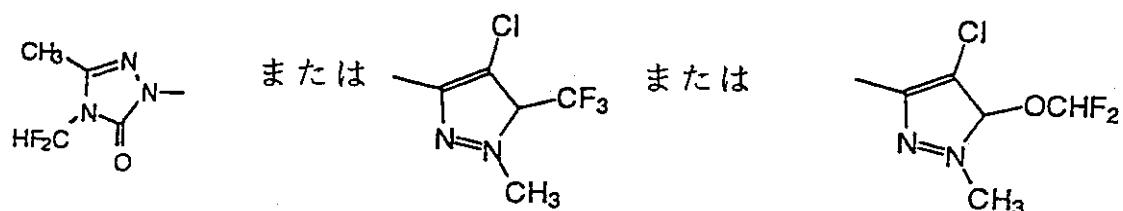
[式中、Qは



(式VII)

(式VIII)

(式IX)



(式IX)

(式IXa)

(式IXb)

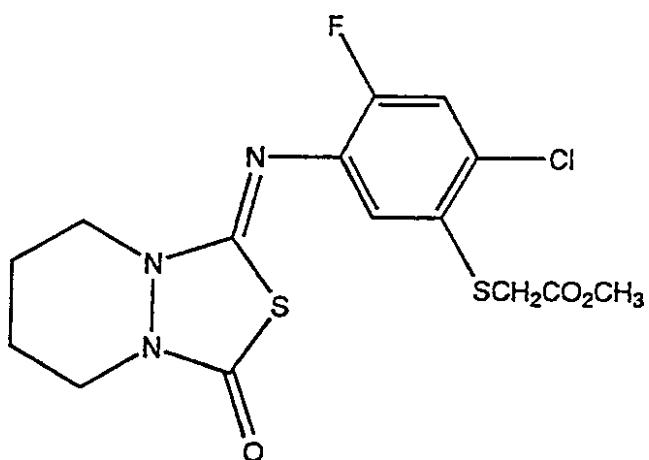
(Ragdale他編「Proceedings of the Eighth International Congress of Pesticide Chemistry」(第8回国際殺虫剤化学会議紀要)、Amer. Chem. Soc., ワシントン, 42~48(1994年)収載のHemper等(1995年)参照)と等しく、R₁はH、C1またはFと等しく、R₂はC1と等しく、R₃は最適に置換されたエーテル、チオエーテル、エステル、アミノまたはアルキル基である]を有するイミドとして知られている除草剤の品種がある。別法として、R₂とR₃が合わさって5員環または6員環の複素環を形成してもよい。特に関心の対象のイミド除草剤の例は、

10

20

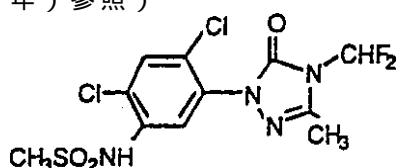
30

40



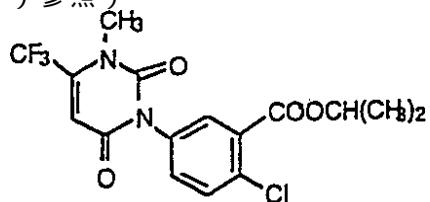
10

(式VIIa ; フルチアセット - メチル、Miyazawa等, Brighton Crop Protection Conference - Weeds 23~28 (1993年) 参照)



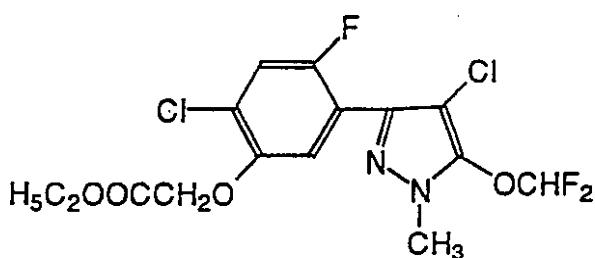
20

(式X : sulfentrazone、Van Saun等, Brighton Crop Protection Conference - Weeds 77~82 (1991年) 参照)



30

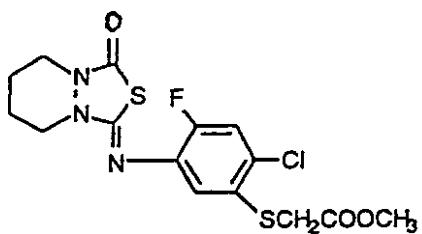
(式XI)



40

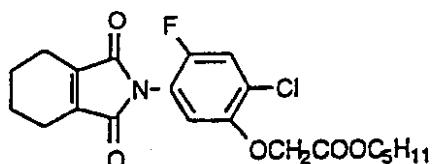
(式XII)

(Miura等, Brighton Crop Protection Conference - Weeds : 35~40 (1993年) 参照)

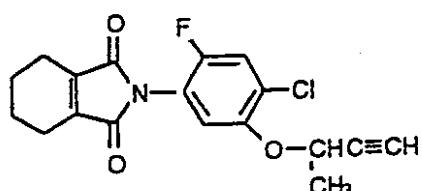


(式 XI-III)

10

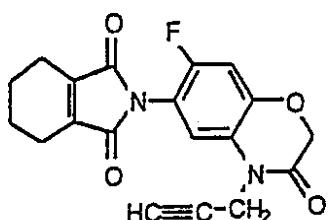


(式 XI-IV)



20

(式 XI-V)



30

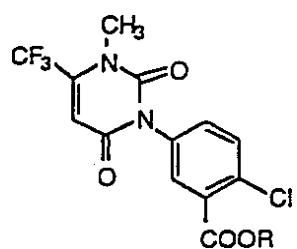
(式 XI-VI)

などである。

上記の化合物の除草活性は、Proceedings of the 1991 Brighton Crop Protection Conference, Weeds (British Crop Protection Council) (式Xおよび式XVI)、Proceedings of the 1993 Brighton Crop Protection Conference, Weeds (British Crop Protection Council) (式XI-IIIおよび式XI-IV)、米国特許第4,746,352号(式XI)およびAbstracts of the Weed Science Society of America第33巻9頁(1993年) (式XI-V)に記載されている。

40

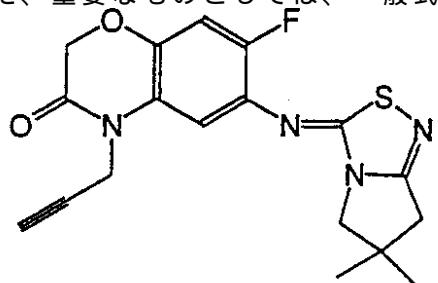
最も好ましいイミド除草剤はアリールウラシルに分類され、一般式：



(式XVII)

[式中、Rは参照により本明細書の一部とする米国特許第5,183,492号に開示される基(C₂~6-アルケニロキシ)カルボニル-C₁~4-アルキルを示す]を有するものである。

また、重要なものとしては、一般式：

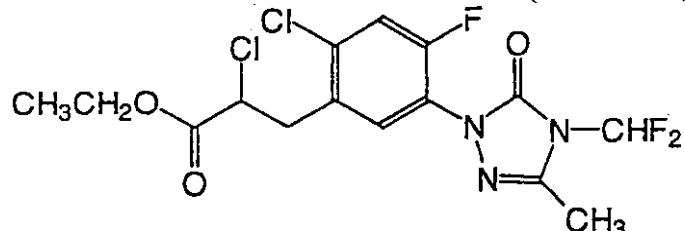


10

20

(式XVIII ; チアジアジン)

(WeilerらおよびBrighton Crop Protection Conference-Weeds 29~34 (1993年) 参照)

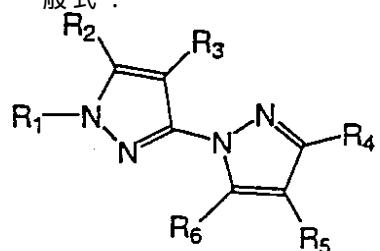


30

(式XIX ; carfentrazone)

(Van Saun等, Brighton Crop Protection Conference-Weeds: 19~22 (1993年) 参照)を有する除草剤、

一般式：



40

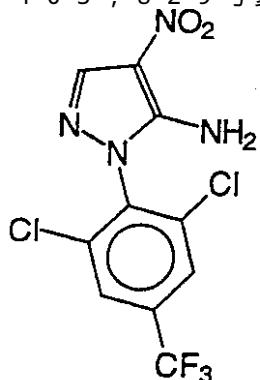
(式XX)

[式中、R₁は自由選択で1個以上のハロゲン原子と置換されたC₁~C₄のアルキルであり、R₂は水素、あるいは各々自由選択で1個以上のハロゲン原子と置換されたC₁~C₄のアルコキシであり、

R₁およびR₂は合わさって基-(CH₂)_n-X-(XはR₂で結合する)を形成し、

50

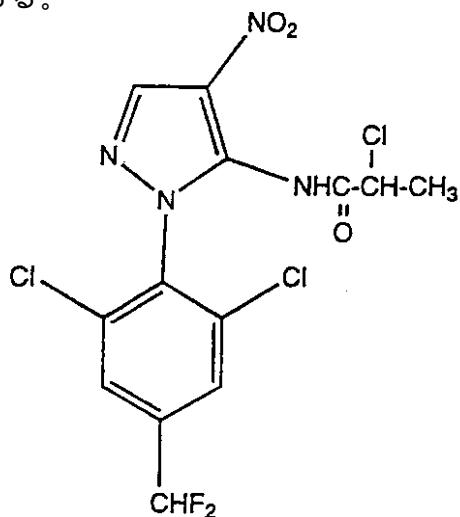
R_3 は水素またはハロゲンであり、
 R_4 は水素または $C_1 \sim C_4$ のアルキルであり、
 R_5 は水素、ニトロ、シアノ、あるいは基- $COOR_6$ または- $CONR_7R_8$ であり、
 R_6 は水素、 $C_1 \sim C_6$ のアルキル、 $C_2 \sim C_6$ のアルケニルまたは $C_2 \sim C_6$ のアルキニルである]のN置換ピラゾール、
(Scheringの国際特許公開WO 94/08999、WO 93/10100および米国特許第5,405,829号参照)、



10

(式XXI；nipyraclofen)

(C.R.Worthing編「Pesticide Manual」第9版, British Crop Protection Council, Surrey(1991年)の621ページを参照。)などのN-フェニルピラゾール、
および3-置換-2-アリール-4,5,6,7-tetrahydroindazoles(Lygaa等, Pesticide Sci. 42.29~36(1994年))などがある。



20

(式XXIa；BAY 11340)

また、重要なものとしては、WO 96/01254およびWO 97/00246(それらの両方を参照により本明細書の一部とする)に記載された種類のフェニルピラゾールがある。(式XXII)。

通常、protoxの活性を阻害する除草剤の量としては、当技術分野で知られている適用率などがあり、それは部分的に適用の環境、時間および方法などの外部要因に依存する。例えば、式V乃至式IXによって表わされるイミド除草剤、より詳しくは式X乃至式VIIによって表わされるイミド除草剤の場合、適用率は、0.0001~10kg/haの範囲であり、好ましくは0.005~2kg/haの範囲である。除草剤のこの適用

30

40

50

量または濃度は所望の作用および使用される特定の化合物によって異なり、当技術分野で知られている方法によって決定し得る。

本発明のさらなる目的は、アラビドプシス、サトウキビ、ダイズ、大麦、ワタ、タバコ、テンサイ、脂肪種子ナタネ、トウモロコシ、コムギ、モロコシ、ライ麦、エンバク、芝生および飼草、キビ、フォーレージおよびイネ等から成る群から選択される植物の集団に有効量の *protox* 阻害性除草剤を適用する段階を含む、好ましくない植生を調節する方法である。好ましいのは、ダイズ、ワタ、タバコ、テンサイ、脂肪種子ナタネ、トウモロコシ、コムギ、モロコシ、ライ麦、エンバク、飼草およびイネから成る群から選択される植物の集団に有効量の *protox* 阻害性除草剤を適用する段階を含む、好ましくない植生を調節する方法である。特に好ましいのは、アラビドプシス、ダイズ、ワタ、テンサイ、脂肪種子ナタネ、トウモロコシ、コムギ、モロコシおよびイネから成る群から選択される植物の集団に適用する段階を含む、好ましくない植生を調節する方法である。10

本発明をさらに、以下の詳細な実施例を参照することによって記載する。これらの実施例は説明のみの目的で提供するものであり、特に指示がない限り、限定しようとするものではない。

実施例

本明細書で使用する標準的な組換えDNAおよび分子クローニング技術は当技術分野でよく知られており、T. Maniatis, E. F. FritschおよびJ. Sambrook著「Molecular Cloning: A Laboratory manual (分子クローニング: 実験室マニュアル)」Cold Spring Harbor Laboratory, ニューヨーク市コールドスプリング港(1989年)と、T. J. Sillhavy, M. L. BermanおよびL. W. Enquist著「Experiments with Gene Fusions (遺伝子融合による実験)」Cold Spring Harbor Laboratory, ニューヨーク市コールドスプリング港(1984年)に記載されている。20

セクションA 植物プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ(*protox*)遺伝子の単離および特性決定

実施例1. *トウモロコシprotox-1*コード配列との配列相同性に基づくコムギ*protox-1cDNA*の単離

特別注文で Uni-Zapベクター中でcDNAライブラリーを構築するため、*Triticum aestivum* (栽培品種: Kanzler) から調製したRNA全体を Clontech に提出した。およそ 50,000 pfu の cDNA ライブラリーをペトリ皿 10 cm 当たりおよそ 5,000 pfu の密度でプレーティングし、ニトロセルロース膜上に複製フィルター・リフトを作製した (Schleicher および Schuel 1)。このブラークリフトをランダムブライミング法 (Life Technologies) により 32P-dCTP で標識し、トウモロコシ *protox-1cDNA* (配列番号: 5; 1995年6月8日に出願され、1995年12月21日にWO95/34659 として公開された国際出願PCT/IB95/00452 の実施例2参照) で探査した。ハイブリダイゼーション条件は 7% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、0.5 M NaPO₄ (pH 7.0)、1 mM EDTA、50 であった。洗浄条件は、2倍濃度 SSC、1% SDS、50 とした (Church およびギルバート, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 1991~1995. (1984年)、その全体を参照により本明細書の一部とする) とした。ポジティブにハイブリダイズしたブラークを精製し、*in vivo* で切り出して pBlue script プラスミドに挿入した。cDNA インサートの配列を蛍光性色素 (Applied Biosystems 社) で標識したジデオキシターミネーターを使用する連鎖停止法によって決定した。最初のスクリーン作業から得られた「コムギ *protox-1*」と称する最長のコムギ *protox-1cDNA* は、長さが 1489 塩基対であった。既知の他の植物 *protox* ペプチド配列との比較によると、コムギ *protox-1* は、輸送ペプチドのコード配列と成熟コード配列のおよそ 126 個のアミノ酸が欠失している。304050

より長いコムギ *protox* cDNAを得るために2回目のスクリーンを実施した。このスクリーンでは、Uni-Zapベクターを使用して、生体内で *Triticum aestivum* (栽培品種: Kanzler) cDNAライブラリーを調製した。プローブおよびハイブリダイゼーションとしてコムギ *Protox-1* cDNAを使用し、洗浄条件を 50 の代わりに 65 とした以外は上記と同様にして、およそ 200,000 pfu の DNA ライブラリーをスクリーンした。このスクリーン作業から得られた「コムギ *Protox1a*」と称する最長のコムギ cDNA は、長さ 1811 塩基対であった。この cDNA のヌクレオチド配列およびそれがコードするアミノ酸配列をそれぞれ配列番号: 9 および 10 に示す。他の公知の植物 *protox* ペプチド配列および相当するゲノム配列と比較すると、この cDNA は完全長であるか、ほんの少数の輸送ペプチド・コドンが欠失している(表1)。このコムギ蛋白配列は、配列番号: 6 に示すトウモロコシ *protox-1* 蛋白配列と 91% 相同(95%類似)である。

pBluescript SKベクター中のコムギ *Protox-1a* を 1996 年 3 月 19 日に pWDC-13 (NRL#B21545) として寄託した。

実施例 2. アラビドプシス *protox-1* コード配列との配列相同性に基づくダイズ *protox-1* cDNA の単離

ダイズ (var. Williams 82、上胚軸) から調製された *Lambda Uni-Zap* cDNA ライブラリーを Stratagene から購入した。およそ 50,000 pfu のライブラリーをペトリ皿 10 cm当たりおよそ 5,000 pfu の密度でプレーティングし、コロニー/ブラーク・スクリーン膜 (NEN Dupont) 上に複製フィルター・リフトを作製した。このブラークリフトをランダムプライミング法 (Life Technologies) により 32P-dCTP で標識し、アラビドプシス *protox-1* cDNA (配列番号: 1; 1995 年 6 月 8 日に出願され、1995 年 12 月 21 日に WO95/34659 として公開された国際出願 PCT/IB95/00452 の実施例 1 参照) で探査した。ハイブリダイゼーション条件は 7% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、0.5M NaPO₄ (pH 7.0)、1mM EDTA、50 とした。

洗浄条件は、2 倍濃度 SSC、1% SDS、50 であった (Church およびギルバート (1984 年) とした。ハイブリダイズ陽性のブラークを精製し、in vivo で切り出して pBluescript プラスミドに挿入した。cDNA インサートの配列を蛍光性色素 (Applied Biosystems 社) で標識したジデオキシタミネーターを使用する連鎖停止法によって決定した。「ダイズ *protox-1*」と称する、得られた最長のダイズ cDNA は、既知の他の植物 *protox* ペプチド配列との比較によると完全長である(表1)。ダイズ *protox-1* は長さが 1847 塩基対であり、58.8 kDa の蛋白質をコードする。この cDNA のヌクレオチド配列およびそれがコードするアミノ酸配列をそれぞれ配列番号: に 11 および 12 示す。このダイズ蛋白はアラビドプシス *protox-1* 蛋白と 78% 相同(87%類似)である。

pBluescript SKベクター中のダイズ *protox-1* を 1995 年 12 月 15 日に pWDC-12 (NRL#B21516) として寄託した。

配列番号: 2、6、10、12、15、17、19、21、23 に示す配列によりコードされる、それぞれの蛋白質の予想アミノ酸配列のアライメントを表1に示す。配列番号: 4 と 8 に示す配列によりコードされる、それぞれの蛋白質の予想アミノ酸配列を表2に示す。

表1

アラビドブシス（「A r a b p t - 1」、配列番号：2）、トウモロコシ（「M z p t - 1」、配列番号：6）、コムギ（「W t p t - 1」、配列番号：10）、S o y b e a n（「S o y b e a n p t - 1」、配列番号：12）、ワタ（「C o t t o n p t - 1」、配列番号：16）、テンサイ（「S u g p t 1」、配列番号：18）、ナタネ（「R a p e p t - 1」、配列番号：20）、イネ（「R i c e p t - 1」、配列番号：22）およびモロコシ（「S o r g h u m p t - 1」、配列番号：24）由来のP r o t o x - 1アミノ酸配列の比較

P i l e U p プログラム（G C G パッケージ、ウィスコンシン大学、ウィスコンシン州マディソン）を使用してアライメントを実施する。阻害物質耐性を付与または増強するために本明細書の教示によって変更し得る位置を太字で示す。

1	50	
Rapept-1MDLSLLRP.. QPFLSPFSNP FPRSRPYKPL	
Arabpt-1MELSLLRPTT QSLLPSFSKP NLRLNVYKPL	
Sorghumpt-1	
Mzpt-1	
Wtpt-1M ATATVAAASP LRGRVTGRPH	
Ricept-1	
Cottonpt-1MTAL IDLSLLRSSP SVSPFSIPH QHPPRFRKPF	10
Soybeanpt1MV SVFNEILFPP NQTLRPSLH SPTSFFTSPT RKFPRSRPNP	
Sugpt-1	MKSMAISNCI PQTQCMPLRS SGHYRGNCIM LSIPCSLIGR RGYYSHKKRR	
51	100	
Rapept-1	NLRCCSVSGGS VVGSSTIEGG GGGKIVIADC VIVGGGISGL CIAQALVIKH	
Arabpt-1	RLRCSVAGGP TVGSSKIEGG GGT.TITTDC VIVGGGISGL CIAQALATKH	
Sorghumpt-1	
Mzpt-1ADC VVGGGISGL CIAQALATRH	20
Wtpt-1	KVRPRCATAS SATETPAAPG VRL...SAEC VIVGAGISGL CIAQALATRY	
Ricept-1	
Cottonpt-1	KLRCSLAEGP TISSSKIDGG ESS...IADC VIVGGGISGL CIAQALATKH	
Soybeanpt1	ILRCSIAEES TASPPKTR.. DSA...PVDC VVGGGVSGL CIAQALATKH	
Sugpt-1	MSMSCSTSSG SKSAVKEAGS GSGAGGLLDC VIVGGGISGL CIAQALCTKH	
101	150	
Rapept-1	PDA..AKNVM VTEAKDRVGG NIIT..REQ GFLWEEGPNS FQPSDPMLIM	30
Arabpt-1	PDA..APNLI VTEAKDRVGG NIIT..REEN GFLWEEGPNS FQPSDPMLIM	
Sorghumpt-1SIVVERPEE GYLWEEGPNS FQPSDPVLSM	
Mzpt-1	..G..VGDVL VTEARARPGG NITTVERPEE GYLWEEGPNS FQPSDPVLM	
Wtpt-1	..G..VSDLL VTEARDRPGG NITTVERPDE GYLWEEGPNS FQPSDPVLM	
Ricept-1	
Cottonpt-1	RDV..ASNVI VTEARDRPGG NITTVER..D GYLWEEGPNS FQPSDPILIM	
Soybeanpt1	..A..NANVV VTEARDRPGG NITIMER..D GYLWEEGPNS FQPSDPMLIM	40
Sugpt-1	SSSSLSPNFI VTEAKDRVGG NIVIVE..AD GYLWEEGPNS FQPSDAVLIM	

151

200

Rapept-1 VWDGGLKDDL VLGDPTAPRF VIWNGKLRLPV PSKLTDLPFF DLMSIGGKIR
 Arabpt-1 VWDGGLKDDL VLGDPTAPRF VIWNGKLRLPV PSKLTDLPFF DLMSIGGKIR
 Sorghumpt-1 AVDGLKDDL VFGDPNAPRF VIWEGKLRLPV PSKPADLPFF DLMSIPGKLR
 Mzpt-1 AVDGLKDDL VFGDPNAPRF VIWEGKLRLPV PSKPADLPFF DLMSIPGKLR
 Wtpt-1 AVDGLKDDL VFGDPNAPRF VIWEGKLRLPV PSKPGDLPFF SLMSIPGKLR
 Ricept-1
 Cottonpt-1 AVDGLKDDL VLGDPTAPRF VIWEGKLRLPV PSKPTDLPFF DLMSIAGKLR
 10 Soybeanpt1 VWDGGLKDEL VLGDPTAPRF VIWNRKLRLPV PGKLTDLPFF DLMSIGGKIR
 Sugpt-1 AVDGLKDEL VLGDPTAPRF VLWNDKLRLPV PSSLTDLPFF DLMTIPGKIR

201

250

Rapept-1 AGFGAIGIRP SPPGREESVE EFVRRNLGDE VFERLIEPPC SGVYAGDPAK
 Arabpt-1 AGFGALGIRP SPPGREESVE EFVRRNLGDE VFERLIEPPC SGVYAGDPSK
 Sorghumpt-1 AGLGALGIRP PAPGREESVE EFVRRNLGAE VFERLIEPPC SGVYAGDPSK
 Mzpt-1 AGLGALGIRP PPPGREESVE EFVRRNLGAE VFERLIEPPC SGVYAGDPSK
 20 Wtpt-1 AGLGALGIRP PPPGREESVE EFVRRNLGAE VFERLIEPPC SGVYAGDPSK
 Ricept-1
 Cottonpt-1 AGFGAIGIRP PPPGYEESVE EFVRRNLGAE VFERFIEPPC SGVYAGDPSK
 Soybeanpt1 AGFGALGIRP PPPGHEESVE EFVRRNLGDE VFERLIEPPC SGVYAGDPSK
 Sugpt-1 AALGALGFRP SPPPHEESVE HFVRRNLGDE VFERLIEPPC SGVYAGDPAK

251

300

30

Rapept-1 LSMKAAGKV WKLEENGSSI IGGAFKAIQA KNKAPKTIKD PRLPKPKGQT
 Arabpt-1 LSMKAAGKV WKLEQNGSSI IGGTFKAIQE RKNAPKAERD PRLPKPKGQT
 Sorghumpt-1 LSMKAAGKV WRLEEAGGSI IGGTIKTIQE RGKNPKPPRD PRLPKPKGQT
 Mzpt-1 LSMKAAGKV WRLEETGGSI IGGTIKTIQE RSKNPKPPRD ARLPKPKGQT
 Wtpt-1 LSMKAAGKV WRLEEIGGSI IGGTIKAIQD KGKNPKPPRD PRLPAPKGQT
 Ricept-1 RALKAAFGKV WRLEDIGGSI IGGTIKTIQE RGKNPKPPRD PRLPTPKGQT
 Cottonpt-1 LSMKAAGGRV WKLEEIGGSI IGGTFKTIQE RNKTPKPPRD PRLPKPKGQT
 40 Soybeanpt1 LSMKAAGKV WKLEKNGSSI IGGTFKAIQE RNGASKPPRD PRLPKPKGQT
 Sugpt-1 LSMKAAGKV WKLEQKGGSI IGGTLKAIQE RGSNPKPPRD QRLPKPKGQT

301

350

Rapept-1 VGSFRKGLIM LPEAISARLG DKVKVSWKLS SITKLASGEY SLTYETPEGI
 Arabpt-1 VGSFRKGLRM LPEAISARLG SKVKLSWKLS GITKLESGGY NLTYETPDGL
 Sorghumpt-1 VASFRKGLAM LPNAITSSLG SKVKLSWKLT SITKSDGKY VLEYETPEGV
 Mzpt-1 VASFRKGLAM LPNAITSSLG SKVKLSWKLT SITKSDDGKY VLEYETPEGV
 Wtpt-1 VASFRKGLAM LPNAIASRLG SKVKLSWKLT SITKADNQGY VLGYETPEGL
 Ricept-1 VASFRKGLTM LPDAITSRLG SKVKLSWKLT SITKSINKGY ALVYETPEGV
 Cottonpt-1 VGSFRKGLTM LPEAIANSLG SNVKLSWKLS SITKLGNGGY NLTFETPEGM
 Soybeanpt1 VGSFRKGLTM LPDAISARLG NKVKLSWKLS SISKLDSGEY SLTYETPEGV
 Sugpt-1 VGSFRKGLVM LPTAISARLG SRVKLSWILS SIVKSLNGEY SLTYDTPDGL

10

351

400

Rapept-1 VIVQSKSVVM TVPSHVASSL LRPLSDSAAE ALSKLYYPPV AAVSISYAKE
 Arabpt-1 VSVQSKSVVM TVPSHVASGL LRPLSESAAN ALSKLYYPPV AAVSISYPKE
 Sorghumpt-1 VLVQAKSVIM TIPSYVASDI LRPLSGDAAD VLSRFYYPPV AAVTVSYPKE
 Mzpt-1 VSVQAKSVIM TIPSYVASNI LRPLSSDAAD ALSRFYYPPV AAVTVSYPKE
 Wtpt-1 VSVQAKSVIM TIPSYVASDI LRPLSIDAAD ALSKFYYPPV AAVTVSYPKE
 Ricept-1 VSVQAKTVVM TIPSYVASDI LRPLSSDAAD ALSIFYYPPV AAVTVSYPKE
 Cottonpt-1 VSLQSRSVVM TIPSHVASNL LHPLSAAAAD ALSQFYYPPV ASVTVSYPKE
 Soybeanpt1 VSLQCKTIVVL TIPSYVASTL LRPLSAAAAD ALSKFYYPPV AAVSISYPKE
 Sugpt-1 VSVRTKSVVM TVPSYVASRL LRPLSDSAAD SLSKFYYPPV AAVSLSYPK

20

401

450

Rapept-1 AIRSECLIDG ELKGFQQLHP RTQKVELGTYIYSSSLFPNR APPGRVLLLN
 Arabpt-1 AIRTECLIDG ELKGFQQLHP RTQGVETLGT IYSSSLFPNR APPGRILLLN
 Sorghumpt-1 AIRKECLIDG ELQGFQQLHP RSQGVETLGT IYSSSLFPNR APAGRVLNN
 Mzpt-1 AIRKECLIDG ELQGFQQLHP RSQGVETLGT IYSSSLFPNR APDGRVLLLN
 Wtpt-1 AIRKECLIDG ELQGFQQLHP RSQGVETLGT IYSSSLFPNR APAGRVLNN
 Ricept-1 AIRKECLIDG ELQGFQQLHP RSQGVETLGT IYSSSLFPNR APAGRVLNN
 Cottonpt-1 AIRKECLIDG ELKGFQQLHP RSQGIELGTYIYSSSLFPNR APSGRVLLNN
 Soybeanpt1 AIRSECLIDG ELKGFQQLHP RSQGVETLGT IYSSSLFPNR APPGRVLLNN
 Sugpt-1 AIRSECLING ELQGFQQLHP RSQGVETLGT IYSSSLFPGR APPGRILILS

30

40

451

500

Rapept-1 YIGGAINIGI LSKSEGELVE AVDRDLRKML IKPSSTDPLV LGVKLWPQAI
 Arabpt-1 YIGGINTIGI LSKSEGELVE AVDRDLRKML IKPNSTDPLK LGVRVWPQAI
 Sorghumpt-1 YIGGAINIGI VSKTESELVE AVDRDLRKML INPTAVDPLV LGVRVWPQAI
 Mzpt-1 YIGGAINIGI VSKTESELVE AVDRDLRKML INSTAVDPLV LGVRVWPQAI
 Wtpt-1 YIGGINTIGI VSKTESDLVG AVDRDLRKML INPRAADPLA LGVRVWPQAI
 Receipt-1 YIGGINTIGI VSKTESELVE AVDRDLRKML INPRAVDPLV LGVRVWPQAI
 Cottonpt-1 YIGGAINIGI LSKTESELVE AVDRDLRKML INPNAKDPLV LGVRVWPKAI
 Soybeanpt1 YIGGAINIGI LSKTDSSELVE TVDRDLRKIL INPNAQDPFV VGVRVLPQAI
 Sugpt-1 YIGGAKNPGI LNKSKDELAK TVDKDLRRML INPDAKLPRV LGVRVWPQAI

501

550

Rapept-1 PQFLIGHIDL VDAAKASLSS SGHEGLFLGG NYVAGVALGR CVEGAYETAT
 Arabpt-1 PQFLVGHFDI LDTAKSSLTS SGYEGFLFLGG NYVAGVALGR CVEGAYETAI
 Sorghumpt-1 PQFLVGHLDL LEAAKSALDQ GGYNGLFLGG NYVAGVALGR CIEGAYESAA
 Mzpt-1 PQFLVGHLDL LEAAKAALDR GGYDGLFLGG NYVAGVALGR CVEGAYESAS
 Wtpt-1 PQFLIGHLDL LAAAKSALGQ GGYDGLFLGG KYVAGVALGR CIEGAYESAS
 Receipt-1 PQFLIGHLDH LEAAKSALGK GGYDGLFLGG NYVAGVALGR CVEGAYESAS
 Cottonpt-1 PQFLVGHLDL LDSAKMALRD SGFHGLFLGG NYVSGVALGR CVEGAYEVAA
 Soybeanpt1 PQFLVGHLDL LDVAKASIRN TGFEGLFLGG NYVSGVALGR CVEGAYEVAA
 Sugpt-1 PQFSIGHFDL LDAAKAALTD TGVKGLFLGG NYVSGVALGR CIEGAYESAA

551

563

30

Rapept-1 QVNDFMSRYA YK*
 Arabpt-1 EVNNFMSRYA YK*
 Sorghumpt-1 QIYDFLTKYA YK*
 Mzpt-1 QISDFLTKYA YK*
 Wtpt-1 QVSDFLTKYA YK*
 Receipt-1 QISDYLTKYA YK*
 Cottonpt-1 EVKEFLSQYA YK*
 Soybeanpt1 EVNDFLINRV YK*
 Sugpt-1 EVVDFLSQYS DK*

40

表 2

アラビドプシス（配列番号：4）およびトウモロコシ（配列番号：8）のProtox-2アミノ酸配列の比較

相同残基を2つの配列間の縦棒によって示す。Deveraux等, Nucleic Acids Res. 12: 387~395 (1984年) に記載されているGAPプログラムを使用してアライメントを実施する。

類似性(%) : 75.889 ; 同一性(%) : 57.905
Protox-2ペプチド × Mzprotox-2ペプチド

1MASGAVAD.HQIEAVSGKRVAV 21	
1	MLALTASASSASSHPYRHASAHTRRPRLRAVLAMAGSDDPRAAPARSAV 50	20
22	VGAGVSGLAAAYKLKSRGLNVTVFADGRVGGKLR SVMQNGLIWDEGANT 71	
51	VGAGVSGLAAAYRLRQSGVNVTVF EAADRAGGKIR TNSEGGFWDEGANT 100	
72	MTEAEPEVGSLDDLGLREKQQFPISQKKRYIVRNGVPVMLPTNPIELVT 121	
101	MTEGEWEASRLIDDLGLQDKQQYPNSQHKRYIVKDGA PALI PSDLPI SLMK 150	30
122	SSVLSTQSKFQILLEPFLWKK....KSSKVSDASAEESVSEFFQRHFGQE 167	
151	SSVLSTKSKIALFFEPFLYKKANTRNSGVSEEHLS ESVG SF CERHFGRE 200	
168	VVDYLIDPFVGGTSAADPDSL SMKHSFPDLWNVEKSFGSII V GAI RTKFA 217	
201	VVDYFVDPFVAGTSAGDPESLSIRHAFPALWNLERKYGSIVGAILSKLA 250	40
218	AKGGKSRDTKSSPGTKGSRGFSFKGGMQLPDTLCKSLSHDEINLDSK 267	
251	AKGDPVKTRHDSSGKRRNRRV SFSFHGGMQLINALHNEVGDDNVKL GTE 300	

268 VLSLS..YNSGSRQENWSLSCVSHNETORO...NPHYDAVIMTAPlCNVK 312

301 VLSLACTFDGVPALGRWSISVDSKDSGDKDLASNOTEDAVIMTAIPLSNVR 350

313 EMKVMKGOPFOLNFLPEINYMPLSVLITTETKEKVKRPIEGEGVLI.PSK 362

351 RMKFTKGAPVVLDFLPKMDVPLSLMVTAFKKKDVKKPLGEGEVLTIVK 400

10

363 E.QKHGFKTLGTLFSSMMFPDRSPSDVHLVTTFIGGSRNOELAKASTDEL 411

401 EQQKHGLKTLGTLFSSMMFPDRAPDPOYLTTTEVGGSHNRDLAGAPTSIL 450

412 KQVVTSDLRLLGVEGEPVSVNHYYWRKAEPLYDSSYD SVMEAIDKMEND 461

451 KQLVTSSDLKKLLGVEGOPTFVKHVVWGNAEPLYGHDVSSVLEATEKMEKN 500

20

462 LPGFFYAGNHRGGLSVGKSIASGCKAADLVI SYLES CSDKKPNDL* 509

501 LPGFFYAGNSKDGLAVGSIASGSKAADLAI SYLESHTKHNNSH*... 545

実例3. トウモロコシ Protox-1 コード配列との配列相同性に基づくワタ Protox-1 cDNA の単離

Gossypium hirsutum L. (72時間暗生長子葉)から調製された Uni-Zap cDNAライブラリーをアリゾナ州立大学植物学教室の Dick T release 博士から入手した (Ni W. および T release R. N., Arch. Biochem. Biophys. 289: 237~243 (1991年))。およそ 50,000 pfu のライブラリーをペトリ皿 10 cm当たりおよそ 5,000 pfu の密度でプレーティングし、コロニー / プラーク・スクリーン膜 (NEN Dupont) 上に複製フィルター・リフトを作製した。このプラークリフトをランダムプライミング法 (Life Technologies) により 32P-dCTP で標識し、トウモロコシ Protox-1 cDNA (配列番号: 5) で探査した。ハイブリダイゼーション条件は 7% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、0.5M NaPO₄ (pH 7.0)、1mM EDTA、50 とした。洗浄条件は、2倍濃度 SSC、1% SDS、50 であった (Church およびギルバート (1984年) とした。ハイブリダイズ陽性のプラークを精製し、in vivo で切り出して pBluescript プラスミドに挿入した。cDNA インサートの配列を蛍光性色素 (Applied Biosystems 社) で標識したジデオキシタミネーターを使用する連鎖停止法によって決定した。「ワタ Protox-1」と称する、得られた最長のワタ cDNA は、既知の他の植物 protox ペプチド配列との比較によると完全長である (表 1)。ワタ Protox-1 は長さが 1826 塩基対であり、58.2 kDa の蛋白質をコードする。この cDNA のヌクレオチド配列およびそれがコードするアミノ酸配列をそれぞれ配列番号: に 13 および 14 示す。このワタ蛋白はアラビドプシス Protox-1 蛋白と 77% 相同 (86% 類似) である。

p B l u e s c r i p t SKベクター中のワタProtox-1を1996年7月1日にpWDC-15(NRRL#B-21594)として寄託した。

実施例4. アラビドプシス Prototox-1 コード配列との配列相同性に基づくテンサイ

50

Protox-1 cDNAの単離

vulgaris から調製された - Zap cDNAライブラリーを Plant Science Institute (ペンシルヴェニア州フィラデルフィア) 植物学部門の Philip Rea 博士から入手した (Yongcheol Kim, Eugenie J. Kim および Philip A. Rea, Plant Physiol. 106: 375 ~ 382 (1994年))。およそ 50,000 pfu の cDNA ライブラリーをペトリ皿 10 cm 当たりおよそ 5,000 pfu の密度でプレーティングし、ニトロセルロース膜上に複製フィルター・リフトを作製した (Schleicher および Schuell)。このブラークリフトをランダムプライミング法 (Life Technologies) により 32P-dCTP で標識し、アラビドプシス Protox-1 cDNA (配列番号: 1) で探査した。ハイブリダイゼーション条件は 7% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、0.5 M NaPO₄ (pH 7.0)、1 mM EDTA、50 とした。洗浄条件は、2 倍濃度 SSC、1% SDS、50 であった (Church およびギルバート (1984年) とした。ハイブリダイズ陽性のブラークを精製し、in vivo で切り出して pBluecript プラスミドに挿入した。cDNA インサートの配列を蛍光性色素 (Applied Biosystems 社) で標識したジデオキシタミネーターを使用する連鎖停止法によって決定した。「テンサイ Protox-1」と称する、得られた最長のテンサイ Protox-1 cDNA は、既知の他の植物 protox ペプチド配列との比較によると完全長である (表 1)。テンサイ Protox-1 は長さが 1910 塩基対であり、60 kDa の蛋白質をコードする。この cDNA のヌクレオチド配列およびそれがコードするアミノ酸配列をそれぞれ配列番号: に 15 および 16 示す。このテンサイ蛋白はアラビドプシス Protox-1 蛋白と 73% 相同 (82% 類似) である。

pBluecript SKベクター中のテンサイ Protox-1 を 1996 年 7 月 29 日に pWDC-16 (NRRL # B-21595N) として寄託した。

実施例 5. アラビドプシス Protox-1 コード配列との配列相同性に基づくナタネ Protox-1 cDNA の単離

Brassica napus (3 ~ 4 週、成熟緑葉) から調製された Uni-Zap II cDNA ライブラリーをヨハネス・グーテンベルク大学マインツ校 Institut Fuer Allgemeine Botanik (ドイツ) の Guenther Ochs 博士から入手した (Guenther Ochs, Gerald Schrock および Aloysis Wild, Plant Physiol. 103: 303 ~ 304 (1993年))。およそ 50,000 pfu の cDNA ライブラリーをペトリ皿 10 cm 当たりおよそ 5,000 pfu の密度でプレーティングし、ニトロセルロース膜上に複製フィルター・リフトを作製した (Schleicher および Schuell)。このブラークリフトをランダムプライミング法 (Life Technologies) により 32P-dCTP で標識し、アラビドプシス Protox-1 cDNA (配列番号: 1) で探査した。ハイブリダイゼーション条件は 7% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、0.5 M NaPO₄ (pH 7.0)、1 mM EDTA、50 とした。洗浄条件は、2 倍濃度 SSC、1% SDS、50 であった (Church およびギルバート (1984年) とした。ハイブリダイズ陽性のブラークを精製し、in vivo で切り出して pBluecript プラスミドに挿入した。cDNA インサートの配列を蛍光性色素 (Applied Biosystems 社) で標識したジデオキシタミネーターを使用する連鎖停止法によって決定した。「ナタネ Protox-1」と称する、得られた最長のナタネ Protox-1 cDNA は、既知の他の植物 protox ペプチド配列との比較によると完全長である (表 1)。ナタネ Protox-1 は長さが 1784 塩基対であり、57.3 kDa の蛋白質をコードする。この cDNA のヌクレオチド配列およびそれがコードするアミノ酸配列をそれぞれ配列番号: に 17 および 18 示す。このナタネ蛋白はアラビドプシス Protox-1 蛋白と 87% 相同 (92% 類似) である。

pBluecript SKベクター中のナタネ Protox-1 を 1996 年 8 月 250

3日にpWDC-17 (NRR L # B-21615) として寄託した。

実施例6. トウモロコシProtox-1コード配列との配列相同性に基づくイネProtox-1cDNAの単離

Oryza sativa (5日間黄化した苗条) から調製された gtl1 cDNA ライブラーを Clontech から購入した。およそ 50,000 pfu の cDNA ライブラーをペトリ皿 10 cm 当たりおよそ 5,000 pfu の密度でプレーティングし、ニトロセルロース膜上に複製フィルター・リフトを作製した (Schleicher および Schuell)。このブラークリフトをランダムプライミング法 (Life Technologies) により 32P-dCTP で標識し、トウモロコシ Protox-1 cDNA (配列番号: 5) で探査した。ハイブリダイゼーション条件は 7% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、0.5 M NaPO₄ (pH 7.0)、1 mM EDTA、50 とした。洗浄条件は、2倍濃度 SSC、1% SDS、50 であった (Church および ギルバート (1984年) とした。ハイブリダイズ陽性のブラークを精製し、Wizard - Prep キット (Promega) を使用して、DNA を調製した。標準の技術を使用して、この cDNA インサートを pBluescript SK ベクターに Eco RI 断片としてサブクローン化した。cDNA インサートの配列を蛍光性色素 (Applied Biosystems 社) で標識したジデオキシタミネーターを使用する連鎖停止法によって決定した。「イネ Protox-1」と称する、得られた最長のイネ Protox-1 cDNA は、長さが 1224 塩基対であった。既知の他の植物 protox ペプチド配列との比較によると、成熟コード配列のおよそ 172 個のアミノ酸と輸送ペプチドコード配列が欠失している (表 1)。この部分 cDNA のヌクレオチド配列およびそれがコードするアミノ酸配列をそれぞれ配列番号: に 19 および 20 示す。

pBluescript SK ベクター中のイネ Protox-1 を 1996 年 12 月 6 日に pWDC-18 (NRR L # B-21648) として寄託した。

実施例7. トウモロコシProtox-1コード配列との配列相同性に基づいたモロコシProtox-1cDNAの単離

Sorghum bicolor (3~6日の緑色実生苗) から調製された - Zap I cDNA ライブラーをシュツットガルト大学細胞生物免疫研究所 (ドイツ) の Klaus Pfizenmaier 博士から入手した (Herald Wajant、Karl-Wolfgang Mundry および Klaus Pfizenmaier, Plant Mol. Biol. 26: 735~746 (1994年))。およそ 50,000 pfu の cDNA ライブラーをペトリ皿 10 cm 当たりおよそ 5,000 pfu の密度でプレーティングし、ニトロセルロース膜上に複製フィルター・リフトを作製した (Schleicher および Schuell)。このブラークリフトをランダムプライミング法 (Life Technologies) により 32P-dCTP で標識し、トウモロコシ Protox-1 cDNA (配列番号: 5) で探査した。ハイブリダイゼーション条件は 7% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、0.5 M NaPO₄ (pH 7.0)、1 mM EDTA、50 とした。洗浄条件は、2倍濃度 SSC、1% SDS、50 であった (Church および ギルバート (1984年) とした。ハイブリダイズ陽性のブラークを精製し、in vivo で切り出して pBluescript プラスミドに挿入した。cDNA インサートの配列を蛍光性色素 (Applied Biosystems 社) で標識したジデオキシタミネーターを使用する連鎖停止法によって決定した。「モロコシ Protox-1」と称する、得られた最長のモロコシ Protox-1 cDNA は、長さが 1590 塩基対であった。既知の他の植物 protox ペプチド配列との比較によると、成熟コード配列のおよそ 44 個のアミノ酸と輸送ペプチドコード配列が欠失している (表 1)。この部分 cDNA のヌクレオチド配列およびそれがコードするアミノ酸配列をそれぞれ配列番号: に 21 および 22 示す。

pBluescript SK ベクター中のモロコシ Protox-1 を 1996 年 12 月 6 日に pWDC-19 (NRR L # B21649) として寄託した。

実施例8. 細菌系での Protox 阻害性除草剤に対する植物 Protox クローンの感

10

20

20

30

30

40

40

50

受性実験

Protox-1/SAX38、Protox-2/SAX38およびpBluescript/XL1-Blueの液体培養物をLamp¹⁰⁰中で培養した。様々な濃度(1.0nM~10mM)の式XVIのprotox阻害性アリールウラシル除草剤を含む各培養物の100μlアリコートをLamp¹⁰⁰培地上にプレーティングした。各平板の2組ずつを37で18時間インキュベートした。

protox⁺大腸菌株XL1-Blueは、いかなる濃度でも除草剤に感受性を示さず、報告されている類似除草剤に対する天然細菌酵素の耐性と一致した。Protox-1/SAX38は明らかに感受性であり、10nMという低濃度の阻害物質によって細菌層がほぼ完全に除去された。より高い濃度(10uM)の除草剤だけではProtox2/SAX38も感受性であった。除草剤は、ほぼ完全な暗中に維持した平板上でさえ有効であった。平板に20ug/mlのヘマチンを添加したところ、除草剤毒性が完全に除去された。

2つの植物Protox株間での異なる除草剤許容性は、酵素感受性のなんらかの固有差ではなく、これら2つのプラスミドからの示差的発現の結果であると思われる。Protox-1/SAX38は、任意のヘム欠乏培地中でProtox-2/SAX38よりもずっとゆっくり成長する。成長速度がアラビドブシスProtox-1/SAX38に匹敵するMzProtox-2/SAX38株も、より低濃度(10~100nM)の除草剤に対して非常に感受性である。

セクションB Protox阻害性除草剤耐性植物Protox遺伝子

20

実施例9. 大腸菌発現系でのProtox阻害性除草剤耐性植物Protox遺伝子の選択

プラスミド・ベクターpFL61中のアラビドブシス・タリアナ(Landsberg)cDNAライブラリー(Mines等, Plant J. 2: 417~422(1992年))を入手し、増幅した。大腸菌hemG突然変異体SAX38(Sasarmann等, J. Gen. Microbiol. 113: 297(1979年))を入手し、20ug/mlヘマチンを含むL培地(United States Biochemicals)上で維持した。Bio-Rad Gene Pulserおよび製造者の条件を用いたエレクトロポレーションにより、このプラスミドライブラリーをSAX38に形質転換した。エレクトロポレーションを行なった細胞をおよそ500,000形質転換体/10cm²平板の密度で100μg/mlアンピシリンを含むL寒天上にプレーティングした。次いで、細胞を微光中で37~40時間インキュベートし、外因性ヘム添加のない状態で成長する能力によって選択した。pFL61ライブラリーからヘム原栄養体が400/10⁷の頻度で回収された。22個の相補性クローンの塩基配列分析から、9個が葉緑体protox酵素を発現すると期待される「Protox-1」と称するタイプのprotox遺伝子であることが示された。

pFL61ライブラリーは、アラビドブシスcDNAが二方向性で挿入された酵母発現ライブラリーである。これらのcDNAは細菌の中でも発現し得る。protox cDNAは明らかに、ベクターの中のNotIクローニング部位方向へおよそ10アミノ酸5'の酵母PGK3'配列の中の読み枠内ATGから開始し、一方の1acZプロモーターからさらに300塩基対上流または不確定の潜在細菌プロモーターから発現する。葉緑体通過配列の重要な部分を含んでいたProtox-1 cDNAが、大腸菌SAX38株の成長を阻害したため、突然変異誘発/除草剤選択実験用として最小量の葉緑体通過配列が結合したクローンを選択した。このクローン、即ちpSLV19は、DNA配列がアラビドブシスProtox-1 cDNA(配列番号:1)の塩基対151から開始する、17アミノ酸だけの推定葉緑体輸送ペプチドを含む。

プラスミドpSLV19で無作為突然変異誘発株XL1-Red(Stratagene、カリフォルニア州ラホーヤ)を形質転換した。50ug/mlアンピシリンを含むL培地上に形質転換株をプレーティングし、37で48時間インキュベートした。形質転換細胞層を平板からはがし、Wizard Megaprepキット(Promega、

40

50

（ウィスコンシン州マディソン）を使用してプラスミドDNAを調製した。この突然変異誘発株から単離されたプラスミドDNAは、2000ヌクレオチド当たりおよそ1つの無作為塩基変異を含むことが予想される（Greener等, Strategies 7(2): 32~34 (1994年) 参照）。

この突然変異プラスミドDNAでhemG突然変異体SAX38を形質転換し（Sasarmann等, J. Gen. Microbiol. 113: 297 (1979年)）、様々な濃度のprotox阻害性除草剤を含むL培地上にプレーティングした。平板を37で2日間インキュベートした。野生株を効果的に殺滅する除草剤濃度で成長した全てのコロニーからプラスミドDNAを単離した。次いで単離DNAでSAX38を形質転換し、観察された耐性が確実にプラスミドで運搬されるように除草剤上に再びプレーティングした。このスクリーンを通過したプラスミド由来のprotoxコード配列をNot I消化により切り出し、突然変異を起こさせていないベクターに再度クローン化し、除草剤耐性を付与する能力に関して再び試験した。次いで、除草剤耐性を付与したprotox cDNAのDNA配列を決定し、野生アラビドプシスProtox-1配列（配列番号：1）と比較することによって突然変異を確認した。

1回目の突然変異誘発実験から単一のコード配列突然変異体が回収された。この突然変異体は、成長速度を上昇させることによってのみ除草剤「耐性」が増強される。それには、配列番号：2のアミノ酸56でトレオニンのACGコドンがリシンのAAGコドンに変換され、細菌の突然変異体の相補性が改善される、pSLV19の切断型葉緑体輸送配列内の配列番号：1のヌクレオチド197でのCからAへの変異が含まれる。このプラスミドには、AGC(Ser)がAGT(Ser)に変わる、ヌクレオチド1059での無形質コード配列の変異も含まれる。このプラスミドをpMut-1と命名した。

次いで、上記と同様にしてpMut-1プラスミドで突然変異誘発体XL1-Red株を形質転換し、変異したDNAを単離し、突然変異を起こさせていないpMut-1 protox遺伝子にとって致死濃度の除草剤上にプレーティングした。37 2日間培養後に除草剤耐性のコロニーを単離し、上記と同様にして分析した。多数のプラスミドが除草剤耐性のprotoxコード配列を含むことが明らかにされた。塩基配列分析によると、耐性遺伝子が2種類に分類されることが示唆された。確認された1つの耐性変異は配列番号：1に示すアラビドプシスProtox-1配列のヌクレオチド689でのCからTへの変異であった。この変異は、配列番号：2のアミノ酸220でアラニンのGCTコドンをバリンのGTTコドンへ変換し、これをpArac-1Valと命名した。

2つ目の種類の除草剤耐性の突然変異体は、アラビドプシスProtox-1配列のヌクレオチド1307AからGへの変異を含む。この変異は、アミノ酸426でチロシンのTACコドンをシステインのTGCコドンに変換し、これをpArac-2Cysと命名した。

3つ目の耐性突然変異体はアラビドプシスProtox-1配列のヌクレオチド691でのGからAへの変異を有する。この変異は、アミノ酸221のグリシンのGGTコドンをpArac-1中の変異に隣接するコドン位置のセリンのAGTコドンに変換する。このプラスミドをpArac-3Serと命名した。

pMut-1プラスミド中の耐性の突然変異体pArac-2Cysを1994年11月14日にpWDC-7の名称でAgricultural Research Culture Collectionに寄託し、寄託名NRRRL #21339Nが与えられた。

実施例10. 無作為スクリーンで確認された位置での別の除草剤耐性コドン置換

無作為スクリーンで除草剤抵抗部位であることが確認されたアミノ酸を他のアミノ酸と置換し、細菌系での機能および除草剤耐性に関して試験した。

トランスフォーマ部位特異的突然変異誘発キット（Clontech、カリフォルニア州パロアルト）を使用して、アラビドプシスProtox-1配列のオリゴヌクレオチド特異的突然変異誘発を実施する。塩基配列分析によってアミノ酸変更を確認した後、変異プラスミドでSAX38を形質転換し、L-amp¹⁰⁰培地上にプレーティングして機能に関して試験し、また様々な濃度のprotox阻害性除草剤上にプレーティングして耐

10

20

30

40

50

性に関して試験する。

この方法をアラビドプシス *Protox* - 1 配列（配列番号：1）のヌクレオチド 688 ~ 690 のアラニン・コドンおよびヌクレオチド 1306 ~ 1308 のチロシン・コドンに適用する。その結果、ヌクレオチド 688 ~ 690 のアラニン・コドンがバリン、トレオニン、ロイシン、システインまたはイソロイシンのコドンに変異され機能が保持された除草剤耐性 *protox* 酵素を產生し得ることが立証された。この結果からさらに、ヌクレオチド 1306 ~ 1308 のチロシン・コドンがシステイン、イソロイシン、ロイシン、トレオニン、メチオニン、バリンまたはアラニンのコドンに変異され機能が保持された除草剤耐性 *protox* 酵素を產生し得ることが立証された。

実施例 1-1. あらかじめ確認された耐性突然変異体の酵素機能および / または除草剤許容性を増強する別の突然変異体の単離

除草剤耐性 *protox* 遺伝子を含むプラスミドで突然変異誘発株 *X L 1 - Red* を形質転換し、変異 DNA を上記と同様にして単離する。変異プラスミドを *SAX38* に形質転換し、元の「耐性」突然変異体の成長を阻害するのに十分な除草剤濃度で形質転換体をスクリーンする。耐性のコロニーを単離し、比較的耐性の高い表現型がコード配列に依存することを上記と同様にして確認する。これらの突然変異体の配列を決定し、祖先配列と比較して変異を確認する。

この方法を上記の *pArac-1Val* 突然変異体に適用した。その結果、アミノ酸 305（配列番号：2）のセリン・コドンがロイシンのコドンに変異され *pArac-1Val* 突然変異体単独よりも *protox* 阻害性除草剤に対する耐性が高い酵素を產生し得ることが立証された。この第 2 部位変異体を *Arac305Leu* と称する。アミノ酸 249 のトレオニン・コドンでも同じ結果を示し、イソロイシンへの変異でもアラニンへの変異でもより許容性の高い酵素が得られる。これらの変異体をそれぞれ *Arac249Ile* および *Arac249Ala* と称する。

この方法をさらに上記の *pArac-2Cys* 突然変異体に適用した。その結果、アミノ酸 118（配列番号：2）のプロリン・コドンがロイシンのコドンに変異され *pArac-1Cys* 突然変異体単独よりも *protox* 阻害性除草剤に対する耐性が高い酵素を產生し得ることが立証された。この変異を *Arac118Leu* と称する。アミノ酸 305 のセリンコドンでも同じ結果を示し、ロイシンに変異させると、より許容性の高い *pArac-2Cys* 酵素が得られる。この変異体も *pArac-1Val* 突然変異体で上記と同様にして単離され、これを *Arac305Leu* と称する。*pArac-2Cys* 突然変異体の除草剤耐性を増強する、別の変異としては、*Arac425Ser* と称するアミノ酸 425 でのアスパラギンからセリンへの変異、*Arac498Cys* と称するアミノ酸 498 でのチロシンからシステインへの変異などがある。

これらの変異は、除草剤耐性を単独で付与するのには十分ではなく、既に突然変異体である酵素の機能および / または除草剤耐性を増強するため、「第 2 部位」変異と呼ぶ。あらゆる可能な置換に関する徹底的な試験を実施していないので、このことは、これらの部位での他のアミノ酸置換が除草剤耐性の酵素を產生するのに十分である可能性を排除していない。

実施例 1-2. 確認された耐性変異と確認された第 2 部位変異の組合せによる高機能 / 高許容性 *protox* 酵素の創製

上記の *Arac305Leu* 変異は、*Arac-1Val* と *Arac-2Cys* の両方の突然変異体プラスミドの機能 / 除草剤耐性を増強することが分かった。この第 2 部位変異の一般的な有用性を調べるため、これを *Arac-2Leu*、*Arac-2Val* および *Arac-2Ile* 変異と組合せ、除草剤許容性に関して試験した。各場合では、*Arac305Leu* の変異によって、*protox* 阻害性除草剤に関して耐性の *protox* 突然変異体の成長速度が著しく速くなった。*Arac-2Ile* 耐性突然変異体を *Arac249Ile* または *Arac118Leu* のいずれかの第 2 部位突然変異体と組み合わせることによっても、より許容性の高い突然変異体 *protox* 酵素が產生された。*Arac249Ile* 変異によると、*Arac-1* 突然変異体を増強することが確認された第

10

20

30

40

50

2部位変異もAraC-2突然変異体の耐性を増大させることが立証される。AraC2I1e、AraC305LeuおよびAraC24911eを含む3つの変異プラスミドも、高機能、高除草剤許容性のprotox-1酵素を産生することを示した。

実施例13. 変異させると除草剤許容性が得られるトウモロコシProtox-1遺伝子中の部位の確認

他のプラスミドを使用した場合上流プロモーター突然変異体が高頻度で単離されるのに対して、上記のpMut-1アラビドプシスProtox-1プラスミドは、突然変異誘発/スクリーニング実験で使用すると、真正のコード配列突然変異体が高頻度で得られる点で非常に有効である。トウモロコシProtox-1の効率的なプラスミドスクリーニング系を作成するため、アラビドプシスcDNAとほぼ同じ配列中のpMut-1ベクターにトウモロコシcDNAを組み込んだ。標準的方法の重複PCR融合を使用して、pMut-1アラビドプシスクローンの5'末端(上記のようなセンス混合変異が1つある17アミノ酸の葉緑体輸送ペプチドを含む)をトウモロコシ配列のアミノ酸14(配列番号:6)から開始するトウモロコシProtox-1cDNA配列と融合した。トウモロコシcDNAの3'末端は変異していなかった。この融合の両端にNotI制限部位を設け、pMut-1由来のpFL61プラスミドバックボーンにキメラ遺伝子をクローン化した。塩基配列分析から、ヌクレオチド745~747(配列番号:5)のACGコドンがACTコドンに変換される、PCRによる單一ヌクレオチドの無形質変異が明らかになつたが、ACGコドンとACTコドンは両方ともトレオニンをコードする。このキメラアラビドプシス-トウモロコシProtox-1プラスミドをpMut-3と称する。

上記と同様にしてpMut-3プラスミドで突然変異誘発XL1-Red株を形質転換し、変異DNAを単離し、突然変異が起きていないpMut-3トウモロコシprotox遺伝子にとり致死濃度の除草剤上にプレーティングした。37で2日間培養後に除草剤許容性コロニーを単離し、上記と同様にして分析した。この分析から、除草剤耐性protoxのコード配列を含む多数のプラスミドが明らかになった。塩基配列分析から、それぞれ除草剤許容性のトウモロコシProtox-1酵素をもたらす5つの単一塩基の変異が明らかになった。これらの変異のうちの3つは、かつてアラビドプシスProtox-1遺伝子中の相同な位置で耐性を付与することが明らかにされたアミノ酸変異に相当する。3つのうちの2つはアミノ酸164(配列番号:6)のアラニン(GCT)をバリン(GAT)またはトレオニン(ACT)のいずれかに変換するpMzC-1ValおよびpMzC-1Thrである。この位置は上記のpAraC-1変異に相当する。第3の相同性変異はアミノ酸165のグリシン(GGT)をSerine(AGT)に変換し、上記のAraC-3Ser変異に相当する。これらの結果は、1つの植物protox遺伝子で確認された除草剤耐性の変異が別の品種由来の同等の植物protox遺伝子にも除草剤耐性を付与するだろうという予想を確認するのに役立つ。

トウモロコシProtox-1スクリーンから単離された変異のうち2つは、以前には除草剤抵抗部位として確認されていない残基でのアミノ酸変異をもたらす。1つの変異は、トウモロコシProtox-1配列(配列番号:6)のアミノ酸159のシステイン(TGC)をフェニルアラニン(TTC)に変換する。第2の変異はアミノ酸419のイソロイシン(AT)をトレオニン(ACA)に変換する。

トウモロコシ突然変異体部位のうち3つでさらにアミノ酸を置換して試験した。グリシン165がロイシンに変異した時、あるいはシステイン159がロイシンまたはリシンのいずれかに変異した時に許容性を示した。また、ヒスチジン、グリシンまたはアスパラギンにイソロイシン419を変異することによっても許容性酵素が創製された。

許容性の高いアラビドプシスProtox-1酵素を産生した個々のアミノ酸変異を上記と同様にして部位特異的突然変異誘発によってトウモロコシProtox-1遺伝子に組み込んだ。細菌試験から、アミノ酸164(配列番号:6)のアラニン(GCT)をロイシン(CTT)に変異すると許容性の高いトウモロコシ酵素が産生されることが立証された。トウモロコシでの無作為スクリーンでは、アラビドプシス中のAraC-2部位と相同的な変異は単離されなかった。しかしながら、この部位、即ちトウモロコシ酵素(配列番

号：6)中のチロシン370をイソロイシンまたはメチオニンのいずれに変異すると、除草剤許容性酵素が產生された。

実施例14. 変異させると除草剤許容性が得られるコムギProtox-1遺伝子中の部位の確認

効率のよいコムギProtox-1用プラスミドのスクリーニング系を作成するため、トウモロコシcDNAについての上の記載と同様にしてコムギcDNAをpMut-1ベクターに組み込んだ。このアラビドプシス-コムギProtox-1キメラプラスミドをpMut-4と称する。pMut-4DNAを変異させ、上記と同様にして除草剤耐性に関してスクリーンした。この分析から、除草剤耐性protoxのコード配列を含む多数のプラスミドが明らかになった。塩基配列分析から、それぞれ除草剤許容性のコムギProtox-1酵素をもたらす7つの単一塩基の変異が明らかになった。これらの変異のうちの4つは、かつてアラビドプシスおよび/またはトウモロコシProtox-1遺伝子中の相同の位置で耐性を付与することが明らかにされたアミノ酸変異に相当する。2つの変異がアミノ酸211(配列番号：10)のアラニン(GCT)をバリン(GAT)またはトレオニン(ACG)のいずれかに変換する。この位置は上記のpArac-1変異に相当する。第3の相同性変異はアミノ酸212のグリシン(GGT)をSerine(AGT)に変換し、上記のArac-3Ser変異に相当する。第4の変異は、アミノ酸466のイソロイシン(ATG)をトレオニン(ACA)に変換し、これはトウモロコシ由来のMz419Thr突然変異体に相当する。コムギProtox-1スクリーンから単離された変異のうち3つは、以前には除草剤抵抗部位として確認されていない残基でのアミノ酸変異をもたらす。1つの変異は、コムギProtox-1配列(配列番号：10)のアミノ酸356のバリン(GTT)をロイシン(CTT)に変換する。第2の変異はアミノ酸421のセリン(TCT)をプロリン(CCT)に変換する。第3の変異はアミノ酸502のバリン(GTT)をアラニン(GCT)に変換する。

実施例15. 変異させると除草剤許容性が得られるダイズProtox-1遺伝子中の部位の確認

効率のよいダイズProtox-1用プラスミドのスクリーニング系を作成するため、トウモロコシcDNAについての上の記載と同様にしてダイズcDNAをpMut-1ベクターに組み込んだ。このアラビドプシス-ダイズProtox-1キメラプラスミドをpMut-5と称する。pMut-5DNAを変異させ、上記と同様にして除草剤耐性に関してスクリーンした。この分析から、除草剤耐性protoxのコード配列を含む多数のプラスミドが明らかになった。塩基配列分析から、それぞれ除草剤許容性のダイズProtox-1酵素をもたらす4つの単一塩基の変異が明らかになった。これらの変異のうちの2つは、かつてアラビドプシスおよび/またはコムギProtox-1遺伝子中の相同の位置で耐性を付与することが明らかにされたアミノ酸変異に相当する。1つの変異がアミノ酸266(配列番号：12)のアラニン(GCA)をトレオニン(ACA)に変換する。この位置は上記のpArac-1Thr変異に相当する。第2の相同性変異はアミノ酸517のバリン(GTT)をアラニン(GCT)に変換し、コムギ由来のWht502Val変異に相当する。

ダイズProtox-1スクリーンから単離された変異のうち2つは、以前には除草剤抵抗部位として確認されていない残基でのアミノ酸変異をもたらす。1つの変異は、ダイズProtox-1配列(配列番号：12)のアミノ酸369のプロリン(CCT)をセリン(TCT)に変換する。第2の変異はこの同じプロリン369をヒスチジン(CAT)に変換する。

許容性の高いアラビドプシスProtox-1酵素を產生した個々のアミノ酸変異を上記と同様にして部位特異的突然変異誘発によってダイズProtox-1遺伝子に組み込んだ。細菌試験から、アミノ酸226(配列番号：12)のアラニン(GCA)をロイシンに変異すると許容性のダイズ酵素が產生されることが立証された。アミノ酸432(配列番号：12)のチロシン(TAC)をロイシンまたはイソロイシンのいずれかに変異しても除草剤許容性酵素が產生された。

10

20

30

40

50

実施例 16. 変異させると除草剤許容性が得られるテンサイ Protox-1 遺伝子中の部位の確認

効率のよいテンサイ Protox-1 用プラスミドのスクリーニング系を作成するため、トウモロコシ c DNA についての上の記載と同様にしてテンサイ c DNA を p Mut - 1 ベクターに組み込んだ。このアラビドプシス - テンサイ Protox-1 キメラプラスミドを p Mut - 6 と称する。p Mut - 6 DNA を変異させ、上記と同様にして除草剤耐性に関してスクリーンした。この分析から、除草剤耐性 protox のコード配列を含む多数のプラスミドが明らかになった。塩基配列分析から、除草剤許容性のテンサイ Protox-1 酵素をもたらす 1 つの単一塩基の変異が明らかになった。この変異はアミノ酸 449 のチロシン (TAC) をシステイン (TGC) に変換し、アラビドプシス中の AraC-2 変異と相同である。10

許容性の高いアラビドプシス Protox-1 酵素を産生した個々のアミノ酸変異を上記と同様にして部位特異的突然変異誘発によってテンサイ Protox-1 遺伝子に組み込んだ。細菌試験から、アミノ酸 449 のチロシン (TAC) をロイシン、イソロイシン、バリンまたはメチオニンのいずれかに変異したところ、除草剤許容性酵素が産生された。

実施例 17. 変異させると除草剤許容性が得られるワタ Protox-1 遺伝子中の部位の確認

効率のよいワタ Protox-1 用プラスミドのスクリーニング系を作成するため、トウモロコシ c DNA についての上の記載と同様にしてワタ c DNA を p Mut - 1 ベクターに組み込んだ。このアラビドプシス - ワタ Protox-1 キメラプラスミドを p Mut - 7 と称する。p Mut - 7 DNA を変異させ、上記と同様にして除草剤耐性に関してスクリーンした。この分析から、除草剤耐性 protox のコード配列を含む多数のプラスミドが明らかになった。塩基配列分析から、それぞれ除草剤許容性のワタ Protox-1 酵素をもたらす 3 つの単一塩基の変異が明らかになった。2 つの突然変異体が、アミノ酸 428 (配列番号: 16) のチロシン (TAC) をそれぞれシステイン (TGC) およびアルギニン (CGC) に変異する。アルギニンは、以前に確認されたこの AraC-2 部位で耐性を与える新規の置換である。第 3 の変異はアミノ酸 365 のプロリン (CCC) をセリン (TCC) に変換する。この変異はダイズ突然変異体 Soy369Ser に相当する。20

実施例 18. 種々の Protox 阻害性化合物に対する耐性変異の交差許容性実験

30

元々単一の protox 阻害性除草剤に対する耐性に基づいて識別された耐性の突然変異体プラスミドを、他の様々な protox 阻害性化合物について試験した。この試験については、各致死濃度を決定するため、野生型プラスミドを含む SASX38 株を一連の濃度の各化合物上にブレーティングする。SASX38 中の耐性の突然変異体プラスミドをブレーティングし、野生型のプラスミドを含む SASX38 に致死の濃度より少なくとも 10 倍高い各化合物濃度で残存する能力を評価する。

下記表 3A および表 3B に示した細菌の交差耐性試験の結果から、確認された各変異によって様々な protox 阻害化合物に対する耐性が付与されることが明らかである。

表 3 A

種々の Protopox 阻害性化合物に対する植物 Protopox 変異の交差許容性

式	AraC-1Val	AraC-2Cys	AraC-1Thr	AraC-3Thr	MzC-1Val
---	-----------	-----------	-----------	-----------	----------

XVII	+	+	+	+	+	10
VIIa	+	+	+	-	+	
IV	++	-	++	++	-	
XV	+	+	+	+	+	
XI	-	+	+	++	+	20
XVI	-	-	-	-	+	
XII	+	-	++	++	++	
XIV	+	-	+	+	+	

*X

30

+=WTの10倍以上許容性

++=WT 100倍以上許容性

-=交差許容性なし

*=この化合物は試験したが情報を提供しなかった

40

表 3 B

種々の Protopox 阻害性化合物に対する植物 Protopox 変異
の交差許容性

	AraC- 1Leu	AraC- 2Ile	AraC- 1Leu	AraC- 1Leu	AraC- 2Ile	AraC- 2Cys	AraC- 2Leu	AraC- 2Met	
	+	+	+	+	+	+	+	+	
	AraC- 2Met	AraC- 2Leu	AraC3	AraC425	AraC425	AraC425			10
			05Leu	Ser	Ser	Ser			
XVII	+	+	+	+	+	+	+	+	
VIIa	++	++	++	++	++	++	++	++	
IV	++	-	+	++	+	-	+	+	20
XV	++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	
XI	++	++	++	++	++	++	++	++	
XVI	+++	+++	+++	+++	+++	+	++	++	30
XII									
XIV	++	++	++	++	++	-	++	++	

セクション C トランスジェニック植物での除草剤耐性 Protopox 遺伝子の発現
実施例 19. 同種組換えまたは遺伝子転換による protox 阻害性除草剤許容性植物の
遺伝子組換え

天然 protox プロモーターの調節下で発現すると、記載された突然変異体コード配列は有効に除草剤許容性を付与するので、protopox コード配列の天然染色体の位置を標的とした変異は、除草剤耐性の植物および植物細胞を作成する代替手段であることを意味する。所望の変異を含むがそれ自体の発現シグナル（プロモーターまたは 3' 非翻訳領域のいすれか）が欠失している protox DNA 断片は、当技術分野で認められた任意の方法（例えばアグロバクテリウム形質転換、プロトプラストへの直接遺伝子転移、微量噴出性ポンバードなど）により導入し、除草剤許容性の形質転換体を選択し得る。導入された DNA 断片はまた、コードされるアミノ酸配列（即ち、無形質変異）を変異させずに、in vitro の部位特異的突然変異誘発により導入される診断用制限酵素部位または他の配列多形を含む。かつて様々な選択マーカーおよび除草剤許容性遺伝子について報告されたように（例えば、Paszkowski 等, EMBO J. 7: 4021~4026 (1988 年)、Lee 等, Plant Cell 12: 415~425 (1990 年)、Risseeuw 等, Plant J. 7: 109~119 (1995 年) 参照）、あ 40
50

る形質転換体は、突然変異体DNAのprotox染色体座中への相同意向的組込みにより、あるいは天然protox染色体配列の導入された突然変異体配列への転換により得られることが分かっている。これらの形質転換体は、その除草剤許容性表現型の組合せと、そのprotox染色体座中の診断用制限酵素部位の存在によって認められる。

実施例20. 植物形質転換ベクターの構築

多くの形質転換ベクターが植物形質転換に利用可能であり、本発明の遺伝子はこのような任意のベクターと共に使用し得る。使用するベクターの選択は、好みの形質転換技術および形質転換の標的種に依存する。ある標的種に対して異なる抗生物質または除草剤選択マーカーが好みのことがある。形質転換に通常使用される選択マーカーとしては、カナマイシンおよび関連抗生物質に対する耐性を付与するnptII遺伝子(MessingおよびVierra, Gene 19: 259~268(1982年); Bevan等, Nature 304: 184~187(1983年))、除草剤ホスフィノトリシンに対する耐性を付与するbar遺伝子(White等, Nucl Acids Res 18: 1062(1990年)、スペンサー等, Theor Appl Genet 79: 625~631(1990年))、抗生物質ハイグロマイシンに対する耐性を付与するhph遺伝子(BlochingerおよびDiggelmann, Mol Cell Bio 14: 2929~2931)、およびメトトレキサートに対する耐性を付与するdhfr遺伝子、(Bourouis等, EMBO J. 2(7) 1099~1104(1983年))などがある。

I. アグロバクテリウムの形質転換に適したベクターの構築

アグロバクテリウム-ツメファシエンスを使用する多くのベクターが形質転換に利用可能である。通常これらは少なくとも1つのT-DNA境界配列をもち、pBIN19(Bevan, Nucl. Acids Res. (1984年))およびpXYZなどのベクターを含む。2種類の代表的なベクターの構築を以下に記載する。

pCIB200およびpCIB2001の構築:アグロバクテリウムに使用する組換えベクター構築用のバイナリーベクター、pCIB200およびpCIB2001を使用して、次のようにして構築した。pTJS75のNarI消化によりpTJS75kanを作成して(SchmidhauserおよびHelinski, J. Bacteriol. 164: 446~455(1985年))テトラサイクリン抵抗遺伝子の切り出しを可能にした後、NPTIIをもつpUC4K由来のAcc1断片を挿入した(MessingおよびVierra, Gene 19: 259~268(1982年); Bevan等, Nature 304: 184~187(1983年); McBride等, Plant Molecular Biology 14: 266~276(1990年))。左右のT-DNA境界、植物選択可能なnos/nptIIキメラ遺伝子およびpUCポリリンカーを含むpCIB7のEcoRV断片にXbaIリンカーをライゲートし(Rothstein等, Gene 53: 153~161(1987年))、XbaI消化断片をSalI消化pTJS75kanにクローン化してpCIB200を作成した(EP0332104、実施例19も参照)。pCIB200は、EcoRI、SstI、KpnI、BglII、XbaIおよびSalIの特有のポリリンカー制限部位を含む。pCIB2001は、ポリリンカーに追加制限部位を挿入することによって作成されるpCIB200の誘導体である。pCIB2001のポリリンカー中の特有の制限部位はEcoRI、SstI、KpnI、BglIII、XbaI、SalI、MluI、BcII、AvrII、ApaI、HpaIおよびStuIである。これらの特有の制限部位を含むことに加え、pCIB2001はまた、植物および細菌のカナマイシン選択、アグロバクテリウムによる形質転換用の左右のT-DNA境界、大腸菌と他の宿主との間で動員するためのR K 2由来のtrfA機能およびこれもR K 2由来のOrfTとOrfV機能を有する。pCIB2001ポリリンカーは、それ自体の調節シグナルを含む植物発現力セットのクローニングに適する。

pCIB10およびそのハイグロマイシン選択誘導体の構築:バイナリーベクターpCIB10は、植物での選択のためのカナマイシン耐性をコードする遺伝子、T-DNAの右

10

20

30

40

50

境界配列および左境界配列を含む上、広範囲の宿主のプラスミド p R K 2 5 2 由来の配列を組み込んでおり、それによって、大腸菌とアグロバクテリウムの両方で複製が可能である。その構築については、R o t h s t e i n 等, G e n e 5 3 : 1 5 3 ~ 1 6 1 (1 9 8 7 年) に記載されている。G r i t z 等, G e n e 2 5 : 1 7 9 ~ 1 8 8 (1 9 8 3 年) に記載された、ハイグロマイシン B ホスフォトランスフェラーゼの遺伝子を組み込んだ、p C I B 1 0 の様々な誘導体が構築された。これらの誘導体によると、ハイグロマイシンのみ (p C I B 7 4 3) またはハイグロマイシンおよびカナマイシン (p C I B 7 1 5 、 p C I B 7 1 7) に関するトランスジェニック植物細胞の選択が可能になる。

I I . 非アグロバクテリウム形質転換に適したベクターの構築

アグロバクテリウム - ツメファシエンスを使用しない形質転換によると、選択される形質転換ベクター中の T - D N A 配列に対する要求が回避され、従って、T - D N A 配列を含む上記などのベクターに加え、これらの配列が欠失しているベクターを利用し得る。アグロバクテリウムに依存しない形質転換技術としては、粒子ボンバード、プロトプラスト取り込み (例えは P E G およびエレクトロポレーション) 、マイクロインジェクションを介する形質転換などがある。ベクターの選択は主として、形質転換する種にとって好ましい選択に依存する。以下にいくつかの代表的なベクターの構築について記載する。

p C I B 3 0 6 4 の構築 : p C I B 3 0 6 4 は除草剤 b a s t a (またはホスフィノトリシン) による選択と組み合せた直接遺伝子転移技術に適する p U C 由来のベクターである。プラスミド p C I B 2 4 6 は、C a M V 3 5 S プロモーターおよび作用状態で大腸菌 G U S 遺伝子と融合した C a M V 3 5 S 転写ターミネーターを含み、P C T 公開出願 W O 9 3 / 0 7 2 7 8 に記載されている。このベクターの 3 5 S プロモーターは、開始部位の 2 つの A T G 配列 5 ' を含む。標準の P C R 技術を使用して、A T G が除去され、制限部位 S s p I および P v u I I が生じるようにこれらの部位を変異させた。新しい制限部位は、特有の S a I I 部位から 9 6 塩基対および 3 7 塩基対離れ、実際の開始部位から 1 0 1 塩基対および 4 2 塩基対離れていた。得られた p C I B 2 4 6 の誘導体を p C I B 3 0 2 5 と命名した。次いで、S a I I と S a c I による消化によって p C I B 3 0 2 5 から G U S 遺伝子を切り出し、末端を平滑末端化し、再度ライゲーションを行なってプラスミド p C I B 3 0 6 0 を生成させた。J o h n I n n e s C e n t r e (ノリッジ) からプラスミド p J I T 8 2 を入手し、S t r e p t o m y c e s v i r i d o c h r o m o g e n e s 由来の b a r 遺伝子を含む 4 0 0 塩基対の S m a I 断片を切り出し、p C I B 3 0 6 0 の H p a I 部位に挿入した (T h o m p s o n 等, E M B O J 6 : 2 5 1 9 ~ 2 5 2 3 (1 9 8 7 年)) 。これによって、C a M V 3 5 S プロモーターと草剤選択用のターミネーター、即ちアンピシリン耐性の遺伝子 (大腸菌での選択用) および特有の部位 S p h I 、 P s t I 、 H i n d I I I および B a m H I を備えたポリリンカーの調節を受ける b a r 遺伝子を含む p C I B 3 0 6 4 が生成した。このベクターは、それ自体の調節シグナルを含む植物発現カセットのクローニングに適する。

p S O G 1 9 および p S O G 3 5 の構築 : p S O G 3 5 は、選択マーカーとして大腸菌遺伝子ジヒドロ葉酸レダクターゼ (D H F R) を利用し、メトトレキサートに対する耐性を付与する形質転換ベクターである。P C R を使用して 3 5 S プロモーター (約 8 0 0 塩基対) 、トウモロコシ A d h 1 遺伝子由来のイントロン 6 (約 5 5 0 塩基対) および p S O G 1 0 由来の 1 8 塩基対の G U S 非翻訳リーダー配列を増幅した。大腸菌ジヒドロ葉酸レダクターゼ I I 型遺伝子をコードする 2 5 0 塩基対の断片も P C R によって増幅し、これらの 2 個の P C R 断片を p U C 1 9 ベクターバックボーンおよびノパリンシンターゼターミネーターを含む p B I 2 2 1 (C l o n t e c h) 由来の S a c I - P s t I 断片と組み合わせた。これらの断片を組み合わせたところ、イントロン 6 配列、G U S リーダー、D H F R 遺伝子およびノパリンシンターゼターミネーターと融合した 3 5 S プロモーターを含む p S O G 1 9 が生成した。p S O G 1 9 中の G U S リーダーをトウモロコシ C h 1 o r o t i c M o t t l e V i r u s (M C M V) 由来のリーダー配列と置換したところ、ベクター p S O G 3 5 が生成した。p S O G 1 9 と p S O G 3 5 は、アンピシリン耐性の p U C 遺伝子を保有し、外来配列のクローニングに利用可能な H i n d I I I 、 S

10

20

30

40

50

p h I 、 P s t I および E c o R I 部位を有する。

実施例 21. 植物発現力セットの構築

トランスジェニック植物での発現を目的とした遺伝子配列はまず、発現力セットの中の適切なプロモーターの後ろで適切な転写ターミネーターの上流に組み立てる。次いで、これらの発現力セットは上記の実施例 20 に記載した植物形質転換ベクターに容易に転移し得る。

I. プロモーターの選択

発現力セットの中で使用するプロモーターの選択により、トランスジェニック植物中の導入遺伝子の空間的、時間的な発現パターンが決定される。選択されたプロモーターは、特定の細胞型（葉の表皮細胞、葉肉細胞、根の皮質細胞など）または特定の組織または器官（例えば根、葉または花など）の中で導入遺伝子を発現し、この選択は、導入遺伝子の発現の所望の位置を反映している。別法として、プロモーターを光誘発型、または他の一時的に調節して選択されたプロモーターが遺伝子の発現を制御するようにしてもよい。さらなる別法は、選択されたプロモーターを化学的に調節するということである。これによると、望むときに化学的誘導物質処理によって引き起こす時だけに導入遺伝子の発現を誘起する可能性が提供されるであろう。

II. 転写ターミネーター

様々な転写ターミネーターが発現力セットでの使用に利用できる。これらは、導入遺伝子およびその正確なポリアデニル化を超える転写を終了させる役割を果たす。適切な転写ターミネーターは植物中で機能することが知られており、C a M V 3 5 S ターミネーター、t m I ターミネーター、ノパリンシンターゼターミネーター、エンドウ r b c S E 9 ターミネーター、並びに植物 p r o t o x 遺伝子に天然で付随するターミネーター（即ち、「p r o t o x ターミネーター」）などが含まれる。これらは、単子葉植物と双子葉植物の両方で使用し得る。

III. 発現の強化または調節のための配列

多くの配列が転写単位内からの遺伝子発現を増強し、これらの配列を本発明の遺伝子と共に使用してトランスジェニック植物中でのそれらの発現を増大させ得ることが分かっている。

様々なイントロン配列が、特に単子葉の細胞中で発現を増強することが分かっている。例えば、トウモロコシ A d h 1 遺伝子のイントロンは、トウモロコシ細胞へ導入されると、その同種のプロモーター下での野生型遺伝子の発現を著しく増強することが分かった。イントロン 1 は、特に有効であることが分かり、クロラムフェニコールアセチルトランスクエラーゼ遺伝子による融合構築物中での発現を増強した（C a l l i s 等, G e n e s D e v e l o p . 1 : 1 1 8 3 ~ 1 2 0 0 (1 9 8 7 年) ）。同じ実験系で、トウモロコシ b r o n z e 1 遺伝子由来のイントロンに発現増強で類似の効果があった（C a l l i s 等, 前出）。イントロン配列は常法により植物形質転換ベクター、典型的には非翻訳リーダー内に組み入れた。

ウイルス由来の多くの非翻訳リーダー配列も発現を増強することが知られており、これらは双子葉植物細胞で特に有効である。特に、タバコモザイクウイルス（T M V、「W配列」）、M a i z e C h l o r o t i c M o t t l e V i r u s (M C M V) およびアルファルファモザイクウイルス（A M V）由来のリーダー配列は、発現増強に有効なことが示された（例えば、G a l l i e 等, N u c l . A c i d s R e s . 1 5 : 8 6 9 3 ~ 8 7 1 1 (1 9 8 7 年) ；S k u z e s k i 等, P l a n t M o l e c . B i o l . 1 5 : 6 5 ~ 7 9 (1 9 9 0 年) など）。

IV. 植物内遺伝子産物のターゲティング

植物には遺伝生産物ターゲティングの様々なメカニズムが存在することが知られており、これらのメカニズムの機能を調節する配列の特徴をかなり詳細に調べた。例えば、葉緑体への遺伝生産物のターゲティングは、様々な蛋白質のアミノ末端に見られ、葉緑体移入中に切断されて成熟した蛋白質を産生するシグナル配列によって調節される（例えば、C o m a i 等, J . B i o l . C h e m . 2 6 3 : 1 5 1 0 4 ~ 1 5 1 0 9 (1 9 8 8 年) など）。

10

20

20

30

40

40

50

ど）。これらのシグナル配列は、異種遺伝生産物と融合させて異種生産物の葉緑体への移入を達成させ得る（van den Broeck等, *Nature* 313: 358~363 (1985年)）。RUBISCO蛋白、CAB蛋白、EPSPシンターゼ酵素、GS2蛋白および葉緑体に局在していることが知られている他の多くの蛋白質をコードするcDNAの5'末端から、適切なシグナル配列をコードするDNAを単離し得る。

他の遺伝生産物がミトコンドリアやペルオキシゾームなどの他の細胞器官に局在する（例えば、Unger等, *Plant Molec. Biol.* 13: 411~418 (1989年)）。また、これらの生産物をコードするcDNAもこれらの細胞器官への異種遺伝生産物のターゲティングを達成するために操作し得る。このような配列の例は、核コード化ATPアーゼおよびミトコンドリアの特異的アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼアイソフォームである。細胞蛋白体へのターゲティングについてはRogers等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 6512~6516 (1985年)に記載されている。

また、他の細胞区画への遺伝生産物のターゲティングを引き起こす配列の特徴が明らかにされた。アミノ末端配列は、ER、アポプラストおよびアリューロン細胞からの細胞外分泌物へのターゲティングの役割を果す（KoehlerおよびHo, *Plant Cell* 12: 769~783 (1990年)）。さらに、カルボキシ末端配列と組み合わせたアミノ末端配列は、遺伝生産物の空胞へのターゲティングの役割を果す（Shinshi等, *Plant Molec. Biol.* 14: 357~368 (1990年)）。

上記の適切なターゲティング配列の対象導入遺伝子配列との融合によって、導入遺伝子生産物を任意の細胞器官または細胞区画に指向させることが可能である。例えば葉緑体ターゲティングのためには、RUBISCO遺伝子、CAB遺伝子、EPSPシンターゼ遺伝子またはGS2遺伝子由来の葉緑体シグナル配列を導入遺伝子のアミノ末端ATGと読み枠内で融合する。選択されたシグナル配列には、既知の切断部位を含むようにし、構築する融合には、切断に必要な切断部位の後に任意のアミノ酸を考慮に入れるべきである。ある場合には、この要求は切断部位と導入遺伝子ATGとの間に少数のアミノ酸を挿入することによって、あるいは別法として導入遺伝子配列内のいくつかのアミノ酸の置換によって満たしてもよい。葉緑体移入のために構築した融合体は、（Edelmann他編「*Methods in Chloroplast Molecular Biology*」Elsevier, 1081~1091 (1982年)収載のBarlett等の章；Wasemann等, *Mol. Gen. Genet.* 205: 446~453 (1986年)）に記載された技術を使用してin vitroで転写した構築物をin vitroで翻訳した後にin vitroで葉緑体取込みを行なうことによって、葉緑体取込み効果を試験し得る。これらの構築技術は当技術分野でよく知られており、ミトコンドリアとペルオキシゾームと等しく適用可能である。導入遺伝子の発現に必要なターゲティングの選択は、所与の経路の開始点として必要な前駆体が細胞内のどこに局在するかに依存する。通常これはサイトゾルまたは葉緑体であるが、ミトコンドリアまたはペルオキシゾームの場合もある。導入遺伝子発現生成物には通常、ER、アポプラストまたは液胞へのターゲティングは要求されない。

上記の細胞ターゲティングメカニズムは、ターゲティングシグナルが由来するプロモーターのものとは異なった発現パターンを有するプロモーターの転写調節下で特定細胞のターゲティングを行なうという目標を達成するために、それらと同種のプロモーターだけでなく異種プロモーターとも併用し得る。

実施例22. 双子葉植物の形質転換

双子葉植物の形質転換技術は当技術分野でよく知られており、アグロバクテリウムを核とした技術およびアグロバクテリウムを必要としない技術が含まれる。非アグロバクテリウム技術としては、直接プロトプラストまたは細胞による外因性遺伝材料の取込みなどがある。これはPEGまたはエレクトロポレーションによる取込み、粒子ボンバードによる送達、またはマイクロインジェクションによって達成し得る。これらの技術の例については、Paszkowski等, *EMBO J* 3: 2717~2722 (1984年)、P

10

20

30

40

50

o t r y k u s 等, Mol. Gen. Genet. 199: 169~177 (1985年)、Reich等, Biotechnology 4: 1001~1004 (1986年)、Klein等, Nature 327: 70~73 (1987年)などに記載されている。各場合とも、形質転換細胞は当技術分野で知られている標準の技術を使用して植物全体に再生されている。

アグロバクテリウムによる形質転換は、形質転換効率が高く、かつ多種多様な種を幅広く利用できるため、好ましい双子葉植物形質転換技術である。アグロバクテリウムにより通常、形質転換し得る多くの作物種としては、タバコ、トマト、ヒマワリ、ワタ、脂肪種子ナタネ、じゃがいも、ダイズ、アルファルファ、ポプラなどがある (EP 0317511 (ワタ)、EP 0249432 (トマト、Calgene社)、WO 87/07299 (アブラナ、Calgene社)、米国特許第4,795,855号 (ポプラ))。

組換えアグロバクテリウムによる標的植物種の形質転換には通常、アグロバクテリウムと植物由来の外植片との同時培養が含まれ、当技術分野でよく知られている手順に従う。形質転換した組織は、バイナリープラスミドT-DNA境界間に存在する抗生物質耐性マークーまたは除草剤耐性マークーを保有した状態で、選択培地上で再生する。

実施例 23. 単子葉植物の形質転換

今やほとんどの単子葉植物種の形質転換もルーチンとなった。好ましい技術としては、PEGまたはエレクトロポレーションの技術を使用する、プロトプラストへの直接遺伝子転移や、カルス組織中への粒子ボンバードなどがある。形質転換は単一のDNA種または多数のDNA種 (即ち同時形質転換) で行なうことができ、これらの技術は両方とも本発明での使用に適する。同時形質転換は、複合ベクター構築が回避でき、対象遺伝子および選択マークーのための非連結遺伝子座を備えたトランスジェニック植物が作成できるという利点を有し、望ましいと見なす場合には、後代で選択マークーを除去することが可能になる。一方、同時形質転換を使用する場合の欠点は、分離DNA種のゲノムへの組み込み頻度が100%未満だということである (Schöcher等, Biotechnology 4: 1093~1096 (1986年))。

特許出願EP 0292435 (チバ-ガイギー)、EP 0392225 (チバ-ガイギー) およびWO 93/07278 (チバ-ガイギー) は、トウモロコシ優良同系繁殖株由来のカルスおよびプロトプラストの調製、PEGまたはエレクトロポレーションを使用したプロトプラストの形質転換、形質転換プロトプラストからのトウモロコシ植物の再生の各技術について記載している。Gordon-Kamm等, Plant Cell 2: 603~618 (1990年) およびフロム等, Biotechnology 8: 833~839 (1990年) は、粒子ボンバードを使用したA188由来トウモロコシ株の形質転換技術を発表した。さらに、出願WO 93/07278 (チバ-ガイギー) およびKoziel等, Biotechnology 11: 194~200 (1993年) は、粒子ボンバードによるトウモロコシ優良同系繁殖株の形質転換技術について記載している。この技術は、授粉14~15日後にトウモロコシ雌穂から切り出された1.5~2.5mmの長さの未熟トウモロコシ胚芽と、ボンバード用のPDS-1000He Biolistics (微粒子銃) 装置を利用している。

イネの形質転換もプロトプラストまたは粒子ボンバードを利用した直接遺伝子転移技術によって行なうことができる。プロトプラストによる形質転換は、ジャポニカ型およびインディカ型について記載されている (Zhang等, Plant Cell Rep 7: 379~384 (1988年); Shimamoto等, Nature 338: 274~277 (1989年); Datta等, Biotechnology 8: 736~740 (1990年))。両方の型とも通例、粒子ボンバードを使用して形質転換される (Christou等, Biotechnology 9: 957~962 (1991年))。

特許出願EP 0332581 (チバ-ガイギー) は、Pooideaeプロトプラストの生成、形質転換および再生の技術について記載している。これらの技術によると、オーチヤードグラスとコムギの形質転換も可能である。さらに、コムギ形質転換は、長期再生可能なカルスのタイプC細胞への粒子ボンバードを使用するものがVasile等, Biot

10

20

30

40

50

echnology 10: 667~674 (1992年) に、また未熟胚芽および未熟胚芽由来のカルスの粒子ポンバードを使用するものがVassil等, Biotechnology 11: 1553~1558 (1993年)、Weeks等, Plant Physiology 102: 1077~1084 (1993) に記載されている。しかしながら、コムギ形質転換の好ましい技術としては、遺伝子送達前に高蔗糖または高麦芽糖のいずれかの段階を含む、未熟胚芽の粒子ポンバードによるコムギの形質転換などがある。ポンバードに先立ち、任意の数の胚芽（長さ 0.75~1mm）を体細胞不定胚誘導用の 3% 蔗糖 (Muraschige & Skoog, Physiologia Plantarum 15: 473~497 (1962年)) および 3mg/l の 2, 4D を含む MS 培地上にプレーティングし、暗中で生育させる。ポンバードに選択した日に誘導培地から胚芽を取り除き、osmoticum (即ち、蔗糖またはマルトースを所望の濃度、典型的には 15% 加えた誘導培地) の上に置く。胚芽を、2~3 時間原形質単離させた後、ポンバードする。標的平板当たり胚芽 20 個が決定的ではないが典型的である。標準の方法を使用して、ミクロン大の金粒子上に適切な遺伝子保有プラスミド (pCIB3064 または pSG35 など) を付着させる。各胚芽平板を、80 メッシュの標準スクリーンを使用して 1000psi の爆圧を使用する DuPont Biostatics のヘリウム装置によって撃つ。ポンバード後、胚芽を暗中に戻し、約 24 時間 (osmoticum 上) で回復させる。24 時間後、osmoticum から胚芽を取り出して誘導培地上に戻し、再生まで約 1 月間静置する。およそ 1 か月後、成育中の胚性カルス付きの胚芽外植片を、適切な選択剤 (pCIB3064 の場合 10mg/l の basta、pSG35 の場合 2mg/l のメトトレキサート) をさらに含む、再生培地 (MS + 1mg/l の NAA、5mg/l の GA) に移す。およそ 1 か月後、生育した苗条を、半濃度の MS、2% 蔗糖および同濃度の選択剤を含む、「GA7s」として知られている、より大きい滅菌容器に移す。特許出願 WO 94/13822 にはコムギ形質転換法が記載されており、これを参照により本明細書の一部とする。

例 24. アラビドプシス・タリアナ Protox-1 プロモーター配列の単離

アラビドプシス・タリアナ (コロンビア、全植物) から調製された Lambda Zap II ゲノム DNA ライブライリーを Stratagene 社から購入した。およそ 125,000 個のファージを 15cm のペトリ皿当たり 25,000 pfu の密度でプレーティングし、複製リフトを Colony / Plaque Screen 膜 (NEN Dupont) 上に作成した。このブラークリフトを、ランダムプライミング法 (Life Technologies) により 32P-dCTP 標識したアラビドプシス Protox-1 cDNA (配列番号: 1) で探査した。ハイブリダイゼーションおよび洗浄の条件は、Church および Gilbert, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 1991~1995 (1984年) に記載されているように 65 とした。ポジティブにハイブリダイズするクローンを精製し、in vivo で切り出して pBlue script に導入した。ゲノム DNA インサート由来の配列を蛍光色素で標識したジデオキシターミネーター (Applied Biosystems 社) を用いた連鎖停止法によって決定した。1 つのクローン、即ち AraPT1Pro が、Protox-1 蛋白コード配列の開始メチオニン (ATG) の上流に 580 塩基対のアラビドプシス配列を含むことが決定された。このクローンはまた、Protox-1 cDNA 配列の塩基 1241 に向かって伸長するコード配列およびイントロンをも含む。580 塩基対の 5' 非コード断片は推定アラビドプシス Protox-1 プロモーターであり、配列番号: 13 に配列を示す。

AraPT1Pro は、1995 年 12 月 15 日に pWDC-11 (NRRRL # B-21515) として寄託した。

実施例 25. 天然アラビドプシス Protox-1 の後ろに変更 Protox-1 遺伝子を発現する植物形質転換ベクターの構築

適当な変異アラビドプシス Protox-1 cDNA の完全長 cDNA を EcoRI-XbaI 部分消化断片として単離し、植物発現ベクター pCGN1761ENX でクローン

10

20

30

40

50

化した（1995年6月8日に出願され、1995年12月21日にWO95/34659として公開された国際出願PCT/IB95/00452の実施例9参照）。このプラスミドをNcoIとBamHIで消化してアグロバクテリウム・ツメファシエンスのtmI遺伝子の完全なProtox-1 cDNAと3'非翻訳配列由来の転写ターミネーターとで構成された断片を作成した。上記のArabPT1ProプラスミドをNcoIおよびBamHIで消化してpBluescriptおよび580塩基対の推定アラビドプシスProtox1プロモーターを含む断片を作成した。これらの2個の断片をライゲートしたところ、変異protox cDNAが天然protoxプロモーターへ融合された。Protox-1プロモーター/Protox-1 cDNA/tmIターミネーター融合体を含む発現カセットをKpnIによる消化によって切り出し、バイナリーベクターpCIB200でクローニングした。エレクトロポレーションによってアグロバクテリウムをこのバイナリープラスミドで形質転換した後、真空浸潤法（Bechtold等, C.R. Acad. Sci. Paris 316: 1194~1199 (1993年)）を使用してAmbidopsisを形質転換した。変更Protox遺伝子を発現する形質転換体をカナマイシンまたは種々の濃度のProtox阻害性除草剤について選択した。
10

実施例26. 天然Protox-1プロモーター/変更天然Protox-1融合体の発現による除草剤許容性植物の作成

上記の方法を使用して、Protox-1配列（配列番号：1）のヌクレオチド1306～1308にTACからATG（チロシンからメチオニン）への変異を含むアラビドプシスProtox-1 cDNAを天然Protox-1プロモーター断片と融合し、アラビドプシス・タリアナを形質転換した。この改変Protox-1酵素（Arac-2Met）は、前記の細菌発現系で試験するとき、様々なprotox阻害性除草剤に対して天然酵素よりも10倍を超える高い許容性を示した。真空浸潤させた植物由来の種子を集め、一連の濃度（10.0nM～1.0uM）の式XVIIのprotox阻害性アリールウラシル除草剤上にプレーティングした。野野生型アラビドプシスでの多数の実験から、濃度10.0nMのこの化合物が正常な実生苗の発芽を防ぐのに十分であることが示された。天然Protox-1プロモーターと融合したArac-2Met修飾酵素を発現するトランスジェニック種子は、500nMまでの除草剤濃度で正常なアラビドプシス実生苗を産生し、野生型アラビドプシスと比較して少なくとも50倍高い除草剤許容性を示した。従って、このプロモーター/修飾protox酵素融合体は、植物形質転換の有効な選択マーカーとして機能する。100.0nMのprotox阻害性除草剤上で発芽した植物のいくつかを土壤に移植し、2～3週間成長させ、様々な濃度のprotox阻害性除草剤による噴霧測定法で試験した。空ベクター対照形質転換体と比較したところ、ArabPT1Pro/Arac-2Metトランスジェニック植物は、除草剤スプレーに対する許容性が10倍を超えていた。
20

実施例27. アラビドプシス発芽測定法での様々なprotox阻害性化合物に対する耐性変異体の交差許容性実験

上記の方法を使用して、Protox-1配列（配列番号：1）中のヌクレオチド1306～1308のTACからATC（チロシンからイソロイシン）への変異およびヌクレオチド945～947のTCAからTTA（セリンからロイシン）への変異を両方とも含むアラビドプシスProtox-1 cDNAを天然Protox-1プロモーター断片と融合し、アラビドプシス・タリアナを形質転換した。この修飾Protox-1酵素（Arac-2Ile+Arac305Leu）は細菌系で試験したとき、式XVIIのprotox阻害性アリールウラシル除草剤に対する許容性が天然酵素の10倍を超えていることを示した（実施例8～12参照）。上記と同様にして、実生苗発芽測定法でprotoxを阻害する除草剤に対して高い許容性を示した形質転換体から、この融合体を含む同型接合アラビドプシス株を作成した。野生型アラビドプシスの発芽阻害を示した化合物濃度について発芽測定法を繰り返すことより、1株由来の種子につき、様々なprotox阻害化合物に対する交差許容性を試験した。これらの実験の結果を表4に示す。
30

表 4

種子発芽測定法での様々な p r o t o x 阻害化合物に対する交差許容性

式	一般名	許容性	
I I	アシフルオロフェン	+	10
I I I	フォマサフェン	+	
I V	フルオログリコフェン	±	
I V b	ビフェノックス	+	
I V c	オキシフルオロフェン	+	
I V d	ラクトフェン	±	
V I I a	フルチアセットメチル	++	20
X	スルフェントラゾン	+	
X I	フルプロパジル	++	
X I V	フルミクロラック	+	
X V I	フルミオキサジン	+++	
X V I I		++	
XX I a	B A Y 1 1 3 4 0	+	30
XX I I		++	

± w t より許容性が 10 倍以下

± w t より許容性が 10 倍以上

++ w t より許容性が 100 倍以上

+++ w t より許容性が 1000 倍以上

実施例 28. トウモロコシ P r o t o x - 1 プロモーター配列の単離

Stratagene から F I X I I ベクターに挿入したトウモロコシ (ミズーリ 17 同系交配黄化実生) ゲノム DNA ライブラリーを購入した。このライブラリーおよそ 250,000 p f u を 15 cm 平板当たり 50,000 個ファージの密度でプレーティングし、Colony / Plaque スクリーン膜 (N E N Dupont) 上に複製リフトを作成した。このブラークリフトを、ランダムプライミング法 (ライフ・テクノロジーズ) により 32 P - d C T P で標識したトウモロコシ P r o t o x - 1 c DNA (配列番号 : 5) で探査した。ハイブリダイゼーションおよび洗浄の条件は、Church およびギルバート, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 81: 1991 ~ 1995 (1984 年) の記載と同様に 65 とした。Wizard Lambda Preps

DNA Purification System (Promega) を使用して、ポジティブにハイブリダイズする3個のファージから ファージDNAを単離した。制限消化、ハイブリダイゼーションパターンおよびDNA配列分析による解析から、以前cDNAクローニングとして単離されたトウモロコシProtox-1コード配列の5'に位置するおよそ3.5kbのトウモロコシゲノムDNAを含む クローンが確認された。この断片はトウモロコシProtox-1プロモーターを含む。この断片の配列を配列番号：14に示す。ヌクレオチド1～3532から、この配列は5'非コード配列から成る。ヌクレオチド3533～3848から、この配列は、トウモロコシProtox-1蛋白の5'末端をコードする。

トウモロコシProtox-1コード配列の残部と融合させた配列番号：14の配列を含むプラスミドを、1996年3月19日にpWDC-14 (NRRRL#B-21546)として寄託した。 10

実施例29. 天然トウモロコシProtox-1プロモーターの後ろに改変Protox-1遺伝子を発現する植物形質転換ベクター

単離した ファージクローニングから3848塩基対のゲノム断片（配列番号：14）をSalI-KpnI部分消化生成物として切り出し、アミノ酸164（配列番号：6）にアラニンからロイシンへの変異を含む改変トウモロコシProtox-1cDNA由来のKpnI-NotI断片とライゲートした。これにより、細菌系中で除草剤許容性を付与することを示す（実施例8～13）、天然トウモロコシProtox-1プロモーターの完全長cDNAとの融合体が作成された。この融合体をCaMV35Sターミネーター配列を含むpUC18由来ベクターでクローニングしてprotoxプロモーター/改変protox cDNA/ターミネーターを組み込んだ。このカセットを含むプラスミドをpWCo-1と命名した。 20

トウモロコシゲノムクローニング由来のコード配列中に見出した第1イントロンを元のトウモロコシcDNAに組み込むことによってトウモロコシ形質転換のための第2の構築物を作成した。この挿入は標準のオーバーラップPCR融合技術を使用して行なった。イントロン（配列番号：25）は長さ93塩基対であり、実施例28に記載した クローンの天然配列に示されるように、正確に配列番号：6のヌクレオチド203とヌクレオチド204の間に挿入された。この発現カセットのイントロン含有版をpWCo-2と命名した。 30

実施例30. トランスジェニックトウモロコシ植物中のトウモロコシProtox-1プロモーター活性の実験

トウモロコシprotoxプロモーター/改変protox融合体で形質転換されたトウモロコシ植物は導入遺伝子に特異的なプライマーによるPCR分析を使用して確認した。PCRポジティブの植物からRNA全体を調製し、Superscript M-MLV (Life Technologies)を使用して推奨条件下でRNAを逆転写した。改変protox配列に特異的となるように設計したPCR反応中で逆転写反応物2μlを使用した。この反応では、非形質転換対照からは生成物が生じなかつたが、一方pWCo-1で形質転換した植物のおよそ85%からは肯定的な結果が得られ、導入遺伝子由来のmRNAの存在が示された。これは、あるレベルのトウモロコシprotoxプロモーター活性を示す。また、このトランスジェニックトウモロコシ植物由来のRNAも、配列番号：6由来の放射性同位体標識トウモロコシprotox cDNA断片をプローブとして使用する標準のノーザンプロット分析に供した。トランスジェニックトウモロコシ植物のうちのいくつかに非形質転換対照のものをかなり上回るProtox-1 mRNAレベルが検出された。この高いmRNAレベルは、クローニングトウモロコシprotoxプロモーター由来の改変protox-1 mRNAの発現によると推定される。 40

実施例31. テンサイProtox-1プロモーター配列の単離

ゲノムテンサイライブラリーはStratageneにより Fix IIベクター中に調製された。トウモロコシについて実施例28に記載されているようにして、およそ300,000pfuのライブラリーをテンサイprotox-1cDNA配列（配列番号：17）上にプレーティングして探査した。制限消化、ハイブリダイゼーションパターンおよ 50

びDNA配列分析による解析から、以前cDNAクローンとして単離されたテンサイコード配列の5'に位置するおよそ7kbのテンサイゲノムDNAを含むクローンが確認された。クローンから2606bbのPstI-SalI断片をpBluecriptベクターにサブクローン化した。この断片は2068塩基対の5'非コード配列を含み、テンサイProtox-1プロモーターを含む。それはまた、protox-1コード配列の最初の453塩基対およびコード配列に含まれる85塩基対の第1イントロンをも含む。この断片の配列を配列番号：26に示す。

配列番号：26の配列を含むプラスミドを1996年12月6日にpWDC-20(NRRL#B-21650)として寄託した。

実施例32. 天然テンサイProtox-1プロモーターの後に変更Protox-1遺伝子を発現する植物形質転換ベクターの構築

実施例31に記載したゲノムサブクローンからテンサイゲノム断片（配列番号：26）を、2068塩基対の5'非コード配列とテンサイProtox-1コード配列の最初の300塩基対とを含むSacI-BsrGI断片として切り出した。この断片を、アミノ酸449（配列番号：18）にチロシンからメチオニンへの変異を含む変更テンサイProtox-1cDNA由来のBsrGI-NotI断片とライゲートした。これにより、細菌系で除草剤許容性を付与することを示す（実施例8～13）、天然テンサイProtox-1プロモーターの完全長のcDNAへの融合体が作成された。この融合体をCaMV35Sターミネーター配列を含むpUC18由来ベクターでクローン化してProtoxプロモーター/変更protox cDNA/ターミネーターカセットを作成した。このカセットを含むプラスミドをpWCo-3と命名した。

実施例33. 天然テンサイProtox-1プロモーター/変更テンサイProtox-1融合体の発現による除草剤許容性植物の作成

アグロバクテリウム、プロトプラストおよび微粒子銃形質転換技術を含む、双子葉植物植物に適用可能な任意の形質転換方法を使用して、pWCo-3由来の発現カセットをテンサイに形質転換する。RNA-PCRによって変更protox-1酵素を発現するトランスジェニックテンサイを確認し、非形質転換テンサイにとり致死濃度のprotox阻害性除草剤に対する許容性について試験する。

セクションD 植物色素体中のProtox遺伝子発現

実施例34. 色素体形質転換ベクター中のGUSレポーター遺伝子および色素体rps1-6遺伝子3'非翻訳配列と融合したタバコ色素体c1pP遺伝子プロモーターおよび天然c1pP 5'非翻訳配列を含むキメラ遺伝子の調製

I. タバコ色素体c1pP遺伝子プロモーターおよび完全5'非翻訳RNA（5'UTR）の増幅

N. tabacum栽培品種「Xanthi NC」由来のDNA全体を、構成的に発現した色素体c1pP遺伝子のATG開始コドンを基準として-197の位置に導入EcoRI制限部位を含む左から右への「トップストランド」プライマー（プライマーPc1p-P1a: 5' - g c g g a a t t c a t a c t t a t t a t c a t t a g a a a g - 3'（配列番号：27）；下線部はEco-RI制限部位）と、翻訳開始点に導入NcoI制限部位を組み込むc1pPプロモーターのATG開始コドンを基準として-21から-1までの領域と相同的の右から左への「ボトムストランド」プライマー（プライマーPc1p-P2b: 5' - g c g c c a t g g t a a a t g a a a g a a a g a a c t a a a - 3'（配列番号：28）；下線部はNcoI制限部位）とによるPCRのテンプレートとして使用した。このPCR反応は、以下の製造者（パーキン・エルマー/Roche、ニュージャージー州プランチバーグ）の推奨によりPfu熱安定DNAポリメラーゼ（Stratagene（カリフォルニア州ラホーヤ））を用いてパーキン・エルマーThermal Cycler 480中で行なった。95℃7分間に95℃1分間/43℃2分間/72℃1分間を4サイクル、次いで95℃1分間/55℃2分間/72℃2分間を25サイクル。このプロモーターと、左末端のEcoRI部位および右末端のNcoI部位を含みN. tabacum色素体DNA配列のヌクレオチド74700～74500

10

20

30

40

50

5に相当するc 1 p P遺伝子の5'非翻訳領域を含む213塩基対の増幅産物(Shin o zaki等, EMBO J. 5: 2043~2049(1986年))を標準法を用いてゲル精製し、EcoRIおよびNcoIで消化した(制限酵素は全てNew Ing l and Biolabs(マサチューセッツ州ベヴァリー)から購入した)。

II. タバコ色素体rps16遺伝子3'非翻訳RNA配列(3'UTR)の増幅
上記と同様に、N. tabacum栽培品種「Xanthi NC」由来のDNA全体を、リボソーム蛋白S16をコードする色素体rps16遺伝子のTAA停止コドン直後に導入XbaI制限部位を含む左から右へのトップストランドプライマー(プライマー-rps16P_1a(5' GCGTCTAGATCAACCGAAATTCAATTAAAGG-3')(配列番号:30);下線部はXbaI制限部位)と、rps16 3'UTRの3'末端に導入HindIII制限部位を組み込むrps16のTAA停止コドンを基準として+134から+151までの領域と相同的右から左への「ボトムストランド」プライマー(プライマー-rps16P_1b(5' CGCAAGCTTCAATGGAAAGCAATGATAA-3')(配列番号:31);下線部はHindIII制限部位)とによるPCRのテンプレートとして使用した。左末端のXbaI部位と右末端のHindIII部位を含みN. tabacum色素体DNA配列のヌクレオチド4943~5093に相当する領域を含むrps16遺伝子の3'非翻訳領域を含む169塩基対の増幅産物(Shin ozaki等、1986年)をゲル精製し、XbaIおよびHindIIIで消化した。

III. GUSリポーター遺伝子断片のc 1 p P遺伝子プロモーターと5'および3'UTRとのライゲーション 20

ATG開始コドンのNcoI制限部位および天然3'UTRの後のXbaI部位を含む、プラスミドpRAJ275(Clontech)由来の1864塩基対のb-ガラクトロニダーゼ(GUS)リポーター遺伝子断片をNcoIおよびXbaIによる消化によって作成した。この断片を201塩基対のEcoRI/NcoI c 1 p Pプロモーター断片、157塩基対のXbaI/HindIII rps16 3'UTR断片およびクローニングベクター-pGEM3Zf(-)(Promega、ウィスコンシン州マディソン)由来の3148塩基対のEcoRI/HindIII断片に4通りの反応でライゲートしてプラスミドpPH138を構築した。EcoRIとHindIIIでプラスミドpPRV111a(Zoubenko等、1994年)を消化し、得られた7287塩基対断片をpPH138の2222塩基対のEcoRI/HindIII断片にライゲートすることによって色素体形質転換ベクター-pPH140を構築した。 30

実施例35. 色素体形質転換ベクター中のレポーター遺伝子および色素体rps16遺伝子3'非翻訳配列と融合したタバコ色素体c 1 p P遺伝子プロモーターとタバコ色素体p s b A遺伝子最小5'GUS非翻訳配列のキメラ遺伝子の調製

タバコ色素体c 1 p P遺伝子プロモーターおよび切断型5'非翻訳RNA(5'UTR)の増幅:上記と同様にしてN. tabacum栽培品種「Xanthi NC」由来のDNA全体を、左から右への「トップストランド」プライマー-Pc1p_P1a(配列番号:27)と、C1pP5'UTRの位置-11に導入XbaI制限部位を組み込むc 1 p PプロモーターのATG開始コドンを基準として-34から-11までの領域と相同的右から左への「ボトムストランド」プライマー(プライマー-Pc1p_P1b:5'-gcgtctagaaagaactaaatactatattcac-3'(配列番号:29);下線部はXbaI制限部位)とによるPCRのテンプレートとして使用した。左末端のEcoRI部位と右末端のXbaI部位を含み、プロモーターおよびc 1 p P遺伝子の切断型5'UTRを含む202塩基対の増幅産物をゲル精製し、XbaI消化した。このXbaI部位を、クレノウDNAポリメラーゼ(New Ing l and Biolabs)でほぼ満たし、断片をEcoRI消化した。これを、タバコ色素体p s b A遺伝子の5'UTRの最終の38ヌクレオチドおよびATG開始コドン(NcoI制限部位オーバーハング開始コドンをATGに導入)に相当する2本鎖DNA断片に5通りの反応でライゲートしてプラスミドpPH139を構築したが、この2本鎖DNA断片は、合成オリ 40

ゴヌクレオチドminpsb_U(トップストランド: 5' - gggagtcacctgatgattaaataaaaccaggatttac-3' (配列番号: 32))およびminpsb_L(ボトムストランド: 5' - catggtaaaaatcttggtttatttaatcatcaggacccccc-3' (配列番号: 33) 下線部はNco I制限部位5'オーバーハンギング))、上記のNco I / Xba I GUSリポーター遺伝子断片、上記のXba I / Hind III rps16 3' UTR断片、および上記のEco RI / Hind III pGEM3Zf(-)断片をアニーリングすることによって作成した。プラスミドpPRV111a (Zoubenko等, Nucleic Acids Res 22: 3819~3824 (1994年))をEco RIおよびHind IIIで消化し、得られた生じる7287塩基対断片をpPH139の2251塩基対Eco RI / Hind III断片にライゲートすることによって色素体形質転換ベクターpPH144を構築した。

実施例36. タバコ色素体形質転換用のベクター中でアラビドプシス・タリアナProtox-1コード配列および色素体rps16遺伝子3'非翻訳配列と融合したタバコ色素体c1pP遺伝子プロモーターおよび完全5'非翻訳配列を含むキメラ遺伝子の調製

アミノ末端の色素体輸送ペプチド、完全長のcDNAおよび3'非翻訳領域の一部をコードするプロトポルフィリノーゲンIXオキシダーゼ(「PROTOX」)遺伝子由来のcDNA配列を含むアラビドプシス・タリアナNot Iインサートを保有するプラスミドArac-2Met由来のMiniprepDNAを、成熟PROTOX蛋白コード配列の推定された開始点に導入されたNco I制限部位および新しい開始コドンATG(プライマーアルファ-APRTXP1a: 5' - GGGACCCATGGATTGTTGATTCGTCGGCGGAGG-3' (配列番号: 34) ; 下線部はNco I制限部位)を含む左から右への「トップストランド」プライマー(完全長の前駆体蛋白のATG開始コドンを基準として+172から+194のヌクレオチドと相同)とPROTOX前駆体蛋白の天然ATG開始コドンを基準として+917から+940のヌクレオチドに相同的の右から左への「ボトムストランド」プライマー(プライマーアルファ-APRTXP1b: 5' - CTCCCGCTCTCCAGCTTAGTGATAC-3' (配列番号: 35))とを使用する上記のPCRのテンプレートとして使用した。778塩基対の生成物をNco IおよびSfu Iで消化し、得られた682塩基対の断片をPROTOXコード配列の3'部分を含むArac-2Metを含む844塩基対のSfu I / Not I DNA断片と、クローニングベクターpGEM5Zf(+) (Promega、ウィスコンシン州マディソン)の2978塩基対のNco I / Not I断片にライゲートしてプラスミドpPH141を構築した。pPH141をNco IおよびSsp Iにより消化し、完全なPROTOXコード配列を含む1491塩基対の断片を単離し、上記のrps16P_1aおよびrps16P_1bの各PCR産物をHind IIIで消化し、これらをpPH140の7436塩基対のNco I / Hind III断片にライゲートすることによって、rps16 3' UTRにより276'854-耐性SV1-Met PROTOX遺伝子を制御するc1pPプロモーターを含む色素体形質転換ベクターpPH143を構築した。

実施例37. タバコ色素体形質転換用のベクター中でアラビドプシス・タリアナProtox-1コード配列および色素体rps16遺伝子3'非翻訳配列と融合したタバコ色素体c1pP遺伝子プロモーターおよびpsbA遺伝子最小5'非翻訳配列を含むキメラ遺伝子の調製

pPH141をNco IおよびSsp Iにより消化し、完全なPROTOXコード配列を含む1491塩基対の断片を単離し、上記のrps16P_1aおよびrps16P_1bの各PCR産物をHind IIIで消化し、これらをpPH144の7465塩基対のNco I / Hind III断片にライゲートすることによって、rps16 3' UTRにより276'854-耐性SV1-Met PROTOX遺伝子を制御するc1pPプロモーター / psbA 5'のUTR融合体を含む色素体形質転換ベクターpPH145を構築した。

実施例38. タバコ色素体ゲノムのBiological形質転換

10

20

30

40

50

基本的に記載 (Svab, Z. および Maliga, P. (1993) PNAS 90, 91~917) の通り、Nicotiana tabacum 栽培品種「Xanthi nc」の種子を T 寒天培地の上に円形に配列し平板 1 枚当たり 7 個発芽させ、播種から 12~14 日後にプラスミド pPH143 および pPH145 由来の DNA で被覆した 1 μm のタンゲステン粒子 (M10, Biowad, カリフォルニア州ヘラクレス) でポンバードした。ポンバードした実生を T 培地上で 2 日間インキュベートした後、葉を切り出して背軸面を明光 (350~500 μmol 光子 / m² / s) 側にして 500 μg / ml スペクチノマイシンジヒドロクロリド (シグマ、ミズーリ州セントルイス) を含む RMOP 培地 (Svab, Z., Hajdukiewicz, P. および Maliga, P. (1990 年) PNAS 87, 8526~8530) の平板上に置いた。ポンバードから 3~8 週間後に白くなった葉の真下に現われた耐性苗条を、同じ選択培地上にサブクローニングしてカルスを形成させ、二次苗条を単離、サブクローニングした。標準的技術のサザンプロット法 (Sambrook 等, (1989 年) 「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」 Cold Spring Harbor Laboratory、コールドスプリング港) により、独立したサブクローニング中の形質転換色素体ゲノムコピーの完全な分離 (ホモプラスミシティー: homoplasmy) を評価した。BamHI / EcoRI 消化した全細胞 DNA (Mettler, I. J. (1987 年) Plsnt Mol Biol Reporter 5, 346~349) を、1% トリス - ホウ酸塩 (TBE) アガロースゲル上で単離し、ナイロン膜 (Amersham) に移し、rps7/12 色素体ターゲティング配列の一部を含む pC8 由来の 0.7 kb の BamHI / HindIII DNA 断片に相当する DNA 配列を³² P - 標識した無作為プライミング DNA 配列で探査した。ホモプラスミック (Homoplastic) な苗条を、スペクチノマイシンを含む MS / IBA 培地 (McBride, K. E. 等 (1994 年) PNAS 91, 7301~7305) 上で無菌的に根付かせ、温室へ移した。

本明細書に記載した発明の様々な修正は当業者には明白であろう。このような修正は添付した請求の範囲の中に含まれるものとする。

配列表

(1) 一般情報 :

(ii) 発明の名称 : 植物プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼをコードする DNA 分子 30 およびその阻害物質耐性突然変異体

(iii) 配列の数 : 35

(vii) 前の出願のデーター :

(A) 出願番号 : US 60/012,705

(B) 出願日 : 1996 年 2 月 28 日

(vii) 前の出願のデーター :

(A) 出願番号 : US 60/013,612

(B) 出願日 : 1996 年 2 月 28 日

(vii) 前の出願のデーター :

(A) 出願番号 : US 60/020,003

(B) 出願日 : 1996 年 6 月 21 日

(2) 配列番号 : 1:

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 1719 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 分子型 : cDNA

(iii) ハイポセティカル : NO

(iv) アンチセンス : NO

10

20

30

40

50

(vi)由来:

(A)生物:Arabidopsis thaliana

(vii)直接の由来:

(B)クローン:pWDC-2 (NRRL B-21238)

(ix)特徴:

(A)NAME/KEY: CDS

(B)位置:31..1644

(D)他の情報:/product="Arabidopsis protox-1"

(xi)配列の記載:配列番号:1:

TGACAAAATT	CCGAATTCTC	TGCGATTCC	ATG	GAG	TTA	TCT	CTT	CTC	CGT	CCG	54	10				
Met Glu Leu Ser Leu Leu Arg Pro																
			1						5							
ACG	ACT	CAA	TCG	CTT	CCG	TCG	TTT	TCG	AAG	CCC	AAT	CTC	CGA	TTA	102	
Thr	Thr	Gln	Ser	Leu	Leu	Pro	Ser	Phe	Ser	Lys	Pro	Asn	Leu	Arg	Leu	
10				15						20						
AAT	GTT	TAT	AAG	CCT	CTT	AGA	CTC	CGT	TGT	TCA	GTG	GCC	GGT	GGA	CCA	150
Asn	Val	Tyr	Lys	Pro	Leu	Arg	Leu	Arg	Cys	Ser	Val	Ala	Gly	Gly	Pro	20
25				30						35			40			
ACC	GTC	GGA	TCT	TCA	AAA	ATC	GAA	GGC	GGC	GGC	ACC	ACC	ATC	ACG	198	
Thr	Val	Gly	Ser	Ser	Lys	Ile	Glu	Gly	Gly	Gly	Thr	Thr	Ile	Thr		
						45		50		55						
ACG	GAT	TGT	GTG	ATT	GTC	GGC	GGC	GGT	ATT	AGT	GGT	CTT	TGC	ATC	GCT	246
Thr	Asp	Cys	Val	Ile	Val	Gly	Gly	Ile	Ser	Gly	Leu	Cys	Ile	Ala		
				60		65				70					30	
CAG	GCG	CTT	GCT	ACT	AAG	CAT	CCT	GAT	GCT	GCT	CCG	AAT	TTA	ATT	GTG	294
Gln	Ala	Leu	Ala	Thr	Lys	His	Pro	Asp	Ala	Ala	Pro	Asn	Leu	Ile	Val	
				75		80				85					40	
ACC	GAG	GCT	AAG	GAT	CGT	GTT	GGC	GGC	AAC	ATT	ATC	ACT	CGT	GAA	GAG	342
Thr	Glu	Ala	Lys	Asp	Arg	Val	Gly	Gly	Asn	Ile	Ile	Thr	Arg	Glu	Glu	
				90		95				100						

AAT GGT TTT CTC TGG GAA GAA GGT CCC AAT AGT TTT CAA CCG TCT GAT	390		
Asn Gly Phe Leu Trp Glu Glu Gly Pro Asn Ser Phe Gln Pro Ser Asp			
105	110	115	120
CCT ATG CTC ACT ATG GTG GTA GAT AGT GGT TTG AAG GAT GAT TTG GTG	438		
Pro Met Leu Thr Met Val Val Asp Ser Gly Leu Lys Asp Asp Leu Val			
125	130	135	10
TTG GGA GAT CCT ACT GCG CCA AGG TTT GTG TTG TGG AAT GGG AAA TTG	486		
Leu Gly Asp Pro Thr Ala Pro Arg Phe Val Leu Trp Asn Gly Lys Leu			
140	145	150	
AGG CCG GTT CCA TCG AAG CTA ACA GAC TTA CCG TTC TTT GAT TTG ATG	534		
Arg Pro Val Pro Ser Lys Leu Thr Asp Leu Pro Phe Phe Asp Leu Met			
155	160	165	20
AGT ATT GGT GGG AAG ATT AGA GCT GGT TTT GGT GCA CTT GGC ATT CGA	582		
Ser Ile Gly Gly Lys Ile Arg Ala Gly Phe Gly Ala Leu Gly Ile Arg			
170	175	180	
CCG TCA CCT CCA GGT CGT GAA GAA TCT GTG GAG GAG TTT GTA CGG CGT	630		
Pro Ser Pro Pro Gly Arg Glu Glu Ser Val Glu Glu Phe Val Arg Arg			
185	190	195	30
AAC CTC GGT GAT GAG GTT TTT GAG CGC CTG ATT GAA CCG TTT TGT TCA	678		
Asn Leu Gly Asp Glu Val Phe Glu Arg Leu Ile Glu Pro Phe Cys Ser			
205	210	215	
GGT GTT TAT GCT GGT GAT CCT TCA AAA CTG AGC ATG AAA GCA GCG TTT	726		
Gly Val Tyr Ala Gly Asp Pro Ser Lys Leu Ser Met Lys Ala Ala Phe			
220	225	230	40
GGG AAG GTT TGG AAA CTA GAG CAA AAT GGT GGA AGC ATA ATA GGT GGT	774		
Gly Lys Val Trp Lys Leu Glu Gln Asn Gly Gly Ser Ile Ile Gly Gly			
235	240	245	

ACT TTT AAG GCA ATT CAG GAG AGG AAA AAC GCT CCC AAG GCA GAA CGA 822
 Thr Phe Lys Ala Ile Gln Glu Arg Lys Asn Ala Pro Lys Ala Glu Arg
 250 255 260
 GAC CCG CGC CTG CCA AAA CCA CAG GGC CAA ACA GTT GGT TCT TTC AGG 870
 Asp Pro Arg Leu Pro Lys Pro Gln Gly Gln Thr Val Gly Ser Phe Arg
 265 270 275 280 10
 AAG GGA CTT CGA ATG TTG CCA GAA GCA ATA TCT GCA AGA TTA GGT AGC 918
 Lys Gly Leu Arg Met Leu Pro Glu Ala Ile Ser Ala Arg Leu Gly Ser
 285 290 295
 AAA GTT AAG TTG TCT TGG AAG CTC TCA GGT ATC ACT AAG CTG GAG AGC 966
 Lys Val Lys Leu Ser Trp Lys Leu Ser Gly Ile Thr Lys Leu Glu Ser
 300 305 310 20
 GGA GGA TAC AAC TTA ACA TAT GAG ACT CCA GAT GGT TTA GTT TCC GTG 1014
 Gly Gly Tyr Asn Leu Thr Tyr Glu Thr Pro Asp Gly Leu Val Ser Val
 315 320 325
 CAG AGC AAA AGT GTT GTA ATG ACG GTG CCA TCT CAT GTT GCA AGT GGT 1062
 Gln Ser Lys Ser Val Val Met Thr Val Pro Ser His Val Ala Ser Gly
 330 335 340 30
 CTC TTG CGC CCT CTT TCT GAA TCT GCT GCA AAT GCA CTC TCA AAA CTA 1110
 Leu Leu Arg Pro Leu Ser Glu Ser Ala Ala Asn Ala Leu Ser Lys Leu
 345 350 355 360
 TAT TAC CCA CCA GTT GCA GCA GTA TCT ATC TCG TAC CCG AAA GAA GCA 1158
 Tyr Tyr Pro Pro Val Ala Ala Val Ser Ile Ser Tyr Pro Lys Glu Ala 40
 365 370 375
 ATC CGA ACA GAA TGT TTG ATA GAT GGT GAA CTA AAG GGT TTT GGG CAA 1206
 Ile Arg Thr Glu Cys Leu Ile Asp Gly Glu Leu Lys Gly Phe Gly Gln
 380 385 390

TTG CAT CCA CGC ACG CAA GGA GTT GAA ACA TTA GGA ACT ATC TAC AGC 1254
 Leu His Pro Arg Thr Gln Gly Val Glu Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Ser
 395 400 405
 TCC TCA CTC TTT CCA AAT CGC GCA CCG CCC GGA AGA ATT TTG CTG TTG 1302
 Ser Ser Leu Phe Pro Asn Arg Ala Pro Pro Gly Arg Ile Leu Leu
 410 415 420 10
 AAC TAC ATT GGC GGG TCT ACA AAC ACC GGA ATT CTG TCC AAG TCT GAA 1350
 Asn Tyr Ile Gly Gly Ser Thr Asn Thr Gly Ile Leu Ser Lys Ser Glu
 425 430 435 440
 GGT GAG TTA GTG GAA GCA GTT GAC AGA GAT TTG AGG AAA ATG CTA ATT 1398
 Gly Glu Leu Val Glu Ala Val Asp Arg Asp Leu Arg Lys Met Leu Ile
 445 450 455 20
 AAG CCT AAT TCG ACC GAT CCA CTT AAA TTA GGA GTT AGG GTA TGG CCT 1446
 Lys Pro Asn Ser Thr Asp Pro Leu Lys Leu Gly Val Arg Val Trp Pro
 460 465 470
 CAA GCC ATT CCT CAG TTT CTA GTT GGT CAC TTT GAT ATC CTT GAC ACG 1494
 Gln Ala Ile Pro Gln Phe Leu Val Gly His Phe Asp Ile Leu Asp Thr
 475 480 485 30
 GCT AAA TCA TCT CTA ACG TCT TCG GGC TAC GAA GGG CTA TTT TTG GGT 1542
 Ala Lys Ser Ser Leu Thr Ser Ser Gly Tyr Glu Gly Leu Phe Leu Gly
 490 495 500
 GGC AAT TAC GTC GCT GGT GTA GCC TTA GGC CGG TGT GTA GAA GGC GCA 1590
 Gly Asn Tyr Val Ala Gly Val Ala Leu Gly Arg Cys Val Glu Gly Ala
 505 510 515 520 40
 TAT GAA ACC GCG ATT GAG GTC AAC AAC TTC ATG TCA CGG TAC GCT TAC 1638
 Tyr Glu Thr Ala Ile Glu Val Asn Asn Phe Met Ser Arg Tyr Ala Tyr
 525 530 535

AAG TAAATGTAAA ACATTAATC TCCCAGCTTG CGTGAGTTT ATTAAATATT 1691

Lys

TTGAGATATC CAAAAAAA AAAAAAA 1719

(2)配列番号 : 2:

(i)配列の特徴 :

(A)長さ : 537アミノ酸

(B)型 : アミノ酸

(D)トポロジー : 直鎖状 10

(ii)分子型 : 蛋白質

(xi)配列の記載 : 配列数:2:

Met Glu Leu Ser Leu Leu Arg Pro Thr Thr Gln Ser Leu Leu Pro Ser

1

5

10

15

Phe Ser Lys Pro Asn Leu Arg Leu Asn Val Tyr Lys Pro Leu Arg Leu

20

25

30

Arg Cys Ser Val Ala Gly Gly Pro Thr Val Gly Ser Ser Lys Ile Glu 20

35

40

45

Gly Gly Gly Gly Thr Thr Ile Thr Thr Asp Cys Val Ile Val Gly Gly

50

55

60

Gly Ile Ser Gly Leu Cys Ile Ala Gln Ala Leu Ala Thr Lys His Pro

65

70

75

80

Asp Ala Ala Pro Asn Leu Ile Val Thr Glu Ala Lys Asp Arg Val Gly 30

85

90

95

Gly Asn Ile Ile Thr Arg Glu Glu Asn Gly Phe Leu Trp Glu Glu Gly

100

105

110

Pro Asn Ser Phe Gln Pro Ser Asp Pro Met Leu Thr Met Val Val Asp

115

120

125

40

Ser Gly Leu Lys Asp Asp Leu Val Leu Gly Asp Pro Thr Ala Pro Arg

130 135 140

Phe Val Leu Trp Asn Gly Lys Leu Arg Pro Val Pro Ser Lys Leu Thr

145 150 155 160

Asp Leu Pro Phe Phe Asp Leu Met Ser Ile Gly Gly Lys Ile Arg Ala

165 170 175

10

Gly Phe Gly Ala Leu Gly Ile Arg Pro Ser Pro Pro Gly Arg Glu Glu

180 185 190

Ser Val Glu Glu Phe Val Arg Arg Asn Leu Gly Asp Glu Val Phe Glu

195 200 205

Arg Leu Ile Glu Pro Phe Cys Ser Gly Val Tyr Ala Gly Asp Pro Ser

210 215 220 20

Lys Leu Ser Met Lys Ala Ala Phe Gly Lys Val Trp Lys Leu Glu Gln

225 230 235 240

Asn Gly Gly Ser Ile Ile Gly Gly Thr Phe Lys Ala Ile Gln Glu Arg

245 250 255

Lys Asn Ala Pro Lys Ala Glu Arg Asp Pro Arg Leu Pro Lys Pro Gln

260 265 270

30

Gly Gln Thr Val Gly Ser Phe Arg Lys Gly Leu Arg Met Leu Pro Glu

275 280 285

Ala Ile Ser Ala Arg Leu Gly Ser Lys Val Lys Leu Ser Trp Lys Leu

290 295 300

Ser Gly Ile Thr Lys Leu Glu Ser Gly Gly Tyr Asn Leu Thr Tyr Glu

40

305 310 315 320

Thr Pro Asp Gly Leu Val Ser Val Gln Ser Lys Ser Val Val Met Thr

325 330 335

Val Pro Ser His Val Ala Ser Gly Leu Leu Arg Pro Leu Ser Glu Ser

340 345 350

Ala Ala Asn Ala Leu Ser Lys Leu Tyr Tyr Pro Pro Val Ala Ala Val

355 360 365

Ser Ile Ser Tyr Pro Lys Glu Ala Ile Arg Thr Glu Cys Leu Ile Asp

370 375 380 10

Gly Glu Leu Lys Gly Phe Gly Gln Leu His Pro Arg Thr Gln Gly Val

385 390 395 400

Glu Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Ser Ser Ser Leu Phe Pro Asn Arg Ala

405 410 415

Pro Pro Gly Arg Ile Leu Leu Leu Asn Tyr Ile Gly Gly Ser Thr Asn

420 425 430 20

Thr Gly Ile Leu Ser Lys Ser Glu Gly Glu Leu Val Glu Ala Val Asp

435 440 445

Arg Asp Leu Arg Lys Met Leu Ile Lys Pro Asn Ser Thr Asp Pro Leu

450 455 460

Lys Leu Gly Val Arg Val Trp Pro Gln Ala Ile Pro Gln Phe Leu Val

465 470 475 480

Gly His Phe Asp Ile Leu Asp Thr Ala Lys Ser Ser Leu Thr Ser Ser

485 490 495

Gly Tyr Glu Gly Leu Phe Leu Gly Gly Asn Tyr Val Ala Gly Val Ala

500 505 510

Leu Gly Arg Cys Val Glu Gly Ala Tyr Glu Thr Ala Ile Glu Val Asn

515 520 525

Asn Phe Met Ser Arg Tyr Ala Tyr Lys

530 535

(2)配列番号: 3

(i)配列の特徴:

(A)長さ: 1738塩基対

(B)型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 分子型 : cDNA

(iii) ハイボセティカル : NO

(iv) アンチセンス : NO

(vi) 由来 :

(A) 生物 : *Arabidopsis thaliana*

(vii) 直接の由来 :

(B) クローン : pWDC-1 (NRRL B-21237)

(ix) 特徴 :

(A) NAME/KEY : CDS

10

(B) 位置 : 70..1596

(D) 他の情報 : /product= "Arabidopsis protox-2"

(xi) 配列の記載 : 配列番号: 3:

TTTTTACTT ATTTCCGTCA CTGCTTCGA CTGGTCAGAG ATTTTCACTC TGAATTGTTG 60

CAGATAGCA ATG GCG TCT GGA GCA GTA GCA GAT CAT CAA ATT GAA GCG 108

Met Ala Ser Gly Ala Val Ala Asp His Gln Ile Glu Ala

1

5

10

GTT TCA GGA AAA AGA GTC GCA GTC GTA GGT GCA GGT GTA AGT GGA CTT 156

20

Val Ser Gly Lys Arg Val Ala Val Val Gly Ala Gly Val Ser Gly Leu

15

20

25

GCG GCG GCT TAC AAG TTG AAA TCG AGG GGT TTG AAT GTG ACT GTG TTT 204

Ala Ala Ala Tyr Lys Leu Lys Ser Arg Gly Leu Asn Val Thr Val Phe

30

35

40

45

30

GAA GCT GAT GGA AGA GTC GGT GGG AAG TTG AGA AGT GTT ATG CAA AAT	252		
Glu Ala Asp Gly Arg Val Gly Gly Lys Leu Arg Ser Val Met Gln Asn			
50	55	60	
GGT TTG ATT TGG GAT GAA GGA GCA AAC ACC ATG ACT GAG GCT GAG CCA	300		
Gly Leu Ile Trp Asp Glu Gly Ala Asn Thr Met Thr Glu Ala Glu Pro			
65	70	75	
GAA GTT GGG AGT TTA CTT GAT GAT CTT GGG CTT CGT GAG AAA CAA CAA	348		
Glu Val Gly Ser Leu Leu Asp Asp Leu Gly Leu Arg Glu Lys Gln Gln			
80	85	90	
TTT CCA ATT TCA CAG AAA AAG CGG TAT ATT GTG CGG AAT GGT GTA CCT	396		
Phe Pro Ile Ser Gln Lys Lys Arg Tyr Ile Val Arg Asn Gly Val Pro			
95	100	105	
GTG ATG CTA CCT ACC AAT CCC ATA GAG CTG GTC ACA AGT AGT GTG CTC	444		
Val Met Leu Pro Thr Asn Pro Ile Glu Leu Val Thr Ser Ser Val Leu			
110	115	120	125
TCT ACC CAA TCT AAG TTT CAA ATC TTG TTG GAA CCA TTT TTA TGG AAG	492		
Ser Thr Gln Ser Lys Phe Gln Ile Leu Leu Glu Pro Phe Leu Trp Lys			
130	135	140	
AAA AAG TCC TCA AAA GTC TCA GAT GCA TCT GCT GAA GAA AGT GTA AGC	540		
Lys Lys Ser Ser Lys Val Ser Asp Ala Ser Ala Glu Glu Ser Val Ser			
145	150	155	
GAG TTC TTT CAA CGC CAT TTT GGA CAA GAG GTT GTT GAC TAT CTC ATC	588		
Glu Phe Phe Gln Arg His Phe Gly Gln Glu Val Val Asp Tyr Leu Ile			
160	165	170	
GAC CCT TTT GTT GGT GGA ACA AGT GCT GCG GAC CCT GAT TCC CTT TCA	636		
Asp Pro Phe Val Gly Gly Thr Ser Ala Ala Asp Pro Asp Ser Leu Ser			
175	180	185	

ATG AAG CAT TCT TTC CCA GAT CTC TGG AAT GTA GAG AAA AGT TTT GGC	684		
Met Lys His Ser Phe Pro Asp Leu Trp Asn Val Glu Lys Ser Phe Gly			
190	195	200	205
TCT ATT ATA GTC GGT GCA ATC AGA ACA AAG TTT GCT GCT AAA GGT GGT	732		
Ser Ile Ile Val Gly Ala Ile Arg Thr Lys Phe Ala Ala Lys Gly Gly			
210	215	220	10
AAA AGT AGA GAC ACA AAG AGT TCT CCT GGC ACA AAA AAG GGT TCG CGT	780		
Lys Ser Arg Asp Thr Lys Ser Ser Pro Gly Thr Lys Lys Gly Ser Arg			
225	230	235	
GGG TCA TTC TCT TTT AAG GGG GGA ATG CAG ATT CTT CCT GAT ACG TTG	828		
Gly Ser Phe Ser Phe Lys Gly Gly Met Gln Ile Leu Pro Asp Thr Leu			
240	245	250	20
TGC AAA AGT CTC TCA CAT GAT GAG ATC AAT TTA GAC TCC AAG GTC CTC	876		
Cys Lys Ser Leu Ser His Asp Glu Ile Asn Leu Asp Ser Lys Val Leu			
255	260	265	
TCT TTG TCT TAC AAT TCT GGA TCA AGA CAG GAG AAC TGG TCA TTA TCT	924		
Ser Leu Ser Tyr Asn Ser Gly Ser Arg Gln Glu Asn Trp Ser Leu Ser			
270	275	280	30
TGT GTT TCG CAT AAT GAA ACG CAG AGA CAA AAC CCC CAT TAT GAT GCT	972		
Cys Val Ser His Asn Glu Thr Gln Arg Gln Asn Pro His Tyr Asp Ala			
290	295	300	
GTA ATT ATG ACG GCT CCT CTG TGC AAT GTG AAG GAG ATG AAG GTT ATG	1020		
Val Ile Met Thr Ala Pro Leu Cys Asn Val Lys Glu Met Lys Val Met			
305	310	315	40
AAA GGA GGA CAA CCC TTT CAG CTA AAC TTT CTC CCC GAG ATT AAT TAC	1068		
Lys Gly Gly Gln Pro Phe Gln Leu Asn Phe Leu Pro Glu Ile Asn Tyr			
320	325	330	

ATG CCC CTC TCG GTT TTA ATC ACC ACA TTC ACA AAG GAG AAA GTA AAG	1116		
Met Pro Leu Ser Val Leu Ile Thr Thr Phe Thr Lys Glu Lys Val Lys			
335	340	345	
AGA CCT CTT GAA GGC TTT GGG GTA CTC ATT CCA TCT AAG GAG CAA AAG	1164		
Arg Pro Leu Glu Gly Phe Gly Val Leu Ile Pro Ser Lys Glu Gln Lys			
350	355	360	365
CAT GGT TTC AAA ACT CTA GGT ACA CTT TTT TCA TCA ATG ATG TTT CCA	1212		
His Gly Phe Lys Thr Leu Gly Thr Leu Phe Ser Ser Met Met Phe Pro			
370	375	380	
CAT CGT TCC CCT AGT GAC GTT CAT CTA TAT ACA ACT TTT ATT GGT GGG	1260		
Asp Arg Ser Pro Ser Asp Val His Leu Tyr Thr Phe Ile Gly Gly			
385	390	395	
AGT AGG AAC CAG GAA CTA GCC AAA GCT TCC ACT GAC GAA TTA AAA CAA	1308		
Ser Arg Asn Gln Glu Leu Ala Lys Ala Ser Thr Asp Glu Leu Lys Gln			
400	405	410	
GTT GTG ACT TCT GAC CTT CAG CGA CTG TTG GGG GTT GAA GGT GAA CCC	1356		
Val Val Thr Ser Asp Leu Gln Arg Leu Leu Gly Val Glu Gly Glu Pro			
415	420	425	
GTG TCT GTC AAC CAT TAC TAT TGG AGG AAA GCA TTC CCG TTG TAT GAC	1404		
Val Ser Val Asn His Tyr Tyr Trp Arg Lys Ala Phe Pro Leu Tyr Asp			
430	435	440	445
AGC AGC TAT GAC TCA GTC ATG GAA GCA ATT GAC AAG ATG GAG AAT GAT	1452		
Ser Ser Tyr Asp Ser Val Met Glu Ala Ile Asp Lys Met Glu Asn Asp			
450	455	460	
CTA CCT GGG TTC TTC TAT GCA GGT AAT CAT CGA GGG GGG CTC TCT GTT	1500		
Leu Pro Gly Phe Phe Tyr Ala Gly Asn His Arg Gly Gly Leu Ser Val			
465	470	475	

GGG AAA TCA ATA GCA TCA GGT TGC AAA GCA GCT GAC CTT GTG ATC TCA 1548

Gly Lys Ser Ile Ala Ser Gly Cys Lys Ala Ala Asp Leu Val Ile Ser

480

485

490

TAC CTG GAG TCT TGC TCA AAT GAC AAG AAA CCA AAT GAC AGC TTA TAACATTGTC

1603

Tyr Leu Glu Ser Cys Ser Asn Asp Lys Lys Pro Asn Asp Ser Leu

495

500

505

10

AAGGTTCGTC CCTTTTATC ACTTACTTTG TAAACTTGTA AAATGCAACA AGCCGCCGTG 1663

CGATTAGCCA ACAACTCAGC AAAACCCAGA TTCTCATAAG GCTCACTAAT TCCAGAATAA 1723

ACTATTTATG TAAAAA 1738

(2)配列番号 : 4:

(i)配列の特徴 :

(A)長さ : 508アミノ酸

20

(B)型 : アミノ酸

(D)トポロジー : 直鎖状

(ii)分子型 : 蛋白質

(xi)配列の記載 : 配列番号:4:

Met Ala Ser Gly Ala Val Ala Asp His Gln Ile Glu Ala Val Ser Gly

1

5

10

15

Lys Arg Val Ala Val Val Gly Ala Gly Val Ser Gly Leu Ala Ala Ala

20

25

30

30

Tyr Lys Leu Lys Ser Arg Gly Leu Asn Val Thr Val Phe Glu Ala Asp

35

40

45

Gly Arg Val Gly Gly Lys Leu Arg Ser Val Met Gln Asn Gly Leu Ile

50

55

60

Trp Asp Glu Gly Ala Asn Thr Met Thr Glu Ala Glu Pro Glu Val Gly

65

70

75

80

40

Ser Leu Leu Asp Asp Leu Gly Leu Arg Glu Lys Gln Gln Phe Pro Ile

85 90 95

Ser Gln Lys Lys Arg Tyr Ile Val Arg Asn Gly Val Pro Val Met Leu

100 105 110

Pro Thr Asn Pro Ile Glu Leu Val Thr Ser Ser Val Leu Ser Thr Gln

115 120 125

10

Ser Lys Phe Gln Ile Leu Leu Glu Pro Phe Leu Trp Lys Lys Lys Ser

130 135 140

Ser Lys Val Ser Asp Ala Ser Ala Glu Glu Ser Val Ser Glu Phe Phe

145 150 155 160

Gln Arg His Phe Gly Gln Glu Val Val Asp Tyr Leu Ile Asp Pro Phe

165 170 175

20

Val Gly Gly Thr Ser Ala Ala Asp Pro Asp Ser Leu Ser Met Lys His

180 185 190

Ser Phe Pro Asp Leu Trp Asn Val Glu Lys Ser Phe Gly Ser Ile Ile

195 200 205

Val Gly Ala Ile Arg Thr Lys Phe Ala Ala Lys Gly Gly Lys Ser Arg

210 215 220

30

Asp Thr Lys Ser Ser Pro Gly Thr Lys Lys Gly Ser Arg Gly Ser Phe

225 230 235 240

Ser Phe Lys Gly Gly Met Gln Ile Leu Pro Asp Thr Leu Cys Lys Ser

245 250 255

Leu Ser His Asp Glu Ile Asn Leu Asp Ser Lys Val Leu Ser Leu Ser

260 265 270

40

Tyr Asn Ser Gly Ser Arg Gln Glu Asn Trp Ser Leu Ser Cys Val Ser

275 280 285

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

(i)配列の特徴：

(A)長さ：1691塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(ii)分子型：cDNA

(iii)ハイポセティカル：NO

(iv)アンチセンス：NO

(vi)由来：

(A)生物：Zea mays (maize)

10

(vii)直接の由来：

(B)クローン：pWDC-4 (NRRL B-21260)

(ix)特徴：

(A)NAME/KEY : CDS

(B)位置：1..1443

(D)他の情報：/product="Maize protox-1 cDNA"

(xi)配列の記載：配列番号:5:

GCG GAC TGC GTC GTG GTG GGC GGA GGC ATC AGT GGC CTC TGC ACC GCG

48

Ala Asp Cys Val Val Val Gly Gly Gly Ile Ser Gly Leu Cys Thr Ala

20

1

5

10

15

CAG GCG CTG GCC ACG CGG CAC GGC GTC GGG GAC GTG CTT GTC ACG GAG

96

Gln Ala Leu Ala Thr Arg His Gly Val Gly Asp Val Leu Val Thr Glu

20

25

30

GCC CGC GCC CGC CCC GGC GGC AAC ATT ACC ACC GTC GAG CGC CCC GAG	144		
Ala Arg Ala Arg Pro Gly Gly Asn Ile Thr Thr Val Glu Arg Pro Glu			
35	40	45	
GAA GGG TAC CTC TGG GAG GAG GGT CCC AAC AGC TTC CAG CCC TCC GAC	192		
Glu Gly Tyr Leu Trp Glu Glu Gly Pro Asn Ser Phe Gln Pro Ser Asp			
50	55	60	
CCC GTT CTC ACC ATG GCC GTG GAC AGC GGA CTG AAG GAT GAC TTG GTT	240		
Pro Val Leu Thr Met Ala Val Asp Ser Gly Leu Lys Asp Asp Leu Val			
65	70	75	80
TTT GGG GAC CCA AAC GCG CCG CGT TTC GTG CTG TGG GAG GGG AAG CTG	288		
Phe Gly Asp Pro Asn Ala Pro Arg Phe Val Leu Trp Glu Gly Lys Leu			
85	90	95	100
AGG CCC GTG CCA TCC AAG CCC GCC GAC CTC CCG TTC TTC GAT CTC ATG	336		
Arg Pro Val Pro Ser Lys Pro Ala Asp Leu Pro Phe Phe Asp Leu Met			
100	105	110	
AGC ATC CCA GGG AAG CTC AGG GCC GGT CTA GGC GCG CTT GGC ATC CGC	384		
Ser Ile Pro Gly Lys Leu Arg Ala Gly Leu Gly Ala Leu Gly Ile Arg			
115	120	125	130
CCG CCT CCT CCA GGC CGC GAA GAG TCA GTG GAG GAG TTC GTG CGC CGC	432		
Pro Pro Pro Pro Gly Arg Glu Glu Ser Val Glu Glu Phe Val Arg Arg			
135	140		
AAC CTC GGT GCT GAG GTC TTT GAG CGC CTC ATT GAG CCT TTC TGC TCA	480		
Asn Leu Gly Ala Glu Val Phe Glu Arg Leu Ile Glu Pro Phe Cys Ser			
145	150	155	160
GGT GTC TAT GCT GGT GAT CCT TCT AAG CTC AGC ATG AAG GCT GCA TTT	528		
Gly Val Tyr Ala Gly Asp Pro Ser Lys Leu Ser Met Lys Ala Ala Phe			
165	170	175	

CGG AAG GTT TGG CGG TTG GAA GAA ACT GGA GGT AGT ATT ATT GGT GGA 576
 Gly Lys Val Trp Arg Leu Glu Glu Thr Gly Gly Ser Ile Ile Gly Gly
 180 185 190
 ACC ATC AAG ACA ATT CAG GAG AGG AGC AAG AAT CCA AAA CCA CCG AGG 624
 Thr Ile Lys Thr Ile Gln Glu Arg Ser Lys Asn Pro Lys Pro Pro Arg
 195 200 205 10
 GAT GCC CGC CTT CCG AAG CCA AAA GGG CAG ACA GTT GCA TCT TTC AGG 672
 Asp Ala Arg Leu Pro Lys Pro Lys Gly Gln Thr Val Ala Ser Phe Arg
 210 215 220
 AAG CGT CTT GCC ATG CTT CCA AAT GCC ATT ACA TCC AGC TTG GGT AGT 720
 Lys Gly Leu Ala Met Leu Pro Asn Ala Ile Thr Ser Ser Leu Gly Ser
 225 230 235 240 20
 AAA GTC AAA CTA TCA TGG AAA CTC ACG AGC ATT ACA AAA TCA GAT GAC 768
 Lys Val Lys Leu Ser Trp Lys Leu Thr Ser Ile Thr Lys Ser Asp Asp
 245 250 255
 AAG GGA TAT GTT TTG GAG TAT GAA ACG CCA GAA GGG GTT GTT TCG GTG 816
 Lys Gly Tyr Val Leu Glu Tyr Glu Thr Pro Glu Gly Val Val Ser Val
 260 265 270 30
 CAG GCT AAA AGT GTT ATC ATG ACT ATT CCA TCA TAT GTT GCT AGC AAC 864
 Gln Ala Lys Ser Val Ile Met Thr Ile Pro Ser Tyr Val Ala Ser Asn
 275 280 285
 ATT TTG CGT CCA CTT TCA AGC GAT GCT GCA GAT GCT CTA TCA AGA TTC 912
 Ile Leu Arg Pro Leu Ser Ser Asp Ala Ala Asp Ala Leu Ser Arg Phe
 290 295 300 40
 TAT TAT CCA CCG GTT GCT GCT GTA ACT GTT TCG TAT CCA AAG GAA GCA 960
 Tyr Tyr Pro Pro Val Ala Ala Val Thr Val Ser Tyr Pro Lys Glu Ala
 305 310 315 320

ATT AGA AAA GAA TGC TTA ATT GAT GGG GAA CTC CAG GGC TTT GGC CAG	1008	
Ile Arg Lys Glu Cys Leu Ile Asp Gly Glu Leu Gln Gly Phe Gly Gln		
325	330	335
TTG CAT CCA CGT AGT CAA GGA GTT GAG ACA TTA GGA ACA ATA TAC AGT	1056	
Leu His Pro Arg Ser Gln Gly Val Glu Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Ser		
340	345	350
TCC TCA CTC TTT CCA AAT CGT GCT CCT GAC GGT AGG GTG TTA CTT CTA	1104	
Ser Ser Leu Phe Pro Asn Arg Ala Pro Asp Gly Arg Val Leu Leu Leu		
355	360	365
AAC TAC ATA GGA GGT GCT ACA AAC ACA GGA ATT GTT TCC AAG ACT GAA	1152	
Asn Tyr Ile Gly Gly Ala Thr Asn Thr Gly Ile Val Ser Lys Thr Glu		
370	375	380
AGT GAG CTG GTC GAA GCA GTT GAC CGT GAC CTC CGA AAA ATG CTT ATA	1200	
Ser Glu Leu Val Glu Ala Val Asp Arg Asp Leu Arg Lys Met Leu Ile		
385	390	395
AAT TCT ACA GCA GTG GAC CCT TTA GTC CTT GGT GTT CGA GTT TGG CCA	1248	
Asn Ser Thr Ala Val Asp Pro Leu Val Leu Gly Val Arg Val Trp Pro		
405	410	415
CAA GCC ATA CCT CAG TTC CTG GTC GAA CAT CTT GAT CTT CTG GAA GCC	1296	
Gln Ala Ile Pro Gln Phe Leu Val Gly His Leu Asp Leu Leu Glu Ala		
420	425	430
GCA AAA GCT GCC CTG GAC CGA GGT GGC TAC GAT GGG CTG TTC CTA GGA	1344	
Ala Lys Ala Ala Leu Asp Arg Gly Gly Tyr Asp Gly Leu Phe Leu Gly		
435	440	445
GGG AAC TAT GTT GCA GGA GTT GCC CTG GGC AGA TGC GTT GAG GGC GCG	1392	
Gly Asn Tyr Val Ala Gly Val Ala Leu Gly Arg Cys Val Glu Gly Ala		
450	455	460

TAT GAA AGT GCC TCG CAA ATA TCT GAC TTC TTG ACC AAG TAT GCC TAC 1440

Tyr Glu Ser Ala Ser Gln Ile Ser Asp Phe Leu Thr Lys Tyr Ala Tyr

465 470 475 480

AAG TGATGAAAGA AGTGGAGCGC TACTTGTAA TCGTTATGT TGCATAGATG 1493

Lys

AGGTGCCTCC GGGGAAAAAA AAGCTTGAAT AGTATTTTT ATTCTTATTT TGTAAATTGC 1553

10

ATTCTGTTC TTTTCTAT CAGTAATTAG TTATATTTA GTTCTGTAGG AGATTGTTCT 1613

GTTCACTGCC CTTCAAAAGA AATTTATTT TTCATTCTTT TATGAGAGCT GTGCTACTTA 1673

AAAAAAAAAA AAAAAAAA 1691

(2)配列番号: 6:

(i)配列の特徴:

(A)長さ: 481アミノ酸

(B)型: アミノ酸

20

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii)分子型: 蛋白質

(xi)配列の記載: 配列数: 6:

Ala Asp Cys Val Val Val Gly Gly Gly Ile Ser Gly Leu Cys Thr Ala

1 5 10 15

Gln Ala Leu Ala Thr Arg His Gly Val Gly Asp Val Leu Val Thr Glu

20 25 30

30

Ala Arg Ala Arg Pro Gly Gly Asn Ile Thr Thr Val Glu Arg Pro Glu

35 40 45

Glu Gly Tyr Leu Trp Glu Glu Gly Pro Asn Ser Phe Gln Pro Ser Asp

50 55 60

Pro Val Leu Thr Met Ala Val Asp Ser Gly Leu Lys Asp Asp Leu Val

65 70 75 80

40

Phe Gly Asp Pro Asn Ala Pro Arg Phe Val Leu Trp Glu Gly Lys Leu

85 90 95

Arg Pro Val Pro Ser Lys Pro Ala Asp Leu Pro Phe Phe Asp Leu Met

100 105 110

Ser Ile Pro Gly Lys Leu Arg Ala Gly Leu Gly Ala Leu Gly Ile Arg

115 120 125 10

Pro Pro Pro Pro Gly Arg Glu Glu Ser Val Glu Glu Phe Val Arg Arg

130 135 140

Asn Leu Gly Ala Glu Val Phe Glu Arg Leu Ile Glu Pro Phe Cys Ser

145 150 155 160

Gly Val Tyr Ala Gly Asp Pro Ser Lys Leu Ser Met Lys Ala Ala Phe

165 170 175 20

Gly Lys Val Trp Arg Leu Glu Glu Thr Gly Gly Ser Ile Ile Gly Gly

180 185 190

Thr Ile Lys Thr Ile Gln Glu Arg Ser Lys Asn Pro Lys Pro Pro Arg

195 200 205

Asp Ala Arg Leu Pro Lys Pro Lys Gly Gln Thr Val Ala Ser Phe Arg

210 215 220

30

Lys Gly Leu Ala Met Leu Pro Asn Ala Ile Thr Ser Ser Leu Gly Ser

225 230 235 240

Lys Val Lys Leu Ser Trp Lys Leu Thr Ser Ile Thr Lys Ser Asp Asp

245 250 255

Lys Gly Tyr Val Leu Glu Tyr Glu Thr Pro Glu Gly Val Val Ser Val

260 265 270

40

Gln Ala Lys Ser Val Ile Met Thr Ile Pro Ser Tyr Val Ala Ser Asn

275 280 285

Ile Leu Arg Pro Leu Ser Ser Asp Ala Ala Asp Ala Leu Ser Arg Phe

290

295

300

Tyr Tyr Pro Pro Val Ala Ala Val Thr Val Ser Tyr Pro Lys Glu Ala

305

310

315

320

Ile Arg Lys Glu Cys Leu Ile Asp Gly Glu Leu Gln Gly Phe Gly Gln

325

330

335

10

Leu His Pro Arg Ser Gln Gly Val Glu Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Ser

340

345

350

Ser Ser Leu Phe Pro Asn Arg Ala Pro Asp Gly Arg Val Leu Leu Leu

355

360

365

Asn Tyr Ile Gly Gly Ala Thr Asn Thr Gly Ile Val Ser Lys Thr Glu

370

375

380

20

Ser Glu Leu Val Glu Ala Val Asp Arg Asp Leu Arg Lys Met Leu Ile

385

390

395

400

Asn Ser Thr Ala Val Asp Pro Leu Val Leu Gly Val Arg Val Trp Pro

405

410

415

Gln Ala Ile Pro Gln Phe Leu Val Gly His Leu Asp Leu Leu Glu Ala

420

425

430

30

Ala Lys Ala Ala Leu Asp Arg Gly Gly Tyr Asp Gly Leu Phe Leu Gly

435

440

445

Gly Asn Tyr Val Ala Gly Val Ala Leu Gly Arg Cys Val Glu Gly Ala

450

455

460

Tyr Glu Ser Ala Ser Gln Ile Ser Asp Phe Leu Thr Lys Tyr Ala Tyr

465

470

475

480

40

Lys

(2)配列番号 : 7:

(i)配列の特徴 :

(A)長さ : 2061塩基対

(B)型 : 核酸

(C)鎖の数 : 一本鎖

(D)トポロジー : 直鎖状

(ii)分子型 : cDNA

50

(iii)ハイポセティカル: NO

(iv)アンチセンス: NO

(vi)由来:

(A)生物: Zea mays (maize)

(vii)直接の由来:

(B)クローナ: pWDC-3 (NRRL B-21259)

(ix)特徴:

(A)NAME/KEY: CDS

(B)位置: 64..1698

(D)他の情報: /product= "Maize protox-2"

10

(xi)配列の記載: 配列番号: 7:

CTCTCCTACC TCCACCTCCA CGACAACAAG CAAATCCCCA TCCAGTTCCA AACCCCTAACT 60

CAA ATG CTC GCT TTG ACT GCC TCA GCC TCA TCC GCT TCG TCC CAT CCT 108

Met Leu Ala Leu Thr Ala Ser Ala Ser Ser Ala Ser Ser His Pro

1

5

10

15

TAT CGC CAC GCC TCC GCG CAC ACT CGT CGC CCC CGC CTA CGT GCG GTC 156

Tyr Arg His Ala Ser Ala His Thr Arg Arg Pro Arg Leu Arg Ala Val 20

20

25

30

CTC GCG ATG GCG GGC TCC GAC GAC CCC CGT GCA GCG CCC GCC AGA TCG 204

Leu Ala Met Ala Gly Ser Asp Asp Pro Arg Ala Ala Pro Ala Arg Ser

35

40

45

20

GTC GCC GTC GTC GGC GCC GGG GTC AGC GGG CTC GCG GCG GCG TAC AGG 252
 Val Ala Val Val Gly Ala Gly Val Ser Gly Leu Ala Ala Ala Tyr Arg
 50 55 60
 CTC AGA CAG AGC GGC GTG AAC GTA ACG GTG TTC GAA GCG GCC GAC AGG 300
 Leu Arg Gln Ser Gly Val Asn Val Thr Val Phe Glu Ala Ala Asp Arg
 65 70 75
 GCG GGA GGA AAG ATA CGG ACC AAT TCC GAG GGC GGG TTT GTC TGG GAT 348
 Ala Gly Gly Lys Ile Arg Thr Asn Ser Glu Gly Gly Phe Val Trp Asp
 80 85 90 95
 GAA GGA GCT AAC ACC ATG ACA GAA GGT GAA TGG GAG GCC AGT AGA CTG 396
 Glu Gly Ala Asn Thr Met Thr Glu Gly Glu Trp Glu Ala Ser Arg Leu
 100 105 110
 ATT GAT GAT CTT GGT CTA CAA GAC AAA CAG CAG TAT CCT AAC TCC CAA 444
 Ile Asp Asp Leu Gly Leu Gln Asp Lys Gln Gln Tyr Pro Asn Ser Gln
 115 120 125
 CAC AAG CGT TAC ATT GTC AAA GAT GGA GCA CCA GCA CTG ATT CCT TCG 492
 His Lys Arg Tyr Ile Val Lys Asp Gly Ala Pro Ala Leu Ile Pro Ser
 130 135 140
 GAT CCC ATT TCG CTA ATG AAA AGC AGT GTT CTT TCG ACA AAA TCA AAG 540
 Asp Pro Ile Ser Leu Met Lys Ser Ser Val Leu Ser Thr Lys Ser Lys
 145 150 155
 ATT GCG TTA TTT TTT GAA CCA TTT CTC TAC AAG AAA GCT AAC ACA AGA 588
 Ile Ala Leu Phe Phe Glu Pro Phe Leu Tyr Lys Lys Ala Asn Thr Arg
 160 165 170 175
 AAC TCT GGA AAA GTG TCT GAG GAG CAC TTG AGT GAG AGT GTT GGG AGC 636
 Asn Ser Gly Lys Val Ser Glu Glu His Leu Ser Glu Ser Val Gly Ser
 180 185 190

TTC TGT GAA CGC CAC TTT GGA AGA GAA GTT GAC TAT TTT GTT GAT 684
 Phe Cys Glu Arg His Phe Gly Arg Glu Val Val Asp Tyr Phe Val Asp
 195 200 205
 CCA TTT GTA GCT GGA ACA AGT GCA GGA GAT CCA GAG TCA CTA TCT ATT 732
 Pro Phe Val Ala Gly Thr Ser Ala Gly Asp Pro Glu Ser Leu Ser Ile
 210 215 220 10
 CGT CAT GCA TTC CCA GCA TTG TGG AAT TTG GAA AGA AAG TAT GGT TCA 780
 Arg His Ala Phe Pro Ala Leu Trp Asn Leu Glu Arg Lys Tyr Gly Ser
 225 230 235
 GTT ATT GTT GGT GCC ATC TTG TCT AAG CTA GCA GCT AAA GGT GAT CCA 828
 Val Ile Val Gly Ala Ile Leu Ser Lys Leu Ala Ala Lys Gly Asp Pro
 240 245 250 255 20
 GTA AAG ACA AGA CAT GAT TCA TCA GGG AAA AGA AGG AAT AGA CGA GTG 876
 Val Lys Thr Arg His Asp Ser Ser Gly Lys Arg Arg Asn Arg Arg Val
 260 265 270
 TCG TTT TCA TTT CAT GGT GGA ATG CAG TCA CTA ATA AAT GCA CTT CAC 924
 Ser Phe Ser Phe His Gly Gly Met Gln Ser Leu Ile Asn Ala Leu His
 275 280 285 30
 AAT GAA GTT GGA GAT GAT AAT GTG AAG CTT GGT ACA GAA GTG TTG TCA 972
 Asn Glu Val Gly Asp Asp Asn Val Lys Leu Gly Thr Glu Val Leu Ser
 290 295 300
 TTG GCA TGT ACA TTT GAT GGA GTT CCT GCA CTA GGC AGG TGG TCA ATT 1020
 Leu Ala Cys Thr Phe Asp Gly Val Pro Ala Leu Gly Arg Trp Ser Ile 40
 305 310 315
 TCT GTT GAT TCG AAG GAT AGC GGT GAC AAG GAC CTT GCT AGT AAC CAA 1068
 Ser Val Asp Ser Lys Asp Ser Gly Asp Lys Asp Leu Ala Ser Asn Gln
 320 325 330 335

ACC TTT GAT GCT GTT ATA ATG ACA GCT CCA TTG TCA AAT GTC CGG AGG 1116
 Thr Phe Asp Ala Val Ile Met Thr Ala Pro Leu Ser Asn Val Arg Arg
 340 345 350
 ATG AAG TTC ACC AAA GGT GGA GCT CCG GTT CTT GAC TTT CTT CCT 1164
 Met Lys Phe Thr Lys Gly Gly Ala Pro Val Val Leu Asp Phe Leu Pro
 355 360 365 10
 AAG ATG GAT TAT CTA CCA CTA TCT CTC ATG GTG ACT GCT TTT AAG AAG 1212
 Lys Met Asp Tyr Leu Pro Leu Ser Leu Met Val Thr Ala Phe Lys Lys
 370 375 380
 GAT GAT GTC AAG AAA CCT CTG GAA GGA TTT GGG GTC TTA ATA CCT TAC 1260
 Asp Asp Val Lys Lys Pro Leu Glu Gly Phe Gly Val Leu Ile Pro Tyr
 385 390 395 20
 AAG GAA CAG CAA AAA CAT GGT CTG AAA ACC CTT GGG ACT CTC TTT TCC 1308
 Lys Glu Gln Gln Lys His Gly Leu Lys Thr Leu Gly Thr Leu Phe Ser
 400 405 410 415
 TCA ATG ATG TTC CCA GAT CGA GCT CCT GAT GAC CAA TAT TTA TAT ACA 1356
 Ser Met Met Phe Pro Asp Arg Ala Pro Asp Asp Gln Tyr Leu Tyr Thr
 420 425 430 30
 ACA TTT GTT GGG GGT AGC CAC AAT AGA GAT CTT GCT GGA GCT CCA ACG 1404
 Thr Phe Val Gly Gly Ser His Asn Arg Asp Leu Ala Gly Ala Pro Thr
 435 440 445
 TCT ATT CTG AAA CAA CTT GTG ACC TCT GAC CTT AAA AAA CTC TTG GGC 1452
 Ser Ile Leu Lys Gln Leu Val Thr Ser Asp Leu Lys Lys Leu Leu Gly 40
 450 455 460
 GTA GAG GGG CAA CCA ACT TTT GTC AAG CAT GTA TAC TGG GGA AAT GCT 1500
 Val Glu Gly Gln Pro Thr Phe Val Lys His Val Tyr Trp Gly Asn Ala
 465 470 475

TTT CCT TTG TAT GGC CAT GAT TAT AGT TCT GTA TTG GAA GCT ATA GAA 1548

Phe Pro Leu Tyr Gly His Asp Tyr Ser Ser Val Leu Glu Ala Ile Glu

480 485 490 495

AAG ATG GAG AAA AAC CTT CCA GGG TTC TTC TAC GCA GGA AAT AGC AAG 1596

Lys Met Glu Lys Asn Leu Pro Gly Phe Phe Tyr Ala Gly Asn Ser Lys

500 505 510

10

GAT GGG CTT GCT GTT GGA AGT GTT ATA GCT TCA GGA AGC AAG GCT GCT 1644

Asp Gly Leu Ala Val Gly Ser Val Ile Ala Ser Gly Ser Lys Ala Ala

515 520 525

GAC CTT GCA ATC TCA TAT CTT GAA TCT CAC ACC AAG CAT AAT AAT TCA 1692

Asp Leu Ala Ile Ser Tyr Leu Glu Ser His Thr Lys His Asn Asn Ser

530 535 540 20

CAT TGAAAGTGTC TGACCTATCC TCTAGCAGTT GTCGACAAAT TTCTCCAGTT 1745

His

545

CATGTACAGT AGAAACCGAT GCGTTGCAGT TTCAGAACAT CTTCACTTCT TCAGATATTA 1805

ACCCCTTCGTT GAACATCCAC CAGAAAGGTA GTCACATGTG TAAGTGGGAA AATGAGGTTA 1865

AAAACATATTA TGGCGGCCGA AATGTTCCCTT TTTGTTTCC TCACAAGTGG CCTACGACAC 1925

TTGATGTTGG AAATACATTT AAATTTGTTG AATTGTTGA GAACACATGC GTGACGTGTA 1985

ATATTTGCCT ATTGTGATTT TAGCAGTAGT CTTGCCAGA TTATGCTTA CGCCTTAAA 2045

AAAAAAAAA AAAAAA 2061

(2)配列番号: 8:

(i)配列の特徴:

(A)長さ: 544アミノ酸

(B)型: アミノ酸

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii)分子型: 蛋白質

(xi)配列の記載: 配列番号: 8:

30

40

Met Leu Ala Leu Thr Ala Ser Ala Ser Ser Ala Ser His Pro Tyr

1 5 10 15

Arg His Ala Ser Ala His Thr Arg Arg Pro Arg Leu Arg Ala Val Leu

20 25 30

Ala Met Ala Gly Ser Asp Asp Pro Arg Ala Ala Pro Ala Arg Ser Val

35 40 45 10

Ala Val Val Gly Ala Gly Val Ser Gly Leu Ala Ala Ala Tyr Arg Leu

50 55 60

Arg Gln Ser Gly Val Asn Val Thr Val Phe Glu Ala Ala Asp Arg Ala

65 70 75 80

Gly Gly Lys Ile Arg Thr Asn Ser Glu Gly Gly Phe Val Trp Asp Glu

85 90 95 20

Gly Ala Asn Thr Met Thr Glu Gly Glu Trp Glu Ala Ser Arg Leu Ile

100 105 110

Asp Asp Leu Gly Leu Gln Asp Lys Gln Gln Tyr Pro Asn Ser Gln His

115 120 125

Lys Arg Tyr Ile Val Lys Asp Gly Ala Pro Ala Leu Ile Pro Ser Asp

130 135 140 30

Pro Ile Ser Leu Met Lys Ser Ser Val Leu Ser Thr Lys Ser Lys Ile

145 150 155 160

Ala Leu Phe Phe Glu Pro Phe Leu Tyr Lys Lys Ala Asn Thr Arg Asn

165 170 175

Ser Gly Lys Val Ser Glu Glu His Leu Ser Glu Ser Val Gly Ser Phe

40

180 185 190

Cys Glu Arg His Phe Gly Arg Glu Val Val Asp Tyr Phe Val Asp Pro

195 200 205

Phe Val Ala Gly Thr Ser Ala Gly Asp Pro Glu Ser Leu Ser Ile Arg

210 215 220

His Ala Phe Pro Ala Leu Trp Asn Leu Glu Arg Lys Tyr Gly Ser Val

225 230 235 240

Ile Val Gly Ala Ile Leu Ser Lys Leu Ala Ala Lys Gly Asp Pro Val

245 250 255

10

Lys Thr Arg His Asp Ser Ser Gly Lys Arg Arg Asn Arg Arg Val Ser

260 265 270

Phe Ser Phe His Gly Gly Met Gln Ser Leu Ile Asn Ala Leu His Asn

275 280 285

Glu Val Gly Asp Asp Asn Val Lys Leu Gly Thr Glu Val Leu Ser Leu

290 295 300

20

Ala Cys Thr Phe Asp Gly Val Pro Ala Leu Gly Arg Trp Ser Ile Ser

305 310 315 320

Val Asp Ser Lys Asp Ser Gly Asp Lys Asp Leu Ala Ser Asn Gln Thr

325 330 335

Phe Asp Ala Val Ile Met Thr Ala Pro Leu Ser Asn Val Arg Arg Met

340 345 350

30

Lys Phe Thr Lys Gly Gly Ala Pro Val Val Leu Asp Phe Leu Pro Lys

355 360 365

Met Asp Tyr Leu Pro Leu Ser Leu Met Val Thr Ala Phe Lys Lys Asp

370 375 380

Asp Val Lys Lys Pro Leu Glu Gly Phe Gly Val Leu Ile Pro Tyr Lys

385 390 395 400

40

Glu Gln Gln Lys His Gly Leu Lys Thr Leu Gly Thr Leu Phe Ser Ser

405 410 415

Met Met Phe Pro Asp Arg Ala Pro Asp Asp Gln Tyr Leu Tyr Thr Thr

420 425 430

Phe Val Gly Gly Ser His Asn Arg Asp Leu Ala Gly Ala Pro Thr Ser

435 440 445

Ile Leu Lys Gln Leu Val Thr Ser Asp Leu Lys Lys Leu Leu Gly Val

450 455 460

10

Glu Gly Gln Pro Thr Phe Val Lys His Val Tyr Trp Gly Asn Ala Phe

465 470 475 480

Pro Leu Tyr Gly His Asp Tyr Ser Ser Val Leu Glu Ala Ile Glu Lys

485 490 495

Met Glu Lys Asn Leu Pro Gly Phe Phe Tyr Ala Gly Asn Ser Lys Asp

500 505 510

20

Gly Leu Ala Val Gly Ser Val Ile Ala Ser Gly Ser Lys Ala Ala Asp

515 520 525

Leu Ala Ile Ser Tyr Leu Glu Ser His Thr Lys His Asn Asn Ser His

530 535 540

(2)配列番号 : 9:

(i)配列の特徴 :

30

(A)長さ : 1811塩基対

(B)型 : 核酸

(C)鎖の数 : 一本鎖

(D)トポロジー : 直鎖状

(ii)分子型 : cDNA

(iii)ハイポセティカル : NO

(vi)由来 :

(A)生物 : *Triticum aestivum* (wheat)

(vii)直接の由来 :

(B)クローン : pWDC-13 (NRRL B-21545)

40

(ix)特徴 :

(A)NAME/KEY : CDS

(B)位置 : 3..1589

(D)他の情報 : /product= " wheat protox-1 "

(xi)配列の記載 : 配列番号:9:

GC GCA ACA ATG GCC ACC GCC ACC GTC GCG GCG TCG CCG CTC CGC 47
 Ala Thr Met Ala Thr Ala Thr Val Ala Ala Ala Ser Pro Leu Arg
 1 5 10 15
 GGC AGG GTC ACC GGG CGC CCA CAC CGC GTC CGC CCG CGT TGC GCT ACC 95
 Gly Arg Val Thr Gly Arg Pro His Arg Val Arg Pro Arg Cys Ala Thr
 20 25 30 10
 GCG AGC AGC GCG ACC GAG ACT CCG GCG GCG CCC GGC GTG CGG CTG TCC 143
 Ala Ser Ser Ala Thr Glu Thr Pro Ala Ala Pro Gly Val Arg Leu Ser
 35 40 45
 GCG GAA TGC GTC ATT GTG GGC GCC GGC ATC AGC GGC CTC TGC ACC GCG 191
 Ala Glu Cys Val Ile Val Gly Ala Gly Ile Ser Gly Leu Cys Thr Ala
 50 55 60 20
 CAG GCG CTG GCC ACC CGA TAC GGC GTC AGC GAC CTG CTC GTC ACG GAG 239
 Gln Ala Leu Ala Thr Arg Tyr Gly Val Ser Asp Leu Leu Val Thr Glu
 65 70 75
 GCC CGC GAC CGC CCG GGC AAC ATC ACC ACC GTC GAG CGT CCC GAC 287
 Ala Arg Asp Arg Pro Gly Gly Asn Ile Thr Thr Val Glu Arg Pro Asp
 80 85 90 95 30
 GAG GGG TAC CTG TGG GAG GAG GGA CCC AAC AGC TTC CAG CCC TCC GAC 335
 Glu Gly Tyr Leu Trp Glu Glu Gly Pro Asn Ser Phe Gln Pro Ser Asp
 100 105 110

CCG GTC CTC ACC ATG GCC GTG GAC AGC GGG CTC AAG GAT GAC TTG GTG 383
 Pro Val Leu Thr Met Ala Val Asp Ser Gly Leu Lys Asp Asp Leu Val
 115 120 125
 TTC GGG GAC CCC AAC GCG CCC CGG TTC GTG CTG TGG GAG GGG AAG CTG 431
 Phe Gly Asp Pro Asn Ala Pro Arg Phe Val Leu Trp Glu Gly Lys Leu
 130 135 140 10
 AGG CCG GTG CCG TCG AAG CCA GGC GAC CTG CCT TTC AGC CTC ATG 479
 Arg Pro Val Pro Ser Lys Pro Gly Asp Leu Pro Phe Phe Ser Leu Met
 145 150 155
 AGT ATC CCT GGG AAG CTC AGG GCC GGC CTT GGC GCG CTC GGC ATT CGC 527
 Ser Ile Pro Gly Lys Leu Arg Ala Gly Leu Gly Ala Leu Gly Ile Arg
 160 165 170 175 20
 CCA CCT CCT CCA GGG CGC GAG GAG TCG GTG GAG GAG TTT GTG CGC CGC 575
 Pro Pro Pro Pro Gly Arg Glu Glu Ser Val Glu Glu Phe Val Arg Arg
 180 185 190
 AAC CTC GGT GCC GAG GTC TTT GAG CGC CTC ATC GAG CCT TTC TGC TCA 623
 Asn Leu Gly Ala Glu Val Phe Glu Arg Leu Ile Glu Pro Phe Cys Ser
 195 200 205 30
 GGT GTA TAT GCT GGT GAT CCT TCG AAG CTT AGT ATG AAG GCT GCA TTT 671
 Gly Val Tyr Ala Gly Asp Pro Ser Lys Leu Ser Met Lys Ala Ala Phe
 210 215 220
 GGG AAG GTC TGG AGG TTG GAG GAG ATT GGA GGT AGT ATT ATT GGT GGA 719
 Gly Lys Val Trp Arg Leu Glu Glu Ile Gly Gly Ser Ile Ile Gly Gly
 225 230 235 40
 ACC ATC AAG GCG ATT CAG GAT AAA GGG AAG AAC CCC AAA CCG CCA AGG 767
 Thr Ile Lys Ala Ile Gln Asp Lys Gly Lys Asn Pro Lys Pro Pro Arg
 240 245 250 255

GAT CCC CGA CTT CCG GCA CCA AAG GGA CAG ACG GTG GCA TCT TTC AGG 815
 Asp Pro Arg Leu Pro Ala Pro Lys Gly Gln Thr Val Ala Ser Phe Arg
 260 265 270
 AAG GGT CTA GCC ATG CTC CCG AAT GCC ATC GCA TCT AGG CTG GGT AGT 863
 Lys Gly Leu Ala Met Leu Pro Asn Ala Ile Ala Ser Arg Leu Gly Ser
 275 280 285
 AAA GTC AAG CTG TCA TGG AAG CTT ACG AGC ATT ACA AAG GCG GAC AAC 911
 Lys Val Lys Leu Ser Trp Lys Leu Thr Ser Ile Thr Lys Ala Asp Asn
 290 295 300
 CAA GGA TAT GTA TTA GGT TAT GAA ACA CCA GAA GGA CTT GTT TCA GTG 959
 Gln Gly Tyr Val Leu Gly Tyr Glu Thr Pro Glu Gly Leu Val Ser Val
 305 310 315
 CAG GCT AAA AGT GTT ATC ATG ACC ATC CCG TCA TAT GTT GCT AGT GAT 1007
 Gln Ala Lys Ser Val Ile Met Thr Ile Pro Ser Tyr Val Ala Ser Asp
 320 325 330 335
 ATC TTG CGC CCA CTT TCA ATT GAT GCA GCA GAT GCA CTC TCA AAA TTC 1055
 Ile Leu Arg Pro Leu Ser Ile Asp Ala Ala Asp Ala Leu Ser Lys Phe
 340 345 350
 TAT TAT CCG CCA GTT GCT GCT GTA ACT GTT TCA TAT CCA AAA GAA GCT 1103
 Tyr Tyr Pro Pro Val Ala Ala Val Thr Val Ser Tyr Pro Lys Glu Ala
 355 360 365
 ATT AGA AAA GAA TGC TTA ATT GAT GGG GAG CTC CAG GGT TTC GGC CAG 1151
 Ile Arg Lys Glu Cys Leu Ile Asp Gly Glu Leu Gln Gly Phe Gly Gln
 370 375 380
 TTG CAT CCA CGT AGC CAA GGA GTC GAG ACT TTA GGG ACA ATA TAT AGC 1199
 Leu His Pro Arg Ser Gln Gly Val Glu Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Ser
 385 390 395

TCT TCT CTC TTT CCT AAT CGT GCT CCT GCT GGA AGA GTG TTA CTT CTG 1247
 Ser Ser Leu Phe Pro Asn Arg Ala Pro Ala Gly Arg Val Leu Leu Leu
 400 405 410 415
 AAC TAT ATC GGG GGT TCT ACA AAT ACA GGG ATC GTC TCC AAG ACT GAG 1295
 Asn Tyr Ile Gly Gly Ser Thr Asn Thr Gly Ile Val Ser Lys Thr Glu
 420 425 430
 AGT GAC TTA GTA GGA GCC GTT GAC CGT GAC CTC AGA AAA ATG TTG ATA 1343
 Ser Asp Leu Val Gly Ala Val Asp Arg Asp Leu Arg Lys Met Leu Ile
 435 440 445
 AAC CCT AGA GCA GCA GAC CCT TTA GCA TTA GGG GTT CGA GTG TGG CCA 1391
 Asn Pro Arg Ala Ala Asp Pro Leu Ala Leu Gly Val Arg Val Trp Pro
 450 455 460
 CAA GCA ATA CCA CAG TTT TTG ATT GGG CAC CTT GAT CGC CTT GCT GCT 1439
 Gln Ala Ile Pro Gln Phe Leu Ile Gly His Leu Asp Arg Leu Ala Ala
 465 470 475
 GCA AAA TCT GCA CTG GGC CAA GGC GGC TAC GAC GGG TTG TTC CTA GGA 1487
 Ala Lys Ser Ala Leu Gly Gln Gly Gly Tyr Asp Gly Leu Phe Leu Gly
 480 485 490 495
 GGA AAC TAC GTC CCA GGA GTT GCC TTG GGC CGA TGC ATC GAG GGT GCG 1535
 Gly Asn Tyr Val Ala Gly Val Ala Leu Gly Arg Cys Ile Glu Gly Ala
 500 505 510
 TAC GAG AGT GCC TCA CAA GTA TCT GAC TTC TTG ACC AAG TAT GCC TAC 1583
 Tyr Glu Ser Ala Ser Gln Val Ser Asp Phe Leu Thr Lys Tyr Ala Tyr
 515 520 525
 AAG TGA TGGAAAGTAGT GCATCTCTTC ATTTTGTGCA ATATACGAGG TGAGGCTAGG 1639
 Lys
 ATCGGTAAAAA CATCATGAGA TTCTGTAGTG TTTCTTTAAT TGAAAAAAACA AATTTTAGTG 1699
 ATGCAATATG TGCTCTTCC TGTAGTTCGA GCATGTACAT CGGTATGGGA TAAAGTAGAA 1759
 TAAGCTATTG TGCAGAAAGCA GTGATTTTTT TTGAAAAAAA AAAAAAAA AA 1811
 (2)配列番号 : 10: 50

(i)配列の特徴：

(A)長さ：528アミノ酸

(B)型：アミノ酸

(D)トポロジー：直鎖状

(ii)分子型：蛋白質

(xi)配列の記載：配列番号:10:

Ala Thr Met Ala Thr Ala Thr Val Ala Ala Ser Pro Leu Arg Gly

1

5

10

15

Arg Val Thr Gly Arg Pro His Arg Val Arg Pro Arg Cys Ala Thr Ala

10

20

25

30

Ser Ser Ala Thr Glu Thr Pro Ala Ala Pro Gly Val Arg Leu Ser Ala

35

40

45

Glu Cys Val Ile Val Gly Ala Gly Ile Ser Gly Leu Cys Thr Ala Gln

50

55

60

Ala Leu Ala Thr Arg Tyr Gly Val Ser Asp Leu Leu Val Thr Glu Ala

65

70

75

80

Arg Asp Arg Pro Gly Gly Asn Ile Thr Thr Val Glu Arg Pro Asp Glu

85

90

95

Gly Tyr Leu Trp Glu Glu Gly Pro Asn Ser Phe Gln Pro Ser Asp Pro

100

105

110

20

Val Leu Thr Met Ala Val Asp Ser Gly Leu Lys Asp Asp Leu Val Phe

115

120

125

30

Gly Asp Pro Asn Ala Pro Arg Phe Val Leu Trp Glu Gly Lys Leu Arg

130 135 140

Pro Val Pro Ser Lys Pro Gly Asp Leu Pro Phe Phe Ser Leu Met Ser

145 150 155 160

Ile Pro Gly Lys Leu Arg Ala Gly Leu Gly Ala Leu Gly Ile Arg Pro

165 170 175

10

Pro Pro Pro Gly Arg Glu Glu Ser Val Glu Glu Phe Val Arg Arg Asn

180 185 190

Leu Gly Ala Glu Val Phe Glu Arg Leu Ile Glu Pro Phe Cys Ser Gly

195 200 205

Val Tyr Ala Gly Asp Pro Ser Lys Leu Ser Met Lys Ala Ala Phe Gly

210 215 220

20

Lys Val Trp Arg Leu Glu Glu Ile Gly Ser Ile Ile Gly Gly Thr

225 230 235 240

Ile Lys Ala Ile Gln Asp Lys Gly Lys Asn Pro Lys Pro Pro Arg Asp

245 250 255

Pro Arg Leu Pro Ala Pro Lys Gly Gln Thr Val Ala Ser Phe Arg Lys

260 265 270

30

Gly Leu Ala Met Leu Pro Asn Ala Ile Ala Ser Arg Leu Gly Ser Lys

275 280 285

Val Lys Leu Ser Trp Lys Leu Thr Ser Ile Thr Lys Ala Asp Asn Gln

290 295 300

Gly Tyr Val Leu Gly Tyr Glu Thr Pro Glu Gly Leu Val Ser Val Gln

40

305 310 315 320

Ala Lys Ser Val Ile Met Thr Ile Pro Ser Tyr Val Ala Ser Asp Ile

325 330 335

Leu Arg Pro Leu Ser Ile Asp Ala Ala Asp Ala Leu Ser Lys Phe Tyr

340 345 350

Tyr Pro Pro Val Ala Ala Val Thr Val Ser Tyr Pro Lys Glu Ala Ile

355 360 365

Arg Lys Glu Cys Leu Ile Asp Gly Glu Leu Gln Gly Phe Gly Gln Leu

370 375 380

10

His Pro Arg Ser Gln Gly Val Glu Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Ser Ser

385 390 395 400

Ser Leu Phe Pro Asn Arg Ala Pro Ala Gly Arg Val Leu Leu Leu Asn

405 410 415

Tyr Ile Gly Gly Ser Thr Asn Thr Gly Ile Val Ser Lys Thr Glu Ser

420 425 430

20

Asp Leu Val Gly Ala Val Asp Arg Asp Leu Arg Lys Met Leu Ile Asn

435 440 445

Pro Arg Ala Ala Asp Pro Leu Ala Leu Gly Val Arg Val Trp Pro Gln

450 455 460

Ala Ile Pro Gln Phe Leu Ile Gly His Leu Asp Arg Leu Ala Ala Ala

465 470 475 480

30

Lys Ser Ala Leu Gly Gln Gly Gly Tyr Asp Gly Leu Phe Leu Gly Gly

485 490 495

Asn Tyr Val Ala Gly Val Ala Leu Gly Arg Cys Ile Glu Gly Ala Tyr

500 505 510

Glu Ser Ala Ser Gln Val Ser Asp Phe Leu Thr Lys Tyr Ala Tyr Lys

40

515 520 525

(2)配列番号: 11:

(i)配列の特徴:

(A)長さ: 1847塩基対

(B)型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii)分子型: cDNA

(iii)ハイポセティカル: NO

50

(vi)由来:

(A)生物: 大豆

(vii)直接の由来:

(B)クローナ: pWDC-12 (NRRL B-21516)

(ix)特徴:

(A)NAME/KEY: CDS

(B)位置: 55..1683

(D)他の情報: /product= "soybean protox-1"

(xi)配列の記載: 配列番号: 11:

CTTTAGCACA GTGTTGAAGA TAACGAACGA ATAGTGCCAT TACTGTAACC AACC ATG	57	10
Met		
	1	
GTT TCC GTC TTC AAC GAG ATC CTA TTC CCG CCG AAC CAA ACC CTT CTT	105	
Val Ser Val Phe Asn Glu Ile Leu Phe Pro Pro Asn Gln Thr Leu Leu		
5	10	15
CGC CCC TCC CTC CAT TCC CCA ACC TCT TTC ACC TCT CCC ACT CGA	153	20
Arg Pro Ser Leu His Ser Pro Thr Ser Phe Phe Thr Ser Pro Thr Arg		
20	25	30
AAA TTC CCT CGC TCT CGC CCT AAC CCT ATT CTA CGC TGC TCC ATT GCG	201	
Lys Phe Pro Arg Ser Arg Pro Asn Pro Ile Leu Arg Cys Ser Ile Ala		
35	40	45

GAG GAA TCC ACC GCG TCT CCG CCC AAA ACC AGA GAC TCC GCC CCC GTG 249
 Glu Glu Ser Thr Ala Ser Pro Pro Lys Thr Arg Asp Ser Ala Pro Val
 50 55 60 65
 GAC TGC GTC GTC GTC GGC GGA GGC GTC AGC GGC CTC TGC ATC GCC CAG 297
 Asp Cys Val Val Val Gly Gly Val Ser Gly Leu Cys Ile Ala Gln
 70 75 80
 10
 GCC CTC GCC ACC AAA CAC GCC AAT GCC AAC GTC GTC GTC ACG GAG GCC 345
 Ala Leu Ala Thr Lys His Ala Asn Ala Asn Val Val Val Thr Glu Ala
 85 90 95
 CGA GAC CGC GTC GGC GGC AAC ATC ACC ACG ATG GAG AGG GAC GGA TAC 393
 Arg Asp Arg Val Gly Gly Asn Ile Thr Thr Met Glu Arg Asp Gly Tyr
 100 105 110
 20
 CTC TGG GAA GAA GGC CCC AAC AGC TTC CAG CCT TCT GAT CCA ATG CTC 441
 Leu Trp Glu Glu Gly Pro Asn Ser Phe Gln Pro Ser Asp Pro Met Leu
 115 120 125
 ACC ATG GTG GTG GAC AGT GGT TTA AAG GAT GAG CTT GTT TTG GGG GAT 489
 Thr Met Val Val Asp Ser Gly Leu Lys Asp Glu Leu Val Leu Gly Asp
 130 135 140 145
 30
 CCT GAT GCA CCT CGG TTT GTG TTG TGG AAC AGG AAG TTG AGG CCG GTG 537
 Pro Asp Ala Pro Arg Phe Val Leu Trp Asn Arg Lys Leu Arg Pro Val
 150 155 160
 CCC GGG AAG CTG ACT GAT TTG CCT TTC TTT GAC TTG ATG AGC ATT GGT 585
 Pro Gly Lys Leu Thr Asp Leu Pro Phe Phe Asp Leu Met Ser Ile Gly
 165 170 175
 40
 GCC AAA ATC AGG GCT GGC TTT GGT GCG CTT GGA ATT CGG CCT CCT CCT 633
 Gly Lys Ile Arg Ala Gly Phe Gly Ala Leu Gly Ile Arg Pro Pro Pro
 180 185 190

CCA GGT CAT GAG GAA TCG GTT GAA GAG TTT GTT CGT CGG AAC CTT GGT 681
 Pro Gly His Glu Glu Ser Val Glu Glu Phe Val Arg Arg Asn Leu Gly
 195 200 205
 GAT GAG GTT TTT GAA CGG TTG ATA GAG CCT TTT TGT TCA GGG GTC TAT 729
 Asp Glu Val Phe Glu Arg Leu Ile Glu Pro Phe Cys Ser Gly Val Tyr
 210 215 220 225 10
 GCA GGC GAT CCT TCA AAA TTA AGT ATG AAA GCA GCA TTC GGG AAA GTT 777
 Ala Gly Asp Pro Ser Lys Leu Ser Met Lys Ala Ala Phe Gly Lys Val
 230 235 240
 TGG AAG CTG GAA AAA AAT GGT GGT AGC ATT ATT GGT GGA ACT TTC AAA 825
 Trp Lys Leu Glu Lys Asn Gly Ser Ile Ile Gly Gly Thr Phe Lys
 245 250 255 20
 GCA ATA CAA GAG AGA AAT GGA GCT TCA AAA CCA CCT CGA GAT CCG CGT 873
 Ala Ile Gln Glu Arg Asn Gly Ala Ser Lys Pro Pro Arg Asp Pro Arg
 260 265 270
 CTG CCA AAA CCA AAA GGT CAG ACT GTT GGA TCT TTC CGG AAG GGA CTT 921
 Leu Pro Lys Pro Lys Gly Gln Thr Val Gly Ser Phe Arg Lys Gly Leu
 275 280 285 30
 ACC ATG TTG CCT GAT GCA ATT TCT GCC AGA CTA GGC AAC AAA GTA AAG 969
 Thr Met Leu Pro Asp Ala Ile Ser Ala Arg Leu Gly Asn Lys Val Lys
 290 295 300 305
 TTA TCT TGG AAG CTT TCA AGT ATT AGT AAA CTG GAT AGT GGA GAG TAC 1017
 Leu Ser Trp Lys Leu Ser Ser Ile Ser Lys Leu Asp Ser Gly Glu Tyr 40
 310 315 320
 AGT TTG ACA TAT GAA ACA CCA GAA GGA GTG GTT TCT TTG CAG TGC AAA 1065
 Ser Leu Thr Tyr Glu Thr Pro Glu Gly Val Val Ser Leu Gln Cys Lys
 325 330 335

ACT GTT GTC CTG ACC ATT CCT TCC TAT GTT GCT AGT ACA TTG CTG CGT 1113
 Thr Val Val Leu Thr Ile Pro Ser Tyr Val Ala Ser Thr Leu Leu Arg
 340 345 350
 CCT CTG TCT GCT GCT GCA GAT GCA CTT TCA AAG TTT TAT TAC CCT 1161
 Pro Leu Ser Ala Ala Ala Asp Ala Leu Ser Lys Phe Tyr Tyr Pro
 355 360 365 10
 CCA GTT GCT GCA GTT TCC ATA TCC TAT CCA AAA GAA GCT ATT AGA TCA 1209
 Pro Val Ala Ala Val Ser Ile Ser Tyr Pro Lys Glu Ala Ile Arg Ser
 370 375 380 385
 GAA TGC TTG ATA GAT GGT GAG TTG AAG GGG TTT GGT CAA TTG CAT CCA 1257
 Glu Cys Leu Ile Asp Gly Glu Leu Lys Gly Phe Gly Gln Leu His Pro
 390 395 400 20
 CGT AGC CAA GGA GTG GAA ACA TTA GGA ACT ATA TAC ACC TCA TCA CTA 1305
 Arg Ser Gln Gly Val Glu Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Ser Ser Leu
 405 410 415
 TTC CCC AAC CGA GCA CCA CCT GGA AGG GTT CTA CTC TTG AAT TAC ATT 1353
 Phe Pro Asn Arg Ala Pro Pro Gly Arg Val Leu Leu Asn Tyr Ile
 420 425 430 30
 GGA GGA GCA ACT AAT ACT GGA ATT TTA TCG AAG ACG GAC AGT GAA CTT 1401
 Gly Gly Ala Thr Asn Thr Gly Ile Leu Ser Lys Thr Asp Ser Glu Leu
 435 440 445
 GTG GAA ACA GTT GAT CGA GAT TTG AGG AAA ATC CTT ATA AAC CCA AAT 1449
 Val Glu Thr Val Asp Arg Asp Leu Arg Lys Ile Leu Ile Asn Pro Asn
 450 455 460 465 40
 GCC CAG GAT CCA TTT GTA GTG GGG GTG AGA CTG TGG CCT CAA GCT ATT 1497
 Ala Gln Asp Pro Phe Val Val Gly Val Arg Leu Trp Pro Gln Ala Ile
 470 475 480

CCA CAG TTC TTA GTT GGC CAT CTT GAT CTT CTA GAT GTT GCT AAA GCT 1545

Pro Gln Phe Leu Val Gly His Leu Asp Leu Leu Asp Val Ala Lys Ala

485 490 495

TCT ATC AGA AAT ACT GGG TTT GAA GGG CTC TTC CTT GGG GGT AAT TAT 1593

Ser Ile Arg Asn Thr Gly Phe Glu Gly Leu Phe Leu Gly Asn Tyr

500 505 510 10

GTG TCT GGT GTT GCC TTG GGA CGA TGC GTT GAG GGA GCC TAT GAG GTA 1641

Val Ser Gly Val Ala Leu Gly Arg Cys Val Glu Gly Ala Tyr Glu Val

515 520 525

GCA GCT GAA GTA AAC GAT TTT CTC ACA AAT AGA GTG TAC AAA 1683

Ala Ala Glu Val Asn Asp Phe Leu Thr Asn Arg Val Tyr Lys

530 535 540 20

TAGTAGCAGT TTTTGTGTTT GTGGTGGAAAT GGGTGATGGG ACTCTCGTGT TCCATTGAAT 1743

TATAATAATG TGAAAGTTTC TCAAATTCTGT TCGATAGGTT TTTGGCGGCT TCTATTGCTG 1803

ATAATGTAAA ATCCTCTTTA AGTTTGAAAA AAAAAAAA AAAA 1847

(2)配列番号: 12:

(i)配列の特徴:

(A)長さ: 543アミノ酸

(B)型: アミノ酸

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii)分子型: 蛋白質

(xi)配列の記載: 配列番号: 12:

Met Val Ser Val Phe Asn Glu Ile Leu Phe Pro Pro Asn Gln Thr Leu

1 5 10 15

Leu Arg Pro Ser Leu His Ser Pro Thr Ser Phe Phe Thr Ser Pro Thr

20 25 30

30

40

Arg Lys Phe Pro Arg Ser Arg Pro Asn Pro Ile Leu Arg Cys Ser Ile

35 40 45

Ala Glu Glu Ser Thr Ala Ser Pro Pro Lys Thr Arg Asp Ser Ala Pro

50 55 60

Val Asp Cys Val Val Gly Gly Val Ser Gly Leu Cys Ile Ala

65 70 75 80

10

Gln Ala Leu Ala Thr Lys His Ala Asn Ala Asn Val Val Val Thr Glu

85 90 95

Ala Arg Asp Arg Val Gly Gly Asn Ile Thr Thr Met Glu Arg Asp Gly

100 105 110

Tyr Leu Trp Glu Glu Gly Pro Asn Ser Phe Gln Pro Ser Asp Pro Met

115 120 125 20

Leu Thr Met Val Val Asp Ser Gly Leu Lys Asp Glu Leu Val Leu Gly

130 135 140

Asp Pro Asp Ala Pro Arg Phe Val Leu Trp Asn Arg Lys Leu Arg Pro

145 150 155 160

Val Pro Gly Lys Leu Thr Asp Leu Pro Phe Phe Asp Leu Met Ser Ile

165 170 175

30

Gly Gly Lys Ile Arg Ala Gly Phe Gly Ala Leu Gly Ile Arg Pro Pro

180 185 190

Pro Pro Gly His Glu Glu Ser Val Glu Glu Phe Val Arg Arg Asn Leu

195 200 205

Gly Asp Glu Val Phe Glu Arg Leu Ile Glu Pro Phe Cys Ser Gly Val

40

210 215 220

Tyr Ala Gly Asp Pro Ser Lys Leu Ser Met Lys Ala Ala Phe Gly Lys

225 230 235 240

Val Trp Lys Leu Glu Lys Asn Gly Gly Ser Ile Ile Gly Gly Thr Phe

245 250 255

Lys Ala Ile Gln Glu Arg Asn Gly Ala Ser Lys Pro Pro Arg Asp Pro

260 265 270

Arg Leu Pro Lys Pro Lys Gly Gln Thr Val Gly Ser Phe Arg Lys Gly

275 280 285

10

Leu Thr Met Leu Pro Asp Ala Ile Ser Ala Arg Leu Gly Asn Lys Val

290 295 300

Lys Leu Ser Trp Lys Leu Ser Ser Ile Ser Lys Leu Asp Ser Gly Glu

305 310 315 320

Tyr Ser Leu Thr Tyr Glu Thr Pro Glu Gly Val Val Ser Leu Gln Cys

325 330 335

20

Lys Thr Val Val Leu Thr Ile Pro Ser Tyr Val Ala Ser Thr Leu Leu

340 345 350

Arg Pro Leu Ser Ala Ala Ala Asp Ala Leu Ser Lys Phe Tyr Tyr

355 360 365

Pro Pro Val Ala Ala Val Ser Ile Ser Tyr Pro Lys Glu Ala Ile Arg

370 375 380

30

Ser Glu Cys Leu Ile Asp Gly Glu Leu Lys Gly Phe Gly Gln Leu His

385 390 395 400

Pro Arg Ser Gln Gly Val Glu Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Ser Ser Ser

405 410 415

Leu Phe Pro Asn Arg Ala Pro Pro Gly Arg Val Leu Leu Leu Asn Tyr

420 425 430

40

Ile Gly Gly Ala Thr Asn Thr Gly Ile Leu Ser Lys Thr Asp Ser Glu

435 440 445

Leu Val Glu Thr Val Asp Arg Asp Leu Arg Lys Ile Leu Ile Asn Pro

450 455 460

Asn Ala Gln Asp Pro Phe Val Val Gly Val Arg Leu Trp Pro Gln Ala

465 470 475 480

Ile Pro Gln Phe Leu Val Gly His Leu Asp Leu Leu Asp Val Ala Lys

485 490 495

10

Ala Ser Ile Arg Asn Thr Gly Phe Glu Gly Leu Phe Leu Gly Gly Asn

500 505 510

Tyr Val Ser Gly Val Ala Leu Gly Arg Cys Val Glu Gly Ala Tyr Glu

515 520 525

Val Ala Ala Glu Val Asn Asp Phe Leu Thr Asn Arg Val Tyr Lys

530 535 540

20

(2)配列番号 : 13:

(i)配列の特徴 :

(A)長さ : 583塩基対

(B)型 : 核酸

(C)鎖の数 : 一本鎖

(D)トポロジー : 直鎖状

(ii)分子型 : DNA (genomic)

(iii)ハイポセティカル : NO

(ix)特徴 :

(A)NAME/KEY : promoter

(B)位置 : 1..583

(D)他の情報 : /function= " arabidopsis protox-1 promoter "

(xi)配列の記載 : 配列番号:13:

30

GAATTCCGAT CGAATTATAT AATTATCATA AATTTGAATA AGCATGTTGC CTTTTATTAA 60
 AGAGGTTAA TAAAGTTGG TAATAATGGA CTTTGACTTC AAAACTCGATT CTCATGTAAT 120
 TAATTAATAT TTACATCAAA ATTTGGTCAC TAATATTACC AAATTAATAT ACTAAAATGT 180
 TAATTGCAA ATAAAACACT AATTCCAAT AAAGGGTCAT TATGATAAAC ACGTATTGAA 240
 CTTGATAAAG CAAAGCAAAA ATAATGGTT TCAAGGTTG GGTTATATAT GACAAAAAAA 300
 AAAAAAGGTT TGGTTATATA TCTATTGGGC CTATAACCAT GTTATACAAA TTTGGGCCTA 360 10
 ACTAAAATAA TAAAATAAAC GTAATGGTCC TTTTTATATT TGGGTCAAAC CCAACTCTAA 420
 ACCCAAACCA AAGAAAAAGT ATACGGTACG GTACACAGAC TTATGGTGTG TGTGATTGCA 480
 GGTGAATATT TCTCGTCGTC TTCTCCTTTC TTCTGAAGAA GATTACCAA TCTGAAAAAA 540
 ACCAAGAAC TGACAAAATT CCGAATTCTC TGCGATTCC ATG 583

(2)配列番号 : 14:

(i)配列の特徴 :

(A)長さ : 3848塩基対 20

(B)型 : 核酸

(C)鎖の数 : 一本鎖

(D)トポロジー : 直鎖状

(ii)分子型 : DNA (genomic)

(iii)ハイポセティカル : NO

(ix)特徴 :

(A)NAME/KEY : promoter

(B)位置 : 1..3848

(D)他の情報 : /function= " maize protox-1 promoter "

(xi)配列の記載 : 配列番号:14:

TCGATTTTC TAGGCTGATC CCCAAATCTT CCTCCGAAGC CCCTGGCGCC TCTGCCCTT 60
 GGAGCTGGTG GCCTGAAAGA GCTTGCTGT TGCCCCGAAG ATTGTGAGGT ATATTGTGAC 120
 CTCTGAGACT GACTTCCTT GTCGTCACTT TGAGTGGAGT TATGGATTGA CCTGACGTGC 180
 CTCAGATGGA TTCTCCTCC GAAGCCCCGT GTCATTCGG AGAATCTGTA ATCTTATTCC 240
 CTTCTTGGC GAAAATCTGT CAGCTTGGAT GTACTCATCC ATCTTCTGAA GCAGCTTCTC 300

CAGAGTTGT GGAGGCTTCC TGGCGAAATA TTGGGCTGTA GGTCCCTGGAC GAAGACCCCTT 360
 GATCATGGCC TCAATGACAA TCTCATTGGG CACCGTAGGC GCTTGTGCC CCAATCGCAA 420
 GAACCTTCGT ACATATGCCT GAAGGTATTC TTCTGTGATCT TGTGTGCATT GGAACAGAGC 480
 CTGAGCTGTG ACCGACTTCG TTTGAAAGCC TTGGAAGCTA GTAACCAACA TGTGCTTAAG 540
 CTTCTGCCAC GACGTGATAG TCCCTGGCCG AAGAGAACAA TACCATGTTT GGGCTACATT 600
 CCGGACTGCC ATGACGAAGG ACTTCGCCAT GACTACAGTG TTGACCCATACGAAGATAT 660 10
 AGTTGCTTCG TAGCTCATCA GAAACTGCTT TGGATCTGAG TGCCCATCAT ACATGGGGAG 720
 CTGAGGTGGC TTGTATGATG GGGGCCATGG GGTAGCCTGC AGTTCTGCTG CCAAGGGAGA 780
 AGCATCATCA AAAGTAAAGG CATCATGATT AAAATCATCA TACCATCCAT CCTCGTTGAA 840
 TAAGCCTTCT TGACGAAGCT CCCTGTGTTG GGGCCTTCGA TCTTGTTCAT CTTGAACAAG 900
 ATGACGCACT TCTTCAGTGG CTTCGTGAT CTTTCTTGG AGATCAGCCA GTCGCACCAT 960
 CTTCTCCTTC TTTCTTGTGTA CTTGTTGATG GATGATCTCC ATGTCCTGA TCTCTGGTC 1020 20
 CAACTCCTCC TCTTGGAGTG TCAGACTGGT GGCTTCCTC TTCTGGCTTC GAGCCTCTCG 1080
 AAGAGAAAGA GTTTCTTGAT TTGGGTCCAG CGGCTGCAGT GCAGTGGTCC CTGGTGCTGA 1140
 AGCTTCTTC GGTGGCATGA CAAAGGTCAAG TGCTTGCCGA AGGTGGTCA AAAGGGTCA 1200
 CTAGAGGTGG GAGCCAATGT TGGGGACTTC TCAAGTGCTA TGAGTTAAGA ACAAGGCAAC 1260
 ACAAAATGTT AAATATTAAT AGCTTCATC TTTCGAAGCA TTATTTCCCT TTGGGTATAA 1320
 TGATCTTCAG ACGAAAGAGT CCTTCATCAT TGCGATATAT GTTAATAGAA GGAGGAGCAT 1380 30
 ATGAAATGTA AGAGACAACA TGAACAATCG TGTAGCATTG TTAATTCAATC ATCATTAT 1440
 TATTATGGAA AAATAGAAAC AATATTGAAT TACAAATGTA CCTTGGCTT GACAGAAGAT 1500
 AAAAGTACAA GCTTGACGCA CGAGCAAGTA CAAGTCAGTG TGAACAGTAC GGGGGTACTG 1560
 TTCATCTATT TATAGGCACA GGACACAGCC TGTGAGAAAT TACAGTCATG CCCTTACAT 1620
 TTACTATTGA CTTATAGAAA AATCTATGAG GACTGGATAG CCTTTCCCC TTTAAGTCGG 1680
 TGCCTTTTC CGCGATTAAG CGGAATCTCC CTTGGCATA GCTTCGGAGC ATCGGCAACC 1740 40
 TTCGTCACGA TCATGCCCTT CTCATTGTGT ATGCTTTAA TCCTGAATTG GAAGGTACCT 1800
 GTCCATAAAC CATACTTGGA AGACATTGTT AAATTATGTT TTTGAGGACC TTGGAGGAC 1860
 GAAGGCCCCC AACAGTCGTG TTTTGAGGA CCTTCGGAAG ATGAAGGCC CCAACAAGAC 1920

CTATCCATAA AACCAACCTA TCCACAAAAC CGACCCCATT CACCCCTCAT TTGCCTCACC 1980
 AACAAACCTA ATTAGGTTGT TGGTTAAAT TTTTTAGGGT CAATTTGGTC ATCACCATCC 2040
 ACTGTCACTC CACAAACTCA ATATCAATAA ACAGACTCAA TCACCCAAAC TGACCATAAC 2100
 CATAAAAACCG CCCCACCCCTT CTAGCGCCTC GCCAGAAACC AGAAACCCCTG ATTCAGAGTT 2160
 CAAACTTAAA ACGACCATAA CTTTCACCTT GGAACTCGAA TCAGGTCCAT TTTTTTCCAA 2220
 ATCACACAAA ATTAAATTTC GCATCCGATA ATCAAGCCAT CTCTTCACTA TGGTTTAAG 2280 10
 TGTTGCTCAC ACTAGTGTAT TTATGGACTA ATCACCTGTG TATCTCATAAC AATAACATAT 2340
 CAGTACATCT AAGTTGTTAC TCAATTACCA AAACCGAATT ATAGCCTTCG AAAAAGGTTA 2400
 TCGACTAGTC ACTCAATTAC CAAACTAAA CTTTAGACTT TCATGTATGA CATCCAACAT 2460
 GACACTGTAC TGGACTAAAC CACCTTCAA GCTACACAAG GAGCAAAAT AACTAATT 2520
 CGTAGTTGTA GGAGCTAAAG TATATGTCCA CAACAATAGT TAAGGGAAGC CCCCAGGAC 2580
 TTAAAAGTCC TTTTACCTCT TGAAACTTT GTCGTGGTCT ACTTTTCAC TTTAAACTTC 2640 20
 AAAATTTGAC ATTTTATCAC CCCTTAACCTC TTAAAACCAT TTAAATTACA TTCTTACTAG 2700
 ATTATAGATG ATTTTGTGT GAAAAGTTT TAAGACATGT TTACACATTG ATTAAAATCA 2760
 TTTGTTCAAT TTCCTAGAGT TAAATCTAAT CTTATTAAA CTATTAGAGA TACTTCACG 2820
 AGCTCTAAAT ATTTTATTT TTTCATTATG GAATTGGTT AGAATTCTTA TAGACCTTT 2880
 TTTGTTGTTT AAAAGCCTTG CCATGTTTT AACAAAGTTT TTTTCTATT TTTGAAATT 2940
 TCTTGAAAC CACTCTAAC CCGGTAGAAG ATTTATTTG CTACACTTAT ATCTACAACA 3000 30
 AAATCAACTT ATGAAATTGT CTTGGAAACT ACCTCTAACCC CGGTAGAATG AATTGAAATG 3060
 AAAATTAAAC CAACTTACGG AATCGCCAA CATATGTCGA TTAAAGTGGAA TATGGATACA 3120
 TATGAAGAAG CCCTAGAGAT AATCTAAATG GTTTCAGAAT TGAGGGTTAT TTTTGAAAGT 3180
 TTGATGGAA GATAAGACCA TAACGGTAGT TCACAGAGAT AAAAGGGTTA TTTTTTCAG 3240
 AAATATTGT GCTGCAATTG ATCCTGTGCC TCAAATTCAAG CCTGCAACCA AGGCCAGGTT 3300
 CTAGAGCGAA CAAGGCCAC GTCACCCGTG GCCCGTCAGG CGAAGCAGGT CTTGTGCAGA 3360 40
 CTTTGAGAGG GATTGGATAT CAACGGAACCC AATCACGCAC GGCAATGCGA TTCCCAGGCC 3420
 ACCTGTAAACG TTCCAGTGGG CCATCCTAA CTCCAAGCCC AACGGCCCTA CCCCATCTCG 3480
 TCGTGTACATC CACTCCGCCG CACAGGGCCT CAGCTCCGCA ACGCCGCCGG AAATGGTCGC 3540

CGCCACAGCC ACCGCCATGG CCACCGCTGC ATCGCCGCTA CTCAACGGGA CCCGAATACC 3600
 TGCAGGGCTC CGCCATCGAG GACTCAGCGT GCGCTGCGCT GCTGTGGCGG GCGGCGCGGC 3660
 CGAGGCACCG GCATCCACCG GCGCGCGGCT GTCCGCGGAC TGCCTTGCGG TGGGCGGAGG 3720
 CATCAGTGGC CTCTGCACCG CGCAGGCGCT GGCCACGCGG CACGGCGTCG GGGACGTGCT 3780
 TGTCAACGGAG GCCCCGGCCC GCCCCGGCGG CAACATTACC ACCGTGGAGC GCCCCGAGGA 3840
 AGGGTACC 3848

10

(2)配列番号 : 15:

(i)配列の特徴 :

(A)長さ : 1826塩基対
 (B)型 : 核酸
 (C)鎖の数 : 一本鎖
 (D)トポロジー : 直鎖状
 (ii)分子型 : cDNA
 (iii)ハイポセティカル : NO
 (iv)アンチセンス : NO
 (vi)由来 :

20

(A)生物 : *Gossypium hirsutum* (ワタ)

(vii)直接の由来 :

(B)クローニ : pWDC-15 (NRRL B-21594)

(ix)特徴 :

(A)NAME/KEY : misc_feature

(B)位置 : 31..1647

(D)他の情報 : /product= "Cotton protox-1 coding region"

(xi)配列の記載 : 配列番号:15:

CCTCTCGCTC GCCTGGCCCC ACCACCAATC ATGACGGCTC TAATCGACCT TTCTCTTCTC 60

CGTTCCCTCGC CCTCCGTTTC CCCTTTCTCC ATACCCCACC ACCAGCATCC GCCCCGCTTT 120

30

CGTAAACCTT TCAAGCTCCG ATGCTCCCTC GCCGAGGGTC CCACGATTC CTCATCTAAA 180
 ATCGACGGGG GAGAACATC CATCGCGAT TGCCTCATCG TTGGAGGTGG TATCAGTGG 240
 CTTTGCATTG CTCAAGCTCT CGCCACCAAG CACCGTGACG TCGCTTCAA TGTGATTGTG 300
 ACGGAGGCCA GAGACCGTGT TGGTGGCAAC ATCACTACCG TTGAGAGAGA TGGATATCTG 360
 TGGGAAGAAC GCCCCAACAG TTTTCAGCCC TCCGATCCTA TTCTAACCAT GGCGTGGAT 420
 AGTGGATTGA AGGACGATTG GGTGTTAGGT GACCCTAATG CACCGCGATT TGTACTATGG 480 10
 GAGGGAAAAC TAAGGCCTGT GCCCTCCAAG CCAACCGACT TGCCGTTTT TGATTTGATG 540
 AGCATTGCTG GAAAACCTAG GGCTGGGTTG GGGGCTATTG GCATTCGGCC TCCCCCTCCG 600
 GGTTATGAAG AATCGGTGGA GGAGTTGTG CGCCGTAATC TTGGTGCTGA GGTTTTGAA 660
 CGCTTTATTG AACCATTTG TTCAGGTGTT TATGCAGGGG ATCCTTCAAATTAAGCATG 720
 AAAGCAGCAT TTGGAAGAGT ATGGAAGCTA GAAGAGATTG GTGGCAGCAT CATTGGTGGC 780
 ACTTTCAAGA CAATCCAGGA GAGAAATAAG ACACCTAACG CACCCAGAGA CCCCGCTCTG 840 20
 CCAAAACCGA AGGGCCAAAC AGTTGGATCT TTTAGGAAGG GACTTACCAT GCTGCCTGAG 900
 GCAATTGCTA ACAGTTGGG TAGCAATGTA AAATTATCTT GGAAGCTTTC CAGTATTACC 960
 AAATTGGGCA ATGGAGGGTA TAACTTGACA TTTGAAACAC CTGAAGGAAT GGTATCTCTT 1020
 CAGACTAGAA GTGTTGTAAT GACCATTCCA TCCCATGTTG CCAGTAACCT GTTGCATCCT 1080
 CTCTCGGCTG CTGCTGCAGA TGCATTATCC CAATTTATT ATCCTCCAGT TGCATCAGTC 1140
 ACAGTCTCCT ATCCAAAAGA AGCCATTGCA AAAGAATGTT TGATTGATGG TGAACCTAAG 1200 30
 GGGTTTGGCC AGTTGCACCC ACGCAGCCAA GGAATTGAAA CTTTAGGGAC GATATACAGT 1260
 TCATCACTTT TCCCCAATCG AGCTCCATCT GGCAGGGTGT TGCTCTGAA CTACATAGGA 1320
 GGAGCTACCA ACACTGGAAT TTTGTCCAAG ACTGAAGGGG AACTTGTAGA AGCAGTTGAT 1380
 CGTGATTGTA GAAAAATGCT TATAAATCCT AATGCAAAGG ATCCTCTGT TTTGGGTGTA 1440
 AGAGTATGGC CAAAAGCCAT TCCACAGTTC TTGGTTGGTC ATTTGGATCT CCTTGATAGT 1500
 GCAAAAATGG CTCTCAGGGA TTCTGGGTTT CATGGACTGTT TTCTGGGGGG CAACTATGTA 1560 40
 TCTGGTGTGG CATTAGGACG GTGTGTGGAA GGTGCTTACG AGGTTGCAGC TGAAGTGAAG 1620
 GAATTCCCTGT CACAATATGC ATACAAATAA TATTGAAATT CTTGTCAGGC TGCAAATGTA 1680
 GAAGTCAGTT ATTGGATAGT ATCTCTTAGT CTAAAAAATT GGGTAGGGTT TTTTTGTTA 1740
 GTTCCTTGAC CACTTTTGG GGTTTCATT AGAACATTAT ATTGTATAT CATGTTGCAA 1800
 TATCAAAAAA AAAAAAAAGA AAAAAAA 1826

(i)配列の特徴：

(A)長さ：539アミノ酸

(B)型：アミノ酸

(C)鎖の数：無関係

(D)トポロジー：無関係

(ii)分子型：蛋白質

(xi)配列の記載：配列番号:16:

Met Thr Ala Leu Ile Asp Leu Ser Leu Leu Arg Ser Ser Pro Ser Val

1

5

10

15

10

Ser Pro Phe Ser Ile Pro His His Gln His Pro Pro Arg Phe Arg Lys

20

25

30

Pro Phe Lys Leu Arg Cys Ser Leu Ala Glu Gly Pro Thr Ile Ser Ser

35

40

45

Ser Lys Ile Asp Gly Gly Glu Ser Ser Ile Ala Asp Cys Val Ile Val

50

55

60

20

Gly Gly Gly Ile Ser Gly Leu Cys Ile Ala Gln Ala Leu Ala Thr Lys

65

70

75

80

His Arg Asp Val Ala Ser Asn Val Ile Val Thr Glu Ala Arg Asp Arg

85

90

95

Val Gly Gly Asn Ile Thr Thr Val Glu Arg Asp Gly Tyr Leu Trp Glu

100

105

110

30

Glu Gly Pro Asn Ser Phe Gln Pro Ser Asp Pro Ile Leu Thr Met Ala

115

120

125

Val Asp Ser Gly Leu Lys Asp Asp Leu Val Leu Gly Asp Pro Asn Ala

130 135 140

Pro Arg Phe Val Leu Trp Glu Gly Lys Leu Arg Pro Val Pro Ser Lys

145 150 155 160

Pro Thr Asp Leu Pro Phe Phe Asp Leu Met Ser Ile Ala Gly Lys Leu

165 170 175

10

Arg Ala Gly Phe Gly Ala Ile Gly Ile Arg Pro Pro Pro Gly Tyr

180 185 190

Glu Glu Ser Val Glu Glu Phe Val Arg Arg Asn Leu Gly Ala Glu Val

195 200 205

Phe Glu Arg Phe Ile Glu Pro Phe Cys Ser Gly Val Tyr Ala Gly Asp

210 215 220

20

Pro Ser Lys Leu Ser Met Lys Ala Ala Phe Gly Arg Val Trp Lys Leu

225 230 235 240

Glu Glu Ile Gly Gly Ser Ile Ile Gly Gly Thr Phe Lys Thr Ile Gln

245 250 255

Glu Arg Asn Lys Thr Pro Lys Pro Pro Arg Asp Pro Arg Leu Pro Lys

260 265 270

30

Pro Lys Gly Gln Thr Val Gly Ser Phe Arg Lys Gly Leu Thr Met Leu

275 280 285

Pro Glu Ala Ile Ala Asn Ser Leu Gly Ser Asn Val Lys Leu Ser Trp

290 295 300

Lys Leu Ser Ser Ile Thr Lys Leu Gly Asn Gly Gly Tyr Asn Leu Thr

305 310 315 320

40

Phe Glu Thr Pro Glu Gly Met Val Ser Leu Gln Ser Arg Ser Val Val

325 330 335

Met Thr Ile Pro Ser His Val Ala Ser Asn Leu Leu His Pro Leu Ser

340 345 350

Ala Ala Ala Ala Asp Ala Leu Ser Gln Phe Tyr Tyr Pro Pro Val Ala

355 360 365

Ser Val Thr Val Ser Tyr Pro Lys Glu Ala Ile Arg Lys Glu Cys Leu

370 375 380

10

Ile Asp Gly Glu Leu Lys Gly Phe Gly Gln Leu His Pro Arg Ser Gln

385 390 395 400

Gly Ile Glu Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Ser Ser Leu Phe Pro Asn

405 410 415

Arg Ala Pro Ser Gly Arg Val Leu Leu Leu Asn Tyr Ile Gly Gly Ala

420 425 430

20

Thr Asn Thr Gly Ile Leu Ser Lys Thr Glu Gly Glu Leu Val Glu Ala

435 440 445

Val Asp Arg Asp Leu Arg Lys Met Leu Ile Asn Pro Asn Ala Lys Asp

450 455 460

Pro Leu Val Leu Gly Val Arg Val Trp Pro Lys Ala Ile Pro Gln Phe

465 470 475 480

30

Leu Val Gly His Leu Asp Leu Leu Asp Ser Ala Lys Met Ala Leu Arg

485 490 495

Asp Ser Gly Phe His Gly Leu Phe Leu Gly Gly Asn Tyr Val Ser Gly

500 505 510

Val Ala Leu Gly Arg Cys Val Glu Gly Ala Tyr Glu Val Ala Ala Glu

515 520 525

40

Val Lys Glu Phe Leu Ser Gln Tyr Ala Tyr Lys

530 535

(2)配列番号: 17:

(i)配列の特徴:

(A)長さ: 1910塩基対

(B)型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

50

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 分子型 : cDNA

(iii) ハイポセティカル : NO

(iv) アンチセンス : NO

(vi) 由来 :

(A) 生物 : Beta vulgaris (Sugar Beet)

(vii) 直接の由来 :

(B) クローン : pWDC-16 (NRRL B-21595N)

(ix) 特徴 :

(A) NAME/KEY : misc_feature

10

(B) 位置 : 1..1680

(D) 他の情報 : /product= "Sugar Beet Protox-1 coding region"

(xi) 配列の記載 : 配列番号: 17:

ATGAAATCAA TGGCGTTATC AAACTGCATT CCACAGACAC AGTGCATGCC ATTGCGCAGC 60

AGCGGGCATT ACAGGGTAA TTGTATCATG TTGTCAATT CATGTAGTTT AATTGGAAGA 120

CGAGGTTATT ATTCAACATAA GAAGAGGAGG ATGAGCATGA GTTGCAGCAC AAGCTCAGGC 180

TCAAAGTCAG CGGTTAAAGA AGCAGGATCA GGATCAGGTG CAGGAGGATT GCTAGACTGC 240

GTAATCGTTG GAGGTGGAAT TAGCGGGCTT TGCATCGCGC AGGCTTTTG TACAAAACAC 300

TCCTCTTCCT CTTTATCCCC AAATTTATA GTTACAGAGG CCAAAGACAG AGTTGGCGGC 360

AACATCGTCA CTGTGGAGGC CGATGGCTAT ATCTGGGAGG AGGGACCCAA TAGCTTCCAG 420

CCTTCCGACG CGGTGCTCAC CATGGCGGTC GACAGTGGCT TGAAAGATGA GTTGGTGCTC 480

GGAGATCCCA ATGCTCCTCG CTTTGTGCTA TGGAATGACA AATTAAGGCC CGTACCTTCC 540

20

AGTCTCACCG ACCTCCCTT CTTGACCTC ATGACCATTG CGGGCAAGAT TAGGGCTGCT 600
 CTTGGTGCTC TCGGATTTCG CCCTTCTCCT CCACCTCATG AGGAATCTGT TGAACACTTT 660
 GTGCGTCGTA ATCTCGGAGA TGAGGTCTT GAACGCTTGA TTGAACCTT TTGTTCAGGT 720
 GTGTATGCCG GTGATCCTGC CAAGCTGAGT ATGAAAGCTG CTTTGGAAG GGTCTGGAAG 780
 TTGGAGCAAA AGGGTGGCAG CATAATTGGT GGCACCTCTCA AAGCTATACA GGAAAGAGGG 840
 AGTAATCCTA AGCCGCCCG TGACCAGCGC CTCCCTAAAC CAAAGGGTCA GACTGTTGGA 900 10
 TCCTTAGAA AGGGACTCGT TATGTTGCCT ACCGCCATT CTGCTCGACT TGGCAGTAGA 960
 GTGAAACTAT CTTGGACCCCT TTCTAGTATC GTAAAGTCAC TCAATGGAGA ATATAGTCTG 1020
 ACTTATGATA CCCCAGATGG CTTGGTTCT GTAAAGAACCA AAAGTGTGT GATGACTGTT 1080
 CCATCATATG TTGCAAGTAG GCTTCTTCGT CCACTTCAG ACTCTGCTGC AGATTCTCTT 1140
 TCAAAATTT ACTATCCACC AGTTGCAGCA GTGTCACTTT CCTATCCTAA AGAAGCGATC 1200
 AGATCAGAAT GCTTGATTA TGTTGAACTT CAAGGTTTCG GGCAACTACA TCCCCGCACT 1260 20
 CAGGGTGTGG AAACCTTGGG AACAAATTAT AGTCGTCTC TTTTCCCTGG TCGAGCACCA 1320
 CCTGGTAGGA TCTTGATCTT GAGCTACATC GGAGGTGCTA AAAATCCTGG CATATTAAAC 1380
 AAGTCGAAAG ATGAACTTGC CAAGACAGTT GACAAGGACC TGAGAAGAAT GCTTATAAAT 1440
 CCTGATGCAA AACTCCCTCG TGTACTGGGT GTGAGAGTAT GGCCTCAAGC AATACCCAG 1500
 TTTCTATTG GGCACTTGA TCTGCTCGAT GCTGCAAAAG CTGCTCTGAC AGATACAGGG 1560
 GTCAAAGGAC TGTTCCTGG TGGCAACTAT GTTCAGGTG TTGCCTTGGG GCGGTGTATA 1620 30
 GAGGGTGCTT ATGAGTCTGC AGCTGAGGTA GTAGATTCC TCTCACAGTA CTCAGACAAA 1680
 TAGAGCTTCA GCATCCTGTG TAATTCAACA CAGGCCCTTT TGTATCTGTT GTGCGCGCAT 1740
 GTAGTCTGGT CGTGGTGCTA GGATTGATTA GTTGCTCTGC TGTGTGATCC ACAAGAATT 1800
 TGATGGAATT TTTCCAGATG TGGGCATTAT ATGTTGCTGT CTTATAAATC CTTAATTGT 1860
 ACGTTTAGTG AATTACACCG CATTGATGA CTAAAAAAA AAAAAAAA 1910 40

(2)配列番号: 18:

(i)配列の特徴:

(A)長さ: 560アミノ酸

(B)型: アミノ酸

(C)鎖の数: 無関係

(D)トポロジー: 無関係

(ii)分子型: 蛋白質

(xi)配列の記載: 配列番号: 18:

Met Lys Ser Met Ala Leu Ser Asn Cys Ile Pro Gln Thr Gln Cys Met

1 5 10 15

Pro Leu Arg Ser Ser Gly His Tyr Arg Gly Asn Cys Ile Met Leu Ser

20 25 30

Ile Pro Cys Ser Leu Ile Gly Arg Arg Gly Tyr Tyr Ser His Lys Lys

35 40 45

10

Arg Arg Met Ser Met Ser Cys Ser Thr Ser Ser Gly Ser Lys Ser Ala

50 55 60

Val Lys Glu Ala Gly Ser Gly Ser Gly Ala Gly Gly Leu Leu Asp Cys

65 70 75 80

Val Ile Val Gly Gly Ile Ser Gly Leu Cys Ile Ala Gln Ala Leu

85 90 95

20

Cys Thr Lys His Ser Ser Ser Leu Ser Pro Asn Phe Ile Val Thr

100 105 110

Glu Ala Lys Asp Arg Val Gly Gly Asn Ile Val Thr Val Glu Ala Asp

115 120 125

Gly Tyr Ile Trp Glu Glu Gly Pro Asn Ser Phe Gln Pro Ser Asp Ala

130 135 140

30

Val Leu Thr Met Ala Val Asp Ser Gly Leu Lys Asp Glu Leu Val Leu

145 150 155 160

Gly Asp Pro Asn Ala Pro Arg Phe Val Leu Trp Asn Asp Lys Leu Arg

165 170 175

Pro Val Pro Ser Ser Leu Thr Asp Leu Pro Phe Phe Asp Leu Met Thr
 180 185 190
 Ile Pro Gly Lys Ile Arg Ala Ala Leu Gly Ala Leu Gly Phe Arg Pro
 195 200 205
 Ser Pro Pro His Glu Glu Ser Val Glu His Phe Val Arg Arg Asn
 210 215 220 10
 Leu Gly Asp Glu Val Phe Glu Arg Leu Ile Glu Pro Phe Cys Ser Gly
 225 230 235 240
 Val Tyr Ala Gly Asp Pro Ala Lys Leu Ser Met Lys Ala Ala Phe Gly
 245 250 255
 Lys Val Trp Lys Leu Glu Gln Lys Gly Ser Ile Ile Gly Gly Thr
 260 265 270 20
 Leu Lys Ala Ile Gln Glu Arg Gly Ser Asn Pro Lys Pro Pro Arg Asp
 275 280 285
 Gln Arg Leu Pro Lys Pro Lys Gly Gln Thr Val Gly Ser Phe Arg Lys
 290 295 300
 Gly Leu Val Met Leu Pro Thr Ala Ile Ser Ala Arg Leu Gly Ser Arg
 305 310 315 320 30
 Val Lys Leu Ser Trp Thr Leu Ser Ser Ile Val Lys Ser Leu Asn Gly
 325 330 335
 Glu Tyr Ser Leu Thr Tyr Asp Thr Pro Asp Gly Leu Val Ser Val Arg
 340 345 350
 Thr Lys Ser Val Val Met Thr Val Pro Ser Tyr Val Ala Ser Arg Leu
 355 360 365 40
 Leu Arg Pro Leu Ser Asp Ser Ala Ala Asp Ser Leu Ser Lys Phe Tyr
 370 375 380

Tyr Pro Pro Val Ala Ala Val Ser Leu Ser Tyr Pro Lys Glu Ala Ile

385 390 395 400

Arg Ser Glu Cys Leu Ile Asn Gly Glu Leu Gln Gly Phe Gly Gln Leu

405 410 415

His Pro Arg Ser Gln Gly Val Glu Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Ser Ser

420 425 430

10

Ser Leu Phe Pro Gly Arg Ala Pro Pro Gly Arg Ile Leu Ile Leu Ser

435 440 445

Tyr Ile Gly Gly Ala Lys Asn Pro Gly Ile Leu Asn Lys Ser Lys Asp

450 455 460

Glu Leu Ala Lys Thr Val Asp Lys Asp Leu Arg Arg Met Leu Ile Asn

465 470 475 480

20

Pro Asp Ala Lys Leu Pro Arg Val Leu Gly Val Arg Val Trp Pro Gln

485 490 495

Ala Ile Pro Gln Phe Ser Ile Gly His Phe Asp Leu Leu Asp Ala Ala

500 505 510

Lys Ala Ala Leu Thr Asp Thr Gly Val Lys Gly Leu Phe Leu Gly Gly

515 520 525

30

Asn Tyr Val Ser Gly Val Ala Leu Gly Arg Cys Ile Glu Gly Ala Tyr

530 535 540

Glu Ser Ala Ala Glu Val Val Asp Phe Leu Ser Gln Tyr Ser Asp Lys

545 550 555 560

(2)配列番号 : 19:

(i)配列の特徴 :

40

(A)長さ : 1784塩基対

(B)型 : 核酸

(C)鎖の数 : 一本鎖

(D)トポロジー : 直鎖状

(ii)分子型 : cDNA

(iii)ハイポセティカル : NO

(iv)アンチセンス : NO

(vi)由来 :

(A)生物 : Brassica napus (rape)

(vii)直接の由来 :

50

(B) クローン : pWDC-17 (NRRL B-21615)

(ix) 特徴 :

(A) NAME/KEY : misc_feature

(B) 位置 : 47..1654

(D) 他の情報 : /product= "Rape Protox-1 coding region"

(xi) 配列の記載 : 配列番号:19:

GGGCCCCCCC	CAAAATTGAG	GATTCTCCTT	CTCGCGGGCG	ATCGCCATGG	ATTATCTCT	60
TCTCCGTCCG	CAGCCATTCC	TATGCCATT	CTCAAATCCA	TTTCCTCGGT	CGCGTCCCTA	120
CAAGCCTCTC	AACCTCCGTT	GCTCCGTATC	CGGTGGATCC	GTCGTGGCT	CTTCTACAAT	180
CGAAGGCGGA	GGAGGAGGTA	AAACCGTCAC	GGCGGACTGC	GTGATCGTCG	GCGGAGGAAT	240
CAGCGGCCTG	TGCATTGCGC	AAGCGCTCGT	GACGAAGCAC	CCAGACGCTG	CAAAGAATGT	300
GATGGTGACG	GAGGCGAAGG	ACCGTGTGGG	AGGGAATATC	ATCACCGCAG	AGGAGCAAGG	360
GTTTCTATGG	GAAGAAGGTC	CCAATAGCTT	TCAGCCGTCT	GATCCTATGC	TCACTATGGT	420
GGTAGATAGT	GGTTGAAAG	ATGATCTAGT	CTTGGGAGAT	CCTACTGCTC	CGAGGTTTGT	480
GTTGTGGAAT	GGGAAGCTGA	GGCCGGTTCC	GTCGAAGCTA	ACTGACTTGC	CTTTCTTGA	540
CTTGATGAGT	ATTGGAGGGA	AGATTAGAGC	TGGGTTGGT	GCCATTGGTA	TTCGACCTTC	600
ACCTCCGGGT	CGTGAGGAAT	CAGTGGAAAGA	GTGTAAGG	CGTAATCTTG	GTGATGAGGT	660
TTTGAGCGC	TTGATTGAAC	CCTTTGCTC	AGGTGTTTAT	GCGGGAGATC	CTGCGAAACT	720
GAGTATGAAA	GCAGCTTTG	GGAAGGTTG	GAAGCTAGAG	GAGAATGGTG	GGAGCATCAT	780

10

20

TGGTGGTGCT TTTAAGGCAA TTCAAGCGAA AAATAAAGCT CCCAAGACAA CCCGAGATCC 840
 GCGTCTGCCA AAGCCAAAGG GCCAAACTGT TGTTCTTC AGGAAAGGAC TCACAATGCT 900
 GCCAGAGGCA ATCTCCGCAA GGTTGGGTGA CAAGGTGAAA GTTCTTGGAGCTCTCAAG 960
 TATCACTAAG CTGGCCAGCG GAGAATATAG CTTAACTTAC GAAACTCCGG AGGGTATAGT 1020
 CACTGTACAG AGCAAAACTG TAGTGATGAC TGTGCCATCT CATGTTGCTA GTAGTCTCTT 1080
 GCGCCCTCTC TCTGATTCTG CAGCTGAAGC GCTCTCAAAA CTCTACTATC CGCCAGTTGC 1140 10
 AGCCGTATCC ATCTCATACG CGAAAGAAGC AATCCGAAGC GAATGCTTAA TAGATGGTGA 1200
 ACTAAAAGGG TTCGGCCAGT TGCATCCACG CACCGAAAAA GTGGAAACTC TTGGAACAAT 1260
 ATACAGTTCA TCGCTCTTC CCAACCGAGC ACCGCCTGGA AGAGTATTGC TATTGAAC 1320
 CATCGGTGGA GCTACCAACA CTGGGATCTT ATCAAAGTCG GAAGGTGAGT TACTGGAAGC 1380
 AGTAGATAGA GACTTGAGGA AGATGCTGAT AAAGCCAAGC TCGACCGATC CACTTGTACT 1440
 TGGAGTAAAAA TTATGGCCTC AAGCCATTCC TCAGTTCTG ATAGGTACACA TTGATTTGGT 1500 20
 AGACCGAGCG AAAGCATCGC TCTCGTCATC TGGTCATGAG GGCTTATTCT TGGGTGGAAA 1560
 TTACGTTGCC GGTGTAGCAT TGGGTCGGTG TGTGGAAGGT GCTTATGAAA CTGCAACCCA 1620
 AGTGAATGAT TTCATGTCAA GGTATGCTTA CAAGTAATGT AACGCAGCAA CGATTTGATA 1680
 CTAAGTAGTA GATTTGCAG TTTTGACTTT AAGAACACTC TGTTTGAA AAATTCAAGT 1740
 CTGTGATTGA GTAAATTTAT GTATTATTAC TAAAAAAA AAAA 1784

(2)配列番号: 20:

30

(i)配列の特徴:

- (A)長さ: 536アミノ酸
- (B)型: アミノ酸
- (C)鎖の数: 無関係
- (D)トポロジー: 無関係

(ii)分子型: 蛋白質

(xi)配列の記載: 配列番号: 20:

Met Asp Leu Ser Leu Leu Arg Pro Gln Pro Phe Leu Ser Pro Phe Ser

1

5

10

15

40

Asn Pro Phe Pro Arg Ser Arg Pro Tyr Lys Pro Leu Asn Leu Arg Cys

20 25 30

Ser Val Ser Gly Gly Ser Val Val Gly Ser Ser Thr Ile Glu Gly Gly

35 40 45

Gly Gly Gly Lys Thr Val Thr Ala Asp Cys Val Ile Val Gly Gly Gly

50 55 60 10

Ile Ser Gly Leu Cys Ile Ala Gln Ala Leu Val Thr Lys His Pro Asp

65 70 75 80

Ala Ala Lys Asn Val Met Val Thr Glu Ala Lys Asp Arg Val Gly Gly

85 90 95

Asn Ile Ile Thr Arg Glu Glu Gln Gly Phe Leu Trp Glu Glu Gly Pro

100 105 110 20

Asn Ser Phe Gln Pro Ser Asp Pro Met Leu Thr Met Val Val Asp Ser

115 120 125

Gly Leu Lys Asp Asp Leu Val Leu Gly Asp Pro Thr Ala Pro Arg Phe

130 135 140

Val Leu Trp Asn Gly Lys Leu Arg Pro Val Pro Ser Lys Leu Thr Asp

145 150 155 160

Leu Pro Phe Phe Asp Leu Met Ser Ile Gly Gly Lys Ile Arg Ala Gly

165 170 175

Phe Gly Ala Ile Gly Ile Arg Pro Ser Pro Pro Gly Arg Glu Glu Ser

180 185 190

Val Glu Glu Phe Val Arg Arg Asn Leu Gly Asp Glu Val Phe Glu Arg

195 200 205

Leu Ile Glu Pro Phe Cys Ser Gly Val Tyr Ala Gly Asp Pro Ala Lys

210 215 220

30

40

Leu Ser Met Lys Ala Ala Phe Gly Lys Val Trp Lys Leu Glu Glu Asn
 225 230 235 240
 Gly Gly Ser Ile Ile Gly Gly Ala Phe Lys Ala Ile Gln Ala Lys Asn
 245 250 255
 Lys Ala Pro Lys Thr Thr Arg Asp Pro Arg Leu Pro Lys Pro Lys Gly
 260 265 270
 10
 Gln Thr Val Gly Ser Phe Arg Lys Gly Leu Thr Met Leu Pro Glu Ala
 275 280 285
 Ile Ser Ala Arg Leu Gly Asp Lys Val Lys Val Ser Trp Lys Leu Ser
 290 295 300
 Ser Ile Thr Lys Leu Ala Ser Gly Glu Tyr Ser Leu Thr Tyr Glu Thr
 305 310 315 320
 20
 Pro Glu Gly Ile Val Thr Val Gln Ser Lys Ser Val Val Met Thr Val
 325 330 335
 Pro Ser His Val Ala Ser Ser Leu Leu Arg Pro Leu Ser Asp Ser Ala
 340 345 350
 Ala Glu Ala Leu Ser Lys Leu Tyr Tyr Pro Pro Val Ala Ala Val Ser
 355 360 365
 30
 Ile Ser Tyr Ala Lys Glu Ala Ile Arg Ser Glu Cys Leu Ile Asp Gly
 370 375 380
 Glu Leu Lys Gly Phe Gly Gln Leu His Pro Arg Thr Gln Lys Val Glu
 385 390 395 400
 Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Ser Ser Leu Phe Pro Asn Arg Ala Pro
 405 410 415
 40
 Pro Gly Arg Val Leu Leu Leu Asn Tyr Ile Gly Gly Ala Thr Asn Thr
 420 425 430

Gly Ile Leu Ser Lys Ser Glu Gly Glu Leu Val Glu Ala Val Asp Arg

435 440 445

Asp Leu Arg Lys Met Leu Ile Lys Pro Ser Ser Thr Asp Pro Leu Val

450 455 460

Leu Gly Val Lys Leu Trp Pro Gln Ala Ile Pro Gln Phe Leu Ile Gly

465 470 475 480 10

His Ile Asp Leu Val Asp Ala Ala Lys Ala Ser Leu Ser Ser Ser Gly

485 490 495

His Glu Gly Leu Phe Leu Gly Gly Asn Tyr Val Ala Gly Val Ala Leu

500 505 510

Gly Arg Cys Val Glu Gly Ala Tyr Glu Thr Ala Thr Gln Val Asn Asp

515 520 525 20

Phe Met Ser Arg Tyr Ala Tyr Lys

530 535

(2)配列番号 : 21:

(i)配列の特徴 :

(A)長さ : 1224塩基対

(B)型 : 核酸

(C)鎖の数 : 一本鎖

(D)トポロジー : 直鎖状

(ii)分子型 : cDNA

(iii)ハイポセティカル : NO

(iv)アンチセンス : NO

(vi)由来 :

(A)生物 : *Oryza sativa* (イネ)

(vii)直接の由来 :

(B)クローン : pWDC-18 (NRRL B-21648)

(ix)特徴 :

(A)NAME/KEY : misc_feature

(B)位置 : 1..936

(D)他の情報 : /product= " Rice Protox-1 partial coding region "

(xi)配列の記載 : 配列番号:21:

30

40

CGGGCTTGA AGGCTGCATT TGGGAAGGTG TGGAGGCTGG AGGATACTGG AGGTAGCATT 60
 ATTGGTGGAA CCATCAAGAC AATCCAGGAG AGGGGGAAAA ACCCCAAACC GCCGAGGGAT 120
 CCCCCCCTTC CAACGCCAAA GGGGCAGACA GTTGCATCTT TCAGGAAGGG TCTGACTATG 180
 CTCCCGGATG CTATTACATC TAGGTTGGGT AGCAAAGTCA AACTTCATG GAAGTTGACA 240
 AGCATTACAA AGTCAGACAA CAAAGGATAT GCATTAGTGT ATGAAACACC AGAAGGGGTG 300
 GTCTCGGTGC AAGCTAAAAC TGTTGTATG ACCATCCCAT CATATGTTGC TAGTGATATC 360 10
 TTGCGGCCAC TTTCAAGTGA TGCAGCAGAT GCTCTGTCAA TATTCTATTA TCCACCAGTT 420
 GCTGCTGTAA CTGTTTCATA TCCAAAAGAA GCAATTAGAA AAGAATGCTT AATTGACGGA 480
 GAGCTCCAGG GTTTCGGCCA GCTGCATCCG CGTAGTCAGG GAGTTGAGAC TTTAGGAACA 540
 ATATATAGCT CATCACTCTT TCCAAATCGT GCTCCAGCTG GAAGGGTGT ACTTCTGAAC 600
 TACATAGGAG GTTCTACAAA TACAGGGATT GTTTCCAAGA CTGAAAGTGA GCTGGTAGAA 660
 GCAGTTGACC GTGACCTCAG GAAGATGCTG ATAAATCCTA GAGCAGTGGAA CCCTTGGTC 720 20
 CTTGGCGTCC GGGTATGGCC ACAAGCCATA CCACAGTTCC TCATTGCCA TCTTGATCAT 780
 CTTGAGGCTG CAAAATCTGC CCTGGGCAAA GGTGGGTATG ATGGATTGTT CCTCGGAGGG 840
 AACTATGTTG CAGGAGTTGC CCTGGGCCGA TGCGTTGAAG GTGCATATGA GAGTGCCTCA 900
 CAAATATCTG ACTACTTGAC CAAGTACGCC TACAAGTGAT CAAAGTTGGC CTGCTCCTTT 960
 TGGCACATAG ATGTGAGGCT TCTAGCAGCA AAAATTCAT GGGCATCTTT TTATCCTGAT 1020
 TCTAATTAGT TAGAATTAG AATTGTAGAG GAATGTTCCA TTTGCAGTTC ATAATAGTTG 1080 30
 TTCAGATTTC AGCCATTCAA TTTGTGCAGC CATTACTAT ATGTAGTATG ATCTTGTAAG 1140
 TACTACTAAG AACAAATCAA TTATATTTTCTGCAAGTGA CATCTTAATC GTCAGCAAAT 1200
 CCAGTTACTA GTAAAAAAA AAAA 1224

(2)配列番号: 22:

(i)配列の特徴:

(A)長さ: 312アミノ酸

(B)型: アミノ酸

(C)鎖の数: 無関係

(D)トポロジー: 無関係

(ii)分子型: 蛋白質

(xi)配列の記載: 配列番号: 22:

40

Arg Ala Leu Lys Ala Ala Phe Gly Lys Val Trp Arg Leu Glu Asp Thr

1 5 10 15

Gly Gly Ser Ile Ile Gly Gly Thr Ile Lys Thr Ile Gln Glu Arg Gly

20 25 30

Lys Asn Pro Lys Pro Pro Arg Asp Pro Arg Leu Pro Thr Pro Lys Gly

35 40 45

10

Gln Thr Val Ala Ser Phe Arg Lys Gly Leu Thr Met Leu Pro Asp Ala

50 55 60

Ile Thr Ser Arg Leu Gly Ser Lys Val Lys Leu Ser Trp Lys Leu Thr

65 70 75 80

Ser Ile Thr Lys Ser Asp Asn Lys Gly Tyr Ala Leu Val Tyr Glu Thr

85 90 95

20

Pro Glu Gly Val Val Ser Val Gln Ala Lys Thr Val Val Met Thr Ile

100 105 110

Pro Ser Tyr Val Ala Ser Asp Ile Leu Arg Pro Leu Ser Ser Asp Ala

115 120 125

Ala Asp Ala Leu Ser Ile Phe Tyr Tyr Pro Pro Val Ala Ala Val Thr

130 135 140

30

Val Ser Tyr Pro Lys Glu Ala Ile Arg Lys Glu Cys Leu Ile Asp Gly

145 150 155 160

Glu Leu Gln Gly Phe Gly Gln Leu His Pro Arg Ser Gln Gly Val Glu

165 170 175

Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Ser Ser Ser Leu Phe Pro Asn Arg Ala Pro

180 185 190

10

Ala Gly Arg Val Leu Leu Leu Asn Tyr Ile Gly Gly Ser Thr Asn Thr

195 200 205

Gly Ile Val Ser Lys Thr Glu Ser Glu Leu Val Glu Ala Val Asp Arg

210 215 220

Asp Leu Arg Lys Met Leu Ile Asn Pro Arg Ala Val Asp Pro Leu Val

225 230 235 240

20

Leu Gly Val Arg Val Trp Pro Gln Ala Ile Pro Gln Phe Leu Ile Gly

245 250 255

His Leu Asp His Leu Glu Ala Ala Lys Ser Ala Leu Gly Lys Gly Gly

260 265 270

Tyr Asp Gly Leu Phe Leu Gly Gly Asn Tyr Val Ala Gly Val Ala Leu

275 280 285

30

Gly Arg Cys Val Glu Gly Ala Tyr Glu Ser Ala Ser Gln Ile Ser Asp

290 295 300

Tyr Leu Thr Lys Tyr Ala Tyr Lys

305 310

(2)配列番号 : 23:

(i)配列の特徴 :

40

(A)長さ : 1590塩基対

(B)型 : 核酸

(C)鎖の数 : 一本鎖

(D)トポロジー : 直鎖状

(ii)分子型 : cDNA

(iii)ハイポセティカル : NO

(iv)アンチセンス : NO

(vi)由来 :

(A)生物 : Sorghum bicolor (モロコシ)

(vii)直接の由来 :

50

(B) クローン : pWDC-19 (NRRL B-21649)

(ix) 特徴 :

(A) NAME/KEY:misc_feature

(B) 位置 : 1..1320

(D) 他の情報 : /product= "Sorghum Protox-1 partial coding region"

(xi) 配列の記載 : 配列番号:23:

TCCACCGTCG AGCGCCCCGA GGAAGGGTAC CTCTGGGAGG AGGGTCCCAA CAGCTTCCAG 60
 CCATCCGACC CCGTTCTCTC CATGGCCGTG GACAGCGGGC TGAAGGATGA CCTGGTTTT 120
 GGGGACCCCA ACGCGCCACG GTTCGTGCTG TGGGAGGGGA AGCTGAGGCC CGTGCATCC 180
 AAGCCCCCG ACCTCCCGTT CTTCGATCTC ATGAGCATCC CTGGCAAGCT CAGGGCCGGT 240
 CTCGGCGCGC TTGGCATCCG CCCGCCTGCT CCAGGCCGCG AGGACTCAGT GGAGGAGTT 300
 GTGCGCCGCA ACCTCGGTGC TGAGGTCTTT GAGCGCCTAA TTGAGCCTTT CTGCTCAGGT 360 10
 GTCTATGCTG GCGATCCTTC CAAGCTCAGT ATGAAGGCTG CATTGGAA GGTGTGGCGG 420
 TTAGAAGAAG CTGGAGGTAG TATTATTGGT GGAACCATCA AGACGATTCA GGAGAGGGGC 480
 AAGAATCCAA AACCAACCGAG GGATCCCCGC CTTCCGAAGC CAAAAGGGCA GACAGTTGCA 540
 TCTTCAGGA AGGGTCTTGC CATGCTTCCA AATGCCATCA CATCCAGCTT GGCTAGTAAA 600
 GTCAAACATAT CATGGAAACT CACGAGCATG ACAAAATCAG ATGGCAAGGG GTATGTTTG 660
 GAGTATGAAA CACCAGAAGG GGTTGTTTG GTGCAGGCTA AAAGTGTAT CATGACCATT 720 20
 CCATCATATG TTGCTAGCGA CATTTCGCGT CCACTTCAG GTGATGCTGC AGATGTTCTA 780
 TCAAGATTCT ATTATCCACC AGTTGCTGCT GTAACGGTTT CGTATCCAAA GGAAGCAATT 840
 AGAAAAGAAT GCTTAATTGA TGGGAAACTC CAGGGTTTG GCCAGTGCA TCCACGTAGT 900
 CAAGGAGTTG AGACATTAGG AACAAATATAC AGCTCATCAC TCTTCACAA TCGTGCTCCT 960
 GCTGGTAGGG TGTTACTTCT AACTACATA GGAGGTGCTA CAAACACAGG AATTGTTCC 1020
 AAGACTGAAA GTGAGCTGGT AGAACAGTT GACCGTGACC TCCGAAAAAT GCTTATAAAAT 1080 30
 CCTACAGCAG TGGACCCCTT AGTCCTTGGT GTCCGAGTTT GGCCACAAGC CATACTCAG 1140
 TTCCCTGGTAG GACATCTGA TCTTCTGGAG GCCGAAAT CTGCCCTGGA CCAAGGTGGC 1200
 TATAATGGGC TGTTCTAGG AGGAACTAT GTTGCAGGAG TTGCCCTGGG CAGATGCATT 1260
 GAGGGCGCAT ATGAGAGTGC CGCGAAATA TATGACTTCT TGACCAAGTA CGCCTACAAG 1320
 TGATGGAAGA AGTGGAGCGC TGCTTGTAA TTGTTATGTT GCATAGATGA GGTGAGACCA 1380 40
 GGAGTAGTAA AAGGCGTCAC GAGTATTCTT CATTCTTATT TTGTAATTG CACTTCTGTT 1440
 TTTTTTCCT GTCAGTAATT AGTTAGATT TAGTTATGTA GGAGATTGTT GTGTTCACTG 1500
 CCCTACAAAA GAATTCTTAT TTTGCATTG TTTATGAGAG CTGTGCAGAC TTATGTAACG 1560
 TTTTACTGTA AGTATCAACA AAATCAAATA 1590

(2)配列番号 : 24:

(i)配列の特徴 :

(A)長さ : 440アミノ酸

(B)型：アミノ酸

(C)鎖の数：無関係

(D)トポロジー：無関係

(ii)分子型：蛋白質

(xi)配列の記載：配列番号:24:

Ser Thr Val Glu Arg Pro Glu Glu Gly Tyr Leu Trp Glu Glu Gly Pro

1

5

10

15

Asn Ser Phe Gln Pro Ser Asp Pro Val Leu Ser Met Ala Val Asp Ser

10

20

25

30

Gly Leu Lys Asp Asp Leu Val Phe Gly Asp Pro Asn Ala Pro Arg Phe

35 40 45

Val Leu Trp Glu Gly Lys Leu Arg Pro Val Pro Ser Lys Pro Ala Asp

50 55 60

Leu Pro Phe Phe Asp Leu Met Ser Ile Pro Gly Lys Leu Arg Ala Gly

65 70 75 80 10

Leu Gly Ala Leu Gly Ile Arg Pro Pro Ala Pro Gly Arg Glu Glu Ser

85 90 95

Val Glu Glu Phe Val Arg Arg Asn Leu Gly Ala Glu Val Phe Glu Arg

100 105 110

Leu Ile Glu Pro Phe Cys Ser Gly Val Tyr Ala Gly Asp Pro Ser Lys

115 120 125 20

Leu Ser Met Lys Ala Ala Phe Gly Lys Val Trp Arg Leu Glu Glu Ala

130 135 140

Gly Gly Ser Ile Ile Gly Gly Thr Ile Lys Thr Ile Gln Glu Arg Gly

145 150 155 160

Lys Asn Pro Lys Pro Pro Arg Asp Pro Arg Leu Pro Lys Pro Lys Gly

165 170 175 30

Gln Thr Val Ala Ser Phe Arg Lys Gly Leu Ala Met Leu Pro Asn Ala

180 185 190

Ile Thr Ser Ser Leu Gly Ser Lys Val Lys Leu Ser Trp Lys Leu Thr

195 200 205

Ser Met Thr Lys Ser Asp Gly Lys Gly Tyr Val Leu Glu Tyr Glu Thr

210 215 220 40

Pro Glu Gly Val Val Leu Val Gln Ala Lys Ser Val Ile Met Thr Ile

225 230 235 240

Pro Ser Tyr Val Ala Ser Asp Ile Leu Arg Pro Leu Ser Gly Asp Ala

245 250 255

Ala Asp Val Leu Ser Arg Phe Tyr Tyr Pro Pro Val Ala Ala Val Thr

260 265 270

Val Ser Tyr Pro Lys Glu Ala Ile Arg Lys Glu Cys Leu Ile Asp Gly

275 280 285

10

Glu Leu Gln Gly Phe Gly Gln Leu His Pro Arg Ser Gln Gly Val Glu

290 295 300

Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Ser Ser Ser Leu Phe Pro Asn Arg Ala Pro

305 310 315 320

Ala Gly Arg Val Leu Leu Leu Asn Tyr Ile Gly Gly Ala Thr Asn Thr

325 330 335

20

Gly Ile Val Ser Lys Thr Glu Ser Glu Leu Val Glu Ala Val Asp Arg

340 345 350

Asp Leu Arg Lys Met Leu Ile Asn Pro Thr Ala Val Asp Pro Leu Val

355 360 365

Leu Gly Val Arg Val Trp Pro Gln Ala Ile Pro Gln Phe Leu Val Gly

370 375 380

30

His Leu Asp Leu Leu Glu Ala Ala Lys Ser Ala Leu Asp Gln Gly Gly

385 390 395 400

Tyr Asn Gly Leu Phe Leu Gly Gly Asn Tyr Val Ala Gly Val Ala Leu

405 410 415

Gly Arg Cys Ile Glu Gly Ala Tyr Glu Ser Ala Ala Gln Ile Tyr Asp

40

420 425 430

Phe Leu Thr Lys Tyr Ala Tyr Lys

435 440

(2)配列番号 : 25:

(i)配列の特徴 :

(A)長さ : 93塩基対

(B)型 : 核酸

(C)鎖の数 : 一本鎖

50

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 分子型：他の核酸

(A) DESCRIPTION: /desc= "maize protox-1 intron sequence"

(xi) 配列の記載：配列番号:25:

GTACGCTCCT CGCTGGCGCC GCAGCGTCTT CTTCTCAGAC TCATGCCAG CCATGGAATT 60

GAGATGCTGA ATGGATTATA TACGCGCGCG CAG

93

(2) 配列番号：26:

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：2606塩基対

10

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 分子型：DNA (genomic)

(iii) ハイポセティカル：NO

(iv) アンチセンス：NO

(vi) 由来：

(A) 生物：Beta vulgaris (テンサイ)

(vii) 直接の由来：

(B) クローン：pWDC-20 (NRRL B-21650)

20

(ix) 特徴：

(A) NAME/KEY: misc_feature

(B) 位置：1..6

(D) 他の情報：/note= "Sall site"

(ix) 特徴：

(A) NAME/KEY: misc_feature

(B) 位置：complement (1..538)

(D) 他の情報：/note= "3'-5'方向のテンサイprotox-1の部分cDNA"

(ix) 特徴：

(A) NAME/KEY: misc_feature

30

(B) 位置：539..2606

(D) 他の情報：/note= "3'-5'方向のテンサイprotox-1のプロモーター領域 (pWDC-20からサブクローニングされた~3kb PstI-Sall断片の部分配列)"

(xi) 配列の記載：配列番号:26:

GTGACCTAC GCACATGCCA CATTCCACAT TCCACGTTAG GAATTGAATT GAATTGAATT 60
ATGATTATGA ATAATGAAGA GACAGAATTA CCGCCATGGT GAGCACCGCG TCGGAAGGCT 120
GGAAGCTATT GGGTCCCTCC TCCCAGATAT AGCCATCGGC CTCCACAGTG ACGATGTTGC 180
CGCCAACCTCT GTCTTGGCC TCTGTCACTA TAAAATTGG GGATAAAGAG GACTGTTTG 240
TACAAAGAGC CTGCGCGATG CAAAGCCCGC TAATTCCACC TCCAACGATT ACCCAGTCTA 300
GCAATCCTCC TGCTCCTGAT CCTGATCCTG ATCCTGCTTC TTTAACCGCT GACTTTGAGC 360 10
CTGAGCTTGT GCTGCAACTC ATGCTCATCC TCCTCTTCTT ATGTGAATAA TAACCTCGTC 420
TTCCAATTAA ACTACATGGA ATTGACAACA TGATACAATT GCCCCTGTAA TGCCCGCTGC 480
TGTGCAATGG CATGCACTGT GTCTGTGGAA TGCAGTTGA TAACGCCATT GATTTCATCT 540
CTCTCTCGCT CTCTCGCCCT CCTTATCCTC TATATCCCT TCTTGCTTGC TCGGGAAATTC 600
TAATTAACCT TATATCAAAA TGAAACAACG GTTTCTAGTT AAAAAGTTTT TTATAAATAG 660
TACTCTAAAT AAACGATTAC ATGTATCTTC TAACCATACT TGTTGGTGG AGGTGGTGCG 720 20
TAACCGGTAA CTTACCTTG TAACTCACCT CAATACCTAC TTATGCTAA GGATACGGAT 780
TCTTTAAC TCTCAGGCAT TGACCTATGT AGCTGGACTG ACTAACATCT GAATTGTTT 840

CTCTGGTTAT ATATGCAATT TTAACGTGAAT CGAAATTCT CTGGATGCTA AAAATGTCTT 900
 TAACGGGGTT TATGAGGACT AAATTATCTC CTTCAATGAG GAGGTTCTTGTG ATTTGCATGT 960
 ATGAGCGTGA AAATGCATTC TTAACGGCTA TAGATTCACT AATAAGTGGT GTAAAAGTA 1020
 AAAAGTACTT GGAAAAATGA TTAACCGACT TAATTTTTT TATTGTTTG AAAGTTGCCT 1080
 TTTCTGGCT ATCTTAACAT GTATTTATCA AACACCTTTT TTAATTACAT GGAAATCGAA 1140
 AAGTTGAAA AAAAAAAATC ATACTCACTA ACCGCCTTAA AATATAAGCT GAAGATGTCT 1200
 10 CACTAACAGA GTGCATGTGA AGCACCCCCA AAGCAATTAT AACACAACAT CTCCGCCTCT 1260
 TCAAAATTCC TACAAATACA TCTAATAAAC TTGTTGAAAC AATCAAAGTA ACATGGTGTG 1320
 TCAATTGCGG ATGCTTCTCA TTCCAGACTT TATATAGTGA TTTTGTAA TCCATAGTCA 1380
 ACAACTCACA TAATGGTACC CAAAGAATAC CCAAATTTTG TGCTAAAAT CCCTAAACAT 1440
 TGTAGCTGTG TAAGTTGAC TAACATGTTT CAGCATGCTT GCCATGGTA AATAAGACTT 1500
 AGGGGCAAAT CTCGAATCCA CAAACTCATC ATTGGTTTA GTTTGTCTCC AACGTAAAAC 1560
 20 AATGATGTGA AATACACCAC AAAATTCTATA CAATCTCGTT ATCTTGAAG CTTGAAAGCC 1620
 ATAATCTTGT TTGTACTTTC ACTACGTGGA GAAGACAAAA TTACAACAA GAAGAGGTCA 1680
 TTGCTCAGTG TCGTGTACTA CTTATCTTTC AACTCATAGA AACAAAGCAA CCAATTGTCA 1740
 CCTATATACT GTACTTCTCC ATCATATACT TCCAACTTGC CTTAAACTCA ATACTATCAT 1800
 AAAAACACAA AAGACATTTC ATAAAAGCAT AATAAAATG TGTCATCACT CTTCAAAGTT 1860
 CCAAAGTGAT TCTAACTACA TTCTAATGAA AATGACATTG GTGTAAACCT AATCCTTGTG 1920
 30 TTATAAAACA CCTACATACC ACGATTATGT TAGAAATATA TTTATGAATG CAGTACCTAC 1980
 ATAAAGCCAT TAAATAACCA GTTTTATGTT ATTCGTGAC CAACATAGTT CCTAAAGATT 2040
 ACGAAGTAAT TTATAGTCAT TTTGTGGCCA CTTAATTCTAT TTAATACCCCA GTATATTAT 2100
 AAGTTACCAAG CTTAAGTAGT TTTGTGACCA TCTCTACATA CTTCCCTCCGG TCCATAATAA 2160
 GGGGGCGTTT GGTTGCAACG GGGTAAAGGG AATGGAATCA AGAAAGGGAG AGGAGAGGAA 2220
 40 AGAAAAGAA AACCCCTAGA TTTAGAGTGG TGTTGGTTA AGATAATGTT AATTCTCTT 2280
 CTTCCCTCTT CTTACCCCTTC TTCCACCCCTA GCACCAACAC TCCTCCCTCT GTTACTATTG 2340
 TCCACGCCGC CTCTCCCTAC CCCAGTAACA CCACCTTGTGCGG GGGCCCCCGG TCTTCCCTT 2400
 CCCCGACGG TTCCCCCCTC CCCTGCGCCG TCACGTGTC CCCCTCACCT CCCTGCACCG 2460

TCGAGTTATC CCCCTCCCT GCGCGTCGCG TTCTCCCTC CCTCACCATC GCGTTCTCCC 2520

CTCCCTCACC GTCGCGTTCT CCCCTCCCTC ACCGTCGCGG TCTCCCTCC CTCACCGTCG 2580

CGGTCTCTCT TTCCCTCCCC CTGCAG 2606

(2)配列番号 : 27:

(i)配列の特徴 :

(A)長さ : 31塩基対

(B)型 : 核酸

(C)鎖の数 : 一本鎖

(D)トポロジー : 直鎖状

(ii)分子型 : 他の核酸

(A)DESCRIPTION : /desc= " PclP_P1a-プラスミドclpP遺伝子プロモータートップストランドPCRプライマー "

(iii)ハイポセティカル : NO

(iv)アンチセンス : NO

(ix)特徴 :

(A)NAME/KEY : misc_feature

(B)位置 : 4..9

(D)他の情報 : /note= " EcoRI restriction site "

(xi)配列の記載 : 配列番号:27:

GCGGAATTCA TACTTATTAA TCATTAGAAA G

31

(2)配列番号 : 28:

(i)配列の特徴 :

(A)長さ : 32塩基対

(B)型 : 核酸

(C)鎖の数 : 一本鎖

(D)トポロジー : 直鎖状

(ii)分子型 : 他の核酸

(A)DESCRIPTION : /desc= " Pclp_P1b-プラスミドclpP遺伝子プロモーターボトムストランドPCRプライマー "

(iii)ハイポセティカル : NO

(iv)アンチセンス : NO

(ix)特徴 :

(A)NAME/KEY : misc_feature

(B)位置 : 4..9

(D)他の情報 : /note= " XbaI restriction site "

(xi)配列の記載 : 配列番号:28:

GCGTCTAGAA AGAACTAAAT ACTATATTTC AC

32

(2)配列番号 : 29:

(i)配列の特徴 :

(A)長さ : 30塩基対

(B)型 : 核酸

(C)鎖の数 : 一本鎖

(D)トポロジー : 直鎖状

(ii)分子型 : 他の核酸

(A)DESCRIPTION : /desc= " Pclp_P2b-プラスミドclpP遺伝子プロモーターボトムストランドPCRプライマー "

(iii)ハイポセティカル : NO

(iv)アンチセンス : NO

40

50

(ix)特徴 :

- (A)NAME/KEY : misc_feature
 (B)位置 : 4..9
 (D)他の情報 : /note= " Ncol restriction site "

(xi)配列の記載 : 配列番号 : 29:

GCGCCATGGT AAATGAAAGA AAGAACTAAA

30

(2)配列番号 : 30:

(i)配列の特徴 :

- (A)長さ : 30塩基対
 (B)型 : 核酸

(C)鎖の数 : 一本鎖

(D)トポロジー : 直鎖状

(ii)分子型 : 他の核酸

(A)DESCRIPTION : /desc= " Trps16_P1a-プラスミド rps16遺伝子3'非翻訳領域 XbaI/HindIII
 |トップストランドPCRプライマー "

(iii)ハイポセティカル : NO

(iv)アンチセンス : NO

(ix)特徴 :

- (A)NAME/KEY : misc_feature
 (B)位置 : 4..9

(D)他の情報 : /note= " XbaI restriction site "

(xi)配列の記載 : 配列番号 : 30:

GCGTCTAGAT CAACCGAAAT TCAATTAAAGG

30

(2)配列番号 : 31:

(i)配列の特徴 :

- (A)長さ : 27塩基対
 (B)型 : 核酸

(C)鎖の数 : 一本鎖

(D)トポロジー : 直鎖状

(ii)分子型 : 他の核酸

(A)DESCRIPTION : /desc= " Trps16_p1b-プラスミド rps16遺伝子3'非翻訳領域 XbaI/HindIII
 |ボトムストランドPCRプライマー "

(iii)ハイポセティカル : NO

(iv)アンチセンス : NO

(ix)特徴 :

- (A)NAME/KEY : misc_feature
 (B)位置 : 4..9

(D)他の情報 : /note= " HindIII restriction site "

(xi)配列の記載 : 配列番号 : 31:

CGCAAGCTTC AATGGAAGCA ATGATAAA

27

40

(2)配列番号 : 32:

(i)配列の特徴 :

- (A)長さ : 36塩基対
 (B)型 : 核酸

(C)鎖の数 : 一本鎖

(D)トポロジー : 直鎖状

(ii)分子型 : 他の核酸

(A)DESCRIPTION : /desc= " minpsb_U-プラスミド psbA遺伝子5'非翻訳領域 38nt (blunt/Ncol) ATG開始コドン、トップストランドプライマー "

(iii)ハイポセティカル : NO

50

(iv)アンチセンス: NO

(xi)配列の記載: 配列番号: 32:

GGGAGTCCT GATGATTAAA TAAACCAAGA TTTTAC

36

(2)配列番号: 33:

(i)配列の特徴:

(A)長さ: 40塩基対

(B)型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii)分子型: 他の核酸

(A)DESCRIPTION: /desc= " minpsb_L-プラスミドpsbA遺伝子5'非翻訳領域38nt (blunt/Nc
ol) ATG開始コドン含有 (ボトムストランドプライマー)"

(iii)ハイポセティカル: NO

(iv)アンチセンス: NO

(xi)配列の記載: 配列番号: 33:

CATGGTAAAA TCTTGGTTTA TTTAACATTC AGGGACTCCC

40

(2)配列番号: 34:

(i)配列の特徴:

(A)長さ: 32塩基対

(B)型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii)分子型: 他の核酸

(A)DESCRIPTION: /desc= " APRTXP1a-変異Arabidopsis protox遺伝子の5'-部分を増幅する
ためのトップストランドPCRプライマー"

(iii)ハイポセティカル: NO

(iv)アンチセンス: NO

(ix)特徴:

(A)NAME/KEY: misc_feature

(B)位置: 5..10

(D)他の情報: /note= " Ncol restriction site/ATG start codon "

(xi)配列の記載: 配列番号: 34:

GGGACCATGG ATTGTGTGAT TGTGGCGGA GG

32

(2)配列番号: 35:

(i)配列の特徴:

(A)長さ: 24塩基対

(B)型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii)分子型: 他の核酸

(A)DESCRIPTION: /desc= " APRTXP1b-変異Arabidopsis protox遺伝子の5'部分を増幅する
ためのドトムストランドPCRプライマー"

(iii)ハイポセティカル: NO

(iv)アンチセンス: NO

(xi)配列の記載: 配列番号: 35:

CTCCGCTCTC CAGCTTAGTG ATAC

24

10

20

30

40

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I
C 12 P 21/02 (2006.01)	C 12 P 21/02
C 12 Q 1/26 (2006.01)	C 12 Q 1/26
G 01 N 33/15 (2006.01)	G 01 N 33/15

(31)優先権主張番号 60/020,003
 (32)優先日 平成8年6月21日(1996.6.21)
 (33)優先権主張国 米国(US)

(74)代理人
 弁理士 西山 雅也

(74)代理人
 弁理士 樋口 外治
 (72)発明者 ボルラース, サンドラ エル.
 アメリカ合衆国, ノースカロライナ 27707, ダーハム, パイン オーク ドライブ 422
 5
 (72)発明者 ジョンソン, マリー エー.
 アメリカ合衆国, ノースカロライナ 27606, ラレイ, ヘザー ドライブ 408
 (72)発明者 ポッター, シャロン エル.
 アメリカ合衆国, ノースカロライナ 27613, ラレイ, ウィスパリング ブランチ ロード
 3837
 (72)発明者 ウォード, エリック アール.
 アメリカ合衆国, ノースカロライナ 27705, ダーハム, モントゴメリー ストリート 30
 03
 (72)発明者 ヘイフェッツ, ペーター ビー.
 アメリカ合衆国, ノースカロライナ 27713, ダーハム, スチュアブリッジ ドライブ 39
 16

審査官 中村 正展

(56)参考文献 国際公開第95/034659 (WO, A1)
 国際公開第97/004089 (WO, A1)
 国際公開第98/029554 (WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C12N 15/00 - 15/90
 C12N 5/00 - 5/10
 A01H 5/00
 C12N 9/00 - 9/99
 C12P 21/02
 C12Q 1/26
 G01N 33/15

JSTPlus(JDream2)

PubMed

AGRICOLA/BIOSIS/WPI(STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

UniProt/SwissProt/PIR/Geneseq