

(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. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

A O 1 H 5/00 (2006.01)

A O 1 H 5/00 A

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/00 C

C 1 2 N 9/02 (2006.01)

C 1 2 N 9/02

C 1 2 N 9/99 (2006.01)

C 1 2 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) 国際出願番号 PCT/US1997/003313
 (87) 国際公開番号 W01997/032011
 (87) 国際公開日 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
 スイス国, ツェーハー - 4 0 5 8 パーゼ
 ル, シュバルツバルトアレー 2 1 5
 (74) 代理人
 弁理士 石田 敬
 (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）、従っ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（*Matringe* 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, *Can J. 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 21 kDa であり、細胞膜に付随している。枯草菌蛋白は 51 kDa であり、可溶性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 WO 95/34659 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。

除草剤を有効に使用するには、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、土壌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（AHAS）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（GS）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イミンなどによる阻害に対して耐性の突然変異体GS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（ACCase）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bezoi c 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-テトラヒドロフタルイミド)、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410 nMで励起した後に約622乃至635 nm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、葉緑体中で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(Le e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 (Sasarmann 等, Can. J. Microbiol. 39:1155(1993年)) および枯草菌 (Dailley 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 Porphyrin Pesticides」, ACS Press: ワシントン (1994年) 収載の Sato 他 の章)。また、阻害物質 S21432 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))。

10

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。

20

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。

30

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産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。

40

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

50

び方法に関する。これらの方法は、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：アラビドプシス・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プシス *protox*-1 アミノ酸配列

配列番号：3：アラビドプシス・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プシス *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：アラビドプシス・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 l p__P 1 a - 色素体 c l p P 遺伝子プロモータートップストランド PCR プライマー

配列番号：28：P c l p__P 1 b - 色素体 c l p P 遺伝子プロモーターボトムストランド PCR プライマー

配列番号：29：P c l p__P 2 b - 色素体 c l p P 遺伝子プロモーターボトムストランド PCR 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ンド PCR プライマー 50

配列番号：31：Trps16__p1b - 色素体 rps16 遺伝子ボトムストランド PCR プライマー

配列番号：32：minpsb__U - プラスチックの psbA 遺伝子トップストランド プライマー

配列番号：33：minpsb__L - 色素体 psbA 遺伝子ボトムストランド プライマー

配列番号：34：APRTXP1a - トップストランド PCR プライマー

配列番号：35：APRTXP1b - ボトムストランド PCR 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 (NRRL) (米国イリノイ州ピオリア、ノースユニバーシティストリート 1 815) に寄託した。

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

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

pBluescript SKベクター中のワタProtox (Cotton Protox) - 1を1996年7月1日にpWDC15 (NRRL#B-21594) として寄託した。

pBluescript SKベクター中のテンサイProtox-1を1996年7月29日にpWDC-16 (NRRL#B21595N) として寄託した。

pBluescript SKベクター中のナタネProtox (Rape Protox) - 1を1996年8月23日にpWDC-17 (NRRL#B-21615) として寄託した。

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

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

pMut-1プラスミド中の耐性突然変異体pAraC-2Cysを1994年11月14日にpWDC-7の名称でAgricultural Research Culture Collectionに寄託し、寄託名称NRRL#21339Nが与えられた。アラビドプシスProtox-1プロモーターを含むAraPT1Proを1995年12月15日にpWDC-11 (NRRL#B-21515) として寄託した。

トウモロコシProtox-1プロモーターをトウモロコシProtox-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1996年3月19日にpWDC-14 (NRRL#B21546) として寄託した。

テンサイProtox-1プロモーター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。

発明の詳細な説明

1. 植物Protoxコード配列

一態様では、本発明はプロトボルフィリノーゲンIXのプロトボルフィリンIX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ボルフィリノーゲンオキシダーゼ (本明細書では「protox」と称する) をコードする単離DNA分子に関する。

コムギ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：9および10として提供する。ダイズ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：11および12として提供する。ワタ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：15お

10

20

30

40

50

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、好ましいのは単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、単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、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：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、1mM EDTA、50℃でハイブリダイゼーション

50

(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(SSC)、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：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： 10

(a) 7%ドデシル硫酸ナトリウム(SSC)、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

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： 20

(a) 7%ドデシル硫酸ナトリウム(SSC)、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

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： 30

(a) 7%ドデシル硫酸ナトリウム(SSC)、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

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： 40

(a) 7%ドデシル硫酸ナトリウム(SSC)、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

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ーンリアクション(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。 40

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 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ェント条件下で前記 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、ポリメラーゼチェーンリアクション (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 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、ノーザンブ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、神経精神病の徴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

10

20

30

40

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産生するには、選択した宿主向けに設計し、組換え産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。蛋白質の組換え産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 Guarente, 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 Autographica 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 pVI11392/Sf21 細胞 (Invitrogen, カリフォルニア州ラホーヤ) である。

組換え産生した真核生物の 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。組換え産生した真核生物の 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 日に出版され、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、酵素の除草剤抵抗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、組換え産生した 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。

II. 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の変更を教示する。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

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。

10

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分子であって、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分子である。

20

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。

30

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。

40

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

50

(p r o t o x) をコードする DNA 分子であって、配列番号： 1 0 のアミノ酸 5 0 2 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 p r o t o x が天然 p r o t o x 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 p r o t o x を含む修飾プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (p r o t o x) をコードする DNA 分子であって、配列番号： 1 0 のアミノ酸 2 1 1 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 p r o t o x が天然 p r o t o x 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 p r o t o x を含む修飾プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (p r o t o x) をコードする DNA 分子であって、配列番号： 1 0 のアミノ酸 2 1 2 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 p r o t o x が天然 p r o t o x 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 p r o t o x を含む修飾プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (p r o t o x) をコードする DNA 分子であって、配列番号： 1 0 のアミノ酸 4 6 6 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 p r o t o x が天然 p r o t o x 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 p r o t o x を含む修飾プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (p r o t o x) をコードする DNA 分子であって、配列番号： 1 2 のアミノ酸 3 6 9 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 p r o t o x が天然 p r o t o x 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 p r o t o x を含む修飾プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (p r o t o x) をコードする DNA 分子であって、配列番号： 1 2 のアミノ酸 2 2 6 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 p r o t o x が天然 p r o t o x 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 p r o t o x を含む修飾プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (p r o t o x) をコードする DNA 分子であって、配列番号： 1 2 のアミノ酸 5 1 7 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 p r o t o x が天然 p r o t o x 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 p r o t o x を含む修飾プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (p r o t o x) をコードする DNA 分子であって、配列番号： 1 2 のアミノ酸 4 3 2 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 p r o t o x が天然 p r o t o x 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 p r o t o x を含む修飾プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (p r o t o x) をコードする DNA 分子であって、配列番号： 1 6 のアミノ酸 3 6 5 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 p r o t o x が天然 p r o t o x 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 p r o t o x を含む修飾プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (p r o t o x) をコードする DNA 分子であって、配列番号： 1 6 のアミノ酸 4 2 8 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 p r o t o x が天然 p r o t o x 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 p r o t o x 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

(p r o t o x) 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 p r o t o x が天然 p r o t o x 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 p r o t o x を含む修飾プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (p r o t o x) をコードする DNA 分子であって、前記第 1 アミノ酸置換が p r o t o x 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 p r o t o x を含む修飾プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (p r o t o x) 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プ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 p r o t o x を含む修飾プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (p r o t o x) 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プ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
- (i i) 配列番号： 2 のアミノ酸 249 のトレオニンに相当する位置
- (i i i) 配列番号： 2 のアミノ酸 118 のプロリンに相当する位置
- (i v) 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
- (l) 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 p r o t o x を含む修飾プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (p r o t o x) をコードする DNA 分子であって、植物 p r o t o x 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 p r o t o x を含む修飾プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (p r o t o x) をコードする DNA 分子であって、植物 p r o t o x 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 1 6 4 のアラニンに相当する位置
- (b) 配列番号：6 のアミノ酸 1 6 5 のグリシンに相当する位置
- (c) 配列番号：6 のアミノ酸 3 7 0 のチロシンに相当する位置
- (d) 配列番号：6 のアミノ酸 1 5 9 のシステインに相当する位置
- (e) 配列番号：6 のアミノ酸 4 1 9 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 3 0 5 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 1 6 4 のアラニンに相当する位置
- (b) 配列番号：6 のアミノ酸 3 7 0 のチロシンに相当する位置

10

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 3 0 5 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 2 4 9 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 1 6 4 のアラニンに相当する位置
- (b) 配列番号：6 のアミノ酸 3 7 0 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 2 4 9 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。

20

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 1 1 8 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 1 6 4 のアラニンに相当する位置
- (b) 配列番号：6 のアミノ酸 3 7 0 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 1 1 8 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 4 2 5 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

30

- (a) 配列番号：6 のアミノ酸 1 6 4 のアラニンに相当する位置
- (b) 配列番号：6 のアミノ酸 3 7 0 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 4 2 5 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 4 9 8 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 1 6 4 のアラニンに相当する位置
- (b) 配列番号：6 のアミノ酸 3 7 0 のチロシンに相当する位置

40

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 4 9 8 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 3 7 0 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 3 7 0 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 1 6 4 に相当する位置に存在する前記アラニンが

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。

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。 20

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、発現カセットおよび組換えベクターであって、前記発現カ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カセットおよび組換えベクターに関する。本発明による発現カセットはさらに、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。

本発明は、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 (p r o t o x) 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カ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 (p r o t o x) 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 (p r o t o x) 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 (p r o t o x) 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 (p r o t o x) 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 p r o t o x 、配列番号：12 に示す配列を含むダイズ p r o t o x 、配列番号：16 に示す配列を含むワタ p r o t o x 、配列番号：18 に示す配列を含むテンサイ p r o t o x 、配列番号：20 に示す配列を含むナタネ p r o t o x 、配列番号：22 に示す配列を含むイネ p r o t o x 、および配列番号：24 に示す配列を含むモロコシ p r o t o x 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 (p r o t o x) 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 (p r o t o x) 酵素が配列番号：10 に示す配列を含むコムギ p r o t o x 、配列番号：12 に示す配列を含むダイズ p r o t o x 、および配列番号：18 に示す配列を含むテンサイ p r o t o x 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「p r o t o x - 1」とは、葉緑体 p r o t o x をいい、「p r o t o x - 2」はミトコンドリア p r o t o x をいう。

特に好ましいのは、DNA 分子が p r o t o x - 1 活性または p r o t o x - 2 活性を有するアラビドプ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 p r o t o x - 1 活性または p r o t o x - 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質が配列番号：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 p r o t o x - 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質が配列番号：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 p r o t o x - 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質が配列番号：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 p r o t o x - 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質が配列番号：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 p r o f o x - 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質が配列番号：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 p r o t o x - 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質が配列番号：20 に示すアミノ酸配列を含むキメラ遺伝子である。

10

20

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、植物にで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 (p r o t o x) 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 (p r o t o x) 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 p r o t o x、配列番号：12に示す配列を含むダイズ p r o t o x、配列番号：16に示す配列を含むワタ p r o t o x、配列番号：18に示す配列を含むテンサイ p r o t o x、配列番号：20に示す配列を含むナタネ p r o t o x、配列番号：22に示す配列を含むイネ p r o t o x および配列番号：24に示す配列を含むモロコシ p r o t o x 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 (p r o t o x) 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 p r o t o x を含む修飾プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (p r o t o x) 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 p r o t o x 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 p r o t o x 酵素を発現する遺伝子により付与される、植物中の天然 p r o t o x 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 p r o t o x を含む修飾プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (p r o t o x) 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 p r o t o x 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 p r o t o x 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 p r o t o x 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カセットを含む、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。

10

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, *Bio Techniques* 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))、Agracetus 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)、プロトプラスト形質転換/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* 2: 603~618 (1990) (トウモロコシ) も参照のこと。

20

30

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。

40

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*

50

ule)、セタリア属(Setaria)の各植物を含むイネ科族の単子葉植物である。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産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、根などを産生する方法である。好ましいのは、プロトボ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、プロトボ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、プロトボ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産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産生する植物、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産生する前記の植物、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性質は、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、土壌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砕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入を特徴とする。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樣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っ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生産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、カルボキシシン、サイラム (TM TD)、メタラキシル (Apron) およびピリミホスメチル (Actellic) 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、あるいは土壌中で育成し、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産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); Koziele等, Bio/technology 11:194 (1993年) 参照）。

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にも含まれる。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；ノパリンシンターゼプロモーター；病因関連 (PR) 蛋白プロモーター；リブローズビスリン酸カルボキシ化酵素 (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-332 104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体を変更してもよい。

30

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別の好まし

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*（プロトボ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/CGC1846）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もよい。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, Pazkowski 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もよい。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、Boutry 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、Neuhaus 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、G418、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胞

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、 α -グルクロニダーゼ、 α -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ボンバードを伴う。ターゲティング配列と呼ばれる1~1.5 kbのブランキング領域は、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156 kb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；Staeb, J. M. およびMaliga, P.（1992年）Plant Cell 4, 39~45、参照により本明細書の一部とする）。これにより、標的葉のボンバード100回につきおよそ1回の頻度で安定したhomoplasmic形質転換体を得られた。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（Staeb, 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clpP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、それを商用品種へ移行し得る。

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 - (3 H) - 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)、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、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) ; Nandihalalli 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 acifluorfen、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 - (3 H) - 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

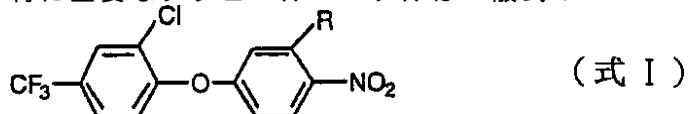
30

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。

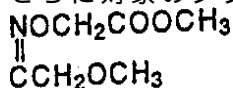
特に重要なジフェニルエーテルは一般式：



10

[式中、R は - COONa (式 II)、- CONHSO₂CH₃ (式 III) または - COOCH₂COOC₂H₅ (式 IV ; Maigrot 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。

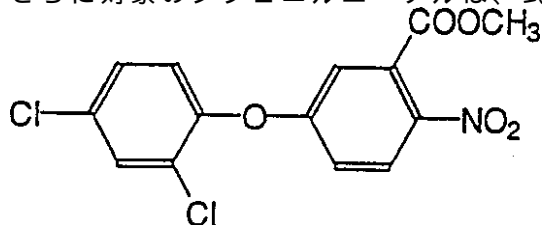
さらに対象のジフェニルエーテルは、R が



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

20

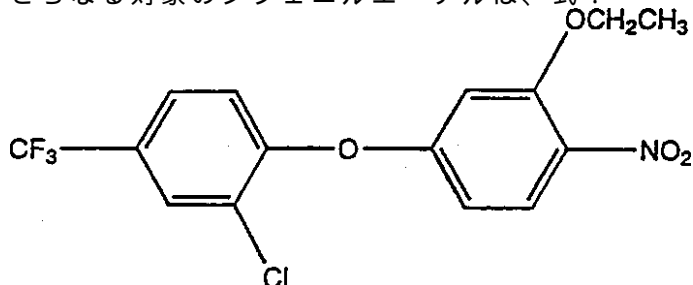
さらに対象のジフェニルエーテルは、式：



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

30

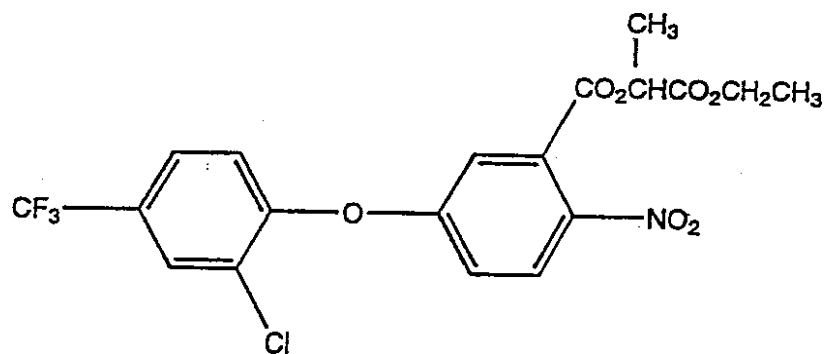
さらなる対象のジフェニルエーテルは、式：



(式 IV c ; 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。

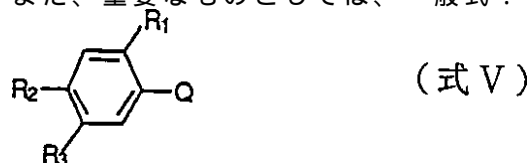
40

また別の対象のジフェニルエーテルは、式：

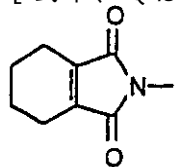


(式IVd; ラクトフェン著, C. Tomlin 編「The Pesticide Manual」第10版, British Crop Protection Council, 英国サリー州(1994年)の623頁参照)を有するものである。

また、重要なものとしては、一般式：

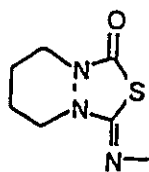


[式中、Qは



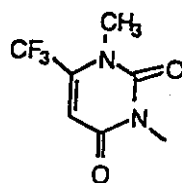
(式VI)

または



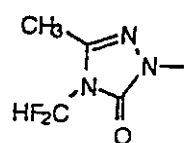
(式VII)

または



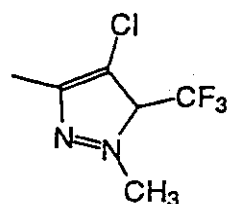
(式VIII)

または



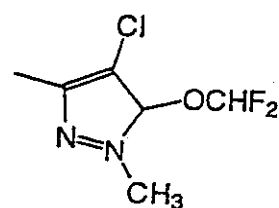
(式IX)

または



(式IXa)

または



(式IXb)

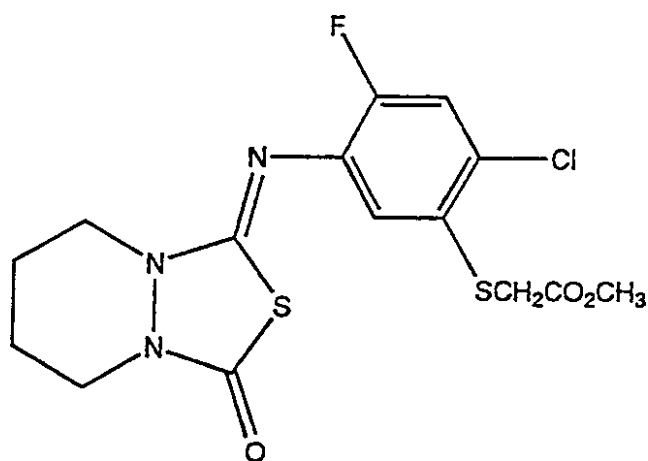
(Ragdale他編「Proceedings of the Eighth International Congress of Pesticide Chemistry (第8回国際殺虫剤化学会議紀要)」, Amer. Chem. Soc, ワシントン, 42~48(1994年)収載のHemper等(1995年)参照)と等しく、 R_1 はH、ClまたはFと等しく、 R_2 はClと等しく、 R_3 は最適に置換されたエーテル、チオエーテル、エステル、アミノまたはアルキル基である]を有するイミドとして知られている除草剤の品種がある。別法として、 R_2 と R_3 が合わさって5員環または6員環の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

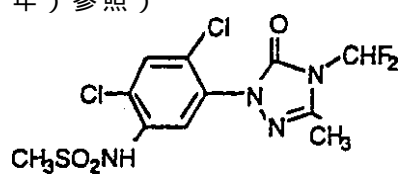
30

40



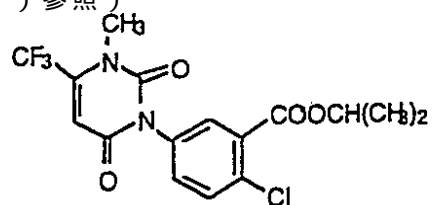
10

(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)



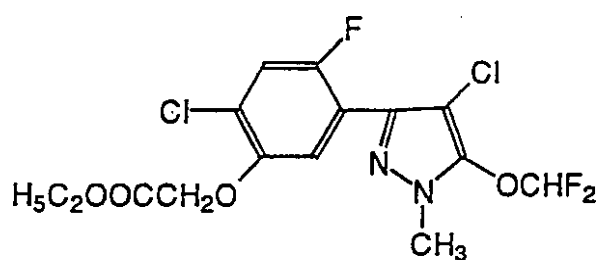
20

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



(式XI)

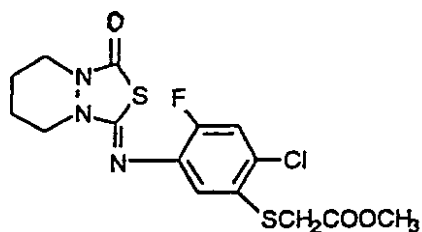
30



(式XII)

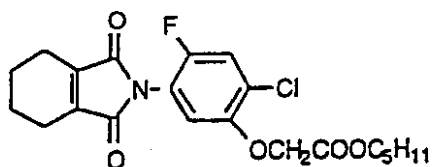
40

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

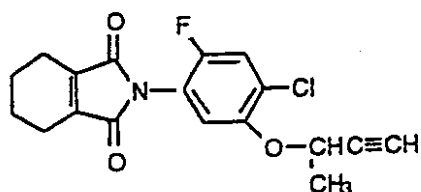


(式XIII)

10

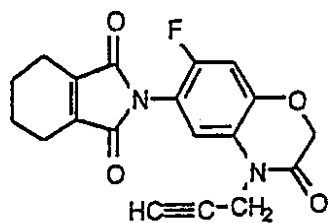


(式XIV)



20

(式XV)



30

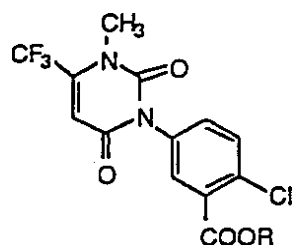
(式XVI)

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XIIおよび式XIII)、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XIV)に記載されている。

40

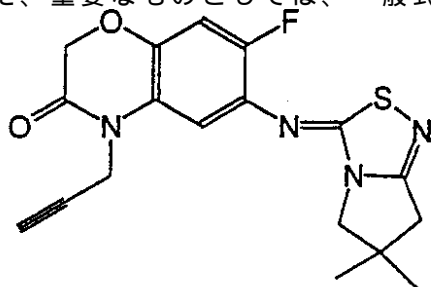
最も好ましいイミド除草剤はアリールウラシルに分類され、一般式：



(式XV I I)

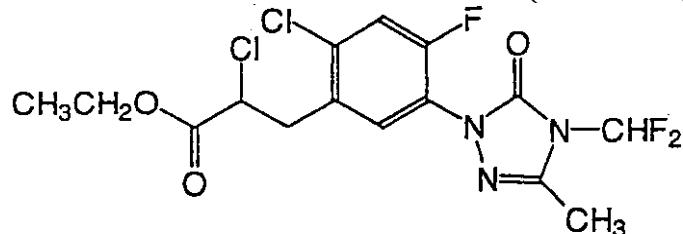
[式中、R は参照により本明細書の一部とする米国特許第 5, 183, 492 号に開示される基 (C₂₋₆-アルケニロキシ) カルボニル - C₁₋₄-アルキルを示す] を有するものである。

また、重要なものとしては、一般式：



(式XV I I I ; チアジアジン)

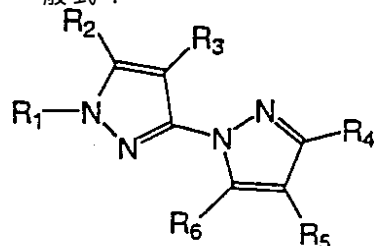
(Weiler らおよび Brighton Crop Protection Conference - Weeds 29 ~ 34 (1993 年) 参照)



(式X I X ; c a r f e n t r a z o n e)

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

一般式：



(式X X)

[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、

10

20

30

40

50

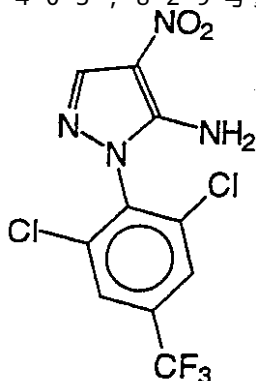
R₃は水素またはハロゲンであり、

R₄は水素またはC₁～C₄のアルキルであり、

R₅は水素、ニトロ、シアノ、あるいは基-COOR₆または-CONR₇R₈であり、

R₆は水素、C₁～C₆のアルキル、C₂～C₆のアルケニルまたはC₂～C₆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WO94/08999、WO93/10100および米国特許第5,405,829号参照)、



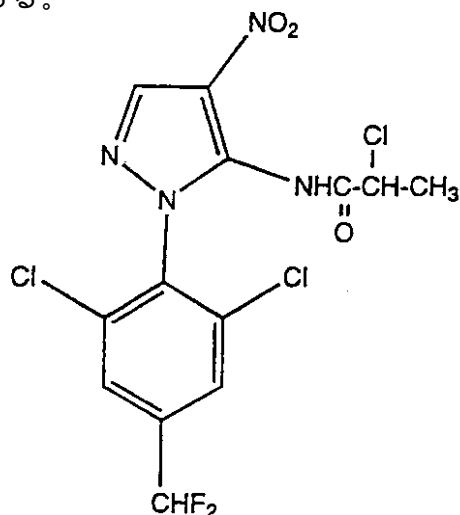
10

(式XXI; nipyraclifen)

20

(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 (Lyga等, Pesticide Sci. 42.29~36 (1994年))などがある。



30

(式XXIa; BAY 11340)

40

また、重要なものとしては、WO96/01254およびWO97/00246(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XVII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

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。

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. Silhavy, 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。

セクション A 植物プロトボ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* - 1 cDNA 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 Schuell)。このブランクリフトをランダムプライミング法 (Life Technologies) により 32 P-dCTP で標識し、トウモロコシ *Protox* - 1 cDNA (配列番号: 5; 1995 年 6 月 8 日に出版され、1995 年 12 月 21 日に WO 95/34659 として公開された国際出願 PCT/IB 95/00452 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 Gilbert, 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ンクを精製し、*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* - 1 cDNA 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。

10

20

30

40

50

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・コー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(NRRL#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(v 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のライブラリーをベトリ皿10cm当たりおよそ5,000 pfuの密度でプレートイングし、コロニー/ブランク・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。このブラン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(pH7.0)、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ンクを精製し、*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ー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、58.8kDa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: 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(NRRL#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。

10

20

30

40

表 1

アラビドプシス（「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）、Soybean（「Soybean 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

10

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。

20

	1		50	
Rapept-1	MDLSLLRP.. QPFLSPFSNP FPRSRYKPL		
Arabpt-1	MELSLLRPTT QSLLPFSKPL NLRINVKPL		
Sorghumpt-1		
Mzpt-1		
Wtpt-1M ATATVAAASP LRGRVTGRPH		
Ricept-1		
Cottonpt-1MEAL IDLSLLRSSP SVSPFSIPHH QHPPRFKPF		10
Soybeanpt1	MV SVFNEILFPP NQTLRLPSLH SPTSFFTSPT RKFPERSRPNP		
Sugpt-1		MKSMALSNCI PQTQCMPLRS SGHYRGNCIM LSIPCSLIGR RGYYSKKRR		
	51		100	
Rapept-1		NLRCSVSGGS VGSSTIEGG GGGKTVTADC VIVGGGISGL CIAQALVTKH		
Arabpt-1		RLRCSVAGGP TVGSSKIEGG GGT.TITTDG VIVGGGISGL CIAQALATKH		
Sorghumpt-1		
Mzpt-1ADC VVGGGISGL CIAQALATRH		20
Wtpt-1		RVRPRCATAS SATETPAAPG VRL...SAEC VIVGAGISGL CIAQALATRY		
Ricept-1		
Cottonpt-1		KLRCSLAEPP TISSSKIDGG ESS...IADC VIVGGGISGL CIAQALATKH		
Soybeanpt1		ILRCSIAEES TASPCKTR.. DSA...PVDC VVGGGVSGSL CIAQALATKH		
Sugpt-1		MSMSCSTSSG SKSAVKZAGS GSGAGLLDC VIVGGGISGL CIAQALCTKH		
	101		150	
Rapept-1		PDA..AKNVM VTEAKDRVGG NIIT..REEQ GFLWEEGNS FQPSDEMLTM		30
Arabpt-1		PDA..APNLI VTEAKDRVGG NIIT..REEN GFLWEEGNS FQPSDEMLTM		
Sorghumpt-1STIVERPEE GYLWEEGNS FQPSDPVLSM		
Mzpt-1	..G..VGDVL VTEARARPGG NITTVERPEE GYLWEEGNS FQPSDPVLTIM			
Wtpt-1	..G..VSDLL VTEARDRPGG NITTVERPDE GYLWEEGNS FQPSDPVLTIM			
Ricept-1		
Cottonpt-1		RDV..ASNVI VTEARDRVGG NITTVER..D GYLWEEGNS FQPSDPILTM		
Soybeanpt1	..A..NANVV VTEARDRVGG NITIMER..D GYLWEEGNS FQPSDEMLTM			40
Sugpt-1		SSSSLSPNFI VTEAKDRVGG NIVTVE..AD GYLWEEGNS FQPSDAVLTM		

151	200	
Rapept-1	VVDSGLKDDL VLGDPAPRF VLWNGKLRPV PSKLTDLPPF DLMSIGGKIR	
Arabpt-1	VVDSGLKDDL VLGDPAPRF VLWNGKLRPV PSKLTDLPPF DLMSIGGKIR	
Sorghumpt-1	AVDSGLKDDL VFGDPNAPRF VLWEGKLRPV PSKPADLPFF DLMSIRGKLR	
Mzpt-1	AVDSGLKDDL VFGDPNAPRF VLWEGKLRPV PSKPADLPFF DLMSIRGKLR	
Wtpt-1	AVDSGLKDDL VFGDPNAPRF VLWEGKLRPV PSKPGDLPPF SLMSIRGKLR	
Ricept-1	
Cottonpt-1	AVDSGLKDDL VLGDPNAPRF VLWEGKLRPV PSKPTDLPPF DLMSIAGKLR	10
Soybeanpt1	VVDSGLKDEL VLGDPNAPRF VLWNRKLRPV PGKLTDLPPF DLMSIGGKIR	
Sugpt-1	AVDSGLKDEL VLGDPNAPRF VLWNDKLRPV PSSLTDLPPF DLMTIPGKIR	
201	250	
Rapept-1	AGFGAIGIRP SPPGREESVE EFVRRNLGDE VFERLIEPFC SGVYAGDPAK	
Arabpt-1	AGFGALGIRP SPPGREESVE EFVRRNLGDE VFERLIEPFC SGVYAGDPSK	
Sorghumpt-1	AGLGALGIRP PAPGREESVE EFVRRNLGAE VFERLIEPFC SGVYAGDPSK	
Mzpt-1	AGLGALGIRP PPPGREESVE EFVRRNLGAE VFERLIEPFC SGVYAGDPSK	20
Wtpt-1	AGLGALGIRP PPPGREESVE EFVRRNLGAE VFERLIEPFC SGVYAGDPSK	
Ricept-1	
Cottonpt-1	AGFGAIGIRP PPPGYEESVE EFVRRNLGAE VFERFIEPFC SGVYAGDPSK	
Soybeanpt1	AGFGALGIRP PPPGHEESVE EFVRRNLGDE VFERLIEPFC SGVYAGDPSK	
Sugpt-1	AALGALGFRP SPPPHEESVE HFVRRNLGDE VFERLIEPFC SGVYAGDPAK	
251	300	
Rapept-1	LSMKAAFQKV WKLEENGSSI IGGAFKAIQA KNKAPKTTRD PRLPKPKGQT	30
Arabpt-1	LSMKAAFQKV WKLEQNGSSI IGGTFKAIQE RKNAPKAERD PRLPKPKGQT	
Sorghumpt-1	LSMKAAFQKV WRLEEAGSSI IGGTIKTIQE RGKNPKPPRD PRLPKPKGQT	
Mzpt-1	LSMKAAFQKV WRLEETGSSI IGGTIKTIQE RSKNPKPPRD ARLPKPKGQT	
Wtpt-1	LSMKAAFQKV WRLEEIGSSI IGGTIKAIQD KGKNPKPPRD PRLPAFKGQT	
Ricept-1	RALKAAFQKV WRLEDIGSSI IGGTIKTIQE RGKNPKPPRD PRLPTPKGQT	
Cottonpt-1	LSMKAAFQKV WKLEEIGSSI IGGTFKTIQE RNKTPKPPRD PRLPKPKGQT	
Soybeanpt1	LSMKAAFQKV WKLEKNGSSI IGGTFKAIQE RKGASKPPRD PRLPKPKGQT	40
Sugpt-1	LSMKAAFQKV WKLEQKGGSI IGGTLKAIQE RGSNPKPPRD QRLPKPKGQT	

	301		350	
Rapept-1	VGSFRKGLTM LPEAISARLG DKVKVSWKLS SITKLASGEY SLTYETPEGI			
Arabpt-1	VGSFRKGLRM LPEAISARLG SKVKLSWKLS GITKLESGGY NLTYETPDGL			
Sorghumpt-1	VASFRKGLAM LPNATTSSLG SKVKLSWKLT SMTKSDGKGY VLEYETPEGV			
Mzpt-1	VASFRKGLAM LPNATTSSLG SKVKLSWKLT SITKSDDKGY VLEYETPEGV			
Wtpt-1	VASFRKGLAM LPNAIASRLG SKVKLSWKLT SITKADNQG Y VLG YETPEGL			
Ricept-1	VASFRKGLTM LPDAITSR LG SKVKLSWKLT SITKSDNKG Y ALV YETPEGV			
Cottonpt-1	VGSFRKGLTM LPEAIANS LG SNVKLSWKLS SITKLGNQGY NLTFETPEGM			10
Soybeanpt1	VGSFRKGLTM LPDAISARLG NKVKLSWKLS SISKLDGGEY SLTYETPEGV			
Sugpt-1	VGSFRKGLVM LPTAISARLG SRVKLSWTLS SIVKSLNGEY SLTYDTPDGL			
	351		400	
Rapept-1	VTVQSKSVVM TVPSHVASSL LRPLSDSAAE ALSKLYYPPV AAVSISYAKE			
Arabpt-1	VSVQSKSVVM TVPSHVASGL LRPLSESAAN ALSKLYYPPV AAVSISYPKE			
Sorghumpt-1	VLVQAKSVIM TIPS YVASDI LRPLSGDAAD VLSRFY YPPV AAVTVSY PKE			20
Mzpt-1	VSVQAKSVIM TIPS YVASNI LRPLSSDAAD ALSRFY YPPV AAVTVSY PKE			
Wtpt-1	VSVQAKSVIM TIPS YVASDI LRPLSIDAAD ALSKFY YPPV AAVTVSY PKE			
Ricept-1	VSVQAKIVVM TIPS YVASDI LRPLSSDAAD ALSIFY YPPV AAVTVSY PKE			
Cottonpt-1	VSLQSRSVVM TIPSHVASNL LHPLSAAAAD ALSQFY YPPV ASVTVSY PKE			
Soybeanpt1	VSLQCKTVVL TIPS YVASTL LRPLSAAAAD ALSKFY YPPV AAVSISYPKE			
Sugpt-1	VSVRTKSVVM TVPSYVASRL LRPLSDSAA D SL SKFY YPPV AAVSLSY PKE			
	401		450	30
Rapept-1	AIRSECLIDG ELKGFGQLHP RTQKVETLGT IYSSSLFPNR APPGRVLLLN			
Arabpt-1	AIRTECLIDG ELKGFGQLHP RTQGVETLGT IYSSSLFPNR APPGRILLLN			
Sorghumpt-1	AIRKECLIDG ELQGFGQLHP RSQGVETLGT IYSSSLFPNR APAGRVLLLN			
Mzpt-1	AIRKECLIDG ELQGFGQLHP RSQGVETLGT IYSSSLFPNR APDGRVLLLN			
Wtpt-1	AIRKECLIDG ELQGFGQLHP RSQGVETLGT IYSSSLFPNR APAGRVLLLN			
Ricept-1	AIRKECLIDG ELQGFGQLHP RSQGVETLGT IYSSSLFPNR APAGRVLLLN			
Cottonpt-1	AIRKECLIDG ELKGFGQLHP RSQGIETLGT IYSSSLFPNR APSGRVLLLN			
Soybeanpt1	AIRSECLIDG ELKGFGQLHP RSQGVETLGT IYSSSLFPNR APPGRVLLLN			40
Sugpt-1	AIRSECLING ELQGFGQLHP RSQGVETLGT IYSSSLFGR APPGRILLIS			

	451	500	
Rapept-1	YIGGAINVIGI LSKSEGELVE AVDRDLRKML IKPSSTDPLV LGVKLWFPQAI		
Arabpt-1	YIGGSTINIGI LSKSEGELVE AVDRDLRKML IKPNSTDPLK LGVRVWPQAI		
Sorghumpt-1	YIGGAINVIGI VSKTESELVE AVDRDLRKML INPTAVDPLV LGVRVWPQAI		
Mzpt-1	YIGGAINVIGI VSKTESELVE AVDRDLRKML INSTAVDPLV LGVRVWPQAI		
Wtpt-1	YIGGSTINIGI VSKTESDLVG AVDRDLRKML INPRAADPLA LGVRVWPQAI		
Ricept-1	YIGGSTINIGI VSKTESELVE AVDRDLRKML INPRAVDPLV LGVRVWPQAI		
Cottonpt-1	YIGGAINVIGI LSKTEGELVE AVDRDLRKML INPNAKDPLV LGVRVWPQAI		10
Soybeanpt1	YIGGAINVIGI LSKTDSSELVE TVDRDLRKIL INPNAQDPFV VGVRLWFPQAI		
Sugpt-1	YIGGAKNPGI LNKSKDELAK TVDKDLRRML INPDAKLPRV LGVRVWPQAI		
	501	550	
Rapept-1	PQFLIGHIDL VDAAKASLSS SGHEGLFLGG NYVAGVALGR CVEGAYETAT		
Arabpt-1	PQFLVGHFID LDTAKSSLTS SGYEGFLFLGG NYVAGVALGR CVEGAYETAI		
Sorghumpt-1	PQFLVGHLDL LEAAKSALDQ GGYNGFLFLGG NYVAGVALGR CIEGAYESAA		20
Mzpt-1	PQFLVGHLDL LEAAKAALDR GGYDGLFLGG NYVAGVALGR CVEGAYESAS		
Wtpt-1	PQFLIGHLDR LAAKSALGQ GGYDGLFLGG KYVAGVALGR CIEGAYESAS		
Ricept-1	PQFLIGHLDH LEAAKSALGK GGYDGLFLGG NYVAGVALGR CVEGAYESAS		
Cottonpt-1	PQFLVGHLDL LDSAKMALRD SGFHGLFLGG NYVSGVALGR CVEGAYEVAA		
Soybeanpt1	PQFLVGHLDL LDVAKASIRN TGFEGFLFLGG 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*		
Ricept-1	QISDYLTKEYA YK*		
Cottonpt-1	EVKEFLSQYA YK*		
Soybeanpt1	EVNDFLINRV YK*		40
Sugpt-1	EVVDFLSQYS DK*		

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Prox-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

Prot ox-2ペプチド×Mz prot ox-2ペプチド

```

1 .....MASGAVAD.HQIEAVSGKRVAV 21
      .| |:|: |: |:|:|
1 MLALTASASSASSHPYRHASAHTRRPRLRAVLAMAGSDDPRAAPARSVAV 50

22 VGAGVSGLAAAYKLKSRGLNVTVFADGRVGGKLRSMQNGLIWDEGANT 71
      |||||:|: |:|:|:|. |:|:|. :|:|:|
51 VGAGVSGLAAAYRLRQSGVNVTVFEAADRAGGKIRTNSEGGFVWDEGANT 100

72 MTEAEPEVGSLLDDLGLREKQQFPISQKKRYIVRNGVPVMLPTNPIELVT 121
      ||:| |:|:|:|:|:| |:|:| |:|:|:|. |:|:|. :|:|. |:|:
101 MTEGEWEASRLIDDLGLQDKQQYPNSQHKRYIVKDGAPALIPSDPISLMK 150

122 SSVLSTQSKFQILLEPFLWKK....KSSKVSDASAEESVSEFFQRHFGQE 167
      |||||. |:|:|:|:|:| |:|:|. |:|:|. |:|:|. |:|:
151 SSVLSTKSKIALFFEPFLYKKANTRNSGKVSEEHLSESVGSFCERHFGRE 200

168 VVDYLIDPFVGGTSAADPDLSMKHSFPDLWNVEKSFGSIIVGAIRTKFA 217
      ||||:|:|:|:|:|:|:|:|:|. |:|:|:|:|:|:|:|:|. |:|
201 VVDYFVDPFVAGTSAGDPESLSIRHAFPALWNLERKYSVIVGAILSKLA 250

218 AKGGKSRDTKSSPGTKKSGRGSFSFKGGMQILPDTLCKSLSHDEINLDSK 267
      ||:|. :. :|. |:|:|. |:|:|:| | :|. :|:|. |:|:
251 AKGDPVKTRHDSSGKRRNRVVSFSFHGGMQSLINALHNEVGDDNVKLGTE 300

```

268 VLSLS..YNSGSRQENWSLSCVSHNETQRQ...NPHYDAVIMTAPLCNVK 312
 |||. :... :.|||. |.....: |. :|||||||:|:
 301 VLSLACTFDGVPALGRWSISVDSKDSGDKDLASNQTFDAVIMTAPLSNVR 350
 313 EMKVMKGGQPFQNLFLPEINYMPLSVLITTTFTKEKVKRPLEGFGVLIPSK 362
 ||. |||. |. |:|||. :|:|||: :|. |. |. :|:||||| | |
 351 RMKFTKGGAPVVLDLFLPKMDYLPLSLMVTAFKKDDVKKPLEGFGVLIPYK 400
 363 E.QKHGFKTLGTLFSSMMFPDRSPSDVHLYTTFIGGSRNQELAKASTDEL 411
 | ||||:||||||| |||||. |. |. ||||:||||:|. :| | |. |
 401 EQQKHGLKTLGTLFSSMMFPDRAPDDQYLYTTFVGGSNDRDLGAPTSIL 450
 412 KQVVTSDLQRLLGVEGEPVSVNHYYWRKAFPLYDSSYDSVMEAIKDMEND 461
 ||:|||||. :|||||:|. |. | | |. ||||:|. |. ||:||||:| |. :
 451 KQLVTSDLKKLLGVEGQPTFVKHVVYWGNAFPLYGHDYSSVLEAIEKMEKN 500
 462 LPGFFYAGNHRGGLSVGKSIASGCKAADLVISYLESCSNDKKPNDSL* 509
 ||||| ||| :|||. ||. ||||:|||||. |||||:
 501 LPGFFYAGNSKDGLAVGSVIASGSKAADLAISYLESHTKHNNSH*... 545

10

20

実施例 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 Trelease 博士から入手した (Ni W. および Trelease 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 32 P - 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 °C とした。洗浄条件は、2 倍濃度 SSC、1% SDS、50 °C であった (Church および Gilbert (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ー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。

30

40

pBluescript 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 Protox - 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, Eugene J. KimおよびPhilip A. Rea, Plant Physiol. 106: 375~382 (1994年))。およそ50,000 pfuのcDNAライブラリーをベトリ皿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Schuehl)。このブランクリフトをランダムプライミング法(Life Technologies)により32 P - 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ンクを精製し、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ー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。

pBluescript 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 SchockおよびAloysius Wild, Plant Physiol. 103: 303~304 (1993年))。およそ50,000 pfuのcDNAライブラリーをベトリ皿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Schuehl)。このブランクリフトをランダムプライミング法(Life Technologies)により32 P - 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ンクを精製し、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ー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 kD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。

pBluescript SKベクター中のナタネProtox - 1を1996年8月2

10

20

30

40

50

3日にpWDC-17(NRRL#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-1 cDNAの単離

Oryza sativa (5日間黄化した苗条)から調製された *gt11* cDNAライブラリーをClontechから購入した。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Schuell)。このブランクリフトをランダムプライミング法(Life Technologies)により32 P-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ンクを精製し、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EcoRI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ー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(NRRL#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-1 cDNAの単離

Sorghum bicolor (3~6日の緑色実生苗)から調製された *-Zap I* cDNAライブラリ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)。このブランクリフトをランダムプライミング法(Life Technologies)により32 P-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ンクを精製し、*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ー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(NRRL#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

受性実験

Protox - 1 / SASX38、Protox - 2 / SASX38およびpBlue script / XL1 - Blueの液体培養物をLamp¹⁰⁰中で培養した。様々な濃度(1.0 nM ~ 10 mM)の式XVIIのprottox阻害性アリアルウルシル除草剤を含む各培養物の100 µlアリコートをして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。

prottox⁺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 / SASX38は明らかに感受性であり、10 nM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(10 µM)の除草剤だけではProtox 2 / SASX38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20 µg / 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 / SASX38は、任意のヘム欠乏培地中でProtox - 2 / SASX38よりもずっとゆっくり成長する。成長速度がアラビドプシスProtox - 1 / SASX38に匹敵するMzProtox - 2 / SASX38株も、より低濃度(10 ~ 100 nM)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

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中のアラビドプシス・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SASX38(Sasarmann等, J. Gen. Microbiol. 113: 297 (1979年))を入手し、20 µg / 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SASX38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 / 10 cm平板の密度で100 µg / mlアンピシリンを含むL寒天培地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prottox酵素を発現すると期待される「Protox - 1」と称するタイプのprottox遺伝子であることが示された。

pFL61ライブラリーは、アラビドプシス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。prottox 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lacZ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部分を含んでいたProtox - 1 cDNAが、大腸菌SASX38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配列がアラビドプシス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。50 µg / 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、

10

20

30

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SASX38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SASX38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NotI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NRR L#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SASX38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 *Protopx-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 *protopx* 酵素を産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 *protopx* 酵素を産生し得ることが立証された。

実施例 11．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

10

除草剤耐性 *protopx* 遺伝子を含むプラスミドで突然変異誘発株 *XL1-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 *SASX38* 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 *protopx* 阻害性除草剤に対する耐性が高い酵素を産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。

20

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 *protopx* 阻害性除草剤に対する耐性が高い酵素を産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変異などがある。

30

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産生するのに十分である可能性を排除していない。

実施例 12．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 *Protopx* 酵素の創製

40

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、 *protopx* 阻害性除草剤に関して耐性の *protopx* 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 *protopx* 酵素が産生された。 *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

50

2 部位変異も A r a C - 2 突然変異体の耐性を増大させることが立証される。A r a C 2 I I e、A r a C 3 0 5 L e u および A r a C 2 4 9 1 l e 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 p r o t o x - 1 酵素を産生することを示した。

実施例 1 3 . 変異させると除草剤許容性が得られるトウモロコシ P r o t o x - 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 p M u t - 1 アラビドプシス P r o t o x - 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 P r o t o x - 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 c D N A とほぼ同じ配列中の p M u t - 1 ベクターにトウモロコシ c D N A を組み込んだ。標準的方法の重複 P C R 融合を使用して、p M u t - 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 1 7 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 1 4 (配列番号 : 6) から開始するトウモロコシ P r o t o x - 1 c D N A 配列と融合した。トウモロコシ c D N A の 3 ' 末端は変異していなかった。この融合の両端に N o t I 制限部位を設け、p M u t - 1 由来の p F L 6 1 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 7 4 5 ~ 7 4 7 (配列番号 : 5) の A C G コドンが A C T コドンに変換される、P C R による単一ヌクレオチドの無形質変異が明らかになったが、A C G コドンと A C T 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 P r o t o x - 1 プラスミドを p M u t - 3 と称する。

上記と同様にして p M u t - 3 プラスミドで突然変異誘発 X L 1 - R e d 株を形質転換し、変異 D N A を単離し、突然変異が起きていない p M u t - 3 トウモロコシ p r o t o x 遺伝子にとり致死濃度の除草剤上にプレティングした。3 7 ° C 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 p r o t o x 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 P r o t o x - 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 P r o t o x - 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。3 つのうちの 2 つはアミノ酸 1 6 4 (配列番号 : 6) のアラニン (G C T) をバリン (G A T) またはトレオニン (A C T) のいずれかに変換する p M z C - 1 V a l および p M z C - 1 T h r である。この位置は上記の p A r a C - 1 変異に相当する。第 3 の相同性変異はアミノ酸 1 6 5 のグリシン (G G T) を S e r i n e (A G T) に変換し、上記の A r a C - 3 S e r 変異に相当する。これらの結果は、1 つの植物 p r o t o x 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 p r o t o x 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 P r o t o x - 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 P r o t o x - 1 配列 (配列番号 : 6) のアミノ酸 1 5 9 のシステイン (T G C) をフェニルアラニン (T T C) に変換する。第 2 の変異はアミノ酸 4 1 9 のイソロイシン (A T A) をトレオニン (A C A) 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 1 6 5 がロイシンに変異した時、あるいはシステイン 1 5 9 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 4 1 9 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 P r o t o x - 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 P r o t o x - 1 遺伝子に組み込んだ。細菌試験から、アミノ酸 1 6 4 (配列番号 : 6) のアラニン (G C T) をロイシン (C T T) 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 A r a C - 2 部位と相同の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

10

20

30

40

50

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産生された。

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

効率のよいコムギ *Proto x* - 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 *Proto x* - 1 キメラプラスミドを *pMut* - 4 と称する。*pMut* - 4 *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 *proto x* 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 *Proto x* - 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 *Proto x* - 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 (ACT) 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* - 3 *Ser* 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 (ATA) 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 *Proto x* - 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 *Proto x* - 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 *Proto x* - 1 遺伝子中の部位の確認

効率のよいダイズ *Proto x* - 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 *Proto x* - 1 キメラプラスミドを *pMut* - 5 と称する。*pMut* - 5 *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 *proto x* 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 *Proto x* - 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 *Proto x* - 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* - 1 *Thr* 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 *Wh t502Val* 変異に相当する。

ダイズ *Proto x* - 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 *Proto x* - 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 *Proto x* - 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ダイズ *Proto x* - 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産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産生された。

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 P r o t o x - 1 遺伝子中の部位の確認

効率のよいテンサイ P r o t o x - 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 D N A についての上の記載と同様にしてテンサイ c D N A を p M u t - 1 ベクターに組み込んだ。このアラビドプシス - テンサイ P r o t o x - 1 キメラプラスミドを p M u t - 6 と称する。p M u t - 6 D N A 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 p r o t o x 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 P r o t o x - 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 (T A C) をシステイン (T G C) に変換し、アラビドプシス中の A r a C - 2 変異と相同である。

10

許容性の高いアラビドプシス P r o t o x - 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 P r o t o x - 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 (T A C) 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 P r o t o x - 1 遺伝子中の部位の確認

効率のよいワタ P r o t o x - 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 D N A についての上の記載と同様にしてワタ c D N A を p M u t - 1 ベクターに組み込んだ。このアラビドプシス - ワタ P r o t o x - 1 キメラプラスミドを p M u t - 7 と称する。p M u t - 7 D N A 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 p r o t o x 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 P r o t o x - 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 (T A C) をそれぞれシステイン (T G C) およびアルギニン (C G C) に変異する。アルギニンは、以前に確認されたこの A r a C - 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 (C C C) をセリン (T C C) に変換する。この変異はダイズ突然変異体 S o y 369 S e r に相当する。

20

実施例 18 . 種々の P r o t o x 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 p r o t o x 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 p r o t o x 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 S A S X 38 株を一連の濃度の各化合物上にプレーティングする。S A S X 38 中の耐性の突然変異体プラスミドをプレーティングし、野生型のプラスミドを含む S A S X 38 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 3 A および表 3 B 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 p r o t o x 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 P r o t o x 阻害性化合物に対する植物 P r o t o x 変異
の交差許容性

式	AraC-1Val	AraC-2Cys	AraC-1Thr	AraC-3Thr	MzC-1Val
XVII	+	+	+	+	+
VIIa	+	+	+	-	+
IV	++	-	++	++	-
XV	+	+	+	+	+
XI	-	+	+	++	+
XVI	-	-	-	-	+
XII	+	-	++	++	++
XIV	+	-	+	+	+
*X					

10

20

30

+ = W T の 1 0 倍以上許容性

++ = W T 1 0 0 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 P r o t o x 阻害性化合物に対する植物 P r o t o x 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 05Leu	AraC425 Ser	AraC425 Ser	AraC425 Ser
XVII	+	+	+	+	+	+	+	+
VIIa	++	++	++	++	++	++	++	++
IV	++	-	+	++	+	-	+	+
XV	++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++
XI	++	++	++	++	++	++	++	++
XVI	+++	+++	+++	+++	+++	+	++	++
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 P r o t o x 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 p r o t o x 阻害性除草剤許容性植物の
遺伝子組換え

天然 p r o t o x 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、p r o t o x 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' 非翻訳領域のいずれか）が欠失している p r o t o x 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、微量噴出性ボンバードなど）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、P a s z k o w s k i 等、E M B O J . 7 : 4 0 2 1 ~ 4 0 2 6 (1 9 8 8 年)、L e e 等、P l a n t C e l l 1 2 : 4 1 5 ~ 4 2 5 (1 9 9 0 年)、R i s s e e u w 等、P l a n t J . 7 : 1 0 9 ~ 1 1 9 (1 9 9 5 年) 参照）、あ

10

20

30

40

50

る形質転換体は、突然変異体DNAのprototox染色体座中への相同的組込みにより、あるいは天然prototox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prototox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に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、好ましい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ましいことがある。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Vierera, 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, Nucleic 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(BloehingerおよびDiggelmann, Mol Cell Biol 4: 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, Nucleic 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AccI断片を挿入した(MessingおよびVierera, 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XhoIリンカーをライゲートし(Rothstein等, Gene 53: 153~161 (1987年))、XhoI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、BglII、XbaI、SalI、MluI、BclI、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RK2由来のtrfA機能およびこれもRK2由来のOriTとOriV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カ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、プロトプラスト取込み (例えば 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わ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 1 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 l 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 2 1 . 植物発現カセットの構築

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、発現カ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、これらの発現カセットは上記の実施例 2 0 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

発現カ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カ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、ノバ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フェ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（1987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つた（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（1987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（1990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（1988年）な

10

20

30

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ル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たす (KoehlerおよびHo, Plant Cell 2: 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たす (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; Wasmann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よって依存する。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 2.2 . 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

otrykus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 (EP0317511 (ワタ)、EP0249432 (トマト、Calgene社)、WO87/07299 (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カ―または除草剤耐性マーカ―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カ―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、後代で選択マーカ―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 (Schocher等, Biotechnology 4: 1093~1096 (1986年))。

特許出願EP0292435 (チバ - ガイギー)、EP0392225 (チバ - ガイギー) およびWO93/07278 (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WO93/07278 (チバ - ガイギー) およびKozziel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EP0332581 (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、オーチャ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Vasil等, Biot

10

20

30

40

50

technology 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ボンバードを使用するものがVasil等, Biotechnology 11:15531558(1993年)、Weeks等, Plant Physiology 102:1077~1084の(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、未熟胚芽の粒子ボンバードによるコムギの形質転換などがある。ボンバードに先立ち、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(Murashige & Skoog, Physiologia Plantarum 15:473~497(1962年))および3mg/lの2,4Dを含むMS培地上にプレートングし、暗中で生育させる。ボ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、ボンバードする。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 Biolisticsのヘリウム装置によって撃つ。ボンバード後、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週間静置する。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WO94/13822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。

10

20

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25,000pfuの密度でプレートングし、複製リフトをColony/Plaque Screen膜(NEN Dupont)上に作成した。このブランクリフトを、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-1cDNA(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pBluescript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-1cDNA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。

30

40

AraPT1Proは、1995年12月15日にpWDC-11(NRRL#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-1cDNAの完全長cDNAをEcoRI-XhoI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

50

化した(1995年6月8日に出版され、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・ツメファシエンズのtmI遺伝子の完全なProtox-1cDNA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AraPTLPro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でクローン化した。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。変異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。

実施例26. 天然Protox-1プロモーター/変異天然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-1cDNA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ATING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壌に移植し、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、AraPTLPro/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。

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-1cDNA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、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。

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	フルチアセトーメチル	++	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 1 0 倍以下

+ w t より許容性が 1 0 倍以上

++ w t より許容性が 1 0 0 倍以上

+++ w t より許容性が 1 0 0 0 倍以上

40

実施例 2 8 . トウモロコシ P r o t o x - 1 プロモーター配列の単離

S t r a t a g e n e 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 1 7 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 2 5 0 , 0 0 0 p f u を 1 5 c m 平板当たり 5 0 , 0 0 0 個ファージの密度でプレーティングし、C o l o n y / P l a q u e スクリーン膜 (N E N D u p o n t) 上に複製リフトを作成した。このプラークリフトを、ランダムプライミング法 (ライフ・テクノロジーズ) により 3 2 P - d C T P で標識したトウモロコシ P r o t o x - 1 c D N A (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、C h u r c h およびギルバート, P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 1 : 1 9 9 1 ~ 1 9 9 5 (1 9 8 4 年) の記載と同様に 6 5 とした。W i z a r d L a m b d a P r e p s

50

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クローン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3.5 kb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 (NRRL#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ンから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ン化してprotoxプロモーター/改変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-1と命名した。

20

トウモロコシゲノムクローン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。

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

30

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2 µl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ったが、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ブ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、クローン化トウモロコシ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FixII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300,000 pfuのライブラリーをテンサイprotox-1cDNA配列(配列番号: 17)上にブ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pBluescript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プロモーターの後ろに改変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改変テンサイ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への融合体を作成された。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/改変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/改変テンサイ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によって改変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clpP 6遺伝子3'非翻訳配列と融合したタバコ色素体clpP遺伝子プロモーターおよび天然clpP 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clpP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clpP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Pclp__P1a:5'-g c g g a a t t c a t a c t t a t t t a t c a t t a g a a a g -3'(配列番号：27)；下線部はEcoRI制限部位)と、翻訳開始点に導入NcoI制限部位を組み込むclpP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Pclp__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/Roché、ニュージャージー州ブランチバーク)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分間後に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74700~7450

10

20

30

40

50

5に相当するc l p P遺伝子の5'非翻訳領域を含む213塩基対の増幅産物(Shinozaki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 England 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'GCGTCTCTAGATCAACCGAAATTC AATTAAAGG-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rps16P__1b(5'CGCAAGCTTTC AATTGGAAGCAATGATAA-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(Shinozaki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 l 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

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 l p Pプロモーター断片、157塩基対のXbaI/HindIII rps16 3'UTR断片およびクロニングベクターpGEM3Zf(-)(Promega、ウイ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。

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 l p P遺伝子プロモーターとタバコ色素体psbA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 l 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Pc l p__P1a(配列番号:27)と、C l p P5'UTRの位置-11に導入XbaI制限部位を組み込むc l 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Pc l p__P1b:5'-g c g t c t a g a a a g a a c t a a a t a c t a t a t t t c a c -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 l 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 England Biolabs)でほぼ満たし、断片をEcoRI消化した。これを、タバコ色素体psbA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

ゴヌクレオチド minpsb__U (トップストランド: 5' - g g g a g t c c c t g a t g a t t a a a t a a a c c a a g a t t t t a c - 3' (配列番号: 32)) および minpsb__L (ボトムストランド: 5' - c a t g g t a a a a t c t t g g t t t a t t t a a t c a t c a g g g a c t c c c - 3' (配列番号: 33)) 下線部は NcoI 制限部位 5' オーバーハング))、上記の NcoI / XbaI GUS リポーター遺伝子断片、上記の XbaI / HindIII rps16 3' UTR 断片、および上記の EcoRI / HindIII 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 EcoRI および HindIII で消化し、得られた生じる 7287 塩基対断片を pPH139 の 2251 塩基対 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 pPH144 を構築した。

10

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 Prot ox - 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 clpP 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ボルフィリノーゲン 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 NotI インサートを保有するプラスミド AraC - 2Met 由来の Mini prep DNA 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 NcoI 制限部位および新しい開始コドン ATG (プライマー APRTXP1a: 5' - G G G A C C A T G G A T T G T G T G A T T G T C G G C G G A G G - 3' (配列番号: 34)) ; 下線部は NcoI 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 APRTXP1b: 5' - C T C C G C T C T C C A G C T T A G T G A T A C - 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 NcoI および SfuI 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 SfuI / NotI 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 NcoI / NotI 断片にライゲートしてプラスミド pPH141 を構築した。pPH141 を NcoI および SspI 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 HindIII で消化し、これらを pPH140 の 7436 塩基対の NcoI / HindIII 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 clpP 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。

20

30

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 Prot ox - 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 clpP 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

40

pPH141 を NcoI および SspI 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 HindIII で消化し、これらを pPH144 の 7465 塩基対の NcoI / HindIII 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 clpP 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 Biolistic 形質転換

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1μmのタングステン粒子(M10、Biorad、カリフォルニア州ヘラクレス)でボンバードした。ボ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。ボンバードから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ン化してカルスを形成させ、二次苗条を単離、サブクローン化した。標準的技術のサザンブロット法(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ン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: homoplasmicity)を評価した。BamHI/EcoRI消化した全細胞DNA(Mettler, I. J. (1987年) Plant 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³²P-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(Homoplasmic)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)ハイボセティカル: 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 TGCGATTTC	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 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	20
Asn Val Tyr Lys Pro Leu Arg Leu Arg Cys Ser Val Ala Gly Gly Pro			
25 30 35 40			
ACC GTC GGA TCT TCA AAA ATC GAA GGC GGA GGA GGC ACC ACC ATC ACG		198	
Thr Val Gly Ser Ser Lys Ile Glu Gly Gly Gly Gly Thr Thr Ile Thr			
45 50 55			30
ACG GAT TGT GTG ATT GTC GGC GGA GGT ATT AGT GGT CTT TGC ATC GCT		246	
Thr Asp Cys Val Ile Val Gly Gly Gly Ile Ser Gly Leu Cys Ile Ala			
60 65 70			
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 GGA 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
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
TTG GGA GAT CCT ACT GCG CCA AGG TTT GTG TTG TGG AAT GGG AAA TTG	486	10
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
AGT ATT GGT GGG AAG ATT AGA GCT GGT TTT GGT GCA CTT GGC ATT CGA	582	20
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
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
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		
365 370 375		40
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 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 ACATTAAATC TCCCAGCTTG CGTGAGTTTT ATTAAATATT 1691

Lys

TTGAGATATC CAAAAAAAAA AAAAAAAAA 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

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

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

20

30

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	
305 310 315 320	40
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
Ala Ala Asn Ala Leu Ser Lys Leu Tyr Tyr Pro Pro Val Ala Ala Val	350
355	360
Ser Ile Ser Tyr Pro Lys Glu Ala Ile Arg Thr Glu Cys Leu Ile Asp	365
370	375
Gly Glu Leu Lys Gly Phe Gly Gln Leu His Pro Arg Thr Gln Gly Val	380
385	390
Glu Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Ser Ser Ser Leu Phe Pro Asn Arg Ala	395
405	410
Pro Pro Gly Arg Ile Leu Leu Leu Asn Tyr Ile Gly Gly Ser Thr Asn	415
420	425
Thr Gly Ile Leu Ser Lys Ser Glu Gly Glu Leu Val Glu Ala Val Asp	430
435	440
Arg Asp Leu Arg Lys Met Leu Ile Lys Pro Asn Ser Thr Asp Pro Leu	445
450	455
Lys Leu Gly Val Arg Val Trp Pro Gln Ala Ile Pro Gln Phe Leu Val	460
465	470
Gly His Phe Asp Ile Leu Asp Thr Ala Lys Ser Ser Leu Thr Ser Ser	475
485	490
Gly Tyr Glu Gly Leu Phe Leu Gly Gly Asn Tyr Val Ala Gly Val Ala	495
500	505
Leu Gly Arg Cys Val Glu Gly Ala Tyr Glu Thr Ala Ile Glu Val Asn	510
515	520
Asn Phe Met Ser Arg Tyr Ala Tyr Lys	525
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)ハイホセティカル：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 CTGCTTTCGA CTGGTCAGAG ATTTTGACTC 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

20

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

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 GTA 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		10
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		20
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		30
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		40
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 GTA 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		
270 275 280 285		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		10
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		
GAT 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 Thr Phe Ile Gly Gly		
385 390 395		20
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		30
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		40
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

10

495

500

505

AAGGTTTCGTC CCTTTTATC ACTTACTTTG TAAACTTGTA AAATGCAACA AGCCGCCGTG 1663

CGATTAGCCA ACAACTCAGC AAAACCCAGA TTCTCATAAG GCTCACTAAT TCCAGAATAA 1723

ACTATTTATG TAAAA

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)ハイボセティカル：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		10
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		20
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		30
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		
130 135 140		
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		40
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		

GGG 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 GGT 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		10
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		20
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		
385 390 395 400		
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		30
CAA GCC ATA CCT CAG TTC CTG GTA GGA 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		40
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 TACTTGTTAA TCGTTTATGT TGCATAGATG 1493
 Lys

AGGTGCCTCC GGGGAAAAAA AAGCTTGAAT AGTATTTTTT ATTCTTATTT TGTAATTGC 1553 10
 ATTTCTGTTC TTTTTTCTAT CAGTAATTAG TTATATTTTA GTTCTGTAGG AGATTGTTCT 1613
 GTTCACTGCC CTTCAAAGA AATTTTATTT TTCATTCTTT TATGAGAGCT GTGCTACTTA 1673
 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 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

(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

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

20

30

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

(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)クローン：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 AACCCTAACT 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 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		10
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		20
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		30
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		40
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 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		
305 310 315		40
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 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		
450 455 460		40
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
 ACCCTTCGTT GAACATCCAC CAGAAAGGTA GTCACATGTG TAAGTGGGAA AATGAGGTTA 1865
 AAAACTATTA TGGCGGCCGA AATGTTCCCTT TTTGTTTTCC TCACAAGTGG CCTACGACAC 1925
 TTGATGTTGG AAATACATTT AAATTTGTTG AATTGTTTGA GAACACATGC GTGACGTGTA 1985
 ATATTTGCCT ATTGTGATTT TAGCAGTAGT CTTGGCCAGA TTATGCTTTA CGCCTTTAAA 2045
 AAAAAAAAAA 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 40
 (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：

10

20

30

40

Met	Leu	Ala	Leu	Thr	Ala	Ser	Ala	Ser	Ser	Ala	Ser	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	
		180					185					190				40
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
His Ala Phe Pro Ala Leu Trp Asn Leu Glu Arg Lys Tyr Gly Ser Val	
225	230
Ile Val Gly Ala Ile Leu Ser Lys Leu Ala Ala Lys Gly Asp Pro Val	
245	250
Lys Thr Arg His Asp Ser Ser Gly Lys Arg Arg Asn Arg Arg Val Ser	
260	265
Phe Ser Phe His Gly Gly Met Gln Ser Leu Ile Asn Ala Leu His Asn	
275	280
Glu Val Gly Asp Asp Asn Val Lys Leu Gly Thr Glu Val Leu Ser Leu	
290	295
Ala Cys Thr Phe Asp Gly Val Pro Ala Leu Gly Arg Trp Ser Ile Ser	
305	310
Val Asp Ser Lys Asp Ser Gly Asp Lys Asp Leu Ala Ser Asn Gln Thr	
325	330
Phe Asp Ala Val Ile Met Thr Ala Pro Leu Ser Asn Val Arg Arg Met	
340	345
Lys Phe Thr Lys Gly Gly Ala Pro Val Val Leu Asp Phe Leu Pro Lys	
355	360
Met Asp Tyr Leu Pro Leu Ser Leu Met Val Thr Ala Phe Lys Lys Asp	
370	375
Asp Val Lys Lys Pro Leu Glu Gly Phe Gly Val Leu Ile Pro Tyr Lys	
385	390
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)ハイボセティカル：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 GCC 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 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 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 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		10
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		20
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		30
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		40
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		10
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		20
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		30
GGA AAC TAC GTC GCA 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		40
AAG TGA TGGAAGTAGT GCATCTCTTC ATTTTGTTC ATATACGAGG TGAGGCTAGG	1639	
Lys		
ATCGGTAAAA CATCATGAGA TTCTGTAGTG TTTCTTTAAT TGAAAAACA AATTTTAGTG	1699	
ATGCAATATG TGCTCTTTCC TGTAGTTCGA GCATGTACAT CGGTATGGGA TAAAGTAGAA	1759	
TAAGCTATTC TGCAAAAGCA GTGATTTTTT TTGAAAAAAA AAAAAAAAAA AA	1811	

(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 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

20

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

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

30

115 120 125

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 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	
305 310 315 320	40
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
His Pro Arg Ser Gln Gly Val Glu Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Ser Ser		
385	390	395
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
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
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		
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)ハイボセティカル：NO

10

20

30

40

50

(vi)由来:

(A)生物:大豆

(vii)直接の由来:

(B)クローン: 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 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		30

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 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
GGC 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 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		
310 315 320		40
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 GCT GCA GAT GCA CTT TCA AAG TTT TAT TAC CCT	1161	
Pro Leu Ser Ala 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 AGC TCA TCA CTA	1305	
Arg Ser Gln Gly Val Glu Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Ser 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 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 Gly Asn Tyr
 500 505 510

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

TAGTAGCAGT TTTTGT TTTT GTGGTGGAAT GGGTGATGGG ACTCTCGTGT TCCATTGAAT 1743
 TATAATAATG TGAAAGTTTC TCAAATTCGT TCGATAGGTT TTTGGCGGCT TCTATTGCTG 1803
 ATAATGTAAA ATCCTCTTTA AGTTTGAAAA AAAAAAAAAA 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

10

20

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 Val Gly 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	
210 215 220	40
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
 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
 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 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
 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
 Ile Gly Gly Ala Thr Asn Thr Gly Ile Leu Ser Lys Thr Asp Ser Glu
 435 440 445

10

20

30

40

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)ハイボセティカル : 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
 AGAGGTTTAA TAAAGTTTGG TAATAATGGA CTTTGACTTC AAACCTCGATT CTCATGTAAT 120
 TAATTAATAT TTACATCAAA ATTTGGTCAC TAATATTACC AAATTAATAT ACTAAAATGT 180
 TAATTCCGAA ATAAAACACT AATTCCAAAT AAAGGGTCAT TATGATAAAC ACGTATTGAA 240
 CTTGATAAAG CAAAGCAAAA ATAATGGGTT TCAAGGTTTG GGTATATAT GACAAAAAAA 300
 AAAAAAGGTT TGGTTATATA TCTATTGGGC CTATAACCAT GTTATACAAA TTTGGGCCTA 360
 ACTAAAATAA TAAAATAAAC GTAATGGTCC TTTTATATT TGGGTCAAAC CCAACTCTAA 420
 ACCCAAACCA AAGAAAAAGT ATACGGTACG GTACACAGAC TTATGGTGTG TGTGATTGCA 480
 GGTGAATATT TCTCGTCGTC TTCTCCTTTC TTCTGAAGAA GATTACCCAA TCTGAAAAAA 540
 ACCAAGAAGC TGACAAAATT CCGAATTCTC TGCGATTTC ATG 583

10

(2)配列番号 : 14:

(i)配列の特徴 :

(A)長さ : 3848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..3848

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

(xi)配列の記載 : 配列番号 : 14:

TCGATCTTTC TAGGCTGATC CCCAAATCTT CCTCCGAAGC CCCTGGCGCC TCTGCCCCCTT 60
 GGAGCTGGTG GCCTGAAAGA GCTTTGCTGT TGCCCCGAAG ATTGTGAGGT ATATTGTGAC 120
 CTCTGAGACT GACTTCCTTT GTCGTCACCTT TGAGTGGAGT TATGGATTGA CCTGACGTGC 180
 CTCAGATGGA TTCTTCCTCC GAAGCCCCTG GTCATTTCCG AGAATCTGTA ATCTTATTCC 240
 CTTCTTTGGC GAAAATCTGT CAGCTTGGAT GTACTCATCC ATCTTCTGAA GCAGCTTCTC 300

20

30

CAGAGTTTGT GGAGGCTTCC TGGCGAAATA TTGGGCTGTA GGTCCCTGGAC GAAGACCCTT 360
 GATCATGGCC TCAATGACAA TCTCATTGGG CACCGTAGGC GCTTGTGCCC TCAATCGCAA 420
 GAACCTTCGT ACATATGCCT GAAGGTATTC TTCGTGATCT TGTGTGCATT GGAACAGAGC 480
 CTGAGCTGTG ACCGACTTCG TTTGAAAGCC TTGGAAGCTA GTAACCAACA TGTGCTTAAG 540
 CTTCTGCCAC GACGTGATAG TCCCTGGCCG AAGAGAAGAA TACCATGTTT GGGCTACATT 600
 CCGGACTGCC ATGACGAAGG ACTTCGCCAT GACTACAGTG TTGACCCCAT ACGAAGATAT 660
 AGTTGCTTCG TAGCTCATCA GAAACTGCTT TGGATCTGAG TGCCCATCAT ACATGGGGAG 720
 CTGAGGTGGC TTGTATGATG GGGGCCATGG GGTAGCCTGC AGTTCGCTG CCAAGGGAGA 780
 AGCATCATCA AAAGTAAAGG CATCATGATT AAAATCATCA TACCATCCAT CCTCGTTGAA 840
 TAAGCCTTCT TGACGAAGCT CCCTGTGTTG GGGCCTTCGA TCTTGTTTCA CTTGAACAAG 900
 ATGACGCACT TCTTCAGTGG CTTTCGTCAT CTTTCTTTGG AGATCAGCCA GTCGCACCAT 960
 CTTCTCCTTC TTTCTTTGTA CTTGTTGATG GATGATCTCC ATGTCCCTGA TCTCTTGGTC 1020
 CAACTCCTCC TCTTGGAGTG TCAGACTGGT GGCTTTCTC TTCTGGCTTC GAGCCTCTCG 1080
 AAGAGAAAGA GTTTCTTGAT TTGGGTCCAG CGGCTGCAGT GCAGTGGTCC CTGGTGCTGA 1140
 AGCTTTCTTC GGTGGCATGA CAAAGGTCAG TGCCTGCCGA AGGTGGTCGA AAAGGGTTCA 1200
 CTAGAGGTGG GAGCCAATGT TGGGGACTTC TCAAGTGCTA TGAGTTAAGA ACAAGGCAAC 1260
 AAAAAATGTT AAATATTAAT AGCTTTCATC TTTCGAAGCA TTATTTCCCT TTGGGTATAA 1320
 TGATCTTCAG ACGAAAGAGT CCTTCATCAT TGCGATATAT GTTAATAGAA GGAGGAGCAT 1380
 ATGAAATGTA AGAGACAACA TGAACAATCG TGTAGCATTG TTAATTCATC ATCATTTTAT 1440
 TATTATGGAA AAATAGAAAC AATATTGAAT TACAAATGTA CCTTTGGCTT GACAGAAGAT 1500
 AAAAGTACAA GCTTGACGCA CGAGCAAGTA CAAGTCAGTG TGAACAGTAC GGGGGTACTG 1560
 TTCATCTATT TATAGGCACA GGACACAGCC TGTGAGAAAT TACAGTCATG CCCTTTACAT 1620
 TTACTATTGA CTTATAGAAA AATCTATGAG GACTGGATAG CCTTTTCCCC TTTAAGTCGG 1680
 TGCCTTTTTT CGCGATTAAG CCGAATCTCC CTTGCGCATA GCTTCGGAGC ATCGGCAACC 1740
 TTCGTCACGA TCATGCCCTT CTCATTGTGT ATGCTTTTAA TCCTGAATTC GAAGGTACCT 1800
 GTCCATAAAC CATACTTGGA AGACATTGTT AAATTATGTT TTTGAGGACC TTCCGAGGAC 1860
 GAAGGCCCCC AACAGTCGTG TTTTGTAGGA CCTTCGGAAG ATGAAGCCCC CCAACAAGAC 1920

10

20

30

40

CTATCCATAA AACCAACCTA TCCACAAAAC CGACCCCAT CACCCTTCAT TTGCCTCACC 1980
AACAAACCCTA ATTAGGTTGT TGGTTTAAAT TTTTtagggT CAATTTGGTC ATCACCATCC 2040
ACTGTCACTC CACAAACTCA ATATCAATAA ACAGACTCAA TCACCCAAAC TGACCATACC 2100
CATAAAACCG CCCACCCCTT CTAGCGCCTC GCCAGAAACC AGAAACCCTG ATTCAGAGTT 2160
CAAACCTAAA ACGACCATAA CTTTCACCTT GGAACCTGAA TCAGGTCCAT TTTTTTCCAA 2220
ATCACACAAA ATTAAATTTT GCATCCGATA ATCAAGCCAT CTCTTCACTA TGGTTTTAAG 2280
TGTTGCTCAC ACTAGTGTAT TTATGGACTA ATCACCTGTG TATCTCATAC AATAACATAT 2340
CAGTACATCT AAGTTGTTAC TCAATTACCA AAACCGAATT ATAGCCTTCG AAAAAGGTTA 2400
TCGACTAGTC ACTCAATTAC CAAAACATAA CTTTAGACTT TCATGTATGA CATCCAACAT 2460
GACACTGTAC TGGACTAAAC CACCTTTCAA GCTACACAAG GAGCAAAAAT AACTAATTTT 2520
CGTAGTTGTA GGAGCTAAAG TATATGTCCA CAACAATAGT TAAGGGAAGC CCCCAAGGAC 2580
TTAAAAGTCC TTTTACCTCT TGAAACTTTT GTCGTGGTCT ACTTTTTCAC TTAAACTTC 2640
AAAATTTGAC ATTTTATCAC CCCTTAACTC TTAAAACCAT TTAAATTACA TTCTTACTAG 2700
ATTATAGATG ATTTTGTGTG GAAAAGTTTT TAAGACATGT TTACACATTG ATTAAAATCA 2760
TTTGTTC AAT TTCTAGAGT TAAATCTAAT CTTATTAAAA CTATTAGAGA TACTTTCACG 2820
AGCTCTAAAT ATTTTATTTT TTTCATTATG GAATTTTGTG AGAATTCTTA TAGACCTTTT 2880
TTTGTGGTTT AAAAGCCTTG CCATGTTTTT AACAAGTTTT TTTTCTATTT TTTGAAATTT 2940
TCTTGGAAC CACTTCTAAC CCGGTAGAAG ATTTATTTTG CTACACTTAT ATCTACAACA 3000
AAATCAACTT ATGAAATTGT CTTGGAAACT ACCTCTAACC CGGTAGAATG AATTTGAATG 3060
AAAATTAAAC CAACTTACGG AATCGCCCAA CATATGTCCA TTAAAGTGGA TATGGATACA 3120
TATGAAGAAG CCCTAGAGAT AATCTAAATG GTTTCAGAAT TGAGGGTTAT TTTTGAAGT 3180
TTGATGGGAA GATAAGACCA TAACGGTAGT TCACAGAGAT AAAAGGGTTA TTTTTTTCAG 3240
AAATATTTGT GCTGCAATTG ATCCTGTGCC TCAAATTCAG CCTGCAACCA AGGCCAGGTT 3300
CTAGAGCGAA CAAGGCCAC GTCACCCGTG GCCCGTCAGG CGAAGCAGGT CTTGTGCAGA 3360
CTTTGAGAGG GATTGGATAT CAACGGAACC AATCAGGCAC GGCAATGCGA TTCCCAGCCC 3420
ACCTGTAACG TTCCAGTGGG CCATCCTTAA CTCCAAGCCC AACGGCCCTA CCCCATCTCG 3480
TCGTGTCATC CACTCCGCCG CACAGGCGCT CAGCTCCGCA ACGCCGCCGG AAATGGTCGC 3540

10

20

30

40

CGCCACAGCC ACCGCCATGG CCACCGCTGC ATCGCCGCTA CTCAACGGGA CCCGAATACC 3600
 TCGCGGGCTC CGCCATCGAG GACTCAGCGT GCGCTGCGCT GCTGTGGCGG GCGGCGCGGC 3660
 CGAGGCACCG GCATCCACCG GCGCGCGGCT GTCCGCGGAC TCGGTTGTGG TGGGCGGAGG 3720
 CATCAGTGGC CTCTGCACCG CGCAGGCGCT GGCCACGCGG CACGGCGTCG GGGACGTGCT 3780
 TGTACGGAG GCCCGCGCCC GCGCGGCGG CAACATTACC ACCGTCGAGC GCGCGGAGGA 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)ハイボセティカル : NO

(iv)アンチセンス : NO

(vi)由来 :

(A)生物 : *Gossypium hirsutum* (ワタ)

(vii)直接の由来 :

(B)クローン : 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

CGTTCCTCGC CCTCCGTTTC CCCTTTCTCC ATACCCCACC ACCAGCATCC GCGCGGCTTT 120

20

30

CGTAAACCTT TCAAGCTCCG ATGCTCCCTC GCCGAGGGTC CCACGATTTC CTCATCTAAA 180
 ATCGACGGGG GAGAATCATC CATCGCGGAT TGGTCATCG TTGGAGGTGG TATCAGTGGA 240
 CTTTGCATTG CTCAAGCTCT CGCCACCAAG CACCGTGACG TCGCTTCCAA TGTGATTGTG 300
 ACGGAGGCCA GAGACCGTGT TGGTGGCAAC ATCACTACCG TTGAGAGAGA TGGATATCTG 360
 TGGGAAGAAG GCCCCAACAG TTTTCAGCCC TCCGATCCTA TTCTAACCAT GGCCGTGGAT 420
 AGTGGATTGA AGGACGATTT GGTTTTAGGT GACCCTAATG CACCGCGATT TGTACTATGG 480
 GAGGGAAAAC TAAGGCCTGT GCCCTCCAAG CCAACCGACT TGCCGTTTTT TGATTTGATG 540
 AGCATTGCTG GAAAACCTAG GGCTGGGTTT GGGGCTATTG GCATTGGGCC TCCCCCTCCG 600
 GGTATGAAG AATCGGTGGA GGAGTTTGTG CGCCGTAATC TTGGTGCTGA GGTTTTTGAA 660
 CGCTTTATTG AACCATTTTG TTCAGGTGTT TATGCAGGGG ATCCTTCAA ATTAAGCATG 720
 AAAGCAGCAT TTGGAAGAGT ATGGAAGCTA GAAGAGATTG GTGGCAGCAT CATTGGTGGC 780
 ACTTTCAAGA CAATCCAGGA GAGAAATAAG ACACCTAAGC CACCCAGAGA CCCGCGTCTG 840
 CCAAACCGA AGGGCCAAAC AGTTGGATCT TTTAGGAAGG GACTTACCAT GCTGCCTGAG 900
 GCAATTGCTA ACAGTTTGGG TAGCAATGTA AAATTATCTT GGAAGCTTTC CAGTATTACC 960
 AAATTGGGCA ATGGAGGGTA TAACTTGACA TTTGAAACAC CTGAAGGAAT GGTATCTCTT 1020
 CAGAGTAGAA GTGTTGTAAT GACCATTCCA TCCCATGTTG CCAGTAACTT GTTGCATCCT 1080
 CTCTCGGCTG CTGCTGCAGA TGCATTATCC CAATTTTATT ATCCTCCAGT TGCATCAGTC 1140
 ACAGTCTCCT ATCCAAAAGA AGCCATTCTA AAAGAATGTT TGATTGATGG TGAACCTAAG 1200
 GGGTTTGGCC AGTTGCACCC ACGCAGCCAA GGAATTGAAA CTTTAGGGAC GATATACAGT 1260
 TCATCACTTT TCCCCAATCG AGCTCCATCT GGCAGGGTGT TGCTCTTGAA CTACATAGGA 1320
 GGAGCTACCA ACACTGGAAT TTTGTCCAAG ACTGAAGGGG AACTTGTAAG AGCAGTTGAT 1380
 CGTGATTGTA GAAAAATGCT TATAAATCCT AATGCAAAGG ATCCTCTTGT TTTGGGTGTA 1440
 AGAGTATGGC CAAAAGCCAT TCCACAGTTC TTGGTTGGTC ATTTGGATCT CCTTGATAGT 1500
 GCAAAAATGG CTCTCAGGGA TTCTGGGTTT CATGGACTGT TTCTTGGGGG CAACTATGTA 1560
 TCTGGTGTGG CATTAGGACG GTGTGTGGAA GGTGCTTACG AGGTTGCAGC TGAAGTGAAG 1620
 GAATTCCTGT CACAATATGC ATACAAATAA TATTGAAATT CTTGTCAGGC TGCAAATGTA 1680
 GAAGTCAGTT ATTGGATAGT ATCTCTTTAG CTAAAAAATT GGGTAGGGTT TTTTTGTGA 1740
 GTTCCTTGAC CACTTTTTGG GGTTTTCATT AGAACTTCAT ATTTGTATAT CATGTTGCAA 1800
 TATCAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAA 1826

10

20

30

40

(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 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
Ala Ala Ala Ala Asp Ala Leu Ser Gln Phe Tyr Tyr Pro Pro Val Ala	350
355	360
Ser Val Thr Val Ser Tyr Pro Lys Glu Ala Ile Arg Lys Glu Cys Leu	365
370	375
Ile Asp Gly Glu Leu Lys Gly Phe Gly Gln Leu His Pro Arg Ser Gln	380
385	390
Gly Ile Glu Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Ser Ser Ser Leu Phe Pro Asn	395
405	410
Arg Ala Pro Ser Gly Arg Val Leu Leu Leu Asn Tyr Ile Gly Gly Ala	415
420	425
Thr Asn Thr Gly Ile Leu Ser Lys Thr Glu Gly Glu Leu Val Glu Ala	430
435	440
Val Asp Arg Asp Leu Arg Lys Met Leu Ile Asn Pro Asn Ala Lys Asp	445
450	455
Pro Leu Val Leu Gly Val Arg Val Trp Pro Lys Ala Ile Pro Gln Phe	460
465	470
Leu Val Gly His Leu Asp Leu Leu Asp Ser Ala Lys Met Ala Leu Arg	475
485	490
Asp Ser Gly Phe His Gly Leu Phe Leu Gly Gly Asn Tyr Val Ser Gly	495
500	505
Val Ala Leu Gly Arg Cys Val Glu Gly Ala Tyr Glu Val Ala Ala Glu	510
515	520
Val Lys Glu Phe Leu Ser Gln Tyr Ala Tyr Lys	525
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

10

20

30

40

50

(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：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 AAACCTGCATT CCACAGACAC AGTGCATGCC ATTGCGCAGC 60
AGCGGGCATT ACAGGGGTAA TTGTATCATG TTGTCAATTC CATGTAGTTT AATTGGAAGA 120
CGAGGTTATT ATTCACATAA GAAGAGGAGG ATGAGCATGA GTTGCAGCAC AAGCTCAGGC 180
TCAAAGTCAG CGGTTAAAGA AGCAGGATCA GGATCAGGTG CAGGAGGATT GCTAGACTGC 240
GTAATCGTTG GAGGTGGAAT TAGCGGGCTT TGCATCGCGC AGGCTCTTTG TACAAAACAC 300
TCCTCTTCCT CTTTATCCCC AAATTTTATA 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 ACCTCCCTTT CTTGACCTC ATGACCATTG CGGGCAAGAT TAGGGCTGCT 600
 CTTGGTGCTC TCGGATTTTCG CCCTTCTCCT CCACCTCATG AGGAATCTGT TGAACACTTT 660
 GTGCGTCGTA ATCTCGGAGA TGAGGTCTTT GAACGCTTGA TTGAACCCTT TTGTTTCAGGT 720
 GTGTATGCCG GTGATCCTGC CAAGCTGAGT ATGAAAGCTG CTTTTGGGAA GGTCTGGAAG 780
 TTGGAGCAAA AGGGTGGCAG CATAATTGGT GGCACCTCTCA AAGCTATACA GGAAAGAGGG 840
 AGTAATCCTA AGCCGCCCCG TGACCAGCGC CTCCTTAAAC CAAAGGGTCA GACTGTTGGA 900
 TCCTTTAGAA AGGGACTCGT TATGTTGCCT ACCGCCATTT CTGCTCGACT TGGCAGTAGA 960
 GTGAAACTAT CTTGGACCCT TTCTAGTATC GTAAAGTCAC TCAATGGAGA ATATAGTCTG 1020
 ACTTATGATA CCCAGATGG CTTGGTTTCT GTAAGAACCA AAAGTGTGTG GATGACTGTT 1080
 CCATCATATG TTGCAAGTAG GCTTCTTCGT CCACTTTCAG ACTCTGCTGC AGATTCTCTT 1140
 TCAAAATTTT ACTATCCACC AGTTGCAGCA GTGTCACTTT CCTATCCTAA AGAAGCGATC 1200
 AGATCAGAAT GCTTGATTAA TGGTGAACCT CAAGGTTTCG GGCAACTACA TCCCCGCAGT 1260
 CAGGGTGTGG AAACCTTGGG AACAATTTAT AGTTCTCTC TTTTCCCTGG TCGAGCACCA 1320
 CCTGGTAGGA TCTTGATCTT GAGCTACATC GGAGGTGCTA AAAATCCTGG CATATTAAAC 1380
 AAGTCGAAAG ATGAACTTGC CAAGACAGTT GACAAGGACC TGAGAAGAAT GCTTATAAAT 1440
 CCTGATGCAA AACTTCCTCG TGTACTGGGT GTGAGAGTAT GGCCTCAAGC AATACCCCAG 1500
 TTTTCTATTG GGCACTTTGA TCTGCTCGAT GCTGCAAAAG CTGCTCTGAC AGATACAGGG 1560
 GTCAAAGGAC TGTTTCTTGG TGGCAACTAT GTTTCAGGTG TTGCCTTGGG GCGGTGTATA 1620
 GAGGGTGCTT ATGAGTCTGC AGCTGAGGTA GTAGATTTCC TCTCACAGTA CTCAGACAAA 1680
 TAGAGCTTCA GCATCCTGTG TAATTCAACA CAGGCCTTTT TGTATCTGTT GTGCGCCGAT 1740
 GTAGTCTGGT CGTGGTGCTA GGATTGATTA GTTGCTCTGC TGTGTGATCC ACAAGAATTT 1800
 TGATGGAATT TTTCCAGATG TGGGCATTAT ATGTTGCTGT CTTATAAATC CTTAATTTGT 1860
 ACGTTTAGTG AATTACACCG CATTTGATGA CTAAAAAAA AAAAAAAAAA 1910

10

20

30

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	Gly	Ile	Ser	Gly	Leu	Cys	Ile	Ala	Gln	Ala	Leu	
			85					90					95			20
Cys	Thr	Lys	His	Ser	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 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 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
 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
 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
 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

10

20

30

(2)配列番号：19:

(i)配列の特徴:

(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)ハイボセティカル：NO

(iv)アンチセンス：NO

(vi)由来:

(A)生物：Brassica napus (rape)

(vii)直接の由来:

40

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 ATTTATCTCT 60
TCTCCGTCCG CAGCCATTCC TATCGCCATT CTCAAATCCA TTTCCTCGGT CGCGTCCCTA 120
CAAGCCTCTC AACCTCCGTT GCTCCGTATC CGGTGGATCC GTCGTCGGCT CTTCTACAAT 180
CGAAGGCGGA GGAGGAGGTA AAACCGTCAC GGC GGACTGC GTGATCGTCG GCGGAGGAAT 240
CAGCGGCCTG TGCATTGCGC AAGCGCTCGT GACGAAGCAC CCAGACGCTG CAAAGAATGT 300
GATGGTGACG GAGGCGAAGG ACCGTGTGGG AGGGAATATC ATCACGCGAG AGGAGCAAGG 360
GTTTCTATGG GAAGAAGGTC CCAATAGCTT TCAGCCGTCT GATCCTATGC TACTATGGT 420
GGTAGATAGT GGT TTGAAAG ATGATCTAGT CTTGGGAGAT CCTACTGCTC CGAGGTTTGT 480
GTTGTGGAAT GGGAAGCTGA GGCCGGTTCC GTCGAAGCTA ACTGACTTGC CTTTCTTTGA 540
CTTGATGAGT ATTGAGGGA AGATTAGAGC TGGGTTTGGT GCCATTGGTA TTCGACCTTC 600
ACCTCCGGGT CGTGAGGAAT CAGTGAAGA GTTTGTAAGG CGTAATCTTG GTGATGAGGT 660
TTTTGAGCGC TTGATTGAAC CCTTTTGCTC AGGTGTTTAT GCGGGAGATC CTGCGAAACT 720
GAGTATGAAA GCAGCTTTTG GGAAGGTTTG GAAGCTAGAG GAGAATGGTG GGAGCATCAT 780
```

10

20

TGGTGGTGCT TTTAAGGCAA TTCAAGCGAA AAATAAAGCT CCCAAGACAA CCCGAGATCC 840
 GCGTCTGCCA AAGCCAAAGG GCCAAACTGT TGGTTCTTTC AGGAAAGGAC TCACAATGCT 900
 GCCAGAGGCA ATCTCCGCAA GGTGGGGTGA CAAGGTGAAA GTTTCTTGGA AGCTCTCAAG 960
 TATCACTAAG CTGGCCAGCG GAGAATATAG CTTAACTTAC GAAACTCCGG AGGGTATAGT 1020
 CACTGTACAG AGCAAAAAGTG TAGTGATGAC TGTGCCATCT CATGTTGCTA GTAGTCTCTT 1080
 GCGCCCTCTC TCTGATTCTG CAGCTGAAGC GCTCTCAAAA CTCTACTATC CGCCAGTTGC 1140
 AGCCGTATCC ATCTCATACG CGAAAGAAGC AATCCGAAGC GAATGCTTAA TAGATGGTGA 1200
 ACTAAAAGGG TTCGGCCAGT TGCATCCACG CACGCAAAAA GTGGAAACTC TTGGAACAAT 1260
 ATACAGTTCA TCGCTCTTTC CCAACCGAGC ACCGCCTGGA AGAGTATTGC TATTGAACTA 1320
 CATCGGTGGA GCTACCAACA CTGGGATCTT ATCAAAGTCG GAAGGTGAGT TAGTGGAAGC 1380
 AGTAGATAGA GACTTGAGGA AGATGCTGAT AAAGCCAAGC TCGACCGATC CACTTGTA CT 1440
 TGGAGTAAAA TTATGGCCTC AAGCCATTCC TCAGTTTCTG ATAGGTCACA TTGATTTGGT 1500
 AGACGCAGCG AAAGCATCGC TCTCGTCATC TGGTCATGAG GGCTTATTCT TGGGTGGAAA 1560
 TTACGTTGCC GGTGTAGCAT TGGGTCGGTG TGTGGAAGGT GCTTATGAAA CTGCAACCCA 1620
 AGTGAATGAT TTCATGTCAA GGTATGCTTA CAAGTAATGT AACGCAGCAA CGATTTGATA 1680
 CTAAGTAGTA GATTTTGCAG TTTTGACTTT AAGAACA CTG TGTGTTGTGAA AAATTCAAGT 1740
 CTGTGATTGA GTAAATTTAT GTATTATTAC TAAAAAAAAA AAAA 1784

10

20

30

(2) 配列番号 : 20:

(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	30
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	40
Leu Ile Glu Pro Phe Cys Ser Gly Val Tyr Ala Gly Asp Pro Ala Lys	
210 215 220	

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 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

30

(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：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

40

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

(xi)配列の記載：配列番号:21:

CGGGCTTTGA AGGCTGCATT TGGGAAGGTG TGGAGGCTGG AGGATACTGG AGGTAGCATT 60
 ATTGGTGGAA CCATCAAGAC AATCCAGGAG AGGGGGAAAA ACCCCAAACC GCCGAGGGAT 120
 CCCC GCCTTC CAACGCCAAA GGGGCAGACA GTTG CATCTT TCAGGAAGGG TCTGACTATG 180
 CTCCCGGATG CTATTACATC TAGGTTGGGT AGCAAAGTCA AACTTTCATG GAAGTTGACA 240
 AGCATTACAA AGTCAGACAA CAAAGGATAT GCATTAGTGT ATGAAACACC AGAAGGGGTG 300
 GTCTCGGTGC AAGCTAAAAC TGTGT CATG ACCATCCCAT CATATGTTGC TAGTGATATC 360
 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 GAAGGGTGTT ACTTCTGAAC 600
 TACATAGGAG GTTCTACAAA TACAGGGATT GTTTCCAAGA CTGAAAGTGA GCTGGTAGAA 660
 GCAGTTGACC GTGACCTCAG GAAGATGCTG ATAAATCCTA GAGCAGTGGA CCCTTTGGTC 720
 CTTGGCGTCC GGGTATGGCC ACAAGCCATA CCACAGTTCC TCATTGGCCA TCTTGATCAT 780
 CTTGAGGCTG CAAAATCTGC CCTGGGCAAA GGTGGGTATG ATGGATTGTT CCTCGGAGGG 840
 AACTATGTTG CAGGAGTTGC CCTGGGCCGA TCGTTGAAG GTGCATATGA GAGTGCCTCA 900
 CAAATATCTG ACTACTTGAC CAAGTACGCC TACAAGTGAT CAAAGTTGGC CTGCTCCTTT 960
 TGGCACATAG ATGTGAGGCT TCTAGCAGCA AAAATTT CAT GGGCATCTTT TTATCCTGAT 1020
 TCTAATTAGT TAGAATTTAG AATTGTAGAG GAATGTTCCA TTTGCAGTTC ATAATAGTTG 1080
 TTCAGATTTT AGCCATTCAA TTTGTGCAGC CATTTACTAT ATGTAGTATG ATCTTGTAAG 1140
 TACTACTAAG AACAAATCAA TTATATTTTC CTGCAAGTGA CATCTTAATC GTCAGCAAAT 1200
 CCAGTTACTA GTAAAAAAA AAAA 1224

10

20

30

(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

30

40

50

(vii) 直接の由来:

(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 CCTGGTTTTT 120
 GGGGACCCCA ACGCGCCACG GTTCGTGCTG TGGGAGGGGA AGCTGAGGCC CGTGCCATCC 180
 AAGCCCGCCG ACCTCCCGTT CTTGATCTC ATGAGCATCC CTGGCAAGCT CAGGGCCGGT 240
 CTCGGCGCGC TTGGCATCCG CCCGCCTGCT CCAGGCCGCG AGGAGTCAGT GGAGGAGTTT 300
 GTGCGCCGCA ACCTCGGTGC TGAGGTCTTT GAGCGCCTAA TTGAGCCTTT CTGCTCAGGT 360
 GTCTATGCTG GCGATCCTTC CAAGCTCAGT ATGAAGGCTG CATTTGGGAA GGTGTGGCGG 420
 TTAGAAGAAG CTGGAGGTAG TATTATTGGT GGAACCATCA AGACGATTCA GGAGAGGGGC 480
 AAGAATCCAA AACCACCGAG GGATCCCCGC CTTCCGAAGC CAAAAGGGCA GACAGTTGCA 540
 TCTTTCAGGA AGGGTCTTGC CATGCTTCCA AATGCCATCA CATCCAGCTT GGGTAGTAAA 600
 GTCAAATAT CATGGAACT CACGAGCATG ACAAATCAG ATGGCAAGGG GTATGTTTTG 660
 GAGTATGAAA CACCAGAAGG GGTTGTTTTG GTGCAGGCTA AAAGTGTTAT CATGACCATT 720
 CCATCATATG TTGCTAGCGA CATTTTGCGT CCACTTTCAG GTGATGCTGC AGATGTTCTA 780
 TCAAGATTCT ATTATCCACC AGTTGCTGCT GTAACGGTTT CGTATCCAAA GGAAGCAATT 840
 AGAAAAGAAT GCTTAATTGA TGGGAACTC CAGGGTTTTG GCCAGTTGCA TCCACGTAGT 900
 CAAGGAGTTG AGACATTAGG AACAATATAC AGCTCATCAC TCTTTCAAA TCGTGCTCCT 960
 GCTGGTAGGG TGTTACTTCT AACTACATA GGAGGTGCTA CAAACACAGG AATTGTTTCC 1020
 AAGACTGAAA GTGAGCTGGT AGAAGCAGTT GACCGTGACC TCCGAAAAT GCTTATAAAT 1080
 CCTACAGCAG TGGACCCTTT AGTCCTTGGT GTCCGAGTTT GGCCACAAGC CATACTCAG 1140
 TTCCTGGTAG GACATCTTGA TCTTCTGGAG GCCGAAAAT CTGCCCTGGA CCAAGGTGGC 1200
 TATAATGGGC TGTTCCTAGG AGGGAATAT GTTGCAGGAG TTGCCCTGGG CAGATGCATT 1260
 GAGGGCGCAT ATGAGAGTGC CGCGCAAATA TATGACTTCT TGACCAAGTA CGCCTACAAG 1320
 TGATGGAAGA AGTGGAGCGC TGCTTGTTAA TTGTTATGTT GCATAGATGA GGTGAGACCA 1380
 GGAGTAGTAA AAGGCGTCAC GAGTATTTTT CATTCCTATT TTGTAAATTG CACTTCTGTT 1440
 TTTTTTTCCT GTCAGTAATT AGTTAGATTT TAGTTATGTA GGAGATTGTT GTGTTCACTG 1500
 CCCTACAAAA GAATTTTTAT TTTGCATTGC TTTATGAGAG CTGTGCAGAC TTATGTAACG 1560
 TTTTACTGTA AGTATCAACA AAATCAAATA 1590

10

20

30

40

(2)配列番号：24:

(i)配列の特徴:

(A)長さ：440アミノ酸

50

(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

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
 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
 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
 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
 Pro Glu Gly Val Val Leu Val Gln Ala Lys Ser Val Ile Met Thr Ile
 225 230 235 240

10

20

30

40

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
 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
 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
 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
 420 425 430
 Phe Leu Thr Lys Tyr Ala Tyr Lys
 435 440

10

20

30

40

(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 TCATGCGCAG CCATGGAATT 60

GAGATGCTGA ATGGATTTTA 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)ハイボセティカル：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="SalI 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-SalI断片の部分配列)"

(xi)配列の記載：配列番号:26:

GTTCGACCTAC GCACATGCCA CATTCCACAT TCCACGTTAG GAATTGAATT GAATTGAATT 60
ATGATTATGA ATAATGAAGA GACAGAATTA CCGCCATGGT GAGCACCGCG TCGGAAGGCT 120
GGAAGCTATT GGGTCCCTCC TCCCAGATAT AGCCATCGGC CTCCACAGTG ACGATGTTGC 180
CGCCAACTCT GTCTTTGGCC TCTGTCACTA TAAAAATTGG GGATAAAGAG GACTGTTTTG 240
TACAAAGAGC CTGCGCGATG CAAAGCCCGC TAATTCCACC TCCAACGATT ACGCAGTCTA 300
GCAATCCTCC TGCTCCTGAT CCTGATCCTG ATCCTGCTTC TTAAACCGCT GACTTTGAGC 360
CTGAGCTTGT GCTGCAACTC ATGCTCATCC TCCTCTTCTT ATGTGAATAA TAACCTCGTC 420
TTCCAATTAA ACTACATGGA ATTGACAACA TGATACAATT GCCCCTGTAA TGCCCGCTGC 480
TGTGCAATGG CATGCACTGT GTCTGTGGAA TGCAGTTTGA TAACGCCATT GATTTTCATCT 540
CTCTCTCGCT CTCTCGCCCT CCTTATCCTC TATATCCCCT TCTTGCTTGC TCGGGAATTC 600
TAATTAACCT TATATCAAAA TGAAACAACT GTTTCTAGTT AAAAAGTTTT TTATAAATAG 660
TACTCTAAAT AAACGATTAC ATGTATCTTC TAACCATACT TGTTTGGTGG AGGTGGTGCG 720
TAACCGGTAA CTTACCTTTG TAACTCACCT CAATACCTAC TTATGCTTAA GGATACGGAT 780
TCTTTTAAAC TCTCAGGCAT TGACCTATGT AGCTGGACTG ACTAACATCT GAATTTGTTT 840

10

20

CTCTGGTTAT ATATGCAATT TTAAGTGAAT CGAAATTTCT CTGGATGCTA AAAATGTCTT 900
TAACGGGGTT TATGAGGACT AAATTATCTC CTTCAATGAG GAGGTTCTTG ATTTGCATGT 960
ATGAGCGTGA AAATGCATTG TTAACGGCTA TAGATTCAGT AATAAGTGGT GTTAAAAGTA 1020
AAAAGTACTT GGAAAAATGA TTAAGCGACT TAATTTTTTT TATTTGTTTG AAAGTTGCCT 1080
TTTCTTGGCT ATCTTAACAT GTATTTATCA AACACCTTTT TTAATTACAT GGAAATCGAA 1140
AAGTTTGAAA AAAAAAATC ATACTACTA ACCGCCTTAA AATATAAGCT GAAGATGTCT 1200
CACTAACAGA GTGCATGTGA AGCACCCCCA AAGCAATTAT AACACAACAT CTCCGCCTCT 1260
TCAAAATTCC TACAAATACA TCTAATAAAC TTGTTGAAAC AATCAAAGTA ACATGGTGTG 1320
TCAATTGCGG ATGCTTCTCA TTCCAGACTT TATATAGTGA TTTTGTTTAA TCCATAGTCA 1380
ACAACTCACA TAATGGTACC CAAAGAATAC CCAAATTTTT TGCTCAAAT CCCTAAACAT 1440
TGTAAGCTGTG TAAGTTTGAC TAACATGTTT CAGCATGCTT GCCATGGGTG AATAAGACTT 1500
AGGGGCAAAT CTCGAATCCA CAAACTCATC ATTGGTTTTA GTTTGTCTCC AACGTAAAAC 1560
AATGATGTGA AATACACCAC AAAATTCATA CAATCTCGTT ATCTTGAAG CTTGAAAGCC 1620
ATAATCTTGT TTGTACTTTC ACTACGTCGA GAAGACAAAA TTACAACTAA GAAGAGGTCA 1680
TTGCTCAGTG TCGTGTACTA CTTATCTTTC AACTCATAGA AACAAGCAA CCAATTGTCA 1740
CCTATATACT GTACTTCTCC ATCATATACT TCCAACTTGC CTTAACTCA ATACTATCAT 1800
AAAAACCACA AAGACATTTT ATAAAAGCAT AATAAAAATG TGTCATCACT CTTCAAAGTT 1860
CCAAAGTGAT TCTAACTACA TTCTAATGAA AATGACATTG GTGTAAACCT AATCCTTGTG 1920
TTATAAAACA CCTACATACC ACGATTATGT TAGAAATATA TTTATGAATG CAGTACCTAC 1980
ATAAAGCCAT TAAATAACCA GTTTTATGTT ATTTTCGTGAC CAACATAGTT CCTAAAGATT 2040
ACGAAGTAAT TTATAGTCAT TTTGTGGCCA CTTAATTCAT TTAATACCCA GTATATTTAT 2100
AAGTTACCAG CTTAAGTAGT TTTGTGACCA TCTCTACATA CTTCCCTCCG TCCATAATAA 2160
GGGGGCGTTT GGTGCAACG GGGTAAAGG AATGGAATCA AGAAAGGGAG AGGAGAGGAA 2220
AGGAAAAGAA AACCTTAGA TTTAGAGTGG TGTTTGTTA AGATAATGTT AATTCTCTTT 2280
CTTCCTCTTT CTTACCTTC TTECACCTA GCACCACCAC TCCTCCCTCT GTTACTATTC 2340
TCCACGCCGC CTCTCCCTAC CCCAGTAACA CCACCTTGTC GGCCCCCGG TCTTCCCTT 2400
CCCGCGACGG TTCCCCCTC CCCTGCGCG TCACGTCGTC CCCCTCACCT CCCTGCACCG 2460

10

20

30

40

TCGAGTTATC CCCCTCCCCT GCGCGTCGCG TTCTCCCCTC CCTCACCATC GCGTTCTCCC 2520
 CTCCTCACC GTCGCGTTCT CCCCTCCCTC ACCGTCGCGG TCTCCCCTCC 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)ハイボセティカル：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 TACTTATTTA 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)ハイボセティカル：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 ACTATATTTT 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)ハイボセティカル：NO

(iv)アンチセンス：NO

10

20

30

40

50

(ix)特徴：

(A)NAME/KEY: misc__feature

(B)位置：4..9

(D)他の情報：/note= " NcoI 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

10

(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/HindII
I トップストランドPCRプライマー "

(iii)ハイボセティカル：NO

(iv)アンチセンス：NO

(ix)特徴：

(A)NAME/KEY: misc__feature

(B)位置：4..9

20

(D)他の情報：/note= " XbaI restriction site "

(xi)配列の記載：配列番号:30:

GCGTCTAGAT CAACCGAAAT TCAATTAAGG

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

30

(A)DESCRIPTION: /desc= " Trps16__p1b-プラスミド rps16遺伝子3'非翻訳領域XbaI/HindII
I ボトムストランドPCRプライマー "

(iii)ハイボセティカル：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 ATGATAA

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/NcoI) ATG開始コドン、トップストランドプライマー "

(iii)ハイボセティカル：NO

50

(iv)アンチセンス：NO

(xi)配列の記載：配列番号:32:

GGGAGTCCCT 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

10

(A)DESCRIPTION: /desc= " minpsb__L-プラスミドpsbA遺伝子5'非翻訳領域38nt (blunt/NcoI) ATG開始コドン含有 (ボトムストランドプライマー) "

(iii)ハイボセティカル：NO

(iv)アンチセンス：NO

(xi)配列の記載：配列番号:33:

CATGGTAAAA TCTTGTTTA TTAAATCATC 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

20

(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= " APRTXPla-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)ハイボセティカル：NO

(iv)アンチセンス：NO

(ix)特徴：

(A)NAME/KEY: misc__feature

(B)位置：5..10

30

(D)他の情報：/note= " NcoI restriction site/ATG start codon "

(xi)配列の記載：配列番号:34:

GGGACCATGG ATTGTGTGAT TGTCCGCCGA 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

40

(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)ハイボセティカル：NO

(iv)アンチセンス：NO

(xi)配列の記載：配列番号:35:

CTCCGCTCTC CAGCTTAGTG ATAC

24

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 P 21/02	(2006.01)	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 Q 1/26	(2006.01)	C 1 2 Q 1/26	
G 0 1 N 33/15	(2006.01)	G 0 1 N 33/15	C

(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 ボルラス, サンドラ エル.

アメリカ合衆国, ノースカロライナ 2 7 7 0 7, ダーハム, パイン オーク ドライブ 4 2 2 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 2 7 6 0 6, ラレイ, ヘザー ドライブ 4 0 8

(72)発明者 ボッター, シャロン エル.

アメリカ合衆国, ノースカロライナ 2 7 6 1 3, ラレイ, ウィスパリング ブランチ ロード 3 8 3 7

(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 2 7 7 0 5, ダーハム, モントゴメニー ストリート 3 0 0 3

(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 2 7 7 1 3, ダーハム, スチュアブリッジ ドライブ 3 9 1 6

審査官 中村 正展

(56)参考文献 国際公開第 9 5 / 0 3 4 6 5 9 (WO, A 1)

国際公開第 9 7 / 0 0 4 0 8 9 (WO, A 1)

国際公開第 9 8 / 0 2 9 5 5 4 (WO, A 1)

(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