

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005 年 10 月 27 日 (27.10.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/099441 A1

- (51) 国際特許分類: **A01H 5/00**, C12N 15/09, C12Q 1/02, G01N 33/15, 33/50, 33/52
- (74) 代理人: 山本 秀策, 外(YAMAMOTO, Shusaku et al.); 〒5406015 大阪府大阪市中央区城見1-2-27 クリスタルタワー 15F Osaka (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/004755
- (22) 国際出願日: 2004 年 3 月 31 日 (31.03.2004)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構 (INCORPORATED ADMINISTRATIVE AGENCY NATIONAL AGRICULTURAL AND BIO-ORIENTED RESEARCH ORGANIZATION) [JP/JP]; 〒3058517 茨城県つくば市観音台3-1-1 Ibaraki (JP). 明治製菓株式会社 (MEIJI SEIKA KAISHA, LTD.) [JP/JP]; 〒1048002 東京都中央区京橋二丁目4番16号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 八木 和子 (YAGI, Kazuko) [JP/JP]; 〒9492304 新潟県中頸城郡中郷村二本木1659-20 Niigata (JP). 岩田 道顕 (IWATA, Michiaki) [JP/JP]; 〒2228567 神奈川県横浜市港北区師岡町760番地 明治製菓株式会社生物産業研究所内 Kanagawa (JP). 梅村 賢司 (UMEMURA, Kenji) [JP/JP]; 〒2228567 神奈川県横浜市港北区師岡町760番地 明治製菓株式会社生物産業研究所内 Kanagawa (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF SCREENING AGRICHEMICAL CAPABLE OF INDUCING DISEASE RESISTANCE AND PLANT FOR USE IN THE METHOD

(54) 発明の名称: 病害抵抗性を誘導する農薬のスクリーニング方法およびその方法に使用される植物体

(57) Abstract: A method or system for screening an agrichemical capable of inducing disease resistance in plant organism; and a plant for use in the method. The provided plant is, for example, a plant usable for screening an agrichemical capable of inducing disease resistance, comprising an expression cassette containing a promoter of gene inducing disease resistance in plant organism (a) and a gene coding for a fluorescent protein, operably linked to the promoter (b).

(57) 要約: 植物において病害抵抗性を誘導する農薬をスクリーニングする方法およびシステム、ならびにその方法に使用される植物体が提供される。提供される植物体は、例えば、病害抵抗性を誘導する農薬をスクリーニングするために使用され得る植物体であって、(a) 植物の病害抵抗性誘導遺伝子のプロモーター; および (b) 該プロモーターに作動可能に連結された、蛍光タンパク質をコードする遺伝子を含む、発現カセットを含む植物体である。



WO 2005/099441 A1

明 細 書

病害抵抗性を誘導する農薬のスクリーニング方法および
その方法に使用される植物体

5

技術分野

本発明は、病害抵抗性を誘導する農薬のスクリーニング方法およびスクリーニングのためのシステム、ならびにその方法に使用される植物体に関する。

10

背景技術

15

20

25

植物の病原菌に対する薬剤としては、代表的には、病原菌に直接の殺菌効果を有する薬剤と、病原菌に対して直接の殺菌効果を示さず、植物の病害抵抗性を誘導する薬剤とが挙げられる。植物の病害抵抗性を誘導する薬剤は、病原菌の耐性菌株の出現の頻度が少ないことから有用ではあるが、病原菌に直接の殺菌効果を有する薬剤と比較してその開発が遅れている。わずかに、イネいもち病防除剤であるオリゼメートの作用成分であるプロベナゾール、セレブロシドB、N-シアノメチル-2-クロロ-イソニコチン酸、2, 6-ジクロロ-イソニコチン酸、ベンゾ[1, 2, 3]チアゾール-7-カルボチオ酸 S-メチルエステル、4-メチル-[1, 2, 3]チアゾール-5-カルボン酸(3-クロロ-4-メチル-フェニル)-アミド)、2, 2-ジクロロ-3, 3-ジメチル-シクロプロパンカルボン酸、N-(2-クロロ-ピリジン-4-カルボニル)-ベンゼンスルホンアミドなどが植物の病害抵抗性を誘導する薬剤またはその候補として開発されているのみである。

植物の病害抵抗性を誘導する薬剤の開発が遅れている原因の1つには、そのス

クリーニング方法の開発が遅れている点にある。従って、簡便かつ迅速な植物の病害抵抗性を誘導する薬剤のスクリーニング方法の開発が求められている。

病害抵抗性を誘導する薬剤によって発現が誘導される遺伝子のプロモーターを用いて、候補薬剤をスクリーニングする場合には、適切なプロモーターを選択することが重要である。例えば、プロベナゾールおよびN-シアノメチル-2-クロロイソニコチン酸の両薬剤に応答性の遺伝子プロモーターとしては、PBZ 1 遺伝子のプロモーターが公知である（特開平9-270）。しかし、これら薬剤に応答性のプロモーターを病害抵抗性を誘導する薬剤のスクリーニング方法に用いた例はない。なぜなら、病害抵抗性を誘導する薬剤のスクリーニングにおいては、培養細胞レベルではなく、植物体においてそのプロモーターの応答性を検証する必要があるものの、従来は、簡便に植物体においてプロモーター活性を決定する方法が確立されていなかったからである。

現在まで、植物体での薬剤のスクリーニング方法は確立されておらず、従来公知のプロモーターがどの程度広範な刺激に対して応答性であるかについて、未だ検証されておらず、そのため、従来公知であるプロモーターが、簡便かつ迅速な植物の病害抵抗性を誘導する薬剤のスクリーニングに適用できるか否かは、不明である。従って、病害抵抗性を誘導する薬剤によって発現が誘導される遺伝子のプロモーターを用いて、種々の薬剤に対する応答性を検証することにより、改善された薬剤スクリーニング方法を確立することが必要である。

発 明 の 要 旨

植物において病害抵抗性を誘導する農薬をスクリーニングする方法およびシステム、ならびにその方法に使用される植物体を提供することが、本発明の課題である。

本発明者らは、a) 植物の病害抵抗性誘導遺伝子の天然のプロモーター；およ

びb) 該プロモーターに作動可能に連結された蛍光タンパク質をコードする遺伝子、を含む発現カセットを含むベクターによって形質転換された植物体を得て、その植物体を候補薬剤によって処理し、その蛍光タンパク質の発現量を指標にして、候補薬剤にスクリーニングを行なう方法を開発し、本発明を完成した。

5 従って、本発明は、以下を提供する。

1. 病害抵抗性を誘導する農薬をスクリーニングするために使用され得る植物体であって、

a) 植物の病害抵抗性誘導遺伝子のプロモーター；および

10 b) 該プロモーターに作動可能に連結された、蛍光タンパク質をコードする遺伝子を含む、発現カセットを含む植物体。

2. 前記プロモーターが、プロベナゾールにより発現誘導され得るプロモーターである、項目1に記載の植物体。

15 3. 前記プロモーターが、配列番号1に記載されるP B Z 1 遺伝子プロモーター配列を有する、項目2に記載の植物体。

4. 前記プロモーターが、配列番号1に記載されるP B Z 1 遺伝子プロモーター配列中の、プロベナゾールにより発現誘導され得る配列からなるフラグメントを有する、項目2に記載の植物体。

20 5. 前記プロモーターが、配列番号4に記載されるD 9 遺伝子プロモーター配列を有する、項目2に記載の植物体。

6. 前記プロモーターが、配列番号4に記載されるD 9 遺伝子プロモーター配列中の、プロベナゾールにより発現誘導され得る配列からなるフラグメントを有する、項目2に記載の植物体。

25 7. 前記プロモーターが、配列番号6に記載されるR a c 1 遺伝子プロモーター配列を有する、項目2に記載の植物体。

8. 前記プロモーターが、配列番号6に記載されるR a c 1 遺伝子プロモーター

一配列中の、プロベナゾールにより発現誘導され得る配列からなるフラグメントを有する、項目 2 に記載の植物体。

9. 病害抵抗性を誘導する農薬をスクリーニングするために使用され得る植物体であって、

5 a) 配列番号 1 に記載される P B Z 1 遺伝子プロモーター配列またはそのフラグメントを有する第 1 のプロモーター、

 b) 該第 1 のプロモーターに作動可能に連結された、第 1 の蛍光タンパク質をコードする遺伝子、

10 c) 配列番号 4 に記載される D 9 遺伝子プロモーター配列またはそのフラグメントを有する第 1 のプロモーター、ならびに

 d) 該第 2 のプロモーターに作動可能に連結された、第 2 の蛍光タンパク質をコードする遺伝子、

を含む、発現カセットを含む植物体。

15 10. 前記蛍光タンパク質をコードする遺伝子が、緑色蛍光タンパク質、黄色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質、キンドリングレッド蛍光タンパク質、カエデタンパク質からなる群から選択される蛍光タンパク質をコードする遺伝子である、項目 1 に記載の植物体。

 11. 前記蛍光タンパク質をコードする遺伝子が、緑色蛍光タンパク質、をコードする遺伝子である、項目 1 に記載の植物体。

20 12. 単子葉植物である、項目 1 に記載の植物体。

 13. イネである、項目 1 に記載の植物体。

 14. 病害抵抗性を誘導する農薬をスクリーニングするために使用され得るシステムであって、

 a) 項目 3 または 4 に記載の植物体、および

25 b) 項目 5 または 6 に記載の植物体、

を含む、システム。

1 5. 病害抵抗性を誘導する農薬をスクリーニングするために使用され得るシステムであって、

- a) 項目 3 または 4 に記載の植物体、
- b) 項目 5 または 6 に記載の植物体、および
- 5 c) 発光ダイオードを光源として使用する蛍光測定法を含む、システム。

1 6. 病害抵抗性を誘導する農薬をスクリーニングするために使用され得るシステムであって、

- a) 項目 3 または 4 に記載の植物体、
 - 10 b) 項目 5 または 6 に記載の植物体、および
 - c) 項目 7 または 8 に記載の植物体、
- を含む、システム。

1 7. 病害抵抗性を誘導する農薬をスクリーニングするために使用され得るシステムであって、

- 15 a) 項目 3 または 4 に記載の植物体、
 - b) 項目 5 または 6 に記載の植物体、
 - c) 項目 7 または 8 に記載の植物体、および
 - d) 発光ダイオードを光源として使用する蛍光測定法
- を含む、システム。

20 1 8. 病害抵抗性を誘導する農薬をスクリーニングするために使用され得るシステムであって、

- a) 項目 9 に記載の植物体、
- を含む、システム。

25 1 9. 病害抵抗性を誘導する農薬をスクリーニングするために使用され得るシステムであって、

- a) 項目 9 に記載の植物体、および

b) 発光ダイオードを光源として使用する蛍光測定法を含む、システム。

20. 病害抵抗性を誘導する農薬をスクリーニングするために使用され得るシステムであって、

5 a) 項目9に記載の植物体、および

b) 項目7または8に記載の植物体、を含む、システム。

21. 病害抵抗性を誘導する農薬をスクリーニングするために使用され得るシステムであって、

10 a) 項目9に記載の植物体、

b) 項目7または8に記載の植物体、および

c) 発光ダイオードを光源として使用する蛍光測定法を含む、システム。

22. 病害抵抗性を誘導する農薬をスクリーニングする方法であって、該方法は、以下の工程：

(i) 配列番号1に記載されるPBZ1遺伝子プロモーター配列またはそのフラグメントを有する第1のプロモーター、および該第1のプロモーターに作動可能に連結された第1の蛍光タンパク質をコードする遺伝子を含む発現カセットを含む第1の植物体を提供する工程；

20 (ii) 配列番号4に記載されるD9遺伝子プロモーター配列またはそのフラグメントを有する第2のプロモーター、および該第2のプロモーターに作動可能に連結された第2の蛍光タンパク質をコードする遺伝子を含む発現カセットを含む第2の植物体を提供する工程；

(iii) 該植物体と候補薬物を接触させる工程；ならびに

25 (iv) 該第1および第2の植物体において該第1および第2の蛍光タンパク質の発現を測定する工程；

を包含し、

ここで該第 1 および第 2 の蛍光タンパク質の発現を測定する工程において第 1 および第 2 の蛍光タンパク質の両方の発現が誘導された場合、候補薬物は植物において病害抵抗性を誘導する農薬であり得る、方法。

5 2 3. 前記第 1 および第 2 の蛍光タンパク質をコードする遺伝子が、緑色蛍光タンパク質、黄色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質、キンドリングレッド蛍光タンパク質、カエデタンパク質からなる群から選択される蛍光タンパク質をコードする遺伝子である、項目 2 2 に記載の方法。

10 2 4. 前記第 1 または第 2 の蛍光タンパク質をコードする遺伝子が、緑色蛍光タンパク質をコードする遺伝子である、項目 2 3 に記載の方法。

2 5. 前記植物細胞が単子葉植物細胞である、項目 2 2 に記載の方法。

2 6. 前記植物細胞がイネ細胞である、項目 2 2 に記載の方法。

2 7. 前記蛍光タンパク質の発現を測定する工程が、発光ダイオードを光源として使用する蛍光測定法である、項目 2 2 に記載の方法。

15 2 8. 病害抵抗性を誘導する農薬をスクリーニングする方法であって、該方法は、以下の工程：

(i) 第 1 および第 2 の発現カセットを含む植物体を提供する工程であって、ここで、

20 該第 1 の発現カセットは、配列番号 1 に記載される P B Z 1 遺伝子プロモーター配列またはそのフラグメントを有する第 1 のプロモーター、および該第 1 のプロモーターに作動可能に連結された第 1 の蛍光タンパク質をコードする遺伝子を含み、そして、

25 該第 2 の発現カセットは、配列番号 4 に記載される D 9 遺伝子プロモーター配列またはそのフラグメントを有する第 2 のプロモーター、および該第 2 のプロモーターに作動可能に連結された第 2 の蛍光タンパク質をコードする遺伝子を含む、工程；

(i i) 該植物体と候補薬物を接触させる工程；ならびに

(i i i) 該植物体において該第1および第2の蛍光タンパク質の発現を測定する工程；
を包含し、

5 ここで該第1および第2の蛍光タンパク質の発現を測定する工程において第1および第2の蛍光タンパク質の両方の発現が誘導された場合、候補薬物は植物において病害抵抗性を誘導する農薬であり得る、方法。

29. 前記第1および第2の蛍光タンパク質をコードする遺伝子が、緑色蛍光タンパク質、黄色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質、キンドリングレッド蛍
10 光タンパク質、カエデタンパク質からなる群から選択される蛍光タンパク質をコードする遺伝子である、項目28に記載の方法。

30. 前記第1または第2の蛍光タンパク質をコードする遺伝子が、緑色蛍光タンパク質をコードする遺伝子である、項目29に記載の方法。

31. 前記植物細胞が単子葉植物細胞である、項目28に記載の方法。

15 32. 前記植物細胞がイネ細胞である、項目28に記載の方法。

33. 前記蛍光タンパク質の発現を測定する工程が、発光ダイオードを光源として使用する蛍光測定法である、項目28に記載の方法。

34. 病害抵抗性を誘導する農薬をスクリーニングする方法であって、該方法は、以下の工程：

20 (i) 発現カセットを含む植物体を提供する工程であって、ここで、該発現カセットは、(a) 配列番号1に記載されるPBZ1遺伝子プロモーター配列またはそのフラグメントを有する第1のプロモーター、および該第1のプロモーターに作動可能に連結された第1の蛍光タンパク質をコードする遺伝子、および
25 (b) 配列番号4に記載されるD9遺伝子プロモーター配列またはそのフラグメントを有する第2のプロモーター、および該第2のプロモーターに作動可能に連結された第2の蛍光タンパク質をコードする遺伝子を含む、工程；

(i i) 該植物体と候補薬物を接触させる工程；ならびに
(i i i) 該植物体において該第 1 および第 2 の蛍光タンパク質の発現を測定する工程；
を包含し、

5 ここで該第 1 および第 2 の蛍光タンパク質の発現を測定する工程において第 1 および第 2 の蛍光タンパク質の両方の発現が誘導された場合、候補薬物は植物において病害抵抗性を誘導する農薬であり得る、方法。

3 5. 前記第 1 および第 2 の蛍光タンパク質をコードする遺伝子が、緑色蛍光タンパク質、黄色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質、キンドリングレッド蛍光タンパク質、カエデタンパク質からなる群から選択される蛍光タンパク質をコードする遺伝子である、項目 3 4 に記載の方法。

3 6. 前記第 1 または第 2 の蛍光タンパク質をコードする遺伝子が、緑色蛍光タンパク質をコードする遺伝子である、項目 3 5 に記載の方法。

3 7. 前記植物細胞が単子葉植物細胞である、項目 3 4 に記載の方法。

15 3 8. 前記植物細胞がイネ細胞である、項目 3 4 に記載の方法。

3 9. 前記蛍光タンパク質の発現を測定する工程が、発光ダイオードを光源として使用する蛍光測定法である、項目 3 4 に記載の方法。

4 0. 病害抵抗性を誘導する農薬を分類する方法であって、該方法は、以下の工程：

20 (i) 配列番号 1 に記載される P B Z 1 遺伝子プロモーター配列またはそのフラグメントを有する第 1 のプロモーター、および該第 1 のプロモーターに作動可能に連結された第 1 の蛍光タンパク質をコードする遺伝子を含む発現カセットを含む第 1 の植物体を提供する工程；

25 (i i) 配列番号 6 に記載される R a c 1 遺伝子プロモーター配列またはそのフラグメントを有する第 2 のプロモーター、および該第 2 のプロモーターに作動可能に連結された第 2 の蛍光タンパク質をコードする遺伝子を含む発現カセット

を含む第2の植物体を提供する工程；

(i i i) 該植物体と候補薬物を接触させる工程；ならびに

(i v) 該第1および第2の植物体において該第1および第2の蛍光タンパク質の発現を測定する工程；

5 を包含し、

ここで該第1および第2の蛍光タンパク質の発現の測定結果から、候補薬物を分類する、方法。

10

図面の簡単な説明

図1は、PBZ1プロモーターと連結したGFP (PBZ1::GFP) を用いた、pBZ1プロモーターのオリゼメート、プロベナゾール、セレブロシドBによる発現誘導を示す。

15

未処理の葉身(A)・オリゼメート処理10日目の葉身(B)、未処理の葉身(C)、プロベナゾール処理3日目の葉身(D)、未処理の葉身(E)、セレブロシドB処理後6時間の葉身(F)、セレブロシドB処理後3日目の葉身(G)。

20

図2は、PBZ1::GFPを用いた、いもち菌レース007菌の噴霧接種の結果を示す。

007菌を接種した葉身を可視光(A)・励起光(B)(D)で観察した。

25

図3は、PBZ1::GFPを用いた、いもち菌レース031菌と007菌のパンチ接種の結果を示す。

031菌を接種した葉身を可視光(A)、励起光(B)で観察した。

007菌を接種した葉身を可視光（C）、励起光（D）で観察した。

図4は、PBZ1プロモーターと連結したGFP（PBZ1::GFP）の完熟種子における発現を示す。

5 PBZ1::GFP導入種子を可視光（A）、励起光（B）で観察した。

図5は、PBZ1::GFPの発芽時の発現を示す。

PBZ1::GFP、導入種子をMS培地に播種後2日目（A、B）、3日目（C、D）、4日目（E、F）7日目（G、H）で可視光（A、C、E、G）、
10 励起光（B、D、F；H）で観察した。

図6は、PBZ1::GFPの組織・器官特異的発現を示す。

励起光下で非型質転換体（A）、PBZ1::GFP導入イネ成熟植物体（B、C）、PBZ1::GFP導入イネの穎果（D）、登熟中の胚乳（E）、胚
15 （F）、根の先端（G）を観察した。

図7は、D9プロモーターと連結したGFPのプロベナゾールによる発現誘導を示す。

未処理の葉身（A）・プロベナゾール処理7日目の葉身（B）。

20

図8は、D9プロモーターと連結したGFPを用いた、いもち菌レース007菌の噴霧接種の結果を示す。

007菌を接種した葉身を可視光（A）、および励起光（B）で観察した。

25 図9は、特開2001-269171に開示される蛍光物質観察用励起光照射装置を示す。

なお、図面における参照番号は、以下のとおりである：

- 1 蛍光物質
- 2 励起光
- 4、6 フィルター
- 5 5 蛍光発光
- 10 発光ダイオードからなる光源
- 11 肉眼で観察できる光量

発 明 の 詳 細 な 説 明

10

以下、本発明を説明する。本明細書の全体にわたり、単数形の冠詞（例えば、英語の場合は「a」、「an」、「the」など、独語の場合の「ein」、「der」、「das」、「die」などおよびその格変化形、仏語の場合の「un」、「une」、「le」、「la」など、スペイン語における「un」、「una」、「el」、「la」など、他の言語における対応する冠詞、形容詞など）は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。また、本明細書において使用される用語は、特に言及しない限り、当該分野で通常用いられる意味で用いられることが理解されるべきである。

15

（用語の定義）

20

以下に本明細書において特に使用される用語の定義を列挙する。

25

本明細書において使用される用語「タンパク質」「ポリペプチド」、「オリゴペプチド」および「ペプチド」は、本明細書において同じ意味で使用され、任意の長さのアミノ酸のポリマーをいう。このポリマーは、直鎖であっても分岐していてもよく、環状であってもよい。アミノ酸は、天然のものであっても非天然のものであってもよく、改変されたアミノ酸であってもよい。この用語はまた、複数のポリペプチド鎖の複合体へとアセンブルされ得る。この用語はまた、天然ま

たは人工的に改変されたアミノ酸ポリマーも包含する。そのような改変としては、例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化または任意の他の操作もしくは改変（例えば、標識成分との結合体化）。この定義にはまた、例えば、アミノ酸の1または2以上のアナログを含むポリペプチド
5 （例えば、非天然のアミノ酸などを含む）、ペプチド様化合物（例えば、ペプチド）および当該分野において公知の他の改変が包含される。

本明細書において使用する場合、「蛍光タンパク質」とは、蛍光を発するタンパク質をいい、例えば、オワンクラゲ由来の緑色蛍光タンパク質（GFP）、配
10 列番号3のアミノ酸配列を有する変異型GFP、イソギンチャク近縁種*Discosona striata*由来の蛍光タンパクであるRFP（Red Fluorescent Protein）、*Aequorea coerulescens*由来のGFP（例えば、Evrogen社（ロシア）のAce-Green（登録商標））、甲殻生物であるCopepod由来のGFP（例えば、Evrogen社（ロシア）のCop-Green（登録商標））、黄色蛍光タンパク質
15 （例えば、Evrogen社（ロシア）のPhi-Yellow（登録商標））、Kindling Red Fluorescent Protein（キンドリングレッド蛍光タンパク質：KFP-Red）（例えば、Evrogen社（ロシア）のKindling-Red（登録商標））、赤色蛍光タンパク質（例えば、Evrogen社（ロシア）のHuRED-tandem（登録商標））、
20 Kaede（カエデ）タンパク質（Andoら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2002、Oct 1; 99(20): 12651-6）。

本明細書において使用する場合、「植物病原体」とは、植物に有害な影響を与える外来の因子をいい、例えば、ウイルス、真菌、細菌が挙げられるがこれらに限定されない。

25 本明細書において使用される用語「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」および「核酸」は、本明細書において同じ意味で使用され、任意の長さのヌ

クレオチドのポリマーをいう。この用語はまた、「誘導体オリゴヌクレオチド」または「誘導体ポリヌクレオチド」を含む。「誘導体オリゴヌクレオチド」または「誘導体ポリヌクレオチド」とは、ヌクレオチドの誘導体を含むか、またはヌクレオチド間の結合が通常とは異なるオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドをいい、互換的に使用される。そのようなオリゴヌクレオチドとして具体的には、例えば、2'-O-メチル-リボヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスホロチオエート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN3'-P5'ホスホロアミデート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合とがペプチド核酸結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン (phenoxazine-modified cytosine) で置換された誘導体オリゴヌクレオチド、DNA中のリボースが2'-O-プロピルリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド中のリボースが2'-メトキシエトキシリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチドなどが例示される。他にそうではないと示されなければ、特定の核酸配列はまた、明示的に示された配列と同様に、その保存的に改変された改変体（例えば、縮重コドン置換体）および相補配列を包含することが企図される。具体的には、縮重コドン置換体は、1またはそれ以上の選択された（または、すべての）コドンの3番目の位置が混合塩基および／またはデオキシイノシン残基で置換された配列を作成することにより達成され得る (Batzera, Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsukaら, J. Biol.

Chem. 260:2605-2608 (1985); Rossoliniら、
Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994))。用語「核酸」
はまた、本明細書において、遺伝子、cDNA、mRNA、オリゴヌクレオチ
ド、およびポリヌクレオチドと互換可能に使用される。特定の核酸配列はまた、
5 「スプライス改変体」を包含する。同様に、核酸によりコードされた特定のタン
パク質は、その核酸のスプライス改変体によりコードされる任意のタンパク質を
暗黙に包含する。その名が示唆するように「スプライス改変体」は、遺伝子のオル
タナティブスプライシングの産物である。転写後、最初の核酸転写物は、異なる
(別の) 核酸スプライス産物が異なるポリペプチドをコードするようにスプラ
10 イスされ得る。スプライス改変体の産生機構は変化するが、エキソンのオルタナ
ティブスプライシングを含む。読み越し転写により同じ核酸に由来する別のポリ
ペプチドもまた、この定義に包含される。スプライシング反応の任意の産物（組
換え形態のスプライス産物を含む）がこの定義に含まれる。

本明細書において「ヌクレオチド」は、天然のものでも非天然のものでもよい。
15 「誘導体ヌクレオチド」または「ヌクレオチドアナログ」とは、天然に存在する
ヌクレオチドとは異なるがもとのヌクレオチドと同様の機能を有するものをいう。
そのような誘導体ヌクレオチドおよびヌクレオチドアナログは、当該分野におい
て周知である。そのような誘導体ヌクレオチドおよびヌクレオチドアナログの例
としては、ホスホロチオエート、ホスホルアミデート、メチルホスホネート、キ
20 ラルメチルホスホネート、2-Ο-メチルリボヌクレオチド、ペプチド-核酸（
PNA）が含まれるが、これらに限定されない。

本明細書において、「フラグメント」とは、全長のポリペプチドまたはポリヌ
クレオチド（長さが n ）に対して、 $1 \sim n-1$ までの配列長さを有するポリペプ
チドまたはポリヌクレオチドをいう。フラグメントの長さは、その目的に応じて、
25 適宜変更することができ、例えば、その長さの下限としては、ポリペプチドの場
合、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50

およびそれ以上のアミノ酸が挙げられ、ここの具体的に列挙していない整数で表される長さ（例えば、11など）もまた、下限として適切であり得る。また、ポリヌクレオチドの場合、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、75、100およびそれ以上のヌクレオチドが挙げられ、ここの具

5 体的に列挙していない整数で表される長さ（例えば、11など）もまた、下限として適切であり得る。本明細書においてプロモーターの「フラグメント」とは、好ましくは、プロモーター配列中の部分配列であって、プロモーター配列と同様の制御（例えば、薬物などの外来因子による発現誘導、組織特異的発現、時期特異的発現など）を受ける配列をいう。

10 本明細書において、「改変体」とは、もとのポリペプチドまたはポリヌクレオチドなどの物質に対して、一部が変更されているものをいう。そのような改変体としては、置換改変体、付加改変体、欠失改変体、短縮（*truncated*）改変体、対立遺伝子変異体などが挙げられる。対立遺伝子（*allele*）とは、同一遺伝子座に属し、互いに区別される遺伝的改変体のことをいう。従って、「

15 対立遺伝子変異体」とは、ある遺伝子に対して、対立遺伝子の関係にある改変体をいう。「種相同体またはホモログ（*homolog*）」とは、ある種の中で、ある遺伝子とアミノ酸レベルまたはヌクレオチドレベルで、相同性（好ましくは、60%以上の相同性、より好ましくは、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上の相同性）を有するものをいう。そのような種相同体を取得する方法

20 は、本明細書の記載から明らかである。「オルソログ（*ortholog*）」とは、オルソログス遺伝子（*orthologous gene*）ともいい、二つの遺伝子がある共通祖先からの種分化に由来する遺伝子をいう。例えば、多重遺伝子構造をもつヘモグロビン遺伝子ファミリーを例にとると、ヒトとマウスの α ヘモグロビン遺伝子はオルソログであるが、ヒトの α ヘモグロビン遺伝子と β ヘ

25 モグロビン遺伝子はパラログ（遺伝子重複で生じた遺伝子）である。オルソログは、分子系統樹の推定に有用であることから、オルソログもまた、本発明におい

て有用であり得る。

「保存的（に改変された）改変体」は、アミノ酸配列および核酸配列の両方に適用される。特定の核酸配列に関して、保存的に改変された改変体とは、同一のまたは本質的に同一のアミノ酸配列をコードする核酸をいい、核酸がアミノ酸配列をコードしない場合には、本質的に同一な配列をいう。遺伝コードの縮重のため、多数の機能的に同一な核酸が任意の所定のタンパク質をコードする。例えば、コドン G C A、G C C、G C G、および G C U はすべて、アミノ酸アラニンをコードする。したがって、アラニンがコドンにより特定される全ての位置で、そのコドンは、コードされたポリペプチドを変更することなく、記載された対応するコドンの任意のものに変更され得る。このような核酸の変動は、保存的に改変された変異の 1 つの種である「サイレント改変（変異）」である。ポリペプチドをコードする本明細書中のすべての核酸配列はまた、その核酸の可能なすべてのサイレント変異を記載する。当該分野において、核酸中の各コドン（通常メチオニンのための唯一のコドンである A U G、および通常トリプトファンのための唯一のコドンである T G G を除く）が、機能的に同一な分子を産生するために改変されることが理解される。したがって、ポリペプチドをコードする核酸の各サイレント変異は、記載された各配列において暗黙に含まれる。好ましくは、そのような改変は、ポリペプチドの高次構造に多大な影響を与えるアミノ酸であるシステインの置換を回避するようになされ得る。

本明細書中において、機能的に等価なポリペプチドを作製するために、アミノ酸の置換のほかに、アミノ酸の付加、欠失、または修飾もまた行うことができる。アミノ酸の置換とは、もとのペプチドを 1 つ以上、例えば、1 ～ 10 個、好ましくは 1 ～ 5 個、より好ましくは 1 ～ 3 個のアミノ酸で置換することをいう。アミノ酸の付加とは、もとのペプチド鎖に 1 つ以上、例えば、1 ～ 10 個、好ましくは 1 ～ 5 個、より好ましくは 1 ～ 3 個のアミノ酸を付加することをいう。アミノ酸の欠失とは、もとのペプチドから 1 つ以上、例えば、1 ～ 10 個、好ましくは

1～5個、より好ましくは1～3個のアミノ酸を欠失させることをいう。アミノ酸修飾は、アミド化、カルボキシル化、硫酸化、ハロゲン化、アルキル化、グリコシル化、リン酸化、水酸化、アシル化（例えば、アセチル化）などを含むが、これらに限定されない。置換、または付加されるアミノ酸は、天然のアミノ酸であってよく、非天然のアミノ酸、またはアミノ酸アナログでもよい。天然のアミノ酸が好ましい。

このような核酸は、周知のPCR法により得ることができ、化学的に合成することもできる。これらの方法に、例えば、部位特異的変位誘発法、ハイブリダイゼーション法などを組み合わせてもよい。

10 本明細書において、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの「置換、付加または欠失」とは、もとのポリペプチドまたはポリヌクレオチドに対して、それぞれアミノ酸もしくはその代替物、またはヌクレオチドもしくはその代替物が、置き換わること、付け加わることまたは取り除かれることをいう。このような置換、付加または欠失の技術は、当該分野において周知であり、そのような技術の例としては、部位特異的変異誘発技術などが挙げられる。置換、付加または欠失は、15 1つ以上であれば任意の数でよく、そのような数は、その置換、付加または欠失を有する改変体において目的とする機能（例えば、癌マーカー、神経疾患マーカーなど）が保持される限り、多くすることができる。例えば、そのような数は、1または数個であり得、そして好ましくは、全体の長さの20%以内、10%以内、または100個以下、50個以下、25個以下などであり得る。

本明細書において使用する場合、「作動可能に連結された（る）」とは、所望の配列の発現（作動）がある転写翻訳調節配列（例えば、プロモーター、エンハンサーなど）または翻訳調節配列の制御下に配置されることをいう。プロモーターが遺伝子に作動可能に連結されるためには、通常、その遺伝子のすぐ上流にプロモーターが配置されるが、必ずしも隣接して配置される必要はない。

本明細書において使用する場合、植物における「病害抵抗性」とは、少なくとも

も2つ以上の植物疾患に対して植物の状態を改善する作用をいう。例えば、病害抵抗性を有する植物は、病害抵抗性を有さない植物と比較して、少なくとも2つ以上の植物疾患に対して、改善された耐性および／または抵抗性を有する。

5 本明細書において使用する場合、植物における「病害抵抗性を誘導する農薬」とは、少なくとも2つ以上の植物疾患に対して植物の状態を改善する農薬であり、かつ植物病原体に対して直接作用しない農薬をいう。

本明細書において使用する場合、植物体と、薬剤および／または農薬を「接触させる」とは、薬剤および／または農薬が植物体に対して何らかの作用をすることが可能な程度に物理的に接近することをいう。この接触は、例えば、噴霧、塗布、パンチ接種、および注入、によってなされ得る。

本明細書において使用する場合、「病害抵抗性誘導遺伝子」とは、病害抵抗性をもたらす何らかの刺激（例えば、プロベナゾールのような化合物との接触）によって誘導される、遺伝子をいう。この遺伝子の例としては、P B Z 1 遺伝子、D 9 遺伝子、R a c 1 遺伝子が挙げられるが、これらに限定されない。

15 P B Z 1 遺伝子のプロモーターを使用する場合、代表的には、イネ由来の配列番号1に記載の配列全長、またはそのフラグメントを用いることができる。

D 9 遺伝子のプロモーターを使用する場合、代表的には、イネ由来の配列番号4に記載の配列全長、またはそのフラグメントを用いることができる。

20 R a c 1 遺伝子のプロモーターを使用する場合、代表的には、イネ由来の配列番号6に記載の配列全長、またはそのフラグメントを用いることができる。

本発明を植物において利用する場合、植物細胞への植物発現ベクターの導入には、当業者に周知の方法、例えば、アグロバクテリウムを介する方法および直接細胞に導入する方法、が用いられ得る。アグロバクテリウムを介する方法としては、例えば、N a g e l らの方法（N a g e l ら（1990）、M i c r o b i o l . L e t t . , 67, 325）が用いられ得る。この方法は、まず、
25 例えば植物発現ベクターでエレクトロポレーションによってアグロバクテリウム

を形質転換し、次いで、形質転換されたアグロバクテリウムをGelvinら（Gelvinら編（1994）、Plant Molecular Biology Manual（Kluwer Academic Press Publishers））に記載の方法で植物細胞に導入する方法である。植物発現ベクターを直接細胞に導入する方法としては、エレクトロポレーション法（Shimamotoら（1989）、Nature、338：274-276；およびRhodesら（1989）、Science、240：204-207を参照のこと）、パーティクルガン法（Christouら（1991）、Bio／Technology 9：957-962を参照のこと）ならびにポリエチレングリコール（PEG）法（Dattaら（1990）、Bio／Technology 8：736-740を参照のこと）が挙げられる。これらの方法は、当該分野において周知であり、形質転換する植物に適した方法が、当業者により適宜選択され得る。

植物発現ベクターを導入された細胞は、まずカナマイシン耐性などの薬剤耐性で選択される。次いで、当該分野で周知の方法により、植物組織、植物器官および／または植物体に再分化され得る。さらに、植物体から種子が取得され得る。導入した遺伝子の発現は、ノーザンブロット法またはPCR法により、検出し得る。必要に応じて、遺伝子産物たるタンパク質の発現を、例えば、ウェスタンブロット法により確認し得る。

好ましい実施形態の説明

（スクリーニングに用いる植物体の作製）

本発明に従って、病害抵抗性を誘導する農薬をスクリーニングするために使用され得る植物体は、（a）植物の病害抵抗性誘導遺伝子のプロモーター；および（b）該プロモーターに作動可能に連結された、蛍光タンパク質をコードする遺

伝子を含む、発現カセットを作製し、その発現カセットを植物に導入することによって作製される。

この発現カセットにおいて使用されるプロモーターとしては、種々の病害抵抗性誘導遺伝子、例えば、P B Z 1 遺伝子のプロモーター（配列番号 1）、D 9 遺
5 伝子のプロモーター（配列番号 4）、および R a c 1 遺伝子のプロモーター（配列番号 6）が挙げられる。また、本発明の発現カセットにおいて使用する場合、必ずしもこれらのプロモーターの全長を用いる必要はなく、これらプロモーターのフラグメントであって、プロベナゾールおよび／またはセレブロシド B のような病害抵抗性を誘導する農薬に応答するフラグメントであってもよい。例えば、
10 配列番号 4 に示される D 9 遺伝子プロモーター領域 1 0 2 0 b p の場合、その全長のみならず、配列番号 4 の 8 1 5 b p フラグメント（配列番号 5）を用いることもできる。実際に、この配列番号 4 の 8 1 5 b p を蛍光タンパク質をコードする遺伝子に作動可能に連結した場合、いもち病によって発現が誘導された。その 8 1 5 b p フラグメントによる誘導の強度は、配列番号 4 の全長 1 0 2 0 b p を
15 用いた場合と同様であった。

また、これらプロモーターを蛍光タンパク質をコードする遺伝子に連結する場合は、プロモーターが作動可能な条件であればよい。

この蛍光タンパク質としては、オワンクラゲ由来の緑色蛍光タンパク質（G F P）、配列番号 3 のアミノ酸配列を有する変異型 G F P、イソギンチャク近縁種
20 *D i s c o s o n a s t r i a t a* 由来の蛍光タンパクである R F P（Red Fluorescent Protein）、*A e q u e c o e r u l e s c e n s* 由来の G F P（例えば、E v r o g e n 社（ロシア）の A c e - G r e e n（登録商標））、甲殻生物である *C o p e p o d* 由来の G F P（例えば、E v r o g e n 社（ロシア）の C o p - G r e e n（登録商標））、黄色蛍光タン
25 パク質（例えば、E v r o g e n 社（ロシア）の P h i - Y e l l o w（登録商標））、*K i n d l i n g R e d F l u o r e s c e n t P r o t e i*

n (キンドリングレッド蛍光タンパク質: KFP-Red) (例えば、Evrogen社 (ロシア) のKindling-Red (登録商標))、赤色蛍光タンパク質 (例えば、Evrogen社 (ロシア) のHuRED-tandem (登録商標))、およびKaede (カエデ) タンパク質 (Andoら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2002, Oct 1; 99(20): 12651-6) が挙げられるが、これらに限定されない。

この発現カセットを導入した植物体の作製は、例えば、植物細胞 (例えば、カルス細胞、胚細胞、種子) に発現カセットを含むベクターを導入し、その後、遺伝子導入された植物細胞を植物体に再生することによって行われ得る。植物細胞へのベクターの導入方法としては、植物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、トランスフェクション、形質導入、以下を用いた形質転換などが挙げられる: アグロバクテリウム (Agrobacterium) (特開昭59-140885、特開昭60-70080、WO94/00977、特開2001-29075 (特許3141084号)、特開2000-245485)、エレクトロポレーション法 (特開昭60-251887)、パーティクルガン (遺伝子銃) を用いる方法 (特許第2606856、特許第2517813) 等が例示される。本発明においては、形質転換後に再生した植物体の後代を用いることも可能である。

また、本発明の植物体を作製する場合は、プロモーター: 蛍光タンパク質コード遺伝子の融合物を2つ以上、植物に導入する発現カセットに含ませてもよい。

また、本発明の植物体を作製する場合は、プロモーター: 蛍光タンパク質コード遺伝子の融合物を有する発現カセットを2種類以上、植物に導入してもよい。

(複数のプロモーターを用いる薬剤のスクリーニング)

上記の本発明の実施例の結果、PBZ1 遺伝子は、プロベナゾールおよびセレブロシドBの両薬剤に対して応答性であり、しかも、他の2つのプロモーター、

D 9 プロモーターおよび R a c 1 プロモーターと比較して、蛍光タンパク質によるシグナルが強かった。従って、P B Z 1 プロモーターは、そのシグナルの強さから、発光ダイオードを光源として使用する蛍光測定法と組み合わせた場合、候補薬剤が病害抵抗性を誘導する農薬であるか否かを簡便に決定することができる。

5 しかし、その一方で、P B Z 1 プロモーターは、他の多くのストレスに対しても応答性であるという特徴を有する。例えば、気温、水温、水分、光量等がイネの生育に不適切である場合、いわゆる生理障害が起こり、P B Z 1 の発現誘導が観察された。また、温室内で、葉が白く抜けるなどの生理障害が生じた場合にも、P B Z 1 遺伝子が誘導される。P B Z 1 プロモーターは、多くの無関係なストレス
10 に対して応答性であることから、病害抵抗性を誘導する農薬のスクリーニングにおいて擬陽性を生じやすいことも判明した。

 その一方で、D 9 プロモーターは、P B Z 1 プロモーターと同様に、プロベナゾールに対して応答性であったが、そのシグナルは、P B Z 1 と比較して弱かった。従って、D 9 プロモーターは、そのシグナルが P B Z 1 と比較して弱いため、
15 P B Z 1 と比較して、候補薬剤が病害抵抗性を誘導する農薬であるか否かの判定を迅速に行うことはできない。その一方で、D 9 プロモーターは、P B Z 1 プロモーターと異なり多くの無関係なストレスに対して応答性ではなかった。そのため、P B Z 1 プロモーターによって問題となる擬陽性は、ほとんど問題とならない。

20 そこで、P B Z 1 プロモーターによるスクリーニングと、D 9 プロモーターによるスクリーニングを組み合わせることによって、迅速かつ擬陽性の少ないスクリーニングを行うことが可能である。

 上記組み合わせスクリーニングにおいては、1つの植物体中に、(a) 配列番号 1 に記載される P B Z 1 遺伝子プロモーター配列またはそのフラグメントを有する第 1 のプロモーター、およびその第 1 のプロモーターに作動可能に連結され
25

た第1の蛍光タンパク質をコードする遺伝子、ならびに(b)配列番号4に記載されるD9遺伝子プロモーター配列またはそのフラグメントを有する第2のプロモーター、およびその第2のプロモーターに作動可能に連結された第2の蛍光タンパク質をコードする遺伝子、を含む1つの発現カセットを導入し、その植物体を用いることができる。あるいは、1つの植物体中に、(a)配列番号1に記載されるPBZ1遺伝子プロモーター配列またはそのフラグメントを有する第1のプロモーター、およびその第1のプロモーターに作動可能に連結された第1の蛍光タンパク質をコードする遺伝子を含む第1の発現カセット、ならびに(b)配列番号4に記載されるD9遺伝子プロモーター配列またはそのフラグメントを有する第2のプロモーター、およびその第2のプロモーターに作動可能に連結された第2の蛍光タンパク質をコードする遺伝子を含む第2の発現カセットを導入し、その植物体を用いることができる。あるいは、(a)配列番号1に記載されるPBZ1遺伝子プロモーター配列またはそのフラグメントを有する第1のプロモーター、およびその第1のプロモーターに作動可能に連結された第1の蛍光タンパク質をコードする遺伝子を含む第1の発現カセットを導入した第1の植物体、ならびに(b)配列番号4に記載されるD9遺伝子プロモーター配列またはそのフラグメントを有する第2のプロモーター、およびその第2のプロモーターに作動可能に連結された第2の蛍光タンパク質をコードする遺伝子を含む第2の発現カセットを導入した第2の植物体を用いることができる。

上記の植物体(単数または複数)を用いて、複数のプロモーターの応答を蛍光タンパク質の発現によって検出することによって、病害抵抗性を誘導する農薬のスクリーニングを行うことができる。

例えば、1次スクリーニングにおいては、PBZ1プロモーターと作動可能に連結した第1の蛍光タンパク質をコードする遺伝子の発現を測定することによって、薬剤および/または農薬の作用を評価する。PBZ1プロモーターを誘導す

る薬剤・農薬は、病害抵抗性を誘導する農薬の候補であり、2次スクリーニングに供される。第1の蛍光タンパク質の発現量の測定は、第1の蛍光タンパク質に適したフィルターを備えた蛍光測定装置を用いて行うことができる。

1次スクリーニングにおいて、陽性を示した薬剤および／または農薬について、次に、D9プロモーターと作動可能に連結した第2の蛍光タンパク質をコードする遺伝子の発現を測定することによって、薬剤および／または農薬の作用を評価する。D9プロモーターを誘導する薬剤・農薬を、病害抵抗性を誘導する農薬の候補として単離する。

上記複数のプロモーターの組み合わせスクリーニングによって、病害抵抗性を誘導する農薬を効率的にスクリーニングすることが可能である。

上記のスクリーニング法はさらに、Rac1プロモーターを用いるスクリーニングと組み合わせられ得る。以下の実施例において示されるように、Rac1プロモーターは、セレブロシドBで誘導されたが、プロベナゾールでの誘導は確認されなかった。薬剤に対するプロモーターの応答性の差異は、薬剤によって異なる経路で細胞に作用することに起因すると考えられる。従って、複数種類のプロモーターの応答性を比較することによって、作用機構に基づいて候補薬剤を分類することが可能になる。

例えば、PBZ1プロモーターからの発現を誘導し、かつRac1プロモーターからの発現を誘導する薬剤は、プロベナゾールと類似する作用機構を有する薬剤であると推定される。これに対して、PBZ1プロモーターからの発現を誘導するが、Rac1プロモーターからの発現を誘導しない薬剤は、セレブロシドBと類似する作用機構を有する薬剤であると推定される。

この知見に基づいて、例えば、PBZ1プロモーターと作動可能に連結した第1の蛍光タンパク質をコードする遺伝子の発現を測定し、そしてRac1プロモーターと作動可能に連結した第2の蛍光タンパク質をコードする遺伝子の発現を

測定することによって、薬剤をその作用機構によって分類することが可能である。

病害抵抗性を誘導する薬剤を分類することによって、その薬剤の施用する量、濃度、時期などの手がかりとすることができる。そのような施用の手がかりがある場合、最適な施用方法の決定に必要な試行錯誤を減らし、その結果、任意の薬剤の施用条件をより容易に決定することが可能である。

(発光ダイオードによる蛍光タンパク質の検出)

本発明において、植物体において発現された蛍光タンパク質を検出するためには、例えば、特開 2 0 0 1 - 2 6 9 1 7 1 に開示される蛍光物質観察用励起光照射装置を用いることができる。その蛍光物質観察用励起光照射装置は、発光ダイオードを光源とし、図 9 に示すように、観察に使用する蛍光物質 1 の励起光 2 の波長に近い波長を発光特性のピークとする発光ダイオード素子を光源 1 0 として備える。例えば、(1) オワンクラゲより単離された蛍光タンパク G F P に由来する改変型 G F P を用いる場合、その励起波長である 4 8 8 nm に近い発光特性を有する発光ダイオードを使用し、G F P を発現する形質転換植物細胞を 5 1 1 nm の蛍光発光によって肉眼で識別できる光量 1 1 とする；(2) イソギンチャク近縁種 *Discosoma striata* より単離された蛍光タンパク (R F P : Red Fluorescent Protein) の改変型 D s R e d を用いる場合は、その励起波長である 5 5 8 nm に近い発光特性を有する発光ダイオードを使用し、R F P を発現する形質転換細胞を D s R e d の 5 8 3 nm の蛍光発光によって識別する。

また、導入遺伝子の発現を起こさせるための装置であるプロモーターの発現特性を、適当な、再分化された個体を対象として、組織毎、あるいは生育ステージ毎に、G F P にあっては 5 1 1 nm、R F P にあっては 5 8 3 nm の蛍光発光を各々検出することにより明らかにすることも可能である。あるいは、複数のプロモーターを各々異なる蛍光タンパク質をコードする遺伝子に連結し、各々のプロモーターの応答性を同時に、測定することも可能である。

必要に応じて、この発光ダイオードを2個またはそれ以上束ねることにより光量を確保する。更に所要により発光帯域を狭める必要がある場合には所要の励起光2の波長のみを透過させるフィルター4を装備する。発光ダイオード素子からの放射光の帯域は狭いため、励起光2の波長のみを透過するフィルター4で波長帯域を制限した場合でも強い励起光2が得られる。

発光ダイオードは電気から光への変換効率が高く、乾電池程度の電源でも十分な光量が得られ、また、発光ダイオード素子の寿命は長く、素子は熱を持ちにくいことから小型化することができる。従って、乾電池またはACアダプターを電源として使用することができる。また、この装置は破損しやすい管球やフィラメント類を使っていないため、可搬性に優れ、暗室や温室、人工気象室内など場所を選ばず容易に移動して、照射、観察が可能となる。

以上、好ましい実施形態を例示して本発明を説明してきた。以下に、図面を参照しながら、実施例に基づいて本発明を説明するが、以下の実施例は、例示の目的のみに提供されることに留意されるべきである。従って、本発明の範囲は、説明に用いた特定の実施形態にも下記実施例にも限定されるものではなく、特許請求の範囲によってのみ限定される。

実施例

以下に実施例等により本発明を詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

(実施例1)

PCR法により単離したPBZ1プロモーター領域を変異型GFP（配列番号2）に融合し、バイナリベクターを用いて、特許3141084号のアグロバクテリウム法により、イネ品種「日本晴」に導入した。遺伝子導入を行ったカルス

から植物体を再分化させ、再生個体を得た。この植物を温室で生育させ、後代の種子を採取した。PBZ1プロモーターを領域を変異型GFPに融合したキメラDNA導入イネ植物体を胚でのGFP発現により選抜し、キメラDNAの導入が確認された植物体を得た。この植物を生育させ、既存の農薬であるオリゼメートを施用し（方法は、明治製菓研究年報NO36、42-54、1997を参考にした）、7～10日目に葉身におけるGFPの発現を観察した。その結果、葉身における変異型GFP発現の誘導が確認された（図1AおよびB）。

（実施例2）

実施例1と同様にキメラDNA導入形質転換イネに、既存の農薬であるオリゼメートの主成分プロベナゾールを200mg/lの濃度で施用し、3日目に葉身における変異型GFPの発現を観察した。その結果、葉身における変異型GFP発現の誘導が確認された（図1CおよびD）。

（実施例3）

実施例1と同様にキメラDNA導入形質転換イネに、いもち菌由来のエリシター分子であるセレブロシドBを2μg/mLの濃度で施用し、6時間後に葉身におけるGFPの発現を観察した。その結果、葉身における変異型GFP発現の誘導が確認された（図1E～G）。

（実施例4）

実施例1と同様にキメラDNA導入形質転換イネに、いもち菌（007菌）を接種し、7日目に変異型GFPの発現を観察した。その結果、葉身のいもち感染部位における変異型GFP発現の誘導が確認された（図2および3）。

（実施例5）

実施例 1 と同様にキメラ DNA 導入形質転換イネにおける非誘導性の変異型 G F P の発現を観察した。その結果、茎、外穎、内穎、根、登熟中の胚、発芽中の胚乳及び、胚で変異型 G F P 発現が観察されたが、完熟種子における G F P 発現は検出されなかった（図 4 ～ 6 ）。

5

（実施例 6）

P B Z 1 以外の病害抵抗性誘導遺伝子である D 9 遺伝子のプロモーターについて、実施例 1、2 および 4 と同様に実験を行った。

10

実施例 1 と同様の方法で D 9 プロモーター（配列番号 4）と連結した G F P （配列番号 2）キメラ DNA を導入した形質転換イネに、既存の農薬であるオリゼメートの主成分プロベナゾールを 2 0 0 m g / l の濃度で施用し、7 日目に葉身における変異型 G F P の発現を観察した。その結果、葉身における変異型 G F P 発現の誘導が確認された（図 7）。

15

次に、実施例 1 と同様の方法で D 9 プロモーター（配列番号 4）と連結した G F P （配列番号 2）キメラ DNA を導入した形質転換イネに、いもち菌（0 0 7 菌）を接種し、7 日目に変異型 G F P の発現を観察した。その結果、葉身のいもち感染部位における変異型 G F P 発現の誘導が確認された（図 8 B）。

20

（実施例 7）

P B Z 1 以外の病害抵抗性誘導遺伝子である R a c 1 遺伝子のプロモーター（配列番号 6）について、実施例 1 ～ 5 と同様に実験を行った。

25

その結果、R a c 1 プロモーターは、セレブロシド B で誘導されたが、プロベナゾールでの誘導は確認できなかった（データ示さず）。また、いもち菌接種時に R a c 1 遺伝子から転写される RNA の発現上昇は見られなかった。しかし、R a c 1 p :: G F P を導入したイネでは、いもち菌接種による G F P の発現誘

導が確認できた。

以上の結果から、病害抵抗性誘導遺伝子の中で、P B Z 1 遺伝子のプロモーターを用いた場合は、プロベナゾールとセレブロシドBの双方において、蛍光タンパク質による検出が可能であったが、R a c 1 プロモーターは、プロベナゾール
5 に対する応答を確認することができず、セレブロシドBに対して応答性であった。このことは、プロベナゾールとセレブロシドBの作用機構が異なること、およびP B Z 1 遺伝子とR a c 1 遺伝子は、異なる経路で発現誘導される遺伝子であることを示す。

10 (実施例8)

上記の本発明の実施例の結果、P B Z 1 遺伝子は、プロベナゾールおよびセレ
ブロシドBの両薬剤に対して応答性であり、しかも、他の2つのプロモーター、
D 9 プロモーターおよびR a c 1 プロモーターと比較して、蛍光タンパク質による
シグナルが強かった。従って、P B Z 1 プロモーターは、そのシグナルの強さ
15 から、発光ダイオードを光源として使用する蛍光測定法と組み合わせた場合、候補
薬剤が病害抵抗性を誘導する農薬であるか否かを簡便に決定することができる。
しかし、その一方で、P B Z 1 プロモーターは、他の多くのストレスに対しても
応答性であるという特徴を有する。例えば、気温、水温、水分、光量等がイネの
生育に不適切である場合、いわゆる生理障害が起こり、P B Z 1 の発現誘導が観
20 察された。また、温室内で、葉が白く抜けるなどの生理障害が生じた場合にも、
P B Z 1 遺伝子が誘導される。P B Z 1 プロモーターは、多くの無関係なスト
レスに対しても応答性であることから、病害抵抗性を誘導する農薬のスクリー
ニングにおいて擬陽性を生じやすいことも判明した。

D 9 プロモーターは、P B Z 1 プロモーターと同様に、プロベナゾールに対し
25 て応答性であったが、そのシグナルは、P B Z 1 と比較して弱かった。従って、
D 9 プロモーターは、そのシグナルがP B Z 1 よりも弱いため、P B Z 1 と比較

して、候補薬剤が病害抵抗性を誘導する農薬であるか否かの判定を簡便に行うことができない。その一方で、D 9 プロモーターは、P B Z 1 プロモーターと異なり多くの無関係なストレスに対して応答性ではなかった。従って、P B Z 1 プロモーターによって問題となる擬陽性は、D 9 プロモーターの場合、ほとんど問題とならない。

そこで、P B Z 1 プロモーターによるスクリーニングと、D 9 プロモーターによるスクリーニングを組み合わせたスクリーニング方法を以下のように行う。

組み合わせスクリーニングにおいて、（a）配列番号 1 に記載される P B Z 1 遺伝子プロモーター配列またはそのフラグメントを有する第 1 のプロモーター、およびその第 1 のプロモーターに作動可能に連結された第 1 の蛍光タンパク質をコードする遺伝子を含む第 1 の発現カセットを導入した第 1 の植物体、ならびに（b）配列番号 4 に記載される D 9 遺伝子プロモーター配列またはそのフラグメントを有する第 2 のプロモーター、およびその第 2 のプロモーターに作動可能に連結された第 2 の蛍光タンパク質をコードする遺伝子を含む第 2 の発現カセットを導入した第 2 の植物体を用いる。

第 1 の植物体に多数の候補薬剤を接触させ、第 1 の蛍光タンパク質を指標として、1 次スクリーニングを行う。多数の候補薬剤の中から、第 1 の蛍光タンパク質の発現を誘導する薬剤、すなわち、P B Z 1 誘導性の薬剤を選択する。次に、その選択された薬剤を、第 2 の植物体に接触させ、第 2 の蛍光タンパク質を指標として、2 次スクリーニングを行う。候補薬剤の中から、第 2 の蛍光タンパク質の発現を誘導する薬剤、すなわち、D 9 誘導性の薬剤を選択する。

以上のように、本発明の好ましい実施形態を用いて本発明を例示してきたが、本発明は、この実施形態に限定して解釈されるべきものではない。本発明は、特許請求の範囲によってのみその範囲が解釈されるべきであることが理解される。

当業者は、本発明の具体的な好ましい実施形態の記載から、本発明の記載および技術常識に基づいて等価な範囲を実施することができることが理解される。本明細書において引用した特許、特許出願および文献は、その内容自体が具体的に本明細書に記載されているのと同様にその内容が本明細書に対する参考として援用
5 されるべきであることが理解される。

産業上の利用可能性

本発明によって、a) 植物の病害抵抗性誘導遺伝子の天然のプロモーター；お
10 よびb) 該プロモーターに作動可能に連結された蛍光タンパク質をコードする遺
伝子、を含む発現カセットを含むベクターによって形質転換された植物体を得て、
その植物体を候補薬剤によって処理し、その蛍光タンパク質の発現量を指標にし
て、候補薬剤にスクリーニングを行なう方法およびその方法のためのシステムが
提供される。また、そのスクリーニング方法によって使用される植物体もまた、
15 提供される

請求の範囲

1. 病害抵抗性を誘導する農薬をスクリーニングするために使用され得る植物体であって、

- 5 a) 植物の病害抵抗性誘導遺伝子のプロモーター；および
 b) 該プロモーターに作動可能に連結された、蛍光タンパク質をコードする遺伝子
 を含む、発現カセットを含む植物体。

- 10 2. 前記プロモーターが、プロベナゾールにより発現誘導され得るプロモーターである、請求項 1 に記載の植物体。

3. 前記プロモーターが、配列番号 1 に記載される P B Z 1 遺伝子プロモーター配列を有する、請求項 2 に記載の植物体。

- 15 4. 前記プロモーターが、配列番号 1 に記載される P B Z 1 遺伝子プロモーター配列中の、プロベナゾールにより発現誘導され得る配列からなるフラグメントを有する、請求項 2 に記載の植物体。

- 20 5. 前記プロモーターが、配列番号 4 に記載される D 9 遺伝子プロモーター配列を有する、請求項 2 に記載の植物体。

- 25 6. 前記プロモーターが、配列番号 4 に記載される D 9 遺伝子プロモーター配列中の、プロベナゾールにより発現誘導され得る配列からなるフラグメントを有する、請求項 2 に記載の植物体。

7. 前記プロモーターが、配列番号 6 に記載される R a c 1 遺伝子プロモーター配列を有する、請求項 2 に記載の植物体。

5 8. 前記プロモーターが、配列番号 6 に記載される R a c 1 遺伝子プロモーター配列中の、プロベナゾールにより発現誘導され得る配列からなるフラグメントを有する、請求項 2 に記載の植物体。

9. 病害抵抗性を誘導する農薬をスクリーニングするために使用され得る植物体であって、

10 a) 配列番号 1 に記載される P B Z 1 遺伝子プロモーター配列またはそのフラグメントを有する第 1 のプロモーター、

b) 該第 1 のプロモーターに作動可能に連結された、第 1 の蛍光タンパク質をコードする遺伝子、

15 c) 配列番号 4 に記載される D 9 遺伝子プロモーター配列またはそのフラグメントを有する第 1 のプロモーター、ならびに

d) 該第 2 のプロモーターに作動可能に連結された、第 2 の蛍光タンパク質をコードする遺伝子、
を含む、発現カセットを含む植物体。

20 10. 前記蛍光タンパク質をコードする遺伝子が、緑色蛍光タンパク質、黄色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質、キンドリングレッド蛍光タンパク質、カエデタンパク質からなる群から選択される蛍光タンパク質をコードする遺伝子である、請求項 1 に記載の植物体。

25 11. 前記蛍光タンパク質をコードする遺伝子が、緑色蛍光タンパク質、をコードする遺伝子である、請求項 1 に記載の植物体。

1 2. 単子葉植物である、請求項 1 に記載の植物体。

1 3. イネである、請求項 1 に記載の植物体。

5

1 4. 病害抵抗性を誘導する農薬をスクリーニングするために使用され得るシステムであって、

a) 請求項 3 または 4 に記載の植物体、および

b) 請求項 5 または 6 に記載の植物体、

10

を含む、システム。

1 5. 病害抵抗性を誘導する農薬をスクリーニングするために使用され得るシステムであって、

a) 請求項 3 または 4 に記載の植物体、

15

b) 請求項 5 または 6 に記載の植物体、および

c) 発光ダイオードを光源として使用する蛍光測定法

を含む、システム。

1 6. 病害抵抗性を誘導する農薬をスクリーニングするために使用され得るシステムであって、

20

a) 請求項 3 または 4 に記載の植物体、

b) 請求項 5 または 6 に記載の植物体、および

c) 請求項 7 または 8 に記載の植物体、

を含む、システム。

25

1 7. 病害抵抗性を誘導する農薬をスクリーニングするために使用され得るシ

システムであって、

- a) 請求項 3 または 4 に記載の植物体、
- b) 請求項 5 または 6 に記載の植物体、
- c) 請求項 7 または 8 に記載の植物体、および
- 5 d) 発光ダイオードを光源として使用する蛍光測定法を含む、システム。

1 8. 病害抵抗性を誘導する農薬をスクリーニングするために使用され得るシステムであって、

- 10 a) 請求項 9 に記載の植物体、を含む、システム。

1 9. 病害抵抗性を誘導する農薬をスクリーニングするために使用され得るシステムであって、

- 15 a) 請求項 9 に記載の植物体、および
- b) 発光ダイオードを光源として使用する蛍光測定法を含む、システム。

2 0. 病害抵抗性を誘導する農薬をスクリーニングするために使用され得るシステムであって、

- 20 a) 請求項 9 に記載の植物体、および
- b) 請求項 7 または 8 に記載の植物体、を含む、システム。

2 1. 病害抵抗性を誘導する農薬をスクリーニングするために使用され得るシステムであって、

- a) 請求項 9 に記載の植物体、
- b) 請求項 7 または 8 に記載の植物体、および
- c) 発光ダイオードを光源として使用する蛍光測定法を含む、システム。

5

2 2. 病害抵抗性を誘導する農薬をスクリーニングする方法であって、該方法は、以下の工程：

(i) 配列番号 1 に記載される P B Z 1 遺伝子プロモーター配列またはそのフラグメントを有する第 1 のプロモーター、および該第 1 のプロモーターに作動可能に連結された第 1 の蛍光タンパク質をコードする遺伝子を含む発現カセットを含む第 1 の植物体を提供する工程；

(i i) 配列番号 4 に記載される D 9 遺伝子プロモーター配列またはそのフラグメントを有する第 2 のプロモーター、および該第 2 のプロモーターに作動可能に連結された第 2 の蛍光タンパク質をコードする遺伝子を含む発現カセットを含む第 2 の植物体を提供する工程；

(i i i) 該植物体と候補薬物を接触させる工程；ならびに

(i v) 該第 1 および第 2 の植物体において該第 1 および第 2 の蛍光タンパク質の発現を測定する工程；

を包含し、

ここで該第 1 および第 2 の蛍光タンパク質の発現を測定する工程において第 1 および第 2 の蛍光タンパク質の両方の発現が誘導された場合、候補薬物は植物において病害抵抗性を誘導する農薬であり得る、方法。

2 3. 前記第 1 および第 2 の蛍光タンパク質をコードする遺伝子が、緑色蛍光タンパク質、黄色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質、キンドリングレッド蛍光タンパク質、カエデタンパク質からなる群から選択される蛍光タンパク質をコ

ードする遺伝子である、請求項 2 2 に記載の方法。

2 4. 前記第 1 または第 2 の蛍光タンパク質をコードする遺伝子が、緑色蛍光タンパク質をコードする遺伝子である、請求項 2 3 に記載の方法。

5

2 5. 前記植物細胞が単子葉植物細胞である、請求項 2 2 に記載の方法。

2 6. 前記植物細胞がイネ細胞である、請求項 2 2 に記載の方法。

10

2 7. 前記蛍光タンパク質の発現を測定する工程が、発光ダイオードを光源として使用する蛍光測定法である、請求項 2 2 に記載の方法。

2 8. 病害抵抗性を誘導する農薬をスクリーニングする方法であって、該方法は、以下の工程：

15

(i) 第 1 および第 2 の発現カセットを含む植物体を提供する工程であって、ここで、

該第 1 の発現カセットは、配列番号 1 に記載される P B Z 1 遺伝子プロモーター配列またはそのフラグメントを有する第 1 のプロモーター、および該第 1 のプロモーターに作動可能に連結された第 1 の蛍光タンパク質をコードする遺伝子を含み、そして、

20

該第 2 の発現カセットは、配列番号 4 に記載される D 9 遺伝子プロモーター配列またはそのフラグメントを有する第 2 のプロモーター、および該第 2 のプロモーターに作動可能に連結された第 2 の蛍光タンパク質をコードする遺伝子を含む、工程；

25

(i i) 該植物体と候補薬物を接触させる工程；ならびに

(i i i) 該植物体において該第 1 および第 2 の蛍光タンパク質の発現を測定

する工程；

を包含し、

ここで該第 1 および第 2 の蛍光タンパク質の発現を測定する工程において第 1 および第 2 の蛍光タンパク質の両方の発現が誘導された場合、候補薬物は植物に
5 おいて病害抵抗性を誘導する農薬であり得る、方法。

29. 前記第 1 および第 2 の蛍光タンパク質をコードする遺伝子が、緑色蛍光
タンパク質、黄色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質、キンドリングレッド蛍
光タンパク質、カエデタンパク質からなる群から選択される蛍光タンパク質をコ
10 ードする遺伝子である、請求項 28 に記載の方法。

30. 前記第 1 または第 2 の蛍光タンパク質をコードする遺伝子が、緑色蛍光
タンパク質をコードする遺伝子である、請求項 29 に記載の方法。

15 31. 前記植物細胞が単子葉植物細胞である、請求項 28 に記載の方法。

32. 前記植物細胞がイネ細胞である、請求項 28 に記載の方法。

33. 前記蛍光タンパク質の発現を測定する工程が、発光ダイオードを光源と
20 して使用する蛍光測定法である、請求項 28 に記載の方法。

34. 病害抵抗性を誘導する農薬をスクリーニングする方法であって、該方法
は、以下の工程：

(i) 発現カセットを含む植物体を提供する工程であって、ここで、該発現カ
25 セットは、(a) 配列番号 1 に記載される P B Z 1 遺伝子プロモーター配列また
はそのフラグメントを有する第 1 のプロモーター、および該第 1 のプロモーター

に作動可能に連結された第 1 の蛍光タンパク質をコードする遺伝子、および
(b) 配列番号 4 に記載される D 9 遺伝子プロモーター配列またはそのフラグメントを有する第 2 のプロモーター、および該第 2 のプロモーターに作動可能に連結された第 2 の蛍光タンパク質をコードする遺伝子を含む、工程；

5 (i i) 該植物体と候補薬物を接触させる工程；ならびに

(i i i) 該植物体において該第 1 および第 2 の蛍光タンパク質の発現を測定する工程；

を包含し、

10 ここで該第 1 および第 2 の蛍光タンパク質の発現を測定する工程において第 1 および第 2 の蛍光タンパク質の両方の発現が誘導された場合、候補薬物は植物において病害抵抗性を誘導する農薬であり得る、方法。

15 3 5. 前記第 1 および第 2 の蛍光タンパク質をコードする遺伝子が、緑色蛍光タンパク質、黄色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質、キンドリングレッド蛍光タンパク質、カエデタンパク質からなる群から選択される蛍光タンパク質をコードする遺伝子である、請求項 3 4 に記載の方法。

20 3 6. 前記第 1 または第 2 の蛍光タンパク質をコードする遺伝子が、緑色蛍光タンパク質をコードする遺伝子である、請求項 3 5 に記載の方法。

3 7. 前記植物細胞が単子葉植物細胞である、請求項 3 4 に記載の方法。

3 8. 前記植物細胞がイネ細胞である、請求項 3 4 に記載の方法。

25 3 9. 前記蛍光タンパク質の発現を測定する工程が、発光ダイオードを光源として使用する蛍光測定法である、請求項 3 4 に記載の方法。

40. 病害抵抗性を誘導する農薬を分類する方法であって、該方法は、以下の工程：

5 (i) 配列番号1に記載されるPBZ1遺伝子プロモーター配列またはそのフラグメントを有する第1のプロモーター、および該第1のプロモーターに作動可能に連結された第1の蛍光タンパク質をコードする遺伝子を含む発現カセットを含む第1の植物体を提供する工程；

10 (ii) 配列番号6に記載されるRac1遺伝子プロモーター配列またはそのフラグメントを有する第2のプロモーター、および該第2のプロモーターに作動可能に連結された第2の蛍光タンパク質をコードする遺伝子を含む発現カセットを含む第2の植物体を提供する工程；

(iii) 該植物体と候補薬物を接触させる工程；ならびに

(iv) 該第1および第2の植物体において該第1および第2の蛍光タンパク質の発現を測定する工程；

15 を包含し、

ここで該第1および第2の蛍光タンパク質の発現の測定結果から、候補薬物を分類する、方法。

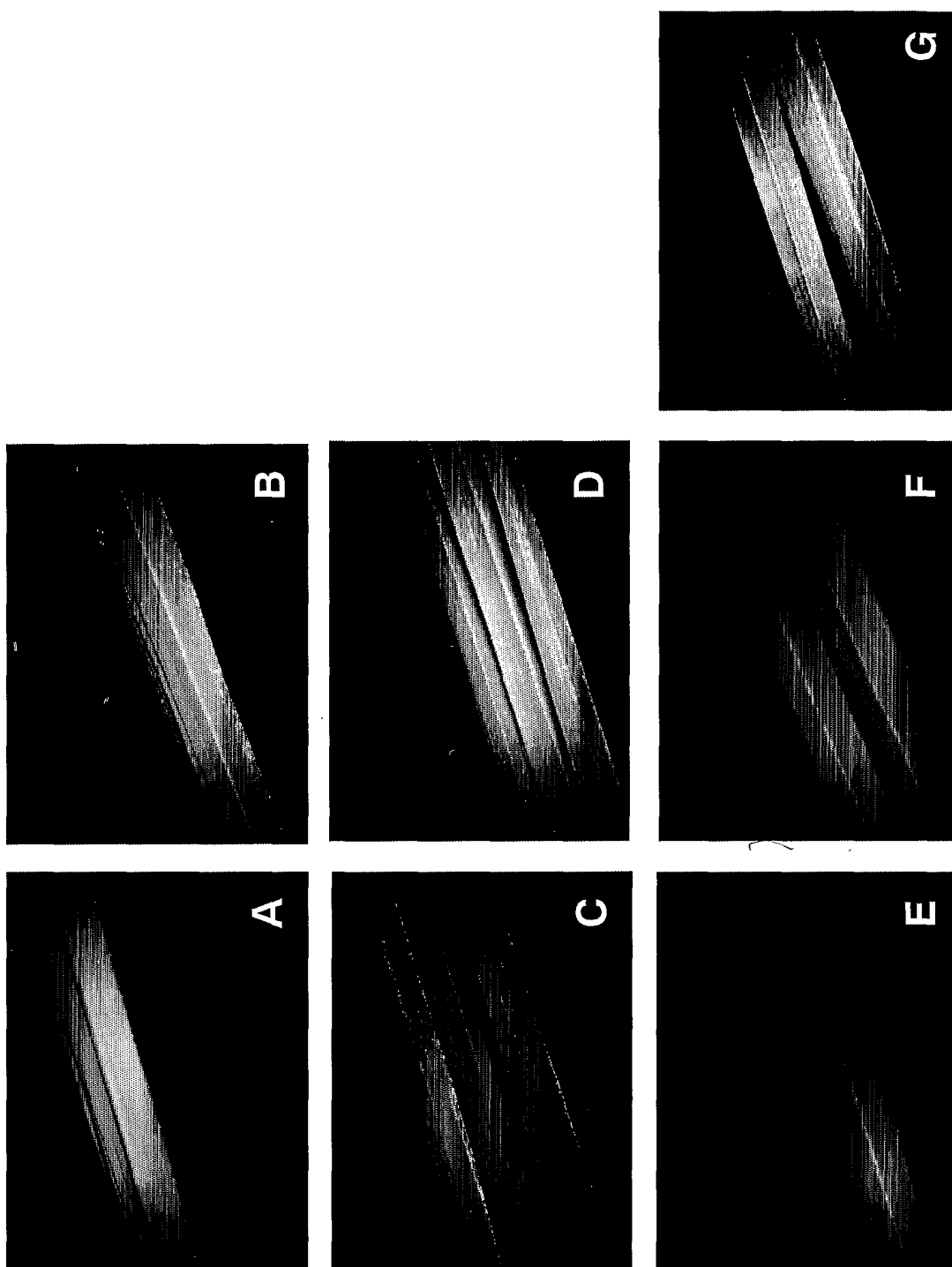
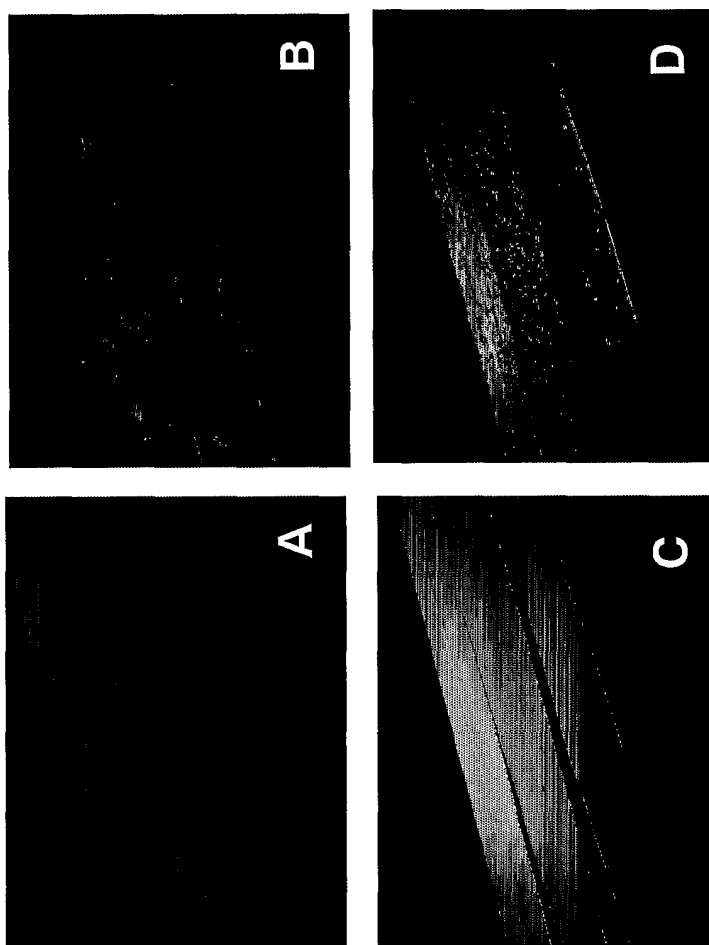


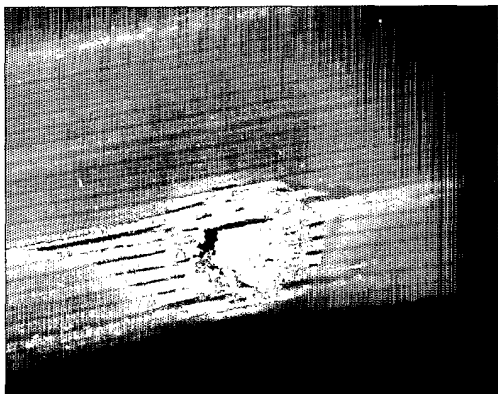
図 1



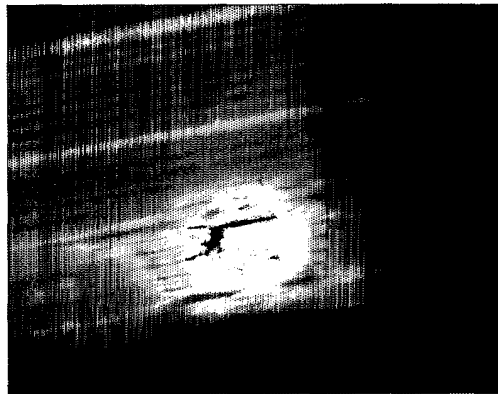
22

図3

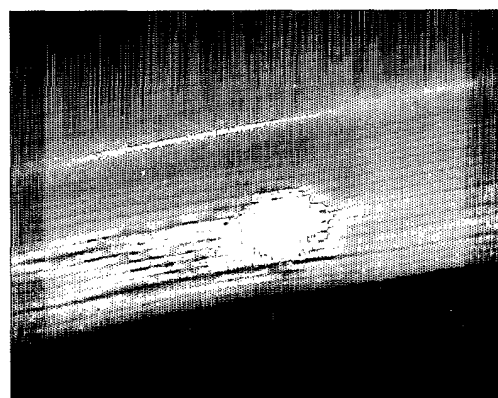
A



B



C



D

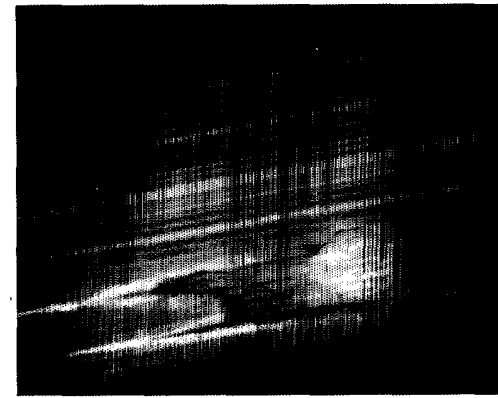


図4

A



B

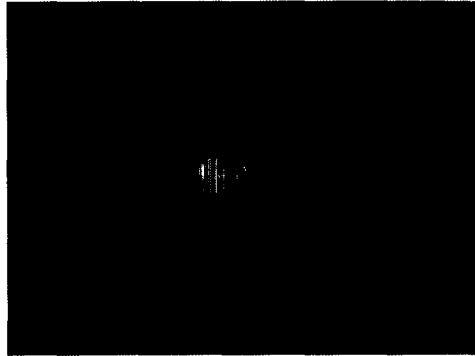


図5

A



B



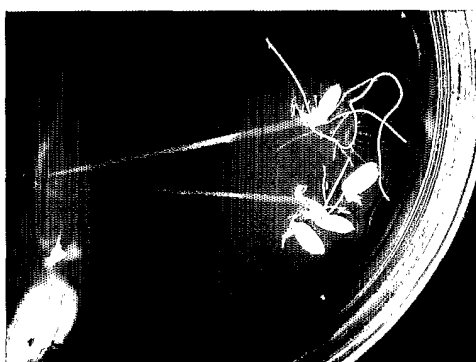
C



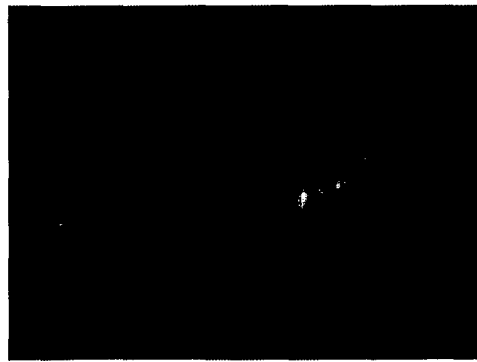
D



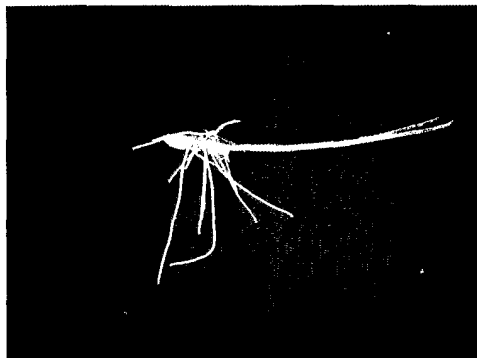
E



F



G



H

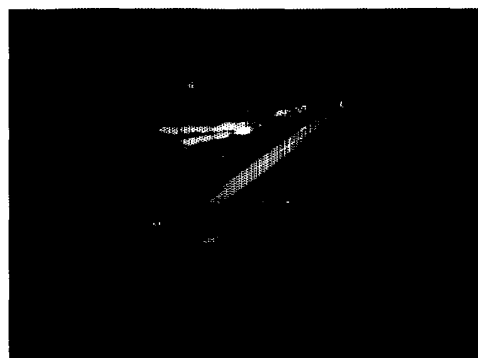
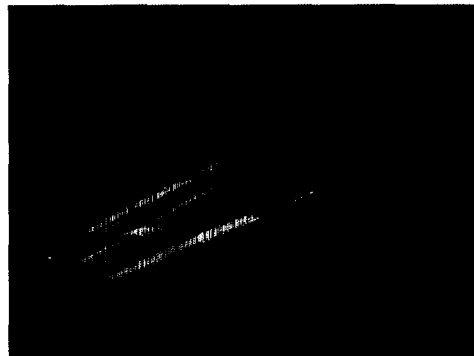


図6

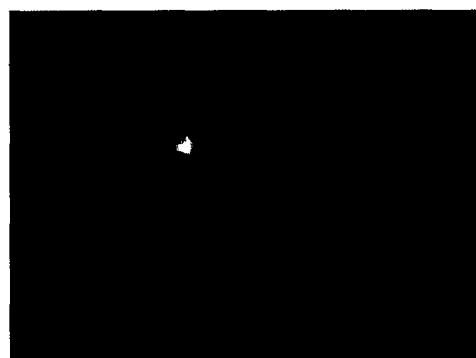
A



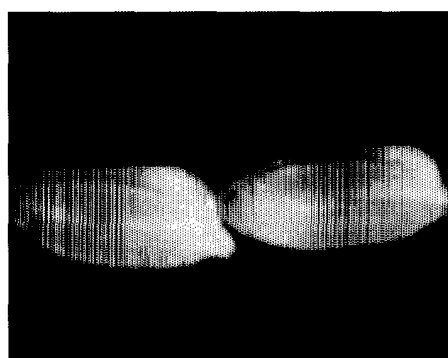
B



C



D



E



F



G

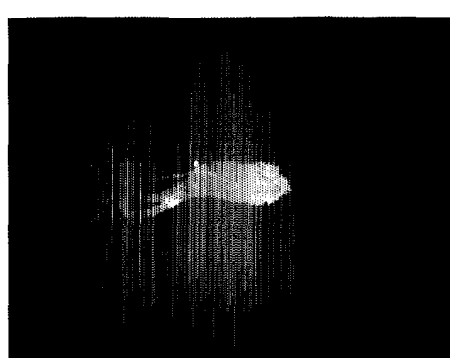
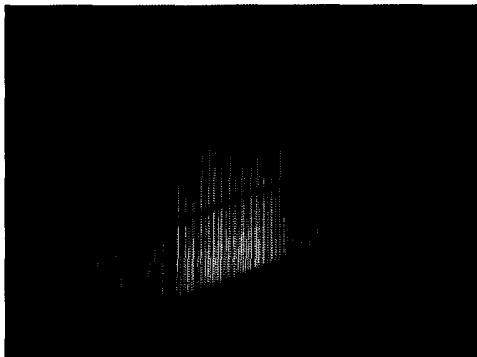


図7

A



B

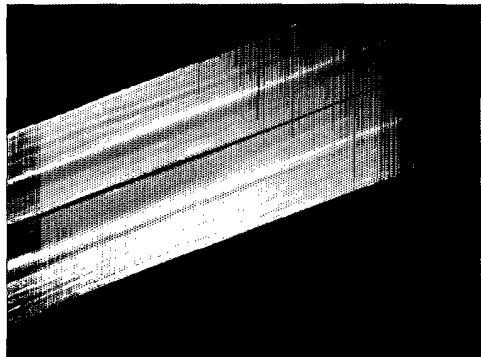
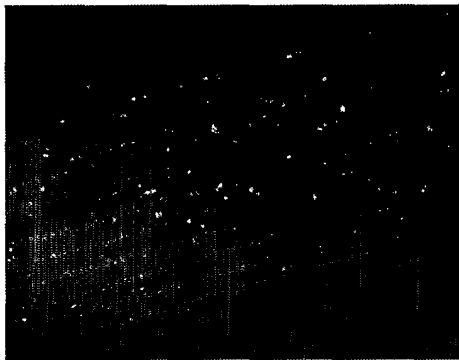


図8

A



B

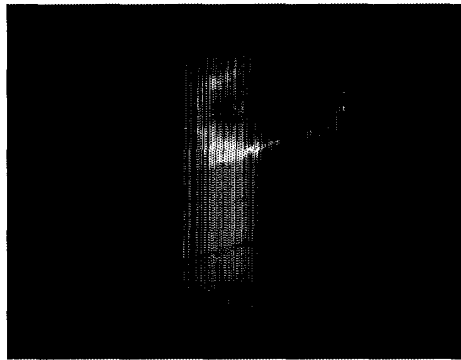
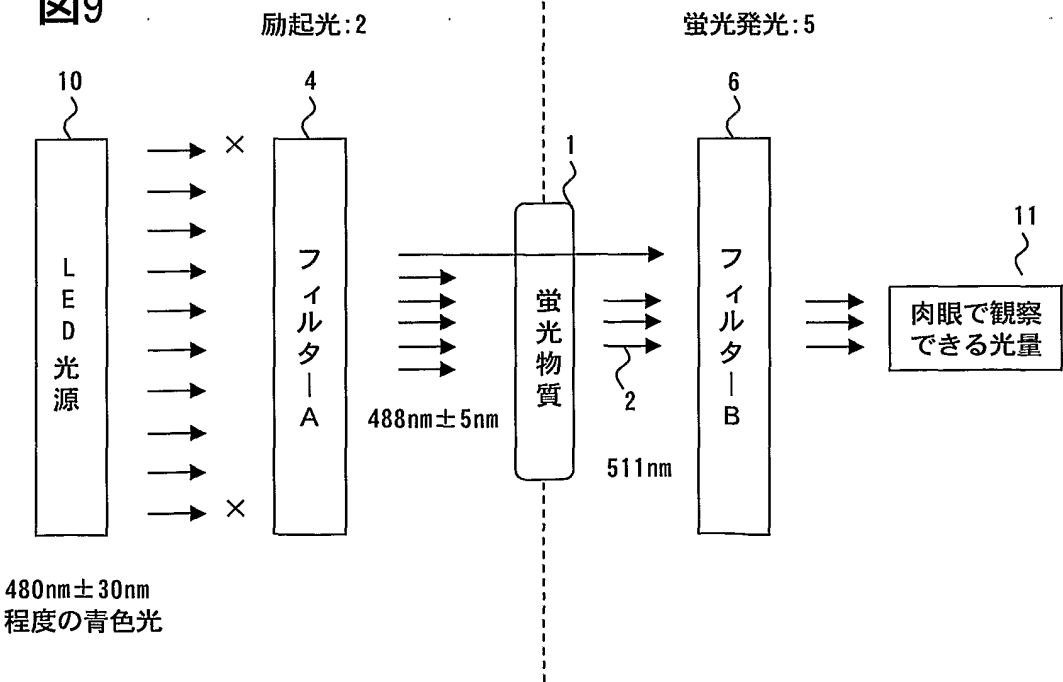


図9



SEQUENCE LISTING

<110> Incorporated Administrative Agency, National Agriculture and Bio-oriented Research Organization

MEIJI SEIKA KAISHA LTD.

<120> Method of screening pesticide to induce resistance against pathogen and plant used for the method

<130> NG006PCT

<160> 6

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1370

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 1

ccggcgaggt gcacgctcga tggcgccgac gtgggggttca cctacgacgg cgacacgagg 60

acatgctcac agagggaccc gcgtcggatt aatttgagcc aagggaacac tggctctttaa 120

tgattatttc tctctcctat tcctccaaaa ataataaaat aatctcaccg gtgtccagca 180

gctaattaac agttttttgt gatgccctac agcaaataca cgttctttacg acatccccta 240

gttaattaca cgtttttcgg acgtcctgta gcaaattttg ccgtataaca attacattac 300

tatcctcatc tttccaaacc aagggttaga agtagagaac ttctctaaaa gtgttttgga 360

atgtaagaac atattttgac acaagttttg aatgctggaa tgataagcaa ttgaaacgg 420

agagatttat caaagttagg acgtacgtgc tctggtacta gccgtacgat gacgcccaat 480

aattcaaccg aagaacaacc acacctatcg atccgaggtg gcaaggtgga aattttgcgt 540
taaagctcaa ttgtccctg gtgaccgtga catcagattg agtatcactg agtctaccaa 600
ttgaaggttg tatatatccg aggtggcaca gtgaaaattg atacgctatg aaaccaaca 660
agattgaaag aaattcataa ttgaattaat acctaccgat aaaggtatt tgtttagacc 720
catctcagag catgacatgt agtcgtacct atcatctaaa agcatttaaa ttagggctctg 780
ttcgatttag attattaaac aaattattat cgttgattac ctaccaattg attatggaaa 840
taaattaaat actttaaaat taaacttaat aaatagttaa aaacaagtga tcaaagcagt 900
agaataaagt ttgttgagag attttttgaa acatagaaca aataatcagt tccaataatc 960
cggcgaataa tctgagaatc agtgttctaa ctgtaaaca agaccatgat ctcatatatg 1020
attattctcc caaccgtcct atatatgcc aggtctcaaa tgtcagctct tctagatgga 1080
accaaagaaa aaaaccctta atttccacag gtcaagccac atgtgatccc caatattcct 1140
acttccagaa ccctagaatt ccacacaaag ttcagcatat gcaaccaatg gagctgagtt 1200
cccaactgca acatttattc tggatgatgt cttcttctcc tcttgccacc ctataaatag 1260
cccatgctac tgctcacctt tgaagcaca gcacaagcac aagcagctct agctagctac 1320
aggcatcagt ggtcagtaga gtgatcagtt gcaactagct agctagttag 1370

<210> 2

<211> 740

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> mutant gene

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(720)

<223>

<400> 2

atg gtg agc aag ggc gag gag ctg ttc acc ggg gtg gtg ccc atc ctg 48
 Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
 1 5 10 15

gtc gag ctg gac ggc gac gtg aac ggc cac aag ttc agc gtg tcc ggc 96
 Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
 20 25 30

gag ggc gag ggc gat gcc acc tac ggc aag ctg acc ctg aag ttc atc 144
 Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
 35 40 45

tgc acc acc ggc aag ctg ccc gtg ccc tgg ccc acc ctc gtg acc acc 192
 Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
 50 55 60

ttc acc tac ggc gtg cag tgc ttc agc cgc tac ccc gac cac atg aag 240
 Phe Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
 65 70 75 80

cag cac gac ttc ttc aag tcc gcc atg ccc gaa ggc tac gtc cag gag 288
 Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
 85 90 95

cgc acc atc ttc ttc aag gac gac ggc aac tac aag acc cgc gcc gag 336
 Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu

100	105	110	
gtg aag ttc gag ggc gac acc ctg	gtg aac cgc atc gag ctg aag ggc		384
Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly			
115	120	125	
atc gac ttc aag gag gac ggc aac atc ctg ggg cac aag ctg gag tac			432
Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr			
130	135	140	
aac tac aac agc cac aac gtc tat atc atg gcc gac aag cag aag aac			480
Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn			
145	150	155	160
ggc atc aag gtg aac ttc aag atc cgc cac aac atc gag gac ggc agc			528
Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser			
165	170	175	
gtg cag ctc gcc gac cac tac cag cag aac acc ccc atc ggc gac ggc			576
Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly			
180	185	190	
ccc gtg ctg ctg ccc gac aac cac tac ctg agc acc cag tcc gcc ctg			624
Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu			
195	200	205	
agc aaa gac ccc aac gag aag cgc gat cac atg gtc ctg ctg gag ttc			672
Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe			
210	215	220	
gtg acc gcc gcc ggg atc act cac ggc atg gac gag ctg tac aag taa			720
Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr His Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys			
225	230	235	
agcggccgcc cgggctgcag			740

<210> 3

<211> 239

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> mutant gene

<400> 3

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
1 5 10 15

Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
20 25 30

Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
35 40 45

Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
50 55 60

Phe Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
65 70 75 80

Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
85 90 95

Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu

100 105 110

Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
115 120 125

Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
130 135 140

Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn
145 150 155 160

Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser
165 170 175

Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
180 185 190

Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu
195 200 205

Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe
210 215 220

Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr His Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
225 230 235

<210> 4

<211> 1020

<212> DNA

<213> *Oryza sativa*

<400> 4

cacctcctgt cgggtggcggg gccccccaac cctaacccta gatcggtcgg aggtgggtag 60

gggcgcgggtg ggggtggcag cgatTTTTTT tttgtttatg gagatgattt ttacaggcgg 120

gtgactgggc cgccaggcga ttgctttcag gcggactact cccccgccgg taaaaatagt 180

ttttggccgc ctgaaaatac tatttttgta agagtgtagt ttagtataga attgaacata 240

accgagtatt ataaatctga atatggcttc tatactacta catgtctaca tctgtctaaa 300

aagactgcag ttttgcactg tacatgtcca acatttaacc gtccatctta tttgaaaaaa 360

aattataatt agtattttta ttgttattag atgataaaac atgaatagta atttatgttt 420

gactattttt ttaaaaattt tttatgaact ttttaaataa gacggacagt aaaacgtaaa 480

taaacaacta catttaaaat gacggaggta gtagtttggg atttatgggat ggataaaata 540

accaccgtgt tagcgagaat tgaatcttgg tcccagcaat gatgacaacc cgacagtcta 600

ttagttagga gcgtatcacg tactttacga acctctcttc tttcttcac ttttcaatta 660

aagctttaca acctaatata acacacagca gatatatatg tccgagataa ttattccaat 720

gtgatataca tgcacacgtg tgagtcgtcg cacgagatgg aaatttcaca atcacgagct 780

agactaactg caccaaagct cccctacgc ccgtacgtag ccgttgcccg gacgggatct 840

gtaattatat gcaatgctat cagacgacga cgggatctag atttttotaga gactgggtacg 900

catgccatca gacgacagga tctagcaatc gacaagtccc ggcttgcagg ttgttcgcaa 960

tatatatata tatagagcag cgcagcggca gtccgagcta ctacgccgag acagtgtggt 1020

<210> 5

<211> 815

<212> DNA

<213> *Oryza sativa*

<400> 5

ttgtaagagt gtagtttagt atagaattga acataaccga gtattataaa tctgaatatg 60

gcttctatac tactacatgt ctacatctgt ctaaaaagac tgcagttttg cactgtacat 120

gtccaacatt taaccgtcca tcttatttga aaaaaaatta taattagtat ttttattggt 180

attagatgat aaaacatgaa tagtaattta tgtttgacta tttttttaa aattttttat 240

gaacttttta aataagacgg acagtaaaac gtaaataaac aactacattt aaaatgacgg 300

aggtagtagt ttggtattat gggatggata aaataaccac cgtgttagcg agaattgaat 360

cttgggtcca gcaatgatga caaccgaca gtctattagt taggagcgta tcacgtactt 420

tacgaacctc tcttctttct tcatcttttc aattaaagct ttacaaccta atataacaca 480

cagcagatat atatgtccga gataattatt ccaatgtgat atacatgcac acgtgtgagt 540

cgtcgcacga gatggaaatt tcacaatcac gagctagact aactgcacca aagctcccc 600

tacgcccgtc cgtagccgtt gcccgacgg gatctgtaat tatatgcaat gctatcagac 660

gacgacggga tctagatttt ctagagactg gtacgcatgc catcagacga caggatctag 720

caatcgacaa gtcccggcct gcaggttggt cgcaatatat atatatatag agcagcgcag 780

cggcagtccg agctactacg ccgagacagt gtggt

815

<210> 6

<211> 1210

<212> DNA

<213> *Oryza sativa*

<400> 6

tatacacggc taacctacac agaatatatc attgatttaa atttcaacag aataaatact	60
tttgtagtga agagtccaac aacacggcat catcccatc ccaatgaggg agaatatgca	120
gtgaaaaaca tatacatata catacataca tacatacata catatatatt ggaaatatga	180
aaaataccgt aggatgaaaa atggacatat gagatttata cacgtaagca cgagtaaaac	240
ttttactctc ataaccatga gtaaaagtgt aacggggagt aaatattttc ctaacaataa	300
cggagacaaa tatgtaccag acgtctatct ttacgtgcta aaatagtttt catatatattt	360
ttttacacta catatcttct tcgcgcaatt accatcacca tgtgcaggaa gcatcagcgg	420
cacaggaacc tcagaagatc cgacaaaacg acgtgcaacc cagggatctg atctccattg	480
ccatgccatg tcatgcaaaa tgcccagatg cgccggttgc gacacgggca ctgcgaacca	540
tccatcgctc cgcttctttc tactgtgtgt ctgtactctt gtgtgttcca gtggttaaggc	600
atccccacta aaatttttca tcctgtcaca tcaaacgttt gaacacctat ataaaatatt	660
aaatataggc taaaaatata taattacata gattgcgaat aatttacgag acgaatcttt	720
taagccta atctccatga ttgataatt aatataatgc tacagtaa ac atttgcta	780
gagggattaa ttaggtttta taaattcatc tcgtagttta ctgatggatt gtgtaattag	840

ttttttatta gtgcctgaac cctatacaac atataatata atagccgatg taacacgtta 900
aaacttttagg ccactggatt taaagcccggt gcagcgtccc aaagctaaag acaaagctta 960
agctcagtgt cagtgtcaca gtgtcagaca cgacgagacg acacgacgac gccccacgtg 1020
caaaccgcag tgcttggcac catcattaac acgccatact taacgctgat tgcacttatt 1080
aattctgtag ccacgagatg atgatggcaa gttcaaacgg agctggaggc agagctagag 1140
tgagactgtg agagtgaaca agagataagc taagctagta cagcaaccag caagaacaaa 1200
gaagagtggc 1210

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004755

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A01H5/00, C12N15/09, C12Q1/02, G01N33/15, G01N33/50,
G01N33/52

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A01H5/00, C12N15/09, C12Q1/02, G01N33/15, G01N33/50,
G01N33/52

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/Geneseq, GenBank/EMBL/DDBJ/Geneseq,
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS), MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 9-270 A (Meiji Seika Kaisha, Ltd.),	1-4, 10-13
Y	07 January, 1997 (07.01.97), (Family: none)	5-9, 14-40
Y	SAKAMOTO, K. et al., Chemical induction of disease resistance in rice is correlated with the expression of a gene encoding a nucleotide binding site and leucine-rich repeats., Plant.Mol.Biol., Vol.40(5), pages 847 to 855 (1999)	5-9, 14-40
Y	Edited by Masamichi NISHIGUCHI et al., "Probenazole Shori ni yori Hatsugen no Henka suru Ine Idenshigun-Microarray ni yoru Kaiseki", Kongetsu no Nogyo, Vol.47, No.10, pages 38 to 42 01 October, 2003 (01.10.03)	5-9, 14-40

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
12 May, 2004 (12.05.04)

Date of mailing of the international search report
01 June, 2004 (01.06.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004755

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 03/000898 A1 (Syngenta Participations AG.), 03 January, 2003 (03.01.03), & EP 1402037 A1 Particularly, SEQ.ID.No.6273	5-9, 14-40
A	Kim, C.Y. et al., Identification of rice blast fungal elicitor-responsive genes by differential display analysis., Mol.Plant-Microbe Interact., Vol.13, No.4, pages 470 to 474 (2000)	1-40

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A01H5/00、C12N15/09、C12Q1/02、G01N33/15、G01N33/50、G01N33/52

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A01H5/00、C12N15/09、C12Q1/02、G01N33/15、G01N33/50、G01N33/52

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/Geneseq、GenBank/EMBL/DDBJ/Geneseq、
WPI(DIALOG)、BIOSIS(DIALOG)、JSTPlus(JOIS)、MEDLINE(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 9-270 A (明治製菓株式会社) 1997. 01. 07	1-4、10-13
Y	(ファミリーなし)	5-9、14-40
Y	Sakamoto, K. et al., Chemical induction of disease resistance in rice is correlated with the expression of a gene encoding a nucleotide binding site and leucine-rich repeats. Plant Mol. Biol., Vol. 40(5), pp. 847-855 (1999)	5-9、14-40

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12. 05. 2004

国際調査報告の発送日

01. 6. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田村 明 照

4 N

8 4 1 2

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	西口正通他著 プロベナゾール処理により発現の変化するイネ遺伝子群—マイクロ アレイによる解析 今月の農業 Vol. 47, No. 10, pp. 38-42 (2003. 10. 01)	5-9、14-40
Y	WO 03/000898 A1 (Syngenta Participations AG) 2003. 01. 03 & EP 1402037 A1 特に、SEQ ID NO 6273	5-9、14-40
A	Kim, C. Y. et al., Identification of rice blast fungal elicitor-responsive genes by differential display analysis. Mol. Plant-Microbe Interact., Vol. 13, No. 4, pp. 470-474 (2000)	1-40