

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成18年4月27日(2006.4.27)

【公表番号】特表2005-531297(P2005-531297A)

【公表日】平成17年10月20日(2005.10.20)

【年通号数】公開・登録公報2005-041

【出願番号】特願2003-576572(P2003-576572)

【国際特許分類】

**C 1 2 N 15/09 (2006.01)**

**A 0 1 H 1/00 (2006.01)**

**A 0 1 H 5/00 (2006.01)**

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

A 0 1 H 1/00 A

A 0 1 H 5/00 A

【手続補正書】

【提出日】平成18年3月8日(2006.3.8)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【発明の詳細な説明】

【発明の名称】タバコ由来シトクロムP450遺伝子のクローニング

【技術分野】

【0001】

本発明は、タバコ(Nicotiana)植物中のシトクロムP450酵素(以後P450およびP450酵素と称する)をコードする核酸配列、およびこの核酸配列を使用して植物の表現型を改変する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

シトクロムP450は、内在性基質および生体異物基質の酸化的、過酸化的、および還元的代謝を含む多様な範囲の化学的に異なる基質の酵素反応を触媒する。植物では、P450は、フェニルプロパノイド、アルカロイド、テルペノイド、脂質、シアン発生性配糖体、グルコシノラートのような、植物生成物の合成を含む生化学的経路に参与する(非特許文献1)。P450ヘム-チオラート蛋白質としても知られているシトクロムP450は、通常、P450-含有モノオキシゲナーゼ系と称される多成分電子移動連鎖において最終酸化酵素として作用する。触媒される特異的反応には、脱メチル化、水酸化、エポキシ化、N-酸化、スルホオキシデーション; N-、S-、およびO-脱アルキル化、脱硫酸化、脱アミノ化、ならびにアゾ、ニトロ、およびN-オキシド群の還元が含まれる。

【0003】

タバコ植物のP450酵素の多様な役割は、フェニルプロパノイド、アルカロイド、テルペノイド、脂質、シアン発生性配糖体、グルコシノラート、および他の化学的存在物の親物質(host)のような様々な植物の代謝産物を生じさせることに参与してきた。近年、一部のP450酵素が、植物中で植物の代謝産物組成に影響を及ぼしうることが明らかになりつつある。例えば、品種改良により選択した脂肪酸のプロファイルを改変することによってある種の植物の香味および芳香を改善することが長い間望まれてきた。しかし、こうした葉の成分のレベルの制御に参与する機構については、ほとんど明らかになって

いない。脂肪酸の改変に関連する P 4 5 0 酵素の下方制御によって、より好ましい葉表現型特性を提供する所望の脂肪酸の蓄積を促進することができる。植物成分における P 4 5 0 酵素の機能および幅広いその役割は依然として発見されつつある。例えば、特定のクラスの P 4 5 0 酵素が、脂肪酸の、果物および野菜の「青葉の」香りの主因である揮発性 C 6 - および C 9 - のアルデヒドおよびアルコールへの分解を触媒することが判明した。他の新規な標的 P 4 5 0 のレベルを変え、タバコ葉中の脂質の組成および関連分解代謝産物を修飾することにより葉成分の特性を強化することができる。葉中のいくつかのこうした成分は、葉の品質特性の成熟を刺激する老化による影響を受ける。さらに、P 4 5 0 酵素が、植物 - 病原体相互作用および耐病性に関与する脂肪酸の改変に機能的役割を果たすことが諸報告に示されてきた。

#### 【 0 0 0 4 】

例えば、P 4 5 0 酵素がアルカロイド生合成に関与することが示唆されてきた。ノルニコチンは、タバコ (*Nicotiana tabacum*) 中に見出される少量のアルカロイドである。N 位置での P 4 5 0 媒介ニコチン脱メチル化、それに続くアシル化反応およびニトロソ化、それにより一連の N - アシルノニコチン (*acylnon nicotine*) および N - ニトロソノルニコチンを生成することによってノルニコチンが産生されることが前提とされてきた。推定上の P 4 5 0 脱メチル化酵素により触媒される N - 脱メチル化は、タバコ中のノルニコチン生合成の主要な供給源であると考えられている。酵素はミクロソームであると考えられているが、今までのところ、ニコチン脱メチル化酵素は首尾よく単離されていないだけでなく、関与する遺伝子も単離されていない。

#### 【 0 0 0 5 】

さらに、P 4 5 0 酵素活性は遺伝的に制御され、環境因子にも強く影響を受けるとの仮説が立てられているが証明されていない。例えば、タバコ中のニコチンの脱メチル化は、植物が成熟期に達するときはかなり増加すると考えられる。さらに、脱メチル化酵素遺伝子は転移因子を含み、これは、存在すると RNA の翻訳を阻害し得ると考えられている。

#### 【 0 0 0 6 】

P 4 5 0 酵素形の多様性、その異なる構造および機能は、この出願に含まれる発明以前のタバコ P 4 5 0 酵素についての研究を非常に困難なものにしてきた。さらに、P 4 5 0 酵素のクローニングは、少なくとも部分的に阻止されてきた。というのは、これらの膜局在化蛋白質は通常低量で存在し、精製するにはしばしば不安定であるからである。

#### 【 0 0 0 7 】

【特許文献 1】米国特許第 4, 945, 050 号明細書

【特許文献 2】米国特許第 5, 141, 131 号明細書

【特許文献 3】米国特許第 5, 177, 010 号明細書

【特許文献 4】米国特許第 5, 104, 310 号明細書

【特許文献 5】欧州特許出願第 0 13 16 24 B 1 号明細書

【特許文献 6】欧州特許出願公開第 1 205 16 号明細書

【特許文献 7】欧州特許第 1 594 18 B 1 号明細書

【特許文献 8】欧州特許出願公開第 1 205 16 号明細書

【特許文献 9】欧州特許第 1 594 18 B 1 号明細書

【特許文献 10】欧州特許出願公開第 1 76, 112 号明細書

【特許文献 11】米国特許第 5, 149, 645 号明細書

【特許文献 12】米国特許第 5, 469, 976 号明細書

【特許文献 13】米国特許第 5, 464, 763 号明細書

【特許文献 14】米国特許第 4, 940, 838 号明細書

【特許文献 15】米国特許第 4, 693, 976 号明細書

【特許文献 16】欧州特許出願公開第 1 167 18 号明細書

【特許文献 17】欧州特許出願公開第 2 907 99 号明細書

【特許文献 18】欧州特許出願公開第 3 205 00 号明細書

【特許文献 19】欧州特許出願公開第 6 046 62 号明細書

- 【特許文献 20】欧州特許出願公開第 6 2 7 7 5 2 号明細書
- 【特許文献 21】欧州特許出願公開第 0 2 6 7 1 5 9 号明細書
- 【特許文献 22】欧州特許出願公開第 0 2 9 2 4 3 5 号明細書
- 【特許文献 23】米国特許第 5 , 2 3 1 , 0 1 9 号明細書
- 【特許文献 24】米国特許第 5 , 4 6 3 , 1 7 4 号明細書
- 【特許文献 25】米国特許第 4 , 7 6 2 , 7 8 5 号明細書
- 【特許文献 26】米国特許第 5 , 0 0 4 , 8 6 3 号明細書
- 【特許文献 27】米国特許第 5 , 1 5 9 , 1 3 5 号明細書
- 【特許文献 28】米国特許第 5 , 3 0 2 , 5 2 3 号明細書
- 【特許文献 29】米国特許第 5 , 4 6 4 , 7 6 5 号明細書
- 【特許文献 30】国際公開第 8 7 / 0 6 6 1 4 号パンフレット
- 【特許文献 31】第 5 , 4 7 2 , 8 6 9 号明細書
- 【特許文献 32】第 5 , 3 8 4 , 2 5 3 号明細書
- 【特許文献 33】国際公開第 9 2 0 9 6 9 6 号パンフレット
- 【特許文献 34】国際公開第 9 3 2 1 3 3 5 号パンフレット
- 【特許文献 35】米国特許第 5 , 5 8 3 , 0 2 1 号明細書
- 【特許文献 36】欧州特許出願公開 8 8 8 1 0 3 0 9 . 0 号明細書
- 【非特許文献 1】Chappel, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 198, 49: 311-343
- 【非特許文献 2】Singleton et al., (1994), Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, second edition, John Wiley and Sons (New York)
- 【非特許文献 3】Caruthers, Methodology of DNA and RNA Sequencing, (1983), Weissman (ed.), Praeger Publishers, New York Chapter 1)
- 【非特許文献 4】Smith and Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981)
- 【非特許文献 5】Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970)
- 【非特許文献 6】Pearson and Lipman Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85: 2444 (1988)
- 【非特許文献 7】Darnell et al. (1990), Molecular Cell Biology, Second Edition Scientific American Books, W. H. Freeman and Company New York for an explanation of codon degeneracy and the genetic code
- 【非特許文献 8】VIGS, Baulcombe, Current Opinions in Plant Biology, 1999, 2: 109-113頁
- 【非特許文献 9】Smith et al., Nature, 2000, 407: 319-320
- 【非特許文献 10】Fire et al., Nature, 1998, 391: 306-311
- 【非特許文献 11】Waterhouse et al., PNAS, 1998, 95: 13959-13964
- 【非特許文献 12】Stalberg et al., Plant Molecular Biology, 1993, 23: 671-683
- 【非特許文献 13】Baulcombe, Current Opinions in Plant Biology, 1999, 2: 109-113
- 【非特許文献 14】Brigneti et al., EMBO Journal, 1998, 17 (22): 6739-6746
- 【非特許文献 15】K. Weising et al., Ann. Rev. Genetics, 22, 421 (1988)

#### 【発明の開示】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0008】

したがって、植物中の P 4 5 0 酵素、およびこれらの P 4 5 0 酵素に関連する核酸配列を同定することが必要とされている。特に、タバコではほんの数種のシトクロムタバコ P 4 5 0 蛋白質しか報告されていない。本明細書に記載の本発明は、その配列同一性に基づき数群の P 4 5 0 種に対応する、実質的な数のシトクロム P 4 5 0 断片の発見を伴っている。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0009】

本発明は、植物の P 4 5 0 酵素を対象とする。さらに、本発明は、タバコ由来の植物 P

４５０酵素を対象とする。さらに、本発明は、その発現がエチレンおよび／または植物の老化によって誘発される、植物中のＰ４５０酵素も対象とする。さらに、本発明は、植物中で例えば酸素添加酵素や脱メチル化酵素などの酵素活性を有する核酸配列、およびこれらの酵素の発現を低減またはサイレンスするためにこれらの配列を使用することを対象とする。さらに、本発明は、低レベルのノルニコチンを示す植物よりも高いレベルのノルニコチンを含む植物中に見出されるＰ４５０酵素に関する。

【００１０】

一態様では、本発明は、配列番号１、３、５、７、９、１１、１３、１５、１７、１９、２１、２３、２５、２７、２９、３１、３３、３５、３７、３９、４１、４３、４５、４７、４９、５１、５３、５５、５７、５９、６１、６３、６５、６７、６９、７１、７３、７５、７７、７９、８１、８３、８５、８７、８９、９１、９３、９５、９７、９９、１０１、１０３、１０５、１０７、１０９、１１１、１１３、１１５、１１７、１１９、１２１、１２３、１２５、１２７、１２９、１３１、１３３、１３５、１３７、１３９、１４１、１４３、１４５および１４７で示される核酸配列を対象とする。

【００１１】

関連する第２の態様では、核酸配列で７５％を超える同一性を含むこれらの断片を、シトクロムＰ４５０のモチーフＧＸＲＸＣＸ（Ｇ／Ａ）に続く第１の核酸から終止コドンまでに対応する領域中の同一性に依って群分けした。その代表的な核酸群およびそれぞれの種を表Ⅰに示す。

【００１２】

第３の態様では、本発明は、配列番号２、４、６、８、１０、１２、１４、１６、１８、２０、２２、２４、２６、２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０、４２、４４、４６、４８、５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６４、６６、６８、７０、７２、７４、７６、７８、８０、８２、８４、８６、８８、９０、９２、９４、９６、９８、１００、１０２、１０４、１０６、１０８、１１０、１１２、１１４、１１６、１１８、１２０、１２２、１２４、１２６、１２８、１３０、１３２、１３４、１３６、１３８、１４０、１４２、１４４、１４６および１４８で示されるアミノ酸配列を対象とする。

【００１３】

関連する第４の態様では、アミノ酸配列で７１％を超える同一性を含むこれらの断片を、シトクロムＰ４５０のモチーフＧＸＲＸＣＸ（Ｇ／Ａ）に続く第１のアミノ酸から終止コドンまでに対応する領域中の互いの同一性に依って群分けした。その代表的なアミノ酸群およびそれぞれの種を表ⅠⅠに示す。

【００１４】

本発明の第５の態様は、配列番号１、３、５、７、９、１１、１３、１５、１７、１９、２１、２３、２５、２７、２９、３１、３３、３５、３７、３９、４１、４３、４５、４７、４９、５１、５３、５５、５７、５９、６１、６３、６５、６７、６９、７１、７３、７５、７７、７９、８１、８３、８５、８７、８９、９１、９３、９５、９７、９９、１０１、１０３、１０５、１０７、１０９、１１１、１１３、１１５、１１７、１１９、１２１、１２３、１２５、１２７、１２９、１３１、１３３、１３５、１３７、１３９、１４１、１４３、１４５および１４７で示される核酸配列の使用である。

【００１５】

関連する第６の態様では、タバコ植物中のＰ４５０酵素の低減または除去を、ＲＮＡウイルス系を使用して一過的に実現することができる。得られた形質転換植物または感染植物を、当業者に通常利用可能な技術を使用して内在性のＰ４５０ＲＮＡ転写物、Ｐ４５０を発現したペプチド、および植物の代謝産物の濃度を分析すること（これらに限定されない）を含めて、表現型の変化について評価する。

【００１６】

重要な第７の態様では、本発明は、Ｐ４５０酵素活性レベルを改変したトランスジェニックタバコ系統の生成も対象とする。本発明に従って、これらのトランスジェニック系統は、ある種の酵素の発現を低減またはサイレンシングし、それによってタバコ内で表現型

に影響を与えるのに効果的な核酸配列を含む。このような核酸配列には、配列番号 1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107、109、111、113、115、117、119、121、123、125、127、129、131、133、135、137、139、141、143、145 および 147 が含まれる。

【0017】

本発明の非常に重要な第 8 の態様では、下方制御能で本発明の核酸を含む植物栽培品種は、対照植物に比べて、改変された代謝産物プロファイルを有するであろう。

【0018】

第 9 の態様では、本発明は、教示されている核酸配列に実質的に核酸同一性を有する遺伝子を含む植物、より好ましくはタバコのスクリーニングを対象とする。本発明の使用は、完全なまたは実質的な同一性を有する核酸配列を含む植物の同定および選択に有利なはずであり、その場合、そのような植物は従来品種またはトランスジェニック品種の品種改良プログラム、突然変異誘発プログラム、または天然に存在する多様な植物集団の一部である。実質的な核酸同一性について植物をスクリーニングすることは、核酸のハイブリッド形成および PCR 分析（それに限定されない）を含めた核酸検出プロトコールと併せて、核酸プローブを使用して植物核酸材料を評価することによって実現することができる。核酸プローブは、配列番号 1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107、109、111、113、115、117、119、121、123、125、127、129、131、133、135、137、139、141、143、145 および 147 に対応する、教示されている核酸配列またはその断片から構成されうる。

【0019】

第 10 の態様では、本発明は、教示されている核酸配列に対応するアミノ酸に実質的な同一性を有する植物遺伝子、より好ましくはタバコの遺伝子の同定を対象とする。cDNA およびそれらの cDNA ゲノム群、ならびにゲノムクローンを含む植物遺伝子、好ましくはタバコ由来のもの、の同定は、核酸ハイブリッド形成および PCR 分析（これらに限定されない）を含めた核酸検出プロトコールと併せて、核酸プローブを使用し植物 cDNA ライブラリーをスクリーニングすることによって実現することができる。核酸プローブは、配列番号 1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107、109、111、113、115、117、119、121、123、125、127、129、131、133、135、137、139、141、143、145 および 147 に対応する核酸配列またはその断片から構成されてよい。

【0020】

別の第 11 の態様では、ペプチドを発現する cDNA 発現ライブラリーは、教示されているアミノ酸配列の一部またはすべてを対象とする抗体を使用してスクリーニングすることができる。このようなアミノ酸配列には配列番号 2、4、8、9、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112、114、11

6、118、120、122、124、126、128、130、132、134、136、138、140、142、144、146および148が含まれる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0021】

定義

定義されていない場合は、本明細書で使用される技術的および科学的用語はすべて、本発明が属する当技術分野の通常の技術者によって一般に理解されている意味と同じ意味を持つ。当業者に本発明で使用する多くの用語の一般的な辞書も提供されている（非特許文献2）。本明細書で言及した特許および刊行物はすべて、参照により本明細書に組み込む。本発明の目的のために以下の用語を以下のように定義する。

【0022】

「酵素活性」は、脱メチル化、水酸化、エポキシ化、N酸化、スルホオキシデーション；N-、S-、およびO-脱アルキル化、脱硫酸化、脱アミノ化、およびアゾ、ニトロ、およびN-オキシド基の還元を含むものとする。「核酸」の語は、1本鎖または2本鎖形の、あるいはセンスまたはアンチセンスのデオキシリボヌクレオチドポリマーまたはリボヌクレオチドポリマーをさし、特に限定しない場合は、天然に存在するヌクレオチドに類似する方式で核酸にハイブリッド形成される、既知の天然ヌクレオチド類似体を包含する。別段の指示がない限り、特定の核酸配列はその相補的配列を含む。「動作可能に結合」、「動作可能な組合せで」かつ「動作可能な順序で」の語は、核酸発現制御配列（プロモータ、シグナル配列、または転写因子結合部位のアレイなど）と第2核酸配列間の機能的な結合であって、発現制御配列が第2の配列に対応する核酸の転写および/または翻訳に作用するものをさす。

【0023】

「組換え」の語は、細胞に関して使用する場合、細胞が異種核酸を複製し、前記核酸を発現し、あるいは異種核酸によってコードされているペプチド、異種ペプチド、または蛋白質を発現することを示唆する。組換え細胞は、天然（非組換え）形細胞では見いだされないセンス形またはアンチセンス形で遺伝子または遺伝子断片を発現することができる。組換え細胞は、天然形細胞で見出される遺伝子を発現することもできるが、その際遺伝子は人工的手段によって修飾され、細胞中に再導入される。

【0024】

「構造遺伝子」は、蛋白質、ポリペプチド、またはその部分をコードするDNAセグメントを含み、かつ転写を開始させる5'配列を除いた遺伝子部分である。構造遺伝子は、代わりに翻訳不能な生成物をコードすることができる。構造遺伝子は、細胞中に通常見出される遺伝子、または細胞中には通常見出されない遺伝子であってよく、あるいは遺伝子を導入した細胞位置でよく、その場合それを「異種遺伝子」と称する。異種遺伝子は、細菌ゲノムまたはエピソーム、真核生物、核またはプラスミドDNA、cDNA、ウイルスDNA、あるいは化学合成DNAを含む当技術分野で公知の任意の供給源から、全体的にまたは部分的に、誘導することができる。構造遺伝子には、生物活性またはその特徴、発現生成物の生体活性またはその化学構造、発現の割合、あるいは発現制御方式に作用できるはずの1つまたは複数の改変を含んでよい。そのような改変には、1つまたは複数のヌクレオチドの突然変異、挿入、欠失および置換が含まれるが、これらに限定されない。構造遺伝子は、連続したコード配列を構成することができ、または適したスプライス連結部によって結合された1つまたは複数のイントロン含むことができる。構造遺伝子は、アンチセンス方向（orientation）中を含め、翻訳可能または翻訳不能であってよい。構造遺伝子は、複数の供給源および複数の遺伝子配列（天然に存在するまたは合成したものであり、合成とは化学合成DNAをさす）に由来する断片の複合体でよい。

【0025】

「由来する」とは、（化学的および/または生物学的）供給源から取る、得る、受ける、たどる、複製する、または伝わることを意味するために使用される。誘導体は、本来の供給源の（置換、付加、挿入、欠失、抽出、単離、突然変異、および複製を含むがそれだ

けには限らない) 化学的または生物学的操作によって生成することができる。

【0026】

DNA 配列に関連して「化学合成」は、ヌクレオチド成分の一部を *in vitro* で組み立てたことを意味する。手作業による DNA の化学合成は、首尾よく確立した手順(非特許文献3)を使用して実現することができ、自動化学合成は、いくつかの市販の機器の1つを使用して実施することができる。

【0027】

比較のための最適な配列のアライメントは、局所的相同性アルゴリズム(非特許文献4)、相同性配列アルゴリズム(非特許文献5)、類似法のための調査(非特許文献6)、これらのアルゴリズムのコンピュータ化[Genetics Computer Group(米国ウィスコンシン州マディソンサイエンス通り575所在)社製米国ウィスコンシン州 Genetics ソフトウェアパッケージ、GAP、BESTFIT、FASTA、および TFASTA]の実施、または精査によって実施することができる。

【0028】

NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschulら、1990年)は、National Center for Biological Information (NCBI、米国メリーランド州ベセスダ)を含むいくつかの供給源、および配列分析プログラム *blastp*、*blastn*、*blastx*、*tblastn*、および *tblastx* と併せて使用するためにインターネット上から入手することができる。NCBIには、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> からアクセスすることができる。このプログラムを使用する配列同一性の決定の仕方についての説明は、[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast\\_help.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_help.html) から利用することができる。

【0029】

アミノ酸配列に適用され、本明細書で使用される「実質的なアミノ酸同一性」または「実質的なアミノ酸配列同一性」の語は、ポリペプチドの特徴を示し、その際、翻訳されたペプチドのシトクロム P450 のモチーフ GXRXCX (G/A) に続く第1のアミノ酸から終止コドンまでに対応する領域にわたる参照グループと比較して、ペプチドが、少なくとも70パーセントの配列同一性を有する配列を含み、アミノ酸配列同一性は80パーセントが好ましく、アミノ酸配列同一性は90パーセントがより好ましく、配列同一性は少なくとも99から100パーセントが最も好ましい。

【0030】

核酸配列に適用され、本明細書で使用される「実質的な核酸同一性」または「実質的な核酸配列同一性」の語は、ポリヌクレオチド配列の特徴を示し、その際、翻訳されたペプチドのシトクロム P450 のモチーフ GXRXCX (G/A) に続く第1の核酸から終止コドンに対応する領域にわたる参照グループと比べて、ポリヌクレオチドは、少なくとも75パーセントの配列同一性を有する配列を含み、アミノ酸配列同一性は81パーセントが好ましく、配列同一性は少なくとも91から99パーセントがより好ましく、配列同一性は少なくとも99から100パーセントが最も好ましい。

【0031】

ヌクレオチド配列が実質的に同一であるという別の兆候は、ストリンジェントな条件下で互いに2個の分子がハイブリッド形成するかどうかである。ストリンジェントな条件とは配列に依存し、異なる状況では違いが生じる。一般に、ストリンジェントな条件は、特異的配列の所定のイオン強度および pH での融点温度 ( $T_m$ ) よりも約5 から約20 低い、通常約10 から約15 低いように選択される。 $T_m$  は、標的配列の50%が、適合するプローブとハイブリッド形成する(所定のイオン強度および pH 下での)温度である。通常、ストリンジェントな条件とは、pH 7で塩濃度が約0.02モル、温度が少なくとも約60 であるような条件であろう。例えば、標準的なサザンハイブリッド形成法の手順では、ストリンジェントな条件は、42 での6倍のSSCによる最初の洗浄と、それに続く少なくとも約55 、通常約60 、しばしば約65 の温度での0.2倍

のSSCによる1回または複数回の追加の洗浄を含む。

【0032】

ヌクレオチド配列がコードするポリペプチドおよび/または蛋白質が実質的に同一である場合、本発明の目的のためのヌクレオチド配列も実質的に同一である。すなわち、1つの核酸配列が第2の核酸配列と本質的に同じポリペプチドをコードする場合、たとえこれらが遺伝暗号により許される縮退の結果としてストリンジェントな条件下でハイブリッドを形成しなくてもこの2つの核酸配列は実質的に同一である(非特許文献7参照)。蛋白質の純度または均一性は、蛋白質試料のポリアクリルアミドゲル電気泳動とそれに続く染色による可視化のような当技術分野で周知のいくつかの手段によって示すことができる。ある種の目的のためには高分解能が求められる可能性がありHPLCまたは同様の精製手段を使用することができる。

【0033】

本明細書では、「ベクター」の語は、DNAセグメントを細胞中に送り込む核酸分子に関して使用される。ベクターは、DNAを複製する働きをすることができ、独立して宿主細胞中で再生することができる。「ビヒクル」の語を「ベクター」と互いに取り替えて使用する場合もある。本明細書では、「発現ベクター」の語は、所望のコード配列、および動作可能に結合されたコード配列を特定の宿主生物中で発現するのに必要な適当な核酸配列を含む組換えDNA分子をさす。通常、原核生物中での発現に必要な核酸配列は、プロモータ、オペレータ(任意選択)、およびリボソーム結合部位を、しばしば他の配列と共に含む。真核生物細胞は、プロモータ、エンハンサ、ならびに停止シグナルおよびポリアダニル化シグナルを使用することが知られている。

【0034】

根を持った完全な遺伝子操作植物を再生する目的で、例えば、*in vivo*接種などのどんな技術によって、または周知の*in vitro*組織培養技術のいずれかによって核酸を植物細胞中に挿入して完全な植物に再生できる形質転換植物細胞を産生することができる。すなわち、例えば、植物細胞中への挿入は病原性または非病原性アグロバクテリウムチュメファシエンス(*Agrobacterium tumefaciens*)で*in vitro*接種することによって行うことができる。他のこのような組織培養技術も利用することができる。

【0035】

「植物組織」は、根、新芽、葉、花粉、種子、腫瘍組織、および、培地中の様々な形の細胞、例えば単細胞、プロトプラスト、胚およびカルス組織を含む(但し、これらに限定されない)分化および未分化植物組織を含む。植物組織は、インプラント(*in planta*)、あるいは器官、組織、または細胞培養物中に存在することができる。

【0036】

本明細書で使用する「植物細胞」は、植物体中の植物細胞、培地中の植物細胞、プロトプラストを含む。一般に、「cDNA」または「相補DNA」は、RNA分子に相補的なヌクレオチド配列を有する1本鎖DNA分子をさす。cDNAは、RNA鋳型に対して酵素、すなわち逆転写酵素の作用によって形成される。

【0037】

核酸配列を得るための戦略

本発明に従って、転化体(*converter*)および非転化体(*non-converter*)タバコ系統のタバコ組織からRNAを抽出した。次いで、抽出RNAを使用してcDNAを作り出した。次いで、2つの戦略を使用して本発明の核酸配列を生成した。

【0038】

第1の戦略では、ポリAが豊富なRNAを植物組織から抽出し、逆転写PCRによってcDNAを製造した。次いで、1本鎖cDNAを使用して、デジェネレートプライマー(*degenerate primer*)にオリゴd(T)リバースプライマー(*reverse primer*)を加えたものを使用しP450特異的PCR集団を作り出した。プライマーの設計は、P450の高度に保存的なモチーフに基づいた。特異的デジェネレートプライマーの例を図1に記載する。適当なサイズの挿入物を含むプラスミド由来の配



列断片をさらに分析した。通常、これらのサイズの挿入物は、どのプライマーを使用したかに応じて約300から約800ヌクレオチドの範囲にあった。

【0039】

第2の戦略では、最初にcDNAライブラリーを構築した。プラスミド中のcDNAを使用して、プラスミド上のデジェネレートプライマーにT7プライマーを加えたものをリバープライマーとして使用し、p450特異的PCR集団を作り出した。第1の戦略と同様に、適当なサイズの挿入物を含むプラスミド由来の配列断片をさらに分析した。

【0040】

高レベルのノルニコチン（転化体）、および検出不可能なレベルのノルニコチンを有する植物系統を産生することが知られているタバコ植物系統を出発物質として使用することができる。

【0041】

次いで、葉を植物から取って、エチレンで処理して本明細書で定義したP450酵素活性を活性化することができる。全RNAを当技術分野で知られている技術を使用し抽出する。次いで、図1に記載したオリゴd(T)プライマーと共にPCR(RT-PCR)を使用してcDNA断片を生成することができる。次いで、cDNAライブラリーを構築することができる、本明細書の実施例により完全に記載した。

【0042】

P450型酵素の保存領域をデジェネレートプライマー（図73）の鋳型として使用することができる。デジェネレートプライマーを使用し、P450特異的バンドをPCRによって増幅することができる。P450様酵素を示すバンドは、DNA配列決定によって同定することができる。適当な候補を同定するためにBLASTサーチ、アライメント、または他のツールを使用してPCR断片を特徴付けることができる。

【0043】

同定された断片からの配列情報を使用してPCRプライマーを開発することができる。これらのプライマーを使用して、エチレン処理された転化体および非転化体植物組織のRNA'sから定量的RT-PCRを実施する。転化体系統に由来する適当なサイズのDNAバンド（300～800bp）、または転化体系統中でより高い発現を示すより高密度のバンドのみを、さらなる特等付けに使用した。得られたクローンすべてについて差分発現（differential expression）を検査するために大規模サザンリバー分析を行った。本発明のこの態様では、クローン化挿入物すべてをスクリーニングするために、異なる組織由来の標識全cDNA'sをプローブとして使用し、こうした大規模リバーサザン検定を実施してクローン化DNA断片とハイブリッド形成させることができる。

【0044】

非放射性ノーザンプロッティング検定も使用してクローンP450断片を特徴付けた。

【0045】

ウイルス誘発遺伝子サイレンシング技術を使用することによって上記のように同定された核酸配列を検査することができる（非特許文献8）。

【0046】

本発明の別の態様では、RNA干渉技術（RNAi）を使用して、さらに本発明のタバコ植物中のシトクロムP450酵素活性を特徴付ける。この技術を説明する以下の参考文献を参照により本明細書に組み込む。（非特許文献9、非特許文献10、非特許文献11、非特許文献12、非特許文献13、非特許文献14）。RNAi技術、アンチセンス技術、または記載した様々な他の方法を使用して植物を形質転換することができる。

【0047】

外来遺伝物質を植物細胞に導入し、導入遺伝子を安定的に維持し発現する植物を得るためのいくつかの技術がある。このような技術には、ミクロ粒子上にコートされた遺伝物質を直接細胞中に加速させることが含まれる（Cornellの特許文献1、Dowellancocoの特許文献2）。アグロバクテリウム技術を使用し、植物を形質転換することがで

きる（トレド大学の特許文献3、Texas A & Mの特許文献4、Schilperoootの特許文献5、Schilperoootの特許文献6、Schilperoootの特許文献7、Schilperoootの特許文献8、Schilperoootの特許文献9、Schilperoootの特許文献10、Schilperoootの特許文献11、Schilperoootの特許文献12、Schilperoootの特許文献13、Schilperoootの特許文献14、Schilperoootの特許文献15、Max Planckの特許文献16、Max Planckの特許文献17、Max Planckの特許文献18、Japan Nicotianaの特許文献19、Japan Nicotianaの特許文献20、Ciba Geigyの特許文献21、Ciba Geigyの特許文献22、Ciba Geigyの特許文献23、Calgeneの特許文献24、Calgeneの特許文献25、Agracetusの特許文献26、Agracetusの特許文献27参照）。他の形質転換技術にはウイスカ（whiskers）の技術が含まれる（Zenecaの特許文献28、Zenecaの特許文献29参照）。植物を形質転換するには電気穿孔法技術も使用されてきた（Boyce Thompson Instituteの特許文献30、Dekalbの特許文献31、Dekalbの特許文献32、PGSの特許文献33、PGSの特許文献34参照）。これらの形質転換特許および刊行物すべてを参照により組み込む。植物を形質転換するための多数の技術に加えて、外来遺伝子と接触する組織の型も変化してよい。このような組織には、胚発生組織、カルス組織Ⅰ型およびⅡ型、胚軸、分裂組織などが含まれるがそれだけには限らないはずである。植物組織はほぼすべて、当技術分野内の適する技術を使用し脱分化中に形質転換することができる。

#### 【0048】

植物に導入される外来遺伝物質には選択マーカーを含めてよい。特定のマーカーについての選択は当業者の裁量によるが、選択マーカーとして機能し得るはずの本明細書に掲載していない他の遺伝子に加えて、以下の選択マーカーのいずれかを使用することができる。このような選択マーカーには、それだけには限らないが、抗生物質のカナマイシン、ネオマイシン、およびG418耐性をコードするトランスポゾンTn5のアミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ遺伝子（AphII）、並びに、グリホサート；ハイグロマイシン；メトトレキサート；フォスフィノスリシン（bar）；クロロスルフロンのようなイミダゾリノン、スルホニルウレアおよびトリアゾロピリミジン除草剤；プロモキシニル、ダラボンなどの耐性または耐容性（tolerance）をコードする遺伝子が含まれる。

#### 【0049】

選択マーカーの他にレポーター遺伝子の使用も所望され得る。時には選択マーカーを用いずにレポーター遺伝子を使用してもよい。通常、レポーター遺伝子は受容生物体または組織中で存在または発現されない遺伝子である。通常、レポーター遺伝子はいくつかの表現型の違いまたは酵素特性を提供する蛋白質をコードする。そのような遺伝子の例が非特許文献15に提供されている。これを参照により本明細書に組み込む。好ましいレポーター遺伝子には、それだけには限らないが、グルクロニダーゼ（GUS）遺伝子およびGFP遺伝子が含まれる。

#### 【0050】

一度植物組織に導入されると当技術分野で周知のどんな手段によっても構造遺伝子の発現を検定することができ、転写されたmRNA、合成された蛋白質、または生じる遺伝子サイレンシングの量として発現を測定することができる（特許文献35参照。これを参照により本明細書に組み込む）。植物組織のin vitro培養やいくつかの場合では完全な植物への再生についての技術が知られている（特許文献36参照）。導入された発現複合体を商業的に有用な栽培品種に変形させる手順は当業者に周知である。

#### 【0051】

一度、所望のレベルのP450酵素を発現する植物細胞が得られたならば、当技術分野で公知の方法や技術を使用し、そこから植物組織および完全な植物を再生することができ

る。次いで、再生植物を従来の手段によって増殖し、導入遺伝子を従来 of 植物品種改良技術によって他の株や栽培品種に移すことができる。

#### 【0052】

以下の実施例は、本発明を実施する方法を例示し、そして、以下の例は、添付の特許請求の範囲で定義される本発明の範囲の例示であるが、本発明の範囲を限定するものではない理解されるべきである。

#### 【実施例】

#### 【0053】

##### (実施例1)

植物組織の発生およびエチレン処理

植物の生長

植物を鉢に播種し温室で4週間栽培した。4週経った実生を個々の鉢に移植し、温室で2カ月間生長させた。生長中、植物には1日に2度、150ppmのNPK肥料を含む水を与えた。育った青葉を植物から取って、以下に記載するエチレン処理を行った。

#### 【0054】

細胞系78379

ケンタッキー大学が公表したバーレー系統のタバコ系統78379を植物材料源として使用した。タバコ育成の当技術分野における標準として100株の植物を栽培し、移植し、識別番号(1~100)を付した。薦められた通りに施肥および農場管理を行った。

#### 【0055】

100株の植物の4分の3が、ニコチンの20から100%をノルニコチンへ転化させた。100株の植物の4分の1が、ニコチンの5%未満をノルニコチンへ転化させた。植物番号87は最小(2%)の転化であったが、植物番号21は100%の転化であった。3%未満を転化する植物を非転化体として分類した。植物番号87および植物番号21の自家受粉種子、および交配種子(21×87および87×21)を作成して遺伝子や表現型の差異を研究した。自家受粉体21由来の植物は転化体であり、87由来自家受粉体の99%は非転化体であった。87由来植物のその他の1%は、低転化率(5~15%)を示した。相互交配由来植物はすべて転化体であった。

#### 【0056】

細胞系4407

バーレー系統のタバコ系統4407を植物材料源として使用した。均一で代表的な植物(100株)を選択しタグを付けた。100株の植物のうち97株は非転化体であり3株は転化体であった。植物番号56は最小量の転化率(1.2%)であり植物番号58は最高レベルの転化率(96%)であった。これら2つの植物を用いて自家受粉種子および交配種子を作成した。

#### 【0057】

自家受粉58由来の植物を、転化体：非転化体比約3：1で分離した。58-33および58-25をそれぞれ、ホモ接合性転化体植物系統および非転化体植物系統として同定した。58-33の転化が安定していることは、その次世代の子孫を分析することによって裏付けられた。

#### 【0058】

エチレン処理手順

2、3カ月間温室で生長させた植物から青葉を取って0.3%エチレン溶液[Prep銘柄のエテホン(ローヌブランク社)]を噴霧した。噴霧した各葉を加湿器を備えた発酵棚(curing rack)中に吊るしプラスチックで被覆した。処理中、試料葉にエチレン溶液を定期的に噴霧した。エチレン処理から約24~48時間後、RNAを抽出するために葉を採取した。代謝組成分析用に別の副試料を採取して葉の代謝産物濃度、および様々なアルカロイドなどのより特異的な注目成分の濃度を測定した。

#### 【0059】

一例として、アルカロイド分析は以下のように実施できる。試料(0.1g)を、2N

のNaOH 0.5 ml、ならびに内部標準としてキノリンおよびメチルト-ブチルエーテルを含む抽出溶液5 mlと共に150 rpmで振盪した。FID検出器を備えたHP 6890 GCで試料を分析した。検出器および注入器には温度250℃を利用した。5%フェノールおよび95%メチルシリコンで架橋した溶融シリカからなるHPカラム(30 m - 0.32 mm - 1.0 μm)を温度勾配毎分10℃で110~185℃にて使用した。キャリアガスとしてヘリウムを使用し100 ml/min、流量1.7 cm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup>、分割比40:1、注入量2.1 μlでカラムを運転した。

#### 【0060】

##### (実施例2)

##### RNAの単離

RNA抽出のために温室栽培で2カ月経った植物から得た中くらいの葉を記載の通りエチレンで処理した。0時間目および24~48時間目の試料をRNA抽出用に使用した。場合によっては、老化過程下の葉試料を、頭状花を除去した後10日目の植物から取った。これらの試料も抽出に使用した。Rneasy Plant Mini Kit(キアゲン、米国カリフォルニア州バレンシア)を使用し、メーカーのプロトコールに従って全RNAを単離した。

#### 【0061】

DEPC処理乳鉢および乳棒を使用し、液体窒素下で組織試料を磨り潰して微粉末にした。約100 mgの磨り潰した組織を1.5 mlの滅菌エッペンドルフチューブに移した。全試料が採取されるまでこのサンプル試験管を液体窒素中に置いた。次いで、キットに装備されている緩衝液RLT 450 μlを(-メルカプトエタノールの添加と共に)個々の試験管に加えた。試料を勢いよくボルテックスし、56℃で3分間培養した。次いで、溶解物を2 mlの採取用試験管に嵌めたQIAshredder スピンカラムに塗布し最大速度で2分間遠心分離した。通過液を採取し、0.5 ml容量のエタノールを透明な溶解物に加えた。試料を十分混合し、2 mlの採取用試験管に置かれたRneasy ミニスピニングカラムに移した。試料を10,000 rpmで1分間遠心分離した。次に、ピペットで緩衝液RW1 700 μlをRneasy カラム上に量り取り、10,000 rpmで1分間遠心分離した。ピペットで緩衝液RPEを新たな採取用試験管内のRneasy カラム上に量り取り、10,000 rpmで1分間遠心分離した。再度、緩衝液RPEをRneasy スピンカラムに加え、最速で2分間遠心分離してメンブレンを乾燥した。残存していたエタノールも除去するために分離型採取用試験管中にメンブレンを置き最速でさらに1分間遠心分離した。Rneasy カラムを1.5 mlの新たな採取用試験管中に移し、RNAase 不含水40 μlをピペットで直接Rneasy メンブレン上に取った。この最終溶解用試験管を10,000 rpmで1分間遠心分離した。全RNAの質および量を変性ホルムアルデヒドゲルおよび分光光度計によって分析した。

#### 【0062】

Oligotex ポリA RNA 精製キット(キアゲン)を使用し、メーカーのプロトコールに従ってポリ(A) RNAを単離した。最大容量250 μl中約200 μgの全RNAを使用した。250 μlの容量の緩衝液OBB、およびOligotex 懸濁液15 μlを全RNA 250 μlに加えた。内容物をピペティングによって完全に混合し、加熱したブロック上70℃で3分間培養した。次いで、室温で約20分試料を置いた。Oligotex:mRNA複合体を最速2分間の遠心分離によってペレット化した。上清50 μlを残しすべてをマイクロ遠心管から除去した。さらに試料をOBB緩衝液によって処理した。ボルテックスによってOligotex:mRNAペレットを400 μlの緩衝液OW2に再懸濁した。新たな試験管中に置いた小スピニングカラム上にこの混合物を移し、最速で1分間遠心分離した。スピニングカラムを新たな試験管に移し、400 μlの追加の緩衝液OW2をカラムに加えた。次いで、試験管を最速で1分間遠心分離した。スピニングカラムを最終の1.5 mlマイクロ遠心管に移した。温めた(70℃)緩衝液OEB 60 μlで試料を溶出させた。ポリA生成物を変性ホルムアルデヒドゲルおよび分光分析によって分析した。

## 【0063】

## (実施例3)

## 逆転写PCR

SuperScript逆転写酵素を使用し、メーカーのプロトコール（インビトロジェン、米国カリフォルニア州Carlsbad）に従って第1鎖cDNAを生成した。ポリAに富むRNA/オリゴdTプライマー混合物は、全RNA 5 µg未満、10 mMのdNTP混合物 1 µl、オリゴd(T)<sub>12-18</sub> (0.5 µg/µl) 1 µl、および10 µlまでのDEPC処理水から構成された。各試料を65 °Cで5分間培養し、次いで少なくとも1分間氷上に置いた。反応混合物は、以下の成分のそれぞれを次の順序で加えることによって調製した：10X RT緩衝液 2 µl、25 mMのMgCl<sub>2</sub> 4 µl、0.1 MのDTT 2 µl、およびRNase OUT組換え型RNase阻害剤 1 µl。反応混合物 9 µlをピペットで取って各RNA/プライマー混合物に加え、穏やかに攪拌した。これを42 °Cで2分間培養し、SuperScript II RT 1 µlを各試験管に加えた。試験管を42 °Cで50分間を培養した。反応を70 °Cで15分間停止させ、氷上で冷却した。遠心分離によって試料を採取し、RNase H 1 µlを各試験管に加え、37 °Cで20分間培養した。200ピコモルのフォワードプライマー（forward primer）（図73、配列番号149～156と同様のデジェネレートプライマー）および100ピコモルのリバースプライマー（18 ntオリゴd(T)とそれに続く1個の任意の塩基の混合物）を用いて2回目のPCRを実施した。

## 【0064】

反応条件は94 °Cで2分間であり、次いで94 °Cで1分間、60 °Cで2分間、72 °Cで3分間で40サイクルのPCRを実施し、さらに72 °Cで10分間延長した。

## 【0065】

増幅試料 10マイクロリットルを1%アガロースゲルを使用し、電気泳動によって分析した。正確なサイズの断片をアガロースゲルから精製した。

## 【0066】

## (実施例4)

## PCR断片集団の生成

実施例3のPCR断片をメーカー使用説明書に従ってpGEM-Tイーザーベクター（プロメガ、米国ウィスコンシン州マディソン）中に結合した。結合生成物をJM109コンピテント細胞に形質転換し、青/白選択するためにLB培地プレート上に播種した。コロニーを選択し、LB培地 1.2 mlを入れた96穴プレート中で終夜37 °Cで増殖した。選択したコロニーすべてについて凍結ストックを生成した。Wizard SVミニプレップキット（プロメガ）と共にベックマン社製Biocheck 2000ミニプレップロボティックスを使用し、プレートからプラスミドDNAを精製した。プラスミドDNAを水 100 µlで溶出し、96穴プレート中に保存した。プラスミドをEcoRIによって消化し、1%アガロースゲルを使用し分析してDNA量および挿入物のサイズを確認した。CEQ2000シーケンサ（ベックマン、米国カリフォルニア州Fullerton）を使用し400～600 bpの挿入物を含むプラスミドを配列決定した。BLASTサーチによってGenBankデータベースを用いて配列をアライメントした。P450関連断片を同定し、さらに分析した。

## 【0067】

## (実施例5)

## cDNAライブラリーの構築

以下のようにエチレン処理した葉から全RNAを調製することによりcDNAライブラリーを構築した。最初に、改変した酸フェノールおよびクロロホルム抽出プロトコールを使用しタバコ系統58-33のエチレン処理した葉から全RNAを抽出した。プロトコールは、磨り潰し続いて抽出緩衝液（100 mMのトリス塩酸、pH 8.5、200 mMのNaCl、10 mMのEDTA、0.5% SDS）5 ml中でボルテックスし、これにフェノール（pH 5.5）5 mlおよびクロロホルム 5 mlを加えた組織 1グラムを使用す

るように手直した。抽出試料を遠心分離し上清を保存した。上清が透明に見えるまでこの抽出ステップをさらに2、3回繰り返した。クロロホルム約5mlを加えて微量のフェノールを除去した。3倍容量のETOHおよび1/10容量の3MのNaOAc(pH5.2)を加え、-20℃で1時間保存することによって合わせた上清画分からRNAを沈殿させた。RNAをCorexガラス容器に移した後、4、9,000RPMで45分間遠心分離した。ペレットを70%エタノールで洗浄し、4、9,000RPMで5分間遠心した。ペレットを乾燥した後、ペレット化したRNAをRNase不含有水0.5mlに溶解した。ペレット化したRNAをRNase不含有水0.5mlに溶解した。全RNAの質および量を、それぞれ、変性ホルムアルデヒドゲルおよび分光光度計によって分析した。

#### 【0068】

オリゴ(dT)セルロースプロトコール(インビトロジェン)およびマイクロ遠心機スピナラム(インビトロジェン)を以下のプロトコールによって使用し、得られた全RNAをポリA+RNAについて単離した。約20mgの全RNAを2度精製して高品質ポリA+RNAを得た。変性ホルムアルデヒドゲル、続いて既知の全長遺伝子のRT-PCRを実施することによってポリA+RNA生成物を分析し、mRNAが高品質であることを確実にした。さらに、エチレン処理した非転化体の葉、ゼロ時間エチレン処理した転化体の葉、およびエチレン処理した転化体の葉に由来するポリA+RNAについて、プローブとしてp450全長を使用しノーザン分析を実施した。試料ごとにポリA+RNA1.8μgを使用し、方法はメーカー使用説明書に提供されているプロトコール(KPL社製RNA検出ノーザンプロットングキット、米国メリーランド州Gaithersburg)に基づいた。移動緩衝液として20倍SSCを使用し、RNAを含むゲルを終夜移動させた。

#### 【0069】

次に、cDNA合成キット、ZAP-cDNA合成キット、およびZAP-cDNA Gigapack IIゴールドクロニングキット(ストラタジーン、米国カリフォルニア州La Jolla)を使用し、ポリA+RNAを鋳型として使用してcDNAライブラリーを作成した。この方法は、メーカーのプロトコールの指示通りに従うことを必要とする。ポリA+RNA約8μgを使用してcDNAライブラリーを構築した。一次ライブラリーの分析によって約 $2.5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$  pfuであることが明らかになった。IPTGおよびX-galを使用し、相補性検定によりライブラリーの品質背景試験(quality background test)を完了し、そこでは組換えプラークが背景反応の100倍を超えて発現した。

#### 【0070】

ランダムPCRによるライブラリーの一層定量的な分析によって、挿入cDNAの平均サイズは約1.2kbであることが示された。方法は、以下のように2段階PCR法を使用した。第1段階では、P450断片から得られた予備配列情報に基づいてリバースプライマーを設計した。設計したリバースプライマーおよびT3(フォワード)プライマーを使用してcDNAライブラリーから対応遺伝子を増幅した。PCR反応産物をアガロース電気泳動にかけ、対応する高分子量バンドを切り取り、精製し、クローン化し、配列決定した。第2段階では、リバースプライマー(P450の3'UTRから設計)と共に、フォワードプライマーとしてP450の5'UTRまたは開始コード領域から設計した新規なプライマーを続くPCRに使用してP450クローン全長を得た。

#### 【0071】

リバースプライマーを除いて実施例3に記載したように、構築したcDNAライブラリーからPCR増幅によってP450断片を生成した。cDNA挿入物の下流のプラスミドに位置するT7プライマー(図7.3を参照のこと)をリバースプライマーとして使用した。実施例4に記載したようにPCR断片を単離し、クローン化し、配列決定した。

#### 【0072】

前述の発明の詳細な説明を考察するとき当業者には本発明の実施において多数の修正お

よび変形が思い浮かぶと予想される。したがって、そのような修正および変形は添付の請求項の範囲内に含まれるものとする。

【0073】

(実施例6)

クローン化断片の特徴付け - 逆 (reverse) サザンブロットティング分析

上記実施例で同定した P450 クローンすべてについて非放射性大規模逆サザンブロットティング検定を実施して差分発現を検出する。異なる P450 クラスタのうちでは発現レベルは非常に異なることが観察された。さらに、高発現のものについてリアルタイム検出を行った。

【0074】

非放射性サザンブロットティング手順を以下のように行った。

【0075】

1) 実施例2に記載したようにキアゲン Rnaeasy キットを使用し、エチレン処理した転化体の葉 (58-33) および非転化体の葉 (58-25) から全 RNA を抽出した。

【0076】

2) 上記ステップで生成したポリ A 富化 RNA 由来の 1 本鎖 cDNA をビオチンテール標識することによってプローブを生成した。プライマーとしてビオチン標識 (biotin allylated) オリゴ (dT) (プロメガ) を使用したことを除き、実施例3に記載した通り転化体および非転化体の全 RNA (インビトロジェン) の RT-PCR によってこの標識 1 本鎖 cDNA を生成した。これらをプローブとして使用してクローン化 DNA とハイブリッド形成した。

【0077】

3) プラスミド DNA を制限酵素 EcoR1 で消化しアガロースゲル上を走らせた。同時に、ゲルを乾燥し、2 枚のナイロンメンブレン (Biodyne B) に移した。1 枚のメンブレンを転化体プローブと、他方を非転化体プローブとハイブリッド形成した。ハイブリッド形成の前にメンブレンを UV 架橋した (自動架橋セッティング、254 nm、ストラタジーン、Stratallinker)。

【0078】

あるいは、プライマーとして p-GEM プラスミドの両腕 T3 および SP6 に位置する配列を使用し、挿入物を各プラスミドから PCR 増幅した。実施の準備が整った 96 穴アガロースゲル上で走らせることによって PCR 生成物を分析した。確認した挿入物を 2 枚のナイロンメンブレン上にプロット (dotted) した。1 枚のメンブレンを転化体プローブと、他方を非転化体プローブとハイブリッド形成した。

【0079】

4) メーカー使用説明書 (Enzo Diagnostics, Inc、米国ニューヨーク州 Farmingdale) であるが、厳格な洗浄をするように修正したものに従ってメンブレンをハイブリッド形成し、洗浄した。メンブレンをハイブリッド形成緩衝液 (2 倍 SSC 緩衝化ホルムアミド、洗浄剤、およびハイブリッド形成促進剤を含む) により 42 °C で 30 分間予備ハイブリッド形成し、変性プローブ 10 µl により 42 °C で終夜ハイブリッド形成した。次いで、1 倍のハイブリッド形成洗浄用緩衝液によってメンブレンの洗浄を室温で 10 分を 1 度、および 68 °C で 15 分を 4 度行った。メンブレンは検出の準備が整った。

【0080】

5) メーカー検出手順 (Enzo Diagnostics, Inc.) に記載されている通り、アルカリフォスファターゼ標識とそれに続く NBT / BCIP 比色検出によって、洗浄したメンブレンを検出した。メンブレンを 1 倍のブロッキング液により室温で 1 時間ブロックし、1 倍の検出試薬により 10 分間 3 度洗浄し、1 倍の予備発色反応緩衝液により 5 分間 2 度洗浄し、次いでドットが出現するまで発色液中で 30 ~ 45 分間プロットを発色させた。試薬はすべて業者から得た (Enzo Diagnostics, Inc

c)。

【0081】

場合によっては、非転化体系(58-25)および転化体系(58-33)由来の全RNAのものについて、P450断片に特異的プライマーを使用し、1段階RT-PCR(ギブコキット、米国カリフォルニア州Carlsbad)を実施した。比較RT-PCRを以下のように行った。

【0082】

1)実施例2に記載したようにエチレン処理した転化体の葉(58-33)および非転化体の葉(58-25)から全RNAを抽出した。

【0083】

2)実施例2に記載したようにキアゲンキットを使用し全RNAからポリ(A)RNAを抽出した。

【0084】

3)クローン化P450に特異的プライマーを使用しメーカー手順(Invitrogen)に従って1段階RT-PCRを行った。ポリAに富むRNAを2倍の反応混合物25 $\mu$ l、10 $\mu$ Mのセンスプライマー1 $\mu$ l、10 $\mu$ Mのアンチセンスプライマー1 $\mu$ l、RT/白金taqMix 1 $\mu$ l、および水50 $\mu$ lまでと共に反応混合物に加えた。反応条件は、50 $^{\circ}$ Cで20分間、次いで94 $^{\circ}$ Cで2分間であり、94 $^{\circ}$ Cで30秒間、55 $^{\circ}$ Cで30秒間、70 $^{\circ}$ Cで1分間で40サイクルのPCRを実施し、さらに72 $^{\circ}$ Cで10分間延長した。増幅試料10マイクロリットルを1%アガロースゲルを使用し、電気泳動によって分析した。

【0085】

(実施例7)

クローン化断片の特徴付け - ノーザンブロット分析

サザンブロット分析の代わりに、一部のメンブレンをノーザンブロットング検定の例で記載したようにハイブリッド形成し検出した。以下のように、ノーザンハイブリッド形成を使用し、タバコ中に差分的に発現したmRNAを検出した。

【0086】

第1ステップ、プローブの調製：クローン化p450 DNA断片からプローブを調製するためにランダムプライミング法(ランダムプライマーDNAピオチン標識キット、KPL)を使用した。次の成分：DNA鋳型(使用前に水浴中で5~10分間煮沸し、氷上で冷却)0.5 $\mu$ g、1倍のランダムプライマー液、1倍のdNTP混合物、クレノー10単位を混合し、水を加えて反応物を50 $\mu$ lにした。混合物を37 $^{\circ}$ Cで1から4時間培養した。反応を200 mMのEDTA 2 $\mu$ lで停止させた。使用前に95 $^{\circ}$ Cで5分間培養することによってプローブを変性した。

【0087】

第2ステップ、試料調製：エチレン処理および未処理の新鮮な葉、ならびに老化した葉からRNA試料を調製した。場合によってはポリA富化RNAを使用した。全RNA約15 $\mu$ gまたはmRNA 1.8 $\mu$ g(RNAおよびmRNAの抽出方法は実施例5に記載)をDEPC H<sub>2</sub>O(5~10 $\mu$ l)と等容量にした。同容量のローディングバッファ(1倍のMOPS、18.5%ホルムアルデヒド、50%ホルムアミド、4%フィコール400、プロモフェノール青)、および臭化エチジウム(0.5 $\mu$ g/ $\mu$ l)0.5 $\mu$ lを加えた。試料を90 $^{\circ}$ Cで5分間加熱し、氷上で冷却した。

【0088】

第3ステップ、電気泳動によるRNAの分離：ホルムアルデヒドゲル(1%アガロース、1倍のMOPS、0.6 Mホルムアルデヒド)上を1倍のMOP緩衝液(0.4 Mのモルホリノプロパンスルホン酸、0.1 Mの酢酸Na-3倍H<sub>2</sub>O、10 mMのEDTA、pH 7.2にNaOHで調整)により試料を電気泳動させた。10倍のSSC緩衝液(1.5 MのNaCl、0.15 Mのクエン酸Na)中、キャピラリー法によりHybond-N+メンブレン(ナイロン、アマシャムファルマシアバイオテック)にRNAを24時



間移した。ハイブリッド形成前にRNA試料付きメンブレンをUV架橋した（自動架橋セッティング、254nm、ストラタジーン、Stratalinker）。

【0089】

第4ステップ、ハイブリッド形成：予備ハイブリッド形成緩衝液（5倍のSSC、50%ホルムアミド、5倍のデンハート液、1%SDS、100μg/ml熱変性させ切断（sheared）した非相同のDNA）5～10mlにより42℃で1～4時間メンブレンを予備ハイブリッド形成した。古い予備ハイブリッド形成緩衝液を廃棄し新たな予備ハイブリッド形成緩衝液およびプローブを加えた。ハイブリッド形成を42℃で終夜実施した。メンブレンを室温で2倍のSSCにより15分間洗浄、続いて65℃で2倍のSSC、0.1%SDSにより2度洗浄、0.1倍のSSCにより最後の洗浄、またはさらに65℃で0.1倍のSDSにより洗浄（任意）を行った。

【0090】

第5ステップ、検出：AP-ストレプトアビジンおよびCDP-Starを使用してハイブリッド形成シグナル（KPL社製DNA検出ノーザンプロットティングキット）を検出した。メンブレンを室温で30分間1倍の検出ブロック液によりブロックした。ブロッキング緩衝液を廃棄し、AP-SA（1：10，000）を含む新たな1倍の検出ブロック液中室温で1時間メンブレンを培養した。メンブレンを1倍のホスファターゼ洗浄液で3度洗浄し、続いて1倍のホスファターゼ検定緩衝液で2度洗浄した。CDP-Star化学発光基質を用いてシグナルを検出した。湿潤メンブレンをサラン（商標）ラップ下X線フィルムに暴露した。結果を分析し記録した。

【0091】

本発明の主眼は、エチレン処理の結果誘発されるか、またはタバコ葉の品質および成分において重要な役割を果たすことができる新規な遺伝子の発見であった。下表に示すように、未誘発植物と比較してエチレン処理によってどの遺伝子が誘発されたかの決定にノーザンプロットは有用であった。興味深いことに、転化体および非転化体では断片のすべてが同様の作用を受けたのではない。当該シトクロムP450断片を部分的に配列決定してその構造関連性を決定した。この情報を使用し、続いて遺伝子クローン全長を単離配列決定した。断片遺伝子を含む全植物体において下方制御法を使用し、機能性分析を実施した。

【0092】

【表1】

断片	誘発した mRNA 発現 エチレン処理	
	転化体	非転化体
D186-AH4	+	
D56-AC7	+	+
D56-AG11	+	
D56-AC12	+	+
D70A-AB5	+	+
D73-AC9	+	+
D70A-AA12	+	+
D73A-AG3	+	
D73A-AE10		+
D35-AG11	+	
D58-AD4	+	+
D34-52	+	+
D56-AG6	+	+

【0093】

## (実施例 8)

核酸の種類 ( I D E N T I T Y ) および単離された核酸断片の構造関連性

ノーザンブロット分析に関連して 100 個超のクローン化 p 4 5 0 断片を配列決定してその構造関連性を決定した。使用した手法は、P 4 5 0 遺伝子のカルボキシ末端付近に位置する 2 個の P 4 5 0 共通モチーフのいずれかに基づくフォワードプライマーを利用した。フォワードプライマーは、図 1 に示すシトクロム P 4 5 0 モチーフ F X P E R F または G R R X C P ( A / G ) に対応した。リバースプライマーには p G E M プラスミドの両腕に位置するプラスミド S P 6 または T 7 のいずれか、またはポリ A テール ( t a i l ) に由来する標準プライマーを使用した。使用したプロトコルを以下に記述する。

## 【 0 0 9 4 】

メーカーのプロトコル ( ベックマンコーラター ) に従い分光光度法を使用して開始 2 本鎖 D N A 濃度を推定した。鋳型を水で希釈して適当な濃度にし、95 で 2 分間の加熱によって変性し、続いて氷上に置いた。変性 D N A 鋳型 0.5 から 10  $\mu$  l、1.6 ピコモルのフォワードプライマー 2  $\mu$  l、Quick Start Master Mix 8  $\mu$  l を使用し配列決定反応を氷上で調製し、水で全容量を 20  $\mu$  l にした。熱サイクリングプログラムは、30 サイクルの次のサイクルから構成された：96 で 20 秒間、50 で 20 秒間、および 60 で 4 分間、続いて 4 で維持。

## 【 0 0 9 5 】

停止緩衝液 ( 等量の 3 M の N a O A c、100 m M の E D T A および 20 m g / m l のグリコーゲン 1  $\mu$  l ) 5  $\mu$  l を加えることによって配列を停止させた。試料を 95 % 冷エタノール 60  $\mu$  l で沈殿させ、6000 g で 6 分間遠心分離した。エタノールを廃棄した。ペレットを 70 % 冷エタノール 200  $\mu$  l で 2 度洗浄した。ペレットが乾燥した後、S L S 液 40  $\mu$  l を加え、ペレットを再懸濁した。鉱油層を上乗せした。次いで、さらに分析するために C E Q 8000 自動シーケンサ上に試料を置いた。

## 【 0 0 9 6 】

核酸配列を確認するために、P 4 5 0 遺伝子の F X P E R F または G R R X C P ( A / G ) 領域に対するフォワードプライマーを使用して、または、プラスミドまたはポリ A テールのいずれかに対するリバースプライマーを使用して、両方向に核酸配列を再度配列決定した。配列決定はすべて、少なくとも 2 度両方向に実施した。

## 【 0 0 9 7 】

G R R X C P ( A / G ) モチーフをコードする領域後の第 1 の核酸に対応するコード領域から終止コドンまでシトクロム P 4 5 0 断片の核酸配列を互いに比較した。P 4 5 0 蛋白質の中で遺伝子の多様性を示す指標としてこの領域を選択した。遺伝的に異なる多数の P 4 5 0 遺伝子、すなわち 70 を超える遺伝子で、他の植物種の遺伝子との類似性が観察された。核酸配列を比較すると、遺伝子はその配列同一性に基づき異なる配列グループ中に配置される恐れがあることが見出された。P 4 5 0 のメンバーの最良の特異的グループ化は、75 % 以上の核酸同一性を有する配列 ( 表 I に示す ) であると決定されることが見出された。同一性の割合を引き下げるとグループは著しく大きくなった。81 % 以上の核酸同一性を有する配列のグループ化が好ましく、91 % 以上の核酸同一性のグループ化がより好ましい、99 % 以上の核酸同一性を有する配列のグループ化が最も好ましいことが観察された。大部分のグループは、少なくとも 2 個のメンバーを含み、しばしば 3 個の以上のメンバーを含む。他は繰り返しでは発見されず、採用した手法が、使用した組織中で低発現および高発現する m R N A の両方を単離できたことを示唆した。

## 【 0 0 9 8 】

75 % 以上の核酸同一性に基づき、2 つのシトクロム P 4 5 0 グループが、グループ内のものとは遺伝的に異なるタバコシトクロム遺伝子に以前は相同した核酸配列を含むことが判明した。グループ 23 は、表 I で使用したパラメータ内で、それぞれ、C z e r n i c らおよび R a l s t o n らによる先の G e n B a n k 配列 G I : 1171579 ( C A A 64635 ) および G I : 14423327 ( または A A K 62346 ) に核酸同一性を示した。G I : 1171579 はグループ 23 メンバーに対して 96.9 % から 99.9 %

5 % の範囲の核酸同一性を有するが、GI : 1 4 4 2 3 3 2 7 はこのグループに対して 9 5 . 4 % から 9 6 . 9 % の範囲の同一性を有する。グループ 3 1 メンバーの核酸同一性は、R a l s t o n らによる GenBank 報告済配列 GI : 1 4 4 2 3 3 1 9 ( A A K 6 2 3 4 2 ) に対して 7 6 . 7 % から 9 7 . 8 % の範囲の同一性である。R a l s t o n ら、C z e r n i c ら、W a n g ら、あるいは L a R o s a および S m i g o c k i によって報告されたタバコ P 4 5 0 遺伝子に対して表 1 の他の P 4 5 0 同一性グループのどれも表 1 に使用したパラメータ同一性は含まなかった。

# 【 0 0 9 9 】

図 7 4 に示すように、適当な核酸デジェネレートプローブ ( n u c l e i c a c i d d e g e n e r a t e p r o b e ) を有するコンセンサス配列が、タバコ植物由来の各グループ別のメンバーを優先的に同定し単離するためのグループから派生する恐れがある。

# 【 0 1 0 0 】

## 【表 2】

表 1 : タバコ P 4 5 0 核酸配列同一性グループ

グループ	断片
1	D58-BG7 (配列番号 1)、D58-AB1 (配列番号 3); D58-BE4 (配列番号 7)
2	D56-AH7 (配列番号 9); D13a-5 (配列番号 11)
3	D56-AG10 (配列番号 13); D35-33 (配列番号 15); D34-62 (配列番号 17)
4	D56-AA7 (配列番号 19); D56-AE1 (配列番号 21); 185-BD3 (配列番号 143)
5	D35-BB7 (配列番号 23); D177-BA7 (配列番号 25) D56A-AB6 (配列番号 27); D144-AE2 (配列番号 29)
6	D56-AG11 (配列番号 31); D179-AA1 (配列番号 33)
7	D56-AC7 (配列番号 35); D144-AD1 (配列番号 37)
8	D144-AB5 (配列番号 39)
9	D181-AB5 (配列番号 41); D73-Ac9 (配列番号 43)
10	D56-AC12 (配列番号 45)
11	D58-AB9 (配列番号 47); D56-AG9 (配列番号 49); D56-AG6 (配列番号 51); D35-BG11 (配列番号 53); D35-42 (配列番号 55); D35-BA3 (配列番号 57); D34-57 (配列番号 59); D34-52 (配列番号 61); D34-25 (配列番号 63)
12	D56-AD10 (配列番号 65)
13	56-AA11 (配列番号 67)
14	D177-BD5 (配列番号 69); D177-BD7 (配列番号 83)
15	D56A-AG10 (配列番号 71); D58-BC5 (配列番号 73); D58-AD12 (配列番号 75)
16	D56-AC11 (配列番号 77); D35-39 (配列番号 79); D58-BH4 (配列番号 81); D56-AD6 (配列番号 87)

# 【 0 1 0 1 】

## 【表 3】

17	D73A-AD6 (配列番号 89); D70A-BA11 (配列番号 91); D70A-BB5 (配列番号 93)
18	D70A-AB5 (配列番号 95); D70A-AA8 (配列番号 97)
19	D70A-AB8 (配列番号 99); D70A-BH2 (配列番号 101); D70A-AA4 (配列番号 103)
20	D70A-BA1 (配列番号 105); D70A-BA9 (配列番号 107); D176-BG2 (配列番号 141)
21	D70A-BD4 (配列番号 109)
22	D181-AC5 (配列番号 111); D144-AH1 (配列番号 113); D34-65 (配列番号 115)
23	D35-BG2 (配列番号 117)
24	D73A-AH7 (配列番号 119)
25	D58-AA1 (配列番号 121); D185-BC1 (配列番号 133); D185-BG2 (配列番号 135)
26	D73-AE10 (配列番号 123)
27	D56-AC12 (配列番号 125)
28	D177-BF7 (配列番号 127); D185-BE1 (配列番号 137); 185-BD2 (配列番号 139)
29	D73A-AG3 (配列番号 129)
30	D70A-AA12 (配列番号 131); D176-BF2 (配列番号 85)
31	D176-BC3 (配列番号 145)
32	D176-BB3 (配列番号 147)
33	D186-AH4 (配列番号 5)

## 【0102】

## (実施例 9)

単離核酸断片の関連アミノ酸配列同一性

シトクロム P 4 5 0 断片用に実施例 8 から得た核酸配列のアミノ酸配列を推定した。推定領域は、G X R X C P ( A / G ) 配列モチーフ直後のアミノ酸からカルボキシ末端の末端、または終止コドンに対応した。断片の配列同一性を比較すると、特有のグループ化は、70% 以上のアミノ酸同一性を有する配列で観察された。好ましいグループ化は、80% 以上のアミノ酸同一性を有する配列で観察され、より好ましい 90% 以上のアミノ酸同一性を有する配列で、最も好ましいグループ化は 99% 以上のアミノ酸同一性を有する配列で観察された。グループ類および対応するグループメンバーのアミノ酸配列を図 2 に示す。いくつかの特有の核酸配列は、他の断片に対して完全なアミノ酸同一性を有することが判明し、したがって同一アミノ酸を有するメンバーは 1 つしかないことが報告された。

## 【0103】

表 I グループ 19 のアミノ酸同一性は、その核酸配列に基づき 3 つの異なるグループに対応した。各グループメンバーのアミノ酸配列およびその同一性を図 7 5 に示す。アミノ酸の差異には印を付けた。

## 【0104】

遺伝子クローニングおよび植物を使用する機能研究のために各アミノ酸同一性グループの少なくとも 1 個のメンバーを選択した。さらに、エチレン処理、またはノーザンおよびサザン分析によって評価した他の生物学的差異によって差分的な作用を受けるグループメンバーも遺伝子クローニングおよび機能研究用に選択した。遺伝子クローニング、発現研究、および全植物体評価に役立てるために、配列同一性および差分配列についてペプチド特異的抗体を調製する。

## 【0105】

【表 4】

表 I I : タバコ P 4 5 O アミノ酸配列同一性グループ

グループ	断片
1	D58-BG7 (配列番号2)、D58-AB1 (配列番号4)
2	D58-BE4 (配列番号8)
3	D56-AH7 (配列番号10); D13a-5 (配列番号12)
4	D56-AG10 (配列番号14); D34-62: (配列番号18)
5	D56-AA7 (配列番号20); D56-AE1 (配列番号22); 185-BD3 (配列番号144)
6	D35-BB7 (配列番号24); D177-BA7 (配列番号26); D56A-AB6 (配列番号28); D144-AE2 (配列番号30)
7	D56-AG11 (配列番号32); D179-AA1 (配列番号34)
8	D56-AC7 (配列番号36); D144-AD1 (配列番号38)
9	D144-AB5 (配列番号40)
10	D181-AB5 (配列番号42); D73-Ac9 (配列番号44)
11	D56-AC12 (配列番号46)
12	D58-AB9 (配列番号48); D56-AG9 (配列番号50); D56-AG6 (配列番号52); D35-BG11 (配列番号54); D35-42 (配列番号56); D35-BA3 (配列番号58); D34-57 (配列番号60); D34-52 (配列番号62)
13	D56AD10 (配列番号66)
14	56-AA11 (配列番号68)
15	D177-BD5 (配列番号70); D177-BD7 (配列番号84)
16	D56A-AG10 (配列番号72); D58-BC5 (配列番号74); D58-AD12 (配列番号76)
17	D56-AC11 (配列番号78); D56-AD6 (配列番号88)
18	D73A-AD6 (配列番号90); D70A-BB5 (配列番号94)
19	D70A-AB5 (配列番号96); D70A-AB8 (配列番号100); D70A-BH2 (配列番号102); D70A-AA4 (配列番号104); D70A-BA1 (配列番号106); D70A-BA9 (配列番号108); D176-BG2 (配列番号142)
20	D70A-BD4 (配列番号110)
21	D181-AC5 (配列番号112); D144-AH1 (配列番号114); D34-65 (配列番号116)
22	D35-BG2 (配列番号118)
23	D73A-AH7 (配列番号120)
24	D58-AA1 (配列番号122); D185-BC1 (配列番号134); D185-BG2 (配列番号136)
25	D73-AE10 (配列番号124)

【 0 1 0 6 】

( 実施例 1 0 )

### cDNA P450 クローン全長のクローニング

以下のようにエチレン処理した葉から全RNAを調製することによりcDNAライブラリーを構築した。最初に、改変した酸フェノールおよびクロロホルム抽出プロトコールを使用しエチレン処理した葉から全RNAを抽出した。プロトコールを修正して、1グラムの組織に使用した。この組織は、粉碎され、続いて抽出緩衝液(100 mMのトリス塩酸、pH 8.5、200 mMのNaCl、10 mMのEDTA、0.5% SDS) 5 ml中ボルテックスされ、これにフェノール(pH 5.5) 5 mlおよびクロロホルム 5 mlが加えられた。抽出試料を遠心分離し上清を保存した。上清が透明に見えるまでこの抽出ステップをさらに2、3回繰り返した。クロロホルム約5 mlを加えて微量のフェノールを除去した。3倍容量のEtOHおよび1/10容量の3 MのNaOAc(pH 5.2)を加え、-20℃で1時間保存することによって合わせた上清画分からRNAを沈殿させた。RNAをCorrexガラス容器に移した後、4℃、9,000 RPMで45分間遠心分離した。ペレットを70%エタノールで洗浄し、4℃、9,000 RPMで5分間遠心した。ペレットを乾燥した後、ペレット化したRNAをRNase不含水0.5 mlに溶解した。ペレット化したRNAをRNase不含水0.5 mlに溶解した。全RNAの質および量を、それぞれ、変性ホルムアルデヒドゲルおよび分光光度計によって分析した。

#### 【0107】

オリゴ(dT)セルロースプロトコール(インビトロジェン)およびマイクロ遠心機スピナラム(インビトロジェン)を使用し、以下のプロトコールによって得られた全RNAをポリA+RNAに対して単離した。約20 mgの全RNAを2度精製して高品質ポリA+RNAを得た。変性ホルムアルデヒドゲル、続いて既知の全長遺伝子のRT-PCRを実施することによってポリA+RNA生成物を分析し、mRNAが高品質であることを確実にした。さらに、エチレン処理した非転化体の葉、ゼロ時間エチレン処理した転化体の葉、およびエチレン処理した転化体の葉から得たポリA+RNAについてプローブとしてp450全長を使用してノーザン分析を実施した。試料ごとに1.8 µgのポリA+RNAを使用し、方法はメーカー使用説明書に提供されているプロトコール(KPL社製RNA検出ノーザンプロットティングキット)に基づいた。移動緩衝液として20倍SSCを使用し、RNAを含むゲルを終夜移動させた。

#### 【0108】

次に、ポリA+RNAを鋳型として使用して、cDNA合成キット、ZAP-cDNA合成キット、およびZAP-cDNA Gigapack II Iゴールドクローニングキット(ストラタジーン)を使用し、cDNAライブラリーを作成した。この方法は、メーカーのプロトコールの指示通りに従うことを必要とする。ポリA+RNA約8 µgを使用してcDNAライブラリーを構築した。一次ライブラリーの分析によって約 $2.5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$  pfuであることが明らかになった。IPTGおよびX-galを使用し相補性によりライブラリーの品質背景試験を完了し、そこでは組換えプラークが背景反応の100倍を超えて発現した。

#### 【0109】

ランダムPCRによるライブラリーより一層定量的な分析によって挿入cDNAの平均サイズは約1.2 kbであることが示された。方法は、以下のように2段階PCR法を使用した。第1段階では、P450断片から入手した予備配列情報に基づいてリバースプライマーを設計した。設計したリバースプライマーおよびT3(フォワード)プライマーを使用してcDNAライブラリーから対応遺伝子を増幅した。PCR反応産物をアガロース電気泳動にかけ、対応する高分子量バンドを切り取り、精製し、クローン化し、配列決定した。第2段階では、(P450の3' UTRから設計した)リバースプライマーと共に、フォワードプライマーとしてP450の5' UTRまたは開始コード領域から設計した新規なプライマーを続くPCRに使用してp450クローン全長を得た。

#### 【0110】

PCR法によって構築したcDNAライブラリーからP450遺伝子全長を単離した。2段階のPCRを使用して遺伝子全長をクローン化した。第1段階PCRでは、非特異的

リバースプライマー（Ｔ３）および（Ｐ４５０の下流配列から生成した）特異的フォワードプライマーを使用してｃＤＮＡライブラリーからＰ４５０の５'末端をクローン化した。次の段階のＰＣＲのフォワードプライマーを設計するためにＰＣＲ断片を単離し、クローン化し、配列決定した。２つの特異的プライマーを使用して第２段階ＰＣＲで、ｐ４５０クローン全長をクローン化した。続いてクローンを配列決定した。

【０１１１】

前述の発明の詳細な説明を考察するとき当業者には本発明の実施において多数の修正および変形が思い浮かぶと予想される。したがって、そのような修正および変形は添付の請求項の範囲内に含まれるものとする。

【図面の簡単な説明】

【０１１２】

【図１】核酸配列番号１およびアミノ酸配列番号２を示す図である。

【図２】核酸配列番号３およびアミノ酸配列番号４を示す図である。

【図３】核酸配列番号５およびアミノ酸配列番号６を示す図である。

【図４】核酸配列番号７およびアミノ酸配列番号８を示す図である。

【図５】核酸配列番号９およびアミノ酸配列番号１０を示す図である。

【図６】核酸配列番号１１およびアミノ酸配列番号１２を示す図である。

【図７】核酸配列番号１３およびアミノ酸配列番号１４を示す図である。

【図８】核酸配列番号１５およびアミノ酸配列番号１６を示す図である。

【図９】核酸配列番号１７およびアミノ酸配列番号１８を示す図である。

【図１０】核酸配列番号１９およびアミノ酸配列番号２０を示す図である。

【図１１】核酸配列番号２１およびアミノ酸配列番号２２を示す図である。

【図１２】核酸配列番号２３およびアミノ酸配列番号２４を示す図である。

【図１３】核酸配列番号２５およびアミノ酸配列番号２６を示す図である。

【図１４】核酸配列番号２７およびアミノ酸配列番号２８を示す図である。

【図１５】核酸配列番号２９およびアミノ酸配列番号３０を示す図である。

【図１６】核酸配列番号３１およびアミノ酸配列番号３２を示す図である。

【図１７】核酸配列番号３３およびアミノ酸配列番号３４を示す図である。

【図１８】核酸配列番号３５およびアミノ酸配列番号３６を示す図である。

【図１９】核酸配列番号３７およびアミノ酸配列番号３８を示す図である。

【図２０】核酸配列番号３９およびアミノ酸配列番号４０を示す図である。

【図２１】核酸配列番号４１およびアミノ酸配列番号４２を示す図である。

【図２２】核酸配列番号４３およびアミノ酸配列番号４４を示す図である。

【図２３】核酸配列番号４５およびアミノ酸配列番号４６を示す図である。

【図２４】核酸配列番号４７およびアミノ酸配列番号４８を示す図である。

【図２５】核酸配列番号４９およびアミノ酸配列番号５０を示す図である。

【図２６】核酸配列番号５１およびアミノ酸配列番号５２を示す図である。

【図２７】核酸配列番号５３およびアミノ酸配列番号５４を示す図である。

【図２８】核酸配列番号５５およびアミノ酸配列番号５６を示す図である。

【図２９】核酸配列番号５７およびアミノ酸配列番号５８を示す図である。

【図３０】核酸配列番号５９およびアミノ酸配列番号６０を示す図である。

【図３１】核酸配列番号６１およびアミノ酸配列番号６２を示す図である。

【図３２】核酸配列番号６３およびアミノ酸配列番号６４を示す図である。

【図３３】核酸配列番号６５およびアミノ酸配列番号６６を示す図である。

【図３４】核酸配列番号６７およびアミノ酸配列番号６８を示す図である。

【図３５】核酸配列番号６９およびアミノ酸配列番号７０を示す図である。

【図３６】核酸配列番号７１およびアミノ酸配列番号７２を示す図である。

【図３７】核酸配列番号７３およびアミノ酸配列番号７４を示す図である。

【図３８】核酸配列番号７５およびアミノ酸配列番号７６を示す図である。

【図３９】核酸配列番号７７およびアミノ酸配列番号７８を示す図である。

- 【図 4 0】核酸配列番号 7 9 およびアミノ酸配列番号 8 0 を示す図である。
- 【図 4 1】核酸配列番号 8 1 およびアミノ酸配列番号 8 2 を示す図である。
- 【図 4 2】核酸配列番号 8 3 およびアミノ酸配列番号 8 4 を示す図である。
- 【図 4 3】核酸配列番号 8 5 およびアミノ酸配列番号 8 6 を示す図である。
- 【図 4 4】核酸配列番号 8 7 およびアミノ酸配列番号 8 8 を示す図である。
- 【図 4 5】核酸配列番号 8 9 およびアミノ酸配列番号 9 0 を示す図である。
- 【図 4 6】核酸配列番号 9 1 およびアミノ酸配列番号 9 2 を示す図である。
- 【図 4 7】核酸配列番号 9 5 およびアミノ酸配列番号 9 6 を示す図である。
- 【図 4 8】核酸配列番号 9 7 およびアミノ酸配列番号 9 8 を示す図である。
- 【図 4 9】核酸配列番号 9 9 およびアミノ酸配列番号 1 0 0 を示す図である。
- 【図 5 0】核酸配列番号 1 0 1 およびアミノ酸配列番号 1 0 2 を示す図である。
- 【図 5 1】核酸配列番号 1 0 3 およびアミノ酸配列番号 1 0 4 を示す図である。
- 【図 5 2】核酸配列番号 1 0 5 およびアミノ酸配列番号 1 0 6 を示す図である。
- 【図 5 3】核酸配列番号 1 0 7 およびアミノ酸配列番号 1 0 8 を示す図である。
- 【図 5 4】核酸配列番号 1 0 9 およびアミノ酸配列番号 1 1 0 を示す図である。
- 【図 5 5】核酸配列番号 1 1 1 およびアミノ酸配列番号 1 1 2 を示す図である。
- 【図 5 6】核酸配列番号 1 1 3 およびアミノ酸配列番号 1 1 4 を示す図である。
- 【図 5 7】核酸配列番号 1 1 5 およびアミノ酸配列番号 1 1 6 を示す図である。
- 【図 5 8】核酸配列番号 1 1 7 およびアミノ酸配列番号 1 1 8 を示す図である。
- 【図 5 9】核酸配列番号 1 1 9 およびアミノ酸配列番号 1 2 0 を示す図である。
- 【図 6 0】核酸配列番号 1 2 1 およびアミノ酸配列番号 1 2 2 を示す図である。
- 【図 6 1】核酸配列番号 1 2 3 およびアミノ酸配列番号 1 2 4 を示す図である。
- 【図 6 2】核酸配列番号 1 2 5 およびアミノ酸配列番号 1 2 6 を示す図である。
- 【図 6 3】核酸配列番号 1 2 7 およびアミノ酸配列番号 1 2 8 を示す図である。
- 【図 6 4】核酸配列番号 1 2 9 およびアミノ酸配列番号 1 3 0 を示す図である。
- 【図 6 5】核酸配列番号 1 3 1 およびアミノ酸配列番号 1 3 2 を示す図である。
- 【図 6 6】核酸配列番号 1 3 3 およびアミノ酸配列番号 1 3 4 を示す図である。
- 【図 6 7】核酸配列番号 1 3 5 およびアミノ酸配列番号 1 3 6 を示す図である。
- 【図 6 8】核酸配列番号 1 3 7 およびアミノ酸配列番号 1 3 8 を示す図である。
- 【図 6 9】核酸配列番号 1 3 9 およびアミノ酸配列番号 1 4 0 を示す図である。
- 【図 7 0】核酸配列番号 1 4 3 およびアミノ酸配列番号 1 4 4 を示す図である。
- 【図 7 1】核酸配列番号 1 4 5 およびアミノ酸配列番号 1 4 6 を示す図である。
- 【図 7 2】核酸配列番号 1 4 7 およびアミノ酸配列番号 1 4 8 を示す図である。
- 【図 7 3】PCR によるシトクロム P 4 5 0 c DNA 断片のクローニングに使用される手順を示す図である。配列番号 1 4 9 ~ 1 5 6 を示す。
- 【図 7 4 - 1】グループメンバーのアミノ酸同一性を示す図である。
- 【図 7 4 - 2】グループメンバーのアミノ酸同一性を示す図である。
- 【図 7 4 - 3】グループメンバーのアミノ酸同一性を示す図である。
- 【図 7 4 - 4】グループメンバーのアミノ酸同一性を示す図である。
- 【図 7 5 - 1】配列グループの比較を示す図である。
- 【図 7 5 - 2】配列グループの比較を示す図である。
- 【図 7 5 - 3】配列グループの比較を示す図である。
- 【図 7 5 - 4】配列グループの比較を示す図である。
- 【図 7 5 - 5】配列グループの比較を示す図である。
- 【図 7 5 - 6】配列グループの比較を示す図である。
- 【図 7 5 - 7】配列グループの比較を示す図である。
- 【図 7 5 - 8】配列グループの比較を示す図である。
- 【図 7 5 - 9】配列グループの比較を示す図である。
- 【図 7 5 - 1 0】配列グループの比較を示す図である。
- 【図 7 5 - 1 1】配列グループの比較を示す図である。



- 【図 75 - 12】配列グループの比較を示す図である。
- 【図 75 - 13】配列グループの比較を示す図である。
- 【図 75 - 14】配列グループの比較を示す図である。
- 【手続補正 2】
- 【補正対象書類名】図面
- 【補正対象項目名】全図
- 【補正方法】変更
- 【補正の内容】

## 【図 1】

配列番号 1 D58-BG7  
1 GCACAACTTG CTATCAACTT GGTCAACATC ATGTTGGGTC ATTGTTGCA TCATTTTACA  
61 TGGGCTCCGG CCCCGGGGT TACCCGGAG GATATTGACT TGGAGGAGAG CCTGGAACA  
121 GTAACTTACA TGAATAATCC AATCAAGCT ATTCCAACTC CAGATTGCC TGCACACTTG  
181 TATGGACGTG TGCAGTGA TATGAA  
配列番号 2  
AQLAINLVTSMLGHLHHTWAPAGVNFEDIDLEESPGTVTYMKNPIQAIPTPRLPALYGRVPVDM

## 【図 2】

配列番号 3 D58-AB1  
1 GCACAACTTG CTATCAACTT GGTCAACATC ATGTTGGGTC ATTGTTGCA TCATTTTACG  
61 TGGGCTCCGG CCCCGGGGT TACCCGGAG AATATTGACT TGGAGGAGAG CCTGGAACA  
121 GTAACTTACA TGAATAATCC AATCAAGCT ATTCCAACTC CAGATTGCC TGCACACTTG  
181 TATGGACGTG TGCAGTGA TATGAA  
配列番号 4  
AQLAINLVTSMLGHLHHTWAPPGVNFENIDLEESPGTVTYMKNPIQAIPTPRLPALYGRVPVDM

## 【図 3】

配列番号 5 D186-AH4  
1 ATGAATTATT CATTCGAAGT GGAACACCTT TCAATTGCTC ATATGATCCA AGGTTTCAGT  
61 TTGCAACTA CGACCAATGA GCTTTGGAT ATGAACAAG GTTGGGTTT AACTTTACCA  
121 AAGAAGACTG ATGTTGAAGT GCTAATTACA CCTGCGCTTC CTCTACGCT TTATCAATAT  
181 TAA  
配列番号 6  
MNYSLQVEHLSIAHMIQGFSPATTNPEFLMKQGVGLTPKKTDEVLITPRLPPTLYQY

## 【図 4】

配列番号 7 D58-BE4  
1 GCACAACTTG CTATCAACTT GGTCAACATC ATGTTGGGTC ATTGTTTAT CATTTTACAT  
61 GGGCTCCGG CCCCGGGGT AACCCGAGG ATATTGACTT GGAGGAGAG CCTGGAACAG  
121 TAACTTACAT GA  
配列番号 8  
AQLAINLVTSMLGHLFIILHGLRPRGLTRILTWRRALQ

## 【図 5】

配列番号 9 D56-AH7  
1 GAAGGATTGG CTATTCGAAT GGTGCGCTTG TCATTGGGAT GTATTATTCA AGTTTGGAT  
61 TGGCAACGCA TGGGGAAGA ATTGGTTGAT ATGACTGAAG GAATGGACT TACTTTGCT  
121 AAAGCTCAAC CTTTGTGGC CAAGGTAGC CCACGACCTA AAATGGCTAA TCTTCTCT  
181 CAGATTGA  
配列番号 10  
EGLAVRMVALSLGCIQCDFWQRIGELVDMTEGTGLTPKAQPLVAKCSPRPKMANLLSQI

## 【図 6】

配列番号 11 D13a-5  
1 GAAGGATTGG CTATTCGAAT GGTGCGCTTG TCATTGGGAT GTATTATTCA ATGCTTTGAT  
61 TGGCAACGCA TGGGGAAGA ATTGGTTGAT AAGACTGAAG GAATGGACT TACTTTGCT  
121 AAAGCTCAAC CTTTGTGGC CAAGGTAGC CCACGACCTA TAATGGCTAA TCTTCTCT  
181 CAGATTGA  
配列番号 12  
EGLAIRMVALSLGCIQCDFWQRLGELVDEGTGLTPKAQPLVAKCSPRPKMANLLSQI

## 【図 7】

配列番号 13 D56-AG10  
1 ATAGGTTTGG CGACTTTAGT GACACATCTG ACTTTTGGTC GCTTGCTTCA AGGTTTIGAT  
61 TTTAGTAAGC CATCAACAC GCCAATTGAC ATGACAGAAG GCGTAGGCGT TACTTTGCT  
121 AAGGTTAATC AAGTTGAAGT TCTAATTACC CCTCGTTTAC CTCTAAGCT TTATTATT  
181 TGA  
配列番号 14  
IGFATLVTHLTFGRLLQGDFDSKPSNTPIDMTEGVGVTLPKVNQVEVLITPRLPKLYLF

## 【図 8】

配列番号 15 D35-33  
1 ATAGGTTTGG CGACTTTAGT GACACATCTG ACTTTTGGTC GCTTGCTTCA AGGTTTIGAT  
61 TTTAGTAAGC CATCAACAC GCCAATTGAC ATGACAGAAG GCGTAGGCGT TACTTTGCT  
121 AAGGTTAATC AAGTTGAAGT TCTAATTACC CCTCGTTTAC CTCTAAGCT TTATTATT  
配列番号 16  
IGFATLVTHLTFGRLLQGDFDSKPSNTPIDMTEGVGVTLPKVNQVEVLITPRLPKLYLF

## 【図 9】

配列番号 17 D34-62  
1 ATAAATTTGG CGACTTTAGT GACACATCTG ACTTTTGGTC GCTTGCTTCA AGGTTTIGAT  
61 TTTAGTAAGC CATCAACAC GCCAATTGAC ATGACAGAAG GCGTAGGCGT TACTTTGCT  
121 AAGGTTAATC AAGTTGAAGT TCTAATTACC CCTCGTTTAC CTCTAAGCT TTATTATT  
181 TGA  
配列番号 18  
INFATLVTHLTFGRLLQGDFDSTPSNTPIDMTEGVGVTLPKVNQVEVLITPRLPKLYLF

## 【 図 1 0 】

配列番号 19 D56A-7  
1 ATTATACCTTG CATTGCCAAT TCTTGGCATC ACTTTGGGAC GTTTGGTTCA GAACCTTGAG  
61 CTGTTGGCTC CTCACGCCA GTCGAAGCTC GACACACAG AGAAAGGTGG ACAGTTCACT  
121 CTCACATTG TGAAGCATTC CACCATTGTG TTGAACCAA GGTCTTTCTG A  
配列番号 20  
IILALPILGITLGRVQNFELLPPPGQSKLDTTERKGQFSLHLKHSTIVLKPRSF

## 【 図 1 1 】

配列番号 21 D56-AE1  
1 ATTATACCTTG CATTGCCAAT TCTTGGCATC ACTTTGGGAC GTTTGGTTCA GAACCTTGAG  
61 CTGTTGGCTC CTCACGCCA GTCGAAGCTC GACACACAG AGAAAGGTGG ACAGTTCACT  
121 CTCACATTG TGAAGCATTC CACCATTGTG TTGAACCAA GGTCTTTCTG A  
配列番号 22  
IILALPILGITLGRVQNFELLPPPGQSKLDTTERKGQFSLHLKHSTIVLKPRSC

## 【 図 1 2 】

配列番号 23 D35-BB7  
1 ATTGCACCTTG GGGTTGCATC AATGGAACTT GCATTGTCAG ATCTTCTTTA TGCATTGAT  
61 TGGGAGTTAC CTTTGGGAT GAAAAAGAA GACATTGACA CAAGGCTCAG GCGTGAATT  
121 ACCATGCATA AGAAAAACA ACTTTATCTT ATCCCTAGAA ATTATCTATA G  
配列番号 24  
IALGVASMEALSNLLYAFDWELPFGMKEDIOTNVRPGITMHHKKNELYLIPKNYL (PSKLYLF)

## 【 図 1 3 】

配列番号 25 D177-BA7  
1 ATTGCACCTTG GGGTTGCATC CATGGAACCTT GCATTGTCAG ATCTTCTTTA TGCATTGAT  
61 TGGGAGTTAC CTTTGGGAT GAAAAAGAA GACATTGACA CAAGGCTCAG GCGTGAATT  
121 ACCATGCATA AGAAAAACA ACTTTATCTT ATCCCTAGAA ATTATCTATA G  
配列番号 26  
IALGVASMEALSNLLYAFDWELPFGMKEDIOTNVRPGITMHHKKNELYLIPKNYL

## 【 図 1 4 】

配列番号 27 D56A-AB6  
1 ATTGCACCTTG GGGTTGCATC CATGGAACCTT GCATTGTCAG ATCTTCTTTA TGCATTGAT  
61 TGGGAGTTAC CTTTGGGAT GAAAAAGAA GACATTGACA CAAGGCTCAG GCGTGAATT  
121 ACCATGCATA AGAAAAACA ACTTTATCTT ATCCCTAGAA ATTATCTATA G  
配列番号 28  
IALGVASMEALSNLLYAFDWELPFGMKEDIOTNVRPGIAMHHKKNELVFNKYL

## 【 図 1 9 】

配列番号 37 D144-AD1  
1 ATGCTATTTC GTTTAGCTAA TGTGGACAA CCTTAGCTC AGTTACTTTA TCACCTTCGAT  
61 TGGAACTCC CTAATGACA AACTCACCAG AATTGACAG TGACTGAGTC ACCTGGAATT  
121 TCTGCTAGAA GAAAGGATGA TCTTATTTCG ATTGCCACTC CTGCTCACTC TTGA  
配列番号 38  
MLFGLANVGGPLAQLLYHFDWKLPGNQTHQNFDMTESPGISATRKDDLLIATPANS

## 【 図 2 0 】

配列番号 39 D144-AB5  
1 TTATTATTTC GTTTAGTTAA TGTAGGACAT CCTTAGCTC AATTGCTTTA TCACCTTCGAT  
61 TGGAACTCC TTCTGGGAT AAGTTCAGAT AGTTGACAG TGACTGAAC AGATGAGTT  
121 ACTGCGGAA GAAAGGATGA CTTTCTTTA ATTGCTACTC CTTTGGCTC CAATTA  
配列番号 40  
LLFGLVNVGHPPLAQLLYHFDWKLPGISSDSFDMTETDVTAGRKDDLLIATPFLN

## 【 図 2 1 】

配列番号 41 D181-AB5  
1 ATGCTGTTTG GTTTAGTTAA CACAGGACAT CCTTAGCTC AGTTGCTCTA TTTCTTTGAC  
61 TGGAAATTC CTAATAGGT TAATGCAAT GATTTCACA CTACTGAAC AAGTAGAGTT  
121 TTTGACGAA GCAAGATGA CTTCTACTG ATTCCACAA ATCACATGGA GCAAGAGTAG  
配列番号 42  
MSFGLVNTGHPPLAQLLYHFDWKLPHKVNADFPTTETS RVFAASKDDLYLIPTNHMEQE

## 【 図 2 2 】

配列番号 43 D73-AC9  
1 ATGCTGTTTG GTTTAGTTAA CACAGGACAT CCTTAGCTC AGTTGCTCTA TTTCTTTGAC  
61 TGGAAATTC CTAATAGGT TAATGCAAT GATTTCACA CTACTGAAC AAGTAGAGTT  
121 TTTGACGAA GCAAGATGA CTTCTACTG ATTCCACAA ATCACATGGA GCAAGAGTAG  
配列番号 44  
MSFGLVNTGHPPLAQLLYHFDWKLPHKVNADFPTTETS RVFAASKDDLYLIPTNHMEQE

## 【 図 1 5 】

配列番号 29 D144-AE2  
1 ATTGCACCTTG GGGTTGCATC CATGGAACCTT GCATTGTCAG ATCTTCTTTA TGCATTGAT  
61 TGGGAGTTCC CTTATGGAGT GAAAAAGAA GACATGACA CAACGTTAG GCGTGAATT  
121 GCGATGACA AGAAAAACA ACTTTGCTT TCCCCAAAAA AATTATTAT AATTATAT  
181 GGGACGTGA TCTCATGCTA G  
配列番号 30  
IALGVASMEALSNLLYAFDWELPFGVKKEDIOTNVRPGIAMHHKKNELVPRKLFINYIGTWISC

## 【 図 1 6 】

配列番号 31 D56-AG11  
1 ATTTCGTTTG GTTTAGCTAA TGTCTATTG CCATTGGCTC AATTACTTTA TCACCTTCGAT  
61 TGGGAACTCC CCACTGGAAT CAACCAAGC GACTTGGACT TGACTGAGTT GGTGGAGTA  
121 ACTGCGCTA GAAAAAGTA CTTTACTTG GTTGGACTC CTTATCAACC TCCTCAAAAC  
181 TGA  
配列番号 32  
ISFGLANVYPLAQLLYHFDWELPTGKPSDLDLTVGVTAARKSDLYLVATPYQPPQN

## 【 図 1 7 】

配列番号 33 D179-AA1  
1 ATTTCGTTTG GTTTAGCTAA TGTCTATTG CCATTGGCTC AATTACTATA TCACCTTCGAT  
61 TGGAACTCC CTGCTGGAAT CAACCAAGC GACTTGGACT TGACTGAGTT GGTGGAGTA  
121 ACTGCGCTA GAAAAAGTA CTTTACTTG GTTGGACTC CTTATCAACC TCCTCAAAAC  
181 TGA  
配列番号 34  
ISFGLANVYPLAQLLYHFDWKLPGIEPSDLDLTVGVTAARKSDLYLVATPYQPPQN

## 【 図 1 8 】

配列番号 35 D56-AC7  
1 ATGCTATTTC GTTTAGCTAA TGTGGACAA CCTTAGCTC AGTTACTTTA TCACCTTCGAT  
61 TGGAACTCC CTAATGACA AACTCACCAG AATTGACAG TGACTGAGTC ACCTGGAATT  
121 TCTGCTAGAA GAAAGGATGA TCTTATTTCG ATTGCCACTC CTTATGATTC TTATTA  
配列番号 36  
MLFGLANVGGPLAQLLYHFDWKLPGNQSHNFTMTESPGISATRKDDLLIATPYDSY

## 【 図 2 3 】

配列番号 45 D56-AC12  
1 ATGCAATTTC GTTTGGCTC TGTACTCTG CCATTGGCTC AATTGCTTCA CAATTTCGAT  
61 TGGAACTCC CGAAGGAT TAATGCAAG GATTGGACA TGACAGAGGC AAATGGGATA  
121 TCTGCTAGAA GAAAAAGTA TCTTACTTG ATTGCTACTC CTTATGATTC ACCTTCGAT  
181 TAA  
配列番号 46  
MQFGLANVYPLAHLHNFDMKLPGINARDLMTANGISARREKDYLIATPYVPSLD

## 【 図 2 4 】

配列番号 47 D58-AB9  
1 ATGACTTATG CATTGCAAGT GGAACACCTA ACAATGGCAC ATTTGATCCA GGGTTCAAT  
61 TACAGAACTC CAATGACGA GGCCTTGGAT ATGAAGGAG GTGCAGGCAT AACTATAGCT  
121 AAGTAAATC CTGTGAAAGT GATAATAGC CTTGCTTGG CACTGAGCT TTATTA  
配列番号 48  
MTYALQVEHLMHAHLIQGFNYRTPTDPELDMKEGAGITIRKVNPKVIITPRLAPELY

## 【 図 2 5 】

配列番号 49 D56-AG9  
1 ATGACTTATG CATTGCAAGT GGAACACCTA ACAATGGCAC ATTTAATCCA GGGTTCAAT  
61 TACAAACTC CAATGACGA GGCCTTGGAT ATGAAGGAG GTGCAGGCAT AACTATAGCT  
121 AAGTAAATC CTGTGAAAGT GATAATAGC CTTGCTTGG CACTGAGCT TTATTA  
配列番号 50  
MTYALQVEHLMHAHLIQGFNYKTPNDEALDMKEGAGITIRKVNPKVIITPRLAPELY

## 【 図 2 6 】

配列番号 51 D56-AG6  
1 ATGACTTATG CATTGCAAGT GGAACACCTA ACAATGGCAC ATTTAATCCA GGGTTCAAT  
61 TACAAACTC CAATGACGA GGCCTTGGAT ATGAAGGAG GTGCAGGCAT AACTATAGCT  
121 AAGTAAATC CTGTGAAAGT GATAATAGC CTTGCTTGG CACTGAGCT TTATTA  
配列番号 52  
MTYALQVEHLMHAHLIQGFNYKTPNDEALDMKEGAGITIRKVNPKVIITPRLAPELY

## 【 図 2 7 】

配列番号 53 D35-BG11  
1 ATGACTTATG CATTGCAAGT GGAACACCTA ACAATGGCAC ATTTGATCCA AGGTTTCAAT  
61 TACAGAACTC CAATGACGA GGCCTTGGAT ATGAAGGAG GTGCAGGCAT AACTATAGCT  
121 AAGTAAATC CTGTGAAAGT GATAATAGC CTTGCTTGG CACTGAGCT TTATTA  
配列番号 54  
MTYALQVEHLMHAHLIQGFNYKTPNDEALDMKEGAGITIRKVNPKVIITPRLAPELY

## 【 図 2 8 】

配列番号 55 D35-42  
1 ATGACTTATG CATTGCAAGT GGAACACCTA ACAATGGCAC ATTGATCCA AGGTTTCAAT  
61 TACAGAACTC CAAATGACGA GCCCTTGGAT ATGAAGGAAG GTGCAGGCAT AACTATACTG  
121 AAGGTAATC CTGGGAAGT GATAATAGCG CCCCTGGCAC CTGAGCTTTA TAA  
配列番号 56  
MTYALQVEHLTHAHLIQGFNYRTPNDEPLDMKEGAGITIRKVNPEVLIAPRLAPELY

## 【 図 2 9 】

配列番号 57 D35-BA3  
1 ATGACTTATG CATTGCAAGT GGAACACCTA ACAATGGCAC ATTGATCCA AGGTTTCAAT  
61 TACAGAACTC CAAATGACGA GCCCTTGGAT ATGAAGGAAG GTGCAGGCAT AACTATACTG  
121 AAGGTAATC CTGGGAAGT GATAATAGCG CCCCTGGCAC CACCTGAGCT TTATTAA  
配列番号 58  
MTYALQVEHLTHAHLIQGFNYRTPNDEPLDMKEGAGITIRKVNPEVLIAPRLAPELY

## 【 図 3 0 】

配列番号 59 D34-57  
1 ATGACTTATG CATTGCAAGT GGAACACCTA ACAATAGCAC ATTGATCCA GGGTTTCAAT  
61 TACAGAACTC CAAATGACGA GCCCTTGGAT ATGAAGGAAG GTGCAGGATT AACCATACGT  
121 AAGGTAATC CTGTAGAAGT GACAACACG CTCGCGCTGG CACCTGAGCT TTATTAA  
配列番号 60  
MTYALQVEHLTHAHLIQGFNYKTPNDEPLDMKEGAGITIRKVNPEVTTARLAPELY

## 【 図 3 1 】

配列番号 61 D34-52  
1 ATGACTTATG CATTGCAAGT GGAACACCTA ACAATAGCAC ATTGATCCA GGGTTTCAAT  
61 TACAGAACTC CAAATGACGA GCCCTTGGAT ATGAAGGAAG GTGCAGGATT AACTATACTG  
121 AAGGTAATC CTGTAGAAGT GACAATACG CTCGCGCTGG CACCTGAGCT TTATTAA  
配列番号 62  
MTYALQVEHLTHAHLIQGFNYKTPNDEPLDMKEGAGITIRKVNPEVTTARLAPELY

## 【 図 3 2 】

配列番号 63 D34-25  
1 ATGACTTATG CATTGCAAGT GGAACACCTA ACAATAGCAC ATTGATCCA GGGTTTCAAT  
61 TACAGAACTC CAAATGACGA GCCCTTGGAT ATGAAGGAAG GTGCAGGATT AACTATACTG  
121 AAGGTAATC CTGTAGAAGT GACAATACG CTCGCGCTGG CACCTGAGCT TTATTAA  
配列番号 64  
MTYALQVEHLTHAHLIQGFNYKTPNDEPLDMKEGAGITIRKVNPEVTTARLAPELY

## 【 図 3 7 】

配列番号 73 58-BC5  
1 ATGCAACTTG GGCCTTATGC ATTGAAGAAG GCACTGGCCC ATCTTCTCT TTGCTTTACT  
61 TGGGAATTGC CAGATGGTAT GAAACCAAGT GAGCTTAAAA TGGATGATAT TTTTGGACTC  
121 ACTGCTCCAA GAGCTAATCG ACTCGTGCCT GTGCTAGCT CACGTTTGT GTGCCACCTT  
181 TATTAA  
配列番号 74  
MQLGLYALEMAVAHLLHCFWELPDGMKPSSELMDDIFGLTAPRANRLVAVPTPRLLCPLY

## 【 図 3 8 】

配列番号 75 D58-AD12  
1 ATGCAACTTG GGCCTTATGC ATTGAAGAAG GCTGTGGCCC ATCTTCTTCA TTGTTTACT  
61 TGGGAATTGC CAGATGGTAT GAAACCAAGT GAGCTTAAAA TGGATGATAT TTTTGGACTC  
121 ACTGCTCCAA GAGCTAATCG ACTCGTGCCT GTGCTAGCT CACGTTTGT GTGCCACCTT  
181 TATTAA  
配列番号 76  
MQLGLYALEMAVAHLLHCFWELPDGMKPSSELMDDIFGLTAPRANRLVAVPTPRLLCPLY

## 【 図 3 9 】

配列番号 77 D56-AC11  
1 ATGCTTTGGA GTGCGAGTAT AGTGGCGCTC AGCTACCTAA CTGTATTTA TAGATTCCAA  
61 GTATATGCTG GGTCTGTGTT CAGAGTAGCA TGA  
配列番号 78  
MLWSASIVRVSYLTCTIYRFQVYAGSVFVA

## 【 図 4 0 】

配列番号 79 D35-39  
1 ATGCTTTGGA GTGCGAGTAT AGTGGCGCTC AGCTACCTAA CTGTATTTA TAGATTCCAA  
61 GTATATGCTG GGTCTGTGTT CAGAGTAGCA TGA  
配列番号 80  
MLWSASIVRVSYLTCTIYRFQVYAGSVFVA

## 【 図 4 1 】

配列番号 81 D58-BH4  
1 ATGCTTTGGA GTGCGAGTAT AGTGGCGCTC AGCTACCTAA CCTGTATTTA TAGATTCCAA  
61 GTATATGCTG GGTCTGTGTT CAGAGTAGCA TGA  
配列番号 82  
MLWSASIVRVSYLTCTIYRFQVYAGSVFVA

## 【 図 3 3 】

配列番号 65 D56AD10  
1 TATAGCCTTG GACTTAAGGT TATCGAGTA ACATTAGCCA ACATGTTGCA TGGATTCAAC  
61 TGGGAATTAC CTGAAGGTAT GAAGCCAGAA GATATAAGTG TGAAGAACA TTATGGGCTC  
121 ACTACACATC CTAAGTTTCC TGTTCTGTG ATCTTGGAACT CTAGACTTTC TTCAGATCTC  
181 TATTCOCCCA TCACCTAA  
配列番号 66  
YSLGLKVRVTLANMLHGFNWKLPFGMKPEDISVEHYGLTTHPKFPVPEVLESRLSSDLYSPIT

## 【 図 3 4 】

配列番号 67 D56-AA11  
1 TACAGTCTTG GGAATCGTAT AATTAGGGCA ACTTTAGCTA ACTTGTGCA TGGATTCAAC  
61 TGGGAGTTGC CTAATGGTAT GAGTCCAGAA GACATTAGCA TGAAGAGAT TTATGGGCTA  
121 ATTACACACC CCAAGTCGC ACTTGACGTG ATGATGGAGC CTCGACTTCC CAACCATCTT  
181 TACAAATAG  
配列番号 68  
YSLGIRIIRATLANLLHGFNWRPNMGSPEDISMEIYGLITHPKVALDVMEPRNPLNLYK

## 【 図 3 5 】

配列番号 69 D177-BD5  
1 ATTAATTTTT CAATACCACT TGTGAGCTT GCACTTGCTA ATCTATTGTT TCATTATRAAT  
121 TGGTCACTTC CTGAAGGGAT GCTAGCTAAG GATGTTGATA TGAAGAAGC TTTGGGGATT  
181 ACCATGCACA AGAAATCTCC CTTTGTCTTA GTAGCTTCTC ATTATACTTG TGA  
配列番号 70  
INFSIPLVELALANLLFHYNWSLPEGLAKVDVMEALGITMHKKSPLCLVASHYTC

## 【 図 3 6 】

配列番号 71 D56A-AG10  
1 ATGCAACTTG GGCCTTATGC ATTGAAGAAG GCTGTGGCCC ATCTTCTTCA TTGTTTACT  
61 TGGGAATTGC CAGATGGTAT GAAACCAAGT GAGCTTAAAA TGGATGATAT TTTTGGACTC  
121 ACTGCTCCAA AAGCTAATCG ACTCGTGCCT GTGCTAGCT CACGTTTGT GTGCCACCTT  
181 TATTAA  
配列番号 72  
MQLGLYALEMAVAHLLHCFWELPDGMKPSSELMDDIFGLTAPRANRLVAVPTPRLLCPLY

## 【 図 4 2 】

配列番号 83 D177-BD7  
1 ATTAATTTTT CAATACCACT TGTGAGCTT GCACTTGCTA ATCTATTGTT TCATTATRAAT  
61 TGGTCACTTC CTGAAGGGAT GCTAGCTAAG GATGTTGATA TGAAGAAGC TTTGGGGATT  
121 ACCATGCACA AGAAATCTCC CTTTGTCTTA GTAGCTTCTC ATTATACTTG GTTGGA  
配列番号 84  
INFSIPLVELALANLLFHYNWSLPEGLAKVDVMEALGITMHKKSPLCLVASHYNLL

## 【 図 4 3 】

配列番号 85 D176-BF2  
1 ATATCATTTG GTTGGCTAA TGTTTATTGT CCACTAGCTC AATTGTATA TCATTITGAT  
121 TGGAACTCC CTACTGGAAT CAATTCAAGT GACTTGGACA TGACTGATC GTGAGAGTA  
181 ACTTGTGCTA GAAAGAGTGA TTTATACCTT AGCTGCTACT CATATCACT TTTCAAGAG  
241 TG A  
配列番号 86  
ISFGLANVLPALQLYHFDWKLPTGINSDDLDMTESSGVTCAKRSDLYLATFPYQLSQE

## 【 図 4 4 】

配列番号 87 D56-AD6  
1 ATGCTTTGGA GTGCGAGTAT AGTGGCGCTC AGCTACCTAA CTGTATTTA TAGATTCCAA  
61 GTATATGCTG GGTCTGTGTT CAGAGTAGCA TGA  
配列番号 88  
MLWSASIVRVSYLTCTIYRFQVYAGSVFVA

## 【 図 4 5 】

配列番号 89 D70A-AD6  
1 CTGAATTITG CAATGTTAGA GSCAAAATG GCACCTGCAT TGATCTTACA ACACATAGCT  
61 TTTGAGCTCT CTCCATCTTA TGACACAGCT CCTCATACAA TTATCACTCT GCACCTCAA  
121 CATGGTGCTC CTTTGATTTT GCGCAAGCTG TAG  
配列番号 90  
LNFAMLEAKMALALLQHYAFELSPSYAHAPHTIITLQPHGAPLILRL

## 【 図 4 6 】

配列番号 91 D70A-Ball  
1 CTGAATTITG CAATGTTAGA GSCAAAATG GCACCTGCAT TGATCTTACA ACACATAGCT  
121 TTTGAGCTCT CTCCATCTTA TGACACAGCT CCTCATACAA TTATCACTCT GCACCTCAA  
181 CATGGTGCTC CTTTGATTTT GCGCAAGCTG TAG  
配列番号 92  
LNFAMLEAKMALALLQHYAFELSPSYAHAPHTIITLQPHGAPLILRL

## 【 図 4 7 】

配列番号 95 D70A-AB5  
1 CAAAACCTTG CGATTTTGGG AGCAAAATG GCTATAGCTA TGATTCTACA ACGCTTCTCC  
61 TTGAGCTCT CCCCATCTTA TACACACTCT CCATACACTG TGGTCACTT GAAACCCAAA  
121 TATGGTGCTC CCTAATAAT GCACAGGCTG TAG  
配列番号 96  
QNFAILEAKMAIAMILQRFSFELSPSYTHSPYTVVTLKPKYGAPLIMHRL

## 【 図 4 8 】

配列番号 97 D70A-AA8  
1 CAAAACCTTG CGATTTTGGG AGCAAAATG GCTATAGCTA TGATTCTACA ACGCTTCTCC  
61 TTGAGCTCT CCCCATCTTA TACACACTCT CCATACACTG TGGTCACTT GAAACCCAAA  
121 TATGGTGCTC CCTAATAAT GCACAGGCTG TAG  
配列番号 98  
QNFAILEAKMAIAMILQRFSFELSPSYTHSPYTVVTLKPKYGAPLIMHRL

## 【 図 4 9 】

配列番号 99 D70A-AB8  
1 CAAAACCTTG CGATTTTGGG AGCAAAATG GCTATAGCTA TGATTCTACA ACGCTTCTCT  
61 TTGAGCTCT CCCCATCTTA TACACACTCT CCATACACTG TGGTCACTT GAAACCCAAA  
121 TATGGTGCTC CCTAATAAT GCACAGGCTG TAG  
配列番号 100  
QNFAILEAKMAIAMILQRFSFELSPSYTHSPYTVVTLKPKYGAPLIMHRL

## 【 図 5 0 】

101 D70A-BH2  
1 ATAAACCTTG CAATGACAGA AGCGAAGATG GCTATGGCTA TGATTCTGCA ACGCTTCTCC  
61 TTGAGCTAT CTCATCTTA CACACATGCT CCACAGTCTG TAATAACTAT GCAACCCCAA  
121 TATGGTGCTC CTCCTATAT GCACAAATG TAA  
102  
INFAMTEAKMAMAMILQRFSFELSPSYTHAPQSVITMQPQYGAPLILHKL

## 【 図 5 1 】

配列番号 103 D70A-AA4  
1 ATAAACCTTG CAATGACAGA AGCGAAGATG GCTATGGCTA TGATTCTGCA ACGCTTCTCC  
61 TTGAGCTAT CTCATCTTA CACACATGCT CCACAGTCTG TAATAACTAT GCAACCCCAA  
121 TATGGTGCTC CTCCTATAT GCACAAATG TAA  
配列番号 104  
INFAMTEAKMAMAMILQRFSFELSPSYTHAPQSVITMQPQYGAPLILHKL

## 【 図 5 7 】

配列番号 115 D34-65  
1 CATAGCTTGG GCGTCAAGGT GATTCAAGCT AGCTTAGCTA ATCTTCTACA TGGATTAAAC  
61 TGGTCATTGC CTGATATAT GACTCCTGAG GACCTCAACA TGGATGAGAT TTTTGGGCTC  
121 TCTACACCTA AAAAATTTCC ACTTGCTACT GTGATTGAGC CAAGACTTTC ACCAAAACCT  
181 TACTCTGTTT GA  
配列番号 116  
HSLGLKVIQASLANLLHGFNWSLPDNNMTPEDLNNDIEFGLSTPKKFLATVIEPLSPKLYSV

## 【 図 5 8 】

配列番号 117 D35-BG2  
1 CTGTGCTTTC CATGTTTAAT CTCTAGTTAT ATACTGCGTT TGAATGTGAA TCTGTATCAT  
61 AATTTCCTGC AATTTCCTCC TTCCATTCTT TATTA  
配列番号 118  
LCFFCLISSYILALNVNLYHFLQISPSISY

## 【 図 5 9 】

配列番号 119 D73A-AH7  
1 TCTGGACTTG CTCATGTGT GGTGGTTTA GCTTTAGCAA CTCTAGTGCA GTGTTTGGAG  
61 TGGAAAGGG TAGCGAAGA GGTGGTTGAT TTGACGGAG GAAAAGGCTC CACTATGCCA  
121 AAACCCGAGC CACTCATGCG TGGTGGCAA GCTCGTGACA TTTTTCACAA AGTCTTTTCA  
181 AAGATATCTT AA  
配列番号 120  
SGLAQCVCGLALATLVQCFEWRKVSSEVVDLTGKGLTMPKPELMARCEARDIFHKVLSIS

## 【 図 6 0 】

配列番号 121 D58-AA1  
1 TTGGGCTTGG CAACGGTGCA TGTGAATTTG ATGTTGGCCG GAATGATTCA AGAATTTGAA  
61 TGGTCGCTTT ACCCGAATA TAGGAAGTGG GATTTTACTG AGAATTTGAA ATTTACTGTG  
121 GTGATGAAA ATCTCTTAAG AGCTAGGCTC AAGCCAGAA TGCAAGTGT GTAA  
配列番号 122  
LGLATVHVNLMLARMIGEFENSAYPENRKVDFTENLEFTVVMKNPLRAKVKPKQVV

## 【 図 6 1 】

配列番号 123 D73A-AE10  
1 TATGCTTTGG CTATGCTTCA TTTAGAGTAC TTTGGGCTA ATTTGGTTTG GCAATTTGCA  
61 TGGGAGGCTG TGGAGGGAGA TGATGTGAT CTTCAGAAA AGCTAGAATT CACCGTTGTG  
121 ATGAAGAATC CACTTCGAGC TGTATCTGC CCCAGAGTTA ACTCTATTG A  
配列番号 124  
YALAMHLLEYFVANLVWHFWEAVEGGDDVDLSEKLEFTVVMKNPLRARICPRVNSI

## 【 図 5 2 】

配列番号 105 D70A-BA1  
1 CAAAACCTTG CAATGATGGA AGCAAAATG GCAGTAGCTA TGACTACTACA AAAATTTTCC  
61 TTTGAACAT CCCCCTCTTA TACACATGCT CCATTGCAA TTGTACTAT TCATCCTCAG  
121 TATGGTGCTC CTCTGCTTAT GCGCAGACTT TAA  
配列番号 106  
QNFAMMEAKMAVAMILKQFSFELSPSYTHAPFAIVTHPQYGAPLIMRRL

## 【 図 5 3 】

配列番号 107 D70A-BA9  
1 CAAAACCTTG CAATGATGGA AGCAAAATG GCAGTAGCTA TGACTACTACA TAAATTTTCC  
61 TTTGAACAT CCCCCTCTTA TACACATGCT CCATTGCAA TTGTACTAT TCATCCTCAG  
121 TATGGTGCTC CTCTGCTTAT GCGCAGACTT TAA  
配列番号 108  
QNFAMMEAKMAVAMILKQFSFELSPSYTHAPFAIVTHPQYGAPLIMRRL

## 【 図 5 4 】

配列番号 109 D70A-BD4  
1 CAAAATTTTG CTAATGTTAGA GGCTAAATG GCAATGGCTA TGATTCTGAA A/CCTATGCA  
61 TTGAGCTCT CTCATCTTA TGCTCATGCT CCTCATCCAC TACTACTTCA A/CTCAATAT  
121 GTGCTCAT TAATTTTGA CAAAGTTGAG  
配列番号 110  
QNFAMLEAKMAMAMILKTYAFELSPSYAHAPHLPLLPQYGAQLILYKL

## 【 図 5 5 】

配列番号 111 D181-AC5  
1 TATAGCATGG GCGTCAAGGC GATTCAAGCT AGCTTAGCTA ATCTTCTACA TGGATTAAAC  
61 TGGTCATTGC CTGATAATAT GACTCCTGAG GACCTCAACA TGGATGAGAT TTTTGGGCTC  
121 TCTACACCTA AAAAATTTCC ACTTGCTACT GTGATTGAGC CAAGACTTTC ACCAAAACCT  
181 TACTCTGTTT GA  
配列番号 112  
YSMLGLKAIQASLANLLHGFNWSLPDNNMTPEDLNNDIEFGLSTPKKFLATVIEPLSPKLYSV

## 【 図 5 6 】

配列番号 113 D144-AH1  
1 TATAGCATGG GCGTCAAGGC GATTCAAGCT AGCTTAGCTA ATCTTCTACA TGGATTAAAC  
61 TGGTCATTGC CTGATAATAT GACTCCTGAG GACCTCAACA TGGATGAGAT TTTTGGGCTC  
121 TCTACACCTA AAAAATTTCC ACTTGCTACT GTGATTGAGC CAAGACTTTC ACCAAAACCT  
181 TACTCTGTTT GA  
配列番号 114  
YSLGLKEIQASLANLLHGFNWSLPDNNMTPEDLNNDIEFGLSTPKKFLATVIEPLSPKLYSV

## 【 図 6 2 】

配列番号 125 D56A-AC12  
1 CAGCAAGTTG GACTTCTTAG AACAACCAT TCTATCGGCT CATTACTGTC TGAATATAAG  
61 CTGAACCTC GCTCAACCA GAACAGATT GAACACCG ATTAAATCC AGCAATTTGG  
121 CTCAATTGCA TAAAGGCGA ACTGTTAGTC GATGCGATTC CTCGAAGAA GCGCGATT  
181 TAA  
配列番号 126  
QQVGLRTTTFIPLASLLSEYKLKPRSHQKQVELTDLPASWLSHSIKGELLVDAIPRKKAAF

## 【 図 6 3 】

配列番号 127 D177-BW7  
1 ATCAACATTG CTAAGTTTGT GAATGAGCTA GCATTGGCAA GATTAATGTT CCAATTTGAT  
121 TCTCGCTAC CAAGAGAGT TAAGCATGAG GATTGAGCG TGGAGGAGC TGTGGAAT  
181 ATCTGTTGAA GGAAGTCCC CCTTTAGCC GTGCGCACTC CATGTCGCTG A  
配列番号 128  
ITFAKEVNEALARLMFHDFSLPKGVKHELDVEEAAGITVRRKFLPVATPSCS

## 【 図 6 4 】

配列番号 129 D73A-AG3  
1 CAGAGGTATG CTATAACCA TTTGATGCT TTTATTGCGT TGTTCACGGC TGTGATTGAT  
121 TTCAAGAGC ACAGACGGA CGGCTGTGAT GATATCGCT ATATTCCAC CATTGCTCCA  
181 AAGGATGATT GTAAAGTGT CTTTACAG AGGTGCACT GATTCCCATC TTTTCATGA  
配列番号 130  
QRYAINHMLFIALFTALIDFKRHKTGCDIAYIPTIAKDDCKVFLSQRCTAFPSFS

## 【 図 6 5 】

配列番号 131 D70A-AA12  
1 ATGCAATTG GTTATGTA TCTTTACTA CCATTGGCTC AATTACTCTA TCACITTGAC  
61 TGGAACTCC CAACCGAAT CAAGCCAGA GACTTGGACT TGAACGATTT ATCGGGGAATA  
121 ACTATTGCTA GAAAGGTGA CCTTTACTA AATGCTACT CTATCAACC TTTCTGAGAG  
181 TAA  
配列番号 132  
MSFGLANLYPLAQLLYHFDWKLPTGIKPADLDLTELSGITIAKRGDLYLNATPYQPSRE

## 【 図 6 6 】

配列番号 133 D185-BC1  
1 TTGGGGCTGG CAACGGTGCA TGTGAATTG ATGTTGGCCC GAACGATTCA AGAATTGAA  
61 TGGTCCGCTT ACCCGGAAAA TAGGAAAGTG GATTTTACTG AGAAATTGGA ATTTACTGTG  
121 GTGATGAAAA ACCCTTTAAG AGCTAAGSTC AAGCCAAGAA TGCAGTGGT GZAA  
配列番号 134  
LGLATVHVNLMLARTIQEFWSAYPENRKVDTEKLEFTVMKNPLRAKVKPRMQVV

## 【 図 6 7 】

配列番号 135 D185-BG2  
1 TTGGCGCTTG CAACGGTGCA TGTGAATTG ATGTTGGCCC GAATGATTCA AGAATTGAA  
61 TGGTCCGCTT ACCCGGAAAA TAGGAAAGTG GATTTTACTG AATATTGGA TTTACTGTG  
121 TGA  
配列番号 136  
LGLATVHVNLMLARMIQEFWSAYPENRKVDLLRNWNLN

## 【 図 6 8 】

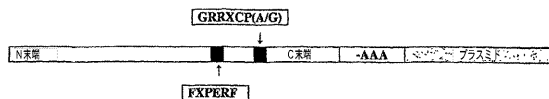
配列番号 137 D185-BE1  
1 ATCAGATTG CTAAGTTTGT GAATGAGCTA GCATTGGCAA GATTAAATGT CCATTTTGAT  
61 TTCTCGCTAC CAAAGGAGT TAAGCATGCG GATTGGACG TGGAGGAGC TGCTGGAATT  
121 ACTGTTAGAA GGAAGTTCCC CCTTTTAGCC GTCGCCACTC CATGCTCGTG A  
配列番号 138  
ITFAKFNELALARLMHFDFSLPGVKHEDLDVEEAAGITVRRKFPLLAVATPCS

## 【 図 6 9 】

配列番号 139 D185-BD2  
1 ATCAGATTG CTAAGTTTGT GAATGAGCTA GCATTGGCAA GATTAAATGT CCATTTTGAT  
61 TTCTCGCTAC CAAAGGAGT TAAGCATGCG GATTGGACG TGGAGGAGC TGCTGGAATT  
121 ACTGTTAGAA GGAAGTTCCC CCTTTTAGCC GTCGCCACTC CATGCTCGTG A  
配列番号 140  
ITFAKFNELALARLMHFDFSLPGVKHADLDVEEAAGITVRRKFPLLAVATPCS

## 【 図 7 3 】

PCRによるシトクロムP450cDNA断片のクローニング



DM	EXPERF	for	5'-TTTTCGCTAC CAAAGGAGT TAAGCATGCG GATTGGACG TGGAGGAGC TGCTGGAATT	配列番号	149
DM4	GRRXCP(A/G)	for <td>5'-GGTGGCTTGG CAACGGTGCA TGTGAATTG ATGTTGGCCC GAATGATTCA AGAATTGAA<td>配列番号</td><td>150</td></td>	5'-GGTGGCTTGG CAACGGTGCA TGTGAATTG ATGTTGGCCC GAATGATTCA AGAATTGAA <td>配列番号</td> <td>150</td>	配列番号	150
DM12	EXPERF	for <td>5'-TTTTCGCTAC CAAAGGAGT TAAGCATGCG GATTGGACG TGGAGGAGC TGCTGGAATT<td>配列番号</td><td>151</td></td>	5'-TTTTCGCTAC CAAAGGAGT TAAGCATGCG GATTGGACG TGGAGGAGC TGCTGGAATT <td>配列番号</td> <td>151</td>	配列番号	151
DM13	PERFL	for <td>5'-CCAGARAGATTCTTG-3'<td>配列番号</td><td>152</td></td>	5'-CCAGARAGATTCTTG-3' <td>配列番号</td> <td>152</td>	配列番号	152
DM17	GRRMCP	for <td>5'-GGRMGRMGRATGTGYCC-3'<td>配列番号</td><td>153</td></td>	5'-GGRMGRMGRATGTGYCC-3' <td>配列番号</td> <td>153</td>	配列番号	153
オリゴ d(T)			5'-TTTTTTTTTTTTTTTT-3' <td>配列番号</td> <td>154</td>	配列番号	154
T7			5'-ATTATGCTGAGTGATATCCC-3' <td>配列番号</td> <td>155</td>	配列番号	155
SP6			5'-ATTAGGTGACACTATAG-3' <td>配列番号</td> <td>156</td>	配列番号	156

I=デオキシリノシン; Y=C, T; M=A,C; R=A,G; S=C,G; N=A,T,C,G

## 【 図 7 0 】

配列番号 143 D185-BD3  
1 ATTATCCCTG CACTGCCAAT TCTTGGCATT ACCTTGGGAC GCTTGGTGCA GAACCTTGAG  
61 TTGTTGCCCT CTCCAGGACA GTCAAAGCTT GACACAACAG AGAAGGCGCG GCAATTCAGT  
121 CTGCACATT TGAAGCATT CACCATTGTG ATGAAACCAA GATCTTTTAA A  
配列番号 144  
IILALPILGITLGRVQNFELLPPFGOSKLDTTKGGQPSLHLKHSTIVMKPSF

## 【 図 7 1 】

配列番号 145 D176-BC3  
1 CAAATTTTGG CCATGTTAGA AGCAAAGACT ACTTGGCTA TGATCTACA AGCTTCTCC  
61 TTTGAACTGT CTCCATCTTA TGCACATGCT CCTGATCCA TAATACCTG CACCCCACT  
121 ATGGGCTCC ACTATTTTG CATTAATAT ACTTTATTAC TTCTAAGTAG TGCTCGTGT  
181 TATGTTAAGC ATGATGCCAA AATGTTAGS CCGTAGATC TGCAAAATG GAAATGCAATT  
241 GCATCTGTC ACTGTAGAT GTTGTAA  
配列番号 146  
QNFAMLEAKTTLAMILQRFSFELSPSYAHAPQSIITONFSMLHLFCIKYSLIVSSVSFYVKHESKMLRLVLEQNGHA  
FALVRCRL

## 【 図 7 2 】

配列番号 147 D176-BB3  
1 GCTGATATGG GGTTCGCGAC AGTTTCITTT GCATTAGGTG CACTTATCA ATGCTTTGAC  
61 TGCCCAATTT AGCAAGCGGA AAGCTTTGGG GAAAGCTATA ATTCTAGAT GACTATGACG  
121 AACAGCCCTT TGAAGTTGT CTGCACCTCA CCGAGAGATC TTGCCAGCT TCTATCCCAA  
181 CTCTAA  
配列番号 148  
ADMGLRAVSLALGALIQCFDQIEAESLEESYNSRMTQMKNPLKVCTPREDLGQLSLQ

## 【 図 7 4 - 1 】

グループメンバーのアミノ酸同一性

グループ	メンバー	アミノ酸同一性
グループ 1	AQALNLTSMGLHLLHFTNAPAPNPVEDIDLESFQVTYMGQFQALPTPLPAHLXGVFVDM	配列番号: 2 D59-B27 (96.8)
	AQALNLTSMGLHLLHFTNAPAPNPVEDIDLESFQVTYMGQFQALPTPLPAHLXGVFVDM	配列番号: 4 D58-AB1
グループ 2	GLANLTSMGLHLLHFTNAPAPNPVEDIDLESFQVTYMGQFQALPTPLPAHLXGVFVDM	配列番号: 8 D58-B24
グループ 3	EGALNLTSMGLHLLHFTNAPAPNPVEDIDLESFQVTYMGQFQALPTPLPAHLXGVFVDM	配列番号: 10 D56-AB7 (93.5)
	EGALNLTSMGLHLLHFTNAPAPNPVEDIDLESFQVTYMGQFQALPTPLPAHLXGVFVDM	配列番号: 12 D53a-5
グループ 4	EGALNLTSMGLHLLHFTNAPAPNPVEDIDLESFQVTYMGQFQALPTPLPAHLXGVFVDM	配列番号: 14 D56-AG10 (93.3)
	EGALNLTSMGLHLLHFTNAPAPNPVEDIDLESFQVTYMGQFQALPTPLPAHLXGVFVDM	配列番号: 18 D54-62
グループ 5	ITLALPILGITLGRVQNFELLPPFGOSKLDTTKGGQPSLHLKHSTIVMKPSF	配列番号: 20 D56-AA7 (98.2)
	ITLALPILGITLGRVQNFELLPPFGOSKLDTTKGGQPSLHLKHSTIVMKPSF	配列番号: 24 D185-BD3 (96.4)
	ITLALPILGITLGRVQNFELLPPFGOSKLDTTKGGQPSLHLKHSTIVMKPSF	配列番号: 22 D56-AB1
グループ 6	IALGVASMLSLSLYAFNKLSTGYKKEDIDTNVAPGLAHSFKNELCLVPRKYL	配列番号: 24 D58-BB7 (98.6)
	IALGVASMLSLSLYAFNKLSTGYKKEDIDTNVAPGLAHSFKNELCLVPRKYL	配列番号: 26 D177-BA7 (95.4)
	IALGVASMLSLSLYAFNKLSTGYKKEDIDTNVAPGLAHSFKNELCLVPRKYL	配列番号: 28 D58A-AB5 (94.6)
	IALGVASMLSLSLYAFNKLSTGYKKEDIDTNVAPGLAHSFKNELCLVPRKYL	配列番号: 30 D144-AB2
グループ 7	ISPLANATLFLAQLLHFTNAPAPNPVEDIDLESFQVTYMGQFQALPTPLPAHLXGVFVDM	配列番号: 32 D56-AG11 (93.3)
	ISPLANATLFLAQLLHFTNAPAPNPVEDIDLESFQVTYMGQFQALPTPLPAHLXGVFVDM	配列番号: 34 D179-AA1
グループ 8	MLGLANVQFLAQLLHFTNAPAPNPVEDIDLESFQVTYMGQFQALPTPLPAHLXGVFVDM	配列番号: 36 D56-AC7 (91.2)
	MLGLANVQFLAQLLHFTNAPAPNPVEDIDLESFQVTYMGQFQALPTPLPAHLXGVFVDM	配列番号: 38 D144-AD1
グループ 9	LLGLANVQFLAQLLHFTNAPAPNPVEDIDLESFQVTYMGQFQALPTPLPAHLXGVFVDM	配列番号: 40 D244-AB5

【 図 7 4 - 3 】

### グループメンバーのアミノ酸同一性

配列番号: 90 D73A-AD6  
(74.0)  
配列番号: 94 D70A-BB5

配列番号: 96 D70A-AB5  
(72.0)  
配列番号: 100 D70A-AB8  
(88.0)  
配列番号: 142 D176-BG2  
(86.0)  
配列番号: 102 D70A-BH2  
(98.0)  
配列番号: 104 D70A-AA4  
(70.0)  
配列番号: 108 D70A-BR9  
(28.0)  
配列番号: 106 D70A-BA3

配列番号: 110 D70A-8D4

配列番号: 112 D181-AC5  
(96.8)

配列番号: 114 D144-AH2  
(96.8)

配列番号: 116 D34-65

配列番号: 118 D3S-JG2

配列番号: 120 D73A-AH7

配列番号: 136 C185-BG2  
(77.9)  
配列番号: 122 D58-AA1  
(98.2)  
配列番号: 234 E185-BC1

配列番号: 78 D56-AC11  
(26.7)  
配列番号: 88 D56-AD6F

【 ㊦ 7 5 - 1 】

## 配列グループの比較

グループ1のアライメント

D58-BG7	GCACAACTTGCATCAACTTGGTCACATCTATGTTGGGTCAATTGTTGCATCATTTTACG	配列番号 3
D58-AB1	GCACAACTTGCATCAACTTGGTCACATCTATGTTGGGTCAATTGTTGCATCATTTTACG	配列番号 3
D58-BB4	GCACAACTTGCATCAACTTGGTCACATCTATGTTGGGTCAATTGTTGTT-CATCATTTTACG *****	配列番号 3
D58-BG7	TGGGCTCCGGCCCCGGGGTTAACCCGAGGATATTGACTTGGAGGAGGCCCTGGAAAC	
D58-AB1	TGGGCTCCGGCCCCGGGGTTAACCCGAGGATATTGACTTGGAGGAGGCCCTGGAAAC	
D58-BB4	TGGGCTCCGGCCCCGGGGGTTAACCCGAGGATATTGACTTGGAGGAGGCCCTGGAAAC	
D58-BG7	GTAACCTACATGAAATTCACATACAGCTATTTCGAATCCAGATTCGCTGCACACTTG	
D58-AB1	GTAACCTACATGAAATTCACATACAGCTATTTCCTACTCCAGATTCGCTGCACACTTG	
D58-BB4	GTAACCTACATGAT *****	
D58-BG7	TATGACGCTTGCCAGTGATATGTAA	
D58-AB1	TATGACGCTTGCCAGTGATATGTAA	

부속품은 1.36 D56A-FC2

配列番号: 128 D177-BP7  
(98.2)  
配列番号: 140 D185-BD3

配列番号: 130 D73A-AG

配列番号: 132 D70A-AA12  
(80.0)  
配列番号: 186 176-BF2

配列番号: 146 D176-BC3  
QNGNAFALVHCRL

配列番号: 146 D176-BB3

配列番号: 6 D186-AH4

グループ1の同一性パーセント			
	D58-BG7	D58-BE4	D58-AB1
D58-BG7	***	96.2	98.1
D58-BE4		***	94.0
D58-AB1			***

グループ2のアライメント

[illegible]

## 【図 75 - 2】

D56-AH7 AAGCTCAACCTTTGGTGGCAAGTGTAGCCCAAGACCTAAATGGCTAACTTCTCTCT  
|  
D13a-S AAGCTCAACCTTTAGTGGCAAGTGTAGCCCAAGACCTAAATGGCTAACTTCTCTCT  
\*\*\*\*\*

D56-AH7 CAGATTGGA  
|  
D13a-S CAGATTGGA  
\*\*\*\*\*

## グループ2の同一性パーセント

	D56-AH7	D13a-S	
D56-AH7	***	93.7	配列番号 9
D13a-S		***	配列番号 11

## グループ3のアライメント

D56-AG10 ATAGGTTTTCGACCTTAGTGACACATCTGACTTTGGTCGCTTGCCTCAAGGTTTGGAT 配列番号 13  
|  
D35-33 ATAGGCTTTTCGACCTTAGTGACACATCTGACTTTGGTCGCTTGCCTCAAGGTTTGGAT 配列番号 15  
|  
D34-62 ATAAATTTTTCGACCTTAGTGACACATCTGACTTTGGTCGCTTGCCTCAAGGTTTGGAT 配列番号 17  
\*\*\*

D56-AG10 TTTAGTAAGCCATCAAAACGCGCAATGACATGACAGAGCGTAGGCGTTACTTTGCCT  
|  
D35-33 TTTAGTAAGCCATCAAAACGCGCAATGACATGACAGAGCGTAGGCGTTACTTTGCCT  
|  
D34-62 TTTAGTAAGCCATCAAAACGCGCAATGACATGACAGAGCGTAGGCGTTACTTTGCCT  
\*\*\*\*\*

D56-AG10 AAGGTTAATCAAGTTGAAGTCTAATACCCCTCGTTTACCTTCTAAGCTTTATTTTGA  
|  
D35-33 AAGGTTAATCAAGTTGAAGTCTAATACCCCTCGTTTACCTTCTAAGCTTTATTTTGA  
|  
D34-62 AAGGTTAATCAAGTTGAAGTCTAATACCCCTCGTTTACCTTCTAAGCTTTATTTTGA  
\*\*\*\*\*

## グループ3の同一性パーセント

	D56-AG10	D35-33	D34-62	
D56-AG10	***	98.9	95.1	配列番号 13
D35-33		***	94.4	配列番号 15
D34-62			***	配列番号 17

## 【図 75 - 3】

## グループ4のアライメント

D56-AA7 ATTATACCTTGCACTGCCAATCTTGGCATCACTTTGGGACGTTTGGTTGAGAACTTTGAG  
|  
D56-AE1 ATTATACCTTGCACTGCCAATCTTGGCATCACTTTGGGACGTTTGGTTGAGAACTTTGAG  
|  
D185-BD3 ATTATCCTTGCACTGCCAATCTTGGCATCACTTTGGGACGTTTGGTTGAGAACTTTGAG  
\*\*\*\*\*

D56-AA7 CTGTTGCTCTCTCCAGGCGAGTGGAGCTCGACACCAAGAGAAAGGTGGACAGTTTCAGT  
|  
D56-AE1 CTGTTGCTCTCTCCAGGCGAGTGGAGCTCGACACCAAGAGAAAGGTGGACAGTTTCAGT  
|  
D185-BD3 TGTGTTGCTCTCTCCAGGCGAGTGGAGCTCGACACCAAGAGAAAGGTGGACAGTTTCAGT  
\*\*\*\*\*

D56-AA7 CTCCACATTTTGAAGCATTCACCATTTGTTGTTGAACCAAGGTCTTTCTGA  
|  
D56-AE1 CTCCATATTTTGAAGCATTCACCATTTGTTGTTGAACCAAGGTCTTTCTGA  
|  
D185-BD3 CTGCACATTTTGAAGCATTCACCATTTGTTGTTGAACCAAGGTCTTTCTGA  
\*\* \*

## グループ4の同一性パーセント

	D56AA7	D56-AE1	D185-BD3	
D56AA7	***	98.2	87.7	配列番号 19
D56-AE1		***	87.1	配列番号 21
D185-BD3			***	配列番号 143

## 【図 75 - 4】

## グループ5のアライメント

D56A-AB6 ATTGCATTTGGGTTGCATCAAGAACTTGCCTTGTCAAATCTCTTTATGCACTTTGAT 配列番号 27  
|  
D35-BB7 ATTGCATTTGGGTTGCATCAAGAACTTGCCTTGTCAAATCTCTTTATGCACTTTGAT 配列番号 23  
|  
D177-BA7 ATTGCATTTGGGTTGCATCAAGAACTTGCCTTGTCAAATCTCTTTATGCACTTTGAT 配列番号 25  
|  
D144-AE2 ATTGCATTTGGGTTGCATCAAGAACTTGCCTTGTCAAATCTCTTTATGCACTTTGAT 配列番号 29  
\*\*\*\*\*

D56A-AB6 TGGGAGTTGCTTTATGGAGTGAAGAAAGAGACATCGACACAAAGCTTAGGCTTGAATT  
|  
D35-BB7 TGGGAGTTGCTTTATGGAGTGAAGAAAGAGACATCGACACAAAGCTTAGGCTTGAATT  
|  
D177-BA7 TGGGAGTTGCTTTATGGAGTGAAGAAAGAGACATCGACACAAAGCTTAGGCTTGAATT  
|  
D144-AE2 TGGGAGTTGCTTTATGGAGTGAAGAAAGAGACATCGACACAAAGCTTAGGCTTGAATT  
\*\*\*\*\*

D56A-AB6 GCCATGCAAGAAAGAGAACTTTGCTTGTCCCAAAAAA-TTATTTATA-----  
|  
D35-BB7 ACCATGCAAGAAAGAGAACTTTGCTTGTCCCAAAAAA-TTATCTATAG-----  
|  
D177-BA7 ACCATGCAAGAAAGAGAACTTTGCTTGTCCCAAAAAA-TTATCTATAG-----  
|  
D144-AE2 GCCATGCAAGAAAGAGAACTTTGCTTGTCCCAAAAAA-TTATTTATAATTAT  
\*\*\*\*\*

D56A-AB6 -----  
|  
D35-BB7 -----  
|  
D177-BA7 -----  
|  
D144-AE2 ATTTGAGCCTTGATCTCATGCTAG

## グループ5の同一性パーセント

	D56A-AB6	D35-BB7	D144-AE2	D177-BA7	
D56A-AB6	***	90.6	97.1	91.8	配列番号 27
D35-BB7		***	87.7	93.0	配列番号 23
D144-AE2			***	88.9	配列番号 29
D177-BA7				***	配列番号 25

## 【図 75 - 5】

## グループ6のアライメント

D56-AG11 ATTTCGTTTGGTTAGCTAATGCTTATTTGCCATTGGCTCAATTTATCACTTTGAT  
|  
D179-AA1 ATTTCGTTTGGTTAGCTAATGCTTATTTGCCATTGGCTCAATTTATCACTTTGAT  
\*\*\*\*\*

D56-AG11 TGGGAACCTCCCATCGGAATCAACCAAGCACTTGGAGTTGACTGAGTTGGTTGAGTA  
|  
D179-AA1 TGGGAACCTCCCATCGGAATCAACCAAGCACTTGGAGTTGACTGAGTTGGTTGAGTA  
\*\*\*

D56-AG11 ACTGCCGCTAGAAAAAGTGACCTTTACTTGGTGGGACTTCCTTCAACCTCTCAAAGCTGA  
|  
D179-AA1 ACTGCCGCTAGAAAAAGTGACCTTTACTTGGTGGGACTTCCTTCAACCTCTCAAAGCTGA  
\*\*\*\*\*

## グループ6の同一性パーセント

	配列番号 31	配列番号 33
D56-AG11	***	95.6
D179-AA1		***

## グループ7のアライメント

D56-AC7 ATGCTATTGTTTGGCTAATGTTGGCAACCTTTAGCTCAGTTACTTTATCACTTCGAT 配列番号 35  
|  
D144-AD1 ATGCTATTGTTTGGCTAATGTTGGCAACCTTTAGCTCAGTTACTTTATCACTTCGAT 配列番号 37  
\*\*\*\*\*

D56-AC7 TGGAAACTCCCTAATGGACAAAGTCAATGGAATTTGCAGATGACTGAGTCACTTGAATT  
|  
D144-AD1 TGGAAACTCCCTAATGGACAAAGTCAATGGAATTTGCAGATGACTGAGTCACTTGAATT  
\*\*\*\*\*

D56-AC7 TCTGCTACAAGAAAGGATGATCTTGTTTTGGATGCACTCTTATGATTTCTTTAA  
|  
D144-AD1 TCTGCTACAAGAAAGGATGATCTTGTTTTGGATGCACTCTTATGATTTCTTTAA  
\*\*\*\*\*

## グループ7の同一性パーセント

	D144-AD1	D56-AC7
D144-AD1	***	94.3
D56-AC7		***

## 【図 75 - 6】

## グループ9のアイメント

D181-AB5	ATGTCGTTTGGTTAGTTAAACACAGGCGATCCCTTAGCTCAGTTGCTCTATTCTTTGAC	配列番号 41
D73-AC9	ATGTCGTTTGGTTAGTTAAACACAGGCGATCCCTTAGCTCAGTTGCTCTATTCTTTGAC	配列番号 43
D181-AB5	TGGAAATTCCTCATAAGGTTAATGAGCTGATTTTCACACTGAAACAAGTAGATT	
D73-AC9	TGGAAATTCCTCATAAGGTTAATGAGCTGATTTTCACACTGAAACAAGTAGATT	
D181-AB5	TTTGCAAGCAAGCAAGATGACCTCTACTTGATTCGAAACAAATCACATGAGCAAGAGTAG	
D73-AC9	TTTGCAAGCAAGCAAGATGACCTCTACTTGATTCGAAACAAATCACATGAGCAAGAGTAG	

## グループ9の同一性パーセント

	D181-AB5	D73-AC9	
D181-AB5	***	92.8	配列番号 41
D73-AC9	***	***	配列番号 43

## グループ11のアイメント

D58-AB9	ATGACTTATGCATTGCAAGTGGAAACACCTAACAAATGGCACATTTGATCCAGGTTTCAAT	配列番号 47
D56-AG9	ATGACTTATGCATTGCAAGTGGAAACACCTAACAAATGGCACATTTGATCCAGGTTTCAAT	配列番号 49
D35-BG11	ATGACTTATGCATTGCAAGTGGAAACACCTAACAAATGGCACATTTGATCCAGGTTTCAAT	配列番号 53
D34-25	ATGACTTATGCATTGCAAGTGGAAACACCTAACAAATGGCACATTTGATCCAGGTTTCAAT	配列番号 63
D35-BA3	ATGACTTATGCATTGCAAGTGGAAACACCTAACAAATGGCACATTTGATCCAGGTTTCAAT	配列番号 57
D34-52	ATGACTTATGCATTGCAAGTGGAAACACCTAACAAATGGCACATTTGATCCAGGTTTCAAT	配列番号 61
D56-AG6	ATGACTTATGCATTGCAAGTGGAAACACCTAACAAATGGCACATTTGATCCAGGTTTCAAT	配列番号 51
D35-42	ATGACTTATGCATTGCAAGTGGAAACACCTAACAAATGGCACATTTGATCCAGGTTTCAAT	配列番号 55
D34-57	ATGACTTATGCATTGCAAGTGGAAACACCTAACAAATGGCACATTTGATCCAGGTTTCAAT	配列番号 59

## 【図 75 - 7】

D58-AB9	TACAGAACTCCAATGATGAGCCCTTGATATGAAGAAGTGACAGCATTAATATACGT	
D56-AG9	TACAGAACTCCAATGATGAGCCCTTGATATGAAGAAGTGACAGCATTAATATACGT	
D35-BG11	TACAGAACTCCAATGATGAGCCCTTGATATGAAGAAGTGACAGCATTAATATACGT	
D34-25	TACAGAACTCCAATGATGAGCCCTTGATATGAAGAAGTGACAGCATTAATATACGT	
D35-BA3	TACAGAACTCCAATGATGAGCCCTTGATATGAAGAAGTGACAGCATTAATATACGT	
D34-52	TACAGAACTCCAATGATGAGCCCTTGATATGAAGAAGTGACAGCATTAATATACGT	
D56-AG6	TACAGAACTCCAATGATGAGCCCTTGATATGAAGAAGTGACAGCATTAATATACGT	
D35-42	TACAGAACTCCAATGATGAGCCCTTGATATGAAGAAGTGACAGCATTAATATACGT	
D34-57	TACAGAACTCCAATGATGAGCCCTTGATATGAAGAAGTGACAGCATTAATATACGT	
D58-AB9	AAGGTAAATCCTGTGAAGTGAATAATACGCTCGCTTGGCAGCTTATATTA	
D56-AG9	AAGGTAAATCCTGTGAAGTGAATAATACGCTCGCTTGGCAGCTTATATTA	
D35-BG11	AAGGTAAATCCTGTGAAGTGAATAATACGCTCGCTTGGCAGCTTATATTA	
D34-25	AAGGTAAATCCTGTGAAGTGAATAATACGCTCGCTTGGCAGCTTATATTA	
D35-BA3	AAGGTAAATCCTGTGAAGTGAATAATACGCTCGCTTGGCAGCTTATATTA	
D34-52	AAGGTAAATCCTGTGAAGTGAATAATACGCTCGCTTGGCAGCTTATATTA	
D56-AG6	AAGGTAAATCCTGTGAAGTGAATAATACGCTCGCTTGGCAGCTTATATTA	
D35-42	AAGGTAAATCCTGTGAAGTGAATAATACGCTCGCTTGGCAGCTTATATTA	
D34-57	AAGGTAAATCCTGTGAAGTGAATAATACGCTCGCTTGGCAGCTTATATTA	

## グループ11の同一性パーセント

	D58-AB9	D56-AG9	D35-BG11	D34-25	D35-BA3	D34-52	D34-57	D34-25
D58-AB9	***	93.8	93.2	94.3	90.8	93.2	90.9	92.0
D56-AG9	***	***	96.6	97.2	94.2	96.6	91.5	92.6
D35-BG11	***	***	***	97.1	99.4	90.3	90.9	90.3
D34-25	***	***	***	***	96.5	87.3	88.4	87.9
D35-BA3	***	***	***	***	90.3	91.5	90.9	90.9
D34-52	***	***	***	***	98.9	98.3	98.3	98.3
D34-57	***	***	***	***	99.4	99.4	99.4	99.4

## 【図 75 - 8】

## グループ14のアイメント

D177-BD7	ATTAAATTTTCAATACCACTTGTGAGCTTGCATCTGCTAATCTATTGTTTCAATATAAT	配列番号 83
D177-BD5	ATTAAATTTTCAATACCACTTGTGAGCTTGCATCTGCTAATCTATTGTTTCAATATAAT	配列番号 69
D177-BD7	TGCTCACTTCTTGGGGGATGCTACCTAAGGATGTGATATGGAAGAAGCTTTGGGGATT	
D177-BD5	TGCTCACTTCTTGGGGGATGCTACCTAAGGATGTGATATGGAAGAAGCTTTGGGGATT	
D177-BD7	ACCATGCACAGAAGATCTCCCTTTGCTTAGTAGCTTCTCATTATACTTGTGTA	
D177-BD5	ACCATGCACAGAAGATCTCCCTTTGCTTAGTAGCTTCTCATTATACTTGTGTA	

## グループ14の同一性パーセント

	D177-BD7	D177-BD5	
D177-BD7	***	96.0	配列番号 83
D177-BD5	***	***	配列番号 69

## グループ15のアイメント

D56A-AG10	ATGCACTTGGGCTTTATGCATTGGAAGTGGCTGTGGCCCATCTCTTCATTGTTTACT	配列番号 71
D58-AD12	ATGCACTTGGGCTTTATGCATTGGAAGTGGCTGTGGCCCATCTCTTCATTGTTTACT	配列番号 75
D58-BC5	ATGCACTTGGGCTTTATGCATTGGAAGTGGCTGTGGCCCATCTCTTCATTGTTTACT	配列番号 73
D56A-AG10	TGGGAATTGCCAGATGATGTAACCAAGTAGGCTTAAATGGATGATATTTTGGACTC	
D58-AD12	TGGGAATTGCCAGATGATGTAACCAAGTAGGCTTAAATGGATGATATTTTGGACTC	
D58-BC5	TGGGAATTGCCAGATGATGTAACCAAGTAGGCTTAAATGGATGATATTTTGGACTC	
D56A-AG10	ACTGCTCAAAGCTAATCGACTCGTGGCTGTGCTACTCCAGCTTTGTTGTGCTCCCTT	
D58-AD12	ACTGCTCAAAGCTAATCGACTCGTGGCTGTGCTACTCCAGCTTTGTTGTGCTCCCTT	
D58-BC5	ACTGCTCAAAGCTAATCGACTCGTGGCTGTGCTACTCCAGCTTTGTTGTGCTCCCTT	

## 【図 75 - 9】

D56A-AG10	TATTAA
D58-AD12	TATTAA
D58-BC5	TATTAA

## グループ15の同一性パーセント

	D56A-AG10	D58-AD12	D58-BC5	
D56A-AG10	***	99.5	95.7	配列番号 71
D58-AD12	***	***	96.2	配列番号 75
D58-BC5	***	***	***	配列番号 73

## グループ16のアイメント

D56-AD6	ATGCTTTGGAGTGGAGTATAGTGCAGCTCAGCTACCTAATCTGTATTTATAGATCCAA	配列番号 87
D56-AC11	ATGCTTTGGAGTGGAGTATAGTGCAGCTCAGCTACCTAATCTGTATTTATAGATCCAA	配列番号 77
D35-39	ATGCTTTGGAGTGGAGTATAGTGCAGCTCAGCTACCTAATCTGTATTTATAGATCCAA	配列番号 79
D58-BH4	ATGCTTTGGAGTGGAGTATAGTGCAGCTCAGCTACCTAATCTGTATTTATAGATCCAA	配列番号 81
D56-AD6	GTATATGCTGGGCTCTGTGTCAGAGTAGCATGA	
D56-AC11	GTATATGCTGGGCTCTGTGTCAGAGTAGCATGA	
D58-BH4	GTATATGCTGGGCTCTGTGTCAGAGTAGCATGA	

## グループ16の同一性パーセント

	D56-AC11	D56-AD6	D58-BH4	D35-39	
D56-AC11	***	98.7	98.7	98.7	配列番号 77
D56-AD6	***	***	98.7	98.7	配列番号 87
D58-BH4	***	***	***	98.7	配列番号 81
D35-39	***	***	***	***	配列番号 79



【 図 7 5 - 1 1 】

### グループ17のアライメント

D73A-AD6	CTGAATTTTGCAATTGTAGAGGCAAJAATGGCAGTTCGATTGATCTACACACTATGCT	配列番号 89
D70A-BALL	CTGAATTTTGCAATTGTAGAGGCAAJAATGGCAGTTCGATTGATCTACACACTATGCT	配列番号 91
	*****	
D73A-AD6	TTTGAGCTCTCTCATCTCTATGCGACATGCTCTCTATAACAATTATCACTCTGCACCTCAA	
D70A-BALL	TTTGAGCTCTCTCATCTATGCGACAGCTCTCTATAACAATTATCACTCTGCACCTCAA	
	*****	
D73A-AD6	CATGTTGCTCCTTATGATTTTGGCAAGCTGTAG	
D70A-BALL	CATGTTGCTCCTTATGATTTTGGCAAGCTGTAG	
	*****	

グループ17の同一性パーセント

<u>D73A-AD 70A-BA11</u>		
D73A-AD6	*** 99.3	配列番号 89
D70A-BA11	***	配列番号 91

### グループ18のアライメント

D70A-AB5	CAAACTCTCGCGATTTTGGAGCAAAATGGCTATAGCTATGATTCTACACGCTTCTCC	序列番号: 95
D70A-AA8	CAAAACTCTCGCGATTTTGGAGCAAAATGGCTATAGCTATGATTCTACACGCTTCTCC	序列番号: 97
D70A-AB5	TTGAGCTCTCTCCCATCTCTATACACACTCTCTCATACACTGTGGTCACTTTGAACCCAAA	
D70A-AA8	TTGAGCTCTCTCCCATCTCTATACACACTCTCTCATACACTGTGGTCACTTTGAACCCAAA	
D70A-AB5	TATGGTGCTCCCTTAATAATGACAGCGCTGTAG	
D70A-AA8	TATGGTGCTCCCTTAATAATGACAGCGCTGTAG	

グループ18の同性パーセント

	D70A-AB5	D70A-AA8
D70A-AB5	***	99.6
D70A-AA8		***

### グループ19のアライメント

D70A-AB8	CAGAAATTTGGCAGTGTAGAGACGAAGATGGCTCTGTCTATGATCTCTGCAGCGCTTCTCT	配列番号 99
D70A-BH2	ATTAAACTTGTGCATGACAGAGCAAGATGGCTATGCTATGATCTCTGCAGCGCTTCTCTC	配列番号 101
D70A-AA4	ATZAACTTTGCATGTGCAGAGCAAGATGGCTATGGCTATGATCTCTGCAGCGCTTCTCTC	配列番号 103
D70A-AB8	TTTGAACCTGTCTCGCTCTTATGCACATGCCCTCCATCCATTAACCGT-CAGCCACAA	
D70A-BH2	TTTGAACCTGTCTCGCTCTTATGCACATGCCCTCCATCCATTAACCTGTCTGACGCCCAA	
D70A-AA4	TTTGAACCTATCCACTCTACACACATGCTCCACATCTGTATTAACCTGTCTGACGCCCAA	
D70A-AB8	TATGGTGTCTCCATTTATTTCCACAGCTATAA	
D70A-BH2	TATGGTGTCTCTCTATTTATTTCCACAGTTGTA	
D70A-AA4	TATGGTGTCTCTCTATTTATTTCCACAGTTGTA	

グループ19の同一性パーセント

	D70A-AB8	D70A-AA4	D70A-BH2	
D70A-AB8	***	77.8	77.8	配列番号 99
D70A-AA4		***	99.3	配列番号 101
D70A-BH2			***	配列番号 103

### グループ20のアライメント

D70A-BA1	CAAAACTTTCGAATGGAAGCAAAATGGCAGTAGCTATGATACTACATAAAATTTTCC	配列番号 105
D70A-BA9	CAAAACTTTCGAATGGAAGCAAAATGGCAGTAGCTATGATACTACATAAAATTTTCC	配列番号 107
D70A-BA1	TTTGAACTATCCCTCTCTATACACATGCTCCATTGCAATTGTGACTATTCACTCTCAG	
D70A-BA9	TTTGAACTATCCCTCTCTATACACATGCTCCATTGCAATTGTGACTATTCACTCTCAG	
D70A-BA1	TATGTGCTCTCTCTGCTTATGCGCAGACTTTAA	
D70A-BA9	TATGTGCTCTCTCTGCTTATGCGCAGACTTTAA	

## 【 ㊦ 7 5 - 1 2 】

グループ20の同一性パーセント

	D70A-BA1	D70A-BA9	
D70A-BA1	***	99.4	配列番号 105
D70A-BA9		***	配列番号 107

### グループ22のアライメント

D144-AH1	TATAGCTGGGGCTCAAGGAGATTCAAGCTAGCTAGCTAATCTTCTACATGGATTAAAC	配列番号 113
D34-65	CATAGCTTGGGGCTCAAGTGATTCAAGCTAGCTAGCTAATCTTCTACATGGATTAAAC	配列番号 115
D181-ACS	TATAGCATGGGGCTCAAGCGGATTCAAGCTAGCTAGCTAATCTTCTACATGGATTAAAC	配列番号 111
D144-AH1	TGGTCATGGCCTGATAATATGACTCTGAGGACCTCAACATGGATGAGATTTTGGGCTC	
D34-65	TGGTCATGGCCTGATAATATGACTCTGAGGACCTCAACATGGATGAGATTTTGGGCTC	
D181-ACS	TGGTCATGCTGATAATATGACTCTGAGGACCTCAACATGGATGAGATTTTGGGCTC	
D144-AH1	TCTCACGCTAAAAAATTCACCTTGCTACTGTGATTGAGCCAGACTTTCACCAAAACTT	
D34-65	TCTCACGCTAAAAAATTCACCTTGCTACTGTGATTGAGCCAGACTTTCACCAAAACTT	
D181-ACS	TCCTACGCTAAAAAATTCACCTTGCTACTGTGATTGAGCCAGACTTTCACCAAAACTT	
D144-AH1	TACTCTGTTTGA	
D34-65	TACTCTGTTTGA	
D181-ACS	TACTCTGTTTGA	

グループ22の同一性パーセント

	D34-65	D181-AC5	D144-AH1	
D34-65	***	98.4	99.0	配列番号 115
D181-AC5		***	99.0	配列番号 111
D144-AH1			***	配列番号 113

【 ㊦ 7 5 - 1 3 】

## グループ25のアライメント

D58-AA1	TTGGGCTTGGCAACGGTGCAATGTGAATTTGATGTTGGCCCGAATGATTCAGAAGATTGAA	配列番号 121
D185-BC1	TTGGGCTTGGCAACGGTGCAATGTGAATTTGATGTTGGCCCGAATGATTCAGAAGATTGAA	配列番号 133
D185-BG2	TTGGGCTTGGCAACGGTGCAATGTGAATTTGATGTTGGCCCGAATGATTCAGAAGATTGAA	配列番号 135
D58-AA1	TGGTCCGCTTACCGGAAAATAGGAAAGTGGATTTTACTGGAAGAAATGGAATTTACTGTG	
D185-BC1	TGGTCCGCTTACCGGAAAATAGGAAAGTGGATTTTACTGGAAGAAATGGAATTTACTGTG	
D185-BG2	TGGTCCGCTTACCGGAAAATAGGAAAGTGGATTTTACTGGAAGAAATGGAATTTACTGTG	
D58-AA1	GTGATGAAAAATCTTTTAAAGACTAAGGTCAAGCCAGAAGTCAAGTGGTGTA	
D185-BC1	GTGATGAAAAACCTTTTAAAGACTAAGGTCAAGCCAGAAGTCAAGTGGTGTA	
D185-BG2	GTGA-----	

グループ25の同一性パーセント

	D58-AA1	D185-BG2	D185-BC1
D58-AA1	***	95.9	98.9
D185-BG2		***	95.1
D185-BC1			***

グループ28のアライメント

D177-BF7	ATCACATTTCCTAAGTTTGTGAATGAGTAGCAATTGGCAAGATTAAATGTTCCATTTTGAT	配列番号 127
D185-BD2	ATCACATTTCCTAAGTTTGTGAATGAGTAGCAATTGGCAAGATTAAATGTTCCATTTTGAT	配列番号 139
D185-BE1	ATCACATTTCCTAAGTTTGTGAATGAGTAGCAATTGGCAAGATTAAATGTTCCATTTTGAT	配列番号 137

## 【 図 75 - 14 】

```

D177-BF7      TTCTCGCTACCAAAGGAGTTAAGCATGAGGATTGGACGTGGAGGAAGCTGCTGGAATT
                |
D185-BD2      TTCTCGCTACCAAAGGAGTTAAGCATGCGGATTGGACGTGGAGGAAGCTGCTGGAATT
                |
D185-BE1      TTCTCGCTACCAAAGGAGTTAAGCATGAGGATTGGACGTGGAGGAAGCTGCTGGAATT
                |
                *****
D177-BF7      ACTGTTAGAAGGAAGTCCCCCTTTAGCCGTCGCCACTCCATGCTCGTGA
                |
D185-BD2      ACTGTTAGAAGGAAGTCCCCCTTTAGCCGTCGCCACTCCATGCTCGTGA
                |
D185-BE1      ACTGTTAGAAGGAAGTCCCCCTTTAGCCGTCGCCACTCCATGCTCGTGA
                |
                *****

```

グループ28の同一性パーセント

	D177-BF7	D185-BD2	D185-BE1	
D177-BF7	***	99.4	99.4	配列番号 127
D185-BD2		***	98.8	配列番号 139
D185-BE1			***	配列番号 137

グループ30のアライメント

```

D70A-AA12      ATGTCATTGGTTTGGCTAATCTTTACTTACCATGGCTCAATTACTCTATCACTTTGAC 配列番号 131
                |
D176-BF2      ATATCATTTGGTTTGGCTAATGTTTATTTGCCACTAGCTCAATGTTATATCAITTTGAT 配列番号 85
                |
                *****
D70A-AA12      TGGAACTCCCAACCGGAATCAAGCCAAGAGACTTGGACTTGACCGAATTATCGGGAATA
                |
D176-BF2      TGGAACTCCCTACTGGAATCAATCAAGTGACTTGGACATGACTGAGTCTGCAAGAGTA
                |
                *****
D70A-AA12      ACTATTGCTAGAAAGGGTGGACCTTACTTAAATGCTACTCTTATCAACCTTCTGAGAGTAA
                |
D176-BF2      ACTTGTGCTAGAAAGAGTGATTATATCTTGACTGCTACTCCATATCAACTTCTCAAGAGTGA
                |
                *****

```

グループ30の同一性パーセント

	D176-BF2	D70A-AA12	
D176-BF2	***	77.0	配列番号 85
D70A-AA12		***	配列番号 131