

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200880010591.3

[51] Int. Cl.

C12N 15/09 (2006.01)

A01N 63/00 (2006.01)

A01H 1/00 (2006.01)

A01P 21/00 (2006.01)

[43] 公开日 2010 年 3 月 17 日

[11] 公开号 CN 101675162A

[22] 申请日 2008.3.26

[21] 申请号 200880010591.3

[30] 优先权

[32] 2007.3.28 [33] JP [31] 083365/2007

[86] 国际申请 PCT/JP2008/000734 2008.3.26

[87] 国际公布 WO2008/117537 日 2008.10.2

[85] 进入国家阶段日期 2009.9.28

[71] 申请人 SCIVAX 股份有限公司

地址 日本国神奈川县

[72] 发明人 高倍铁子 高倍昭洋 内田明男

[74] 专利代理机构 隆天国际知识产权代理有限公司

代理人 吴小瑛 吕俊清

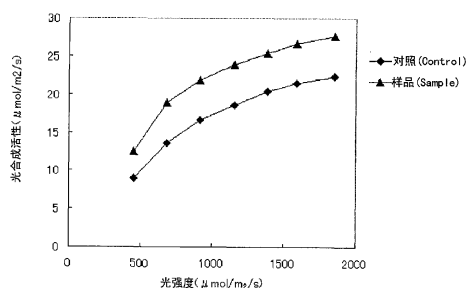
权利要求书 2 页 说明书 15 页 序列表 7 页
附图 1 页

[54] 发明名称

防干剂

[57] 摘要

本发明提供以编码来自耐碱性蓝藻的热休克蛋白的核酸作为有效成分的防干剂。进而，还提供含有编码由参与光合成控制的蛋白质/酶、控制植物体大小的蛋白质/酶、促进根伸展的蛋白质/酶、促进植物体生长的蛋白质/酶、以及提高 RNA 稳定性的蛋白质/酶中选出的蛋白质的核酸或由该核酸的反义序列组成的核酸的防干剂，该防干剂在提高光合成效率中的应用，植物的蒸发抑制方法。



1. 一种防干剂，其作为有效成分含有编码热休克蛋白的核酸。
2. 如权利要求1所述的防干剂，其特征在于，热休克蛋白为 DnaK 蛋白或 HSP70 蛋白。
3. 如权利要求2所述的防干剂，其特征在于，上述 DnaK 蛋白为抗碱性蓝藻的 DnaK 蛋白。
4. 一种防干剂，该防干剂作为有效成分含有编码蛋白质的核酸，所述蛋白质含有下述(a)~(d)的氨基酸序列，
 - (a) 由序列号 2 记载的氨基酸序列中的氨基酸编号 1~721 组成的氨基酸序列；
 - (b) 由序列号 2 记载的氨基酸序列中的氨基酸编号 116~721 组成的氨基酸序列；
 - (c) 由序列号 2 记载的氨基酸序列中的氨基酸编号 164~721 组成的氨基酸序列；
 - (d) 在(a)~(c)的序列中具有一个或多个氨基酸的取代、缺失、插入或转移的氨基酸序列。
5. 如权利要求1~4中任意一项所述的防干剂，其特征在于，还含有编码蛋白质的核酸或由该核酸的反义序列组成的核酸，所述蛋白质是由参与光合成控制的蛋白质/酶、控制植物体大小的蛋白质/酶、促进根的伸展的蛋白质/酶、促进植物体生长的蛋白质/酶、以及提高 RNA 稳定性的蛋白质/酶组成的组中选出的一种以上蛋白质。
6. 如权利要求1~5中任意一项所述的防干剂，其特征在于，核酸为脱氧核糖核酸。
7. 编码热休克蛋白的核酸作为防干剂的应用。
8. 编码 DnaK 蛋白或 HSP70 蛋白的核酸作为防干剂的应用。
9. 如权利要求8所述的应用，其特征在于，上述 DnaK 蛋白为抗碱性蓝藻的 DnaK 蛋白。
10. 编码含下述(a)~(d)氨基酸序列的蛋白质的核酸作为防干剂的应用，
 - (a) 由序列号 2 记载的氨基酸序列中的氨基酸编号 1~721 组成的氨基酸序列；

(b) 由序列号 2 记载的氨基酸序列中的氨基酸编号 116~721 组成的氨基酸序列;

(c) 由序列号 2 记载的氨基酸序列中的氨基酸编号 164~721 组成的氨基酸序列;

(d) 在(a)~(c)的序列中具有一个或多个氨基酸的取代、缺失、插入或转移的氨基酸序列。

11. 如权利要求 1~6 中任一项所述的防干剂在提高光合效率中的应用。

12. 一种植物的蒸发抑制方法, 其特征在于, 将编码热休克蛋白的核酸导入植物细胞内的基因组中, 并使含有导入了上述核酸的基因组的植物细胞生长。

防干剂

技术领域

本发明涉及以编码热休克蛋白的核酸作为有效成分的防干剂、或者该核酸作为防干剂的应用。

背景技术

热休克蛋白（Heat Shock Protein，以下记载为“HSP”）是随着高温刺激而诱导其表达的蛋白质，作为称作“分子伴侣”的一群蛋白质而广为人知。HSP 已被确认广泛存在于从原核生物到真核生物的大量生物种中，例如，已知有（1）分子量为约 15kDa～约 30kDa 的小 HSP（small HSP）；（2）分子量为约 60kDa 的 HSP60 蛋白或 GroEL 蛋白（“HSP60”的名称是真核生物中的名称，“GroEL”的名称是原核生物中的名称）；以及（3）分子量为约 70kDa 的 HSP70 蛋白或 DnaK 蛋白（“HSP70”的名称是真核生物中的名称，“DnaK”的名称是原核生物中的名称）。

关于 HSP 的功能，虽然已经指出了与高温抗性有关系，但目前还仍处于研究阶段，已探明的并不多。

作为植物中 HSP 功能的研究例，已知在烟草中，若通过反义法抑制 HSP60 蛋白的表达时，显示出异常的表型（非专利文献 1），另外，已知在拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）中，若通过反义法抑制 HSP70 蛋白的表达时，显示出异常的表型（非专利文献 2）。而且，已知在拟南芥中，通过抑制用于控制热休克基因转录的基因，提高 HSP70 蛋白的表达量，拟南芥获得了高温抗性（非专利文献 3）。进而已知，当将编码来自栗树（chestnut）的小 HSP 的基因导入大肠菌时，若使上述蛋白质在大肠菌中表达，则大肠菌获得了高温抗性（非专利文献 4）。

另外，关于高温抗性以外的环境刺激（例如，高碱性、干燥、或强光）抗性与分子伴侣之间的关系，例如，已有 DnaK 及 HSP70 参与了抗碱性、抗干燥性等中的报告（专利文献 1）。

而且，专利文献 2 中记载有，在不会对植物体给予特殊刺激的环境下，

HSP70 起到重要的作用的内容。然而，对 HSP70 具有抑制由植物引起的水蒸发的作用，进而，虽然能够大幅促进光合成，但不会促进水蒸发的作用等内容，没有作出任何的记载，也得不到任何的启示。

专利文献 1: JP 特开 2001-78603 号公报

非专利文献 1: Plant J., 6, 425-432(1994)

非专利文献 2: Mol. Gen. Genet., 252, 11-19(1996)

非专利文献 3: Plant J., 8, 603-612(1995)

非专利文献 4: Plant Physiol., 120, 521-528(1999)

发明内容

发明要解决的课题

在植物的生长过程中水是必须的，然而，特别是在绿化事业等的现实情况中，希望有能够提高水消费效率的方案。

用于解决课题的方法

本发明人等为了解决上述课题进行了悉心研究的结果，惊奇地发现导入了 HSP 的重组植物相比于没有进行重组的植物，虽然能够大幅促进光合成作用，但也抑制了蒸发作用的亢进，并通过将 HSP 作为防干剂，完成了本发明。

即，本发明的技术方案如下所述。

1. 一种防干剂，其作为有效成分含有编码热休克蛋白的核酸。
2. 如 1 所述的防干剂，其特征在于，热休克蛋白为 DnaK 蛋白或 HSP70 蛋白。
3. 如 2 所述的防干剂，其特征在于，上述 DnaK 蛋白为抗碱性蓝藻的 DnaK 蛋白。
4. 一种防干剂，该防干剂作为有效成分含有编码蛋白质的核酸，所述蛋白质含有下述(a)~(d)的氨基酸序列，
 - (a) 由序列号 2 记载的氨基酸序列中的氨基酸编号 1~721 组成的氨基酸序列；
 - (b) 由序列号 2 记载的氨基酸序列中的氨基酸编号 116~721 组成的氨基酸序列；

(c) 由序列号 2 记载的氨基酸序列中的氨基酸编号 164~721 组成的氨基酸序列;

(d) 在(a)~(c)的序列中具有一个或多个氨基酸的取代、缺失、插入或转移的氨基酸序列。

5. 如 1~4 中任意一项所述的防干剂, 其特征在于, 还含有编码蛋白质的核酸或由该核酸的反义序列组成的核酸, 所述蛋白质是由参与光合成控制的蛋白质/酶、控制植物体大小的蛋白质/酶、促进根伸展的蛋白质/酶、促进植物体生长的蛋白质/酶、以及提高 RNA 稳定性的蛋白质/酶组成的组中选出的以上蛋白质。

6. 如 1~5 中任意一项所述的防干剂, 其特征在于, 核酸为脱氧核糖核酸。

7. 编码热休克蛋白的核酸作为防干剂的应用。

8. 编码 DnaK 蛋白或 HSP70 蛋白的核酸作为防干剂的应用。

9. 如 8 所述的应用, 其特征在于, 上述 DnaK 蛋白为抗碱性蓝藻的 DnaK 蛋白。

10. 编码含下述(a)~(d)氨基酸序列的蛋白质的核酸作为防干剂的应用,

(a) 由序列号 2 记载的氨基酸序列中的氨基酸编号 1~721 组成的氨基酸序列;

(b) 由序列号 2 记载的氨基酸序列中的氨基酸编号 116~721 组成的氨基酸序列;

(c) 由序列号 2 记载的氨基酸序列中的氨基酸编号 164~721 组成的氨基酸序列;

(d) 在(a)~(c)的序列中具有一个或多个氨基酸的取代、缺失、插入或转移的氨基酸序列。

11. 上述 1~6 中所述的防干剂在提高光合效率中的应用。

12. 一种植物蒸发抑制方法, 其特征在于, 将编码热休克蛋白的核酸导入植物细胞内的基因组中, 并使含导入有上述核酸的基因组的植物细胞生长。

另外, 在本说明书中, “植物”意指将生物分类为微生物、植物、及动物的三类时的上述植物, 包括植物体(即植物整体)及其一部分(例如, 花、叶、茎、根、或种子、或组织)。另外, “植物细胞”包括已经分化的植物的细胞/组织之外, 例如还包括未分化的植物细胞或未分化的植物组织培

养物、或原生质体、愈伤组织（细胞团块）、不定胚、不定芽。

另外，“育种”意指使之生长、进行培养等使植物细胞增殖、分化、肥大化、伸张等成长行为。

发明效果

根据本发明，能够提供 HSP 作为防干剂的新型用途。

附图说明

图 1 是通过二氧化碳固定量比较作用了本发明防干剂的水稻和对照群水稻的光合成活性的图。“样品（Sample）”表示作用了本发明防干剂的水稻，“对照（Control）”表示对照群水稻。纵轴表示二氧化碳固定量（单位面积、单位时间固定的二氧化碳量）。

图 2 是比较作用了本发明防干剂的水稻和对照群水稻的蒸发速度的图。“样品（Sample）”表示作用了本发明防干剂的水稻，“对照（Control）”表示对照群水稻。纵轴表示蒸发速度（单位面积、单位时间内释放到大气中的水分子摩尔数）。

具体实施方式

下面，通过用于实施本发明的最佳方式，详细说明本发明。

1. 本发明的防干剂

本发明的防干剂作为有效成分含有编码 HSP 的核酸。

作为本发明防干剂中的“HSP”，可以使用小 HSP（例如，Mol. Gen. Genet., 219, 365-372(1989)中记载的 HSP17.4 蛋白或 HSP18.2 蛋白等）、HSP60 蛋白（例如，Plant Mol. Biol., 18, 873-885 中记载的 HSP60 蛋白等）、GroEL 蛋白（例如，Plant J., 10, 1119-1125(1996)中记载的 CPN10 蛋白）、HSP70 蛋白（例如，Plant Mol. Biol., 25, 577-583(1994)中记载的 HSC70 蛋白、Plant Physiol., 88, 731-740(1988)中记载的 HSP70-1 蛋白、HSP70-2 蛋白、HSP70-3 蛋白、Plant Cell Physiol., 37, 862-865(1996)中记载的 BiP 蛋白等）、DnaK 蛋白、HSP90（Plant Physiol., 99, 383-390(1992)中记载的 HSP81-1 蛋白、HSP81-2 蛋白、HSP81-3 蛋白、Plant Mol. Biol., 35, 955-961(1997)中记载的 HSP81-4 蛋白、HSP88.1

蛋白、HSP89.1 蛋白等)、HSP100 (Plant Cell, 6, 1899-1909 (1994)中记载的 HSP101 蛋白等)中的任意一种,但优选 DnaK 蛋白及 HSP70 蛋白。优选 DnaK 蛋白质,特别优选抗碱性蓝藻或细菌的 DnaK 蛋白。

作为 HSP70 蛋白,可以使用真核生物的 HSP70 蛋白,例如,可以举出动物、植物、或真菌(例如霉菌、酵母菌或伞菌等)的 HSP70 蛋白。

在这些蛋白质中,特别优选抗碱性蓝藻类的 DnaK 蛋白。作为上述抗碱性蓝藻,只要是具有抗碱性的蓝藻即可,没有特别的限定,例如,可以举出在 NaCl 浓度为 0.25 mol/L~3mol/L 的条件下能够生长的高碱抗性蓝藻,作为实例可以举出嗜盐隐杆藻(*Aphanothece halophytica*)。作为抗碱性蓝藻中的一种的嗜盐隐杆藻的 DnaK 蛋白,整体上由 721 个氨基酸残基组成,其与抗碱性蓝藻以外的原核生物(例如,大肠菌或淡水性蓝藻)的 DnaK 蛋白、或真核生物的 HSP70 蛋白不同,在羧基末端(C 末端)具有由约 100 个氨基酸残基组成的多余的氨基酸序列。已知嗜盐隐杆藻的 DnaK 蛋白具有即使在高碱性浓度中,也影响其他蛋白质正确组装的特性。将嗜盐隐杆藻 DnaK 蛋白的氨基酸序列示于序列号 2。若将编码该 DnaK 蛋白的核酸导入植物细胞的基因组,则通过后述的蒸发抑制效果的确认方法评价的蒸发抑制效果,比未使用本发明防干剂的植物相比提高了 20%以上。本发明防干剂中作为有效成分使用的核酸,优选为具有 50%以上蒸发抑制效果的核酸,更优选为具有 65%以上蒸发抑制效果的核酸,最优选为具有 80%以上蒸发抑制效果的核酸。

然而,天然存在的蛋白质中,除了编码该蛋白质的 DNA 的多态性或突变以外,由于生成后的蛋白质细胞内及精制中的修饰反应等,在其氨基酸序列中可能发生氨基酸的取代、缺失、插入或转移等突变。已知尽管有这样的突变,仍具有与未突变的蛋白质实质上同等的生理、生物学活性。如此的虽然在结构上存在一些差异,但在其功能上没有太大的差别的蛋白质,也包含在由作为本发明防干剂有效成分的核酸编码的氨基酸序列中。人为地向蛋白质的氨基酸序列导入上述突变的情况下也相同,在这种情况下能够制造出更多种多样的突变体。例如,在人白细胞介素 2 (IL-2) 的氨基酸序列中,已知用丝氨酸取代某半胱氨酸残基的多肽保持 IL-2 活性(*Science*,224,1431(1984))。另外,已知某种蛋白质具有对活性不是必要的肽区域。例如,在细胞外分泌的蛋白质中存在的信号肽、蛋白酶的前躯体中常见的前序列等相当于这些,

这些区域中的大多数在转译后，或向活性型蛋白质转化时被去除。这种蛋白质是虽然在一次结构上以不同的形式存在，但最终具有同等功能的蛋白质。

同样，DnaK 蛋白及 HSP70 蛋白当然包含天然的 DnaK 蛋白及 HSP70 蛋白、还含有突变体、基因学上能够得到的基因重组蛋白、或者氨基酸序列为在 DnaK 蛋白或 HSP70 蛋白的氨基酸序列中一个或一个以上（优选一个或多个）氨基酸发生缺失、取代、或添加的氨基酸序列的突变蛋白质。另外，本说明书中所说的“多个”是指氨基酸序列中全部氨基酸数量的 7%的整数个，优选为 5%的整数个、更优选为 3%的整数个。例如，在由 721 个氨基酸组成的氨基酸序列中，表示 50 个，优选表示 36 个，更优选表示 21 个。

但是，已知 β -1,4-半乳糖基转移酶在框架内包含两个 ATG 密码子（Nakazawa, K. et al. (1988) J.Biochem, 104, 165-168、Shaper, N. et al. (1988) J. Biol. Chem., 263, 10420-10428）。另外，Shaper 等发现，由于从两处开始翻译， β -1,4-半乳糖基转移酶同时具有长的形式和短的形式两种形式。如此地，在自然界存在的氨基酸中，已知存在着即使来自同一基因也具有不同大小的蛋白质。同样，例如在 DnaK 中，也存在着多个 ATG 密码子作为开始密码子起作用的可能性。然而，不管哪个 ATG 密码子为开始密码子，在编码上述 DnaK 蛋白的方面是相同的，具有从第 2 位、第 3 位 ATG 密码子开始的碱基序列的核酸也可以在本发明的防干剂中使用。因此，DnaK 蛋白除了包含序列号 2 记载的由嗜盐隐杆藻氨基酸序列的氨基酸编号 1~721 组成的氨基酸序列以外，还包含由氨基酸编号 116~721 组成的氨基酸序列、由氨基酸编号 164~721 组成的氨基酸序列。

本发明防干剂中的“核酸”，可以举出脱氧核糖核酸（DNA）及核糖核酸（RNA），从本发明防干剂的保存稳定性及使用时的稳定性优异的方面考虑，优选为 DNA。另外，这些核酸既可以是单链（例如，DNA 为上述 HSP 的正义链或者反义链中的任意一种），也可以是双链（成对的上述正义链及反义链），但从核酸的稳定性优异方面考虑，优选双链。例如，作为编码上述嗜盐隐杆藻的氨基酸序列（序列号 2 记载）的 DNA 碱基序列，可以举出由序列号 1 记载的碱基序列中的碱基编号 1~2166 组成的碱基序列。另外，作为编码由序列号 2 的氨基酸编号 116~721 组成的氨基酸序列的 DNA 碱基序列，可以举出由序列号 1 记载的碱基序列中的碱基编号 345~2166 组成的碱基序

列。进而，作为编码由序列号 2 的氨基酸编号 164~721 组成的氨基酸序列的 DNA 碱基序列，可以举出由序列号 1 记载的碱基序列中的碱基编号 490~2166 组成的碱基序列。另外，对应一个氨基酸的密码子（对应氨基酸的碱基序列）存在多个是本领域技术人员的公知技术。因此，对本领域技术人员来说，很容易理解例如编码序列号 2 记载的氨基酸序列的碱基序列，不能解释为限定在序列号 1 记载的碱基序列中。

另外，由这样的碱基序列组成的核酸（例如 DNA），也可以在构成该核酸的碱基序列中具有一个或多个碱基的取代、缺失、插入或转移。即使发生了该突变，突变对由其编码的氨基酸序列的影响小，只要能够保持本发明防干剂的蒸发抑制效果（优选通过湿润重量测定的生长率保持 30%以上），也可以对氨基酸序列给予突变。该碱基序列，可以举出严谨条件下与由序列号 1 记载的碱基序列组成的核酸（DNA 或 RNA）杂交的核酸。

另外，“严谨条件下”是指，例如在 50%甲酰胺、5×SSPE（20×SSPE：包含 2.97 mol/L NaCl、0.2 mol/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、0.025 mol/L EDTA（乙二胺四乙酸）的 pH7.4 的水溶液）、5×Denhardt's 溶液（100×Denhardt's 液：将 1g 聚蔗糖 400（Pharmacia 公司制）、1g 聚乙烯吡咯烷酮（PVP-360：Sigma Corporation 制）、1gBSA FractionV（牛血清白蛋白：Sigma Corporation 制）溶解在 50ml 水中的水溶液）、0.5%SDS（十二烷基硫酸钠）存在下、于 42℃温度下 16 小时的恒温箱、进而依次用含 0.1%SDS 的 1×SSPE、含 0.1%SDS 的 0.1×SSPE 在 55℃下进行洗涤的条件，或与核酸的杂交中同等功能的条件。在该条件下，由与某 DNA 杂交的碱基序列组成的 DNA，与某 DNA 至少具有 70%以上的同一性，例如，由 2166 碱基组成的 DNA 中，1527 碱基以上的碱基序列是共同的。

该核酸可作为防干剂使用（将该使用称作“本发明使用”）。

本发明防干剂优选还含有编码 HSP 以外的蛋白质的核酸。即，由于本发明的防干剂是用于改善基因重组植物中的生长性不良，因此，能够想到将编码 HSP 以外蛋白质的核酸同时导入基因组时的使用。作为该“HSP 以外的蛋白质”，例如可以举出用于促进光合成的酶等基因（例如，磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶（JP 特开平 10-248419 号公报）等）、赋予不稔性的反义序列（Bgpl（国际公开公报 WO9413809）、MS2（美国专利第 5932784 号公报）等）、

控制植物体大小的基因（BON1（美国公开 2002/0194639 号公报）、BAP1（美国公开 2002/0194639 号公报）等）、与根的伸展有关的基因（脯氨酸转运因子的基因（ProT:例如, Plant Cell Physiol., 42(11), 1282-1289(2001)记载）、果糖-1,6-二磷酸醛缩酶基因（美国专利第 6441277 号公报）等）、促进植物体生长的基因（细胞周期蛋白基因（美国专利第 6166293 号公报）等）、提高 RNA（mRNA）稳定性的蛋白质的基因（HVD1 基因（JP 特开 2002-34576 号）等）等，可以使用任意一种。上述“HSP 以外的蛋白质”既可以作为与 HSP 的融合蛋白表达的方式构建，也可以作为单独的蛋白质表达的方式构建。

上述本发明的防干剂中含有的上述核酸，能够以核酸单体的状态存在，但为了提高核酸的稳定性，例如，优选以导入到使用本发明防干剂时采用的重组载体中的状态存在。作为该重组载体的实例，例如，可以举出二元载体 pBI121（Methods Enzymol., 118, 6270640(1986)记载）、pCIAMBIA、pE21- Ω -MCS 等，可以使用现有的重组载体。只要是本领域技术人员，考虑到向由本发明防干剂促进生长的对象植物基因组的导入效率，能够选择适当的重组载体而使用。

将核酸导入重组载体时，优选在要导入的核酸的上游及下游，分别插入能够在对象植物细胞内起作用的启动子及终止子，另外，优选作为得到转化体时有效的筛选标记插入合适的 DNA。

作为上述启动子，例如，可以举出花椰菜花叶病毒 35S 启动子。作为上述终止子，例如，可以举出来自胭脂碱合成酶（NOS）的终止子。作为上述筛选标记，例如，可以举出卡那霉素抗性基因（NPTII）、潮霉素抗性基因（HPT 基因）等。

作为本发明防干剂的剂型，可以举出液状、微粉状、膏状等，只要不损害本发明防干剂中含有的核酸的稳定性，且能够在后述的使用例中使用的情況下，也可以采用其他剂型。

2. 本发明的蒸发抑制方法

本发明的蒸发抑制方法，其特征在于，将编码 HSP 的核酸导入植物细胞内的基因组中，并使含有导入了上述核酸的基因组的植物细胞生长。

本发明的蒸发抑制方法中，“HSP”及“核酸”与上述“1. 本发明的防

干剂”中记载的相同。

本发明蒸发抑制方法中的“植物细胞”可以是被子植物细胞或裸子植物细胞中的任意种，也可以是双子叶植物细胞或单子叶植物细胞中的任意种，另外，还可以是草本植物或木本植物中的任意种。作为草本植物，例如可以举出谷类植物，草坪草(Turfgrass)类、或野菜类，作为木本植物，例如可以举出常绿阔叶树、落叶阔叶树等。

作为上述草坪草类，例如，可以举出禾本科草[例如，画眉草亚科(例如，牧草类(grass group)或狗牙根(Bermuda grass)类)、羊茅亚科(例如，剪股颖(bent grass)类、早熟禾(blue grass)类、牛毛草(fescue)类、或黑麦草(ryegrass)类)、或者黍亚科(Panicoideae)]、莎草科(Cyperaceae)类、及菊科类。作为上述谷类植物，例如，可以举出禾本科植物、例如，水稻、黑麦、大麦、小麦、小米、高粱、甘蔗、玉米/爆花用玉米、或薏苡。作为上述野菜类，例如，可以举出茄科植物(例如，烟草、茄子、马铃薯、番茄、或辣椒)、藜科植物(例如，菠菜、糖萝卜等)、豆科植物(例如，大豆、小豆、豌豆等)、油菜科(例如，油菜、芝麻叶等)或芝麻科植物(例如芝麻)。

作为上述常绿阔叶树，例如可以举出桉树、刺槐、或咖啡树。作为上述落叶阔叶树，例如，可以举出白杨、柞树、柳树、白桦、或栎。

另外，本发明的促进方法对通常作为观叶植物为人所知的植物(例如龙舌兰科、天南星科、棕榈科、五加科、桑科、萝藦科、爵床科、夹竹桃科、竹芋科、柏科、芸香科、木棉科、露兜树科、芭蕉科、大戟科、木樨科、鸭跖草科、凤梨科、景天科、龙血树科、杨柳科等植物、蕨类植物等)也有效。

在该植物细胞中，优选禾本科植物、藜科植物、豆科植物、油菜科植物、桉树、刺槐、白杨的细胞，特别优选甘蔗、糖萝卜、大豆、油菜、芝麻、桉树、白杨的细胞，但只要能够促进生长即可，并不限定于这些植物。

作为将核酸导入该植物细胞内基因组的方法，可以使用通过公知的表达载体(pBI121等)，例如使具有含目的基因的载体的土壤杆菌(*Agrobacterium*)感染在植物组织的方法；聚乙二醇处理法；对原生质体进行电脉冲处理从而将上述载体导入的电穿孔法；或者、将上述载体置于金属粒子而导入植物组织的基因枪法等常用方法。

使通过上述方法转化的植物细胞，在适当的培养基[例如，Murashige and Skoog 培养基；Plant Physiol., 15, 473-497(1962)]中生长、再生，由此能够得到转化植物。此时，若将对应于筛选标记的适当的抗生物质（例如，卡那霉素）添加培养基，则可以选择转化体。

例如，当将编码 DnaK 蛋白或 HSP70 蛋白的 DNA 导入禾本科草（例如，结缕草或剪股颖）时，可根据以下步骤实施。

根据上述聚乙二醇处理法导入时，例如，可如下所述地进行。将 1~100 $\mu\text{g/mL}$ 载体和 $10^5 \sim 10^6$ 个/mL 原生质体悬浮在作为浸透压调节剂含有 0.4~0.6 mol/L 甘露醇等的缓冲液等液体溶剂中。向其中添加聚乙二醇溶液，以使最终浓度达到 10~30%，在室温下放置 5~30 分钟后，通过稀释聚乙二醇，将基因导入原生质体中。

通过上述电穿孔法进行的导入，可如下所述地进行。将 1~100 $\mu\text{g/mL}$ 载体和 $10^5 \sim 10^6$ 个/mL 原生质体悬浮在作为浸透压调节剂含有 0.4~0.6mol/L 甘露醇等的缓冲液等液体溶剂中。向其施加由电场强度 300~600V/cm、时间常数 10~50ms 组成的电脉冲，从而施加电刺激，将基因导入原生质体中。

通过上述基因枪法进行的导入，例如，可如下所述地进行。使细胞团块（0.3~0.5 ml 程度）均匀地展开/吸附在过滤纸上。然后，准备通过氯化钙和亚精胺吸附了载体的直径 0.1~5 μm 的金属粒子，利用基因枪，以 800~1500PSI 的空气压力或火药爆炸时的压力，打入细胞团块而进行导入。作为金属粒子，可以使用钨或金等。

基因导入处理后的原生质体，通过在植物的组织培养培养基中，例如在 N6 培养基、R2 培养基、K8p 培养基、或 AA 培养基等中添加植物生长调节剂，例如添加 2,4-二氯苯氧基乙酸、萘乙酸等茁长素类及激动素等细胞分裂素类而成的液体或固体培养基进行培养。培养在暗处进行，温度优选为 20~30℃。通过上述培养，由导入了基因的原生质体形成细胞团块。

通过在植物的组织培养培养基中，例如在 N6 培养基、R2 培养基、K8p 培养基、或 AA 培养基等中添加植物生长调节剂，例如添加 2, 4-二氯苯氧基乙酸、萘乙酸等茁长素类及激动素等细胞分裂素类而成的液体或固体培养基培养基因导入处理后处于脱分化状态的细胞团块。培养在暗处进行，温度优选为 20~30℃。进而，每 14~40 天更换新鲜培养基，继续进行培养。培养

优选在明处进行。培养开始 24~48 天后能够得到不定胚或不定芽。

将上述不定胚或不定芽，通过在植物体再生培养基中，例如在 N6 培养基、R2 培养基、MS 培养基、或 LS 培养基等中添加植物生长调节剂，例如添加 2, 4-二氯苯氧基乙酸、萘乙酸等的苗长素类及激动素等细胞分裂素类而成的培养基进行培养。每 14~40 天更换新鲜培养基，继续进行培养。培养优选在明处进行。培养开始 24~48 天后可以得到转化植物体。

通过下述方法，比较如此得到的植物体与在通常的生长条件下未采用本发明蒸发抑制方法而生长的植物体的生长率时，从上述得到的植物体中能够观察到蒸发抑制效果。

例如，通过下述方法能够确认本发明蒸发抑制方法的效果。

即，可以举出，使插入了不含 HSP 的载体的阴性对象植物和蒸发抑制对象植物生长，测定经过相同生长期间的植物体吸水量的方法；或者，采取植物体整体或其一部分，测定释放出空气中的水蒸气量并进行对比的方法。

根据本发明的蒸发抑制方法，若使阴性对象和样品在同一条件下进行光合成时，则光合成活性亢进 10%以上（优选 15%以上，最优选 20%以上），而且蒸发作用的亢进被抑制在低于 10%（优选低于 5%，更优选低于 3%）。

这些测定，若根据实施例中记载的方法进行，则能够达到更正确的测定。

3. 本发明防干剂的使用方法

本发明防干剂可通过公知方法将其导入植物细胞的基因组，使具有导入后基因组的植物体培养或生长而使用。

将本发明防干剂导入植物细胞基因组的方法，可通过已公知的方法进行，作为该方法，可以举出在“2. 本发明的蒸发抑制方法”中记载的将土壤杆菌感染在植物组织的方法、聚乙二醇处理法、电穿孔法、以及基因枪法等，都是采用重组载体的方法。

当待编码 HSP 的核酸插入在重组载体中，并将该 HSP 使用于本发明防干剂时，可以使用插入有该核酸的重组载体或根据生长促进对象的植物制备的载体（通过公知的方法切取“编码 HSP 的核酸”并进行分离，通过公知方法导入至根据生长促进对象植物选择的重组载体中而构建）。

作为本发明防干剂的使用对象的植物，与“2. 本发明的蒸发抑制方法”

中记载的植物相同。

重组载体向植物细胞的导入，可通过事先插入在重组载体中的标记基因（例如，卡那霉素抗性基因（NPTII）、潮霉素抗性基因（HPT 基因）等的表达系来确认。例如，当将 NPTII 等抗生物质抗性基因作为标记基因使用时，则重组后在含有对应于抗性基因的抗生物质的培养基中培养植物细胞，选择在该培养基中生长的植物细胞，由此能够得到基因导入在基因组的株。

对所选株的培育，只要是本领域技术人员，均可以在适当的条件下进行。

实施例

下面，通过实施例更具体地说明本发明。

测定例 1：

1. 糖/淀粉的提取

糖的提取是根据 Rufty 方法进行（Rufty, T.W. and Huber, S.C. 1983. Plant Physiol. 72 : 474-480）。

即，按照下述方法进行糖分级。用液氮将新鲜重为 0.2 g 的叶子粉碎，并通过 5ml、80%(v/v)的乙醇在 100℃下煮沸 1 小时而提取。然后在 3000×g 下离心分离 5 分钟，回收上清。进而，将 2.5ml 的 80% (v/v)乙醇添加至残渣中进行悬浮，并以 3000×g 进行 5 分钟离心分离，从而回收上清，将上述操作重复两次。通过该 80% (v/v)乙醇提取的糖的分级，包括蔗糖、己糖、戊糖、可溶性低聚糖。

淀粉分级的提取是如下所述地进行。在该沉淀物中加入 0.2mol/L 氢氧化钾 1ml，在 100℃下处理 1 小时后，添加 1mol/L 的乙酸缓冲液(pH5.5)0.2mL 进行中和。进而，用 10ml 氨基葡萄糖苷酶（来自枯草杆菌（*Bacillus subtilis*）：和光纯药工业制，含 35 U/mL 的 50 mmol/L 乙酸缓冲液,pH 5.5)在 37℃下消化 16 小时。对该可溶化状态的糖进行淀粉分级。

2. 糖的定量

糖的定量是通过蒽酮法进行（Roe, J.H. 1955,J. Biol. Chem. 212 : 335-343）。即，在蒽酮试剂(含 0.05%蒽酮的 66% H₂SO₄)1ml 中，添加上述 1 得到的糖提取液 20-100 μl，使其在 100℃下反应 15 分钟。然后，以葡萄糖为标准测定 620nm 吸光度。

测定例 2：光合成活性的测定

二氧化碳的固定和蒸发速度，是在 CO₂ 为 350 ppm、温度为 25℃、湿度为 60%的条件下，通过光合作用测试系统(photosynthesis system) HCM -1000 (Heinz Walz GmbH, Germany)进行。这些测定是在上午 11 点~下午 1 点之间进行。

实施例 1：本发明防干剂的制造

从具有嗜盐隐杆藻 DnaK 基因的质粒 pEADK1 [Plant Mol. Biol., 35, 763-775(1997)]，切取含 DnaK 基因的 XbaI/BamHI 片段（即，由限制性酶 XbaI 及 BamHI 消化而得到的 DNA 片段），导入至二元载体 pBI121 的 XbaI / BamHI 认知部位。通过该操作，能够得到在二元载体中的花椰菜花叶病毒 35S 启动子与来自胭脂碱合成酶（NOS）的终止子之间导入了嗜盐隐杆藻 DnaK 基因的 pBI121-ADK。该质粒 pBI121-ADK，作为筛选标记具有来自上述二元载体 pBI121 的卡那霉素抗性基因（NPTII）。

将如此得到的 pBI121-ADK 作为冷冻干燥制剂的本发明防干剂 1。

pBI121-ADK 可在广泛通用于水稻、麦子等禾本科植物、烟草等茄科植物、结缕草等草本植物、以及其他各种植物（对观叶植物等也相同）中的本发明防干剂上应用。

另外，根据常用方法，使在插入上述 pBI121 之前的 DnaK 基因上游连接了 XbaI 粘着末端的 HVD1 基因加以连接，并导入至 pBI121 而得到的 pBI121-ADKHD 冷冻干燥，得到本发明防干剂 2。另外，通过同样的方法，能够得到使用了 ProT 基因的本发明防干剂 3（所得到的重组载体为 pBI121-ADKPT）。

同样，能够制造出含插入了小 HSP sHSP 的 pBI121-SH 的本发明防干剂 2，所述小 HSP sHSP 来自从 kazusa DNA 研究所得到的蓝绿藻(Cyanobacteria)，另外，同样可以制造出含插入了 HSP60 的 pBI121-H6 的本发明防干剂 3。

实施例 2：本发明防干剂在水稻中的使用

通过电穿孔法，将实施例 1 得到的本发明防干剂 1 导入根癌农杆菌（*Agrobacterium tumefaciens*）EHA101 株中。此时，作为二元载体使用

pCAMBIA [Nucleic Acid Res., 12, 8711-8721(1984)]。接着,对来自水稻(*Oryza sativa* L. *Notohikari*) 种子胚的不定胚状愈伤组织,利用含本发明防干剂的根癌农杆菌进行转化处理。使其在含 3%蔗糖及 50 μ g/mL 潮霉素的 Murashige & Skoog 琼脂培养基 [Plant Physiol., 15, 473-497(1962)] 上无菌生长,得到合计 250 个植物株。从中选择 15 种独立转化体 (F0), 采集种子。从 15 种 F1 中,选择 4 种 DnaK-mRNA 表达量多者,采集种子。所得到的 4 种转化体 (F2) 均表示基本相同的表型。以下,将其中的 1 种用于水稻的分析中。

另外,作为对照群使用仅导入 pBI121 且生长 5 周后的水稻 (图 1)。

结果,使用本发明防干剂 1 的水稻,根据测定例确认光合成活性时,可以确认比对照群 20%以上的亢进。

另一方面,根据测定例测定蒸发作用时,可以确认亢进均低于 3% (图 2)。

实施例 3: 本发明防干剂在烟草中的使用

通过电穿孔法,将实施例 1 得到的本发明防干剂 1 导入根癌农杆菌 LBA4404 株中。此时,作为二元载体,使用 pCAMBIA [Nucleic Acid Res., 12, 8711-8721(1984)]。

接着,利用导入了上述本发明防干剂 1 的根癌农杆菌,处理从烟草 (*Nicotiana tabacum* PetitHavaba SR1) 叶切取的圆形叶片。使其在含 3%蔗糖和 50 μ g/mL 卡那霉素的 Murashige & Skoog 寒天培养基上无菌生长,得到合计 250 个植物株。从中选择 15 种独立转化体 (F0), 采集种子。从 15 种 F1 中,选择 4 种 DnaK-mRNA 表达量多者,采集种子。所得到的 4 种转化体 (F2) 均表示基本相同的表型。

该烟草与没有作用本发明生长促进剂 1 的烟草 (野生烟草) 相比,能够确认烟草中的蒸发抑制效果。

实施例 4: 本发明防干剂在结缕草中的使用

将上述实施例 1 中制备的本发明防干剂 1 用于结缕草 (*Zoysia japonica*) 的原生质体中,使处理后的结缕草生长,比较该结缕草与未作用本发明防干剂 1 的结缕草 (野生结缕草),能够确认结缕草中的蒸发抑制效果。

实施例 5：本发明防干剂在剪股颖中的使用

通过上述实施例 1 中制备的本发明防干剂 2 处理匍匐剪股颖 (*Agrostis stolonifera*) 的原生质体, 并使该匍匐剪股颖生长。通过比较该匍匐剪股颖的生长和导入了仅插入有 HVD1 基因的表达载体 pBI121 的匍匐剪股颖生长, 能够确认本发明防干剂 2 的蒸发抑制效果。

实施例 6：本发明防干剂在白杨中的使用

通过电穿孔法, 将实施例 1 得到的本发明防干剂 2 导入根癌农杆菌 LBA4404 株中。此时, 作为二元载体, 使用 pE2113- Ω [Nucleic Acid Res., 12, 8711-8721(1984)]。

接着, 将无菌条件下从白杨 (*Populus tremula*) 苗取出的胚轴, 在导入了上述本发明防干剂 2 的根癌农杆菌溶液中浸渍 7 分钟。然后, 将其置于 LS 培养基, 使其在暗处生长 2 天。然后, 取出胚轴, 用 CIM 培养基 (callus induction medium: 在 LS 培养基含有 $0.1 \mu\text{mol/L}$ 的 4PPU、 $50 \mu\text{g/mL}$ 的卡那霉素、 $300 \mu\text{g/mL}$ 羧苄青霉素、0.3% 的 gel lyte) 使其生长。形成新芽后, 切出新芽, 移到 RIM 培养基 (root induction medium: LS 培养基上含有 $4 \mu\text{mol/L}$ 的吲哚乙酸、 $50 \mu\text{g/mL}$ 的卡那霉素、 $300 \mu\text{g/mL}$ 的羧苄青霉素、0.3% 的 gel lyte) 使其生长。等到根分化、且植物生长一定程度后, 使其适应水土移到盆中生长, 得到植物株。其中选择 7 种独立转化体 (F0), 采集种子。从 5 种 F1 中, 选择 DnaK-mRNA 表达量多的 4 种, 结果, 所得 4 种转化体 (F2) 均表示基本上相同的表达型。

比较该白杨与未作用本发明防干剂 2 的白杨 (野生白杨), 结果能够确认白杨中的蒸发抑制效果。

<110> SCIVAX股份有限公司 (SCIVAX Corporation)

<120> 防干剂 (New Antidesiccant)

<130> T0901278

<150> JP 07/83365

<151> 2007-03-28

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 2166

<212> DNA

<213> 嗜盐隐杆藻 (Phanothece halophytica)

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (2166)

<223>

<400> 1

atg gga aaa gtt att ggt ata gat ctc ggc acc acc aac agt tgc ttt	48
Met Gly Lys Val Ile Gly Ile Asp Leu Gly Thr Thr Asn Ser Cys Phe	
1 5 10 15	

gct gtt tta gaa ggc ggt aaa ccc ctt gtt att gag aat gta gaa gga	96
Ala Val Leu Glu Gly Gly Lys Pro Leu Val Ile Glu Asn Val Glu Gly	
20 25 30	

gga cgc aca acc cct agc att gtt gct ttt acc aaa gaa aag gag cgg	144
Gly Arg Thr Thr Pro Ser Ile Val Ala Phe Thr Lys Glu Lys Glu Arg	
35 40 45	

tta gtg ggt caa ctg gcg aaa cga caa gcc gta acc aat gca gaa aat	192
Leu Val Gly Gln Leu Ala Lys Arg Gln Ala Val Thr Asn Ala Glu Asn	
50 55 60	

acg att tat agc atc aag cgg ttt att gga cga cgc tgg gaa gat acc	240
Thr Ile Tyr Ser Ile Lys Arg Phe Ile Gly Arg Arg Trp Glu Asp Thr	
65 70 75 80	

gag caa gag cgc aac cga gtt tct tac cac tgt gtt cct gga cga gat	288
Glu Gln Glu Arg Asn Arg Val Ser Tyr His Cys Val Pro Gly Arg Asp	
85 90 95	

aaa acg gtg gat gtg aaa tgt tgg ggc aaa caa tac acg ccc caa gaa	336
Lys Thr Val Asp Val Lys Cys Trp Gly Lys Gln Tyr Thr Pro Gln Glu	
100 105 110	

ctc tcc gct atg atc tta caa acc ctg aaa gcg gga gcc gaa gcc tat	384
Leu Ser Ala Met Ile Leu Gln Thr Leu Lys Ala Gly Ala Glu Ala Tyr	
115 120 125	

ctc aac gag acg gta acc gaa gca gtg att aca gtt ccc gcc tat ttc Leu Asn Glu Thr Val Thr Glu Ala Val Ile Thr Val Pro Ala Tyr Phe 130 135 140	432
acc gat gcc caa cgt cag gca act aaa gac gca ggg acg atc gcg ggt Thr Asp Ala Gln Arg Gln Ala Thr Lys Asp Ala Gly Thr Ile Ala Gly 145 150 155 160	480
ttg aat gtg atg aga att atc aat gag ccc aca gca gca gcc ctt gcc Leu Asn Val Met Arg Ile Ile Asn Glu Pro Thr Ala Ala Ala Leu Ala 165 170 175	528
ttt ggt ctc gat aag caa gaa caa aga gag cag gtt ctg gtc tat gac Phe Gly Leu Asp Lys Gln Glu Gln Arg Glu Gln Val Leu Val Tyr Asp 180 185 190	576
tta ggc ggt ggt acg ctt gat gtt tcc atc ctg caa ctg gga gat ggg Leu Gly Gly Gly Thr Leu Asp Val Ser Ile Leu Gln Leu Gly Asp Gly 195 200 205	624
gtg ttt gaa gtg aaa gca acg gcg ggg aac aac cat ctc gga gga gat Val Phe Glu Val Lys Ala Thr Ala Gly Asn Asn His Leu Gly Gly Asp 210 215 220	672
gat ttt gat aat gtc att gtc gag tgg atg ctc tca gaa ttt caa gcg Asp Phe Asp Asn Val Ile Val Glu Trp Met Leu Ser Glu Phe Gln Ala 225 230 235 240	720
caa gaa ggc atc aat ctt aat gaa gat aaa atg gca atg caa cgt ttg Gln Glu Gly Ile Asn Leu Asn Glu Asp Lys Met Ala Met Gln Arg Leu 245 250 255	768
cgg gaa gca gca gaa cgg gcc aaa atc gaa ctt tcg acg cgc cca act Arg Glu Ala Ala Glu Arg Ala Lys Ile Glu Leu Ser Thr Arg Pro Thr 260 265 270	816
acc tcc att aat tta ccc ttt att act gct ttt agt aaa gga gga ggg Thr Ser Ile Asn Leu Pro Phe Ile Thr Ala Phe Ser Lys Gly Gly Gly 275 280 285	864
gag gtt ggt ccg aaa cat tta aag tta aac tta agc cga gcc aag ttc Glu Val Gly Pro Lys His Leu Lys Leu Asn Leu Ser Arg Ala Lys Phe 290 295 300	912
aat gaa ctc tct cgt ccc ttg gtg gaa aaa aca att gat ccc ctc aag Asn Glu Leu Ser Arg Pro Leu Val Glu Lys Thr Ile Asp Pro Leu Lys 305 310 315 320	960
caa gcc att gaa gat tct gga ctt agt gtt gac caa att gat cgt atc Gln Ala Ile Glu Asp Ser Gly Leu Ser Val Asp Gln Ile Asp Arg Ile 325 330 335	1008
tta ctg gtg ggc ggg tca act cgc att cct gag gtt cag gaa gcc ttg Leu Leu Val Gly Gly Ser Thr Arg Ile Pro Glu Val Gln Glu Ala Leu 340 345 350	1056

aaa aag ttt ttt aat ggc aaa gaa cca gat cgc tcg att aac ccc gat Lys Lys Phe Phe Asn Gly Lys Glu Pro Asp Arg Ser Ile Asn Pro Asp 355 360 365	1104
gaa gct gtt gct ttg ggt gct gcg att caa ggt ggg gtg ttg ggg caa Glu Ala Val Ala Leu Gly Ala Ala Ile Gln Gly Gly Val Leu Gly Gln 370 375 380	1152
gag caa gaa gta gaa gat tta tta ctt tta gtt gtc att ccc ctt tct Glu Gln Glu Val Glu Asp Leu Leu Leu Leu Val Val Ile Pro Leu Ser 385 390 395 400	1200
tta ggc att gaa acc ctt gga gaa gta ttt aca aaa gta atc gag cgt Leu Gly Ile Glu Thr Leu Gly Glu Val Phe Thr Lys Val Ile Glu Arg 405 410 415	1248
aat acg acc att ccc acc agt aag tca caa gtg ttt tct act gcc agt Asn Thr Thr Ile Pro Thr Ser Lys Ser Gln Val Phe Ser Thr Ala Ser 420 425 430	1296
gat gga caa acc tct gta gaa att cat gtt tta caa ggg gaa cgg gcg Asp Gly Gln Thr Ser Val Glu Ile His Val Leu Gln Gly Glu Arg Ala 435 440 445	1344
atg gca aat gat aat aaa acc ctt ggt aag ttc ctg ctg aca ggg att Met Ala Asn Asp Asn Lys Thr Leu Gly Lys Phe Leu Leu Thr Gly Ile 450 455 460	1392
cct gct gct ccc cga ggc gta ccc caa att gaa gtg agc ttt gat att Pro Ala Ala Pro Arg Gly Val Pro Gln Ile Glu Val Ser Phe Asp Ile 465 470 475 480	1440
gat gtc aat ggc atc ttg aaa gta tcc gca gaa gat aaa ggc act ggg Asp Val Asn Gly Ile Leu Lys Val Ser Ala Glu Asp Lys Gly Thr Gly 485 490 495	1488
cgt gaa caa ggc att gtt att aaa gaa aca ggg ggg ctg tct caa caa Arg Glu Gln Gly Ile Val Ile Lys Glu Thr Gly Gly Leu Ser Gln Gln 500 505 510	1536
gaa atc gag cgt atg cag caa gaa gcc gaa caa tat gcg gac gaa gac Glu Ile Glu Arg Met Gln Gln Glu Ala Glu Gln Tyr Ala Asp Glu Asp 515 520 525	1584
cgc aaa cgg atg caa cgg atc gaa ctt agt aac caa gcc gat agc cta Arg Lys Arg Met Gln Arg Ile Glu Leu Ser Asn Gln Ala Asp Ser Leu 530 535 540	1632
ttc tat agc cat gaa gcc act ctc aaa gat aat caa ggc tta att cca Phe Tyr Ser His Glu Ala Thr Leu Lys Asp Asn Gln Gly Leu Ile Pro 545 550 555 560	1680
caa aaa gta aaa gcc act gcg aat aag aag aaa gaa gaa ctg atg gcg Gln Lys Val Lys Ala Thr Ala Asn Lys Lys Lys Glu Glu Leu Met Ala 565 570 575	1728
ata ctt gaa gat ccc aat gtt gaa ttg gga gtc att caa act cgc ctt	1776

Ile	Leu	Glu	Asp	Pro	Asn	Val	Glu	Leu	Gly	Val	Ile	Gln	Thr	Arg	Leu	
			580					585					590			
gaa	gac	tat	cga	caa	gct	gta	tta	agc	atg	gga	tca	gaa	gtt	tat	agt	1824
Glu	Asp	Tyr	Arg	Gln	Ala	Val	Leu	Ser	Met	Gly	Ser	Glu	Val	Tyr	Ser	
		595					600					605				
caa	ggc	agt	agc	aaa	tct	tcc	gca	agg	gat	tat	gag	aca	gtg	gga	gaa	1872
Gln	Gly	Ser	Ser	Lys	Ser	Ser	Ala	Arg	Asp	Tyr	Glu	Thr	Val	Gly	Glu	
	610					615					620					
gaa	gag	atg	act	agg	gaa	act	gga	aat	tct	caa	gag	tcc	aat	gct	gcc	1920
Glu	Glu	Met	Thr	Arg	Glu	Thr	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Asn	Ala	Ala	
625					630					635					640	
ttc	tcc	acc	caa	cca	gag	gga	aca	gtc	aat	aat	gat	aac	ctc	gaa	ctg	1968
Phe	Ser	Thr	Gln	Pro	Glu	Gly	Thr	Val	Asn	Asn	Asp	Asn	Leu	Glu	Leu	
				645					650					655		
gaa	gct	gtg	ttt	agc	acg	tat	aat	gat	cac	aca	caa	ggt	tca	gat	gtt	2016
Glu	Ala	Val	Phe	Ser	Thr	Tyr	Asn	Asp	His	Thr	Gln	Gly	Ser	Asp	Val	
			660					665					670			
gct	acc	tcc	tcc	cat	gat	gag	ata	gat	tta	gga	gat	gca	agt	gac	aat	2064
Ala	Thr	Ser	Ser	His	Asp	Glu	Ile	Asp	Leu	Gly	Asp	Ala	Ser	Asp	Asn	
			675				680					685				
tcc	cag	acg	aac	ttc	gat	ctc	gac	gat	gaa	gac	ttt	aac	ccc	ttt	gaa	2112
Ser	Gln	Thr	Asn	Phe	Asp	Leu	Asp	Asp	Glu	Asp	Phe	Asn	Pro	Phe	Glu	
	690					695					700					
gac	ttt	gat	gaa	gaa	gag	gaa	gcc	tca	act	gat	gat	tat	gag	gcg	gtg	2160
Asp	Phe	Asp	Glu	Glu	Glu	Glu	Ala	Ser	Thr	Asp	Asp	Tyr	Glu	Ala	Val	
705					710					715					720	
gaa	taa															2166
Glu																

<210> 2

<211> 721

<212> PRT

<213> 嗜盐隐杆藻 (Phanothece halophytica)

<400> 2

Met Gly Lys Val Ile Gly Ile Asp Leu Gly Thr Thr Asn Ser Cys Phe
1 5 10 15

Ala Val Leu Glu Gly Gly Lys Pro Leu Val Ile Glu Asn Val Glu Gly
20 25 30

Gly Arg Thr Thr Pro Ser Ile Val Ala Phe Thr Lys Glu Lys Glu Arg
35 40 45

Leu Val Gly Gln Leu Ala Lys Arg Gln Ala Val Thr Asn Ala Glu Asn
 50 55 60

Thr Ile Tyr Ser Ile Lys Arg Phe Ile Gly Arg Arg Trp Glu Asp Thr
 65 70 75 80

Glu Gln Glu Arg Asn Arg Val Ser Tyr His Cys Val Pro Gly Arg Asp
 85 90 95

Lys Thr Val Asp Val Lys Cys Trp Gly Lys Gln Tyr Thr Pro Gln Glu
 100 105 110

Leu Ser Ala Met Ile Leu Gln Thr Leu Lys Ala Gly Ala Glu Ala Tyr
 115 120 125

Leu Asn Glu Thr Val Thr Glu Ala Val Ile Thr Val Pro Ala Tyr Phe
 130 135 140

Thr Asp Ala Gln Arg Gln Ala Thr Lys Asp Ala Gly Thr Ile Ala Gly
 145 150 155 160

Leu Asn Val Met Arg Ile Ile Asn Glu Pro Thr Ala Ala Ala Leu Ala
 165 170 175

Phe Gly Leu Asp Lys Gln Glu Gln Arg Glu Gln Val Leu Val Tyr Asp
 180 185 190

Leu Gly Gly Gly Thr Leu Asp Val Ser Ile Leu Gln Leu Gly Asp Gly
 195 200 205

Val Phe Glu Val Lys Ala Thr Ala Gly Asn Asn His Leu Gly Gly Asp
 210 215 220

Asp Phe Asp Asn Val Ile Val Glu Trp Met Leu Ser Glu Phe Gln Ala
 225 230 235 240

Gln Glu Gly Ile Asn Leu Asn Glu Asp Lys Met Ala Met Gln Arg Leu
 245 250 255

Arg Glu Ala Ala Glu Arg Ala Lys Ile Glu Leu Ser Thr Arg Pro Thr
 260 265 270

Thr Ser Ile Asn Leu Pro Phe Ile Thr Ala Phe Ser Lys Gly Gly Gly
 275 280 285

Glu Val Gly Pro Lys His Leu Lys Leu Asn Leu Ser Arg Ala Lys Phe
 290 295 300

Asn Glu Leu Ser Arg Pro Leu Val Glu Lys Thr Ile Asp Pro Leu Lys
 305 310 315 320

Gln Ala Ile Glu Asp Ser Gly Leu Ser Val Asp Gln Ile Asp Arg Ile
 325 330 335

Leu Leu Val Gly Gly Ser Thr Arg Ile Pro Glu Val Gln Glu Ala Leu
 340 345 350

Lys Lys Phe Phe Asn Gly Lys Glu Pro Asp Arg Ser Ile Asn Pro Asp
 355 360 365

Glu Ala Val Ala Leu Gly Ala Ala Ile Gln Gly Gly Val Leu Gly Gln
 370 375 380

Glu Gln Glu Val Glu Asp Leu Leu Leu Leu Val Val Ile Pro Leu Ser
 385 390 395 400

Leu Gly Ile Glu Thr Leu Gly Glu Val Phe Thr Lys Val Ile Glu Arg
 405 410 415

Asn Thr Thr Ile Pro Thr Ser Lys Ser Gln Val Phe Ser Thr Ala Ser
 420 425 430

Asp Gly Gln Thr Ser Val Glu Ile His Val Leu Gln Gly Glu Arg Ala
 435 440 445

Met Ala Asn Asp Asn Lys Thr Leu Gly Lys Phe Leu Leu Thr Gly Ile
 450 455 460

Pro Ala Ala Pro Arg Gly Val Pro Gln Ile Glu Val Ser Phe Asp Ile
 465 470 475 480

Asp Val Asn Gly Ile Leu Lys Val Ser Ala Glu Asp Lys Gly Thr Gly
 485 490 495

Arg Glu Gln Gly Ile Val Ile Lys Glu Thr Gly Gly Leu Ser Gln Gln
500 505 510

Glu Ile Glu Arg Met Gln Gln Glu Ala Glu Gln Tyr Ala Asp Glu Asp
515 520 525

Arg Lys Arg Met Gln Arg Ile Glu Leu Ser Asn Gln Ala Asp Ser Leu
530 535 540

Phe Tyr Ser His Glu Ala Thr Leu Lys Asp Asn Gln Gly Leu Ile Pro
545 550 555 560

Gln Lys Val Lys Ala Thr Ala Asn Lys Lys Lys Glu Glu Leu Met Ala
565 570 575

Ile Leu Glu Asp Pro Asn Val Glu Leu Gly Val Ile Gln Thr Arg Leu
580 585 590

Glu Asp Tyr Arg Gln Ala Val Leu Ser Met Gly Ser Glu Val Tyr Ser
595 600 605

Gln Gly Ser Ser Lys Ser Ser Ala Arg Asp Tyr Glu Thr Val Gly Glu
610 615 620

Glu Glu Met Thr Arg Glu Thr Gly Asn Ser Gln Glu Ser Asn Ala Ala
625 630 635 640

Phe Ser Thr Gln Pro Glu Gly Thr Val Asn Asn Asp Asn Leu Glu Leu
645 650 655

Glu Ala Val Phe Ser Thr Tyr Asn Asp His Thr Gln Gly Ser Asp Val
660 665 670

Ala Thr Ser Ser His Asp Glu Ile Asp Leu Gly Asp Ala Ser Asp Asn
675 680 685

Ser Gln Thr Asn Phe Asp Leu Asp Asp Glu Asp Phe Asn Pro Phe Glu
690 695 700

Asp Phe Asp Glu Glu Glu Glu Ala Ser Thr Asp Asp Tyr Glu Ala Val
705 710 715 720

Glu

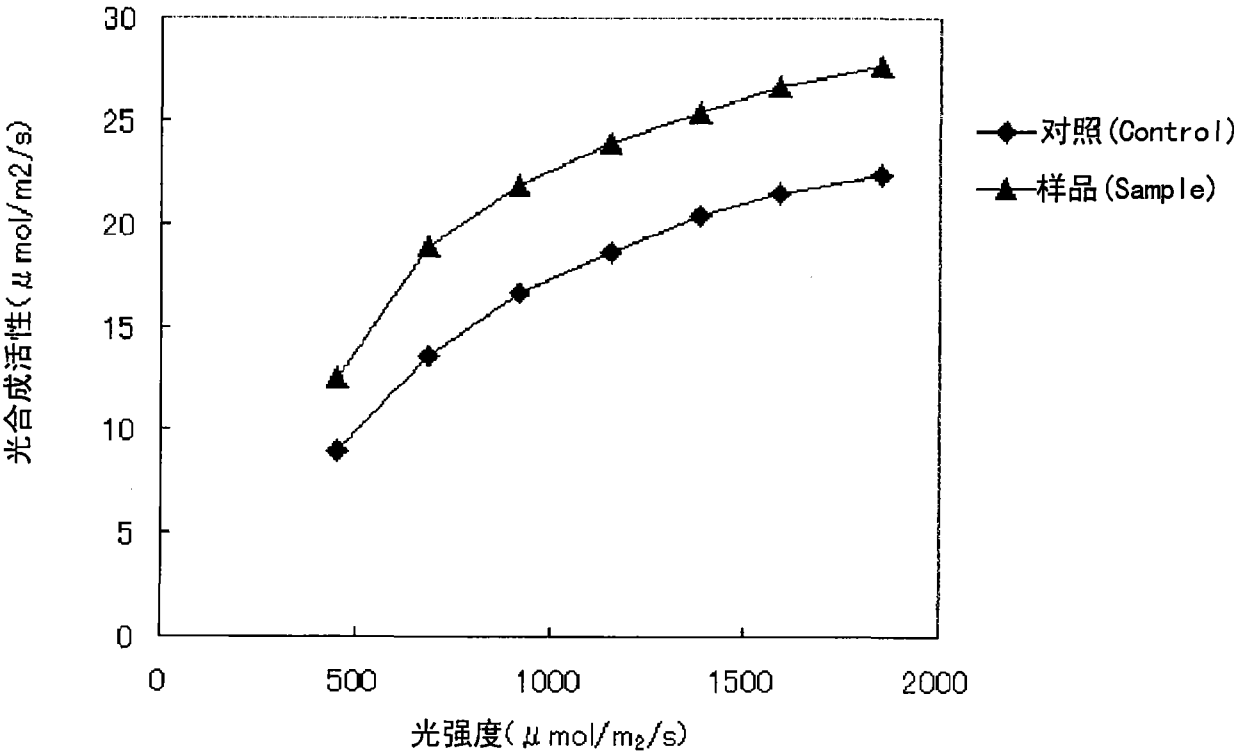


图1

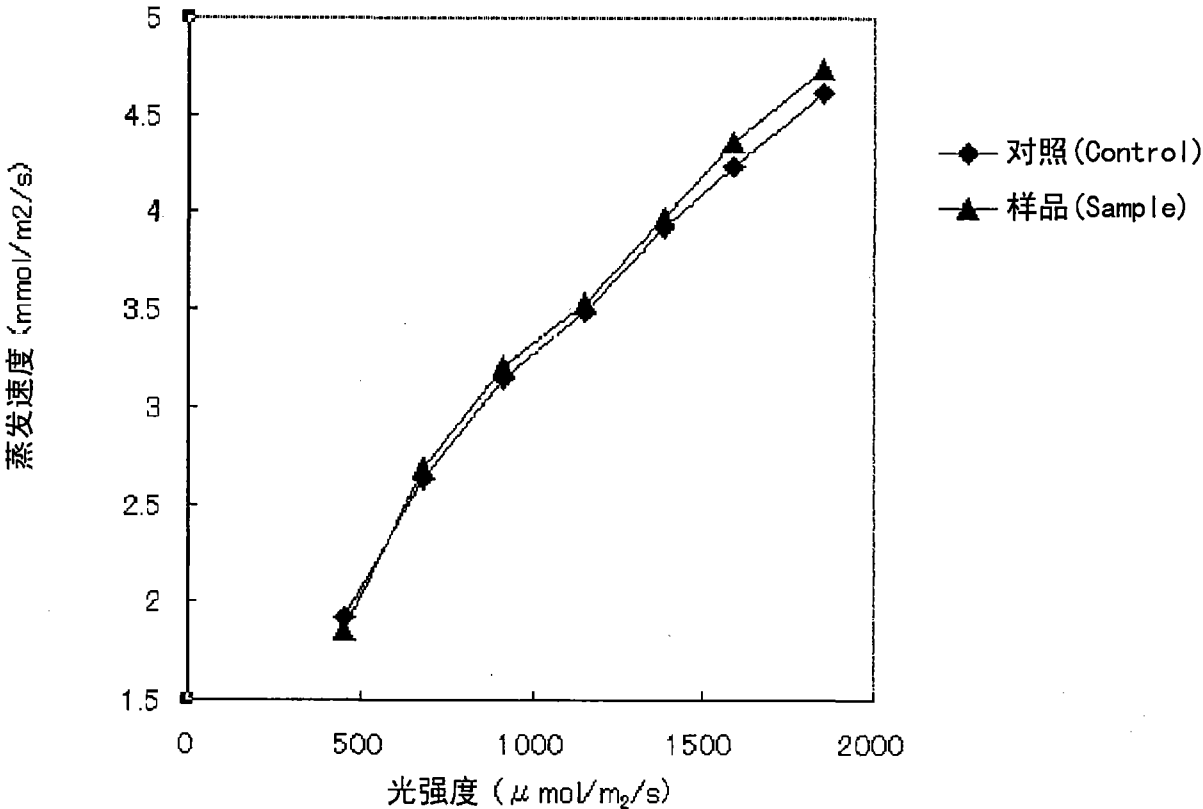


图2