

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4942082号
(P4942082)

(45) 発行日 平成24年5月30日 (2012.5.30)

(24) 登録日 平成24年3月9日 (2012.3.9)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

A O 1 H 5/00 (2006.01)

A O 1 H 5/00 A

C O 7 K 14/415 (2006.01)

C O 7 K 14/415

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/00 1 O 3

請求項の数 7 (全 32 頁)

(21) 出願番号 特願2006-177527 (P2006-177527)
 (22) 出願日 平成18年6月28日 (2006.6.28)
 (65) 公開番号 特開2008-5726 (P2008-5726A)
 (43) 公開日 平成20年1月17日 (2008.1.17)
 審査請求日 平成21年1月16日 (2009.1.16)

特許法第30条第1項適用 平成18年3月21日 日本植物生理学会主催の「第47回日本植物生理学会年会」において文書をもって発表

(73) 特許権者 505374783
 独立行政法人日本原子力研究開発機構
 茨城県那珂郡東海村村松4番地49
 (74) 代理人 100140109
 弁理士 小野 新次郎
 (74) 代理人 100075270
 弁理士 小林 泰
 (74) 代理人 100080137
 弁理士 千葉 昭男
 (74) 代理人 100096013
 弁理士 富田 博行
 (74) 代理人 100117813
 弁理士 深澤 憲広

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 植物のオーキシシンおよびオーキシシン系除草剤の感受性に関わる新規遺伝子

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

SEQ ID NO: 2で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質を、植物細胞において機能低下させることにより、植物個体に対してオーキシシンあるいはオーキシシン系除草剤への耐性を賦与する方法。

【請求項2】

SEQ ID NO: 2で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質の機能低下が、SEQ ID NO: 1で示される塩基配列における変異により生じる、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

SEQ ID NO: 2で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質の機能低下が、SEQ ID NO: 1で示される塩基配列における欠失変異により生じる、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

SEQ ID NO: 2で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質が、植物の胚軸伸長を抑制する機能を有する、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】

前記タンパク質が、シロイヌナズナ由来である、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】

植物細胞中でSEQ ID NO: 2で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質を機能欠損させた、オーキシシンあるいはオーキシシン系除草剤への耐性を賦与された、遺伝子改変植物体あ

20

るいは遺伝子改変植物細胞。

【請求項7】

改変された遺伝子が、SMAP1 (SEQ ID NO: 1) である、請求項6に記載の遺伝子改変植物体あるいは遺伝子改変植物細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、植物における胚軸伸長を抑制する遺伝子、オーキシン系除草剤あるいは単にオーキシンの感受性に関わる遺伝子を同定することに関する。本発明はまた、そのような植物における胚軸伸長を抑制する遺伝子、オーキシン系除草剤あるいは単にオーキシンの感受性に関わる遺伝子または遺伝子発現をモジュレートし、植物における胚軸伸長やオーキシン系除草剤あるいは単にオーキシンの感受性を制御することにも関する。

10

【背景技術】

【0002】

植物ホルモンであるオーキシンは、植物の胚発生や胚軸伸長から老化までのあらゆる場面での生長制御に重要な役割を果たしている。過去10年にわたり、生化学的手法とオーキシンに対する応答が変化した変異体を解析する遺伝学的手法とを組み合わせることにより、オーキシンの作用機序が明らかにされてきた（非特許文献1；非特許文献2；非特許文献3；非特許文献4）。オーキシシンシグナル伝達のメカニズムは、ユビキチン-介在性タンパク質分解に依存することが見いだされ、多数の関連するタンパク質やその相互作用が明らかにされてきた。概説すると、オーキシンは、SCF^{TIR1}と呼ばれる複数サブユニットから成るE3ユビキチンリガーゼの構成要素であるTIR1 (transport inhibitor response 1) タンパク質と直接的に結合する；オーキシン結合が、SCF^{TIR1}およびAUX (オーキシン) / IAA (インドール-3-酢酸) タンパク質と総称される多数の分子からなる制御タンパク質のファミリーの構成分子との相互作用を促進する。SCF^{TIR1}は、AUX/IAAタンパク質をユビキチン化し、その速やかな分解を誘導する。AUX/IAAタンパク質の分解・消失により、オーキシン依存性の遺伝子発現を制御する転写因子である1または複数のオーキシン-反応因子 (ARFタンパク質) が、AUX/IAAタンパク質による阻害から解放されて、放出される。その結果、オーキシン依存性の遺伝子発現のカスケードが活性化し、オーキシン応答が引き起こされる。

20

30

【0003】

これらの研究により、オーキシシンシグナル伝達が解明されたが、多数の領域が未だ闇に包まれている。例えば、オーキシンに対する初期段階の特定の反応は、ヘテロ-三量体G-タンパク質により媒介されることが報告されたが（非特許文献5；非特許文献6）、これらがSCF^{TIR1}-複合体経路とどのように関連しているのかについては明らかにはなっていない。さらに、植物は、外来性オーキシンに対して数桁の広い濃度範囲にわたって反応するが、SCF^{TIR1}-複合体経路がどのようにしてそのような広い濃度範囲に適応するかは明らかになっていない。またさらに、オーキシンの極性移動プロセスは、単純に周辺の濃度による制御よりも、オーキシン作用とより深く関連しているようであるが、この関連性の詳細は、未だ明らかになっていない。

40

【0004】

このような研究の進展の多くは、遺伝的アプローチによる、オーキシンに対する反応の変化を伴う変異体のスクリーニングによりもたらされた；しかしながら、オーキシンは植物の胚発生や生育には不可欠な物質であることを考慮すると、オーキシンを用いて変異体の幼苗をスクリーニングすることには、限界がある可能性がある。

【0005】

この問題を解決するため、遺伝学的アプローチと化学遺伝学的アプローチとを組み合わせたアプローチがとられ、オーキシンの詳細な作用機構を明らかにするためのオーキシンの情報伝達経路を阻害する化学物質の同定が進められている。

【0006】

50

PCIB (p-クロロフェノキシイソ酪酸) は、合成オーキシシンまたはオーキシシン系除草剤として知られる2,4-D (2,4-ジクロロフェノキシ酢酸) と構造上類似した化合物であり (非特許文献7)、いくつかのオーキシシン-誘導性生理学的反応を競合的に阻害することが示された (非特許文献8; 非特許文献9; 非特許文献10)。古くからオーキシシンの生理作用を競争的に阻害することで知られていたが、最近になってオーキシシンによる遺伝子発現誘導や AUX/IAAタンパク質の分解の阻害なども軽減する作用をもつことも明らかとなった。

【0007】

また、オーキシシン系除草剤として知られる2,4-D (2,4-ジクロロフェノキシ酢酸) は、数十年間にわたり、主としてその安定性が高いという理由から、実験や変異体スクリーニングにおいて、オーキシシンの外来性供給源として使用されてきた。2,4-DおよびIAAは、共通のシグナル伝達経路を共有していることが、一般的に受け入れられてきた (例えば、非特許文献12)。2,4-DとIAAとのあいだで認識されている相違点は、輸送において、2,4-DはIAAよりもゆっくりと流出することが示唆される点、そして代謝において、2,4-Dの分解速度がIAAよりも遅いため2,4-Dが細胞内に蓄積されると考えられる点である (非特許文献13; 非特許文献14; 非特許文献15; 非特許文献16; 非特許文献17)。

【非特許文献1】 Dharmasiri N, Estelle M (2004) Trends in Plant Science 9: 302-308

【非特許文献2】 Dharmasiri N, et al., (2005) Nature 435: 441-445

【非特許文献3】 Kepinski S, and Leyser O (2005) Nature 435: 446-451

【非特許文献4】 Woodward AW, and Bartel B (2005) Ann Bot 95: 707-735

【非特許文献5】 Ullah H, et al., (2001) Science 292: 2066-2069

【非特許文献6】 Ullah H, et al., (2003) Plant Cell 15: 393-409

【非特許文献7】 Jonsson A (1961) In Encyclopedia of plant physiology, (W Ruhland, ed, Ed Vol 14. Springer, Berlin, pp 959-1006

【非特許文献8】 Aberg B (1950) Physiol Plant 3: 447-461

【非特許文献9】 Aberg B (1951) Physiol Plant 4: 627-640

【非特許文献10】 Burstrom H (1950) Physiol. Plant. 3: 277-292

【非特許文献11】 Oono Y, et al., (2003) Plant Physiol. 133: 1135-1147

【非特許文献12】 Taiz L, and Zeiger E (2002) In. Sinauer Associates, Inc, Sunderland MA, pp 423 - 460

【非特許文献13】 Delbarre et al., (1996) Planta 198: 532-541

【非特許文献14】 Sterling and Hall, (1997) In Herbicide activity: toxicology, biochemistry and molecular biology, (RM Roe, JD Burton, RJ Kuhr, eds). IOS Press, Amsterdam, pp 111-141

【非特許文献15】 Jackson et al., (2002) The Plant Journal 32: 573-583

【非特許文献16】 Staswick et al., (2005) Plant Cell 17: 616-627

【非特許文献17】 Campanoni and Nick, (2005) Plant Physiol. 137: 939-948

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明は、植物における胚軸伸長を抑制する遺伝子、オーキシシン系除草剤あるいは単にオーキシシンの感受性に関わる遺伝子を同定することを目的とする。本発明はまた、そのような植物における胚軸伸長を抑制する遺伝子、オーキシシン系除草剤あるいは単にオーキシシンの感受性に関わる遺伝子の発現をモジュレートし、植物における胚軸伸長やオーキシシン系除草剤あるいは単にオーキシシンの感受性を制御することもまた目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明の発明者らは、放射線照射により作成されたaar1変異株の原因遺伝子を解析し、そしてaar1変異株の性質を解明することにより、上記課題について種々検討した。その結果、SMAP1遺伝子およびSMAP2遺伝子と命名した新規の遺伝子をクローニングし、それぞれ

10

20

30

40

50

の遺伝子のDNA塩基配列の解析およびそのSMAP1遺伝子のDNAによりコードされるタンパク質の解析を行うことにより、本発明を完成するに至った。

【0010】

すなわち、本発明の一態様において、植物細胞に対してオーキシンあるいはオーキシン系除草剤への感受性を賦与する活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を有する核酸を提供する。上述する本発明の核酸には、SEQ ID NO: 1またはSEQ ID NO: 3で示される塩基配列またはこれらの配列に類似する塩基配列からなる塩基配列からなり、植物細胞に対してオーキシンあるいはオーキシン系除草剤への感受性を賦与する活性を有するタンパク質をコードする核酸が含まれる（図1）。

【0011】

また、本発明は本発明の別の態様において、上述したような核酸によりコードされ、植物細胞に対してオーキシンあるいはオーキシン系除草剤への感受性を賦与する活性を有するタンパク質もまた、提供する。具体的には、本発明は、植物細胞に対してオーキシンあるいはオーキシン系除草剤への感受性を賦与する活性を有するタンパク質を提供する。上述する本発明のタンパク質には、SEQ ID NO: 2またはSEQ ID NO: 4で示されるアミノ酸配列またはこれらの配列に類似するアミノ酸配列からなり、植物細胞に対してオーキシンあるいはオーキシン系除草剤への感受性を賦与する活性を有する、タンパク質が含まれる（図1）。

【0012】

本発明は別の態様において、上述した核酸のいずれかを含有する組換えベクター；植物細胞中でのオーキシンあるいはオーキシン系除草剤への感受性を賦与された、遺伝子改変植物体あるいは遺伝子改変植物細胞；もまた提供する。

【発明の効果】

【0013】

本発明により、植物における胚軸伸長を抑制する遺伝子、オーキシン系除草剤あるいは単にオーキシンの感受性を賦与する活性を有するタンパク質、SMAP1およびSMAP2、およびそれらをコードする核酸が提供される。本発明により、SMAP1またはSMAP2の発現をモジュレートし、植物における胚軸伸長や、オーキシンあるいはオーキシン系除草剤の感受性を制御することもできる。

【発明の実施の形態】

【0014】

本発明の発明者らは、シロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）の乾燥種子に対してイオンビームを照射することにより得られた、aar1変異株として定義されるシロイヌナズナの変異株の原因遺伝子を同定し、そしてaar1変異株の性質を解明した。本発明において解析の対象としたaar1変異株は、明条件下においても暗条件下においても、野生型よりも長い胚軸を有することを特徴としている。

【0015】

そのため、本発明の発明者らはまず、原因遺伝子を同定するための研究を行った。その結果、aar1変異株においては、4番染色体のT6G15遺伝子座上の9692～53586 ntのあいだに欠損領域が存在し、この領域にaar1変異株の原因遺伝子として推定される遺伝子が存在することが推定された（この領域には、8つの注釈付き遺伝子が含有される）。さらに、PCIBに対して耐性であるET-202変異体（本明細書中ではaar1-2変異体とも呼ぶ）において解析を行ったところ、aar1-1変異体で欠損していた8個の遺伝子のうち、4個の遺伝子（オープンリーディングフレーム）を含む約27 Kbが、トランスポゾンにより破壊され欠失していることが明らかになった

さらに原因遺伝子を特定するため、aar1変異株において相補性試験を行ったところ、At4g13520（4番染色体のT6G15遺伝子座上の48928-49367 nt）を含有する断片を導入したaar1-1形質転換体のみが、野生型と同様の表現型（例えば、根の生長におけるPCIB感受性および2,4-D感受性の回復や、aar1-1系統よりも短い胚軸長）を示すことが明らかになった

【0016】

この実験結果を裏付けるため、RNAiベクター中に組み込んだ目的とするDNA断片をアグロバクテリウムを介して野生型へ導入することにより、RNAi解析を行った。その結果、At4g13520に対する二本鎖RNA構築物を発現するRNAi個体のみが、aar1-1変異体と同様の表現型（すなわち、2,4-DとPCIB感受性の低下、および胚軸が長くなること）を有することが明らかになった。

【0017】

このようにして、推定等電点3.3 (pK 3.3) の低分子タンパク質 (62アミノ酸、予測分子量6.9 kDa) をコードするAt4g13520 (4番染色体のT6G15遺伝子座上の48928-49367 nt) 遺伝子が、aar1変異の原因遺伝子であることが明らかになった。本発明の発明者らは、この遺伝子によりコードされるタンパク質のことを、低分子酸性タンパク質1 (small acidic protein 1; SMAP1) と命名した (ヌクレオチド配列は、SEQ ID NO: 1、アミノ酸配列は、SEQ ID NO: 2) (図1)。また、解析の結果、シロイヌナズナには類似する遺伝子も含まれ、その分子のことを、SMAP2と命名した (ヌクレオチド配列は、SEQ ID NO: 3、アミノ酸配列は、SEQ ID NO: 4) (図1)。SMAP1とSMAP2は、ヌクレオチドレベルで62%の同一性を有し、アミノ酸レベルで43%の同一性を有する。

10

【0018】

上述したSMAP1遺伝子のヌクレオチド配列をESTsのBLAST検索の結果、フェニルアラニンおよびアスパラギン酸 (F/D) を多く含んだ非常に保存されたC-末端ドメインを有するSMAP1の推定ホモログの存在が、ヒト、マウス、ハエ、魚 (フグ、ダニオなど)、およびコメのデータベースにおいて確認されたが、酵母および原核生物ゲノム中には、存在しなかった。SMAP1のヒト推定ホモログ、SMAP1のマウス推定ホモログ、SMAP1のハエ推定ホモログ、SMAP1の魚推定ホモログ、およびSMAP1のコメ推定ホモログとのヌクレオチドレベルでの配列同一性は、それぞれ56%、57%、58%、58%、53%であり、アミノ酸レベルでの配列同一性は、それぞれ41%、40%、31%、40%、23%であった。

20

【0019】

以上の結果から、本発明は、植物細胞に対してオーキシンあるいはオーキシン系除草剤への感受性を賦与する活性を有するタンパク質を提供することができ、ここで本発明のタンパク質には、SEQ ID NO: 2またはSEQ ID NO: 4からなるアミノ酸配列またはこれらの配列に類似するアミノ酸配列からなるタンパク質が含まれる。より具体的には、上述する本発明のタンパク質には、

30

(1) SEQ ID NO: 2またはSEQ ID NO: 4で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質；
(2) SEQ ID NO: 2またはSEQ ID NO: 4で示されるアミノ酸配列において1もしくは複数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質；もしくは

(3) SEQ ID NO: 2またはSEQ ID NO: 4で示されるアミノ酸配列との間で少なくとも80%のアミノ酸配列相同性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質；
からなる群から選択されるタンパク質が含まれる。

【0020】

ここで、「SEQ ID NO: 2またはSEQ ID NO: 4からなるアミノ酸配列に類似するアミノ酸配列からなるタンパク質」という場合、上述の(2)または(3)のタンパク質のことをいう。

40

【0021】

本発明はまた、植物細胞に対してオーキシンあるいはオーキシン系除草剤への感受性を賦与する活性を有するタンパク質をコードする核酸を提供することができ、ここで本発明の核酸には、

SEQ ID NO: 1またはSEQ ID NO: 3で示される塩基配列またはこれらの配列に類似する塩基配列を含む核酸；または

SEQ ID NO: 2またはSEQ ID NO: 4で示されるアミノ酸配列またはこれらの配列に類似するアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする核酸；

50

が含まれる。より具体的には、上述する本発明の核酸には、

- (i) SEQ ID NO: 1またはSEQ ID NO: 3で示される塩基配列；
 - (ii) SEQ ID NO: 1またはSEQ ID NO: 3で示される塩基配列と縮重の関係にある塩基配列からなる核酸；
 - (iii) SEQ ID NO: 1またはSEQ ID NO: 3で示される塩基配列において1もしくは複数個の塩基が欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなる核酸；
 - (iv) SEQ ID NO: 1またはSEQ ID NO: 3で示される塩基配列と相補的な塩基配列との間で、ストリンジェントな条件下においてハイブリダイズ可能な塩基配列からなる核酸；もしくは
 - (v) SEQ ID NO: 1またはSEQ ID NO: 3で示される塩基配列との間で少なくとも60%、
より好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%の塩基配列相同性を有する塩基配列からなる核酸；
 - (a) SEQ ID NO: 2またはSEQ ID NO: 4で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする核酸；
 - (b) SEQ ID NO: 2またはSEQ ID NO: 4で示されるアミノ酸配列において1もしくは複数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする核酸；もしくは
 - (c) SEQ ID NO: 2またはSEQ ID NO: 4で示されるアミノ酸配列との間で少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%のアミノ酸配列相同性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする核酸；
- からなる群から選択される核酸が含まれる。

【0022】

上述した(i)～(iv)に記載する核酸または(a)～(c)に記載する核酸は、植物細胞に対してオーキシシンあるいはオーキシシン系除草剤への感受性を賦与する活性を有する、上述した(1)～(3)のタンパク質をコードすることができる。

【0023】

ここで、「SEQ ID NO: 1またはSEQ ID NO: 3で示される塩基配列に類似する塩基配列を含む核酸」という場合、上述の(ii)～(v)に記載される核酸のことをいい、「SEQ ID NO: 2またはSEQ ID NO: 4で示されるアミノ酸配列に類似するアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする核酸」という場合、上述の(b)または(c)に記載される核酸のことをいう。

【0024】

本明細書中で「オーキシシンあるいはオーキシシン系除草剤」という場合、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)、p-クロロフェノキシイソ酪酸(PCIB)、などが含まれるが、これらには限定されない。「オーキシシンあるいはオーキシシン系除草剤への感受性を賦与する活性」という場合、2,4-DとPCIBへの感受性が低下すること、および胚軸が長くなることに関わる活性のことをいう。

【0025】

本発明において「1もしくは数個」とは、好ましくは1～20個、より好ましくは1～10個、最も好ましくは1～5個のことをいう。

【0026】

また、本発明において塩基の「欠失」、「置換」、「付加」を有する核酸は、SMAP1遺伝子の塩基配列(SEQ ID NO: 1)またはSMAP2遺伝子の塩基配列(SEQ ID NO: 3)について生じ、かつSMAP1タンパク質(SEQ ID NO: 2)またはSMAP2タンパク質(SEQ ID NO: 4)と同様の性質、すなわち植物細胞に対してオーキシシンあるいはオーキシシン系除草剤への感受性を賦与する活性を有するタンパク質をコードする核酸をいう。

【0027】

一方、アミノ酸の「欠失」、「置換」、「付加」を有するタンパク質は、SMAP1タンパク質(SEQ ID NO: 2)またはSMAP2タンパク質(SEQ ID NO: 4)と同様の性質を有するタンパク質をいう。例えば、アミノ酸の「置換」の場合には、同様の性質を有するアミノ酸

10

20

30

40

50

同士の置換、例えばある疎水性アミノ酸から別の疎水性アミノ酸への置換、ある親水性アミノ酸から別の親水性アミノ酸への置換、ある酸性アミノ酸から別の酸性アミノ酸への置換、あるいはある塩基性アミノ酸から別の塩基性アミノ酸への置換、などの置換が含まれる。

【0028】

上述のような「欠失」、「置換」、「付加」を有する塩基配列、または上述のような「欠失」、「置換」、「付加」を有するタンパク質を作成するためには、イオンビーム照射や変異原処理などの細胞レベルでの変異生成処理の他、部位特異的変異生成 (Site Directed Mutagenesis) やPCR増幅ミスを用いたランダム変異生成 (Random Mutagenesis)、カセット導入変異生成 (Cassette Mutagenesis) などの遺伝子工学的変異生成処理などの、
10 本発明の技術分野において既知の様々な方法を用いることができる。

【0029】

本発明の植物細胞に対してオーキシシンあるいはオーキシシン系除草剤への感受性を賦与する活性を有するタンパク質をコードする塩基配列には、SMAP1遺伝子の塩基配列 (SEQ ID NO: 1) またはSMAP2遺伝子の塩基配列 (SEQ ID NO: 3) と相補的な塩基配列との間で、高ストリンジントな条件下においてハイブリダイズ可能な塩基配列を含むDNAを有し、かつ植物細胞に対してオーキシシンあるいはオーキシシン系除草剤への感受性を賦与する活性を有するタンパク質をコードする塩基配列も含まれる。

【0030】

本発明において、高ストリンジントな条件とは、目的の塩基配列が、SMAP1遺伝子をコードする塩基配列 (例えば、SEQ ID NO: 1) またはSMAP2遺伝子をコードする塩基配列 (例えば、SEQ ID NO: 3) もしくはこれと縮重の関係にある塩基配列との間で、特異的にハイブリダイズ可能である条件をいう。
20

【0031】

ハイブリダイズ条件は、温度、イオン濃度などの条件を考慮して決定されるが、一般的には温度が高いほど、またイオン濃度が低いほどストリンジントな程度が高くなることが知られている。このようなストリンジントな条件の設定は、当業者であれば、例えば、SambrookおよびRussel (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition (2001)) の記載に基づいて行うことができる。

【0032】

本発明において利用することができる高ストリンジントな条件の具体的な例としては、例えば、6×SSC、5×Denhardt's、0.1% SDS、25 ないし68 などのハイブリダイゼーション条件を使用することが考えられる。この場合、ハイブリダイゼーションの温度としては、より好ましくは45 ないし68 (ホルムアミド無し) または25 ないし50 (50%ホルムアミド) を挙げることができる。
30

【0033】

本発明においてアミノ酸あるいは塩基配列の配列相同性は、視覚的検査および数学的計算により決定してもよい。あるいは、2つのタンパク質配列の配列相同性は、NeedlemanおよびWunsch (J. Mol Biol., 48: 443 - 453, 1970) のアルゴリズムに基づき、そしてウィスコンシン大学遺伝学コンピューターグループ (UWGCG) より入手可能なGAPコンピュータープログラムを用い配列情報を比較することにより、決定してもよい。GAPプログラムの好ましいデフォルトパラメーターには: (1) HenikoffおよびHenikoff (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 10915-10919, 1992) に記載されるような、スコアリング・マトリックス、blosum62; (2) 12のギャップ加重; (3) 4のギャップ長加重; および (4) 末端ギャップに対するペナルティなし、が含まれる。
40

【0034】

本発明においてアミノ酸あるいは塩基配列の配列相同性解析には、当業者に用いられる、配列比較の他のプログラムもまた用いることができる。例えばAltschulら (Nucl. Acid s. Res. 25., p. 3389-3402, 1997) に記載されているBLASTプログラムを用いて配列情報と比較し決定することが可能である。具体的には、塩基配列解析の場合、Nucleotide BLA
50

ST (BLASTN) プログラムで、Query塩基配列を入力して、GenBank、EMBL、DDBJなどの塩基配列データベースと照合することができる。また、アミノ酸配列解析の場合、Protein BLAST (BLASTP) プログラムで、Queryアミノ酸配列を入力して、GenBank CDS、PDB、SwissProt、PIRなどのアミノ酸配列データベースと照合することができる。当該プログラムは、インターネット上でNational Center for Biotechnology Information (NCBI)、あるいはDNA Data Bank of Japan (DDBJ) のウェブサイトから利用することが可能である。BLASTプログラムによる相同性検索の各種条件(パラメーター)は同サイトに詳しく記載されており、一部の設定を適宜変更することが可能であるが、検索は通常デフォルト値を用いて行う。当業者に用いられる、配列比較の他のプログラム、例えばClustalW ver. 1.7 (Thompson, J.D., et al., (1994)、上述) もまた、用いてもよい。

10

【0035】

本発明はまた、前述した(i)~(iv)に記載する核酸または(a)~(c)に記載する核酸を含有する組換えベクターもまた提供することができる。このような組換えベクターは、適切なベクター中に本発明の前述した(i)~(iv)に記載する核酸または(a)~(c)に記載する核酸を発現可能に連結することにより得ることができる。本発明において使用することができるベクターとしては、植物宿主細胞中で複製可能なものであればどのようなものを使用してもよく、例えば、プラスミドDNA、ファージDNAなどを使用することができる。プラスミドDNAとしては、アグロバクテリウム由来のプラスミド(例えば、Tiプラスミド、Riプラスミドなど)、大腸菌由来のプラスミド(例えばpUC19、pBR322など)、枯草菌由来のプラスミド(例えばpAM 1など)、酵母由来のプラスミド(例えばpGILDA、YACなど)などを使用することができ、ファージDNAとしては、ファージ(EMBL、ZAP、gt10など)などを使用することができる。このようなベクターに前述した(i)~(iv)に記載する核酸または(a)~(c)に記載する核酸を挿入するためには、ベクターを適当な制限酵素で切断し、その制限酵素と同じ切断末端を生じる制限酵素により処理した前述した(i)~(iv)に記載する核酸または(a)~(c)に記載する核酸を、ベクターの切断部分に挿入する。

20

【0036】

このベクター中には、(i)~(iv)に記載する核酸または(a)~(c)に記載する核酸に加えて、この核酸の発現を制御するための配列、ベクターのゲノム中への取り込みを促進するための配列(例えばT-DNA配列など)、および/または選択マーカー(例えば、ジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子など)の配列を含んでもよい。上述の核酸の発現を制御するための配列としては、例えばプロモーター、エンハンサー、スプライシングシグナル、ポリ(A)付加シグナルなどを使用することができる。ここでプロモーターは、植物で一般に多用されるカリフラワーモザイクウイルス由来の35Sプロモーター以外に、当業者であれば、ベクターを形質転換する植物での目的に応じて適宜選択することができ、例えば植物がシロイヌナズナの花の場合にはシロイヌナズナの花で高発現する内在性の遺伝子のプロモーターを使用することができる。

30

【0037】

本発明においては、前述の組換えベクターを含む形質転換体植物細胞もまた、提供することができる。本発明の形質転換体植物細胞は、本発明の組換えベクターを宿主となる植物細胞中に導入することにより得ることができる。本発明において形質転換させる植物細胞は、植物体のうちいずれの部分に由来する細胞であってもよく、例えば、葉、花弁、茎、根、種子などの他、培養植物細胞であってもよい。植物細胞の由来となる植物には特に限定はないが、例えばアブラナ科、イネ科、マメ科などの植物が含まれる。

40

【0038】

植物細胞に対する前述の組換えベクターの形質転換は、当該技術分野において既知の形質転換法、例えばアグロバクテリウム法、エレクトロポレーション法、パーティクルガン法、ポリエチレングリコール法(PEG法)などを使用することにより行う。

【0039】

50

アグロバクテリウム法を用いる場合は、構築した植物用発現ベクターを適当なアグロバクテリウム、例えば *Agrobacterium tumefaciens* に導入し、この株をバキュームインフィルトレーション法 (Bechtold et al. (1993) C. R. Acad. Sci. Ser. III Sci. Vie, 316, 1194-1199)、フローラル・ディップ法 (Clough, S.J., and Bent, A.F. (1998). Plant J. 16, 735-743) またはリーフディスク法 (Gartland K.M.A. and Davey M.R. ed (1995) Method in Molecular Biology, vol.44) などに従って宿主植物あるいは宿主の無菌培養片に感染させ、形質転換植物を得ることができる。

【0040】

エレクトロポレーション法を用いる場合は、パルスコントローラーを備えたエレクトロポレーション装置により、電圧500~600 V、1000 μ F、20 msecの条件で処理し、遺伝子を宿主に導入する。

10

【0041】

また、パーティクルガン法を用いる場合は、植物体、植物器官、植物組織自体をそのまま使用してもよく、切片を調製した後に使用してもよく、プロトプラストを調製して使用してもよい。このように調製した試料を遺伝子導入装置 (例えばBIOLISTIC POS 1000/He; BioRadなど) を用いて処理することができる。処理条件は植物または試料により異なるが、通常は1000~1100 psi程度の圧力、5~10 cm程度の距離で行う。

【0042】

ポリエチレングリコール法 (PEG法) を用いる場合は、主に、培養細胞からプロトプラストを調整し、カルシウム、リン酸の存在下のもとPEGを加えてDNA細胞に取り込ませる。

20

【0043】

植物細胞中に目的とする (i) ~ (iv) に記載する核酸または (a) ~ (c) に記載する核酸が形質転換されたかどうかについては、PCR法、サザンハイブリダイゼーション法、ノザンハイブリダイゼーション法、などにより確認することができる。例えばPCR法により確認する場合、形質転換体植物細胞からDNAを調製し、もしくはmRNAを採取した後cDNAを調製し、当該DNAもしくはcDNAを鋳型として用いて、所望の核酸を特異的に増幅させることができる様に設計されたプライマーを使用して、PCR法を行うことにより確認する。

【0044】

本発明においてはさらに、このようにして得られた植物細胞を培養し、再分化・育成することにより、(i) ~ (iv) に記載する核酸または (a) ~ (c) に記載する核酸を含むトランスジェニック植物を作出することができる。植物細胞を植物体に再分化させる際には、培地から植物ホルモンを取り除くか、または適当な濃度の植物ホルモン、例えばオーキシン、サイトカイニン、ジベレリン、アブシジン酸などを単独もしくは組み合わせて投与する。

30

【0045】

トランスジェニック植物を生長させる際には、圃場および温室内での土壌栽培、温室内での水耕栽培、人工培養器などを使用することができる。

【0046】

本発明をさらに具体的に説明するため、以下に実施例を記載する。本発明の範囲がこれらに限定されるものではない。

40

【実施例】

【0047】

実施例1：変異体の作成および同定

本実施例においては、p-クロロフェノキシイソ酪酸 (PCIB) が、オーキシシグナル伝達経路と相互作用する活性 (Oono Y, et al., (2003) Plant Physiol. 133: 1135-1147) に基づき、PCIB-依存性の根の生長阻害に対して耐性である変異体について、スクリーニングした。

【0048】

イオンビーム照射したシロイヌナズナ種子約6700を生長させ自家受粉後得られたM2種子約30000個を、ジメチルスルホキシド (DMSO) 中に溶解した20 μ M PCIB (Sigma Chemical

50

Co., St. Louis, MO, USA) を含有する培地上で発芽・育成し、2週間の連続明期の下で生長させた。具体的には、表面を滅菌した種子を、方形プレート (D210-16, Simport, Quebec, Canada) 中、20 μM PCIBを添加した生長培地 (1/2に薄めたMurashigeとSkoogの塩 (pH 5.8)、1% [w/v] スクロース、および1% [w/v] Bactoアガーを含むもの) またはPCIBを添加しない生長培地上に静置し、暗所にて4 で冷却処理した後2日～4日保存した後に、プレートを、蛍光灯 (FL 40SSW-37-B, Hitachi, Tokyo, Japan) により供給される20～30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の強度の連続照明下、23 の恒温室に移して、鉛直方向に生長させた。幼苗の根および胚軸の長さは、特に示さない限りは、発芽後10日後に測定した。暗処理のためには、栽培箱内で種子を8時間照射し、そして暗所に移した。

【0049】

10

2週間後に、より長い根を有する幼苗を変異体候補として取り出し、この変異体候補をさらに育成し、種子を収穫し、そして数世代の自家受粉の後、この形質が安定に遺伝するかどうかを確認することにより、変異体を確立した。

【0050】

本発明はこの変異体のうちのひとつ、抗オーキシン耐性1 (aar1-1) と名付けた一つの系統の解析に焦点を当てる。この変異体をコロンビア株 (野生型) と戻し交配すると、次世代の個体 (F1世代) は全てが野生型PCIB感受性を示し、そしてその後代であるF2後代は、PCIB感受性植物とPCIB耐性植物がほぼ3:1の比で分離した。このことから、aar1-1は、単一の劣性変異により引き起こされることが示唆された。

【0051】

20

図2において、野生型 (WT) およびaar1-1の幼苗表現型を示す。この図1において、(A) は、11日齢の光条件下で生長させた幼苗の結果を、(B) は7日齢の暗条件下で生長させた幼苗の結果を、(C) は20 μM PCIBに曝露させた、10日齢の光条件下で生長させた幼苗の結果を、そして(D) は40 nM 2,4-Dに曝露させた、10日齢の光条件下で生長させた幼苗の結果をそれぞれ示す。そして、スケールバー= 1 cmを示す。

【0052】

aar1-1幼苗の形態学的特徴は、変異体が、明条件下においても暗条件下においても、野生型よりも長い胚軸を有すること (図2、表1) 以外は、野生型と同様であった。胚軸長の差異は明条件下における方が大きかった。成熟した植物においては、aar1-1は野生型と外見上識別できず、薹立ちの時期、花序茎の数、第1花序の長さ、そして開花期を含む、いくつかのパラメータを測定することにより確認した。

30

【0053】

【表1】

表1. 野生型およびaar1-1における生長パラメータの比較

遺伝子型	明所で生長させた幼苗:		暗所で生長させた幼苗:
	胚軸の長さ (cm)	根の長さ (cm)	胚軸の長さ (cm) *
野生型	0.31 \pm 0.05	4.66 \pm 0.74	2.23 \pm 0.28
aar1-1	0.69 \pm 0.11	4.62 \pm 0.68	2.44 \pm 0.37

10日齢の明所で生長させた幼苗および7日齢の暗所で生長させた幼苗を使用した。
データは、平均 \pm S.Dである。*0.05>P>0.01

40

【0054】

実施例2: aar1-1変異体における根の伸長、側根誘導、発芽反応における2,4-D耐性

本実施例においては、オーキシンおよびその他の化合物に対するaar1-1の反応の特徴を明らかにするため、共試する化合物を添加した生長培地上で種子を発芽させ、根の長さを測定した。

【0055】

aar1-1変異体のオーキシン (IAA)、1-ナフタレン酢酸 (NAA)、インドール酪酸 (IBA) 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) (いずれもSigma Chemical Co., St. Louis, MO

50

、USA)をはじめとする植物生長調節物質に対する反応を調べるために、aar1-1変異体の種子を、上記各種生長調節物質を含む生長培地で発芽させ、10日後に根の長さを測定した。より具体的には、表面を滅菌した種子を、DMSO中に溶解した生長制御因子(IAA、NAA、IBA、2,4-D)を添加した生長培地(1/2 MS培地(pH 5.8)、1% [w/v] スクロース、および1% [w/v] Bactoアガー)または生長制御因子を添加しない生長培地の表面に静置し、鉛直方向に生長させた。幼苗の根および胚軸の長さは、特に示さない限りは、発芽後10日後に測定した。側根の数を、実体顕微鏡(MZFLIII; Leica, Wetzlar, Germany)の下で計測した。発芽の研究のため、植物を冷却処理後4日間生長させ、そして小根の発生および子葉の伸展により(Brady SM, et al., (2003) The Plant Journal 34: 67-75)、発芽を陽性と判断した。

10

【0056】

aar1-1変異体は、IAA、NAA、およびIBAに対して野生型と同様に反応した。しかしながら、2,4-Dに対しては、感受性が低かった。さらに、aar1-1は、オーキシン輸送阻害剤であるトリヨード安息香酸(TIBA)やナフチルフサラミック酸(naphthylphthalamic acid; NPA)に対して野生型と同様に反応した。このことから、aar1-1においてはオーキシン輸送は攪乱されていないことが示唆された。

【0057】

さらに、aar1-1の根は、エチレン、サイトカイニン、およびジャスモン酸メチルに対して野生型と同様の反応を示し、このことから、aar1-1生長表現型が、それほど多面的ではないことが示された(図3)。この図3において、Aは、幼苗を、連続光条件下で10日後にアッセイした結果を示す。バーは、平均±SDを示す(n=10~14)。B~Dは、添加物なしで生長させた5日齢の幼苗を、指定の化合物を含む培地上に移し、さらに5日間伸長させた根の長さを測定した結果を示す。バーは、平均±SDを示す(Bについてn=7~8、CおよびDについてn=11~12)。

20

【0058】

オーキシンに対するaar1-1の根の異なる反応が、実在する変異体のあいだでは例外的であるため、本発明の発明者らは、根の伸長および側根の形成についての用量-反応アッセイを行った。変異体は、伸長および側根形成において2,4-Dに対して強力な耐性を示したが、IAAおよびNAAに対しては野生型の反応を示した(図4)。この図4においては、PCIB、IAA、NAA、および2,4-Dの濃度と比較した、根の伸長(左パネル)および側根の生成(右パネル)を示す。符号は、平均±SEを示す。データは、処置あたり10~12個体の幼苗を用いて、2~5回の独立した実験のものである。PCIBに対して、aar1-1における根の伸長は耐性であったが、側根形成は野生型と同様に反応した。図4の実験は、添加培地上に種子を播くことにより行ったので観察された遺伝子型間の相違が、発芽および伸長のいずれかまたは両方における相違を反映している可能性があった。しかしながら、上述の4種類の化合物上に幼苗を移植し、5日後に反応を測定したところ、連続的処理に完全に合致する結果が得られた。以上の結果から、用量-反応データは、根の生長および側根形成に関して、aar1-1は、IAAおよびNAAに対しては野生型と同様に反応するが、2,4-Dに対しては耐性であることを示す。

30

【0059】

その他の反応を調べるため、本発明の発明者らは、種子発芽におけるオーキシンとアブシジン酸のあいだでの最近報告された相乗作用(Brady SM, et al., (2003) The Plant Journal 34: 67-75)を調べた(図5)。この図5においては、1 μMオーキシン(IAA)、30 nM 2,4-Dおよび10 μMアブシジン酸(ABA)の存在下または非存在下にて、外来性アブシジン酸の濃度を増加させることに対する、野生型種子(上パネル)およびaar1-1種子(下パネル)の発芽を示す。下パネルにおける点線は、オーキシンの非存在下での野生型の発芽率を示す。実験は、3~6回繰り返した。200個の種子を、各実験において測定した。符号は、平均±SDを示す。

40

【0060】

その結果、オーキシンが存在しない場合、aar1-1種子の発芽は、野生型の感受性と比較

50

して、アブシジン酸に対してより感受性が高かった（図5）。予想されるように、IAA、2,4-D、またはIBAのいずれかで種子を処理すると、野生型種子のアブシジン酸に対する感受性が高まった；しかしながら、aar1-1においては、IAAは、野生型における場合と同様に効果的に、アブシジン酸に対する感受性を高めたが、2,4-Dは有効ではなかった。このことは、この変異体が、合成オーキシンに対して特異的に耐性であるという認識を裏付けるものである。

【0061】

実施例3：aar1-1におけるオーキシン依存性の遺伝子発現およびタンパク質分解

本実施例においては、本発明のaar1-1変異体が2,4-Dに対して特異的に耐性であることから、この変異の分子生物学的な因果関係を理解するため、はじめにDR5：GUS染色（Ulmasov T, et al., (1997) Plant Cell 9: 1963-1971）を調べることで、オーキシン-誘導性遺伝子発現について解析した。

【0062】

DR5：GUSを有するトランスジェニック系統（DR5：GUS形質転換体）は、Jane Murfett氏およびTom Guilfoyle氏（University of Missouri, Columbia）から入手した。DR5：GUS形質転換体はオーキシン依存的遺伝子発現のマーカー系統であり、オーキシン存在下でGUS遺伝子の発現が誘導され、GUS活性を検出することができる。

【0063】

本発明の発明者らは、DR5：GUS形質転換体を、aar1-1変異体に交配して、aar1-1およびDR5：GUS遺伝子の両方についてホモ接合性である植物において、オーキシン添加時におけるGUS発現パターンを、5～7日間垂直において育成した幼苗を1%のSucroseを含む1/2MS培地に植物生長物質添加（または添加せず）して暗黒下で培養し、GUS染色緩衝液で洗浄した後、1 mMの5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-D-GlcA（X-gluc）を含む染色緩衝液に18時間、37℃、暗黒条件で処理することにより、組織化学的解析により調べた（図6）。幼苗は、液体中のオーキシンに対して6時間曝露した。GUSの染色パターンはデジタルカメラを装着した実体顕微鏡下でおこなった。

【0064】

IAAは、両方の遺伝子型において同様に、DR5：GUS発現を誘導したが、一方2,4-Dは、野生型と比較して、aar1-1において、全ての濃度において効果が低かった。同様に、本発明の発明者らは、別のオーキシン-感受性レポーター（BA：GUS）の発現に関して、aar1-1における2,4-D反応性の特異的低下を観察した（Oono Y, et al., (1998) Plant Cell 10: 1649-1662）。それぞれのレポーターに関して、反応パターンは、3回の独立した交配から得られた系統において確認された。

【0065】

IAAおよび2,4-Dの遺伝子発現に対する作用を直接的に解析するため、リアルタイムRT-PCRを使用して、定常レベルの内在性オーキシン-反応性遺伝子、IAA11（AUX/IAAファミリーの構成分子）の転写物を定量した。

【0066】

具体的には、リアルタイムRT-PCRは、連続光下で7日目の垂直に育成した幼苗を根と胚軸の境界領域で切断し、根の部分を1%のスクロースと種々の濃度のIAAまたは2,4-Dを含む1/2MS培地中で2時間処理し、水で洗浄し液体窒素により素早く凍結したサンプルから、QIAGEN社のRNeasy Plant mini kitにより抽出し、DNAaseにより処理した全RNAを鋳型として使用し、プライマーとしてフォワードプライマー5'-ggctcttacgttgagccttgg-3'（SEQ ID NO: 5）、およびリバースプライマー5'-gtggctgaagccttagcttg-3'（SEQ ID NO: 6）を使用して、Roche社のLight Cyclerを用い、Light Cycler-RNA Master SYBR Green I Kitを用いておこなった。リアルタイムRT-PCRの反応条件は、61℃・20分、95℃・30秒で処理した後（95℃・1秒、55℃・5秒、72℃・13秒）を45サイクルおこなった。PCR増幅の特異性は溶解曲線の解析とアガロース電気泳動により検定した。特異的mRNAの相対量は濃度とサイズの明らかなcDNA標品を用いてEF1αのmRNA量で標準化し、計測した。

【0067】

結果を図7において示す。この図7は、野生型およびaar1-1における、IAA11遺伝子の発現のリアルタイムPCR解析を示す。7日齢幼苗由来の根は、IAAまたは2,4-Dを含む液体または含まない液体中で、2時間処置した。IAA11転写物のコピー数は、EF1 転写物のコピー数に対して正規化することにより計算した。結果は、2,4-DおよびIAAに関してそれぞれ5回および4回の独立した実験に基づいて、EF1 コピー数に対するIAA11の平均比 \pm SDとして示す（非処置の野生型比率を1とした）。

【0068】

IAA11発現を誘導することに関して、IAAについての遺伝子型間の差異は顕著ではなかった；一方、2,4-Dは、野生型と比較して、aar1-1において、顕著に効果が低かった（ $p < 0.02$ ）（図7）。aar1-1においては、IAA11メッセージの蓄積を誘導する際だけでなく、DR5- 10
駆動性およびBA-駆動性GUS発現を刺激する際にも、2,4-Dの効率が低下することは、AAR1が、2,4-Dを特異的に認識する反応経路の構成要素であることを示唆している。

【0069】

aar1-1変異体におけるオーキシシンシグナル伝達の状態に関してさらなる知見を得るため、本発明の発明者らは、HS:AXR3NT-GUS構築物を利用した。HS:AXR3NT-GUS構築物を有する系統は、Stefan Kepinski氏およびOttoline Leyser氏（York University）から入手した。HS:AXR3NT-GUS形質転換体は、オーキシシン添加によりGUSタンパク質を含む融合タンパク質が分解され、GUS活性が低下するマーカー系統である。この構築物は、AUX/IAAタンパク質（AXR3）の安定性を直接的に可視化することができる（Gray WM, et al., (2001) Na 20
ture 414: 271-276）。

【0070】

本発明の発明者らは、HS:AXR3NT-GUS構築物を、HS:AXR3NT-GUS形質転換体をaar1-1変異体に交配することによりaar1-1変異体中に導入し、aar1-1およびHS:AXR3NT-GUS遺伝子の両方についてのホモ接合体系統において、オーキシシン添加時におけるGUS活性のレベルを組織化学的に観察することにより、タンパク質安定性を評価した（図8）。組織化学的解析は、本実施例に上述したように行った。

【0071】

結果を図8に示す。この図8は、野生型遺伝子型およびaar1-1遺伝子型におけるAUX/IAAタンパク質の安定性を示す。野生型系統およびHS:AXR3NT-GUSを発現するaar1-1系統を、37 30
にて120分間、添加物なしの液体生長培地中でインキュベートし、23 にて30分間、新鮮な培地に移し、図に示したように添加物を加えた生長培地中で120分間インキュベートし、そしてその後、X-glucにて2時間染色した。熱ショックプロモータが遺伝子型にも添加物にも感受性ではないということが、HS:GUSを発現する系統を用いて繰り返し実験をすることにより確認された。幼苗は、写真用に透明化した。

【0072】

aar1-1の根において、IAAは、野生型と同様に効果的に、AUX/IAAレポータータンパク質の分解を促進した；しかしながら、0.1 μ M 2,4-Dでは、野生型における効果と比較して、aar1-1において効果が低かった。高い濃度において、2,4-Dは、aar1-1におけるレポータータンパク質の分解を促進する際には、IAAと同様に効果的であった。このことは、生長と遺伝子発現の両方に関する本発明の発明者らの知見と一致しており、aar1-1が高い濃度の2,4-Dには反応することができることを示している。PCIBに関して、野生型においては、低濃度ではAUX/IAAタンパク質の分解を促進し、高濃度ではその安定性を向上させた；対照的に、aar1-1においては、PCIBはどのような濃度でも、タンパク質の安定性に影響を及ぼすことはできなかった。これらの結果から、aar1-1のPCIBおよび2,4-Dの両方に対する耐性は、AUX/IAAタンパク質分解の上流が変化したことによるものであることが示される。

【0073】

実施例4：aar1-1変異体における2,4-Dの取り込みと代謝

aar1-1の2,4-Dに対する特異性は、輸送または代謝に関するものであることが可能性として考えられた。そのため、本実施例においては、これらの可能性を調べることを目的と 50

した。

【 0 0 7 4 】

これらの可能性を調べるため、本発明の発明者らはまず、根端の先端3 mmにおける放射性標識2,4-Dの1時間の蓄積を比較した。取り込みアッセイは、文献 (Rahman et al., (2001)) に記載される様に行った。簡単に説明すると、先端3 mmの根端を処置当たり10個切り出し、そして1 μ M [14 C] 2,4-D (2.035 MBq μ mol $^{-1}$) 中で1時間、ほぼ飽和水蒸気条件下でインキュベートした。インキュベーションの最後に、根端を洗浄し、5 mLの液体シンチレーション液 (Scintisol EX-H) 中に一晚浸漬し、そしてその放射活性を、シンチレーションカウンター (Model LS6500, Beckman Instruments, Fullerton, CA) を使用して測定した。代謝アッセイに関して、5日齢の幼苗を、1 μ M [14 C] 2,4-D (2.035 MBq μ mol $^{-1}$) 中で8時間または24時間処置し、そしてその後、根を切り出し、蒸留水で2回洗浄し、そして使用するまで-80 で保存した。根を、80%メタノールで処理し、そして抽出物をTLC (TLCアルミニウムシートシリカゲル60; Merck, City, Country) にかけて、そしてクロロホルム：エチル酢酸：蟻酸 (5:4:1) により展開した。TLCの展開後、分離されたR_fゾーンを15分割に切り出し、そして放射性活性を調べるために計数した。

【 0 0 7 5 】

2,4-Dの取り込み・蓄積は、野生型とaar1-1変異体の間に顕著な違いはみられなかった。(表2)。これは、この変異体の2,4-Dに対する選択的耐性が輸送と関連しているという考えと一致しなかった。本発明の発明者らは次に、標識2,4-D中で8時間または24時間インキュベーションした後の根抽出物をクロマトグラフィーで解析し、代謝をしらべた(図9)。この図9においては、野生型およびaar1-1における2,4-Dの代謝を示す。幼苗を放射性標識した2,4-D中で、8時間または24時間インキュベートし、そして抽出物をクロマトグラフィーに供した。画分Cが、2,4-Dを含有すると報告されている。一方画分Aと画分Bは、それぞれグルコシネートおよびアミノ酸複合体を含有する(Riov J, et al., (1979) *Physiol. Plant.* 46: 133-138)。棒グラフは、4回の実験の繰り返しから得られた平均 \pm SDを示す。3つの分離された画分のいずれにおいても、放射性活性量は変化せず、大半が代謝されずに残っていた(画分C)。このことから、2,4-Dの代謝は、aar1-1において変化していないことが示唆された。

【 0 0 7 6 】

【表 2】

表2. 野生型およびaar1-1における[14 C] 2,4-Dの蓄積

系統	放射性活性 (dpm)
野生型	181 \pm 40.9
aar1-1	200 \pm 40.6
データは、12回の実験の平均 \pm S.D.である。	

【 0 0 7 7 】

実施例5: At4g13520遺伝子のPCIBと2,4-D応答性に対する関与

本実施例においては、aar1-1変異体の原因遺伝子のマッピングを行い、原因遺伝子とPCIBや2,4-Dに対する応答性との関連性を明らかにすることを目的として行った。

【 0 0 7 8 】

マッピングは、ホモ接合体のaar1-1を、Landsberg erectaと交配させることにより、そしてPCIB耐性に基づいてF₂における個々の変異体植物を特定し、SSLPマーカーまたはCAPSマーカーの連鎖をスコア化することにより行なった。開発された新規なSSLP/CAPSマーカーを、表3に列挙し、そしてArabidopsis Information Resource (<http://www.arabidopsis.org/>) に寄託した。

【 0 0 7 9 】

【表 3 - 1】

表 3. <i>aar1-1</i> 変異のマッピングのために使用した新規マーカーの記載							
SEQ ID NO:	名称	型	AGI 位置 (Mb)	プライマー配列 (5' → 3')	PCR 生成物 サイズ	R. E.	消化産物の サイズ
7	T4C9	SSLP	7.26	tggaagacatgggaacaact	126 (C)	-	-
8	(JAERI-1)			gagcatgaaagcagaggaat	149 (L)		
9	T20K18	SSLP	7.48	gattgcaccttctttcagta	771 (C)	-	-
10	(JAERI-2)			ttgaaaccaagaggatactg	710 (L)		
11	T9E8-1	SSLP	7.73	actcttttcttttggccttt	198 (C)	-	-
12	(JAERI-3)			caagcagagctattgtaggg	216 (L)		
13	T9E8-2	SSLP	7.76	aggagaaacttgcaacagaa	161 (C)	-	-
14	(JAERI-4)			caacaagctctgcacaata	179 (L)		
15	T9E8-2-2	CAPS	7.794	gcactgcttgacgtaactg	393	<i>Ava</i> II	(C) 273, 69, 51 (L) 324, 69
16	(JAERI-5)			atagttttgactcggcaggt			
17	T9E8-2-3	CAPS	7.795	cacggatgctttaagagttt	175	<i>Mse</i> I	(C) 69, 66, 40 (L) 135, 40
18	(JAERI-6)			tcctctcggtaatggtaaga			
19	T9E8-3	SSLP	7.80	ccaaaccttcagcaagtaag	244 (C)	-	-
20	(JAERI-7)			ctggtgcttttggatcttc	229 (L)		
21	T6G15-3	SSLP	7.87	aatgctgaagaagtcgttgt	247 (C)	-	-
22	(JAERI-8)			agttcgtatagacggggact	268 (L)		
23	T6G15-4	SSLP	7.88	gaccataagcaacgctagtc	250 (C)	-	-
24	(JAERI-9)			cttgaacatccctaataccaa	240 (L)		
25	T6G15-5	SSLP	7.91	tcattgctctgctacaaaga	231 (C)	-	-
26	(JAERI-10)			ggtgcatgagtctctcaaat	223 (L)		
27	T6G15-6	SSLP	7.92	cagaaatgctgtctgcaata	161 (C)	-	-
28	(JAERI-11)			tttgtgaacaaagaaaaacg	154 (L)		
29	F18A5-0-1	CAPS	7.943	agcttggtgattggtagaaat	174	<i>Mse</i> I	(C) 131, 43 (L) 102, 43, 29
30	(JAERI-12)			tgccctctctttttatttcg			
31	F18A5-0-2	SSLP	7.945	gatgtaaaagggaacaact	203 (C)	-	-
32	(JAERI-13)			ttagtcggggttaagacaaa	195 (L)		

【表 3 - 2】

33	F18A5-0-3	CAPS	7.959	caaattcgcgatggaagaaag	248	<i>EcoRI</i>	(C) 180, 68
34	(JAERI-14)			catttttctcgaggatggtgt			(L) No Cut
35	F18A5-1	SSLP	7.97	aacttgcttgtggttttcat	201 (C)	-	-
36	(JAERI-15)			cagcatgaagcataaactga	234 (L)		
37	F18A5-3	SSLP	7.98	tcgatggagagatgctaact	217 (C)	-	-
38	(JAERI-16)			tttttggtcggatagtagga	201 (L)		
39	FCA0-3	SSLP	8.12	aatttgaagcaacaatgacc	180 (C)	-	-
40	(JAERI-17)			cagagagctccattttcatc	167 (L)		
41	FCA1 3.0	SSLP	8.34	tttgtctcttggttgattcc	200 (C)	-	-
42	(JAERI-18)			aagcagtataaacgcaggtc	214 (L)		
43	FCA2S1	SSLP	8.46	gctagggttcacacatacgc	162 (C)	-	-
44	(JAERI-19)			gtagctccgaatcctactcc	172 (L)		
45	FCA2S4	SSLP	8.61	tcctaatgaggaatcacttc	194 (C)	-	-
46	(JAERI-20)			cctcgggtctaccatacaag	158 (L)		

10

20

【0081】

マッピングの結果、AAR1遺伝子は、AGI (Release 5.0) 座標における7790 k~7950 kにまたがる、4番染色体のT9E8-2-2とF18A5-0-1のあいだに位置していることが示された (図10A)。650個の染色体の中では、T9E8-3マーカーとF18A5-0-1マーカーとのあいだで、組換えは見いだされなかった。野生型ゲノムDNAおよびaar1-1ゲノムDNAの両方から増幅することができるロングPCR生成物の位置は、濃い黒線により示し、そしてaar1-1において増幅が起こらなかった生成物の位置を、薄い黒線により示す。ゲノム両方から増幅された正常なPCR生成物の位置およびaar1-1からは増幅されなかった正常なPCR生成物の位置を、それぞれ黒丸および白丸で示した。プライマー配列は上記表3に示し、そして正確な生成物位置は、上部右箱囲み中に示す。aar1-1において欠失した44 kbpのゲノムDNA領域は、9692~53586の箱囲みにより示される。欠失領域に由来する670 bpの断片が、2番染色体のT17M13に見いだされた (図10A下右箱囲み中12408~13077の枠で示される)。

30

【0082】

また、図10Bは、PCR解析およびTAIL-PCR解析により、26 kbpゲノムDNAが、aar1-2において破壊されていることを示す。この結果およびPCR生成物の位置は、右側箱囲み中に示される。欠損したDNAのかわりに、左側境界配列 (LB) を有するDs断片 (GUSおよびNPT II) が、この領域中に挿入されている。推定無傷オープンリーディングフレームは黒線で示され、破壊されたものは淡色線で示される (AT4g13490、AT4g13500、AT4g13510、およびAT4g13520)。

40

【0083】

TAIL-PCRおよび塩基配列解析の結果を、図11に示す。図11は、aar1遺伝子座のマップおよび相補性試験のために使用した構築物のマップを示す。図11Aにおいては、aar1-1において欠損した領域を、枠により示した (一番上の線)。aar1-2におけるエンハンサートラップ挿入物の構造を示す (2番目の線)。注釈付きオープンリーディングフレーム (エクソンおよびイントロン両方とも) を、黒枠で示す (3番目の線)。TAIL-PCRおよび塩基配列解析の結果、T6G15上の9692~53586 ntのあいだに欠損領域があることを示した (図11Aおよび図10)。この領域には、8つの注釈付き遺伝子が含有されるが、本発明の発明者らが知る限りでは、これらのいずれも、オーキシン反応に関与するものではなかった。

50

【 0 0 8 4 】

aar1-1表現型の原因となる遺伝子を具体的に特定するため、本発明の発明者らは、シロイヌナズナの種子ストックセンターより当該領域が破壊された系統をとりよせ、PCIBを含む培地でテストし、これらの遺伝子座に関して利用可能な挿入変異を調べた。以下の実験でETを頭文字にもつ系統は、ColdSpring Harbor Laboratoryから提供を受けたものでシロイヌナズナのLandsberg系統である。

【 0 0 8 5 】

PCIBに対して耐性であるエンハンサトラップ集団に由来するET-202が（表4）、長い胚軸と2,4-D-耐性の根の生長を有することを見いだした。これらの観察された形質（胚軸長が長い形質、2,4-D耐性の形質）は、aar1-1変異体と同様の形質であった。この系統におけるPCIB-耐性表現型は、野生型に対して劣勢であり、そしてaar1-1変異体との交配に由来する全てのF1後代は、PCIB耐性であった。このことから、ET-202におけるこの変異が、aar1-1変異と同じ遺伝子座のもの、すなわちaar1-1に対立するものであることが示唆された。したがって、本発明の発明者らは、ET-202のことをaar1-2と名付けた。

10

【 0 0 8 6 】

このaar1-2変異体において当該領域のDNA配列をTAIL-PCRおよび配列決定により調べたところ、aar1-2変異体においては、aar1-1変異体で欠損していた8個の遺伝子のうち、4個の遺伝子（オープンリーディングフレーム）を含む約27 Kbが、トランスポゾンにより破壊され欠失していることが明らかになった（図11A）。

【 0 0 8 7 】

20

【表 4】

表 4. PCIB 耐性について試験した T-DNA および ET 系統のリスト			
遺伝子	T6G15 上の位置	T-DNA または ET 系統	PCIB 耐性？
At4g13460	11139-9187	SALK_048033 SALK_048093	なし なし
At4g13470	14016-12507		
At4g13480	21209-22187		
At4g13490	24818-23671	SALK_099600 (1000-5') SALK_027018 (R300-5') ET202	なし なし あり*
At4g13500	42443-41333	SALK_106395 ET5082	なし なし
At4g13510	42717-44421	amt1;1T-DNA SM_3_1809	なし なし
At4g13520	48928-49367	SALK 132825 (300-5')	なし
At4g13530	51262-53275	ET5064 (300-5') GT_5_111756	なし なし
T-DNA または ET 系統を 20 μ M PCIB を含有する GM 上で発芽させ、根の生長における PCIB 耐性を調べた。最後の欄は、種子個体群が PCIB 耐性植物を含有するかどうかを示す。			
* PCIB 耐性植物の数および感受性植物の数は、それぞれ 8 個体および 36 個体であった。			

【 0 0 8 8 】

aar1 の表現型におけるこれらの破壊された遺伝子の関連性を調べるため、本発明の発明者らは、T6G15 BAC クローンより適当な制限酵素で切断した断片を、アグロバクテリウムを介した形質転換により aar1-1 変異体に導入する相補性試験をおこなった。具体的には、相補性試験のため、T6G15 BAC DNA を適切な制限酵素により消化し、その結果得られた DNA フラグメントを、pPZP121 (Hajdukiewicz P, et al., (1994) Plant Molecular Biology 25: 989-994)、pBIN19 (Bevan M (1984) Nucl. Acids. Res. 12: 8711-8721) または SLJ 75515 (<http://www.jic.bbsrc.ac.uk/sainsbury-lab/jj/plasmid-list/plasmid.htm>) のいずれかのバイナリベクターにライゲーションした。aar1-1 植物は、アグロバクテリウム媒介性形質転換法 (Clough SJ, and Bent AF (1998) The Plant Journal 16: 735-743) を介して、得られた構築物で形質転換された。

【 0 0 8 9 】

相補性試験の結果を図 11B および図 12 に示す。図 11B は、ゲノムのこの領域の制限酵素部位 (縦線) を示す (パネル A およびパネル B は、同一スケールにして並べたものである)。aar1-1 中に導入した DNA 断片を、灰色で示す箱囲み (相補したもの) および白色の箱囲み

(相補しなかったもの)で示し、アッセイした独立したT1系統数に対するPCIB感受性T2幼苗が分離したT1系統の数を、箱の中に示した。下から2段の2つの箱囲みは、図12における系統を作製するために使用した3.7 Kbp Bam HI / Sac I (B/S) 断片および4.0 Kbp Xba I / Bam HI (X/B) 断片を示す。

【0090】

また、図12は、aar1-1表現型の相補性試験の結果を示す。データは、野生型、aar1-1、およびAt4g13520 (B/S) を含有するゲノム断片または隣接する断片 (X/B) によりaar1-1を形質転換することにより作製されたいくつかの独立したホモ接合体トランスジェニック系統を比較している。図12A~Bは、(A) 20 μ M PCIBまたは(B) 40 nM 2,4-Dに対する根の伸長の耐性を示す。根の長さは10日後に測定し、非処置野生型に対する値として表した。バーは、少なくとも6株の幼苗 (A) または15株の幼苗 (B) に関する平均 \pm SDを示す。図12Cは、胚軸の長さを示す。データは、光条件下で鉛直方向に生長させた非処置5日齢幼苗の胚軸の長さ (平均 \pm SD (n = 9)) を示す。

【0091】

図11Bおよび図12において示されるように、At4g13520を含有する断片 (例えば、“B/S”断片) を導入した形質転換されたaar1-1形質転換体のみが、野生型に見られるような根の生長におけるPCIB感受性および2,4-D感受性の両方を回復し、また胚軸長についても、野生型ほど短くはなかったが、よりaar1-1系統よりも短い胚軸を有していた。一方隣接する遺伝子を含有するがAt4g13520を含まない断片 (例えば、“X/B”断片) を導入した場合は、このような相補はみられず、感受性を回復することができなかった。

【0092】

これらの相補性試験により、At4g13520が2,4-DおよびPCIBに対する感受性を回復させることが示されるが、いくつかの遺伝子が、aar1の両アリルにおいて欠損している可能性が残されていた。そこで、At4g13520のみが欠損した場合の結果を解析するため、本発明の発明者らは、RNA干渉 (RNAi) 法を使用した。

【0093】

RNAi解析は、RNAiベクター中に組み込んだ目的とするDNA断片をアグロバクテリウムを介して野生型へ導入することにより行った。具体的には、まず、T6G15 BAC DNAからAt4g13490、Atg13500、At4g13510、At4g13520、At4g13530遺伝子を含むDNA断片をそれぞれを鋳型として用い、表5に記載するプライマーを使用してPCRを行った。PCRの反応条件は、95 \cdot 2分、(95 \cdot 30秒、55 \cdot 30秒、72 \cdot 1分) \times 40サイクル、72 \cdot 10分であった。増幅したフラグメントを、キット (pENTR Directional TOPO-Cloning Kit; Invitrogen, Carlsbad CA) によりpENTR/D-TOPOクローニングベクター中にクローニングし、その後、ゲートウェイバイナリRNAiベクター、pB7GWIWG2 (II) 中に、LR反応 (Karimi M, et al., (2002) Trends in Plant Science 7: 193-195) によりフラグメントを組み込んだ (<http://www.psb.ugent.be/gateway/>)。野生型植物を、得られた構築物により、アグロバクテリウム媒介性形質転換を通じて形質転換した。

【0094】

【表 5】

表 5. RNAi 実験において使用されたプライマー		
名称	プライマー配列	
At4g13490	5'-cacctggctaataatgatgctgacgaa-3' (SEQ ID NO: 47)	
	5'-ttgacgttgcatccttgtg-3' (SEQ ID NO: 48)	
At4g13500	5'-cacccgttttagccacagggttagt-3' (SEQ ID NO: 49)	10
	5'-ggcaaaagcaatggctaaga-3' (SEQ ID NO: 50)	
At4g13510	5'-caccggaatcacatggctcgatag-3' (SEQ ID NO: 51)	
	5'-tccaaaccagaggaggaatg-3' (SEQ ID NO: 52)	
At4g13520	5'-caccttcccgaagaagaaaacgaa-3' (SEQ ID NO: 53)	
	5'-ccacaaacataaaaaatcccagaa-3' (SEQ ID NO: 54)	
At4g13530	5'-cacctgttccttatggtccgaagc-3' (SEQ ID NO: 55)	20
	5'-gccatggacaaagaccaa-3' (SEQ ID NO: 56)	

【0095】

At4g13520に対する二本鎖RNA構築物を発現するRNAi個体は、2,4-DとPCIB感受性が低下しており、さらに胚軸が長くなる幼苗を分離した。一方、At4g13520以外の欠失領域に存在する遺伝子に対する二本鎖RNA構築物を発現するRNAi系統（すなわち、At4g13490、At4g13500、At4g13510、およびAt4g13530）は、このような変化は認められなかった。

【0096】

At4g13510およびAt4g13520を標的とする構築物についてのホモ接合体系統（それぞれ、510i系統および520i系統）において、At4g13510およびAt4g13520のmRNA転写量をRT-PCRにより調べた。具体的には、転写物量をRT-PCRにより推定するため、本発明の発明者らは、Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis IN, USA) を使用した。それぞれの系統由来のcDNAを、オリゴdTプライマーを使用して、20 μl反応混合物中、0.5 μgの全RNAから調製した。PCR工程のために使用されたプライマー配列は、表6中に記載する。

【0097】

【表 6】

表 6. RT-PCR 実験において使用されたプライマーの記載		
名称	プライマー配列	
T6G15-49151F	5'-cgatgatgatttcgatgacac-3' (SEQ ID NO: 57)	40
T6G15-49348R	5'-cacaaatcaaagtgttttagtaatccaa-3' (SEQ ID NO: 58)	
EF1 αA4-5	5'-cttgctttcacccttggtgt-3' (SEQ ID NO: 59)	
EF1 αA4-6	5'-tccctcgaatccagagattg-3' (SEQ ID NO: 60)	

【0098】

RNAi実験に関連する実験の結果を図13に示す。図13Aは、At4g13520転写物およびEF1 A 50

4転写物の半定量的RT-PCRを示す。増幅が飽和していないことを示すため、対照DNAを時に増幅させた（At4g13520に関しては、 $1x = 0.001 \text{ pg}/\mu\text{l}$ のT6G15 BAC DNAからpKS中にサブクローニングした7.38 Kb Sac I断片；EF1 に関しては、 $1x = 0.1 \text{ pg}/\mu\text{l}$ の増幅cDNA断片）。図13Bおよび図13Cは、（B）20 μM PCIBまたは（C）30 nM 2,4-Dに対する根の伸長の耐性を示す。根の長さを10日後に測定し、そして非処置野生型に対する値として表した。バーは、少なくとも9株の幼苗（B）または12株の幼苗（C）の平均 \pm SDを示す。図13Dは、側根の誘導を示す。データは、5日齢のときにDMSOまたは2,4-Dに移し、さらに5日間生長させたものである、選択した系統についての側根発生数の平均 \pm SD（ $n = 12$ ）を示す。図13Cおよび図13Dにおいて、データは比較のためベクターのみ〔pB7GWIWG2（II）、系統F〕によるトランスジェニック系統についてのデータも示す。図13Eは、胚軸の長さを示す。データは、光条件下で生長させた非処置5日齢幼苗の胚軸の長さ（平均 \pm SD（ $n = 11$ ））を示す。

10

【0099】

その結果、At4g13520 mRNAレベルが、520i系統においては減少し、ある場合には検出できないレベルにまで減少したが、510i系統においては減少しなかった（図13A）。520i系統のほとんどは、aar1-1とは区別することができないPCIBおよび2,4-Dに対する耐性を示したが、510i系統では全く示さなかった（図13B～D）。520i系統は、野生型よりも長い胚軸を生じさせた（図13E）。このことから、At4g13520のメッセージは、胚軸の長さを短くすることができることが示唆される。

20

【0100】

相補性試験およびaar1-2の単離とあわせて、RNAiの結果は、At4g13520がPCIBおよび2,4-Dに対する感受性を賦与することを示す。

【0101】

実施例6：At4g13520は未知機能の低分子酸性タンパク質をコードする

本実施例においては、実施例5において特定したAt4g13520がコードする遺伝子を特定することを目的として行った。

【0102】

At4g13520は、推定等電点3.3（ $pK 3.3$ ）の低分子タンパク質（62アミノ酸、予測分子量6.9 kDa）をコードすることが明らかになった（ヌクレオチド配列は、SEQ ID NO: 1、アミノ酸配列は、SEQ ID NO: 2）；したがって、本発明の発明者らは、このタンパク質のことを、低分子酸性タンパク質1（small acidic protein 1；SMAP1）と命名した。シロイヌナズナゲノムは、類似する遺伝子At3g24280が含まれ、これのことを本発明の発明者らは、SMAP2と命名した（ヌクレオチド配列は、SEQ ID NO: 3、アミノ酸配列は、SEQ ID NO: 4）。

30

【0103】

これらの推定SMAP1ホモログのアラインメントを、図14に示す。図14においては、A. thaliana SMAP1配列を最上部に示し、同一のアミノ酸を濃色で示し、そして類似するアミノ酸を淡色で示す。配列は、Genbankから得た：〔A. thaliana SMAP1、NP_567406；A. thaliana SMAP2、NP_189071；Tetradodon species、CAF94193；Homo sapiens、AAL96264；Mus musculus、BAE31120；Xenopus laevis、NP_001005143；Danio rerio、AAH62283；Strongylocentrotus purpuratus、XP_787254；Drosophila melanogaster、NP_652383；そしてOryza sativa、XP_483827〕。

40

【0104】

これらの2つの分子、SMAP1とSMAP2は、ヌクレオチドレベルで62%の同一性を有し、アミノ酸レベルで43%の同一性を有する。ESTsのBLAST検索の結果、フェニルアラニンおよびアスパラギン酸（F/D）を多く含んだ非常に保存されたC-末端ドメインを有するSMAP1の推定ホモログの存在が、ヒト、マウス、ハエ、魚（ダニオ）、およびコメのデータベースにおいて確認されたが、酵母および原核生物ゲノム中には、存在しなかった（図14）。SMAP1配列は、認識できるシグナル配列を何も含有しておらず、このことは、そのタンパク質が細胞質中で機能することを示唆する。本発明の発明者らが知る限り、このタンパク質

50

ファミリーの機能は、どの生物においても未だ示されておらず、BLAST並びにタンパク質構造アルゴリズムに基づけば、SMAP1は、認識可能なドメインを含有しない；以上の結果、本発明の発明者らは、胚軸伸長および2,4-D反応性への関与が、新たな遺伝子ファミリーの最初の構成分子としてのSMAP1の機能を定義づけるものであることを提案する。

【産業上の利用可能性】

【0105】

本発明により、植物における胚軸伸長を抑制する遺伝子、オーキシン系除草剤あるいは単にオーキシンの感受性を賦与する活性を有するタンパク質、SMAP1およびSMAP2、およびそれらをコードする核酸が提供される。本発明により、SMAP1またはSMAP2の発現をモジュレートし、植物における胚軸伸長や、オーキシンあるいはオーキシン系除草剤の感受性を制御することもできる。

10

【図面の簡単な説明】

【0106】

【図1】図1は、本発明において新たに取得されたSMAP1（図1A）およびSMAP2（図1B）の塩基配列およびアミノ酸配列をそれぞれ示す。

【図2】図2は、野生型（WT）およびaar1-1の幼苗表現型を示す写真である。

【図3】図3は、ホルモンおよびその他の生長制御因子の、野生型の根の生長およびaar1-1の根の生長に対する作用を示す。

【図4】図4は、PCIB、IAA、NAA、および2,4-Dの濃度と比較した、根の伸長（左パネル）および側根の生成（右パネル）を示す。

20

【図5】図5は、1 μ Mオーキシン（IAA）、30 nM 2,4-Dおよび10 μ Mアブシジン酸（IBA）の存在下または非存在下にて、外来性アブシジン酸の濃度を増加させることに対する、野生型種子（上パネル）およびaar1-1種子（下パネル）の発芽を示す。

【図6】図6は、IAAおよび2,4-Dに対する、野生型およびaar1-1におけるDR5:GUS発現の結果を示す。

【図7】図7は、野生型およびaar1-1における、IAA11遺伝子の発現のリアルタイムPCR解析を示す。

【図8】図8は、野生型遺伝子型およびaar1-1遺伝子型におけるAUX/IAAタンパク質の安定性を示す。

【図9】図9は、野生型およびaar1-1における2,4-Dの代謝を示す。

30

【図10】図10は、aar1-1およびaar1-2のポジショナルマッピングの工程を示す。

【図11】図11は、aar1遺伝子座のマッピングおよび相補性試験のために使用した構築物のマッピングを示す。

【図12】図12は、aar1-1表現型の相補性試験の結果を示す。

【図13 - 1】図13-1は、RNAi実験の結果を示す。

【図13 - 2】図13-2は、RNAi実験の結果を示す。

【図14】図14は、SMAP1およびSMAP2と推定SMAP1ホモログとのアラインメントを示す。

【図 1】

SMAP1 (SEQ ID NO: 1およびSEQ ID NO: 2)

```

atg agg ccg atg cag ctg gat atg tta tgg gag atg gat gca ggt
Met Arg Pro Met Gln Leu Asp Met Leu Ser Glu Met Asp Ala Gly
1           5           10           15

tct tcg atg gcc atg gac gtt gat gac ctc gaa gcc atg gag ata ctc
Ser Ser Met Ala Met Asp Val Asp Leu Glu Ala Met Glu Ile Leu
20          25          30

aac gaa gga gga ctt gtc tca gat aac aag ctc gcc gac gcc gat ttc
Asn Glu Gly Gly Leu Val Ser Asp Asn Lys Leu Ala Asp Ala Asp Phe
35          40          45

ttc aac aaa ttc gat gat ttc gat gac acc gat atc aac taa
Phe Asn Lys Phe Asp Asp Phe Asp Asp Thr Asp Ile Asn
50          55          60

```

SMAP2 (SEQ ID NO: 3およびSEQ ID NO: 4)

```

atg gat aga tat tgg gaa caa gac ccg atg agg ccg atg gtg tac cgt
Met Asp Arg Tyr Trp Glu Gln Asp Pro Met Arg Pro Met Val Tyr Arg
1           5           10           15

gac ttt ctg ggt gag atg gag tat cca gga tac tgg atg cct atg cag
Asp Phe Leu Gly Glu Met Glu Tyr Pro Gly Tyr Ser Met Pro Met Gln
20          25          30

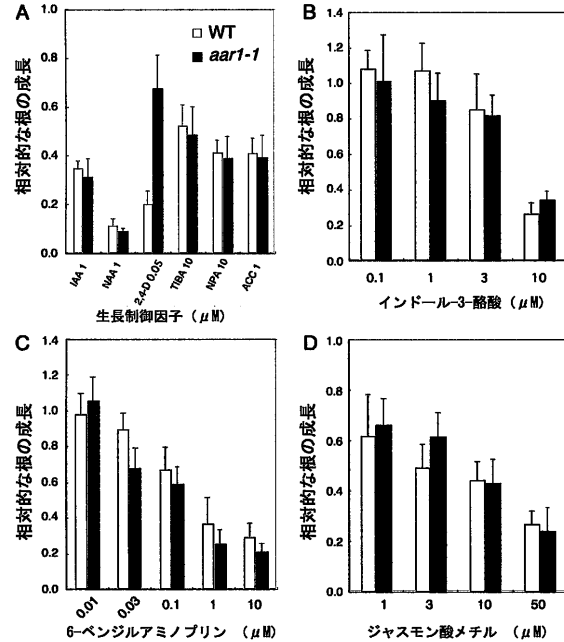
atg gag atc gat gaa gac gac ttc ggg ccc atg gat atg cag ttt gaa
Met Glu Ile Asp Glu Asp Asp Phe Gly Pro Met Asp Met Gln Phe Glu
35          40          45

gtt gga gga att tca ccc ttt caa atg aag ccc gaa gac agc gat ttc
Val Gly Gly Ile Ser Pro Phe Gln Met Lys Pro Glu Asp Ser Asp Phe
50          55          60

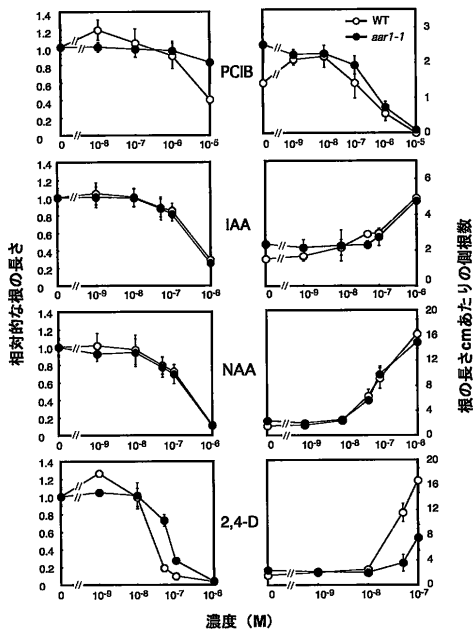
ttc aac aag ttc gag gat gat ttt gat gat tcc gat atc aat tag
Phe Asn Lys Phe Glu Asp Asp Phe Asp Asp Ser Asp Ile Asn
65          70          75

```

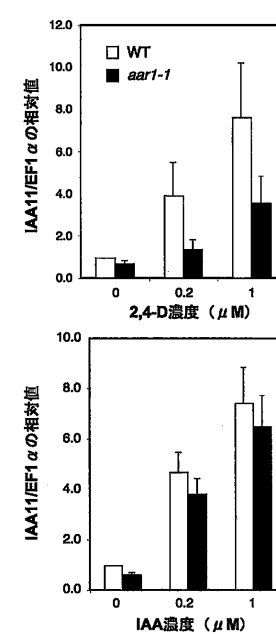
【図 3】



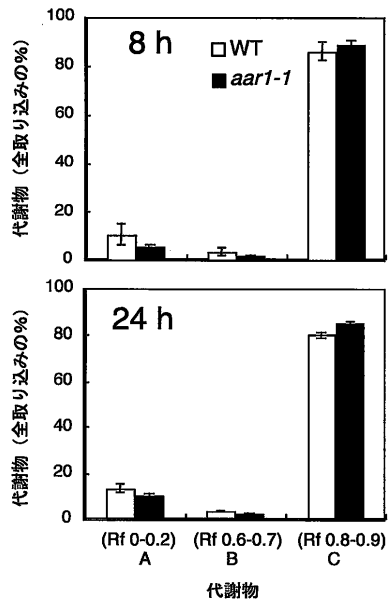
【図 4】



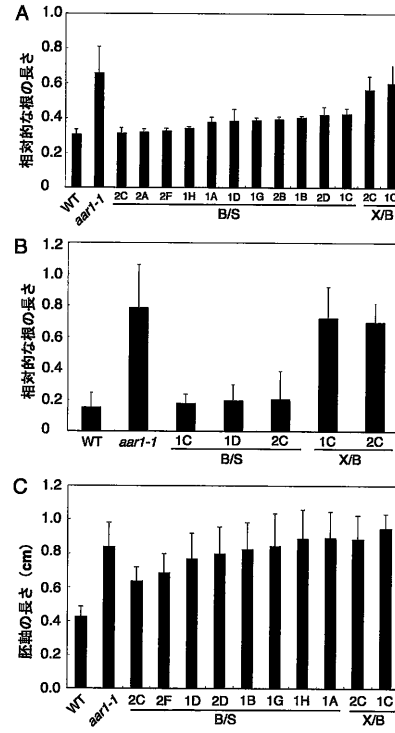
【図 7】



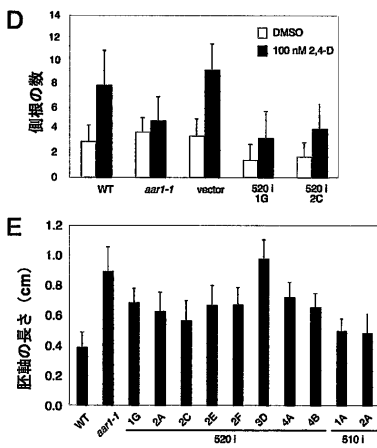
【図 9】



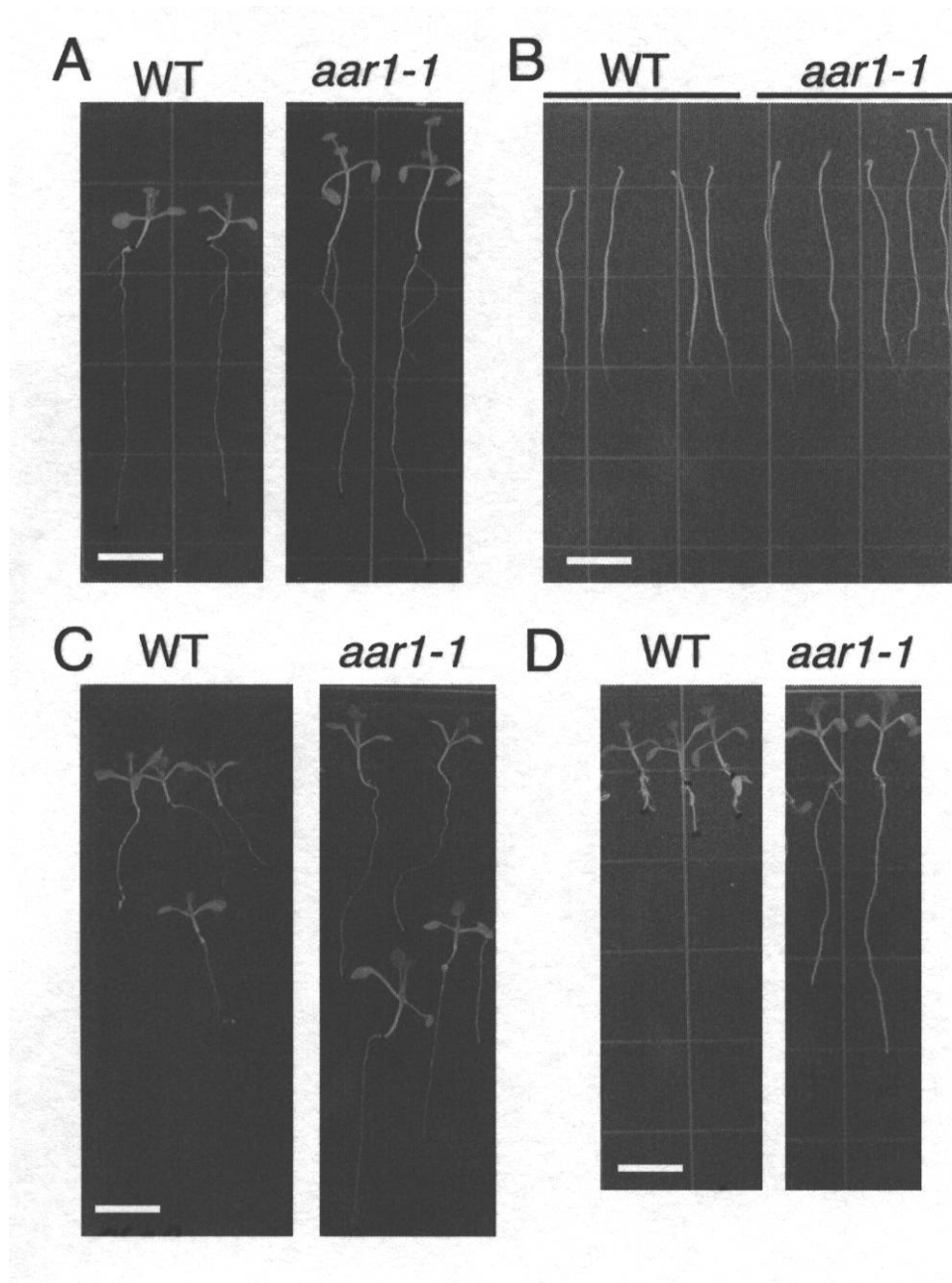
【図 12】



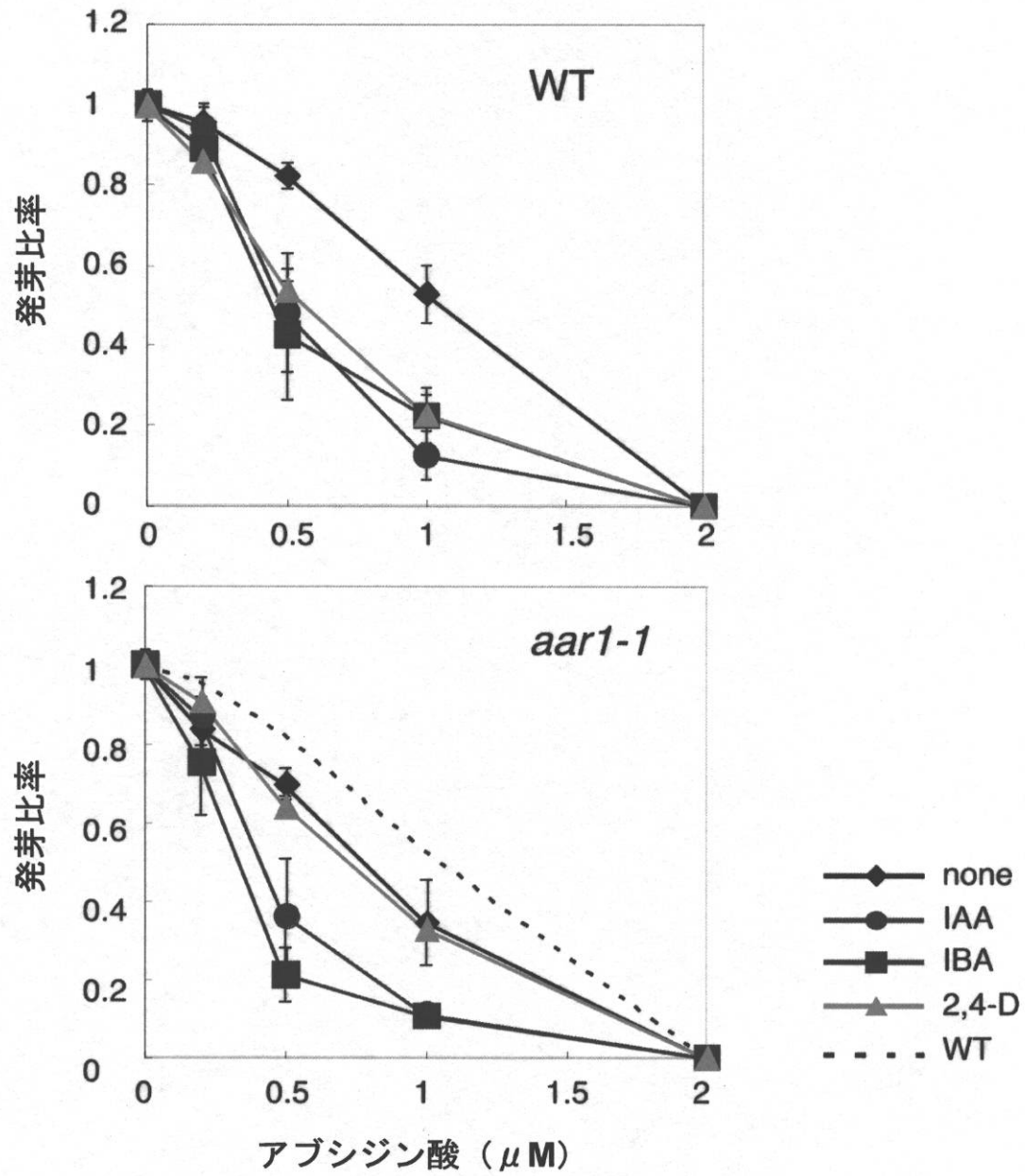
【図 13 - 2】



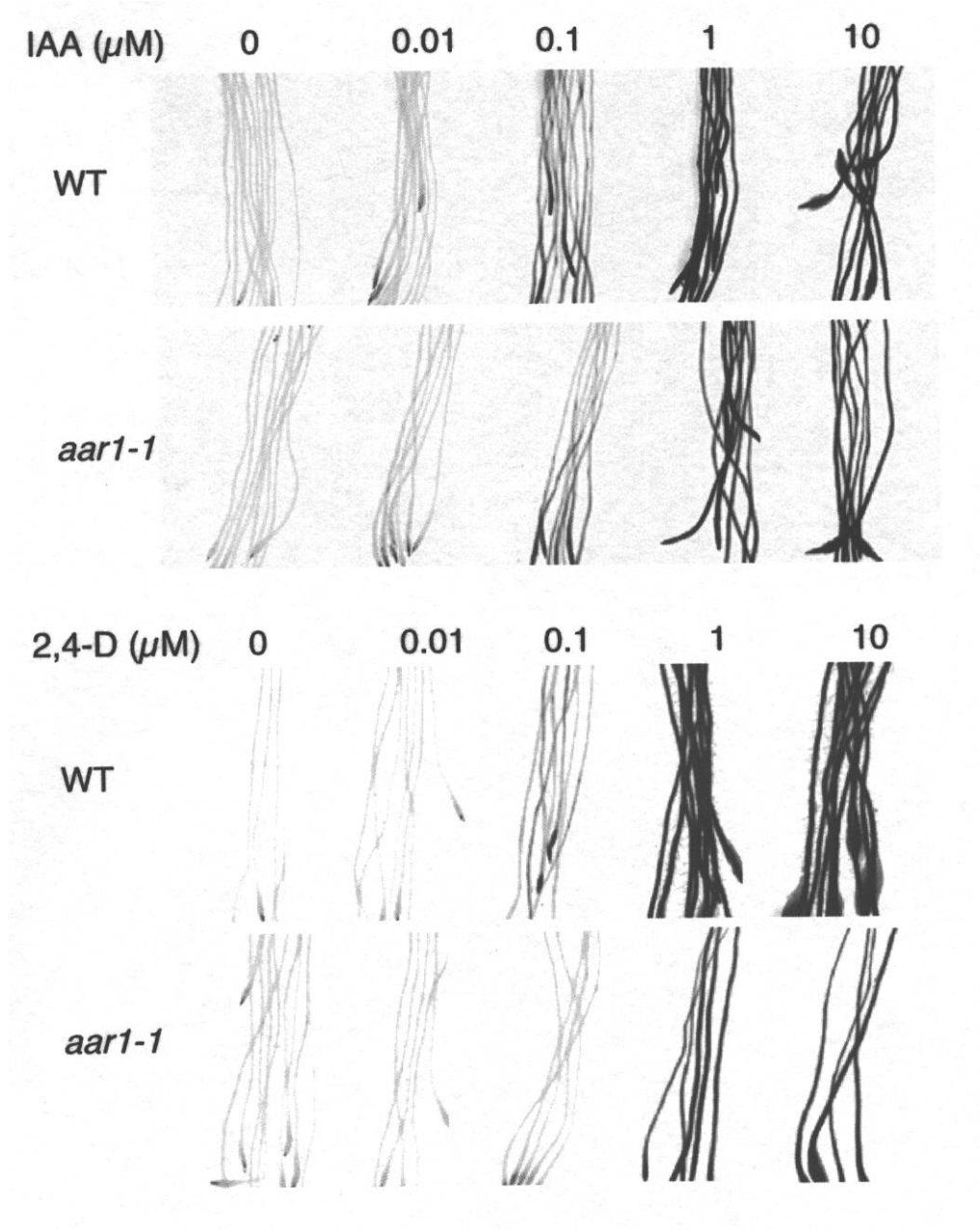
【図 2】



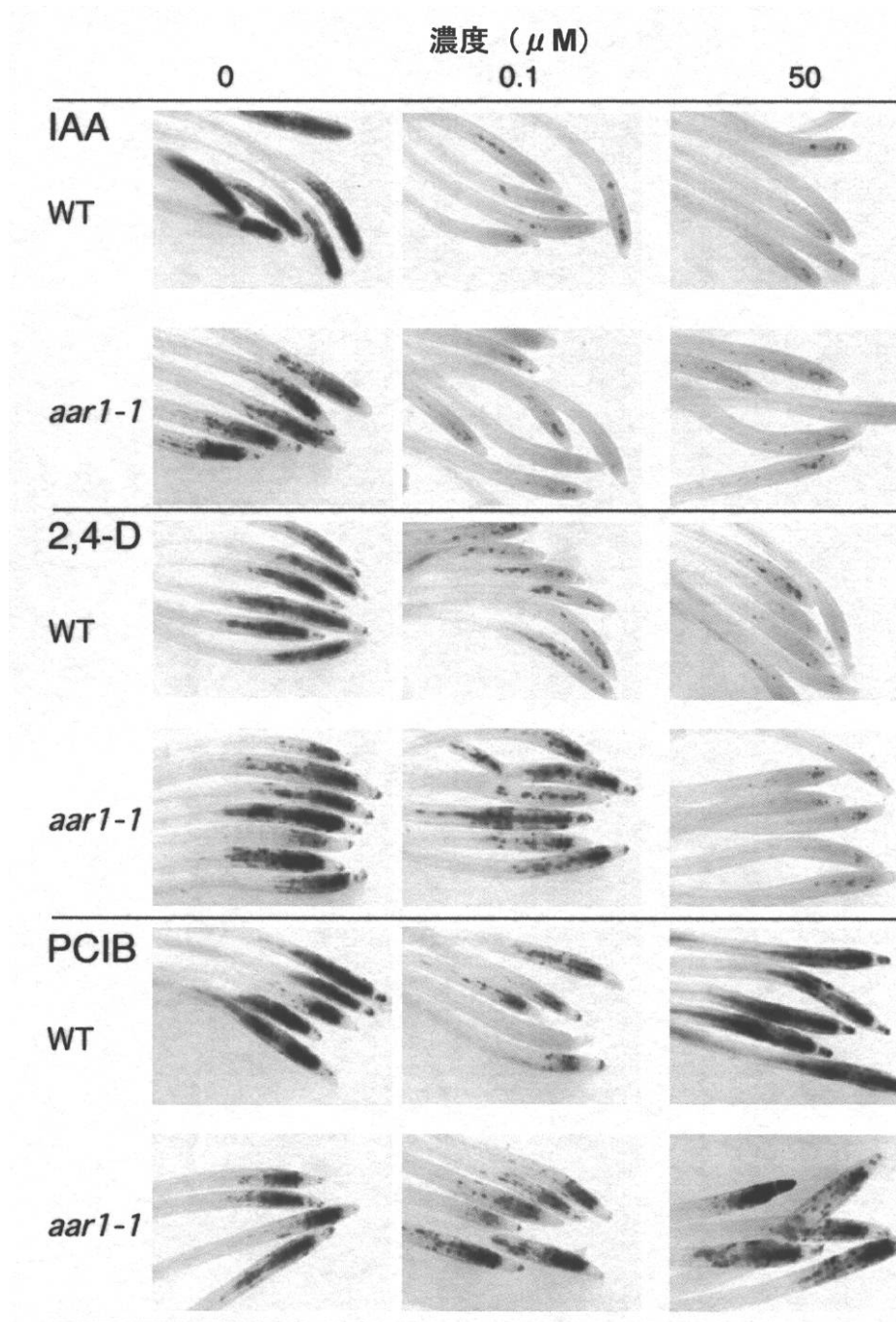
【図5】



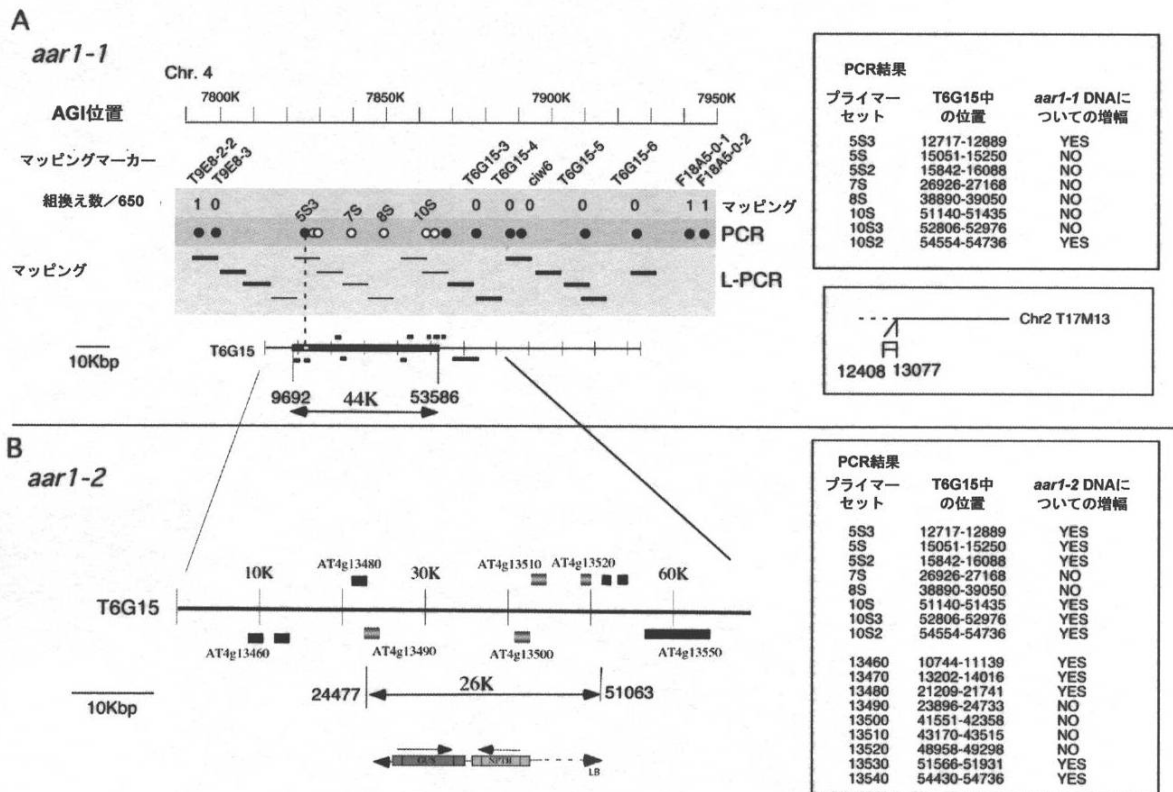
【図 6】



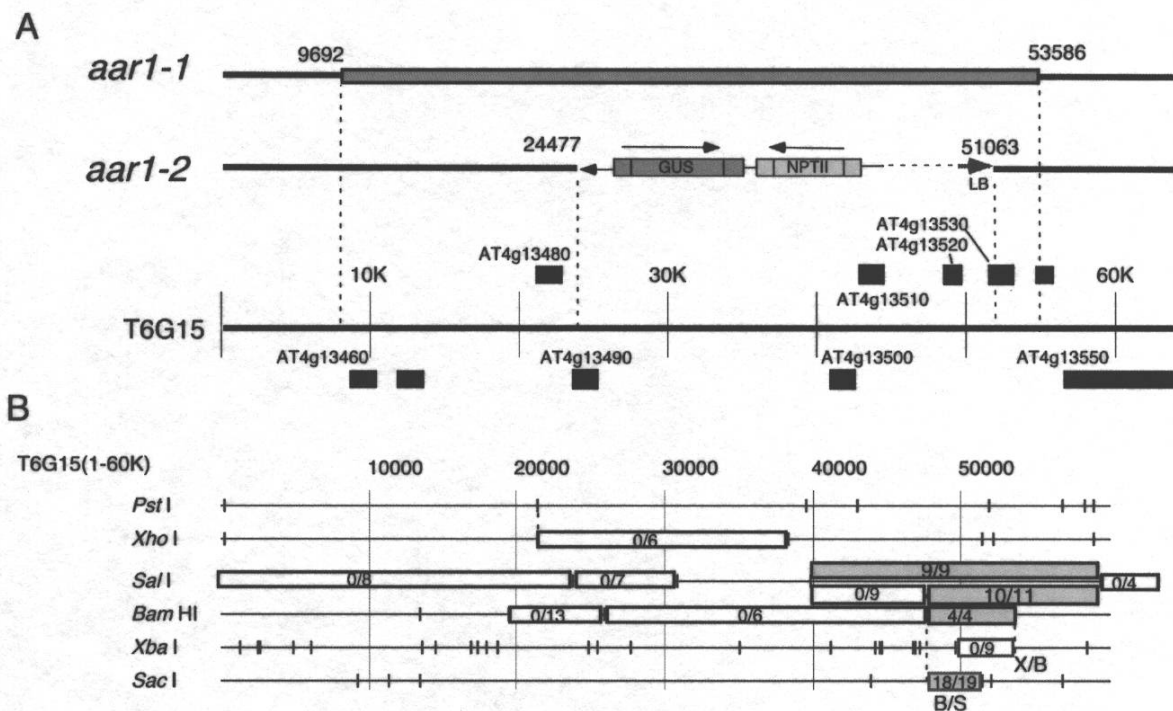
【図 8】



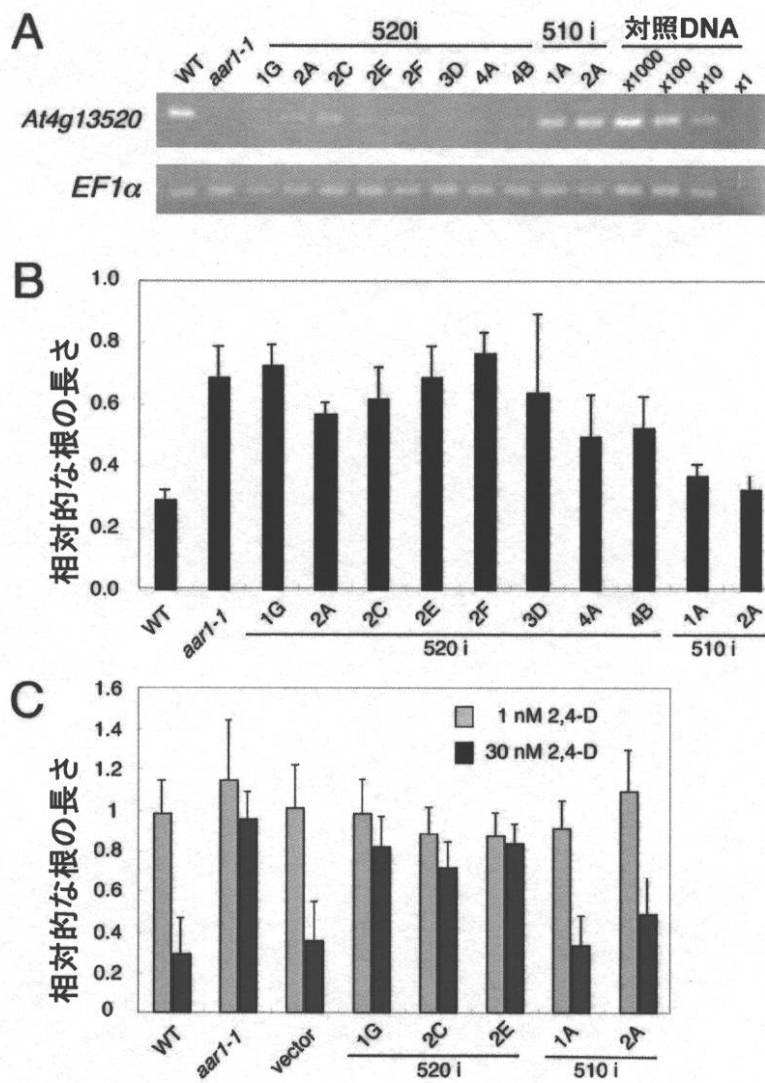
【図10】



【図11】



【図 13 - 1】



【図 14】

SMAP1	1	-----MRPMQL-DMLSEMDD
SMAP2	1	-----MDRYWEQDFMRPMVYRFLGEMEY
フグ	1	-----MPLKDQSNNTVMKPAVDENFP
ヒト	1	-----MKPAVDENFP
マウス	1	-----MKPAVDENFP
アフリカツメガエル	1	-----MKPAVDENFP
ダニオ	1	-----MFP
ウニ	1	-----MKPVAVDENFP
ショウジョウバエ	1	-----MDLNMKPSLAADENFS
コメ	1	MPTPAGGLCCGVPSLPTYNYKSLWKRRQSEEEIGDRKSNHPIQDSKSGWINRVINSS

SMAP1	AGSS----	MAMDVDDLEA--	MEILNEGGLV-----	SDNKLADADFFNKFD	DDFD	DDTDIN-----
SMAP2	PGYMPMQMEITED	FGPMDNQ--	FEVGGIS-----	PFQMPPEIS	DFFNKFE	DDFDSDIN-----
フグ	EGAGP--	YVDL	EVQLCVFLWQAGGSTGL	LMD---	LAANEKAVHS	DFNDFEDLFDDDDI-----
ヒト	EGAGP--	YVDL	EAG-----	GSTGL	LMD---	LAANEKAVHADFFNDFEDLFDDDDIQ-----
マウス	EGAGP--	YVDL	EAG-----	GSTGL	LMD---	LAANEKAVHADFFNDFEDLFDDDDIVQ-----
アフリカツメガエル	EGAGP--	YVDL	EAG-----	GSTGL	LMD---	LAANEKAVHADFFNDFEDLFDDDDIQ-----
ダニオ	EGAGP--	YVDL	EAG-----	GSSGL	LMD---	LAANEKAVHSDFNDFEDLFDDDDIQ-----
ウニ	EGSGP--	YVDL	EAG-----	GTAGL	LMD---	LAANEKAVHSDFNDFEDLFDDDEILS-----
ショウジョウバエ	EGPG---	YEM	ESG-----	GATGMMMD--	HLPNDKHVHADFY	NDFDDLFD
コメ	PGGVNEWEDSPGEMES	ASA	VGMMMEVDADDRHPP	SSLPI	DADFFNS	FPDDFDQDLA-----

F/Dリッチドメイン

【配列表】

0004942082000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 大野 豊

群馬県高崎市綿貫町1233番地 独立行政法人日本原子力研究開発機構 高崎量子応用研究所内

(72)発明者 ラーマン アビドゥール

群馬県高崎市綿貫町1233番地 独立行政法人日本原子力研究開発機構 高崎量子応用研究所内

審査官 上條 肇

(56)参考文献 欧州特許出願公開第01033405(E P, A1)

国際公開第00/040695(WO, A1)

Town, C.D. et al., Arabidopsis thaliana expressed protein (At4g13520) mRNA, complete cds., Genbank [online], 米国, National Center for Biotechnology Information, Bethesda MD, 2003年7月, Accession NM_117426, GenInfo Identifier No.30682511, URL, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/30682511?sat=24&satkey=4621082>

Town, C.D. et al., Arabidopsis thaliana hypothetical protein (At3g24280) mRNA, complete cds., Genbank [online], 米国, National Center for Biotechnology Information, Bethesda MD, 2003年7月, Accession NM_113334, GenInfo Identifier, URL, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/18404124?sat=24&satkey=4627992>

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

C07K 14/415

GenBank/EMBL/DDBJ/GenSeq

UniProt/GenSeq