(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2016 年 2 月 4 日(04.02.2016)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2016/017641 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *A01H 5/00* (2006.01)
A01H 1/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2015/071380

(22) 国際出願日: 2015 年 7 月 28 日(28.07.2015)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2014-157155 2014 年 7 月 31 日(31.07.2014) JP
特願 2015-148125 2015 年 7 月 27 日(27.07.2015) JP

(71) 出願人: トヨタ自動車株式会社 (TOYOTA JIDOSHA KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒4718571 愛知県豊田市トヨタ町１番地 Aichi (JP).

(72) 発明者: 小川 健一(OGAWA, Kenichi); 〒7161241 岡山県加賀郡吉備中央町吉川７５４９－１ 岡山県農林水産総合センター生物科学研究所内 Okayama (JP). 近藤 聡(KONDO, Satoshi); 〒4718571 愛知県豊田市トヨタ町１番地 トヨタ自動車株式会社内 Aichi (JP). 大音 徳(OHTO, Chikara); 〒4718571 愛知県豊田市トヨタ町１番地 トヨタ自動車株式会社内 Aichi (JP). 野田 壮一郎(NODA, Soichiro); 〒7161241 岡山県加賀郡吉備中央町吉川７５４９－１ 岡山県農林水産総合センター生物科学研究所内 Okayama (JP). 安河内 絢(YASUKOCHI, Aya); 〒7161241 岡山県加賀郡吉備中央町吉川７５４９－１ 岡山県農林水産総合センター生物科学研究所内 Okayama (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人ＨＡＲＡＫＥＮＺＯ ＷＯＲＬＤ ＰＡＴＥＮＴ ＆ ＴＲＡＤＥＭＡＲＫ (HARAKENZO WORLD PATENT & TRADEMARK); 〒5300041 大阪府大阪市北区天神橋２丁目北２番６号 大和南森町ビル Osaka (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則 5.2(a)）

WO 2016/017641 A1

(54) **Title**: PLANT BODY IDEAL FOR HIGH-DENSITY PLANTING AND USE THEREOF

(54) 発明の名称 : 高密度植栽に好適な植物体およびその利用

(57) **Abstract**: In the present invention, in order to raise the limits of high-density planting and improve biomass productivity per unit surface area, a plant biomass is produced by planting, under high-density planting conditions, a plant body obtained by transformation using exogenous genes that include MYB30-related genes.

(57) 要約: 高密度植栽における限界を引き上げて単位面積あたりのバイオマス生産性を向上させるために、ＭＹＢ３０関連遺伝子を含む外因性遺伝子を用いて形質転換した植物体を高密度植栽条件下にて栽培することによって植物バイオマスを生産する。

明　細　書

発明の名称 ： 高密度植栽に好適な植物体およびその利用

技術分野

[0001] 本発明は、高密度植栽に好適な植物体およびその利用に関する。

背景技術

[0002] 一般的に、植物は単位面積あたりに植栽した個体数（以下、植栽密度という。）が増加すると、植物個体の重量が減少することが知られている。その一方で、植栽密度を増加させると、単位面積あたりの収穫量および総バイオマス量が増加することもまた知られている。例えば、ダイズは、高い植栽密度での栽培が収量の向上に有効であり、このような手法が農業分野に普及しつつある。

[0003] 収量の向上を目的として高い植栽密度での栽培を行うことによって単位面積あたりのバイオマス量は向上する。しかし、個体間の競合を生育の初期段階から早めてしまうため、過繁茂になることから収量は頭打ちとなる。つまり、植栽密度の増加に伴って植物個体あたりのバイオマス量が減少するため、単位面積あたりのバイオマス量は、やがて頭打ちとなる。非特許文献１には、植栽密度を上げると個体重量が減少し、個体重量「Ｗ」と面積あたりの植物数（植栽密度）「Ｎ」との関係が、

[0004] [化1]

$$\log W = -3/2 \log N$$

[0005] で示される（いわゆる、「－３／２乗則」）ことが記載されている。このように、非特許文献１には、植栽密度と植物個体重量との関係を示す対数グラフの傾きが一定となる旨が記されている。

[0006] また、植物の全バイオマス量に対する収穫物のバイオマス量の割合を増加させる技術（特許文献１）、植物の単位面積あたりのバイオマス量を十分に向上させる技術（特許文献２）がこれまでに知られている。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：国際公開ＷＯ２００８／０７２６０２パンフレット（２００８年６月１９日国際公開）

特許文献2：国際公開ＷＯ２００８／０８７９３２パンフレット（２００８年７月２４日国際公開）

非特許文献

[0008] 非特許文献1：Lack and Evans (2001) Plant Biology 175-179, BIOS Scientific Publishers Limited

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] このように、植物には、単位面積あたりのバイオマス生産性に最適な植栽密度があり、それを上回る密度で植栽しても単位面積あたりのバイオマス生産性は向上しない。したがって、単位面積あたりのバイオマス生産性を向上させるためには、高い植栽密度での栽培における収量の限界を引き上げることが必要である。また、高い植栽密度での栽培による収量の向上には品種間で差異があることも知られており、収量向上の手段としての高い植栽密度での栽培に適した植物品種の創出が求められている。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明は、高い植栽密度での栽培を利用した植物バイオマスの生産方法およびそのツール並びにこれらの利用を提供する。本発明は、非特許文献１に記載されたグラフの傾きを変化させて、高い植栽密度での栽培において従来なし得なかった収量向上を実現するための技術を提供する。

[0011] 本発明に係る植物バイオマスを生産する方法は、ＭＹＢ３０シグナル伝達経路が活性化した植物体を高密度植栽条件下にて栽培する工程を包含することを特徴としている。

[0012] 本発明に係る方法において、上記植物体は、ＭＹＢ３０関連遺伝子を含む外因性遺伝子を用いて形質転換された形質転換体植物であることが好ましい

。一実施形態において、上記ＭＹＢ３０関連遺伝子は、発現の時期を制御するプロモーターと作動可能に連結されていてもよく、その場合、上記プロモーターは、上記ＭＹＢ３０関連遺伝子の発現を非形質転換体植物の花芽形成期直前に開始するものであることが好ましい。

[0013] 本発明に係る方法は、上記植物体の栽培後にバイオマスを回収する工程をさらに包含することが好ましく、栽培した上記植物体が結実した後にバイオマスを回収する工程をさらに包含しても、花芽形成期よりも前にバイオマスを回収する工程をさらに包含してもよい。

[0014] 本発明に係る方法において、上記ＭＹＢ３０関連遺伝子は、ＡｔＭＹＢ３０、ＢＡＫ１およびＰＬＡ２αからなる群より選択されるタンパク質と機能的に等価なタンパク質をコードする遺伝子であることが好ましい。

[0015] 本発明に係るキットは、植物の高密度植栽条件下での単位面積あたりの生産性を向上させるために、ＭＹＢ３０関連遺伝子を含む外因性遺伝子を備えていることを特徴としている。本発明に係るキットは、ＭＹＢ３０シグナル伝達経路の活性化に起因する病害抵抗性の有無を調べるための試薬をさらに備えていてもよい。

[0016] 上記外因性遺伝子において、上記ＭＹＢ３０関連遺伝子は、タンパク質発現の時期を制御するプロモーターと作動可能に連結されていてもよく、ＡｔＭＹＢ３０、ＢＡＫ１およびＰＬＡ２αからなる群より選択されるタンパク質と機能的に等価なタンパク質をコードする遺伝子であることが好ましい。

[0017] 本発明に係る形質転換体植物の作製方法は、上記キットを用いてスクリーニングされた遺伝子を含む外因性遺伝子を用いて、植物体を形質転換する工程を包含することを特徴としている。本発明に係る形質転換体植物の作製方法は、ＭＹＢ３０シグナル伝達経路の活性化に起因する病害抵抗性が向上している個体を選抜する工程をさらに包含してもよい。

[0018] 本発明に係るスクリーニング方法は、高密度植栽条件下での単位面積あたりの生産性が向上した植物体をスクリーニングするために、ＭＹＢ３０関連遺伝子の発現量またはＭＹＢ３０関連遺伝子にコードされるタンパク質の発

現量を、基準値と比較する工程；および上記発現量が基準値よりも高いまたは低い（基準値との間に有意差を有する）個体を選択する工程を包含することを特徴としている。また、本発明に係るスクリーニング方法は、高密度植栽条件下での単位面積あたりの生産性が向上した植物体をスクリーニングするために、ＭＹＢ３０関連遺伝子にコードされるタンパク質の活性を、基準値と比較する工程；および上記活性が基準値よりも高いまたは低い（基準値との間に有意差を有する）個体を選択する工程を包含することを特徴としている。本発明に係るスクリーニング方法は、ＭＹＢ３０シグナル伝達経路の活性化に起因する病害抵抗性が向上している個体を選抜する工程をさらに包含してもよい。

発明の効果

[0019] 本発明を用いれば、高密度植栽に適した植物体を得ることができ、植物バイオマスの収量を向上させることができる。

図面の簡単な説明

[0020] [図1]播種４週間後の植物における野生型（Ｃｏｌ－０）におけるＭＹＢ３０遺伝子の発現量に対する、形質転換体植物（１８－１，１５－１，３－１）におけるＭＹＢ３０遺伝子の発現量を示す図である。

[図2]野生型（Ｃｏｌ－０）およびＭＹＢ３０形質転換体植物（３－１）の地上部の生重量と植栽密度との関係を示す両対数グラフである。

[図3]野生株および形質転換体植物の地上部の生重量と植栽密度との関係を両対数グラフの傾きを示す累乗数ａを比較した図である。

[図4]リアルタイムＰＣＲで測定したＭＹＢ３０遺伝子の発現量と、植物の生重量と植栽密度との関係を示す両対数グラフの傾きａとの相関を示す図である。

[図5]野生型（Ｃｏｌ－０）およびＭＹＢ３０形質転換体植物（（ａ）１８－１、（ｂ）１５－１、（ｃ）３－１）におけるポット当たりのバイオマス収穫量（地上部生重量）と植栽密度との関係を比較した結果を示す図である。

[図6]野生型（Ｃｏｌ－０）およびＧｍＭＹＢ７４形質転換体植物（＃３－２

株）の地上部の乾燥重量と植栽密度との関係を示す両対数グラフである。

[図7]野生型イネおよび形質転換体イネにおけるポット当たりのバイオマス収穫量（地上部生重量）と植栽密度との関係を比較した結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0021] 〔１：ＭＹＢ３０関連遺伝子〕

ｍｙｂ遺伝子は、真核生物において広く存在する遺伝子群であり、植物においても多く存在している。ｍｙｂ遺伝子にコードされるＭＹＢタンパク質は、ＭＹＢドメインを有する転写因子であり、植物において数多く存在していることが知られており、そして、種々の遺伝子の発現調節を行って細胞内の種々の調節／制御にかかわると考えられている。

[0022] シロイヌナズナのＭＹＢタンパク質（ＭＹＢ転写因子）の１つであるＡｔＭＹＢ３０（Ａｔ３ｇ２８９１０）は、Ｃ末端領域の繰り返し配列の様式に基づいてＲ２Ｒ３型に分類される転写因子である。例えばシロイヌナズナには１２５個のＲ２Ｒ３型転写因子が存在しており、ＡｔＭＹＢ３０はサブグループ１に分類されている。

[0023] ＡｔＭＹＢ３０は、植物の過敏感反応とその細胞死に関与する転写因子として同定され、植物と病原体の相互作用、具体的には病原性細菌（キサントモナス・カンペストリス（Xanthomonas campestris）、シュードモナス・シリンゲ（Pseudomonas syringe）等）の感染に対する抵抗性（過敏感反応）に寄与していることが知られており、その応答にはＡｔＭＹＢ３０の活性化に伴う超長鎖脂肪酸（ＶＬＣＦＡ）の合成が関与していることが知られており（例えば、Daniel et al. (1999) The Plant Journal 20(1): 57-66；Raffaele et al. (2008) The Plant Cell 20: 752-767；Reina-Pinto et al. (2009) The Plant Cell 21: 1252-1272等参照）、この過敏感反応に伴って過酸化水素が放出されることが知られている（例えば、Breusegem et al. (2006) Plant Physiology 141: 381-390；Reina-Pinto et al.（前出）参照）。また、ＡｔＭＹＢ３０はＢＥＳ１という転写因子の下流で機能していることが知られており、植物ホルモンであるブラシノステロイドのシグナル伝達系に関

与していることが報告されている。そして、Li et al. (2009) The Plant Journal 58: 275-28には、ブラシノステロイド感受性変異体であるｂｒｉ－１は矮性を示し、ＡｔＭＹＢ３０をノックアウトすることによってｂｒｉ－１の矮性が強化されることが記載されている。さらに、Daniel et al. （前出）には、ＭＹＢ３０は植物の発生の早い時期に重要な役割を担っていることが示唆されている。また、内因性のＭＹＢ３０の量はユビキチンＥ３リガーゼであるＭＩＥＬ１によって調節されていることが知られている（Marino et al. (2013) Nature Communications 4: 1476）。しかし、ＡｔＭＹＢ３０が、植栽密度に関連した知見はこれまでに全く報告されていない。

[0024] 本明細書中で使用される場合、「植栽密度」は、単位面積あたりに植栽した個体数をいう。通常、植物を育成する場合には、適切な間隔で苗や苗木を植栽したり、間引いたりする。これは、個体の植栽密度が高まると、個体あたりのバイオマス生産性が低下し、単位面積当たりのバイオマス生産性は頭打ちとなるからである。このように、いずれの植物にも、単位面積あたりのバイオマス生産性に最適な植栽密度があり、それを上回る密度での植栽は種子や苗の購入費用に対する収穫物量の低下を招くことから好ましくない。

[0025] サトウキビ、トウモロコシなどのデンプン糖をエタノール発酵して得られるバイオマスエタノールは、二酸化炭素の排出削減に関わる、極めて重要な低級アルコール燃料である。また、木本などの木質系バイオマスの利用が注目されており、木本由来のグルコースからエタノールを製造する技術や、セルロースおよびリグニンから構成されているリグノセルロースから単糖またはオリゴ糖を製造する技術の開発が進んでいる。

[0026] バイオマスは、再生可能な、生物由来の有機性資源であって、化石資源を除いたものが意図される。バイオマスを燃焼した際に排出される二酸化炭素は、植物の成長過程で光合成によって大気中から吸収した二酸化炭素に由来するので、バイオマスを燃焼しても大気中の二酸化炭素量を増加させていないと考えられている。よって、バイオマス生産性の向上は、化石資源からの転換に非常に有用である。

[0027] 本明細書中で使用される場合、「高密度植栽」は、単位面積あたりのバイオマス生産性に最適な植栽密度を上回る密度での植栽が意図され、単位面積あたりのバイオマス量を十分に向上させる植栽密度である。「単位面積あたりのバイオマス量を十分に向上させる植栽密度」とは、各品種における最適な植栽密度（すなわち、単位面積あたりのバイオマス生産性が最大となる最適な植栽密度）を意味する。なお、最適な植栽密度は植物種ごとに異なるが、用いる植物に応じて最適な植栽密度を当業者は容易に知ることができる。なお、本明細書中において、単位面積あたりのバイオマス生産性に最適な植栽密度を「至適密度植栽」といい、至適密度を下回る密度での植栽を「低密度植栽」という。

[0028] 本明細書中で使用される場合、「バイオマス量」は植物個体の乾燥重量または生産量が意図される。バイオマス量が増加することにより、二酸化炭素を炭水化物として固定することができるので大気中のCO_2量を効率的に減らす効果、野菜の場合その可食部も大きくなり食糧増産となる効果、樹木などの場合は紙などの原料を増産できるという効果など、種々の利益が得られる。

[0029] 本明細書中で使用される場合、用語「ＭＹＢ３０関連遺伝子」は、ＭＹＢ３０関連タンパク質をコードする遺伝子が意図され、用語「ＭＹＢ３０関連タンパク質」は、ＡｔＭＹＢ３０様タンパク質（ＡｔＭＹＢ３０またはＡｔＭＹＢ３０と機能的に等価なタンパク質）、あるいはＡｔＭＹＢ３０様タンパク質の発現または機能をポジティブに制御し得るタンパク質、あるいはＡｔＭＹＢ３０様タンパク質のシグナル伝達経路（以下、ＭＹＢ３０シグナル伝達経路ともいう。）においてＡｔＭＹＢ３０様タンパク質の下流で機能しているタンパク質が意図される。

[0030] 本明細書中で使用される場合、用語「タンパク質」は、「ペプチド」または「ポリペプチド」と交換可能に使用される。また、本明細書中で使用される場合、用語「遺伝子」は、「ポリヌクレオチド」、「核酸」または「核酸分子」と交換可能に使用され、ヌクレオチドの重合体が意図される。

[0031] 後述する実施例に示すように、シロイヌナズナのアクチベーションタグラインを用いたスクリーニング結果から、ＡｔＭＹＢ３０が活性化されている植物体が高密度植栽に有利であることが確認され、これにより、ＡｔＭＹＢ３０の発現または機能をポジティブに制御し得る遺伝子産物（例えば、ＢＡＫ１、ＢＲ１１、ＢＥＳ１、ＭＩＥＬ１など）、あるいは、ＭＹＢ３０シグナル伝達経路においてＡｔＭＹＢ３０の下流で機能している遺伝子産物（例えばＰＬＡ$_2$α、ＫＣＳ１、ＦＤＨなど）が、高密度植栽についてＡｔＭＹＢ３０と同様の機能を示すことが示唆された。

[0032] シロイヌナズナにおいて、ＰＬＡ$_2$αは、ＡｔＭＹＢ３０とインビボで相互作用することが知られており、ＡｔＭＹＢ３０は、ＰＬＡ$_2$αの細胞質小胞から核への移行に関与していることが知られている。また、ＰＬＡ$_2$αは、リン脂質とアシルＣｏＡプールとの間で超長鎖脂肪酸（ＶＬＣＦＡｓ）の入れ替えを行い、過敏感細胞死に関与することが示されている（Raffaele et al.（前出）；Reina-Pinto et al.（前出））。ＢＡＫ１は、leucine-rich repeat receptor kinaseの１つであるＢＲＩ１と結合することが知られている。ＢＲＩ１は、転写因子であるＢＥＳ１の発現を誘導することが知られており、このＢＥＳ１はＭＹＢ３０の機能に関わることが知られている（Li et al.（前出））。これらの報告は、高密度植栽についてＰＬＡ$_2$αおよびＢＡＫ１がＡｔＭＹＢ３０と同様の効果を示し得ることを支持する。確かに、後述の実施例に示すように、シロイヌナズナのアクチベーションタグラインを用いたスクリーニング結果において、ＢＡＫ１およびＰＬＡ$_2$αがエンハンサー近傍で見出されている。

[0033] このように、ＰＬＡ$_2$αまたはＢＡＫ１をコードする遺伝子を用いれば、高密度植栽に有利な植物体を得ることが可能であると考えられる。

[0034] 一実施形態において、「ＭＹＢ３０関連遺伝子」は、ＭＹＢ３０シグナル伝達経路を制御するタンパク質をコードする遺伝子が意図され、ＭＹＢ３０シグナル伝達経路を活性化するタンパク質、すなわち、ＡｔＭＹＢ３０様タンパク質およびその上流または下流にて上記経路をポジティブに制御（上方

制御）するタンパク質をコードする遺伝子が意図される。ＡｔＭＹＢ３０の発現または機能をポジティブに制御し得るタンパク質としてはＢＥＳ１およびＢＡＫ１が挙げられ、ＡｔＭＹＢ３０の下流で機能しているタンパク質としてはＰＬＡ$_2$αが挙げられるがこれらに限定されない。一実施形態において、ＭＹＢ３０関連遺伝子は、ＡｔＭＹＢ３０様タンパク質、ＰＬＡ$_2$α様タンパク質（ＰＬＡ$_2$αまたはＰＬＡ$_2$αと機能的に等価なタンパク質）またはＢＡＫ１様タンパク質（ＢＡＫ１またはＢＡＫ１と機能的に等価なタンパク質）をコードする遺伝子であり得る。

[0035] シロイヌナズナのＡｔＭＹＢ３０、ＢＡＫ１およびＰＬＡ２αのタンパク質は、それぞれ配列番号１１、１３および２１に示されるアミノ酸配列からなり、これらをコードする遺伝子は、それぞれ配列番号１２、１４および２２に示される塩基配列からなる。これらの遺伝子に機能的に等価な遺伝子は、公知の文献およびデータベースを参照して取得することができ、これらもまた本発明に好適に用いられる。

[0036] Dubos et al. (2010) TRENDS in Plant Science 15(10): 573-581に示されるように、ＭＹＢ転写因子のサブグループは類似の機能を発揮することが知られており、上述したように、ＡｔＭＹＢ３０はサブグループ１に分類されている。よって、シロイヌナズナのサブグループ１に属するＡｔＭＹＢ３１（Ａｔ１ｇ７４６５０）、ＡｔＭＹＢ６０（Ａｔ１ｇ０８８１０）、ＡｔＭＹＢ９４（Ａｔ３ｇ４７６６０）、ＡｔＭＹＢ９６（Ａｔ５ｇ６２４７０）は、ＭＹＢ３０関連タンパク質として、ＡｔＭＹＢ３０と同様に本発明に好適に用いることができる。なお、ＡｔＭＹＢ３０と機能的に等価な転写因子は、これらに限定されず、シロイヌナズナ以外の植物において同様の機能を有する転写因子（以下、相同転写因子と称す。）も含まれる。ＡｔＭＹＢ３０と機能的に等価な転写因子（ＡｔＭＹＢ３０様タンパク質）としては、例えば、イネ（Oryza sativa）における相同転写因子であるＯｓ０３ｇ０３７８５００、Ｏｓ０９ｇ０４１４３００、Ｏｓ０８ｇ０４３７２００、Ｏｓ１１ｇ０５５８２００、Ｏｓ０７ｇ０６２９０００、ソルガム（Sorghum bicol

or）における相同転写因子であるＳｂ０７０２１４３０、Ｓｂ０２ｇ０２４６４０、Ｓｂ０７ｇ０２１４２０、Ｓｂ０２ｇ０４０１６０、Ｓｂ０５ｇ０２１８２０、Ｓｂ０５ｇ００１７３０、Ｓｂ０８ｇ００１８００、ブドウ（Vitis Vinifera）における相同転写因子であるＧＳＶＩＶＰ０００１６３３７００１、ＧＳＶＩＶＰ００２０９６８００１、ＧＳＶＩＶＰ０００３３６８１００１、ポプラ（Populus trichocarpa）における相同転写因子であるＰＯＰＴＲ＿００１７ｓ１１８８０ｇ、ダイズ（Glycine max）における相同転写因子であるＧｌｙｃｉｎｅ ｍａｘ ＭＹＢ７４、ミカン(Citrus clementina)における相同転写因子であるＣＩＣＬＥ＿ｖ１００１２１５２ｍｇ等を挙げることができる。

[0037] 本発明において、ＡｔＭＹＢ３０と機能的に等価なこれらの転写因子（相同転写因子）が利用可能であることは、ダイズ（Glycine max）における相同転写因子であるＧｌｙｃｉｎｅ ｍａｘ ＭＹＢ７４をコードする遺伝子が、ＡｔＭＹＢ３０遺伝子と同様に高密度植栽条件下での単位面積あたりのバイオマス生産性が向上した形質転換体植物をもたらすことからも明らかである。

[0038] 相同転写因子は、植物ゲノム情報が明らかになっていれば、遺伝子の塩基配列に基づいて、検索対象のゲノム情報から検索することができる。相同転写因子は、そのアミノ酸配列が、目的の転写因子のアミノ酸配列に対して、例えば５０％以上、好ましくは７０％以上、より好ましくは９０％以上、最も好ましくは９５％以上の配列相同性を有するアミノ酸配列として検索される。そして、目的の転写因子の機能ドメイン（例えばＭＹＢタンパク質のＭＹＢドメイン）のアミノ酸配列に対して、例えば８５％以上、好ましくは９０％以上、より好ましくは９５％以上、最も好ましくは９８％以上の配列相同性を有するアミノ酸配列を含むものが相同転写因子として検索される。配列相同性の値は、ｂｌａｓｔアルゴリズムを実装したコンピュータプログラムおよび遺伝子配列情報を格納したデータベースを用いてデフォルトの設定で求められる値を意味する。

[0039] シロイヌナズナのＰＬＡ$_2$α遺伝子（Ａｔ２ｇ０６９２５）以外に、植物に由来するＰＬＡ$_2$α遺伝子として、イネのＯｓ１１ｇ０５４６６００、Ｏｓ０３ｇ０２６１１００、Ｏｓ０３ｇ０７０８０００、ソルガムのＳｂ０５ｇ０２１０００、Ｓｂ０１ｇ０４０４３０、Ｓｂ０１ｇ０１０６４０、ブドウのＧＳＶＩＶＰ０００１５４７００１等が知られており、これらの遺伝子産物もＰＬＡ$_2$α様タンパク質として本発明に好適に用いることができる。また、ＢＡＫ１遺伝子（Ａｔ４ｇ３３４３０）のオルソログとして、Ａｔ２ｇ１３７９０、Ａｔ２ｇ１３８００、Ａｔ１ｇ３４２１０、Ａｔ１ｇ７１８３０等が知られており、シロイヌナズナ以外の植物由来のＢＡＫ１遺伝子として、例えば、イネのＯｓ０４ｇ０４５７８００、Ｏｓ０８ｇ０１７４７００、ソルガムのＳｂ０７ｇ００４７５０、Ｓｂ０６ｇ０１８７６０、Ｓｂ０４ｇ０２３８１０、ブドウのＧＳＶＩＶＰ００００９５４４００１、ＧＳＶＩＶＰ００００１７７７００１、ＧＳＶＩＶＰ００００１９４１２００１、ヒメツリガネゴケ（Physcomitrella patens）のＰｐ１３５２６８、Ｐｐ１８６５９８、イヌタカヒバ（Selaginella moellendorffii）のＳｍ２６８０３２、Ｓｍ４４４５９０、Ｓｍ２６８１５８等が知られており、これらの遺伝子産物もＢＡＫ１様タンパク質として本発明に好適に用いることができる。

[0040] 上述した遺伝子および対応するタンパク質の配列は配列表に示されており、その配列番号は以下のとおりである。

[0041]

[化2]

	配列番号			配列番号	
	タンパク質	遺伝子		タンパク質	遺伝子
AtMYB30 (At3g28910)	11	12	POPTR_0017s11880g	65	66
BAK1 (At4g33430)	13	14	Glycine max MYB74	67	68
BRI1 (AT4G39400)	15	16	CICLE_v10012152mg	69	70
BES1 (AT1G19350)	17	18	Os11g0546600	71	72
MIEL1 (AT5G18650)	19	20	Os03g0261100	73	74
PLA2a (AT2G26560)	21	22	Os03g0708000	75	76
KCS1 (AT1G01120)	23	24	Sb05g021000	77	78
FDH (AT2G26250)	25	26	Sb01g040430	79	80
AtMYB31 (At1g74650)	27	28	Sb01g010640	81	82
AtMYB60 (At1g08810)	29	30	GSVIVP00001547001	83	84
AtMYB94 (At3g47660)	31	32	At2g13790	85	86
AtMYB96 (At5g62470)	33	34	At2g13800	87	88
Os03g0378500	35	36	At1g34210	89	90
Os09g0414300	37	38	At1g71830	91	92
Os08g0437200	39	40	Os04g0457800	93	94
Os11g0558200	41	42	Os08g0174700	95	96
Os07g0629000	43	44	Sb07g004750	97	98
Sb07g021430	45	46	Sb06g018760	99	100
Sb02g024640	47	48	Sb04g023810	101	102
Sb07g021420	49	50	GSVIVP00009544001	103	104
Sb02g040160	51	52	GSVIVP00001777001	105	106
Sb05g021820	53	54	GSVIVP00019412001	107	108
Sb05g001730	55	56	Pp135268	109	110
Sb08g001800	57	58	Pp186598	111	112
GSVIVP00016337001	59	60	Sm268032	113	114
GSVIVP00020968001	61	62	Sm444590	115	116
GSVIVP00033681001	63	64	Sm268158	117	118

[0042] また、上述したように、ＡｔＭＹＢ３０の活性化は、病原性細菌の感染に対する植物の過敏感反応（以下、ＭＹＢ３０シグナル伝達経路の活性化に起因する病害抵抗性とも称する。）を向上させる。よって、ＡｔＭＹＢ３０、ＢＡＫ１およびＰＬＡ２αのタンパク質の変異体であっても、ＭＹＢ３０シグナル伝達経路の活性化に起因する病害抵抗性を向上させる機能を有している限り、ＭＹＢ３０関連遺伝子にコードされるタンパク質である。一実施形態において、配列番号１１、１３または２１に示されるアミノ酸配列におい

て、１または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り、かつＭＹＢ３０シグナル伝達経路の活性化に起因する病害抵抗性を向上させるポリペプチドも本発明に好適に用いることができる。

[0043] なお、病害抵抗性や環境ストレス耐性を植物に付与することは、必ずしも植物の生産性の向上につながらない。例えば、病害抵抗性および／または環境ストレス耐性に関する遺伝子を植物体で構成的に発現させた場合、植物体の成長が損なわれることが報告されている（例えば、Nakashima et al. (2007) The Plant Journal 51: 617-630参照）。このような植物の成長を損なわないためには何らかの工夫が必要であるが、そのような工夫には用いる遺伝子ごとに異なる技術が要求されるので、植物の成長を損なわないための技術として確立されているものは何ら存在せず、そのような技術は決して技術常識でも技術水準でもない。

[0044] ポリペプチド（アミノ酸）の観点で用いられる場合、「１または数個」は、当業者が、過度の実験を行うことなく、部位特異的突然変異誘発法等の公知の変異ペプチド作製法によって欠失、置換もしくは付加し得る程度の数が意図され、１～３０個の範囲内であることが好ましく、２０個以下であることがより好ましく、１、２、３、４、５、６、７、８、９または１０個（すなわち１０個以下）であることがさらに好ましく、１、２、３、４または５個（すなわち５個以下）であることがなおさらに好ましい。なお、当業者は、目的のポリペプチドの長さに応じて、用語「１または数個」によって示されるアミノ酸数の範囲がどの程度であるのかを容易に理解し得るとともに、過度の実験を行うことなく、「１または数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたポリペプチド」を作製し得る。また、このようなポリペプチドは、人為的に導入された変異を有するポリペプチドに限定されず、天然に存在するポリペプチドを単離精製したものであってもよい。そして、当業者は、本明細書中に記載の手順に従って、上記ポリペプチドが所望の活性を有しているか否かを、試行錯誤することなく確認することができる。

[0045] 本明細書中で使用される場合、目的のポリペプチドについての同一性は、

８０％以上であることが好ましく、８５％以上であることがより好ましく、９０％以上であることがさらに好ましく、９５％以上であることがなおさらに好ましく、９９％以上であることが最も好ましい。

[0046] タンパク質のアミノ酸配列中のいくつかのアミノ酸が、このタンパク質の構造または機能に有意に影響することなく容易に改変され得ることは、当該分野において周知である。さらに、人為的に改変させるだけでなく、天然のタンパク質において、当該タンパク質の構造または機能を有意に変化させない変異体が存在することもまた周知である。

[0047] 好ましい変異体は、保存性もしくは非保存性アミノ酸置換、欠失、または添加を有する。好ましくは、サイレント置換、添加、および欠失であり、特に好ましくは、保存性置換である。これらは、本発明に係るポリペプチド活性を変化させない。

[0048] 代表的に保存性置換と見られるのは、脂肪族アミノ酸Ａｌａ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、およびＩｌｅの中での１つのアミノ酸の別のアミノ酸への置換、ヒドロキシル残基ＳｅｒおよびＴｈｒの交換、酸性残基ＡｓｐおよびＧｌｕの交換、アミド残基ＡｓｎおよびＧｌｎの間の置換、塩基性残基ＬｙｓおよびＡｒｇの交換、ならびに芳香族残基Ｐｈｅ、Ｔｙｒの間の置換である。

[0049] また、本発明においては、ＭＹＢ３０シグナル伝達経路の活性化に起因する病害抵抗性を向上させるポリペプチドをコードし得る限りにおいて、配列番号１２、１４または２２に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドを用いることもできる。このようなポリヌクレオチドには、例えば、配列番号１１、１３または２１に示されるアミノ酸配列において、１または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ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドや、配列番号１２、１４または２２に示される塩基配列において、１または数個の塩基が欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなるポリヌクレオチドが含まれる。

[0050] ポリヌクレオチド（塩基）の観点で用いられる場合、「１または数個」は

、１～１００個の範囲内であることが好ましく、１～５０個の範囲内であることがより好ましく、１～３０個の範囲内であることがさらに好ましく、１～１５個の範囲内であることがなおさらに好ましい。なお、当業者は、目的のポリヌクレオチドの長さに応じて、用語「１または数個」によって示される塩基数の範囲がどの程度であるのかを容易に理解し得る。

[0051] 本明細書中で使用される場合、目的のポリヌクレオチドについての同一性は、８０％以上であることが好ましく、８５％以上であることがより好ましく、９０％以上であることがさらに好ましく、９５％以上であることがなおさらに好ましく、９７％以上であることが最も好ましい。

[0052] 本発明において「ストリンジェントな条件」とは、少なくとも９０％の同一性、好ましくは少なくとも９５％の同一性、最も好ましくは少なくとも９７％の同一性が配列間に存在するときにのみハイブリダイゼーションが起こることを意味する。具体的には、例えば、ハイブリダイゼーション溶液（５０％ホルムアミド、５×ＳＳＣ（１５０ｍＭのＮａＣｌ、１５ｍＭのクエン酸三ナトリウム）、５０ｍＭのリン酸ナトリウム（ｐＨ７．６）、５×デンハート液、１０％硫酸デキストラン、および２０μｇ／ｍｌの変性剪断サケ精子ＤＮＡを含む）中にて４２℃で一晩インキュベーションした後、約６５℃にて０．１×ＳＳＣ中でフィルターを洗浄する条件を挙げることができる。

[0053] ハイブリダイゼーションは、Sambrookら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory (2001) に記載されている方法のような周知の方法で行うことができる。通常、温度が高いほど、塩濃度が低いほどストリンジェンシーは高くなり（ハイブリダイズし難くなり）、より相同性の高いポリヌクレオチドを取得することができる。

[0054] アミノ酸配列や塩基配列の同一性は、カーリンおよびアルチュールによるアルゴリズムＢＬＡＳＴ（Karlin S and Altschul SF (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 2264-2268; (1993) Proc. Natl. Acad Sci. USA, 90: 5873-5877）を用いて決定できる。ＢＬＡＳＴのアルゴリズムに基づいたＢＬ

ＡＳＴＮやＢＬＡＳＴＸと呼ばれるプログラムが開発されている（Altschul SF, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403）。

[0055] 本発明に用いられるＭＹＢ３０関連遺伝子は、ゲノムＤＮＡに由来しても、ｃＤＮＡに由来してもよく、化学合成ＤＮＡであってもよい。また、ＲＮＡでもよい。

[0056] 本発明に用いられるＭＹＢ３０関連遺伝子を取得する方法として、公知の技術により、ＭＹＢ３０関連遺伝子のタンパク質をコードするＤＮＡ断片を単離し、クローニングする方法が挙げられる。例えば、シロイヌナズナのＭＹＢ３０、$PLA_2\alpha$またはＢＡＫ１のタンパク質をコードするＤＮＡの塩基配列の一部と特異的にハイブリダイズするプローブを調製し、ゲノムＤＮＡライブラリーやｃＤＮＡライブラリーをスクリーニングすればよい。

[0057] あるいは、本発明に用いられるＭＹＢ３０関連遺伝子を取得する方法として、ＰＣＲ等の増幅手段を用いる方法を挙げることができる。例えば、シロイヌナズナのＭＹＢ３０関連遺伝子のｃＤＮＡのうち、５’側および３’側の配列（またはその相補配列）の中からそれぞれプライマーを調製し、これらプライマーを用いてゲノムＤＮＡ（またはｃＤＮＡ）を鋳型にしてＰＣＲ等を行い、両プライマー間に挟まれるＤＮＡ領域を増幅することで、本発明に用いられるＭＹＢ３０関連遺伝子のオープンリーディングフレームを含むＤＮＡ断片を大量に取得することができる。

[0058] 本発明に用いられるＭＹＢ３０関連遺伝子は、任意の植物の組織または細胞を供給源として取得することができる。全ての植物はＭＹＢ３０関連遺伝子を有しているので、所望の植物を供給源としてＭＹＢ３０関連遺伝子を取得すればよい。

[0059] 〔２：高密度植栽に好適な植物体およびその利用〕

植物は、食糧としてだけでなく、鑑賞用や、紙や薬品などの工業材料や燃料として種々の局面において人類と深くかかわってきた。また、近年では、化石燃料に替わるバイオマスエネルギーとしても注目を集めている。しかし、植物の発芽、成長、開花等のメカニズムについては未だ明らかとなってい

ない点も多い。このため、植物は、経験や勘により栽培されることが主であり、気候などの自然の影響により収穫が大きく左右されていた。それゆえ、植物の発芽、成長、開花のメカニズムを解明して、それらを調整・制御することは、鑑賞用の草花や、穀物・野菜等の食糧の収量増加において重要なだけでなく、森林における木材の育成や、さらにバイオマスエネルギーに関しても極めて重要なことである。

[0060] 後述する実施例にて示すように、ＭＹＢ３０関連遺伝子を導入した形質転換体において、親植物または野生型植物と比較して高密度植栽の際の単位面積あたりのバイオマス量が増加することが確認されている。また、後述する実施例にて示すように、ＭＹＢ３０関連遺伝子の活性レベルが増加している植物体において、親植物または野生型植物と比較して高密度植栽の際の単位面積あたりのバイオマス量が増加することが確認されている。すなわち、本発明は、ＭＹＢ３０シグナル伝達経路が活性化した、高密度植栽の際の単位面積あたりのバイオマス量を増加させる植物体およびその製造方法を提供する。

[0061] 特許文献２には、植物の内因性のγ－グルタミルシステインシンセターゼ（ＧＳＨ１）においてその発現レベルまたは活性レベルを増加させる変異が生じている植物や、植物由来のＧＳＨ１遺伝子が導入されている形質転換体植物において、高密度植栽の際の単位面積あたりのバイオマス量が増加していることが開示されている。しかし、ＧＳＨ１遺伝子は、ＭＹＢ３０関連遺伝子でない。このことは、ＧＳＨ１形質転換体において、高密度植栽の際の単位面積あたりのバイオマス量だけでなく種子収量も増加しているにもかかわらず、ＭＹＢ３０形質転換体において、種子収量が減少していることからも明らかである。

[0062] 一実施形態において、本発明は、ＭＹＢ３０関連遺伝子活性レベルを増加させた植物体を提供する。本実施形態に係る植物体は、人工的な変異誘導または天然の変異によって、内因性のＭＹＢ３０関連遺伝子の発現量が増加している植物または内因性のＭＹＢ３０関連遺伝子が活性化されている植物で

あり得る。すなわち、本実施形態に係る植物体の製造方法は、内因性のＭＹＢ３０関連遺伝子に人工的な変異を誘導する工程を包含する。

[0063] 別の実施形態において、本発明は、ＭＹＢ３０関連遺伝子を含む外因性遺伝子を用いて形質転換した、親植物と比較して高密度植栽の際の単位面積あたりのバイオマス量が増加する形質転換体植物を提供する。すなわち、本実施形態に係る植物体の製造方法は、ＭＹＢ３０関連遺伝子を含む外因性遺伝子を用いて植物体を形質転換する工程を包含する。

[0064] 植物体の形質転換に用いられる外因性遺伝子は、植物細胞で機能するプロモーターがＭＹＢ３０関連遺伝子の上流に連結されており、植物細胞で機能するターミネーターが下流に連結されている。このような外因性遺伝子を植物体に導入することにより、目的の植物体を形質転換することができる。

[0065] 植物細胞で機能するターミネーターとしては、ノパリン合成酵素（ＮＯＳ）遺伝子由来のターミネーター、カリフラワーモザイクウイルス由来のターミネーターなどを挙げることができる。

[0066] 植物細胞で機能するプロモーターとして、構成的に発現するカリフラワーモザイクウイルス３５Ｓプロモーターがよく用いられるがこれに限定されない。カリフラワーモザイクウイルス３５Ｓプロモーター以外の構成的プロモーターとしては、イネのアクチンプロモーター、トウモロコシのユビキチンプロモーターなどを挙げることができ、これらのプロモーターも本発明に好適に用いることができる。

[0067] 構成的プロモーター以外のプロモーターとしては、ｒｂｃＳプロモーター、Ｃａｂプロモーターなどの緑葉組織特異的なプロモーターやＨＳＰ７０プロモーターなどの誘導性プロモーターが挙げられるが、これに限定されない。また、葉緑体のゲノムに直接挿入する場合のプロモーターは、ｒｂｃＬプロモーターなどが挙げられるが、葉緑体内で機能するプロモーターであればこれに限定されない。

[0068] 本発明に用いられる外因性遺伝子の一実施形態としての組換え発現ベクターは、植物細胞内でＭＹＢ３０関連遺伝子を発現させることが可能なもので

あれば特に限定されない。特に、植物体へのベクターの導入法がアグロバクテリウムを用いる方法である場合には、ｐＢＩ系等のバイナリーベクターを用いることが好ましい。バイナリーベクターとしては、例えば、ｐＢＩＧ、ｐＢＩＮ１９、ｐＢＩ１０１、ｐＢＩ１２１、ｐＢＩ２２１、ｐＭＡＴ１３７などを挙げることができる。

[0069] 本発明において形質転換の対象となる植物体は、植物体全体、植物器官（例えば葉、花弁、茎、根、種子など）、植物組織（例えば表皮、師部、柔組織、木部、維管束、柵状組織、海綿状組織など）または植物培養細胞、あるいは種々の形態の植物細胞（例えば、懸濁培養細胞）、プロトプラスト、葉の切片、カルスなどのいずれをも意味する。形質転換に用いられる植物体としては、特に限定されず、用いられるＭＹＢ３０関連遺伝子が発現し得る植物を適宜選択すればよい。

[0070] ここで、シロイヌナズナのＭＹＢ３０関連遺伝子を用いる場合、形質転換の対象となる植物は、シロイヌナズナに近縁なアブラナ科の植物が好適であるがこれに限定されず、種々の植物において、自身の遺伝子または他の植物由来の遺伝子を用いて所望の形質転換体植物を作出し得ることが報告されている（Franke R et al. (2000) Plant J. 22: 223-234；Yamaguchi and Blumwald (2005) TRENDS in Plant Science 10(12): 615-620参照）。同様に、シロイヌナズナのＭＹＢ３０関連遺伝子を上記のような植物に導入すれば、高密度植栽に好適な形質転換体植物、すなわち、高密度植栽条件下での単位面積あたりのバイオマス生産性が向上した形質転換体植物を容易に作出することができる。

[0071] 本発明が種々の植物に対して適用可能であることは、ＡｔＭＹＢ３０遺伝子の相同転写因子を発現しているイネにＡｔＭＹＢ３０遺伝子を導入することによって、高密度植栽条件下での単位面積あたりのバイオマス生産性が向上した形質転換体イネを作出し得ることからも明らかである。

[0072] 植物細胞への組換え発現ベクターの導入には、当業者に公知の形質転換方法（例えば、アグロバクテリウム法、パーティクルガン法、ポリエチレング

リコール法、エレクトロポレーション法など）が用いられる。例えば、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、アグロバクテリウム・ツメファシエンス（Agrobacterium tumefaciens））に導入し、この株をリーフディスク法（内宮博文著，植物遺伝子操作マニュアル，１９９０，２７－３１ｐｐ，講談社サイエンティフィック，東京）などにしたがって無菌培養葉片に感染させ、形質転換体植物を得ることができる。

[0073] 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ＰＤＳ－１０００（ＢＩＯ－ＲＡＤ社）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って異なるが、通常は４５０～２０００ｐｓｉ程度の圧力、４～１２ｃｍ程度の距離で行う。

[0074] 目的の遺伝子が導入された細胞または植物組織は、まずカナマイシン耐性やハイグロマイシン耐性などの薬剤耐性マーカーで選択され、次いで定法によって植物体に再生される。形質転換細胞から植物体の再生は、植物細胞の種類に応じて当業者に公知の方法で行うことが可能である。

[0075] 目的の遺伝子が植物に導入されたか否かの確認は、ＰＣＲ法、サザンハイブリダイゼーション法、ノーザンハイブリダイゼーション法などによって行うことができる。例えば、形質転換体植物からＤＮＡを調製し、導入されたＤＮＡに特異的プライマーを設計してＰＣＲを行う。その後、増幅産物についてアガロースゲル電気泳動、ポリアクリルアミドゲル電気泳動またはキャピラリー電気泳動などを行い、臭化エチジウムなどによって染色し、目的の増幅産物を検出することによって、形質転換されたことを確認することができる。

[0076] ゲノム内にＭＹＢ３０関連遺伝子が導入された形質転換体植物体がいったん得られれば、当該植物体から有性生殖または無性生殖により子孫を得ることができる。また、当該植物体やその子孫あるいはクローンから繁殖材料（

例えば、種子、プロトプラストなど）を得て、それらを基に目的の植物体を量産することも可能である。

[0077] 本発明に係る植物体は、単位面積あたりのバイオマス量を十分に向上させる植栽密度よりも高い植栽密度にて栽培された場合であっても、親植物／野生型植物と比較して単位面積あたりのバイオマス量がさらに増加する。つまり、本発明に係る植物体は、高密度植栽によって親植物／野生型植物では提供し得ないバイオマス量を提供することができる。ただし、本発明に係る植物体を栽培する際の植栽密度は、上記最適な植栽密度よりも高い場合に限定される必要がなく、各品種における最適な植栽密度の３０％以上であることが好ましく、６０％以上であることがより好ましく、１００％以上であることがなお好ましい。

[0078] 本発明に係る植物体は、野生型植物または親植物と比較して、高密度植栽の際に得られるバイオマス量が増加している。よって、高密度植栽を行った際にバイオマス量が野生型植物または親植物よりも増加しているか否かを確認することによって、本発明に係る植物体であるか否かを知ることができる。すなわち、本発明に係る植物体の製造方法は、高密度植栽を行った際にバイオマス量が野生型植物または親植物よりも増加しているか否かを確認する工程をさらに包含してもよい。

[0079] また、本発明に係る植物体は、ＭＹＢ３０シグナル伝達経路が活性化しているので、ＭＹＢ３０シグナル伝達経路の活性化に起因する病害抵抗性が向上している。よって、ＭＹＢ３０シグナル伝達経路の活性化に起因する病害抵抗性が向上しているか否かを確認することによって、具体的には、病原性細菌（例えば、キサントモナス・カンペストリス（Xanthomonas campestris）、シュードモナス・シリンゲ（Pseudomonas syringe）等）への抵抗性が向上しているか否かを確認することによって本発明に係る植物体であるか否かを知ることができる。すなわち、本発明に係る植物体の製造方法は、ＭＹＢ３０シグナル伝達経路の活性化に起因する病害抵抗性が向上しているか否かを確認する工程をさらに包含してもよい。

[0080] 上記の手順に従って得られた植物体（すなわち本発明に係る植物体）は、単位面積あたりのバイオマス量を十分に向上させる植栽密度よりも高い植栽密度にて栽培することによって、親植物（または形質転換に用いた植物）と比較して、得られるバイオマス量が増加している。すなわち、本発明は、上述した植物体を用いた植物バイオマス生産方法を提供する。

[0081] 本発明に係る生産方法は、本発明に係る植物体を高密度植栽条件下にて栽培する工程を包含することを特徴としている。一実施形態において、上記植物体は、人工的な変異誘導または天然の変異によって、内因性のＭＹＢ３０関連遺伝子の発現量が増加している植物または内因性のＭＹＢ３０関連遺伝子が活性化されている植物であり得る。すなわち、本実施形態に係る生産方法は、内因性のＭＹＢ３０関連遺伝子に人工的な変異を誘導する工程をさらに包含し得る。

[0082] 別の実施形態において、上記植物体は、ＭＹＢ３０関連遺伝子を含む外因性遺伝子を用いて形質転換した植物であり得る。すなわち、本実施形態に係る生産方法は、ＭＹＢ３０関連遺伝子を含む外因性遺伝子を用いて植物体を形質転換する工程をさらに包含し得る。

[0083] 本実施形態に係る生産方法において用いられる外因性遺伝子において、上記ＭＹＢ３０関連遺伝子は、発現の時期および／または発現させる器官を制御するプロモーター（誘導性プロモーター）と作動可能に連結されていることが好ましい。１つの局面において、上記プロモーターは、上記ＭＹＢ３０関連遺伝子の発現を非形質転換体植物の花芽形成期直前に開始するものであり得る。別の局面において、上記プロモーターは、葉器官特異的にＭＹＢ３０関連遺伝子を発現させるものであり得る。

[0084] 形質転換される植物体は、ＭＹＢ３０関連遺伝子の遺伝子産物と機能的に等価である内因性の転写因子を有する植物であれば特に限定されない。ＭＹＢ３０関連遺伝子と機能的に等価な転写因子は、ＮＣＢＩ（National Center for Biotechnology Information）等が公開している公知のデータベース上において、単子葉植物から双子葉植物までの広範囲に存在していることを確

認することができる。すなわち、形質転換される植物体としては、単子葉植物および双子葉植物が広く使用可能であり、単子葉植物としては、例えばウキクサ属植物（ウキクサ）及びアオウキクサ属植物（アオウキクサ，ヒンジモ）が含まれるうきくさ科植物；カトレア属植物、シンビジウム属植物、デンドロビューム属植物、ファレノプシス属植物、バンダ属植物、パフィオペディラム属植物、オンシジウム属植物等が含まれるラン科植物、がま科植物、みくり科植物、ひるむしろ科植物、いばらも科植物、ほろむいそう科植物、おもだか科植物、とちかがみ科植物、ほんごうそう科植物、いね科植物（スイートコーン等のトウモロコシ等）、かやつりぐさ科植物、やし科植物、さといも科植物、ほしぐさ科植物、つゆくさ科植物、みずあおい科植物、いぐさ科植物、びゃくぶ科植物、ゆり科植物、ひがんばな科植物、やまのいも科植物、あやめ科植物、ばしょう科植物、しょうが科植物、かんな科植物、ひなのしゃくじょう科植物等を例示することができる。また、双子葉植物としては、例えばアサガオ属植物（アサガオ）、ヒルガオ属植物（ヒルガオ，コヒルガオ，ハマヒルガオ）、サツマイモ属植物（グンバイヒルガオ、サツマイモ）、ネナシカズラ属植物（ネナシカズラ、マメダオシ）が含まれるひるがお科植物；ナデシコ属植物（カーネーション等）、ハコベ属植物、タカネツメクサ属植物、ミミナグサ属植物、ツメクサ属植物、ノミノツヅリ属植物、オオヤマフスマ属植物、ワチガイソウ属植物、ハマハコベ属植物、オオツメクサ属植物、シオツメクサ属植物、マンテマ属植物、センノウ属植物、フシグロ属植物、ナンバンハコベ属植物が含まれるなでしこ科植物；もくまもう科植物、どくだみ科植物、こしょう科植物、せんりょう科植物、やなぎ科植物、やまもも科植物、くるみ科植物、かばのき科植物、ぶな科植物、にれ科植物、くわ科植物、いらくさ科植物、かわごけそう科植物、やまもがし科植物、ぼろぼろのき科植物、びゃくだん科植物、やどりぎ科植物、うまのすずくさ科植物、やっこそう科植物、つちとりもち科植物、たで科植物、あかざ科植物、ひゆ科植物、おしろいばな科植物、やまとぐさ科植物、やまごぼう科植物、つるな科植物、すべりひゆ科植物、もくれん科植物、やまぐる

ま科植物、かつら科植物、すいれん科植物、まつも科植物、きんぽうげ科植物、あけび科植物、めぎ科植物、つづらふじ科植物、ろうばい科植物、くすのき科植物、けし科植物、ふうちょうそう科植物、あぶらな科植物、もうせんごけ科植物、うつぼかずら科植物、べんけいそう科植物、ゆきのした科植物、とべら科植物、まんさく科植物、すずかけのき科植物、ばら科植物、まめ科植物、かたばみ科植物、ふうろそう科植物、あま科植物、はまびし科植物、みかん科植物、にがき科植物、せんだん科植物、ひめはぎ科植物、とうだいぐさ科植物、あわごけ科植物、つげ科植物、がんこうらん科植物、どくうつぎ科植物、うるし科植物、もちのき科植物、にしきぎ科植物、みつばうつぎ科植物、くろたきかずら科植物、かえで科植物、とちのき科植物、むくろじ科植物、あわぶき科植物、つりふねそう科植物、くろうめもどき科植物、ぶどう科植物、ほるとのき科植物、しなのき科植物、あおい科植物、あおぎり科植物、さるなし科植物、つばき科植物、おとぎりそう科植物、みぞはこべ科植物、ぎょりゅう科植物、すみれ科植物、いいぎり科植物、きぶし科植物、とけいそう科植物、しゅうかいどう科植物、さぼてん科植物、じんちょうげ科植物、ぐみ科植物、みそはぎ科植物、ざくろ科植物、ひるぎ科植物、うりのき科植物、のぼたん科植物、ひし科植物、あかばな科植物、ありのとうぐさ科植物、すぎなも科植物、うこぎ科植物、せり科植物、みずき科植物、いわうめ科植物、りょうぶ科植物、いちやくそう科植物、つつじ科植物、やぶこうじ科植物、さくらそう科植物、いそまつ科植物、かきのき科植物、はいのき科植物、えごのき科植物、もくせい科植物、ふじうつぎ科植物、りんどう科植物、きょうちくとう科植物、ががいも科植物、はなしのぶ科植物、むらさき科植物、くまつづら科植物、しそ科植物、なす科植物（トマト等）、ごまのはぐさ科植物、のうぜんかずら科植物、ごま科植物、はまうつぼ科植物、いわたばこ科植物、たぬきも科植物、きつねのまご科植物、はまじんちょう科植物、はえどくそう科植物、おおばこ科植物、あかね科植物、すいかずら科植物、れんぷくそう科植物、おみなえし科植物、まつむしそう科植物、うり科植物、ききょう科植物、きく科植物等からなる群より選択さ

れるものであることが好ましく、アブラナ科植物、ナス科植物、マメ科植物、イネ科植物、フトモモ科植物、ヤナギ科植物、ミカン科植物、ウリ科植物、アオギリ科植物、アオイ科商物、トウダイグサ科植物、バラ科植物、スイレン科植物、シソ科植物、リンドウ科植物、ブドウ科植物からなる群より選択される植物であることがより好ましい。なお、本発明の対象となる植物は、上記例示した植物の野生型のみならず、変異体や形質転換体であってもよい。

[0085] 本発明が単子葉植物から双子葉植物までの広範な種々の植物に対して適用可能であることは、双子葉植物であるシロイヌナズナに由来するＡｔＭＹＢ３０遺伝子を、単子葉植物であるイネにＡｔＭＹＢ３０遺伝子を導入することによって、高密度植栽条件下での単位面積あたりのバイオマス生産性が向上した形質転換体イネを作出し得ることからも明らかである。

[0086] また、本実施形態に係る生産方法において、花芽形成期よりも前にバイオマスを回収することが好ましい場合は、誘導性プロモーターが使用されなくてもよい。この場合、形質転換される植物体は上述した植物であればよい。

[0087] 〔３：植物バイオマス生産用ツールおよびその利用〕

本発明はまた、植物の高密度植栽条件下での単位面積あたりのバイオマス生産性を向上させるためのキットを提供する。本発明に係るキットは、植物の高密度植栽条件下での単位面積あたりの生産性を向上させるために、ＭＹＢ３０関連遺伝子を含む外因性遺伝子を備えていることを特徴としている。

[0088] 上記外因性遺伝子において、上記ＭＹＢ３０関連遺伝子は、タンパク質発現の時期を制御するプロモーターと作動可能に連結されていてもよく、ＡｔＭＹＢ３０、ＢＡＫ１およびＰＬＡ２αからなる群より選択されるタンパク質をコードする遺伝子であることが好ましい。

[0089] 本発明に係るキットは、高密度植栽条件下での単位面積あたりのバイオマス生産性が向上した形質転換体植物を製造するために用いられ得る。すなわち、本発明は、上記キットを用いて植物体を形質転換する工程を包含する形質転換体植物の作製方法を提供する。この場合、本発明に係るキットは、Ｍ

ＹＢ３０シグナル伝達経路の活性化に起因する病害抵抗性の有無を調べるための試薬をさらに備えていてもよい。そして、本発明に係る作製方法は、ＭＹＢ３０シグナル伝達経路の活性化に起因する病害抵抗性が向上している個体を選抜する工程をさらに包含してもよい。これにより、得られた形質転換体植物においてＭＹＢ３０シグナル伝達経路が活性化しているか否かを容易に知ることができ、その結果、得られた形質転換体植物が、高密度植栽条件下での単位面積あたりのバイオマス生産性を向上させるという所望の形質を有しているか否かを容易に知ることができる。なお、ＭＹＢ３０シグナル伝達経路の活性化に起因する病害抵抗性の有無を調べるための試薬としては、過敏感細胞死に伴い葉内に放出される過酸化水素を検出する２，７－Ｄｉｃｈｌｏｒｏｄｉｈｙｄｒｏｆｌｕｏｒｅｓｃｅｉｎ ｄｉａｃｅｔａｔｅ（ＤＣＦＨ－ＤＡ）、Ｈｙｄｒｏｘｙｐｈｅｎｙｌ Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｉｎ、ＢＥＳ－H_2O_2－Ａｃ等の過酸化水素特異的蛍光プローブが挙げられるがこれらに限定されない。また、ＭＹＢ３０シグナル伝達経路の活性化に起因する病害抵抗性の有無を調べる際に、病原体として病原性細菌を用いることが好ましく、病原性細菌としてはキサントモナス・カンペストリス（Xanthomonas campestris）、シュードモナス・シリンゲ（Pseudomonas syringe）等が挙げられるがこれらに限定されない。このような病原性細菌もまた、ＭＹＢ３０シグナル伝達経路の活性化に起因する病害抵抗性の有無を調べるための試薬であり得る。

[0090] 本発明に係るキットは、これらの物質以外の他の成分を備えていてもよい。ＭＹＢ３０関連遺伝子を含む外因性遺伝子、及び上記他の成分は、適切な容量及び／又は形態で含有した一つの容器（例えば、ボトル、プレート、チューブ、ディッシュなど）に入れられて提供されてもよいし、それぞれ別の容器に入れられて提供されてもよい。また、本発明に係るキットは、植物を生育させるための器具、培地等をさらに備えていてもよい。さらに、植物の高密度植栽条件下での単位面積あたりの生産性を向上させるという用途を実現するために、本発明に係るキットは、植物の高密度植栽条件下での単位面

積あたりの生産性を向上させるための使用手順を記載した指示書、あるいは植物の高密度植栽条件下での単位面積あたりの生産性が向上した植物を製造するための使用手順を記載した指示書を備えていることが好ましい。「指示書」は、紙またはその他の媒体に書かれていても印刷されていてもよく、あるいは磁気テープ、コンピューター読み取り可能ディスクまたはテープ、ＣＤ－ＲＯＭなどのような電子媒体に付されてもよい。本発明に係るキットは、上述した組成物を構成するために用いられてもよく、上述した組成物に含まれる物質を別々に備えていても、上述した組成物とさらなる成分とを別々に備えていてもよい。

[0091] 〔４：高密度植栽に好適な植物体のマーカー〕

上述したように、植物体におけるＭＹＢ３０関連遺伝子の発現量または活性の向上は、当該植物体が、高密度植栽条件下での単位面積あたりの生産性が向上した植物体であることを知る指標となる。すなわち、ＭＹＢ３０関連遺伝子は、高密度植栽条件下での単位面積あたりの生産性が向上した植物体のスクリーニングに利用可能なマーカーである。

[0092] すなわち、本発明は、ＭＹＢ３０関連遺伝子をマーカーとして用いて、高密度植栽条件下での単位面積あたりの生産性が向上した植物体をスクリーニングする方法を提供する。

[0093] 一実施形態において、本発明に係るスクリーニング方法は、高密度植栽条件下での単位面積あたりの生産性が向上した植物体をスクリーニングするために、ＭＹＢ３０関連遺伝子の発現量またはＭＹＢ３０関連遺伝子にコードされるタンパク質の発現量を、基準値と比較する工程；および上記発現量が基準値よりも高い個体を選択する工程を包含することを特徴としている。別の実施形態において、本発明に係るスクリーニング方法は、高密度植栽条件下での単位面積あたりの生産性が向上した植物体をスクリーニングするために、ＭＹＢ３０関連遺伝子にコードされるタンパク質の活性を、基準値と比較する工程；および上記活性が基準値よりも高い個体を選択する工程を包含することを特徴としている。

[0094] 上記基準値は、上記発現量または上記活性を予め取得したものであっても、スクリーニングに用いられた集団における平均値であってもよい。

[0095] 上述したように、植物体におけるＭＹＢ３０関連遺伝子の発現量または活性の向上は、ＭＹＢ３０シグナル伝達経路の活性化に起因する病害抵抗性の向上と相関すると考えられる。よって、ＭＹＢ３０シグナル伝達経路の活性化に起因する病害抵抗性が向上している個体を選抜することによって、本発明に係る植物体であるか否かを知ることができる。すなわち、本発明に係る植物体の製造方法は、ＭＹＢ３０シグナル伝達経路の活性化に起因する病害抵抗性が向上しているか否かを確認する工程をさらに包含してもよい。

[0096] 本発明に係る植物体は、ＭＹＢ３０シグナル伝達経路が活性化しているので、ＭＹＢ３０シグナル伝達経路の活性化に起因する病害抵抗性が向上している。よって、ＭＹＢ３０シグナル伝達経路の活性化に起因する病害抵抗性が向上しているか否かを確認することによって、高密度植栽条件下での単位面積あたりの生産性が向上した植物体をスクリーニングすることができる。すなわち、本発明に係るスクリーニング方法は、ＭＹＢ３０シグナル伝達経路の活性化に起因する病害抵抗性が向上している個体を選抜する工程をさらに包含してもよい。

[0097] 〔５：さらなる利用〕

後述する実施例にて示すように、（ａ）Ｔ－ＤＮＡ挿入変異体植物の種子ライブラリーを栽培して第一世代の種子を得る；（ｂ）第一世代の種子を栽培して第二世代の種子を得る；（ｃ）第二世代の種子を栽培して第三世代の種子を得る；（ｄ）種子からのゲノムＤＮＡにおけるＴ－ＤＮＡ挿入部位を同定する；（ｅ）上記Ｔ－ＤＮＡ挿入部位から１０ｋｂ以下の範囲内にオープンリーディングフレームを有する目的遺伝子を同定する、ことによって、植物の高密度植栽条件下での単位面積あたりの生産性を向上させる遺伝子をスクリーニングすることができ、この場合、上記ａ～ｃの少なくとも１つが、高密度植栽条件下にて栽培されかつ栽培時の生育状態が良好な個体からその種子を得ればよい。

[0098] このような手順に従ってスクリーニングされた遺伝子を含む外因性遺伝子を用いて、植物体を形質転換することによって、本発明に係る形質転換体植物を作製することができ、その際に、ＭＹＢ３０シグナル伝達経路の活性化に起因する病害抵抗性が向上している個体を選抜することがさらに行われてもよい。

[0099] このように、本発明は、植物の高密度植栽条件下での単位面積あたりの生産性を向上させる遺伝子をスクリーニングする方法であって、上記ａ～ｅの工程を包含し、かつ上記ａ～ｃの少なくとも１つが、高密度植栽条件下にて栽培されかつ栽培時の生育状態が良好な個体からその種子を得ることによって行われる方法を提供する。

[0100] 本発明に係る遺伝子スクリーニング方法は、（ｆ）ＭＹＢ３０シグナル伝達経路の活性化に起因する病害抵抗性が向上している個体を選抜すること、がさらに行われてもよい。

[0101] なお、発明を実施するための最良の形態として示した具体的な実施態様および以下の実施例は、あくまでも、本発明の技術内容を明らかにするものであって、そのような具体例にのみ限定して狭義に解釈されるべきものではなく、当業者は、本発明の精神および添付の特許請求の範囲内で変更して実施することができる。

[0102] また、本明細書中に記載された学術文献および特許文献の全てが、本明細書中において参考として援用される。

実施例

[0103] 以下、本発明について実施例を用いてさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

[0104] 〔実施例１〕

〔１〕ＭＹＢ３０遺伝子の取得

ＡｔＭＹＢ３０をコードする遺伝子（ＡｔＭＹＢ３０遺伝子：Ａｔ３ｇ２８９１０）のＯＲＦ領域を含む断片を増幅するために、ＴＡＩＲ（http://www.arabidopsis.org/home.html）で公開されている配列情報に基

づいてＰＣＲ用プライマー（ATMYB30_F (HindIII)およびATMYB30_R (XbaI)）を設計しかつ合成した。なお、これらプライマーの末端には、発現ベクターへ導入するときに必要となる制限酵素サイト（HindIIIまたはXbaI）を付加した。

[0105] [化3]

ATMYB30_F (HindIII)：
5'- AAG CTT ATG GTG AGG CCT CCT TGT TGT G -3'（配列番号１）
ATMYB30_R (XbaI)：
5'- TCT AGA CCG GAT ATG AGC GAG CAT TTT TTG GTC -3'（配列番号２）

[0106] 野生型シロイヌナズナ、Ｃｏｌ－０エコタイプを栽培し、採取した幼葉を液体窒素凍結下で粉砕した。ＱＩＡＧＥＮ社製ＤＮＡ調製キット（DNeasy Plant Mini Kit）を用いて、キット添付の標準プロトコルに従ってＤＮＡを調製した。調製したＤＮＡをテンプレートとし、酵素KOD-Plus（TOYOBO社製）、プライマーATMYB30_F (HindIII)およびATMYB30_R (XbaI)を用いてＰＣＲ反応を行った。反応の液組成および反応条件をそれぞれ表１および表２に示す。

[0107] [表1]

鋳型(ゲノムDNA)	60 ng
10×PCR Buffer for KOD -Plus- (TOYOBO社製)	5 μL
2 mM dNTPs (TOYOBO社製)	5 μL
25 mM $MgSO_4$	2 μL
各プライマー	20 pmol
KOD -Plus-	1.0 unit
総容量	50 μL

[0108] [表2]

＃１：94℃（2 分）
＃２：94℃（15 秒）／63℃（30 秒）／68℃（1 分）を25サイクル

[0109] ＰＣＲ増幅産物を、２％アガロースゲル（ＴＡＥバッファー）で電気泳動し、エチジウムブロマイドによって断片を染色した。目的断片を含むゲルを切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit （QIAGEN社製）を用いて目的のＤＮＡ断片を溶出しかつ精製した。得られたＤＮＡ断片に、A-Addition Kit（

QIAGEN社製）を用いてアデニンを付加した。アデニンを付加した増幅ＤＮＡをＴＡクローニングベクターにライゲーションし、ライゲーション反応後のベクターを用いてコンピテントセル（ＤＨ５α，ニッポン・ジーン）の形質転換を、キット添付のプロトコルに従って行った。上記手順には、pGEM-T Easy Vector System（Promega社製）を用いた。形質転換反応液を塗布したＬＢ培地プレート（５０μｇ／ｍＬのアンピシリンを含む。）にて出現したコロニーをＬＢ培地中で液体培養し、得られた菌体からPlasmid Mini Kit（QIAGEN社製）を用いてプラスミドＤＮＡを調製した。塩基配列決定および配列解析を行って、ＡｔＭＹＢ３０遺伝子のＯＲＦを含むベクターをクローニングした。

[0110] 〔２〕植物発現用ベクターの作製

カリフラワーモザイクウイルス由来の３５Ｓプロモーターを含む植物発現用ベクターｐＭＡＴ１３７に、ＡｔＭＹＢ３０遺伝子のＯＲＦを含む断片を挿入したコンストラクトを作製した。

[0111] まず、クローニングしたＡｔＭＹＢ３０遺伝子含有ベクターを、制限酵素HindIIIおよびSacIで消化した。次いで、ｐＭＡＴ１３７を制限酵素HindIIIおよびSacIで消化した。これらの制限酵素消化産物を０．８％アガロースゲルにて電気泳動し、QIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN社製）を用いて、約１．４　ｋｂｐのＡｔＭＹＢ３０遺伝子のＯＲＦを含む断片およびｐＭＡＴ１３７をそれぞれゲルから精製した。

[0112] ｐＭＡＴ１３７の断片と、ベクターとしてＡｔＭＹＢ３０遺伝子のＯＲＦを含む断片とを、ベクター：インサート比が１：１０になるように混合し、等量のTaKaRa Ligation kit ver.2（タカラバイオ社製）を用いたライゲーション反応を１６℃で一晩行った。ライゲーション反応後のベクターを用いてコンピテントセル（ＤＨ５α，ニッポン・ジーン）の形質転換を、キット添付のプロトコルに従って行った。形質転換反応液を塗布したＬＢ寒天培地（１２．５μｇ／ｍＬのカナマイシンを含む。）を一晩培養し、出現したコロニーをＬＢ培地で液体培養し、得られた菌体からPlasmid Mini Kit（QIAGEN

社製）を用いてプラスミドＤＮＡを調製した。塩基配列決定および配列解析を行って、ＡｔＭＹＢ３０遺伝子のＯＲＦを含む断片を有する植物発現用ベクターを得た。

[0113] 〔３〕アグロバクテリウム法を用いたシロイヌナズナへの遺伝子導入

作製した植物発現用ベクターをエレクトロポレーション法（Plant Molecular Biology Mannal, Second Edition , B. G. Stanton and A. S. Robbert, Kluwer Acdemic Publishers (1994)）によって、アグロバクテリウム・ツメファシエンス（Agrobacterium tumefaciens）ＬＢＡ４４０４株へ導入した。次いで、植物発現用ベクターが導入されたアグロバクテリウム・ツメファシエンスを、Cloughらに記載された浸潤法（Steven J. Clough and Andrew F. Bent (1998) The Plant Journal 16: 735-743）に従って、野生型シロイヌナズナエコタイプＣｏｌ－０へ導入した。

[0114] カナマイシン含有培地を用いて複数の形質転換体植物を選抜した。形質転換体植物を栽培し自家受粉を繰り返し、３種類のＴ３種子またはＴ４種子を得、それぞれを１８－１、１５－１、３－１と名付けた。

[0115] 〔４〕形質転換体植物の遺伝子発現量の確認

バーミキュライト混合土を入れた２６ｃｍ×１９．５ｃｍトレイを８区画に分割し、得られたＴ３種子を１区画につき１ラインずつ、１００粒ずつをシードスプーンで計りとって播種した。２２℃、１００μｍｏｌ／ｍ^2／ｓｅｃ、１６時間明期／８時間暗期の条件で４週間栽培した。栽培した植物個体の中からロゼット葉を約１０枚回収し、それぞれの形質転換体植物および野生型植物（Ｃｏｌ－０）におけるＡｔＭＹＢ３０遺伝子の発現量を、リアルタイムＰＣＲ法を用いて測定した。細胞内で構成的に発現していると考えられている１８Ｓ　ｒＲＮＡ遺伝子の発現量を内部標準として用いた。

[0116] RNeasy Plant Mini Kit（QIAGEN社製）を用いて、回収したロゼット葉から全ＲＮＡを調製した。PrimeScript（登録商標） RT reagent Kit (Perfect Real Time)（タカラバイオ社製）を用いて、１μｇの全ＲＮＡからｃＤＮＡを作製した。反応の液組成および反応条件をそれぞれ表３および表４に示す。

[0117] [表3]

total RNA	1 μg
5×PrimeScript Buffer	4 μL
Oligo dT Primer	50 pmol
Randam 6mers	100 pmol
PrimeScript RT enzyme Mix I	1 μL
総容量	20 μL

[0118] [表4]

ステップ1 37 ℃ (15 分)
ステップ2 85 ℃ (5 秒)
ステップ3 4 ℃

[0119] リアルタイムＰＣＲは、Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems社製) と7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems社製) とを用い、次の反応サイクルに従って実行した。なお、鋳型として用いるｃＤＮＡを、ＡｔＭＹＢ３０の検出の際には５倍希釈で、１８Ｓ ｒＲＮＡの検出の際には５００倍希釈で用いた。また、コントロールとして、野生型シロイヌナズナＣｏｌ－０のゲノムを用いて、０．０００１～１０ｎｇの濃度範囲で１０倍ずつの希釈列を作製した。反応の液組成および反応条件をそれぞれ表５および表６に示す。

[0120] [表5]

Template	1 μL
Forward Primer	10 pmol
Reverse Primer	10 pmol
2×Power SYBR Green PCR Master Mix	12 μL
総容量	24 μL

[0121] [表6]

ステップ1 : 50 ℃ (2 分)
ステップ2 : 95 ℃ (10 分)
ステップ3 : 95 ℃ (15 秒) ／60 ℃ (1 分) を 40 サイクル
ステップ4 : 95 ℃ (15 秒) ／60 ℃ (1 分) →95 ℃ (15 秒) ／60 ℃ (15 秒)

[0122] ＡｔＭＹＢ３０遺伝子および１８ｓ ｒＲＮＡ遺伝子の増幅に用いたプライマーの配列は次のとおりである。

[0123] [化4]

myb30
At3g28910F:
5'-GTG AAA AAC TCG CCG AAG AC -3'（配列番号３）
At3g28910R:
5'-GCA CAC TCC TTC CCA TCA TC -3'（配列番号４）

18S rRNA
At18S F：
5'- TCC TAG TAA GCG CGA GTC ATC -3'（配列番号５）
At18S R：
5'- CGA ACA CTT CAC CGG ATC AT -3'（配列番号６）

[0124] 測定結果からＡｔＭＹＢ３０遺伝子の発現量を算出し、野生型（ｃｏｌ－０）と形質転換体植物（３－１，１５－１，１８－１）における発現量の比較を行った。

[0125] 〔５〕形質転換体植物の表現型の確認

作製したＴ４種子を、バーミキュライト混合土を入れた３８．４４　ｃｍ^{2}のポット４つに、それぞれ１個体、３個体、８個体、１６個体となるように播種し、２２℃、１００μｍｏｌ／ｍ^2／ｓｅｃ、１６時間明期／８時間暗期の条件で４週間栽培した。各ポットはトレイに入れて管理し、ひとつのトレイ当たり３５個（７行×５列）を配置し、計測には群落中央周辺の１５個のポットを使用した。形質転換体植物の他に、対照の非組換体植物として野生型シロイヌナズナ（Ｃｏｌ－０）を使用した。４週間栽培した後に、植物体地上部の生重量（バイオマス量）を電子天秤で秤量した。

[0126] 〔６〕形質転換体植物における遺伝子発現量の確認

図１は、播種４週間後の植物における野生型（Ｃｏｌ－０）におけるＡｔＭＹＢ３０遺伝子の発現量を１としたときの形質転換体植物（１８－１，１５－１，３－１）におけるＡｔＭＹＢ３０遺伝子の発現量を示している。形質転換体植物では、ＡｔＭＹＢ３０遺伝子が野生型植物よりも多く発現していることが認められた。また、その発現量はＣｏｌ－０＜１８－１＜１５－１＜３－１の順であった。

[0127] 〔７〕形質転換体植物の表現型

図２に野生型（Ｃｏｌ－０）およびＡｔＭＹＢ３０遺伝子のＯＲＦを含む断片を導入した形質転換体植物（３－１）の地上部の生重量と植栽密度との関係を両対数グラフに示した。点線および実線はそれぞれ野生株（Ｃｏｌ－０）と形質転換体植物（３－１）との近似線を示している。

[0128] 植物の個体重量は、植栽密度の上昇に伴って減少する。植栽密度と植物個体との関係は－３／２乗則と呼ばれる法則に従っていることが知られており、この法則によると、グラフの傾きは一定であることが知られている。しかしながら、形質転換体植物（３－１）において、近似線の傾きが緩やかになっていることがわかった。低密度植栽または至適密度植栽における個体重量は、野生型植物の方が大きかったが、高密度植栽条件下での個体重量は、形質転換体植物の方が大きかった。この結果は、形質転換体植物において、植栽密度の上昇に伴う個体重量の減少が軽減されていることを示している。

[0129] 植栽密度をＸ、生重量をＹとして、このグラフを$Y = bX^{a}$と示したとき、近似曲線の数式は次のような結果となった。

[0130] [化5]

野生型（Col-0）	：	$Y = 777.45X^{-0.742}$	（$R^2 = 0.9976$）
形質転換体植物（18-1）	：	$Y = 770.30X^{-0.722}$	（$R^2 = 0.9973$）
形質転換体植物（15-1）	：	$Y = 706.53X^{-0.678}$	（$R^2 = 0.9948$）
形質転換体植物（3-1）	：	$Y = 663.49X^{-0.657}$	（$R^2 = 0.999$）

[0131] 図３は、野生株および形質転換体植物におけるグラフの傾きを示す累乗数ａを比較したものであり、野生型（Ｃｏｌ－０）＞１８－１＞１５－１＞３－１の順に傾きが小さくなることがわかった。

[0132] 図４は、リアルタイムＰＣＲで測定したＡｔＭＹＢ３０遺伝子の発現量と傾きａとの相関を示している。この結果から、ＡｔＭＹＢ３０遺伝子の発現量が多くなるほどグラフの傾きが緩やかになる傾向があり、ＡｔＭＹＢ３０形質転換体が高密度植栽に有利な個体であることがわかった。

[0133] また、図５は、野生型（Ｃｏｌ－０）および形質転換体植物（（ａ）１８－１、（ｂ）１５－１、（ｃ）３－１）におけるポット当たりのバイオマス

収穫量（地上部生重量）と植栽密度との関係を比較した結果を示している。プロットはそれぞれの測定平均値を示し、点線および実線は近似線を示している。高密度植栽条件下でのポットあたりバイオマス量は、全ての形質転換体植物において野生型植物よりも増加していた。このことは、ＡｔＭＹＢ３０遺伝子を植物に過剰発現させることによって単位面積あたりの生産性を向上させることが可能であることを示している。

[0134] 〔８〕高密度植栽の際の単位面積あたりの植物バイオマス量を向上させる遺伝子

シロイヌナズナ変異体（Activation-tag T-DNA lines: Weigel T-DNA lines、計２００７２系統）の種子を、Nottingham Arabidopsis Stock Centre（NASC）から購入した。使用した種子についてはWeigel, D. et al. (2000) Plant Physiol. 122: 1003-1013を参照のこと。

[0135] Weigel T-DNA linesを用いて高密度植栽に適した株の選抜を行った。まず、バーミキュライト混合土を入れた２６ｃｍ×１９．５ｃｍトレイに、種子を２０粒ずつ（計約２０００粒）を播種した。栽培にはCO_2チャンバー（LOW TEMPERATURE O_2/CO_2 INCUBATOR MODEL-9200: WAKENYAKU）を用い、CO_2濃度１％（１０，０００　ｐｐｍ）、２２℃、２００μｍｏｌ／ｍ^2／ｓｅｃの照明下（１６時間明期／８時間暗期のサイクル）にて４週間培養し、生育の良い個体を選抜した（一次選抜）。得られた個体を栽培し、それぞれの種子を得た。

[0136] さらに二次選抜を行った。バーミキュライト混合土を入れた２６ｃｍ×１９．５ｃｍトレイを８区画に分割し、一次選抜で得られた植物の種子を、１区画につき１ラインずつ、１００粒ずつをシードスプーンで計りとって播種した。CO_2チャンバー（LOW TEMPERATURE O_2/CO_2 INCUBATOR MODEL-9200: WAKENYAKU）を用い、CO_2濃度１％（１０，０００

ｐｐｍ）、２２℃、２００μｍｏｌ／ｍ^2／ｓｅｃの照明下（１６時間明期／８時間暗期のサイクル）にて４週間培養し、生育の良い個体を選抜した。得られた個体を栽培し、それぞれの種子を得た。

[0137] 取得した種子を栽培した個体から幼葉を採取し、液体窒素凍結下で粉砕した。ＱＩＡＧＥＮ社製ＤＮＡ調製キット（DNeasy Plant Mini Kit）を用いて、キット添付の標準プロ
トコルに従ってゲノムＤＮＡを調製した。

[0138] 得られたゲノムＤＮＡにおけるＴ－ＤＮＡ挿入部位を、ＴＡＩＬ－ＰＣＲ法によって決定した。まず、Weigel T-DNA linesで用いられているアクティベーションタギング用ベクター（pSKI015 : GenBank accession No.AF187951）のＴ－ＤＮＡ配列（T-DNA left border）付近に対応させて３種類の特異的プライマーＴＬ１、ＴＬ２およびＴＬ３を設計した。

[0139] これらを任意プライマーＰ１とともに用いて、以下のＰＣＲ反応の液組成および反応条件を用いてＴＡＩＬ－ＰＣＲ（島本功、佐々木卓治監修, 新版, 植物のＰＣＲ実験プロトコル, １９９７, 第８３～８９頁, 秀潤社, 東京 ; Liu, Y.G. et al. (1995) The Plant Journal 8: 457-463）を行い、Ｔ－ＤＮＡに隣接するゲノムＤＮＡを増幅した。

[0140] プライマーＴＬ１、ＴＬ２、ＴＬ３およびＰ１の具体的な配列は以下の通りである。

[0141] [化6]

TL1:
5'- TGC TTT CGC CAT TAA ATA GCG ACG G -3'（配列番号７）
TL2:
5'- CGC TGC GGA CAT CTA CAT TTT TG -3'（配列番号８）
TL3:
5'- TCC CGG ACA TGA AGC CAT TTA C -3'（配列番号９）
P1:
5'- NGT CGA SWG ANA WGA A -3'（配列番号１０）

[0142] なお、Ｐ１の配列において、ｎは、ａ、ｇ、ｃまたはｔを表し（存在位置：１および１１）、ｓは、ｇまたはｃを表し（存在位置：７）、ｗは、ａまたはｔを表す（存在位置：８および１３）。

[0143] １回目のＰＣＲ反応の液組成および反応条件をそれぞれ表７および表８に示す。

[0144] [表7]

鋳型(ゲノムDNA)	10 ng
10×PCRバッファー(タカラバイオ社製)	2 μL
2.5 mM dNTPs (タカラバイオ社製)	1.6 μL
１個目の特異的プライマー (TL1)	0.5 pmol
任意プライマー１(P1)	100 pmol
TaKaRa Ex Taq (タカラバイオ社製)	1.0 unit
総容量	20 μL

[0145] [表8]

＃１：94 ℃ (30 秒) ／95 ℃ (30 秒)
＃２：94 ℃ (30 秒) ／65 ℃ (30 秒) ／72℃ (1 分)　5 サイクル
＃３：94 ℃ (30 秒) ／25 ℃ (１分) →３分間で 72℃へ／72℃ (３分) へ
＃４：94 ℃ (15 秒) ／65 ℃ (30 秒) ／72 ℃ (1 分)
　　94 ℃ (15 秒) ／68 ℃ (30 秒) ／72 ℃ (1 分)
　　94 ℃ (15 秒) ／44 ℃ (30 秒) ／72 ℃ (1 分)　15 サイクル
＃５：72 ℃ (３ 分)

[0146] ２回目のＰＣＲ反応の液組成および反応条件をそれぞれ表９および表１０に示す。

[0147] [表9]

鋳型(1 回目 PCR 産物 50 倍希釈)	1 μL
10×PCRバッファー(タカラバイオ社製)	2 μL
2.5 mM dNTPs (タカラバイオ社製)	1.5 μL
２個目の特異的プライマー (TL2)	5 pmol
任意プライマー１(P1)	100 pmol
TaKaRa Ex Taq (タカラバイオ社製)	0.8 unit
総容量	20 μL

[0148] [表10]

＃６：94 ℃ (15 秒) ／64 ℃ (30 秒) ／72 ℃ (1 分)
　：94 ℃ (15 秒) ／64 ℃ (30 秒) ／72 ℃ (1 分)
　：94 ℃ (15 秒) ／44 ℃ (30 秒) ／72 ℃ (1 分) を 12 サイクル
＃５：72 ℃ (５ 分)

[0149] ３回目のＰＣＲ反応の液組成および反応条件をそれぞれ表１１および表１２に示す。

[0150]

[表11]

鋳型（２回目 PCR 産物 50 倍希釈）	1 μL
10×PCR バッファー（タカラバイオ社製）	5 μL
2.5 mM dNTPs（タカラバイオ社製）	0.5 μL
３個目の特異的プライマー（TL3）	10 pmol
任意プライマー１(P1)	100 pmol
TaKaRa Ex Taq（タカラバイオ社製）	1.5 unit
総容量	50 μL

[0151] [表12]

＃７：94 ℃（30 秒）／44 ℃（30 秒）／72 ℃（1 分）を 20 サイクル
＃５：72 ℃（5 分）

[0152] 次いで、２回目のＰＣＲ反応および３回目のＰＣＲ反応における反応液をアガロースゲルで電気泳動した後、増幅の有無と反応の特異性を確認した。また、特異的プライマーＴＬ３、およびBigDye Terminator Cycle Sequencing Kit Ver.3.1（アプライドバイオシステム社製）を用いて、ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer（アプライドバイオシステム社製）によって３回目のＰＣＲ反応における増幅産物の塩基配列決定を行った。その結果、選抜したうち３つの植物体から配列情報が３つ得られた（配列番号１２、１４、２２）。

[0153] 得られた配列情報をThe Arabidopsis Information Resource（ＴＡＩＲ：http://www.arabidopsis.org/）のＢＬＡＳＴにおいて検索したところ、３つの配列情報の全てにおいて、Ｔ－ＤＮＡ挿入部位近傍１０ｋｂ以内にシロイヌナズナ３番染色体のＡｔ３ｇ２８９１０のオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）遺伝子が存在することがわかった。

[0154] さらに、スクリーニングで得られた、異なるいくつかの植物体ラインについても同様の解析を行ったところ、それらのＴ－ＤＮＡ挿入部位の近傍１０ｋｂ以内にＢＡＫ１遺伝子（Ａｔ４ｇ３３４３０）およびＰＬＡ$_2$α遺伝子（Ａｔ２ｇ０６９２５）が存在することがわかった。

[0155] 〔９〕結果

高密度植栽に有利であるＡｔＭＹＢ３０形質転換体において、ＡｔＭＹＢ３０遺伝子の発現が高いほど単位面積あたりの生産性が向上することがわか

った。このことは、ＡｔＭＹＢ３０の発現量を調べることによって、高密度植栽に有利である植物体、および単位面積あたりの生産性が向上した植物体をスクリーニングすることが可能であることを示している。つまり、ＡｔＭＹＢ３０が、高密度植栽に対する適正や、単位面積あたりの生産性についてのマーカーとして利用可能である。

[0156] また、シロイヌナズナのアクチベーションタグライン（Activation-tag T-DNA lines）を用いたスクリーニング結果から、ＡｔＭＹＢ３０が活性化されている植物体が高密度植栽に有利であることが確認され、これにより、ＡｔＭＹＢ３０によって制御されているシグナル伝達経路において、ＡｔＭＹＢ３０の機能または発現量をポジティブに制御し得る分子であるＢＡＫ１、およびＡｔＭＹＢ３０よりも下流に存在する分子（ＭＹＢ３０関連遺伝子）であるＰＬＡ$_2\alpha$が、高密度植栽についてＡｔＭＹＢ３０と同様の機能を示すことが示唆された。

[0157] 〔実施例２〕

ＡｔＭＹＢ３０遺伝子のオルソログの効果を確認するために、ＮＣＢＩのｐｒｏｔｅｉｎ　Ｂｌａｓｔ検索によりＡｔＭＹＢ３０のアミノ酸配列と相同性の高い配列をもつ転写因子を多数見出した。これらの中からＡｔＭＹＢ３０遺伝子の相同転写因子として、マメ科植物の重要作物であるダイズ由来のＧｍＭＹＢ７４遺伝子を選択し、その効果の確認を行うこととした。なお、ＧｍＭＹＢ７４とＡｔＭＹＢ３０のアミノ酸配列相同性(sequence identity)は５３％である。

[0158] ＡｔＭＹＢ３０遺伝子およびＧｍＭＹＢ７４遺伝子は、共にＭＹＢドメイン（Ｒ２Ｒ３型）を含む転写因子である。ＡｔＭＹＢ３０のＭＹＢドメインのアミノ酸配列（配列番号１２３）とＧｍＭＹＢ７４のＭＹＢドメインのアミノ酸配列（配列番号１２４）との相同性（sequence identity）は９２．３％であり、両者の相同性は極めて高い。

[0159] GenScript社の人工遺伝子合成受託サービスを使用して、ＧｍＭＹＢ７４をコードする遺伝子（ＧｍＭＹＢ７４遺伝子；配列番号６８）の全長を含む配

列を人工的に合成した（配列番号１１９）。実施例１にて用いたｐＭＡＴベクターを用いるとベクターサイズが大きくなり、導入遺伝子の配列の解析に不向きであったため、本実施例では、カリフラワーモザイクウイルス由来の３５Ｓプロモーターを含む植物発現用ベクターｐＧｒｅｅｎ ＩＩベクター（John Innes Center社、英国）に、上記遺伝子の合成の際に付加していたＮｏｔ Ｉサイト（開始コドン側）およびＨｐａ Ｉサイト（終始コドン側）を平滑末端化して得たフラグメント（配列番号１２０）を挿入した。ｐＧｒｅｅｎ ＩＩベクターは、アブラナ属やコムギ、オオムギなどの植物の形質転換に好適に使用し得ることが知られている汎用のベクターである。平滑末端化にはT4 DNA Polymerase（タカラバイオ）を用い、目的のライゲーション反応にはRapid DNA Dophos & Ligation kit (Roche)を用いた。ライゲーション反応後のベクターで形質転換したコンピテントセル（ＤＨ５α，ニッポン・ジーン）をＬＢ寒天培地（１２．５μｇ／ｍＬのカナマイシンを含む。）中で増殖させた後に、得られた菌体からQIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN社製)を用いてプラスミドＤＮＡを調製し、ＧｍＭＹＢ７４遺伝子のＯＲＦ（配列番号６８）を含む植物発現用ベクターを得た。また、得られたベクターにおける挿入遺伝子の配列を確認した。

[0160] ＧｍＭＹＢ７４遺伝子を有する植物発現用ベクターをヘルパープラスミドとしてのｐＳｏｕｐとともに、アグロバクテリウム（ＧＶ３１０１株）へ実施例１と同様の方法を用いて導入し、これを実施例１と同様に野生型シロイヌナズナエコタイプＣｏｌ－０へ導入した。

[0161] ハイグロマイシンによる選抜と自家受粉を繰り返し、ＧｍＭＹＢ７４遺伝子を高発現する株（＃３－２株）のＴ３種子を得た。また、当該Ｔ３種子において、ＧｍＭＹＢ７４遺伝子がホモで挿入されていることを確認した。

[0162] ＃３－２株の種子を、バーミキュライト混合土を入れた３８．４４ ｃｍ^{2}のポット４つに、それぞれ１個体、３個体、８個体、１６個体となるように播種し、２２℃、１００μｍｏｌ／ｍ^2／ｓｅｃ、１６時間明期／８時間暗期の条件で４週間栽培した。各ポットはトレイに入れて管理し、ひとつのトレ

イ当たり２５個（５行×５列）を配置し、計測には群落中央周辺の６～９個のポットを使用した。形質転換体植物の他に、対照の非組換体植物として野生型シロイヌナズナ（Ｃｏｌ－０）を使用した。４週間栽培した後に、植物体地上部の生重量（バイオマス量）を電子天秤で秤量した。

[0163] 図６に、野生型（Ｃｏｌ－０）およびＧｍＭＹＢ７４遺伝子を導入した形質転換体植物（＃３－２株）の地上部の乾燥重量と植栽密度との関係を両対数グラフに示した。点線および実線はそれぞれ野生株（Ｃｏｌ－０）と形質転換体植物（＃３－２株）との近似線を示している。

[0164] 上述したように、植物の個体重量は、植栽密度の上昇に伴って減少する。植栽密度と植物個体との関係は－３／２乗則と呼ばれる法則に従っていることが知られており、この法則によると、グラフの傾きは一定であることが知られている。しかしながら、実施例１と同様に、形質転換体植物（＃３－２株）において、近似線の傾きが緩やかになっていることがわかった。低密度植栽または至適密度植栽における個体重量は、野生型植物の方が大きかったが、高密度植栽条件下での個体重量は、形質転換体植物の方が大きかった。

[0165] これらの結果は、ダイズ（Glycine max）におけるＡｔＭＹＢ３０相同転写因子であるＧｌｙｃｉｎｅ ｍａｘ ＭＹＢ７４をコードする遺伝子が、ＡｔＭＹＢ３０遺伝子と同様に、植栽密度の上昇に伴う個体重量の減少を軽減させることを示している。すなわち、ＡｔＭＹＢ３０の相同転写因子が本発明に利用可能であることがわかった。

[0166] 〔実施例３〕

実施例１で得たＡｔＭＹＢ３０遺伝子を植物発現用ｐＧｒｅｅｎ ＩＩベクターに挿入した。ｐＧｒｅｅｎ ＩＩベクターとのライゲーションのために、プライマーSalI-AtMYB30_fおよびNotI-AtMYB30_rを用いてＡｔＭＹＢ３０遺伝子の末端にＳａｌ ＩサイトおよびＮｏｔ Ｉサイトを付加した。

[0167] プライマーSalI-AtMYB30_fおよびNotI-AtMYB30_rの具体的な配列は以下の通りである。

[0168]

[化7]

SalI-AtMYB30_f:
5' - ATT AGT CGA CAT GGT GAG GCC TCC TTG -3'（配列番号１２１）
NotI-AtMYB30_r:
5' - TTA TGC GGC CGC TCA GAA GAA ATT AGT GTT -3'（配列番号１２２）

[0169] 上記プライマーを用いて得られたＰＣＲ産物およびｐＧｒｅｅｎＩＩを制限酵素（SalI、NotI）で処理し、これらの制限酵素消化産物を、それぞれアガロースゲルにて電気泳動し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製)を用いて、ＡｔＭＹＢ３０遺伝子のＯＲＦを含む断片およびｐＧｒｅｅｎＩの断片をそれぞれゲルから精製した。ＡｔＭＹＢ３０遺伝子のＯＲＦを含む断片およびｐＧｒｅｅｎＩＩの断片を混合し、Rapid DNA Dophos & Ligation kit (Roche)を用い、所定の容量によるライゲーション反応を１６℃で３０分以上行った。ライゲーション反応後のベクターを用いてコンピテントセル（ＤＨ５α，ニッポン・ジーン）の形質転換を、キット添付のプロトコルに従って行った。形質転換反応液を塗布したＬＢ寒天培地（１２．５μｇ／ｍＬのカナマイシンを含む。）を一晩培養し、出現したコロニーをＬＢ培地で液体培養し、得られた菌体からQIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN社製)を用いてプラスミドＤＮＡを調製し、ＡｔＭＹＢ３０遺伝子のＯＲＦを含む植物発現用ベクターを得た。さらに、当該ベクターの配列を確認した。

[0170] 得られた植物発現用ベクターを用いて、野生型イネ（日本晴）カルスの形質転換を行った。ハイグロマイシン含有培地を用いて複数の形質転換体植物を選抜し、再分化によって得られた形質転換体イネ（Ｔ０）を栽培し、Ｔ１種子を得た。

[0171] 直径９ｃｍのポット４つを４区画に分割し、５粒または１５粒のＴ１種子を各区画に播種し、２５℃、２００μｍｏｌ／ｍ^2／ｓｅｃ、１４時間明期／１０時間暗期の条件で２週間栽培した。対照区の非形質転換体植物として、野生型のイネ（日本晴）を使用した。４週間栽培した後に、植物体地上部の生重量（バイオマス量）を電子天秤で秤量した。

[0172] 図７に、野生型イネおよび形質転換体イネにおけるポット当たりのバイオ

マス収穫量（地上部生重量）と植栽密度との関係を比較した結果を示した。

[0173] 野生型植物（ＷＴ）では、５粒播きと比較して１５粒播きの方が、個体あたりの生重量が小さくなった。すなわち、１５粒播きの条件では、生育の競合が起きていることがわかる。一方、ＡｔＭＹＢ３０を高発現させた形質転換イネ（ＡｔＭＹＢ３０＃１、ＡｔＭＹＢ３０＃２、ＡｔＭＹＢ３０＃４、ＡｔＭＹＢ３０＃１２）では、５粒播きと比較して１５粒播きの方が、個体あたりの生重量が大きくなった。野生型植物（ＷＴ）で生育の競合が生じる１５粒播きの条件下であっても、ＡｔＭＹＢ３０を高発現させた形質転換イネでは個体の生重量が増加していた。これは、形質転換イネにおいて生育の競合が起きていないことを示しており、ＡｔＭＹＢ３０を高発現させた形質転換イネが野生型植物に比べて密植栽培条件で有利に生育できることを示している。

[0174] このように、ＡｔＭＹＢ３０相同転写因子を発現しているイネにＡｔＭＹＢ３０遺伝子を導入することによって、高密度植栽条件下での単位面積あたりのバイオマス生産性が向上した形質転換体イネを作出し得ることや、双子葉植物に由来する遺伝子による機能が単子葉植物において確認されたことは、広範な種々の植物が本発明に利用可能であることを裏付ける。

産業上の利用可能性

[0175] 本発明によれば、植物バイオマスの収量を増加させることができる。したがって、農林業だけでなく、食品産業、エネルギー産業等の広範な産業に利用可能である。

請求の範囲

[請求項1] ＭＹＢ３０シグナル伝達経路が活性化した植物体を高密度植栽条件下にて栽培する工程を包含する、植物バイオマスを生産する方法。

[請求項2] 前記植物体が、ＭＹＢ３０関連遺伝子を含む外因性遺伝子を用いて形質転換された形質転換体植物である、請求項１に記載の方法。

[請求項3] 前記外因性遺伝子において、前記ＭＹＢ３０関連遺伝子が、発現の時期を制御する誘導性プロモーターと作動可能に連結されている、請求項２に記載の方法。

[請求項4] 前記ＭＹＢ３０関連遺伝子が、ＡｔＭＹＢ３０、ＢＡＫ１およびＰＬＡ２αからなる群より選択されるタンパク質をコードする遺伝子である、請求項２または３に記載の方法。

[請求項5] 前記植物体の栽培後にバイオマスを回収する工程をさらに包含する、請求項１～４のいずれか１項に記載の方法。

[請求項6] ＭＹＢ３０関連遺伝子を含む外因性遺伝子を備えている、植物の高密度植栽条件下での単位面積あたりの生産性を向上させるためのキット。

[請求項7] ＭＹＢ３０シグナル伝達経路の活性化に起因する病害抵抗性の有無を調べるための試薬をさらに備えている、請求項６に記載のキット。

[請求項8] 請求項６または７に記載のキットを用いて植物体を形質転換する工程を包含する、形質転換体植物を作製する方法。

[請求項9] ＭＹＢ３０シグナル伝達経路の活性化に起因する病害抵抗性が向上している個体を選抜する工程をさらに包含する、請求項８に記載の方法。

[請求項10] 請求項８または９に記載の方法によって作製された、形質転換体植物。

[請求項11] 高密度植栽条件下での単位面積あたりの生産性が向上した植物体をスクリーニングする方法であって、

ＭＹＢ３０関連遺伝子の発現量またはＭＹＢ３０関連遺伝子にコー

ドされるタンパク質の発現量を、基準値と比較する工程；および

上記発現量が基準値よりも高い個体を選択する工程

を包含する、方法。

[請求項12] 高密度植栽条件下での単位面積あたりの生産性が向上した植物体をスクリーニングする方法であって、

ＭＹＢ３０関連遺伝子にコードされるタンパク質の活性を、基準値と比較する工程；および

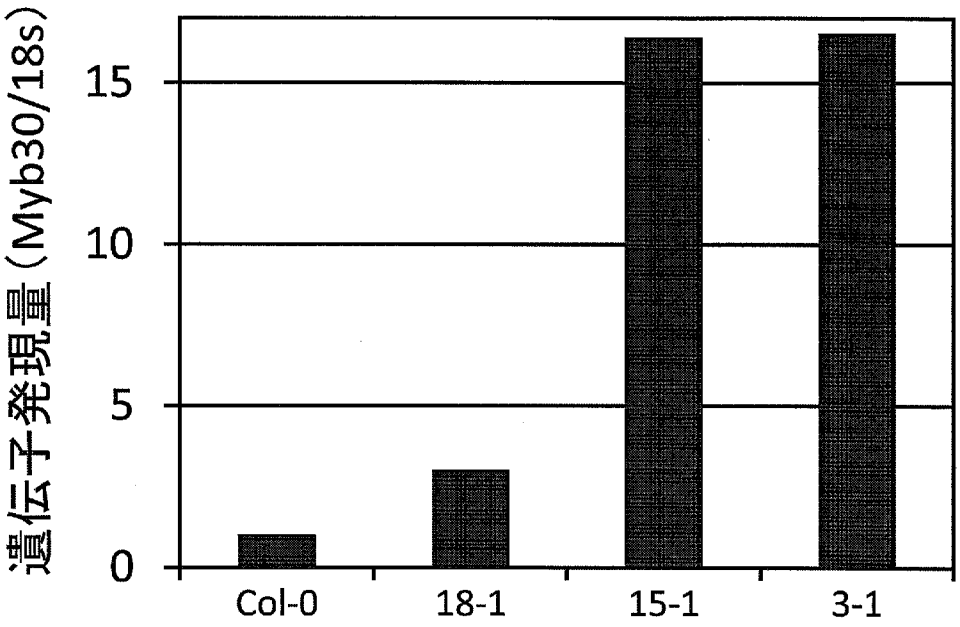
上記活性が基準値よりも高い個体を選択する工程

を包含する、方法。

[請求項13] ＭＹＢ３０シグナル伝達経路の活性化に起因する病害抵抗性が向上している個体を選抜する工程をさらに包含する、請求項１１または１２に記載の方法。

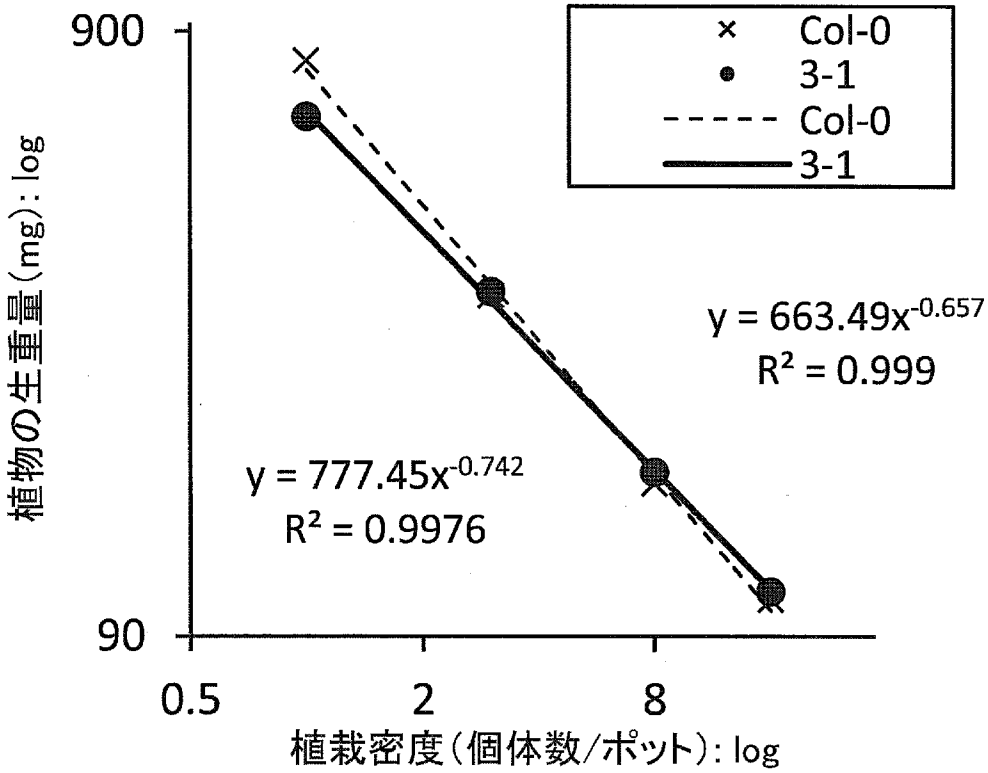
[図1]

図 1


遺伝子発現量（Myb30/18s）
15
10
5
0
Col-0
18-1
15-1
3-1

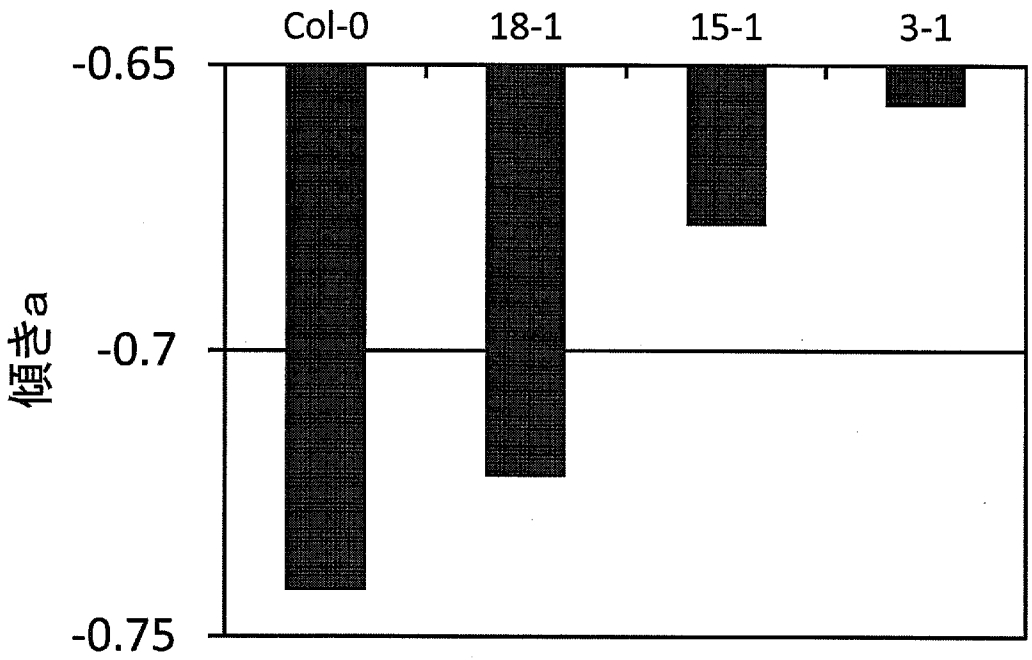
[図2]

図 2


900
90
0.5
2
8
植物の生重量（mg）: log
植栽密度（個体数/ポット）: log
Col-0
3-1
Col-0
3-1
y = 663.49x-0.657
R² = 0.999
y = 777.45x-0.742
R² = 0.9976

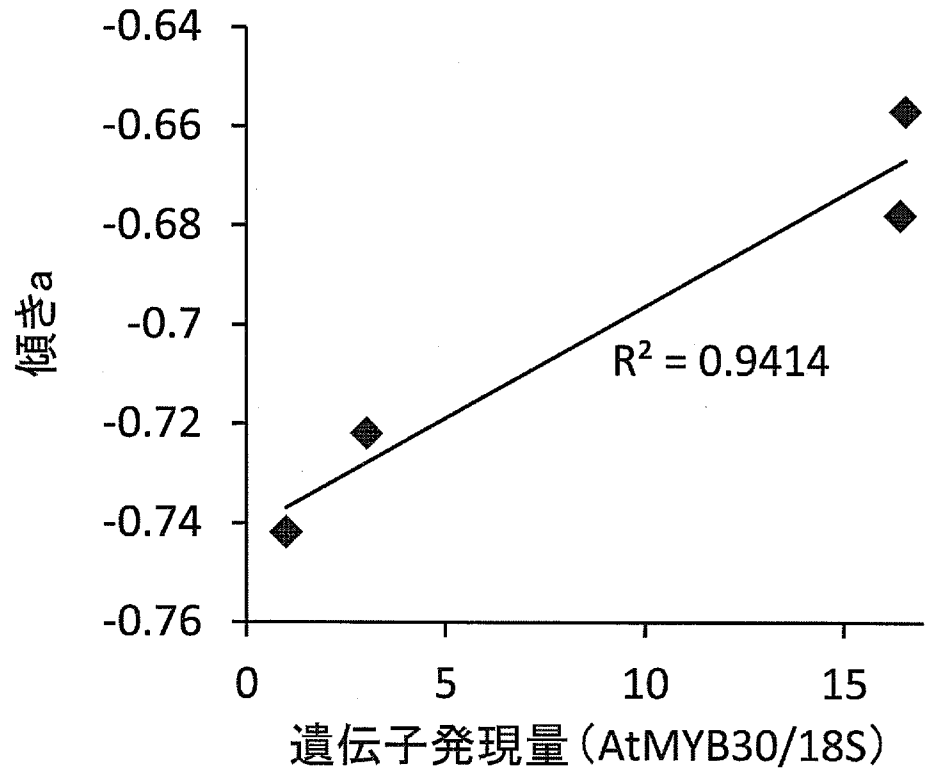
[図3]

図 3


Col-0
18-1
15-1
3-1
-0.65
-0.7
-0.75
傾きa

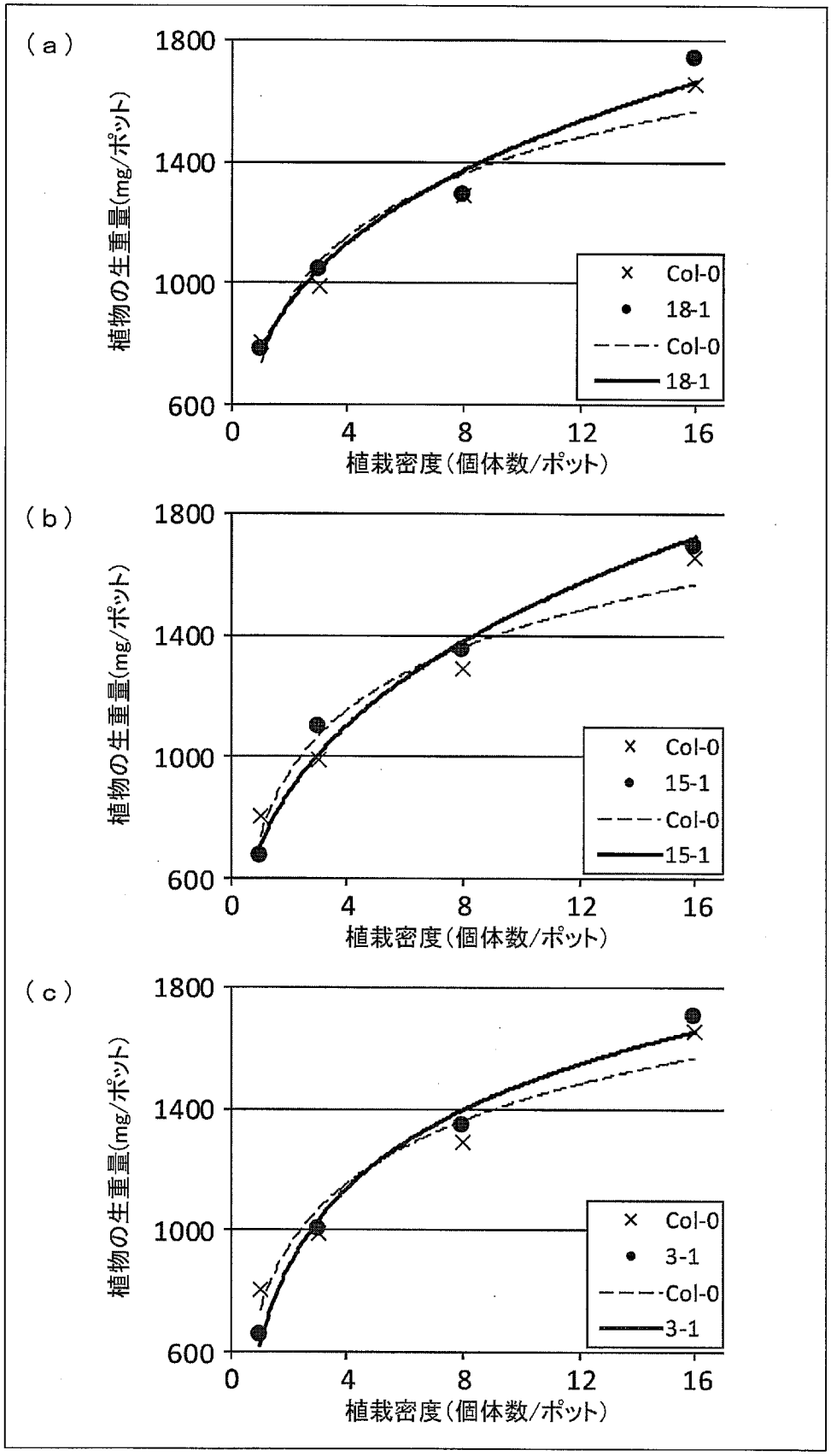
[図4]

図 4


-0.64
-0.66
-0.68
-0.7
-0.72
-0.74
-0.76
傾きa
R² = 0.9414
0
5
10
15
遺伝子発現量（AtMYB30/18S）

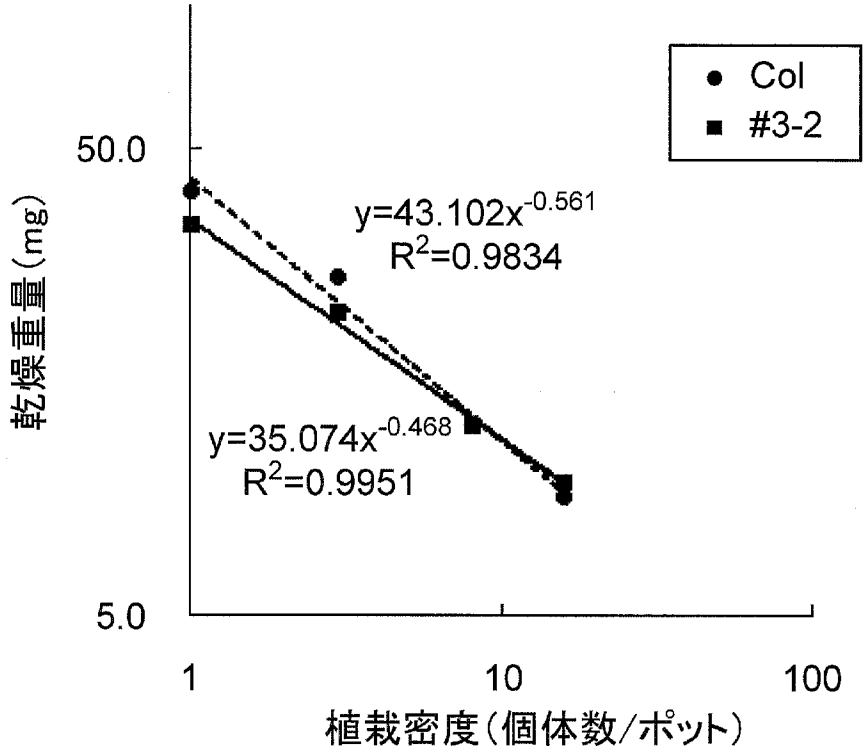
[図5]

図 5


(a)
植物の生重量(mg/ポット)
1800
1400
1000
600
0
4
8
12
16
植栽密度(個体数/ポット)
Col-0
18-1
Col-0
18-1
(b)
植物の生重量(mg/ポット)
1800
1400
1000
600
0
4
8
12
16
植栽密度(個体数/ポット)
Col-0
15-1
Col-0
15-1
(c)
植物の生重量(mg/ポット)
1800
1400
1000
600
0
4
8
12
16
植栽密度(個体数/ポット)
Col-0
3-1
Col-0
3-1

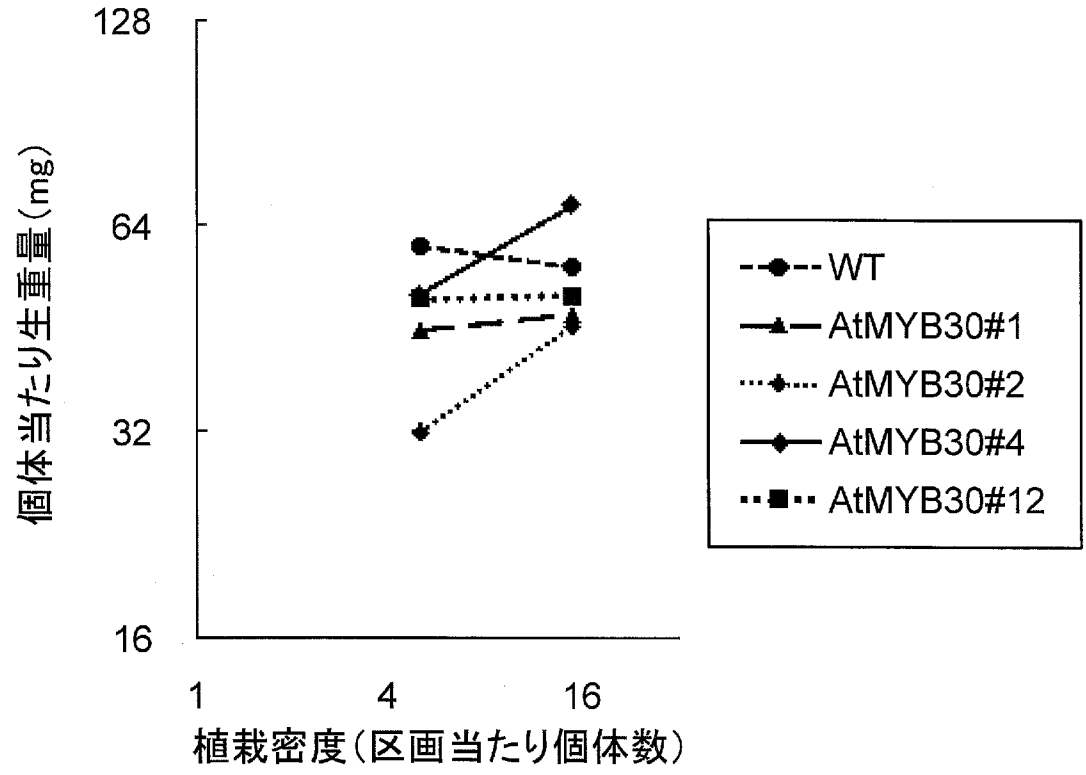
[図6]

図 6


Col
#3-2
50.0
5.0
乾燥重量（mg）
y=43.102x-0.561
R2=0.9834
y=35.074x-0.468
R2=0.9951
1
10
100
植栽密度（個体数/ポット）

[図7]

図 7


128
64
32
16
個体当たり生重量（mg）
WT
AtMYB30#1
AtMYB30#2
AtMYB30#4
AtMYB30#12
1
4
16
植栽密度（区画当たり個体数）

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2015/071380

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N15/09(2006.01)i, *A01H1/00*(2006.01)i, *A01H5/00*(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N15/09, A01H1/00, A01H5/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2015 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2015

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), WPIDS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/AGRICOLA/SCISEARCH(STN), Science Direct, Wiley Online Library, CiNii

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	VAILLEAU F et al., A R2R3-MYB gene, AtMYB30, acts as a positive regulator of the hypersensitive cell death program in plants in response to pathogen attack., Proc Natl Acad Sci U S A., 2002.07.23, 99(15), 10179-84	8-10/1-7, 11-13
X/A	LIU L et al., Elevated levels of MYB30 in the phloem accelerate flowering in Arabidopsis through the regulation of FLOWERING LOCUS T., PLoS One., 2014.02.25, 9(2), e89799	8-10/1-7, 11-13
X/A	JP 2008-507969 A (Expressive Research B.V.), 21 March 2008 (21.03.2008), entire text; particularly, example 3; fig. 3, 6, 8 & US 2008/0220971 A1 & WO 2006/011788 A1 & EP 1621629 A1 & CN 101027400 A	8-10/1-7, 11-13

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
21 August 2015 (21.08.15)	01 September 2015 (01.09.15)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3,Kasumigaseki,Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915,Japan	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2015/071380

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	FROIDURE S et al., AtsPLA2-alpha nuclear relocalization by the Arabidopsis transcription factor AtMYB30 leads to repression of the plant defense response., Proc Natl Acad Sci U S A., 2010.08.24, 107(34), 15281-6	8-10/1-7, 11-13
A	MORINAKA Y et al., Morphological alteration caused by brassinosteroid insensitivity increases the biomass and grain production of rice., Plant Physiol., 2006.07, 141(3), 924-31	1-13
A	WO 2008/087932 A1 (Japan Science and Technology Agency), 24 July 2008 (24.07.2008), entire text & US 2010/0083404 A1 & EP 2123753 A1 & CN 101583713 A	1-13
A	WARNASOORIYA SN et al., Enhancing the productivity of grasses under high-density planting by engineering light responses: from model systems to feedstocks., J Exp Bot., 2014.06, 65(11), 2825-34	1-13

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１５／０７１３８０

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N15/09(2006.01)i, A01H1/00(2006.01)i, A01H5/00(2006.01)i

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N15/09, A01H1/00, A01H5/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１５年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１５年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１５年

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), WPIDS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/AGRICOLA/SCISEARCH(STN), Science Direct, Wiley Online Library, CiNii

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X/A	VAILLEAU F et al., A R2R3-MYB gene, AtMYB30, acts as a positive regulator of the hypersensitive cell death program in plants in response to pathogen attack., Proc Natl Acad Sci U S A., 2002.07.23, 99(15), 10179-84	8-10/1-7,11-13
X/A	LIU L et al., Elevated levels of MYB30 in the phloem accelerate flowering in Arabidopsis through the regulation of FLOWERING LOCUS T., PLoS One., 2014.02.25, 9(2), e89799	8-10/1-7,11-13

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
２１．０８．２０１５	０１．０９．２０１５

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｂ　３０３８
山本　匡子
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８

C（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X/A	JP 2008-507969 A (エクスプレッシブ　リサーチ　ビー．ブイ) 2008.03.21, 全文、特に実施例３、図３，図６，図８ & US 2008/0220971 A1 & WO 2006/011788 A1 & EP 1621629 A1 & CN 101027400 A	8-10/1-7,11-13
X/A	FROIDURE S et al., AtsPLA2-alpha nuclear relocalization by the Arabidopsis transcription factor AtMYB30 leads to repression of the plant defense response., Proc Natl Acad Sci U S A., 2010.08.24, 107(34), 15281-6	8-10/1-7,11-13
A	MORINAKA Y et al., Morphological alteration caused by brassinosteroid insensitivity increases the biomass and grain production of rice., Plant Physiol., 2006.07, 141(3), 924-31	1-13
A	WO 2008/087932 A1 (独立行政法人科学技術振興機構) 2008.07.24, 全文 & US 2010/0083404 A1 & EP 2123753 A1 & CN 101583713 A	1-13
A	WARNASOORIYA SN et al., Enhancing the productivity of grasses under high-density planting by engineering light responses: from model systems to feedstocks., J Exp Bot., 2014.06, 65(11), 2825-34	1-13