(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
2008 年4 月17 日 (17.04.2008)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2008/044800 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/29 (2006.01) *A01H 5/00* (2006.01)
A01H 1/00 (2006.01) *C07K 14/415* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2007/070396

(22) 国際出願日: 2007 年10 月12 日 (12.10.2007)

(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 2006-278988
2006 年10 月12 日 (12.10.2006) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人理化学研究所 **(RIKEN)** [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢２番１号 Saitama (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 冨永るみ **(TOMINAGA, Rumi)** [JP/JP]; 〒2300045 神奈川県横浜市鶴見区末広町１丁目７番２２号独立行政法人理化学研究所 横浜研究所内 Kanagawa (JP). 和田拓治 **(WADA, Takuji)** [JP/JP]; 〒2300045 神奈川県横浜市鶴見区末広町１丁目７番２２号独立行政法人理化学研究所 横浜研究所内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 平木祐輔，外 **(HIRAKI, Yusuke et al.)**; 〒1050001 東京都港区虎ノ門4丁目3番20号 神谷町MTビル19階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, 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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

(54) **Title:** MUTANT PLANT AND METHOD FOR PRODUCTION THEREOF

(54) 発明の名称: 変異植物体及びその製造方法

(57) **Abstract:** Regarding a gene having a CPC-like Myb sequence and unknown function, the function of the gene is analyzed. Based on a finding resulted from the analysis, a novel mutant plant can be provided. The function of either one of the following proteins (a) and (b) is suppressed: (a) a protein comprising the amino acid sequence depicted in SEQ ID NO:2; and (b) a protein which comprises an amino acid sequence having the substitution, deletion, addition or insertion of one or more amino acid residues in the amino acid sequence depicted in SEQ ID NO:2 and which can act as a transcription factor for regulating the differentiation of an epidermal cell. By suppressing the function of either one of the proteins in a plant, it becomes possible to produce such a characteristic phenotype that the plant can grow larger compared to the wild-type of the plant.

(57) 要約: 機能が未知のCPC様Myb配列を有する遺伝子の機能を解析し、得られた知見に基づいて新規な変異植物体を提供する。 以下のいずれか１記載のタンパク質の機能を抑制する。（a）配列番号２に示すアミノ酸配列からなるタンパク質（b）配列番号２に示すアミノ酸配列において１又は複数のアミノ酸が置換、欠失、付加又は挿入されたアミノ酸配列からなり、表皮細胞分化を制御する転写因子として機能するタンパク質 上記タンパク質の機能を抑制することによって、野生型と比較して大きく成長できるといった特徴的な表現型が得られる。

WO 2008/044800 A1

明 細 書

変異植物体及びその製造方法

技術分野

本発明は、特徴的な形態を示す変異植物体及びその製造方法に関する。

背景技術

非特許文献１には、シロイヌナズナにおける根毛細胞分化に慣用する R3 MYB モチーフを有するタンパク質である CAPRICE（以下、CPC タンパク質)が開示されている。非特許文献２では、この CPC タンパク質が非根毛細胞から根毛細胞に細胞間移行し、ホメオドメイン-ロイシンジッパー遺伝子（GLABRA2）の発現を抑制していることが示された。

TRIPTYCHON 遺伝子(TRY 遺伝子)を含む４種類の CPC 様 Myb 配列がシロイヌナズナゲノムから見いだされている。TRY 遺伝子欠損株においてトライコームのクラスターが観察されることから、TRY タンパク質はトライコーム形成を制御している。Kirik らは、これら４種類の CPC 様 Myb 配列のうち既に２種（ETC1 及び ETC2 と称される）を同定し、遺伝学的にこれらと CPC 及び TRY との関係を解析している（非特許文献３及び非特許文献４）。David Marks のグループは、TRY 及び At1g01380 (ETC1)との関係を解析し、GL3 が TRY 遺伝子の発現を制御するが ETC1 の発現を制御していないことを示した（非特許文献５）。

しかし、現在、その他の CPC 様 Myb 配列からなる遺伝子に関する解析はなされておらず、当該遺伝子の機能は未知である。

非特許文献１ Wada, T., Tachibana, T., Shimura, Y., and Okada, K. (1997). Epidermal cell differentiation in Arabidopsis determined by a Myb homolog, CPC. Science 277, 1113-1116.

非特許文献２ Wada, T., Kurata, T., Tominaga, R., Koshino-Kimura, Y., Tachibana, T., Goto, K., Marks, M.D., Shimura, Y., and Okada, K. (2002). Role of a positive regulator of root hair development, CAPRICE, in Arabidopsis

root epidermal cell differentiation. Development 129, 5409-5419.

非特許文献３ Kirik, V., Simon, M., Huelskamp, M., and Schiefelbein, J. (2004b). The ENHANCER OF TRY AND CPC1 gene acts redundantly with TRIPTYCHON and CAPRICE in trichome and root hair cell patterning in Arabidopsis. Dev Biol 268, 506-513.

非特許文献４ Kirik, V., Simon, M., Wester, K., Schiefelbein, J., and Hulskamp, M. (2004a). ENHANCER of TRY and CPC 2 (ETC2) reveals redundancy in the region-specific control of trichome development of Arabidopsis. Plant Mol Biol 55, 389-398.

非特許文献５ Esch, J.J., Chen, M.A., Hillestad, M., and Marks, M.D. (2004). Comparison of TRY and the closely related At1g01380 gene in controlling Arabidopsis trichome patterning. Plant J 40, 860-869.

発明の開示

そこで、本発明は、機能が未知のCPC様Myb配列を有する遺伝子の機能を解析し、得られた知見に基づいて新規な変異植物体を提供することを目的とし、また、当該変異植物体の製造方法を提供することを目的とする。

本発明者らは、機能が未知のCPC様Myb配列を有する遺伝子の機能を解析した結果、当該遺伝子の欠損株が野生型と比較して特徴的な形態を示すことを見いだし、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は以下を包含する。

（１）以下のいずれか１記載のタンパク質の機能を抑制した変異植物体。

(a) 配列番号２に示すアミノ酸配列からなるタンパク質

(b)配列番号２に示すアミノ酸配列において１又は複数のアミノ酸が置換、欠失、付加又は挿入されたアミノ酸配列からなり、表皮細胞分化を制御する転写因子として機能するタンパク質

(c)配列番号１に示す塩基配列からなるポリヌクレオチドにおいて１又は複数の塩基が置換、欠失、付加又は挿入された塩基配列からなるポリヌクレオチドによってコードされ、表皮細胞分化を制御する転写因子として機能するタンパク質

（2）上記（a）～（c）のいずれか１記載のタンパク質をコードする遺伝子を欠損していることを特徴とする（１）記載の変異植物体。

（3）双子葉植物であることを特徴とする（１）記載の変異植物体。

（4）アブラナ科植物であることを特徴とする（１）記載の変異植物体。

（5）対象とする植物における以下のいずれか１記載のタンパク質の機能を抑制する、変異植物体の製造方法。

(a) 配列番号２に示すアミノ酸配列からなるタンパク質

(b)配列番号２に示すアミノ酸配列において１又は複数のアミノ酸が置換、欠失、付加又は挿入されたアミノ酸配列からなり、表皮細胞分化を制御する転写因子として機能するタンパク質

(c)配列番号１に示す塩基配列からなるポリヌクレオチドにおいて１又は複数の塩基が置換、欠失、付加又は挿入された塩基配列からなるポリヌクレオチドによってコードされ、表皮細胞分化を制御する転写因子として機能するタンパク質

（6）上記（a）～（c）のいずれか１記載のタンパク質をコードする遺伝子を欠損させることを特徴とする（５）記載の変異植物体の製造方法。

（7）上記対象とする植物は双子葉植物であることを特徴とする（５）記載の変異植物体の製造方法。

（8）上記対象とする植物はアブラナ科植物であることを特徴とする（５）記載の変異植物体の製造方法。

（9）対象とする植物における以下のいずれか１記載のタンパク質の機能を抑制することを特徴とする、野生型と比較して、より大きな形態又はより早い開花時期を示す変異植物体の製造方法。

(a) 配列番号２に示すアミノ酸配列からなるタンパク質

(b)配列番号２に示すアミノ酸配列において１又は複数のアミノ酸が置換、欠失、付加又は挿入されたアミノ酸配列からなり、表皮細胞分化を制御する転写因子として機能するタンパク質

(c)配列番号１に示す塩基配列からなるポリヌクレオチドにおいて１又は複数の塩基が置換、欠失、付加又は挿入された塩基配列からなるポリヌクレオチドによってコードされ、表皮細胞分化を制御する転写因子として機能するタンパク質

（１０）上記（a）～（c）のいずれか１記載のタンパク質をコードする遺伝子を欠損させることを特徴とする（９）記載の変異植物体の製造方法。

（１１）上記対象とする植物は双子葉植物であることを特徴とする（９）記載の変異植物体の製造方法。

（１２）上記対象とする植物はアブラナ科植物であることを特徴とする（９）記載の変異植物体の製造方法。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願 2006-278988 号の明細書および／または図面に記載される内容を包含する。

図面の簡単な説明

図１－１は、CPL3 遺伝子とイネ由来オーソログとの関係を示す系統樹である。

図１－２は、LOC_Os01g43180、LOC_Os01g43230、CPC、TRY、ETC1、ETC2 及び CPL3 についてアミノ酸配列におけるアライメントを示す図である。

図２は、CPC タンパク質、ETC1 タンパク質、ETC2 タンパク質、TRY タンパク質及び CPL3 タンパク質のアミノ酸配列におけるアライメント及び、各遺伝子を欠損する変異体における T-DNA 挿入位置を模式的に示す図である。

図３は、CPC 遺伝子、TYR 遺伝子、ETC1 遺伝子、ETC2 遺伝子及び CPL3 遺伝子に対する二重変異体及び三重変異体について、根毛の数を計測した結果を示す特性図である。

図４は、CPC 遺伝子、TYR 遺伝子、ETC1 遺伝子、ETC2 遺伝子及び CPL3 遺伝子に対する二重変異体及び三重変異体について、トライコーム数を計測した結果を示す特性図である。

図５は、cpl3-1 変異体、35S::CPL3 形質転換体、CPL3::CPL3 形質転換体及び野生型について、同じ成長段階における生重量を測定した結果を示す特性図である。

図６は、cpl3-1 変異体、35S::CPL3 形質転換体、CPL3::CPL3 形質転換体及び野生型について、同じ成長段階における写真である。

図７は、cpl3-1 変異体、CPL3::CPL3 形質転換体及び野生型について、核内倍加を測定した結果を示す特性図である。

図８は、各変異体及び形質転換体について本葉数を測定した結果を示す特性図

である。

図９は、各変異体及び形質転換体について抽台日数を測定した結果を示す特性図である。

図１０は、cpl3-1 変異体、CPL3::CPL3 形質転換体及び野生型について、葉及び胚軸における細胞の表現型を光学顕微鏡を用いて観察した結果を示す写真である。

図１１は、CPC 遺伝子、ETC1 遺伝子、ETC2 遺伝子、TRY 遺伝子及び CPL3 遺伝子を 35S プロモーターの制御下、又は自身のプロモーターの制御下に過剰発現する形質転換体における根毛の数を比較した結果を示す特性図である。

図１２は、CPC 遺伝子、ETC1 遺伝子、ETC2 遺伝子、TRY 遺伝子及び CPL3 遺伝子を 35S プロモーターの制御下、又は自身のプロモーターの制御下に過剰発現する形質転換体におけるトライコームの数を比較した結果を示す特性図である。

図１３は、CPC 遺伝子、ETC1 遺伝子、ETC2 遺伝子、TRY 遺伝子及び CPL3 遺伝子のプロモーター制御下で GUS タンパク質を発現する形質転換体を用いて、各遺伝子の発現パターンを検討した結果を示す写真である。

図１４は、CPC 遺伝子、ETC1 遺伝子、ETC2 遺伝子、TRY 遺伝子及び CPL3 遺伝子について GFP 融合タンパク質を高発現する形質転換体を用いて、各遺伝子の発現パターンを検討した結果及び RT-PCR 並びに In situ hybridization よって各遺伝子の発現パターンを検討した結果を示す特性図である。

図１５は、cpc、try、etc1、etc2 及び cpl3 変異植物体における CO、FT、SOC1 及び CPL3 の発現量を示すリアルタイム PCR の結果を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明に係る変異植物体は、野生型の植物体における特定のタンパク質の機能を欠損させたものである。本発明に係る変異植物体は、野生型の植物体と比較して、大きく成長といった特徴がある。具体的に本発明に係る変異植物体は、野生型の植物体と同条件で同程度まで育成した時に重量を測定すると、野生型の植物体と比較して有意差をもって重いといった特徴がある。また本発明に係る変異植物体は、野生型の植物体と比較して、より速い開花時期を示すという特徴がある。

ここで、本明細書において、タンパク質の機能を欠損させるとは、当該タンパク質をコードする遺伝子をゲノムから欠損させること、当該タンパク質をコードする遺伝子の発現を阻害すること、及び当該タンパク質の活性を低下させることを含む意味である。

より詳細に、特定のタンパク質をコードする遺伝子を欠損させる方法としては、特に限定されないが、相同組換えを用いた方法やトランスポゾンを用いた方法を挙げることができる。また、当該遺伝子を欠損させる場合には、当該遺伝子の全長を欠損させても良いし、部分的に欠損させても良い。

また、特定のタンパク質をコードする遺伝子の発現を阻害する方法としては、特に限定しないが、当該遺伝子の発現を制御しているプロモーターを欠損させる方法、当該遺伝子の発現を制御しているプロモーターを発現誘導型プロモーターに置換する方法、当該遺伝子の発現を制御しているプロモーターに突然変異を導入する方法、ＲＮＡ干渉を利用して当該遺伝子の転写産物を分解する方法、及びアンチセンスＲＮＡを利用して当該遺伝子の翻訳を阻害する方法を挙げることができる。

さらに、特定のタンパク質の活性を低下させる方法としては、当該タンパク質に特異的に結合して当該タンパク質の活性を抑制する機能を有する物質を作用させる方法を挙げることができる。当該物質としては、当該タンパク質の機能を阻害できる抗体や阻害物質を挙げあることができる。

本発明に係る変異植物体においては、シロイヌナズナにおいてAt4g01060として登録された遺伝子によってコードされるタンパク質の機能を欠損させる。具体的に、At4g01060として登録された遺伝子は、本明細書中、CPC様Myb配列を有するタンパク質として、CPL3遺伝子と呼ばれる。CPL3遺伝子の塩基配列を配列番号１に示し、CPL3遺伝子によってコードされるCPL3タンパク質のアミノ酸配列を配列番号２に示す。

すなわち、本発明に係る変異植物体は、以下の（１）、（２）又は（３）のタンパク質の機能が欠損している。

（１）配列番号２に示すアミノ酸配列からなるタンパク質

（２）配列番号２に示すアミノ酸配列において１又は複数のアミノ酸が置換、欠

失、付加又は挿入されたアミノ酸配列からなり、表皮細胞分化を制御する転写因子として機能するタンパク質

（３）配列番号１に示す塩基配列からなるポリヌクレオチドにおいて１又は複数の塩基が置換、欠失、付加又は挿入された塩基配列からなるポリヌクレオチドによってコードされ、表皮細胞分化を制御する転写因子として機能するタンパク質

ここで、複数のアミノ酸とは、例えば２～３３個のアミノ酸残基、好ましくは２～１５個のアミノ酸残基、より好ましくは２～５個のアミノ酸残基を意味する。また、１又は複数のアミノ酸が置換、欠失、付加又は挿入する部位としては、配列番号２に示すアミノ酸配列において、３～５番目の領域、２１～３２番目の領域、及び７７番目以降の領域等を挙げることができる。これらの領域は、CPC 様 Myb 配列以外の領域であるため、１又は複数のアミノ酸が置換、欠失、付加又は挿入されたとしてもCPL3タンパク質の機能に影響が少ないと考えられる。

また、複数の塩基とは、上述した『複数のアミノ酸』に対応して、例えば６～９９個の塩基、好ましくは６～４５個の塩基、より好ましくは６～１５個の塩基を意味する。１又は複数の塩基が置換、欠失、付加又は挿入する部位もまた、上述した『複数のアミノ酸』に対応して、配列番号１に示す塩基配列において、９～１５番目の領域、６３～９６番目の領域、及び２３１番目以降の領域等を挙げることができる。

また、本発明は、如何なる植物体にも適用することができる。すなわち、本発明は、野生型の植物体が上述したように定義されるタンパク質を有している限り如何なる植物体にも適用することができる。例えば、本発明は、特に双子葉植物が好ましく、中でもシロイヌナズナに代表されるアブラナ科植物に対して適用することが好ましい。

アブラナ科植物としては、ハクサイ (B. campestris)、コマツナ (B. campestris var. peruviridis)、カラシナ(B. juncea)、タカナ(B. juncea var. integlifolia)、ハゴロモカンラン (ケール) (B. oleracea var. acephala)、ハボタン (B. oleracea var. acephala)、カリフラワー (B. oleracea var. botrytis)、キャベツ (B. oleracea var. capitata)、メキャベツ (B. oleracea var. gemmifera)、コールラビ (B. oleracea var. gongylodes)、ブロッコリー (B. oleracea var. italica)、

カブ (B. rapa)、チンゲンサイ (B. rapa var. chinensis)、ノザワナ (B. rapa var. hakabura)、ミズナ (B. rapa var. lancinifolia) 及びアブラナ (B. rapa var. nippo-oleifera) 等のアブラナ属 (Brassica) に属する植物を挙げることができる。また、アブラナ科植物としては、オランダガラシ (クレソン) (N. officinale) 等のオランダガラシ属 (Nasturtium) に属する植物、コショウソウ (クレス) (L. sativum) 等のコショウソウ属 (Lepidium) に属する植物、ダイコン (R. sativus) 及びハツカダイコン (R. sativus var. radicula) 等のダイコン属 (Raphanus) に属する植物、キバナスズシロ (ルッコラ) (E. vesicaria) 等のキバナスズシロ属 (Eruca) に属する植物、ワサビ (W. japonica) 等のワサビ属 (Wasabia / Eutrema) に属する植物、セイヨウワサビ (ホースラディッシュ) (A. rusticana) 等のセイヨウワサビ属 (Armoracia) に属する植物、アラセイトウ (ストック) (M. incana) 等のアラセイトウ属 (Matthiola) に属する植物、ナズナ (C. bursa-pastoris) 等のナズナ属 (Capsella) に属する植物、シロイヌナズナ (A. thaliana) 等のシロイヌナズナ属 (Arabidopsis) に属する植物、オオアラセイトウ (ショカツサイ、ムラサキハナナ) (O. violaceus) 等のオオアラセイトウ属 (Orychophragmus) に属する植物、並びにイヌガラシ属 (Rorippa) に属する植物を挙げることができる。

一方、本発明に係る変異植物体は、上述したような双子葉植物に限定されず、イネに代表される単子葉植物であってもよい。例えば、イネゲノムの配列データを格納したデータベースに対して、配列番号２に示すアミノ酸配列データをキーとして検索することによって、CPL3 遺伝子に相当する遺伝子をイネゲノムにおいて同定することができる。具体的には、CPL3 遺伝子のオーソログをイネゲノムデータベースから２つ同定することができた。これら２つのオーソログ遺伝子は、LOC_Os01g43180 及び LOC_Os01g43230 として登録され、共に第一染色体上に存在している。CPL3 遺伝子と LOC_Os01g43180 との相同性はアミノ酸レベルで６３％であり、CPL3 遺伝子と LOC_Os01g43230 との相同性はアミノ酸レベルで５９％であった。LOC_Os01g43180 によってコードされるタンパク質のアミノ酸配列を配列番号３に示し、LOC_Os01g43230 によってコードされるタンパク質のアミノ酸配列を配列番号４に示す。

また、LOC_Os01g43180 及び LOC_Os01g43230 について、TRY 遺伝子、CPC 遺伝子、

ETC1 遺伝子及び ETC2 遺伝子との相同性を計算した。LOC_Os01g43180 は、CPC に対してアミノ酸レベルで 61%、ETC2 に対してアミノ酸レベルで 54%、ETC1 に対してアミノ酸レベルで 53%、TRY に対してアミノ酸レベルで 51%のホモロジーを示した。LOC_Os01g43230 は、ETC2 に対してアミノ酸レベルで 56%、CPC に対してアミノ酸レベルで 54%、ETC1 に対してアミノ酸レベルで 49%、TRY に対してアミノ酸レベルで 44%のホモロジーを示した。これらの結果を系統樹として図１－１に示す。なお、図１－２には、LOC_Os01g43180、LOC_Os01g43230、CPC、TRY、ETC1、ETC2 及び CPL3 についてアミノ酸配列でアライメントをとった結果も示している。

このように、イネゲノムにおいて見いだされた LOC_Os01g43180 及び LOC_Os01g43230 は、CPC 様 Myb 配列を含むタンパク質のなかで CPL3 と最も相同性が高く、シロイヌナズナにおける CPL3 遺伝子と同等の機能を有する蓋然性が高いと判断できる。

以上のように定義した本発明に係る変異植物体は、野生型の植物体と比較して大きく成長するといった特徴がある。従って、本発明によれば、変異導入対象の植物体が食用であるような場合には大型化による生産量の向上を期待することができる。また、本発明によれば、変異導入対象の植物体内部で物質を生産する様な場合には、当該有用物質の生産性を向上させることができる。ここで、物質としては、野生型の植物体が本来的に産生する物質であってもよいし、野生型の植物体を形質転換することによって産生されるような物質であってもよい。

また本発明に係る変異植物体は、野生型の植物体と比較してより開花時期が早いという特徴を有する。したがって、果実や種子の形成を促進できるため、通常年一回しか収穫できない作物を複数回収穫可能であるという利点を有する。またこのような本発明の変異植物体の性質により、作物の収穫までにかかる時間やコストの削減が可能である。

以下、実施例を用いて本発明をより詳細に説明するが、本発明の技術的範囲は以下の実施例によって限定されるものではない。

（実験例１）　CPL3 遺伝子を欠損した変異植物体のスクリーニング

本実施例では、野生型の植物体として Arabidopsis thaliana ecotype Col-0（以下、野生型シロイヌナズナと称する）を使用した。本実施例では、Wisconsin T-DNA

群のなかから、配列番号１に示す塩基配列を含む遺伝子に変異が導入されたcpl3-1変異体をスクリーニングした。

また、本例では、SALK T-DNA 群のなかから、TRY 遺伝子に変異が導入されたtry-29760変異体、ETC1遺伝子に変異が導入されたetc1-1変異体及びETC2遺伝子に変異が導入された etc2-40390 変異体を単離した。また、Kurata, T らCell-to-cell movement of the CAPRICE protein in Arabidopsis root epidermal cell differentiation. Development 132, 5387-5398 (2005)に開示された、CPC遺伝子に変異が導入された cpc-2 変異体を準備した。得られた変異体におけるT-DNA挿入部位を図２に示す。

（実験例２）　形質転換植物の作製

本実施例では、CPC 遺伝子、ETC1 遺伝子、ETC2 遺伝子、TRY 遺伝子及び CPL3遺伝子を 35S プロモーターの制御下に恒常的に発現する形質転換体、これら遺伝子とGFP遺伝子とを連結してGFP融合タンパク質を高発現する形質転換体及びこれら遺伝子のプロモーター配列とGUS遺伝子とを連結してGUSタンパク質を発現する形質転換体を作製した。

本例で使用したプライマーの名前、塩基配列及び配列番号の一覧を表１に示した。

表１

プライマー名	配列（5’→3’）	配列番号
TW1165	ATATGGTACCAATAAAAAATAAATCAC	配列番号５
TW1166	TGCTTGTCGACTGTATACACTAA	配列番号６
TW1167	ATATGGTACCTTTAACATAGAAACCGAC	配列番号７
TW1168	ATATGTCGACATCTACGACTTAGCTTC	配列番号８
TW1169	ATATGGTACCACTTCATGTTCTTCCCTT	配列番号９
TW1170	ATATGTCGACAAGCCAATACATATCCA	配列番号１０
RT46	GGCCAGTCGACAGAAAACTCACTCACTATTCACATC	配列番号１１
RT47	CGAGGATCCACGCTGCGTATTCATCTCAA	配列番号１２
RT48	GGCCAGTCGACGCTTGGCTAGCTCATAAACG	配列番号１３
RT49	CGATCTAGAACGGTTGGTATTATCCATAACTACT	配列番号１４
RT50	GGCCAGTCGACCAGCCCTGAAAACAGCTAAGAA	配列番号１５
RT51	CGAGGATCCGCGATGGTTATCCATGTCAAAC	配列番号１６
RT67	ATATGTCGACAGAAAACTCACTCACTATTCACATC	配列番号１７
RT68	ATATCCCGGGACGTAATTGAGATCTTCGATGATTC	配列番号１８
RT69	ATATGTCGACGCTAGCTCATAAACGTTGGTACG	配列番号１９
RT70	ATATGATATCCAATTTTAGATTTTCTTGGAGATTAAG	配列番号２０
RT71	ATATGTCGACCAGCCCTGAAAACAGCTAAGAA	配列番号２１
RT72	ATATGATATCATTTTTCATGACCCAAAACCTCT	配列番号２２
RT73	CGATGGATAACACTGACCGTCGTC	配列番号２３
RT88	ATATGGATCCACGGTCAGTGTTATCCATTACTATT	配列番号２４
RT89	ATATGTCGACCTCAATATATCAAATTCAAACATTCA	配列番号２５
RT90	ATATCCCGGGGGAAGGATAGATAGAAAAGCGAG	配列番号２６
RT91	ATATGGATCCGTTGGACATTTCCTTCTCTCTC	配列番号２７
RT92	ATATGTCGACCTAACCGCATGGATTAAAGTTG	配列番号２８
RT122	GCGATCGTAAATCTTTGTGTACTAAG	配列番号２９
RT123	CTCAGGAACAAAACTGCAGAATTAC	配列番号３０
RT124	GATAATACCAACCGTCTTCGTCTTC	配列番号３１
RT125	TTCTTGGAGATTAAGAGGAGAAGTAG	配列番号３２
RT126	GATAACCATCGCAGGACTAAGC	配列番号３３
RT127	TACAACGGAATATAATCGAAACAATC	配列番号３４
RT128	CTTCTTGTTTCTCGAGATTTATTCTC	配列番号３５
RT129	AATAGTAATTCAAGGACAGGTACATTTC	配列番号３６

各遺伝子を 35S プロモーターの制御下に恒常的に発現する形質転換体を得るため、以下の構築物を作製した。すなわち、まず、TW1169 及び TW1170 を用いて ETC1 遺伝子を含む 0.7kb の PCR 断片を増幅した。また、TW1165 及び TW1166 を用いて ETC2 遺伝子を含む 1.4kb の PCR 断片を増幅した。さらに、TW1167 及び TW1168 を用いて CPL3 遺伝子を含む 0.8kb の PCR 断片を増幅した。さらにまた、RT91 及び RT92 を用いて TRY 遺伝子を含む 1.4kb の PCR 断片を増幅した。次に、得られた各

PCR 断片を、Pyrobest DNA polymerase (Takara, Japan)を用いて pBluescript SK+ (Stratagene)にそれぞれサブクローンした。作製されたプラスミドをそれぞれ pBS-ETC1、pBS-ETC2、pBS-CPL3 及び pBS-TRY とした。

次に、pBS-ETC1、pBS-ETC2 及び pBS-CPL3 を Acc65I 及び SalI で処理して得られた断片を、pCHF3 バイナリベクター(Jarvis, P ら An Arabidopsis mutant defective in the plastid general protein import apparatus. Science 282, 100-103 (1998))の Acc65I 及び SalI サイトに挿入し、35S::ETC1、35S:: ETC2 及び 35S::CPL3 コンストラクトを作製した。また、pBS-TRY に対しては、BamHI 及び SalI で処理する以外は同様にして 35S::TRY コンストラクトを作製した。

各遺伝子と GFP 遺伝子とを連結して GFP 融合タンパク質を高発現する形質転換体を得るため、以下のコンストラクトを作製した。すなわち、RT67 及び RT68 を用いて ETC1 遺伝子を含む 2.3kb の PCR 断片を増幅し、これを SalI 及び SmaI で制限酵素処理した。また、RT69 及び RT70 を用いて、ETC2 遺伝子を含む 4.0kb の PCR 断片を増幅し、これを SalI 及び EcoRV を用いて消化した。さらに、RT71 及び RT72 を用いて 3.0kb の PCR 断片を増幅し、これを SalI 及び EcoRV で制限酵素処理した。さらにまた、RT89 及び RT90 を用いて 4.0kb の PCR 断片を増幅し、これを SalI 及び SmaI で制限酵素処理した。得られた断片を pBS-2xGFP (Kurata, T ら Cell-to-cell movement of the CAPRICE protein in Arabidopsis root epidermal cell differentiation. Development 132, 5387-5398 (2005))の SalI 及び EcoRV サイトにそれぞれ挿入し、pBS-ETC1:2xGFP、pBS-ETC2:2xGFP、pBS-CPL3:2xGFP 及び pBS-TRY:2xGFP を作製した。

次に、pBS-ETC1:2xGFP を SalI 及び XbaI で処理して得られた断片を pJHA212K バイナリベクター(Yoo, S.Y ら The 35S promoter used in a selectable marker gene of a plant transformation vector affects the expression of the transgene. Planta 221, 523-530 (2005))の SalI 及び XbaI サイトに挿入した。また、pBS-ETC2:2xGFP を SalI 及び SacII で処理して得られた断片を pJHA212K バイナリベクターの SalI 及び SmaI サイトに挿入した。さらに、pBS-CPL3:2xGFP 及び pBS-TRY:2xGFP をそれぞれ SalI 及び SacI で処理して得られた断片を pJHA212K バイナリベクターの SalI 及び SacI サイトに挿入した。

各遺伝子のプロモーター配列とGUS遺伝子とを連結してGUSタンパク質を発現する形質転換体を得るため、以下の構築物を作製した。すなわち、RT46及びRT47を用いてETC1遺伝子のプロモーター領域を含む1.9kbのPCR断片を増幅した。また、RT48及びRT49を用いてETC2遺伝子のプロモーター領域を含む3.0kbのPCR断片を増幅した。さらに、RT50及びRT51を用いてCPL3遺伝子のプロモーター領域を含む2.4kbのPCR断片を増幅した。さらにまた、RT88及びRT89を用いてTRY遺伝子のプロモーター領域を含む3.0kbのPCR断片を増幅した。得られた増幅断片をそれぞれNotI及びAccIで処理した後、pBSにサブクローンした。作製されたプラスミドをそれぞれpBS-ETC1、pBS-ETC2、pBS-CPL3及びpBS-TRYとした。

次に、pBS-ETC1及びpBS-CPL3をSalI及びBamHIで処理して得られた断片をpBI101バイナリベクター(Clontech Laboratories, Inc., CA, USA)のSalI及びBamHIサイトに挿入した。得られたプラスミドをETC1promoter::GUS及びCPL3promoter::GUSとした。また、pBS-ETC2及びpBS-TRYをSalI及びXbaIで処理して得られた断片をpBI101バイナリベクターのSalI及びXbaIサイトに挿入した。得られたプラスミドをETC2promoter::GUS及びTRYpromoter::GUSとした。

以上のようにして得られた35S::ETC1、35S:: ETC2、35S::CPL3、ETC1::ETC1:2xGFP、ETC2::ETC2:2xGFP、CPL3::CPL3:2xGFP、TRY::TRY:2xGFP、ETC1promoter::GUS、CPL3promoter::GUS、ETC2promoter::GUS及びTRYpromoter::GUSを用いて、Kurata, Tら The YORE-YORE gene regulates multiple aspects of epidermal cell differentiation in Arabidopsis. Plant J 36, 55-66 (2003)に開示された方法に従って形質転換した。

〔実施例１〕CPL３遺伝子を欠損する変異体における表現型

（実験例１）で単離したetc1-1変異体、etc2-40390変異体及びcpl3-1変異体のホモ接合体をF2世代においてPCRを用いて同定することで、CPC遺伝子、TRY遺伝子、ETC1遺伝子、ETC2遺伝子及びCPL3遺伝子に対する二重変異体及び三重変異体を同定した。各遺伝子の変異体、得られた二重変異体及び三重変異体について、根毛の数を計測した結果を図３に示す。

図３から判るように、cpl3-1変異体においては、根毛の数が僅かに減少していた。また、CPC遺伝子及びTRY遺伝子に対する二重変異株、CPC遺伝子及びETC1

遺伝子に対する二重変異株、並びにTRY遺伝子、CPL3遺伝子及びCPC遺伝子に対する三重変異株においては、根毛の数が大幅に減少しているか、根毛が殆ど計測されなかった。

各遺伝子の変異体、得られた二重変異体及び三重変異体について、トライコームの数を計測した結果を図４に示す。図４から判るように、cpl3-1変異体においては、cpc-2 変異体と同様に野生型と比較してトライコーム数が増加していた。また、TRY遺伝子、CPC遺伝子及びCPL3遺伝子に対する三重変異体においては、更にトライコーム数が増加していた。さらに、TRY 遺伝子、CPC 遺伝子、ETC1 遺伝子及びCPL3遺伝子に対する四重変異体においては、更に多くのトライコームが形成され葉の主面全体がトライコームで覆われていた。

また、（実験例 1）で単離したcpl3-1変異体、及び（実験例２）で作製した形質転換体について成長を観測した。

各植物について同じ成長段階における生重量を測定した結果を図５に示し、各植物の同時期における写真を図６に示す。図５及び６から分かるように、CPL3遺伝子を欠損する変異体は野生型と比較して大きく成長している。これに対して、CPL3遺伝子を過剰に発現する形質転換体は、野生型と比較して30%程度の成長であった。なお、結果を図示しないが、CPC遺伝子、ETC1遺伝子、ETC2遺伝子及びTRY 遺伝子を欠損する各変異体においては、野生型と同等の成長しか示さなかった。

また、これら各植物について倍数性を検証した結果を図７に示す。なお、倍数性は、播種から２週間経過後の各植物について、Ploidy Analtzer PA Flow Cytometer (Partec) を使用して製造元マニュアルに従って測定した。図７から分かるように、CPL3遺伝子を欠損する変異体においては、16Cのピークが著しく上昇している。この結果から、CPL3遺伝子を欠損する変異体は、核内倍化が向上することにより細胞のサイズ向上といった表現型を示していることが示唆された。

さらに、各植物について本葉数を測定した結果を図８に示し、各植物の抽台日数を測定した結果を図９に示す。図８及び９から分かるように、CPL3遺伝子を欠損する変異体は、野生型及びその他の変異体ならびに形質転換体と比較して早咲きであった。

さらに、各植物について、葉及び胚軸における細胞の表現型を光学顕微鏡を用いて観察した。その結果を図１０に示す。図１０から分かるように、CPL3 遺伝子を欠損する変異体においては、野生型及び CPL3 遺伝子を過剰発現する形質転換体と比較して、葉の表皮細胞が大きく、且つ胚軸が長いといった特徴を示した。また、各植物について、葉のサイズ、上皮細胞数を計測した結果を表２に示す。

表２

遺伝子型	葉のサイズ (mm^2)	上皮細胞 (数 mm^{-2})	上皮細胞 ／葉
Col-0	16.8±0.3	181±19	3035±311
cpl3	19.0±1.3	158±26	3014±535
CPL3::CPL3	9.5±0.9	311±14	2960±306

なお、上皮細胞数の測定に際しては、播種から２週間経過した後、第３葉を採取し、抱水クロラール（重量）：グリセロール（容量）：水（容量）を８：２：１で含む洗浄液で洗浄し、Zeiss Axio plan2（Carl Zwiss、Germany）を用いて可視化した。表２の数値は、５枚の葉について計測した平均を示している。

図１０及び表２に示した結果より、CPL3 遺伝子を欠損した変異体においては、野生型と比較して細胞数の増加は見られないものの野生型と比較して大きく成長していることから、野生型と比較して個々の細胞における成長が促進されていることが明らかとなった。

〔実施例２〕

本実施例では、（実験例２）で作製した形質転換体を用いて、CPC 遺伝子、ETC1 遺伝子、ETC2 遺伝子、TRY 遺伝子及び CPL3 遺伝子を 35S プロモーターの制御下、又は自身のプロモーターの制御下に過剰発現する形質転換体における根毛の数を比較した。結果を図１１に示す。図１１に示すように、35S プロモーターの制御下に恒常的に発現する全ての形質転換体において、野生型と比較して根毛の数が増加した。しかし、35S プロモーターの制御下に CPL3 遺伝子を発現する形質転換体においては、他の形質転換体と比較して根毛の数が増加がやや緩やかであった。さらに、ETC1 プロモーターの制御下に ETC1 遺伝子を過剰発現する形質転換体においては、自身のプロモーターの制御下に過剰発現する他の形質転換体及び野生

型と比較して根毛の数が増加した。

また、同様にして各形質転換体におけるトライコームの数を測定した結果を図１２に示す。図１２に示すように、ETC2 プロモーターの制御下に ETC2 遺伝子を過剰発現する形質転換体を除いて全ての形質転換体において、トライコームが完全に欠失していた。ETC2 プロモーターの制御下に ETC2 遺伝子を過剰発現する形質転換体も、野生型と比較するとトライコーム数が大幅に減少していた。

〔実施例３〕

本実施例では、(実験例２）で作製した、各遺伝子のプロモーター制御下で GUS タンパク質を発現する形質転換体を用いて、各遺伝子の発現パターンを検討した。その結果を図１３に示す。また、(実験例２）で作製した、各遺伝子について GFP 融合タンパク質を高発現する形質転換体を用いて、各遺伝子産物の発現パターンを検討した。結果を図１４に示す。また、図１４には、RT-PCR 及び In situ hybridization によって各遺伝子の発現パターンを検討した結果も示す。

図１３及び１４に示すように、CPC 遺伝子、TRY 遺伝子および ETC1 遺伝子の産物は、若い葉のトライコーム及び根表皮における非根毛細胞（Hairless Cell）に特異的に蓄積していた。また、ETC2 遺伝子及び CPL3 遺伝子の産物は、葉における向軸側及び背軸側の気孔孔辺細胞を含む表皮細胞に特異的に蓄積しており、根及びトライコームには蓄積していなかった。特に、ETC2 遺伝子よりも CPL3 遺伝子は、葉、子葉、胚軸及び葉柄における気孔孔辺細胞に限定的に発現していた。

〔実施例４〕

本実施例では、実施例１と同様にして同定した cpc、try、etc1、etc2 及び cpl3 ノックアウト変異体、並びに実験例２と同様にして作製した CPL3 過剰発現植物体の開花時期及び葉数を調査した。

これらの各変異植物体の開花時期、及び各開花時期における葉数を調査した結果を表３に示す。なお、データは１実験当たり少なくとも 10 個体の植物の平均±SD を示す。

表３

遺伝子型	開花時期（日）	葉数
Col-0	37.6±0.5	17.4±0.6
cpl3	28.9±0.5	8.2±0.3
cpc	39.6±0.5	19.2±0.6
try	36.0±0.8	14.3±0.6
etc1	40.6±0.8	19.3±0.8
etc2	39.0±0.5	14.1±1.9
35S:CPL3	41.1±1.1	28.5±1.7

表3に示されるように、cpl3ノックアウト変異植物体は野生型よりも早く開花し(28.9±0.5対37.6±0.5日)、葉数はより少なかった(8.2±0.3対17.4±0.6)。他方、cpc、try、etc1及びetc2変異植物体は、野生型と有意差はなかった(表3)。35S:CPL3トランスジェニック植物は野生型よりわずかに遅く開花し(41.1±1.1対37.6±0.5)、葉数はより多かった(28.5±1.7対17.4±0.6)。

さらに、開花に対するCPL3遺伝子の効果を明確にするために、花成(開花)の制御において中心的な役割を果たすことがわかっているFLOWERING LOCUS T (FT)、SUPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO 1 (SOC1)及びCONSTANS (CO) (Bagnall, Annals of Botany 71,75,1993; Leeら,Genes & development 14,2366-2376,2000; Koornneefら,Mol Gen Genet 229, 57-66,1991)の発現を、CPL3発現を改変した植物系統においてリアルタイムPCRを用いて調査した。

リアルタイムPCRは以下のように実施した。全RNAをRNeasy plant mini kit(Qiagen)を用いて抽出した。オンカラムDNアーゼI消化は、RNeasy mini Handbookに記載されるプロトコールに従ってRNA精製の間に行った。第一鎖のcDNAを、20μL反応混合液中、Prime Script RT regent kit (Takara)を用いて、1μgの全RNAから合成した。リアルタイムPCRは、SYBR Premix Ex Taq (Takara)を用いてChromo4 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)で実施した。PCR増幅は、95℃30秒の変性ステップ、その後の95℃で5秒、60℃で30秒の、CPL3については45サイクル、CO、FT、SOC1及びACT2については40サイクルとした。mRNAの相対レベルは、iQ5ソフトウェア(Bio-Rad)によって計

算し、ACT2 mRNAの濃度に標準化した。

cpl3ノックアウト変異体におけるFT及びSOC1の発現は、葉の発育の間、長日(LD)条件下で、野生型と比較してより高かった。21日齢の葉において、cpl3ノックアウト変異体におけるFTの発現は、野生型よりも、約7.5倍高く、SOC1の発現は3.2倍高かった（図15A及び15B）。cpl3ノックアウト変異体におけるCOの発現は野生型と有意差はなかった（図15C）。これらの結果は、FT及びSOC1発現を抑制することによる開花調節にCPL3が関与していることを示す。

産業上の利用可能性

本発明によれば、野生型と比較して、より大きな形態又はより早い開花時期を示す新規な変異植物体及びその製造方法を提供することができる。本発明に係る変異植物体によれば、野生型と比較して大きな形態を示すため、例えば、植物体から抽出される物質の生産性を向上させることができる。また本発明に係る変異植物体によれば、野生型と比較してより早い開花時期を示すため、果実や種子の形成を促進でき、例えば通常年一回しか収穫できない作物が複数回収穫可能である。またこのような本発明の変異植物体の性質により、作物の収穫までにかかる時間やコストの削減が可能である。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

請求の範囲

1． 以下のいずれか１記載のタンパク質の機能を抑制した変異植物体。

（１）配列番号２に示すアミノ酸配列からなるタンパク質

（２）配列番号２に示すアミノ酸配列において１又は複数のアミノ酸が置換、欠失、付加又は挿入されたアミノ酸配列からなり、表皮細胞分化を制御する転写因子として機能するタンパク質

（３）配列番号１に示す塩基配列からなるポリヌクレオチドにおいて１又は複数の塩基が置換、欠失、付加又は挿入された塩基配列からなるポリヌクレオチドによってコードされ、表皮細胞分化を制御する転写因子として機能するタンパク質

2． 上記（１）～（３）のいずれか１記載のタンパク質をコードする遺伝子を欠損していることを特徴とする請求項１記載の変異植物体。

3． 双子葉植物であることを特徴とする請求項１記載の変異植物体。

4． アブラナ科植物であることを特徴とする請求項１記載の変異植物体。

5． 対象とする植物における以下のいずれか１記載のタンパク質の機能を抑制する、変異植物体の製造方法。

（１）配列番号２に示すアミノ酸配列からなるタンパク質

（２）配列番号２に示すアミノ酸配列において１又は複数のアミノ酸が置換、欠失、付加又は挿入されたアミノ酸配列からなり、表皮細胞分化を制御する転写因子として機能するタンパク質

（３）配列番号１に示す塩基配列からなるポリヌクレオチドにおいて１又は複数の塩基が置換、欠失、付加又は挿入された塩基配列からなるポリヌクレオチドによってコードされ、表皮細胞分化を制御する転写因子として機能するタンパク質

6． 上記（１）～（３）のいずれか１記載のタンパク質をコードする遺伝子を欠損させることを特徴とする請求項５記載の変異植物体の製造方法。

7． 上記対象とする植物は双子葉植物であることを特徴とする請求項５記載の変異植物体の製造方法。

8． 上記対象とする植物はアブラナ科植物であることを特徴とする請求項５記載の変異植物体の製造方法。

９．　対象とする植物における以下のいずれか１記載のタンパク質の機能を抑制することを特徴とする、野生型と比較して、より大きな形態又はより早い開花時期を示す変異植物体の製造方法。

（１）配列番号２に示すアミノ酸配列からなるタンパク質

（２）配列番号２に示すアミノ酸配列において１又は複数のアミノ酸が置換、欠失、付加又は挿入されたアミノ酸配列からなり、表皮細胞分化を制御する転写因子として機能するタンパク質

（３）配列番号１に示す塩基配列からなるポリヌクレオチドにおいて１又は複数の塩基が置換、欠失、付加又は挿入された塩基配列からなるポリヌクレオチドによってコードされ、表皮細胞分化を制御する転写因子として機能するタンパク質

１０．　上記（１）～（３）のいずれか１記載のタンパク質をコードする遺伝子を欠損させることを特徴とする請求項９記載の変異植物体の製造方法。

１１．　上記対象とする植物は双子葉植物であることを特徴とする請求項９記載の変異植物体の製造方法。

１２．　上記対象とする植物はアブラナ科植物であることを特徴とする請求項９記載の変異植物体の製造方法。

図１－１

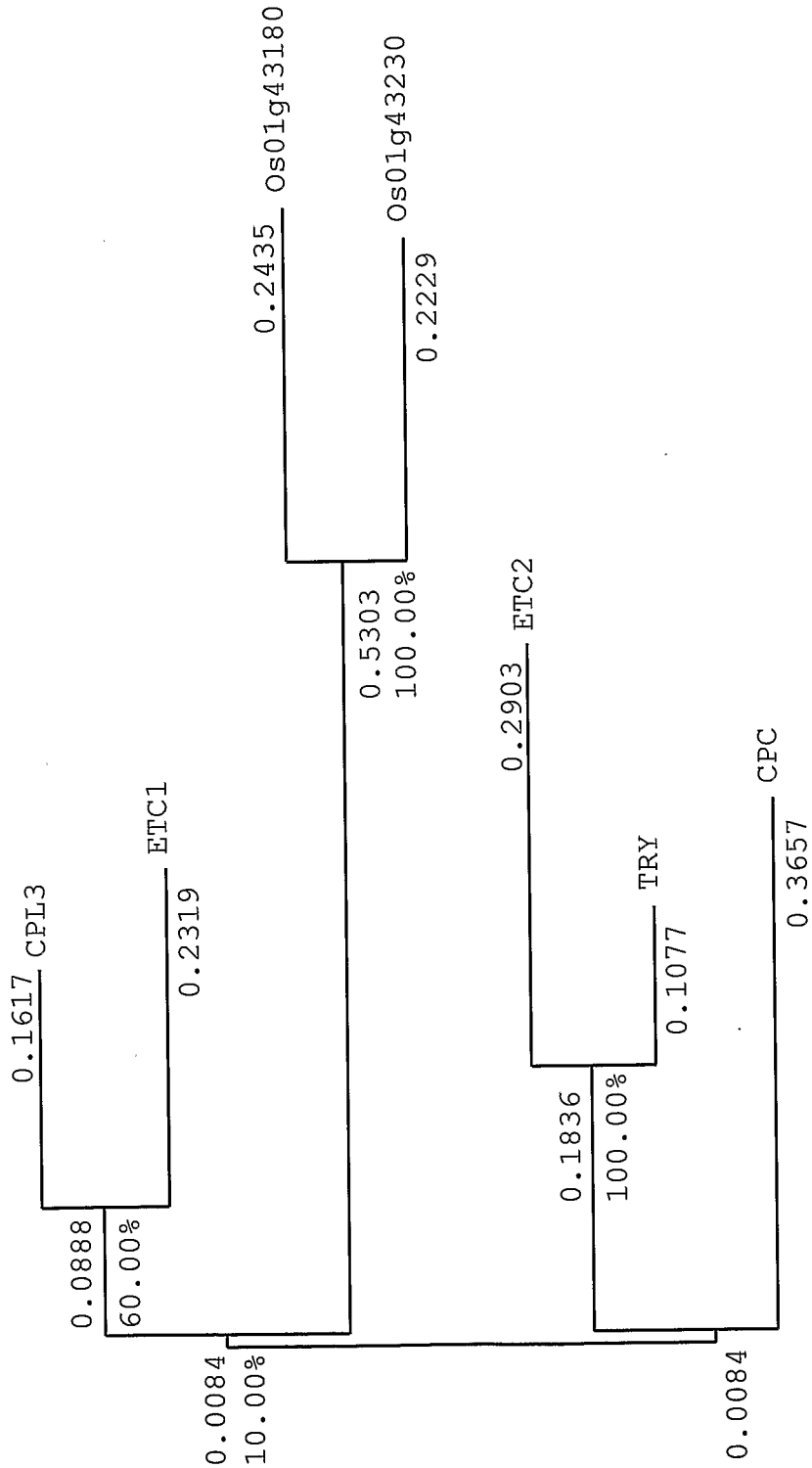

[GENETYX-MAC： 系統樹]
日付： 2006.07.13
方法： NJ
ブートストラップトライアル： 10
0.1617 CPL3
ETC1
0.2319
0.0888
60.00%
0.0084
10.00%
0.2435 Os01g43180
Os01g43230
0.2229
0.5303
100.00%
0.2903 ETC2
TRY
0.1077
0.1836
100.00%
CPC
0.3657
0.0084

図１－２

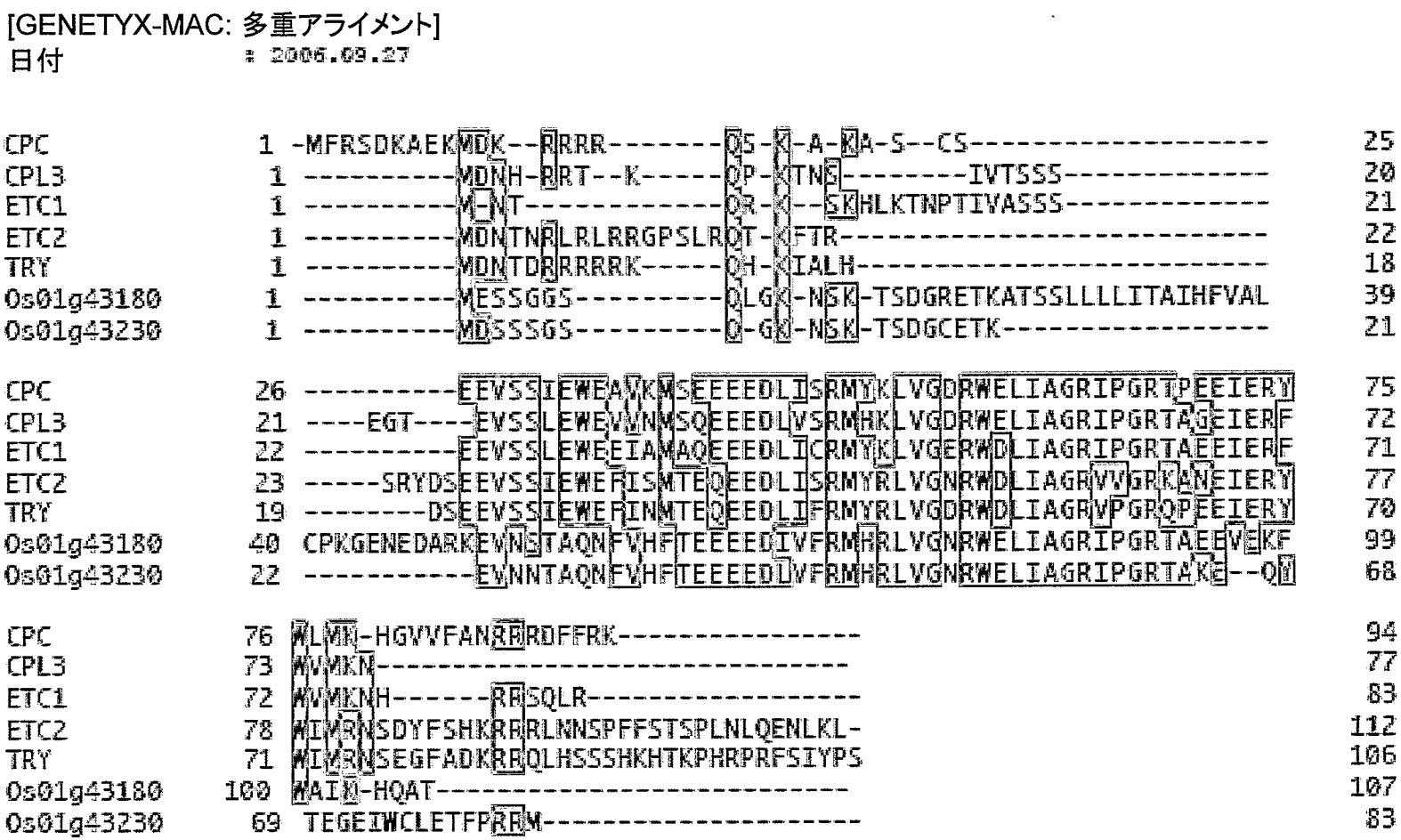

[GENETYX-MAC: 多重アライメント]
日付 : 2006.09.27
CPC
CPL3
ETC1
ETC2
TRY
Os01g43180
Os01g43230

図2

```
CPC    MFRSDKAEKMD--KRR-RR-----QSKAK---------A-SCSE--EVSSI EWEAVKMSEEE
TRY            MDNTDRRRRR----KQHK---------I-ALHDSE---VSSI EWEFI NMTEQE
ETC1           M-NT-----------QRKSKHLKTNPTI VA-SSSE--EVSSLEWEEI AMAQEE
ETC2           MDNTNRLRRRGPSLRQTKF----TRSRY----DSE--EVSSI EWEFI SMTEQE
CPL3           MDN-HRRT------KQPK----TNS-I VT-SSSEGTEVSSLEWEVVNMSQEE

EDLI SRMYKLVGDRWELIAGRI PGRTPEEI ERYWLMKHGVVFANRRRDFFRK
EDLI FRMYRLVGDRWDLIAGRVPGRQPEEI ERYWI MRNSEGFADKRRQL HSSSHKHTKPHRPRFSI YPS
EDLI CRMYKLVGERWDLIAGRI PGRTAEEI ERFWVMKNHRRSQLR
EDLI SRMYRLVGNRWDLIAGRVVGRKANEI ERYWI MRNSDYFSHKRRRLN NSPFFSTSPLNLQENL KL
EDLVSRMHKLVGDRWELIAGRI PGRTAGEI ERFWVMKN
```

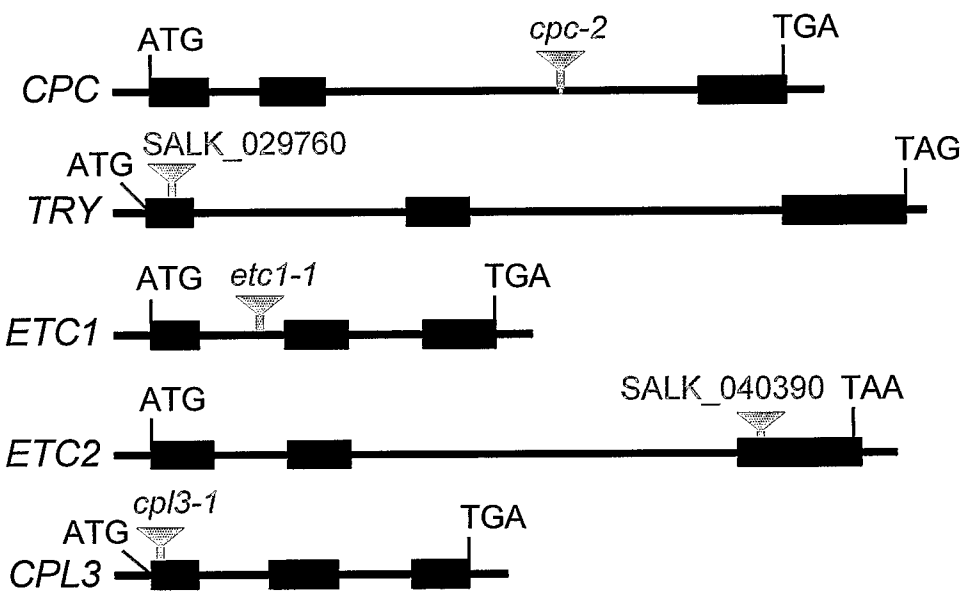


図3

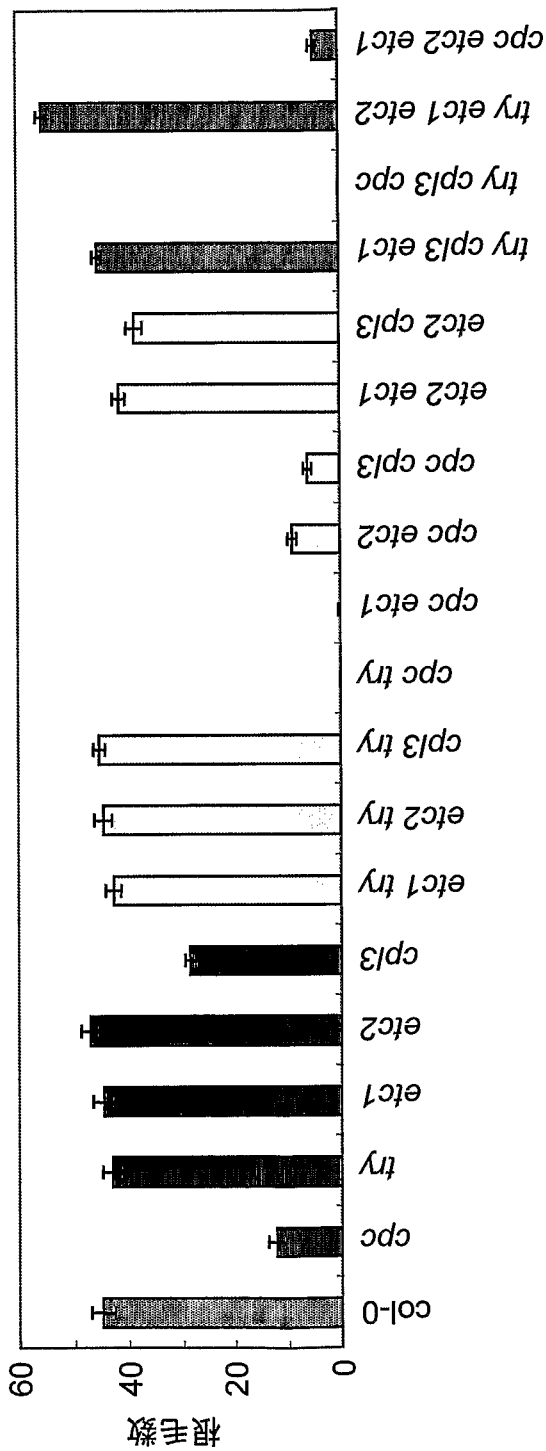

根毛数
0
20
40
60
col-0
cpc
try
etc1
etc2
cpl3
etc1 try
etc2 try
cpl3 try
cpc try
cpc etc1
cpc etc2
cpc cpl3
etc2 etc1
etc2 cpl3
try cpl3 etc1
try cpl3 cpc
try etc1 etc2
cpc etc2 etc1

図4

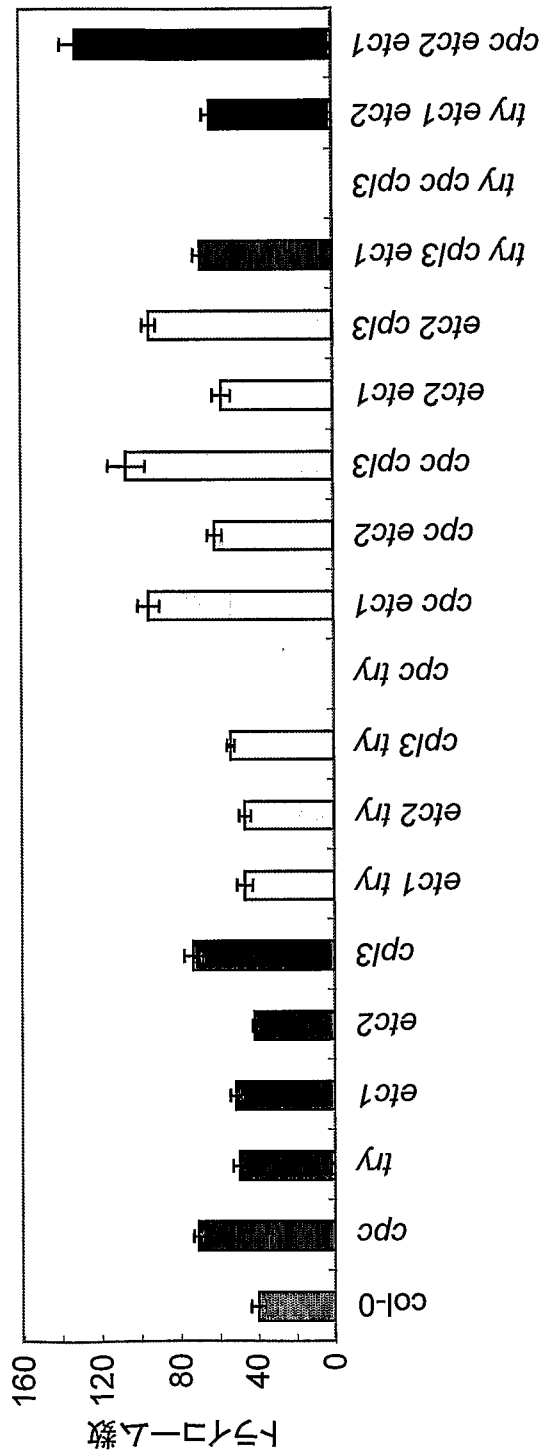

トライコーム数
0
40
80
120
160
col-0
cpc
try
etc1
etc2
cpl3
etc1 try
etc2 try
cpl3 try
cpc try
cpc etc1
cpc etc2
cpc cpl3
etc2 etc1
etc2 cpl3
try cpl3 etc1
try cpc cpl3
try etc1 etc2
cpc etc2 etc1

図5

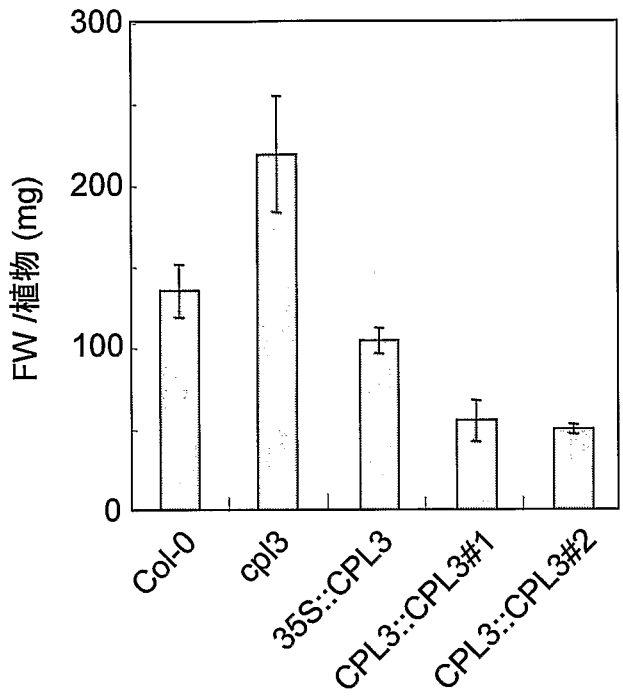


図6

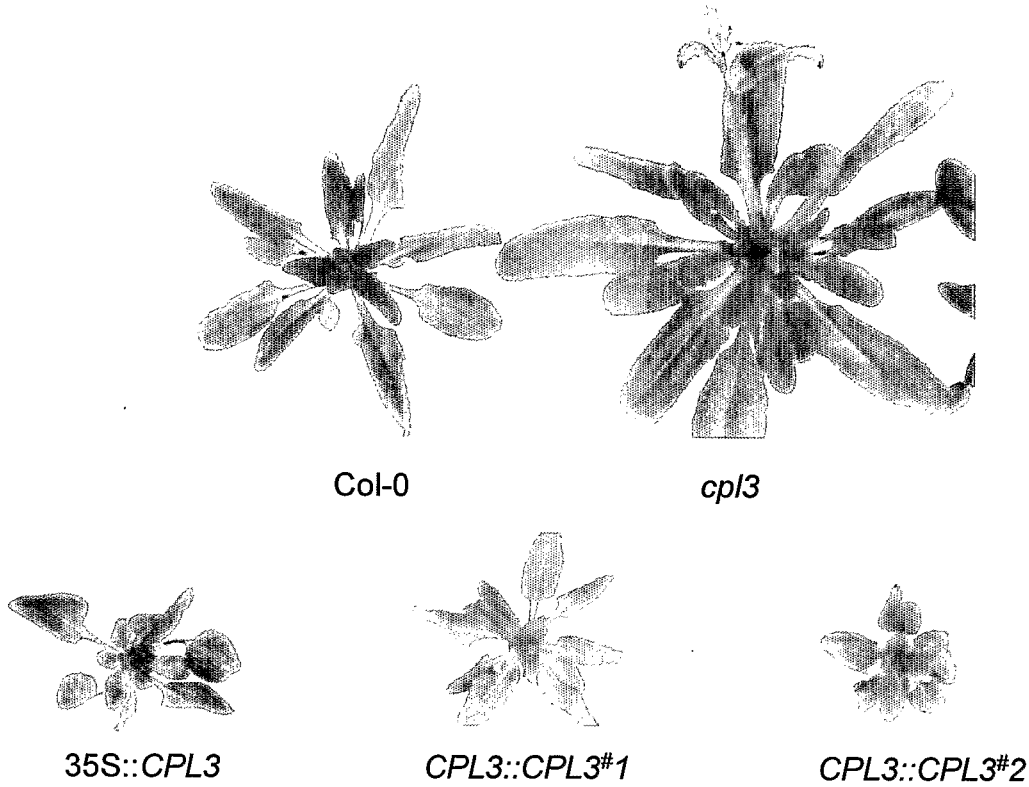
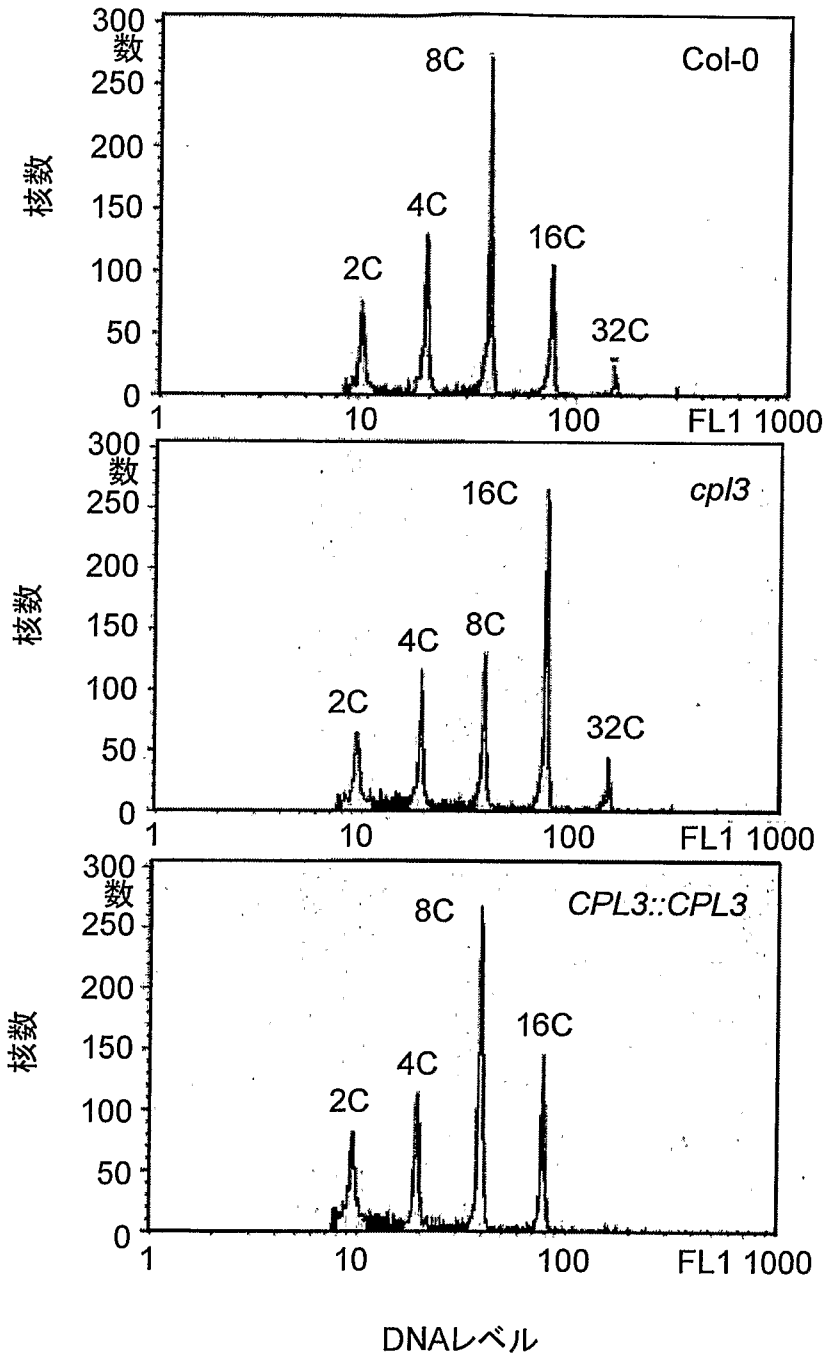


図 7


核数
300
250
200
150
100
50
0
1
10
100
FL1 1000
Col-0
2C
4C
8C
16C
32C
cpl3
CPL3::CPL3
DNAレベル

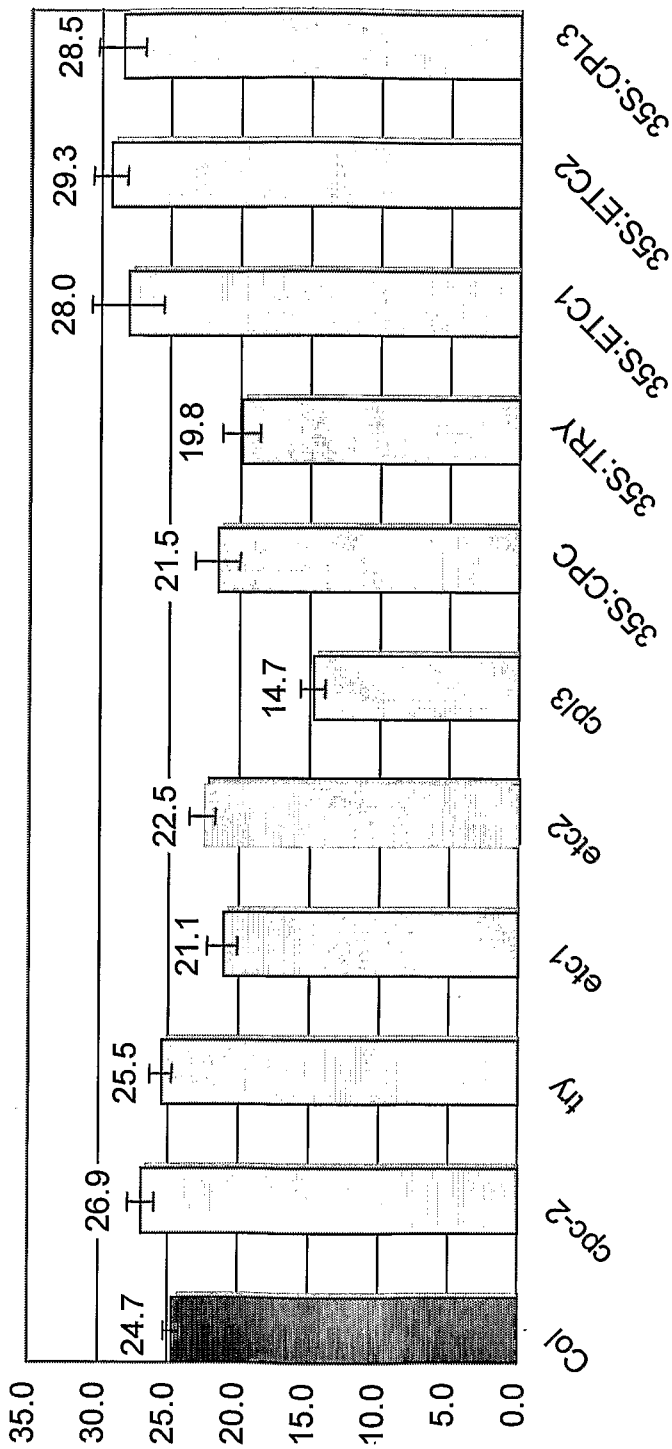

35.0
30.0
25.0
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
Col
cpc-2
try
etc1
etc2
cpl3
35S:CPC
35S:TRY
35S:ETC1
35S:ETC2
35S:CPL3
24.7
26.9
25.5
21.1
22.5
14.7
21.5
19.8
28.0
29.3
28.5

図8

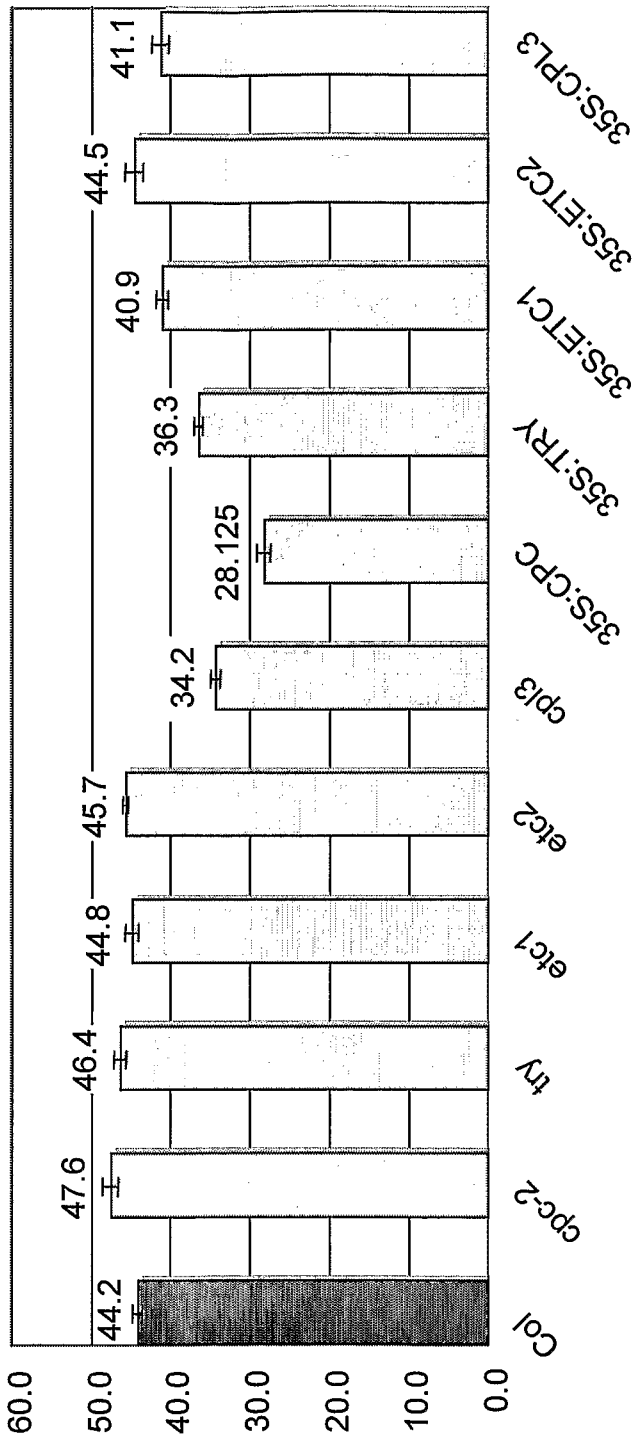

60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
Col
cpc-2
try
etc1
etc2
cpl3
35S:CPC
35S:TRY
35S:ETC1
35S:ETC2
35S:CPL3
44.2
47.6
46.4
44.8
45.7
34.2
28.125
36.3
40.9
44.5
41.1

図 9

図１０

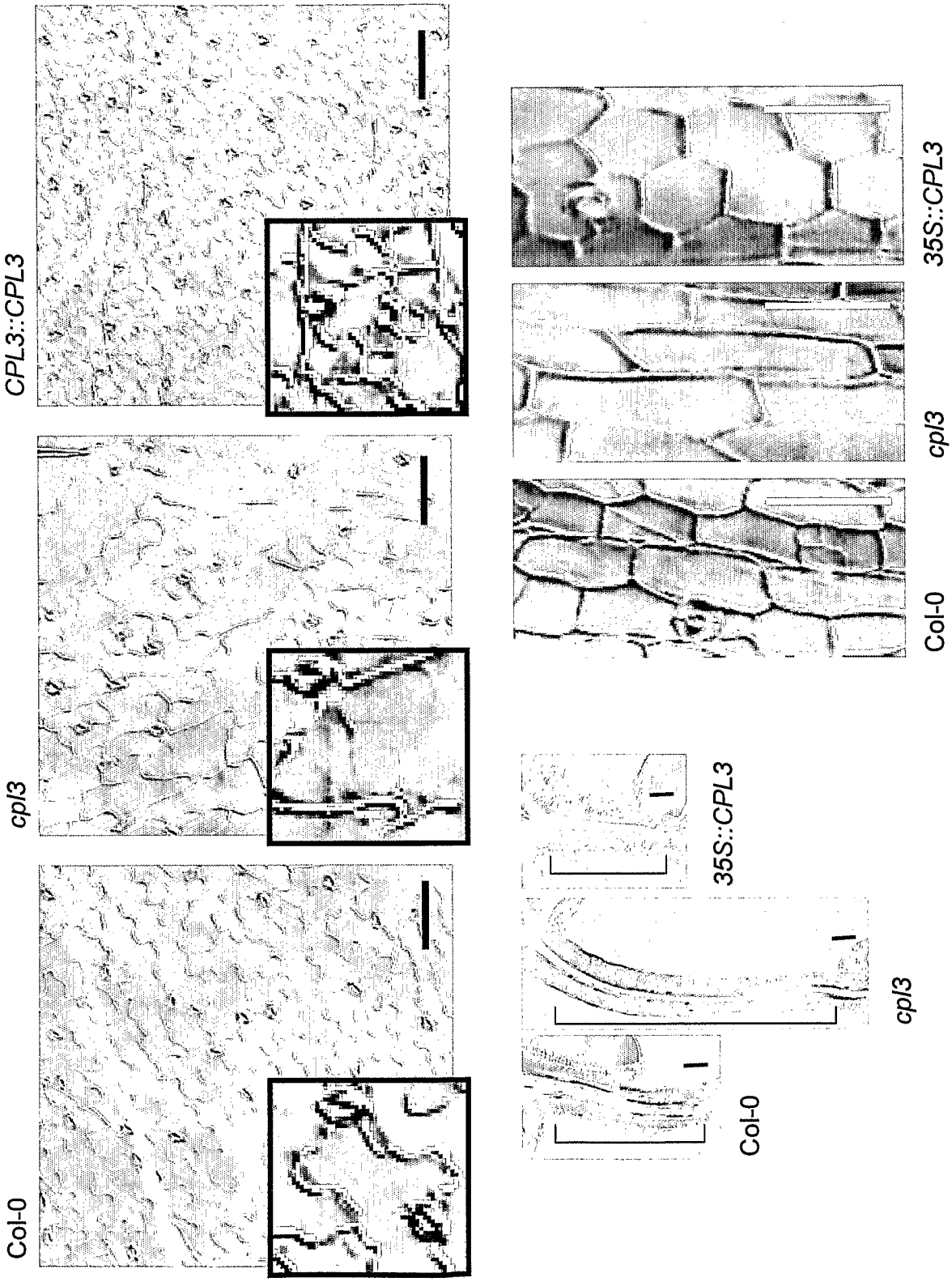


図１１

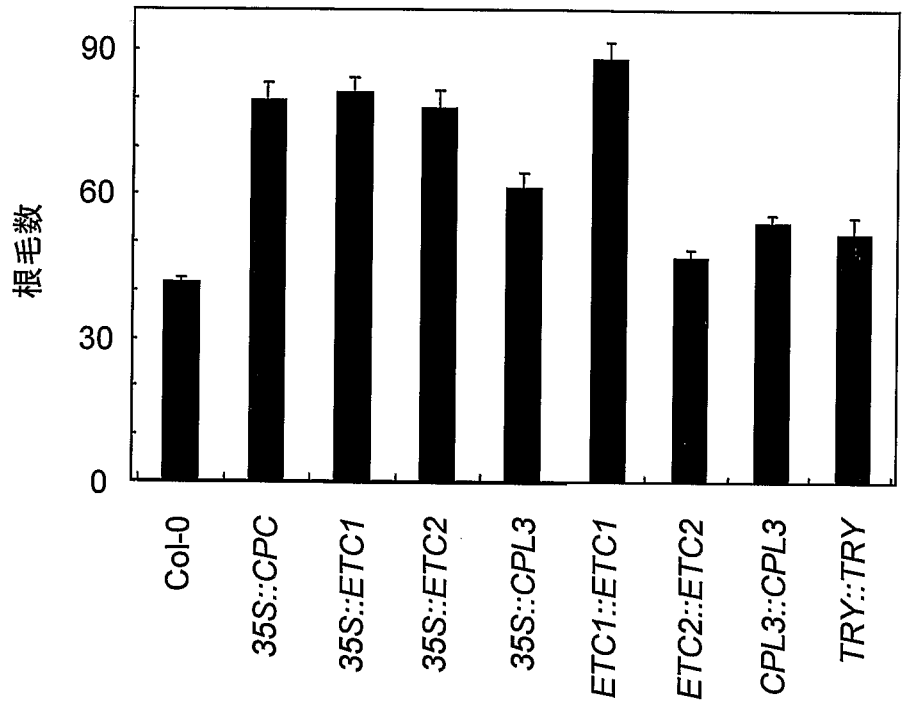

根毛数
90
60
30
0
Col-0
35S::CPC
35S::ETC1
35S::ETC2
35S::CPL3
ETC1::ETC1
ETC2::ETC2
CPL3::CPL3
TRY::TRY

図１２

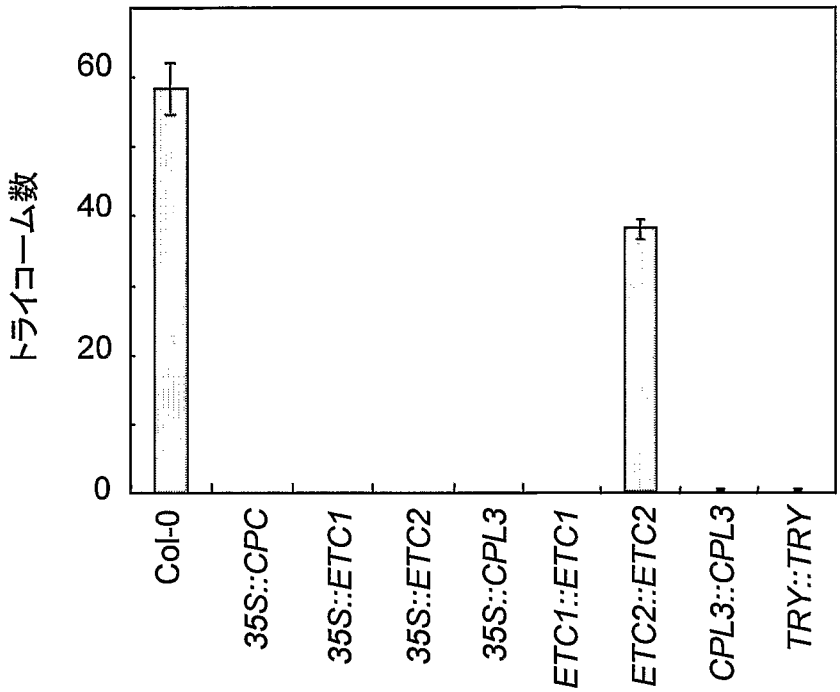

トライコーム数
60
40
20
0
Col-0
35S::CPC
35S::ETC1
35S::ETC2
35S::CPL3
ETC1::ETC1
ETC2::ETC2
CPL3::CPL3
TRY::TRY

図13

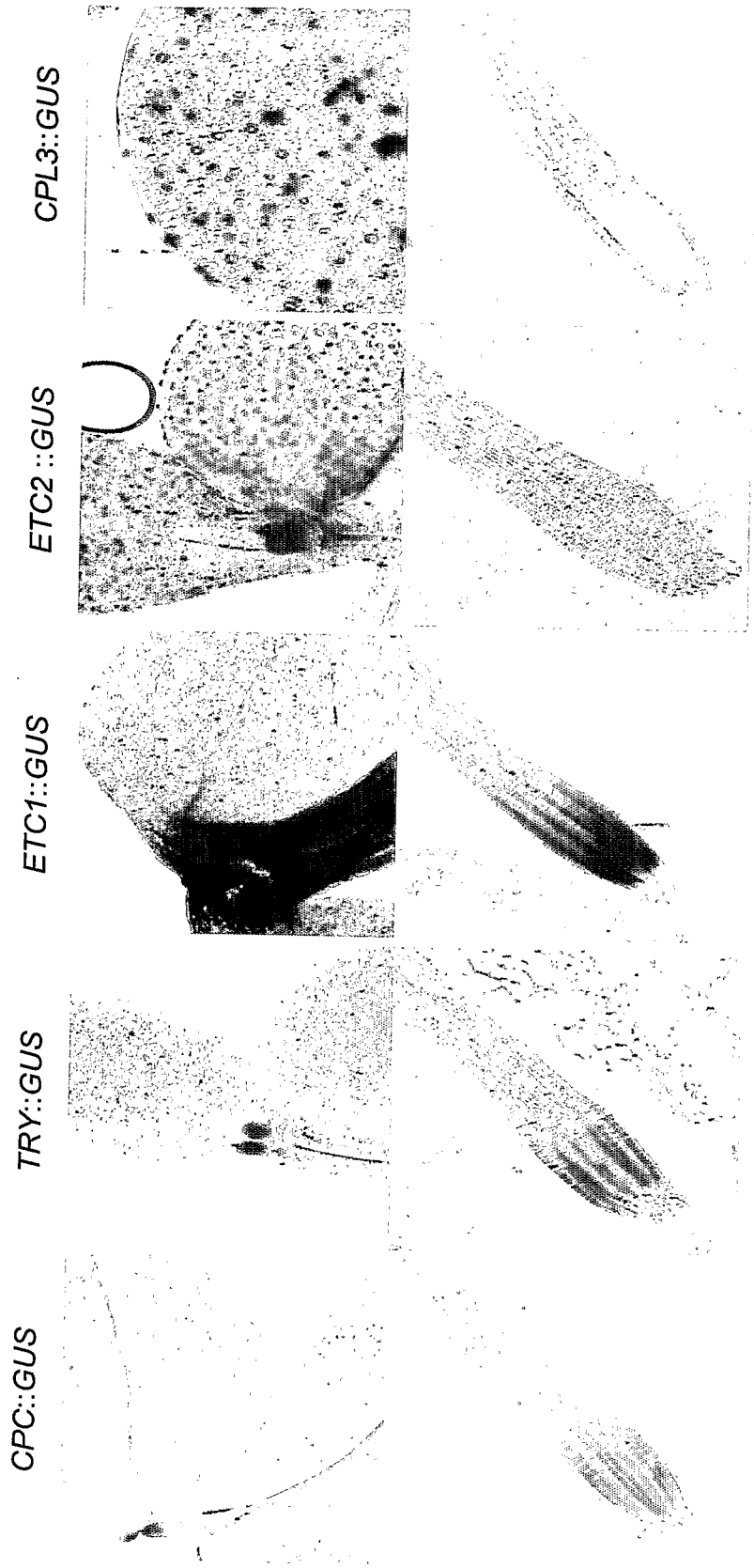


図１４

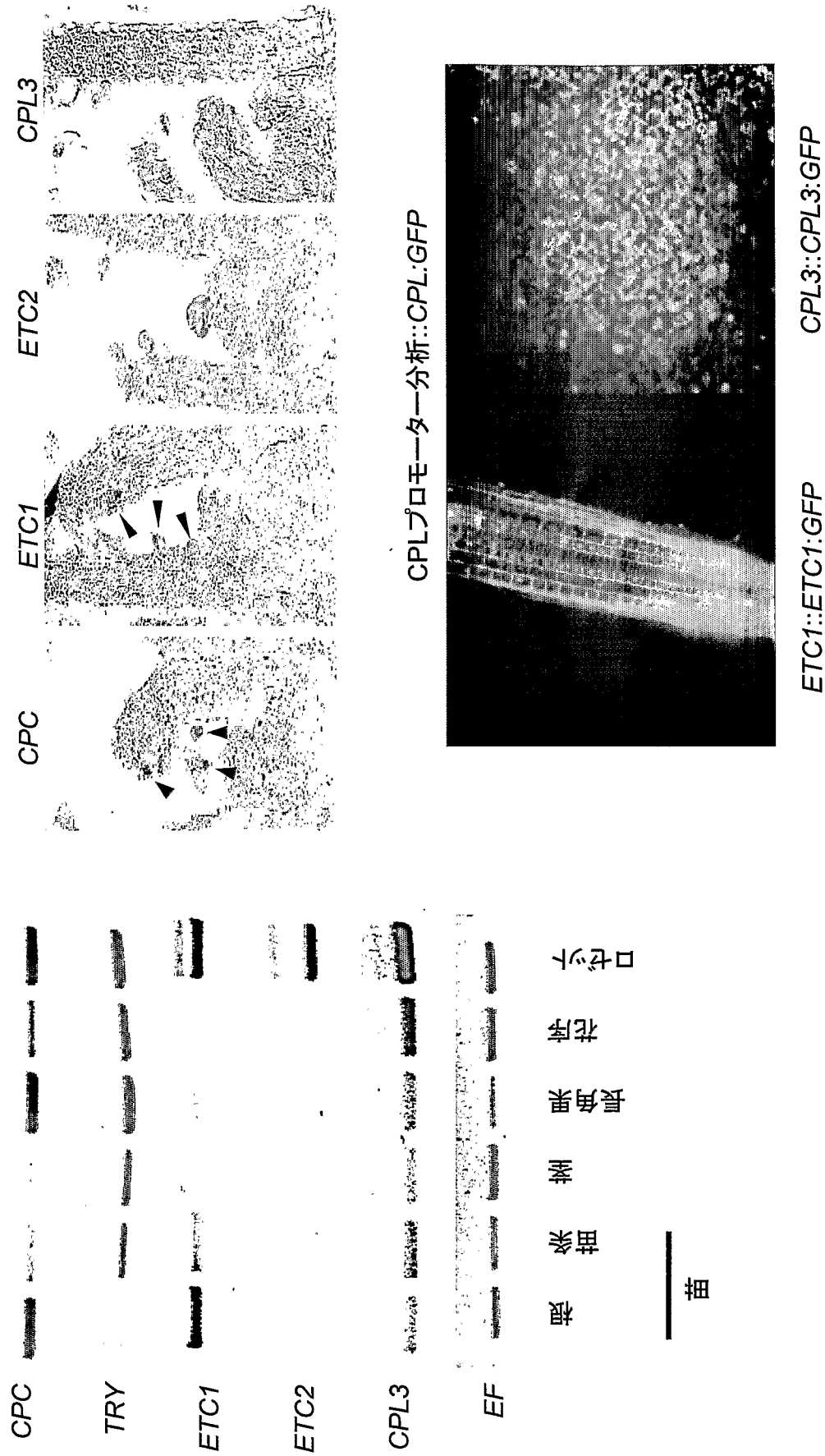
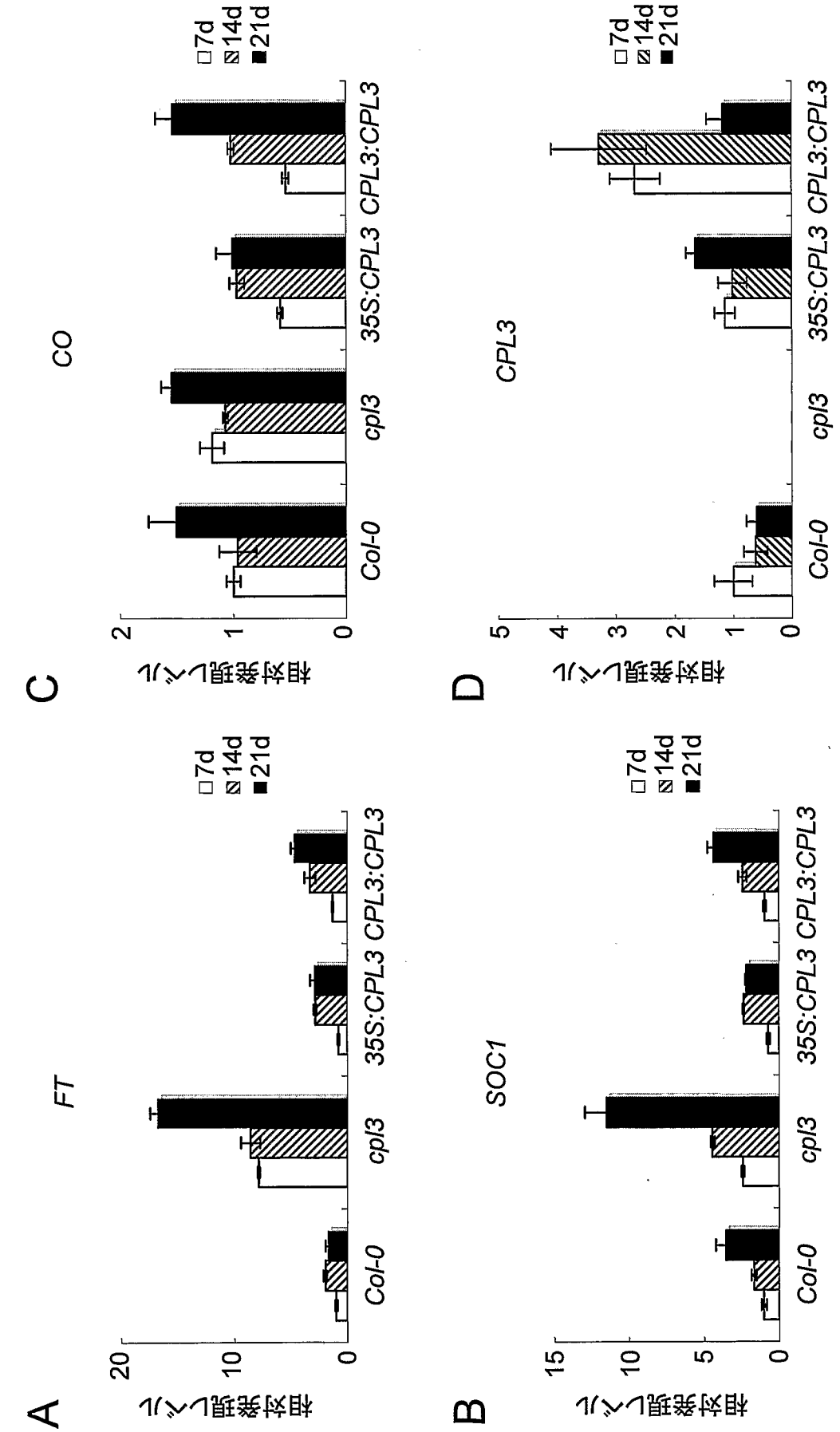

RT-PCR分析
CPC
TRY
ETC1
ETC2
CPL3
EF
根
茎葉
茎
長角果
花序
ロゼット
雌
In situ ハイブリダイゼーションパターン
CPC
ETC1
ETC2
CPL3
CPLプロモーター分析::CPL:GFP
ETC1::ETC1:GFP
CPL3::CPL3:GFP

図15


A
FT
相対発現レベル
20
10
0
□7d
▨14d
■21d
Col-0
cpl3
35S:CPL3
CPL3:CPL3
B
SOC1
相対発現レベル
15
10
5
0
C
CO
相対発現レベル
2
1
0
D
CPL3
相対発現レベル
5
4
3
2
1
0

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2007/070396

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N15/29(2006.01)i, *A01H1/00*(2006.01)i, *A01H5/00*(2006.01)i, *C07K14/415*(2006.01)n

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)
C12N15/00-15/90, A01H1/00, A01H5/00, C07K14/415, C12N5/00-5/10

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPIDS(STN), BIOSIS(STN), MEDLINE(STN), AGRICOLA(STN), BIOENG(STN), CA(STN), CABA(STN), CONFSCI(STN), CROPU(STN), SCISEARCH(STN), JSTPlus(JDreamII),

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	Mineko IWATA, et al., "Shiroinunazuna no Hyohi Saibo Bunka ni Kan'yo suru MYB Idenshi no Kaiseki", Dai 45 Kai The Japanese Society of Plant Physiologists Nenkai Yoshishu, 20 March, 2004 (20.03.04), page 211. (Abstract 3aE06(437))	1-8/9-12
X/A	US 2004/0006797 A1 (SHI L et al.), 08 January, 2004 (08.01.04), Seq ID: 3, 15; example 1; table 1; Claims 11, 13 (Family: none)	1-8/9-12
X/A	KIRIK V et al., The ENHANCER OF TRY AND CPC1 gene acts redundantly with TRIPTYCHON and CAPRICE in trichome and root hair cell patterning in Arabidopsis., Dev. Biol., 2004, vol. 268, 506-513.	1-8/9-12

☒ 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
05 November, 2007 (05.11.07)	13 November, 2007 (13.11.07)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2007/070396

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	SIMON M and SCHIEFELBEIN J, Role of the CAPRICE family of myb genes in root epidermal development., 16th International conference on Arabidopsis research, 2005, TAIR accession: 501716944, http://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?type=publication&id=501716944	1-8/9-12
X/A	WO 2005/047516 A2 (MENDEL BIOTECHNOLOGY, INC.), 26 May, 2005 (26.05.05), Pages 49 to 54, 261 to 262, 265 to 268; Claims 16 to 22 & EP 1682668 A2	1-8/9-12
X/A	US 2004/0045049 A1 (ZHANG J et al.), 04 March, 2004 (04.03.04), Seq ID: 467, 468, 1808, 1809; Pages 40, 51, 144; Claims 20, 47, 52 & US 2007/0061911 A1	1-8/9-12
X/A	WO 2004/076638 A2 (MENDEL BIOTECHNOLOGY, INC.), 10 September, 2004 (10.09.04), Seq ID: 147, 148; Pages 40 to 43, 80; Claims 20 to 22 & US 2005/0086718 A1 & US 2005/0155117 A1 & US 2006/0242738 A1 & EP 1601758 A2	1-8/9-12
X/A	US 2004/0019927 A1 (SHERMAN B K et al.), 29 January, 2004 (29.01.04), Seq ID: 147, 148; Fig. 3; tables 4, 6; Pages 48, 356 to 357; Claims 1, 15 & US 2006/0162006 A1	1-8/9-12
X/A	US 2003/0229915 A1 (KEDDIE J et al.), 11 December, 2003 (11.12.03), Seq ID 161, 162, Ex. VI (page 14, left column); Claims 7, 8, 10 & US 7223904 B2	1-8/9-12
A	KIRIK V et al., ENHANCER of TRY and CPC2 (ETC2) revealas redundancy in the region-specific control of trichome development in Arabidopsis., Plant Mol. Biol., 2004, vol. 55, p. 389-398.	1-12
P,X	Rumi TOMINAGA, et al., "Shiroinunazuna no Hyohi Saibo Bunka ni Kan'yo suru CPC LIKE MYB Idenshi no Kaiseki", Dai 48 Kai The Japanese Society of Plant Physiologists Nenkai Yoshishu, 15 March, 2007 (15.03.07), page 157. (Abstract 2aB08(263))	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2007/070396

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	TOMINAGA R et al., The CAPRICE-like Myb3 (CPL3) is involved in the determination of epidermal cell fate in Arabidopsis., 18th International conference on Arabidopsis research, 2007.06, TAIR accession: 501722033, http://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?type=publication&id=501722033	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2007/070396

Continuation of B. FIELDS SEARCHED
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

GenBank/EMBL/DDBJ/Geneseq, UniProt/PDB/Geneseq

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２００７／０７０３９６

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N15/29(2006.01)i, A01H1/00(2006.01)i, A01H5/00(2006.01)i, C07K14/415(2006.01)n

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.　C12N15/00 - 15/90, A01H1/00, A01H5/00, C07K14/415, C12N 5/00 - 5/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

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

WPIDS(STN), BIOSIS(STN), MEDLINE(STN), AGRICOLA(STN), BIOENG(STN), CA(STN), CABA(STN), CONFSCI(STN), CROPU(STN), SCISEARCH(STN), JSTPlus(JDreamII)
GenBank/EMBL/DDBJ/Geneseq, UniProt/PDB/Geneseq

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
Ｘ／Ａ	岩田美根子、他, シロイヌナズナの表皮細胞分化に関与するＭＹＢ遺伝子の解析, 第45回日本植物生理学会年会要旨集, 2004.03.20, p. 211. (Abstract 3aE06(437))	1-8/9-12
Ｘ／Ａ	US 2004/0006797 A1 (SHI L et al.) 2004.01.08, Seq ID: 3, 15, Example 1, Table 1, Claim 11 and 13 (ファミリーなし)	1-8/9-12

☑　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
０５．１１．２００７	１３．１１．２００７

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　３５３７
中村　正展
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８

C（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
X／A	KIRIK V et al., The ENHANCER OF TRY AND CPC1 gene acts redundantly with TRIPTYCHON and CAPRICE in trichome and root hair cell patterning in Arabidopsis., Dev. Biol., 2004, vol. 268, 506-513.	1-8/9-12
X／A	SIMON M and SCHIEFELBEIN J, Role of the CAPRICE family of myb genes in root epidermal development., 16th International conference on Arabidopsis research, 2005, TAIR accession: 501716944, http://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?type=publication&id=501716944	1-8/9-12
X／A	WO 2005/047516 A2 (MENDEL BIOTECHNOLOGY, INC.) 2005.05.26, p. 49-54, 261-262, 265-268, claim 16-22 & EP 1682668 A2	1-8/9-12
X／A	US 2004/0045049 A1 (ZHANG J et al.) 2004.03.04, Seq ID: 467, 468, 1808, 1809, p. 40, 51, 144, claim 20, 47, 52 & US 2007/0061911 A1	1-8/9-12
X／A	WO 2004/076638 A2 (MENDEL BIOTECHNOLOGY, INC.) 2004.09.10, Seq ID: 147, 148, p. 40-43, 80, claim 20-22 & US 2005/0086718 A1 & US 2005/0155117 A1 & US 2006/0242738 A1 & EP 1601758 A2	1-8/9-12
X／A	US 2004/0019927 A1 (SHERMAN B K et al.) 2004.01.29, Seq ID: 147, 148, Fig. 3, Table 4, 6, p. 48, 356-357, claim 1, 15 & US 2006/0162006 A1	1-8/9-12
X／A	US 2003/0229915 A1 (KEDDIE J et al.) 2003.12.11, Seq ID 161, 162, Ex. VI (p. 14 left column), claim 7, 8, 10 & US 7223904 B2	1-8/9-12

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
Ａ	KIRIK V et al., ENHANCER of TRY and CPC2 (ETC2) revealas redundancy in the region-specific control of trichome development in Arabidopsis., Plant Mol. Biol., 2004, vol. 55, p. 389-398.	1-12
ＰＸ	冨永るみ、他, シロイヌナズナの表皮細胞分化に関与するCPC LIKE MYB遺伝子の解析, 第48回日本植物生理学会年会要旨集, 2007.03.15, p. 157. (Abstract 2aB08(263))	1-12
ＰＸ	TOMINAGA R et al., The CAPRICE-like Myb3 (CPL3) is involved in the determination of epidermal cell fate in Arabidopsis., 18th International conference on Arabidopsis research, 2007.06, TAIR accession: 501722033, http://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?type=publication&id=501722033	1-12

第Ⅰ欄　ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第１ページの１．ｃの続き）

１．この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

ａ．タイプ
- ☑ 配列表
- ☐ 配列表に関連するテーブル

ｂ．フォーマット
- ☐ 紙形式
- ☑ 電子形式

ｃ．提出時期
- ☐ 出願時の国際出願に含まれていたもの
- ☑ この国際出願と共に電子形式により提出されたもの
- ☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出されたもの

２．☑ さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

３．補足意見：