

(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
2017 年 9 月 14 日(14.09.2017)



(10) 国際公開番号
WO 2017/155048 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *A01H 1/00* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2017/009516
- (22) 国際出願日: 2017 年 3 月 9 日(09.03.2017)
- (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 2016-047311 2016 年 3 月 10 日(10.03.2016) JP
- (71) 出願人: 国立研究開発法人産業技術総合研究所
(NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒1008921 東京都千代田区霞が関 1 丁目 3 番 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 大島 良美(OSHIMA Yoshimi); 〒3058566 茨城県つくば市東 1-1-1 中央第 6 国立研究開発法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP).
光田 展隆(MITSUDA Nobutaka); 〒3058566 茨城県つくば市東 1-1-1 中央第 6 国立研究開発法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, 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))

(54) Title: METHOD FOR PREVENTING DETERIORATION OF SEEDS

(54) 発明の名称: 種子の劣化を抑制する方法

(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing: a seed having high storage ability by accumulating cuticula, which is a substance capable of protecting the surface of a plant, in the surface part of the seed at a high level; and a plant of which seeds have improved storage capability. Provided is a method for increasing the accumulation of cuticula in a seed coat by expressing a transcription regulation factor encoded by "LMI2 gene" or "MYB16 gene" or "MYB106 gene" originated from a plant *Arabidopsis thaliana* or a homologue of the transcription regulation factor in a plant of interest under the control of a promoter originated from CYP77A6 gene.

(57) 要約: 本発明の課題は、植物の表面を保護するクチクラを種子の表面に高蓄積させることによる保存性の高い種子の提供、及び種子の保存能力を高めた植物を提供することにある。対象とする植物において、シロイヌナズナ由来の「LMI2 遺伝子」又は「MYB16 遺伝子」又は「MYB106 遺伝子」によりコードされる転写制御因子、又はそのホモログを、CYP77A6 遺伝子由来プロモータの制御下で発現させることにより種皮へのクチクラの蓄積を増加させる方法を提供する。



WO 2017/155048 A1

明 細 書

発明の名称： 種子の劣化を抑制する方法

技術分野

[0001] 本発明は、植物において特定の転写制御因子の発現を強化させることにより、種皮にクチクラを高蓄積させて種子の劣化を抑制する方法、及び劣化が抑制された種子を産生する植物の生産方法に関する。

背景技術

[0002] 種子は植物の繁殖手段として農業上または種の保存の観点から重要であり、さらに種子そのものが食糧や飼料として欠かすことができない。これまでに、作物の栽培、育種、植物研究などを目的として、種子を劣化させずに発芽能力と生育特性を保った状態で保存、運搬するための技術開発や生理学的研究が広く行われてきた。種子の劣化とは、湿度、温度、酸素、二酸化炭素、紫外線等の環境ストレスや病原菌、害虫などの生物ストレスにさらされたことにより、酸化ストレスや傷、電解質流出、DNAの損傷、膜の分解等が起こることである。種子の劣化を防ぐため、種子は種皮によって保護され、抗酸化物質を蓄積したり、代謝活性を低下させたりするほか、損傷の修復機構が備わっているが、植物種や遺伝的な要因により保存可能期間は大きく異なる。熱帯性の植物に多いレカルシトラント種子は冷却や乾燥に弱い。それに対して、その他の多くの種子はオーソドックス種子と呼ばれ、低温・低湿条件下で寿命を延ばすことができる。一般的には湿度が1%下がる、または5.6℃下がるごとに保存性は2倍に上昇すると言われており、厳密な相対湿度と温度の管理が望ましい。また、高酸素圧やカビ等の発生は寿命を縮める原因となるため、各国のジーンバンクでは殺菌処理及び密閉容器による保存が行われている。ジーンバンクで行われるような温度、湿度管理のもと、種子を保存することは活性を保ったまま最大限寿命を延ばすためには重要であるが、一方で設備コストがかかるため多量に保管することは難しい。農業上の保存は、例えば穀類の場合、水分含量12～13%、常温で、もしくは夏場は冷温庫で

一年程度の保存が目標とされている。多くの植物種に対して種子の保存条件の検討が行われ、農業上や長期保存に適した手法が開発されてきた。しかし、これまでの経験や知見に基づいた方法では未だ十分な保存期間を確保できない植物も数多く存在する。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1 : WO 2 0 0 7 / 1 0 2 3 4 6

非特許文献

[0004] 非特許文献1 : Plant Physiology, 2000 122, 403-413

非特許文献2 : The Plant Cell, 2007 19, 351-368

非特許文献3 : Yoshimi Oshima, Masahito Shikata, Tomotsugu Koyama, Norihiro Ohtsubo, Nobutaka Mitsuda, Masaru Ohme-Takagi, The Plant Cell, 2013, 25, 1609-1624

非特許文献4 : Yoshimi Oshima, Nobutaka Mitsuda, Plant Signaling & Behavior, 2013, 8, e26826

非特許文献5 : Plant Physiology, 2009 151, 1773-1789

非特許文献6 : Molecular plant, 2010 3, 563-575

非特許文献7 : Development, 2011 138, 3189-3198

非特許文献8 : 大島良美、鳴海貴子、高木優、光田展隆、花芽発生を制御する転写因子LMI2の未熟種子クチクラ形成における機能、第55回日本植物生理学会年会、2014, 3月

非特許文献9 : 大島良美、鳴海貴子、金子康子、石川寿樹、川合真紀、高木優、光田展隆、花芽発生を制御する転写因子LATE MERISTEM IDENTITY 2のクチクラ形成における機能、第56回日本植物生理学会年会、2015, 3月

非特許文献10 : Yoshimi Oshima, Nobutaka Mitsuda, Masaru Nakata, Tsuyoshi Nakagawa, Shingo Nagaya, Ko Kato, Masaru Ohme-Takagi, Plant Biotechnology, 2011, 28, 201-210

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 植物の種皮は抗酸化物質（色素）、脂質性ポリエステル層、二次細胞壁を含んでいることにより水分、酸素、二酸化炭素、紫外線などの透過を制限し、内部の胚を守っていることが知られている。その中でも主要な役割を果たすと考えられているのは色素とスベリンであり、色素の合成が出来なくなる変異体や外側の細胞層の分化（脂質性ポリエステル層スベリンと二次細胞壁を含む）が異常になる変異体種子は野生型と比べて容易に劣化する（非特許文献1）。スベリンの合成酵素の変異体では、種子の水分透過性が上昇する（非特許文献2）。しかし、色素やスベリンの合成酵素遺伝子を導入し、これらの構造を増強して種子劣化を防いだという報告はなく、色素やスベリンなどの生合成には複数の遺伝子が関わることから単一遺伝子を高発現させても期待した効果が得られなかった可能性が高い。劣化防止に利用する為には、適切な組成でそれぞれの単量体を蓄積、重合させる必要があると考えられ、容易ではない。

このように、種子の保護組織を改変するのは容易ではなく、保存方法も限られている。

本発明においては、種子表面にクチクラを高蓄積させることにより、外部環境による種子の劣化を抑える技術を提供することを目的とする。種子の品質を維持する方法の開発により作物の生産や交配育種による新品種の開発、希少種の保存、豆類、穀類、ナッツ、油糧作物等の品質維持に貢献できる。

課題を解決するための手段

[0006] クチクラは植物の地上部のほとんどすべてを覆っている構造で、植物を乾燥、汚れ、強光、病原菌や害虫から守っている。クチクラはワックスと脂質性ポリエステルのクチン、芳香族化合物などから構成されており、ワックスは食品加工、化粧品、工業品にも使われる。未熟種子の最外層にもクチクラが形成され、種子の発達過程で種子同士や種子と果実内部の癒着を防ぐ働きが知られている（非特許文献5、非特許文献6）。しかし、成熟種子での機

能は知られておらず、種子の保存性に寄与するとは考えられてこなかった。

本発明者らはシロイヌナズナの転写因子遺伝子について広く検討する中で、MYB転写制御因子遺伝子ファミリーに属するMYB16とMYB106転写因子がクチクラの形成を制御することを発見した（非特許文献3、非特許文献4）。これらの転写因子にヘルペスウイルス由来の強力な転写活性化ドメインを融合した活性強化タイプのMYB16-VP16やMYB106-VP16を植物全身で発現させると、クチクラ形成に必要な一群の酵素群及びトランスポーターなどの発現を介して葉の表面に葉に見られるタイプのワックスや花卉特有のクチクラを蓄積させることができた。このことから、MYB16及びMYB106転写因子には、クチクラ形成に必要な一連の遺伝子発現を誘導することで機能的なクチクラを高蓄積させる機能があることを解明した。

[0007] MYB16、MYB106転写因子は、MYBファミリーのうちでもR2R3MYBサブグループ9に属するが、当該サブグループには、花芽の分化を制御するLMI2転写因子（非特許文献7）も含まれる。LMI2転写因子は、サブグループ内のクレードがMYB16、MYB106とは異なっており、タンパク質ドメインの構造もMYB16及びMYB106とは大きく異なる為、タンパク質機能も異なると考えられていた（非特許文献3）。

本発明者らは、以前、LMI2転写因子の機能解明のため、LMI2遺伝子に強力な転写抑制ドメインを融合して恒常的に発現させることにより機能欠損の表現型を誘導した植物を作成したところ、予想に反して葉やつぼみ表面の癒着や水分透過性の上昇、エピクチクラワックスの減少などクチクラ減少の表現型を示すことを見出した。さらに、LMI2の遺伝子破壊株lmi2-2は種子の表面が癒着し、未熟種皮表面のクチクラが薄くなり、水分透過性が上昇したことから、LMI2遺伝子は種子のクチクラの形成に不可欠な遺伝子であることも見出した（非特許文献8、非特許文献9）。

これらのことから、LMI2転写因子もMYB16、MYB106転写因子と同様に、植物内で高発現させることにより機能的なクチクラを高蓄積させる可能性があることが期待される転写因子であるといえる。

[0008] 本発明者らは、前記課題を解決するために、LMI2転写因子などを種子特異的に発現させることで、種子表面のクチクラ形成を増強することができれば、クチクラによる種子表面の保護作用により種子の劣化を防げるのではないかと発想した。

しかしながら、種子でのクチクラ形成には種々の一連の遺伝子が関わっており、LMI2遺伝子のみを高発現させたからといって、果たしてクチクラを高蓄積できるのかすら不明な状況であり、しかも種子表面のみでの高蓄積が可能か否かは全くわからなかった。確かに、同じR2R3MYBサブグループ内のMYB16、MYB106転写因子の発現によって、葉や花弁内でクチクラの高蓄積に成功していたといっても、種子の場合は、単なる植物小器官の葉や花弁とは事情が大きく異なり、次の世代の完全な植物体を形成するための全機能と共に発芽のためのホルモン形成や栄養分の貯蔵機能が凝縮されて詰まっている。そのような種子内で特定の経路の遺伝子を高発現させることにより、望みの機能のみが発現できる確実性は乏しかった。すなわち、仮に種子表面にクチクラが高蓄積するとしても、カーボンリソースがそれに奪われることなどにより、種子本来の重要な機能が損なわれる可能性もあった。

実際、本発明者らはまず、種子特異的にLMI2遺伝子に強力な転写活性化ドメインのVP16を融合したキメラアクティベーター遺伝子が発現させるために、種子全体を含めた植物全身で働くカリフラワーモザイクウイルス由来の35Sプロモータと種皮の発達段階で長く働くABCG12プロモータを試してみたが、種子本来の機能を損なう結果となり、種子数の低下や発芽率の低下を引き起こした。

[0009] そこで、本発明者らは、クチクラ合成経路中の酵素遺伝子であるCYP77A6遺伝子が、植物体内の広範な部位でのクチクラ合成に関わる遺伝子であって、種子特異的とはいえないが、種子内では種皮のみで発現している点とLMI2遺伝子と発現時期が似ている点に注目し、CYP77A6遺伝子由来のプロモータにLMI2-VP16遺伝子を繋ぎ発現させた。

その結果、予想に反し、植物体内の広範な部位でのクチクラ合成はそれほ

ど活発ではないのに対し、種子においては種皮のみでクチクラの高蓄積が起こって種皮のクチクラが厚くなり、種子本来の機能を損なうことなく劣化に強い種子を提供することができた。

以上の知見から、本発明を完成した。

[0010] すなわち、本発明は、以下の発明を包含する。

〔１〕 種皮で特異的にクチクラを蓄積する種子を産生する植物の生産方法であって、

対象植物を、MYB転写制御因子遺伝子ファミリーに属するLMI2、MYB16、及びMYB106転写制御因子並びにそのホモログからなる群より選択される少なくとも一つの転写制御因子をコードする遺伝子を用いて形質転換することを特徴とする、植物の生産方法。

〔２〕 転写制御因子をコードする遺伝子が、転写活性化ドメインをコードする遺伝子と融合されていることを特徴とする前記〔１〕に記載の方法。

〔３〕 転写活性化ドメインをコードする遺伝子がヘルペスウイルス由来VP16遺伝子である、前記〔２〕に記載の方法。

〔４〕 転写制御因子をコードする遺伝子が、形質転換された植物において、当該遺伝子自身のプロモータ又はクチクラ生合成遺伝子由来プロモータの制御下で発現することを特徴とする、前記〔１〕～〔３〕のいずれかに記載の方法。

〔５〕 クチクラ生合成遺伝子由来プロモータが、CYP77A6プロモータ又はそのオルソログ遺伝子のプロモータである前記〔４〕に記載の方法。

〔６〕 転写制御因子が、下記(ア)～(オ)のいずれかに示される転写制御因子である、前記〔１〕～〔５〕のいずれかに記載の方法；

(ア)配列番号１又は１２又は１４に示されるアミノ酸配列からなる転写制御因子、

(イ)配列番号１又は１２又は１４に示されるアミノ酸配列において１若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加しており、かつ、クチクラの形成を制御する活性を有する転写制御因子、

(ウ)配列番号 1 又は 1 2 又は 1 4 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 60% の同一性を有するアミノ酸配列からなる転写制御因子であって、かつ、クチクラの形成を制御する活性を有する転写制御因子、

(エ)配列番号 1 0 又は 1 3 又は 1 5 に示される塩基配列によりコードされる転写制御因子、

(オ)配列番号 1 0 又は 1 3 又は 1 5 に示される塩基配列の相補配列とストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズする塩基配列によりコードされる転写制御因子であり、かつ、クチクラの蓄積量を制御する活性を有する転写制御因子。

〔7〕 対象植物の形質転換方法が、種皮で遺伝子発現を誘導するプロモータの下流に、以下の(a)~(o)のいずれかに記載の核酸が作動可能に連結された発現カセットを含むベクターを用いることを特徴とする、前記〔1〕~〔6〕のいずれかに記載の方法；

(a) 配列番号 1 に示される第一のアミノ酸配列と配列番号 2 に示される第二のアミノ酸配列とが連結したアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする核酸、

(b) 前記(a)に記載の核酸において、第一のアミノ酸配列及び／又は第二のアミノ酸配列が、1 若しくは数個のアミノ酸の欠失、置換又は付加を有しており、かつ、クチクラの蓄積量を増加する活性を有するポリペプチドをコードする核酸、

(c) 前記(a)の核酸において、第一のアミノ酸配列及び／又は第二のアミノ酸配列が、配列番号 1 及び／又は配列番号 5 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 60% の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ、クチクラの蓄積量を増加する活性を有するポリペプチドをコードする核酸、

(d) 配列番号 1 0 に示される第一の塩基配列と配列番号 1 1 に示される第二の塩基配列とが連結した塩基配列からなる核酸、

(e) 前記(d)の核酸において、第一の塩基配列及び／又は第二の塩基配列が、配列番号 1 0 及び／又は配列番号 1 1 に示される塩基配列の相補配列と

ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列であり、かつ、クチクラの蓄積量を増加する活性を有するポリペプチドをコードする核酸、

(f) 配列番号 1 2 に示される第一のアミノ酸配列と配列番号 2 に示される第二のアミノ酸配列とが連結したアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする核酸、

(g) 前記(f)に記載の核酸において、第一のアミノ酸配列及び／又は第二のアミノ酸配列が、1 若しくは数個のアミノ酸の欠失、置換又は付加を有しており、かつ、クチクラの蓄積量を増加する活性を有するポリペプチドをコードする核酸、

(h) 前記(f)の核酸において、第一のアミノ酸配列及び／又は第二のアミノ酸配列が、配列番号 1 2 及び／又は配列番号 2 に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ、クチクラの蓄積量を増加する活性を有するポリペプチドをコードする核酸、

(i) 配列番号 1 3 に示される第一の塩基配列と配列番号 1 1 に示される第二の塩基配列とが連結した塩基配列からなる核酸、

(j) 前記(i)の核酸において、第一の塩基配列及び／又は第二の塩基配列が、配列番号 1 3 及び／又は配列番号 1 1 に示される塩基配列の相補配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列であり、かつ、クチクラの蓄積量を増加する活性を有するポリペプチドをコードする核酸、

(k) 配列番号 1 4 に示される第一のアミノ酸配列と配列番号 2 に示される第二のアミノ酸配列とが連結したアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする核酸、

(l) 前記(k)に記載の核酸において、第一のアミノ酸配列及び／又は第二のアミノ酸配列が、1 若しくは数個のアミノ酸の欠失、置換又は付加を有しており、かつ、クチクラの蓄積量を増加する活性を有するポリペプチドをコードする核酸、

(m) 前記(k)の核酸において、第一のアミノ酸配列及び／又は第二のアミノ酸配列が、配列番号 1 4 及び／又は配列番号 2 に示されるアミノ酸配列と

少なくとも60%の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ、クチクラの蓄積量を増加する活性を有するポリペプチドをコードする核酸、

(n) 配列番号13に示される第一の塩基配列と配列番号11に示される第二の塩基配列とが連結した塩基配列からなる核酸、

(o) 前記(n)の核酸において、第一の塩基配列及び／又は第二の塩基配列が、配列番号13及び／又は配列番号11に示される塩基配列の相補配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列であり、かつ、クチクラの蓄積量を増加する活性を有するポリペプチドをコードする核酸。

[0011] [8] 種皮で特異的にクチクラを蓄積する種子を産生する植物を生産するための発現カセットであって、種皮で遺伝子発現を誘導するプロモータの制御下にMYB転写制御因子遺伝子ファミリーに属するLMI2、MYB16、及びMYB106転写制御因子並びにそのホモログからなる群より選択される少なくとも一つの転写制御因子をコードする遺伝子を含む、発現カセット。

[9] 転写制御因子をコードする遺伝子が、転写活性化ドメインをコードする遺伝子と融合されていることを特徴とする前記[8]に記載の発現カセット。

[10] 種皮で遺伝子発現を誘導するプロモータが、前記転写制御因子遺伝子由来のプロモータ又はクチクラ生合成遺伝子由来プロモータの制御下で発現することを特徴とする、前記[8]又は[9]に記載の発現カセット。

[11] クチクラ生合成遺伝子由来プロモータが、CYP77A6プロモータ又はそのオルソログ遺伝子のプロモータである前記[10]に記載の発現カセット。

[12] 発現カセットが、種皮で遺伝子発現を誘導するプロモータの制御下に、以下の(a)～(o)のいずれかに記載の核酸が作動可能に連結された発現カセットである、前記[8]～[11]のいずれかに記載の発現カセット；

(a) 配列番号1に示される第一のアミノ酸配列と配列番号2に示される第二のアミノ酸配列とが連結したアミノ酸配列からなるポリペプチドをコード

する核酸、

(b) 前記(a)に記載の核酸において、第一のアミノ酸配列及び／又は第二のアミノ酸配列が、1若しくは数個のアミノ酸の欠失、置換又は付加を有しており、かつ、クチクラの蓄積量を増加する活性を有するポリペプチドをコードする核酸、

(c) 前記(a)の核酸において、第一のアミノ酸配列及び／又は第二のアミノ酸配列が、配列番号1及び／又は配列番号2に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ、クチクラの蓄積量を増加する活性を有するポリペプチドをコードする核酸、

(d) 配列番号2に示される第一の塩基配列と配列番号6に示される第二の塩基配列とが連結した塩基配列からなる核酸、

(e) 前記(d)の核酸において、第一の塩基配列及び／又は第二の塩基配列が、配列番号10及び／又は配列番号11に示される塩基配列の相補配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列であり、かつ、クチクラの蓄積量を増加する活性を有するポリペプチドをコードする核酸、

(f) 配列番号12に示される第一のアミノ酸配列と配列番号2に示される第二のアミノ酸配列とが連結したアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする核酸、

(g) 前記(f)に記載の核酸において、第一のアミノ酸配列及び／又は第二のアミノ酸配列が、1若しくは数個のアミノ酸の欠失、置換又は付加を有しており、かつ、クチクラの蓄積量を増加する活性を有するポリペプチドをコードする核酸、

(h) 前記(f)の核酸において、第一のアミノ酸配列及び／又は第二のアミノ酸配列が、配列番号12及び／又は配列番号2に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ、クチクラの蓄積量を増加する活性を有するポリペプチドをコードする核酸、

(i) 配列番号13に示される第一の塩基配列と配列番号11に示される第二の塩基配列とが連結した塩基配列からなる核酸、

(j) 前記(i)の核酸において、第一の塩基配列及び／又は第二の塩基配列が、配列番号13及び／又は配列番号11に示される塩基配列の相補配列とストリンジントな条件下でハイブリダイズする塩基配列であり、かつ、クチクラの蓄積量を増加する活性を有するポリペプチドをコードする核酸、

(k) 配列番号14に示される第一のアミノ酸配列と配列番号2に示される第二のアミノ酸配列とが連結したアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする核酸、

(l) 前記(k)に記載の核酸において、第一のアミノ酸配列及び／又は第二のアミノ酸配列が、1若しくは数個のアミノ酸の欠失、置換又は付加を有しており、かつ、クチクラの蓄積量を増加する活性を有するポリペプチドをコードする核酸、

(m) 前記(k)の核酸において、第一のアミノ酸配列及び／又は第二のアミノ酸配列が、配列番号14及び／又は配列番号2に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ、クチクラの蓄積量を増加する活性を有するポリペプチドをコードする核酸、

(n) 配列番号13に示される第一の塩基配列と配列番号11に示される第二の塩基配列とが連結した塩基配列からなる核酸、

(o) 前記(n)の核酸において、第一の塩基配列及び／又は第二の塩基配列が、配列番号13及び／又は配列番号11に示される塩基配列の相補配列とストリンジントな条件下でハイブリダイズする塩基配列であり、かつ、クチクラの蓄積量を増加する活性を有するポリペプチドをコードする核酸。

〔13〕 前記〔8〕～〔12〕のいずれかに記載の発現カセットを含むベクター。

〔14〕 前記〔13〕に記載のベクターを含むキット。

発明の効果

[0012] 本発明の植物の生産方法によれば、「LMI2遺伝子」又は「MYB16遺伝子」又は「MYB106遺伝子」によりコードされる転写制御因子又はそのホモログの機能を強化することでクチクラを厚くし、劣化しにくい種子を有する植物を生

産することが可能となる。これにより、種子の保存期間の延長や冷蔵庫などを使用しない保存方法を採用することができる。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]図1はシロイヌナズナ野生株 (Wild-type)、35S:LMI2-SRDX株 (LMI2転写因子にSRDX転写抑制ドメインを付加してカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモータによりシロイヌナズナにおいて発現させた株)の葉の表面の癒着 (A, B)、つぼみ内部の癒着 (C, D)、つぼみ外部の癒着 (E, F)、エピクチクラワックスの蓄積 (G, H)、トルイジンブルー染色 (I, J) を、観察した画像を示す。野生株は葉や花器官の癒着が見られないのに対し、35S:LMI2-SRDX株では葉や花器官の癒着が見られた。茎表面の走査型電子顕微鏡観察を行うと、野生株ではエピクチクラワックスの白い結晶が多く見られたのに対し、35S:LMI2-SRDX株では減少していた。機能的なクチクラを有する野生株は水溶性の染色液であるトルイジンブルーを組織内部に吸収しない為、染色されないのに対し、35S:LMI2-SRDX株はトルイジンブルーにより青く染色された。すなわち、35S:LMI2-SRDX株のクチクラの機能的な欠損とクチクラワックスの減少は、LMI2が正常なクチクラ形成を制御する機能を持つことを示している。

[図2]図2はシロイヌナズナ野生株 (Wild-type)、lmi2-2変異株の種子の癒着 (A, B)、未熟種子のトルイジンブルー染色 (C, D)、未熟種皮表皮細胞断面の透過型電子顕微鏡画像 (E, F)、未熟種子表面クチクラの厚さ (G)を示す。野生株は一つ一つ独立した種子を形成するのにに対し、lmi2-2変異株の種子は表面が癒着した。野生型はクチクラが正常である為トルイジンブルーに染色されないのに対し、lmi2-2変異株はトルイジンブルーに染色された。オスミウム染色により黒い層として観察されるクチクラは野生株と比較してlmi2-2では薄い。すなわち、LMI2遺伝子は種子のクチクラ形成に機能する。

[図3]図3は、シロイヌナズナの野生株 (Wild-type)、lmi2-2変異体及びCYP77A6pro:LMI2-VP16株 (LMI2転写因子にVP16転写活性化ドメインを付加してシロイヌナズナCYP77A6プロモータによりシロイヌナズナにおいて発現させた株)の成熟種子断面の走査型電子顕微鏡による反射電子画像を示す。反射電子

像では脂質層が白く見え、表面に存在する白い層がクチクラを示す。野生株に対してlmi2-2変異株ではクチクラが薄くなり、CYP77A6pro:LMI2-VP16株(LMI2-VP16#1, LMI2-VP16#21)ではクチクラが厚くなっていた。

[図4]図4は、シロイヌナズナの野生株(Wild-type)とCYP77A6pro:LMI2-VP16株の人工的に短期間で行う種子劣化処理(A: 相対湿度100%、40℃、3日間)または常温常湿6か月(B)による種子劣化処理後の発芽率を示す。人工的な劣化処理を行わない場合(Control)、野生株、CYP77A6pro:LMI2-VP16株ともに発芽率の低下は見られないが、人工的な劣化処理後、野生株は発芽率が60%程度に低下するのに対し、CYP77A6pro:LMI2-VP16株は90%の発芽率を保っていた。収穫後すぐの発芽率に対する常温常湿6か月保存後の発芽率は野生株に比較してCYP77A6pro:LMI2-VP16株の方が高かった。

発明を実施するための形態

[0014] 以下、本発明をさらに詳細に説明する。

1. 本発明における種皮にクチクラを高蓄積させて劣化を防止した種子、及び当該種子を産生する植物について

(1) 種皮のクチクラを高蓄積させる遺伝子について

本発明において植物に対して種皮のクチクラを高蓄積させて種子の保存性を制御する遺伝子は、典型的には、シロイヌナズナ由来の配列番号10で表される「LMI2遺伝子」又は配列番号13で表される「MYB16遺伝子」又は配列番号15で表される「MYB106遺伝子」である。

LMI2転写因子 (GenBank Accession No.:NM_115989) 並びにMYB16 (GenBank Accession No.:NM_001085120)、MYB106転写因子 (GenBank Accession No.:NM_110979) は、MYBファミリーのR2R3MYBサブグループ9に属する既知の転写因子であり、当該サブグループにはLMI2転写因子が含まれるクレード及びMYB16、MYB106転写因子が含まれるクレードの2種類しか存在しないので、他のR2R3MYBサブグループ9に属する転写因子についても同様の機能が期待できる。また、植物の転写因子群においては、従来から植物間での機能の保存性が高く、同一機能のホモログが存在し、かつ植物種を越えて機能が共有できるこ

とが知られており、本発明においても、例えばイネ由来のOs02g0641900遺伝子や、キンギョソウ由来のAmMIXTA遺伝子などのオルソログ、パラログなどのホモログやその塩基配列の一部に変異が導入されたものも含まれる。そして、当該「LMI2遺伝子」若しくは「MYB16遺伝子」若しくは「MYB106遺伝子」又はそのホモログによりコードされるタンパク質(転写制御因子)の機能を強化することで、種皮のクチクラの生産能が向上した植物を得ることができる。

[0015] 「LMI2遺伝子」と「MYB16遺伝子」及び「MYB106遺伝子」は、全アミノ酸配列同士の一貫性はそれほど高くないが、転写因子機能に関わるとされるアライン可能領域(R2R3-MYBドメイン。LMI2遺伝子産物のアミノ酸配列1番目~183番目の位置。)内のアミノ酸レベルで約65%の一貫性が認められる。これら転写因子はクチクラ形成に関して同じ機能を持っていることから、当該アライン可能領域の配列一貫性の高いシロイヌナズナ又は他の植物ゲノム中の相同遺伝子、又は一部に変異が導入された遺伝子のうちでも当該アライン可能領域の保存性が確保されていれば、同様の機能が期待できる。例えば、イネのOs02g0641900遺伝子などのLMI2遺伝子オルソログなどは同一機能を有すると期待される。

「LMI2遺伝子」又は「MYB16遺伝子」又は「MYB106遺伝子」とアミノ酸レベルで少なくとも60%、好ましくは70%、80%、より好ましくは90%の一貫性を有する類似遺伝子であれば同様に用いられることが明らかである。また同一機能を保持している限り、そのフラグメントでもよい。そのような遺伝子は、アミノ酸配列では配列番号1又は配列番号12又は配列番号14と少なくとも60%、好ましくは70%、80%、より好ましくは90%以上の一貫性を有する。

[0016] 以上のことから、本発明において、種皮特異的にクチクラを蓄積させるために用いる植物転写制御因子は、「MYB転写制御因子遺伝子ファミリーに属するLMI2、MYB16、及びMYB106転写制御因子並びにそのホモログからなる群より選択される少なくとも一つの転写制御因子」と表現することができ、ここでいう「LMI2、MYB16、及びMYB106転写制御因子並びにホモログ」には、前記ア

ライン可能領域が保存されたシロイヌナズナ又は他の植物ゲノム中の相同遺伝子、又は一部に変異が導入された遺伝子と共に、「LMI2遺伝子」又は「MYB16遺伝子」又は「MYB106遺伝子」とアミノ酸レベルで少なくとも60%、好ましくは70%、80%、より好ましくは90%、の同一性を有する類似遺伝子が含まれる。

[0017] (2) 本発明における種皮にクチクラを高蓄積させて劣化を抑えた種子の作成方法

本発明の種皮に増加したクチクラを含有する種子の生産方法は、「LMI2遺伝子」又は「MYB16遺伝子」又は「MYB106遺伝子」によりコードされる転写制御因子の機能を種皮で特異的に高発現させる工程を含み、当該工程によりクチクラを種皮で高蓄積する植物を得ることができる。

[0018] 本発明の種皮で増加したクチクラを含有する種子の生産方法において、機能強化の対象である「LMI2遺伝子」によりコードされる転写制御因子というとき、「LMI2遺伝子」の全長は必要でなく、アライン可能領域が保存されていれば良く、また、上述のように他の植物由来のホモログ遺伝子であっても良い。「LMI2遺伝子」のアミノ酸配列又は塩基配列を用いて表現すれば、例えば、下記(ア)～(オ)のように記載することができる；

(ア) 配列番号1に示されるアミノ酸配列からなる転写制御因子、

(イ) 配列番号1に示されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、クチクラの蓄積を制御する活性を有する転写制御因子、

(ウ) 配列番号1に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%の同一性を有するアミノ酸配列からなる転写因子であって、かつ、クチクラの蓄積を制御する活性を有する転写制御因子。

(エ) 配列番号10に示される塩基配列によりコードされる転写制御因子、

(オ) 配列番号10に示される塩基配列の相補配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列によりコードされる転写制御因子であり、かつ、クチクラの蓄積量を制御する活性を有する転写制御因子。

[0019] 同様に、「MYB16遺伝子」によりコードされる転写制御因子を「MYB16遺伝子」のアミノ酸配列又は塩基配列を用いて表現すれば、例えば、下記(カ)～(コ)のように記載することができる；

(カ) 配列番号 1 2 に示されるアミノ酸配列からなる転写制御因子、

(キ) 配列番号 1 2 に示されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、クチクラの蓄積を制御する活性を有する転写制御因子、

(ク) 配列番号 1 2 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 60% の同一性を有するアミノ酸配列からなる転写因子であって、かつ、クチクラの蓄積を制御する活性を有する転写制御因子。

(ケ) 配列番号 1 3 に示される塩基配列によりコードされる転写制御因子、

(コ) 配列番号 1 3 に示される塩基配列の相補配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列によりコードされる転写制御因子であり、かつ、クチクラの蓄積量を制御する活性を有する転写制御因子。

[0020] 同様に、「MYB106遺伝子」によりコードされる転写制御因子を「MYB106遺伝子」のアミノ酸配列又は塩基配列を用いて表現すれば、例えば、下記(サ)～(ソ)のように記載することができる；

(サ) 配列番号 1 4 に示されるアミノ酸配列からなる転写制御因子、

(シ) 配列番号 1 4 に示されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、クチクラの蓄積を制御する活性を有する転写制御因子、

(ス) 配列番号 1 4 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 60% の同一性を有するアミノ酸配列からなる転写因子であって、かつ、クチクラの蓄積を制御する活性を有する転写制御因子。

(セ) 配列番号 1 5 に示される塩基配列によりコードされる転写制御因子、

(ソ) 配列番号 1 5 に示される塩基配列の相補配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列によりコードされる転写制御因子であり、かつ、クチクラの蓄積量を制御する活性を有する転写制御因子。

[0021] ここで、「アミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加」しているとは、当該アミノ酸配列中のアミノ酸が、そのポリペプチドの構造又は機能に有意に影響することなく改変していることを指す。また、「数個」とは、2～160個、2～100個、2～50個、好ましくは2～20個、より好ましくは2～10個の変異が存在することを指す。また、配列番号1に示されるアミノ酸において「数個」のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたというとき、例えば、2～119個、2～89個、好ましくは2～59個、より好ましくは2～29個の変異が存在することをいう。また、配列番号12に示されるアミノ酸において「数個」のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたというとき、例えば、2～130個、2～97個、好ましくは2～65個、より好ましくは2～32個の変異が存在することをいう。また、配列番号14に示されるアミノ酸において「数個」のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたというとき、例えば、2～155個、2～116個、好ましくは2～77個、より好ましくは2～38個の変異が存在することをいう。また、配列番号2に示されるアミノ酸において「数個」のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたというとき、例えば、2～31個、2～15個、好ましくは2～7個、より好ましくは2または3個の変異が存在することをいう。

[0022] また、上述のように、機能強化の対象となる転写制御因子としては、「LMI2遺伝子」又は「MYB16遺伝子」又は「MYB106遺伝子」によりコードされる転写制御因子のアミノ酸配列と少なくとも60%の同一性を有し、かつ、クチクラの形成を制御する活性を有する転写制御因子も含まれる。また、同一の機能を保持している限り、「LMI2遺伝子」又は「MYB16遺伝子」又は「MYB106遺伝子」によりコードされる転写制御因子のアミノ酸配列と少なくとも60%の同一性を有する転写制御因子は、そのフラグメントであってもよい。「LMI2遺伝子」又は「MYB16遺伝子」又は「MYB106遺伝子」によりコードされる転写制御因子のアミノ酸配列に対する同一性は、少なくとも60%、70%、80%であることが好ましい。

[0023] また、ストリンジェントな条件とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形

成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。例えば、同一性が高い核酸、すなわち配列番号2又は配列番号4に示す塩基配列と90%以上、好ましくは95%以上の同一性を有する塩基配列からなるDNAの相補鎖がハイブリダイズし、それより同一性が低い核酸の相補鎖がハイブリダイズしない条件が挙げられる。このようなストリンジントな条件については、T. Maniatisら編、Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratoryなどに記載の通常のハイブリダイゼーション操作における T_m 値を高めた条件として当業者には自明である。例えば、0.5% SDS、5×デンハルト [Denhardt's, 0.1% ウシ血清アルブミン (BSA)、0.1% ポリビニルピロリドン、0.1% フィコール400] 及び100 µg/ml サケ精子DNAを含む6×SSC (1×SSCは0.15M NaCl、0.015M クエン酸ナトリウム、pH7.0) 中で、50℃で4時間〜一晩保温を行う条件などである。

[0024] (3) 本発明の対象となる植物

本発明の対象となる植物としては、イモ類、豆類、ナス科類などの双子葉植物一般に適用できるが、特に種子作物保存の観点からは、大豆、小豆などの豆類、菜種、綿実、ヒマワリなどの油糧作物、が好ましい。ただし、本発明は、これらの植物に限定されるものではなく、イネ、小麦、大麦などの単子葉穀類の育種一般にも適用できる。

[0025] 本発明によれば、例えば、上記に列挙するような植物について、増加したクチクラを種皮に含有する植物を得ることができる。また、本明細書において、「植物の子孫」というとき、当該植物の有性生殖又は無性生殖により得られる子孫をいい、当該植物のクローンを含む。例えば、当該植物体やその子孫から繁殖材料(例えば、種子、果実、切穂、塊茎、塊根、株、カルス、プロトプラスト等)を得て、それらを基に当該植物の子孫を作出することが可能である。また、本明細書において、「植物若しくはその子孫、又はそれらの一部」というときは、特別な場合を除き、当該植物又はその子孫の植物における、種子(発芽種子、未熟種子を含む)、器官又はその部分(葉、根、茎、花、雄蕊、雌蕊、それらの片を含む)、植物培養細胞、カルス、プロトプラスト

を含む。

[0026] また、本明細書において、「クチクラの形成を制御する活性」とは、「LMI2遺伝子」又は「MYB16遺伝子」又は「MYB106遺伝子」によりコードされる転写制御因子が本来的に備えているクチクラの生合成に係る遺伝子の転写制御活性をいう。本明細書においては、とりわけ、当該転写制御因子又はそのホモログや変異体において、その機能を強化した際に、植物体内においてクチクラの合成が増す場合、当該転写制御因子若しくはそのホモログ、又はそれらの変異体は、クチクラの合成を制御する活性を有していることができる。また、当該転写制御因子が本来的に備えている転写の制御活性は、当該転写制御因子の機能と同義で使用される。

[0027] (4) 本発明の転写制御因子の機能を強化する方法

本発明では、転写制御因子の機能を強化する手法といっても、単に植物体内における目的の転写因子の遺伝子又はタンパク質の発現を増強すればよいわけではなく、植物生体内の生育機能、又特に種子内の本来の機能を損なわずに種皮特異的にクチクラの蓄積を増大させる必要がある。

本発明におけるLMI2遺伝子などの転写制御因子の機能を強化する手法の1つとして、当該転写制御因子をコードする遺伝子に対し、転写活性化ドメインをコードする遺伝子を付加することが有効である。本実施例ではヘルペスウイルス由来の「転写活性化ドメイン」である「VP16（配列番号5）」を利用したが、これに限定されない。他に、酵母由来のGAL4タンパク質の転写活性化ドメインなどが同様に用いられる。

[0028] (5) 種皮特異的にクチクラを高蓄積できるプロモータの利用

本発明において、LMI2遺伝子などの発現を促し、かつ種皮特異的にクチクラを高蓄積できるプロモータとしては、種皮におけるLMI2遺伝子の適度な発現を促して、種子の発達を妨げないことが重要である。

本実施例で用いたCYP77A6プロモータ（配列番号16）は、シロイヌナズナのクチクラ合成経路中のCYP77A6酵素遺伝子のプロモータであり、CYP77A6酵素はクチクラを産生する組織のうち主に発達中の花器官で発現するが、種子

内では種皮のみで発現しており、また発現時期がLMI2遺伝子と似ていることから、種皮におけるLMI2遺伝子の適度な発現が可能となり、種皮への高蓄積が達成できたと考えられる。

このことから、本発明の種皮特異的にクチクラを高蓄積させるためのプロモータとしては、CYP77A6プロモータ（配列番号16）もしくはそのオルソログ遺伝子のプロモータの他、クチクラ生合成経路中の酵素遺伝子由来プロモータ及びLMI2遺伝子自身のプロモータ（配列番号17）又はそのホモログ遺伝子由来プロモータも同様に用いることができる。

[0029] なお、以下では、本発明の一実施の形態である転写活性化ドメインを付加する手法を用いた「LMI2遺伝子」によりコードされる転写制御因子の機能を強化する方法を、一例として具体的に説明する。しかしながら、本発明は、下記で説明する手法に限られず、「LMI2遺伝子」又は「MYB16遺伝子」又は「MYB106遺伝子」又はそのホモログ(オルソログ及びパラログを含む)によりコードされる転写制御因子の機能を強化できる方法であれば上記に挙げたものを含めて採用することができる。

[0030] 本発明の一実施の形態である転写活性化ドメインを付加する手法を用いた形質転換植物の作出方法では、シロイヌナズナ由来の「LMI2遺伝子」によりコードされる転写制御因子に「転写活性化ドメイン」が付加されたポリペプチドをコードする核酸を使用することができる。転写活性化ドメインとして用いられるポリペプチドとしてはVP16(配列番号5)が好ましく用いられている。

[0031] 本発明の一実施の形態において、転写活性化ドメインを付加する手法を用いて「LMI2遺伝子」の機能を強化する場合、クチクラ増強形質を発現するために導入される核酸(導入遺伝子)は、例えば、以下のように表現することができる；

(a) 配列番号1に示される第一のアミノ酸配列と配列番号2に示される第二のアミノ酸配列とが連結したアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする核酸、

(b) 前記(a)に記載の核酸において、第一のアミノ酸配列及び／又は第二のアミノ酸配列が、1若しくは数個のアミノ酸の欠失、置換又は付加を有しており、かつ、クチクラの蓄積量を増加する活性を有するポリペプチドをコードする核酸、

(c) 前記(a)の核酸において、第一のアミノ酸配列及び／又は第二のアミノ酸配列が、配列番号1及び／又は配列番号5に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ、クチクラの蓄積量を増加する活性を有するポリペプチドをコードする核酸、

(d) 配列番号10に示される第一の塩基配列と配列番号11に示される第二の塩基配列とが連結した塩基配列からなる核酸、

(e) 前記(d)の核酸において、第一の塩基配列及び／又は第二の塩基配列が、配列番号10及び／又は配列番号11に示される塩基配列の相補配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列であり、かつ、クチクラの蓄積量を増加する活性を有するポリペプチドをコードする核酸。

[0032] なお、本発明の一実施の形態において、転写活性化ドメインを付加する手法を用いて「MYB16遺伝子」の機能を強化する場合、クチクラ増強形質を発現するために導入される核酸(導入遺伝子)は、例えば、以下のように表現することができる；

(f) 配列番号12に示される第一のアミノ酸配列と配列番号2に示される第二のアミノ酸配列とが連結したアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする核酸、

(g) 前記(f)に記載の核酸において、第一のアミノ酸配列及び／又は第二のアミノ酸配列が、1若しくは数個のアミノ酸の欠失、置換又は付加を有しており、かつ、クチクラの蓄積量を増加する活性を有するポリペプチドをコードする核酸、

(h) 前記(f)の核酸において、第一のアミノ酸配列及び／又は第二のアミノ酸配列が、配列番号12及び／又は配列番号2に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ、クチクラの

蓄積量を増加する活性を有するポリペプチドをコードする核酸、

(i) 配列番号 13 に示される第一の塩基配列と配列番号 11 に示される第二の塩基配列とが連結した塩基配列からなる核酸、

(j) 前記(i)の核酸において、第一の塩基配列及び／又は第二の塩基配列が、配列番号 13 及び／又は配列番号 11 に示される塩基配列の相補配列とストリンジントな条件下でハイブリダイズする塩基配列であり、かつ、クチクラの蓄積量を増加する活性を有するポリペプチドをコードする核酸。

[0033] なお、本発明の一実施の形態において、転写活性化ドメインを付加する方法を用いて「MYB106遺伝子」の機能を強化する場合、クチクラ増強形質を発現するために導入される核酸(導入遺伝子)は、例えば、以下のように表現することができる；

(k) 配列番号 14 に示される第一のアミノ酸配列と配列番号 2 に示される第二のアミノ酸配列とが連結したアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする核酸、

(l) 前記(k)に記載の核酸において、第一のアミノ酸配列及び／又は第二のアミノ酸配列が、1 若しくは数個のアミノ酸の欠失、置換又は付加を有しており、かつ、クチクラの蓄積量を増加する活性を有するポリペプチドをコードする核酸、

(m) 前記(k)の核酸において、第一のアミノ酸配列及び／又は第二のアミノ酸配列が、配列番号 14 及び／又は配列番号 2 に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ、クチクラの蓄積量を増加する活性を有するポリペプチドをコードする核酸、

(n) 配列番号 15 に示される第一の塩基配列と配列番号 11 に示される第二の塩基配列とが連結した塩基配列からなる核酸、

(o) 前記(n)の核酸において、第一の塩基配列及び／又は第二の塩基配列が、配列番号 15 及び／又は配列番号 11 に示される塩基配列の相補配列とストリンジントな条件下でハイブリダイズする塩基配列であり、かつ、クチクラの蓄積量を増加する活性を有するポリペプチドをコードする核酸。

[0034] ここで、「配列番号 1 に示される第一のアミノ酸配列」又は「配列番号 1 2 に示される第一のアミノ酸配列」又は「配列番号 1 4 に示される第一のアミノ酸配列」とは、「LMI2遺伝子」又は「MYB16遺伝子」又は「MYB106遺伝子」によりコードされる転写制御因子のアミノ酸配列であって、第二のアミノ酸配列とインフレームに連結するためにそのC末端側の一部を欠いていてもよいアミノ酸配列である。本発明に使用される「LMI2遺伝子」又は「MYB16遺伝子」又は「MYB106遺伝子」によりコードされる転写制御因子のアミノ酸配列」としては、配列番号 1 又は配列番号 1 2 又は配列番号 1 4 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド以外に、下記(i)又は(i i)のいずれかであって、かつ、「LMI2遺伝子」又は「MYB16遺伝子」又は「MYB106遺伝子」によりコードされる転写制御因子の機能を有するポリペプチドも含まれる；(i) 当該アミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加したもの、又は、(i i) 当該アミノ酸配列であって、少なくとも60%、より好ましくは、70%、80%、さらに好ましくは、90%以上の同一性を有するアミノ酸配列。本発明の一実施の形態である転写活性化ドメインを付加する手法を用いた植物の作出方法において、「LMI2遺伝子」又は「MYB16遺伝子」又は「MYB106遺伝子」によりコードされる転写制御因子の機能を有するポリペプチドという場合、好ましくは、当該転写制御因子のDNA結合能を有するポリペプチドである。すなわち、当該転写制御因子のDNA結合領域を含むポリペプチドであれば、当該転写制御因子の断片のアミノ酸配列も、本発明に使用される「LMI2遺伝子」によりコードされる転写制御因子のアミノ酸配列に含まれる。

[0035] また、「配列番号 2 に示される第二のアミノ酸配列」とは、「LMI2遺伝子」によりコードされる転写制御因子の機能を強化するために付加される「転写活性化ドメイン」である。本発明に使用される「転写活性化ドメイン」としては、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド以外に、下記(i)又は(i i)のいずれかであって、かつ、第一のアミノ酸配列によりコードされる転写制御因子の機能を強化可能なポリペプチドも含まれる；(

i) 当該アミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加したもの、又は、(ii) 当該アミノ酸配列であって、少なくとも80%以上、より好ましくは、90%以上、さらに好ましくは95%の同一性を有するアミノ酸配列。

[0036] すなわち、上記(c)には、下記の一形態が含まれる：

(c-1) 前記(a)の核酸において、第一のアミノ酸配列が、配列番号1に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%(より好ましくは、70%以上、80%以上、さらに好ましくは、90%以上)の同一性を有するアミノ酸配列からなり、

(c-2) 前記(a)の核酸において、第二のアミノ酸配列が、配列番号2に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%(より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上)の同一性を有するアミノ酸配列からなり、

かつ、クチクラの蓄積量を増加する活性を有するポリペプチドをコードする核酸。

[0037] また、上記(h)には、下記の一形態が含まれる：

(h-1) 前記(f)の核酸において、第一のアミノ酸配列が、配列番号12に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%(より好ましくは、70%以上、80%以上、さらに好ましくは、90%以上)の同一性を有するアミノ酸配列からなり、

(h-2) 前記(f)の核酸において、第二のアミノ酸配列が、配列番号2に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%(より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上)の同一性を有するアミノ酸配列からなり、

かつ、クチクラの蓄積量を増加する活性を有するポリペプチドをコードする核酸。

[0038] また、上記(m)には、下記の一形態が含まれる：

(m-1) 前記(k)の核酸において、第一のアミノ酸配列が、配列番号14に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%(より好ましくは、70%以上、80%以上、さらに好ましくは、90%以上)の同一性を有するアミノ酸配列からなり、

(m-2) 前記(k)の核酸において、第二のアミノ酸配列が、配列番号2に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%(より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上)の同一性を有するアミノ酸配列からなり、

かつ、クチクラの蓄積量を増加する活性を有するポリペプチドをコードする核酸。

[0039] また、「第一のアミノ酸配列及び／又は第二のアミノ酸配列が、1若しくは数個のアミノ酸の欠失、置換又は付加を有する」というとき、第一のアミノ酸配列と第二のアミノ酸配列とが連結したアミノ酸配列において、(1) 第一のアミノ酸配列の部分が1若しくは数個のアミノ酸の欠失、置換又は付加を有する場合、(2) 第二のアミノ酸配列の部分が1若しくは数個のアミノ酸の欠失、置換又は付加を有する場合、及び、(3) 第一のアミノ酸配列と第二のアミノ酸配列とが連結したアミノ酸配列全体において、1若しくは数個のアミノ酸の欠失、置換又は付加を有する場合、を含む。

[0040] また、「第一の塩基配列及び／又は第二の塩基配列が、配列番号10及び／又は配列番号11に示される塩基配列の相補配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列である」というとき、第一の塩基配列及び第二の塩基配列とが連結した塩基配列において、(4) 第一の塩基配列の部分が、配列番号10に示される塩基配列の相補配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列である場合、(5) 第二の塩基配列の部分が、配列番号11に示される塩基配列の相補配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列である場合、及び、(6) 第一の塩基配列及び第二の塩基配列とが連結した塩基配列全体が、配列番号10に示される塩基配列と配列番号11に示される塩基配列とが連結した塩基配列の相補配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列である場合、を含む。なお、「第一の塩基配列及び／又は第二の塩基配列が、配列番号13及び／又は配列番号11に示される塩基配列の相補配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列である」というとき、及び「第一の塩基配列及び／又は第二の塩基配列が、配列番号15及び／又は配列

番号 1 1 に示される塩基配列の相補配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列である」というときも同様に上記(4)～(6)の場合を含む。

[0041] また、「第一のアミノ酸配列」と「第二のアミノ酸配列」、又は「第一の塩基配列」と「第二の塩基配列」は、それぞれ、「ポリペプチドリンカー」又は「ポリヌクレオチドリンカー」を介して連結されていてもよい。なお、当該リンカーの使用は必須ではなく、必要に応じて適宜設計・使用することができる。当該リンカーのアミノ酸配列又は塩基配列は、当該転写制御因子の機能を強化可能なポリペプチドを産生できる限りにおいて特に限定されず、例えば、配列番号 3 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドリンカー又は配列番号 4 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドリンカーを好適に使用することができる。また、リンカーには、ベクターへの当該転写制御因子のゲートウェイクロニングの結果によって生じた配列を含ませることもできる。例えば、ゲートウェイLR反応によって生じたattB配列などを含ませることができる。従って、リンカーは上記の配列に限定されず、使用するベクターの種類等により、当業者であれば適宜好ましいリンカーを設計可能である。

[0042] なお、第一のアミノ酸配列又は塩基配列と、第二のアミノ酸配列又は塩基配列との配置の順序は、どちらがN末側又は5'側に配置されてもよい。好ましくは、N末側又は5'側より、(1)第一のアミノ酸配列又は塩基配列、(2)ポリペプチドリンカー又はポリヌクレオチドリンカー、(3)第二のアミノ酸配列又は塩基配列の順である。なお、(1)と(3)の位置を入れ替える際には、1つのポリペプチドとして翻訳されるように、適宜開始コドンや終止コドンの設計を行う。

[0043] また、本明細書において、「発現カセット」とは、そのカセットに内包された核酸(主に、遺伝子又はその断片)を発現することのできる一つの発現系単位をいう。発現カセットは、前記核酸を含む領域の他に、遺伝子発現に必要な発現調節領域を有する。そのような発現調節領域には、例えば、プロモ

ータ及びターミネータが含まれる。また、その他の構成として、エンハンサー、ポリA付加シグナル、5' -UTR(非翻訳領域)、標識若しくは選抜マーカー遺伝子、マルチクローニング部位、複製開始点等を含むことができる。発現カセットには、特定の遺伝子等を発現させる上で必要な一つの発現系単位をゲノム上からそのまま取り出したものや、様々な生物由来の発現調節領域等を組み合わせる等して人工的に構築したものが存在する。本発明においては、いずれの発現カセットも利用することが可能である。また、上述する発現調節領域の構成については、本明細書中に記載のない限り、当該分野において公知の構成を適宜選択することが可能である。

[0044] 本明細書において「発現カセット」は、目的とする植物内の「LMI2遺伝子」によりコードされる転写制御因子の活性を強化する効果を提供し、その植物においてクチクラの蓄積量を増加させる機能を有する。

[0045] (2-2) クチクラの蓄積が種皮で増強された植物の作出方法

上述のように、本発明で用いられる導入遺伝子を発現させるためのプロモータは、「種皮においてLMI2遺伝子発現を誘導するプロモータ」であり、「種皮特異的にクチクラを高蓄積できるプロモータ」は、CYP77A6プロモータもしくはそのオルソログ遺伝子のプロモータである（以下、単に「CYP77A6プロモータ」という。）。

導入遺伝子を「CYP77A6プロモータ」の下流に配置したコンストラクト(組換えベクター)を常法に従って構築し、野生株に形質転換して作製する。

[0046] 本明細書において「ベクター」とは上記発現カセットを含むものであって、上記発現カセットに含まれる塩基配列からなる核酸の増殖に使用される大腸菌等へ導入されるベクターや、植物の形質転換を行うためのベクターを含む。本発明に使用されるベクターとしては、当該分野において公知のベクターを使用でき、導入する植物やベクターの使用する手法・目的に応じて適宜選択すればよい。ベクターとしては、例えば、下記実施例にて使用されるR4pGWB5_VP16_HSPなどを使用することができるが、これに限定されない。他に、pDEST_VP16_HSP_GWB5を用いることができる。

[0047] 本発明は、一つの態様として、増加したクチクラを含有する植物を生産するためのキットを提供する。当該キットの具体例としては、「LMI2遺伝子」又は「MYB16遺伝子」又は「MYB106遺伝子」によりコードされる転写制御因子の機能を強化するために使用されるベクターを挙げることができる。このようなベクターを含むキットとしては、種皮で遺伝子発現を誘導するプロモータの下流に、上記(a)～(c)のいずれかに記載の核酸が作動可能に連結された発現カセットを含むベクターを少なくとも含んでいればよく、当該ベクターを植物細胞に導入するための試薬群を含んでいればより好ましい。当該試薬群としては、形質転換の種類に応じた酵素やバッファー等を挙げることができる。その他、必要に応じてマイクロ遠心チューブ等の実験用素材が添付されていてもよい。

[0048] 遺伝子又は組換えベクターを植物中に導入する方法としては、アグロバクテリウム法が典型的であるが、PEG-リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、リポソーム法、パーティクルガン法、マイクロインジェクション法等、従来周知の方法が適用できる。

[0049] (3) 「LMI2遺伝子」によりコードされる転写制御因子の機能が強化された植物の形質的特徴の評価

(3-1) クチクラ蓄積量の評価

「LMI2遺伝子」又は「MYB16遺伝子」又は「MYB106遺伝子」によりコードされる転写制御因子の機能が強化された植物においては、下記の実施例で示すように、種皮のクチクラ蓄積量が増加する。増加したクチクラを評価するには、例えば、走査型電子顕微鏡を用いて種皮断面を観察することにより表面に存在する脂質層の厚さで評価することができる。

走査型電子顕微鏡は、反射電子を検出する場合、組成の違いでコントラストがつく。脂質は明るく写るため、他の細胞構造と区別することができ、これによりクチクラの厚さを調べることができる。

下記の実施例により得られたLMI2-VP16シロイヌナズナの種子をカミソリで切断し断面を走査型電子顕微鏡で観察すると、種皮の表面に野生株より厚い

脂質層が観察された（図3）。

このように、本発明により得られる、クチクラの蓄積量が増加した植物は、好ましい実施形態において、野生株と比較した際に、増加したクチクラを含有する。

[0050] (3-2) 種子保存性向上の評価

「LMI2遺伝子」によりコードされる転写制御因子の機能が強化された植物においては、クチクラが高蓄積する。クチクラの高蓄積に伴い種子の保存性が向上しているかどうかは劣化処理後の発芽率を調べることで推定することができる。劣化処理の方法は人為的に劣化を促進させる方法と自然に劣化を待つ方法がある。人為的に劣化を促進させる方法では、高温高湿条件を用いることにより種子を長期保存した際の劣化を再現することができる。

LMI2-VP16シロイヌナズナと野生株の種子を収穫後収穫後一週間以上低温室（相対湿度6～12%、7～10℃）に保管して水分含量を安定させた後、相対湿度100%、40℃で3日間劣化処理を行った。続いて、相対湿度10～30%、室温で3日間乾燥後、低温室に2日以上置いた。劣化させないコントロール種子は低温室で保管した。以上の処理を行った種子をPPMで殺菌すると同時に4℃で4日間吸水後、寒天培地に播種した。継時的に発芽率を調べたところ、LMI2-VP16シロイヌナズナは野生株と比較して発芽が早く、発芽率が上昇していた（図4）。

室温、常湿で6ヶ月間保存したLMI2-VP16シロイヌナズナと野生株の種子の発芽率を調べ、収穫後すぐに播種した場合の発芽率と比較した。収穫後すぐの発芽率を100%とした場合、6ヶ月経過後の野生株の発芽率は70%程度に低下したのに対し、LMI2-VP16シロイヌナズナ種子の発芽率はほとんど低下しなかった（図4）。

このことから、本発明により得られる、クチクラの蓄積量が増加した植物では種子の劣化が抑えられていたことがわかった。

[0051] 2. その他

本発明におけるその他の用語や概念は、当該分野において慣用的に使用さ

れる用語の意味に基づくものであり、本発明を実施するために使用する様々な技術は、特にその出典を明示した技術を除いては、公知の文献等に基づいて当業者であれば容易かつ確実に実施可能である。例えば、遺伝子工学的技術はJ. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd edition), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989); D. M. Glover et al. ed., *DNA Cloning*, 2nd ed., Vol. 1 to 4, (The Practical Approach Series), IRL Press, Oxford University Press (1995)などに記載の方法により、又はそれらと実質的に同様な方法や改変法により行うことができる。また、本発明で使用する各種タンパク質やペプチド、あるいはそれらをコードするDNAについては、既存のデータベース(URL : <http://www.arabidopsis.org/>又は<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=pubmed>等)から入手することができる。

なお、本明細書中に引用した技術文献、特許公報及び特許出願明細書中の記載内容は、本発明の記載内容として参照されるものとする。

実施例

[0052] 以下、本発明の実施例を示すが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

[0053] (実施例 1) ProCYP77A6 : LMI2-VP16で形質転換したシロイヌナズナ植物体の作成

(1-1) 形質転換ベクターProCYP77A6 : LMI2-VP16の構築

以下のように形質転換ベクターを構築した。

終止コドンを除いたシロイヌナズナ由来のLMI2タンパク質コード領域を下記のオリゴヌクレオチドペアをプライマーとしたPCRで増幅し、ゲートウェイドナーベクターpDONR207ベクター(インビトロジェン社)に、BPクロナーゼによってクローニングした。

5' -ggggacaagtttgtacaaaaagcaggcttcATGGGAAGAACACCTTGTTGTGACAAGAT-3' (LMI2、配列番号5)

5' - ggggaccactttgtacaagaaagctgggttGAATTTGGAAACCATGGAAACAAGACCAAT -3

’ (LMI2、配列番号 6)

シロイヌナズナ由来のCYP77A6プロモータを下記のオリゴヌクレオチドペアをプライマーとしたPCRで増幅し、非特許文献 10 に記載のゲートウェイドナーベクター pDONRG_P4P1R に BP クロナーゼによりクローニングした。

5’ - GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGTTATCTTCCCGGAATTAGTGAAGACCC - 3’ (LMI2、配列番号 7)

5’ - GGGGACTGCTTTTTTGTACAAACTTGGCATTTTTAGCTTCTTGTCTTTCTTCTT - 3’ (LMI2、配列番号 8)

つぎに R4pGWB5_VP16_HSP ベクター (配列番号 9) に LR クロナーゼによって上記 CYP77A6 プロモータと LMI2 遺伝子のタンパク質コード領域を連結すると同時に移し変えることによって、形質転換に使用したベクターを構築した。

なお、R4pGWB5_VP16_HSP ベクターには、CYP77A6 プロモータの下流に、LMI2 遺伝子のタンパク質コード領域と VP16 転写活性化ドメインをコードする塩基配列とがポリヌクレオチドリンカーを介して連結された状態で配置されている。これにより、当該ベクターを用いて形質転換された植物の種皮では、配列番号 8 (LMI2-VP16) に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドが発現される。

[0054] (1-2) フローラルディップ法を用いた ProCYP77A6 : LMI2-VP16 によるシロイヌナズナの形質転換

上記実施例 (1-1) で得られたプラスミドを、土壌細菌 (*Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 (C58C1 Rif^r) pMP90 (Gmr) (Koncz and Schell 1986)) 株にエレクトロポレーション法で導入した。導入した菌を 200ml の抗生物質 (スペクチノマイシン (Spe) 50mg/L、ゲンタマイシン (Gm) 25mg/L 及びリファンピシリン (Rif) 50mg/L) を含む LB 培地で 2 日間培養した。

次いで、培養液から菌体を回収し、500ml の浸潤培地 (Infiltration medium ; 特許文献 1 を参照) に懸濁した。形質転換させる植物体として、シロイヌナズナ Columbia-0 を 45 日間～60 日間育てて花を咲かせ、主茎を切った後にさらに 10 日間育て形質転換に用いた。形質転換は、当該シロイヌナズナを菌体を

懸濁させた浸潤培地に2分間浸して感染させ、通常通り育成しT1種子を収穫した。そののち、T1種子を50%ブリーチ、0.02%Triton X-100溶液で7分間滅菌した後、滅菌水で3回リンスし、30mg/lのハイグロマイシン(Hg)を含むMS選択培地に播種した。

上記ハイグロマイシンプレートで生育する形質転換植物体(ProCYP77A6 : LMI2-VP16, T1)を選抜し、土壌に植え換えて生育し、種子を採取して播種し、次世代(T2)のシロイヌナズナ植物を得た。続いて、上記ハイグロマイシンプレートで生育する形質転換体(ProCYP77A6 : LMI2-VP16, T2)を選抜し、土壌に植え換えて生育し、種子を採取して播種し、次世代(T3)のシロイヌナズナ植物を得た。

[0055] (実施例2) ProCYP77A6 : LMI2-VP16シロイヌナズナ植物の種子の断面観察

上記実施例(1-2)で得られたProCYP77A6 : LMI2-VP16シロイヌナズナT2種子をカミソリで種皮に対して直角に切断し、走査型電子顕微鏡で観察した。その結果、ProCYP77A6:LMI2-VP16株では野生株と比較して種皮表層にクチクラが厚く蓄積していた(図3)。

[0056] (実施例3) ProCYP77A6 : LMI2-VP16シロイヌナズナ植物の種子の劣化試験
(3-1) 人為的な劣化

上記実施例(1-2)で得られたProCYP77A6 : LMI2-VP16シロイヌナズナT3種子を収穫後収穫後一週間以上低温室(相対湿度6~12%、7~10℃)に置いて水分含量を安定させた後、相対湿度100%、40℃で3日間劣化処理を行った。相対湿度10~30%、室温で3日間乾燥後、低温室に2日以上置いた。劣化させないコントロール種子は低温室で保管した。以上の処理を行った種子を1/50希釈PPM, 0.005% Triton X-100溶液に浸漬して殺菌すると同時に4℃で4日間吸水後、MS寒天培地に播種した。継時的に発芽率を調べたところ、LMI2-VP16シロイヌナズナは野生株と比較して発芽が早く、発芽率が上昇していた(図4A)。この結果からProCYP77A6:LMI2-VP16シロイヌナズナは野生株に比べて種子の劣化が抑えられており、種子の長期保存に有利であると考えられた。

[0057] (3-2) 自然な劣化

上記実施例(1-2)で得られたProCYP77A6:LMI2-VP16シロイヌナズナT2種子を室温、常湿で6ヶ月間保存し、T3種子を収穫後すぐに用いた。これらの種子を1/50希釈PPM, 0.005% Triton X-100溶液に浸漬して殺菌すると同時に4℃で4日間吸水後、MS寒天培地に播種した。継続的に発芽率を調べたところ、収穫後すぐの発芽率を100%とした場合、6ヶ月経過後の野生株の発芽率は低下したのに対し、LMI2-VP16シロイヌナズナ種子の発芽率はほとんど低下しなかった(図4B)。

この結果からProCYP77A6:LMI2-VP16シロイヌナズナは野生株に比べて常温常湿下での種子の劣化が抑えられており、簡易な環境条件での種子の保存に有利であると考えられた。

請求の範囲

- [請求項1] 種皮で特異的にクチクラを蓄積する種子を産生する植物の生産方法であって、
対象植物を、MYB転写制御因子遺伝子ファミリーに属するLMI2、MYB16、及びMYB106転写制御因子並びにそのホモログからなる群より選択される少なくとも一つの転写制御因子をコードする遺伝子を用いて形質転換することを特徴とする、植物の生産方法。
- [請求項2] 転写制御因子をコードする遺伝子が、転写活性化ドメインをコードする遺伝子と融合されていることを特徴とする請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 転写活性化ドメインをコードする遺伝子がヘルペスウイルス由来VP16遺伝子である、請求項2に記載の方法。
- [請求項4] 転写制御因子をコードする遺伝子が、形質転換された植物において、当該遺伝子自身のプロモータ又はクチクラ生合成遺伝子由来プロモータの制御下で発現することを特徴とする、請求項1～3のいずれかに記載の方法。
- [請求項5] クチクラ生合成遺伝子由来プロモータが、CYP77A6プロモータ又はそのオルソログ遺伝子のプロモータである請求項4に記載の方法。
- [請求項6] 転写制御因子が、下記(ア)～(オ)のいずれかに示される転写制御因子である、請求項1～5のいずれかに記載の方法；
(ア)配列番号1又は12又は14に示されるアミノ酸配列からなる転写制御因子、
(イ)配列番号1又は12又は14に示されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加しており、かつ、クチクラの形成を制御する活性を有する転写制御因子、
(ウ)配列番号1又は12又は14に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%の同一性を有するアミノ酸配列からなる転写制御因子であって、かつ、クチクラの形成を制御する活性を有する転写制御因子

(エ)配列番号 10 又は 13 又は 15 に示される塩基配列によりコードされる転写制御因子、

(オ)配列番号 10 又は 13 又は 15 に示される塩基配列の相補配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列によりコードされる転写制御因子であり、かつ、クチクラの蓄積量を制御する活性を有する転写制御因子。

[請求項7]

対象植物の形質転換方法が、種皮で遺伝子発現を誘導するプロモータの下流に、以下の(a)～(o)のいずれかに記載の核酸が作動可能に連結された発現カセットを含むベクターを用いることを特徴とする、請求項 1～6 のいずれかに記載の方法；

(a) 配列番号 1 に示される第一のアミノ酸配列と配列番号 2 に示される第二のアミノ酸配列とが連結したアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする核酸、

(b) 前記(a)に記載の核酸において、第一のアミノ酸配列及び／又は第二のアミノ酸配列が、1 若しくは数個のアミノ酸の欠失、置換又は付加を有しており、かつ、クチクラの蓄積量を増加する活性を有するポリペプチドをコードする核酸、

(c) 前記(a)の核酸において、第一のアミノ酸配列及び／又は第二のアミノ酸配列が、配列番号 1 及び／又は配列番号 5 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 60%の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ、クチクラの蓄積量を増加する活性を有するポリペプチドをコードする核酸、

(d) 配列番号 10 に示される第一の塩基配列と配列番号 11 に示される第二の塩基配列とが連結した塩基配列からなる核酸、

(e) 前記(d)の核酸において、第一の塩基配列及び／又は第二の塩基配列が、配列番号 10 及び／又は配列番号 11 に示される塩基配列の相補配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列であり、かつ、クチクラの蓄積量を増加する活性を有するポリペプ

チドをコードする核酸、

(f) 配列番号 1 2 に示される第一のアミノ酸配列と配列番号 2 に示される第二のアミノ酸配列とが連結したアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする核酸、

(g) 前記(f)に記載の核酸において、第一のアミノ酸配列及び／又は第二のアミノ酸配列が、1 若しくは数個のアミノ酸の欠失、置換又は付加を有しており、かつ、クチクラの蓄積量を増加する活性を有するポリペプチドをコードする核酸、

(h) 前記(f)の核酸において、第一のアミノ酸配列及び／又は第二のアミノ酸配列が、配列番号 1 2 及び／又は配列番号 2 に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ、クチクラの蓄積量を増加する活性を有するポリペプチドをコードする核酸、

(i) 配列番号 1 3 に示される第一の塩基配列と配列番号 1 1 に示される第二の塩基配列とが連結した塩基配列からなる核酸、

(j) 前記(i)の核酸において、第一の塩基配列及び／又は第二の塩基配列が、配列番号 1 3 及び／又は配列番号 1 1 に示される塩基配列の相補配列とストリンジентな条件下でハイブリダイズする塩基配列であり、かつ、クチクラの蓄積量を増加する活性を有するポリペプチドをコードする核酸、

(k) 配列番号 1 4 に示される第一のアミノ酸配列と配列番号 2 に示される第二のアミノ酸配列とが連結したアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする核酸、

(l) 前記(k)に記載の核酸において、第一のアミノ酸配列及び／又は第二のアミノ酸配列が、1 若しくは数個のアミノ酸の欠失、置換又は付加を有しており、かつ、クチクラの蓄積量を増加する活性を有するポリペプチドをコードする核酸、

(m) 前記(k)の核酸において、第一のアミノ酸配列及び／又は第二

のアミノ酸配列が、配列番号 1 4 及び／又は配列番号 2 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 60% の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ、クチクラの蓄積量を増加する活性を有するポリペプチドをコードする核酸、

(n) 配列番号 1 3 に示される第一の塩基配列と配列番号 1 1 に示される第二の塩基配列とが連結した塩基配列からなる核酸、

(o) 前記(n)の核酸において、第一の塩基配列及び／又は第二の塩基配列が、配列番号 1 3 及び／又は配列番号 1 1 に示される塩基配列の相補配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列であり、かつ、クチクラの蓄積量を増加する活性を有するポリペプチドをコードする核酸。

[請求項8] 種皮で特異的にクチクラを蓄積する種子を産生する植物を生産するための発現カセットであって、種皮で遺伝子発現を誘導するプロモータの制御下にMYB転写制御因子遺伝子ファミリーに属するLMI2、MYB16、及びMYB106転写制御因子並びにそのホモログからなる群より選択される少なくとも一つの転写制御因子をコードする遺伝子を含む、発現カセット。

[請求項9] 転写制御因子をコードする遺伝子が、転写活性化ドメインをコードする遺伝子と融合されていることを特徴とする請求項8に記載の発現カセット。

[請求項10] 種皮で遺伝子発現を誘導するプロモータが、前記転写制御因子遺伝子由来のプロモータ又はクチクラ生合成遺伝子由来プロモータの制御下で発現することを特徴とする、請求項8又は9に記載の発現カセット。

[請求項11] クチクラ生合成遺伝子由来プロモータが、CYP77A6プロモータ又はそのオルソログ遺伝子のプロモータである請求項10に記載の発現カセット。

[請求項12] 発現カセットが、種皮で遺伝子発現を誘導するプロモータの制御下

に、以下の(a)～(o)のいずれかに記載の核酸が作動可能に連結された発現カセットである、請求項8～11のいずれかに記載の発現カセット；

(a) 配列番号1に示される第一のアミノ酸配列と配列番号2に示される第二のアミノ酸配列とが連結したアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする核酸、

(b) 前記(a)に記載の核酸において、第一のアミノ酸配列及び／又は第二のアミノ酸配列が、1若しくは数個のアミノ酸の欠失、置換又は付加を有しており、かつ、クチクラの蓄積量を増加する活性を有するポリペプチドをコードする核酸、

(c) 前記(a)の核酸において、第一のアミノ酸配列及び／又は第二のアミノ酸配列が、配列番号1及び／又は配列番号2に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ、クチクラの蓄積量を増加する活性を有するポリペプチドをコードする核酸、

(d) 配列番号2に示される第一の塩基配列と配列番号6に示される第二の塩基配列とが連結した塩基配列からなる核酸、

(e) 前記(d)の核酸において、第一の塩基配列及び／又は第二の塩基配列が、配列番号10及び／又は配列番号11に示される塩基配列の相補配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列であり、かつ、クチクラの蓄積量を増加する活性を有するポリペプチドをコードする核酸、

(f) 配列番号12に示される第一のアミノ酸配列と配列番号2に示される第二のアミノ酸配列とが連結したアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする核酸、

(g) 前記(f)に記載の核酸において、第一のアミノ酸配列及び／又は第二のアミノ酸配列が、1若しくは数個のアミノ酸の欠失、置換又は付加を有しており、かつ、クチクラの蓄積量を増加する活性を有す

るポリペプチドをコードする核酸、

(h) 前記(f)の核酸において、第一のアミノ酸配列及び／又は第二のアミノ酸配列が、配列番号12及び／又は配列番号2に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ、クチクラの蓄積量を増加する活性を有するポリペプチドをコードする核酸、

(i) 配列番号13に示される第一の塩基配列と配列番号11に示される第二の塩基配列とが連結した塩基配列からなる核酸、

(j) 前記(i)の核酸において、第一の塩基配列及び／又は第二の塩基配列が、配列番号13及び／又は配列番号11に示される塩基配列の相補配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列であり、かつ、クチクラの蓄積量を増加する活性を有するポリペプチドをコードする核酸、

(k) 配列番号14に示される第一のアミノ酸配列と配列番号2に示される第二のアミノ酸配列とが連結したアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする核酸、

(l) 前記(k)に記載の核酸において、第一のアミノ酸配列及び／又は第二のアミノ酸配列が、1若しくは数個のアミノ酸の欠失、置換又は付加を有しており、かつ、クチクラの蓄積量を増加する活性を有するポリペプチドをコードする核酸、

(m) 前記(k)の核酸において、第一のアミノ酸配列及び／又は第二のアミノ酸配列が、配列番号14及び／又は配列番号2に示されるアミノ酸配列と少なくとも60%の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ、クチクラの蓄積量を増加する活性を有するポリペプチドをコードする核酸、

(n) 配列番号13に示される第一の塩基配列と配列番号11に示される第二の塩基配列とが連結した塩基配列からなる核酸、

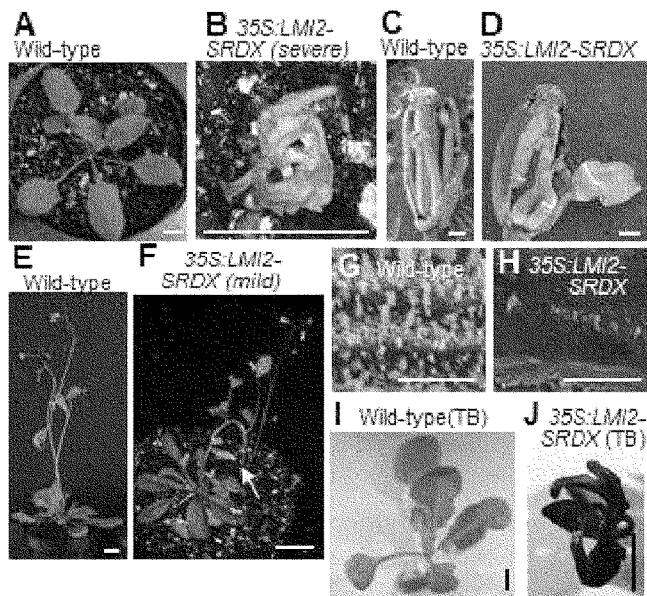
(o) 前記(n)の核酸において、第一の塩基配列及び／又は第二の塩

基配列が、配列番号 1 3 及び／又は配列番号 1 1 に示される塩基配列の相補配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列であり、かつ、クチクラの蓄積量を増加する活性を有するポリペプチドをコードする核酸。

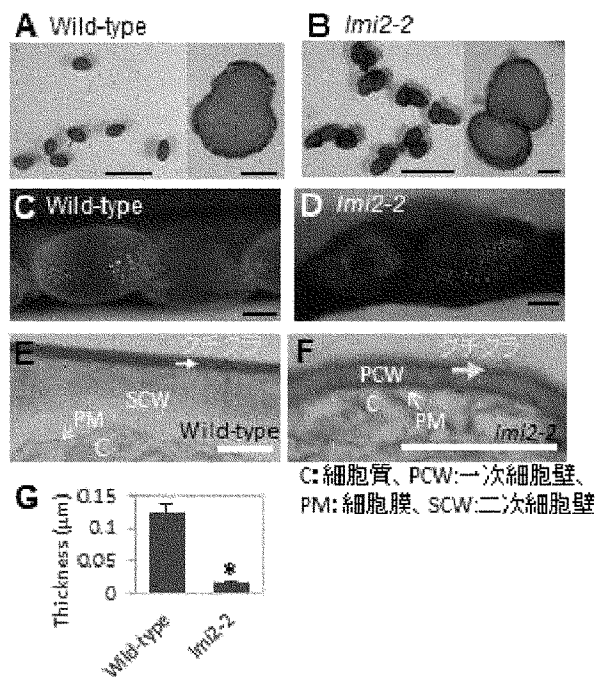
[請求項13] 請求項 8 ～ 1 2 のいずれかに記載の発現カセットを含むベクター。

[請求項14] 請求項 1 3 に記載のベクターを含むキット。

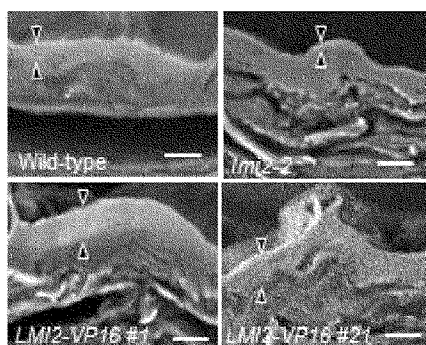
[図1]



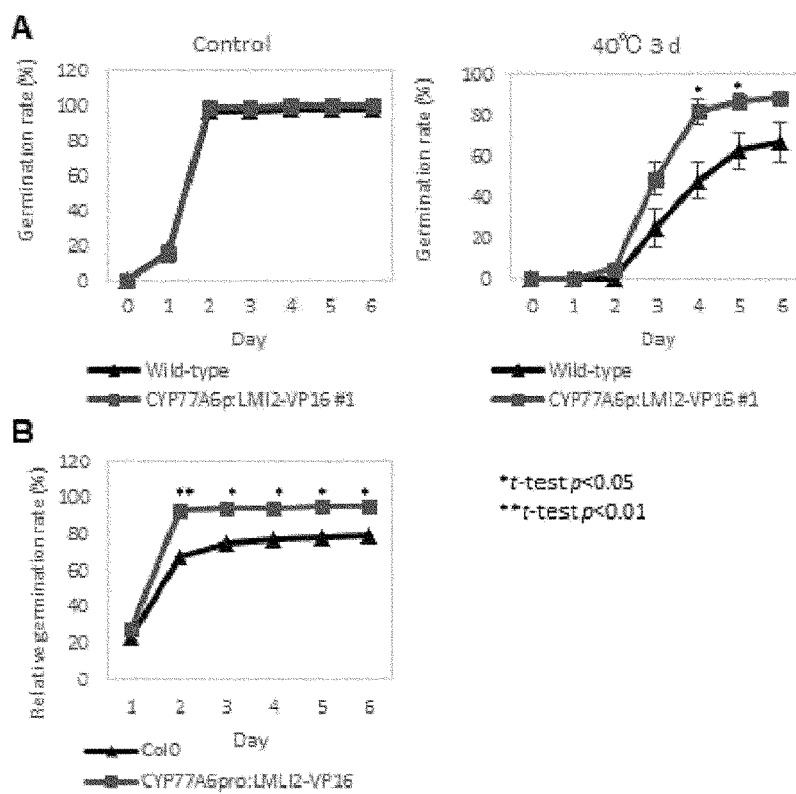
[図2]



[図3]



[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/009516

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, A01H1/00(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

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 1996-2017

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2017 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2017

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	OSHIMA, Yoshimi, et al., Enhanced cuticle accumulation by employing MIXTA-like transcription factors, Plant Biotechnology, 2016.11.17, Vol. 33, No. 3, pp. 161-168	1-14
P, A	OSHIMA, Yoshimi, et al., LATE MERISTEM IDENTITY2 regulates cuticle formation in seed surface and promotes seed longevity, Abstract Book Annual Meeting of JSPP, 2016.03.11, 57th, p. 156, 1pB07(0107)	1-14
P, A	Yoshimi OSHIMA et al., "Shushi no Hozonsei Iji ni Taisuru Cuticle no Yakuwari", Dai 34 Kai Japanese Society for Plant Cell and Molecular Biology (Ueda) Taikai Koen Yoshishu, 20 August 2016 (20.08.2016), page 89, 1Cp-02	1-14

☒ 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
20 April 2017 (20.04.17)Date of mailing of the international search report
09 May 2017 (09.05.17)Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/009516

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Yoshimi OSHIMA et al., "Haname Bunka o Seigyo suru Tensha Inshi LMI2 no Mijuku Shushi Cuticle Keisei ni Okeru Kino", Dai 55 Kai Proceedings of the Annual Meeting of the Japanese Society of Plant Physiologists, 2014, page 194, 2aC05(0205)	1-14
A	Yoshimi OSHIMA et al., "Haname Hassei o Seigyo suru Tensha Inshi LMI2 wa Shushi no Cuticle Keisei o Seigyo suru", Dai 32 Kai Japanese Society for Plant Cell and Molecular Biology (Morioka) Taikai Symposium Koen Yoshishu, 2014, page 108, 22D-06	1-14
A	Yoshimi OSHIMA et al., "Seishoku Kikan to Mijuku Shushi no Cuticle Keisei o Seigyo suru Tensha Inshi no Kaiseiki", Dai 31 Kai Japanese Society for Plant Cell and Molecular Biology (Sapporo) Taikai Symposium Koen Yoshishu, 2013, page 225, 2Ca-09	1-14
A	JP 2006-149313 A (Japan Science and Technology Agency), 15 June 2006 (15.06.2006), (Family: none)	1-14
A	OSHIMA, Yoshimi, et al., MIXTA-Like Transcription Factors and WAX INDUCER1/SHINE1 Coordinately Regulate Cuticle Development in Arabidopsis and Torenia fournieri, The Plant Cell, 2013, Vol. 25, pp. 1609-1624	1-14
A	OSHIMA, Yoshimi, et al., The MIXTA-like Transcription factor MYB16 is a major regulator of cuticle formation in vegetative organs, Plant Signaling & Behavior, 2013, Vol. 8, e26826, [online], [retrieved on 2017.04.20], Retrieved from the Internet:<URL: http://www.tandfonline.com/doi/full/10.4161/psb.26826 >	1-14
A	JP 2012-187040 A (National Agriculture and Food Research Organization), 04 October 2012 (04.10.2012), (Family: none)	1-14

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

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

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	1971-2017年
日本国実用新案登録公報	1996-2017年
日本国登録実用新案公報	1994-2017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),
CAplus/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN)

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
P,A	OSHIMA, Yoshimi, et al., Enhanced cuticle accumulation by employing MIXTA-like transcription factors, Plant Biotechnology, 2016.11.17, Vol. 33, No. 3, pp. 161-168	1-14
P,A	OSHIMA, Yoshimi, et al., LATE MERISTEM IDENTITY2 regulates cuticle formation in seed surface and promotes seed longevity, Abstract Book Annual Meeting of JSPP, 2016.03.11, 57th, p. 156, 1pB07(0107)	1-14

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

20.04.2017

国際調査報告の発送日

09.05.2017

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

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)

千葉 直紀

4 B

3 4 3 4

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
P, A	大島良美, ほか, 種子の保存性維持に対するクチクラの役割, 第 34 回日本植物細胞分子生物学会 (上田) 大会講演要旨集, 2016. 08. 20, p. 89, 1Cp-02	1-14
A	大島良美, ほか, 花芽分化を制御する転写因子 LMI2 の未熟種子クチクラ形成における機能, 第 55 回日本植物生理学会年会要旨集, 2014, p. 194, 2aC05(0205)	1-14
A	大島良美, ほか, 花芽発生を制御する転写因子 LMI2 は種子のクチクラ形成を制御する, 第 32 回日本植物細胞分子生物学会 (盛岡) 大会・シンポジウム講演要旨集, 2014, p. 108, 22D-06	1-14
A	大島良美, ほか, 生殖器官と未熟種子のクチクラ形成を制御する転写因子の解析, 第 31 回日本植物細胞分子生物学会 (札幌) 大会・シンポジウム講演要旨集, 2013, p. 225, 2Ca-09	1-14
A	JP 2006-149313 A (独立行政法人科学技術振興機構) 2006. 06. 15, (ファミリーなし)	1-14
A	OSHIMA, Yoshimi, et al., MIXTA-Like Transcription Factors and WAX INDUCER1/SHINE1 Coordinately Regulate Cuticle Development in Arabidopsis and Torenia fournieri, The Plant Cell, 2013, Vol. 25, pp. 1609-1624	1-14
A	OSHIMA, Yoshimi, et al., The MIXTA-like Transcription factor MYB16 is a major regulator of cuticle formation in vegetative organs, Plant Signaling & Behavior, 2013, Vol. 8, e26826, [online], [retrieved on 2017.04.20], Retrieved from the Internet:<URL: http://www.tandfonline.com/doi/full/10.4161/psb.26826 >	1-14
A	JP 2012-187040 A (独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構) 2012. 10. 04, (ファミリーなし)	1-14