

(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 8 月 4 日(04.08.2016)



(10) 国際公開番号

WO 2016/121707 A1

- (51) 国際特許分類:
A01H 5/00 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/052052
- (22) 国際出願日: 2016 年 1 月 25 日(25.01.2016)
- (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:
62/108,327 2015 年 1 月 27 日(27.01.2015) US
- (71) 出願人: 国立研究開発法人理化学研究所(RIKEN) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 Saitama (JP).
- (72) 発明者: 中野 雄司(NAKANO Takeshi); 〒3510198 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 国立研究開発法人理化学研究所内 Saitama (JP). 浅見 忠男(ASAMI Tadao); 〒3510198 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 国立研究開発法人理化学研究所内 Saitama (JP). 山上 あゆみ(YAMAGAMI Ayumi); 〒3510198 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 国立研究開発法人理化学研究所内 Saitama (JP). 長田 裕之(OSADA Hiroyuki); 〒3510198 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 国立研究開発法人理化学研究所内 Saitama (JP).
- (74) 代理人: 平木 祐輔, 外(HIRAKI Yusuke et al.); 〒1056232 東京都港区愛宕 2 丁目 5 番 1 号 愛宕グリーンヒルズMORIタワー 3 2 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, 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, JP, 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), ユーロアジア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ユーロッパ (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 CONTROLLING PLANT GROWTH

(54) 発明の名称: 植物の成長制御方法

(57) Abstract: The method addressed by the present invention is to clarify the mechanism of controlling plant growth by brassinosteroids, and the mechanism of cell nucleus transfer of BIL1 protein, which is the master transcription factor for signal transmission of brassinosteroids, discover new factors which contribute to same, and use these factors in controlling plant growth to increase the production of plant biomass and grains. According to the present invention, provided are: a transgenic plant, characterized in that the expression of a BSS1 gene, which binds to BIL1 protein and hinders transfer into the cell nucleus, and controls the signal transmission of brassinosteroids to a negative value, is suppressed or promoted; and a method for controlling plant growth, characterized in that the expression of the BSS1 gene in plants is suppressed or promoted.

(57) 要約: 本発明の課題は、ブラシノステロイドによる植物の成長制御のメカニズム、ならびにブラシノステロイドのシグナル伝達のマスター転写因子である BIL1 タンパク質の細胞核移行のメカニズムを解明し、それに関与する新たな因子を発見し、植物の成長制御に利用して植物バイオマスや穀物の増産を図ることにある。本発明によれば、BIL1 タンパク質に結合して細胞核内への移行を阻害し、ブラシノステロイドのシグナル伝達を負に制御する活性を有する BSS1 遺伝子の発現が抑制又は促進されていることを特徴とする、形質転換植物、BSS1 遺伝子の植物体における発現を抑制又は促進することを特徴とする、植物の成長の制御方法が提供される。

WO 2016/121707 A1

明 細 書

発明の名称：植物の成長制御方法

技術分野

[0001] 本発明は、ブラシノステロイドのシグナル伝達を負に制御するBSS遺伝子の利用に関する。

背景技術

[0002] 植物ホルモンは、植物の生体内に存在し、さまざまな生理現象をもたらす化学物質である。植物ホルモンの一つである「ブラシノステロイド」は、植物に対し、細胞伸長や細胞分裂の促進など細胞レベルの促進的作用、子葉の開化・胚軸の伸長・維管束の分化・緑葉の上偏成長・葉柄の伸長・茎の伸長など器官レベルの制御作用、耐冷・耐塩・耐乾燥などの環境ストレス耐性付与作用、及び植物自然免疫活性化による植物病害抵抗性の促進作用など、様々な生理作用を示す。よって、ブラシノステロイドを植物に与えることによって植物の成長促進、収穫量増加、環境ストレスに対する耐性強化といった効果がある。しかしながら、ブラシノステロイドは農作物などの育種開発において上記のような有用な効果があると認識されているものの、高価であることや、植物内への浸透、移行性、安定性などに問題があることから、農業や植物バイオマス増産に実際に使用されるには至っていない。

[0003] また、ブラシノステロイドの生合成に関する研究は大部分が明らかになってきているが、植物の中でどのように機能しているのかは明らかにされておらず、基礎研究と応用研究の両面で、その解明が待たれる。これまで、ブラシノステロイドの生合成を自在に制御できる阻害剤「ブラシナゾール (Brz)」を用いたケミカルバイオロジー研究によって、野生型よりも長い胚軸を有する突然変異体bil1(brz-insensitive-long hypocotyl)の原因遺伝子としてBIL1遺伝子が同定された（非特許文献1、2）。その後、BIL1に由来するタンパク質「BIL1タンパク質」は、実験植物シロイヌナズナのゲノム上の約30,000種類ある遺伝子の内、約3,000種類にも及ぶ多種類の遺伝子の発現調節を行

う転写因子であることが明らかにされ、現在では、BIL1タンパク質が、ブラシノステロイドのシグナル伝達のマスター転写因子（遺伝子の発現を連鎖的に引き起こす因子）であると考えられている。

[0004] BIL1タンパク質は、その転写制御対象の広さから考えられる重要性に加えて、ブラシノステロイドを添加すると細胞質から細胞核内に移行する、という興味深い動態（ダイナミクス）を示すことが知られている。しかし、その細胞核移行の制御機構については、詳細な仕組みは明らかにされていない。

先行技術文献

非特許文献

[0005] 非特許文献1: Asami, T., Nakano, T., and Nakashita, H. (2003). The influence of chemical genetics on plant science: shedding light on functions and mechanism of action of brassinosteroids using biosynthesis inhibitors. J. plant growth Regul. 22: 336-349.

非特許文献2: Wang, Z.-Y., Bai, M.-Y., Oh, E., and Zhu, J.-Y. (2012). Brassinosteroid signaling network and regulation of photomorphogenesis. Annu. Rev. Genet. 46: 701-724.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 従って、本発明の課題は、ブラシノステロイドによる植物の成長制御のメカニズム、ならびにブラシノステロイドのシグナル伝達のマスター転写因子であるBIL1タンパク質の細胞核移行のメカニズムを解明し、それに関与する新たな因子を発見し、植物の成長制御に利用して植物バイオマスや穀物の増産を図ることにある。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、ブラシノステロイド生合成の阻害剤Brzで処理したシロイヌナズナの中に、胚軸の長さが野生型より短い変異体であるbss1 (brz-sensitive short hypocotyl 1)を発

見し、このbss1変異体の原因遺伝子としてBIL1と相互作用するアンキリンリピートドメインを有するBSS1タンパク質をコードする遺伝子を同定した。BSS1タンパク質についてさらに解析を行ったところ、BSS1タンパク質は、ブラシノステロイドの増減に伴って、他の植物ホルモンなどの生理活性物質では見られないことのない「集合」と「拡散」という珍しい動態を示すこと、ブラシノステロイドの欠損条件ではBIL1タンパク質と結合して細胞質内に捕捉し、BIL1タンパク質の細胞核への移行を阻害する結果、植物の茎の伸長が低下し、草丈が短くなること、一方、ブラシノステロイドの添加条件では、BIL1タンパク質を解放し、BIL1タンパク質が細胞核に移行する結果、植物の茎の伸長が促進し、草丈が長くなるという知見を得た。これらの結果から、植物の成長（草丈の伸長）の制御が、BSS1タンパク質の「集合」と「拡散」というタンパク質の動態によってコントロールされているという新しい制御メカニズムを明らかにした。本発明はかかる知見により完成されたものである。

[0008] 即ち、本発明は以下の発明を包含する。

(1) BSS1遺伝子の発現が抑制又は促進されていることを特徴とする、形質転換植物。

(2) 以下の(a)～(f)のいずれかの遺伝子の発現が抑制又は促進されていることを特徴とする形質転換植物。

(a) 配列番号2又は5に示す塩基配列からなるDNAを含む遺伝子

(b) 配列番号2又は5に示す塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつブラシノステロイドのマスター転写因子BIL1タンパク質に結合して細胞核内への移行を阻害し、ブラシノステロイドのシグナル伝達を負に制御する活性を有するタンパク質をコードするDNAを含む遺伝子

(c) 配列番号2又は5に示す塩基配列に対して60%以上の配列同一性を有する塩基配列からなり、かつブラシノステロイドのマスター転写因子BIL1タンパク質に結合して細胞核内への移行を阻害し、ブラシノステロイドのシグナル伝達を負に制御する活性を有するタンパク質をコードするDNAを含む遺伝子

(d) 配列番号 3 又は 6 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子

(e) 配列番号 3 又は 6 に示す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、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつブラシノステロイドのマスター転写因子BIL1タンパク質に結合して細胞核内への移行を阻害し、ブラシノステロイドのシグナル伝達を負に制御する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子

(f) 配列番号 3 又は 6 に示すアミノ酸配列に対して60%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつブラシノステロイドのマスター転写因子BIL1タンパク質に結合して細胞核内への移行を阻害し、ブラシノステロイドのシグナル伝達を負に制御する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子

(3) 植物が、植物体、植物器官、植物組織、又は植物培養細胞である、(1) 又は (2) に記載の形質転換植物。

(4) 植物が、単子葉植物又は双子葉植物である、(1) ~ (3) のいずれかに記載の形質転換植物。

(5) BSS1遺伝子の植物体における発現を抑制又は促進することを特徴とする、植物の成長の制御方法。

(6) 以下の(a)~(f)のいずれかの遺伝子の植物体における発現を抑制又は促進することを特徴とする、植物の成長の制御方法。

(a) 配列番号 2 又は 5 に示す塩基配列からなるDNAを含む遺伝子

(b) 配列番号 2 又は 5 に示す塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつブラシノステロイドのマスター転写因子BIL1タンパク質に結合して細胞核内への移行を阻害し、ブラシノステロイドのシグナル伝達を負に制御する活性を有するタンパク質をコードするDNAを含む遺伝子

(c) 配列番号 2 又は 5 に示す塩基配列に対して60%以上の配列同一性を有する塩基配列からなり、かつブラシノステロイドのマスター転写因子BIL1タン

パク質に結合して細胞核内への移行を阻害し、ブラシノステロイドのシグナル伝達を負に制御する活性を有するタンパク質をコードするDNAを含む遺伝子

(d) 配列番号3又は6に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子

(e) 配列番号3又は6に示す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、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつブラシノステロイドのマスター転写因子BIL1タンパク質に結合して細胞核内への移行を阻害し、ブラシノステロイドのシグナル伝達を負に制御する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子

(f) 配列番号3又は6に示すアミノ酸配列に対して60%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつブラシノステロイドのマスター転写因子BIL1タンパク質に結合して細胞核内への移行を阻害し、ブラシノステロイドのシグナル伝達を負に制御する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子

(7) BSS1遺伝子の植物体における発現を抑制又は促進することを特徴とする、成長が制御された植物の作製方法。

(8) 以下の(a)～(f)のいずれかの遺伝子の植物体における発現を抑制又は促進することを特徴とする、成長が制御された植物の作製方法。

(a) 配列番号2又は5に示す塩基配列からなるDNAを含む遺伝子

(b) 配列番号2又は5に示す塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつブラシノステロイドのマスター転写因子BIL1タンパク質に結合して細胞核内への移行を阻害し、ブラシノステロイドのシグナル伝達を負に制御する活性を有するタンパク質をコードするDNAを含む遺伝子

(c) 配列番号2又は5に示す塩基配列に対して60%以上の配列同一性を有する塩基配列からなり、かつブラシノステロイドのマスター転写因子BIL1タンパク質に結合して細胞核内への移行を阻害し、ブラシノステロイドのシグナル伝達を負に制御する活性を有するタンパク質をコードするDNAを含む遺伝子

(d) 配列番号 3 又は 6 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子

(e) 配列番号 3 又は 6 に示す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、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつブラシノステロイドのマスター転写因子BIL1タンパク質に結合して細胞核内への移行を阻害し、ブラシノステロイドのシグナル伝達を負に制御する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子

(f) 配列番号 3 又は 6 に示すアミノ酸配列に対して60%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつブラシノステロイドのマスター転写因子BIL1タンパク質に結合して細胞核内への移行を阻害し、ブラシノステロイドのシグナル伝達を負に制御する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子

(9) 植物が、植物体、植物器官、植物組織、又は植物培養細胞である、(5)～(8)のいずれかに記載の方法。

(10) 植物が、単子葉植物又は双子葉植物である、(5)～(8)のいずれかに記載の方法。

(11) 以下の(a)～(f)のいずれかの遺伝子の発現を抑制することによって、植物のバイオマスを増量させる方法。

(a) 配列番号 2 又は 5 に示す塩基配列からなるDNAを含む遺伝子

(b) 配列番号 2 又は 5 に示す塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつブラシノステロイドのマスター転写因子BIL1タンパク質に結合して細胞核内への移行を阻害し、ブラシノステロイドのシグナル伝達を負に制御する活性を有するタンパク質をコードするDNAを含む遺伝子

(c) 配列番号 2 又は 5 に示す塩基配列に対して60%以上の配列同一性を有する塩基配列からなり、かつブラシノステロイドのマスター転写因子BIL1タンパク質に結合して細胞核内への移行を阻害し、ブラシノステロイドのシグナル伝達を負に制御する活性を有するタンパク質をコードするDNAを含む遺伝子

(d) 配列番号 3 又は 6 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子

(e) 配列番号 3 又は 6 に示す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、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつブラシノステロイドのマスター転写因子BIL1タンパク質に結合して細胞核内への移行を阻害し、ブラシノステロイドのシグナル伝達を負に制御する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子

(f) 配列番号 3 又は 6 に示すアミノ酸配列に対して60%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつブラシノステロイドのマスター転写因子BIL1タンパク質に結合して細胞核内への移行を阻害し、ブラシノステロイドのシグナル伝達を負に制御する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子

(12) バイオマスを増量が、草丈若しくは茎丈の伸長促進、維管束の分化促進、葉柄の伸長、又は葉の上偏成長である、(11)に記載の方法。

[0009] 本願は、2015年1月27日に出願された米国仮特許出願No. 62/108,327の優先権を主張するものであり、該特許出願の明細書に記載される内容を包含する。

発明の効果

[0010] 本発明によれば、ブラシノステロイド生合成の阻害剤Brz処理による胚軸伸長抑制効果が野生型より高いbss1 (brz-sensitive short hypocotyl 1)変異体の原因遺伝子として同定されたBSS遺伝子を用いる植物の成長成長方法が提供される。BSS遺伝子はブラシノステロイドのシグナル伝達を負に制御する活性を有するので、BSS遺伝子の植物体での発現を抑制又は促進することにより植物の成長（草丈や茎丈の伸長、維管束の分化、葉の上偏成長、葉柄の伸長など）を制御することが可能となり、植物バイオマス増産や植物への二酸化炭素固定促進のための基盤技術の開発につながることを期待できる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]図1 Aは、DMSO又は3 μ M Brzを含有する培地にて7日間暗所で育成した

野生型(WT)、*bss1-1D*、及びBSS1-0Xの表現型を示す(スケールバー: 1mm)。
図1 Bは、異なる濃度のBrzを含有する培地にて7日間暗所で育成した野生型(WT)、*bss1-1D*、及びBSS1-0Xの胚軸の長さを示す。結果は平均値 ± 標準偏差 ($n>30$)で表した。図1 Cは、30日間長日条件下土壌で育成した野生型(WT)、*bss1-1D*、及びBSS1-0Xの表現型を示す。右パネルは40日後の表現型を示す。図1 Dは、野生型(WT)及び*bss1-1D*の葉の形態を示す。図1 Eは、*bss1-1D*のT-DNA挿入部位に隣接するゲノム領域のダイアグラムを示す。図1 Fは、図1 Cに示した明所で育成した野生型(WT)、*bss1-1D*、BSS1-0XにおけるBSS1/BO P1(At3g57130)の発現レベルのqRT-PCR解析結果を示す。結果は4回の独立した実験の平均値 ± 標準偏差として表す。すべてのqRT-PCR解析についてACT2を内部コントロールとして用いた。

[図2]図2 Aは、野生型(WT)及びBSS1-0XにおけるBR-応答性遺伝子のBrz及びBL応答性を示す。暗所で育成した7日齢苗をDMSO(Mock)、3 μ M Brz (+Brz)、又は100 nM BL (+BL)を含む培地で3時間処理し、TCH、BAS1、IAA19、及びSAUR-AC1の発現レベルをqRT-PCRによって解析した。データは4回の独立した実験の平均値 ± 標準偏差で表す(** $P<0.01$, Student's t-test)。図2 Bは、野生型(WT)、*bss1-1D*、及びBSS1-0XにおけるBIL1のリン酸化状態のイムノブロット解析を示す。Brzを添加した培地で育成した10日齢の苗を100nM BL又はmock溶液で3時間処理した。全タンパク質を抽出し、抗-BIL1抗体でイムノブロットングによって解析した。P-BIL1はリン酸化BIL1、de P-BIL1は脱リン酸化BIL1を示す。上側のパネルは、野生型(WT)、*bss1-1D*、及びBSS1-0X植物から抽出したBIL1タンパク質のイムノブロットを示す。リン酸化BIL1(上)及び脱リン酸化BIL1(下)のシグナル強度を三角矢印で示し、各バンドシグナルはWT苗におけるリン酸化BIL1のレベルに対するパーセントとしてカウントした。下側のパネルは、ポンソーS-染色ゲルを示す。

[図3]図3 Aは、DMSO又は3 μ M Brzを含む培地で、7日間暗所で育成した野生型(WT)、*bss1-1D*、及びBSS1欠損型変異体(*bop1-3*, *bop2-1*, *bop1-3 bop2-1*)の表現型(スケールバー: 1 mm)を示す。図3 Bは、DMSO又は3 μ M Brzを含

む培地で、7日間暗所で育成させた後の野生型 (WT) と比較したBSS1欠損型変異体 (bop1-3, bop2-1, bop1-3 bop2-1) の相対胚軸長を示す。結果は平均値±標準偏差で表す (n=34, *P<0.05, Student's t-test)。図3Cは、BSS1欠損型変異体 (bop1-3 bop2-1) におけるBR-応答性遺伝子のBrz及びBL応答性を示す。明所で育成した9日齢苗をDMS0 (Mock)、3 μ M Brz (+Brz)、又は100 nM BL (+BL) を含む培地で3時間処理し、TCH4、BAS1、IAA19、及びSAUR-AC1の発現レベルをqRT-PCRによって解析した。データは4回の独立した実験の平均値±標準偏差で表す (**P<0.01, *P<0.05, Student's t-test)。図3Dは、野生型 (WT) 及びBSS1欠損型変異体 (bop1-3 bop2-1) のリン酸化状態のイムノブロット解析を示す。リン酸化BIL1 (上) 及び脱リン酸化BIL1 (下) のシグナル強度を三角矢印で示し、各バンドシグナルはWT苗におけるリン酸化BIL1のレベルに対するパーセントとしてカウントした。下側のパネルは、ポンソーS-染色ゲルを示す。

[図4] 図4Aは、Brz無添加 (cont.) 又は3 μ M添加 (+Brz) の培地で暗所又は明所で7日間育成した野生型 (WT) 苗中のBSS1の発現レベルのqRT-PCR解析結果を示す。データは4回の独立した実験の平均値±標準偏差で表す。図4Bは、BSS1 pro:GUSを発現する形質転換植物内のGUSレポーター遺伝子発現を示す。試料は図4Aと同条件で3日間育成した (スケールバー: 5 mm)。図4C～Eは、BSS1発現レベルをqRT-PCRによって測定した結果を示す。BSS1発現レベルの解析には、異なる濃度のBrz (図4C) 及びBL (図4D) を添加した培地で明所で7日間育成した野生型 (WT) 苗、0-7日間光を照射して明所で育成した苗を用いた (図4E)。データは4回の独立した実験の平均値±標準偏差で表す。

[図5] 図5Aは、3 μ MのBrz (左) 又は100 nMのBL (右) を添加した培地で育成した10日齢の苗の根細胞中のBSS1-GFPを示す (スケールバー: 10 μ m。Cont: mock-処理コントロール)。図5Bは、暗所で育成した4日齢の苗を3 μ M Brz (+Brz)、mock 処理 (Mock) として同量のDMS0、又は100 μ M BL (+BL) で1時間処理した胚軸細胞中のBSS1-GFPを示す (スケールバー: 10 μ m)。図5C～

Eは、Brz及びBLで処理した際のBSS1-GFP 斑点シグナル強度の解析を示す。7日齢のBSS1-GFP形質転換苗を3 μ M Brz(Brz)、等量のDMSO(Mock)、又は100 μ M BL(BL)で3時間処理した。図5 Cのグラフは細胞あたりの斑点の数を示す。図5 Dのグラフは、シグナル強度比(斑点/全細胞)を示す(n=9, *P<0.05, **P<0.01, Student's t-test)。図5 Eのグラフは、斑点のシグナル強度を示す(n=73)。結果は平均値±標準偏差で表す。シグナル強度はImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>)を用いて測定した。

[図6]図6 Aは、Brzを添加した培地で10日間育成した形質転換植物の葉由来の非還元(-DTT)及び還元(+DTT)タンパク質を抗-GFP抗体を用いてイムノブロッティングによって解析した結果を示す。三角矢印(O)はオリゴマーBSS1-GFP、三角矢印(M)はモノマーBSS1-GFPを示す。図6 Bは、4 μ M FM4-64 で30分間染色したBSS1-GFP形質転換植物の根細胞を示す(スケールバー:10 μ m)。図6 Cは、50 μ M brefeldin A (BFA)で1時間処理したBSS1-GFP形質転換植物の根細胞を示す(スケールバー:10 μ m)。図6 Dは、3 μ M Brz 添加培地で4日間育成したBSS1-プロモーター:BSS1-GFP 形質転換植物の胚軸細胞を示す(白矢印: BSS1-GFP斑点。スケールバー:10 μ m)。図6 Eは、超遠心及び界面活性剤処理のBSS1オリゴマーに対する効果を示す。全ライセートを形質転換植物から調製し、超遠心分離して不溶性画分(沈降物)及び可溶性画分(上清)に分離した。不溶性画分を、所定の界面活性剤で処理し、さらに超遠心分離に供した。得られた上清及びペレットを免疫ブロッティングに供した。コントロールは、所定の界面活性剤で処理したBIL2-GFP(ミトコンドリアに局在したタンパク質)試料を上記と同様にして遠心分離した。

[図7]図7 Aは、3 μ M Brzを含む培地にて暗所で7日間育成した野生型(WT)、bss1-1D、bil1-1D、及びbss1-1D bil1-1D 二重変異体の表現型を示す(スケールバー:1 mm)。図7 Bは、長日条件下40日間土壌で育成したbss1-1D、bil1-1D、及び bss1-1D bil1-1D 二重変異体の表現型を示す。図7 Cは、 β -ガラクトシダーゼ活性測定に基づくBSS1とBIL1間の酵母ツーハイブリッドアッセイの結果を示す。BIL1を結合ドメイン(BD)に融合させ、BSS1をpreyドメイ

ン(AD)に融合させた。空ベクターをコントロールとして用いた。結果は3回の独立した実験の平均値±標準偏差として表す。図7Dは、BSS1及びBIL1の共免疫沈降の結果を示す。野生型(WT)、FLAG-BIL1、BSS1-GFP、及びBSS1-GFP FLAG-BIL1の苗を23日間明所にてプレート上で育成した。FLAG-BIL1を抗-FLAG抗体を用いて免疫沈降させ、抗-GFP及び抗-FLAG抗体を用いてイムノブロットした。図7Eは、シロイヌナズナプロトプラスト細胞内のBSS1(nEYFP-BSS1)とBIL1(BIL1-cEYFP)の間の相互作用のBiFC (Bi-molecular Fluorescence Complementation) 解析結果を示す。プロトプラスト培地はDMSO、100nM BL、又は3 μ M Brz含み、細胞は12時間培養した。一番下のパネルはnYFP-BSS1及びBSS1-cEYFPをコトランスフェクトしたプロトプラストを示す(YFP: YFP蛍光、BF: 明視野、Merge: YFP とBFのマージ(Merge)画像。矢印: 核、スケールバー: 5 μ m)。

[図8]図8Aは、3 μ M Brz (+Brz)又はDMSO(Cont.)を添加した培地で育成した4日齢苗の根細胞におけるBIL1-GFPを示す(スケールバー: 10 μ m)。図8Bは、暗所で育成した野生型(WT)又はbri1-116バックグラウンドの4日齢苗の根細胞におけるBIL1-GFPを示す(スケールバー: 10 μ m)。

[図9]図9Aは、DMSO(Cont.)又は3 μ M Brz (Brz)を含む培地にて育成した4日齢の野生型(WT)又はbop1-3 bop2-1の苗の根細胞におけるBIL1-GFPの画像を示す(スケールバー: 10 μ m)。図9Bは、4日齢の野生型(WT)及びbop1-3 bop2-1の苗の根細胞におけるシグナル比(核/細胞質)を示す。結果を平均値±標準偏差として表す(n=61, *P<0.01, Student's t-test)。図9Cは、培地で育成した4日齢の野生型(WT)及びBSS1-0X2バックグラウンドの苗を3 μ M Brzで3時間処理した後の根細胞におけるBIL1-GFPの画像を示す(スケールバー: 10 μ m)。図9Dは、4日齢の野生型(WT)及びBSS1-0X2の苗の根細胞におけるシグナル強度比(核/細胞質)を示す。結果は平均値±標準偏差として示す(n=27, *P<0.01, Student's t-test)。

[図10]図10Aは、3 μ M Brzを含む培地で、暗所で7日間育成した野生型(WT)、BSS1-0X、bes1-1D、及びBSS1-0X/bes1-1D 二重変異体の表現型を示す(

スケールバー：1 mm)。図10Bは、長日条件下40日間土壌で育成したBSS1-0X、bes1-1D、及びBSS1-0X/bes1-1D二重変異体の表現型を示す。図10Cは、 β -ガラクトシダーゼ活性を測定することによって評価した、酵母ツーハイブリッドアッセイを用いるBSS1とBES間の相互作用を示す。最初の20アミノ酸欠損したBES1をコードするcDNAをpDEST32 結合ドメインベクター(BD)にクローン化した。BSS1のcDNAをpDEST22 prey vector (AD)にクローン化した。空ベクター(E)をコントロールとして用いた。結果を3回の独立した実験の平均±標準偏差として表わす(* $P < 0.05$, Student's t-test)。図10Dは、シロイヌナズナのプロトプラスト細胞におけるBSS1とBES1の間のBiFC (Bi-molecular Fluorescence Complementation) 解析結果を示す。プロトプラスト細胞はYFP-BSS1及び/又はBES1-cEYFP構築物でコトランスフェクトした。プロトプラスト細胞はコントロール試験としてDMSOを含む培地で育成した (YFP : YFP 蛍光、BF : 明視野、Merge : YFP とBFのマージ(Merge)画像。矢印 : 核、スケールバー : 5 μ m)。

[図11]BRシグナル伝達におけるBSS1機能のモデルを示す。BrzによるBR活性化の不存在下では、BSS1 mRNA発現が誘導された。BSS1はホモオリゴマーを形成し、BIL1に結合し、BIL1の核への移送を阻害した。BRの刺激により、BSS1オリゴマーはモノマーに減少し、その結果、BIL1オリゴマーの核への移送と、BR-反応性遺伝子の発現が誘導された。

[図12]図12A-Cは、35日間長日条件下土壌で育成した野生型(WT)、bss1-1D、及びBR-生合成変異体 (det2)、BR-シグナル伝達変異体 (bri1, bin2)の表現型を示す。図12D-Eは、3 μ M Brz添加 (図12D) 又は無添加 (図12E) の培地にて暗所で7日間育成した野生型(WT)、bss1-1D、及びBR-生合成変異体 (det2)、BR-シグナル伝達変異体 (bin2-1)の表現型を示す。

[図13]図13Aは、BSS1/BOP1、BOP2、及びNPR1タンパク質のマルチプル配列アラインメントを示す。図13Bは、BSS1/BOP1及びホモログの系統樹を示す。

[図14]図14は、イネ野生型 (Nipponbare)およびイネBSS1-RNAi株の表現型

を示す。

[図15]図15は、イネ野生型 (Nipponbare)およびイネBSS1-RNAi株の分けつ数、籽粒数、稔実種子数を示す。

発明を実施するための形態

[0012] 以下、本発明を詳細に説明する。

1. BSS遺伝子

本発明は、シロイヌナズナのbss1 (brz-sensitive short hypocotyl 1)変異体の原因遺伝子であるBSS遺伝子の利用に関する。本発明は、BSS遺伝子の発現制御によって植物の成長を制御する方法を提供するものである。

[0013] BSS遺伝子は、実験植物シロイヌナズナだけでなく、植物種を超えて、イネ、トウモロコシ、サトウキビなどにも広く保存されている遺伝子であり、いずれの植物の由来のBSS遺伝子であっても利用できる。BSS遺伝子が由来する植物としては、例えばイネ、オオムギ、コムギ、トウモロコシ、サトウキビ、シバ、ソルガム、アワ、及びヒエ等の単子葉植物、ダイズ、ナタネ、トマト、バレイショ等の双子葉植物が挙げられるが、これらに限定はされない。

[0014] 例えば、シロイヌナズナのBSS遺伝子 (AtBSS遺伝子) は、配列番号1に示すゲノムDNA配列を有し、配列番号2に示すcDNA配列を有する。BSS遺伝子のオープンリーディングフレーム(ORF)は、配列番号1に示す塩基配列の第278位から826位までの領域 (549塩基) であり、配列番号3に示すアミノ酸配列 (182アミノ酸) からなるタンパク質をコードする。イネのBSS遺伝子 (OsBSS遺伝子) は、配列番号4に示すゲノムDNA配列を有し、配列番号5に示すcDNA配列を有する。BSS遺伝子のオープンリーディングフレーム(ORF)は、配列番号4に示す塩基配列の第1位から528位までの領域と第1497位から2453位までの領域 (1485塩基) であり、配列番号6に示すアミノ酸配列 (494アミノ酸) からなるタンパク質をコードする。

[0015] 本発明において用いるBSS遺伝子は、配列番号2に示す配列からなるAtBSS遺伝子、配列番号5に示すOsBSS遺伝子のほか、当該遺伝子と同等の機能を有する限り、配列番号2又は5に示す塩基配列と類似する塩基配列からなるホ

モログBSS遺伝子を使用することもできる。ホモログBSS遺伝子は、天然から調製されたものでも人工的に調製されたものでもよい。例えば、上記配列番号の塩基配列のホモログ（オーソログ、パラログを含む）、人工的に変異をいれたものであってもよい。

[0016] 従って、本発明に用いるBSS遺伝子には以下の遺伝子が包含される。

(a) 配列番号2又は5に示す塩基配列からなるDNAを含む遺伝子

(b) 配列番号2又は5に示す塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつブラシノステロイドのマスター転写因子BIL1タンパク質に結合して細胞核内への移行を阻害し、ブラシノステロイドのシグナル伝達を負に制御する活性を有するタンパク質をコードするDNAを含む遺伝子

(c) 配列番号2又は5に示す塩基配列に対して60%以上の配列同一性を有する塩基配列からなり、かつブラシノステロイドのマスター転写因子BIL1タンパク質に結合して細胞核内への移行を阻害し、ブラシノステロイドのシグナル伝達を負に制御する活性を有するタンパク質をコードするDNAを含む遺伝子

(d) 配列番号3又は6に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子

(e) 配列番号3又は6に示す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、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつブラシノステロイドのマスター転写因子BIL1タンパク質に結合して細胞核内への移行を阻害し、ブラシノステロイドのシグナル伝達を負に制御する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子

(f) 配列番号3又は6に示すアミノ酸配列に対して60%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつブラシノステロイドのマスター転写因子BIL1タンパク質に結合して細胞核内への移行を阻害し、ブラシノステロイドのシグナル伝達を負に制御する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子

[0017] 上記の「ストリンジントな条件」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。上記のストリンジेंटなハイブリダイゼーション条件は、当業者であれば、Sambrookら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory(2001)を参照し、適宜選択することができる。一例を示せば、25%ホルムアミド、よりストリンジेंटな条件では50%ホルムアミド、4×SSC、50mM HEPES (pH7.0)、10×デンハルト溶液、20 μg/ml変性サケ精子DNAを含むハイブリダイゼーション溶液中、42℃で一晩プレハイブリダイゼーションを行った後、標識したプローブを添加し、42℃で一晩保温することによりハイブリダイゼーションを行う。その後の洗浄における洗浄液及び温度条件は、「1×SSC、0.1% SDS、37℃」程度であり、よりストリンジेंटな条件としては「0.5×SSC、0.1% SDS、42℃」程度であり、さらにストリンジेंटな条件としては「0.2×SSC、0.1% SDS、65℃」程度である。温度が高いほど、塩濃度が低いほどストリンジエンシーは高くなり、より同一性の高い遺伝子を単離できる。

[0018] 但し、上記SSC、SDS及び温度の条件の組み合わせは例示であり、当業者であれば、ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーを決定する上記若しくは他の要素（例えば、プローブ濃度、プローブの長さ、ハイブリダイゼーション反応時間など）を適宜組み合わせることにより、上記と同様のストリンジエンシーを実現することが可能である。

[0019] 上記のストリンジेंटな条件下でのハイブリダイゼーションにより得られるDNAは、配列番号2又は5に示す塩基配列により示されるDNAと通常高い同一性を有する。ここで、高い同一性とは、上記配列番号の塩基配列と少なくとも60%以上、好ましくは70%以上、80%以上、85%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、もっとも好ましくは97%以上（例えば、98から99%）の配列の同一性をいう。

[0020] また、上記の「1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列」について、欠失、置換若しくは付加されてもよいアミノ酸の数としては、部位特異的突然変異誘発法等の公知の変異タンパク質作製法

により欠失、置換、若しくは付加できる程度の数を行い、「ブラシノステロイドのマスター転写因子BIL1タンパク質に結合して細胞核内への移行を阻害し、ブラシノステロイドのシグナル伝達を負に制御する活性」を保持する限り、その個数は制限されないが、通常は、たとえば、1～20個、好ましくは1～10個、より好ましくは1～7個、さらに好ましくは1～5個をいう。ここで、他のアミノ酸への置換としては、疎水性アミノ酸（Ala、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、Trp、Thr、Val）、親水性アミノ酸（Arg、Asp、Asn、Cys、Glu、Gln、Gly、His、Lys、Ser、Thr）、脂肪族側鎖を有するアミノ酸（Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro）、水酸基含有側鎖を有するアミノ酸（Ser、Thr、Tyr）間の置換などが含まれる。また、ここにいう「変異」は、主には公知の変異タンパク質作製法により人為的に導入された変異を意味するが、天然に存在する同様の変異であってもよい。あるアミノ酸配列に対する1又は数個のアミノ酸残基の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換されたアミノ酸配列を有するポリペプチドがその生物学的活性を維持することはすでに知られている。

[0021] また、前記のアミノ酸配列に関し、「60%以上の配列同一性」とは、好ましくは70%以上、80%以上、85%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましく95%以上、最も好ましくは97%以上（例えば、98から99%）の配列の同一性をいう。

[0022] 本明細書において配列同一性とは、比較対象の少なくとも2つの配列を整理化させ、それぞれの配列に存在する同一の残基を決定して、適合部位の数を決定し、次いで、比較対象の配列領域内の残基の総数で、前記適合部位の数を割り、得られた数値に100をかけることにより算出される値をいう。配列の同一性は、BLASTN（核酸レベル）やBLASTX（アミノ酸レベル）のプログラムを利用して決定することができる。

[0023] 本発明に用いるBSS遺伝子は、公知技術によって調製することができる。例えば、シロイヌナズナ又はイネ組織抽出物からtotal mRNAを調製し、配列番号2又は5の塩基配列をもとにプライマーを設計し、RACE法等を行って上記

配列番号の塩基配列の完全長cDNAを得ることができる。又はシロイヌナズナ又はイネ組織抽出物からcDNAライブラリーを作製し、上記配列番号の塩基配列をもとにプローブを設計し、ハイブリダイゼーション法によって得ることもできる。さらには、上記配列番号の塩基配列をもとに、人工的に合成してもよい。

[0024] また、当業者であれば、Molecular Cloning (Sambrook, J. et al., Molecular Cloning :a Laboratory Manual 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 10 Skyline Drive Plainview, NY (2001))等を参照することにより、BSS遺伝子のホモログを容易に取得することができる。

[0025] たとえば、アミノ酸の欠失、付加、及び置換は、上記タンパク質をコードする遺伝子に、当該技術分野で公知の手法によって変異を導入することによって行うことができる。遺伝子に変異を導入するには、Kunkel法又は Gapped duplex法等の公知手法又はこれに準ずる方法により行うことができ、例えば部位特異的突然変異誘発法を利用した変異導入用キット（例えばMutant-K(TAKARA社製)やMutant-G(TAKARA社製)）、TAKARA社のLA PCR in vitro Mutagenesis シリーズキットを利用することができる。あるいは、上記配列番号の塩基配列に変異を導入した配列を、市販の核酸合成装置によって合成することも可能である。

[0026] 2. 形質転換植物及びその作製方法

本発明の形質転換植物は、上記のBSS遺伝子の植物体における発現を抑制又は促進するように対象の植物を形質転換することによって作出することができる。BSS遺伝子の発現の抑制には、BSS遺伝子の転写の抑制及びタンパク質への翻訳の抑制が含まれる。また、発現の抑制には、発現の完全な停止のみならず発現の減少も含まれる。一方、BSS遺伝子の発現の促進には、BSS遺伝子の転写の促進及びタンパク質への翻訳の促進が含まれる。また、発現の促進には、過剰発現のみならず発現の増加も含まれる。

[0027] BSS遺伝子の発現が抑制された形質転換植物は、植物体に存在するBSS遺伝子の発現を抑制することにより作出できる。BSS遺伝子の発現を抑制する方法

としては、アンチセンス法、RNAi法、リボザイム法、共抑制法などが挙げられる。これらの方法は、内因性BSS遺伝子の発現を抑制させるDNAを導入することにより行なわれる。本明細書において「内因性BSS遺伝子」とは形質転換の対象となる植物に元来存在するBSS遺伝子をいう。

[0028] アンチセンス法においては、BSS遺伝子の発現を抑制させるDNAとして、該遺伝子から転写されるmRNAの全部又はその一部に対して相補的な配列を有するRNA（アンチセンスRNA）をコードするアンチセンスDNAを用いる。アンチセンスDNAは、その相補鎖であるBSS遺伝子の転写産物であるmRNAと結合し、それによってBSS遺伝子の翻訳を阻害し、発現を抑制できる。アンチセンスRNAをコードするアンチセンスDNAの塩基配列の長さは、BSS遺伝子の発現を抑制することのできる長さであれば、必ずしもBSS遺伝子のmRNAの塩基配列の全長である必要はなく、一部であってもよい。一部とは、BSS遺伝子のmRNAの塩基配列全長の30%、好ましくは50%、より好ましくは80%、さらに好ましくは90%に該当する長さである。

[0029] アンチセンスDNAは、組換えベクターにおいてアンチセンスの方向に連結する。連結は、直接でも、又はリンカーを介した連結でもよい。アンチセンスDNAは、宿主内で転写されたときに、BSS遺伝子のmRNAに対してハイブリダイズするアンチセンスRNAが生成するようにベクターに連結し、該ベクターを植物細胞に導入する。アンチセンスRNAが生成するようにベクターに連結するには、プロモーター配列を有するDNA断片の下流にアンチセンスの方向（逆向き方向）にアンチセンスDNAを連結し、プロモーターの作動によりRNAに転写されるようにする。

[0030] RNAi法においては、BSS遺伝子の発現を抑制させるDNAとして、RNA干渉（RNAi）によりBSS遺伝子の発現を抑制するRNAをコードするDNA、すなわち、BSS遺伝子の配列と同一もしくは類似した配列を逆位反復に配置したDNAを用いることもできる。RNA干渉とは、宿主に標的遺伝子と同一もしくは類似した配列を逆位反復に配置したDNAを形質転換により導入すると、導入DNAに由来する二本鎖RNAが発現し、標的遺伝子の発現が抑制される現象をいう。RNA干渉は、（

i) 標的遺伝子のmRNAと導入配列由来の二本鎖RNA (double-strand RNA、dsRNA) がRNA-induced silencing complex(RISC)と呼ばれる複合体を形成し、会合した配列をプライマーとして相補的なRNAが合成されるステップ、(ii)内在性RNase によってこの複合体が断片化されるステップ、(iii)20~30塩基対に断片化した二本鎖RNA (small interfering RNA、siRNA) が二次的なRNA干渉のシグナルとして機能することによって再び標的遺伝子のmRNAを分解するステップによって進行すると考えられている。RNAi法に用いるDNAの長さとしては、標的遺伝子の全長を使用してもよいが、少なくとも20塩基、好ましくは30塩基以上、より好ましくは50塩基以上であればよい。

[0031] 植物のRNAiには、RNAiを引き起こすdsRNAをヘアピン型dsRNAとして発現するベクターが好適に利用される。これは数塩基以上のリンカー（スペーサー）配列の両端にIR（inverted repeat：逆位反復）となるようにdsRNA形成部分に対応したDNA配列を配置し、植物体内で高発現するプロモーターによりヘアピン型dsRNAを転写し、細胞内でsiRNAを産生するシステムである。また、siRNA発現システムには上記のようなヘアピンタイプのほか、タンデムタイプもある。タンデムタイプでは、2つのプロモーターからセンスRNAとアンチセンスRNAが転写され、細胞内でハイブリダイズしてsiRNAを産生する。このようなRNAiベクターは、当該分野で周知の方法に従い、あるいは市販のRNAi用ベクターやシステム（例えば、psiRNA (Invitrogen)、pSUPER RNAi System™ (OligoEngine) 等）を利用して容易に構築することができる。

[0032] リボザイム法においては、BSS遺伝子の発現を抑制させるDNAとして、BSS遺伝子の転写産物であるmRNAを特異的に切断できるよう設計されたリボザイムをコードするDNAを用いる。リボザイムには、ハンマーヘッド型やヘアピン型と呼ばれる40ヌクレオチド程度の活性ドメインを有するものがあり、そのいずれもが本発明において用いることができる。リボザイムをコードするDNAは、植物細胞中で転写されるように組換えベクター内のプロモーター及び転写終結配列に連結して用いればよい。また、リボザイム部分の5'側や3'側に、植物細胞内でのトリミングのためのシスに働く別のトリミングリボザイムを

配置させてもよい。これにより、転写されたりボザイムを含むRNAからリボザイム部分だけを正確に切り出すことができる。

[0033] 共抑制法においては、BSS遺伝子の発現を抑制するDNAとして、共抑制効果によりBSS遺伝子の発現を抑制するRNAをコードするDNA、すなわち、BSS遺伝子の配列と同一もしくは類似した配列を有するDNAを用いる。共抑制とは、宿主に標的遺伝子と同一もしくは類似した配列を有するDNAを形質転換により導入すると、導入した外来遺伝子及び標的遺伝子の両方の発現が抑制される現象をいう。共抑制に用いる遺伝子は、標的とするBSS遺伝子と完全に同一である必要はないが、少なくとも70%以上、好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上の配列の同一性を有する。

[0034] また、BSS遺伝子の発現が抑制された形質転換植物は、植物中に存在するBSS遺伝子を破壊又はBSS遺伝子の活性を抑制することによっても作出できる。BSS遺伝子を破壊又はBSS遺伝子の活性を抑制する方法としては、例えば、T-DNAの挿入、トランスポゾンの挿入、速中性子線照射、イオンビーム照射、変異原性物質〔アルキル化剤（N-エチル-N-ニトロソウレア（ENU）、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン（NTG）、メタンスルホン酸エチル（EMS）等）；塩基類似化合物（BrdU等）；多環芳香族炭化水素（ベンゾピレン、クリセン等）；DNAインターカレーター（臭化エチジウム等）；DNA架橋剤（シスプラチン、マイトマイシンC等）〕による処理、ドミナントネガティブの形質を有する遺伝子の挿入、部位特異的DNA分解酵素（Zinc Finger Nuclease（ZFN）、Transcription Activator Like Effector Nuclease（TALEN）等）による処理によりBSS遺伝子に変異又は欠失を導入する方法が挙げられる。部位特異的突然変異による方法において、変異（例えば置換）導入部位は、変異導入後に遺伝子がコードするBSSタンパク質の活性が抑制される部位であればよく、変異導入後に遺伝子がコードするBSSタンパク質の活性が消失する部位であることがより好ましい。導入される変異としては、フレームシフト変異、ナンセンス変異、ミスセンス変異が例示され、このうち、フレームシフト変異又はナンセンス変異が好ましい。

[0035] 一方、BSS遺伝子の発現が促進された形質転換植物は、BSS遺伝子をセンス方向に導入することにより作出することができる。従って、目的とする形質に応じてBSS遺伝子の発現を抑制する方法、または、BSS遺伝子の発現を促進する方法のいずれかを選択して行えばよい。

[0036] 上記のBSS遺伝子の発現を抑制する方法、あるいは、BSS遺伝子の発現を促進する方法において用いるベクターは、基本的に通常の植物形質転換用の組換えベクターであってよい。ベクターとしては、例えば、アグロバクテリウムを介して植物にBSS遺伝子又はBSS遺伝子の発現を抑制するDNA（目的遺伝子という）を導入することができる、pBI系、pPZP系、pSMA系、pCAMBIA系のベクターなどが好適に用いられる。特にpBI系のバイナリーベクター又は中間ベクター系が好適に用いられ、例えば、pBI121、pBI101、pBI101.2、pBI101.3等が挙げられる。バイナリーベクターとは大腸菌（*Escherichia coli*）及びアグロバクテリウムにおいて複製可能なシャトルベクターで、バイナリーベクターを保持するアグロバクテリウムを植物に感染させると、ベクター上にあるLB配列とRB配列より成るボーダー配列で囲まれた部分のDNAを植物核DNAに組み込むことが可能である。一方、pUC系のベクターは、植物に遺伝子を直接導入することができ、例えば、pUC18、pUC19、pUC9等が挙げられる。また、カリフラワーモザイクウイルス（CaMV）、インゲンマメモザイクウイルス（BG MV）、タバコモザイクウイルス（TMV）等の植物ウイルスベクターも用いることができる。

[0037] バイナリーベクター系プラスミドを用いる場合、上記のバイナリーベクターの境界配列(LB, RB)間に、目的遺伝子を挿入し、この組換えベクターを大腸菌中で増幅する。次いで、増幅した組換えベクターを*Agrobacterium tumefaciens* GV3101、C58、LBA4404、EHA101、EHA105あるいは*Agrobacterium rhizogenes* LBA1334等に、エレクトロポレーション法等により導入し、該アグロバクテリウムを植物の形質導入に用いる。

[0038] ベクターに目的遺伝子を挿入するには、まず、精製されたDNAを適当な制限酵素で切断し、適当なベクター DNAの制限酵素部位又はマルチクローニング

サイトに挿入してベクターに連結する方法などが採用される。

- [0039] また、組換えベクターには、目的遺伝子上流、内部、あるいは下流に、プロモーター、エンハンサー、ターミネーター、バイナリーベクター系を使用するための複製開始点（Ti又はRiプラスミド由来の複製開始点など）、選抜マーカー遺伝子などを含めることができる。
- [0040] 「プロモーター」としては、植物細胞において機能し、植物の特定の組織内あるいは特定の発育段階において発現を導くことのできるDNAであれば、植物由来のものでなくてもよい。具体例としては、BSS遺伝子自身のプロモーター、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)35Sプロモーター、ノパリン合成酵素遺伝子のプロモーター（Pnos）、トウモロコシ由来ユビキチンプロモーター、イネ由来のアクチンプロモーター、タバコ由来PRタンパク質プロモーター等が挙げられる。また、特定器官について特に目的遺伝子を発現させたい場合は、組織特異的に発現するプロモーターを用いることもできる。例えば、維管束特異的遺伝子のプロモーターを用いれば、本発明の目的遺伝子の植物成長制御効果を効率的に取得することも可能である。
- [0041] エンハンサーとしては、例えば、目的遺伝子の発現効率を高めるために用いられ、CaMV35Sプロモーター内の上流側の配列を含むエンハンサー領域などが挙げられる。
- [0042] ターミネーターとしては、プロモーターにより転写された遺伝子の転写を終結できる配列であればよく、例えば、ノパリン合成酵素（NOS）遺伝子のターミネーター、オクトピン合成酵素(OCs)遺伝子のターミネーター、CaMV 35S RNA遺伝子のターミネーター等が挙げられる。
- [0043] 選抜マーカー遺伝子としては、例えば、アンピシリン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、ピアラホス耐性遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子などが挙げられる。
- [0044] また、選抜マーカー遺伝子は、目的遺伝子とともに同一のプラスミドに連結させて組換えベクターを調製してもよいが、あるいは、選抜マーカー遺伝子をプラスミドに連結して得られる組換えベクターと、目的遺伝子に連結し

て得られる組換えベクターとを別々に調製してもよい。別々に調製した場合は、各ベクターを宿主にコトランスフェクト（共導入）する。

[0045] 本発明の形質転換植物は、目的遺伝子を対象植物に導入することによって作出することができる。本発明において「遺伝子の導入」とは、例えば公知の遺伝子工学的手法により、目的遺伝子を上記宿主植物の細胞内に発現可能な形で導入することを意味する。ここで導入された遺伝子は、宿主植物のゲノムDNA中に組み込まれてもよいし、外来ベクターに含有されたままで存在していてもよい。

[0046] 上記目的遺伝子を植物中に導入する方法としては、既に報告され、確立されている種々の方法を適宜利用することができ、例えば、アグロバクテリウム法、PEGー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が挙げられる。アグロバクテリウム法を用いる場合は、プロトプラストを用いる場合、組織片を用いる場合、及び植物体そのものを用いる場合（in planta法）がある。プロトプラストを用いる場合は、TiプラスミドないしはRiプラスミドをもつアグロバクテリウム（それぞれ*Agrobacterium tumefaciens*又は*Agrobacterium rhizogenes*）と共存培養する方法、スフェロプラスト化したアグロバクテリウムと融合する方法（スフェロプラスト法）、組織片を用いる場合は、対象植物の無菌培養葉片（リーフディスク）に感染させる方法やカルス（未分化培養細胞）に感染させる等により行うことができる。また種子あるいは植物体を用いるin planta法を適用する場合、すなわち植物ホルモン添加の組織培養を介さない系では、吸水種子、幼植物（芽生え）、鉢植え植物などへのアグロバクテリウムの直接処理等にて実施可能である。これらの植物形質転換法は、「島本功、岡田清孝 監修、新版 モデル植物の実験プロトコル 遺伝学的手法からゲノム解析まで（2001）、秀潤社」などの一般的な教科書の記載に従って行うことができる。

[0047] 目的遺伝子が植物体に組み込ま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、ウェスタンブロー

ッティング法等により行うことができる。例えば、形質転換植物からDNAを調製し、目的遺伝子特異的プライマーを設計してPCRを行う。PCRを行った後は、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又はキャピラリー電気泳動等を行い、臭化エチジウム、SYBR Green液等により染色し、そして増幅産物を1本のバンドとして検出することにより、形質転換されたことを確認することができる。また、予め蛍光色素等により標識したプライマーを用いてPCRを行い、増幅産物を検出することもできる。さらに、マイクロプレート等の固相に増幅産物を結合させ、蛍光又は酵素反応等により増幅産物を確認する方法でもよい。さらに、その植物細胞からタンパク質を抽出し、2次元電気泳動を行って分画し、目的遺伝子がコードするタンパク質のバンドを検出することにより、植物細胞に導入された目的遺伝子が発現されていること、すなわちその植物が形質転換されていることを確認してもよい。

[0048] あるいは、種々のレポーター遺伝子、例えば β -グルクロニダーゼ (GUS)、ルシフェラーゼ (LUC)、Green fluorescent protein (GFP)、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT)、 β -ガラクトシダーゼ (LacZ) 等の遺伝子を目的遺伝子の下流域に連結したベクターを作製し、該ベクター導入したアグロバクテリムを用いて上記と同様にして植物を形質転換させ、該レポーター遺伝子の発現を測定することによっても確認できる。

[0049] 本発明において形質転換に用いられる植物としては単子葉植物又は双子葉植物のいずれであってもよく、例えば、例えばアブラナ科、イネ科、ナス科、マメ科、キク科、ヤシ科、ウルシ科、ウリ科、バラ科、ナデシコ科、ヤナギ科、フトモモ科、ユリ科等に属する植物（下記参照）が挙げられる。

[0050] アブラナ科：シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)、アブラナ (*Brassica rapa*、*Brassica napus*)、キャベツ (*Brassica oleracea* var. *capitata*)、ナタネ (*Brassica rapa*、*Brassica napus*)、ナノハナ (*Brassica rapa*、*Brassica napus*)、ハクサイ (*Brassica rapa* var. *pekinensis*)、チンゲンサイ (*Brassica rapa* var. *chinensis*)、カブ (*Brassica rapa* var. *rapa*)、

ノザワナ (*Brassica rapa* var. *hakabura*)、ミズナ (*Brassica rapa* var. *lancinifolia*)、コマツナ (*Brassica rapa* var. *peruviridis*)、パクチヨイ (*Brassica rapa* var. *chinensis*)、ダイコン (*Brassica Raphanus sativus*)、ワサビ (*Wasabia japonica*) など。

イネ科：トウモロコシ (*Zea mays*)、イネ (*Oryza sativa*)、オオムギ (*Hordeum vulgare*)、コムギ (*Triticum aestivum*)、タケ (*Phyllostachys*)、サトウキビ (*Saccharum officinarum*)、ネピアグラス (*Pennisetum purpureum*)、エリアンサス (*Erianthus ravenae*)、ミスキヤンタス (ススキ) (*Miscanthus virgatus*)、ソルガム (*Sorghum*)、スイッチグラス (*Panicum*) など。

ナス科：タバコ (*Nicotiana tabacum*)、ナス (*Solanum melongena*)、ジャガイモ (*Solaneum tuberosum*)、トマト (*Lycopersicon lycopersicum*)、トウガラシ (*Capsicum annuum*)、ペチュニア (*Petunia*) など。

マメ科：ダイズ (*Glycine max*)、エンドウ (*Pisum sativum*)、ソラマメ (*Vicia faba*)、フジ (*Wisteria floribunda*)、ラッカセイ (*Arachis hypogaea*)、ミヤコグサ (*Lotus corniculatus* var. *japonicus*)、インゲンマメ (*Phaseolus vulgaris*)、アズキ (*Vigna angularis*)、アカシア (*Acacia*) など。

キク科：キク (*Chrysanthemum morifolium*)、ヒマワリ (*Helianthus annuus*) など。

ヤシ科：アブラヤシ (*Elaeis guineensis*, *Elaeis oleifera*)、ココヤシ (*Cocos nucifera*)、ナツメヤシ (*Phoenix dactylifera*)、ロウヤシ (*Copernicia*)

ウルシ科：ハゼノキ (*Rhus succedanea*)、カシユーナットノキ (*Anacardium occidentale*)、ウルシ (*Toxicodendron vernicifluum*)、マンゴー (*Mangifera indica*)、ピスタチオ (*Pistacia vera*) など。

ウリ科：カボチャ (*Cucurbita maxima*, *Cucurbita moschata*, *Cucurbita pepo*)、キュウリ (*Cucumis sativus*)、カラスウリ (*Trichosanthes cucumer*

oides)、ヒョウタン (*Lagenaria siceraria* var. *gourda*) など。

バラ科：アーモンド (*Amygdalus communis*)、バラ (*Rosa*)、イチゴ (*Fragaria*)、サクラ (*Prunus*)、リンゴ (*Malus pumila* var. *domestica*) など。

ナデシコ科：カーネーション (*Dianthus caryophyllus*) など。

ヤナギ科：ポプラ (*Populus trichocarpa*、*Populus nigra*、*Populus tremula*) など。

フトモモ科：ユーカリ (*Eucalyptus camaldulensis*、*Eucalyptus grandis*) など。

ユリ科：チューリップ (*Tulipa*)、ユリ (*Lilium*) など。

[0051] 本発明において、形質転換の対象とする植物材料としては、茎、葉、種子、胚、胚珠、子房、茎頂等の植物器官、葯、花粉等の植物組織やその切片、未分化のカルス、それを酵素処置して細胞壁を除いたプロプラスト等の植物培養細胞のいずれであってもよい。またin planta法適用の場合、吸水種子や植物体全体を利用できる。

[0052] 本発明において、形質転換植物とは、植物体全体、植物器官(例えば葉、花弁、茎、根、穀実、種子等)、植物組織(例えば表皮、師部、柔組織、木部、維管束等)、又は植物培養細胞(例えばカルス)のいずれをも意味するものである。

[0053] 植物培養細胞を対象とする場合において、得られた形質転換細胞から形質転換体を再生させるためには既知の組織培養法により器官又は個体を再生させればよい。このような操作は、植物細胞から植物体への再生方法として一般的に知られている方法により、当業者であれば容易に行うことができる。植物細胞から植物体への再生については、例えば、以下のように行うことができる。

[0054] まず、形質転換の対象とする植物材料として植物組織又はプロトプラストを用いた場合、これらが無機要素、ビタミン、炭素源、エネルギー源としての糖類、植物生長調節物質(オーキシン、サイトカイニン、ジベレリン、ア

ブシジン酸、エチレン、ブラシノステロイド等の植物ホルモン)等を加えて滅菌したカルス形成用培地中で培養し、不定形に増殖する脱分化したカルスを形成させる(以下「カルス誘導」という)。このように形成されたカルスをオーキシン等の植物生長調節物質を含む新しい培地に移しかえて更に増殖(継代培養)させる。

[0055] カルス誘導は寒天等の固型培地で行い、継代培養は例えば液体培養で行うと、それぞれの培養を効率良くかつ大量に行うことができる。次に、上記の継代培養により増殖したカルスを適当な条件下で培養することにより器官の再分化を誘導し(以下、「再分化誘導」という)、最終的に完全な植物体を再生させる。再分化誘導は、培地におけるオーキシン等の植物生長調節物質、炭素源等の各種成分の種類や量、光、温度等を適切に設定することにより行うことができる。かかる再分化誘導により、不定胚、不定根、不定芽、不定茎葉等が形成され、更に完全な植物体へと育成させる。あるいは、完全な植物体になる前の状態(例えばカプセル化された人工種子、乾燥胚、凍結乾燥細胞及び組織等)で貯蔵等を行ってもよい。

[0056] 本発明の形質転換植物は、当該遺伝子を導入した植物体(形質転換された細胞やカルスから再生された植物体を含む)の有性生殖又は無性生殖により得られる子孫(T2世代及びT3世代)の植物体、及びその子孫植物体の組織や器官等の一部(種子、プロトプラストなど)も包含するものとする。本発明の形質転換植物は、前記目的遺伝子を導入して形質転換した植物体から、種子、プロトプラストなどの繁殖材料を取得し、それを栽培又は培養することによって量産することができる。

[0057] 上記のようにして得られる形質転換植物のうち、BSS1遺伝子の発現が抑制されている形質転換植物は、BSS1によるブラシノステロイドのシグナル伝達の負の制御が解除される結果、植物の成長が促進され、植物一個体当たりのバイオマスが増量する。本発明においては、「バイオマス」とは、ある時点に任意の空間内に存在する植物体又はその部分の量をいい、当該植物体又はその部分を由来とする物質、食料、資材、燃料、資源などをも含む意味で用

いる。具体的には、バイオマスの増量は、地下茎（根茎、球茎、塊茎、鱗茎）・地上茎・花茎・蔓の肥大、種子の肥大、茎丈・草丈、稈丈、穂丈の伸長促進、葉などのソース器官の増大をいう。本発明によるバイオマスの増量は、植物体の背丈が対象の野生型植物に比較して例えば1.2倍以上、好ましくは1.5倍以上、より好ましくは2倍以上増加することによって特徴付けられる。

[0058] また、上記のようにして得られる形質転換植物のうち、BSS1遺伝子の発現が促進されている形質転換植物は、BSS1によるブラシノステロイドのシグナル伝達の負の制御が働き、植物が矮小化する。矮小化は、代表的には、草丈伸長抑制をいい、植物体の草丈が対象の野生型植物に比較して例えば1.2倍以上、好ましくは1.5倍以上、より好ましくは2倍以上減少することによって特徴付けられる。草丈が低いという表現形質は、台風などの風害に強い、穀粒が増えても倒れにくい、例えばイネの場合、苗を植える列数を増やせるために、単位面積当たりの植苗密度をより大きくすることができる、高さが数メートルになる果樹（バナナ、マンゴなど）やヤシの木（ナツメヤシ、ココナツなど）に適用すると果実の収穫作業が容易になる、単位資源（水や肥料など）当たりの収穫高が大きくなる、などの利点がある。

実施例

[0059] 以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

実施例において使用した材料及び方法を以下に示す。

[材料及び方法]

(1) 植物材料及び育成条件

Arabidopsis thaliana ecotype Columbia (Col-0) を野生型植物として用いた。種子を0.8%フィトアガー (Duchefa) 及び1.5%ショ糖を添加した1/2 ムラシゲスクーグ(MS) 培地(Duchefa)で発芽させ、その後、土壌に移した。植物を白色光(長日条件用に16-時間明所/8-時間暗所サイクル)下、22℃で育成した。

[0060] (2) bss1-1D 変異体のスクリーニング

約10,000 のRIKEN GSC シロイヌナズナアクチベーションタグライン((Nakazawa et al., 2003, Activation tagging, a novel tool to dissect the functions of a gene family. Plant J. 34: 741-750)を3 μ M Brz(Asami et al., 2000, Characterization of brassinazole, a triazole-type brassinosteroid biosynthesis inhibitor. Plant Physiol. 123: 93-100)を含む1/2 M S 培地上でスクリーニングした。暗所で7日間育成した後、コントロールよりも短い胚軸のついた苗を同定し、土壌に移した。インバースPCRを既報(Bradshaw Jr., 2005, Mutations in CAX1 produce phenotypes characteristic of plants tolerant to serpentine soils. New Phytol. 167: 81-88)に記載のとおり、pPCVICE4HPT のT-DNAのフランキングゲノム配列を増幅するのに用いた。全RNA を、暗所で育成した3日齢の野生型及びbss1-1D 植物よりRNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)を用いて抽出した。第一鎖cDNA をPrimeScript (Takara)で合成し、定量的リアルタイムPCR (qRT-PCR)に用いた。qRT-PCR 解析はSYBR Premix ExTaq system (Takara)を用いてThermal Cycler Dice (Takara)用に提供された指示書に従い行った。以下の遺伝子特異的プライマーをqRT-PCR に用いた。

(BSS1用)

5' -CATGACCTAACCTCGACTTT-3' (配列番号7)

5' -CCCATCACCATTAGCTTC-3' (配列番号8)

(構成的に発現するコントロール遺伝子ACT2用)

5' -CGCCATCCAAGCTGTTCTC-3' (配列番号9)

5' -TCACGTCCAGCAAGGTCAAG-3' (配列番号10)

[0061] (3) 形質転換植物の作製

bss1-1D 表現型を再生 (recapitulate) し、細胞内局在を分析するために、停止コドンなしのBSS1cDNAをBSS1-フォワード: 5' -CACCATGAGCAATACTTCGAAGAATCACTCAAA-3' (配列番号11) 及び BSS1-リバーズ: 5' -GAAATGGTGGTG GTGGTGATGATACATC-3' (配列番号12) を用いてArabidopsis Col-0 cDNAか

ら増幅し、pENTR/D-TOPO (Invitrogen)にクローニングし、続いてGateway strategy (Invitrogen)を用いてCaMV 35S プロモーター及びGFPを含むバイナリーベクター pGWB5 (Nakagawa et al., 2007, Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. J. Biosci. Bioeng. 104: 34-41)(<http://shimane-u.org/nakagawa/gbv.htm>)にクローニングした。BSS1 cDNA をCaMV 35SプロモーターとGFPとの間にクローニングした。

[0062] GUSと融合させたBSS1プロモーター、及び自身のプロモーターによって駆動されるGFPと融合させたBSS1を構築するために、第一エクソンとプロモーター領域含む1.0-kb 断片、コーディング領域とプロモーター領域を含む3.0-kb 断片をそれぞれArabidopsis Col-0 ゲノム DNAから増幅した。プライマーとして、GUS 構築物に対しては、BSS1 -GUS-フォワード：5' -CACCATATGGTCGATCCCAAACCAACAGGAGAA-3' (配列番号13) 及びBSS1-GUS-リバーズ：5' -AGTAAGCAACGCGAGCTGCTCGACGCCAAAGTA-3' (配列番号14)、GFP 構築物に対してはBSS1-GFP-フォワード：5' -CACCATATGGTCGATCCCAAACCAACAGGAGAA-3' (配列番号15) 及びBSS1-GFP-リバーズ：5' -GAAATGGTGGTGGTGGTGATGATACATC-3' (配列番号16)を用いた。

[0063] 増幅産物をpENTR/D-TOPO (Invitrogen)にクローニングし、続いてGateway strategy (Invitrogen)を用いてバイナリーベクター pGWB3 及びpGWB4にクローニングした。

BIL1の細胞内局在を分析するために、ストップコドンなしのcDNAをBIL1-フォワード：5' -CACCATGACTTCGGATGGAGCTAC-3' (配列番号17) 及びBIL1-リバーズ：5' -ACCACGAGCCTTCCCATTTC-3' (配列番号18)を用いて増幅し、pENTR/D-TOPO (Invitrogen) にクローニングし、続いてバイナリーベクターpGWB5にクローニングした。得られたCaMV 35S-BSS1-GFP、CaMV 35S-BIL1-GFP、BSS1プロモーター:BSS1-GFP 及びBSS1プロモーター:GUS 融合構築物をフローラルディッピング法(Clough and Bent., 1998)にてCol-0 に形質導入した。形質転換植物を25 mg/L カナマイシンを含有する1/2 MS 培地上で

スクリーニングした。

[0064] (4) 定量的リアルタイムPCR(qRT-PCR)

全 RNA をRNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)を用いて植物から抽出した (QIAGEN)。

第一鎖cDNA をPrimeScript (Takara)を用いて合成し、qRT-PCRにおいて使用した。qRT-PCRは、SYBR Premix ExTaq system (Takara)を用いてThermal Cycler Dice (Takara) 用に提供された指示書に従い行った。以下のプライマーを用いた。

(TCH4用)

TCH4-フォワード : 5' -CGAGTCTTGAACGCTGAT-3' (配列番号 19)

TCH4-リバース : 5' -CTTCTTGTTGAAAGCCACGG-3' (配列番号 20)

(BAS1用)

BAS1-フォワード : 5' -GCCAAATTGACACTCGCTGTAA-3' (配列番号 21)

BAS1-リバース : 5' -GACGGTAGGTGCATGCTGATAA-3' (配列番号 22)

(IAA19用)

IAA19-フォワード : 5' -GAAGGACTCGGGCTTGAGAT-3' (配列番号 23)

IAA19-リバース : 5' -GACGCCGCTTTCACATTG-3' (配列番号 24)

(SAUR-AC1用)

SAUR-AC1-フォワード : 5' -GAGATATGTGGTGCCGGTTT-3' (配列番号 25)

SAUR-AC1-リバース : 5' -GTATTGTTAAGCCGCCATT-3' (配列番号 26)

[0065] (5) GUS 染色

BSS1プロモーター:GUS 形質転換植物の苗をGUS 発現の組織学的検出に用いた。試料を既報(Ito and Fukuda, 2002, ZEN1 is a key enzyme in the degradation of nuclear DNA during programmed cell death of tracheary elements. Plant Cell 14: 3201-3211)に記載のとおり、GUS 染色溶液中で37℃にて一晩染色した。GUS 発現の誘導を試験するために、3日齢の形質転換苗を3 μ M Brz又はコントロールとしてジメチルスルホキシド(DMSO)を添加した培地で育成した。

[0066] (6) 蛍光顕微鏡観察

CaMV35S-BSS1-GFP 構築物 BSS1(-GFP)-OX及びCaMV35S-BIL1-GFP 構築物 BIL1-GFP-OXで形質転換した植物を、Model CSU10共焦点スキャナ (Yokogawa Electric) 及び LSM700 (Zeiss)を備えた BX60蛍光顕微鏡(Olympus)を用いて共焦点走査型顕微鏡観察を行った。

[0067] (7) BFA 処理及びFM4-64 染色

水に溶解したFM4-64 (Molecular Probes) を最終濃度4 μ Mで3分間 シロイヌナズナ植物にアプライした。過剰な染色剤を除去するために植物を水洗し、観察した。Brefeldin A (BFA)(Sigma)のDMSO-ベースストック溶液を 最終濃度50 μ Mで1時間細胞にアプライした。

[0068] (8) シグナル強度の解析

画像をImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>)を用いて解析した。各細胞についてBIL1-GFPの核及び細胞質シグナルの割合を測定するために、核及び細胞質におけるシグナル強度を各エリア内の強度の平均値から算出した。細胞質シグナルに対する核シグナルの割合を各細胞について算出した。平均核／細胞質シグナル比及び標準偏差を各系統から少なくとも54細胞の測定から算出した(図9B)。液胞から核まで細胞質全体にわたりラインスキャン測定を行った。試料測定の代表的なプロットプロフィールを図5Cに示す。

[0069] (9) BiFC

BSS1、BIL1、及びBES1 cDNAは、BSS1に対してはBSS1-フォワード及びBSS1-リバーズ-SC : 5' -CTAGAAATGGTGGTGGTGGTGATGATAC-3' (配列番号27) プライマー、BIL1に対してはBIL1-フォワード及びBIL1-リバーズプライマー、ならびにBES1に対しては、BES1-フォワード : 5' -CACCATGACGTCTGACGGAGCAAC-3' (配列番号28) 及び BES1-リバーズ : 5' -ACTATGAGCTTTACCATTTCCAA G-3' (配列番号29) プライマーを用いて増幅し ; pENTR/D-TOPO (Invitrogen)にクローニングし ; 続いてLR 組換えによってバイナリーGateway発現ベクターnEYFP/pUGW0 及びcEYFP/pUGW2にクローニングした。その結果得られたnE

YFP-BSS1 及びnEYFP-BIL1又は BES1-cEYFPをコードするベクターを、既報(Ueda et al., 2004, Functional differentiation of endosomes in Arabidopsis cells. Plant J. 40: 783-789)に記載のとおり、シロイヌナズナ懸濁培養細胞における一過性発現解析に用いた。プロトプラストはLSM700 顕微鏡 (Zeiss)を用いて観察した。

[0070] (10)免疫ブロット解析

明所で育成した7日及び10日齢の野生型、bss1-1D、BSS1-0X、bop1-3 及びbop1-3 bop2-1 苗を液体窒素中で摩砕し、BIL1及び BSS1-GFPの免疫ブロット解析のために、1× Laemmli buffer [50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 100 mM DTT, 2% (w/v) SDS, 0.1% (w/v) ブロモフェノールブルー、及び10% (w/v) グリセロール] (等量・生重量) とともに煮沸することによって抽出した。タンパク質をSDS-PAGE (10% アクリルアミドゲル) によって分離した。電気泳動後、タンパク質をHybond ECL ニトロセルロース膜(Amersham)に電気泳動的に移した。

[0071] 5% 無脂肪乳(Morinaga milk)を含有するTBS (20 mM Tris, 0.137 M NaCl, pH 7.4, 及び0.05% ポリエチレンソルビタンモノラウレート)中で室温にてブロッキングした後、膜を、GFP (Molecular Probes)及びBIL1に対するポリクローナル抗体(1:20000)を用いてWestern Blot Immuno Booster Solution 1 (Takara) 中で4℃にて一晩インキュベートした。1%無脂肪乳(Morinaga milk)を含むTBS中で室温にて洗浄した後、ブロットをWestern Blot Immuno Booster Solution 2 (Takara)中でホースラディッシュペーパーオキシダーゼー結合二次抗体(1:50000)(Promega)と室温にて1時間インキュベートし、複合体をECL Immobilon Western HRP substrate (Millipore)で可視化した。BIL1に対するポリクローナル抗体はマルトース-結合ドメイン(MBP)-タグ化BIL1タンパク質(91-336 aa)でウサギを免疫化することによって調製した。当該抗体を、BIL1ポリペプチドを用いてアフィニティ精製した。LAS-4000 mini (Fuji Film) デジタル画像システムを検出に用いた。非還元免疫ブロット解析は、基本的に既報(Mou et al., 2003, Inducers of plant systemic acquired resistance

ce regulate NPR1 function through redox changes. Cell 113: 935–944)に記載のとおり実施した。画像は相対シグナル強度を測定するために、ImageQuantTL software (version 7.0; GE Healthcare Life Sciences)を用いて解析した。

[0072] (11)BSS1 タンパク質複合体の沈降及び界面活性剤処理

全2gの植物材料を液体窒素で凍結し、乳鉢と乳棒で摩砕することによって抽出し、5mlの冷抽出バッファー(50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 20%ショ糖 及び protease inhibitor cocktail (Sigma))に懸濁した。このライセートを200gで4℃にて2分間遠心分離し、得られた上清をさらに50,000 rpm (153,000×g)で4℃にて2時間遠心分離した。ペレットを0.5% 界面活性剤 (CHAPS はw/v ; TritonX-100 及び Nonidet P-40はv/v)を含む300 µl抽出バッファー に懸濁した。界面活性剤処理したペレットを50,000 rpm (153,000×g)で4℃にて2時間遠心分離した。各上清サンプルをAmicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter (Millipore)にロードし、容量120 µlまで濃縮した。回収した上清及び等量の植物材料から抽出したペレットをイムノブロット解析に用いた。

[0073] (12) 酵母ツーハイブリッド解析

最初の21アミノ酸を欠失させたBIL1、最初の20アミノ酸を欠失させたBES1をコードするcDNAをpDEST32 bait vector (Invitrogen)にクローニングした。全長BSS1をコードするcDNAをpDEST22 prey vector (Invitrogen)にクローニングした。当該プラスミドを酵母株Y187 (Clontech)に形質転換した。得られた酵母細胞を酵母ツーハイブリッド解析に用いた。ProQuest Two-hybrid System (Invitrogen)の製造業者のプロトコルに記載のとおり、選択培地で育成した陽性形質転換体をさらに育成し、2.23 mM クロロフェノールレッド-β-D-ガラクトピラノシド (CPRG)を基質として含むアッセイバッファー(180 mM HEPES, 154 mM NaCl, 1 mM L-アスパラギン酸塩(hemi-Mg salt), 1% BSA及び 0.05% Tween 20, pH 7.3)に再懸濁した。タンパク質-タンパク質相互作用を定量するために、β-ガラクトシダーゼ活性をMicroplate Reader SH-9000 (CORONA electric)を用いてOD₅₇₄にて測定し、そのβ-ガラクトシダーゼ活性を

式： $1000 \times OD_{574} / (OD_{600} \times \text{アッセイ時間 (分)} \times \text{アッセイ体積 (mL)})$ を用いて算出した。

[0074] (13) 免疫沈降解析

1/2 MS 培地で23日間育成させた植物 (5 g 生重量)を液体窒素で凍結させ、乳鉢と乳棒で摩砕することによって抽出し、14 mL の冷抽出バッファー(50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 0.2 % Nonidet P-40, 及びprotease inhibitor cocktail (Sigma))に添加した。このライセートを10,000 g で5分間 4℃にて2回遠心分離した。上清を、抗-FLAG M2 アフィニティゲル (Sigma-Aldrich)と4℃にて1時間インキュベートした。ビーズを回収し、氷冷抽出バッファーにて4回洗浄し、FLAG-会合タンパク質を2× SDSサンプルローディングバッファー(4% SDS, 100 mM Tris-HCl (pH 6.8), 200 mM DTT, 20% グリセロール 及び0.003% [w/v] BPB)で溶出した。100℃にて5分間インキュベーション後、タンパク質をSDS-PAGEによって溶解させた。免疫沈降したタンパク質を、モノクローナル抗-Flag M2 抗体(Sigma-Aldrich)を1:500 の希釈率で、及び抗-GFP抗体 (Molecular Probes) 1:2000 の希釈率で用い、Hybond ECL ニトロセルロース膜 (GE Healthcare)上で、イムノブロット解析によって検出した。

[0075] (14) アクセッション番号

本明細書中の配列データは、Arabidopsis Genome Initiative 又はGenBank /EMBL データライブラリーにおいて下記のアクセッション番号で登録されている。

BSS1(AT3G57130), BIL1(AT1G75080), BES1 (AT1G19350), BRI1 (AT4G39400), DWF4 (AT3G50660), DET2 (AT2G38050), BIN2 (AT4G18710), 14-3-3 (AT1G22230), SAUR-AC1 (AT4G38850), TCH4 (AT4G57560), CPD (AT5G05690), ACT2 (AT3G18780), AS2 (AT1G65620), AP1 (AT1G69120), Pp-BOP1 (Phypa_119190), Pp-BOP2 (Phypa_121620), NPR1 (AT1G64280), BZS (AT4G39070), LOB (AT5G63090), CUC (AT3G15170), 及びAHA1 (AT2G18960)。

[0076] [結果]

(実施例 1) bss1-1D 変異体の原因遺伝子の同定

BR シグナル伝達に関与する新規な因子を探索するために、約10,000のシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)のアクチベーションータグライン(Nakazawa et al., 2003, Activation tagging, a novel tool to dissect the functions of a gene family. Plant J. 34: 741-750)を、Brzを用いてスクリーニングした。その結果、Brz-sensitive-short hypocotyl 1-1D (bss1-1D) を単離した。bss1-1Dは、Brzの不存在下で通常に伸長した胚軸を有するが、Brzを添加した培地にて暗所で育成すると野生型植物よりも短い胚軸を有していた(図1 A及び図1 B, 図1 2 D及び図1 2 E)。

[0077] 明所で育成したbss1-1Dは、BR生合成及びシグナル伝達欠損型変異体であるdet2, bri1及びbin2と類似する表現型を示した(図1 C及び図1 D, 図1 2 A-C)。bss1-1Dのこれらの表現型は、BRシグナル伝達がbss1-1D変異において抑制されることを示唆するものである。

[0078] bss1-1D 変異を同定するために、Brz-感受性-短胚軸表現型の共偏析 (co-segregation) を分析したところ、クロモソームIIIの最後にT-DNA 挿入部位を見つけた。T-DNA 挿入の約1 kb 上流に位置するAt3g57130 遺伝子の発現は、定量的リアルタイムPCR (qRT-PCR)によって測定されるように、野生型に比べてbss1-1D において増加した(図1 E及び図1 F)。この遺伝子の高発現がbss1-1D 表現型の原因であるかどうかを確認するために、At3g57130を過剰発現する植物を作出した(図1 F)。BSS1-過剰発現植物(BSS1-OX)は、bss1-1Dと同様に、Brzを含有する培地にて暗所で育成すると、短い胚軸を示し、明所で育成すると矮化の表現型を示した(図1 A-D)。よって、At3g57130をBSS1と同定した。

[0079] BSS1 は、葉の形態形成、葉のパターニング、及び落花の制御において重要な働きをすることが報告されているBLADE ON PETIOLE 1 (BOP1)として知られているアンキリンリピートを有するBTB-POZ ドメインタンパク質をコードする。BOP1は、植物防御応答レギュレータNPR1を含むタンパク質のファミリーに属している(図1 3 A及び図1 3 B)。

[0080] (実施例2) BSS1によるBRシグナル伝達の制御機構の解明

BR-欠損表現型がBRシグナル伝達の阻害によるものであるのかどうかを決定するために、qRT-PCRによりBR-応答性遺伝子 (TCH4, BAS1, IAA19 及びSAUR-AC1) の発現を分析した。TCH4, BAS1, IAA19 及びSAUR-AC1の発現は、野生型 (WT)植物では、活性BRブラシノリド (BL)によって増加し、Brzによって抑制された。BSS1-0Xでは、TCH4, BAS1, IAA19及びSAUR-AC1の発現が野生型 (WT)植物におけるそれらの発現に比べてコントロール (Mock)の条件下では顕著に減少した。BSS1-0Xにおける遺伝子発現の抑制率はBrzの存在下でより高くなった (図2 A)。

[0081] 低BR条件下で高度にリン酸化され、かつBR処理によって脱リン酸化されることが知られている、下流のバイオケミカルマーカーBIL1のリン酸化状態を分析した。リン酸化及び脱リン酸化BIL1の量は、野生型植物と比較して、bss1-1D及びBSS1-0X植物においてそれぞれ減少した (図2 B)。これらの結果は、bss1-1D及びBSS1-0XにおけるBRシグナル伝達がBIL1の上流で抑制されることを示している。

[0082] プロモーター領域におけるシングル及びダブルT-DNA挿入変異体bop1-3, bop2-1及び bop1-3 bop2-1は、緩やかではあるが顕著に ($P < 0.05$)、Brzを添加した培地において暗所で育成したとき、野生型よりも長い胚軸を示した (図3 A及び図3 B)。bop1-3 bop2-1 変異体では、TCH4, BAS1 及びIAA19の発現が、野生型植物よりもBLの存在下で顕著に高かった (図3 C)。また、免疫ブロット解析では、リン酸化及び脱リン酸化BIL1の量が、bop1-3 及びbop1-3 bop2-1 植物においてそれぞれ増加した (図3 D)。これらの結果は、BSS1の欠損はBRシグナル伝達を活性化することが示唆するものである。

[0083] BSS1のBR-制御発現をqPCR解析により詳細に調べたところ、BSS1発現は、発芽初期の間は、Brzの用量依存的添加に応答して増加した (図4 A及び図4 C)。これに対し、BSS1発現はBLに応答して減少した (図4 D)。

[0084] β -グルクロニダーゼ遺伝子に融合させたBSS1プロモーター領域を有する形質転換植物 (BSS1 pro:GUS) の解析では、明所で育成した苗に強い発現が認

められたが、暗所で育成した苗では発現は認められなかった。Brzは、暗所では胚軸においてBSS1発現を引き起こし、明所及び暗所では子葉においてBSS1発現を引き起こした(図4 B)。BSS1発現は、Brz処理を用いたBRの欠乏によって誘導され、苗においては明所で抑制された(図4 E)。これらの結果は、BSS1は、発芽初期の間、BRシグナル伝達の負の制御によって胚軸伸長の最適な長さを制御することを示すものである。よって、BSS1は、葉の形態形成だけでなく、BRシグナル伝達による胚軸成長においても重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

[0085] (実施例3) BSS1の細胞内局在ならびに斑点状構造の特徴

BSS1の細胞内局在を調べた。野生型植物に比べてBrz条件下で短い胚軸をもち、短い開花をもつCaMV 35S:BSS1-GFP 形質転換体において、BSS1-GFPは、核と細胞質の両方に局在した。また細胞質において主に拡散シグナルを伴う多くの斑点状BSS1-GFPシグナルが認められた(図5 A)。興味深いことに、Brzを含む培地で育成した苗では、コントロールに比べて、斑点状のBSS1-GFPは数が増加し、細胞質における拡散したBSS1-GFPシグナルは、減少した。これに対し、BRを添加した培地で育成した苗では、斑点状のBSS1-GFPの数は減少し、細胞質において拡散した。このようなBR及びBrzに対するBSS1-GFPの応答は処理後15分で始まり、根(図5 A)及び胚軸(図5 B)の両方で観察された。Brz処理は、mock 処理に比較して、強い斑点の数を増加させ、細胞質の蛍光シグナルを減少させた。BL処理は、細胞あたりの斑点数を減少させた(図5 C)。Brz処理は、全細胞の蛍光強度に対する細胞あたりの斑点の蛍光強度を増加させたが(図5 D)、各斑点の単一の蛍光強度はBrz及びBL処理の間で同じであった(図5 E)。これらの結果は、斑点状BSS1の形成は、Brzに引き起こされ、その解離はBRによって引き起こされることを示唆する。

[0086] FM4-64は、斑点状構造として観察される、細胞膜及びエンドサイトーシス構造を染色する。Brefeldin A (BFA)は、斑点状細胞質オルガネラのように見える、初期エンドソーム及びゴルジ装置を阻害する。

[0087] 斑点状のBSS1-GFP 蛍光シグナルが細胞質内オルガネラ又はタンパク質複合

体のいずれから発するものであるのかを決定するために、FM4-64処理(図 6 B)、BFA処理(図 6 C)後のBSS1-GFPシグナルを解析した。斑点状のBSS1は、FM4-64とはマージせず、それらの形成はBFAによって阻害されなかった。これらの結果は、斑点がエンドソームでもなく、ゴルジ装置でもないことを示唆する。

[0088] さらに、斑点状BSS1は、CaMV 35S プロモーター::BSS1-GFP形質転換体及びBSS1プロモーター:: BSS1-GFP形質転換体の両方で観察された(図 6 D)。これらの解析は、BSS1は自然に斑点を形成することを示した。

[0089] 斑点状BSS1が、タンパク質オリゴマーによって形成されるかどうかを決定するために、非還元の免疫ブロット解析を実施した。非還元条件(DTTなし)下では、モノメリックなBSS1-GFP融合タンパク質(分子量78,000)と、より分子量の高いタンパク質を表す二つのバンドが検出された(図 6 A; O 三角矢印)。モノメリックなBSS1のシグナルはそのままであるのに対し、より分子量の高いタンパク質のシグナルは還元条件下(DTTあり)では消失した(図 6 A; M 三角矢印)。BOP1はホモダイマーを形成し(Jun et al., 2010, BLADE-ON-PETIOLE1 coordinates organ determinacy and axial polarity in Arabidopsis by directly activating ASYMMETRIC LEAVES2, Plant Cell 22: 62-76)、検出した高分子量シグナルはBSS1のオリゴマーであった。BL処理後、BSS1-GFPのオリゴマー形態の量は顕著に減少した。

[0090] さらに生化学的分析をBSS1構造の斑点のより詳細な特徴づけを可能するために実施した。大きなタンパク質複合体及び細胞内オルガネラが超遠心分離によって沈澱させることができることから、いずれも細胞質に斑点状GFP蛍光シグナルを提示する、BSS1-GFP 形質転換体からのタンパク質抽出物及びミトコンドリアタンパク質BIL2-GFP形質転換体(Davka et al., 2013)からのタンパク質を用いて、超遠心分離を実施した。最初の超遠心からのペレットは界面活性剤CHAPS, Nonidet P-40 又はTritonX-100で処理した。これらの界面活性剤処理は、オルガネラの膜を溶解させるが、タンパク質複合体は溶解させない(Nishikoori et al., 2006; Kinoshita et al., 2005, Binding of b

rassinosteroids to the extracellular domain of plant receptor kinase BRI1. Nature 433: 167-171)。界面活性剤処理画分を用いる2回目の超遠心分離の後、緩衝液処理（界面活性剤なし）のコントロール画分に比べてBIL2-GFPシグナルは、ペレットでより強く、上清で弱かった。それにも関わらず、BSS1-GFPシグナルは、界面活性剤の有り無しの両方で処理後にペレットで同様に強かった。BSS1-GFPシグナルはすべての上清画分で非常に弱く、界面活性剤処理によって増加した（図6E）。これらの結果は、BSS1-GFP形質転換体で観察された斑点状蛍光シグナルはタンパク質複合体の指標であり、BIL2-GFP形質転換体で検出されるように、オルガネラの膜の内側にパッケージされているモノメリックなタンパク質を示すものではないことを示唆した。BSS1斑点は、各BSS1ユニット間のジルスフィド結合によって結合し、この複合体はBLによって解離し、Brzによって集合する。

[0091]（実施例4）BSS1タンパク質複合体による細胞質から核へのBIL1の移送機構の解明

BRシグナル伝達における斑点状BSS1の可能性のある機能を調べるために、まずbil1-1Dと bss1-1D間の遺伝的相互作用を解析した。bss1-1D及びbil1-1D二重変異体の表現型はbil1-1Dと類似な表現型を示した（図7A及び図7B）。これらの結果は、bil1-1Dが、bss1-1Dに対して上位（エピスタシス）であり、BIL1が、BSS1の下流で作用することを示す。

[0092] BSS1とBIL1間の直接的な相互作用を検出するために、酵母ツーハイブリッドアッセイを実施した（図7C）。BIL1のcDNAをpDEST32 結合-ドメインベクター(BD)にクローニングした。BSS1のcDNAをpDEST22 prey vector (AD)にクローニングした。pBD-BIL1及びpAD-BSS1によって形質転換された酵母において、ひとつのベクターで形質転換された酵母よりもより高い β -ガラクトシダーゼ活性が検出された。これらの結果は、BSS1及びBIL1が生化学的に互いに直接的に関係すること示すものである。

[0093] BIL1-FLAG タンパク質を、BSS1-GFP及びBIL1-FLAGの両方を発現する形質転換シロイヌナズナ植物において抗-FLAG抗体によって免疫沈降させ、生じた免

疫沈降物を抗-FLAG及び抗-GFP抗体を用いる免疫ブロット解析によって解析した。抗-FLAG抗体は、BIL1-FLAGを免疫沈降させ、BSS1-GFPを共免疫沈降させたが、BSS1-GFPのみを発現する形質転換体又は野生型シロイヌナズナの免疫沈降物には、BSS1-GFP シグナルはまったく検出されなかった(図7D)。

[0094] リン酸化BIL1-FLAG及び脱リン酸化BIL1-FLAGの両方が免疫ブロッティングによって検出され、インプット画分におけるリン酸化BIL1-FLAGに対する脱リン酸化BIL1-FLAGの割合は、免疫沈降後変化しなかった(図7D)。これらの試験の結果は、植物内でBSS1がBIL1と相互作用することを強く示唆する。

[0095] 植物細胞におけるBSS1とBIL1間の直接的な相互作用を解析するために、そして、当該2つのタンパク質間の可能性のある相互作用の局在化を同定するために、二分子蛍光相補性(BiFC)解析を行った。シロイヌナズナのプロトプラスト細胞をnYFP-BSS1 及び/又は BIL1-cYFP 構築物で共形質転換した。当該プロトプラスト細胞を、DMSO、100 nM BL 又は3 μ M Brzを含む培地で12時間処理した。nYFP-BSS1及びBIL1-cYFPの結合によって起こるYFP蛍光シグナルは、細胞質のみに観察され、プロトプラストの核には観察されなかった(図7E)。斑点状のYFPシグナルはBrz処理で増加した。これらのBrzによって生じる斑点は興味深いことに細胞質のみで検出され、核では検出されなかった(図7E)。これらの結果は、BSS1の複合体は細胞質にとどまり、BSS1タンパク質複合体がBIL1を細胞質に捕捉することを示す。

[0096] BL処理後、nYFP-BSS1及びBIL1-cYFPの相互作用に起因するYFPシグナルは拡散し、細胞質及び核全体に広がった(図7E)。拡散したBSS1のみがBIL1と二量体化した。拡散したBSS1はBIL1を細胞質内に制限せず、BIL1はBL処理条件で核に移送された。

[0097] nYFP-BSS1及びBIL1-cYFPとの二量体化に起因するYFPシグナルは細胞質で観察され、これらのシグナルはいくつかのケースでは核内の斑点として検出された(図7E)。これらの結果は、Brz 処理後の核内のBSS1-GFPからの蛍光シグナル(図5A)が、BSS1自身によるものであり、BSS1-BIL1複合体によるものではないことを示唆する。

- [0098] BIL1-GFPは細胞質及び核の両方でその拡散状態で局在することが報告されている(Ryu et al., 2007, Nucleocytoplasmic shuttling of BZR1 mediated by phosphorylation is essential in Arabidopsis brassinosteroid signaling. Plant Cell 19: 2749-2762)。しかしながら、本実施例では、Brz 処理後、細胞質(図8 A)及びbri1-116 変異体バックグラウンド(図8 B)に多くの斑点状のBIL1-GFPシグナルが検出された。これらの結果はBSS1及びBIL1がBR-欠乏条件で細胞質において自然に斑点を形成することを示す。
- [0099] BIL1の細胞質から核への移送に対するBSS1の効果を解析するために、BSS1-欠損及び過剰発現条件下でのBIL1の核内の局在を観察し、測定した。BIL1-GFPシグナルの核/細胞質の比率は、野生型バックグラウンドにおけるよりもbop1-3 bop2-1 バックグラウンドにおいて高かった。その蛍光比は、Brz処理の野生型バックグラウンドにおいて減少したが、bop1-3 bop2-1 バックグラウンドにおける増加したBIL1-GFPシグナルは、Brz条件下で強く維持された。斑点状BIL1-GFPシグナルは、野生型バックグラウンドにおいてBrz処理後に観察されたが、Brz処理したbop1-3 bop2-1植物では検出されなかった。これらの結果は、BSS1-欠損が、BIL1-GFP局在と斑点形成の制御においてBrzに対する耐性を促進することを示唆した(図9 A及び図9 B)。これに対し、核内のBIL1-GFPシグナルは、野生型バックグラウンドよりも、BSS1-過剰発現形質転換体バックグラウンドにおいて弱かった(図9 C及び図9 D)。BSS1-欠損及び過剰発現体バックグラウンドの両方において、BIL1-GFPシグナルは核及び細胞質において検出された。それにも関わらず、BIL1-GFP核/細胞質シグナル比は、野生型バックグラウンドにおけるよりもbop1-3 bop2-1 バックグラウンドにおけるほうが高く(図9 A及び図9 B)、そして野生型バックグラウンドにおけるよりもBSS1-過剰発現形質転換体バックグラウンドにおけるほうが低かった(図9 C及び図9 D)。これらの結果は、BIL1へのBSS1の結合及びBSS1の斑点状タンパク質複合体形成がBIL1の細胞質から核への移送を阻害することを示す。同時に、遺伝的な及び直接的な相互作用はBSS1とBIL1のホモログであるBES1間で検出された(図10)。

[0100] (実施例5) イネの形質転換体作製

イネのBSS1相同遺伝子OsBSS1をRNAiベクターであるpANDAに挿入したベクターを構築し、イネの形質転換を行った。最初にイネのBSS1相同遺伝子OsBSS1のクローニングを行った。イネ日本晴野生型のtotal RNAをQiagenのRNA easy plantキットで抽出した。次にtotal RNAからInvitrogenのSuperScript IIIキットを用いてcDNAを合成した。このcDNAを鋳型にして、以下のプライマーを用いてPCRを行い、OsBSS1を増幅した。

OsBSS1-GW-F3 : caccatgagctccgaggactcgctcaaatccttgtcg(配列番号30)

OsBSS1-GW-R3 : ttatgcgaagccattggggaagtacatggcggg(配列番号31)

[0101] 増幅したOsBSS1は、pENTR/D TOP0 cloning kit (Invitrogen) を用いてクローニングを行った。作製したベクターを、アグロバクテリウムEHA105株を介して高速形質転換法 (Toki et al. Plant J. 47:969-76, 2006) によりイネ (品種: 日本晴) に導入した。得られた形質転換体 (BSS1-RNAi株) は、分けつ数の増加、ラミナジョイントの屈曲増大傾向の形質を示した (図14)。また、得られた形質転換T1世代、T2ホモ世代について、収量形質の調査を行った。その結果、T1世代、T2ホモ世代のいずれにおいても、分けつ数の増加、籾粒数、稔実種子数の増加が認められた (図15)。

産業上の利用可能性

[0102] 本発明は、草丈が制御された形質転換植物の育種分野において利用できる。

[0103] 本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書に組み入れるものとする。

請求の範囲

[請求項1] BSS1遺伝子の発現が抑制又は促進されていることを特徴とする、形質転換植物。

[請求項2] 以下の(a)～(f)のいずれかの遺伝子の発現が抑制又は促進されていることを特徴とする形質転換植物。

(a) 配列番号2又は5に示す塩基配列からなるDNAを含む遺伝子

(b) 配列番号2又は5に示す塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつブラシノステロイドのマスター転写因子BIL1タンパク質に結合して細胞核内への移行を阻害し、ブラシノステロイドのシグナル伝達を負に制御する活性を有するタンパク質をコードするDNAを含む遺伝子

(c) 配列番号2又は5に示す塩基配列に対して60%以上の配列同一性を有する塩基配列からなり、かつブラシノステロイドのマスター転写因子BIL1タンパク質に結合して細胞核内への移行を阻害し、ブラシノステロイドのシグナル伝達を負に制御する活性を有するタンパク質をコードするDNAを含む遺伝子

(d) 配列番号3又は6に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子

(e) 配列番号3又は6に示す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、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつブラシノステロイドのマスター転写因子BIL1タンパク質に結合して細胞核内への移行を阻害し、ブラシノステロイドのシグナル伝達を負に制御する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子

(f) 配列番号3又は6に示すアミノ酸配列に対して60%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつブラシノステロイドのマスター転写因子BIL1タンパク質に結合して細胞核内への移行を阻害し、ブラシノステロイドのシグナル伝達を負に制御する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子

- [請求項3] 植物が、植物体、植物器官、植物組織、又は植物培養細胞である、請求項 1 又は 2 に記載の形質転換植物。
- [請求項4] 植物が、単子葉植物又は双子葉植物である、請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載の形質転換植物。
- [請求項5] BSS1 遺伝子の植物体における発現を抑制又は促進することを特徴とする、植物の成長の制御方法。
- [請求項6] 以下の(a)～(f)のいずれかの遺伝子の植物体における発現を抑制又は促進することを特徴とする、植物の成長の制御方法。
- (a) 配列番号 2 又は 5 に示す塩基配列からなるDNAを含む遺伝子
 - (b) 配列番号 2 又は 5 に示す塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつブラシノステロイドのマスター転写因子BIL1タンパク質に結合して細胞核内への移行を阻害し、ブラシノステロイドのシグナル伝達を負に制御する活性を有するタンパク質をコードするDNAを含む遺伝子
 - (c) 配列番号 2 又は 5 に示す塩基配列に対して60%以上の配列同一性を有する塩基配列からなり、かつブラシノステロイドのマスター転写因子BIL1タンパク質に結合して細胞核内への移行を阻害し、ブラシノステロイドのシグナル伝達を負に制御する活性を有するタンパク質をコードするDNAを含む遺伝子
 - (d) 配列番号 3 又は 6 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子
 - (e) 配列番号 3 又は 6 に示す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、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつブラシノステロイドのマスター転写因子BIL1タンパク質に結合して細胞核内への移行を阻害し、ブラシノステロイドのシグナル伝達を負に制御する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子
 - (f) 配列番号 3 又は 6 に示すアミノ酸配列に対して60%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつブラシノステロイドのマ

スター転写因子BIL1タンパク質に結合して細胞核内への移行を阻害し、ブラシノステロイドのシグナル伝達を負に制御する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子

[請求項7] BSS1遺伝子の植物体における発現を抑制又は促進することを特徴とする、成長が制御された植物の作製方法。

[請求項8] 以下の(a)～(f)のいずれかの遺伝子の植物体における発現を抑制又は促進することを特徴とする、成長が制御された植物の作製方法。

(a) 配列番号2又は5に示す塩基配列からなるDNAを含む遺伝子

(b) 配列番号2又は5に示す塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつブラシノステロイドのマスター転写因子BIL1タンパク質に結合して細胞核内への移行を阻害し、ブラシノステロイドのシグナル伝達を負に制御する活性を有するタンパク質をコードするDNAを含む遺伝子

(c) 配列番号2又は5に示す塩基配列に対して60%以上の配列同一性を有する塩基配列からなり、かつブラシノステロイドのマスター転写因子BIL1タンパク質に結合して細胞核内への移行を阻害し、ブラシノステロイドのシグナル伝達を負に制御する活性を有するタンパク質をコードするDNAを含む遺伝子

(d) 配列番号3又は6に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子

(e) 配列番号3又は6に示す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、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつブラシノステロイドのマスター転写因子BIL1タンパク質に結合して細胞核内への移行を阻害し、ブラシノステロイドのシグナル伝達を負に制御する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子

(f) 配列番号3又は6に示すアミノ酸配列に対して60%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつブラシノステロイドのマスター転写因子BIL1タンパク質に結合して細胞核内への移行を阻害し

、ブラシノステロイドのシグナル伝達を負に制御する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子

[請求項9] 植物が、植物体、植物器官、植物組織、又は植物培養細胞である、請求項5～8のいずれかに記載の方法。

[請求項10] 植物が、単子葉植物又は双子葉植物である、請求項5～8のいずれかに記載の方法。

[請求項11] 以下の(a)～(f)のいずれかの遺伝子の発現を抑制することによって、植物のバイオマスを増量させる方法。

(a) 配列番号2又は5に示す塩基配列からなるDNAを含む遺伝子

(b) 配列番号2又は5に示す塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつブラシノステロイドのマスター転写因子BIL1タンパク質に結合して細胞核内への移行を阻害し、ブラシノステロイドのシグナル伝達を負に制御する活性を有するタンパク質をコードするDNAを含む遺伝子

(c) 配列番号2又は5に示す塩基配列に対して60%以上の配列同一性を有する塩基配列からなり、かつブラシノステロイドのマスター転写因子BIL1タンパク質に結合して細胞核内への移行を阻害し、ブラシノステロイドのシグナル伝達を負に制御する活性を有するタンパク質をコードするDNAを含む遺伝子

(d) 配列番号3又は6に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子

(e) 配列番号3又は6に示す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、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつブラシノステロイドのマスター転写因子BIL1タンパク質に結合して細胞核内への移行を阻害し、ブラシノステロイドのシグナル伝達を負に制御する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子

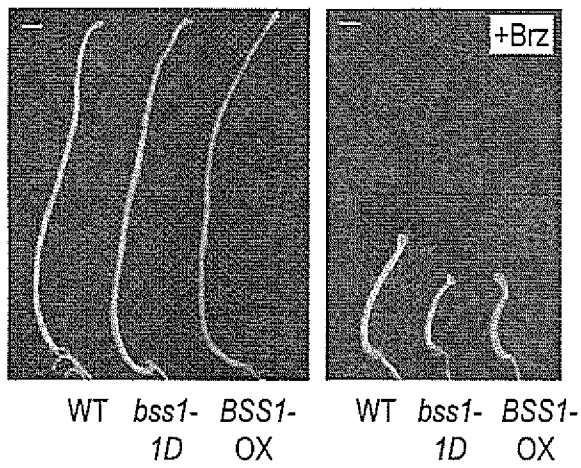
(f) 配列番号3又は6に示すアミノ酸配列に対して60%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつブラシノステロイドのマ

スター転写因子BIL1タンパク質に結合して細胞核内への移行を阻害し、ブラシノステロイドのシグナル伝達を負に制御する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子

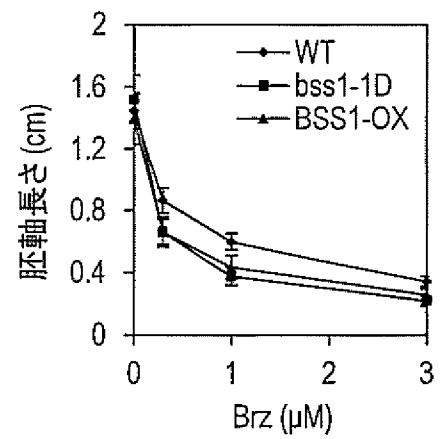
[請求項12] バイオマスを増量が、草丈若しくは茎丈の伸長促進、維管束の分化促進、葉柄の伸長、又は葉の上偏成長である、請求項 1 1 に記載の方法。

[図1]

A



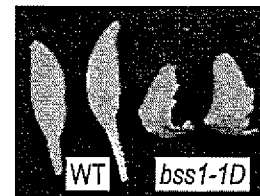
B



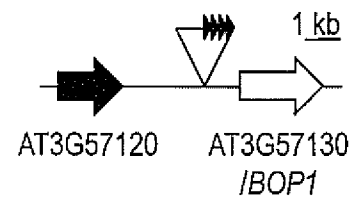
C



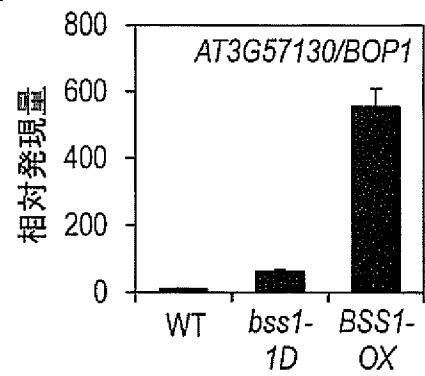
D



E

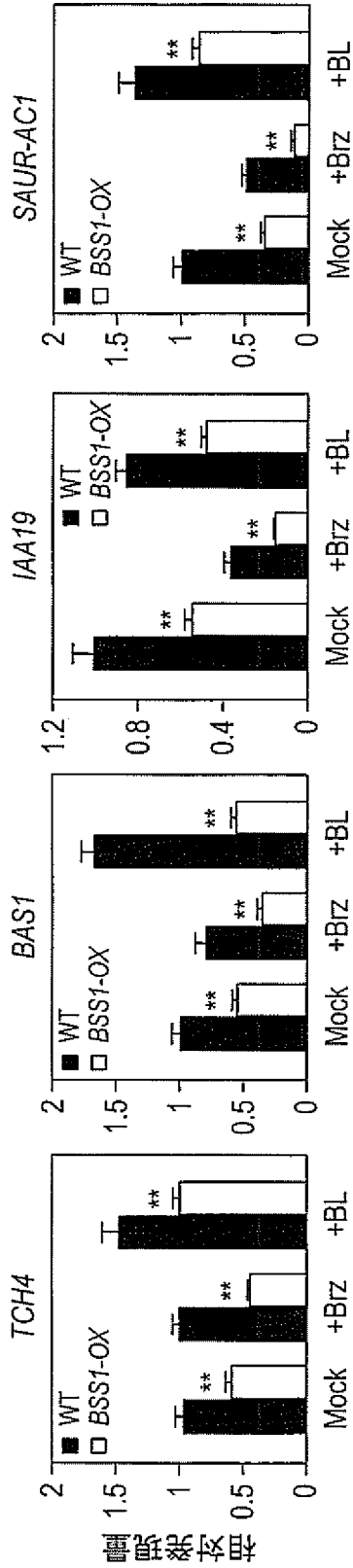


F

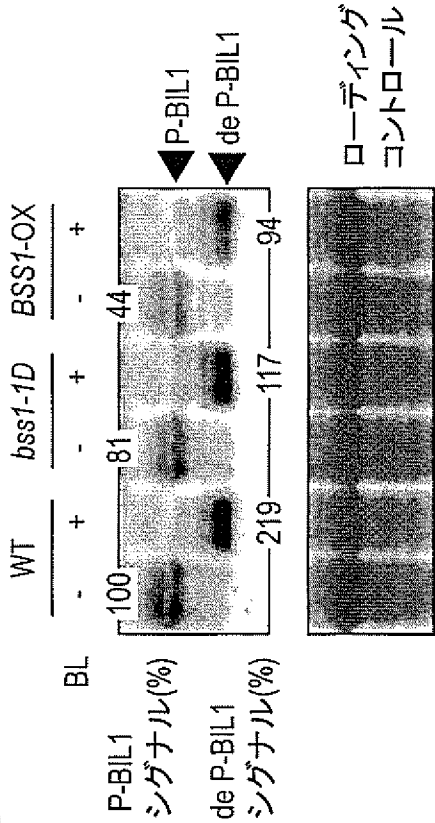


[図2]

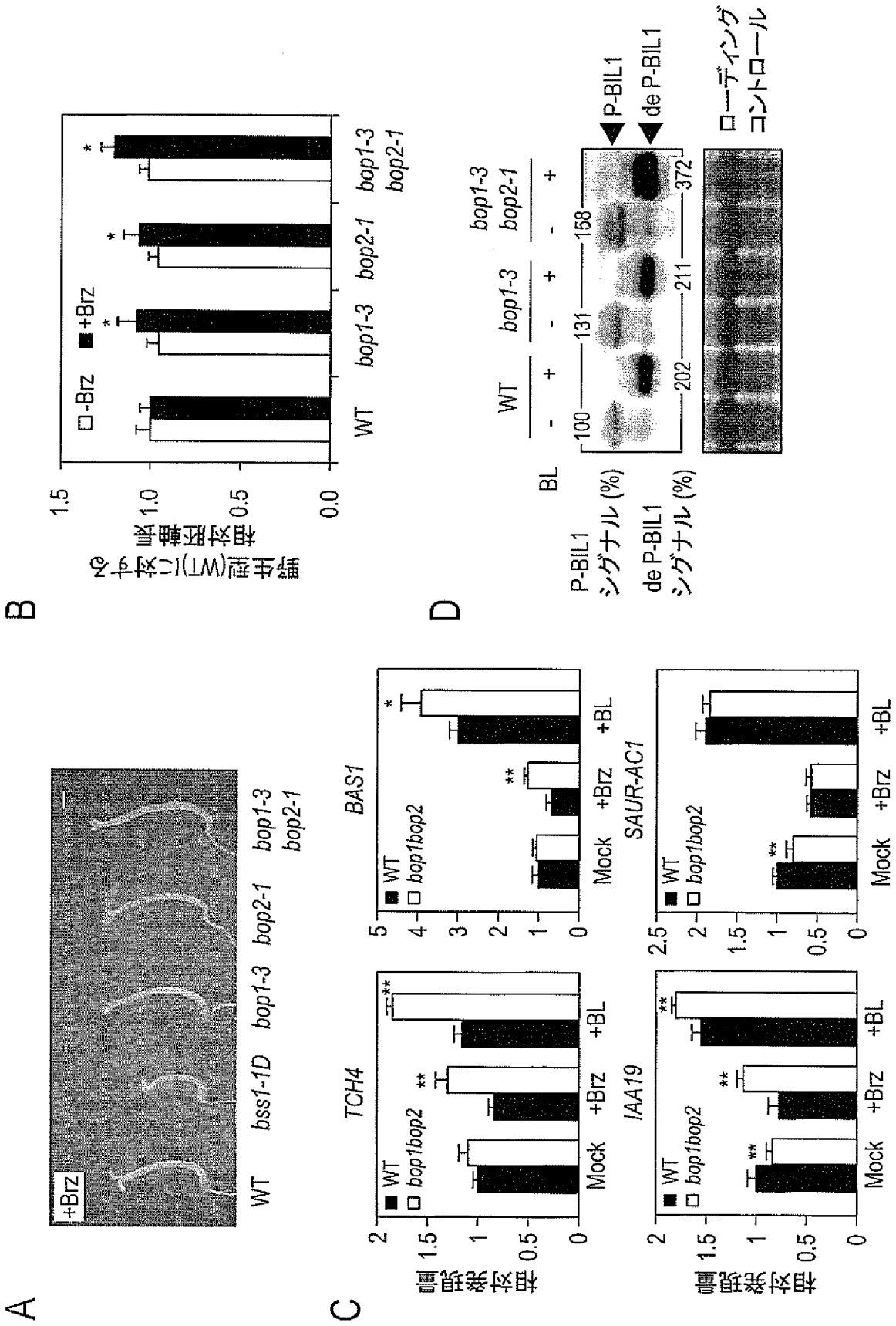
A



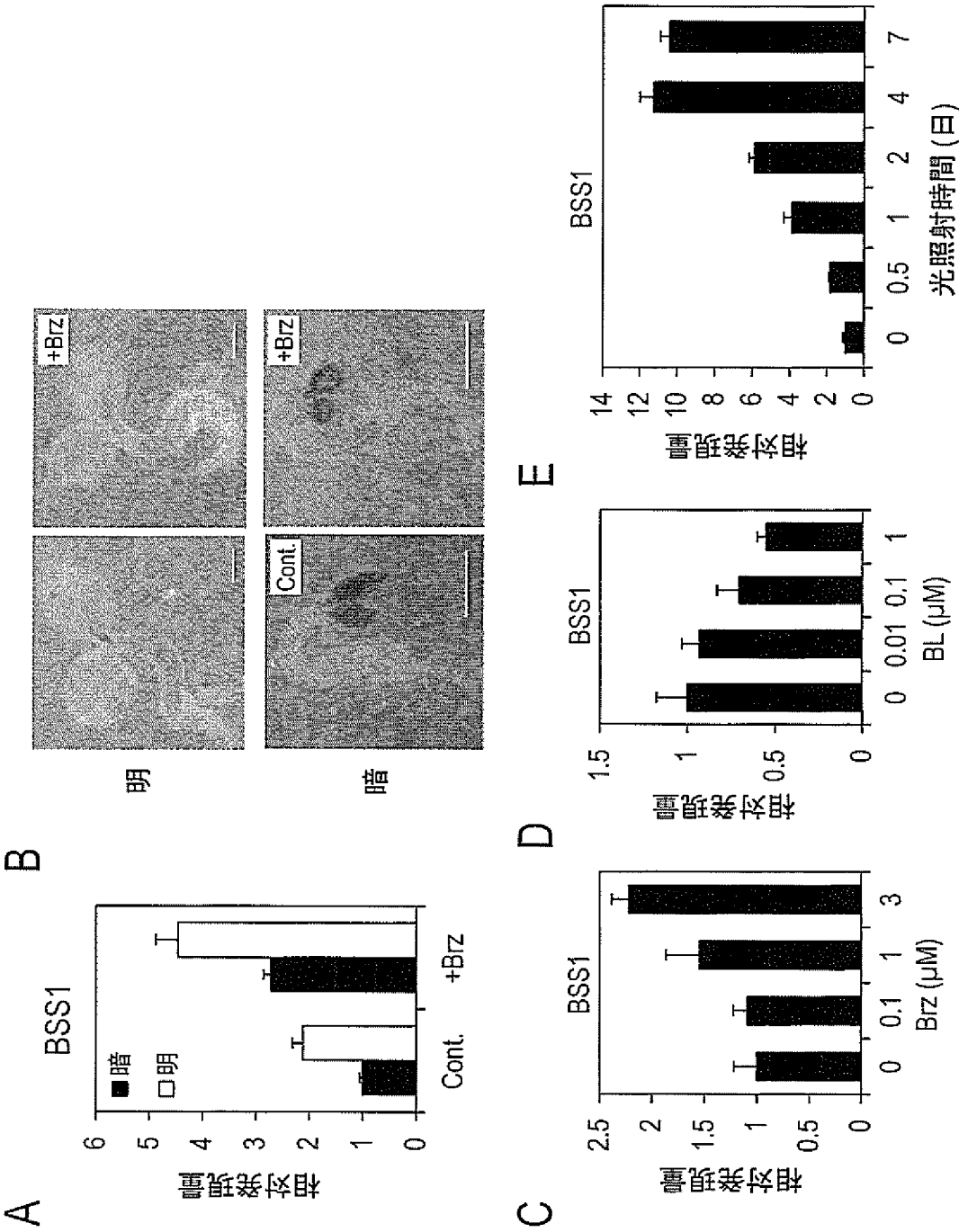
B



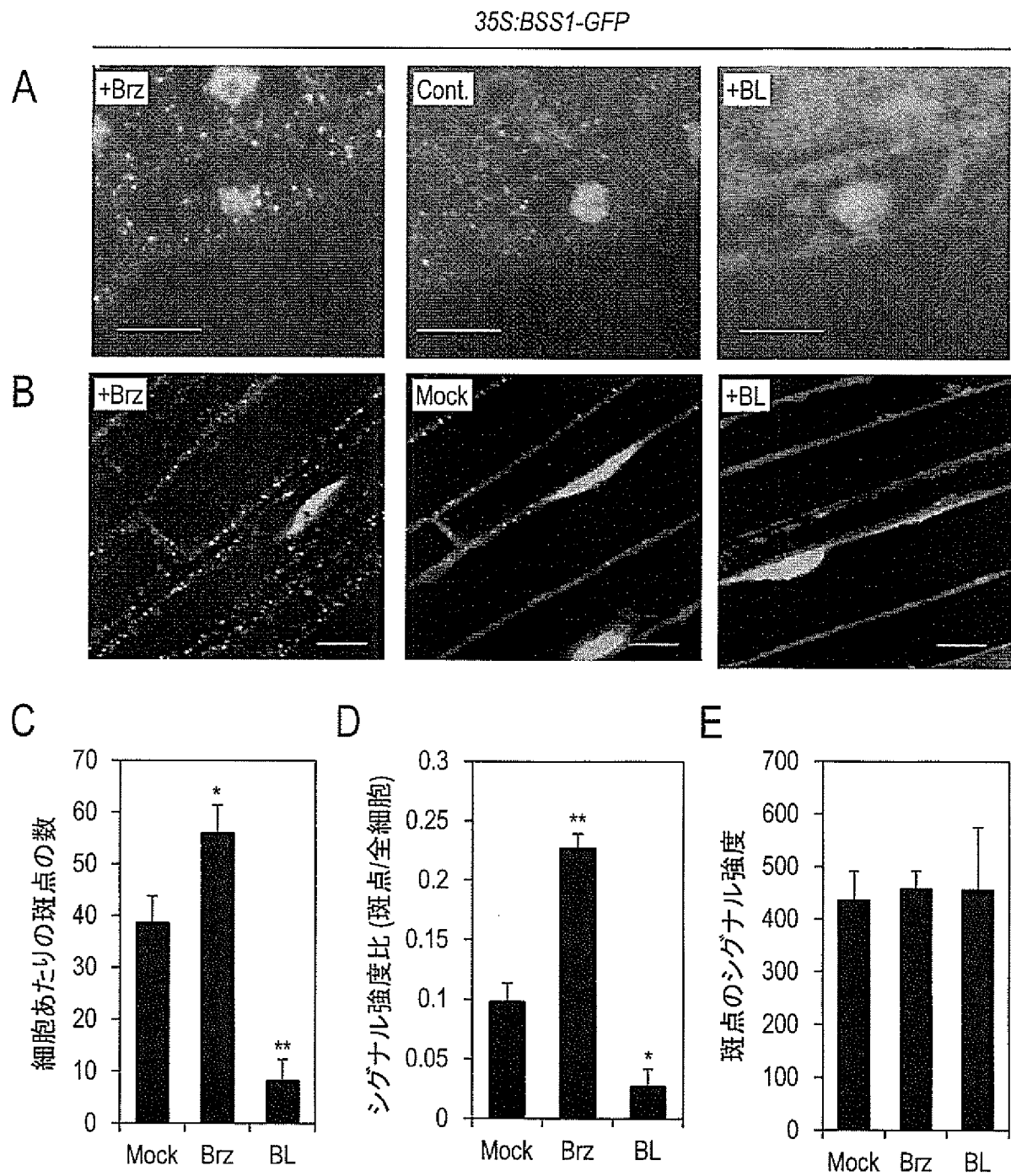
[図3]



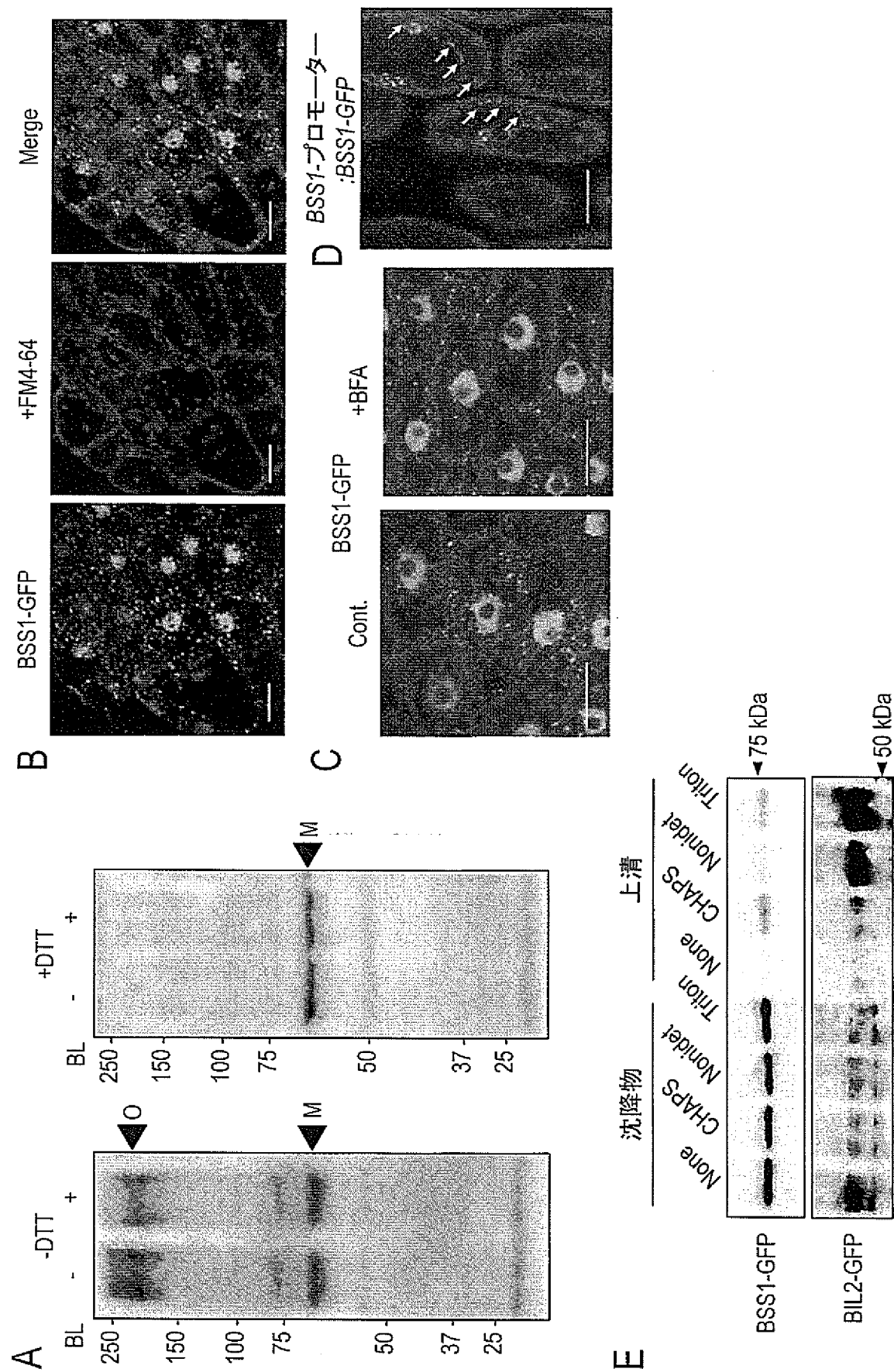
[図4]



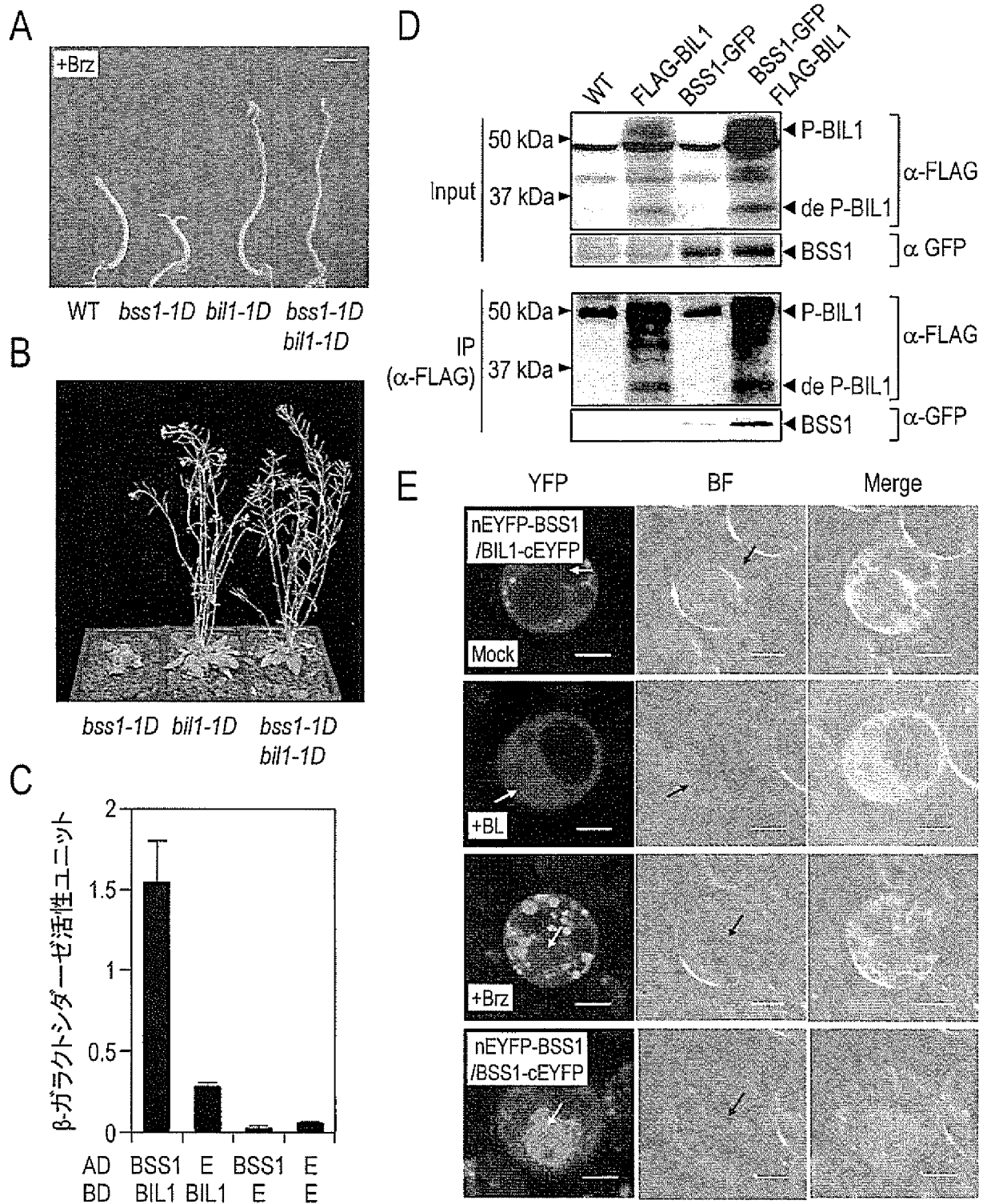
[図5]



[図6]



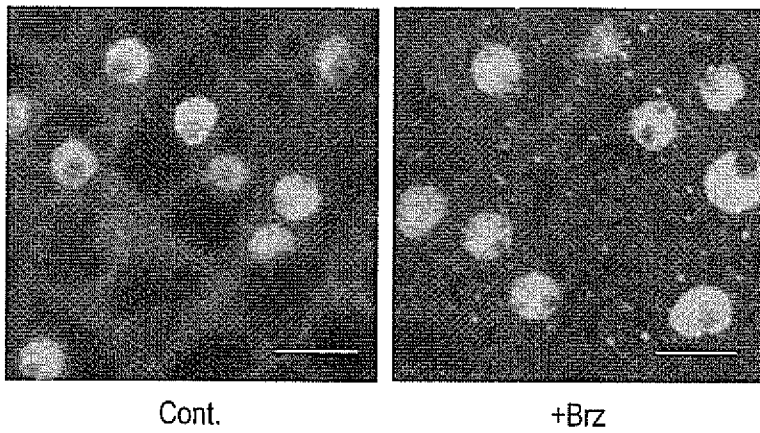
[図7]



[図8]

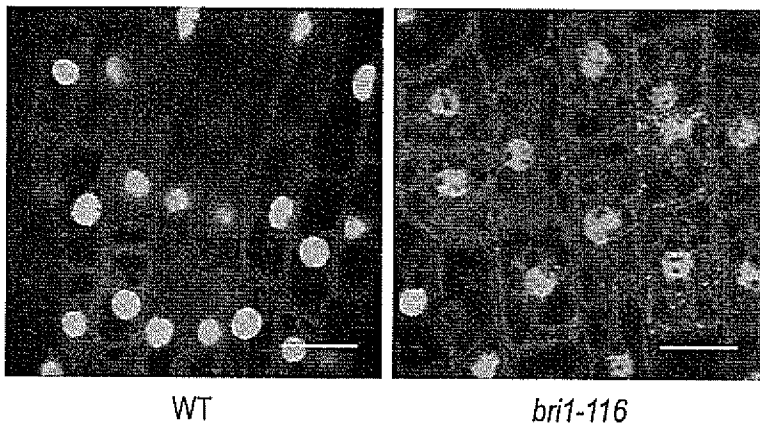
A

BIL1-GFP

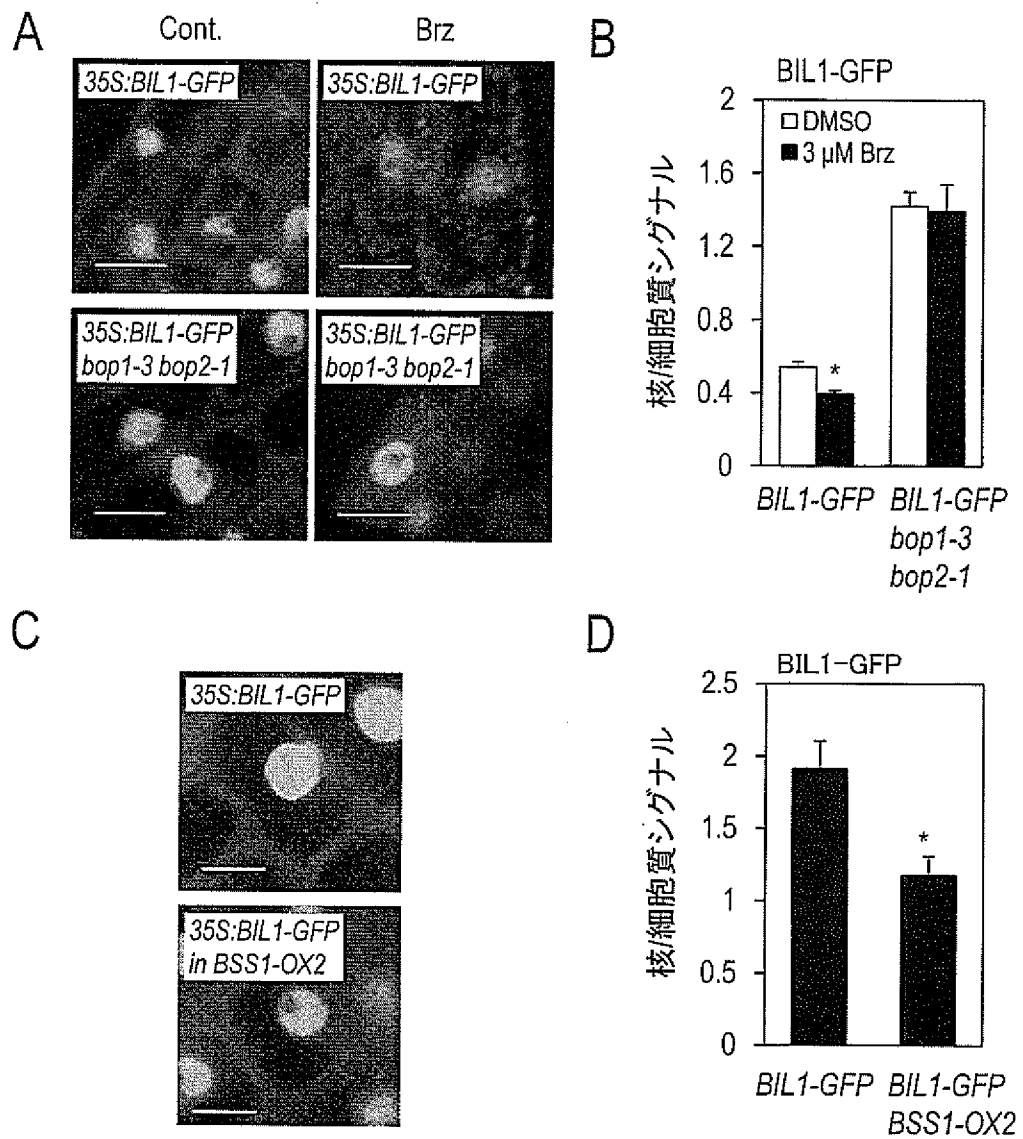


B

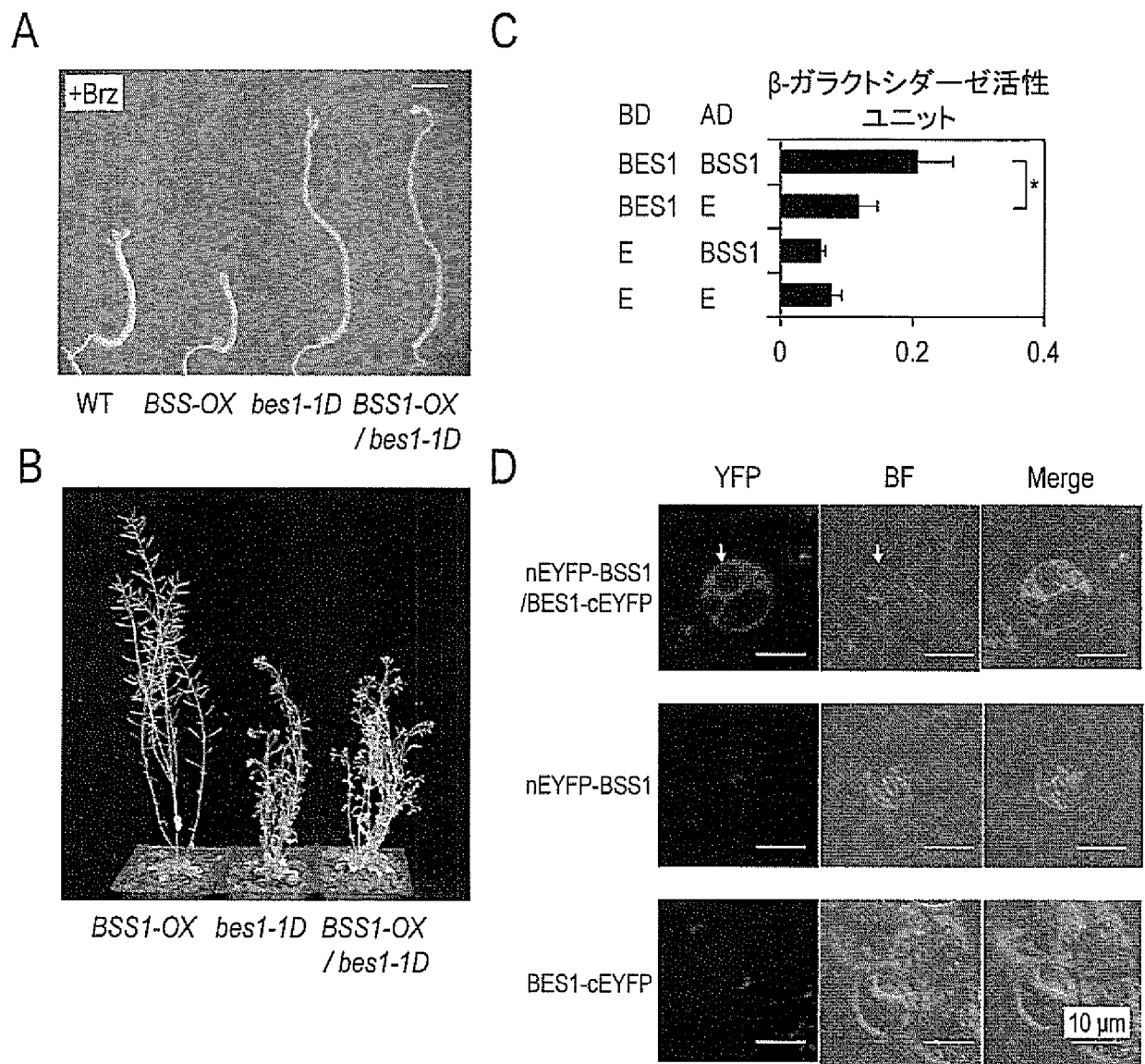
BIL1-GFP



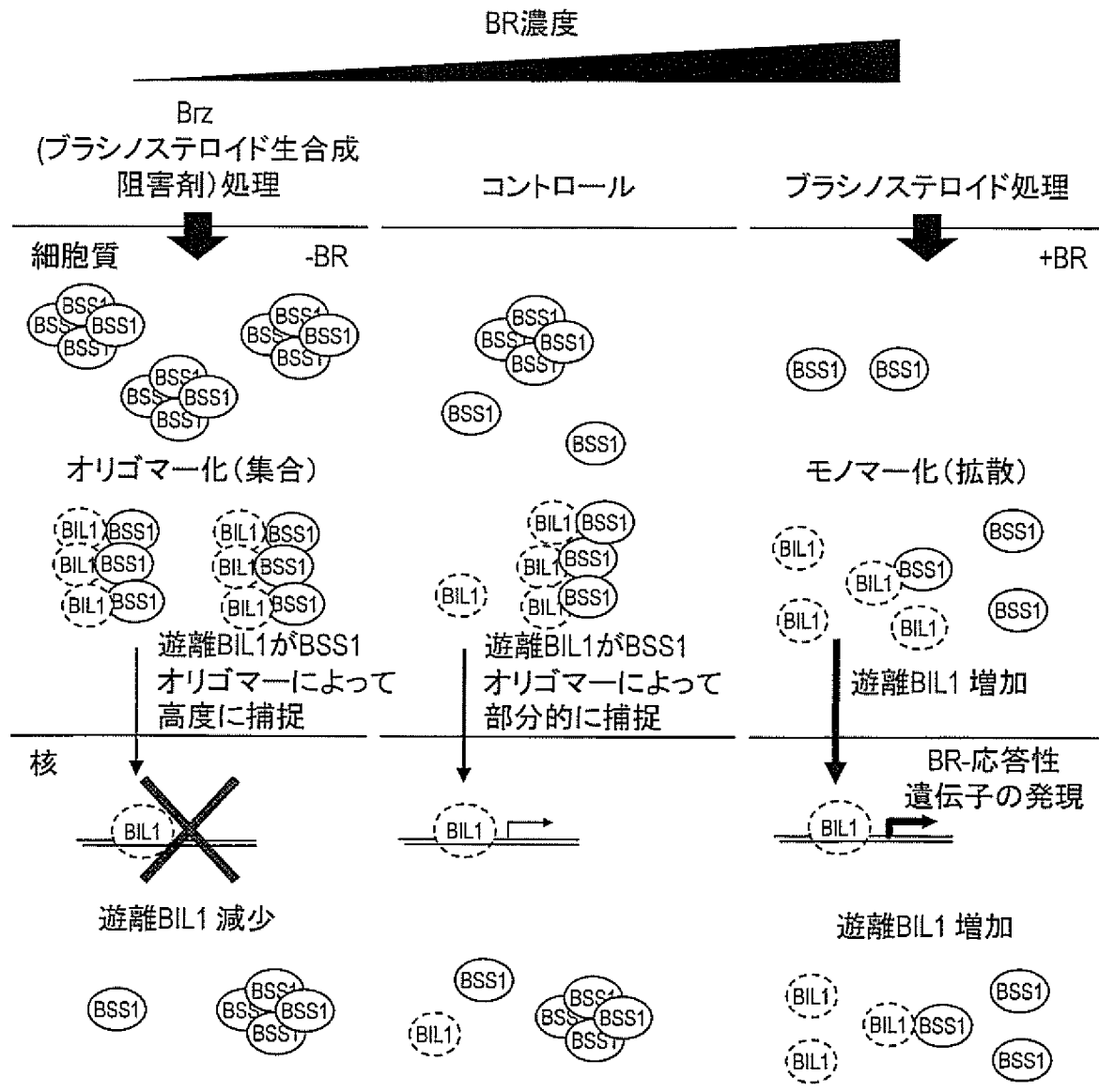
[図9]



[図10]



[図11]

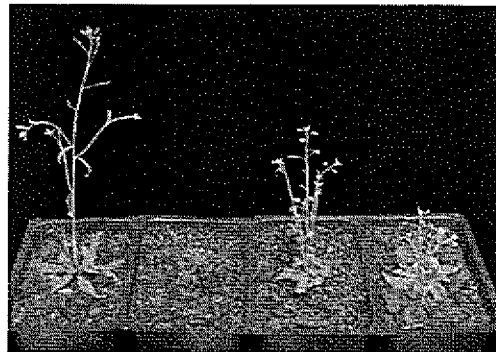


[図12]

A

WT *bri1-5* *bss1-1D*

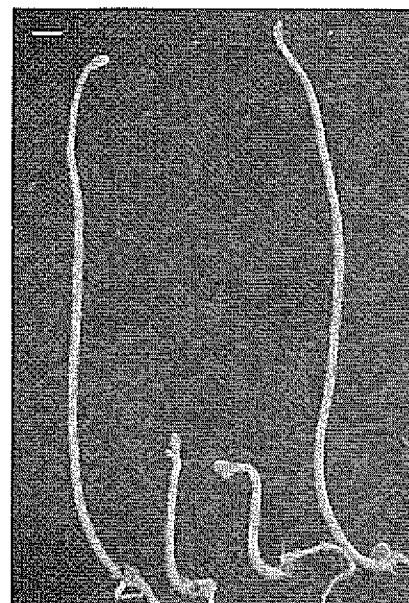
B

WT *bin2-1-/-* *bin2-1-/+* *bss1-1D*

C

WT *det2* *bss1-1D*

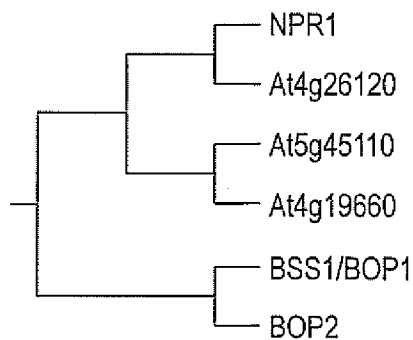
E

WT *det2* *bin2-1* *bss1-1D*

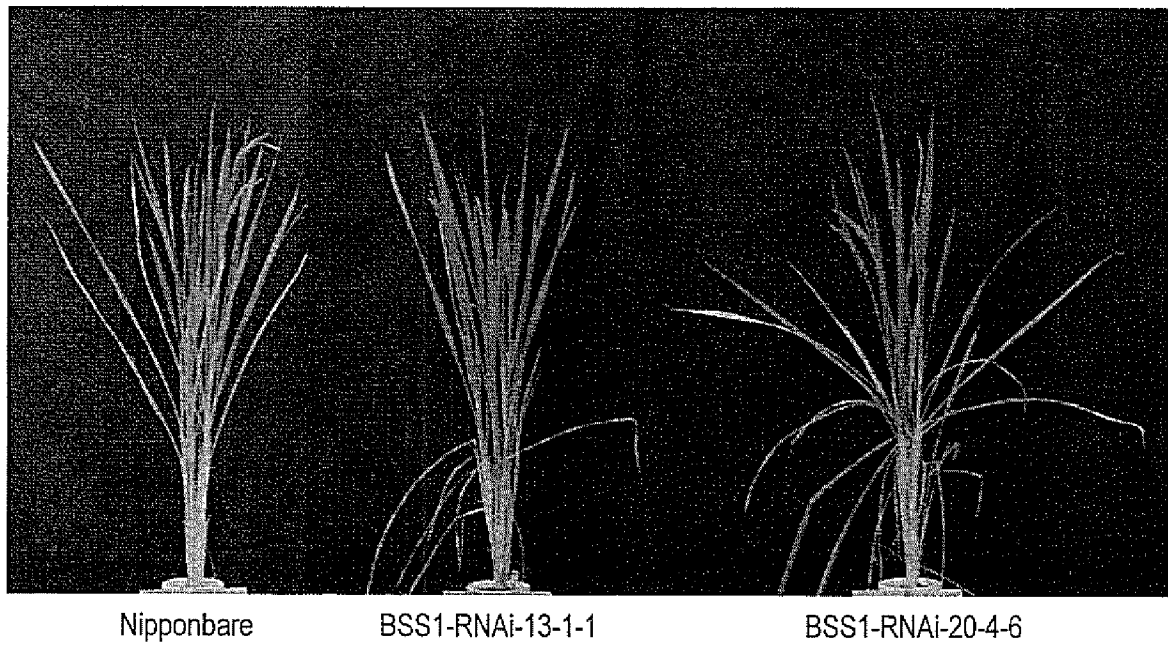
D

WT *det2* *bin2-1* *bss1-1D*

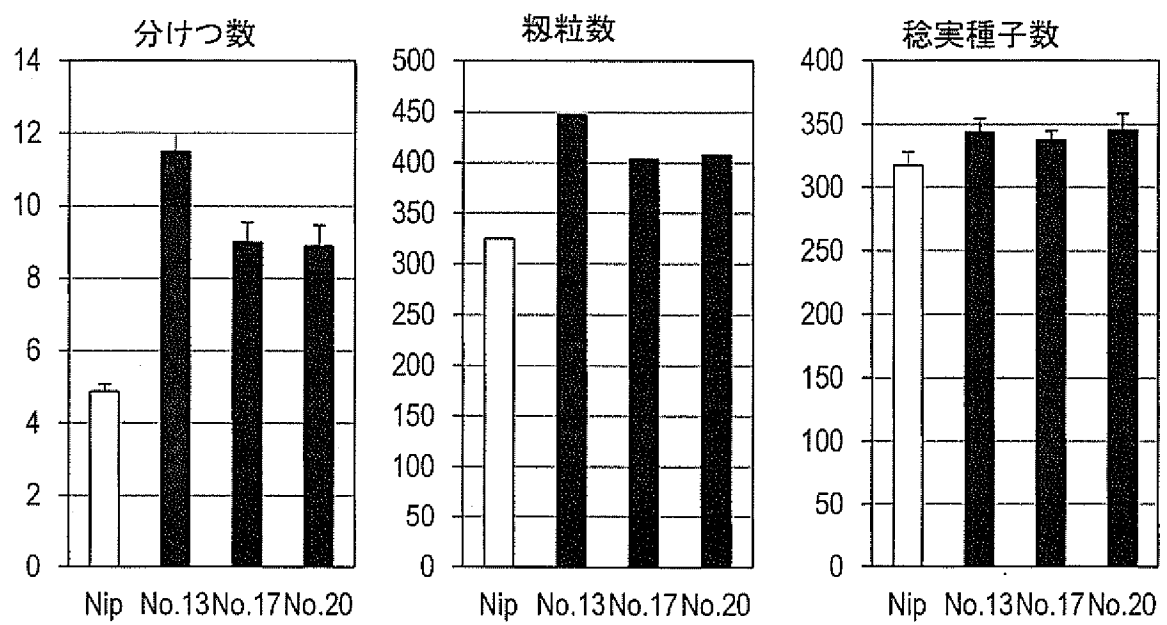
A



[図14]



[図15]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/052052

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A01H5/00(2006.01)i, C12N15/09(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)

A01H5/00, C12N15/09

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	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAPplus/WPIDS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	Setsuko SHIMADA et al., "Analysis for brassinosteroid signaling factor BSS1", Japanese Society for Chemical Regulation of Plants Kenkyu Happyo Kirokushu, 01 October 2014 (01.10.2014), vol.49, no.Supplement, page 54, particularly, column of 'Results and Study'	1, 3-5, 7, 9-10/2, 6, 8, 11-12
X/A	HA C. M. et al., BLADE-ON-PETIOLE1 Encodes a BTB/POZ Domain Protein Required for Leaf Morphogenesis in Arabidopsis thaliana, Plant Cell Physiol., 2004, Vol. 45, No. 10, pp.1361-1370 particularly, abstract, fig. 1 to 4	2-4, 6, 8-12/ 1, 5, 7

☒ 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
30 March 2016 (30.03.16)

Date of mailing of the international search report
12 April 2016 (12.04.16)

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/JP2016/052052

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	Takeshi NAKANO et al., "Brassinosteroid Joho Dentatsu Tanpakushitsu BSS1 no 'Shugo to Kakusan' ni yoru Shokubutsu Kusatake Seigyo Kiko Shokubutsu Chemical Biology ga Akiraka ni shita Aratana Tanpakushitsu no Dynamics", Kagaku to Seibutsu, 20 October 2015 (20.10.2015), vol.53, no.11, pages 734 to 736, particularly, page 734	1-12
P,X	SHIMADA S. et al., Formation and Dissociation of the BSS1 Protein Complex Regulates Plant Development via Brassinosteroid Signaling, The Plant Cell, 2015.02.06, Vol. 27, pp.375-390 particularly, abstract	1-12

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

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

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	1971-2016年
日本国実用新案登録公報	1996-2016年
日本国登録実用新案公報	1994-2016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), Cplus/WPIDS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/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 請求項の番号
X/A	嶋田勢津子 他, ブラシノステロイド情報伝達因子BSS1タンパク質複合体の離合集散 による植物成長とブラシノステロイド情報伝達経路の制御機構, 植物化学調節学会研究発表記録集, 2014.10.01, Vol.49, No.Supplement, pp.54 特に[結果と考察]欄	1, 3-5, 7, 9-10 /2, 6, 8, 11-12

☒ 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

30.03.2016

国際調査報告の発送日

12.04.2016

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)

高山 敏充

4 B

4 1 5 3

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	HA C. M. et al., BLADE-ON-PETIOLE1 Encodes a BTB/POZ Domain Protein Required for Leaf Morphogenesis in Arabidopsis thaliana, Plant Cell Physiol., 2004, Vol. 45, No. 10, pp.1361-1370 特に要約、図1-4	2-4, 6, 8-12 /1, 5, 7
P, X	中野雄司 他, ブラシノステロイド情報伝達タンパク質 BSS1 の「集合と拡散」によ る植物草丈制御機構 植物ケミカルバイオロジーが明らかにした新 たなタンパク質のダイナミクス, 化学と生物, 2015.10.20, Vol. 53, No. 11, pp.734-736 特に pp.734	1-12
P, X	SHIMADA S. et al., Formation and Dissociation of the BSS1 Protein Complex Regulates Plant Development via Brassinosteroid Signaling, The Plant Cell, 2015.02.06, Vol. 27, pp.375-390 特に要約	1-12