

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-525013

(P2008-525013A)

(43) 公表日 平成20年7月17日 (2008.7.17)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 B 0 3 0
C 0 7 K 14/415 (2006.01)	C 0 7 K 14/415	4 B 0 2 4
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 C	4 B 0 6 5
A 0 1 H 1/00 (2006.01)	A 0 1 H 1/00 A	4 H 0 4 5

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 39 頁)

(21) 出願番号	特願2007-548079 (P2007-548079)	(71) 出願人	502258417 ポスコ
(86) (22) 出願日	平成17年12月22日 (2005.12.22)		大韓民国、790-300、キョンサンブ
(85) 翻訳文提出日	平成19年8月21日 (2007.8.21)		ックード、ポーハング、ナムーク、コード
(86) 国際出願番号	PCT/KR2005/004461		ンードン 1
(87) 国際公開番号	W02006/068432	(71) 出願人	503367099
(87) 国際公開日	平成18年6月29日 (2006.6.29)		ポステック ファンデーション
(31) 優先権主張番号	60/638,460		大韓民国、キョンサンブクード、ポハ
(32) 優先日	平成16年12月22日 (2004.12.22)		ンーシティ、ナムーク、ヒョジャード
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ン、サン 31
		(74) 代理人	100090033 弁理士 荒船 博司
		(74) 代理人	100093045 弁理士 荒船 良男

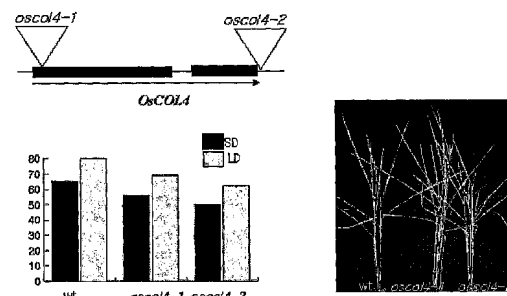
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 開花時期を調節する遺伝子、これを利用する形質転換植物体及び開花時期調節方法

(57) 【要約】

本発明は稲で分離された開花時期及び／または幹伸張調節因子 *OsMADS50*、*OsMADS51*、*OsMADS56*、*OsMADS14*、*OsTRX1*、*OsVIN2*、*OsCOL4* 及び *OsCOL8* からなる群の中で選択された遺伝子と、前記遺伝子を含む DNA 構造体、前記 DNA 構造体に形質転換された遺伝子導入植物体及び前記遺伝子を利用して植物の開花時期及び／または幹伸張を調節する方法に関し、本発明を通じて多様な植物の開花時期と幹伸張を調節することによって多様な農業的利益を図ることができる。

【選択図】 なし



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

SEQ ID NO:1 の塩基配列を有する OsMADS50 遺伝子、SEQ ID NO:3 の塩基配列を有する OsMADS51 遺伝子、SEQ ID NO:5 の塩基配列を有する OsMADS56 遺伝子、SEQ ID NO:17 の塩基配列を有する Cドメインコーディング序列を含む 3' 末端が除去された切頭 OsMADS14 遺伝子、SEQ ID NO:7 の塩基配列を有する OsTRX1 遺伝子、SEQ ID NO:9 の塩基配列を有する OsVIN2 遺伝子、SEQ ID NO:11 の塩基配列を有する OSCOL4 遺伝子、及び SEQ ID NO:13 の塩基配列を有する OsCOL8 遺伝子からなる群の中で選択された遺伝子を有する稲の開花時期調節因子。

10

【請求項 2】

SEQ ID NO:1 の塩基配列を有する OsMADS50 遺伝子、SEQ ID NO:3 の塩基配列を有する OsMADS51 遺伝子、SEQ ID NO:7 の塩基配列を有する OsTRX1 遺伝子、SEQ ID NO:9 の塩基配列を有する OsVIN2 遺伝子、及び SEQ ID NO:13 の塩基配列を有する OsCOL8 遺伝子からなる群の中で選択された遺伝子を有し、開花促進活性を有することを特徴とする、請求項 1 に記載の稲の開花時期調節因子。

【請求項 3】

SEQ ID NO:5 の塩基配列を有する OsMADS56 遺伝子、及び SEQ ID NO:11 の塩基配列を有する OSCOL4 遺伝子からなる群の中で選択された遺伝子を有し、開花抑制活性を有することを特徴とする、請求項 1 に記載の稲の開花時期調節因子。

20

【請求項 4】

SEQ ID NO:17 の塩基配列を有する Cドメインコーディング序列を含む 3' 末端が除去された切頭 OsMADS14 遺伝子を有し、短日条件下では開花促進活性を有し、長日条件下では開花抑制活性を有することを特徴とする、請求項 1 に記載の稲の開花時期調節因子。

【請求項 5】

単子葉植物の開花時期調節因子、前記単子葉植物での稲の SEQ ID NO:1 の塩基配列を有する OsMADS50 遺伝子、SEQ ID NO:3 の塩基配列を有する OsMADS51 遺伝子、SEQ ID NO:5 の塩基配列を有する OsMADS56 遺伝子、SEQ ID NO:17 の塩基配列を有する Cドメインコーディング序列を含む 3' 末端が除去された切頭 OsMADS14 遺伝子、SEQ ID NO:7 の塩基配列を有する OsTRX1 遺伝子、SEQ ID NO:9 の塩基配列を有する OsVIN2 遺伝子、SEQ ID NO:11 の塩基配列を有する OSCOL4 遺伝子、及び SEQ ID NO:13 の塩基配列を有する OsCOL8 遺伝子からなる群の中で選択された遺伝子に相応する遺伝子を有することを特徴とする開花時期調節因子。

30

【請求項 6】

SEQ ID NO:1 の塩基配列を有する OsMADS50 遺伝子を有することを特徴とする稲の幹伸張調節因子。

40

【請求項 7】

請求項 1 の開花時期調節因子から生産される蛋白質で、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14 及び SEQ ID NO:18 からなる群の中で選択されたアミノ酸序列を有することを特徴とする開花時期調節蛋白質。

【請求項 8】

SEQ ID NO:1 の塩基配列を有する OsMADS50 遺伝子、SEQ ID NO:3 の塩基配列を有する OsMADS51 遺伝子、SEQ ID NO:5 の塩基配列を有する OsMADS56 遺伝子、SEQ ID NO:17 の塩基配列を有する Cドメインコーディング序列を含む 3' 末端が除去された切頭 OsMADS14 遺伝子、SEQ ID N

50

OsTRX1 遺伝子、SEQ ID NO:9 の塩基配列を有する OsVIN2 遺伝子、SEQ ID NO:11 の塩基配列を有する OSCOL4 遺伝子、及び SEQ ID NO:13 の塩基配列を有する OSCOL8 遺伝子からなる群の中で選択された遺伝子を有する開花時期調節因子を含む DNA 構造体で、

前記開花時期調節因子は植物で作用可能なストロングプロモーターと作動可能に連結されたり、植物で作用可能なエンハンサーと作動可能に連結されて過発現が誘導されたり、植物遺伝子内に挿入可能な外来遺伝子または内生トランスポゾンが挿入されたり、前記序列が全部または一部変更されて機能喪失が誘導されたものであることを特徴とする DNA 構造体。

【請求項 9】

前記開花時期調節因子が玉蜀黍ユビキチン (ubi) プロモーターと作動可能に連結されて過発現が誘導されたものであることを特徴とする、請求項 8 に記載の DNA 構造体。

【請求項 10】

前記開花時期調節因子がプロモーター領域に挿入された T-DNA 内の 35S エンハンサーによって過発現が誘導されたものであることを特徴とする、請求項 8 に記載の DNA 構造体。

【請求項 11】

前記開花時期調節因子の特定領域に T-DNA または内生トランスポゾンが挿入されて機能喪失が誘導されたものであることを特徴とする、請求項 8 に記載の DNA 構造体。

【請求項 12】

前記開花時期調節因子が全部または一部変更されて機能喪失が誘導されたものであることを特徴とする、請求項 8 に記載の DNA 構造体。

【請求項 13】

SEQ ID NO:1 の塩基配列を有する OsMADS50 遺伝子を含み、前記 OsMADS50 遺伝子が第 4 イントロンに T-DNA が挿入されて機能喪失が誘導されたものであることを特徴とする、請求項 8 に記載の DNA 構造体。

【請求項 14】

SEQ ID NO:11 の塩基配列を有する OSCOL4 遺伝子、及び SEQ ID NO:13 の塩基配列を有する OSCOL8 遺伝子からなる群の中で選択された遺伝子を有する開花時期調節因子を含み、前記開花時期調節因子が第 1 エクソンまたは 3' UTR 領域に T-DNA が挿入されて機能喪失が誘導されたものであることを特徴とする、請求項 8 に記載の DNA 構造体。

【請求項 15】

SEQ ID NO:1 の塩基配列を有する OsMADS50 遺伝子、SEQ ID NO:3 の塩基配列を有する OsMADS51 遺伝子、SEQ ID NO:5 の塩基配列を有する OsMADS56 遺伝子、SEQ ID NO:17 の塩基配列を有する Cドメインコーディング序列を含む 3' 末端が除去された切頭 OsMADS14 遺伝子、SEQ ID NO:7 の塩基配列を有する OsTRX1 遺伝子、SEQ ID NO:9 の塩基配列を有する OsVIN2 遺伝子、SEQ ID NO:11 の塩基配列を有する OSCOL4 遺伝子、及び SEQ ID NO:13 の塩基配列を有する OSCOL8 遺伝子からなる群の中で選択された遺伝子を有する開花時期調節因子を含む DNA 構造体によって形質転換された遺伝子導入植物、植物の一部または植物細胞で、

前記 DNA 構造体に含まれている開花時期調節因子は植物で作用可能なストロングプロモーターと作動可能に連結されたり、植物で作用可能なエンハンサーと作動可能に連結されて過発現が誘導されたり、植物遺伝子内に挿入可能な外来遺伝子または内生トランスポゾンが挿入されたり、前記序列が全部または一部変更されて機能喪失が誘導され開花が促進されたり抑制された遺伝子導入植物、植物の一部または植物細胞。

【請求項 16】

SEQ ID NO:1 の塩基配列を有する OsMADS50 遺伝子、SEQ ID NO:3 の塩基配列を有する OsMADS51 遺伝子、SEQ ID NO:7 の塩基配列を有す

10

20

30

40

50

るOsTRX1遺伝子、SEQ ID NO:9の塩基配列を有するOsVIN2遺伝子、及びSEQ ID NO:13の塩基配列を有するOsCOL8遺伝子からなる群の中で選択された遺伝子を有する開花時期調節因子を含むDNA構造体によって形質転換され、前記開花時期調節因子が玉蜀黍ユビキチン(ubi)プロモーターと作動可能に連結されて過発現が誘導されたものであるために開花が促進されたことを特徴とする、請求項15に記載の遺伝子導入植物、植物の一部または植物細胞。

【請求項17】

SEQ ID NO:1の塩基配列を有するOsMADS50遺伝子、SEQ ID NO:3の塩基配列を有するOsMADS51遺伝子、SEQ ID NO:7の塩基配列を有するOsTRX1遺伝子、SEQ ID NO:9の塩基配列を有するOsVIN2遺伝子、及びSEQ ID NO:13の塩基配列を有するOsCOL8遺伝子からなる群の中で選択された遺伝子を有する開花時期調節因子を含むDNA構造体によって形質転換され、前記開花時期調節因子がプロモーター領域に挿入されたT-DNA内の35Sエンハンサーによって過発現が誘導されたものであるために開花が促進されたことを特徴とする、請求項15に記載の遺伝子導入植物、植物の一部または植物細胞。

10

【請求項18】

SEQ ID NO:1の塩基配列を有するOsMADS50遺伝子、SEQ ID NO:3の塩基配列を有するOsMADS51遺伝子、SEQ ID NO:7の塩基配列を有するOsTRX1遺伝子、SEQ ID NO:9の塩基配列を有するOsVIN2遺伝子、及びSEQ ID NO:13の塩基配列を有するOsCOL8遺伝子からなる群の中で選択された遺伝子を有する開花時期調節因子を含むDNA構造体によって形質転換され、前記開花時期調節因子が特定領域にT-DNAまたは内生トランスポゾンが挿入されて機能喪失が誘導されたものであるために開花が抑制されたことを特徴とする、請求項15に記載の遺伝子導入植物、植物の一部または植物細胞。

20

【請求項19】

SEQ ID NO:1の塩基配列を有するOsMADS50遺伝子、SEQ ID NO:3の塩基配列を有するOsMADS51遺伝子、SEQ ID NO:7の塩基配列を有するOsTRX1遺伝子、SEQ ID NO:9の塩基配列を有するOsVIN2遺伝子、及びSEQ ID NO:13の塩基配列を有するOsCOL8遺伝子からなる群の中で選択された遺伝子を有する開花時期調節因子を含むDNA構造体によって形質転換され、前記開花時期調節因子が全部または一部変更されて機能喪失が誘導されたものであるために開花が抑制されたことを特徴とする、請求項15に記載の遺伝子導入植物、植物の一部または植物細胞。

30

【請求項20】

SEQ ID NO:1の塩基配列を有するOsMADS50遺伝子を有する開花時期調節因子を含むDNA構造体に形質転換され、前記OsMADS50遺伝子が第4イントロンにT-DNAが挿入されて機能喪失が誘導されたものであるか、

SEQ ID NO:13の塩基配列を有するOsCOL8遺伝子からなる群の中で選択された遺伝子を有する開花時期調節因子を含むDNA構造体に形質転換され、前記開花時期調節因子が第1エクソンまたは3'UTR領域にT-DNAが挿入されて機能喪失が誘導されたものであるために開花が抑制されたことを特徴とする、請求項15に記載の遺伝子導入植物、植物の一部または植物細胞。

40

【請求項21】

SEQ ID NO:5の塩基配列を有するOsMADS56遺伝子及びSEQ ID NO:11の塩基配列を有するOsCOL4遺伝子からなる群の中で選択された遺伝子を有する開花時期調節因子を含むDNA構造体に形質転換され、前記開花時期調節因子がストロングプロモーターと作動可能に連結されたり、プロモーター領域にエンハンサーを有する植物遺伝子内に挿入可能な外来遺伝子が挿入されることによって過発現が誘導されたものであるために開花が抑制されたことを特徴とする、請求項15に記載の遺伝子導入植物、植物の一部または植物細胞。

50

【請求項 2 2】

SEQ ID NO: 5 の塩基配列を有する OsMADS 5 6 遺伝子及び SEQ ID NO: 1 1 の塩基配列を有する OsCOL 4 遺伝子からなる群の中で選択された遺伝子を有する開花時期調節因子を含む DNA 構造体に形質転換され、前記開花時期調節因子が特定位置に T-DNA または内生トランスポゾンが挿入されたり、序列の全部または一部が変更されて機能喪失が誘導されたものであるために開花が促進されたことを特徴とする、請求項 1 5 に記載の遺伝子導入植物、植物の一部または植物細胞。

【請求項 2 3】

SEQ ID NO: 1 7 の塩基配列を有する Cドメインコーディング序列を含む 3' 末端が除去された切頭 OsMADS 1 4 遺伝子を有する開花時期調節因子を含む DNA 構造体に形質転換され、Cドメインの部分が除去された OsMADS 1 4 部分蛋白質が過発現されて開花が促進されたことを特徴とする、請求項 1 5 に記載の遺伝子導入植物、植物の一部または植物細胞。

【請求項 2 4】

前記植物が稲であることを特徴とする、請求項 1 5 乃至 2 3 のいずれかに記載の遺伝子導入植物、植物の一部または植物細胞。

【請求項 2 5】

SEQ ID NO: 1 の塩基配列を有する OsMADS 5 0 遺伝子、SEQ ID NO: 3 の塩基配列を有する OsMADS 5 1 遺伝子、SEQ ID NO: 5 の塩基配列を有する OsMADS 5 6 遺伝子、SEQ ID NO: 1 7 の塩基配列を有する Cドメインコーディング序列を含む 3' 末端が除去された切頭 OsMADS 1 4 遺伝子、SEQ ID NO: 7 の塩基配列を有する OsTRX 1 遺伝子、SEQ ID NO: 9 の塩基配列を有する OsVIN 2 遺伝子、SEQ ID NO: 1 1 の塩基配列を有する OSCOL 4 遺伝子、及び SEQ ID NO: 1 3 の塩基配列を有する OsCOL 8 遺伝子からなる群の中で選択された遺伝子を有する開花時期調節因子を、

植物で作用可能なストロングプロモーターと作動可能に連結させたり、植物で作用可能なエンハンサーと作動可能に連結させて過発現を誘導したり、

植物遺伝子内に挿入可能な外来遺伝子または内生トランスポゾンを挿入させたり、前記序列が全部または一部を変形させて機能喪失を誘導して植物の開花を促進させたり抑制させることを特徴とする植物の開花調節方法。

【請求項 2 6】

SEQ ID NO: 1 の塩基配列を有する OsMADS 5 0 遺伝子、SEQ ID NO: 3 の塩基配列を有する OsMADS 5 1 遺伝子、SEQ ID NO: 7 の塩基配列を有する OsTRX 1 遺伝子、SEQ ID NO: 9 の塩基配列を有する OsVIN 2 遺伝子、及び SEQ ID NO: 1 3 の塩基配列を有する OsCOL 8 遺伝子からなる群の中で選択された遺伝子を有する開花時期調節因子を、

玉蜀黍ユビキチン (ubi) プロモーターと作動可能に連結させて過発現を誘導させることで開花を促進させることを特徴とする、請求項 2 5 に記載の植物の開花調節方法。

【請求項 2 7】

SEQ ID NO: 1 の塩基配列を有する OsMADS 5 0 遺伝子、SEQ ID NO: 3 の塩基配列を有する OsMADS 5 1 遺伝子、SEQ ID NO: 7 の塩基配列を有する OsTRX 1 遺伝子、SEQ ID NO: 9 の塩基配列を有する OsVIN 2 遺伝子、及び SEQ ID NO: 1 3 の塩基配列を有する OsCOL 8 遺伝子からなる群の中で選択された遺伝子を有する開花時期調節因子のプロモーター領域に T-DNA を挿入させ、前記挿入された T-DNA 内の 3 5 S エンハンサーによって過発現を誘導させることによって開花を促進させることを特徴とする、請求項 2 5 に記載の植物の開花調節方法。

【請求項 2 8】

SEQ ID NO: 1 の塩基配列を有する OsMADS 5 0 遺伝子、SEQ ID NO: 3 の塩基配列を有する OsMADS 5 1 遺伝子、SEQ ID NO: 7 の塩基配列を有する OsTRX 1 遺伝子、SEQ ID NO: 9 の塩基配列を有する OsVIN 2 遺伝子、

及びSEQ ID NO:13の塩基配列を有するOsCOL8遺伝子からなる群の中で選択された遺伝子を有する開花時期調節因子の特定領域にT-DNAまたは内生トランスポゾン挿入させて機能喪失を誘導させることによって開花を抑制させることを特徴とする、請求項25に記載の植物の開花調節方法。

【請求項29】

SEQ ID NO:1の塩基配列を有するOsMADS50遺伝子、SEQ ID NO:3の塩基配列を有するOsMADS51遺伝子、SEQ ID NO:7の塩基配列を有するOsTRX1遺伝子、SEQ ID NO:9の塩基配列を有するOsVIN2遺伝子、及びSEQ ID NO:13の塩基配列を有するOsCOL8遺伝子からなる群の中で選択された遺伝子を有する開花時期調節因子の塩基配列全部または一部を変形させて機能喪失を誘導することによって開花を抑制させることを特徴とする、請求項25に記載の植物の開花調節方法。

10

【請求項30】

SEQ ID NO:1の塩基配列を有するOsMADS50遺伝子の第4イントロンにT-DNA挿入させて機能喪失を誘導させたり、

SEQ ID NO:13の塩基配列を有するOsCOL8遺伝子からなる群の中で選択された遺伝子を有する開花時期調節因子の第1エクソンまたは3'UTR領域にT-DNA挿入させて機能喪失を誘導させることによって開花を抑制させることを特徴とする、請求項25に記載の植物の開花調節方法。

【請求項31】

20

SEQ ID NO:5の塩基配列を有するOsMADS56遺伝子及びSEQ ID NO:11の塩基配列を有するOsCOL4遺伝子からなる群の中で選択された遺伝子を有する開花時期調節因子をストロングプロモーターと作動可能に連結させたり、プロモーター領域にエンハンサーを有する植物遺伝子内挿入可能な外来遺伝子を挿入させて過発現を誘導させることで開花を抑制させることを特徴とする、請求項25に記載の植物の開花調節方法。

【請求項32】

SEQ ID NO:5の塩基配列を有するOsMADS56遺伝子及びSEQ ID NO:11の塩基配列を有するOsCOL4遺伝子からなる群の中で選択された遺伝子を有する開花時期調節因子の特定位置にT-DNAまたは内生トランスポゾン挿入させたり、序列の全部または一部が結実させて機能喪失を誘導することによって開花を促進させることを特徴とする、請求項25に記載の植物の開花調節方法。

30

【請求項33】

SEQ ID NO:14またはSEQ ID NO:15の塩基配列を有するOsMADS14遺伝子のCDメインコーディング序列を含む3'末端を除去してSEQ ID NO:18のアミノ酸序列を有するCDメイン部位が除去されたOsMADS14蛋白質を過発現させることによって開花を促進させることを特徴とする、請求項25に記載の植物の開花時期調節方法。

【請求項34】

前記植物が稲であることを特徴とする、請求項25乃至33のいずれか1項に記載の植物の開花調節方法。

40

【請求項35】

植物細胞を準備し、

前記植物細胞を請求項8乃至14のいずれか1項に記載されたDNA構造体に形質転換させ、

前記得られた形質転換細胞を培養する段階を含む、

開花時期が調節された遺伝子導入植物、植物の一部または植物細胞の製造方法。

【請求項36】

SEQ ID NO:1のOsMADS50遺伝子の発現を過発現させたり機能喪失させる段階を含む植物の幹伸張調節方法。

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は稲の開花時期及び／または幹伸張に関与する調節因子、前記遺伝子を利用して形質転換された遺伝子導入植物及び、前記調節因子を利用して植物の開花時期及び／または幹伸張を調節する方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

植物の発達過程は栄養生長と生殖生長に区分され、多様な開花信号を受けて前記2種類生長間の転換が行われる。このような開花信号には光周期、光強度のような環境的要因と植物体内の遺伝的要因など、多様な要素が影響を与える(Dung et al., 1998; Yamamoto et al., 1998)。このような生長転換結果、多様な形態的变化が起こるが、これは科学的観点から興味深い主題である。それだけでなく、開花調節から得られる経済的効用によって開花関連機序は多く研究されてきた。

特に、アラビドプシス(Arabidopsis: 日本名はシロイヌナズナ)をモデルにした分子遺伝学的研究は開花調節遺伝子の機能と、これら相互間の関連性を理解させ、これを通じて開花信号経路を具体的に明らかにした。アラビドプシスの場合、光、温度、光周期などのような外部信号と、栄養状態、ホルモンなどのような内部信号が開花に関与し、開花経路は、およそ、光周期経路、春化経路、ジベレリン(GA, gibberellin)経路、内在的経路に分かれる。

【0003】

これに反し、稲においては開花時期が主に光周期経路と内在的経路によって調節されると思われている(Yamamoto et al., 1998)。最近、稲における光周期経路に関与するものと推定される幾つかの遺伝子が分離され、稲での光周期経路の輪郭がある程度明らかになった(Yano et al., 2001, Mouradov et al., 2002)。まず、光周期感性を調節する幾つかの特定遺伝子座が同定されたが、Se(Photoperiodic sensitivity)1(Se1)、Se3-Se7及びEE1-E3等がそれである(Poonyarit et al., 1989, Sano, 1992, Tsai, 1995, Yokoo et al., 1980, Yokoo and Okuno, 1993)。また、分子水準マーカを使用する量的形質遺伝子座分析(quantitative trait loci (QTL) analyses)によって出穂期(heading date)に関する数十個の遺伝子座を検出したが、出穂期1(Hd1)、出穂期6(Hd6)、出穂期3a(Hd3a)等のような遺伝子が分離された(Li et al., 1995, Lin et al., 1996, 1998, Maheswaran et al., 2000, Yano et al., 1997, Xiao et al., 1995)。前記遺伝子のうち、Se5、Hd1、Hd6、Hd3a遺伝子はそれぞれアラビドプシスの長い胚軸1(LONG HYPOCOTYL1: HY1)、CONSTANS(CO)、カゼインキナーゼ2(CASEIN KINASE2: CK2)、FLOWERING LOCUST (FT)に相応する遺伝子で、アラビドプシスの遺伝子と類似な生化学的機能を担当すると予想される。

【0004】

しかし、前記稲の遺伝子とアラビドプシスの遺伝子は光周期に対して相異なる反応を示す場合がある。アラビドプシスのCONSTANS遺伝子は日長を認識して開花時期を誘導する開花促進遺伝子である。稲にもCONSTANSと相同性のある遺伝子が存在し、そのうちHd1(出穂期1: heading date1)という遺伝子が稲の開花時期を調節する。稲のHd1遺伝子はzinc fingerドメインと核位置化信号を含む蛋白質をコーディングする遺伝子で、短日(SD)条件でHd3a遺伝子の発現を増加させて開花を促進するが、長日(LD)条件ではむしろHd3a遺伝子の発現を阻害して開花を抑制することが明らかになった(Izawa et al., 2002)。これに反し、前記Hd1に対応するアラビドプシスのCO遺伝子は長日条件でFT(稲のHd3aに

当る)の発現を増加させて開花促進子として作用するが、短日条件で開花抑制者として作用しない(Putterill et al., 1995)。このように植物種に応じる相異なる光周期反応に対する分子水準の理解は短日植物と長日植物の差が理解できる糸口を提供することと予測される。

【特許文献1】特開2002-153283(特許文献2の優先権基礎出願)

【特許文献2】米国特許7,196,246(特許文献1に対応させて翻訳に利用)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

現在まで稲において前記で提示したような幾つかの開花関連遺伝子が明らかになったが、その数は制約的であり、アラビドプシスと区別される稲特異的遺伝子についても知らされたことがあまりない。また、長日条件特異的開花調節因子や他の開花経路の内在的経路を調節する遺伝子についても知らされたことがない。開花時期が植物の耕作時期及び耕作地域を決める時に非常に重要で、開花時期を調節することで莫大な農業的利益が得られることを考慮する時、稲の開花時期調節経路を明らかにし、これに関与する遺伝子を探索するための努力が切実に要求される。

これに本発明者らは追加的に稲で開花調節遺伝子を同定し、その特性を究明した。公知されていない開花調節因子が発見されただけでなく、稲でその機能が特異に分化した結果も得ることができた。

【0006】

このような要求に応じるために本発明は、稲における開花時期調節に関与する遺伝子を明らかにし、これらの作用条件を探して稲の開花時期を調節することによって農業的利益を追求することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

このような目的を達成するために、本発明者らは稲のT-DNA挿入突然変異株から開花時期が促進されたり遅延された変異株を選抜して遺伝子进行分析し、アラビドプシスのAGL20、CONSTANS遺伝子などのような開花時期調節因子に相応する遺伝子を含む開花調節因子を分離し、追加的な形質転換分析によってこれら遺伝子の機能と作用条件を究明して本発明を完成した。また、前記遺伝子のうちの一部は稲の幹伸張を促進することが明らかになった。また、前記遺伝子は稲だけでなく、とうもろこし、麦、小麦などのような発生的類似性を有する他の単子葉植物にも類似な作用が行われると予想される。

より具体的には、本発明は1)開花時期及び/または幹伸張調節因子、2)前記調節因子からコーディングされる開花時期調節蛋白質、3)前記調節因子の過発現または機能喪失が誘導される構造体、4)前記過発現または機能喪失が誘導される構造体によって形質転換される遺伝子導入植物体、植物の一部または植物細胞、4)前記遺伝子導入植物の製造方法、及び5)前記調節因子を使用して開花時期及び/または幹伸張を調節する方法を提供する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

まず、本発明は開花時期及び/または幹伸張の調節機序に関与する調節因子を提供する。

T-DNAを標識として挿入させた遺伝子導入植物体の中で開花時期が遅れたり速くなるなど、開花時期に変化がある個体を選別してT-DNA挿入部位の隣接部位遺伝子序列进行分析して次のような幾つかの開花時期調節因子を捜し出した。

このように発見された開花時期調節因子のうちの1つが稲のMADSボックス遺伝子のうちの1つであるOryza sativa MADS50(以下、“OsMADS50”と言う)で、その序列をSEQ ID NO:1として示した。

【0009】

前記調節因子は従来のNCBI(米国国立National Center for

10

20

30

40

50

B i o t e c h n o l o g y I n f o r m a t i o n) データベースに登録されていた登録 (A c c e s s i o n) 番号 A B 0 0 3 3 2 8 に対して特異な 2 対のプライマーを利用した P C R 反応によって分離し、その序列を分析して “ O r y z a s t a v i s M A D S 5 0 ” (以下、“ O s M A D S 5 0 ” と言う) と命名された。前記 O s M A D S 5 0 は稲の M A D S ボックス含有遺伝子のうちの 1 つで、典型的な M I K C ((M A P S 、 I n t e r v e n i n g 、 ケラチン類 (K e r a t i n - l i k e) 及び C - 末端領域) - t y p e M A D S ボックス遺伝子である。前記 O s M A D S 5 0 遺伝子のゲノム D N A 序列は A C 0 9 8 6 9 5 で登録されている。前記 O s M A D S 5 0 は 3 番染色体に存在し、7 個のエクソンと 6 個のイントロになり (図 2 a 参照、a l v a r e z - B u y l l a e t a l . , 2 0 0 0 、 L e e e t a l . , 2 0 0 3)) 、同じ M A D S ボックス遺伝子などで O s M A D S 5 6 と最も相同性が高いことが明らかになった (6 0 . 8 %) 。

【0010】

前記 O s M A D S 5 0 はアラビドプシスに存在する C O 1 過発現抑制因子 / A G A M O U S - L I K E 2 0 (S O C 1 / A G L 2 0) 遺伝子の稲における o r t h o l o g としての役割を果たす、稲での開花促進因子であることが明らかになった。このような O s M A D S 5 0 の開花促進効果は、T - D N A 挿入などで O s M A D S 5 0 機能が失われた O s M A D S 5 0 ノックアウト (K O) 個体、または O s M A D S 5 0 部位または前記遺伝子の M A D S ボックスの M 、 I 、 K 及び C ドメインのうちの全部または一部が除去された O s M A D S 5 0 R N A i (i n t e r f e r e n c e) 個体または前記ドメインの中の一部または全部が n t 置換などによって変形された個体で開花時期が遅延する反面、植物で作用可能なストロングプロモーター (例えば、アクチンプロモータ (a c t i n p r o m o t e r) 、チトクローム C (c y t o c h r o m e C) 、玉蜀黍ユビキチン (m a i z e u b i q u i t i n : u b i) プロモータなど) による O s M A D S 5 0 の過発現個体 (u b i : O s M A D S 5 0) ではカルス段階から極端に速い開花が進められるという事実から分かる。

【0011】

本発明において、特定遺伝子の過発現はアクチンプロモータ、チトクローム C 、ユビキチン (u b i) プロモータ (P u b i) 等のような植物で作用可能なストロングプロモーターを作動可能に連結するか、適切な位置にエンハンサーを含む D N A 断片を挿入して行うことができ、特定遺伝子の機能喪失は T - D N A のような植物ゲノム内挿入が可能な外来遺伝子または T O S 1 7 のような内生トランスポゾンを利用したり、エックス線やガンマ線などを注射して突然変異を誘発したり、R N A i または a n t i - s e n s e 方法を利用して行うことができる。このような遺伝子過発現または機能喪失方法は本発明の遺伝子に一般に適用される。

【0012】

このような O s M A D S 5 0 K O 個体または O s M A D S R N A i 個体と、 u b i : O s M A D S 5 0 個体の R T - P C R 分析によって O s M A D S 5 0 が稲の開花機序に関与する O s M A D S 1 、 O s M A D S 1 4 、 O s M A D S 1 5 、 O s M A D S 1 8 及び H d 3 a 遺伝子の u p s t r e a m r e g u l a t o r 役割を果たすことが明らかになった。このような結果は前記遺伝子 O s M A D S 5 0 が単独及び直接的に稲の開花に影響を与えることではなく、開花機序に関与する多様な遺伝子を調節することによってより根源的に開花時期を調節することを示す。

【0013】

また、 O s M A D S 5 0 遺伝子の機能が失われた個体で野生型と比較して顕著な幹伸張を示すことを観察して、前記遺伝子が開花時期だけでなく幹伸張調節にも関与することを確認した。つまり、 O s M A D S 5 0 機能が失われた個体は前記のように開花は遅延された反面、節間伸張が増加した表現型を示すことを発見して、前記遺伝子が開花調節だけでなく幹伸張調節にも影響を与えることを確認した。

【0014】

また、 O s M A D S 5 0 機能が失われた個体は長日条件下でだけ開花時期を遅延させる

10

20

30

40

50

ことが明らかになり、OsMADS50は長日条件下で作用する開花促進因子であることを確認した。

【0015】

また、前記OsMADS50遺伝子の他にも、過発現または機能喪失によって開花時期に影響を与える遺伝子として、OsMADS51、OsMADS56、OsTRX1及びOsVIN2遺伝子を分離した。

【0016】

OsMADS51遺伝子は従来NCBIデータベースにAB003327という番号で登録されているが(SEQ ID NO:3)、器官別発現様相のみ報告され、その機能については知られていない(Shinozuka et al., 1999)。前記OsMADS51遺伝子のゲノムDNA序列はAP008207で登録されている。本発明では過発現または機能喪失変異時に開花時期が変化する遺伝子として前記遺伝子を探索してPCRによって分離した。本発明において、OsMADS51遺伝子は過発現時に自然条件下で1乃至2週程度開花を促進させ、機能喪失されたノックアウト個体は短日条件で開花を遅延させることが示され(図11参照)、前記遺伝子もやはり開花時期調節因子であることを確認した。

【0017】

また、本発明者らは過発現または機能喪失変異時に開花時期が変化する遺伝子で、OsMADS56遺伝子を分離同定してNCBIデータベースに登録番号AY345224で登録した(SEQ ID NO:5)。前記遺伝子のゲノムDNA序列はAC092697で登録されている。本発明において、OsMADS56過発現形質転換体は自然条件で開花時期が1乃至2週程度遅れた。日長を調節した後、育てた時には、短日条件では開花時期が変化せず、長日条件でだけ1ヶ月だけ開花時期が遅れた(図12参照)。

【0018】

T-DNA挿入による機能喪失によって開花時期が変化する他の遺伝子として、OsTRX1遺伝子とOsVIN2遺伝子を発見し、これらの塩基配列をそれぞれSEQ ID NO:7(OsTRX1)とSEQ ID NO:9(OsVIN2)に示した。前記遺伝子のゲノムDNA序列はそれぞれAP008215(OsTRX1)とAP008208(OsVIN2)で登録されている。本発明において、OsTRX1ノックアウト個体は自然条件下で開花時期を1ヶ月以上遅延させ、OsVIN2ノックアウト個体は長日条件では32日程度、短日条件では10日程度開花時期を遅延させることが示され、これら遺伝子もまた開花時期調節因子であることを確認した(図13参照)。

【0019】

また、T-DNA挿入によって開花時期を変化させる他の遺伝子として、OsCOL4(Oryza sativa CONSTANS Like 4)遺伝子を発見した。前記OsCOL4遺伝子は稲ゲノムプロジェクトによってその序列が公開され(SEQ ID NO:11)、稲に存在するアラビドプシスCONSTANS類似遺伝子として知られているが、まだその機能については明らかになったことがない遺伝子である。前記遺伝子のゲノムDNA序列はAP004063で登録されている。

【0020】

本発明において、OsCOL4遺伝子の過発現などの機能活性化を誘導する時、野生型に比べて開花時期が15日以上遅れる表現型を示し(図14参照)、OsCOL4遺伝子の機能喪失突然変異を誘導する時、野生型に比べて開花時期が10日程度促進されることを確認してOsCOL4遺伝子の開花抑制因子としての機能を明らかにした。前記OsCOL4遺伝子は開花抑制作用のみを有し、幹伸張などの稲の栄養状態には影響を与えないことが確認された。また、前記OsCOL4遺伝子に対して日長に応じた開花時期を調査した時、過発現個体は長日、短日に関係なく野生型に比べて開花時期が遅れ、機能喪失突然変異は長日、短日に関係なく開花時期が速くなることを確認し、前記OsCOL4遺伝子は長日または短日条件の影響を受けずに稲の開花を抑制する因子であることを確認した。

10

20

30

40

50

【0021】

本発明の具体的な例において、OsCOL4遺伝子の機能活性化はT-DNAがOsCOL4遺伝子のプロモーター領域に挿入された場合、T-DNA内の35Sエンハンサーによって誘発されたり（図15及び16参照）、Pubiと作動可能に連結されて誘発されることができ（図17参照）、OsCOL4遺伝子の機能喪失はT-DNAがOsCOL4遺伝子の最初のエクソンまたは3'UTR領域に挿入されて誘発されることもできる（図18参照）。

【0022】

植物の開花時期調節因子の中で開花を促進する遺伝子は多く知られているが、開花を抑制する遺伝子は多く知られていないことを考慮する時、OsMADS56及びOsCOL4のように開花を抑制する役割を果たす開花調節因子の発見は非常に価値のあることである。植物の開花時期を操り上げるために開花促進因子を過剰発現するように形質転換された形質転換体に比べて開花抑制因子の機能抑制変異体により安定的に遺伝されることができ、OsCOL4の機能抑制突然変異は形質転換以外の方法（稲の内生トランスポゾンであるTos17による突然変異など）でも作ることができるので、遺伝子変形食品（GMO）の問題点を避けられると言う長所がある。

【0023】

また、他の開花調節因子として稲に存在するCONSTANS類似遺伝子のうちの1つであり、小麦での春化处理による開花時期を調節するVRN2遺伝子とも類似なOsCOL8（Oryza sativa CONSTANS Like 8）が開花時期を調節することを発見した。この遺伝子もまた稲ゲノムプロジェクトによってその序列はすでに知られているが（SEQ ID NO:13）、その機能は明らかになっていなかった。前記遺伝子のゲノムDNA序列はAC079874で登録されている。本発明ではCol8遺伝子の機能喪失個体を試験した結果、長日条件では開花時期が野生型と別に差がなかったが、短日条件では開花時期が遅れたことを確認し、前記OsCOL8遺伝子が短日条件下で開花を促進する植物の開花時期調節因子であることを確認した。

【0024】

本発明の稲の開花時期調節因子は個別的にも作用するが、相互相反したり、類似な作用を行う調節因子の共同作用によってその機能が相殺または増幅されてより効果的に開花時期を調節することができる。

【0025】

また、前記遺伝子の他にも開花時期調節遺伝子としてOsMADS14を分離した。前記遺伝子のゲノムDNA序列とcDNA序列をそれぞれSEQ ID NO:15とSEQ ID NO:16に示した。アラビドプシスのAPETALA1（AP1）遺伝子は花器官形成と開花時期調節に関与することで、稲でAP1類似遺伝子が少なくとも4個存在すると知られている。これらは各々OsMADS14、OsMADS15、OsMADS18及びOsMADS20遺伝子として命名されている。この中でOsMADS14遺伝子はOsMADS6と言う蛋白質と相互結合するパートナーとして最初にクローニング（cloning）され、過剰発現によって開花が促進されると知られているが、具体的な作用形態及び作用条件などは明らかになっていない。

【0026】

本発明では前記OsMADS14遺伝子のT-DNAまたはTos17挿入突然変異を分析した結果、開花時期及び花発達などに特別な変化がないことを観察した（図21参照）。このような結果はOsMADS14遺伝子の他の遺伝子が過剰（redundant）に作用することを暗示する。OsMADS14の場合、MADSボックス内に存在するM、I、K（KI、KII、KIII、KIV）及びCドメインの中でCドメインを含む末端部位が除去された部分蛋白質を過剰発現させた結果、短日条件では開花時期が一ヶ月程度速くなり、長日条件では開花時期が2週程度遅れた結果を得た。前記Cドメインが除去された部分OsMADS14蛋白質はOsMADS14遺伝子のCドメインコーディング序列を含む3'末端領域を除去して発現させることによって得られ、本発明の具体例ではKドメ

インコーディング序列とCドメインコーディング序列の間にstop codonを挿入して得た。このようにCドメインコーディングの部分が除去されたOsMADS14遺伝子序列をSEQ ID NO:17に示し、これから得られるCドメインが除去されたOsMADS14部分蛋白質の序列をSEQ ID NO:18に示した。このような結果はOsMADS14のC末端部位除去の部分蛋白質が短日条件で開花時期を促進し、長日条件で開花時期を促進する遺伝子と相互作用して開花を抑制することを示す。

【0027】

稲は単子葉植物で、とうもろこし、小麦など他の単子葉植物での稲のOsMADS50、OsMADS51、OsMADS56、OsMADS14、OsTRX1、OsVIN2、OSCOL4及びOsCOL8に対応する遺伝子また開花時期及び／または幹伸張の調節因子としての役割を果たすと予測される。

10

【0028】

また、本発明はこのようなOsMADS50、OsMADS51、OsMADS56、Cドメインコーディング序列を含む3'末端部位が除去された切頭(truncated)OsMADS14、OsTRX1、OsVIN2、OSCOL4及びOsCOL8遺伝子によってコーディングされる開花時期調節蛋白質を提供する。前記開花時期調節蛋白質はSEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14及びSEQ ID NO:18からなる群の中で選択されたいずれか1つのアミノ酸序列を有するものであってもよい。

20

【0029】

また、本発明は過発現または機能喪失が誘導された開花時期調節因子を含むDNA構造体を提供する。

【0030】

本発明のDNA構造体は機能が失われたOsMADS50、OsMADS51、OsMADS56、OsMADS14、OsTRX1またはOsVIN2遺伝子を含むことができる。より具体的には、本発明のDNA構造体は外来遺伝子挿入などによって誘導されたOsMADS50、OsMADS51、OsMADS56、OsMADS14、OsTRX1またはOsVIN2遺伝子のノックアウト変異株を含むことができる。例えば、OsMADS50、OsMADS51、OsMADS56、OsMADS14、OsTRX1またはOsVIN2遺伝子内部の特定位置にT-DNAのように植物細胞染色体内挿入が可能なDNA切片が挿入されてノックアウトされた変異株を含むことができる。特に、OsMADS50の場合、6個のイントロンのうちの第4イントロンにT-DNAが挿入されていることができる(図2a参照)。また、本発明のDNA構造体はOsMADS50、OsMADS51またはOsMADS56全長遺伝子のうちの一部、好ましくは少なくともMADSボックスを含む部分が除去されたり、nt置換などによって変更したものを含み、OsMADS50、OsMADS51、OsMADS56またはOsMADS14遺伝子の機能が喪失されることができる。

30

【0031】

また、本発明のDNA構造体は過発現されたOsMADS50、OsMADS51、OsMADS56、OsTRX1またはOsVIN2遺伝子を含むことができる。本発明の具体的な例において、前記DNA構造体はアクチンプロモータ、チトクロームCプロモータ、玉蜀黍ユビキチン(ubi)プロモータのような植物で作用可能なストロングプロモーターと作動可能に連結されてOsMADS50、OsMADS51、OsMADS56、OsTRX1またはOsVIN2遺伝子の過発現が誘導されたものであり得る。

40

【0032】

また、本発明のDNA構造体はCドメインコーディング序列を含む3'末端部位が除去されてCドメインが除去されたOsMADS14部分蛋白質を生産する切頭OsMADS14遺伝子を含むことができる。前記Cドメインコーディング序列を含む3'末端部位が除去された切頭OsMADS14遺伝子はこのような植物で作用可能なストロングプ

50

ロモーターと作動可能に連結されて過発現が誘導されたものであり得る。

【0033】

また、本発明のDNA構造体は過発現されたOsCOL4遺伝子を含むことができる。本発明の具体的な例において、OsCOL4遺伝子はアクチンプロモータ、チトクロームCプロモータ、玉蜀黍ユビキチン（ubi）プロモータのようなストロングプロモーターと作動可能に連結されたり、またはT-DNAのような植物遺伝子内挿入可能な遺伝子がプロモーターに挿入されて前記挿入遺伝子内のエンハンサー（例えば、T-DNAの35Sエンハンサー）によって過発現が誘導されたものであり得る。また、本発明のDNA構造体は機能喪失されたOsCOL4遺伝子を含むことができる。本発明の具体例において、前記OsCOL4遺伝子は特定位置にT-DNAのような植物遺伝子内挿入可能な遺伝子が挿入されて機能が喪失されたものであってもよく、より具体的には、T-DNAが最初のエクソンまたは3'UTR領域に挿入されたものであってもよい。

10

【0034】

また、本発明のDNA構造体は過発現されたOsCOL8遺伝子を含むことができる。本発明の具体例において、OsCOL8遺伝子は玉蜀黍ユビキチン（ubi）プロモータのようなストロングプロモーターと作動可能に連結されて過発現が誘導されたものであり得る。また、本発明のDNA構造体は機能喪失されたOsCOL8遺伝子を含むことができる。本発明の具体例において、前記OsCOL4遺伝子は特定位置にT-DNAのような植物遺伝子内挿入可能な遺伝子が挿入されて機能が喪失されたものであることができ、より具体的には、T-DNAが第1エクソン領域に挿入されたものであり得る。

20

【0035】

また、本発明は前記のような開花時期調節因子の過発現または機能喪失が直接的に誘導されたり、過発現または機能喪失が誘導された開花時期調節因子を含むDNA構造体によって形質転換された遺伝子導入植物体、植物の一部または植物細胞を提供する。このような植物体、植物の一部または植物細胞の形質転換に使用されるベクターの種類には特別な制限がなく、植物の形質転換に通常使用されるベクターを使用することができ、より具体的には、pGA1611類のバイナリーベクターを使用することができる。

【0036】

より具体的には、本発明の遺伝子導入植物体、植物の一部または植物細胞は、前記のような方法によってOsMADS50、OsMADS51、OsTRX1、OsVIN2またはOsCOL8遺伝子の過発現が直接誘導されたり、過発現が誘導されたOsMADS50、OsMADS51、OsTRX1、OsVIN2またはOsCOL8遺伝子を含むDNA構造体によって形質転換されて開花が促進されたものであることもできる。また、本発明の遺伝子導入植物体、植物の一部または植物細胞は、このような方法によってOsMADS50、OsMADS51、OsTRX1、OsVIN2またはOsCOL8遺伝子の機能喪失が直接誘導されたり、機能喪失されたOsMADS50、OsMADS51、OsTRX1、OsVIN2またはOsCOL8遺伝子を含むDNA構造体によって形質転換されて開花が遅れたことであることもできる。また、本発明の遺伝子導入植物体、植物の一部または植物細胞は、このような方法によってOsMADS56またはOsCOL4遺伝子の過発現が直接誘導されたり、過発現されたOsMADS56またはOsCOL4遺伝子を含むDNA構造体によって形質転換されて開花が遅れたものであり得る。

30

40

【0037】

また、本発明の遺伝子導入植物体、植物の一部または植物細胞は、このような方法によってOsMADS56またはOsCOL4遺伝子の機能喪失が直接誘導されたり、機能喪失されたOsMADS56またはOsCOL4遺伝子を含むDNA構造体によって形質転換されて開花が促進されたものであり得る。

【0038】

また、本発明の遺伝子導入植物体、植物の一部または植物細胞はOsMADS14遺伝子のCドメインコーディングの部分が除去された遺伝子を含むDNA構造体によって形質転換されてCドメインが除去されたOsMADS14部分遺伝子を生産し、長日条件では

50

開花が遅れ、短日条件では開花が促進されたものであることができる。

【0039】

また、本発明の遺伝子導入植物体、植物の一部または植物細胞は、このような方法によってOsMADS50遺伝子の機能が喪失されたり、機能喪失されたOsMADS50遺伝子を含むDNA構造体によって形質転換されて野生型と比較して顕著な幹伸張を示すものであり得る。

また、本発明は前記のような調節因子を過発現または機能喪失を誘導して開花時期及び／または幹伸張を調節する方法を提供する。

【0040】

本発明の開花時期調節方法はOsMADS50、OsMADS51、OsTRX1、OsVIN2またはOsCOL8遺伝子の機能を喪失させて開花を遅延させるものであり得る。具体的には、本発明の開花時期調節方法は外来遺伝子挿入または遺伝子結実などによってOsMADS50、OsMADS51、OsTRX1、OsVIN2またはOsCOL8遺伝子の機能喪失を直接誘導したり、植物を機能喪失が誘導されたOsMADS50、OsMADS51、OsTRX1、OsVIN2またはOsCOL8遺伝子を含むDNA構造体を使用して形質転換させることによって開花を遅延させる方法であり得る。例えば、前記OsMADS50、OsMADS51、OsTRX1、OsVIN2またはOsCOL8遺伝子の機能喪失は前記遺伝子内部の特定位置にT-DNAのように植物細胞染色体内挿入可能なDNA断片が挿入されることによって誘導できる。例えば、OsMADS50遺伝子の場合、6個のイントロンのうちの第4イントロンにT-DNAを挿入したり、OsCOL8遺伝子の場合には、第1エクソンにT-DNAを挿入して機能を喪失させることができる。

【0041】

また、前記OsMADS50、OsMADS51、OsTRX1、OsVIN2またはOsCOL8遺伝子の機能喪失は前記遺伝子の全部または一部が除去されて誘導されたものであり得る。例えば、OsMADS50、OsMADS50またはOsMADS51の場合、少なくともMADSボックス部位を除去して機能を喪失させることができる。

【0042】

本発明の開花時期調節方法は植物を前記のような方法で機能が失われたOsMADS50、OsMADS51、OsTRX1、OsVIN2またはOsCOL8遺伝子を含むDNA構造体によって形質転換させることによって、前記植物の開花を遅延時期は方法であり得る。

【0043】

また、本発明は前記のようにOsMADS50遺伝子内部に外来遺伝子を挿入したり、一部または全部除去させることによって機能を喪失させ、植物の幹伸張を促進させる方法を提供する。

【0044】

また、本発明の開花時期調節方法はOsMADS50、OsMADS51、OsTRX1、OsVIN2またはOsCOL8遺伝子を過発現させることによって開花を促進させることであってもよい。例えば、本発明の開花調節方法はOsMADS50、OsMADS51、OsTRX1、OsVIN2またはOsCOL8遺伝子を植物で作動可能なストロングプロモーターと作動可能に連結させることによって前記遺伝子を過発現させて植物の開花を促進させるものであり得る。また、本発明の開花調節方法はこのようなストロングプロモーターと作動可能に連結されて過発現が誘導されたOsMADS50、OsMADS51、OsTRX1、OsVIN2またはOsCOL8遺伝子を含むDNA構造体を使用して植物体を形質転換させることによって開花を促進させる方法であり得る。前記ストロングプロモーターとしてアクチンプロモータ、チトクロームCプロモータ、玉蜀黍ユビキチン(ubi)プロモータなどを使用することができる。

【0045】

また、本発明の開花時期調節方法はOsMADS56またはOsCOL4遺伝子を過発

現させて開花を抑制したり、機能を喪失させて開花を促進させることによって開花時期を調節することであってもよい。

【0046】

より具体的には、本発明の開花時期調節方法はストロングプロモーターと作動可能に連結されたり、プロモーター領域にエンハンサーを有する植物遺伝子内挿入可能な外来遺伝子が挿入されることによってOsMADS56またはOsCOL4遺伝子を過発現させて開花を抑制することであり得る。例えば、本発明の開花時期調節方法は玉蜀黍ユビキチン(u b i)プロモーターと作動可能に連結させて発現を誘導することによってOsMADS56遺伝子を過発現させたり、OsCOL4遺伝子のプロモーター領域にT-DNAを挿入してT-DNA内の35SエンハンサーによってOsCOL4遺伝子を過発現させて植物の開花を抑制させることであり得る。また、本発明の開花時期調節方法は前記のような方法で過発現が誘導されたOsMADS56遺伝子またはOsCOL4遺伝子を含むDNA構造体を使用して植物体を形質転換させることによって植物の開花を抑制することであり得る。

10

【0047】

また、本発明の開花時期調節方法はOsMADS14遺伝子のCDメインコーディング序列を含む3'末端部位を除去し、CDメインが除去されたOsMADS14部分蛋白質を過発現させることによって、長日条件では開花を遅延させ、短日条件では開花を促進させることであり得る。

【0048】

また、本発明の開花時期調節方法は遺伝子内特定部位に植物遺伝子内挿入可能な外来遺伝子挿入によってOsMADS56遺伝子またはOsCOL4遺伝子を機能喪失させることによって開花を促進することであり得る。より具体的には、本発明の開花調節方法はOsCOL4遺伝子の第1エキソンまたは3'UTR領域にT-DNAを予め挿入し、前記OsCOL4遺伝子を機能喪失させることによって、植物の開花を促進させることであり得る。

20

【0049】

また、本発明の開花調節方法は前記のように機能が失われたOsMADS56遺伝子またはOsCOL4遺伝子を含むDNA構造体を使用して植物を形質転換させることによって植物の開花を促進させることであり得る。

30

【0050】

また、本発明の開花時期調節方法はOsMADS14遺伝子を過発現させて、短日条件下では開花を促進させ、長日条件下では開花を遅延させることであり得る。前記OsMADS14遺伝子の過発現はC末端部位を除去して得られたOsMADS14部分蛋白質を過発現させることによって得られる。

【0051】

また、本発明はこのような過発現または機能喪失された開花時期調節因子を含むDNA構造体を利用して形質転換させることによって、開花時期が調節された遺伝子導入植物、植物の一部または植物細胞を製造する方法を提供する。本発明の製造方法は植物細胞を準備する段階;前記のようなDNA構造体を使用して準備された植物細胞を形質転換させる段階;及び前記形質転換された細胞を培養する段階を含む。前記開花時期調節因子はOsMADS50、OsMADS51、OsMADS56、OsMADS14、OsTRX1、OsVIN2、OsCOL4及びOsCOL8遺伝子からなる群の中で選択され、前記方法によって過発現されたり機能喪失されたものである。前記形質転換された植物細胞は細胞で培養されたり、通常の組織分化誘導方法を利用して特定組織で分化されたり、個体で発生することができる。

40

【0052】

本発明による開花時期調節方法及び遺伝子導入植物の製造方法は稲以外のとうもろこし、小麦などの他の単子葉植物に適用でき、各植物でのこのような稲のOsMADS50、OsMADS51、OsMADS56、OsMADS14、OsTRX1、OsVIN2

50

、O s C O L 4 及び O s C O L 8 遺伝子に相応する遺伝子を利用して適用することができる。

【0053】

（実施例1：T-DNAが挿入された突然変異体から開花時期が変わった突然変異体選抜1）

T i プラスミドバイナリーベクター p G A 2 1 4 4 (J e o n e t a l. , T h e P l a n t J o u r n a l (2000) 22 (6)、561-570) を利用して稲細胞（童真稲の種子から誘導されたカルス）を処理してT-DNAが挿入された第1世代（T1）突然変異株を得た。前記T i プラスミドバイナリーベクター p G A 2 1 4 4 を利用した処理は前記“J e o n e t a l. 2000b”の記載に従った。つまり、アグロバクテリアと稲のカルスを共培養させてT-DNAを植物体内に送信させ、抗生剤を利用して転送された細胞を選別して再分化させる方法で行った。得られた2933個のT1突然変異株を畑に展開させて第2世代（T2）遺伝子導入植物体を得て、これらの中で開花時期において変化を示した突然変異株を選別した。他の遺伝子導入植物の平均開花時期と比較して2週間以上差がある25植物体を観察し、この中で16植物体は早期開花し、9細胞株は開花が遅れた。

【0054】

図1はO s M A D S 5 0 にT-DNAが挿入されたO s M A D S 5 0 ノックアウト（K O）個体と野生型（W T）個体間の表現型を比較した写真で、W T 植物体（W/W）が開花した時を撮影し、まだO s M A D S 5 0 K O 植物体（T/T）は開花していないことが分かる。

【0055】

突然変異が誘導された遺伝子を分析するために、制限酵素としてゲノムDNAを切断した後、両端を接合させて2回にわたってP C R を通じてT-DNAが挿入された周辺序列を明らかにする“A n e t a l. 2003”に報告されたi n v e r s e P C R 方法を利用してT-DNAが挿入された部位の隣接部位序列を分析し、米国国立バイオテクノロジーセンター（N C B I）データベースを利用してT-DNAの挿入位置を確認した。その結果、図1の右側に現れた個体（l i n e 0-153-43）での回復序列はM A D S ボックス含有遺伝子であるO s M A D S 5 0 で、T-DNAの挿入位置はO s M A D S 5 0 の第4イントロンであることが確認された（図2a参照）。前記O s M A D S 5 0 はアラビドプシスでの開花促進因子であるS O C 1 / A G L 2 0 と50.6%の序列相同性を示し、稲に存在する36 M I K C (M A P S , I n t e r v e n i n g , K e r a t i n - l i k e , a n d C - t e r m i n a l d o m a i n) - t y p e M A D S ボックス蛋白質の中でO s M A D S 5 6 と最も高い相同性を示し（60.8%）、とうもろこし（m a i z e）Z m M A D S 1（75.2%）、タバコT o b M A D S 1（51.1%）及びマスタードS a M A D S A（50.0%）とも相同性を示す。前記に記載された相同性は全長蛋白質序列を整理して計算したものである。

【0056】

図1に示されているように、野生型対照群（W/W）に比べてO s M A D S 5 0 にT-DNAが挿入された個体（T/T）で開花時期が1ヶ月だけ遅れた。O s M A D S 5 0 に誘導された突然変異による開花遅延は前記遺伝子がアラビドプシスの開花調節因子であるA G L 2 0 に相応すると予測される因子であることを考える時、意味のある結果であると言える。

【0057】

図2Aに示したように、M A D S ボックス含有遺伝子であるO s M A D S 5 0 は3番染色体に位置し、典型的なM I K C - t y p e M A D S ボックス蛋白質をコーディングするもので、7個のエクソンと6個のイントロンで構成される。本実施例によってT-DNAが挿入された個体においてT-DNAは第4イントロンに挿入され、T-DNAでのベータ-グルクロニダーゼ（b e t a - g l u c u r o n i d a s e , g u s）遺伝子の転写方向はO s M A D S 5 0 の転写方向と反対方向であった。

【0058】

図2Aに示されているように、OsMADS50とT-DNAに位置するプライマーを使用してPCRし、T2植物体の遺伝子型を決めた。プライマーF2 (forward primer in the I region: 5'-aaagctgacgctgatggttt-3'、SEQ ID NO:23) とR1 (reverse primer at 3' UTR: 5'-ttgggtaccgagatccagcttattcctgg-3'、SEQ ID NO:22) を使用してPCRし、正常なOsMADS50遺伝子(W)の増幅を確認し、プライマーF2とR2 (reverse primer in the hygromycin phosphotransferase (hph) gene in T-DNA: 5'-atccagactgaatgccacacag-3'、SEQ ID NO:24) を使用してPCRし、T-DNAが挿入されたOsMADS50遺伝子(T)の増幅を確認した。

10

【0059】

その結果、13植物体の中で3個体がT-DNA挿入体に対して同型接合体(homozygotic、T/T)であった(図2B、サンプル4、10及び13)。これら植物体は全て植えた後、約99日後に開花した。反面、異形接合体(W/T)または野生型(W/W)の植物体は植えた後、約73日後に開花した。

【0060】

図2はOsMADS50の概略図で、T-DNA挿入位置及びOsMADS50 KO子孫の遺伝子型を示す。図2AはOsMADS50及びT-DNA挿入の構造を示すもので、7個のエクソン(満たされた四角)と6個のイントロン(満たされた四角の間の線)を示す。図2AにM、I、K、Cで示された部位はエクソンを示す。K部位は4個のエクソンで構成され、他の部位はそれぞれ1つのエクソンを含む。T-DNAは第4イントロンに挿入されている。矢印はプライマーを示す。F1は5' UTRの正方向プライマー、F2はI部位の正方向プライマー、R1は3' UTRの逆方向プライマー、R2はT-DNAのハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ(hph)遺伝子内の逆方向プライマーである。

20

【0061】

図2BはOsMADS50 KO子孫の遺伝子型を示す図面である。T-DNAが挿入されていない場合には、F2とR1プライマーが1.6 kbゲノムDNAに増幅される。T-DNAが挿入されると2つのプライマーの間の長さが長すぎて増幅できなくなる。また、T-DNAが第4イントロンに挿入されると、F2プライマーとR2プライマーは約2 kbバンドに増幅される。サンプル2、3、5、11及び12は単にゲノムDNAだけ増幅されたので、WT(W/W)であることが分かり;サンプル4、10及び13は開花が遅延された突然変異体から収穫されたもので、2 kbバンドにのみ増幅されて同型接合体(T/T)であることが分かり;他のサンプルは2つのバンドとも増幅されて異形接合体(W/T)であることが分かる。植えた後、出穂期までの時日を各植物体別に示した。

30

【0062】

前記から分かるように、開花遅延植物体の場合には全てT-DNAが挿入されたOsMADS50遺伝子のみを有し(T/T)、開花が正常な植物体は正常なOsMADS50遺伝子(W)を少なくとも1つ有していることを確認した。したがって、開花遅延突然体がT-DNAの挿入によって誘導されたことを証明することができる。

40

【0063】

(実施例2: OsMADS50遺伝子の分離)

前記から分離したOsMADS50遺伝子の序列をSEQ ID NO:1に示した。前記OsMADS50遺伝子は従来NCBIデータベースにAB003328と言う番号で登録されている。しかし、器官別発現様相のみ報告され、その機能については知られていない(Shinozuka et al., 1999)。これに本発明者らは特異な二対のプライマーをデザインしてPCRを通じてこの遺伝子を分離した後、OsMADS50と命名した。最初のPCRではSEQ ID NO:19 (F1: forward at 5' U

50

TR:5'-atcaagccttt acggccaaac cctacagc-3')とSEQ ID NO:20 (R1:reverse primer at 3' UTR:5'-ttgggtaccg atgggttagtg gagtctgc-3')の序列を有するプライマーで遺伝子を増幅し、第2 PCRでは増幅された産物の内側に位置するSEQ ID NO:21 (5'-atcaagccttg ttgggttcattc ggcgatcg-3')とSEQ ID NO:22 (5'-ttgggtaccg agatccagct tatttcctgg-3')に相当するプライマーを利用して最初の産物を鋳型にして増幅した。S11905の全コーディング部位と隣接した部位を含むPCR増幅産物をHindIII-BamHI (Roche)で切断してpBluescript SK (-)ベクター (stratagene)にクローニングし、シーケンシング機械 (ABI3100)で塩基配列を決めた後、この遺伝子をOsMADS50と命名した。この遺伝子は染色体3番の短いアーム (short arm)に位置するAP004322で登録されたクローンに含まれ、この位置はHd9と知られた突然変異と一致した (Lin et al., 2000)。

【0064】

(実施例3:OsMADS50 RNA干渉 (RNAi) 形質転換体分析)

OsMADS50 遺伝子発現の抑制によって遅れた開花表現型が誘発されるかどうかを確認するために、図3Aに示したようにOsMADS50 RNAi 個体を製作し、これを利用して遺伝子導入植物を生成した。MADSボックス領域を除いたOsMADS50 遺伝子をGUS遺伝子を介して互いに反対方向にpBluescript SK (-)ベクター (stratagene)にクローニングし、これをpGA1611ベクター (AY373338)の玉蜀黍ユビキチンプロモーター (Pubi)とnosターミネーター (Tnos)の間に挿入した。全82個のT1形質転換体を分析した結果、76個体で1ヶ月またはそれ以上開花時期が遅れることを観察することができた (図3B)。6個体は野生型の対照群と類似に植えた後、74~78日が経過した後に開花し、8個体は140日が過ぎても開花しなかった。このような結果はOsMADS50が重要な開花促進因子であることを証明する。

【0065】

このような開花遅延表現型の他にも、本実施例の遺伝子導入植物は伸張された節間をさらに多く有する。これと対照的に、大部分のOsMADS50 RNAi 植物は6個 (23.5%)乃至7個 (62.7%)の伸張した節間を有し、一部は8個 (13.7%)まで有した。反面、対照群 (CON)と野生型 (WT)の幹が主に5~6個の伸張された節間を有すると確認された。したがって、OsMADS50 RNAi 個体は開花遅延と共に形質転換体の幹伸張が促進される効果を有するということが分かる。

【0066】

図3はOsMADS50 RNAi 構造体の概略図と前記RNAi 構造体を発現する遺伝子導入植物の表現型を示す図面である。図3AはOsMADS50の2つのIKC部位の間に挿入されたGUSスペースを有するOsMADS50 RNAi 構造体を示す図面である。前記構造体をmaizeubiプロモーター (Pubi)とnosターミネーター (Tnos)の間に挿入した。図3BはOsMADS50 RNAi T1 遺伝子導入植物での出穂期までの日数の頻度分布、つまり、移植時期から開花まで必要な日数を示す。WTと他の遺伝子導入対照群植物は植えた後、74乃至78で開花した。9個の変異株は植えた後、140日まで開花していないことが分かる。broken barはX軸上の2つの数値間の大きな差を示す。図3CはOsMADS50 RNAi 植物体とWT対照群の伸張された節間個数比率を示す。平均値はそれぞれWT (63)、遺伝子導入対照群 (152)、OsMADS50 RNAi 幹 (102)であった。Y軸は伸張された節間を有する幹の相対的比率を示すもので範囲は4から8までである。

【0067】

RNAゲルプロット分析によってOsMADS50 RNAi 転写体が遅れた開花表現型を示す遺伝子導入植物に高い水準で存在することが確認された。発現程度が非常に高いためにプロットでの内部OsMADS50 転写体水準を可視化することが非常に難しい。

したがって、RT-PCR分析を使用してOsMADS50発現の抑制を確認した(図4B)。遅れた開花遺伝子導入植物において、転写体水準(F1/R1によって確認された)は顕著に減少した。このような結果はOsMADS50の発現減少が稲での遅れた開花を招くと言うことを示す。OsMADS50 RNAi植物体9及び10が植物体6乃至8より遅く開花したので、遅れた開花程度はOsMADS50 RNAi水準と比例する。

【0068】

図4はOsMADS50 RNA干渉効果を分析した図面で、OsMADS50 RNAi植物体内のOsMADS50の内部水準を示す。図4AはOsMADS50 RNAi構造体を発現する遺伝子導入植物でのOsMADS50 RNAi転写体とOsMADS50に対するRNAゲルプロット分析を示すもので、RNA干渉形質転換体(RNAi transgenics)でRNA干渉遺伝子(RNAi)が強く発現していることを示す。しかし、内在的に発現されるOsMADS50(sense)が阻害するかどうかは確実でない。5個のWT植物体(1-5)と5個の独立的遺伝子導入植物体(6-10)を試験した。遺伝子導入植物体6、7、8、9及び10はそれぞれ植えた後、111、115、115、130及び135日目に開花した。対照群としてrRNA水準を観察した(下側)。RNAiはOsMADS50 RNAi転写体:senseは内部OsMADS50転写体である。図4BはWT植物体(1-5)と遺伝子導入植物体(6-10)でのOsMADS50とOsMADS50 RNAi転写体に対するRT-PCR分析を示す図面である。RNAゲルプロット分析のために分離された同一なRNAを逆転写してcDNAを合成した。全長OsMADS50の検出のために使用したプライマー対は図2Aに示したようなF1(SEQ ID NO:2)/R1(SEQ ID NO:5)であった。対照群としてアクチンを使用した。OsMADS50とアクチンを増幅させるためにPCRをそれぞれ26回と23回行った。プライマーF1とR1を利用したRT-PCR結果は内在的に発現されるOsMADS50遺伝子がRNA干渉形質転換体で発現が阻害したことを示した。

【0069】

(実施例4:OsMADS50過発現形質転換体分析)

OsMADS50の開花時期に対する機能的役割をさらに調べるために、図5Aに示されているようにOsMADS50のセンス構造体を過発現する遺伝子導入稲植物を製作し、玉蜀黍ユビキチン(ubi)プロモーターを使用して構成性発現を誘導した。つまり、OsMADS50遺伝子のコーディング領域全体をSEQ ID NO:2及びSEQ ID NO:3の序列を有するプライマーに増幅した後、HindIII-Asp718(Roche)で切断してpBluescript SK(-)ベクター(stratagene)にクローニングして塩基配列を確認し、pGA1611ベクター(AY373338)のubiquitinプロモーターとnosターミネーターの間に挿入した。

【0070】

遺伝子導入calliが発芽誘導培地(shoot induction media、MSR media)上にトランスファーされる時、再分化されたT1個体のうちの約20%が類似花器官、例えば、内穎(palea)/外穎(lemma)(図5B)、雌しべ(stigmas)(図5B)、雄しべ(stamens)(図5c)、子房(ovaries)(図5c)及び花房(panicles)(図5D)等の構造で発生した。全ての花器官を含む小穂(小さい穂状花)を観察した。calliの約80%が芽で発生したことにもかかわらず、これらのうちの2/3は極度の矮小症と葉身(leaf blade)の成長欠乏を示した(図5E)。これら植物は結局死んだ。残存する1/3の芽は正常植物体として発生した。これらのうちの一部は対照群より早く開花し、残りはWT植物体と同じ時期に開花した。

遺伝子導入calliで観察される花器官類似構造が実質的に生殖可能であるかどうかを知るために、花特異的MADSボックス遺伝子OsMADS3とOsMADS4の転写体水準を測定した。前者はC機能遺伝子(C function gene、雄しべ及び雌

しべ発達に關与)であり、後者はB機能遺伝子(B function gene、萼と雄しべ発達に關与)である。これら遺伝子をubi:OsMADS50遺伝子導入calliから発生する花器官で特異に発現したが、これは前記器官が本物であることを示す。

【0071】

図5はubi:OsMADS50植物を分析した結果である。図5AはOsMADS50センス構造体の概略図である(Pubi:maize ubi promoter、Tnos:nos terminator)。図5Bはpalea/lemma(p/l)類似構造体とstigma(s)類似構造体を有する再生産された芽を示す。図5Cはstamen(st)類似構造体とstigma類似構造体を有する再生産された芽を示す。図5Dはpanicle(p)類似構造体を有する再生産された芽を示す。図5Eは矮小症と葉身成長欠乏を見せる再生産された芽を示す。図5Fは花器官類似構造でのOsMADS3とOsMADS4の発現様相(portrait)を示す(対照群葉:empty vectorで形質転換された葉;50S葉:OsMADS50を過発現する遺伝子導入葉;50S花:OsMADS50を過発現する花器官類似構造体)。アクチンを対照群として使用した。RT-PCRを通じて調べた結果、前記類似花器官50S花で花器官特異的に発現されるOsMADS3とOsMADS4の発現が増進されることが確認された。対照群葉(control leaves)と形質転換体の葉(50S leaves)ではこれら遺伝子の発現が検出されなかった。

【0072】

(実験例1:OsMADS50を含む開花調節因子の発現分析)

RNAゲルブロット分析によってOsMADS50が大部分の器官で多様に発現することが確認された(図6A)。分析のために選択した器官は実生の根(seedling root)、実生の地上部(seedling shoot)、9-10葉期の葉身(Young LB)、80日目の葉身(LB 80 DAP)、105日目の葉身(LB 105 DAP)、105日目の初葉の葉身(FL 105 DAP)と2cm以下の花房(Panicle<2cm)、10~20cmの花房(Panicle 10-20cm)の全8種類である。前記遺伝子は種子段階では低い水準に検出され、植物体の成長に伴って転写が増加した。若い花房で最初に低い発現を示し、この器官が成長しながら持続的に減少した。葉器官では強く発現した。葉発達段階別に4発生段階における葉のRT-PCR分析によって前記RNAゲルブロット分析を確認した(図6B)。OsMADS50転写体が4段階全てで検出され、20日目の植物と比較して49日目の植物で増加した発現水準を示した。Hd3a、OsMADS14、OsMADS15及びOsMADS18のような他の開花調節因子転写体の発現も80日目のまで漸進的に増加する様相を示した。

【0073】

図6はOsMADS50と他の開花調節因子の発現様相を示す図面である。図6AはRNAゲルブロット分析を示し、各サンプルに使用された全RNA量は15ugで、OsMADS50のKC部位がプローブ役割を果たした。下側は対照群として使用されたrRNAである。左側から発芽後7日目の実生の根と実生の地上部、9-10葉期の若い葉身(LBs)(植えた後、経過日(DAP):35日)、LBs 80 DAP、LBs 105 DAP、flag LBs 105 DAP、長さが2cmより短い花房、長さが10乃至20cmである花房。植物体は90 DAPに開花した。図6Bは多様な発生段階における推定開花時期調節因子のRT-PCR分析結果を示した図面である。WT植物をグロースチャンパーでSD条件(10h明期/14h暗期、30℃)下で育て、LBを20、49、80、113 DAPでサンプリングした。全てのサンプルを照明をつけた後6時間目に収穫した。開花日は87日目であった。

前記のような発現分析によって前記遺伝子が植物発生の初期に作用し、栄養器官でより多く発現され、花器官形成の間には非常に低い水準まで減少していることが分かる。

【0074】

(実験例2:OsMADS50突然変異体と過多発現体でOsMADS50を含む開花調節因子の発現分析)

10

20

30

40

50

OsMADS50の役割をさらに調べるために、OsMADS50 KO突然変異株と過発現体で開花調節因子の発現変化を分析してその結果を図7に示した。実施例1で得られたOsMADS50 KO個体で2つの光周期経路で開花時期を調節するhd1、hd3a及びOsGIに対してRT-PCR反応を行った。また、4個のMADSボックス遺伝子(OsMADS1、OsMADS14、OsMADS15及びOsMADS18)に対する調査を行った。その結果、これらもまた光周期経路に関与すると推定された。前記調査において、Hd1とOsGIの発現はOsMADS50 KO個体で変化がなかった。Hd3a転写体はOsMADS50 KO突然変異体で検出されなかったが、これはHd3aがOsMADS50の下流に位置することを暗示する。OsMADS18転写体における減少程度は他の遺伝子の減少程度だけ顕著でなかったにもかかわらず、全てのOsMADSボックス遺伝子の発現水準はOsMADS50 KO突然変異体で顕著に減少した。

10

【0075】

再分化されたubi:OsMADS50植物体の葉における調節遺伝子の発現程度を試験した(図7c)。これら植物体は再生産培地に移された後、数週日目に開花した。KO植物体と対照的にOsMADS14とOsMADS18転写体の水準はubi:OsMADS50植物体では増加した反面、OsMADS1、OsGI及びHd1では明確な変化がなかった。OsMADS15とHd3aの発現水準は非常に低いため、これらの転写体における変化が測定できなかった。

【0076】

20

図7はOsMADS50 KO葉とubi:OsMADS50葉でのMADSボックス遺伝子と光周期経路遺伝子の発現様相を示す図面である。図7AはOsMADS50 KO葉でのRT-PCR分析結果を示す。植えた後、73日目の日出2時間前にKO植物体から葉身を収穫した。RT-PCRの後、特定プローブを使用してDNAゲルプロット分析を行った。2つの独立的なWT分離個体(segregant)と2つの独立的なOsMADS50 KO植物体を試験した。図7BはOsMADS50 KO植物体でのRT-PCR結果の概略図である。DNAバンド強度を測定してアクチン転写体水準に対して正常化した(normalize)。示された結果はそれぞれの植物体に対する3回の独立的な試験の平均値である。2つのWTと2つのKO植物体の平均値を示した。Bars、SDs。図7Cはubi:OsMADS50植物体の発現様相を示した図面である。OsMADS50を過発現する遺伝子導入植物と対照群植物から葉身をサンプリングし、定量的RT-PCR分析によって遺伝子の転写体水準を測定した。示されたデータは2乃至3個の独立的サンプル、Con:empty vectorに形質転換されたT1対照群;と50S:ubi:OsMADS50葉の平均値である。Bars、SDs。PCRプライマーと各遺伝子の増幅回数を表1に示した。

30

【表 1】

Table 1 Primers and PCR cycles used in RT-PCR analyses

Gene	Forward primer	Reverse primer	PCR cycles 50 KO ^a	PCR cycles 50 S ^b
<i>OsMADS1</i>	tccatattgtctggcaagat	aagagagcagcgcactctt	28	32
<i>OsMADS14</i>	tctatgcagaaaaggtcctt	ggacgaagccaaaatatacac	36	36
<i>OsMADS15</i>	gctcttattcagctgaa	tcatatgtagcctgtagg	36	36
<i>OsMADS18</i>	ccaaactggatgcacttcag	atcaatatcgtggaagatg	23	32
<i>OsMADS50</i>	aaagctgacgctgatggttg	ttgggtaccgagatccagcttattcctgg	23	26
<i>OsGI</i>	tggagaagggttggtgatgc	gatagacggcacttcagcagat	23	26
<i>Hd1</i>	ttctctctccaaagattcc	catacgcttcttctgtttca	28	26
<i>Hd3a</i>	atggcgggaagtggcaggac	atcgatcgggatacgttag	36	36
<i>Actin</i>	gtatccatgagactacatacaact	tactcagccttgcaatccaca	23	26

^aPCR cycles used for *OsMADS50* KO plants and WT segregants.^bPCR cycles used for *ubi:OsMADS50* plants and WT controls.

【0077】

つまり、*OsMADS50* KO突然変異株でRT-PCRを行った結果、*OsMADS1*、*OsMADS14*、*OsMADS15*、*OsMADS18*、*Hd3a*の発現が野生型（WT）と比較した時に顕著に低くなることが観察された反面、*Hd1*または*OsGI*の発現には差がなく、*OsMADS50*過多発現体では*OsMADS14*、*OsMADS18*の発現は増加したが、*OsMADS1*、*OsMADS15*、*Hd3a*、*Hd1*、*OsGI*の発現には特別な差がなかった。このような結果を総合してみる時、*OsMADS50*は*OsMADS14*や*OsMADS15*のような開花調節因子の上位でこれらの発現を調節するが、*Hd1*または*OsGI*とは独立的にまたは下位で機能すると推定される。

【0078】

（実験例3：光条件に応じた*OsMADS50* KO個体での開花時期分析）

光条件を変化させながら、実施例1で得られたT-DNAが挿入されたT1から分離された独立した2つのT2 *OsMADS50* KOライン（それぞれ50 KO23及び50 KO24と言う）と野生型個体（対照群）の開花時期を観察した。光条件は短日条件（SD:10h L/14h D）と長日条件（LD:14h L/10h D）にした。このような観察結果を図8に示した。図8に示されているように、短日条件下では対照群と*OsMADS50* KO個体の開花時期が大きな差を見せなかった。しかし、長日条件下で対照群は78日頃に開花したが、*OsMADS50* KO個体は140日が過ぎても開花しなかった。つまり、開花時期調節因子*OsMADS50*は長日条件下で作用する調節因子であることが分かった。

【0079】

（実験例4：*OsMADS50* KO個体での開花時期調節因子の発現パターン分析）

植えた後、60日目に実施例1で得られた*OsMADS50* KO個体と野生型個体（対照群）の葉身をサンプリングした。前記のサンプルにおける*OsMADS50*以外の他の開花時期調節因子、*OsMADS14*、*OsMADS18*、*Hd3a*、*Hd1*及び*OsGI*の発現を分析して図9に示した。図9に示されているように、長日条件下で*OsMADS50* KO個体の*OsMADS14*、*OsMADS18*及び*Hd3a*の機能が阻害された反面、*Hd1*と*OsGI*の発現は大きな差がなかった。したがって、*OsMADS50*は*OsMADS14*、*OsMADS18*及び*Hd3a*のような他の開花時期調節因子の上流に位置するということが分かった。

【0080】

（実施例5：*OsMADS51*、*OsMADS56*、*OsTRX1*及び*OsVIN2*遺伝子の分離）

10

20

30

40

50

実施例 1 に記載されたような原理で製作した T-DNA を標識とした個体の中で O s M A D S 5 1、O s M A D S 5 6、O s T R X 1 及び O s V I N 2 遺伝子に T-DNA が挿入されたラインをそれぞれ分離した。

【0081】

まず、O s M A D S 5 1 遺伝子を序列分離同定して S E Q I D N O : 2 に示した。前記 O s M A D S 5 1 遺伝子は従来 N C B I データベースに A B 0 0 3 3 2 7 という番号でそれぞれ登録されているもので、器官別発現様相のみ報告され、その機能については知られていない (Shinozuka et al., 1999)。これに本発明者らは P C R を通じて前記遺伝子を分離して機能を明らかにした。

また、O s M A D S 5 6 遺伝子の序列を分離及び同定して S E Q I D N O : 3 に示した。前記遺伝子は本発明者らが P C R 方法を通じて分離して N C B I データベースに A Y 3 4 5 2 2 4 という登録番号で登録した。

追加的に、O s T R X 1 と O s V I N 2 遺伝子の塩基配列を S E Q I D N O : 4 と S E Q I D N O : 5 に示した。

【0082】

(実験例 5 : O s M A D S 5 1、O s M A D S 5 1、O s M A D S 5 6、O s T R X 1 及び O s V I N 2 遺伝子過発現形質転換体及び機能喪失形質転換体の開花時期分析)

前記実施例 5 から分離された遺伝子の開花時期に対する機能的役割をさらに調査するために、O s M A D S 5 1 遺伝子と O s M A D S 5 6 遺伝子のセンス構造体を過発現する遺伝子導入稲植物を本実験室で製作した p G A 1 6 1 1 ベクター (A Y 3 7 3 3 3 8) を使用して製作し、玉蜀黍ユビキチン (u b i) プロモーターを使用して構成性発現を誘導した (図 5 A 参照)。その結果、O s M A D S 5 1 過発現形質転換体は自然条件で 1 乃至 2 週程度開花時期が速くなった反面、O s M A D S 5 6 過発現形質転換体は自然条件で開花時期が 1 乃至 2 週程度遅れた (図 1 2 参照)。

【0083】

光条件を短日条件 (S D : 1 0 h L / 1 4 h D) と長日条件 (L D : 1 4 h L / 1 0 h D) にして実験した場合、興味深く O s M A D S 5 1 K O 植物体は短日条件でのみ開花時期が 1 ヶ月程度遅れ (図 1 1 参照)、O s M A D S 5 6 過発現体は長日条件でのみ開花時期が遅れた (図 1 2 参照)。O s M A D S 5 6 の場合、2 つの独立的な形質転換個体 (それぞれ 8 番と 1 0 番に命名) について実験を行った。また、自然条件で O s M A D S 5 1 K O 植物体は老化が遅延する表現型が観察された。

一方、O s T R X 1 と O s V I N 2 を前記の O s M A D S 5 0 K O 個体製法と同様な方法でノックアウトさせて O s T R X 1 K O 個体と O s V I N 2 K O 個体を得た。O s T R X 1 K O 個体は自然条件で開花時期が 1 ヶ月以上遅れ (図 1 0 参照)、O s V I N 2 K O 個体は長日条件では 3 2 日程度、短日条件では 1 0 日程度開花時期が遅延された (図 1 3 参照)。

【0084】

(実施例 6 : O s C O L 4 遺伝子の分離)

稲の開花時期を調節する遺伝子を探すためにアクティベーションタギングベクター (p G A 2 7 1 5 ; J o e n g et al, Plant Physiology, December 2002, Vol. 130, pp. 1636-1644) が挿入された突然変異稲集団で開花時期が変わる個体を選別した。そのうち 1 B-00735 と命名されたラインはワイルドタイプに比べて開花時期が 1 5 日以上遅れる表現型を示した (図 1 4 参照)。前記突然変異体の遺伝型を分析した結果、T-DNA が O s C O L 4 遺伝子のプロモーター領域に挿入され、T-DNA 内の 3 5 S エンハンサーによって O s C O L 4 遺伝子が過発現されることが分かった (図 1 5 及び 1 6 参照)。前記 O s C O L 4 遺伝子内の T-DNA の挿入位置と T-DNA 内部の 3 5 S エンハンサーの作用は図 1 5 に示す通りである。このような結果に基づいて、開花調節因子として前記 O s C O L 4 遺伝子を分離して塩基配列を S E Q I D N O : 6 に示した。

【0085】

(実験例 6 : O s C O L 4 遺伝子の過発現及び機能喪失形質転換体の開花時期分析)

前記のように、T-DNA が O s C O L 4 遺伝子のプロモーター領域に挿入され、T-DNA 内の 35S エンハンサーによって O s C O L 4 遺伝子が過剰発現された形質転換体で開花遅延表現型が現れた。また、このような O s C O L 4 遺伝子の過剰発現 (アクティベーションタギング) による開花遅延は O s C O L 4 遺伝子がストロングプロモーターである p U b i と作動可能に連結されて過剰発現する形質転換植物体で 2 週程度開花が遅れることを観察して再確認することができた (図 17 参照)。図 17 で、A c t 1 は対照群として使用された稲のアクチン遺伝子を示す。

これに反し、O s C O L 4 遺伝子が機能を喪失した時には開花が 2 週程度促進される表現型を観察した (図 18 参照)。前記のような O s C O L 4 遺伝子の機能喪失突然変異は T-DNA が O s C O L 4 遺伝子の第 1 エクソンに挿入された個体 (図 18 の O s C O L 4-1) と 3' UTR に挿入された個体 (図 18 の O s C O L 4-2) で全て確認された。

一方、日長に応じる開花時期を調査した時、O s C O L 4 遺伝子のアクティベーションタギング個体は長日、短日に関係なく野生型に比べて開花時期が遅れた反面、機能喪失突然変異個体は長日、短日に関係なく開花時期が速くなった (図 19 参照)。図 19 で、‘O s C O L 4-D’ は O s C O L 4 のアクティベーションタギング突然変異体を意味する。

【0086】

(実施例 7 : O s C O L 8 遺伝子の分離)

O s C O L 8 遺伝子は稲に存在する C O N S T A N S 類似遺伝子のうちの 1 つであり、小麦で春化处理による開花時期を調節する V R N 2 遺伝子と類似なもので、本発明の T-DNA 挿入個体分析によって前記 T-DNA が挿入されることによって開花時期が変化する遺伝子のうちの 1 つに分離され、その序列を S E Q I D N O : 7 に示した。

【0087】

(実験例 7 : O s C O L 8 遺伝子の機能喪失形質転換体の開花時期分析)

O s C O L 8 遺伝子による開花時期調節を知るために、O s C O L 8 の第 1 エクソンに T-DNA が挿入された突然変異体を分析した結果、長日条件では開花時期が野生型と類似な反面、短日条件では開花が遅れることを確認した (図 20 参照)。したがって、O s C O L 8 は短日条件で開花を促進する遺伝子として機能をする予測される。

【0088】

(実施例 8 : O s M A D S 14 遺伝子の分離)

アラビドプシスの花器官形成と開花時期調節に関与する A P E T A L A 1 (A P 1) 遺伝子の類似遺伝子が稲に 4 種存在すると知られ、それぞれ O s M A D S 14、O s M A D S 15、O s M A D S 18 及び O s M A D S 20 と命名されている。この中で O s M A D S 14 遺伝子は O s M A D S 6 という蛋白質と相互結合するパートナーとして最初にクローニングされたが、具体的な機能が明らかになっていない。本実施例では前記 O s M A D S 14 遺伝子に T-DNA などが挿入された場合に開花時期が変化するを観察して開花調節因子として O s M A D S 14 遺伝子を分離し、その塩基配列を S E Q I D N O : 8 に示した。

【0089】

(実験例 8 : O s M A D S 14 遺伝子の機能喪失及び過剰発現形質転換体の開花時期分析)

前記 O s M A D S 14 遺伝子内部に T-DNA または T o s 17 が挿入突然変異を分析した結果、開花時期及び花発達などに特別な変化はなかった (図 21 参照)。前記 O s M A D S 14 遺伝子内部の T-DNA または T o s 17 の挿入位置は図 21 に示す通りである。このような結果は O s M A D S 14 以外の他の遺伝子が過剰に作用することを暗示する。

O s M A D S 14 遺伝子の最後の K ドメイン (K I V) と C ドメインの間にストップコドンを入法的に挿入した遺伝子を p G A 1611 (A Y 373338) ベクターに導入して C ドメインを含む末端部位が除去された O s M A D S 14 部分蛋白質の過剰発現誘導し

10

20

30

40

50

た。このように、Cドメインを含む末端部位が除去されたOsMADS14部分蛋白質を過剰発現させた結果、短日条件では開花時期が1ヶ月程度速くなり、長日条件では開花時期が2週程度遅れたことが観察された。このような結果は3'領域が除去されたOsMADS14の部分遺伝子を過剰発現させることによって短日条件で開花時期を促進させ、長日条件では開花時期を促進する遺伝子と相互作用して開花を抑制する効果が得られることを示す。

【図面の簡単な説明】

【0090】

【図1】OsMADS50にT-DNAが挿入された結果形成された突然変異体(T/T)を対照群(W/W)と共に示したものである。

10

【図2】OsMADS50突然変異体の発生原因、遺伝子型、開花時期を示す図で、(a)OsMADS50の構造と、この遺伝子上にT-DNAが挿入された位置、(b)T-DNA挿入機能損失突然変異体第2世代の表現型と遺伝子型を調べた結果である。

【図3】OsMADS50RNA干渉ベクターに形質転換された植物体を分析した結果を示す図で、(a)OsMADS50RNA干渉ベクターの構造、(b)第1世代(T1)稲個体の開花時期分布、(c)T1稲個体の伸張した節間数の分布を示したものである。

【図4】OsMADS50RNA干渉効果を分析した図で、(a)内在的に発現するOsMADS50と外部から導入されたRNA干渉用遺伝子の発現様相に対するRNAゲルブロット(RNA gel blot)結果、(b)内在的に発現するOsMADS50に対するRT-PCR結果を示したものである。

20

【図5】OsMADS50過剰発現体を分析した結果で、(a)OsMADS50過剰発現ベクターの構造、(b)～(e)第1世代稲個体の表現型、(f)類似花器官でOsMADS3とOsMADS4の発現を示したものである。

【図6】OsMADS50と他の開花調節因子の発現を分析した結果で、(a)OsMADS50の器官別発現様相、(b)葉発達別開花調節因子の発現様相を示したものである。

【図7】OsMADS50突然変異体と過剰発現体で開花調節因子の発現変化を分析した結果で、(a)OsMADS50突然変異体でRT-PCR結果、(b)(a)から得られた結果、(c)OsMADS50過剰発現体でRT-PCR結果を図式化したものである。

30

【図8】長日及び短日条件下でのOsMADS50 KO(ノックアウト)個体の開花時期を示すグラフである。

【図9】OsMADS50 KO個体での開花時期調節因子の発現パターンを示すものである。

【図10】OsTRX1 KO個体の開花遅延表現型を示す写真である。

【図11】OsMADS51 KO個体の開花遅延を示すグラフである。

【図12】OsMADS56過剰発現個体の開花遅延を示すグラフである。

【図13】OsVIN2 KO個体の開花遅延を示すグラフである。

【図14】OsCOL4過剰発現個体の開花遅延表現型を示す写真である。

【図15】OsCOL4プロモーター領域に35Sエンハンサーを有するT-DNAが挿入されたことを示す模式図である。

40

【図16】OsCOL4遺伝子の過剰発現の姿を示す電気泳動写真である。

【図17】OsCOL4遺伝子の過剰発現形質転換体の開花が遅延された様相を示す写真である。

【図18】OsCOL4遺伝子の機能喪失形質転換体の開花が促進された様相を示す写真である。

【図19】OsCOL4遺伝子の機能喪失形質転換体の短日、長日及び自然条件下での開花促進様相を示すグラフである。

【図20】OsCOL8遺伝子の機能喪失形質転換体の短日条件及び長日条件下での開花時期変化を示すグラフである。

50

【図 2 1】 T-DNA が挿入された O s M A D S 1 4 遺伝子の様相とその発現様相を示す写真である。

【図 2 2】 O s M A D S 5 0 遺伝子の c D N A 塩基配列 (S E Q I D N O : 1) を示すものである。

【図 2 3】 O s M A D S 5 1 遺伝子の c D N A 塩基配列 (S E Q I D N O : 3) を示すものである。

【図 2 4】 O s M A D S 5 6 遺伝子の c D N A 塩基配列 (S E Q I D N O : 5) を示すものである。

【図 2 5】 O s T R X 1 遺伝子の c D N A 塩基配列 (S E Q I D N O : 7) を示すものである。

【図 2 6】 O s V I N 2 遺伝子の c D N A 塩基配列 (S E Q I D N O : 9) を示すものである。

【図 2 7】 O s C O L 4 遺伝子の c D N A 塩基配列 (S E Q I D N O : 1 1) を示すものである。

【図 2 8】 O s C O L 8 遺伝子の c D N A 塩基配列 (S E Q I D N O : 1 3) を示すものである。

【図 2 9 A】 O s M A D S 1 4 遺伝子のゲノム塩基配列 (S E Q I D N O : 1 5) を示すものである。

【図 2 9 B】 O s M A D S 1 4 遺伝子のゲノム塩基配列 (S E Q I D N O : 1 5) を示すものである。

【図 2 9 C】 O s M A D S 1 4 遺伝子のゲノム塩基配列 (S E Q I D N O : 1 5) を示すものである。

【図 2 9 D】 O s M A D S 1 4 遺伝子のゲノム塩基配列 (S E Q I D N O : 1 5) を示すものである。

【図 2 9 E】 O s M A D S 1 4 遺伝子のゲノム塩基配列 (S E Q I D N O : 1 5) を示すものである。

【図 2 9 F】 O s M A D S 1 4 遺伝子のゲノム塩基配列 (S E Q I D N O : 1 5) を示すものである。

【図 3 0 A】 O s M A D S 1 4 遺伝子の c D N A 塩基配列 (S E Q I D N O : 1 6) を示すものである。

【図 3 0 B】 O s M A D S 1 4 遺伝子の c D N A 塩基配列の中で C ドメインコーディング序列を含む 3 ' 末端部位が除去された切頭 O s M A D S 1 4 遺伝子の塩基配列 (S E Q I D N O : 1 7) を示すものである。

10

20

30

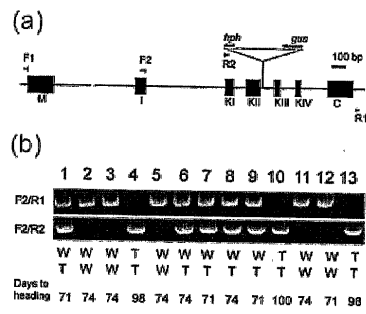
【 図 1 】

FIG. 1



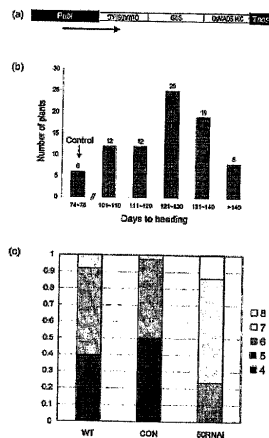
【 図 2 】

FIG. 2



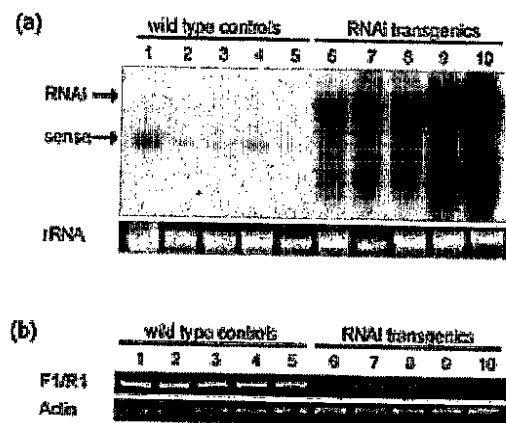
【 図 3 】

FIG. 3



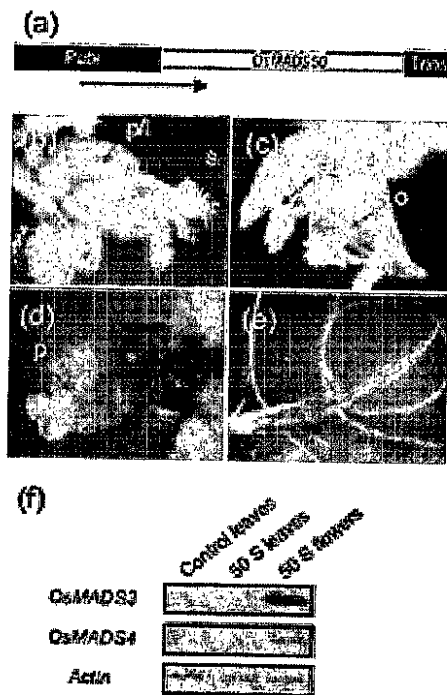
【 図 4 】

FIG. 4



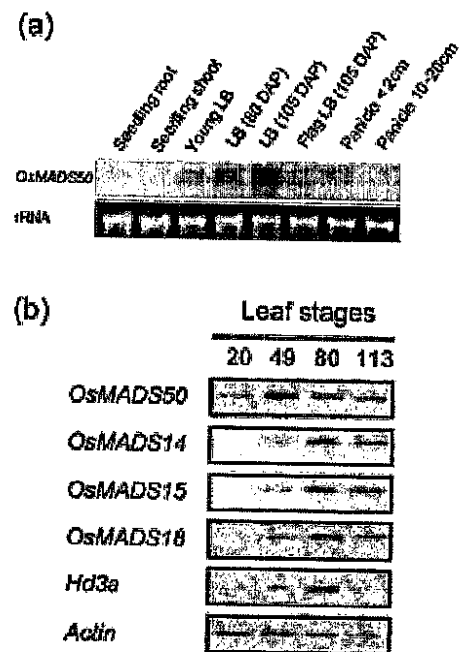
【 図 5 】

FIG. 5



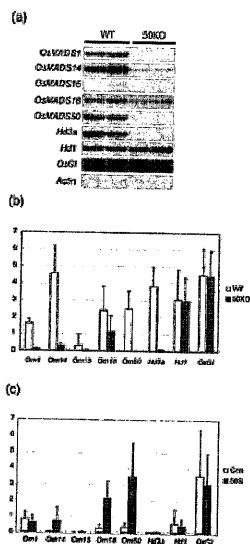
【 図 6 】

FIG. 6



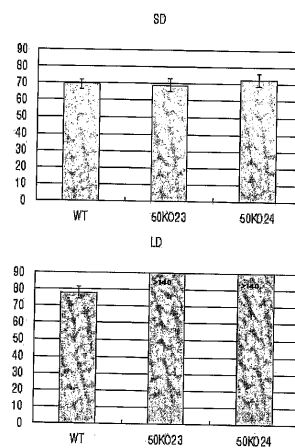
【 図 7 】

FIG. 7



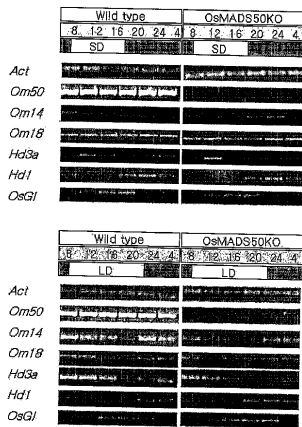
【 図 8 】

FIG. 8



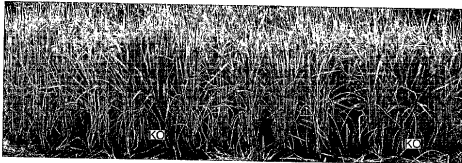
【図 9】

FIG. 9



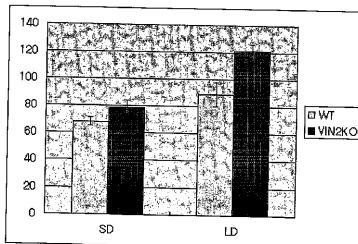
【図 10】

FIG. 10



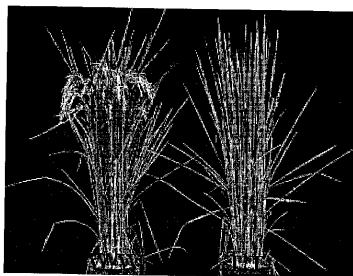
【図 13】

FIG. 13



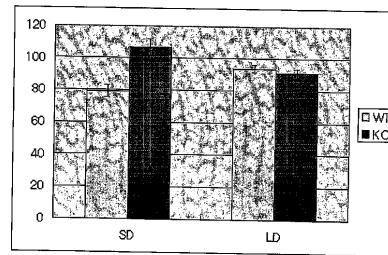
【図 14】

FIG. 14

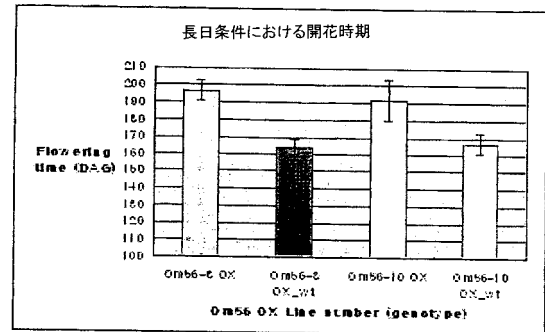


【図 11】

FIG. 11

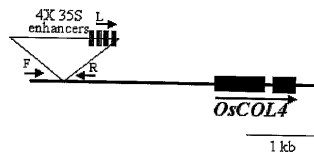


【図 12】



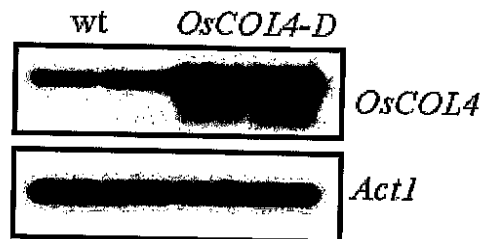
【図 15】

FIG. 15



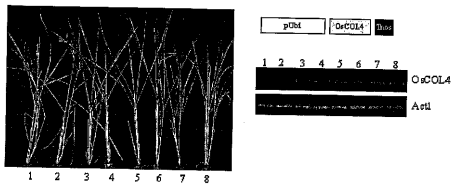
【図 16】

FIG. 16



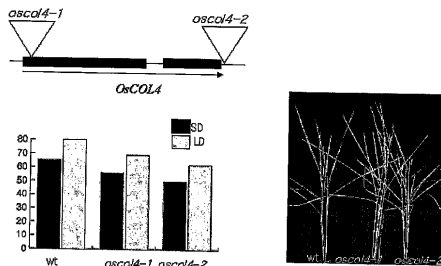
【図 17】

FIG. 17



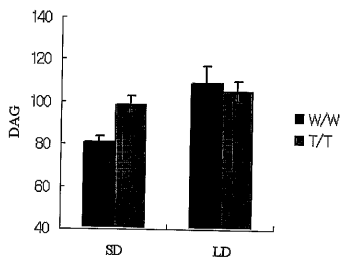
【図 18】

FIG. 18



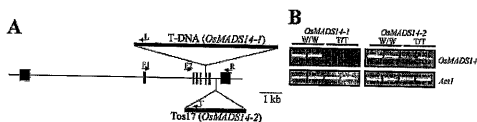
【図 20】

FIG. 20



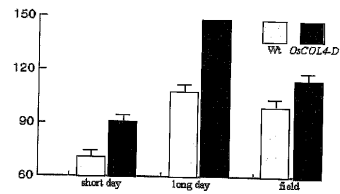
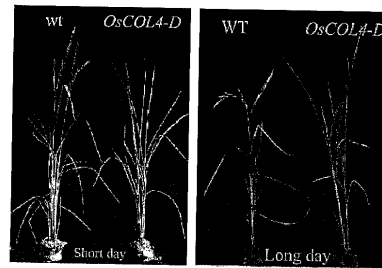
【图 2 1】

FIG. 21



【 図 1 9 】

FIG. 19



【図 2 2】

FIG. 22

cDNA sequence of OsMADS50 cDNA

1 gttgttcatt cgcgcatacga gtagtgcgtg gggagaaagc cagctgaagc
51 ggtatgagaa cccacagcgc cgcagatcga cttcttcacg agtcgcgaac
101 ggctctctca agaaactcct gacgtctctc gctctctca agtcgcgaag
151 cgcgtctctc ttgttccttc cgcgcgcgca gctctctca ttgcgcagat
201 ccagtcgaca gaataactat gacgtctctc gacgtctctc aagaagaata
251 cgtccacaca agcagctcga cgcagattata gacgactata agctctgacg
301 tgatgtgtg ccaagaagca taagtctctc tgaactac; taagaataa
351 tctcgtgttg aaggtgtgtg taagtctctc ttgaagactc gatactctc
401 gaattcagca ttgaagactc cacttttagc attcgaggga ggaagacaga
451 cgtctctgag cagacgtgtg ccaactcgcg agagagagag ttatgactct
501 gacagacaaa ttgaagtata cgcgaaatg taagtactca gcttccttt
551 tctctctct tgaactctg gtcgcgaagc gataagcagc accctgaatt
601 caacacacac aagacagata tgaatctga aactcgtctc ttatcagggc
651 tctcgtcagc cttaagcttc acgcgcgttc ctatcagata tatcagaagc
701 atgcacctt ctatgacttc agcagacaca taatgactgc ctct

【图 2 3】

FIG. 23

[illegible]

[illegible][illegible]

[illegible][illegible]

[illegible][illegible][illegible]

2008525013000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/KR 2005/004461

Continuation of first sheet

Continuation No. I:

Nucleotide and/or amino acid sequence(s)

(Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material: a sequence listing

b. format of material: in computer readable form

c. time of filing/furnishing: filed together with the international application in computer readable form

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR 2005/004461

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC⁸: **C12N 15/82** (2006.01)

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)

IPC⁸: C12N

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

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

EPODOC, WPI, MEDLINE, BLAST

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Lee S. et al (2004). Functional analyses of the flowering time gene OsMADS50, the putative SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1 AGAMOUS-LIKE 20 (SOC1/AGL20) ortholog in rice. The Plant Journal, 38, 754-64. <i>entire document.</i>	1-9, 11-16, 18-20, 23-30, 33-36
X	Lee S. et al (2003). Systematic reverse genetic screening of T-DNA tagged genes in rice for functional genomic analyses: MADS-box genes as a test case. Plant Cell Physiology, 44(12), 1403-11. <i>entire document.</i>	1, 3, 5, 7, 8, 11, 15, 21, 22, 24, 25, 31, 32, 34, 35

☒ 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
21 April 2006 (21.04.2006)Date of mailing of the international search report
26 April 2006 (26.04.2006)Name and mailing address of the ISA/ AT
Austrian Patent Office
Dresdner Straße 87, A-1200 Vienna

Facsimile No. +43 / 1 / 534 24 / 535

Authorized officer

ETZ H.

Telephone No. +43 / 1 / 534 24 / 215

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR 2005/004461

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Moon YH. et al (1999). Determination of the motif responsible for interaction between rice APETALA1/AGAMOUS-LIKE9 family proteins using a yeast two-hybrid system. Plant Physiology, 120(4), 1193-1204. <i>entire document</i>	1, 4, 5, 7, 8, 12, 15, 23-25, 33-35
A	Kang HG. et al (1997). Characterization of two rice MADS box genes that control flowering time. Molecular Cells, 7(4), 559-66. <i>entire document.</i>	1-36

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family membersInternational application No.
PCT/KR 2005/004461

Patent document cited in search report			Publication date	Patent family member(s)	Publication date
KA	A	NGHGETAL		none	
LE	A	ESSETAL		none	
MO	A	ONYHETAL		none	

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 アン, ギャンヒュン

大韓民国, キュンサンブクード 790-751, ポハンーシティ, ナムーク, ジゴクードン 756, ファクルティ アパートメント #9-1803

(72)発明者 リー, シンヤン

大韓民国, クワンジュ 506-300, クワンサンーク, ウォルグードン, ホバン アパートメント 108-308

(72)発明者 ジェオン, ドンーホーン

大韓民国, キュンサンブクード 790-390, ポハンーシティ, ナムーク, ジゴクードン 756, ナクウォン アパートメント 3-402

(72)発明者 ヨー, ジヒュー

大韓民国, ソウル 152-092, ジュログ, ガエボン 2ードン, ヒュンダイ ホームタウン 207-2502

(72)発明者 リュー, チューンーホワン

大韓民国, キュンサンブクード 790-751, ポハンーシティ, ナムーク, ジゴクードン 756, ドーミトリ 3-202

(72)発明者 ジェオン, ジョンーセオン

大韓民国, ギェオンギード 431-070, アニヤンーシ, ドンガンーグ, ピェオンチ ョンードン, インゾクォン, ダエオー アパートメント 115-1004

(72)発明者 キム, スンーリユル

大韓民国, キュンサンブクード 790-751, ポハンーシティ, ナムーク, ジゴクードン 756, ドーミトリ 1-103

(72)発明者 キム, ヤンーオク

大韓民国, キュンサンブクード 790-829, ポハンーシティ, ナムーク, ソンドードン, 425-1, 14/3

(72)発明者 キム, ジョオニユル

大韓民国, カングォンード 252-820, インジェークン, ブクミェオン, ウォント ーリ, スンド アパートメント ガードン 301

(72)発明者 アン, スヨン

大韓民国, キュンサンブクード 740-976, ギチェオンーシ, ブゴクードン, 415-10

(72)発明者 ハン, ジョンージン

大韓民国, キュンサンブクード 790-784, ポハンーシティ, ポハン ユニバーシテ ィ オブ サイエンス, ディヴィジョン オブ モレキュラー アンド ライフ サイエンス, ナショナル リサーチ ラボラトリー オブ プラント ファンクショナル ジェノミックス

(72)発明者 ハン, ミンージュン

大韓民国, キュンサンブクード 790-784, ポハンーシティ, ポハン ユニバーシテ ィ オブ サイエンス, ディヴィジョン オブ モレキュラー アンド ライフ サイエンス, ナショナル リサーチ ラボラトリー オブ プラント ファンクショナル ジェノミックス

Fターム(参考) 2B030 AA02 AD20 CA17

4B024 AA07 CA02 DA01 FA02

4B065 AA88X AA89Y AB01 BA02 CA53

4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 CA31 EA05 FA74