(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
2001年2月1日 (01.02.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/07618 A1

(51) 国際特許分類[7]: C12N 15/29, 1/21, C07K 14/415, C12P 21/02, C12N 5/10, A01H 5/00 // (C12N 15/29, C12R 1:91) (C12N 1/21, C12R 1:01) (C12P 21/02, C12R 1:01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/04904

(22) 国際出願日: 2000年7月21日 (21.07.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願平11/207995 1999年7月22日 (22.07.1999) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): サントリー株式会社 (SUNTORY LIMITED) [JP/JP]; 〒530-8203 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号 Osaka (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 柿本辰男 (KAKIMOTO, Tatsuo) [JP/JP]; 〒560-0005 大阪府豊中市西緑丘2-2-2-223 Osaka (JP).

(74) 代理人: 石田 敬, 外 (ISHIDA, Takashi et al.); 〒105-8423 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AU, CA, NZ, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

２文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: HOMEOBOX GENES ENCODING PROTEINS PARTICIPATING IN DIFFERENTIATION

(54) 発明の名称: 分化に関わる蛋白質をコードするホメオボックス遺伝子

(57) Abstract: Genes which encode novel proteins participating in differentiation and having a homeodomain-like sequence. For example, a gene originating in *Arabidopsis thaliana* and encoding a protein which has the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:2 or 4 and has a homeodomain-like sequence. This gene is not only usable in producing the above-described protein but can be transferred into plants thereby regulating the regeneration, differentiation, growth, etc. of the plants.

(57) 要約:

分化に関わり、ホメオドメイン様配列を持つ新規な蛋白質をコードする遺伝子が提供される。例えばシロイヌナズナ（Arabidpsis thaliana）に由来し、配列番号：２又は４に示すようなアミノ酸配列を有する分化に関わり、ホメオドメイン様配列を持つ蛋白質をコードする遺伝子が提供される。この遺伝子は、前記蛋白質の製造のために利用できるほか、植物に導入することにより、植物の再生、分化、成長等の制御のために利用できる。

WO 01/07618 A1

明　細　書

分化に関わる蛋白質をコードするホメオボックス遺伝子

発明の分野

本発明は分化に関わり、ホメオドメイン様配列を持つ蛋白質をコードする遺伝子に関する。具体的には、本発明は不定芽・分枝誘導能を有し、ホメオドメイン様配列を持つ蛋白質をコードする遺伝子ならびにその利用方法に関するものである。

背景技術

植物は一般に分化全能性を持ち、例えば体細胞に由来する未分化組織から不定芽、あるいは不定胚の再生を経て植物個体を再生することができる。この能力は苗条培養における苗の生産等に利用されている。また、植物の体細胞組織や培養細胞に遺伝子を導入した後、不定芽や不定胚の再生を経て形質転換植物を再生することは、近年、植物バイオテクノロジー分野においては不可欠の重要な技術である。一般に未分化細胞塊であるカルスや、葉・茎等の植物組織からの不定根や不定芽の再生は植物ホルモンであるオーキシンやサイトカイニンの相互作用によって制御されると言われている。

また、植物の形態形成については、植物ホルモン以外に、ホメオボックスを含む一連の遺伝子群が関わっていることが報告されている。ホメオボックスはショウジョウバエの発生を制御するいくつかの遺伝子に共通して存在する、よく保存された183 塩基対のDNA 配列として見出された。この領域から翻訳される61アミノ酸配列はホメオドメインと呼ばれ、3 つのαヘリックスからなるヘリックス－ターン－ヘリックス構造をとり、特異的な塩基配列を認識してDNA

に結合する。

動物のホメオボックス遺伝子は発生過程を調節する転写因子であることが明らかにされてきたが、高等植物のホメオボックス遺伝子は1991年、トウモロコシのKNOTTED1（KN1）遺伝子として単離されたのが最初である（Vollbrecht et al.、Nature 350：241－243、1991）。トウモロコシの葉の葉脈は平行脈であるがKnotted1変異株は葉脈が乱れ、葉脈に沿って結び目（knot）のような突起を作ることからKnotted という名前がつけられた。

一方、多くの動物で見つかっていたホメオボックス内の特に保存性の高いアミノ酸配列に対応する合成DNA を用いて、双子葉植物のシロイヌナズナのゲノムDNA が検索され、いくつかのホメオボックス遺伝子が報告された（Ruberti et al.、EMBO J. 10: 1787-1791、1991）。

これまでに報告された高等植物のホメオボックス遺伝子は、ホメオドメインのアミノ酸組成の類似性やホメオボックス部分以外の構造から大きく5 つのタイプに分類されてきた（田坂，蛋白質核酸酵素 40 （8 ）:1033-1042、1995）。第1のタイプはトウモロコシのKN1 遺伝子に代表されるタイプ、第2 のタイプはホメオボックスが蛋白質のほぼ中央に位置し、そのC 末端側に隣接して蛋白質の2 量体形成に関与するロイシン残基の規則的な繰り返し構造（ロイシンジッパー）が存在するものである。第3 のタイプは蛋白質のC 末端付近にホメオドメインを有し、さらにN 末端側に金属結合型のフィンガー構造を有する。第4 のタイプは、第3 のタイプと共通の構造に加えて、いくつかのアミノ酸配列の繰り返し構造を含むものである。第5 のタイプはN 末端側にホメオボックスを有するが、それ以外によく知られた特徴的な構造は見出されていない。

それぞれのタイプ間の全体を通したアミノ酸配列の相同性はホメ

オドメイン内で32～58％であるが、動物のホメオドメインを含む蛋白質がDNA に結合する際に、ホメオドメイン中の3 番目のヘリックスがターゲットとなるDNA の2 重らせんの主溝に入り込み転写を調節するという報告からも推測できるように、植物のホメオボックス遺伝子産物でも、タイプを超えて、この3 番目のヘリックスが最も高い相同性を示す。この領域は、ホメオドメイン蛋白質が転写因子としてDNA に結合するために必須といわれている。なお、最近、これら5つのグループに属さないホメオボックス遺伝子WUSCHEL が報告された（Cell, vol.95, p805-815, 1998）。WUSCHEL 遺伝子の機能欠損突然変異体では茎頂分裂組織の正常な発達ができないが、WUSCHEL 遺伝子を過剰発現させた実験報告はなく、WUSCHEL 遺伝子の発現を人為的に上昇させた場合、どのような変化が起こるのかは不明である。

植物のホメオボックス遺伝子については、器官形成や発生過程の調節、また感染防御や植物体内での物質輸送の制御に関与する可能性が示唆されているが、その詳細は明らかになっていない。また、一般にホメオボックスを持つ蛋白質は転写因子として機能すると考えられるが、それぞれのホメオドメイン蛋白質が転写調節を行うターゲット遺伝子も未だ明らかになっていない。さらに、ホメオボックス遺伝子のうち、KN1 タイプのものを過剰発現させると植物体に激しい形態異状が引き起こされるが、カルス上で不定芽を形成するかどうかは不明である。

また、農業への利用という観点から考えれば、組織培養系で、例えばカルス等の培養組織の上に不定芽や分枝を誘導する能力の高い遺伝子が有用であると考えられるが、そのようなものはない。

発明の開示

そこで、分化に関わり、ホメオドメイン様配列を持つ蛋白質、具体的には不定芽・分枝誘導能を有する蛋白質をコードする遺伝子及びそれによりコードされる蛋白質並びにこれらの用途を提供しようとするものである。

本発明者は、シロイヌナズナ（Arabidopsis thaliana）を用いてアクティベーションタギング（activation tagging）を行い、不定芽・分枝誘導能を有する蛋白質をコードする遺伝子を得た。アクティベーションタギングとは、植物ゲノムにランダムにエンハンサー配列を挿入することにより、挿入エンハンサー近くの遺伝子の転写が活性化された突然変異体を分離する方法である。

従って、本発明は、分化に関わり、ホメオドメイン様配列を持つ蛋白質をコードする遺伝子を提供する。詳しくは、不定芽・分枝誘導能を有し、ホメオドメイン様配列を持つ蛋白質をコードする遺伝子を提供する。

より具体的には、本発明は配列番号：2に記載のアミノ酸配列を有し、分化に関わり、ホメオドメイン様配列を持つ蛋白質をコードする遺伝子を提供する。本発明はさらに、配列番号：2のアミノ酸配列において、1～複数個のアミノ酸の付加・欠失及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸を有し且つ分化に関わり、ホメオドメイン様配列を持つ蛋白質をコードする遺伝子を提供する。本発明はさらに、配列番号：1に記載する核酸、特にDNA、又はその部分とハイブリダイズし、且つ分化に関わり、ホメオドメイン様配列を持つ蛋白質をコードする遺伝子を提供する。

本発明はさらに、配列番号：4に記載のアミノ酸配列を有し、分化に関わり、ホメオドメイン様配列を持つ蛋白質をコードする遺伝子を提供する。本発明はさらに、配列番号：4のアミノ酸配列において、1～複数個のアミノ酸の付加・欠失及び／又は他のアミノ酸

による置換により修飾されたアミノ酸を有し且つ分化に関わり、ホメオドメイン様配列を持つ蛋白質をコードする遺伝子を提供する。本発明はさらに、配列番号：３に記載する核酸、特にDNA 、又はその部分とハイブリダイズし、且つ分化に関わり、ホメオドメイン様配列を持つ蛋白質をコードする遺伝子を提供する。

なお、分化に関わり、ホメオドメイン様配列を持つ蛋白質とは、細胞が形態的・機能的に違いを持った細胞、例えば不定芽、枝、葉、花などに分化する過程に関わり、DNA 結合ドメインとして機能するホメオドメインに類似の配列を持つ蛋白質であり、具体的には、不定芽の形成を誘導する蛋白質、分枝を誘導する蛋白質等を示す。

本発明はまた、上記遺伝子を含んでなるベクターを提供する。

本発明はさらに、上記ベクターにより形質転換された宿主を提供する。この宿主は植物細胞であっても、植物体であってもよい。

本発明はまた、上記宿主を培養、栽培することによる、分化に関わり、ホメオドメイン様配列を持つ蛋白質の製造方法を提供する。

本発明はまた、上記遺伝子を植物又は植物細胞に導入し、該遺伝子を発現せしめることによる植物又は植物細胞の分化を誘導する方法を提供する。

本発明はまた、上記遺伝子を植物又は植物細胞に導入し、該遺伝子を発現せしめることによる植物又は植物細胞の不定芽形成を誘導する方法を提供する。

本発明はまた、上記遺伝子を植物に導入し、該遺伝子を発現せしめることにより植物の分枝形成を誘導する方法を提供する。

発明の実施の形態

発明者は、アクティベーションタギングによって過剰発現した時に、カルスの上に不定芽形成を誘導するような分化に関わる遺伝子

を同定できるのではないかと考えた。そこで、アクティベーションタギング用ベクターpPCVICEn4HPTをアグロバクテリウムを介して導入したシロイヌナズナ形質転換体カルスをサイトカイニンを含まない培地上でスクリーニングし、通常は、サイトカイニン非存在下では不定芽が形成されないが、サイトカイニン非存在下でも不定芽を形成した突然変異体を分離した。このうち、many shoot（msh）と名付けた変異体は、サイトカイニン非存在下において不定芽を形成した。

msh 変異体の表現型の原因となっているMSH 遺伝子とそれに対応するMSH cDNAを単離し解析した結果、MSH 遺伝子にコードされる蛋白質はホメオドメインと有意な相同性を示すアミノ酸配列を有し、中でも、一連のホメオドメイン蛋白質で保存されているホメオドメインの第3 番目のαヘリックス部分の相同性が高かった。また、MSH cDNAのコード領域をシロイヌナズナカルスに導入し過剰発現させたところ、msh 変異体の表現型からも推測されるように、形質転換されたカルスは培地中のサイトカイニンの有無に関わらず不定芽を形成した。さらに、MSH cDNAを過剰発現させたシロイヌナズナ形質転換体では、野性型シロイヌナズナと比べて分枝が多くなる場合が多く、葉の上に不定芽が形成されることもあった。

以上のことから、MSH 遺伝子は分化に関わり、ホメオボックス様配列を持つ蛋白質をコードすることが明らかになり、これを過剰発現させることによって不定芽・分枝形成能が向上することが期待できる。

本発明の遺伝子としては、例えば配列番号：２又は４に記載のアミノ酸配列をコードするものが挙げられる。しかしながら、複数個のアミノ酸の付加、欠失および／または他のアミノ酸との置換によって修飾されたアミノ酸配列を有する蛋白質ももとの蛋白質と同様

の作用を維持することが知られている。従って本発明は、配列番号：2又は4に記載のアミノ酸配列に対して1個または複数個のアミノ酸の付加、欠失および／または他のアミノ酸との置換により修飾されたアミノ酸配列を有する蛋白質および当該蛋白質をコードする遺伝子も本発明に属する。

ここで、この修飾の程度は、本件出願の前に周知技術となっている手段、例えば部位特定変異誘発、PCR 法等により可能な程度である。不定芽・分枝誘導活性を維持しながら修飾の対象となるアミノ酸の数は、例えば50個以下、好ましくは25個以下、例えば10個以下である。

本発明はまた、配列番号：1又は3に記載の塩基配列を有する核酸、例えばDNA 、又はその部分と、ストリンジエント条件下でハイブリダイズすることができ、且つ分化に関わり、ホメオドメイン様配列を持つ蛋白質をコードする遺伝子を提供する。ここでストリンジエント条件とは、例えば5 xSSC、50℃の条件下でハイブリダイズする条件をいう。なお適切なハイブリダイゼーションの温度は塩基配列やその塩基配列の長さによって異なるため、適宜選択して行うことができる。

また、上記の核酸の部分とは、少なくとも数個の連続するアミノ酸配列をコードする部分であり、好ましくはホメオドメイン内の連続する数個のアミノ酸配列をコードする部分である。より好ましくは、配列番号：1又は3に記載の配列のうち、ホメオドメインの配列の一部又は全部を含み、かつ配列番号：1又は3に記載の全コード配列に対して、25％以上、例えば50％以上、さらに好ましくは75％以上の長さを有する部分又は断片を意味する。

上記ハイブリダイゼーションの対象としての遺伝子源としては、植物、微生物などから調製されるcDNAライブラリー、ゲノムDNA ラ

イブラリー等を使用することができ、植物として例えばシロイヌナズナ、ペチュニア、キンギョソウ、イネ、トウモロコシ、タバコ、ポプラ等が挙げられる。

このようにして得られる、分化に関わり、ホメオドメイン様配列を持つ蛋白質をコードする遺伝子の塩基配列は、配列番号：1又は3に示す塩基配列に対して、50%以上、60%以上、好ましくは70%以上又は80%以上、例えば90%以上の相同性を有する。

配列番号：2又は4に示すアミノ酸配列を有する蛋白質をコードする本発明の遺伝子は、cDNAまたはゲノムDNA として、シロイヌナズナから得ることができる。

生来の塩基配列を有する遺伝子は実施例に具体的に示すように、例えばcDNAライブラリーのスクリーニングによって得られる。また、修飾されたアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNA は生来の塩基配列を有するDNA を基礎として、常用の部位特定変異誘発やPCR 法を用いて合成することができる。例えば修飾を導入したいDNA 断片を生来のcDNAまたはゲノムDNA の制限酵素処理によって得、これを鋳型にして、所望の変異を導入したプライマーを用いて部位特異的変異誘発またはPCR 法を実施し、所望の修飾を導入したDNA 断片を得る。その後、この変異を導入したDNA 断片を目的とする蛋白質の他の部分をコードするDNA 断片と連結すればよい。

あるいはまた、短縮されたアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするDNA を得るには、例えば目的とするアミノ酸配列より長いアミノ酸配列、例えば全長アミノ酸配列をコードするDNA を所望の制限酵素により切断し、その結果得られたDNA 断片が目的とするアミノ酸配列の全体をコードしていない場合は、不足部分の配列からなるDNA 断片を合成し、連結すればよい。

得られた遺伝子を大腸菌および酵母での遺伝子発現系を用いて発

現させることにより、遺伝子産物であるMSH 蛋白質を得ることができる。あるいはまた、配列番号：２又は４のいずれかに記載のアミノ酸配列がコードする蛋白質に対する抗体を用いても、MSH の蛋白質を得ることができ、抗体を用いて他の生物からMSH と同様の機能を有する蛋白質の遺伝子をクローン化することもできる。

従って本発明はまた、前述の遺伝子を含む組換えベクター、特に発現ベクター、及び当該ベクターによって形質転換された宿主に関するものである。宿主としては、原核生物または真核生物を用いることができる。原核生物としては細菌、例えばエシェリヒア（Escherichia)属に属する細菌、例えば大腸菌（Escherichia coli）、バシルス（Bacillus）属微生物、例えばバシルス．スブシルス（Bacillus subtilis)など常用の宿主を用いることができる。

真核性宿主としては、下等真核生物、例えば真核性微生物、例えば真菌である酵母または糸状菌が使用できる。酵母としては例えばサッカロミセス（Saccharomyces)属微生物、例えばサッカロミセス．セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）等が挙げられ、また糸状菌としてはアスペルギルス（Aspergillus)属微生物、例えばアスペルギルス．オリゼ（Aspergillus oryzae）、アスペルギルス．ニガー（Aspergillus niger)、ペニシリウム（Penicillium)属微生物が挙げられる。さらに動物細胞または植物細胞が使用でき、動物細胞としては、マウス、ハムスター、サル、ヒト等の細胞系が使用され、具体的にはCOS 細胞、Vero細胞、CHO 細胞、Ｌ細胞、C127細胞、BALB／c3T3細胞、Sp－2/0 細胞等を用いることもできる。植物細胞としては、タバコの培養細胞、ポプルス属、ユーカリ属、アカシア属の培養細胞等が使用される。

さらに昆虫細胞、例えばカイコ細胞、またはカイコの成虫それ自体も宿主として使用される。具体的には、昆虫細胞、例えばヨガ細

胞（Spodoptera frugiperda）、カイコ細胞（Bombyx mori）等を用いることができる。

発現ベクターとしては、プラスミド、ファージ、ファージミド、ウィルス（バキュロウイルス（昆虫細胞発現系）、ワクシニアウイルス（動物細胞発現系））等が使用できる。

本発明の発現ベクターはそれらを導入すべき宿主の種類に依存して発現制御領域、例えばプロモーターおよびターミネーター、複製起点等を含有する。細菌用発現ベクターのプロモーターとしては、常用のプロモーター、例えばtrc プロモーター、tac プロモーター、lac プロモーター等が使用され、酵母用プロモーターとしては、例えばグリセルアルデヒド３リン酸デヒドロゲナーゼプロモーター、PH05プロモーター、adhIプロモーター、pqk プロモーター等が使用され、糸状菌用プロモーターとしては例えばアミラーゼ、trpC等が使用される。

また、昆虫用プロモーターとしてはバキュロウィルスポリヘドリンプロモーター等、動物細胞としてはSimian Virus 40 のearly およびlateプロモーター、CMV プロモーター、HSV-TKプロモーターまたはSRαプロモーター等が挙げられる。

また、植物用プロモーターとしては、例えばCaMV35S プロモーター、ノパリン合成酵素のプロモーター、誘導型プロモーターとしては、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼII系遺伝子のプロモーター、hsp80 プロモーター、リブロース２リン酸カルボキシラーゼ小サブユニット遺伝子のプロモーター等が挙げられる。また、発現ベクターには、以上の他にエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリＡ付加シグナル、選択マーカー（例えばジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子（メトトレキセート耐性）、neo 遺伝子（Ｇ418 耐性）等）等を含有しているのを用いるのも好ましい一態様である。なお、

エンハンサーを使用する場合、例えばSV40のエンハンサー等を遺伝子の上流または下流に挿入する。

発現ベクターによる宿主の形質転換は、当業者においてよく知られている常法により行うことができ、これらの方法は例えば、Current Protocols In Molecular Biology, John Wiley & Sons 社、1995年、に記載されている。形質転換体の培養も常法に従って行うことができる。培養物からの精製は、蛋白質を単離・精製するための常法に従って、例えば、限外ろ過、各種カラムクロマトグラフィー、例えばセファロースを用いるクロマトグラフィー等により行うことができる。また、GST やポリヒスチジンとの融合タンパク質として宿主中で発現させた場合、適切なアフィニティークロマトグラフィーにより容易に精製できる。

現在の技術水準をもってすれば、さらに、このcDNAあるいはゲノムクローンを構成的なあるいは誘導型のプロモーターの制御下に連結し、アグロバクテリウムを用いるシステムあるいはパーティクルガン、エレクトロポーレーションを用いるシステムで、この遺伝子を植物に導入し発現させることで、植物ホルモンによる人為調節によっても個体再生が困難な植物、例えばバラなどにおいて、不定芽の形成や分枝形成等の分化を促進することが可能である。

さらに、本発明の遺伝子の発現を制御することで、園芸植物の形態を変化させること、例えばスタンダードタイプの植物をスプレータイプに変化させ、その結果として花数や葉数の増加させることができると考えられる。

実施例

以下実施例に従って発明の詳細を述べる。分子生物学的手法は特に断らない限り、Molecular Cloning (Sambrook et al., 1989) に

従った。

実施例１．サイトカイニン応答突然変異体のスクリーニング

分化、例えば不定芽・分枝の形成に関与する遺伝子の転写量を増大させ、サイトカイニン非存在下でもサイトカイニン応答を示す突然変異体を得るため、シロイヌナズナ（Arabidopsis thaliana）を用いてアクテイベーションタギングを行った。

約50,000個のシロイヌナズナのカルスを赤間らの方法（Akama et al., Plant Cell Rep., 12, 7, 1992）に従い、アクテイベーションタギング用ベクターpPCVICEn4HPT（Hayashi et al.、Science, 258, p1350-1353, 1992）を用いて形質転換を行った。なお、pPCVICEn4HPTにはCaMV35S プロモーターに由来する強力なエンハンサー配列が存在するので、植物のゲノムに挿入された後に、このエンハンサー配列に隣接する遺伝子の転写が活性化される。形質転換後、形質転換されたカルスをサイトカイニンを含まない培地上で培養した。

野生型（非形質転換）シロイヌナズナカルスはサイトカイニンを含まない培地上では細胞増殖が抑えられ、不定芽形成を行うことができないが、形質転換カルスの中には、サイトカイニンが存在しないにも関わらず、不定芽を形成するカルスが存在した。その中でも、不定芽形成能が高く多くの不定芽を形成する突然変異体をmsh（many shoot）突然変異体と名付けた。msh 変異体から得られた種子を通常シロイヌナズナ培養用寒天培地に播種したところ、子葉の上にも多くの不定芽が観察された。

実施例２．msh 突然変異体の原因遺伝子MSH の単離

実施例１で得られたmsh 突然変異体からゲノムDNA を抽出した。このゲノムDNA を制限酵素SacIで処理した後、DNA を精製し、T4リガーゼによりDNA 断片の環状化をおこなった。これを大腸菌に導入

し、アンピシリン耐性を獲得した大腸菌よりプラスミドを回収した。このようにして回収されたプラスミドはT-DNA のほとんどの領域とmsh 突然変異体のゲノム内でT-DNA のRight border（RB）に隣接しているゲノム配列を含んでいる。

このRBに隣接するゲノムDNA 5610bpの塩基配列を決定し、得られた塩基配列についてGENSCAN アルゴリズム(http://CCR-081.mit.edu/GENSCAN.html）で遺伝子の存在を予測したところ、RBに最も近い遺伝子はRBから882 番目の塩基から転写が始まることが明らかとなり、本遺伝子をMSH と名付けた。

実施例３． MSH cDNA の単離

msh 突然変異体ならびに野生型シロイヌナズナの植物体全体からRNA を抽出し、oligotex dT30 （日本ロッシュ社）を用いてmRNAを精製した。これを鋳型とし、ラムダZAPII cDNAライブラリー合成キット(Stratagene 社）を用いて、Stratagene社の推奨する方法によりcDNAライブラリーを作製した。これらmsh 突然変異体並びに野生型シロイヌナズナのcDNAライブラリーを実施例２で得られたMSH 遺伝子をプローブとしてスクリーニングした。野性株由来のcDNAライブラリーは、約300,000 クローンをスクリーニングしてもMSH 遺伝子に対応するcDNAは得られず、このことから、野生型シロイヌナズナにおいてMSH 遺伝子の発現は非常に弱い、あるいは特定の細胞でのみ発現していると考えられる。

一方、msh 突然変異体由来のcDNAライブラリー約20,000クローンをスクリーニングしたところ、31個の陽性クローンが得られ、このうち、M6と名付けたクローンをその後の解析に用いた。M6クローンの塩基配列を決定し、その配列を配列表の配列番号：１に示す。また、その塩基配列に対応するアミノ酸配列を配列番号：２に示す。

このコード領域全長の配列はMSH 遺伝子に含まれており、M6はMS

H 遺伝子に対応するcDNAであることが判明した。cDNAの塩基配列を解析した結果、MSH 遺伝子にコードされる蛋白質はホメオドメイン蛋白質と有意な相同性を示し、中でもホメオドメイン蛋白質間で保存されているホメオドメインの第3 番目のαヘリックスに相当する配列が、MSH 遺伝子にコードされる蛋白質においてもよく保存されていることがわかった。また、MSH 遺伝子にコードされるタンパク質のアミノ酸配列は、ホメオドメイン蛋白質の中でもWUSCHEL の配列と最も高い相同性を示した。

ただし、報告されている中でMSH と最も相同性の高いWUSCHEL と比較した場合でも、ホメオドメイン内の同一アミノ酸の割合は42%、タンパク質全体では約20%であり、配列からはWUSCHEL と類似の機能を持つかどうかは判断できない。ホメオドメイン蛋白質の中で、WUSCHEL の次に相同性が高かったのはKN1 タイプの蛋白質であるが、これらをMSH とホメオドメイン内で比較した場合の相同性は、同一アミノ酸の割合が20%以下であった。また、クローニングの過程で、MSH cDNAとホメオドメイン内で86%、全領域で40%の同一性のある配列を有するcDNAクローンも単離され、M8と名付けた。その塩基配列を配列表の配列番号：3に示し、対応するアミノ酸配列を配列番号：4に示す。

実施例4．MSH cDNAの過剰発現による不定芽形成

実施例2で予測されたように、MSH 遺伝子の過剰発現が不定芽の形成を引き起こすのかどうかを解析した。バイナリーベクターpBE2113GUS（Plant Cell Physiology, 37, p49-59, 1996 、NIARより入手）から、制限酵素BamHI ／SacI 処理によってGUS 遺伝子を除き、替わりにMSHM6 cDNAのコード領域をプライマー#170(5’－GAAGATCTCATCATGTCCTCCTCAAAC-3’）（配列番号：5）とプライマー#172（5’－CGGAGCTCTAAATAAGATAATAGATTGCGC-3’）（配列番号：6）を

用いたPCR で増幅し、その後制限酵素BglII/SacIで処理したDNA 断片を組み込んだ。この操作により、バイナリーベクターに挿入されたMSH cDNAはCaMV35S プロモーター由来の人工プロモーターの制御下に置かれている。このプラスミドをpBE2113MSHと名付けた。

pBE2113GUSとpBE2113MSHをアグロバクテリウムを介して野生型シロイヌナズナカルスに導入した。カナマイシン耐性を指標として形質転換細胞を選別した。pBE2113GUSを導入した形質転換体カルスは不定芽形成にサイトカイニンを要求したが、pBE2113MSHで形質転換されたカルスはサイトカイニンの有無に関わらず不定芽を再生することができた。サイトカイニン存在下では、どちらのプラスミドで形質転換したカルスも不定芽を再生したが、pBE2113MSHで形質転換されたカルスは、pBE2113GUSで形質転換されたカルスよりも速やかに不定芽を再生した。また、既に報告されている2成分制御系（two-component system）のセンサー・ヒスチジンキナーゼであるCKI1 cDNA を過剰発現するシロイヌナズナカルスもサイトカイニン非存在下で不定芽を形成できるが、形成される不定芽の数はMSH cDNAを過剰発現しているカルスのほうが多かった。

一方、pBE2113MSHをアグロバクテリウム減圧浸潤法を用いてシロイヌナズナの生殖細胞に導入し（Bechtold et al., C.R.Acad.Sci. Paris, Life Sciences, 316, p1194-1199, 1993 、荒木崇, 植物細胞工学シリーズ4, モデル植物の実験プロトコール, p109-113, 1996）、遺伝子が導入された芽生えをカナマイシン耐性を指標として選択した。このようにして得られた形質転換体シロイヌナズナでは、野性株と比べて分枝が多いことが観察された。

さらに、実施例3 で得られた、MSH cDNAと相同な蛋白質をコードするM8 cDNA にコードされる蛋白質の機能に関しても、M8ｃDNA にコードされる蛋白質とGUS の融合タンパク質をシロイヌナズナ植物

体で過剰発現させることによって解析した。M8 cDNA のコード領域をプライマー#224（5'－GCTCTAGAACAATGGCTTCTTCGAATAGACAC-3'）（配列番号：7）とプライマー#225（5'－TCCCCCGGGCTGATCAGATAGTACGAGGCTCC-3'）（配列番号：8）を用いてPCR によって増幅後、制限酵素XbaI/SmaI 処理によって得られる遺伝子断片を、pBE2113GUS のXbaI/SmaI 認識部位の間に挿入した。

得られたバイナリーベクターpBE2113M8GUSをアグロバクテリウム減圧浸潤法を用いてシロイヌナズナの生殖細胞に導入し、遺伝子が導入された芽生えをカナマイシン耐性を指標として選択した。このようにして得られた形質転換体シロイヌナズナでは、先のMSHM6 cDNAを過剰発現したシロイヌナズナ変異株と同様、分枝が多くなった。

産業上の利用可能性

以上のように、アクテイベーションタギングによってシロイヌナズナから得られた遺伝子MSH は、不定芽形成に関与するホメオボックス遺伝子と考えられ、不定芽形成に関わる遺伝子の転写因子をコードすると推測される。MSH cDNA を35S プロモーターの制御下で過剰発現させた結果から、サイトカイニンの有無に関わらず、MSH が不定芽形成を促進すること、加えて、植物体の分枝にも関与することが示唆された。

このことから、MSH 遺伝子の発現を制御することによって、植物又は植物細胞からの不定芽・分枝形成を制御することが可能となった。

請　求　の　範　囲

1．配列番号：2に記載のアミノ酸配列を有し、分化に関わり、ホメオドメイン様配列を持つ蛋白質をコードする遺伝子。

2．配列番号：2に記載のアミノ酸配列において1 個又は複数個のアミノ酸の付加、欠失及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されているアミノ酸配列を有し、且つ分化に関わり、ホメオドメイン様配列を持つ蛋白質をコードする遺伝子。

3．配列番号：1に記載の塩基配列を有する核酸又はその部分と、ストリンジエント条件下でハイブリダイズし、且つ分化に関わり、ホメオドメイン様配列を持つ蛋白質をコードする遺伝子。

4．配列番号：4に記載のアミノ酸配列を有し、分化に関わり、ホメオドメイン様配列を持つ蛋白質をコードする遺伝子。

5．配列番号：4に記載のアミノ酸配列において1 個又は複数個のアミノ酸の付加、欠失及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されているアミノ酸配列を有し、且つ分化に関わり、ホメオドメイン様配列を持つ蛋白質をコードする遺伝子。

6．配列番号：3に記載の塩基配列を有する核酸又はその部分と、ストリンジエント条件下でハイブリダイズし、且つ分化に関わり、ホメオドメイン様配列を持つ蛋白質をコードする遺伝子。

7．前記蛋白質が、不定芽誘導能を有する蛋白質である請求項1～6のいずれか1項に記載の遺伝子。

8．前記蛋白質が、分枝誘導能を有する蛋白質である請求項1～6のいずれか1項に記載の遺伝子。

9．請求項1～8のいずれか1項に記載の遺伝子を含んでなるベクター。

10．請求項9に記載のベクターにより形質転換された宿主。

１１．請求項１～８のいずれか１項に記載の遺伝子によってコードされる蛋白質。

１２．請求項１０に記載の宿主を培養し、又は成育させ、そして該宿主から分化に関わり、ホメオドメイン様配列を持つ蛋白質を採取することを特徴とする該蛋白質の製造方法。

１３．前記蛋白質が、不定芽誘導能を有する蛋白質である請求項１２に記載の蛋白質の製造方法。

１４．前記蛋白質が、分枝誘導能を有する蛋白質である請求項１２に記載の蛋白質の製造方法。

１５．請求項１～８のいずれか１項に記載の遺伝子が導入された植物又は植物細胞。

１６．請求項１～８のいずれか１項に記載の遺伝子を植物又は植物細胞に導入し、該遺伝子を発現せしめることによる植物又は植物細胞から分化を誘導する方法。

１７．請求項１～８のいずれか１項に記載の遺伝子を植物又は植物細胞に導入し、該遺伝子を発現せしめることによる植物又は植物細胞から不定芽形成を誘導する方法。

１８．請求項１～８のいずれか１項に記載の遺伝子を植物体に導入し、該遺伝子を発現せしめることによる植物体の分枝を誘導する方法。

SEQUENCE LISTING

<110> Suntory Limited

<120> Homeobox gene coding for protein participating in differentiation

<130> H773

<160> 8

<210> 1

<211> 1214

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<221> CDS

<222> (36)...(1010)

<223> Nucleotide sequence coding for protein participating in differentiation

<400> 1

ctttagctct cgattatcat cattacacca tcatc atg tcc tcc tca aac aaa 53
Met Ser Ser Ser Asn Lys
1 5

aat tgg cca agc atg ttc aaa tcc aaa cct tgc aac aat aat cat cat 101
Asn Trp Pro Ser Met Phe Lys Ser Lys Pro Cys Asn Asn Asn His His
10 15 20

cat caa cat gaa atc gat act cca tct tac atg cac tac tct aat tgc 149
His Gln His Glu Ile Asp Thr Pro Ser Tyr Met His Tyr Ser Asn Cys
25 30 35

aac cta tca tct tcc ttt tcc tca gat cgg ata cca gat cct aaa ccg 197
Asn Leu Ser Ser Ser Phe Ser Ser Asp Arg Ile Pro Asp Pro Lys Pro
40 45 50

aga tgg aat cct aaa ccg gag cag att agg ata ctc gaa tca atc ttc 245
Arg Trp Asn Pro Lys Pro Glu Gln Ile Arg Ile Leu Glu Ser Ile Phe
55 60 65 70

aat tcc ggt act att aac cca cct aga gag gag att caa aga atc cgg 293
Asn Ser Gly Thr Ile Asn Pro Pro Arg Glu Glu Ile Gln Arg Ile Arg
75 80 85

atc cgg ctt caa gaa tat ggt caa atc ggt gac gca aac gtg ttt tac 341
Ile Arg Leu Gln Glu Tyr Gly Gln Ile Gly Asp Ala Asn Val Phe Tyr
90 95 100

tgg ttt caa aac cgg aaa tct cga gca aaa cac aag ctt cgt gtt cat 389
Trp Phe Gln Asn Arg Lys Ser Arg Ala Lys His Lys Leu Arg Val His
105 110 115

cac aaa agc cct aaa atg tca aag aag gac aag acg gtt att cct agt 437
His Lys Ser Pro Lys Met Ser Lys Lys Asp Lys Thr Val Ile Pro Ser
120 125 130

act gac gct gat cat tgt ttt ggt ttt gtt aac caa gaa acc gga tta 485
Thr Asp Ala Asp His Cys Phe Gly Phe Val Asn Gln Glu Thr Gly Leu
135 140 145 150

tat ccg gtt caa aac aat gag ttg gtg gta acc gaa ccg gcc ggt ttt 533
Tyr Pro Val Gln Asn Asn Glu Leu Val Val Thr Glu Pro Ala Gly Phe
155 160 165

cta ttt ccg gtt cat aat gat ccg agc gct gct caa tca gcg ttt ggt 581
Leu Phe Pro Val His Asn Asp Pro Ser Ala Ala Gln Ser Ala Phe Gly
170 175 180

ttt ggc gat ttt gtt gta ccg gtg gta acg gaa gaa ggg atg gca ttc 629
Phe Gly Asp Phe Val Val Pro Val Val Thr Glu Glu Gly Met Ala Phe
185 190 195

tct acc gtt aat aac ggc gtt aat ttg gag act aac gaa aat ttt gat 677
Ser Thr Val Asn Asn Gly Val Asn Leu Glu Thr Asn Glu Asn Phe Asp
200 205 210

aaa att ccg gcg atc aat tta tac ggc gga gat gga aat ggc ggt gga 725
Lys Ile Pro Ala Ile Asn Leu Tyr Gly Gly Asp Gly Asn Gly Gly Gly
215 220 225 230

aat tgt ttt cct cct ttg act gtt cca tta acc atc aat caa tct caa 773
Asn Cys Phe Pro Pro Leu Thr Val Pro Leu Thr Ile Asn Gln Ser Gln
235 240 245

gaa aaa cga gat gta gga tta tcc ggt ggt gaa gac gtc gga gat aat 821
Glu Lys Arg Asp Val Gly Leu Ser Gly Gly Glu Asp Val Gly Asp Asn
250 255 260

gtt tat ccg gtg aga atg acg gtg ttt att aac gag atg cct atc gaa 869
Val Tyr Pro Val Arg Met Thr Val Phe Ile Asn Glu Met Pro Ile Glu
265 270 275

gta gtg tct gga tta ttc aac gtt aag gca gct ttc gga aac gat gcc 917
Val Val Ser Gly Leu Phe Asn Val Lys Ala Ala Phe Gly Asn Asp Ala
280 285 290

gtt ttg atc aac tcg ttt ggc cag cct att ctt aca gat gaa ttt ggt 965
Val Leu Ile Asn Ser Phe Gly Gln Pro Ile Leu Thr Asp Glu Phe Gly
295 300 305 310

gtt act tat caa cct ctc caa aat ggc gca atc tat tat ctt att 1010
Val Thr Tyr Gln Pro Leu Gln Asn Gly Ala Ile Tyr Tyr Leu Ile
315 320 325

tagaagatat tgaaaagcaa atgttatggt gctatggata aatattaata taataataaa 1070

agatttctgc gatttattta gttattaatt agataagaat ttcatttctt atcttttaaa 1130

tttatgaaca atttacagga catttacatt ttcgagactt tgaaaaataa agaatgaaat 1190

taagttaaaa aaaaaaaaaa aaaa 1214

<210> 2

<211> 325

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<223> Amino acid sequence of protein participating in differentiation

<400> 2

Met Ser Ser Ser Asn Lys Asn Trp Pro Ser Met Phe Lys Ser Lys Pro
1 5 10 15

Cys Asn Asn Asn His His His Gln His Glu Ile Asp Thr Pro Ser Tyr
20 25 30

Met His Tyr Ser Asn Cys Asn Leu Ser Ser Ser Phe Ser Ser Asp Arg
35 40 45

Ile Pro Asp Pro Lys Pro Arg Trp Asn Pro Lys Pro Glu Gln Ile Arg
50 55 60

Ile Leu Glu Ser Ile Phe Asn Ser Gly Thr Ile Asn Pro Pro Arg Glu
65 70 75 80

Glu Ile Gln Arg Ile Arg Ile Arg Leu Gln Glu Tyr Gly Gln Ile Gly
85 90 95

Asp Ala Asn Val Phe Tyr Trp Phe Gln Asn Arg Lys Ser Arg Ala Lys
100 105 110

His Lys Leu Arg Val His His Lys Ser Pro Lys Met Ser Lys Lys Asp
115 120 125

Lys Thr Val Ile Pro Ser Thr Asp Ala Asp His Cys Phe Gly Phe Val
130 135 140
Asn Gln Glu Thr Gly Leu Tyr Pro Val Gln Asn Asn Glu Leu Val Val
145 150 155 160
Thr Glu Pro Ala Gly Phe Leu Phe Pro Val His Asn Asp Pro Ser Ala
165 170 175
Ala Gln Ser Ala Phe Gly Phe Gly Asp Phe Val Val Pro Val Val Thr
180 185 190
Glu Glu Gly Met Ala Phe Ser Thr Val Asn Asn Gly Val Asn Leu Glu
195 200 205
Thr Asn Glu Asn Phe Asp Lys Ile Pro Ala Ile Asn Leu Tyr Gly Gly
210 215 220
Asp Gly Asn Gly Gly Gly Asn Cys Phe Pro Pro Leu Thr Val Pro Leu
225 230 235 240
Thr Ile Asn Gln Ser Gln Glu Lys Arg Asp Val Gly Leu Ser Gly Gly
245 250 255
Glu Asp Val Gly Asp Asn Val Tyr Pro Val Arg Met Thr Val Phe Ile
260 265 270
Asn Glu Met Pro Ile Glu Val Val Ser Gly Leu Phe Asn Val Lys Ala
275 280 285
Ala Phe Gly Asn Asp Ala Val Leu Ile Asn Ser Phe Gly Gln Pro Ile
290 295 300
Leu Thr Asp Glu Phe Gly Val Thr Tyr Gln Pro Leu Gln Asn Gly Ala
305 310 315 320
Ile Tyr Tyr Leu Ile
325

< 2 1 0 > 3

<211> 1518

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<221> CDS

<222> (152)...(1285)

<223> Nucleotide sequence coding for protein participating in differentiation

<400> 3

ttttattta tctttccttt agccattctg ttccctgtct cttcctcctc tcttttgac 60

acatcacatc atcatcacat catcattcaa catcaatcat catcatatgc atacacatac 120

atctgtgttc tgcggatcga gttaattagt t atg gct tct tcg aat aga cac 172

Met Ala Ser Ser Asn Arg His

1 5

tgg cca agc atg ttc aag tcc aaa cct cat ccc cat caa tgg caa cat 220

Trp Pro Ser Met Phe Lys Ser Lys Pro His Pro His Gln Trp Gln His

10 15 20

gac atc aac tct cct ctc ttg cct tct gct tct cac cga tct tct cct 268

Asp Ile Asn Ser Pro Leu Leu Pro Ser Ala Ser His Arg Ser Ser Pro

25 30 35

ttc tct tca gga tgt gaa gtg gag agg agt cca gag cca aaa cca aga 316

Phe Ser Ser Gly Cys Glu Val Glu Arg Ser Pro Glu Pro Lys Pro Arg

40 45 50 55

tgg aat cca aag cca gag cag att cgg ata ctt gaa gca atc ttt aac 364

Trp Asn Pro Lys Pro Glu Gln Ile Arg Ile Leu Glu Ala Ile Phe Asn

60 65 70

tcc ggg atg gtg aat cct cca aga gag gag atc agg agg att agg gct 412
Ser Gly Met Val Asn Pro Pro Arg Glu Glu Ile Arg Arg Ile Arg Ala
75 80 85

cag ctt caa gaa tac ggc caa gtc ggt gat gct aac gtc ttc tac tgg 460
Gln Leu Gln Glu Tyr Gly Gln Val Gly Asp Ala Asn Val Phe Tyr Trp
90 95 100

ttc caa aac cgt aag tcc cgt agt aaa cac aaa ctc cgc ctc ctc cac 508
Phe Gln Asn Arg Lys Ser Arg Ser Lys His Lys Leu Arg Leu Leu His
105 110 115

aac cac tcc aaa cac tct ctc cct caa acg caa ccg cag ccg cag ccg 556
Asn His Ser Lys His Ser Leu Pro Gln Thr Gln Pro Gln Pro Gln Pro
120 125 130 135

caa cct tcg gct tcc tct tcc tct tcc tcc tcc tct tcc tcc tcc aaa 604
Gln Pro Ser Ala Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Lys
140 145 150

tcc acc aaa ccc cga aaa agc aag aac aag aac aac act aat ctc tct 652
Ser Thr Lys Pro Arg Lys Ser Lys Asn Lys Asn Asn Thr Asn Leu Ser
155 160 165

ttg ggt ggt agt caa atg atg ggg atg ttt cca ccg gaa ccg gcg ttt 700
Leu Gly Gly Ser Gln Met Met Gly Met Phe Pro Pro Glu Pro Ala Phe
170 175 180

ctc ttc ccg gtc tcc act gtc gga ggg ttt gaa ggt atc acc gtc tca 748
Leu Phe Pro Val Ser Thr Val Gly Gly Phe Glu Gly Ile Thr Val Ser
185 190 195

tcc caa tta ggg ttt ctc tcc ggt gat atg att gag caa caa aaa ccg 796
Ser Gln Leu Gly Phe Leu Ser Gly Asp Met Ile Glu Gln Gln Lys Pro
200 205 210 215

gct cca acg tgt acc gga ctc ctg ctg agt gag atc atg aac ggt agt 844
Ala Pro Thr Cys Thr Gly Leu Leu Leu Ser Glu Ile Met Asn Gly Ser
220 225 230

gtg agt tat gga act cat cat caa caa cac ttg agt gag aaa gaa gtt 892
Val Ser Tyr Gly Thr His His Gln Gln His Leu Ser Glu Lys Glu Val
235 240 245

gaa gaa atg agg atg aag atg ttg caa cag cca cag act cag att tgt 940
Glu Glu Met Arg Met Lys Met Leu Gln Gln Pro Gln Thr Gln Ile Cys
250 255 260

tac gct acc act aat cat caa ata gct tct tac aac aac aac aac aac 988
Tyr Ala Thr Thr Asn His Gln Ile Ala Ser Tyr Asn Asn Asn Asn Asn
265 270 275

aac aat aac atc atg ctt cat att cct ccc act act tct act gcc acc 1036
Asn Asn Asn Ile Met Leu His Ile Pro Pro Thr Thr Ser Thr Ala Thr
280 285 290 295

act att act act tcg cat tct ctc gct act gtc cca tca act tcg gac 1084
Thr Ile Thr Thr Ser His Ser Leu Ala Thr Val Pro Ser Thr Ser Asp
300 305 310

cag ctt caa gtt caa gcg gac gca cga ata aga gtt ttc atc aat gaa 1132
Gln Leu Gln Val Gln Ala Asp Ala Arg Ile Arg Val Phe Ile Asn Glu
315 320 325

atg gag ctt gaa gtg agc tca gga ccg ttc aat gtg agg gat gca ttt 1180
Met Glu Leu Glu Val Ser Ser Gly Pro Phe Asn Val Arg Asp Ala Phe
330 335 340

ggg gaa gag gtt gtt ctg att aat tcc gcg ggt cag ccc att gtc acc 1228
Gly Glu Glu Val Val Leu Ile Asn Ser Ala Gly Gln Pro Ile Val Thr
345 350 355

gat gaa tat ggc gtc gct ctt cac cct ctt caa cac gga gcc tcg tac 1276
Asp Glu Tyr Gly Val Ala Leu His Pro Leu Gln His Gly Ala Ser Tyr
360 365 370 375

tat ctg atc tagtcgtgtg ggagatttga gtttgaagaa gaaattaaga 1325
Tyr Leu Ile

cctgtctctt tctttcacca tctactcgta cgtaggctta aatgttaaga ttttataaag 1385

tattggtttc agttacctgt tgtgacggtg tttatgtatg agtttcggac aacattcaca 1445

aaactctctc gttaaattgt tgacctaata atatatgatg tgtgtttcat tattaaaaaa 1505

aaaaaaaaaa aaa 1518

<210> 4

<211> 378

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<223> Amino acid sequence of protein participating in differentiation

<400> 4

Met Ala Ser Ser Asn Arg His Trp Pro Ser Met Phe Lys Ser Lys Pro
1 5 10 15

His Pro His Gln Trp Gln His Asp Ile Asn Ser Pro Leu Leu Pro Ser
20 25 30

Ala Ser His Arg Ser Ser Pro Phe Ser Ser Gly Cys Glu Val Glu Arg
35 40 45

Ser Pro Glu Pro Lys Pro Arg Trp Asn Pro Lys Pro Glu Gln Ile Arg
50 55 60

Ile Leu Glu Ala Ile Phe Asn Ser Gly Met Val Asn Pro Pro Arg Glu
65 70 75 80

Glu Ile Arg Arg Ile Arg Ala Gln Leu Gln Glu Tyr Gly Gln Val Gly
85 90 95
Asp Ala Asn Val Phe Tyr Trp Phe Gln Asn Arg Lys Ser Arg Ser Lys
100 105 110
His Lys Leu Arg Leu Leu His Asn His Ser Lys His Ser Leu Pro Gln
115 120 125
Thr Gln Pro Gln Pro Gln Pro Gln Pro Ser Ala Ser Ser Ser Ser Ser
130 135 140
Ser Ser Ser Ser Ser Ser Lys Ser Thr Lys Pro Arg Lys Ser Lys Asn
145 150 155 160
Lys Asn Asn Thr Asn Leu Ser Leu Gly Gly Ser Gln Met Met Gly Met
165 170 175
Phe Pro Pro Glu Pro Ala Phe Leu Phe Pro Val Ser Thr Val Gly Gly
180 185 190
Phe Glu Gly Ile Thr Val Ser Ser Gln Leu Gly Phe Leu Ser Gly Asp
195 200 205
Met Ile Glu Gln Gln Lys Pro Ala Pro Thr Cys Thr Gly Leu Leu Leu
210 215 220
Ser Glu Ile Met Asn Gly Ser Val Ser Tyr Gly Thr His His Gln Gln
225 230 235 240
His Leu Ser Glu Lys Glu Val Glu Glu Met Arg Met Lys Met Leu Gln
245 250 255
Gln Pro Gln Thr Gln Ile Cys Tyr Ala Thr Thr Asn His Gln Ile Ala
260 265 270
Ser Tyr Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Ile Met Leu His Ile Pro
275 280 285

Pro Thr Thr Ser Thr Ala Thr Thr Ile Thr Thr Ser His Ser Leu Ala
290 295 300

Thr Val Pro Ser Thr Ser Asp Gln Leu Gln Val Gln Ala Asp Ala Arg
305 310 315 320

Ile Arg Val Phe Ile Asn Glu Met Glu Leu Glu Val Ser Ser Gly Pro
325 330 335

Phe Asn Val Arg Asp Ala Phe Gly Glu Glu Val Val Leu Ile Asn Ser
340 345 350

Ala Gly Gln Pro Ile Val Thr Asp Glu Tyr Gly Val Ala Leu His Pro
355 360 365

Leu Gln His Gly Ala Ser Tyr Tyr Leu Ile
370 375

<210> 5

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223> Primer

<400> 5

gaagatctca tcatgtcctc ctcaaac 27

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223> Primer

<400> 6

cggagctcta aataagataa tagattgcgc 30

<210> 7

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223> Primer

<400> 7

gctctagaac aatggcttct tcgaatagac ac 32

<210> 8

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223> Primer

<400> 8

tcccccgggc tgatcagata gtacgaggct cc 32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP00/04904

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl[7] C12N15/29, C12N1/21, C07K14/415, C12P21/02, C12N5/10, A01H5/00 // (C12N15/29, C12R1:91), (C12N1/21, C12R1:01), (C12P21/02, C12R1:01)
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)
Int.Cl[7] C12N15/00-90, C12N1/00-5/28, C07K14/00-825, C12P21/00-08, A01H5/00

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)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)
SwissProt/PIR/GeneSeq, MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Plant Mol.Biol., Vol.40, No.3, (June 1999), p.419-429, Cho S.,et al, "Analysis of the C-terminal region of Arabidopsis thaliana APETALA1 as a transcrition actibvation domain."	1-18
PA	SCIENCE, Vol.285, No.5427, (July 25 1999), p.582-584, D. Wagner, et al, "Transcriptional Activation of APETALA1 by LEAFY."	1-18
A	Cell, Vol.95, No.6, (1998), p.805-815, Klaus F. X. Mayer, et al, "Role of WUSCHEL in Regulating Stem Cell Fate in the Arabidopsis Shoot Meristem."	1-18
A	Genes & Development, Vol.9, No.18, (1995), p.2292-2304, R. D. Schneeberger, et al, "Ectopic expression of the knox homeo box gene rough sheath1 alters cell fate in the maize leaf."	1-18

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
13 September, 2000 (13.09.00)	26 September, 2000 (26.09.00)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ００／０４９０４

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））
Int.Cl⁷　Ｃ１２Ｎ１５／２９，Ｃ１２Ｎ１／２１，Ｃ０７Ｋ１４／４１５，Ｃ１２Ｐ２１／０２，Ｃ１２Ｎ５／１０，Ａ０１Ｈ５／００ // (Ｃ１２Ｎ１５／２９，Ｃ１２Ｒ１：９１)，(Ｃ１２Ｎ１／２１，Ｃ１２Ｒ１：０１)，(Ｃ１２Ｐ２１／０２，Ｃ１２Ｒ１：０１)

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.Cl⁷　Ｃ１２Ｎ１５／００－９０，Ｃ１２Ｎ１／００－５／２８，Ｃ０７Ｋ１４／００－８２５，Ｃ１２Ｐ２１／００－０８，Ａ０１Ｈ５／００

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

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）

ＧｅｎＢａｎｋ／ＥＭＢＬ／ＤＤＢＪ／ＧｅｎｅＳｅｑ、ＷＰＩ(ＤＩＡＬＯＧ)、ＢＩＯＳＩＳ(ＤＩＡＬＯＧ)
ＳｗｉｓｓＰｒｏｔ／ＰＩＲ／ＧｅｎｅＳｅｑ，　ＭＥＤＬＩＮＥ（ＳＴＮ）

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
Ａ	Plant Mol.Biol., Vol.40, No.3, (June 1999), p.419-429, Cho S.,et al, "Analysis of the C-terminal region of Arabidopsis thaliana APETALA1 as a transcrition actibvation domain."	１－１８
ＰＡ	SCIENCE, Vol.285, No.5427, (July 25 1999), p.582-584, D.Wagner,et al, "Transcriptional Activation of APETALA1 by LEAFY."	１－１８

☒ 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 １３．０９．００	国際調査報告の発送日 26.09.00
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	特許庁審査官（権限のある職員） 齊藤　真由美　４Ｂ　８９３１ 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８

様式ＰＣＴ／ＩＳＡ／２１０（第２ページ）（１９９８年７月）

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
A	Cell, Vol.95, No.6, (1998), p.805-815, Klaus F.X.Mayer, et al, "Role of WUSCHEL in Regulating Stem Cell Fate in the Arabidopsis Shoot Meristem."	１－１８
A	Genes & Development, Vol.9, No.18, (1995), p.2292-2304, R.D.Schneeberger,et al, "Ectopic expression of the knox homeo box gene rough sheath1 alters cell fate in the maize leaf."	１－１８