

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2006 年 11 月 2 日 (02.11.2006)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2006/115181 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/29 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2006/308356

(22) 国際出願日: 2006 年 4 月 20 日 (20.04.2006)

(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2005-125774 2005 年 4 月 22 日 (22.04.2005) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): タカラバイオ株式会社 (TAKARA BIO INC.) [JP/JP]; 〒5202193 滋賀県大津市瀬田三丁目 4 番 1 号 Shiga (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 大場 利治 (OHBA, Toshiharu). 西村 真理子 (NISHIMURA, Mariko). 安藤 達哉 (ANDO, Tatsuya). 梅田 香穂子 (UMEDA, Kahoko). 浅田 起代蔵 (ASADA, Kiyozo). 加藤 郁之進 (KATO, Ikunoshin).

(74) 代理人: 細田 芳徳 (HOSODA, Yoshinori); 〒5406591 大阪府大阪市中央区大手前一丁目 7 番 3 1 号 OMM ビル 5 階 私書箱 2 6 号 細田国際特許事務所内 Osaka (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, 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.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

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

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: METHOD OF MODIFYING PLANT CHARACTERS

(54) 発明の名称: 植物の形質改変方法

(57) Abstract: [PROBLEMS] To provide a novel polynucleotide sequence for efficiently producing a plant having dwarfness which is an agriculturally important character; a vector for inducing gene knockdown; a plant; and a method of constructing this plant. It is also intended to provide a method of efficiently finding out a transcriptional factor or a regulatory factor relating to the modification of plant characters. [MEANS FOR SOLVING PROBLEMS] A method of modifying the characters of a plant characterized by inhibiting the expression of a gene encoding a polypeptide the expression of which varies upon stimulation with brassinosteroid in a plant individual and which has a high correlation to a change in the expression of XTR7 (At4g14130) and has a RING finger motif; a nucleic acid to be used in this method; a plant constructed by using the above method; and a method of searching for a gene usable as a target in a character modification method.

(57) 要約: 【課題】 農業上重要な形質である矮性の植物体を効率よく生産するための新規ポリヌクレオチド配列、遺伝子ノックダウンの誘導用のベクター、植物体、および該植物体を作成する方法を提供すること。また、植物の形質改変に関連する転写因子や調節因子を効率的に見出す方法を提供すること。【解決手段】 植物個体中でブラシノステロイド刺激に対してその発現が変動し、XTR7 (At4g14130) と発現変動の相関が高く、かつリング・フィンガー・モチーフを有するポリペプチドをコードする遺伝子の発現を抑制することの特徴とする植物の形質改変方法、当該方法に用いられる核酸、当該方法を用いて作成された植物体、及び形質改変方法のターゲットとなる遺伝子の探索方法。

WO 2006/115181 A1

明 細 書

植物の形質改変方法

技術分野

- [0001] 本発明は、遺伝子組換え技術を用いた矮性植物体を効率よく生産するための新規ヌクレオチド配列、遺伝子ノックダウンの誘導用のベクター、植物体、および該植物体を作成する方法と植物の形質改変に関連する転写因子や調節因子を効率的に見出す方法に関する。

背景技術

- [0002] 人口増加、耕地面積の減少により、あと数十年後には地球上の人類を十分に養う量の食糧は不足する。この問題を解決するには、単位耕地面積あたりの植物の収量をあげるしかない。しかし、単位耕地面積あたりの植物の収量を上げてきた化学肥料の原料である石油をはじめとする化石エネルギーの埋蔵量は、有限である。よって、育種による植物の機能をあげることは重要である。

また、エネルギー問題を考えると、現代の生活を維持するならば、数十年後には石油の枯渇が予想される。そういった中で、人類の使用する化石エネルギーの総使用量は、あと植物の機能を10%あげるとまかなえる量であるといわれている。そこで、機能をあげた植物を開発し現代の生活を維持しつつもエネルギー収支のあう循環型社会が構想されている。

- [0003] 植物はそのポテンシャルを環境や病害によって十分に引き出されていないといわれている。その中で、20世紀におきた“緑の革命”は、たった一つの遺伝子の突然変異に基づく育種母体があったからなされた。よって、収量増加を期待できる、育種母体として利用できる植物体の作成技術は、非常に重要な技術である。その中で矮性形質は、環境からの植物の形質をひきあげるための重要な農業形質である。

1つの遺伝子のノックアウトによって矮性形質が現れる例としては、植物ホルモンのレセプターや生合成系酵素などの遺伝子ノックアウトが知られている。

- [0004] 植物の細胞の分裂や伸長の制御という植物成長の基本制御機構に関する植物ホルモンとしてブラシノステロイドがある。ブラシノステロイド欠損植物体、例えば生合成系

酵素の遺伝子det2 (AGIコード: At2g38050; 例えば、非特許文献1参照) のノックアウト植物体やブラシノステロイドレセプターBRI1 (AGIコード: At4g39400; 例えば、非特許文献2参照) 欠損植物体は著しい矮性の形質を示す。しかしながら、これらの遺伝子は作用を示す植物ホルモンの合成やその受容にかかわるものであり、受容体からのシグナル伝達の中流から下流に位置するような機能性因子、転写因子・調節因子ではない。また、これらの遺伝子は実用的には矮性の形質が強すぎる。さらにシグナル伝達の上流に位置するために他の有用形質にも影響を与えている可能性が高い。さらに、他のシグナル伝達系とのクロストークなどにより簡単にその形質が復帰したりすると考えられる。よって、シグナル伝達系の中流から下流に位置する機能性因子、細胞伸長を直接的に起こす細胞壁関連酵素遺伝子や液胞へのトランスポート関連遺伝子を直接的に制御するような転写因子・調節因子などが期待されるが、強い形質を示すものはいまだで同定されていなかった。

[0005] 実際、小麦の“緑の革命”の原因となった遺伝子はジベレリンのシグナル伝達系の転写因子であることが最近明らかになり、転写因子の突然変異体による矮性形質は、実用的に利用されることがわかっている。

[0006] また、ブラシノステロイド欠損植物体は、他の植物ホルモンの場合と異なり、形態は非常に明瞭でありながらも発芽や栄養成長は維持され致死にはなりにくいという利点がある。さらに生合成系酵素の遺伝子det2のノックアウト植物体をみると矮性形質ばかりでなく、頂芽優勢の低下に伴う茎数の増加、葉の暗緑色などの特徴を示す。これは、矮性による耐倒伏性を付与することによる台風など暴風雨による被害の軽減や果樹では摘果・収穫作業効率のアップに伴う収量の増加ばかりでなく、直接的な収量の増加をもたらすと考えられる。

[0007] このため、ブラシノステロイド関連の遺伝子、特に転写因子の突然変異植物体は、農業育種の現場で育種母体としてのより利用価値が高いと考えられるが、弱い形質を示す遺伝子としてBEE1~3 (AGIコード: At1g18400, At4g36540, At1g73830; 例えば、非特許文献3参照) がディファレンシャルディスプレイで見出されてはいないが、十分な形質のものはまだ発見されていない。

[0008] 最近、ブラシノステロイドで遺伝子発現が抑制され合成変異体cpdで発現が上昇し

ている遺伝子として、BRH1 (AGIコード:At3g61460:例えば、非特許文献4参照) が同定された。これはRING-H2 finger(C3H2C3-type RING finger)をもつポリペプチドをコードしている。前記の遺伝子をアンチセンス法で抑制した場合には明瞭に遺伝子発現の抑制は確認されるが、矮性の形質は示さない。また、小松らは、ブラシノステロイドによって影響を受けるイネのOsBLE1、2遺伝子について、当該遺伝子の発現を抑制することによるイネのわい化について報告している(非特許文献5、6及び特許文献1参照)。しかしながら、前記遺伝子の塩基配列には、リング・フィンガー・ドメイン部位は存在しない。また、前記遺伝子とXTR7遺伝子との関係についても記載はない。

[0009] 非特許文献1:Plant Cell、第3巻、445-459頁(1991)

非特許文献2:Plant Physiology、第111巻、671-678頁(1996)

非特許文献3:Genetics、第162巻、1445-1456頁(2002)

非特許文献4:Planta、第215巻、127-133頁(2002)

非特許文献5:Plant Mol Biol. 第52巻(4)、843-854頁(2003)

非特許文献6:Plant Physiol Biochem. 第42巻(1)、1-6頁(2004)

特許文献1:米国第2003/0217390号公開公報

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0010] 本発明の目的は、上記従来技術を鑑みて行われたものであり、ブラシノステロイドの関連遺伝子で、シグナル伝達経路の中流から下流にある機能性因子、細胞伸長を直接的に起こす細胞壁関連酵素遺伝子や膨圧を起こす関連遺伝子を直接的に制御するような転写因子・調節因子を発見し、農業上重要な形質である矮性の植物体を効率よく生産するために、新規ポリヌクレオチド配列、遺伝子ノックダウンの誘導用のベクター、植物体、および該植物体を作成する方法を提供することにある。また、植物の形質改変に関連する転写因子や調節因子を効率的に見出す方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0011] 本発明者らは、鋭意研究を行った結果、ブラシノステロイドによる刺激に応答する遺

伝子群において、リング・フィンガー・ドメインを有するポリペプチドをコードする機能未知の遺伝子の発現を制御することにより、植物個体に矮性、茎数の増加、葉の暗緑色化等の農業上重要な形質がもたらされることを見出した。また、ブラシノステロイドによる刺激に応答する遺伝子をDNAマイクロアレイを用いて探索する過程、得られた遺伝子群より網羅的遺伝子発現解析データを利用して注目機能(例えば細胞壁再構築、ブラシノリド代謝)を担う遺伝子との間に遺伝子発現比の相関の高い遺伝子を集める過程、こうして選択された遺伝子の機能を、前記遺伝子の発現を制御した形質転換植物を作成して確認する過程を通して、農業上重要な形質を有する植物体を効率よく作成する方法を見出し、本発明を完成させた。

[0012] 本発明の第一の発明は、植物の形質を改変する方法であって、植物個体中でブラシノステロイド刺激に対してその発現が変動し、XTR7 (At4g14130)と発現変動の相関が高く、かつリング・フィンガー・ドメインを有するポリペプチドをコードする遺伝子の発現を抑制することを特徴とする植物の形質改変方法に関する。

本発明の第一の発明の方法において、野生型植物と比較して、下記から選択される形質の改変がもたらされる植物の形質改変方法であってもよい。;

(a) 矮性

(b) 茎数の増加;および

(c) 葉の暗緑色化。

また、本発明の第一の発明の方法において、植物個体中で下記の遺伝子の発現を抑制することを特徴とする植物の形質改変方法であってもよい。:

(1) 配列表の配列番号10に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする遺伝子;

(2) 配列表の配列番号10に示されるアミノ酸配列に1～数個のアミノ酸残基の置換、欠失、または挿入がなされたアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする遺伝子であって、植物個体中での発現が抑制されると植物の形質が改変される遺伝子;および

(3) (1)または(2)のポリペプチドをコードする遺伝子の相補鎖に厳密な条件下でハイブリダイズする遺伝子であって、植物個体中での発現が抑制されると植物の形質が

改変される遺伝子。

また、本発明の第一の発明の方法において、RNA干渉により遺伝子の発現を抑制する植物の形質改変方法であってもよい。特に限定はされないが例えば、配列表の配列番号9記載の塩基配列あるいはその断片を有する核酸及び／またはその相補鎖の塩基配列を有する核酸を使用することができる。

[0013] 本発明の第二の発明は、野生型植物と比較して、矮性、茎数の増加あるいは葉の暗緑色化のいずれかの形質の改変に関与する遺伝子であって；

(1)配列表の配列番号10に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする遺伝子；

(2)配列表の配列番号10に示されるアミノ酸配列に1～数個のアミノ酸残基の置換、欠失、または挿入がなされたアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする遺伝子；
および

(3) (1)または(2)のポリペプチドをコードする遺伝子の相補鎖に厳密な条件下でハイブリダイズする遺伝子に関する。

[0014] 本発明の第三の発明は、植物個体の形質の改変に関与する遺伝子の発現を抑制する核酸であって、下記特徴を有する核酸；

(1)配列表の配列番号10に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする遺伝子又はその相補鎖に厳密な条件下でハイブリダイズする核酸；及び

(2)配列表の配列番号10に示されるアミノ酸配列に1～数個のアミノ酸残基の置換、欠失、または挿入がなされたアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする遺伝子又はその相補鎖に厳密な条件下でハイブリダイズする核酸に関する。

本発明の第三の発明において、配列表の配列番号9記載の塩基配列あるいはその断片の塩基配列及び／又はその相補鎖の塩基配列を有する核酸が好適に使用できる。

[0015] 本発明の第四の発明は、本発明の第一の発明で作成された、形質が改変された植物に関する。本発明の第四の発明において、下記から選択される形質の改変がもたらされている、植物が作成できる。；

(a)矮性

(b) 茎数の増加;および

(c) 葉の暗緑色化。

[0016] 本発明の第五の発明は、(1)ブラシノステロイドによる刺激に応答する遺伝子を探索する工程;

(2) 上記(1)工程で得られた遺伝子群より細胞壁の再構築を担う遺伝子との間に遺伝子発現比の相関の高い遺伝子を集める工程;および

(3) 上記(2)工程で選択された遺伝子の機能を、前記遺伝子の発現を制御した形質転換植物を作成して確認する工程を包含することを特徴とする、前記細胞壁の再構築に関連する植物の形質改変に有用な遺伝子の探索方法に関する。

発明の効果

[0017] 本発明により、農業上の重要形質である矮性、茎数の増加、および葉の暗緑色化等の形質を獲得した植物品種が提供される。前記植物は品種や収量の向上や耐虫性増加が見られることから、農業生産分野において特に有用である。

発明を実施するための最良の形態

[0018] 以下に本発明について詳細に説明する。

(1) 本発明の植物の形質改変に有用な遺伝子及び当該遺伝子の探索方法

本発明の植物の形質改変に有用な遺伝子は、植物個体中でブラシノステロイド刺激に対してその発現が変動し、細胞壁の再構築を担う遺伝子と発現変動の相関が高く、かつリング・フィンガー・ドメインを有するポリペプチドをコードする遺伝子であるものが好適である。

[0019] ブラシノステロイド刺激に対してその発現が変動する遺伝子とは、Fold Change法で算出した数値が1.5倍以上、好ましくは、1.8倍以上、特に好ましくは、2倍以上のものを言う。なお、他の計算方法で算出された変動遺伝子であっても、Fold Change法で算出した数値が上記範囲内であれば、本明細書で定義されるブラシノステロイド刺激に対してその発現が変動する遺伝子であることは言うまでもない。

[0020] また、細胞壁の再構築を担う遺伝子とは、細胞壁の伸縮等の再構築に関連する遺伝子のことを言う。特に限定はされないが、例えば細胞壁関連酵素EXGT遺伝子、細胞伸長に関係あるエクспанシン遺伝子、ブラシノステロイドの生合成と代謝関連

遺伝子やこれらのファミリー遺伝子等が挙げられる。特に好ましくは、XTR7 (At4g14130) である。また、細胞壁の再構築を担う遺伝子と発現変動の相関が高い遺伝子とは、マイクロアレイ等による発現解析において前記細胞壁の再構築を担う遺伝子の発現挙動に応じてその発現が変化する遺伝子のことを言う。特に限定はされないが、例えばXTR7 (At4g14130) 遺伝子の発現変動と相関が高い遺伝子等が挙げられる。前記、発現変動の相関は、例えばコサインの相関係数によって表示することができ、その相関係数が0.2以上、好ましくは、0.25以上、特に好ましくは、0.3以上のものを相関が高いと言う。なお、他の計算方法で算出されたXTR7 (At4g14130) と発現変動の相関が高い遺伝子であっても、コサインの変動係数算出法で算出した数値が上記範囲内であれば、本明細書で定義されるXTR7 (At4g14130) と発現変動の相関が高い遺伝子であることは言うまでもない。

- [0021] さらに、前記リング・フィンガー・ドメインを有するポリペプチドとは、特に限定はされないが、例えばユビキチンプロテアソームシステムにおけるユビキチンタンパク質リガーゼ (E3) に属するものが例示される。当該E3は、ubiquitylationのために基質の特異性を決定して、細胞内での蛋白質の代謝的安定性を決定する酵素であり、HECT (homologous to E6-AP carboxyl terminus) 型E3とリング・フィンガー型E3のファミリーに大別される。リング・フィンガー・ドメインには、C3HC4-タイプとC3H2C3-タイプがあり、亜鉛の2つの原子を結合する40～60残基のZn-fingerの一種で、タンパク質タンパク質相互作用に関わると推定される。本発明においては、C3HC4-タイプとC3H2C3-タイプのドメインを有するもののいずれもが好適に使用できる。特に限定はされないが例えば、Swiss-Protデータベース (<http://www.expasy.uniprot.org/>) のAccessionがQ9SK92蛋白質のもつC3HC4タイプリングフィンガードメインを有するもの、さらに好ましくはQ9SK92蛋白質のC3HC4タイプリングフィンガードメインとこの配列の前後にあるPfamBドメインを有するものが好ましい。なお、Swiss-ProtデータベースのAccessionがQ9SK92蛋白質のもつC3HC4タイプリングフィンガードメインの情報は、例えば、[<http://us.expasy.org/ExpasyHunt/>] でSwiss-ProtデータベースのAccessionがQ9SK92として検索できる。

また、PfamBドメインは、Pfamデータベース[<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>]でUniProt IdentifierがQ9SK92として検索できるものが好ましい。

[0022] 特に限定はされないが例えば、Zf-C3HC4ドメインを示すアミノ酸番号が118～159である場合において、Zf-C3HC4ドメイン、当該ドメインより前のアミノ酸番号36～117のPfamBドメイン、Zf-C3HC4ドメインより後のアミノ酸番号161～380のPfamBドメイン、特にアミノ酸番号241～290のPfamBドメインを含むポリペプチドが好適である。

[0023] 本発明の植物の形質改変に有用な遺伝子は、(1)ブラシノステロイドによる刺激に応答する遺伝子を探索する工程；
(2) 上記(1)工程で得られた遺伝子群より細胞壁の再構築を担う遺伝子との間に遺伝子発現比の相関の高い遺伝子を集める工程；および
(3) 上記(2)工程で選択された遺伝子の機能を、前記遺伝子の発現を制御した形質転換植物を作成して確認する工程を包含することを特徴とする探索方法により取得することができる。上記(1)の工程において目的の遺伝子を探索する方法としては、遺伝子の発現を網羅的に解析できるものであれば特に限定はなく、DNAチップ法、マイクロビーズアレイ法(メガソート法、MPSS法)、RT-PCR法のいずれもが好適に使用できる。上記探索方法を用いて、例えばシロイヌナズナから下記工程により取得することができる。

すなわち、シロイヌナズナ由来のcDNA断片が固定化されたマイクロアレイ[例えばアラビドプシスDNAマイクロアレイ(タカラバイオ製)]を用いて、ブラシノステロイドで制御される細胞壁関連遺伝子やブラシノステロイドの生合成と代謝関連遺伝子の調節因子をスクリーニングする。すなわち、シロイヌナズナの野生株(コロンビア株)とブラシノステロイドの生合成のノックアウトラインの芽生えをブラシノライド処理したものと無処理区とから全RNAを抽出、DNAマイクロアレイによるハイブリダイゼーションを実施する、こうしてブラシノライドによってアップレギュレートおよびダウンレギュレートされる遺伝子群を見出すことができる。

次に、細胞壁の再構築を担う遺伝子、例えば矮性との関連が期待される遺伝子(細

胞壁関連酵素EXGT遺伝子、細胞伸長に関係あるエクспанシン遺伝子、ブラシノステロイドの生合成と代謝関連遺伝子やこれらのファミリー遺伝子)に注目して、他のさまざまな組織や環境、条件下での遺伝子発現比データを使用して細胞壁の再構築を担う遺伝子と関連の強い遺伝子を探索することができる。

- [0024] 他の遺伝子発現比データは、シロイヌナズナを対象としたものであれば何でもよく、ブラシノステロイド処理以外で自ら行ったものでもよいし、他のマイクロアレイを用いた公開されているものでもよい。例えば、公開されているデータとして、AFGC (Arabidopsis Functional Genomics Consortium、
http://www.arabidopsis.org/info/2010_projects/comp_proj/AFGC/RevisedAFGC/site1L.htm)が行ったマイクロアレイプロジェクトのデータが上げられる。このデータは、TAIR (The Arabidopsis Information Resource; <http://www.arabidopsis.org/home.html>)のFTPサイト(ftp://ftp.arabidopsis.org/home/tair/Microarrays/analyzed_data/)からダウンロード可能である。

こうして、ブラシノライドによってアップレギュレートおよびダウンレギュレートされる遺伝子群のうちから、遺伝子発現の変動に関して注目遺伝子との間に高い相関係数を有する遺伝子を選択することができる。

- [0025] 本発明に有用な遺伝子は、前記リング・フィンガー・ドメインをコードするアミノ酸及び／又は核酸の相同性からも選択することができる。特に限定はされないが、アミノ酸レベルでは、類似アミノ酸を許容する条件で40%以上、好ましくは50%以上、さらに好ましくは60%以上のものが挙げられる。また、核酸レベルでは、60%以上、好ましくは70%以上、さらに好ましくは80%以上のものが挙げられる。
- [0026] さらに、本発明に有用な遺伝子は、前記相同性表示に変えてBLAST検索プログラムのスコアで表示されたものでも良く、特に限定はされないが例えばアミノ酸レベルでBLASTPのスコアが150以上、好ましくは300以上、さらに好ましくは350以上のものが好適に使用できる。
- [0027] 選択された遺伝子の生物学的機能は、遺伝子発現のノックダウンされた植物体を作製し、その表現型を確認して調べることができる。

ノックダウンの方法には、RNA干渉(RNAi)を起こすためにターゲット遺伝子の二本鎖RNA(dsRNA)が生成されるようにインバーテッドリピート形の核酸構築物を作製して植物体に導入、発現する方法、アンチセンス法、センス鎖をいれてコ・サプレッション(co-suppression)を利用する方法などがあるが、いずれでもかまわない。

植物に導入するベクターは、所望の遺伝子を植物個体に導入できるものであれば特に限定はない。例えばノックダウンすることが望まれる遺伝子(ターゲット遺伝子)の配列の塩基配列の一部を有する二本鎖RNAが生成されるように、インバーテッドリピート型で発現できるベクターに挿入して構築したアグロバクテリウム用のバイナリーベクターを用いることができる。

植物への導入方法には、使用するベクターに適した公知の方法を用いればよい。例えば、改良したin planta法(蕾感染法)を用いてシロイヌナズナにベクターを保有するアグロバクテリウムを感染させて、形質転換植物を作製することができる。

表現型として矮化が確認された形質転換植物が得られた場合には、この植物体におけるターゲット遺伝子のmRNA量を定量して前記遺伝子がノックダウンされたホモ個体である植物体を選択することができる。

[0028] 本発明に有用な遺伝子として、特に限定はされないが、シロイヌナズナの場合、上記の方法によりAGIコードでAt1g22500の遺伝子とそのノックダウンによって植物体が矮性を獲得するものとして選択された。この遺伝子の(cDNAの)塩基配列を配列表の配列番号9に示す。また、前記の塩基配列にコードされているポリペプチドのアミノ酸配列を配列表の配列番号10に示す。この遺伝子がコードする前記ポリペプチドは配列からの予測でC3HC4-type RING finger family proteinと考えられているが、生物学的機能は未知であった。以下本明細書において、植物体が矮性の形質を示すことより機能が明らかになったので、ブラシノリド・レスポンス・リングフィンガー蛋白質遺伝子の頭文字をとってBRR1遺伝子と称する。

[0029] 本発明において有用な遺伝子としては、上記BRR1 (AGIコード:At1g22500)以外にAGIコード:At5g27420、At5g41400等の遺伝子が例示される。さらにシロイヌナズナ以外の植物については、目的の植物に由来する、前記遺伝子と同一の機能を有する遺伝子であれば特に限定はなく、例えばマスクメロンのGenBank ACC

SSION:AAV43794の遺伝子、ライスのGenBank ACCESSION:XM_483020の遺伝子、あるいはライスの、GenBank ACCESSION:XM_450948の遺伝子等が挙げられる。

[0030] 前記遺伝子は、ノックダウンするためのいくつかの独立した形質転換体を作製して同様な表現型が出現することを調べ、この表現型が前記遺伝子のノックダウンに起因するものであることを確認することができる。この操作によりノックダウン効率の異なる個体が得られれば、表現型の強弱とノックダウンの手法、例えば使用されたベクター等との相関を見ることも可能である。

[0031] 本発明において有用な遺伝子であるAt1g22500の遺伝子がノックダウンされたシロイヌナズナは、矮化の形質ばかりでなく、茎数の増加、葉の暗緑色化などの特徴的な形質改変を示す。これは、ブラシノステロイドの生合成系酵素のノックアウト植物の形質と似ているが、前記遺伝子はシグナル伝達の中流から下流に位置する機能性因子、転写因子・調節因子と予想されることから、このようなカテゴリーの遺伝子で強い表現型が確認された初めてのケースである。また、C3HC4-タイプのリング・フィンガー・ドメインを有する点でRING-H2 finger(C3H2C3-type RING finger)を有する前記のBRH1のノックアウト形態とも異なる。すなわち、At1g22500の遺伝子は、ユビキチン化システムによる蛋白質分解による機能調節とブラシノステロイドのシグナル伝達を強く結びつける最初の例であると推測される。

[0032] (2) 本発明の植物の形質改変方法

本発明の植物の形質改変方法は、上記(1)記載の遺伝子を抑制することができる核酸を用いることを特徴とする。例えば、植物個体中でブラシノステロイド刺激に対してその発現が変動し、XTR7(At4g14130)と発現変動の相関が高く、かつリング・フィンガー・ドメインを有するポリペプチドをコードする遺伝子の発現を抑制することを特徴とする植物の形質改変方法である。前記遺伝子の例としては、シロイヌナズナで見出された、AGIコード:At1g22500として知られている遺伝子、もしくは該遺伝子のコードするポリペプチドと同一の機能を有するポリペプチドをコードする遺伝子が挙げられる。

当該方法に用いられる核酸としては、AGIコード:At1g22500遺伝子をターゲット

とする場合、例えば(1)配列表の配列番号10に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする遺伝子又はその相補鎖に厳密な条件下でハイブリダイズする核酸、(2)配列表の配列番号10に示されるアミノ酸配列に1～数個のアミノ酸残基の置換、欠失、または挿入がなされたアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする遺伝子又はその相補鎖に厳密な条件下でハイブリダイズする核酸であれば特に限定はされない。

[0033] 前記「厳密な条件化でハイブリダイズする」とは、特に本発明を限定するものではないが、0.5% SDS、0.1% ウシ血清アルブミン、0.1% ポリビニルピロリドン、0.1% フィコール400、0.01% 変性サケ精子DNAを含む6×SSC (1×SSCは、0.15M NaCl、0.015M クエン酸ナトリウム、pH7.0である)中、65℃にて12～20時間インキュベートした後、0.5% SDSを含む2×SSC中、65℃にて30分間洗浄を行っても、本発明において有用な遺伝子の相補鎖の全部あるいはその一部とハイブリダイズしていることを言う。

[0034] 上記方法は、いわゆるターゲット遺伝子のノックダウン方法であり、特に限定はないが、RNA干渉法、アンチセンス法、コ・サプレッション法等が例示される。下記実施例にも記載のとおり、シロイヌナズナの場合には、ターゲット遺伝子の塩基配列の一部がアンチセンス、センス方向の両方で挿入されたバイナリーベクタープラスミドを導入されたアグロバクテリウムを感染させることにより、ターゲット遺伝子の一部の塩基配列を有する二本鎖RNAが植物個体内で発現され、RNA干渉が起こる。

前記RNA干渉法において使用できる核酸としては、他の遺伝子との間に相同性のない塩基配列を有するものが好ましく、その鎖長は20～1000塩基の範囲、好ましくは100～500塩基の範囲、さらに好ましくは、250～350塩基の範囲である。特に好ましくは、300塩基程度の鎖長であって目的の遺伝子に対する配列特異性が高いものが例示される。例えば配列表の配列番号9記載の塩基配列あるいはその断片の塩基配列及び／又はその相補鎖の塩基配列を有する核酸を使用することができる。前記断片として特に限定はないが配列表の配列番号11記載の塩基配列及び／又はその相補鎖の塩基配列を有する核酸が例示される。

[0035] 配列表の配列番号11記載の塩基配列をノックダウン方法に利用する場合、当該塩

基配列及び／又はその相補鎖の塩基配列を有する核酸をRNAに変換できるような任意の方法に使用するか、あるいは前記核酸に対応するRNAを使用するか、のいずれの方法であってもよい。例えば、配列表の配列番号11記載の塩基配列を有する核酸に対応するRNAはコ・サプレッション法に、配列表の配列番号11記載の塩基配列及びその相補鎖の塩基配列を有する核酸に対応するRNAはRNA干渉法に、また配列表の配列番号11記載の塩基配列の相補的な塩基配列はアンチセンス法に利用できる。

前述のRNA干渉による目的遺伝子の発現抑制の結果、前記植物個体は矮性、茎数の増加、葉の暗緑色化等の表現型を示すこととなる。こうして、本発明を利用することにより、優良形質を備えた商業的に価値のある新規な植物品種を創製することができる。

[0036] (3) 本発明の植物体

本発明の植物体は、前記(1)記載の遺伝子をターゲットとし、前記(2)記載の方法で作成することができる。本発明の植物体は、(a)矮性、(b)茎数の増加、及び／又は(c)葉の暗緑色化しているものが例示される。

本発明において、矮性とは当該植物個体の丈が野生体に比較して低いことを言う。また、茎数の増加とは当該植物個体の茎数が野生体に比較して多いことを言う。さらに葉の暗緑色化とは当該植物個体の葉の色が野生体に比較して濃い緑色になることを言う。

例えば、シロイヌナズナの場合、上記のとおりBRR1遺伝子をノックダウンすることにより、矮性の個体を作製することができる。同様に、ブラシノリドにレスポンスして、XTR7と発現変動に相関があり、さらにリング・フィンガー・ドメインをもつ蛋白質をコードする別の遺伝子をノックダウンすることによっても矮性の個体を作製することができる。

実施例

[0037] 以下に実施例により、さらに詳細に本発明を説明するが、本発明は実施例の範囲内に限定されるものではない。

[0038] 実施例1 ブラシノステロイドにレスポンスする遺伝子の収集

アラビドプシスDNAマイクロアレイ(タカラバイオ社製)を用いて、ブラシノステロイドで制御される細胞壁関連遺伝子やブラシノステロイドの生合成と代謝関連遺伝子の調節因子をスクリーニングした。

(1) 試料の調製

シロイヌナズナの野性株(コロンビア株)とブラシノステロイドの生合成のノックアウトラインdet2-1の種子(ABRC:Arabidopsis Biological Resource Centerより種子を分与、ストックNo. CS6159、<http://www.biosci.ohio-state.edu/~plantbio/Facilities/abrc/abrchome.htm>)を殺菌後、100粒以上を1/2 MS液体培地(和光純薬社製)、Sucrose濃度1.5%(v/v)を入れた9cm径深型シャーレに入れた。4℃、暗所2日間の春化处理後、22℃、照光下(24時間連続照明、3000ルクス)で7日間栽培した。

[0039] 7日目の芽生えを用いて、DMSO(終濃度0.1%, v/v)に溶かしたブラシノライド(第一ファインケミカル社製、終濃度10nM)で3h処理した区と、模擬試験としてDMSO(終濃度0.1%, v/v)で3h処理した対照区と別々に芽生えを回収した。各々をトリゾル試薬(ギブコ社製)により全RNAを抽出した後、RNase free DNaseI(タカラバイオ社製)によりゲノムDNAを除去した。

[0040] (2) DNAマイクロアレイによるハイブリダイゼーション

RNA Transcript SureLABEL™ Core Kit(タカラバイオ社製)を用いて、野性株(コロンビア株)とdet2株のそれぞれについて、対照区をCy3標識、ブラシノライド処理区をCy5標識した。タカラDNAチッププロトコールにしたがって、競合ハイブリダイゼーションを行った。野性株(コロンビア株)とdet2株のそれぞれについて、ブラシノライドによってアップレギュレートおよびダウンレギュレートされる遺伝子群を見出した。2倍の変動を閾値にして選択すると1488遺伝子がブラシノライド処理で変動することが確認できた。

[0041] 実施例2 遺伝子発現比データを用いたシグナル伝達の中流から下流に位置するような機能性因子、転写因子・調節因子の探索

シロイヌナズナにおいて、さまざまな組織や環境刺激に対してのアレイ実験に基づく網羅的発現解析データとして、AFGC(Arabidopsis Functional Genomics

Consortium)が行ったマイクロアレイプロジェクトのデータを利用した。このデータは、TAIR(The Arabidopsis Information Resource)のFTPサイト(ftp://ftp.arabidopsis.org/home/tair/Microarrays/analyzed_data/)からafgc_data_397_061703.zipとして入手できる。

この397のアレイ実験に基づく発現比データを用いて、細胞壁関連酵素EXGT遺伝子ファミリーであるAt-XTH15, 別名、XTR7 (AGIコード:At4g14130)とAt-XTH16 (AGIコード:At3g23730)、細胞伸長に関係あるエクспанシン遺伝子EXPL1 (AGIコード:At3g45970)、ブラシノステロイドの生合成と代謝関連遺伝子CPD (AGIコード:At5g05690)に注目して、上記実施例1で発現変動のあった遺伝子群との相関係数を求めた。

その結果、ブラシノリドで2倍以上レスポンスして、注目遺伝子に相関係数が0.3以上で相関している遺伝子を57種類見出した。

[0042] 実施例3 遺伝子特異的に発現ノックダウンする配列の設計と作成

上記実施例2の57種類の遺伝子に対して遺伝子ノックダウンを行うため、遺伝子特異的な配列の設計およびDNA断片を作製した。

(1) 遺伝子特異的な配列の設計

遺伝子特異的なノックダウンを起こすために、他の遺伝子と類似性のない配列の設計およびDNA断片を作製した。すなわち、まず、シロイヌナズナのcDNAクローンの配列を含む全EST配列、ゲノム情報からのORF配列を用いて、ESTクラスタリングとアセンブルを行った結果、25,397個に分類された。これにより重なりのない転写配列データベースを作成した。この結果からcDNAクローンに関しては配列を推定した。BLASTのホモロジーサーチアルゴリズムを用いた類似性の解析を遺伝子配列毎に、転写配列データベースをもとに転写配列全体またはゲノム全体に対して行なった。その結果を配列の各塩基に対してポイントを与えていき、このポイント評価により最もホモロジーの低い領域を決定し、ノックダウンに用いるターゲット領域配列(長さ約300塩基)とした。また、cDNAクローンのない遺伝子に関しては、ゲノム配列から遺伝子特異的な配列(長さ約300塩基)を設計した。

[0043] (2) DNA断片の作製

シロイヌナズナcDNAクローンDNAあるいはシロイヌナズナゲノムDNAを鋳型に、それぞれの遺伝子のターゲット領域の両末端の20base配列にM4配列、RV配列を付加したプライマー(例えば、BRR1遺伝子用としては、配列表の配列番号1及び2記載の塩基配列を有する)を用いて、PCRあるいはICAN法で遺伝子増幅して作製した。得られた各DNA断片は、アガロースゲル電気泳動で純度を、吸光度で収量を確認した。また、各DNA断片をMegaBaseシーケンサーを用いて配列解析を行ったところ、目的のターゲット領域の配列が確認された。

[0044] 実施例4 植物への遺伝子導入のためのアグロバクテリウム作製

(1) Gateway system(インビトロジェン社製)を用いたコンストラクト作製

上記実施例3で作製した遺伝子特異的DNA断片を鋳型とし、配列番号3及び4で示される塩基配列を有するプライマー(インビトロジェン社製)を用いたPCRにより約300bpのDNA断片を増幅した。PCR Cloning System with Gateway Technology(インビトロジェン社製)を用いてそのプロトコールに従って、BP反応を行いエントリークローンを作製した。次に、Gateway LR Clonase Enzyme Mix(インビトロジェン社製)を用いてそのプロトコールに従って、LR反応を行い、pKRH101ベクターにターゲット遺伝子がアンチセンス、センス方向で挿入されたバイナリーベクタープラスミドを作製した。そのバイナリーベクタープラスミドを図1に示す。

[0045] 上記pKRH101ベクターは、植物でのRNA干渉による遺伝子発現ノックダウン用に作製したベクターであり、以下の手順で作製した。

まず、pBI221プラスミド(クロンテック社製)を制限酵素XbaIで切断後ブランディング、脱リン酸化したプラスミドに、Gateway Vector Conversion System(インビトロジェン社製)のRfC. 1カセットをライゲーションして、35S promoter-attR1-CmR-ccdB-attR2-GUSの向きにカセットが挿入されたプラスミドpBI221-Rを作製した。

次に、pBI221-RプラスミドをSnaBIとSacIで切断してGUS配列の3'側の部分を取り除いたプラスミド断片に、次の手順で作製したRfC. 1カセットの末端が平滑末端とSacIサイトを持つカセットをライゲーションして、GUS配列の5'側の部分をループ構造とするRfC. 1カセットがインバーティドリピート構造をとるプラスミドpBI221-R2

を作製した。

- [0046] RfC. 1カセットの末端が平滑末端とSacIサイトを持つカセットは、pUC19プラスミド(タカラバイオ社製)をSphIとKpnIで切断した後ブランディング、脱リン酸化したプラスミドに、Gateway Vector Conversion SystemのRfC. 1カセットをライゲーションして、SacIサイト-attR1-CmR-ccdB-attR2-HindIIIサイトの向きにカセットが挿入されたプラスミドを作製し、これをHindIIIで切断後ブランディングし、その後さらにSacIで切断することにより作製した。

最後に、植物への導入用のバイナリーベクターとするために、バイナリーベクターpIG121-Hmプラスミド(Ohta s., Mita S., Hattori T., Nakamura K., Plant Cell Physiol., 31, 805-813, 1990)をHindIIIとSacIで切断し、35S promoter-intron-GUSの配列を除き、そこにpBI221-R2プラスミドをHindIIIとSacIで切断し精製したHindIIIサイト-35S promoter-attR1-CmR-ccdB-attR2-GUS-attR2-ccdB-CmR-attR1-SacIサイトのDNA断片をライゲーションしてプラスミドpKRH101を作製した。

- [0047] (2)アグロバクテリウムの形質転換

エレクトロポレーション法を用いて、上記(1)で得られたプラスミドによるアグロバクテリウムEHA105の形質転換を行い、カナマイシン 100 μ g/ml、ハイグロマイシン 100 μ g/mlを含むLB寒天培地にて、28°C、2晩、静置培養を行った。配列表の配列番号5及び6、さらに配列番号7及び8記載の塩基配列を有するプライマーを用いてコロニーPCRを行い、導入遺伝子を有するアグロバクテリウムを選抜し、形質転換アグロバクテリウムを作製した。

- [0048] 実施例5 ノックダウン植物の作製

- (1)シロイヌナズナの播種、育成

シロイヌナズナ(コロンビア株)の種子をロックウール(アラシシステム社製)に播種し、24時間 明条件にて約3週間栽培後、摘心を行い、16時間明、8時間 暗条件で数日から一週間放置した。

- [0049] (2)アグロバクテリウムの感染

上記実施例4で作製した組換えアグロバクテリウムをシロイヌナズナに感染させた。

配列表の配列番号9(塩基配列)及び10(アミノ酸配列)記載のBRR1(AGIコード: At1g22500)の遺伝子ノックダウン用のアグロバクテリウムは、2鉢の植物体に感染し、植物体をそれぞれ209-1と209-2と命名した。上記バイナリーベクターに挿入した塩基配列を配列表の配列番号11に示す。

感染は、カナマイシン(最終濃度 100 μ g/ml)、ハイグロマイシン(最終濃度 100 μ g/ml)を含むLB液体培地にて28℃ 二晩培養した組み換えアグロバクテリウムの菌体を回収後、湿潤用懸濁培地(1/2×MS塩、1/2×Gamborg B5ビタミン、5%ショ糖(v/v)、0.5g/L-MES)に懸濁し、つぼみに適下することにより行った。感染後の植物体を長日条件にて栽培した。

[0050] (3) T1種子の選抜

感染した植物体の自家受粉により得られた種子を、カナマイシン 50 μ g/ml、ハイグロマイシン 10 μ g/ml、カルベニシリン 100 μ g/mlを含むMS0培地上に移植し、発芽・生育が旺盛なT1個体(209-1-1~209-1-4および209-2-1~209-2-3)を選抜、ロックウールに移植し、育成した。

(4) T2植物体の選抜とT3種子の取得

選抜されたトランスジェニックT1植物体の種子(T2種子)を、上記(3)と同様の選択培地に移植し、著しく生育旺盛な遺伝子型がホモであると予想されたT2植物体を選抜後、育成し、T3種子を取得した。

T1植物体、すなわち209-1-4および209-2-1より得られた種子から栽培したT2植物体の形態について図2に示す。図中、「Wild」は野生株、「209」は209-1-4のT2植物体を示す。

[0051] 図2に示したように、栽培した非形質転換植物体(wild type、野生型)に比較して、本発明の植物体のいずれもが著しく背丈が低く、茎の量が多い表現型を示すことが確認できた。

[0052] (5) T3植物体の表現型

遺伝子型がホモであると予想されたT2植物体209-1-4-3、209-2-1-1の自家受粉により得られたT3種子を、青色・赤色光照射下で11日間育成した。その結果を図3に示す。

[0053] 図3に示したように、非形質転換体(wild type、野生型)と比較して、本発明の植物体は、胚軸長が短くなっていることが確認できた。

また、上記(3)と同様の選択培地プレートで栽培したところ、すべての種子が旺盛に生育したので、導入遺伝子型がホモであることが同定された。

[0054] 実施例6 ノックダウンラインにおけるターゲット遺伝子発現量の確認

本発明のノックダウンラインにおけるターゲット遺伝子のRNA干渉を調べるためにリアルタイムPCRを行った。

(1) 試料の調製

青赤光下で12日間生育させたシロイヌナズナ野生株、ノックダウンライン209-1-4-3ならびに209-2-1-1より、芽生えを回収した。トリゾル試薬(ギブコ社製)により全RNAを抽出した後、RNase free DNaseI(タカラバイオ社製)によりゲノムDNAを除去した。

[0055] (2) 逆転写反応およびリアルタイムPCR

逆転写反応およびリアルタイムPCRは、SYBR(登録商標) RT-PCR Kit (Perfect Real Time、タカラバイオ社製)を用い、添付のプロトコールに従って行った。すなわち、野生株および209-1-4-3、209-2-1-1の全RNAを鋳型とし、Random hexamerをプライマーに用いた逆転写反応により一本鎖cDNAを合成した。なお、野生株の全RNAについては、検量線作成用として、段階希釈したものを用いた。次に、野生株およびノックダウンラインの2個体から調製した一本鎖cDNAを鋳型とし、Smart Cycler II SystemによるリアルタイムPCRを行った。

[0056] 増幅のターゲットとした18S rRNA遺伝子の増幅には、配列表の配列番号12、13記載の塩基配列を有するプライマーを用いた。また、BRR1遺伝子については、3つの領域、すなわち導入DNA配列の一部(A:導入領域内)、および導入配列から離れた部位(B:5'側、またはC:3'側の領域)を増幅のターゲットとした。当該導入配列の増幅には、配列表の配列番号14、15記載の塩基配列を有するプライマー(以下、導入領域内プライマーと呼ぶ)を用いた。遺伝子導入配列から離れた部位の増幅には、配列表の配列番号16、17記載の塩基配列を有するプライマー(以下、導入領域外5'プライマーと呼ぶ)、および配列表の配列番号18、19記載の塩基配列を

有するプライマー(以下、導入領域外3'プライマーと呼ぶ)を用いた。

上記プライマー対を用いてリアルタイムPCR実施後、得られたCt値をそれぞれの検量線に代入し、初期鋳型量を算出した。18S rRNAの発現量により、個体間のRNA量を補正した後、ノックダウンライン2個体におけるBRR1遺伝子のRNAの相対量、すなわち野生株における発現量を100とした場合のRNA含量を算出した。その結果を図4に示す。図4中、縦軸は野生株に対するBRR1遺伝子のRNA発現量の相対量%を示し、横軸は、ノックダウンラインの種類を示す。

[0057] 図4に示したように、植物体に導入した遺伝子配列自身のRNA発現量は増加したが、導入配列以外の領域のRNA発現量は、半分以下に抑えられ、最大27%に抑えられていた。従って、RNA干渉の作用により、BRR1遺伝子のRNA発現が抑制されたと考えられた。

また、RNA発現抑制の効率が高い209-1-4-3において上記実施例5の胚軸長が約5mm、RNA発現抑制の効率がやや低い209-2-1-1の胚軸長が約7.5 mm、野生型が約9mmであることから、RNA発現抑制の度合いと胚軸長の表現型とは密接に相関していることが確認できた。

(3) ノーザンブロットング解析

さらに野生株、ノックダウンラインの芽生えTotal RNAについて、DIG標識したPCRプローブを用いたノーザン解析を行なった。ノーザン解析は、常法に従って行った。その結果、ノックダウンラインでのみ、20 nt付近にバンドが検出され、BRR1由来のsiRNAの生成が確認できた。

図面の簡単な説明

[0058] [図1]本発明で用いるバイナリーベクターの模式図である。

[図2]本発明のノックダウンラインの形態の比較を示す図である。

[図3]本発明のノックダウンラインの胚軸長の比較を示す図である。

[図4]本発明のノックダウンラインのRNA干渉を示すグラフである。

産業上の利用可能性

[0059] 本発明により、農業上重要な形質である矮性の植物体を効率よく生産することができる。また、目的の植物の収量を増加させることができる。さらに本発明により任意の

遺伝子に関連する転写因子や任意の遺伝子の調節因子を効率的に見出すことができる。すなわち、人為的な単一の遺伝子変異により効率的に農業上重要な形質である矮性の植物体を作成することが可能となり、有用農作物生産の分野において有用な技術である。

配列表フリーテキスト

- [0060] SEQ ID No:1; A sequence of designed oligonucleotide PCR primer for amplifying BRR1 gene
- SEQ ID No:2; A sequence of designed oligonucleotide PCR primer for amplifying BRR1 gene
- SEQ ID No:3; A sequence of designed oligonucleotide PCR primer for using Gateway system
- SEQ ID No:4; A sequence of designed oligonucleotide PCR primer for using Gateway system
- SEQ ID No:5; A sequence of designed oligonucleotide primer for using colony PCR
- SEQ ID No:6; A sequence of designed oligonucleotide primer for using colony PCR
- SEQ ID No:7; A sequence of designed oligonucleotide primer for using colony PCR
- SEQ ID No:8; A sequence of designed oligonucleotide primer for using colony PCR
- SEQ ID No:11; A fragment of BRR1 gene for inserting binary vector
- SEQ ID No:12; A sequence of designed oligonucleotide PCR primer for amplifying 18S rRNA
- SEQ ID No:13; A sequence of designed oligonucleotide PCR primer for amplifying 18S rRNA
- SEQ ID No:14; A sequence of designed oligonucleotide PCR primer for amplifying BRR1 gene
- SEQ ID No:15; A sequence of designed oligonucleotide PCR primer for amplifying BRR1 gene
- SEQ ID No:16; A sequence of designed oligonucleotide PCR primer for amplifying BRR1 gene

SEQ ID No:17; A sequence of designed oligonucleotide PCR primer for amplifying BRR1 gene

SEQ ID No:18; A sequence of designed oligonucleotide PCR primer for amplifying BRR1 gene

SEQ ID No:19; A sequence of designed oligonucleotide PCR primer for amplifying BRR1 gene

請求の範囲

- [1] 植物の形質を改変する方法であって、植物個体中でブラシノステロイド刺激に対してその発現が変動し、XTR7 (At4g14130) と発現変動の相関が高く、かつリング・フィンガー・ドメインを有するポリペプチドをコードする遺伝子の発現を抑制することを特徴とする植物の形質改変方法。
- [2] 野生型植物と比較して、下記から選択される形質の改変がもたらされる請求項1記載の植物の形質改変方法；
- (a) 矮性
 - (b) 茎数の増加；および
 - (c) 葉の暗緑色化。
- [3] 植物個体中で下記の遺伝子の発現を抑制することを特徴とする請求項1または2記載の植物の形質改変方法：
- (1) 配列表の配列番号10に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする遺伝子；
 - (2) 配列表の配列番号10に示されるアミノ酸配列に1～数個のアミノ酸残基の置換、欠失、または挿入がなされたアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする遺伝子であって、植物個体中での発現が抑制されると植物の形質が改変される遺伝子；および
 - (3) (1) または (2) のポリペプチドをコードする遺伝子の相補鎖に厳密な条件下でハイブリダイズする遺伝子であって、植物個体中での発現が抑制されると植物の形質が改変される遺伝子。
- [4] RNA干渉により遺伝子の発現を抑制する請求項1～3いずれかに記載の植物の形質改変方法。
- [5] 配列表の配列番号9記載の塩基配列あるいはその断片の塩基配列及び／又はその相補鎖の塩基配列を有する核酸を使用する請求項4記載の植物の形質改変方法。
- [6] 野生型植物と比較して、矮性、茎数の増加あるいは葉の暗緑色化のいずれかの形質の改変に関与する遺伝子であって；
- (1) 配列表の配列番号10に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする

遺伝子;

(2)配列表の配列番号10に示されるアミノ酸配列に1～数個のアミノ酸残基の置換、欠失、または挿入がなされたアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする遺伝子; および

(3) (1)または(2)のポリペプチドをコードする遺伝子の相補鎖に厳密な条件下でハイブリダイズする遺伝子。

[7] 植物個体の形質の改変に関与する遺伝子の発現を抑制する核酸であって、下記特徴を有する核酸;

(1)配列表の配列番号10に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする遺伝子又はその相補鎖に厳密な条件下でハイブリダイズする核酸;及び

(2)配列表の配列番号10に示されるアミノ酸配列に1～数個のアミノ酸残基の置換、欠失、または挿入がなされたアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする遺伝子又はその相補鎖に厳密な条件下でハイブリダイズする核酸。

[8] 配列表の配列番号9記載の塩基配列あるいはその断片の塩基配列及び／又はその相補鎖の塩基配列を有する請求項7記載の核酸。

[9] 請求項1～5いずれか記載の方法で作成された、形質が改変された植物。

[10] 下記から選択される形質の改変がもたらされている、請求項9記載の植物;

(a)矮性

(b)茎数の増加;および

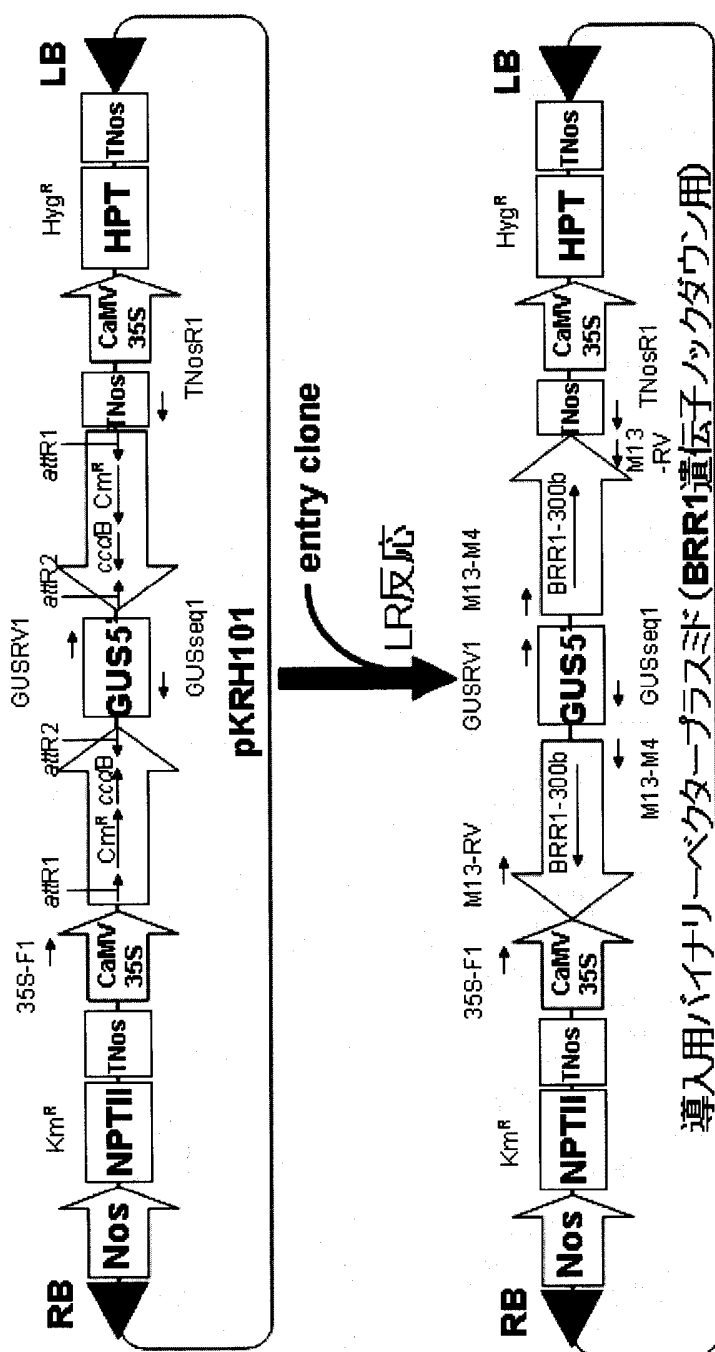
(c)葉の暗緑色化。

[11] (1)ブラシノステロイドによる刺激に応答する遺伝子を探索する工程;

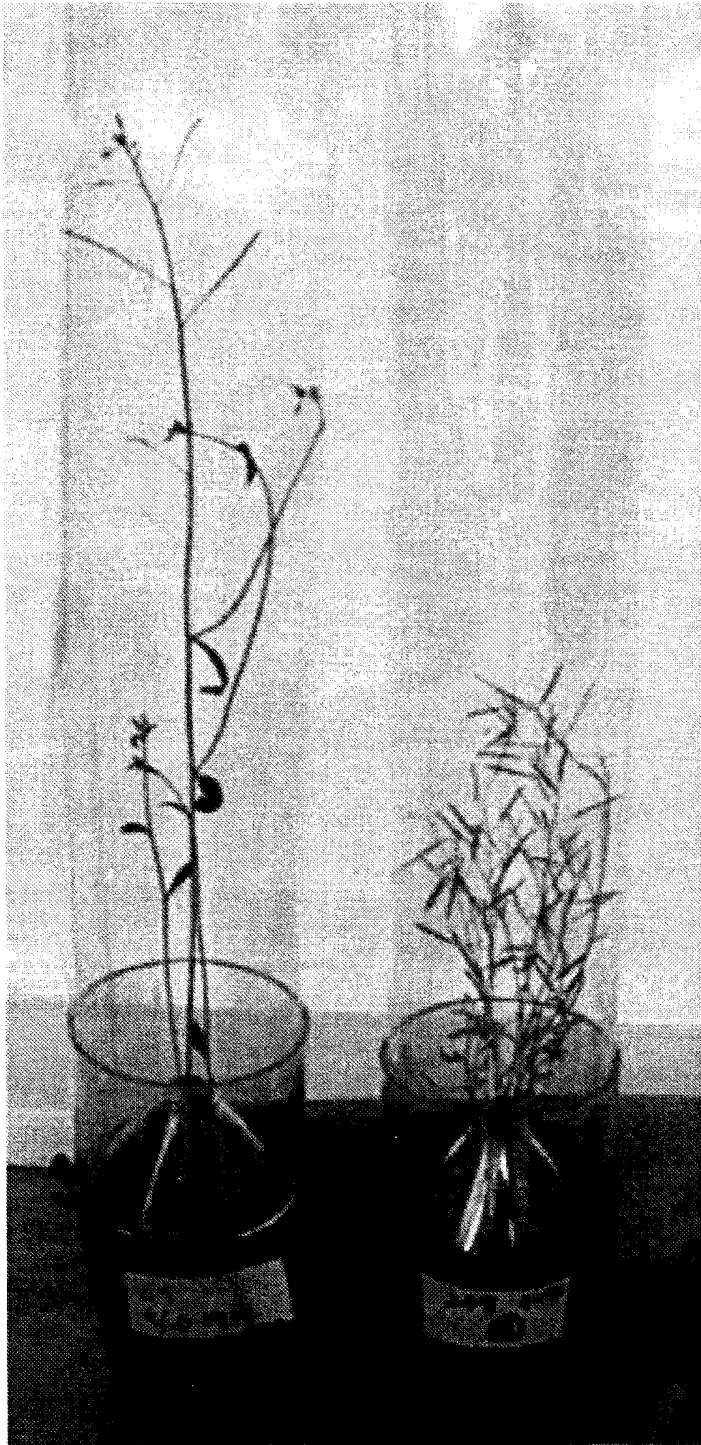
(2)上記(1)工程で得られた遺伝子群より細胞壁の再構築を担う遺伝子との間に遺伝子発現比の相関の高い遺伝子を集める工程;および

(3)上記(2)工程で選択された遺伝子の機能を、前記遺伝子の発現を制御した形質転換植物を作成して確認する工程を包含することを特徴とする、前記細胞壁の再構築に関連する植物の形質改変に有用な遺伝子の探索方法。

[図1]

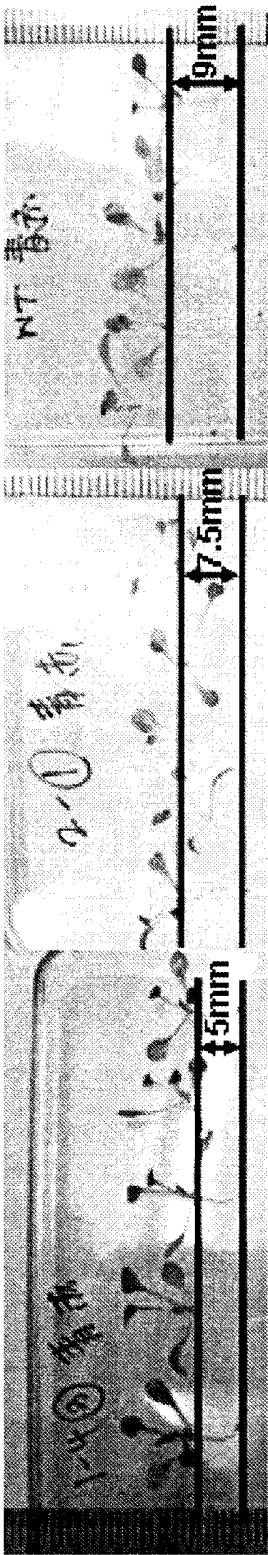


[図2]



Wild 209

[図3]

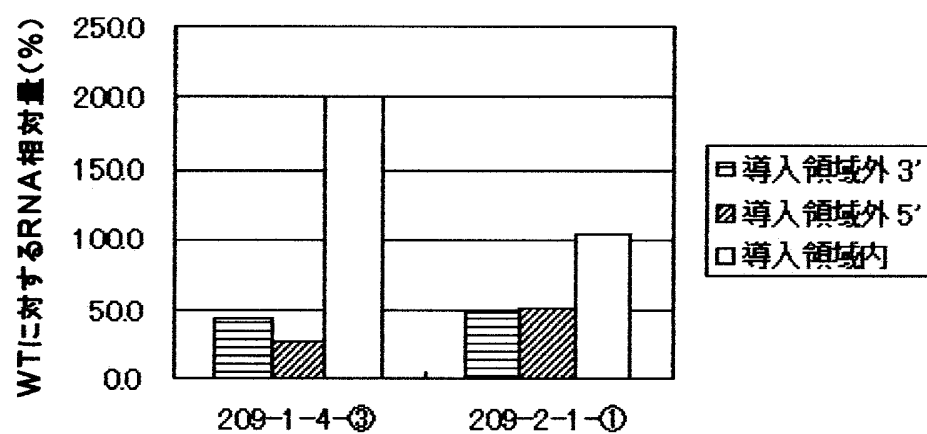


209-1-4

209-2-1

Wild

[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/308356

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/29(2006.01), **A01H5/00**(2006.01), **C12Q1/68**(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)

A01H5/00, C12N15/00-15/90, C12Q1/68

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)

WPI (STN), BIOSIS (STN), AGRICOLA (STN), Medline (STN), JSTPlus (JDreamII),
Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/SwissProt/PIR/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	"Accession: NM_102099 [gi: 18395125], Definition: Arabidopsis thaliana zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein (At1g22500) mRNA, complete cds.", NCBI Sequence Revision History [online]; 23 February, 2005 (23.02.05) updated, NCBI, <URL:http://www.ncbi. nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?18395125:NCBI: 8510890> [retrieved on 04 July, 2006 (04.07.06)] Retrieved from the Internet: <URL:http://www. ncbi.nlm.nih.gov/entrez/sutils/girevhist.cgi? val=NM_102099>	1-10
X	STONE S.L. et al., Functional analysis of the RING-type ubiquitin ligase family of Arabidopsis., Plant Physiol., 2005.01, Vol.137, pages 13 to 30	1-10

☒ 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
13 July, 2006 (13.07.06)

Date of mailing of the international search report
25 July, 2006 (25.07.06)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/308356

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	US 2003/0101481 A1 (ZHANG J. et al.), 29 May, 2003 (29.05.03), (Family: none) (SEQ ID:111, 112)	6-8/1-5, 9, 10
Y	MUSSIG C. and ALTMANN T., Genomic brassinosteroid effects., J. Plant Growth Regul., 2003, Vol.22, pages 313 to 324	11
Y	MUSSIG C. et al., Brassinosteroid-regulated gene expression., Plant Physiol., 2002, Vol.129, pages 1241 to 1251	11
Y	GODA H. et al., Microarray analysis of brassinosteroid-regulated genes in Arabidopsis., Plant Physiol., 2002, Vol.130, pages 1319 to 1334	11
Y	YOKOYAMA R. and NISHITANI K., Functional diversity of xyloglucan-related proteins and its implications in the cell wall dynamics in plants., Plant Biol., 2000, Vol.2, pages 598 to 604	11
A	"Accession: BH753950 [gi: 19034147], Definition: SALK_033680.26.25.x Arabidopsis thaliana TDNA insertion lines Arabidopsis thaliana genomic clone SALK_033680.26.25.x, genomic survey sequence.", NCBI Sequence Revision History [online]; 01 March, 2002 (01.03.02) uploaded, NCBI, <URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ viewer.fcgi?19034147:GSS:3511568> [retrieved on 04 July, 2006 (04.07.06)] Retrieved from the Internet:<URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ entrez/sutils/girevhist.cgi?val=BH753950>	1-10
A	SERRANO M. and GUZMAN P., Isolation and gene expression analysis of Arabidopsis thaliana mutants with constitutive expression of ATL2, an early elicitor-response RING-H2 zinc-finger gene. Genetics, 2004, Vol.167, pages 919 to 929 (Figure 6, ATL15)	1-10
A	GODA H. et al., Comprehensive comparison of auxin-regulated and brassinosteroid-regulated genes in Arabidopsis., Plant Physiol., 2004, Vol.134, pages 1555 to 1573	11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/308356

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The method of screening a gene as claimed in claim 11 is neither a method of producing a specific gene (At1g22500), which is obtained by this selection method and corresponds to the compound as claimed in claims 6 and 7, nor a method of using the same. Moreover, no specific structure of a compound required for functioning as "a gene useful in modifying plant characters" in the above selection method is suggested. Thus, it does not appear that the invention relating to a method of selecting a gene as claimed in claim 11, the inventions relating to a gene which corresponds to the compound as claimed in claims 6 to 8 and the inventions wherein this gene is used as claimed in (continued to extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

the

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee..
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/308356

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet (2)

claims 1 to 5, 9 and 10 are a group of inventions so linked as to form a single general invention concept. Such being the case, the present application has two different invention groups, i.e., the inventions according to claims 1 to 10 and the invention according to claim 11. Thus, the present application does not comply with the requirement of unity of invention.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/29 (2006.01), A01H5/00 (2006.01), C12Q1/68 (2006.01)			
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.Cl. A01H5/00, C12N 15/00 - 15/90, C12Q 1/68			
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) WPI (STN), BIOSIS (STN), AGRICOLA (STN), Medline (STN), JSTPlus (JDreamII), Genbank/EMBL/DBJ/GeneSeq, UniProt/SwissProt/PIR/GeneSeq			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示		関連する 請求の範囲の番号
X	“Accession: NM_102099 [gi: 18395125], Definition: Arabidopsis thaliana zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein (At1g22500) mRNA, complete cds.” NCBI Sequence Revision History [online]; 23-Feb.-2005 updated, NCBI, <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?18395125:NCBI:8510890> [retrieved on 04 July 2006] Retrieved from the Internet: <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/sutils/girevhist.cgi?val=NM_102099>		1-10
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 13.07.2006		国際調査報告の発送日 25.07.2006	
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) 中村 正展 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4 B 3537

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	STONE S L et al., Functional analysis of the RING-type ubiquitin ligase family of Arabidopsis., Plant Physiol., 2005.01, Vol. 137, p. 13-30.	1-10
X/ A	US 2003/0101481 A1 (ZHANG J et al.) 2003.05.29 (ファミリーなし) (SEQ ID:111, 112)	6-8/ 1-5, 9, 10
Y	MUSSIG C and ALTMANN T, Genomic brassinosteroid effects., J. Plant Growth Regul., 2003, Vol. 22, p. 313-324.	11
Y	MUSSIG C et al., Brassinosteroid-regulated gene expression., Plant Physiol., 2002, Vol. 129, p. 1241-1251.	11
Y	GODA H et al., Microarray analysis of brassinosteroid-regulated genes in Arabidopsis., Plant Physiol., 2002, Vol. 130, p. 1319-1334.	11
Y	YOKOYAMA R and NISHITANI K, Functional diversity of xyloglucan-related proteins and its implications in the cell wall dynamics in plants., Plant Biol., 2000, Vol. 2, p. 598-604.	11
A	“Accession: BH753950 [gi: 19034147], Definition: SALK_033680.26.25.x Arabidopsis thaliana TDNA insertion lines Arabidopsis thaliana genomic clone SALK_033680.26.25.x, genomic survey sequence.” NCBI Sequence Revision History [online]; 01-Mar.-2002 uploaded, NCBI, <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?19034147:GSS: 3511568 > [retrieved on 04 July 2006] Retrieved from the Internet: <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/sutils/girevhist.cgi?val= BH753950 >	1-10

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	SERRANO M and GUZMAN P, Isolation and gene expression analysis of Arabidopsis thaliana mutants with constitutive expression of ATL2, an early elicitor-response RING-H2 zinc-finger gene. Genetics, 2004, Vol. 167, p. 919-929. (Figure 6, ATL15)	1-10
A	GODA H et al., Comprehensive comparison of auxin-regulated and brassinosteroid-regulated genes in Arabidopsis., Plant Physiol., 2004, Vol. 134, p. 1555-1573	11

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（P C T 17条(2) (a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってP C T規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるときの国際調査機関は認めた。

請求の範囲11に記載された遺伝子の選抜方法は、該選抜方法により得られるものであって請求の範囲6及び7に記載された化合物である特定(At1g22500)の遺伝子の製造方法ではなく、これを使用する方法でもない。そして該選抜方法において「植物の形質改変に有用な遺伝子」として機能するために要求される化合物の特定構造に関する示唆もないので、請求の範囲11に記載された遺伝子の選抜方法に係る発明と、請求の範囲6乃至8に記載された化合物である遺伝子に係る発明並びに該遺伝子を使用する請求の範囲1乃至5、9及び10に係る発明とは、単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとは言えない。したがって、この出願の請求の範囲には、請求の範囲1乃至10に係る発明と、請求の範囲11に係る発明という別異の2つの発明群が包含されており、この出願は発明の単一性の要件を満たさない。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付を伴う異議申立てがなかった。