

(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
2010年12月16日(16.12.2010)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2010/143749 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/00 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/060256
- (22) 国際出願日: 2010年6月10日(10.06.2010)
- (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 2009-139477 2009年6月10日(10.06.2009) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人鹿児島大学(KAGOSHIMA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒8908580 鹿児島県鹿児島市郡元一丁目2番24号 Kagoshima (JP). 独立行政法人科学技術振興機構(JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒3320012 埼玉県川口市本町四丁目1番8号 Saitama (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 坂田祐介(SAKATA, Yusuke) [JP/JP]; 〒8908580 鹿児島県鹿児島市郡元一丁目2番24号国立大学法人鹿児島大学内 Kagoshima (JP). 橋本文雄

(HASHIMOTO, Fumio) [JP/JP]; 〒8908580 鹿児島県鹿児島市郡元一丁目2番24号国立大学法人鹿児島大学内 Kagoshima (JP). 清水圭一(SHIMIZU, Keiichi) [JP/JP]; 〒8908580 鹿児島県鹿児島市郡元一丁目2番24号国立大学法人鹿児島大学内 Kagoshima (JP). ウレド ラバ イセルモ(OULD, Rabah Isselmou) [MR/JP]; 〒8800805 宮崎県宮崎市橘通東1丁目7番4号独立行政法人科学技術振興機構 J S T イノベーションセンター宮崎内 Miyazaki (JP).

(74) 代理人: 平木祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.); 〒1050001 東京都港区虎ノ門4丁目3番20号 神谷町MTビル19階 Tokyo (JP).

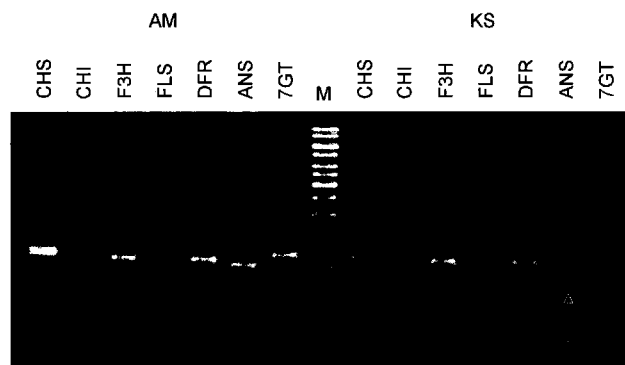
(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR SELECTION OF EUSTOMA GRANDIFLORUM (RAF.) SHINN. CAPABLE OF HAVING WHITE FLOWERS

(54) 発明の名称: 白色花を生じるトルコギキョウ[Eustoma grandiflorum (Raf.) Shinn.]を選別する方法

図 1



(57) Abstract: A gene marker associated with white flowers of a plant *Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn.; a method for selecting a plant *Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn. that can have white flowers before flowering or among from colored varieties utilizing the marker, specifically a method for selecting a plant *Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn. that can have white flowers, which comprises detecting either one of a marker associated with white flowers or a maker associated with colored followers in an anthocyanin synthetase (ANS) gene collected from a DNA sample of *Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn.; and a kit for achieving the method.

(57) 要約:

[続葉有]

WO 2010/143749 A1



(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, 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 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, 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 (条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

本発明は、トルコギキョウの白色花に関連する遺伝子マーカーの開発、及び該マーカーを利用した、開花前に又は有色品種から、白色花を生じるトルコギキョウを選別する方法、具体的には、トルコギキョウ[Eustoma grandiflorum (Raf.) Shinn.]の DNA サンプルから、アントシアニン合成酵素(ANS)遺伝子中の白色花関連マーカー又は有色花関連マーカーのいずれかを検出することを含む、白色花を生じるトルコギキョウを選別する方法、及び該方法を実施するためのキットに関する。

明 細 書

発明の名称

白色花を生じるトルコギキョウ [Eustoma grandiflorum (Raf.) Shinn.] を選別する方法

技術分野

本発明は、トルコギキョウ [Eustoma grandiflorum (Raf.) Shinn.] のアントシアニン合成酵素 (ANS) 遺伝子中の白色花関連マーカーを利用した、白色化を生じるトルコギキョウの選別方法、及び白色化を生じるトルコギキョウを選別するためのキットに関する。

背景技術

トルコギキョウ [Eustoma grandiflorum (Raf.) Shinn.] は、リンドウ科に属し、アメリカ南西部を原産とする一年性の草本である。本種は、その大きな花と長い茎、そして花持ちのよさの点で、日本で最も人気の高い切花の一つとなっている。典型的なトルコギキョウの野生種の花色は紫色であり、その主要色素はデルフィニジン系のアントシアニンである。主に日本における商業育種によって、ピンク、白、クリーム色、藤色、赤などの多様な花色の系統が作出されているが、更なる花色の多彩化、効率的な花色育種法が望まれている。

例えば、花色の複対立遺伝子が提唱されているが、白色花の形成機構はまだ DNA レベルでは詳しく証明されていない（特許文献 1）。

一方、野田らは、トルコギキョウでアントシアニン合成に関わるフラボノール合成酵素 (FLS)、ジヒドロフラボノール 4 還元酵素 (DFR)、カルコン合成酵素 (CHS)、アントシアニン合成酵素 (ANS) などの発現を詳しく解析しているが、これらの遺伝子と白色花との関係は不明である（非特許文献 1）。

先行技術文献

特許文献

特許文献 1 国際公開 W02004/103065 号パンフレット

非特許文献

非特許文献 1 N. Noda et al., 「Regulation of gene expression involved in flavonol and anthocyanin biosynthesis during petal development in *lisianthus* (*Eustoma grandiflorum*)」 *Physiologia Plantarum* 2004 年、第 122 巻、305-313.

発明の概要

上記のような状況下、現在までは、個々のトルコギキョウが白色花か否かは、生育の後期に花が形成されるまで栽培を行わないと判別することができなかった。また、有色花系統が白色花遺伝子をヘテロでもっている場合には、子孫を作って花が咲くまで調査を行わないと白色花を生じるか判別できないため、白色花を生じる可能性を試験当代で判定することはできなかった。

したがって、トルコギキョウの白色花発現に関係する特定の遺伝子マーカーを見出し、該遺伝子マーカーに基づいて、開花前に又は有色品種から、白色花を生じるトルコギキョウを選別することができれば、白色花を有するトルコギキョウを効率的に育種できると考えられる。

そこで本発明は、トルコギキョウの白色花に関連する遺伝子マーカーの開発、及び当該マーカーを利用した、開花前に又は有色品種から、白色花を生じるトルコギキョウを選別する方法を提供することを目的とする。

本発明者らは、白色花及び有色花のトルコギキョウにおいて、アントシアニン生合成に関与する遺伝子群を調査する過程で、各遺伝子の配列情報に基づいて設計したプライマーを用いて RT-PCR 分析を行ったところ、白色花の系統ではアントシアニン合成酵素 (ANS) の増幅が認められないことを確認した (図 1)。

そこで白色花系統と有色花系統との間で ANS 遺伝子の塩基配列を調査し、両者を比較したところ、エクソンの配列は特定の連続した 94 ヌクレオチドの欠失を除いて約 98% 同一であり、イントロンの配列においては顕著な違いがあることを見出した (図 2 及び 8)。

本発明は、上記塩基配列の差異に基づく白色花のトルコギキョウの選別方法であり、以下の特徴を包含する。

(1) トルコギキョウ [*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn.] の DNA サンプルから、アントシアニン合成酵素 (ANS) 遺伝子中の白色花関連マーカ―又は有色花関連マーカ―のいずれかを検出することを含む、白色花を生じるトルコギキョウを選別する方法。

(2) 白色花関連マーカ―は、配列番号 2 若しくは 20 に示すポリヌクレオチド、又はそれらのポリヌクレオチドにおいて 1~複数個のヌクレオチドの置換、付加、欠失若しくは挿入を含むポリヌクレオチドである、上記(1)記載の方法。

(3) 有色花関連マーカ―は、配列番号 1 若しくは 19 に示すポリヌクレオチド、又はそれらのポリヌクレオチドにおいて 1~複数個のヌクレオチドの置換、付加、欠失若しくは挿入を含むポリヌクレオチドである、上記(1)記載の方法。

(4) 有色花関連マーカ―は、配列番号 1 のヌクレオチド 2366~2459 若しくは配列番号 19 のヌクレオチド 2379~2472、又は配列番号 1 のヌクレオチド 2366~2459 若しくは配列番号 19 のヌクレオチド 2379~2472 において、1~数個のヌクレオチドの置換、付加、欠失若しくは挿入を含むポリヌクレオチドである、上記(1)記載の方法。

(5) 白色花関連マーカ―及び有色花関連マーカ―の双方を検出することにより、ANS 遺伝子の遺伝子型を決定することをさらに含む、上記(1)記載の方法。

(6) 配列番号 1 のヌクレオチド 2366~2459 又は配列番号 19 のヌクレオチド 2379~2472 に隣接する 5' 側配列及び 3' 側配列に特異的にアニーリングすることができる正方向プライマー及び逆方向プライマーからなるプライマーセットによる DNA サンプルの PCR 増幅と、その後の電気泳動によって前記決定を行うことを特徴とする、上記(5)記載の方法。

(7) 前記プライマーセットは、配列番号 3 に示す正方向プライマー及び配列番号 4 に示す逆方向プライマーからなることを特徴とする、上記(6)記載の方法。

(8) 白色花関連マーカ―がホモ型で存在する場合に、トルコギキョウの花色を白色と判定することをさらに含む、上記(5)記載の方法。

(9) 白色花関連マーカ―がヘテロ型で存在する場合に、試験当代は有色花であるが、自殖により白色花を生じるものであると判定することをさらに含む、上記(5)記載の方法。

(10) 以下の(i)又は(ii)のいずれか1つ以上を含む、白色花を生じるトルコギキョウを選別するためのキット。

(i) 配列番号2若しくは20に示すヌクレオチド配列又はその相補的配列を有する核酸プローブ;及びストリンジェントな条件下で配列番号2若しくは20に示すヌクレオチド配列又はその相補的配列とハイブリダイズするが配列番号1及び19に示すヌクレオチド配列並びにその相補的配列とハイブリダイズしない、15塩基以上の長さを有する核酸プローブ、よりなる群から選択される少なくとも1つの白色花関連マーカを検出するための核酸プローブ

(ii) 配列番号1若しくは19に示すヌクレオチド配列又はその相補的配列を有する核酸プローブ;ストリンジェントな条件下で配列番号1若しくは19に示すヌクレオチド配列又はその相補的配列とハイブリダイズするが配列番号2及び20に示すヌクレオチド配列並びにその相補的配列とハイブリダイズしない、15塩基以上の長さを有する核酸プローブ;及び配列番号1のヌクレオチド2366～2459又は配列番号19のヌクレオチド2379～2472の少なくとも一部に特異的にハイブリダイズ可能であり、かつ15塩基以上の長さを有する核酸プローブ、よりなる群から選択される少なくとも1つの有色花関連マーカを検出するための核酸プローブ

(11) 前記核酸プローブは標識化されている、上記(10)記載のキット。

(12) 前記(i)及び(ii)を含むことを特徴とする、上記(10)記載のキット。

(13) 前記(i)の核酸プローブと、前記(ii)の核酸プローブとが異なる標識を有する、上記(12)記載のキット。

(14) 配列番号1のヌクレオチド2366～2459又は配列番号19のヌクレオチド2379～2472に隣接する5'側配列と3'側配列に特異的にアニーリングすることができる正方向プライマー及び逆方向プライマーからなるプライマーセットを含む、白色花を生じるトルコギキョウを選別するためのキット。

(15) 前記プライマーセットは、配列番号3に示す正方向プライマー及び配列番号4に示す逆方向プライマーからなることを特徴とする、上記(14)記載のキット。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願2009-139477号の明細書

及び/又は図面に記載される内容を包含する。

図面の簡単な説明

図1は、アントシアニン生合成に関与する様々な遺伝子の、有色花系統 AM 及び白色花系統 KS 間での発現差を示す電気泳動図を示す。なお図中の略記は次の通りである：CHS、カルコン合成酵素；CHI、カルコンイソメラーゼ；F3H、フラバノン 3-水酸化酵素；FLS、フラボノール合成酵素；DFR、ジヒドロフラボノール 4-還元酵素；ANS、アントシアニン合成酵素；7GT、アントシアニン 7-糖転移酵素；M、DNA サイズマーカー。

図2は、有色花系統 AM(配列番号 1)及び白色花系統 KS(配列番号 2)間での ANS 遺伝子の配列比較を示す。下線部は、白色系花系統で特徴的な連続した 94 ヌクレオチドの欠失部位を示す。

図3は、トルコギキョウの有色花系統 AM の花を示す。

図4は、トルコギキョウの白色花系統 KS の花を示す。

図5は、トルコギキョウの有色花系統 AM とトルコギキョウの白色花系統 KS の交雑個体の花を示す。

図6は、トルコギキョウの有色花系統 AM とトルコギキョウの白色花系統 KS の交雑個体の自殖後代の分離した集団の ANS 遺伝子の PCR の結果を示す。

図7は、トルコギキョウの栽培品種の ANS 遺伝子の PCR の結果を示す。各レーンのサンプルは次の通りである：M、DNA サイズマーカー；1、AM（有色花）；2、KS；3、AW；4、ロジーナグリーン；5、キュートグリーン；6、キングオブイエロー；7、あすかタイプホワイト；8、スピカホワイト；9、つくしの新雪（以上白色花）。

図8は、有色花系統 AM(配列番号 19)及び白色花系統 KS(配列番号 20)間での ANS 遺伝子の配列比較を示す。下線部は、白色系花系統で特徴的な連続した 94 ヌクレオチドの欠失部位を示す。

発明を実施するための形態

本発明は、白色花を生じるトルコギキョウ [*Eustoma grandiflorum* (Raf.)

Shinn.] を選別する方法（以下、本発明の方法という）に関する。

本発明でいう「白色花」とは、植物の花の主要色素の一つであるアントシアニンを全く生合成しないか、又はその生合成量が非常に少ないため、肉眼で色素の発現を識別できず白く見える花をいい、レモン色、黄色、緑色の花を含む。これに対して「有色花」とは、アントシアニンが肉眼で観察可能な程度に発現している、赤、青、紫、オレンジ、ピンク、黒色の花をいう。また本発明で使用する「白色花を生じる」とは、試験当代が白色花であること、及び試験当代は有色花であるが、自殖により潜在的に白色花を生じること、の両者を指す。

本発明の方法は、トルコギキョウの DNA サンプルから、アントシアニン合成酵素(ANS)遺伝子中の白色花関連マーカールを検出することを含んでいる。

本発明に使用されるトルコギキョウの DNA は、花形成前のトルコギキョウの組織、例えば種子、葉、根、茎から、又は、あらゆる時点での有色品種の組織(花を含む)から、抽出することにより取得することができる。DNA の抽出は、当業者に一般的な手法に従って行えばよい。すなわち、トルコギキョウの組織を微塵切りにし、これを適当なバッファー中でホモジナイズした後、フェノール抽出などの公知の DNA 抽出法にて、全 DNA を抽出する。またその際に使用する DNA 抽出キットは市販のものであってよく、例えば Plant Genomics DNA Mini キット(バイオジェーン社)などを使用することができる。

本発明でいう白色花関連マーカールとは、花組織で正常に ANS を発現する ANS 遺伝子にはない、花組織で正常に発現されない ANS 遺伝子に特徴的なヌクレオチド配列をいう。そのようなヌクレオチド配列として、配列番号 2 若しくは 20 に示す白色花品種の ANS 遺伝子(以下、白色花遺伝子と称する)又はその変異体、あるいは配列番号 2 又は 20 に示す白色花遺伝子において、それぞれ配列番号 1 又は 19 に示す有色花品種の ANS 遺伝子(以下、有色花遺伝子と称する)の対応領域と、塩基配列が顕著に異なる領域(以下、白色花領域と称する)を挙げることができる。

本発明でいう白色花遺伝子の変異体としては、配列番号 2 又は 20 に示すポリヌクレオチドにおいて 1~複数個のヌクレオチドの置換、付加、欠失若しくは挿入を含むポリヌクレオチドが挙げられる。ここで「複数個」とは、100 個以下、好ましくは 50 個以下、40 個以下、30 個以下、20 個以下、そして最も好ましくは 10

個以下の整数をいう。

また、本発明でいう白色花遺伝子の変異体としては、配列番号 2 又は 20 に示すポリヌクレオチドに対して 80%以上、好ましくは 90%以上、特に好ましくは 95%、96%、97%、98%、99%以上のヌクレオチド同一性を有するポリヌクレオチドが挙げられる。

さらに、本発明でいう白色花遺伝子の変異体としては、配列番号 2 又は 20 に示すポリヌクレオチドと相補的なポリヌクレオチドから成る DNA とストリンジेंटな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドが挙げられる。ここで、「ストリンジेंटな条件」は、当業者が適宜設定でき、例えば 30～50℃で、3～5xSSC、0.1～1%SDS 中で 1～15 時間のハイブリダイゼーション、その後の、例えば 0.1～2xSSC、0.1～1%SDS 中、室温～70℃での洗浄を含んでいる。ストリンジेंट条件の例は、例えば Sambrook ら、Molecular Cloning、A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989 に開示されている。

上記白色花遺伝子の変異体には、配列番号 2 若しくは 20 に示す塩基配列又はその相補的配列の突然変異体、及び異なるトルコギキョウ白色花品種のホモログが含まれる。

白色花領域は、例えば本願明細書の図 2 及び 8 に示される有色花遺伝子と白色花遺伝子の配列アライメントから、両配列間で顕著に異なる配列領域を選択することによって特定することができる。

本発明の方法において、白色花関連マーカの検出は、当業者に公知の任意の手法に従って行うことができる。そのような手法として、ANS 遺伝子領域の PCR 増幅と、その後の塩基配列決定による検出；白色花関連マーカの少なくとも一部に特異的にハイブリダイズする標識化プローブを用いた検出(例えばサザンハイブリダイゼーション、マイクロアレイなどの手法による)などを挙げることができる。上記手法による白色花関連マーカの検出に際し、当業者は適宜最適な条件を設定することができる。

具体的に、上記目的で使用される PCR プライマーの長さは、15～50 塩基、好ましくは 17～25 塩基の範囲で設定することができる。PCR 条件は、目的の ANS 遺伝子領域が増幅可能な限り限定されないが、例えば 94～95℃で 10 秒～1 分の変性、

50～65℃で10秒～1分間のアニーリング、72℃で30秒～10分の伸長反応を1サイクルとし、20～50サイクル反応を行うことを含む。

目的の白色花関連マーカ―を該白色花関連マーカ―の一部に特異的にハイブリダイズする標識化プローブを用いて検出する場合、使用されるプローブの長さは、15塩基以上、例えば20～200塩基、25～100塩基、25～50塩基であり、サンプルとプローブとの接触はストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下にて行うものとする。ここでストリンジエントな条件は、プローブの長さ、目的の白色花関連マーカ―の塩基配列に基づいて当業者が適宜設定でき、例えば30～50℃で、3～5xSSC、0.1～1%SDS中で1～15時間のハイブリダイゼーション、その後の、例えば0.1～2xSSC、0.1～1%SDS中、室温～70℃での洗浄を含んでいる。ストリンジエント条件の例は、例えばSambrookら、Molecular Cloning、A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989に開示されている。プローブの標識化は当業者に公知であり、例えば蛍光ラベル化剤、放射性同位元素を使用することによって行うことができる。

上記のようにしてトルコギキョウのDNAサンプルから目的とする白色花関連マーカ―が検出された場合には、白色花を生じるトルコギキョウとして試験当代を選別することができる。

本発明の方法は、遺伝子マーカ―を利用するため、花形成前を含むあらゆる時点で白色花を生じる系統の選別が可能であり、選別に要する時間を大幅に短縮することができる。また所望でない花色品種を育成する不都合を回避することができるため、育成に必要な畑面積はより少なくて済み、農薬、肥料などの農業資材の節約にも資する。

一方、上記白色花関連マーカ―の検出は、試験当代が白色花であることを保証するものではない。なぜなら、白色形質は劣性であるため、ANS遺伝子が有色花遺伝子と白色花遺伝子とをヘテロ型で有している場合には、上記白色花関連マーカ―が検出できたとしても試験当代は有色花となるからである。

したがって本発明の方法は、上記白色花関連マーカ―の検出に代えて又はこれに加えて、ANS遺伝子中の有色花関連マーカ―を検出することを含むことができる。

本発明において、有色花関連マーカーとして、配列番号 1 若しくは 19 に示す有色花遺伝子又はその変異体、あるいは配列番号 1 又は 19 に示す有色花遺伝子において、それぞれ配列番号 2 又は 20 に示す白色花遺伝子の対応領域と、塩基配列が顕著に異なる領域（以下、有色花領域と称する）を挙げることができる。

本発明でいう有色花遺伝子の変異体としては、配列番号 1 又は 19 に示すポリヌクレオチドにおいて 1～複数個のヌクレオチドの置換、付加、欠失若しくは挿入を含むポリヌクレオチドが挙げられる。ここで「複数個」とは、200 個以下、好ましくは 100 個以下、より好ましくは 50 個以下、40 個以下、30 個以下、20 個以下、そして最も好ましくは 10 個以下の整数をいう。

また、本発明でいう有色花遺伝子の変異体としては、配列番号 1 又は 19 に示すポリヌクレオチドに対して 80%以上、好ましくは 90%以上、特に好ましくは 95%、96%、97%、98%、99%以上のヌクレオチド同一性を有するポリヌクレオチドが挙げられる。

さらに、本発明でいう有色花遺伝子の変異体としては、配列番号 1 又は 19 に示すポリヌクレオチドと相補的なポリヌクレオチドから成る DNA とストリンジेंटな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドが挙げられる。ここで、「ストリンジेंटな条件」は、当業者が適宜設定でき、例えば 30～50℃で、3～5xSSC、0.1～1%SDS 中で 1～15 時間のハイブリダイゼーション、その後の、例えば 0.1～2xSSC、0.1～1%SDS 中、室温～70℃での洗浄を含んでいる。ストリンジेंट条件の例は、例えば Sambrook ら、Molecular Cloning、A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989 に開示されている。

上記有色花遺伝子の変異体には、配列番号 1 若しくは 19 に示す塩基配列又はその相補的配列の突然変異体、及び異なるトルコギキョウ有色花品種のホモログが含まれる。

有色花領域は、例えば本願明細書の図 2 及び 8 に示される有色花遺伝子と白色花遺伝子の配列アライメントから、両配列間で顕著に異なる配列領域を選択することによって特定することができる。本発明において好ましい有色花領域として、有色花遺伝子(配列番号 1)のヌクレオチド 2366～2459 若しくは有色花遺伝子(配列番号 19)のヌクレオチド 2379～2472 又はその変異体を挙げることができる。

ここで「配列番号 1 のヌクレオチド 2366～2459 又は配列番号 19 のヌクレオチド 2379～2472 の変異体」としては、配列番号 1 のヌクレオチド 2366～2459 又は配列番号 19 のヌクレオチド 2379～2472 において、1～数個のヌクレオチドの置換、付加、欠失若しくは挿入を含むポリヌクレオチドが挙げられる。ここで「数個」とは、10 以下の整数、好ましくは 5 以下の整数をいう。

また、「配列番号 1 のヌクレオチド 2366～2459 又は配列番号 19 のヌクレオチド 2379～2472 の変異体」としては、配列番号 1 のヌクレオチド 2366～2459 又は配列番号 19 のヌクレオチド 2379～2472 に対して 80%以上、好ましくは 90%以上、特に好ましくは 95%、96%、97%、98%、99%以上のヌクレオチド同一性を有するポリヌクレオチドが挙げられる。

さらに、「配列番号 1 のヌクレオチド 2366～2459 又は配列番号 19 のヌクレオチド 2379～2472 の変異体」としては、配列番号 1 のヌクレオチド 2366～2459 又は配列番号 19 のヌクレオチド 2379～2472 と相補的なポリヌクレオチドから成る DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドが挙げられる。ここで、「ストリンジェントな条件」は、当業者が適宜設定でき、例えば 30～50℃で、3～5xSSC、0.1～1%SDS 中で 1～15 時間のハイブリダイゼーション、その後の、例えば 0.1～2xSSC、0.1～1%SDS 中、室温～70℃での洗浄を含んでいる。ストリンジェント条件の例は、例えば Sambrook ら、Molecular Cloning、A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989 に開示されている。

有色花関連マーカーの検出は、上記白色花関連マーカーの検出と同様にして行うことができるが、例えば有色花関連マーカーの少なくとも一部に特異的にハイブリダイズ可能なプローブは、有色花関連マーカーを検出することができるだけでなく、該プローブによる検出が認められない場合には、白色花関連マーカーの検出を行うことなく試験当代は白色花であると判定することができるため、好ましい。具体的に、トルコギキョウの DNA サンプルへの上記プローブの結合が検出されなかった場合には、白色遺伝子をホモ型で有しているため、試験当代は白色花であると判定することができる。

一方、トルコギキョウの DNA サンプルへの上記プローブの結合が検出された場

合には、有色花遺伝子をホモ型又はヘテロ型で有しているため、試験当代は有色花であると判定することができる。なおこの場合には、上述した白色花関連マーカの検出と組合せてANS遺伝子の遺伝子型を決定することにより、自殖により白色花を生じるトルコギキョウを選別することができる。

上記遺伝子型の決定は、上記の通り白色花関連マーカ及び有色花関連マーカを個々に検出することによって行ってもよいが、配列番号 1 のヌクレオチド 2366～2459 又は配列番号 19 のヌクレオチド 2379～2472 (94 ヌクレオチド) を挟む領域を増幅することができるプライマーセットを用いた PCR 増幅と、その後の電気泳動により、簡便に行うことができる。上記の通り、有色花遺伝子と白色花遺伝子のエクソン配列は、前記 94 ヌクレオチドの有無を除いて約 98% の配列同一性を有するため、配列番号 1 のヌクレオチド 2366～2459 に隣接する 5' 側配列と 3' 側配列に特異的にアニーリングすることができる正方向プライマーと逆方向プライマーの多くは、配列番号 2 のこれに相当する領域とも特異的にアニーリングすることができる。同様に、配列番号 19 のヌクレオチド 2379～2472 に隣接する 5' 側配列と 3' 側配列に特異的にアニーリングすることができる正方向プライマーと逆方向プライマーの多くは、配列番号 20 のこれに相当する領域とも特異的にアニーリングすることができる。したがって、上記正方向プライマーと逆方向プライマーからなるプライマーセットを用いたトルコギキョウの DNA サンプルの PCR 増幅は、ANS 遺伝子がヘテロ型である場合に、前記 94 ヌクレオチドだけ長さの異なる 2 種類の増幅産物を生じさせることができる。この 2 種類の増幅産物は、電気泳動 (例えばアガロースゲル) によって視覚的に識別可能であるため、白色花関連マーカの検出と、それに基づく遺伝子型の決定とを同時に行うことができる。すなわち、上記電気泳動によって長さの異なる 2 本のバンドが検出された場合には、白色花関連マーカをヘテロで有しているため、試験当代は有色花であるが、自殖により白色花を生じるものであると判定することができる。一方、1 本のバンドが検出された場合には、白色花関連マーカをホモ型で有するものであるか増幅産物の長さに基づいて判定し、試験当代が有色花であるか又は白色花であるかを判定することができる。

上記プライマーセットの例として、配列番号 3 に示す正方向プライマーと配列

番号 4 に示す逆方向プライマーとからなるプライマーセットを挙げることができるが、これに限定されるものではなく、例えば本願明細書に添付の図 2 及び 8 の配列アライメントに基づいて、当業者は適宜適切なプライマーセットを構築することができる。

上記本発明の方法により、従来は試験当代で選別することができなかった、潜在的に白色花系統を生じる有色花系統の選別も、当代個体の花形成前に簡便に行うことができ、育種規模のコンパクト化のみならず育種年限の短縮も可能になる。

本発明はさらに、白色花を生じるトルコギキョウを選別するためのキットを包含する。本発明に係るキットは、少なくとも白色花関連マーカ―又は有色花関連マーカ―のいずれかを特異的に検出するための構成を含んでいる。そのような構成の例として、これに限定されるものではないが、以下に示す核酸プローブを挙げることができる：

(i) 配列番号 2 若しくは 20 に示すヌクレオチド配列又はその相補的配列を有する核酸プローブ；及びストリンジェントな条件下で配列番号 2 若しくは 20 に示すヌクレオチド配列又はその相補的配列とハイブリダイズするが配列番号 1 及び 19 に示すヌクレオチド配列並びにその相補的配列とハイブリダイズしない、15 塩基以上の長さを有する核酸プローブ、からなる群より選択される少なくとも 1 つの白色花関連マーカ―を検出するための核酸プローブ

(ii) 配列番号 1 若しくは 19 に示すヌクレオチド配列又はその相補的配列を有する核酸プローブ；ストリンジェントな条件下で配列番号 1 若しくは 19 に示すヌクレオチド配列又はその相補的配列とハイブリダイズするが配列番号 2 及び 20 に示すヌクレオチド配列並びにその相補的配列とハイブリダイズしない、15 塩基以上の長さを有する核酸プローブ；及び配列番号 1 のヌクレオチド 2366～2459 又は配列番号 19 のヌクレオチド 2379～2472 の少なくとも一部に特異的にハイブリダイズ可能であり、かつ 15 塩基以上の長さを有する核酸プローブ、からなる群より選択される少なくとも 1 つの有色花関連マーカ―を検出するための核酸プローブ。

上記核酸プローブのサイズは、20～90 塩基、好ましくは 30～70 塩基、例えば 40～60 塩基の長さである。また上記核酸プローブは、蛍光ラベル化剤、放射性同

位元素などのラベル化剤によって標識されていることが好ましい。そのような蛍光ラベル化剤、放射性同位元素として、これに限定されるものではないが、ローダミン、フルオレセイン、ダンシル、及びそれらの誘導体、Cy ダイ、 ^{32}P 並びに ^{35}S などが挙げられる。

本発明に係るキットは、好ましくは、白色花関連マーカー及び有色花関連マーカーの双方を特異的に検出するための構成を含んでいる。この場合、有色花関連マーカーの検出と白色花関連マーカーの検出とを区別できるように、白色花関連マーカー用の核酸プローブの標識と有色花関連マーカー用の核酸プローブの標識とが異なることが好ましい。

本発明に係るキットは、最も好ましくは、トルコギキョウの ANS 遺伝子の遺伝子型を判定することができる構成を含むものであり、そのような構成の例として、これに限定されるものではないが、配列番号 1 のヌクレオチド 2366～2459 又は配列番号 19 のヌクレオチド 2379～2472 に隣接する 5' 側配列と 3' 側配列に特異的にアニーリングすることができる正方向プライマー及び逆方向プライマーからなるプライマーセットが挙げられる。

また上記プライマーセットの具体例として、配列番号 3 に示す正方向プライマーと配列番号 4 に示す逆方向プライマーとからなるプライマーセットを挙げることができる。

以下、本発明の一例を実施例として詳細に説明するが、本発明はこの実施例のみに限定されるものではない。

[実施例 1]

アントシアニン生合成に関与する遺伝子群の有色花品種及び白色花品種間での発現の比較

RNA 抽出は、Plant Total RNA Extraction Miniprep System (VIOGENE) を使用し、100mg の花卉から行った。抽出後の DNA 除去のために、deoxyribonuclease、amplification grade (Invitrogen) を使用した。cDNA 合成には SuperScript™ II First-Strand Synthesis System (Invitrogen) を使用した。いずれも製品に添付されたプロトコールに従って実験を行った。

RT-PCR のプライマーは非特許文献 1 に報告されている各遺伝子の配列を参考

に設計した以下のようなものである:CHS 用プライマー、5' -AGAGGTGAGAAGGGCTCAAAG-3' (配列番号 5) 及び 5' -CGAGACACTGTGTAGAACCACTG-3' (配列番号 6); CHI 用プライマー、5' -TTCCTCCACTCCTTCCCTTT-3' (配列番号 7) 及び 5' -ATTCGGGTGCCAAACTCTT-3' (配列番号 8); F3H 用プライマー、5' -TGGCTCCATCTACACTAACAGC-3' (配列番号 9) 及び 5' -GATCTCCTCAATAGGCTTGCTC-3' (配列番号 10); DFR 用プライマー、5' -CCCTGAAAGCCTGTAAGAGC-3' (配列番号 11) 及び 5' -TACGTGTCCTTGCCATGTTC-3' (配列番号 12); ANS 用プライマー、5' -CCCCAGAGTAGAAAGCTTGG-3' (配列番号 13) 及び 5' -TCCTGAAGAGCTTGTGCTTG-3' (配列番号 14); 7GT 用プライマー、5' -AAACCTTGSTCCATGGGTCAA-3' (配列番号 15) 及び 5' -TGCTCAGCAAACATAGGCCACGTC-3' (配列番号 16)。

RT-PCR 反応は以下の条件で行った。先ず反応液は合計を 20 μ l [1 $\times$ Ex Taq Buffer、0.2mM dNTPs、0.5 units TaKaRa Ex TaqTM HS、0.5 μ M forward、reverse 各プライマー (各 10 μ M)、約 25ng の一本鎖 cDNA] とし、94°C で 1 分間熱変性させた後、さらに熱変性後 (94°C 30 秒)、アニーリング (60°C 30 秒)、伸長反応 (72°C 1.5 分) を 25 サイクルおよび 30 サイクルで繰り返し行い、72°C で 7 分間反応させた後、最後に 4°C まで冷却させた。PCR 増幅産物は 0.8% アガロースゲル (AMRESCO) で電気泳動 (50V、1 $\times$ TAE、60 分) し、エチジウムブロマイド (EtBr) 溶液 (100 倍 EtBr 4 μ l、TAE Buffer 400ml) で 30 分間染色した後、ゲルを UV 照射下で観察した。

図 1 から分かるとおり、白色花品種 KS ではアントシアニン合成酵素 (ANS) 遺伝子の増幅が認められないことが分かった。

[実施例 2]

アントシアニン合成酵素 (ANS) 遺伝子配列の有色花品種及び白色花品種間での比較

ゲノム DNA 抽出は、Plant Genomic DNA Extraction Miniprep System に添付されているプロトコールに従って使用し、100mg の若い葉から行った。抽出したゲノム DNA を対象に、ANS 遺伝子の全長 ORF を含むプライマー (5' -ATTCAGCAAAAAGTAAAGATCAAAGCA-3' (配列番号 17) 及び 5' -CATGCATATTACATGGTTGAATCC-3' (配列番号 18)) を用いてゲノミック PCR を行っ

た。反応液の合計を 50 μ l [1 $\times$ Buffer for KOD-plus-ver. 2、0.2mM dNTPs、1.5mM MgSO₄、1.0units KOD-plus-、0.3mM each forward、reverse 各プライマー（各 10 μ M）、約 25ng 鋳型 DNA]とし、94 $^{\circ}$ Cで2分間熱変性させた後、さらに熱変性後（94 $^{\circ}$ C 15秒）、アニーリング（63 $^{\circ}$ C 30秒）、伸長反応（68 $^{\circ}$ C 3分）を35サイクル繰り返して行い、68 $^{\circ}$ Cで4分間反応させた後、最後に4 $^{\circ}$ Cまで冷却させた。PCR増幅産物は1%アガロースゲルで電気泳動（50V 1 $\times$ TAE、60分）し、エチジウムブロマイド（EtBr）溶液（100倍 EtBr 4 μ l、TAE Buffer 400ml）で30分間染色した後、ゲルをUV照射下で観察し、目的の遺伝子が増えていることを確認した。

その後、泳動に使用しなかった残りのPCR増幅産物からDNAを精製した。精製はPCR-M Clean Up System(VIOGENE)を用い、添付されているプロトコールに従って行った。シーケンス解析は鹿児島大学学内共同研究施設である遺伝子実験施設のシーケンスサービスを利用し、施設の推奨する方法に従って行った。塩基配列およびアミノ酸配列のマルチプルアライメントには GENETYX version 8 program(GENETYX Co.)を用いた。

[実施例3]

白色花品種アントシアニン合成酵素(ANS)遺伝子中の94ヌクレオチドの欠失を利用した、白色花品種と有色花品種の識別

トルコギキョウの有色花系統AM（図3）と白色花系統KS（図4）を交配し、有色花の後代を得た（図5）。この後代を自殖させ種子を収穫し、その種子を播種して植物体になるまで育成したところ有色花23個体、白色花8個体が得られた。これは、メンデルの法則の3:1に分離比に適合している。

これらの後代のうち有色花10個体、白色花6個体からDNAを抽出した。DNA抽出は、バイオジーン社のプラントゲノムミニプレップシステムを用いてマニュアルに従って行った。

次に図2及び8に示すANS遺伝子の配列アライメントに基づいて、94塩基欠失部分を挟み込む形で増幅可能なプライマー（5'-TGGATCACAGCCAAATGTGT-3'（配列番号3）及び5'-TGTTGAATCCATGTCTTTTG-3'（配列番号4）のDNA配列を有するオリゴヌクレオチド）を設計した。

PCR反応はGeneAmp9700システム（ABI社）を使用して行った。反応液20 μ l

中には 10ng DNA、0.5 units TAKARA EXTaq (タカラバイオ社)、0.2mM dNTP、0.5 μ M、2 μ l 10xEXTaq バッファーが含まれる。PCR 条件は、95℃で 10 秒間のデネイチャー、62℃で 30 秒間のアニール、72℃で 30 秒間の伸長反応を 1 サイクルとし、30 サイクル反応させた。

反応後、2%アガロースゲル (バイオジーン社) 上の電気泳動によりバンドの確認を行った。

その結果を図 6 に示す。図 6 からわかるように、有色花のトルコギキョウでは、491bp のバンドが必ずあり、白色花のトルコギキョウでは 397bp の短いバンドしか検出できない。

また、トルコギキョウの他の白色花品種 6 種 (ロジーナグリーン、キュートグリーン、キングオブイエロー、あすかタイプホワイト、スピカホワイト、つくしの新雪) についても上記と同様の検出を行った(図 7)。図 7 に示すように、他のトルコギキョウの白色花の品種でも 397bp の短いバンドしか検出できなかった。また、有色花の品種は必ず 491bp のバンドを有していた。

以上の結果、本発明では白色花遺伝子を持つトルコギキョウを完全に識別できる方法が確立された。

産業上の利用可能性

本発明によれば、白色花のトルコギキョウに関連する新規な遺伝子マーカー、及び該マーカーを利用した白色花を生じるトルコギキョウの選別方法が提供される。遺伝子マーカーを利用することにより、開花前若しくは花形成前を含むあらゆる時点で白色花を生じる系統の選別が可能であるため、選別に要する時間を大幅に短縮することができる。また所望でない花色品種を育成する不都合を回避することができるため、育成に必要な畑面積はより少なくて済み、農薬、肥料などの農業資材の節約にもなる。

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

請求の範囲

1. トルコギキョウ [*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn.] の DNA サンプルから、アントシアニン合成酵素 (ANS) 遺伝子中の白色花関連マーカ―又は有色花関連マーカ―のいずれかを検出することを含む、白色花を生じるトルコギキョウを選別する方法。

2. 白色花関連マーカ―は、配列番号 2 若しくは 20 に示すポリヌクレオチド、又はそれらのポリヌクレオチドにおいて 1～複数個のヌクレオチドの置換、付加、欠失若しくは挿入を含むポリヌクレオチドである、請求項 1 記載の方法。

3. 有色花関連マーカ―は、配列番号 1 若しくは 19 に示すポリヌクレオチド、又はそれらのポリヌクレオチドにおいて 1～複数個のヌクレオチドの置換、付加、欠失若しくは挿入を含むポリヌクレオチドである、請求項 1 記載の方法。

4. 有色花関連マーカ―は、配列番号 1 のヌクレオチド 2366～2459 若しくは配列番号 19 のヌクレオチド 2379～2472、又は配列番号 1 のヌクレオチド 2366～2459 若しくは配列番号 19 のヌクレオチド 2379～2472 において、1～数個のヌクレオチドの置換、付加、欠失若しくは挿入を含むポリヌクレオチドである、請求項 1 記載の方法。

5. 白色花関連マーカ―及び有色花関連マーカ―の双方を検出することにより、ANS 遺伝子の遺伝子型を決定することをさらに含む、請求項 1 記載の方法。

6. 配列番号 1 のヌクレオチド 2366～2459 又は配列番号 19 のヌクレオチド 2379～2472 に隣接する 5' 側配列及び 3' 側配列に特異的にアニーリングすることができる正方向プライマー及び逆方向プライマーからなるプライマーセットによる DNA サンプルの PCR 増幅と、その後の電気泳動によって前記決定を行うことを特徴とする、請求項 5 記載の方法。

7. 前記プライマーセットは、配列番号 3 に示す正方向プライマー及び配列番号 4 に示す逆方向プライマーからなることを特徴とする、請求項 6 記載の方法。

8. 白色花関連マーカ―がホモ型で存在する場合に、トルコギキョウの花色を白色と判定することをさらに含む、請求項 5 記載の方法。

9. 白色花関連マーカ―がヘテロ型で存在する場合に、試験当代は有色花で

あるが、自殖により白色花を生じるものであると判定することをさらに含む、請求項 5 記載の方法。

10. 以下の(i)又は(ii)のいずれか1つ以上を含む、白色花を生じるトルコギキョウを選別するためのキット。

(i) 配列番号2若しくは20に示すヌクレオチド配列又はその相補的配列を有する核酸プローブ;及びストリンジェントな条件下で配列番号2若しくは20に示すヌクレオチド配列又はその相補的配列とハイブリダイズするが配列番号1及び19に示すヌクレオチド配列並びにその相補的配列とハイブリダイズしない、15塩基以上の長さを有する核酸プローブ、よりなる群から選択される少なくとも1つの白色花関連マーカを検出するための核酸プローブ

(ii) 配列番号1若しくは19に示すヌクレオチド配列又はその相補的配列を有する核酸プローブ;ストリンジェントな条件下で配列番号1若しくは19に示すヌクレオチド配列又はその相補的配列とハイブリダイズするが配列番号2及び20に示すヌクレオチド配列並びにその相補的配列とハイブリダイズしない、15塩基以上の長さを有する核酸プローブ;及び配列番号1のヌクレオチド2366~2459又は配列番号19のヌクレオチド2379~2472の少なくとも一部に特異的にハイブリダイズ可能であり、かつ15塩基以上の長さを有する核酸プローブ、よりなる群から選択される少なくとも1つの有色花関連マーカを検出するための核酸プローブ

11. 前記核酸プローブは標識化されている、請求項10記載のキット。

12. 前記(i)及び(ii)を含むことを特徴とする、請求項10記載のキット。

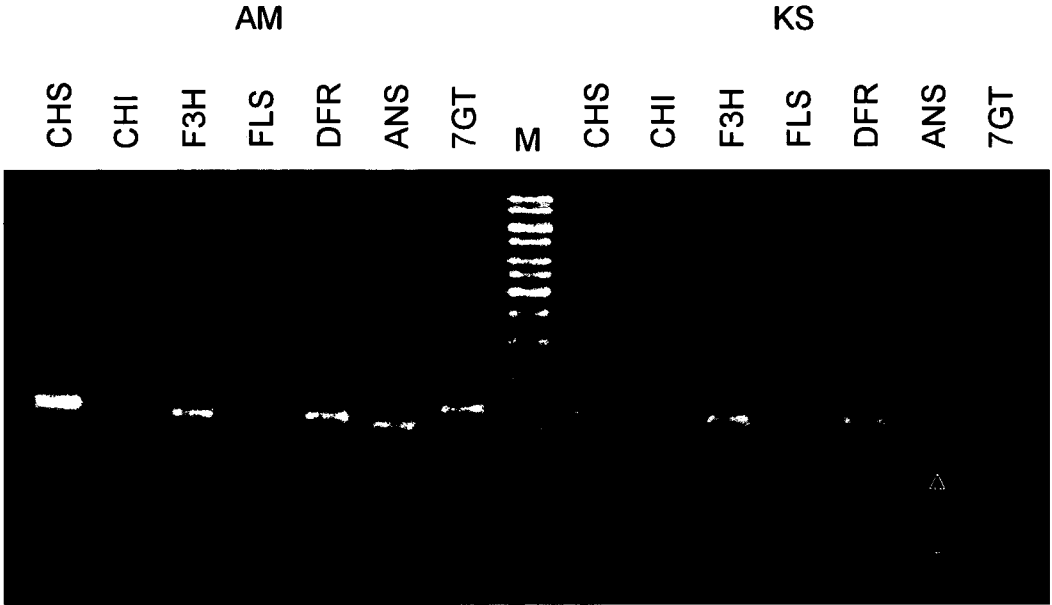
13. 前記(i)の核酸プローブと、前記(ii)の核酸プローブとが異なる標識を有する、請求項12記載のキット。

14. 配列番号1のヌクレオチド2366~2459又は配列番号19のヌクレオチド2379~2472に隣接する5'側配列と3'側配列に特異的にアニーリングすることができる正方向プライマー及び逆方向プライマーからなるプライマーセットを含む、白色花を生じるトルコギキョウを選別するためのキット。

15. 前記プライマーセットは、配列番号3に示す正方向プライマー及び配列番号4に示す逆方向プライマーからなることを特徴とする、請求項14記載のキ

ット。

図 1



2

1	ATGGGAATTC	CGGTGTG	CCCCAGAGT	AGAAAGCT	TGGCCAGAGGGGCA	CCCAAGNAAT	TTCCAAAGAA	TACGTGAGGAC	TAAAGNAGCT	TAACAACAT	TTCGATGT	TTTTCG	TGAAAGAA	AAACACG	ACGACGAGGGCC	140
1	ATGGGAATTC	CGGTGTG	CCCCAGAGT	AGAAAGCT	TGGCCAGAGGGGCA	CCCAAGNAAT	TTCCAAAGAA	TACGTGAGGAC	TAAAGNAGCT	TAACAACAT	TTCGATGT	TTTTCG	TGAAAGAA	AAACACG	ACGACGAGGGCC	140
141	TCAAAGTAC	CCCATGAT	TGACAT	TAAGACAT	TGATGATG	AGAGAGACAT	TCAGTGTG	AGAGAAAGG	TGTGATGAT	GTATGT	TTGAAACAA	AGCTGCAAT	TGATGAT	TTGAAACAA	AGCTGCAAT	280
141	TCAAAGTAC	CCCATGAT	TGACAT	TAAGACAT	TGATGATG	AGAGAGACAT	TCAGTGTG	AGAGAAAGG	TGTGATGAT	GTATGT	TTGAAACAA	AGCTGCAAT	TGATGAT	TTGAAACAA	AGCTGCAAT	280
281	TTGGTCGG	TAAAGT	CCGGTGG	CAAGAC	CCCTCT	TGATCT	TCGAGT	TAGGAGAA	AGAAAGT	ATGCCAAT	TGATCAGG	CTCCGGAAT	TGTCOA	AGGATATG	GAAGGATATG	420
281	TTGGTCGG	TAAAGT	CCGGTGG	CAAGAC	CCCTCT	TGATCT	TCGAGT	TAGGAGAA	AGAAAGT	ATGCCAAT	TGATCAGG	CTCCGGAAT	TGTCOA	AGGATATG	GAAGGATATG	420
421	GGGAGGAC	TATTTTT	CCCAT	TTTCCG	TGAGAG	AGAGCGGT	GACATG	ACATTT	TGGCCAA	AGACATCC	CAGAGG	ATACAT	TGTAAGT	CCCATATAT	TAGCAAGT	560
421	GGGAGGAC	TATTTTT	CCCAT	TTTCCG	TGAGAG	AGAGCGGT	GACATG	ACATTT	TGGCCAA	AGACATCC	CAGAGG	ATACAT	TGTAAGT	CCCATATAT	TAGCAAGT	560
561	CTAGTCG	CACATTT	CGATCT	AAATTT	GTATTT	TGCGTGTG	TTTTTCAT	GTCTCT	CATAGAT	TATTTT	CATAGAG	CGGTGTTT	TAACAT	GTCTCAC	CCCGCATTTT	700
561	CTAGTCG	CACATTT	CGATCT	AAATTT	GTATTT	TGCGTGTG	TTTTTCAT	GTCTCT	CATAGAT	TATTTT	CATAGAG	CGGTGTTT	TAACAT	GTCTCAC	CCCGCATTTT	700
701	AAATCTT	GGTGTG	TTGGAT	TTTCC	CAAGTAC	CTAGGAT	CTATTT	GTACAG	CGAATGT	GTGAC	ATAGAT	AGAT	GTAGT	GCAT	CCAGTTC	840
701	AAATCTT	GGTGTG	TTGGAT	TTTCC	CAAGTAC	CTAGGAT	CTATTT	GTACAG	CGAATGT	GTGAC	ATAGAT	AGAT	GTAGT	GCAT	CCAGTTC	840
841	ATTTTCC	AACTAAAT	TAAGAG	AAATTT	TATAGG	TAGGTC	AGCATG	AGGAG	CGGCAAG	CTTAT	TATAGG	AGCATG	AGGAG	CGGCAAG	CTTAT	980
818	ATTTTCC	AACTAAAT	TAAGAG	AAATTT	TATAGG	TAGGTC	AGCATG	AGGAG	CGGCAAG	CTTAT	TATAGG	AGCATG	AGGAG	CGGCAAG	CTTAT	941
981	TGTGGAT	CA	TAC	AGGCTAG	TCGAT	CA	GAAT	CAGG	TATTT	CA	AGGCTAGG	GGT	TAGT	ATAG	CGGCTAG	1118
942	TGTGGAT	CA	TAC	AGGCTAG	TCGAT	CA	GAAT	CAGG	TATTT	CA	AGGCTAGG	GGT	TAGT	ATAG	CGGCTAG	1081
1119	AGAGCAT	TTGA	AGGCTCT	TTGT	AGAG	CGGCAAG	TAAGG	CGGCAAG	TAAGG	CGGCAAG	TAAGG	CGGCAAG	TAAGG	CGGCAAG	TAAGG	1258
1082	AGAGCAT	TTGA	AGGCTCT	TTGT	AGAG	CGGCAAG	TAAGG	CGGCAAG	TAAGG	CGGCAAG	TAAGG	CGGCAAG	TAAGG	CGGCAAG	TAAGG	1221
1259	GAGGAT	TA	AGGCTAG	TCGAT	CA	GAAT	CAGG	TATTT	CA	AGGCTAGG	GGT	TAGT	ATAG	CGGCTAG	1397	
1222	GAGGAT	TA	AGGCTAG	TCGAT	CA	GAAT	CAGG	TATTT	CA	AGGCTAGG	GGT	TAGT	ATAG	CGGCTAG	1361	
1398	GTATG	CA	AGGCTAG	TCGAT	CA	GAAT	CAGG	TATTT	CA	AGGCTAGG	GGT	TAGT	ATAG	CGGCTAG	1537	
1362	GTATG	CA	AGGCTAG	TCGAT	CA	GAAT	CAGG	TATTT	CA	AGGCTAGG	GGT	TAGT	ATAG	CGGCTAG	1500	
1538	TGTGTGT	GTG	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	1646
1501	TGTGTGT	GTG	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	1633
1646	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	1633
1634	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	1646
1773	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	1773
1762	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	TCGAT	1762
1913	CGTCC	CCCTT	GAA	GGT	ACT	TGAC	CAAT									

図 3



図 4

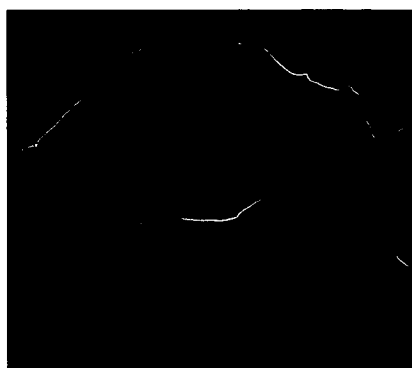


図 5



図 6

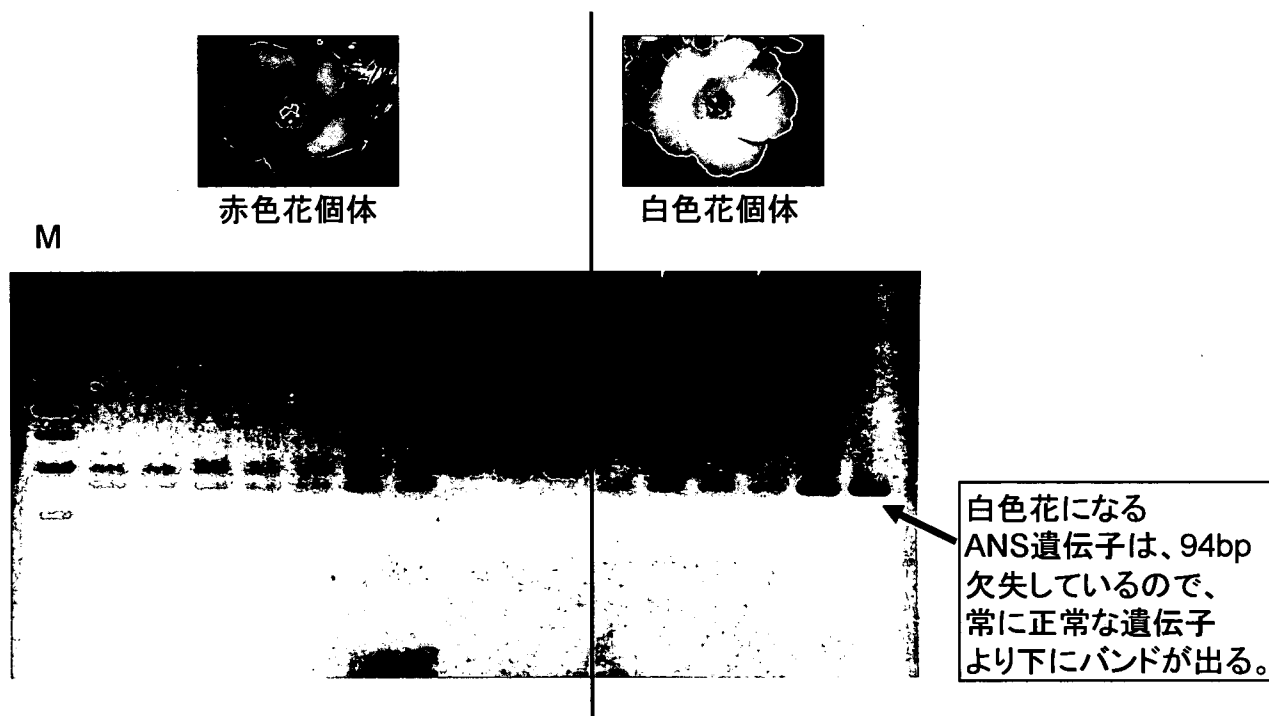
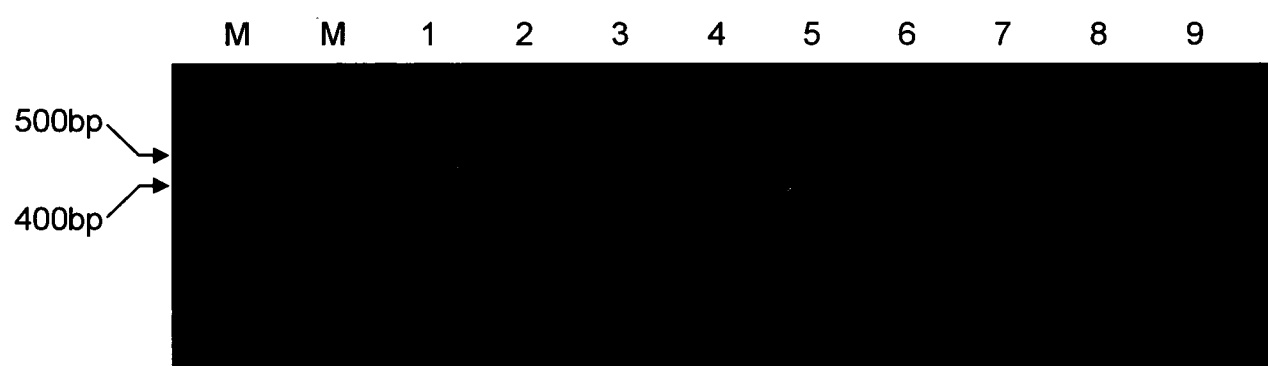


図 7



[illegible]

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/060256

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/00, C12N15/09, 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)

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	Saeko OTAKE et al., "Torukogikyoku no Hakushokuka Hinshu de Miidasareta Anthocyanidin Gosei Koso no Kesshitsu Hen'i", Horticultural Research (Japan), 26 September 2009 (26.09.2009), vol.8, suppl.2, page 529	1-15
Y/A	NAKATSUKA, T., et al., Two different mutations are involved in the formation of white-flowered gentian plants. Plant Science, 2005, Vol.169, pp.949-958	1-3, 5, 10-13/ 4, 6-9, 14, 15
Y/A	JP 2004-236516 A (HASHIMOTO F), 26 August 2004 (26.08.2004), entire text; particularly, paragraphs [0001] to [0019] (Family: none)	1-3, 5, 10-13/ 4, 6-9, 14, 15



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
12 July, 2010 (12.07.10)Date of mailing of the international search report
20 July, 2010 (20.07.10)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/060256

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MATSUBARA, K., et al., PCR-Based Markers for the Genotype Identification of Flavonoid-3',5'-Hydroxylase Genes Governing Floral Anthocyanin Biosynthesis in Commercial Petunias. <i>Breeding Science</i> , 2006, Vol.56, pp.389-397	1-15
A	Masami MATO, "Anthocyanidin in the cyanic flower of <i>Eustoma grandiflorum</i> and flower pigments of the white flower", <i>Journal of the Japanese Society for Horticultural Science</i> , 2002, vol.71, suppl.2, page 407	1-15
A	JP 2007-325533 A (UNIV KAGOSHIMA), 20 December 2007 (20.12.2007), (Family: none)	1-15
A	WO 2004/103065 A1 (KAGOSHIMA TLO CO., LTD.), 02 December 2004 (02.12.2004), & EP 1629710 A1 & US 2007/0011776 A1 & JP 4314241 B2	1-15

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12N15/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12N15/00, C12N15/09, C12Q1/68

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）

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)、JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
PX	大竹 沙永子、外7名、 トルコギキョウの白色花品種で見出されたアントシアニン合成酵素の欠失 変異。 園芸学研究, 2009.9.26, Vol.8, Suppl.2, p.529	1-15

☒ 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

1 2 . 0 7 . 2 0 1 0

国際調査報告の発送日

2 0 . 0 7 . 2 0 1 0

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / 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）

伊達 利奈

4 B

3 9 6 0

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y/ A	NAKATSUKA, T., et al., Two different mutations are involved in the formation of white-flowered gentian plants. Plant Science, 2005, Vol.169, pp.949-958	1-3, 5, 10-13/ 4, 6-9, 14, 15
Y/ A	JP 2004-236516 A (HASHIMOTO F) 2004.08.26, 全文、特に、【0001】～【0019】 (ファミリーなし)	1-3, 5, 10-13/ 4, 6-9, 14, 15
A	MATSUBARA, K., et al., PCR-Based Markers for the Genotype Identification of Flavonoid- 3', 5'-Hydroxylase Genes Governing Floral Anthocyanin Biosynthesis in Commercial Petunias. Breeding Science, 2006, Vol.56, pp.389-397	1-15
A	間藤 正美、 トルコギキョウのサイアニック花のアントシアニンと白花の花色素. 園芸学会雑誌, 2002, Vol.71, Suppl.2, p.407	1-15
A	JP 2007-325533 A (UNIV KAGOSHIMA) 2007.12.20, (ファミリーなし)	1-15
A	WO 2004/103065 A1 (KAGOSHIMA TLO CO LTD) 2004.12.02, & EP 1629710 A1 & US 2007/0011776 A1 & JP 4314241 B2	1-15