

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5419112号

(P5419112)

(45) 発行日 平成26年2月19日 (2014. 2. 19)

(24) 登録日 平成25年11月29日 (2013. 11. 29)

(51) Int. Cl.

F 1

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

A O 1 H 1/00 (2006. 01)

A O 1 H 1/00 Z

C 1 2 Q 1/68 (2006. 01)

C 1 2 Q 1/68 A

A O 1 H 5/00 (2006. 01)

A O 1 H 5/00 Z

請求項の数 12 (全 31 頁)

(21) 出願番号 特願2012-502941 (P2012-502941)
 (86) (22) 出願日 平成22年3月4日 (2010. 3. 4)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2010/053565
 (87) 国際公開番号 W02011/108104
 (87) 国際公開日 平成23年9月9日 (2011. 9. 9)
 審査請求日 平成24年7月27日 (2012. 7. 27)

(73) 特許権者 501203344
 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究
 機構
 茨城県つくば市観音台3-1-1
 (74) 代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔
 (74) 代理人 100118773
 弁理士 藤田 節
 (72) 発明者 蝶野 真喜子
 茨城県つくば市観音台2-1-18 独立
 行政法人農業・食品産業技術総合研究機構
 作物研究所内

審査官 太田 雄三

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アブシジン酸代謝酵素遺伝子変異の集積によるコムギの種子休眠性強化方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験コムギ由来のゲノムDNAについて、配列番号 1 1 で示される塩基配列又はその相補配列の連続した少なくとも15塩基の塩基配列を含む1種以上のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて核酸増幅を行うことにより、コムギDゲノムのアブシジン酸8'位水酸化酵素遺伝子中の挿入変異を検出することを含む、被験コムギのアブシジン酸8'位水酸化酵素遺伝子の機能欠損変異を検出する方法。

【請求項 2】

(i) 配列番号 1 0 で示される塩基配列の1809位から上流の少なくとも15塩基の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドプライマー、又は配列番号 1 0 で示される塩基配列の2776位から下流の少なくとも15塩基の塩基配列の相補配列を含むオリゴヌクレオチドプライマーと、(ii) 配列番号 1 1 で示される塩基配列又はその相補配列の連続した少なくとも15塩基の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドプライマーとを含むプライマーペアを用いて、核酸増幅を行う、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

配列番号 1 1 で示される塩基配列又はその相補配列の連続した少なくとも15塩基の塩基配列を含む1種以上のオリゴヌクレオチドプライマーが、配列番号 3 6 で示される塩基配列を含むオリゴヌクレオチドプライマーを含む、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

配列番号 1 0 で示される塩基配列の1809位から上流の少なくとも15塩基の塩基配列を含

10

20

むオリゴヌクレオチドプライマーが、配列番号27で示される塩基配列を含むオリゴヌクレオチドプライマーである、請求項2又は3に記載の方法。

【請求項5】

前記核酸増幅を、前記オリゴヌクレオチドプライマーと、配列番号35で示される塩基配列を含むオリゴヌクレオチドプライマー、又は配列番号37及び38で示される塩基配列をそれぞれ含む2つのオリゴヌクレオチドプライマーからなるプライマーペアとを反応液中で共存させて用いたマルチプレックスPCRにより行う、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】

a) 請求項1～5のいずれか1項に記載の方法を用いて、機能欠損変異型アブシジン酸8'位水酸化酵素遺伝子を有するコムギを選択し、
b) 工程a)で得たコムギを育種親として用いて育種し、
c) 工程b)で取得される子孫コムギ由来のゲノムDNAについて、コムギA、B及びDゲノムのアブシジン酸8'位水酸化酵素遺伝子の変異を検出することを、種子休眠性が強化されたコムギの育種方法。

【請求項7】

子孫コムギ由来のゲノムDNAを、配列番号16及び32で示される塩基配列のそれぞれからなるオリゴヌクレオチドプライマーを含むプライマーペア、又は配列番号21及び26で示される塩基配列のそれぞれからなるオリゴヌクレオチドプライマーを含むプライマーペアを用いて核酸増幅し、得られた増幅産物を制限酵素AluIで消化することにより、コムギA、B及びDゲノムのアブシジン酸8'位水酸化酵素遺伝子の変異を検出する、請求項6に記載の方法。

【請求項8】

子孫コムギ由来のゲノムDNAを、配列番号15及び27で示される塩基配列のそれぞれからなるオリゴヌクレオチドプライマーを含むプライマーペアを用いて核酸増幅することにより、コムギA、B及びDゲノムのアブシジン酸8'位水酸化酵素遺伝子の変異を検出する、請求項6又は7に記載の方法。

【請求項9】

配列番号11で示される塩基配列又はその相補配列の連続した少なくとも15塩基の塩基配列を含む、コムギDゲノムのアブシジン酸8'位水酸化酵素遺伝子の機能欠損変異検出用のオリゴヌクレオチドプライマー。

【請求項10】

配列番号27で示される塩基配列を含むオリゴヌクレオチドプライマーと、配列番号36で示される塩基配列を含むオリゴヌクレオチドプライマーとを含む、コムギDゲノムのアブシジン酸8'位水酸化酵素遺伝子の機能欠損変異検出用のプライマーペア。

【請求項11】

以下の(a)～(c)のいずれかである、コムギA、B及びDゲノムのアブシジン酸8'位水酸化酵素遺伝子検出用のプライマーペア。

(a) 配列番号16及び32で示される塩基配列のそれぞれからなるオリゴヌクレオチドプライマーを含むプライマーペア、
(b) 配列番号21及び26で示される塩基配列のそれぞれからなるオリゴヌクレオチドプライマーを含むプライマーペア
(c) 配列番号15及び27で示される塩基配列のそれぞれからなるオリゴヌクレオチドプライマーを含むプライマーペア

【請求項12】

請求項9に記載のオリゴヌクレオチドプライマー又は請求項10に記載のプライマーペアと、請求項11に記載のプライマーペアとを含む、コムギ種子休眠性強化育種用のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

20

30

40

50

【0001】

本発明は、遺伝子変異集積に基づくコムギの種子休眠性強化方法に関する。

【背景技術】

【0002】

通常、種子は休眠性を有しており、収穫前及び収穫直後の発芽が抑制されている。しかし、半乾燥地域を起源とするコムギ (*Triticum aestivum*) の種子は元来休眠性が弱い
ため、栽培の均一化や大規模化、機械化の過程で穂発芽（収穫前に親植物上で種子が発芽する現象）が問題とされるようになってきた。本州以南の日本では、コムギの収穫時期が梅
雨入り前後に当たるため、降雨や高湿度に基づく吸水刺激による穂発芽がしばしば起きる
。梅雨のない北海道でも、コムギの収穫時期には霧が多く、穂発芽が起きる。世界的には
、登熟期が低温・曇天になりやすいイギリスやスウェーデン、ポーランド、ドイツなどの
北ヨーロッパの地域では、穂発芽は大きな問題である。近年の異常気象の多発により、カ
ナダやアメリカ、オーストラリアなどのこれまで穂発芽が問題とならなかった地域でも、
穂発芽被害が報告されるようになってきている。穂発芽は、薬剤による防除が難しいため、コ
ムギの最も厄介な障害とされているが、既存の栽培手法では穂発芽問題の解決は難しい。
穂発芽が生ずると、種子のデンプン等が消費されることになる。このため穂発芽した種子
が収穫物に混入することにより、小麦粉製品の品質低下が起きる。そこで、穂発芽しない
種子休眠性の強いコムギ品種を作るための技術が必要とされている。一方で、作物である
コムギでは、収穫時期には発芽しないが播種時期には一斉に発芽することが必要になる。
そのため、種子休眠性を高めるだけでなく、適切な期間・適切な程度のみ発芽が抑制され
たコムギ品種を作製できる技術も求められる。

10

20

【0003】

アブシジン酸 (ABA) は、種子休眠に関与する植物ホルモンである。種子が休眠から覚
め、発芽する際にABA量は減少する。このABA量の減少には、ABAの主要な不活化酵素であ
るABA8'位水酸化酵素 (ABA8'ox) によるABAの代謝が関与している（非特許文献1）。こ
れまでに、シロイヌナズナの突然変異体やオオムギの形質転換体を用いた解析では、種子
が発芽する際に機能しているABA8'oxの遺伝子発現量を抑制すると、発芽が著しく遅延す
ることが示されている（非特許文献1～3）。

【0004】

コムギでも、シロイヌナズナやオオムギと同様に、種子が発芽する際に機能しているABA8'oxの活性を大幅に低下させることができれば、発芽が抑制される可能性がある。しかし、コムギ (*Triticum aestivum*) はA、B、Dの3種のゲノムからなる異質6倍体であり、発芽時に発現しているコムギABA8'ox遺伝子 (TaABA8'ox1) として3つの同祖遺伝子 (TaABA8'ox1A、TaABA8'ox1B、TaABA8'ox1D) がゲノムA、B、D上に1つずつ存在する。異質6倍体であるコムギでは、優性の遺伝子変異を除き、遺伝子変異を表現型の変化につなげるには、同祖遺伝子群全てに変異を導入する必要がある。例えば、顆粒結合型澱粉合成酵素 (GBSSI) の遺伝子変異であるモチ性 (waxy) 変異を例として説明すると、2倍体であるイネやオオムギ、トウモロコシでは、放射線などの変異原処理により作られたモチ変異体の報告が多数あり、変異の確率は $1/10^{-6}$ と推定されている。その推定を基準とすれば、コムギでモチ性変異体が発現原処理により起きる確率は $1/10^{-6} \times 1/10^{-6} \times 1/10^{-6} = 1/10^{-18}$ となり、その確率は限りなく低い。このことから、コムギのTaABA8'ox1遺伝子でも、単純な変異原処理では、同様に極めて低い確率でしか全ての同祖遺伝子に変異が起きないため、表現型が改変されたTaABA8'ox1変異体を作出することは極めて難しいと考えられる。RNAi法やアンチセンスRNA法などを利用して、TaABA8'ox1の発現を抑制した組換えコムギを作出する方法もあるが、組換え作物の利用についての社会的受容状況はまだ厳しく、組換えコムギの実用化は困難な状況にある。

30

40

【0005】

TaABA8'ox1同祖遺伝子群には、終止コドン直後にそれぞれ長さの異なるギャップがある。このギャップを含む領域をPCRで増幅し、得られた増幅断片の電気泳動パターンを比較することで、TaABA8'ox1同祖遺伝子間の遺伝子型の違いを検出することができる（非特許

50

文献4)。この多型検出法では、コムギ遺伝資源系統は、TaABA8'ox1A, B, Dのそれぞれに由来する3本のバンドが増幅される系統(ABD型)と、TaABA8'ox1Dに由来するバンドが増幅されない系統(AB型)に分けられる。このTaABA8'ox1の遺伝子型と種子休眠性との関係については、ABD型を示すコムギ品種「ゼンコウジコムギ」とAB型を示すコムギ品種「タマイズミ」の半数体倍加系統(DH)を用いて解析した場合、TaABA8'ox1の遺伝子型の相違による種子休眠性への影響は認められなかったことが報告されている(非特許文献4)。

【0006】

既存のコムギ遺伝資源に存在する種子休眠性をもたらす遺伝子変異を、交配により他のコムギ品種に効率よく導入できれば、遺伝子組換え法を利用せずに高品質なコムギ品種を作出できると考えられる。しかし上記の通り、種子休眠性をもたらすようなTaABA8'ox1遺伝子上の変異はまだ見出されていない。

10

【0007】

種子休眠性の高いコムギを選抜する技術として、コムギ4A染色体上の休眠性遺伝子と連鎖した遺伝子マーカーの検出に基づく方法(特許文献1)もある。しかしこの方法は、高休眠性遺伝子の間接的検出に基づいており、コムギ品種における高休眠性遺伝子の存在を直接的に確実に検出することはできない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

20

【特許文献1】特開2004-113007号公報

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Kushiro, T. et. al., (2004) EMBO J., 23, p.1647-1656

【非特許文献2】Okamoto, M. et al., (2006) Plant Physiol., 141, p.97-107

【非特許文献3】Gubler et al., (2008) Plant Physiol., 147, p.886-896

【非特許文献4】蝶野ら、(2009) 育種学研究、日本育種学会、第11巻別冊1号 p.203

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

30

本発明は、コムギに優れた種子休眠性を付与する休眠性遺伝子の検出方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を行った結果、日本国内の一部のコムギ品種・系統では、コムギの第6群染色体上に座乗するアブシジン酸8'位水酸化酵素(ABA8'ox)をコードするTaABA8'ox1同祖遺伝子群のうちのTaABA8'ox1D遺伝子が、本来の終止コドンよりも前に挿入変異を有していること、この挿入変異型TaABA8'ox1D遺伝子にコードされたタンパク質はABA8'oxの機能に必要な領域を欠失しており活性を喪失していること、このTaABA8'ox1D挿入変異が種子休眠性を付与するのに有用であることを見出した。本発明者らはさらに、TaABA8'ox1D挿入変異を特異的かつ直接的に検出する方法、及びTaABA8'ox1D挿入変異と組み合わせて種子休眠性を付与するのに有効な他のTaABA8'ox1同祖遺伝子変異の検出方法を見出して、本発明を完成させた。

40

【0012】

すなわち、本発明は以下のものを提供する。

【0013】

[1] 被験コムギ由来のゲノムDNAについて、配列番号11で示される塩基配列又はその相補配列の連続した少なくとも15塩基の塩基配列を含む1種以上のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて核酸増幅を行うことにより、コムギDゲノムのアブシジン酸8'位水酸化酵素遺伝子中の挿入変異を検出することを含む、被験コムギのアブシジン酸8'位水酸化酵素

50

遺伝子の機能欠損変異を検出する方法。

【0014】

この方法の好ましい一実施形態では、(i)配列番号10で示される塩基配列の1809位から上流の少なくとも15塩基の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドプライマー、又は配列番号10で示される塩基配列の2776位から下流の少なくとも15塩基の塩基配列の相補配列を含むオリゴヌクレオチドプライマーと、(ii)配列番号11で示される塩基配列又はその相補配列の連続した少なくとも15塩基の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドプライマーとを含むプライマーペアを用いて、核酸増幅を行うことができる。

【0015】

この方法に用いる、配列番号11で示される塩基配列又はその相補配列の連続した少なくとも15塩基の塩基配列を含む1種以上のオリゴヌクレオチドプライマーには、配列番号36で示される塩基配列を含むオリゴヌクレオチドプライマーを含むことが好ましい。

10

【0016】

また、上記実施形態において、配列番号10で示される塩基配列の1809位から上流の少なくとも15塩基の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドプライマーとして、配列番号27で示される塩基配列を含むオリゴヌクレオチドプライマーを好適に使用することができる。

【0017】

本発明に係る方法では、前記核酸増幅を、前記オリゴヌクレオチドプライマーと、配列番号35で示される塩基配列を含むオリゴヌクレオチドプライマー、又は配列番号37及び38で示される塩基配列をそれぞれ含む2つのオリゴヌクレオチドプライマーからなるプライマーペアとを反応液中で共存させて用いたマルチプレックスPCRにより行うこともできる。

20

【0018】

[2] a) 上記[1]の方法を用いて、機能欠損変異型アブシジン酸8'位水酸化酵素遺伝子を有するコムギを選択し、

b) 工程a)で得たコムギを育種親として用いて育種し、

c) 工程b)で取得される子孫コムギ由来のゲノムDNAについて、コムギA、B及びDゲノムのアブシジン酸8'位水酸化酵素遺伝子の変異を検出する

ことを含む、種子休眠性が強化されたコムギの育種方法。

【0019】

30

この方法では、例えば、子孫コムギ由来のゲノムDNAを、配列番号16及び32で示される塩基配列のそれぞれからなるオリゴヌクレオチドプライマーを含むプライマーペア、又は配列番号21及び26で示される塩基配列のそれぞれからなるオリゴヌクレオチドプライマーを含むプライマーペアを用いて核酸増幅し、得られた増幅産物を制限酵素AluIで消化することにより、コムギA、B及びDゲノムのアブシジン酸8'位水酸化酵素遺伝子の変異を検出することができる。

【0020】

この方法では、子孫コムギ由来のゲノムDNAを、配列番号15及び27で示される塩基配列のそれぞれからなるオリゴヌクレオチドプライマーを含むプライマーペアを用いて核酸増幅することにより、コムギA、B及びDゲノムのアブシジン酸8'位水酸化酵素遺伝子の変異を検出してもよい。

40

【0021】

[3] 配列番号11で示される塩基配列又はその相補配列の連続した少なくとも15塩基の塩基配列を含む、コムギDゲノムのアブシジン酸8'位水酸化酵素遺伝子の機能欠損変異検出用のオリゴヌクレオチドプライマー。

【0022】

[4] 配列番号27で示される塩基配列を含むオリゴヌクレオチドプライマーと、配列番号36で示される塩基配列を含むオリゴヌクレオチドプライマーとを含む、コムギDゲノムのアブシジン酸8'位水酸化酵素遺伝子の機能欠損変異検出用のプライマーペア。

【0023】

50

[5] 以下の(a)～(c)のいずれかである、コムギA、B及びDゲノムのアブシジン酸8'位水酸化酵素遺伝子検出用のプライマーペア。

【0024】

(a) 配列番号16及び32で示される塩基配列のそれぞれからなるオリゴヌクレオチドプライマーを含むプライマーペア、

(b) 配列番号21及び26で示される塩基配列のそれぞれからなるオリゴヌクレオチドプライマーを含むプライマーペア

(c) 配列番号15及び27で示される塩基配列のそれぞれからなるオリゴヌクレオチドプライマーを含むプライマーペア

[6] 上記[3]のオリゴヌクレオチドプライマー又は上記[4]のプライマーペアと、上記[5]のプライマーペアとを含む、コムギ種子休眠性強化育種用のキット。

【発明の効果】

【0025】

本発明を用いれば、コムギアブシジン酸8'位水酸化酵素(ABA8'ox)遺伝子の変異集積を効率よく検出することができ、種子休眠性強化コムギの開発を促進することができる。

【図面の簡単な説明】

【0026】

【図1】図1は、3つのTaABA8'ox1同祖遺伝子(相同遺伝子)(TaABA8'ox1A、TaABA8'ox1B、TaABA8'ox1D)の塩基配列(全長cDNA配列;配列番号1、3、5)のアラインメントによる比較を示す図である。図中に枠で示した開始コドン(ATG)及び終止コドン(TGA)は、TaABA8'ox1A遺伝子ではそれぞれ配列番号1の112位～114位及び1552位～1554位に位置する。TaABA8'ox1B遺伝子では、開始コドン(ATG)及び終止コドン(TGA)は配列番号3の96位～98位及び1524位～1526位に位置する。TaABA8'ox1D遺伝子では、開始コドン(ATG)及び終止コドン(TGA)は配列番号5の101位～103位及び1535位～1537位に位置する。

【図2】図2は、3つのTaABA8'ox1同祖遺伝子(相同遺伝子)(TaABA8'ox1A、TaABA8'ox1B、TaABA8'ox1D)のゲノムDNA上の塩基配列(ゲノム配列;配列番号7～9)のアラインメントによる比較を示す図である。図中に枠で示した開始コドン及び終止コドンは、TaABA8'ox1A遺伝子ではそれぞれ配列番号7の14位～16位及び1960位～1962位、TaABA8'ox1B遺伝子では配列番号8の14位～16位及び1930位～1932位、そしてTaABA8'ox1D遺伝子では配列番号9の14位～16位及び1937位～1939位に位置する。

【図3】図3は、TaABA8'ox1同祖遺伝子群を検出するためのプライマーセットの設計について示す図である。各DNAマーカーに対応する核酸増幅産物を示す四角枠の右側には、枠内に記載された制限酵素での処理によって増幅産物から得られるDNA断片のサイズ(bp)が記載されている。A、B、Dは、それぞれTaABA8'ox1A、TaABA8'ox1B、及びTaABA8'ox1Dを示す。

【図4】図4は、コムギNullisomic-tetrasomic系統における各DNAマーカーのバンドパターンを示す図である。ox1A、ox1B、ox1Dは、それぞれ、TaABA8'ox1A、TaABA8'ox1B、TaABA8'ox1D遺伝子に対応するバンドを表す(他の図でも同様)。AはDNAマーカーS7A3/AluI、S1A8/AluI、及びS2A2mixの設計について示す。白抜き矢印は、タマイズミDゲノム中に見出された挿入変異のおおよその位置を示している。また、図示したS2A2mixの増幅産物を示す枠中には、終止コドン直後に存在する、同祖遺伝子間で長さの異なるギャップ部位(Gap)を示した。BはS7A3/AluIマーカー、CはS1A8/AluIマーカー、DはS2A2mixマーカーについての解析結果を示す。各レーンには、解析に用いたNullisomic-tetrasomic系統名を示す。例えば「N6AT6B」は、6A染色体(ゲノムAの第6染色体)が欠失し、かつ6B染色体(ゲノムBの第6染色体)を1本過剰に有している系統を意味する。他の系統名も同様の形式で記載されている。

【図5】図5は、S2A2mixマーカーを用いたTaABA8'ox1同祖遺伝子群の多型解析によって示された、コムギ遺伝資源におけるTaABA8'ox1の遺伝子型を示す図である。各レーンにはコムギ遺伝資源の品種又は系統名を示す。

【図6】図6は、TaABA8'ox1D遺伝子における挿入変異を示す図である。「D」は「農林61

10

20

30

40

50

号」由来TaABA8'ox1D遺伝子の部分ゲノム配列、「D Insertion」は「新中長」由来TaABA8'ox1D遺伝子の部分ゲノム配列を示す。d_S1は遺伝子特異的プライマーTaABAox1d_S1、A2_AGCGは遺伝子特異的プライマーTaABAox1.A2_AGCGの位置を示す。d_insert A1は挿入配列内に設計したTaABAox1d_InsertA1プライマー、S2はTaABAox1.S2プライマーの位置を示す。「農林61号」及び「新中長」由来TaABA8'ox1D遺伝子のそれぞれの塩基配列上に終止コドン（TGA及びTAG）を枠で囲って示した。

【図7】図7は、TaABA8'ox1D遺伝子中の挿入変異によるアミノ酸配列の変化を示す図である。Aは「新中長」のTaABA8'ox1Dの挿入配列を含むゲノム配列（D Insertion）と、「農林61号」のTaABA8'ox1Dの対応する領域のゲノム配列（D）とのアラインメントを示す。Bは「新中長」由来の挿入変異を有するTaABA8'ox1Dと様々な植物種起源のABA8'oxのC末端アミノ酸配列のアラインメントを示す。TaABA8'ox1A、TaABA8'ox1B、TaABA8'ox1D、及びTaABA8'ox1D insertionは、本願実施例で決定した「農林61号」由来TaABA8'ox1A,B,D遺伝子及び「新中長」由来TaABA8'ox1D遺伝子にコードされるアミノ酸配列を示している。図中の、Triticum aestivum、Hordeum vulgare、Oryza sativa、Zea mays、Sorghum bicolor、Ricinus communis、Solanum tuberosum、及びPopulus trichocarpa、Arabidopsis thaliana（CYP707A1、CYP707A2、CYP707A3、CYP707A4）のABA8'oxのC末端アミノ酸配列は、それぞれ配列番号39～50に示す。TaABA8'ox1D insertionの枠で囲った配列が、挿入変異により変化したアミノ酸配列である。アスタリスクはヘム結合領域のCys残基を示す。ヘム結合領域の保存配列（Phe-X-X-Gly-X-Arg/His-X-Cys-X-Gly）はこの図では439位のPheから448位のGlyまでである。

【図8】図8は、TaABA8'ox1D遺伝子の挿入配列を含むゲノム領域のPCR増幅について記載した図である。Aは、「新中長」のTaABA8'ox1D遺伝子のゲノム構造及び挿入配列を示す。Bは、プライマーTaABAox1d_S1（dS1）及びTaABAox1.A2_AGCG（A2_AGCG）を用いたPCRによるTaABA8'ox1Dのゲノム領域の増幅産物の電気泳動結果を示す。N:「農林61号」、S:「新中長」、T:「タマイズミ」、M:「タマイズミ」変異体（「タマイズミ」のγ線照射系統のTaABA8'ox1A/TaABA8'ox1D変異体）。上側のより大きなサイズのバンドが挿入配列を含むTaABA8'ox1Dの増幅断片、下側のより小さなサイズのバンドが挿入配列を含まないTaABA8'ox1Dの増幅断片である。

【図9】図9は、挿入配列を含むTaABA8'ox1D遺伝子をマルチプレックスPCRにより特異的に増幅した結果を示す電気泳動写真である。Aは、S2d_InsertA1&A2_AGCG解析の結果、BはS2d_InsertA1&a_S1a_A1解析の結果を示す。N、S、T、Mは図8と同様である。

【図10】図10は、S2d_InsertA1&a_S1a_A1マルチプレックスPCRを用いた、様々なコムギ登録品種におけるTaABA8'ox1D挿入変異の検出結果を示す図である。各レーンにはコムギ品種名を示す。S2d_InsertA1、a_S1a_A1は、それぞれ、TaABAox1a_S1とTaABAox1a_A1のプライマーペア、TaABAox1.S2とTaABAox1d_InsertA1のプライマーペアで増幅されたバンドを示す。

【図11】図11は、S2d_InsertA1&a_S1a_A1マルチプレックスPCRを用いた、様々なコムギ遺伝資源におけるTaABA8'ox1D挿入変異の検出結果を示す図である。各レーンにはコムギ遺伝資源の品種又は系統名を示す。

【図12】図12は、DNAマーカーを用いたTaABA8'ox1遺伝子変異体の検出結果を示す図である。AはDNAマーカーS1A8/AluI、BはDNAマーカーS7A3/AluI、CはDNAマーカーS2A2mixによる解析結果である。同じコムギ個体のサンプルは、A、B、及びCで同位置のレーンにアプライされている。バンドの喪失によって表されるTaABA8'ox1A、TaABA8'ox1B、TaABA8'ox1Dのそれぞれの遺伝子欠失変異の存在を、A変異、B変異、D変異として示す。

【図13】図13は、「タマイズミ」由来のγ線照射系統におけるTaABA8'ox1遺伝子変異の検出結果を示した図である。AはDNAマーカーS7A3/AluI、BはDNAマーカーS1A8/AluI、CはDNAマーカーS2A2mixによる解析結果である。電気泳動像の各レーンは右から新中長、184G4、タマイズミ、農林61号である。

【図14】図14は、184G4（TaABA8'ox1A/TaABA8'ox1D変異体）の多型パターンを示す図である。N:「農林61号」、T:「タマイズミ」、M:「タマイズミ」変異体184G4（「タマイ

10

20

30

40

50

ズミ」の γ 線照射系統のTaABA8'ox1A/TaABA8'ox1D変異体)、S:「新中長」。A、B、Dは、それぞれTaABA8'ox1A、TaABA8'ox1B、及びTaABA8'ox1D由来増幅断片を示す。DNAマーカーS7A3/AluI、S7A7/AluI、S7A8/MseI、S6A8/MseI、及びS8A8/MseIを用いた。

【図15】図15は、184G4(TaABA8'ox1A/TaABA8'ox1D変異体)の多型パターンを示す図である。N、T、M、Sは図14と同様である。DNAマーカーS1A8/AluI、S1A10/AluI+MboI、S1A11/AluI+MboI、S1A12/AluI+MboI、及びS1A1/AluI+MboIを用いた。A、B、Dは、それぞれTaABA8'ox1A、TaABA8'ox1B、及びTaABA8'ox1D由来増幅断片を示す。アスタリスク(*)は、当該バンドがTaABA8'ox1A由来のバンドの推定増幅断片サイズよりも若干短いことを示す。

【図16】図16は、184G4(TaABA8'ox1A/TaABA8'ox1D変異体)の多型パターンを示す図である。N、T、M、Sは図14と同様である。AはDNAマーカーS2A2mixを用いた解析結果、BはDNAマーカーS7A9/KpnIを用いた解析結果を示す。

【図17】図17は、TaABA8'ox1同祖遺伝子変異の集積による発芽抑制効果を示した図である。Aは開花後49日目の種子、Bは開花後70日目の種子の累積発芽率を示した。

【発明を実施するための形態】

【0027】

本発明は、本質的には、コムギゲノムに坐乗するアブシジン酸8'位水酸化酵素(ABA8'ox)をコードするTaABA8'ox1D遺伝子のコード領域中の挿入配列に基づいて設計した検出用核酸を用いてその挿入配列の存在を検出することにより、TaABA8'ox1D遺伝子の挿入変異を検出し、それによりコムギゲノム中の機能欠損変異したTaABA8'ox1D遺伝子を検出する方法に基づくものである。

【0028】

以下、本発明をより詳細に説明する。

【0029】

1. TaABA8'ox1D遺伝子の挿入変異の検出

本発明に係る検出方法の適用対象となるコムギは、普通コムギ(*Triticum aestivum*)に属する任意のコムギ植物であり得るが、栽培種の普通コムギ品種又は系統がより好ましい本発明に係る検出方法の適用対象となるコムギは、日本在来品種若しくは系統又はその子孫コムギであってよいし、例えば品種「新中長」の子孫コムギであってもよい。

【0030】

本発明に係る検出方法では、まず、本検出方法に供するコムギから、ゲノムDNAを調製することが好ましい。ゲノムDNAは、コムギ個体より採取した任意の組織(例えば、葉、茎、根、カルス、種子など)から、植物分子生物学の分野で慣用されている手法に従って抽出し、必要に応じて精製することにより、調製すればよい。コムギからのゲノムDNAの抽出は、例えば、市販の植物ゲノムDNA抽出キット(例えば、DNeasy Plant Mini Kit(QIAGEN))やPlant Genomic DNA Extraction Mini(VIOGENE)等)を用いて行うこともできる。このようにして調製されるコムギ由来のゲノムDNAについては、核酸増幅反応の鑄型として用いる前にRNase処理等によりRNAを除去することも好ましい。

【0031】

本検出法では、このようにして調製されるコムギ由来のゲノムDNAを鑄型として、品種「新中長」で見出されるコムギDゲノムのアブシジン酸8'位水酸化酵素遺伝子(TaABA8'ox1D遺伝子)中の挿入配列に基づいて設計したオリゴヌクレオチドプライマーを用いて核酸増幅を行えばよい。このオリゴヌクレオチドプライマーは、TaABA8'ox1D遺伝子中の終止コドンの約130bp上流の部位(配列番号9で示されるTaABA8'ox1D遺伝子のゲノム配列の1809位と1810位の間に挿入された塩基配列(配列番号11)に基づき、常法により配列特異的なオリゴヌクレオチドプライマーを設計すればよい。このようなオリゴヌクレオチドプライマーは、典型的には、配列番号11で示される塩基配列又はその相補配列の連続した少なくとも15塩基の塩基配列を含む1種以上のオリゴヌクレオチドプライマーである。本明細書において、特定の塩基配列の「相補配列」とは、その特定の塩基配列からなるポリヌクレオチドに対する相補鎖(アンチセンス鎖)全長の塩基配列(5'から3'方向に記載

した配列)を意味する。配列番号11で示される塩基配列の連続した少なくとも15塩基の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドプライマーは、通常はフォワードプライマーとして使用される。配列番号11で示される塩基配列の相補配列の連続した少なくとも15塩基の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドプライマーは、通常はリバースプライマーとして使用される。このオリゴヌクレオチドプライマーは、少なくとも15塩基長であるが、15~50塩基長が好ましく、15~30塩基長がさらに好ましい。このオリゴヌクレオチドプライマーは、特異性をより高める上では、好ましくは18塩基長以上、さらに好ましくは20塩基長以上であってよい。このオリゴヌクレオチドプライマーとしては、配列番号11で示される塩基配列又はその相補配列の、少なくとも380位~403位(配列番号11の塩基番号による。配列番号36のプライマーがアニーリングする位置に相当)の領域を含む連続した24塩基以上の塩基配列を含むものも好ましい。

10

【0032】

核酸増幅は、コムギDゲノムのアブシジン酸8'位水酸化酵素遺伝子(TaABA8'ox1D遺伝子)中の挿入配列に基づいて設計される上記リバースプライマーと、TaABA8'ox1D遺伝子の挿入配列の上流に設計したフォワードプライマーとを含むプライマーペアを用いて行うことができる。ここで、挿入変異を有するTaABA8'ox1D遺伝子のゲノム配列(配列番号10)において、挿入配列は、配列番号10で示される塩基配列の1810位から2775位までに相当する。従って、挿入配列の上流に設計するこのフォワードプライマーは、例えば、配列番号10で示される塩基配列の1809位から上流の少なくとも15塩基の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドプライマーである。ここで「配列番号10で示される塩基配列の1809位から上流」とは、配列番号10で示される塩基配列の1~1809位の配列を指す。

20

【0033】

核酸増幅はまた、コムギDゲノムのアブシジン酸8'位水酸化酵素遺伝子(TaABA8'ox1D遺伝子)中の挿入配列に基づいて設計される上記フォワードプライマーと、TaABA8'ox1D遺伝子の挿入配列の下流に設計したリバースプライマーとを含むプライマーペアを用いて行うことができる。挿入配列の下流に設計するこのリバースプライマーは、例えば、配列番号10で示される塩基配列の2776位から下流の少なくとも15塩基の塩基配列の相補配列を含むオリゴヌクレオチドプライマーである。ここで「配列番号10で示される塩基配列の2776位から下流」とは、配列番号10で示される塩基配列の2776位~3253位の配列を指す。

30

【0034】

核酸増幅は、コムギDゲノムのアブシジン酸8'位水酸化酵素遺伝子(TaABA8'ox1D遺伝子)中の挿入配列に基づいて設計したフォワードプライマーとリバースプライマーからなるプライマーペアを用いて行うこともできる。

【0035】

プライマーペアの設計は、既存のプライマー設計ソフトウェア等を利用して、常法により行えばよい。例えばプライマーペアは、フォワードプライマーとリバースプライマーのそれぞれの塩基配列から算出されるTM値やCG含量を考慮して設計することができる。

【0036】

核酸増幅はまた、コムギDゲノムのアブシジン酸8'位水酸化酵素遺伝子(TaABA8'ox1D遺伝子)中の挿入配列に基づいて設計したフォワードプライマー又はリバースプライマーのいずれかのみを用いて行うこともできる。

40

【0037】

配列番号11で示される塩基配列又はその相補配列の連続した少なくとも15塩基の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドプライマーの好ましい例としては、以下に限定するものではないが、配列番号36で示される塩基配列を含むオリゴヌクレオチドプライマー、例えば、配列番号36で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドプライマーが挙げられる。

【0038】

一方、配列番号10で示される塩基配列の1809位から上流の少なくとも15塩基の塩基配

50

列を含むオリゴヌクレオチドプライマーとしては、以下に限定するものではないが、配列番号27で示される塩基配列を含むオリゴヌクレオチドプライマー、例えば、配列番号27で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドプライマーが挙げられる。

【0039】

本発明に係る検出方法では、上記のようなオリゴヌクレオチドプライマーを用いたコムギ由来のゲノムDNAの核酸増幅を、公知の核酸増幅法に従って行えばよい。例えばPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）法、LAMP（Loop-Mediated Isothermal Amplification）法、ICAN（Isothermal and Chimeric primer-initiated Amplification of Nucleic acids）法、SDA（Strand Displacement Amplification）法などを利用することができる。本発明に係る方法における核酸増幅は、2つ以上のプライマーペアを反応液中に共存させて行うマルチプレックスPCRによって行ってもよい。核酸増幅を行う際の反応液組成や温度サイクル条件の各温度及び反応時間等は、当業者であれば、使用する核酸増幅法、プライマーのT_m値、サーマルサイクラーの仕様などに合わせて適宜定めることができる。例えば、95～99℃で20秒～1分間の熱変性の後、90～99℃で8秒～1分間及び65～75℃で20秒～2分間のアニーリング及び伸長反応を1サイクルとして20～40サイクル行い、最後に65～80℃で1～4分間の反応を行う温度サイクル条件で核酸増幅（例えばPCR）を実施してもよい。あるいは、95～99℃で20秒～1分間の熱変性の後、90～99℃で8秒～1分間、50～65℃で20秒～1分間、及び65～80℃で30秒～2分間を1サイクルとして20～40サイクル行い、最後に65～80℃で1～4分間の反応を行う温度サイクル条件で核酸増幅（例えばPCR）を実施してもよい。

【0040】

コムギ由来のゲノムDNAについて、TaABA8'ox1D遺伝子中の挿入配列に基づいて設計したオリゴヌクレオチドプライマー、具体的には、配列番号11で示される塩基配列又はその相補配列の連続した少なくとも15塩基の塩基配列を含む1種以上のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて核酸増幅反応を行った結果、被験ゲノムDNAに「新中長」で見出されたのと同様の挿入変異を有するTaABA8'ox1D遺伝子が含まれていれば、そのオリゴヌクレオチドプライマーによる特異的な核酸増幅が起こる。従って、核酸増幅後の反応液に、TaABA8'ox1D遺伝子中の挿入配列に基づいて設計したオリゴヌクレオチドプライマーによる増幅産物が確認された場合、コムギゲノムのアブシジン酸8'位水酸化酵素遺伝子中の挿入変異が検出されたことになる。

【0041】

本発明に係る方法では、そのような核酸増幅の結果として得られる上記オリゴヌクレオチドプライマーによる増幅産物を、任意の核酸分析手段によって確認することができる。例えば、そのような増幅産物を含む核酸増幅反応終了後の反応液を、ゲル電気泳動と染色（例えば、0.5～4%アガロースゲル、および、5～20%ポリアクリルアミドゲル上での電気泳動及び臭化エチジウム染色）、蛍光又は放射同位元素等で標識したプライマーを使用した場合のゲル電気泳動と標識検出、キャピラリー電気泳動、自動シーケンサー等を用いた塩基配列決定、MALDI-TOF/MS分析等に供し、その核酸分析結果から、目的の増幅産物が得られたかどうかを確認することができる。目的の増幅断片が得られたかどうかは、例えばTaABA8'ox1D遺伝子のゲノム配列（配列番号9）や挿入変異を有するTaABA8'ox1D遺伝子のゲノム配列（配列番号10）に基づいて予測される増幅産物の塩基配列やそのサイズ等と一致するかどうかにより判定することができる。

【0042】

上記オリゴヌクレオチドプライマーによる増幅産物は、適当な制限酵素で処理した後に、電気泳動して、予測される切断断片長のバンドが得られるかどうかに基づいて、確認してもよい。

【0043】

本発明に係る検出方法の一例として、配列番号27で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドプライマーをフォワードプライマー、配列番号36で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドプライマーをリバースプライマーとするプライマーペアを用いて、コムギゲノムDNAを鋳型としてPCRにより核酸増幅することにより、TaABA8'ox1D遺伝子

中の挿入配列に対する特異的な増幅産物を得ることができる。この場合、PCRの温度サイクル条件の好ましい例は、98℃で30秒間の熱変性の後、98℃で10秒間及び70℃で45秒間のアニーリング及び伸長反応を1サイクルとして20～40サイクル行い、最後に72℃で1～4分間の反応を行うものである。このPCRにより、挿入配列に対する特異的な増幅産物として、典型的には492bpの増幅産物が得られる。

【0044】

配列番号27で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドプライマーと、配列番号36で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドプライマーとから構成されるプライマーペアを、挿入変異を有するTaABA8'ox1D遺伝子を増幅せずに他のTaABA8'ox1D遺伝子の特異的に増幅するコントロール用のオリゴヌクレオチドプライマーと反応液中で共存させて、核酸増幅を行うこともできる。核酸増幅法がPCRである場合、このPCRはいわゆるマルチプレックスPCRと呼ばれる。この方法によれば、他のTaABA8'ox1D遺伝子も同時に検出できるので、挿入変異を有するTaABA8'ox1D遺伝子をより精度良く検出することができる。

10

【0045】

このようなマルチプレックスPCRに用いるコントロール用のプライマーの例としては、配列番号35で示される塩基配列を含むオリゴヌクレオチドプライマーが挙げられ、これは配列番号27で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドプライマーとの組み合わせにより、挿入変異を有しないTaABA8'ox1D遺伝子の特異的に核酸増幅できる。この場合、特に特異的な核酸増幅のためには、アニーリング及び伸長反応は、30～50秒、例えば45秒とすることが好ましい。配列番号27で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドプライマーと、配列番号35で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドプライマーによる特異的な核酸増幅では、挿入変異を有しないTaABA8'ox1D遺伝子から、典型的には294bpの増幅産物が得られる。

20

【0046】

さらに、マルチプレックスPCRに用いるコントロール用のプライマーの例として、配列番号37で示される塩基配列を含むオリゴヌクレオチドプライマーと配列番号38で示される塩基配列を含むオリゴヌクレオチドプライマーの組み合わせ（プライマーペア）が挙げられ、これはTaABA8'ox1A遺伝子の特異的に核酸増幅できる。配列番号37で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドプライマーと、配列番号38で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドプライマーによる特異的な核酸増幅では、TaABA8'ox1A遺伝子から、典型的には198bpの増幅産物が得られる。

30

【0047】

本発明に係る検出方法では、以上のようにして、被験コムギのゲノムにおける、TaABA8'ox1D遺伝子中の挿入変異を検出することができる。本発明に係る検出方法によれば、TaABA8'ox1D遺伝子中の挿入変異をホモ接合で有する被験コムギだけでなく当該挿入変異をヘテロ接合で有する被験コムギについても、その挿入変異を特異的に検出することができる。なお、例えば、挿入変異を有するTaABA8'ox1D遺伝子を増幅せずに挿入変異を有するTaABA8'ox1D遺伝子の特異的に増幅するコントロール用のオリゴヌクレオチドプライマーを用いた核酸増幅を併用することにより、TaABA8'ox1D遺伝子中の挿入変異をホモ接合で有する被験コムギと、当該挿入変異をヘテロ接合で有する被験コムギとを識別することもできる。

40

【0048】

このようにして検出されるTaABA8'ox1D遺伝子中の挿入変異は、野生型TaABA8'ox1D遺伝子によりコードされるアブシジン酸8'位水酸化酵素のC末端アミノ酸配列を変更し、さらに、そのタンパク質コード領域内で終止コドンを引き起こすことにより、アブシジン酸8'位水酸化酵素のC末端アミノ酸を欠失させる。具体的には、この方法で検出される挿入変異を有するTaABA8'ox1D遺伝子によりコードされるアブシジン酸8'位水酸化酵素は、野生型アブシジン酸8'位水酸化酵素（配列番号6）の436位以降のアミノ酸を欠失している（配列番号12）。アブシジン酸8'位水酸化酵素はシトクロムP450スーパーファミリーに分類されるが、シトクロムP450ファミリーのヘム結合領域のCys残基よりC末端側には、6番

50

目の基質の認識に関わる部位がある（今井嘉郎、化学と生物、Vo. 36, No.8（1998）、Gotoh, J. Biol. Chem., 267, 83（1992））。植物のアブシジン酸8'位水酸化酵素のアミノ酸配列を比較すると、ヘム結合領域のCys残基よりC末端側に高度に保存されたアミノ酸配列（PFxxPxxGL）があるが、シロイヌナズナのアブシジン酸8'位水酸化酵素遺伝子CYP707A2の変異体cyp707a2-2では、7番目のイントロンにT-DNAが挿入されることによりPFxxPxxGL配列を含むC末端領域（WEVIGDEEGIQYGFPPVKKGLPIRVTP；配列番号51）が翻訳されない（Kushiro et al., EMBO, 2004）。このcyp707a2-2変異体の種子発芽は、野生型に比較して顕著に遅延することから、アブシジン酸の代謝活性を失っていると考えられる（Kushiro et al., EMBO, 2004）。このようにC末端アミノ酸を欠失したアブシジン酸8'位水酸化酵素は活性を喪失することになる。なお、図7Bに、TaABA8'ox1A,B,D、TaABA8'ox1D insertionと、シロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）等の他植物種のアブシジン酸8'位水酸化酵素とのC末端アミノ酸配列のアラインメントを示している。上記のようにTaABA8'ox1D遺伝子中の挿入変異が検出された被験コムギのTaABA8'ox1D遺伝子は、活性のあるアブシジン酸8'位水酸化酵素を発現できず、機能を欠損している。従って本発明に係る検出方法では、TaABA8'ox1D遺伝子中の挿入変異を上記のようにして検出することにより、被験コムギの有するアブシジン酸8'位水酸化酵素遺伝子の機能欠損変異を検出することができる。この本発明に係る検出方法によりアブシジン酸8'位水酸化酵素遺伝子の機能欠損変異が検出された被験コムギは、機能欠損変異型アブシジン酸8'位水酸化酵素遺伝子の供給源として有用である。

【0049】

2. TaABA8'ox1同祖遺伝子群の同時検出方法

本発明は、所定のプライマーペアを用いた核酸増幅を行い、コムギのアブシジン酸8'位水酸化酵素遺伝子（TaABA8'ox1）の各同祖遺伝子（TaABA8'ox1A、TaABA8'ox1B、TaABA8'ox1D；コムギA、B及びDゲノムのアブシジン酸8'位水酸化酵素遺伝子）に特異的な増幅産物を確認することにより、被験コムギのTaABA8'ox1同祖遺伝子群を互いに区別して検出する方法も提供する。

【0050】

このTaABA8'ox1同祖遺伝子群の検出方法は、各同祖遺伝子（TaABA8'ox1A、TaABA8'ox1B、TaABA8'ox1D）の多型検出が可能なDNAマーカーを用いて行うことができる。具体的には、TaABA8'ox1同祖遺伝子群の多型部位を増幅するプライマーペアを用いた核酸増幅（好ましくはPCR）と、必要に応じてその後の制限酵素処理を行い、各同祖遺伝子に特異的な増幅産物（DNA断片）を確認することにより、TaABA8'ox1A、TaABA8'ox1B、及びTaABA8'ox1D遺伝子を区別して同時に検出することができる。本明細書において「増幅産物」とは、プライマー又はプライマーペアにより特定の領域について増幅された核酸増幅産物又はその制限酵素処理で得られたDNA断片をいう。

【0051】

より具体的には、本発明は、被験コムギ由来のゲノムDNAについて、以下の(1)～(13)のいずれかの工程により、コムギA、B及びDゲノムのアブシジン酸8'位水酸化酵素遺伝子のそれぞれに特異的な増幅産物を得ることにより、コムギアブシジン酸8'位水酸化酵素遺伝子群を検出する方法を提供する：

- (1) 配列番号16及び32で示される塩基配列のそれぞれからなるオリゴヌクレオチドプライマーを含むプライマーペアを用いたPCRにより核酸増幅を行い、得られた増幅産物を制限酵素AluIで消化する工程〔実施例中のDNAマーカーS7A3/AluIに対応〕、
- (2) 配列番号20及び32で示される塩基配列のそれぞれからなるオリゴヌクレオチドプライマーを含むプライマーペアを用いたPCRにより核酸増幅を行い、得られた増幅産物を制限酵素AluIで消化する工程〔実施例中のDNAマーカーS7A7/AluIに対応〕、
- (3) 配列番号21及び32で示される塩基配列のそれぞれからなるオリゴヌクレオチドプライマーを含むプライマーペアを用いたPCRにより核酸増幅を行い、得られた増幅産物を制限酵素MseIで消化する工程〔実施例中のDNAマーカーS7A8/MseIに対応〕、
- (4) 配列番号21及び31で示される塩基配列のそれぞれからなるオリゴヌクレオチドプ

ライマーを含むプライマーペアを用いたPCRにより核酸増幅を行い、得られた増幅産物を制限酵素MseIで消化する工程〔実施例中のDNAマーカーS6A8/MseIに対応〕、

(5) 配列番号 2 1 及び 3 3 で示される塩基配列のそれぞれからなるオリゴヌクレオチドプライマーを含むプライマーペアを用いたPCRにより核酸増幅を行い、得られた増幅産物を制限酵素MseIで消化する工程〔実施例中のDNAマーカーS8A8/MseIに対応〕、

(6) 配列番号 2 1 及び 2 6 で示される塩基配列のそれぞれからなるオリゴヌクレオチドプライマーを含むプライマーペアを用いたPCRにより核酸増幅を行い、得られた増幅産物を制限酵素AluIで消化する工程〔実施例中のDNAマーカーS1A8/AluIに対応〕、

(7) 配列番号 2 3 及び 2 6 で示される塩基配列のそれぞれからなるオリゴヌクレオチドプライマーを含むプライマーペアを用いたPCRにより核酸増幅を行い、得られた増幅産物を制限酵素AluIとMboIで消化する工程〔実施例中のDNAマーカーS1A10/AluI+MboIに対応〕、

(8) 配列番号 2 4 及び 2 6 で示される塩基配列のそれぞれからなるオリゴヌクレオチドプライマーを含むプライマーペアを用いたPCRにより核酸増幅を行い、得られた増幅産物を制限酵素AluIとMboIで消化する工程〔実施例中のDNAマーカーS1A11/AluI+MboIに対応〕、

(9) 配列番号 2 5 及び 2 6 で示される塩基配列のそれぞれからなるオリゴヌクレオチドプライマーを含むプライマーペアを用いたPCRにより核酸増幅を行い、得られた増幅産物を制限酵素AluIとMboIで消化する工程〔実施例中のDNAマーカーS1A12/AluI+MboIに対応〕、

(10) 配列番号 1 4 及び 2 6 で示される塩基配列のそれぞれからなるオリゴヌクレオチドプライマーを含むプライマーペアを用いたPCRにより核酸増幅を行い、得られた増幅産物を制限酵素AluIとMboIで消化する工程〔実施例中のDNAマーカーS1A1/AluI+MboIに対応〕

、
(11) 配列番号 2 2 及び 3 2 で示される塩基配列のそれぞれからなるオリゴヌクレオチドプライマーを含むプライマーペアを用いたPCRにより核酸増幅を行い、得られた増幅産物を制限酵素KpnIで消化する工程〔実施例中のDNAマーカーS7A9/KpnIに対応〕、

(12) 配列番号 1 5 及び 2 7 で示される塩基配列のそれぞれからなるオリゴヌクレオチドプライマーを含むプライマーペアを用いたPCRにより核酸増幅を行う工程〔実施例中のDNAマーカーS2A2mixに対応〕、

(13) 配列番号 1 8 及び 2 7 で示される塩基配列のそれぞれからなるオリゴヌクレオチドプライマーを含むプライマーペアを用いたPCRにより核酸増幅を行う工程〔実施例中のDNAマーカーS2A5mixに対応〕。

【0052】

本発明に係るTaABA8'ox1同祖遺伝子群の検出方法において、各工程で得られる各TaABA8'ox1同祖遺伝子に特異的な増幅産物（その制限酵素切断断片を含む）のサイズは、図3に記載されている。またPCRの温度サイクル条件等の詳細については後述の実施例を参照できる。本方法における核酸増幅法と特異的増幅産物の検出手段は、上記の1. 同様にして行えばよい。

【0053】

本発明に係るTaABA8'ox1同祖遺伝子群の検出方法においては、特に、上記の(1)のDNAマーカーS7A3/AluI、(6)のDNAマーカーS1A8/AluI、及び(12)のDNAマーカーS2A2mixの少なくとも1つを利用することが好ましい。

【0054】

本発明に係るTaABA8'ox1同祖遺伝子群の検出方法を用いれば、それぞれのTaABA8'ox1同祖遺伝子の増幅産物の変化に基づき、それらの遺伝子の変異を容易に検出することができる。例えば、DNAマーカーS2A2mixを用いたTaABA8'ox1同祖遺伝子群の検出方法では、特に、上記1. で検出される、挿入変異を有するTaABA8'ox1D遺伝子については、TaABA8'ox1D遺伝子由来の増幅産物に対応するバンドが喪失することにより、その挿入変異を容易に検出できる。

【0055】

このTaABA8'ox1同祖遺伝子群の変異の検出方法では、3つのTaABA8'ox1同祖遺伝子群の変異を同時に検出できるため、遺伝子変異を効率的に検出できる。また本方法では、複数

10

20

30

40

50

のDNAマーカーを利用してTaABA8'ox1同祖遺伝子群の検出を行ってもよい。すなわち、複数の遺伝子内領域に対して設計した複数のプライマーペアを用いてTaABA8'ox1同祖遺伝子群の核酸増幅を行うことにより、プライマーとゲノム中のアニーリング部位の塩基配列の不一致による増幅不良を防ぎつつ、各TaABA8'ox1同祖遺伝子の欠失変異をより確実に検出することができる。

【0056】

3. 種子休眠性を強化したコムギの育種方法

本発明に係るアブシジン酸8'位水酸化酵素遺伝子の機能欠損変異の検出方法によれば、機能欠損変異型アブシジン酸8'位水酸化酵素遺伝子を有する被験コムギを選択することができる。このようにして選択された機能欠損変異型アブシジン酸8'位水酸化酵素遺伝子を有するコムギは、TaABA8'ox1同祖遺伝子群（TaABA8'ox1A、TaABA8'ox1B、TaABA8'ox1D）の全てを機能欠損させたTaABA8'ox1完全変異体を作成する上で、育種親として有利に使用できる。機能欠損変異型アブシジン酸8'位水酸化酵素遺伝子をヘテロ接合で有するコムギも育種親として使用できるが、機能欠損変異型アブシジン酸8'位水酸化酵素遺伝子をホモ接合で有するコムギを育種親として用いることがより好ましい。

【0057】

本発明では、このように選択された機能欠損変異型アブシジン酸8'位水酸化酵素遺伝子を有するコムギを育種親として用いてコムギを育種することができる。コムギの育種は、常法により行うことができる。例えば、育種親である機能欠損変異型アブシジン酸8'位水酸化酵素遺伝子を有するコムギを他の品種又は系統のコムギと1回以上交配することによりコムギの育種を行うことができ、その結果得られた種子を採種することにより子孫コムギを取得することができる。あるいは、育種親である機能欠損変異型アブシジン酸8'位水酸化酵素遺伝子を有するコムギを変異原処理した後、自家交配することによってコムギの育種を行うこともでき、その結果得られた種子を採種することにより子孫コムギを取得することができる。変異原処理は、限定するものではないが、例えば、コムギ種子をγ線照射又はアジ化ナトリウム処理することにより実施することができる。γ線照射は、例えば、乾燥種子に対してγ線を10Gy/hで20時間照射することにより行うことができる。アジ化ナトリウム処理は、例えば、吸水種子（20℃、48時間）を4mMアジ化ナトリウム溶液に2時間浸漬することにより行うことができる。

【0058】

機能欠損変異型アブシジン酸8'位水酸化酵素遺伝子を有するコムギを育種親としてコムギを育種することにより得られた子孫コムギについて、さらに、そのゲノムDNA中のTaABA8'ox1同祖遺伝子群の変異を検出してもよい。ゲノムDNA中のTaABA8'ox1同祖遺伝子群の変異の検出は、上記2.に記載したTaABA8'ox1同祖遺伝子群の同時検出方法を用いて行うことができる。すなわち、子孫コムギのゲノムDNAについて、TaABA8'ox1同祖遺伝子群の同時検出方法により各TaABA8'ox1同祖遺伝子の特異的に検出した結果、例えば特定のTaABA8'ox1同祖遺伝子からの増幅産物のみが検出されない場合には、そのTaABA8'ox1同祖遺伝子に変異が存在することが示される。複数のDNAマーカーを利用して、複数のプライマーペアで複数のTaABA8'ox1遺伝子内領域の増幅を行うことも好ましい。複数のプライマーペアでTaABA8'ox1遺伝子配列を増幅しても増幅産物が得られない場合には、当該子孫コムギはそのTaABA8'ox1同祖遺伝子を欠失していると考えられる。

【0059】

上記1.の方法によって選択された、挿入変異によって機能欠損したTaABA8'ox1D遺伝子を有するコムギを育種親として行う育種の過程で、子孫コムギのゲノムDNAについてTaABA8'ox1同祖遺伝子群の検出を行うことにより、コムギA、B及びDゲノムのアブシジン酸8'位水酸化酵素遺伝子（TaABA8'ox1A、TaABA8'ox1B）の変異（好ましくは遺伝子欠失等の機能欠損変異）を検出すれば、TaABA8'ox1D遺伝子における挿入変異に加えてTaABA8'ox1A及び／又はTaABA8'ox1B遺伝子の変異（好ましくは遺伝子欠失等の機能欠損変異）をさらに生じた子孫コムギを容易にスクリーニングすることができる。また、コムギDゲノムのアブシジン酸8'位水酸化酵素遺伝子（TaABA8'ox1D）における挿入変異も併せて検出するこ

とにより、子孫コムギにおけるTaABA8'ox1D遺伝子における挿入変異の保持を確認することができる。

【0060】

TaABA8'ox1同祖遺伝子群の検出は、限定するものではないが、例えば、上記2. に示した(1)～(13)のいずれかの工程に基づく方法により行うことがより好ましい。特に、(1)のDNAマーカーS7A3/AluI、(6)のDNAマーカーS1A8/AluI、及び(12)のDNAマーカーS2A2mixの1つ以上、好ましくはそれら3つを利用して行うことがより好適である。

【0061】

例えば、子孫コムギ由来のゲノムDNAを、配列番号16及び32で示される塩基配列のそれぞれからなるオリゴヌクレオチドプライマーを含むプライマーペア（DNAマーカーS7A3/AluIの場合）、又は配列番号21及び26で示される塩基配列のそれぞれからなるオリゴヌクレオチドプライマーを含むプライマーペア（DNAマーカーS1A8/AluIの場合）を用いて核酸増幅し、得られた増幅産物を制限酵素AluIで消化することにより、コムギA、B及びDゲノムのアブシジン酸8'位水酸化酵素遺伝子の変異を検出することが好ましい。例えば、核酸増幅と制限酵素処理後の反応産物を電気泳動して、TaABA8'ox1A、TaABA8'ox1B及びTaABA8'ox1Dに特異的な増幅産物に対応した予測されるサイズ（表2）のバンドの有無を確認し、バンドが現れない場合には当該TaABA8'ox1遺伝子の変異が検出されたと判断することができる。

【0062】

あるいは、子孫コムギ由来のゲノムDNAを、配列番号15及び27で示される塩基配列のそれぞれからなるオリゴヌクレオチドプライマーを含むプライマーペア（DNAマーカーS2A2mixの場合）を用いて核酸増幅することにより、コムギA、B及びDゲノムのアブシジン酸8'位水酸化酵素遺伝子の変異を検出することも好ましい。例えば、核酸増幅後の反応産物を電気泳動して、TaABA8'ox1A、TaABA8'ox1B及びTaABA8'ox1Dに特異的な増幅産物に対応した予測されるサイズ（表2）のバンドの有無を確認し、バンドが現れない場合には当該TaABA8'ox1遺伝子の変異が検出されたと判定することができる。なお、このプライマーペア（S2A2mix）は、上記1.の方法で検出される挿入変異を有するTaABA8'ox1D遺伝子を増幅せず、挿入変異を有しないTaABA8'ox1D遺伝子の特異的に増幅するため、この方法によれば、TaABA8'ox1D遺伝子の挿入変異を簡便に検出することができる。

【0063】

DNAマーカーS7A3/AluI、S1A8/AluI、及びS2A2mixの3種を用いてTaABA8'ox1遺伝子の変異を検出し、特定のTaABA8'ox1同祖遺伝子からの特異的な増幅産物が、3種のDNAマーカーのいずれによっても得られない場合には、そのTaABA8'ox1同祖遺伝子は遺伝子全体又はその大部分が欠失しており、機能欠損していると判定することができる。

【0064】

このようにして得られる、TaABA8'ox1同祖遺伝子群の機能欠損変異が集積した子孫コムギでは、アブシジン酸8'位水酸化酵素の全体的な活性レベルが顕著に低下する。その結果、TaABA8'ox1同祖遺伝子群の機能欠損変異が集積した子孫コムギでは、種子休眠性が強化される。

【0065】

本発明における「種子休眠性」のレベルは、種子休眠性の指標となる、吸水処理後の種子の発芽率で表すことができる。まず、発芽試験として、No.2濾紙を2枚入れた直径9cmのシャーレに蒸留水を6mL添加し、その濾紙の上に被験コムギ（育種親コムギ、子孫コムギ等が含まれる）から採種した種子を並べることにより吸水を開始させ、その後、24時間毎に発芽粒数を調べ、累積発芽粒数を吸水刺激処理の7日後まで計数する。この発芽試験は、20℃暗所にて行う。吸水処理した種子の総数に対する発芽した種子の累積数の割合を、発芽率（％）として算出する。種子休眠性を調べるコムギ種子は、限定するものではないが、例えば、開花後49日目の種子、又は開花後70日目の種子であってよい。吸水処理の7日後の発芽率（％）（累積発芽率）が、子孫コムギの育種親のコムギ品種若しくは系統と比較して有意に低減しているか又は発芽率0％であることが示される場合には、当該子孫

10

20

30

40

50

コムギの種子休眠性は育種親よりも強化されていることが実証される。

【0066】

従って本発明は、このような方法で実施する、種子休眠性が強化されたコムギの育種方法も提供する。この育種方法では、交配や変異原処理等の従来の方法を用いて、TaABA8'ox1同祖遺伝子群の機能欠損変異を集積させることができる。この方法を用いれば、最終的にはTaABA8'ox1完全変異体を作出することができる。

【0067】

TaABA8'ox1同祖遺伝子群の機能欠損変異が集積した子孫コムギでは、吸水処理後も種子の発芽を抑制することができることから、本育種方法によれば、TaABA8'ox1同祖遺伝子群の機能欠損変異をコムギ個体に集積することにより、コムギ種子の発芽を抑制することができる。このようなコムギ種子発芽抑制方法も本発明の範囲に含まれる。

【0068】

4. プライマー及びキット

本発明は、本発明に係る方法に好適に用いることができるオリゴヌクレオチドプライマーも提供する。

【0069】

本発明に係るそのようなオリゴヌクレオチドプライマーの一実施形態は、配列番号11で示される塩基配列又はその相補配列の連続した少なくとも15塩基の塩基配列を含む、コムギDゲノムのアブシジン酸8'位水酸化酵素遺伝子の機能欠損変異検出用のオリゴヌクレオチドプライマーである。

【0070】

本発明に係るオリゴヌクレオチドプライマーの特に好ましい一実施形態として、配列番号27で示される塩基配列を含むオリゴヌクレオチドプライマーと、配列番号36で示される塩基配列を含むオリゴヌクレオチドプライマーとを含む、コムギDゲノムのアブシジン酸8'位水酸化酵素遺伝子の機能欠損変異検出用のプライマーペアが挙げられる。

【0071】

本発明はまた、本発明に係る育種方法に好適に使用され得るプライマーペアとして、以下の(a)～(c)：

- (a) 配列番号16及び32で示される塩基配列のそれぞれからなるオリゴヌクレオチドプライマーを含むプライマーペア、
- (b) 配列番号21及び26で示される塩基配列のそれぞれからなるオリゴヌクレオチドプライマーを含むプライマーペア
- (c) 配列番号15及び27で示される塩基配列のそれぞれからなるオリゴヌクレオチドプライマーを含むプライマーペア

のいずれかである、コムギA、B及びDゲノムのアブシジン酸8'位水酸化酵素遺伝子検出用のプライマーペアも提供する。

【0072】

本発明に係るオリゴヌクレオチドプライマーは、少なくとも15塩基 (bp)、好ましくは15～50塩基 (bp)、より好ましくは15～30塩基 (bp)、必要に応じて18～30塩基 (bp) (例えば20～30塩基 (bp)) の塩基長を有する。本発明に係るオリゴヌクレオチドプライマーは、当業者に周知の任意の化学合成法により作製することができ、例えば市販の自動DNA合成装置を使用して慣用手順により合成することができる。本発明に係るオリゴヌクレオチドプライマーは、オリゴヌクレオチドにさらに任意の修飾が施されたものでもよい。例えば本発明に係るオリゴヌクレオチドプライマーは、その5'末端又は3'末端に当該プライマーの検出や増幅を容易にするための標識物質 (例えば、蛍光分子、色素分子、放射性同位元素、ジゴキシゲニンやビオチン等の有機化合物など) 及び／又は付加配列 (LAMP法で用いるループプライマー部分等) を含んでいてもよい。本発明に係るプライマーは、5'末端でリン酸化又はアミン化されていてもよい。本発明に係るプライマーはまた、天然塩基のみを含んでもよいし、修飾塩基を含んでもよい。修飾塩基としては、デオキシイノシン、デオキシウラシル、S化塩基などが挙げられるが、これらに限定されるものではない

。本発明に係るプライマーは、ホスホロチオエート結合やホスホロアミデート結合などを含む任意の誘導体オリゴヌクレオチドを含むものであってもよいし、ペプチド核酸結合を含むペプチド-核酸（PNA）を含んでいてもよい。本発明に係るオリゴヌクレオチドプライマーは、DNAであってもRNAであってもよく、RNAである場合には、その塩基配列はDNA配列における「T（チミン）」を「U（ウラシル）」に読み替えるものとする。

【0073】

本発明はまた、本発明に係るオリゴヌクレオチドプライマーを含むキットも提供する。好適な実施形態では、該キットは、上記のコムギDゲノムのアブシジン酸8'位水酸化酵素遺伝子の機能欠損変異検出用のオリゴヌクレオチドプライマー又はプライマーペアと、上記のコムギA、B及びDゲノムのアブシジン酸8'位水酸化酵素遺伝子検出用のプライマーペアとを含む、コムギ種子休眠性強化育種用のキットである。このキットは、さらに制限酵素AluIを含んでいてもよい。このコムギ種子休眠性強化育種用のキットは、種子休眠性が強化されたコムギの作製において非常に便利に使用できる。

【実施例】

【0074】

以下、本発明を実施例を挙げてさらに具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例によって制限されるものではない。

【0075】

以下の実施例で使用したコムギ品種又は系統は、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 作物研究所（日本）で保存されているもの又は農業生物資源ジェンバンクから分与されたものを用いた。

【0076】

〔実施例1〕 TaABA8'ox1同祖遺伝子の単離及び解析

（1）コムギの発芽時に発現するABA8'ox遺伝子の単離

濾紙2枚を入れた直径9cmのシャーレに蒸留水6mlを加え、コムギ品種「Chinese Spring（チャイニーズ・スプリング）」の種子を30粒播種し、発芽及び発根させた。得られた幼植物体からCTAB法（Chang et al. Plant Mol. Biol. Rep. 11, 113-116 (1993)）を用いて全RNAを抽出し、Dynabeads Olygo (dT)25 resin (Dyna)を用いてmRNAを精製した。このmRNAを鋳型として、Marathon cDNA Amplification Kit (Clontech)の使用説明書に従って逆転写反応を行い、5'及び3'末端にアダプターを付加したcDNAを調製し、RACEのための鋳型とした。RACE反応は、Advantage2 PCRキット（Clontech）を用いてその説明書に従って行った。5'-RACE及び3'-RACEには、オオムギのABA8'ox遺伝子と高い相同性を示すコムギのESTの塩基配列（GenBankアクセッション番号CJ702265）を基に設計した遺伝子特異的プライマー（TaABAox1.S1：5'-AGGCCGTGGAGGACGTGGAGTACC-3'；配列番号26、TaABAox1.A3：5'-CCGAAGATGGACAGCAATGCCACAT-3'；配列番号16）とアダプタープライマーAP1（5'-CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC-3'；配列番号13（Marathon cDNA Amplification Kit, Clontech））を用いた。続いて、このようにしてRACEにより得られた増幅断片の塩基配列を決定し、コムギのABA8'ox1をコードすると推定される3つの遺伝子に対応するcDNAの部分塩基配列が明らかになった。

【0077】

さらにこれら3つの遺伝子のcDNA全長の塩基配列を明らかにするために、遺伝子特異的プライマー（TaABAox1.S3：5'-CAAGAACCCCAACGTCTTCTTCG-3'；配列番号28）及び遺伝子特異的プライマー（TaABAox1.A4：5'-TGGCCGGGAAGGTAGGCTTGAAGAG-3'；配列番号17）を合成し、これらプライマーを用いて「Chinese Spring」のcDNAを鋳型とする高忠実性（high fidelity）PCRを行った。PCR反応にはPyrobest DNAポリメラーゼ（TaKaRa）を用い、反応液組成は酵素に添付される説明書通りで行った。PCR反応の温度サイクルは、98℃で10秒での変性、68℃で3分でのアニーリング及び伸長を30サイクルで行った。このようにして増幅されたDNA断片をpCR4 Blunt-TOPOベクター（Invitrogen）中にクローニングし、16クローンについて塩基配列決定を行ったところ、増幅DNA断片について3つの塩基配列が確認された。これら3つの塩基配列と5'-RACE及び3'-RACEで得られた塩基配列に基づき、3つ

の全長cDNAの塩基配列を決定した(図1)。さらに、これら3つの遺伝子がコードする推定アミノ酸配列を、オオムギのABA8'oxのアミノ酸配列と比較したところ、それらは互いに高度の相同性を示した。なお、PCR断片の塩基配列決定は、自動シーケンシングシステム(ABI373A及びABI3100Avant, Applied Biosystems)を用いたジデオキシヌクレオチド・チェーン・ターミネーション法により行った。また、配列の解析は、DNASYS(Hitachi Software Engineering Co., 日本)を用いて実施した。

【0078】

解析の結果、上記のようにして配列決定されたコムギ品種「Chinese Spring」由来の3つの遺伝子は、ABA8'ox相同遺伝子群であることが示された。すなわち単離された3つのコムギABA8'ox相同遺伝子は、TaABA8'ox1同祖遺伝子群を構成する3つのTaABA8'ox1同祖遺伝子(TaABA8'ox1A、TaABA8'ox1B、及びTaABA8'ox1D)であった。得られたTaABA8'ox1A、TaABA8'ox1B、TaABA8'ox1D遺伝子の全長cDNA配列をそれぞれ配列番号1、3、5に示す。またこれら遺伝子にコードされるアミノ酸配列をそれぞれ配列番号2(TaABA8'ox1A)、配列番号4(TaABA8'ox1B)、配列番号6(TaABA8'ox1D)に示す。

【0079】

(2) TaABA8'ox1同祖遺伝子群のゲノム配列の決定

上記(1)で単離したTaABA8'ox1同祖遺伝子群のゲノム配列を明らかにするため、まず、コムギ品種「農林61号(Nourin 61)」の葉よりDNeasy Plant Mini Kit(QIAGEN)でゲノムDNAを抽出・精製した。得られたゲノムDNAを鋳型として、遺伝子特異的プライマー(TaABAox1.S5: 5'-GCCTTTCGTTGRCATGGCGWCTT-3'; 配列番号30)と遺伝子特異的プライマー(TaABAox1.A2mix: 5'-CGTYGCCWCTATCGYGCYGTGAT-3'; 配列番号15)との組合せ、及び、遺伝子特異的プライマー(TaABAox1.S3: 5'-CAAGAACCCCAACGTCTTCTTCG-3'; 配列番号28)と遺伝子特異的プライマー(TaABAox1.A9: 5'-ACTTCTTTGTGGCGCCGATCTC-3'; 配列番号22)との組合せを用いてPyrobest DNAポリメラーゼ(TaKaRa)による高忠実性(high fidelity)PCRを行った。このようにして増幅されたDNA断片をpCR4 Blunt-TOPOベクター(Invitrogen)中にクローニングし、上記(1)と同様の方法で塩基配列を決定した。これら2種類の遺伝子特異的プライマーペアで得られた塩基配列を組合せてゲノムDNA上の塩基配列を決定した。このようにして同祖遺伝子TaABA8'ox1A、TaABA8'ox1B、TaABA8'ox1Dのゲノム配列を決定し(図2)、それぞれ配列番号7、8、及び9に示した。

【0080】

(3) TaABA8'ox1の各同祖遺伝子特異的検出のためのDNAマーカーの開発

TaABA8'ox1同祖遺伝子群の塩基配列の違いを利用して、各同祖遺伝子の多型を同時に検出できるDNAマーカーの開発を試みた。TaABA8'ox1同祖遺伝子群の塩基配列は非常に類似していたが、部分的に保存されていない領域も存在していた。そこで、それらの塩基配列の違いを検出可能な領域を増幅するプライマー(表1)を設計した(図3)。

【表1】

プライマー名	略語	プライマー配列 (5'→3')
TaABAox1.A1	A1	CCGCTCTCGGACTTGGAGGTGGAC (配列番号14)
TaABAox1.A2mix	A2mix	CGTYGCCWCTATCGYGCTTGAT (配列番号15)
TaABAox1.A3	A3	CCGAAGATGGACAGCAATGCCACAT (配列番号16)
TaABAox1.A4	A4	TGGCCGGGAAGGTAGGCTTGAAGAG (配列番号17)
TaABAox1.A5mix	A5mix	TTYCCTTTGGGAACGAGGAGGAG (配列番号18)
TaABAox1.A6	A6	GCCCACGTACGGCCACCCCAT (配列番号19)
TaABAox1.A7	A7	TTGTCGCCGAGGAACTTGACCATC (配列番号20)
TaABAox1.A8	A8	CACTTTCCAGCCCTTGGGAATCAG (配列番号21)
TaABAox1.A9	A9	ACTTCTTTGTGGCGCCGGATCTC (配列番号22)
TaABAox1.A10	A10	GGCATGAACGTGTTGGGCTTGG (配列番号23)
TaABAox1.A11	A11	GGCACGAGTGGGTCCCGTTCC (配列番号24)
TaABAox1.A12	A12	ATCTGTACTTGGTGGCGAGGTGGTG (配列番号25)
TaABAox1.S1	S1	AGGCCGTGGAGGACGTGGAGTACC (配列番号26)
TaABAox1.S2	S2	AAGCCCAACACGTTTCATGCCGTTT (配列番号27)
TaABAox1.S3	S3	CAAGAACCCCAACGTCTTCTTCG (配列番号28)
TaABAox1.S4mix	S4mix	GKKCGTCGTCGGGCGGCGGC (配列番号29)
TaABAox1.S5	S5	GCCTTTCGTTGRCATGGCWGCTT (配列番号30)
TaABAox1.S6	S6	ATGTGGCATTGCTGTCCATCTTCGG (配列番号31)
TaABAox1.S7	S7	CTCCCTCGGCTCCTGGGAAGAC (配列番号32)
TaABAox1.S8	S8	GTGCTCACGTGGATGGTCAAGTTCC (配列番号33)

* S1～S8はフォワードプライマー、A1～A12はリバースプライマー。

【0081】

次いで、コムギ品種「農林61号」、「新中長」及び「タマイズミ」から常法により抽出し調製したゲノムDNAを鋳型とし、設計した遺伝子特異的プライマーペア（S7A3 [S7：フォワードプライマー、A3：リバースプライマー。以下同様]、S7A7、S7A8、S6A8、S8A8、S1A8、S1A10、S1A11、S1A12、S1A1、S2A5mix、S2A2mix、S7A9）を用いてPCRを行った。PCRは、Ex Taq Hot Start Version (TaKaRa) 及びGeneAmp（登録商標）PCR System 9700（Applied Biosystems）を用いて、酵素に添付の説明書に従って行った。PCR反応後、S2A5m

10

20

30

40

50

ix及びS2A2mix以外のプライマーペアによる増幅産物については、同祖遺伝子間の塩基配列の違いに基づいて異なる切断パターンを示す制限酵素でさらに処理した。用いた制限酵素は、S7A3についてはAluI、S7A7についてはAluI、S7A8についてはMseI、S6A8についてはMseI、S8A8についてはMseI、S1A8についてはAluI、S1A10についてはAluIとMboI、S1A11についてはAluIとMboI、S1A12についてはAluIとMboI、S1A1についてはAluIとMboI、S7A9についてはKpnIである。得られたDNA断片をアクリルアミドゲル又はアガロースゲルで電気泳動した。

【0082】

電気泳動の結果、これらDNAマーカーのうち、TaABA8'ox1A、TaABA8'ox1B、TaABA8'ox1Dをより明確に区別できたものはS7A3/AluI、S1A8/AluI、S2A5mix、及びS2A2mixであった。

【0083】

これらのDNAマーカーを用いて各同祖遺伝子について得られる増幅DNA断片又はその制限酵素処理後の切断DNA断片のサイズを表2に示す。

【表2】

DNAマーカー	プライマーセット	制限酵素処理	TaABA8' ox1A	TaABA8' ox1B	TaABA8' ox1D
S7A3/AluI	S7A3	AluI	142bp+70bp	129bp+70bp	135bp+70bp
S1A8/AluI	S1A8	AluI	252bp	266bp	146bp+115bp
S2A5mix	S2A5mix	—	239bp	255bp	270bp
S2A2mix	S2A2mix	—	264bp	280bp	295bp

【0084】

(4) コムギNullisomic-tetrasomic (零染色体-テトラソミー) 系統を用いた座乗染色体の決定

3つのTaABA8'ox1同祖遺伝子群が座乗する染色体を明らかにするため、上記(3)で開発したDNAマーカーのうちの3つ(S7A3/AluI、S1A8/AluI、及びS2A2mix)を用いて、コムギ品種「Chinese Spring」のNullisomic-tetrasomic系統(特定染色体が1対無く、それを補償する同祖染色体が1対余分にある系統)から調製したゲノムDNAを鋳型として上記(3)と同様にして解析を行った。S1A8/AluI及びS7A3/AluIマーカーについては、S1A8又はS7A3プライマーペアを用いて、98℃で30秒での変性に続き、98℃で10秒、68℃で1分を35サイクル行い、さらに72℃で2分の後、4℃で維持する温度条件でPCRを行った後、AluIで切断した。S2A2mixマーカーについては、S2A2mixプライマーペアを用い、98℃で30秒での変性に続き、98℃で10秒、60℃で30秒、72℃で30秒を35サイクル行い、さらに72℃で2分の後、4℃で維持する温度条件でPCRを行った。得られたDNA断片を電気泳動した(図4)。

【0085】

この解析の結果、6A、6B、6D染色体がそれぞれ欠失した系統において増幅産物の消失が確認されたことから、3つのTaABA8'ox1遺伝子(TaABA8'ox1A、TaABA8'ox1B、及びTaABA8'ox1D)が、それぞれ6A、6B、6D染色体に座乗することが示された。

【0086】

[実施例2] コムギのTaABA8'ox1同祖遺伝子の解析

(1) コムギ遺伝資源におけるTaABA8'ox1の多型解析

470品種又は系統のコムギ遺伝資源から調製したゲノムDNAを鋳型として、実施例1で開発したDNAマーカーS2A2mixを用いて、実施例1と同様にしてTaABA8'ox1遺伝子群の多型解析を行った。S2A2mixを用いて増幅したPCR産物の電気泳動の結果を図5に示す。

【0087】

多型解析の結果、検索した420品種又は系統の中に、S2A2mixによりTaABA8'ox1DのゲノムDNAが増幅されない品種又は系統が多数含まれること、及びそれらは2品種を除き全て国内品種又は系統であることが示された。これらの品種又は系統はTaABA8'ox1D遺伝子に変異を有していると考えられ、この変異が日本のコムギ遺伝資源に由来する可能性があると考えられた。さらに、S2A2mixによるTaABA8'ox1Dの増幅が示されなかったコムギ品種又は

系統の大多数が、コムギ品種「新中長 (Shin chuunaga)」を系譜上に有していた。このことから、TaABA8'ox1Dに起きた遺伝子変異は日本古来の品種である「新中長」に由来すると推定した。

【0088】

(2) TaABA8'ox1Dにおける遺伝子変異部位の決定

実施例2-(1)により多数のコムギ遺伝資源で見出されたTaABA8'ox1D中の遺伝子変異部位を明らかにするため、「新中長」より調製したゲノムDNAを鋳型として、TaABA8'ox1D遺伝子を特異的に増幅できる遺伝子特異的プライマー (TaABAox1d_S1: 5'-GACGCGCTCCTAACCGAACGAAC-3'; 配列番号34) と遺伝子特異的プライマー (TaABAox1.A2_AGCG: 5'-CGTCGCCTCTATCGCGCTGTTGAT-3'; 配列番号35) とのプライマーペアを用いてPCRを行った。PCRには、PCR増幅の際の正確性を上げるため、より正確性の高いDNAポリメラーゼであるPrime STAR HS DNAポリメラーゼ (TaKaRa) を用いて、酵素に添付される説明書に記載の反応条件でPCRを行った。その結果、Ex Taq Hot Start Version (TaKaRa) を用いた場合には増幅されなかった約1.5 kbpのバンドが増幅された。次いで、得られた約1.5 kbpのDNA断片をクローニングし、その塩基配列を決定した。塩基配列の決定は実施例1-(1)と同様の方法で行った。次いで「新中長」由来TaABA8'ox1Dの塩基配列を、実施例1-(2)で得られた「農林61号」由来TaABA8'ox1Dの塩基配列と比較した。その結果、「新中長」のTaABA8'ox1Dには、本来の終止コドンよりも前の位置に966 bpの挿入配列が存在し (図6)、同一の読み枠内に新たに終止コドンが生じていることが判明した (図6、図7A)。なお、挿入配列を含む「新中長」由来のTaABA8'ox1D遺伝子のゲノム配列 (配列番号7~9の配列と同じゲノム領域に相当) を、配列番号10に示す。「新中長」のTaABA8'ox1D中の挿入配列 (966 bp) は配列番号11に示す。

【0089】

さらに、「新中長」由来TaABA8'ox1D遺伝子の推定アミノ酸配列 (配列番号12) を他の同祖遺伝子 (TaABA8'ox1A, B, D) 及びコムギ以外の植物種由来ABA8'位水酸化酵素 (ABA8'ox) 遺伝子のアミノ酸配列 (Triticum aestivum (GenBankアクセッション番号 (NCBI Proteinデータベース) ACB78189)、Hordeum vulgare (同アクセッション番号ABB71585)、Oryza sativa (同アクセッション番号Q05JG2)、Zea mays (同アクセッション番号ACN34951)、Sorghum bicolor (同アクセッション番号XP_002452685)、Ricinus communis (同アクセッション番号XP_002518804)、Solanum tuberosum (同アクセッション番号ABA55732)、Populus trichocarpa (同アクセッション番号XP_002328843))、Arabidopsis thaliana (同アクセッション番号NP_567581 (CYP707A1)、NP_180473 (CYP707A2)、NP_851136 (CYP707A3)、NP_566628 (CYP707A4)) と比較した。その結果、「新中長」由来TaABA8'ox1Dでは、種間でよく保存されているABA8'oxのC末端の約40アミノ酸が翻訳されず、機能発現に必要な領域を欠失していることが示された (図7B)。このことから、「新中長」のTaABA8'ox1D遺伝子によってコードされるABA8'-水酸化酵素は、その活性を失っていると考えられた。

【0090】

さらに、「新中長」以外のコムギ品種でも「新中長」と同様のTaABA8'ox1D挿入変異を有するかを調べるため、コムギ品種「タマイズミ」、「タマイズミ」変異体 (γ線照射系統)、「新中長」及び「農林61号」より調製したゲノムDNAを鋳型として同様にPCRを行った。上記と同じプライマーTaABAox1d_S1及びTaABAox1.A2_AGCGをプライマーペアとして用いた。98℃で30秒での変性に続き、98℃で10秒、68℃で1分を35サイクルを行い、さらに72℃で2分の後、4℃で維持する温度条件でPCRを行った。得られたDNA断片を電気泳動した。その結果、「新中長」を系譜上にもつ「タマイズミ」及び「タマイズミ」変異体は、「新中長」と同じサイズのバンドを示し、「農林61号」と同じサイズのバンドは示さなかった (図8)。従ってこれらの品種及び系統もTaABA8'ox1D遺伝子中に挿入配列を有することが示された。

【0091】

[実施例3] TaABA8'ox1D挿入変異の特異的検出

10

20

30

40

50

(1) TaABA8'ox1D挿入変異を特異的に検出するDNAマーカーの開発

「新中長」と同様のTaABA8'ox1D遺伝子中の挿入変異が他のコムギ品種にも存在するかどうかを確認するために、「新中長」のTaABA8'ox1D遺伝子中の挿入配列に特異的なプライマー (TaABAox1d_InsertA1: 5'-CTACTGCCGGATGCCACACAACAC-3'; 配列番号 36) を設計した。合成した遺伝子特異的プライマー (TaABAox1.S2: 5'-AAGCCCAACACGTTTCATGCCGTTTC-3'; 配列番号 27) 及び挿入配列特異的プライマーTaABAox1d_InsertA1: 5'-CTACTGCCGGATGCCACACAACAC-3'; 配列番号 36) をプライマーペアとして (図 6~8; DNAマーカー: S2d_InsertA1)、「タマイズミ」、「タマイズミ」変異体、「新中長」及び「農林61号」より調製したゲノムDNAを鋳型とするPCRに用いた。このPCRは、TaABAox1.S2との組合せで挿入変異を有しないTaABA8'ox1D遺伝子の特異的に増幅可能な遺伝子特異的プライマー (TaABAox1.A2_AGCG: 5'-CGTCGCCTCTATCGCGCTGTTGAT-3'; 配列番号 35) を、TaABAox1.S2及びTaABAox1d_InsertA1と共にPCR反応液に共存させて、マルチプレックスPCRとして行った (S2d_InsertA1&A2_AGCGマルチプレックスPCR)。用いたPCRの温度条件は、98℃で30秒での変性に続き、98℃で10秒、70℃で45秒を35サイクル行い、さらに72℃で2分の後、4℃にて維持するものである。PCRにはPrime STAR HS DNAポリメラーゼ (TaKaRa) を使用した。

【0092】

また、TaABA8'ox1A遺伝子の特異的に増幅する遺伝子特異的プライマー (TaABAox1a_S1: 5'-GACGCGCTCCTAACTCAAGGGAAC-3'; 配列番号 37) と遺伝子特異的プライマー (TaABAox1a_A1: 5'-CAGAGGGCTGTGAATGATGATGCTG-3'; 配列番号 38) のプライマーペアを、TaABAox1.S2及びTaABAox1d_InsertA1と共にPCR反応液に共存させて、別のマルチプレックスPCRも行った (S2d_InsertA1&a_S1a_A1マルチプレックスPCR)。このPCRは、98℃で30秒での変性に続き、98℃で10秒、70℃で45秒を35サイクル行い、さらに72℃で2分の後、4℃で維持する温度条件で行った。Ex Taq Hot Start Version (TaKaRa) をこのPCRに使用した。

【0093】

得られたDNA断片を電気泳動した。その結果、S2d_InsertA1&A2_AGCGの解析では、「新中長」(図9中、S)、「タマイズミ」(T)及び「タマイズミ」変異体(M)では挿入変異を有するTaABA8'ox1Dに対応するバンドが検出されたが、「農林61号」(N)では挿入変異を有しないTaABA8'ox1Dに対応する短いバンドが検出された(図9A)。一方、S2d_InsertA1&a_S1a_A1の解析では、「タマイズミ」変異体以外でTaABA8'ox1Aに対応するバンドが検出された(図9B)。さらに「新中長」、「タマイズミ」、及び「タマイズミ」変異体では挿入変異を有するTaABA8'ox1Dに対応するバンドが検出されたが、「農林61号」(N)では当該バンドは検出されなかった(図9B)。このことから、「タマイズミ」及び「タマイズミ」変異体は、「新中長」と同様の挿入変異をTaABA8'ox1D遺伝子中に有していることが示された。

【0094】

(2) TaABA8'ox1D挿入変異保有コムギ品種又は系統の検出

国内のコムギ品種及び系統には、系譜上に「新中長」を有する品種・系統が多数存在するため、上記と同様のTaABA8'ox1D挿入変異を有している可能性がある。そこで、実施例3-(1)で開発した、TaABA8'ox1D挿入変異を特異的に検出するためのS2d_InsertA1のDNAマーカーを用いて、様々なコムギ品種及び系統におけるTaABA8'ox1D挿入変異を検出した。

【0095】

実施例3-(1)と同様にして、S2d_InsertA1&a_S1a_A1のマルチプレックスPCRを行い、得られたPCR産物をアクリルアミドゲルで電気泳動した。

【0096】

その結果、S2d_InsertA1のDNAマーカーを用いて、TaABA8'ox1D遺伝子中に上記の挿入配列を有する品種及び系統を明確に判別することができた(図10及び11)。日本で品種登録済みのコムギ品種では農林11号、農林26号、農林30号、農林43号、農林49号、農林50号、農林53号、農林60号、農林68号、農林69号、ユウヤケコムギ、イヨコムギ、ダンチコムギ、シラサギコムギ、ジュンレイコムギ、フジミコムギ、セトコムギ、アサカゼコムギ

、アブクマワセ、しゅんよう、ニシノカオリ、キヌヒメ、及びタマイズミにおいて、TaABA8'ox1D遺伝子中の挿入変異が検出された（図10）。また、コムギ遺伝資源品種及び系統では、超極早生、極早生4-15、早小麦、新中長、Olgrumil、Victoria INTA、中国53号、中国81号、中国91号、中国114号、北海195号、関係w361、関係w364、関東66号、関東87号、関東95号、西海77号、西海95号、さぬきの夢2000、秋播き型アブクマワセにおいてTaABA8'ox1D遺伝子中の挿入変異が検出された（図11）。

【0097】

なお、S2A2mixのDNAマーカーでTaABA8'ox1Dの増幅が示された品種又は系統（図5参照）の中にも、TaABA8'ox1D挿入変異を有する系統が存在した。これらのうち、「中国81号」、「北海195号」及び「関東95号」は育成系統であることから、交配後の遺伝的固定が

10

【0098】

以上の結果は、上記で開発されたDNAマーカーS2d_InsertA1は、TaABA8'ox1D挿入変異をホモに有する品種及び系統だけでなくヘテロに有する個体の検出にも有効であることを示していた。

【0099】

〔実施例4〕 TaABA8'ox1欠失変異体の作製

（1）変異原処理系統におけるTaABA8'ox1遺伝子変異体の検出

実施例1－（3）で開発したDNAマーカーを用いて、TaABA8'ox1同祖遺伝子（TaABA8'ox1A、TaABA8'ox1B、及びTaABA8'ox1D）のいずれかに変異が生じた変異コムギ個体（部分変異個体）の検出を行った。

20

【0100】

まず、コムギ品種「バンドウワセ」由来の重イオンビーム処理系統（989系統）のM2世代から、25個体のTaABA8'ox1ヘテロ変異体候補を見出した。そこで、M3世代での変異体TaABA8'ox1の遺伝的分離を期待して、ヘテロ変異体候補25個体（M2個体）から自家受粉種子（M3個体）を採種した。この25個体のうちの15個体について、各M2個体あたり1穂～3穂の種子を播種（1穂あたり12粒）し、苗立ちの確認された幼植物体からゲノムDNAを抽出し調製した後、DNAマーカーを用いて各M3個体の遺伝子型を調べた。DNAマーカーとしては実施例1－（3）に示したS1A8/AluI、S7A3/AluI、及びS2A2mixを用い、実施例1－（4）と同様の方法でPCRを行った。

30

【0101】

その結果、複数の個体で、TaABA8'ox1A,B,Dのいずれかの同祖遺伝子に対応するバンドが検出されず、当該遺伝子の欠失変異をホモ接合で有することが示された。図12に示す解析例では、D433系統、D476系統及びD310系統由来のM3個体から、TaABA8'ox1Aホモ変異体（D433-2、D433-3）、TaABA8'ox1Bホモ変異体（D476-1）、TaABA8'ox1Dホモ変異体（D310-1、D310-2）が見出された（図12）。これらのホモ変異体では、S1A8/AluI、S7A3/AluI、及びS2A2mixの3種全てのDNAマーカーで同じTaABA8'ox1同祖遺伝子に対応するバンドが検出されなかったことから、当該同祖遺伝子の全体又はほぼ全体が欠失していると考えられた。

【0102】

このように、実施例1で開発したDNAマーカーを用いて、TaABA8'ox1遺伝子欠失変異体を検出できることが示された。

40

【0103】

（2）TaABA8'ox1同祖遺伝子変異の集積

本発明者らは、TaABA8'ox1同祖遺伝子群の遺伝子変異を集積し、TaABA8'ox1活性を低下又は喪失させたコムギを作出することにより、吸水後の種子内部でのABA8'ox活性を低下させて種子発芽を抑制することができるであろうと考えた。

【0104】

そこで、TaABA8'ox1D遺伝子中に挿入変異を有することが示された品種「タマイズミ」に変異原処理を行い、TaABA8'ox1A又はTaABA8'ox1Bに欠失変異が起きた個体の検出を行っ

50

た。具体的には、まず「タマイズミ」種子に、変異原処理として γ 線照射又はアジ化ナトリウム処理を行った後、圃場に播種して生育させた。 γ 線照射は、乾燥種子に対して γ 線を10Gy/hで20時間照射することにより行った。アジ化ナトリウム処理は、吸水種子（20℃、48時間）を4mMアジ化ナトリウム溶液に2時間浸漬することにより行った。

【0105】

得られた植物体から自家受粉種子を採種し、その種子（M2世代）を圃場に播種した。 γ 線照射系統のM2世代（2074系統）、及びアジ化ナトリウム処理系統のM2世代（545系統）のそれぞれの植物体の葉からゲノムDNAを調製し、実施例1－（3）で開発したDNAマーカー（S1A8/AluI、S7A3/AluI、及びS2A2mix）を用いてTaABA8'ox1同祖遺伝子における遺伝子欠失変異の有無を検出した。その結果、 γ 線照射系統から、TaABA8'ox1Aに対応するバンドが増幅されない個体（TaABA8'ox1A/TaABA8'ox1D変異体：以下、184G4とする）を1個体見いだした（図13）。S2A2mixではTaABA8'ox1D増幅断片のバンドは検出されなかった（図13C）が、S1A8/AluI及びS7A3/AluIによるTaABA8'ox1Dのバンドは検出された（図13A、B）ことから、184G4が「タマイズミ」が有するTaABA8'ox1D遺伝子中の挿入変異を保持していることが確認された。

10

【0106】

さらに184G4について、TaABA8'ox1A中の遺伝子変異がどの領域で起きているかを調べるため、実施例1－（3）で開発したDNAマーカー（S7A3/AluI、S7A7/AluI、S7A8/MseI、S6A8/MseI、S8A8/MseI、S1A8/AluI、S1A10/AluI+MboI、S1A11/AluI+MboI、S1A12/AluI+MboI、S1A1/AluI+MboI、S2A2mix、S7A9/KpnI）を使用して、実施例1－（3）と同様の方法で解析した。その結果を図14～16に示す。いずれのDNAマーカーによる解析でも、TaABA8'ox1Aに由来するバンドが認められなかったことから、184G4ではTaABA8'ox1Aの座乗する領域が広く欠失していると考えられた。この個体184G4から自家受粉種子（M3世代）を採種し、その遺伝子型を各M3個体について調べたところ、同様のTaABA8'ox1A/TaABA8'ox1D遺伝子変異が確認された。

20

【0107】

184G4では、TaABA8'ox1Aが欠失し、またTaABA8'ox1Dが挿入変異により機能喪失していることが示された。このことから、184G4ではTaABA8'ox1同祖遺伝子のうち活性を有しているのはTaABA8'ox1Bのみであるため、発芽時のABA8'ox1活性が親品種「タマイズミ」よりも低下していると考えられた。

30

【0108】

（3）TaABA8'ox1部分遺伝子変異の集積による発芽抑制効果の判定

実施例4－（2）で得たTaABA8'ox1同祖遺伝子変異体184G4（M4世代）と親品種「タマイズミ」を温室で栽培し、1穂ずつ開花日を穂にラベルした。種子（M5世代）が十分に成熟した開花後49日目、及び開花後70日目に、種子を採種し、20℃暗所で発芽試験を行った。

【0109】

発芽試験は、No.2濾紙を2枚入れた直径9cmのシャーレに蒸留水を6mL添加し、種子を15粒ずつ並べて吸水させることにより行った。また、発芽試験は3連で（in triplicate）行った。吸水開始後は、24時間毎に発芽粒数を調べ、発芽した種子は取り除いた。種子総数（15粒）に対する発芽した種子の累積数の割合を、発芽率（％）として算出した。その結果、184G4の種子発芽は、開花後49日目の種子、及び開花後70日目の種子はいずれも、親品種「タマイズミ」と比較して明らかに抑制されていた（図17）。このことから、TaABA8'ox1の同祖遺伝子における変異を集積することにより、種子休眠性を強めることが示された。

40

【0110】

「タマイズミ」は、醤油や中華めん製造用に適した硬質で高蛋白の白粒品種である。一般に、赤粒品種に比較して、白粒品種の種子休眠性は弱いため、穂発芽が発生しやすく、穂発芽耐性の強化が望まれている。従って種子休眠性が強化された「タマイズミ」変異体は産業上非常に有用と考えられる。

50

【0111】

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願はその全体を参照により本明細書にとり入れるものとする。

【産業上の利用可能性】

【0112】

本発明によれば、植物試料中のコムギの発芽時に発現しているABA8'ox遺伝子（TaABA8'ox1遺伝子）について、日本国内の品種・系統に数多く含まれているTaABA8'ox1D挿入変異を特異的かつ効率的に判別することができる。さらに、本発明に係る方法により、TaABA8'ox1の各同祖遺伝子に起きた変異の有無を特異的かつ効率的に判定し、それにより、簡便かつ確実に、TaABA8'ox1遺伝子の部分変異体（A、B、Dゲノムそれぞれの変異体、又は、そのABゲノム、ADゲノム、BDゲノムの組合せの変異体）又は完全変異体（ABDゲノム全ての変異体）を識別することにより、種子休眠性が強化されたコムギの育種を効率よく実施することができる。

10

【0113】

本発明に係る方法によれば、幼植物体等を含む任意のコムギ植物試料について、TaABA8'ox1遺伝子変異を含有するか否かを判定することができる。すなわち本発明に係る方法は、育種現場におけるTaABA8'ox1遺伝子変異の導入に伴う従来の労力を大幅に軽減できる点で特に有用である。

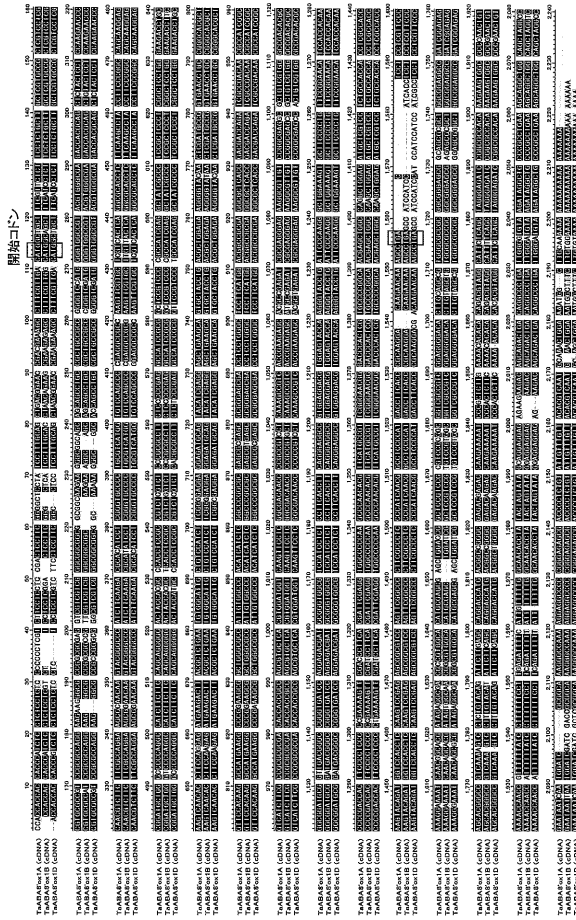
【配列表フリーテキスト】

【0114】

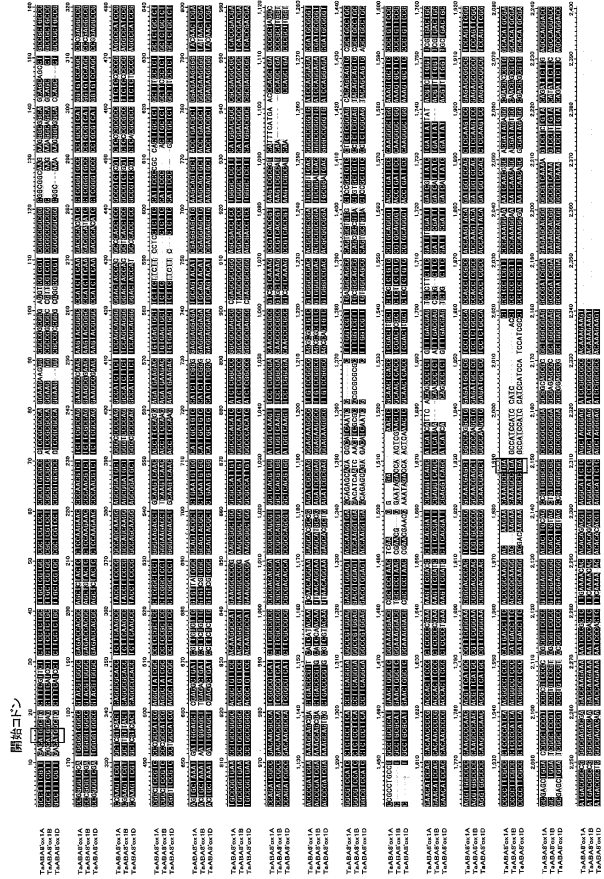
配列番号1：TaABA8'ox1A（cDNA）
配列番号3：TaABA8'ox1B（cDNA）
配列番号5：TaABA8'ox1D（cDNA）
配列番号7：TaABA8'ox1A（ゲノム）
配列番号8：TaABA8'ox1B（ゲノム）
配列番号9：TaABA8'ox1D（ゲノム）
配列番号10：TaABA8'ox1D insertion（ゲノム）
配列番号11：TaABA8'ox1D 挿入配列
配列番号13～38：プライマー

20

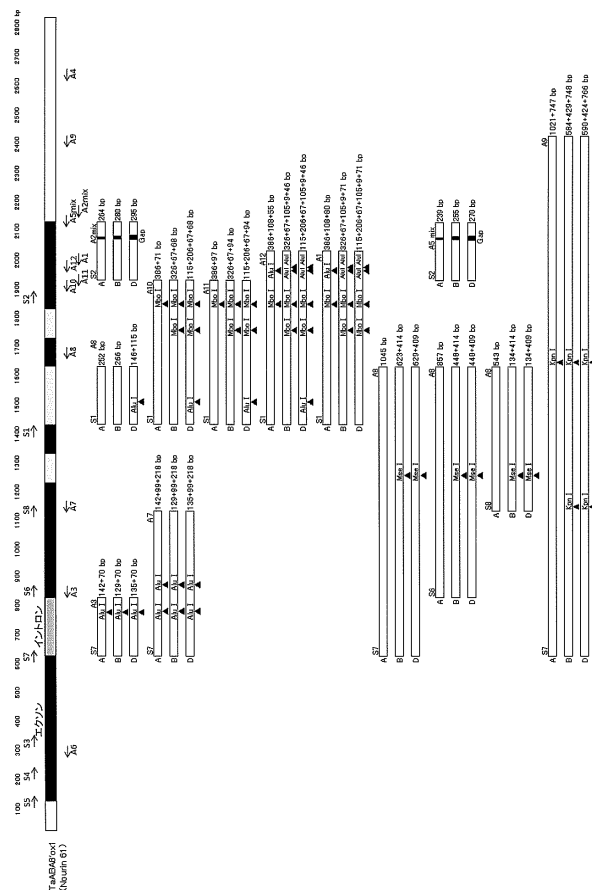
【図 1】



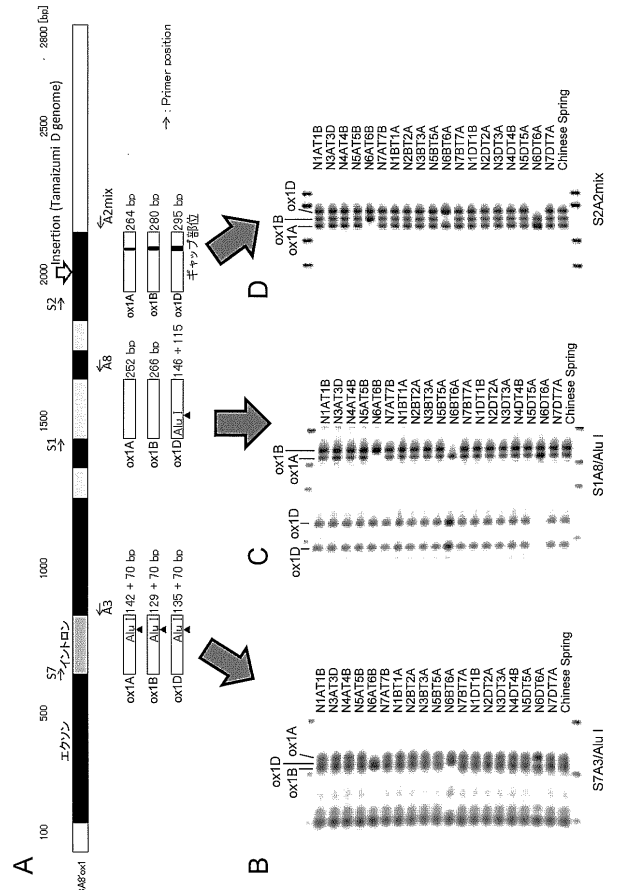
【図 2】



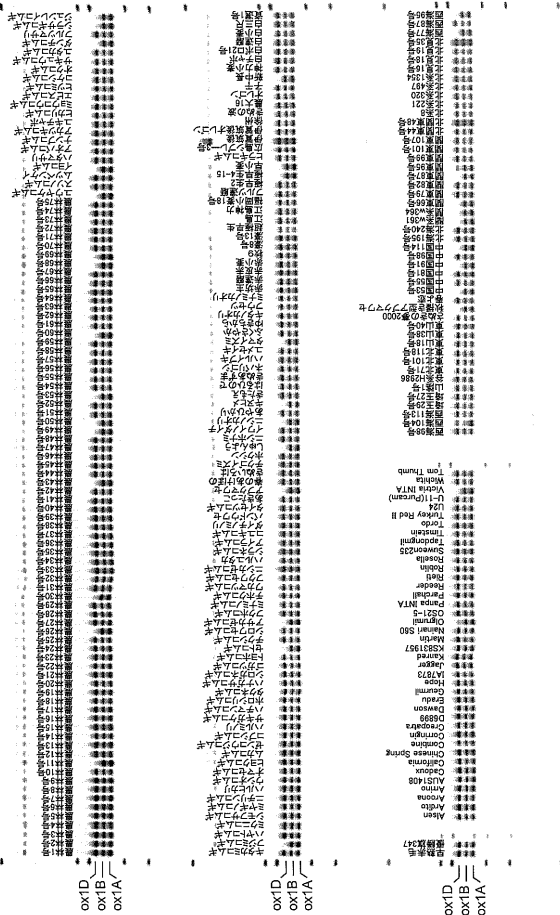
【図 3】



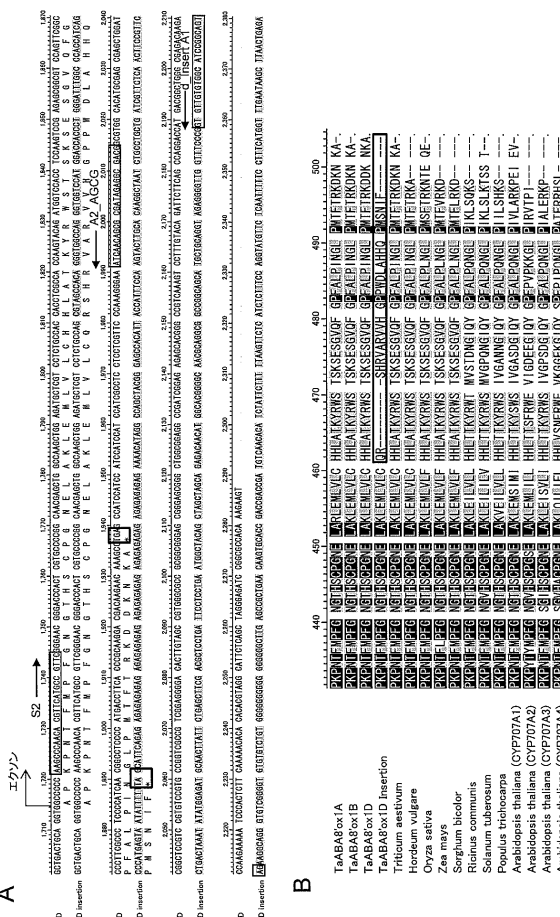
【図 4】



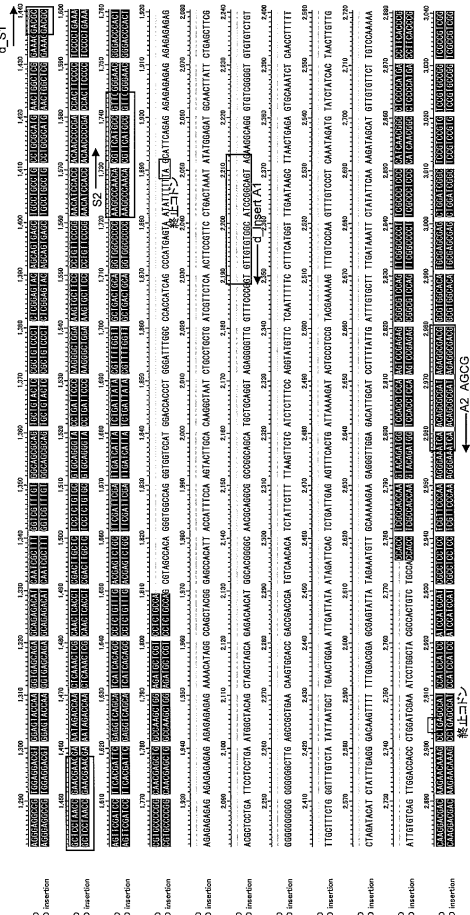
【図 5】



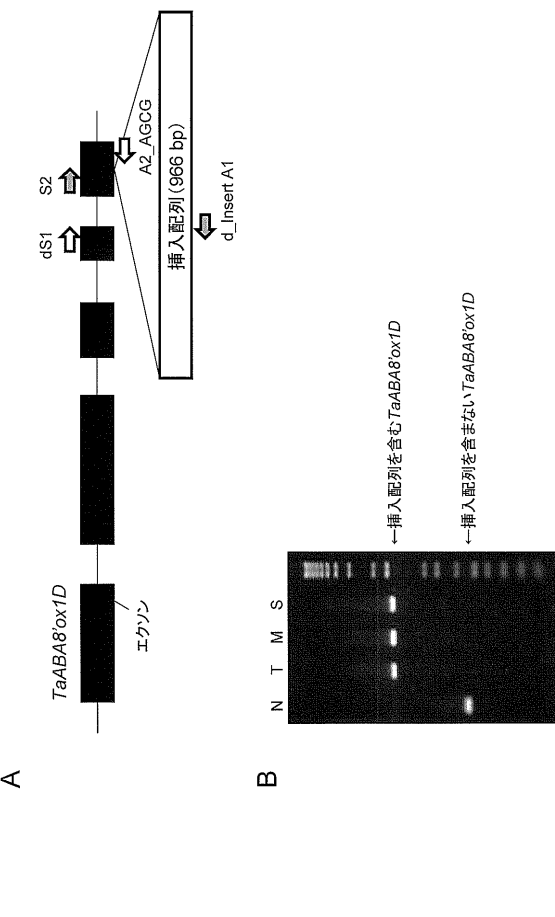
【図 7】



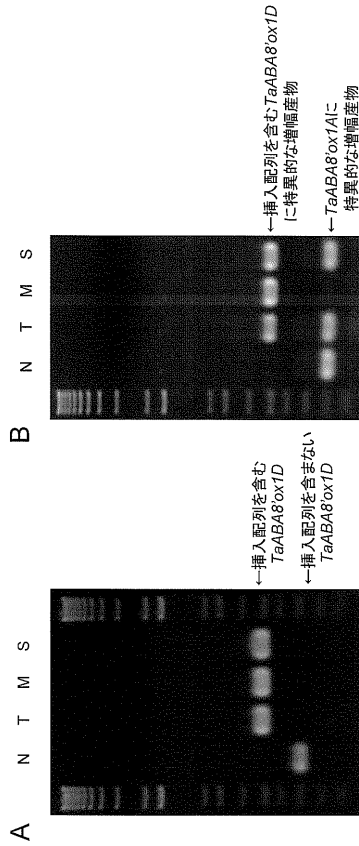
【図 6】



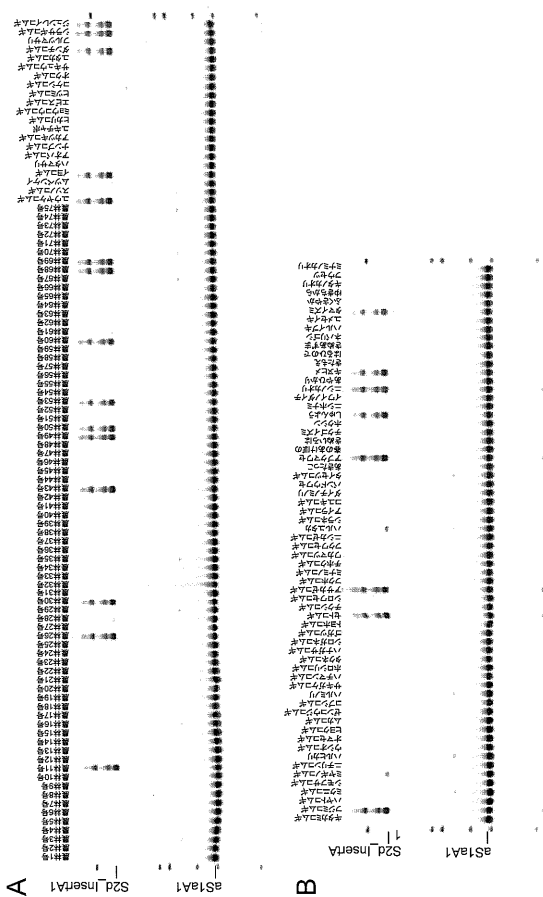
【图 8】



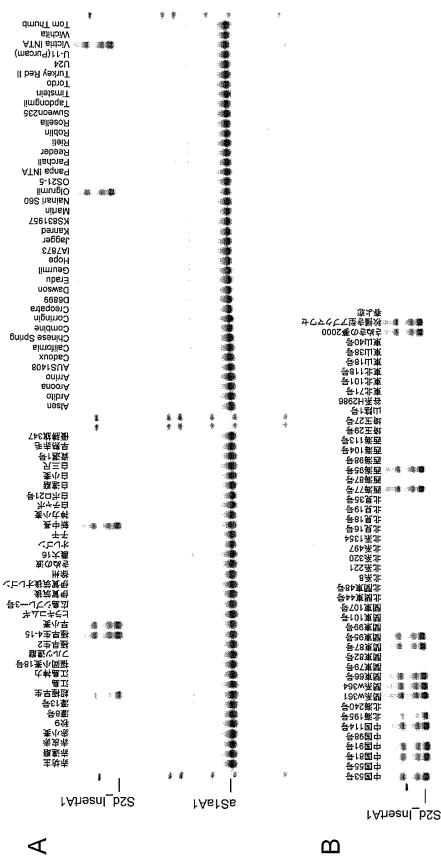
【図 9】



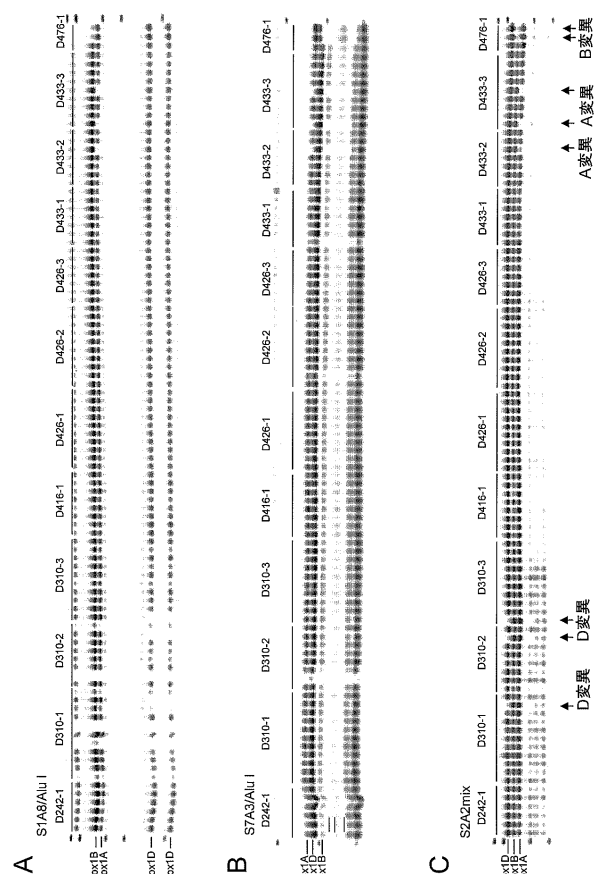
【図 10】



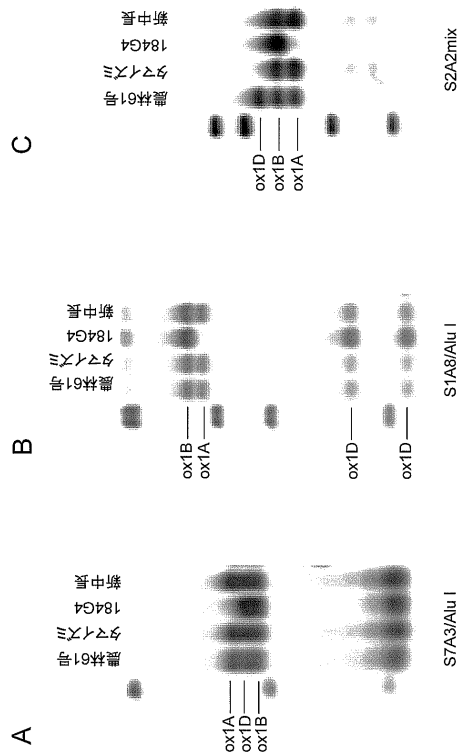
【図 1 1】



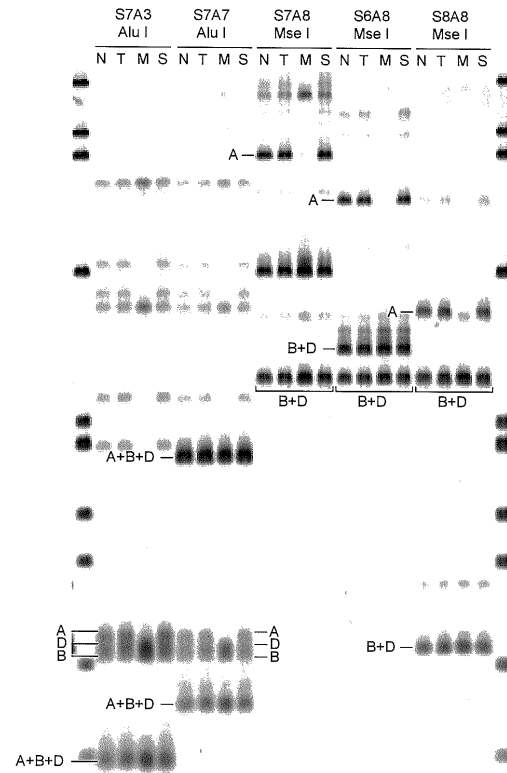
【图 1 2】



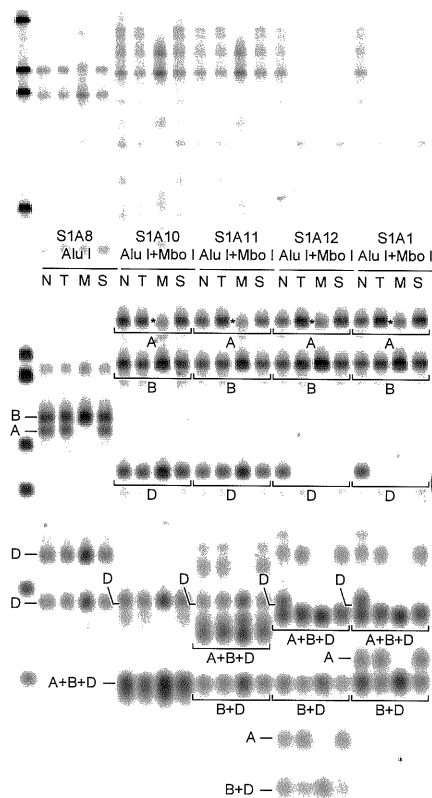
【図 13】



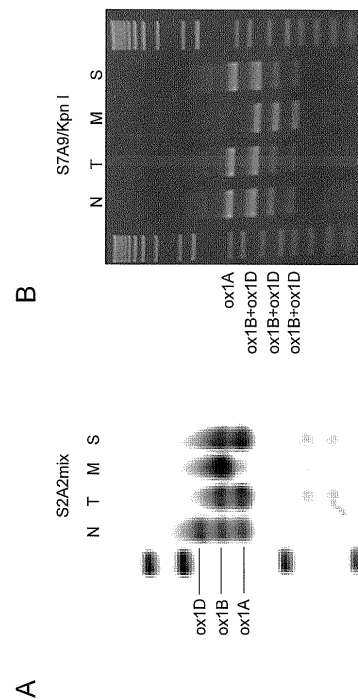
【図 14】



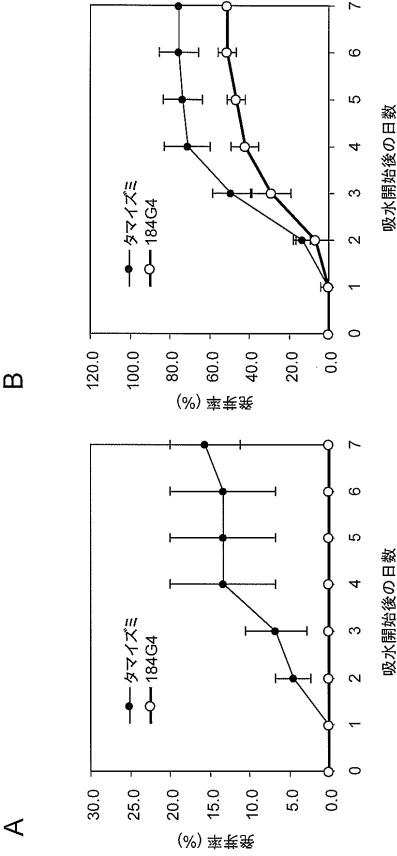
【図 15】



【図 16】



【図 1 7】



【配列表】

0005419112000001.app

フロントページの続き

(56)参考文献 特開2004-113007 (JP, A)

蝶野真喜子, 小麦農林登録品種の種子休眠性の網羅的な比較, くろっぷニュース, 2009年
3月 3日, No. 32, p. 3

松中仁ら, 乾燥方法の違いがコムギ種子休眠性に及ぼす影響, 日本作物学会紀事, 2008年
3月27日, 第77巻(別号1), p. 166-167

KUSHIRO, T., et al., The Arabidopsis cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism, The EMBO Journal, 2004年, Vol. 23, pp. 1647-1656

OKAMOTO, M., et al., CYP707A1 and CYP707A2, Which Encode Absciscic Acid 8'-Hydroxylases, Are Indispensable for Proper Cont, Plant Physiology, 2006年 5月, Vol. 141, pp. 97-107

GUBLER, F., et al., Regulation of Dormancy in Barley by Blue Light and After-Ripening: Effects on Absciscic Acid and Gibb, Plant Physiology, 2008年 6月, Vol. 147, pp. 886-896

CHONO, M., et al., Field studies on the regulation of absciscic acid content and germinability during grain development, Journal of Experimental Botany, 2006年, Vol. 57, No. 10, pp. 2421-2434

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/09

A01H 1/00

A01H 5/00

C12Q 1/68

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

CiNii

WPIDS (STN)