(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
2013 年 10 月 3 日(03.10.2013)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2013/146171 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *A01H 5/00* (2006.01)
A01H 1/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2013/056339

(22) 国際出願日: 2013 年 3 月 7 日(07.03.2013)

(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 2012-077453 2012 年 3 月 29 日(29.03.2012) JP

(71) 出願人: 国立大学法人鳥取大学(**NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION TOTTORI UNIVERSITY**) [JP/JP]; 〒6808550 鳥取県鳥取市湖山町南４丁目１０１番地 Tottori (JP).

(72) 発明者: 富田 因則 (**TOMITA, Motonori**); 〒6808550 鳥取県鳥取市湖山町南４丁目１０１番地 国立大学法人鳥取大学内 Tottori (JP).

(74) 代理人: 鮫島 睦, 外(**SAMEJIMA, Mutsumi** et al.); 〒5300017 大阪府大阪市北区角田町８番１号梅田阪急ビルオフィスタワー青山特許事務所 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, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, 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, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, 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.

(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, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, 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, RS, 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)）

(54) **Title**: GENE FOR SHORTENING STALK OF GRAMINEOUS PLANT AND METHOD FOR PRODUCING SHORT-STALKED GRAMINEOUS PLANT

(54) 発明の名称 : イネ科植物を短稈化させる遺伝子および短稈イネ科植物の作出方法

(57) **Abstract**: The purpose of the invention is to identify a short-stalk gene other than the sd1 gene and produce a short-stalked gramineous plant by utilizing a short-stalk gene other than the sd1 gene. The present invention provides a method for producing a short-stalked gramineous plant utilizing gene d60 for shortening the stalk of a gramineous plant, wherein the method for producing a short-stalked gramineous plant is characterized in that the expression of Os02g0280200 is suppressed. The present invention also provides a short-stalked gramineous plant and the like in which the expression of Os02g0280200 is suppressed.

(57) 要約: 本発明は、ｓｄ１遺伝子以外の短稈遺伝子の同定、およびｓｄ１遺伝子以外の短稈遺伝子を利用した短稈イネ科植物の作出を目的とし、イネ科植物を短稈化させる遺伝子ｄ６０を利用する短稈イネ科植物の作出方法であって、Ｏｓ０２ｇ０２８０２００の発現を抑制することを特徴とする短稈イネ科植物の作出方法、およびＯｓ０２ｇ０２８０２００の発現を抑制された短稈イネ科植物等を提供する。

WO 2013/146171 A1

明 細 書

発明の名称 ：

イネ科植物を短稈化させる遺伝子および短稈イネ科植物の作出方法

技術分野

[0001] 本発明は、イネ科植物を短稈化させる遺伝子、短稈イネ科植物の製造方法、および短稈化したイネ科植物に関する。

背景技術

[0002] イネ科植物は、イネ、コムギ、オオムギ、カラスムギ、ライムギ、キビ、アワ、ヒエ、トウモロコシ、シコクビエ、モロコシ等を含む農業上極めて重要な植物である。稈の長いイネ科植物は、強風、例えば、台風等によって倒伏していまい、収穫量が大きく減少するという問題があった。

[0003] そこで、倒伏しにくい品種を開発するために、短稈遺伝子を求めて、稈の短いイネ科植物の育種が長年に亘って行われている。しかし、植物体の背丈が短稈化すると共に穂や籾も小さくなる場合が多く、このような短稈遺伝子は、生産性の観点から望ましくない。したがって、穂や籾には影響せず、背丈だけを程よく短縮する短稈遺伝子が求められている。

[0004] 今までに見出され、かつ、実用化されている短稈遺伝子はｓｄ１だけである。ｓｄ１は、半矮性と呼ばれる、穂の長さは完全だが植物全体の背丈が低い形質を表出する遺伝子であり、ジベレリン（ＧＡ）の生合成系におけるＣ２０酸化酵素遺伝子の欠損型である。現在、米国のＣａｌｒｏｓｅ７６、東南アジアのＩＲ３６、日本のヒカリ新世紀など、世界各地でイネの短稈品種が栽培されているが、これらの短稈品種について遺伝子分析を行った結果、全ての品種において半矮性遺伝子ｓｄ１と同じ遺伝子座を持つことが分かった。すなわち、現在の短稈イネ科植物の栽培は、わずか１種類の特定の遺伝子に支配され、わずか１種類の特定の遺伝子が広範囲に使用されているという弊害が生じている。品種の遺伝的多様性を維持・拡大しようとする育種の目的に鑑みれば、ｓｄ１遺伝子だけに頼ることなく、他の短稈遺伝子の耐倒

伏性育種への利用を推進すべきであり、新規の短稈遺伝子が求められている。

[0005] 近年では、半矮性遺伝子ｄ６０が新たに見出された（非特許文献１および２）。ｄ６０は、当該遺伝子を有しない植物体と比べてその背丈だけを約２０ｃｍ短稈化する遺伝子である。

[0006] 半矮性遺伝子ｄ６０は、イネに普遍的に存在する配偶子致死遺伝子ｇａｌと共存すると雌雄の配偶子が致死となるため、コシヒカリｄ６０系統、北陸１００号などｄ６０を持つ品種・系統（遺伝子型ｄ６０ｄ６０ＧａｌＧａｌ）と他の品種・系統（Ｄ６０Ｄ６０ｇａｌｇａｌ）との交雑$Ｆ_1$（Ｄ６０ｄ６０Ｇａｌｇａｌ）では、花粉と種子の稔性が７５％となり、後代$Ｆ_2$では６可稔長稈（４Ｄ６０Ｄ６０：２Ｄ６０ｄ６０ＧａｌＧａｌ）：２部分不稔長稈（Ｄ６０ｄ６０Ｇａｌｇａｌ＝Ｆ１型）：１短稈（ｄ６０ｄ６０ＧａｌＧａｌ）の比に分離する特異な遺伝様式をとる。したがって、ｄ６０の遺伝にはＧａｌが不可欠である。ｄ６０はＧａｌの同時の人為突然変異なくしては自然界では得られなかった貴重な短稈遺伝子である。

[0007] 半矮性遺伝子ｄ６０は、イネ科植物の第２染色体上に存在することが見出され、第１染色体上に存在するｓｄ１とは遺伝的にも機能的にも独立した遺伝子であることが示された（特許文献１）。さらに、ＤＮＡマーカーもしくは遺伝子マーカーを利用して、第２染色体上のｄ６０遺伝子の存在および／またはｄ６０遺伝子の遺伝に不可欠な第５染色体上のＧａｌ遺伝子の存在を判別することにより、ｄ６０遺伝子およびＧａｌ遺伝子を有するイネ科植物を選抜する方法が開発されている（特許文献１）。

[0008] しかしながら、今までに、ｄ６０遺伝子は同定されておらず、その短稈化機能も解明されておらず、実用化には至っていない。

先行技術文献

特許文献

[0009] 特許文献1：特開２００８－２３７１３８号

非特許文献

[0010] 非特許文献1：Tomita, M.: The gametic lethal gene gal: activated only in the presence of the semidwarfing gene d60 in rice. In Rice Genetics III (Ed. G.S. Khush, ISBN 971-22-0087-6), International Rice Research Institute, pp. 396-403 (1996)

非特許文献2：Tomita, M., Yamagata, H. and Tanisaka, T.: Developmental cytology on gametic abortion caused by induced complementary genes gal and d60 in japonica rice. In Advances in Rice Genetics (Eds. G.S. Khush, D.S. Brar and B. Hardy, ISBN 971-22-0199-6), International Rice Research Institute, pp. 178-181 (2003)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0011] 本発明は、ｓｄ１遺伝子以外の短稈遺伝子の同定、およびｓｄ１遺伝子以外の短稈遺伝子を利用した短稈イネ科植物の作出を目的とする。

課題を解決するための手段

[0012] 本発明者は、上記のような状況下、ｄ６０遺伝子の利用に着目し、当該遺伝子の同定およびその短稈化機能の解明のために鋭意研究した。その結果、ｄ６０遺伝子のファインマッピングにより、イネの第２染色体短腕末端から１０．２ないし１０．５Ｍｂの位置付近にｄ６０候補遺伝子領域があることを見出した。さらに、候補遺伝子の配列解析を行い、最終的に、ｄ６０遺伝子がＯｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子の機能欠損型であることを同定し、本発明を完成させた。

[0013] すなわち、本発明は、

［１］イネ科植物において、Ｏｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子の発現を抑制することを特徴とする、短稈イネ科植物の作出方法、

［２］アンチセンス法または突然変異誘発法によってＯｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子の発現を抑制することを特徴とする、［１］記載の方法、

［３］Ｏｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子の全長ｃＤＮＡのアンチセンス配列を含有するベクターでイネ科植物を形質転換することを特徴とする、［２］

記載の方法、

［４］Ｏｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子の第２エキソンのアンチセンス配列を含有するベクターでイネ科植物を形質転換することを特徴とする、［２］記載の方法、

［５］Ｏｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子の塩基配列の４７９位にチミンからシトシンへのヌクレオチド変異を導入することを特徴とする、［２］記載の方法、

［６］配列番号２で示される塩基配列を含有するベクターでイネ科植物を形質転換することを特徴とする、［５］記載の方法、

［７］配列番号４で示されるアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする塩基配列を含有するベクターでイネ科植物を形質転換することを特徴とする、［５］記載の方法、

［８］配列番号６で示される塩基配列を含有するベクターでイネ科植物を形質転換することを特徴とする、［５］記載の方法、

［９］配列番号８で示されるアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする塩基配列を含有するベクターでイネ科植物を形質転換することを特徴とする、［５］記載の方法、

［１０］Ｏｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子の発現が抑制された、短稈イネ科植物、

［１１］配列番号２で示される塩基配列を含む短稈遺伝子、

［１２］配列番号４で示されるアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする短稈遺伝子、

［１３］Ｏｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子の全長ｃＤＮＡのアンチセンス配列からなるＤＮＡ、

［１４］Ｏｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子の第２エキソンのアンチセンス配列からなるＤＮＡ、

［１５］配列番号３で示されるアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする塩基配列のアンチセンス配列からなるＤＮＡ、および

［１６］配列番号７で示されるアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする塩基配列のアンチセンス配列からなるＤＮＡ

を提供する。

発明の効果

[0014] 本発明によると、イネ科植物においてＯｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子の発現を抑制することによって、従来のｓｄ１遺伝子に依存することなく、穂や籾には影響せずに背丈だけを程よく短縮した、短稈イネ科植物を得ることができる。したがって、本発明によると、耐倒伏性および生産性の両方を満足する有用なイネ科植物を得ることができる。

図面の簡単な説明

[0015] [図1]図１は、ｄ６０遺伝子のファインマッピング結果を示す。

[図2]図２は、Ｏｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子のアンチセンス配列で形質転換したイネを示す。

[図3]図３は、Ｏｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子のアンチセンス配列で形質転換したイネの籾を示す。

発明を実施するための形態

[0016] 本発明において、ｄ６０遺伝子は、以下の方法で同定された。

コシヒカリの第２染色体をインディカ品種 Kasalathに部分置換した系統（Ｄ６０Ｄ６０ｇａｌｇａｌ）とｄ６０コシヒカリ系統（ｄ６０ｄ６０ＧａｌＧａｌ）との交雑$Ｆ_2$から、短稈ホモ型（ｄ６０ｄ６０ＧａｌＧａｌ）個体を選抜し、ジャポニカ品種／インディカ品種間で差を示す第２染色体上のＳＳＲ（Simple Sequence Repeat）マーカーでファインマッピングを行った。ＤＮＡ多型解析により、使用した各ＳＳＲマーカーとｄ６０遺伝子との連鎖を調べ、組み換え価０％の位置を決定した。ここで、組み換え価は、以下の式によって求められ、完全に連鎖している場合の組み換え価は０％である。

組み換え価（％）＝（組み換え型配偶子数／全配偶子数）×１００

[0017] 以前の研究により、ｄ６０遺伝子がＳＳＲマーカー　ＲＭ４５２から２．８ｃＭの距離に座乗していることが明らかになった（特許文献１）。したが

って、本発明においては、ＲＭ４５２を含めたＲＭ４５２の付近にある各種ＳＳＲマーカーを用いてファインマッピングを行った。その結果、ＲＭ１２９７０とｄ６０遺伝子との組み換え価が０％であったことから、イネの第２染色体短腕末端から１０．２ないし１０．５Ｍｂ付近にｄ６０候補遺伝子領域があることが判明した。

[0018] イネの第２染色体短腕末端から１０．２ないし１０．５Ｍｂ付近で推定される遺伝子のうち、Ｏｓ０２ｇ０２８０２００およびＯｓ０２ｇ０２８０３００について、コシヒカリおよびコシヒカリｄ６０系統間の配列解析を行った。その結果、Ｏｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子の塩基配列の第２エキソンにある４７９位において、チミン（Ｔ）からシトシン（Ｃ）へのヌクレオチド変異が見出された。また、コシヒカリおよびコシヒカリｄ６０系統間のアミノ酸配列解析の結果、上記塩基配列の変異に相当する位置に、フェニルアラニン（Ｆ）からセリン（Ｓ）へのアミノ酸変異が見出された。

[0019] さらに、Ｏｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子の全長ｃＤＮＡのアンチセンス配列またはＯｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子の第２エキソンのアンチセンス配列をコシヒカリに導入した結果、短稈型植物が得られ、ｄ６０遺伝子がＯｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子の機能欠損型であることが同定された。

[0020] コシヒカリのＯｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子の全長塩基配列の一例を配列番号１に示す。コシヒカリｄ６０系統におけるＯｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子の全長塩基配列の一例を配列番号２に示す。また、コシヒカリのＯｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子の第２エキソンの塩基配列を配列番号５に示し、コシヒカリｄ６０系統におけるＯｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子の第２エキソンの塩基配列を配列番号６に示す。さらに、コシヒカリのＯｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子の全長塩基配列によりコードされるアミノ酸配列の一例を配列番号３に示し、コシヒカリｄ６０系統におけるＯｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子の全長塩基配列によりコードされるアミノ酸配列の一例を配列番号４に示す。また、コシヒカリのＯｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子の第２エキソンによりコードされるアミノ酸配列を配列番号７に示し、コシヒカリｄ

６０系統におけるＯｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子の第２エキソンによりコードされるアミノ酸配列を配列番号８に示す。

[0021] したがって、本発明の第１の態様は、Ｏｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子の発現を抑制することを特徴とする、短稈イネ科植物の作出方法を提供する。Ｏｓ０２ｇ０２８０２００は、イネの第２染色体上の遺伝子座の一つを示し、イネアノテーションプロジェクトデータベース（ＲＡＰ－ＤＢ）等において開示されている。本明細書中では、Ｏｓ０２ｇ０２８０２００にある遺伝子を「Ｏｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子」と称する。本発明者は、ｄ６０遺伝子がＯｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子の機能欠損型であることを同定し、当該遺伝子の発現を抑制することによって、イネ科植物を短稈化できることを見出した。したがって、Ｏｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子は、キシログルカントランスグリコシラーゼ（ＸＴＨ）遺伝子に類似する配列を持ち、Ｄ６０は細胞壁のキシログルカンの分子架橋を触媒して形態形成にかかわると考えられ、ｄ６０ではこれが損なわれて短稈化すると考えられる。

[0022] 本発明において、「Ｏｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子」には、イネのＯｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子および他のイネ科植物におけるそれに相当する遺伝子が含まれ、例えば、イネアノテーションプロジェクトデータベース（ＲＡＰ－ＤＢ）Ｂｕｉｌｄ４に開示されるイネの第２染色体上の短腕末端から１０３８８５５８ないし１０３９００６７塩基に位置する遺伝子および他のイネ科植物におけるそれに相当する遺伝子が含まれる。イネのＯｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子は、ＮＣＢＩ Ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ番号 ＮＭ＿００１０５３０８９に開示されるｍＲＮＡ配列を有する。イネのＯｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子によってコードされるタンパク質のアミノ酸配列は、ＮＣＢＩ Ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ番号 ＮＰ＿００１０４６５５４に開示される。イネ以外のイネ科植物におけるＯｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子に相当する遺伝子は、常法により同定することができ、例えば、当該植物のゲノム情報を格納したデータベースを用いて、イネのＯｓ０２ｇ０２８０２００遺

伝子の塩基配列またはそのコードされるアミノ酸配列を用いて相同性検索により同定することができる。

[0023] 本発明において、「短稈イネ科植物」とは、背丈が短縮されたイネ科植物をいい、好ましくは、穂の長さや籾の大きさは正常で、背丈だけが短縮されたイネ科植物をいう。本発明において、「短稈遺伝子」とは、イネ科植物の短稈化をもたらす遺伝子をいい、好ましくは、上記「短稈イネ科植物」をもたらす遺伝子をいう。

[0024] 本発明において、「イネ科植物」には、イネ、コムギ、オオムギ、カラスムギ、ライムギ、キビ、アワ、ヒエ、トウモロコシ、シコクビエ、モロコシ等が包含され、好ましくはイネを用いることができる。イネとしては、Ｏｒｙｚａ　ｓａｔｉｖａ　Ｌ．に属する種々の品種および系統を用いることができ、例えば、ジャポニカ種のコシヒカリ、日本晴、ひとめぼれ、ヒノヒカリ、あきたこまち、キヌヒカリ、ななつぼし、はえぬき、きらら３９７、つがるロマン、まっしぐら等、インディカ種のＫａｓａｌａｔｈ等を用いることができる。

[0025] 本発明において、Ｏｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子の発現の「抑制」とは、該遺伝子の発現が無いこと、または該遺伝子の発現が抑制されない対照と比べて、その発現量が減少することを意味する。

[0026] 本発明において、Ｏｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子の発現の抑制は、当該分野で常用されるいずれの方法で行ってもよく、特に限定されない。例えば、アンチセンス法、突然変異誘発法、ＲＮＡ干渉法等が挙げられる。アンチセンス法の場合、例えば、Ｏｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子の全長ｃＤＮＡのアンチセンス配列、またはＯｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子の第２エキソンのアンチセンス配列をイネ科植物に導入する。突然変異誘発法の場合、Ｏｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子の発現を抑制するような変異を塩基配列中に導入する。例えば、限定するものではないが、Ｏｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子の第２エキソンの４４位に、例えば、Ｏｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子の全長塩基配列の４７９位に、Ｔ（チミン）からＣ（シトシン）への変異を

導入してもよい。例えば、配列番号２または配列番号６で示される塩基配列、または配列番号４または配列番号８で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列をイネ科植物に導入することができる。

[0027] 本発明において、イネ科植物への目的遺伝子配列の導入は、当該分野で常用されるいずれの方法によって行ってもよい。限定するものではないが、例えば、アグロバクテリウム法、パーティクルガン法、エレクトロポレーション法、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）法等の形質転換法が挙げられる。

[0028] 本発明において、イネ科植物の形質転換は、Ｏｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子の発現を抑制するようにまたはＯｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子の構造を改変するように設計された種々の核酸分子、例えば、Ｏｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子の全長ｃＤＮＡのアンチセンス配列、例えば配列番号９で示される配列、Ｏｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子の第２エキソンのアンチセンス配列、例えば配列番号１０で示される配列、Ｏｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子の塩基配列の４７９位にＴ→Ｃ変異を含む塩基配列、例えば配列番号２または配列番号６で示される塩基配列、または配列番号４または配列番号８で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を用いて実施することができる。

[0029] 形質転換には、好ましくは、イネ科植物の細胞、例えば、プロトプラスト、カルス、胚等、組織片、または植物体等を用いることができる。

[0030] 本発明の方法において、イネ科植物は、例えば、目的の核酸分子を含有するベクターを用いて形質転換することができる。ベクターは、目的の遺伝子を発現させることができる種々のプロモーター配列を含有していてもよい。例えば、限定するものではないが、プロモーター配列として、イネＡｃｔｉｎ１プロモーター、３５Ｓプロモーター等を用いることができる。ベクターはまた、ベクターが細胞中に組み込まれた形質転換細胞の選択を可能とする種々の選択マーカーを含有することができる。選択マーカーの例としては、限定するものではないが、抗生物質耐性遺伝子または除草剤耐性遺伝子、例えば、ネオマイシン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシ

ン耐性遺伝子、ビアラフォス耐性遺伝子、ストレプトマイシン耐性遺伝子等が挙げられる。ベクターはまた、ターミネーターを含有することができる。かかるターミネーターは、植物体中で機能するものであれば特に限定されないが、例えば、カリフラワーモザイクウイルス由来のターミネーター、ノパリン合成酵素遺伝子由来のターミネーター（Ｎｏｓターミネーター）等が挙げられる。

[0031] 例えば、本発明の方法においてイネ科植物をアグロバクテリウム法で形質転換する場合、ベクターとして、市販のプラスミドベクターを含む種々のプラスミドベクター、例えば、ｐＳＴＡＲＡ　Ｒ－５、ｐＲＩ２０１－ＯＮ等を用いることができる。

[0032] 形質転換後、細胞を一定期間、選択培地中で生育させ、形質転換植物細胞を選択する。次いで、得られた形質転換細胞から全植物体を再生することによって、短稈イネ科植物を得ることができる。

[0033] したがって、本発明の第２の態様は、Ｏｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子の発現が抑制された短稈イネ科植物を提供する。本発明は、好ましくは、穂の長さや籾の大きさは正常で、背丈だけが短縮された短稈イネ科植物を提供する。

[0034] 本発明の第３の態様は、Ｏｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子の機能欠損型である短稈遺伝子を提供する。好ましくは、本発明は、配列番号２または配列番号６で示される塩基配列を含む短稈遺伝子、または配列番号４または配列番号８で示されるアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする短稈遺伝子を提供する。さらに好ましくは、本発明は、配列番号２で示される塩基配列からなる短稈遺伝子、または配列番号４で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする短稈遺伝子を提供する。

[0035] さらに、本発明は、短稈イネ科植物の作出に使用するための、Ｏｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子の全長ｃＤＮＡのアンチセンス配列からなるＤＮＡ、またはＯｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子の第２エキソンのアンチセンス配列からなるＤＮＡ、好ましくは、配列番号９で示される塩基配列からなるＤＮ

Ａ、または配列番号１０で示される塩基配列からなるＤＮＡを提供する。本発明は、また、短稈イネ科植物の作出に使用するための、配列番号３で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列のアンチセンス配列からなるＤＮＡ、または配列番号７で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列のアンチセンス配列を提供する。

[0036] 下記の実施例によって本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は該実施例に限定されるものではない。

実施例 1

[0037] ｄ６０遺伝子のファインマッピング

コシヒカリの第２染色体をインディカ品種　Ｋａｓａｌａｔｈに部分的に置換した系統（Ｄ６０Ｄ６０ｇａｌｇａｌ）とｄ６０コシヒカリ系統（ｄ６０ｄ６０ＧａｌＧａｌ）とを交雑し、得られた$Ｆ_1$（Ｄ６０ｄ６０Ｇａｌｇａｌ）をさらに自殖して$Ｆ_2$を得た。すなわち、コシヒカリゲノムにおいてｄ６０が座乗する第２染色体がインディカ品種Ｋａｓａｌａｔｈに部分的に置換された系統ＳＬ２０４（第２染色体の短腕末端から６０．３ｃＭまでがＫａｓａｌａｔｈに置換された系統、Ｄ６０Ｄ６０ｇａｌｇａｌ）とコシヒカリｄ６０系統（ｄ６０ｄ６０ＧａｌＧａｌ）との交雑$Ｆ_2$　５１２２個体を播種し、第３葉期にｄ６０ホモ型の短くて丸い葉をもつ短稈（ｄ６０ｄ６０ＧａｌＧａｌ）５３２個体を選抜して鳥取大学フィールドサイエンスセンターで栽培した。これら短稈ホモ型$Ｆ_2$全個体から葉をサンプリングしてＤＮＡを抽出した。

[0038] $Ｆ_2$各個体からのゲノムＤＮＡの抽出は、下記のとおり行った。植物体から採葉し、－８０℃で凍結保存した。葉を液体窒素で凍結し、粉砕した。これに葉の粉末の重量と等量のＤＮＡ抽出液（２％ＣＴＡＢ、１００ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、２０ｍＭ　ＥＤＴＡ・２Ｎａ、１．４Ｍ　ＮａＣｌ、ｐＨ８．０）を加え、５５℃で振盪しながら９０分間インキュベートした。この溶液をクロロホルム・イソアミルアルコール（２４：１）で抽出した。上清に１／１０量の３Ｍ　酢酸ナトリウムｐＨ５．２を加えた後、等量の－２０℃

の９９．５％イソプロパノールを加えて重合沈殿した高分子ＤＮＡをスプールアウトした。スプールアウトしたＤＮＡを１．５ｍｌのＨｉｇｈ－Ｓａｌｔ　ＴＥ（１Ｍ　ＮａＣｌ、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ・ＨＣｌ、１ｍＭ　ＥＤＴＡ・２Ｎａ、ｐＨ８．０）に溶解し、エタノール沈殿後、５００μｌのＴＥ（１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、１ｍＭ　ＥＤＴＡ・２Ｎａ、ｐＨ８．０）に溶解した。これに１／１００量のＲＮａｓｅ溶液（１ｍｇ／ｍｌ）を加えて３７℃で一晩インキュベートした。さらに、フェノール－クロロホルム抽出およびクロロホルム抽出を１回ずつ行った後、エタノール沈殿して５００μｌのＴＥ（１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、１ｍＭ　ＥＤＴＡ・２Ｎａ、ｐＨ８．０）に溶解した。

[0039]　次に、Ｋａｓａｌａｔｈ／コシヒカリ間で多型を示す第２染色体短腕のＳＳＲマーカー４８個を用いて、ｄ６０またはＧａｌとの組換え価を求め、ｄ６０遺伝子の座乗位置を絞り込んだ。

すなわち、上記のようにして抽出した各$Ｆ_2$植物体由来のゲノムＤＮＡ２００ｎｇを鋳型にして、各ＳＳＲマーカーについて各２００ｎＭのフォワードプライマーおよびリバースプライマー、４００μＭ　ｄＮＴＰｓ、２．５ｍＭ　$ＭｇＣｌ_2$、１×ＬＡ　ＰＣＲ　ＢｕｆｆｅｒII（ＴＡＫＡＲＡ）、０．５Ｕ　ＬＡ　ＴａｑＤＮＡポリメラーゼ（ＴＡＫＡＲＡ）を含む全量２５μｌの反応液を作製した。サーマルサイクラーを用いて、変性９４℃１分間、アニーリング５５℃１分間、伸長７２℃１分間の一連の反応を３５回行った。ＰＣＲ反応の後、電気泳動装置ＱＩＡｘｅｌで電気泳動を行った。電気泳動カートリッジはＱＩＡｘｅｌ　ＤＮＡ　ｓｃｒｅｅｎｉｎｇ　Ｋｉｔ（２４００）を用い、サンプル注入を５ｋＶで１０秒、電気泳動を５ｋＶで４２０秒行った。

[0040]　電気泳動結果に基づくＤＮＡ多型解析より、各ＳＳＲマーカーとｄ６０遺伝子との連鎖を調べ、各ＳＳＲマーカーとの組み換え価を求めた。その結果、ＳＳＲマーカー４８個のうち第２染色体の短腕末端から９．２から１１．０Ｍｂの領域にある８個、ＲＭ１２９１８、ＲＭ４５２、ＲＭ１２９３８、 ＲＭ１２９４９、ＲＭ１２９６４、ＲＭ１２９７０、Ｏｓ０２ｓｓｒ０１０４１００、およびＲＭ１３００２について、ｄ６０との強い連鎖が検出された。これらのＳＳＲマーカーとｄ６０との組換え価は、９．５Ｍｂ領域に存在するＲＭ１２９１８では５．７、９．６Ｍｂ領域のＲＭ４５２では５．１、９．９Ｍｂ領域のＲＭ１２９３８では３．９、１０．１Ｍｂ領域のＲＭ１２９４９では２．１、１０．２Ｍｂ領域のＲＭ１２９６４では３．２、１０．２Ｍｂ領域のＲＭ１２９７０では０．０、１０．５Ｍｂ領域のＯｓ０２ｓｓｒ０１０４１００では０．７、１０．９Ｍｂ領域のＲＭ１３００２では４．５となった。これらの組換え価から、ｄ６０が第２染色体の短腕末端から１０．２ないし１０．５Ｍｂ領域に存在することが分かった（図１）。

実施例 2

[0041] ｄ６０遺伝子の配列解析

イネの第２染色体の短腕末端から１０．２ないし１０．５Ｍｂ付近で推定される遺伝子Ｏｓ０２ｇ０２８０２００およびＯｓ０２ｇ０２８０３００をｄ６０候補遺伝子として配列解析を行った。

[0042] コシヒカリおよびコシヒカリｄ６０系統のＯｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子およびＯｓ０２ｇ０２８０３００遺伝子をそれぞれＰＣＲで増幅してｐＵＣ系ベクターｐＵＣ１１９を用いて単離し、大腸菌Ｋ１２株由来のＨＳＴ０８に形質転換してクローニングし、常法によりシークエンスを行った。すなわち、コシヒカリおよびコシヒカリｄ６０系統のゲノムＤＮＡ２００ｎｇを鋳型にして、各２００ｎＭのフォワードプライマー（配列番号１１：TCGATCGATTGATTGATTGGT）およびリバースプライマー（配列番号１２：CCATGGCATGCACATATACATGC）、４００μＭ　ｄＮＴＰｓ、２．５ｍＭ　ＭｇＣｌ$_2$、１×ＬＡ　ＰＣＲ　ＢｕｆｆｅｒＩＩ（ＴＡＫＡＲＡ）、０．５Ｕ　ＬＡ　ＴａｑＤＮＡポリメラーゼ（ＴＡＫＡＲＡ）を含む全量２５μｌの反応液を作製した。サーマルサイクラーを用いて、変性９４℃１分間、アニーリング５８℃１分間、伸長７２℃２分間の一連の反応を３５回行った。また、最初の変性９４℃と最後の合成７２℃を５分間ずつ行った。ＰＣＲ産物を１％アガロース

ゲルで１００Ｖで３５分間電気泳動した。ＤＮＡの精製にはＳＵＰＲＥＣ－ＰＣＲ（ＴＡＫＡＲＡ）を使用した。まず、サンプルリザーバーに滅菌水４００μｌを加え、キャップをして３，５００ｒｐｍで１５分間遠心後、フィルターバイアルからサンプルリザーバーを外し、新しいバイアルへ置いた。次に、サンプルリザーバーにＴＥ２０μｌを加え、軽くピペッティングした後、サンプルリザーバーを逆さに取り付け、３，５００ｒｐｍで２分間遠心した。新しいマイクロチューブに精製したＰＣＲ産物１μｌを入れ、ｐＭＤ２０－Ｔ　ｖｅｃｔｏｒ（ＴＡＫＡＲＡ）１μｌ、滅菌水３μｌを加えて混合した後、３０分ライゲーションした。Ｅ．ｃｏｉｌ　ＨＳＴ０８　Ｐｒｅｍｉｕｍ　Ｃｏｍｐｅｔｅｎｔ　Ｃｅｌｌｓ（ＴＡＫＡＲＡ）を使用直前に、氷中で融解後、穏やかに混和し均一にし、１００μｌのコンピテントセルを１４ｍｌ丸底チューブに移し、ライゲーション溶液を入れ、氷中で３０分間放置した後、４２℃で４５秒間インキュベートした。その後、氷中で１～２分間放置し、あらかじめ３７℃に保温しておいたＳＯＣ培地を全量加え、３７℃で１時間振とうし、固体ＬＢ培地に（５０～１００μｌ）塗布した後、３７℃で一晩放置した。放置した培地から白コロニーを選択して、液体ＬＢ培地３ｍｌに移し、３７℃で１６時間振とうした。プラスミドを保持する大腸菌の培養液（３ｍｌ）からアルカリ法によってプラスミドＤＮＡを精製した。このプラスミドを鋳型にしてダイデオキシ法でシーケンスを行った。

[0043]　その結果、Ｏｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子領域において、コシヒカリとコシヒカリｄ６０系統間で、塩基配列の４７９位にＴ（チミン）→Ｃ（シトシン）変異があることが分かった。Ｏｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子の塩基配列の４７９位は、第２エキソンにある。また、アミノ酸配列の１１２位にＦ（フェニルアラニン）→Ｓ（セリン）変異があることが分かった。

一方、Ｏｓ０２ｇ０２８０３００遺伝子領域については、コシヒカリとコシヒカリｄ６０系統の配列間で変異が見出されなかった。

したがって、ｄ６０遺伝子は、Ｏｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子の機能欠損型であると推測された。コシヒカリのＯｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子の

全長塩基配列の一例を配列番号１に示す。コシヒカリｄ６０系統におけるＯｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子の全長塩基配列の一例を配列番号２に示す。コシヒカリのＯｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子によってコードされるアミノ酸配列の一例を配列番号３に示す。コシヒカリｄ６０系統におけるＯｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子によってコードされるアミノ酸配列の一例を配列番号４に示す。

実施例 3

[0044] ｄ６０遺伝子を用いた短稈イネの生産

Ｏｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子の全長ｃＤＮＡのアンチセンス配列またはＯｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子の第２エキソンのアンチセンス配列をコシヒカリに導入した。アンチセンス配列の導入は下記のとおり行い、最終的に、再分化した植物体を得た。

[0045] １．バイナリーベクターのアグロバクテリウムへの導入

イネＡｃｔｉｎ１プロモーター、Ｎｏｓターミネーター、および選択マーカーとして、イネ由来Ｗ５４８Ｌ／Ｓ６２７Ｉ　２点変異型アセト乳酸シンターゼ遺伝子を含有するｐＳＴＡＲＡ系バイナリーベクターＲ－５（製品名：ｐＳＴＡＲＡ　Ｒ－５；クミアイ化学工業株式会社製）を制限酵素ＸｂａＩおよびＫｐｎＩで消化し、全長ｃＤＮＡのアンチセンス配列（配列番号９）または第２エキソンのアンチセンス配列（配列番号１０）を挿入し、アグロバクテリウム（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｔｕｍｅｆａｃｉｅｎｃｅ）ＥＨＡ１０５株にエレクトロポレーションによって導入した。スペクチノマイシン１００ｐｐｍを含むＬＢ培地で形質転換体を選抜した。

２．胚盤由来カルスの誘導

滅菌したコシヒカリの種子（２５～３５粒）をＮ６Ｄ培地に胚を上向きに置床し、３０℃、明所（１６時間明期）で５日間培養した。

３．アグロバクテリウムの前培養

バイナリーベクターを導入したアグロバクテリウムＥＨＡ１０５株（グリセロールストックより）は、感染前日、ＬＢ液体培地（スペクチノマイシン

１００ｐｐｍ含む）で培養した。

４．アグロバクテリウムの感染と共存培養

１）５日間培養した胚盤由来カルスのシュートと胚乳部分を除去し、Ｎ６Ｄ培地に仮置きした。

２）５０ｍｌのファルコンチューブにＡＡＭ溶液を４０ｍｌ入れ、アセトシリンゴン１００ｍｇ／ｍｌを１６μＬ添加した。

３）上記３で前培養したアグロバクテリウムを集菌し、ＡＡＭ溶液に懸濁、希釈した。

４）上記１）のカルスを新しい５０ｍｌファルコンチューブに入れ、上記３）のアグロバクテリウム懸濁液を加え、１．５分間ゆっくりと転倒混和した。

５）５００ｍｌビーカーの上に置いた滅菌済茶こしへ上記４）を注ぎ、カルスが入った茶こしを滅菌済キムタオルの上において余分な水分を除去した。

６）２Ｎ６－ＡＳ培地にカルス同士が接触しないように置床した（１プレートにつき、約２５個のカルス）。

７）２４℃の暗所で３日間共存培養した。

５．アグロバクテリウムの除去と選抜

１）共存培養したカルスを５０ｍｌファルコンチューブへ移し、カルベニシリン（５００ｍｇ／Ｌ）を含む滅菌水で７～８回洗浄した。

２）洗浄後、水が透きとおってきたら滅菌水中に１０分間静置した。

３）新しいピペットにかえて滅菌水５００ｍｌ使いきりまで洗浄し、カルスを滅菌済キムタオル（登録商標）に移し、余分な水分を除去した。

４）カルスをカルベニシリン４００ｍｇ／Ｌを適当量の選抜試薬を含む選抜培地（Ｎ６Ｄ培地）に置床（１プレートに１４カルス）した。

５）３０℃、明所（以降、１６時間明期）で一ヶ月間培養した。（二週間目に継代培養を行った。）

６．植物体再分化

１）新しいカルスが増殖してきたら、カルベニシリン（２００ｍｇ／Ｌ）および０．２５μＭビスピリバックナトリウム塩を含む再分化培地（ＲＥ－ＩＩＩ）に移植した。

２）３０℃、明所で一ヶ月間培養した。（二週間目に継代培養を行った。）

３）カルスからシュートと根が分化した後、ホルモンフリー（ＨＦ）培地へ移植した。

[0046] 結果を図２に示す。図２から明らかなように、Ｏｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子の全長ｃＤＮＡのアンチセンス配列またはＯｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子の第２エキソンのアンチセンス配列のどちらの形質転換体も、コントロールより、約２０ｃｍ短稈化した。また、穂長を測定したところ、コントロールで１４．１３ｃｍ、ｃＤＮＡ全長のアンチセンス遺伝子形質転換体で１４．１０ｃｍ、第２エキソンのアンチセンス遺伝子形質転換体で１３．４０ｃｍであり、両形質転換体の穂長はコントロールと同等であった。さらに、両形質転換体の籾の大きさもまた、コントロールと同等であった（図３）。

上記の結果から、ｄ６０遺伝子の機能相補性が証明され、ｄ６０遺伝子がＯｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子の機能欠損型であることが確認できた。また、Ｏｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子の発現を抑制することによって、短稈イネ科植物が得られることが証明された。

実施例 4

[0047] <u>形質転換体における組込み配列の確認</u>

実施例３で得られた両形質転換体から、実施例１に記載のようにゲノムＤＮＡを抽出し、下記の各プライマーを用いてＰＣＲ増幅し、電気泳動により増幅バンドを検出した。コントロールとして、形質転換されていないコシヒカリを用いた。

ｃＤＮＡ全長のアンチセンス遺伝子形質転換体用プライマー：３３０３Ｆおよび３３０３Ｒ

フォワードプライマー配列：TTTTGTAGGTAGAAGTCTAGATCAG（配列番号１３）

リバースプライマー配列：GGAAATTCGAGCTCGGTACCATGGC（配列番号１４）

第２エキソンのアンチセンス遺伝子形質転換体用のプライマー：３３０９Ｆおよび３３０９Ｒ

フォワードプライマー配列：TGTAGGTAGAAGTCTAGAACGATCC（配列番号１５）

リバースプライマー配列：AATTCGAGCTCGGTACCACGTCGTC（配列番号１６）

その結果、ｃＤＮＡ全長のアンチセンス遺伝子形質転換体において８９１ｂｐのバンドが検出され、第２エキソンのアンチセンス遺伝子形質転換体において１９４ｂｐのバンドが検出された。一方、コントロールでは、これらのバンドは検出されなかった。これらの結果から、実施例３で得られた形質転換体中に、目的のＤＮＡが確かに組み込まれたことが確認できた。したがって、実施例３で示されたイネ形質転換体の短稈化は、Ｏｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子の発現抑制によるものであることが証明された。

産業上の利用可能性

[0048] 本発明によると、イネ科植物のＯｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子の発現を抑制することによって、従来のｓｄ１遺伝子に依存することなく、短稈イネ科植物を作出することができる。本発明の短稈イネ科植物は、穂や籾は正常で背丈だけが短縮されているので、耐倒伏性を有するだけでなく、生産性も維持する。したがって、本発明は、農業分野におけるイネの生産および種々のイネ科植物の品種改良に利用可能である。

請求の範囲

[請求項1] イネ科植物において、Ｏｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子の発現を抑制することを特徴とする、短稈イネ科植物の作出方法。

[請求項2] アンチセンス法または突然変異誘発法によってＯｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子の発現を抑制することを特徴とする、請求項１記載の方法。

[請求項3] Ｏｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子の全長ｃＤＮＡのアンチセンス配列を含有するベクターでイネ科植物を形質転換することを特徴とする、請求項２記載の方法。

[請求項4] Ｏｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子の第２エキソンのアンチセンス配列を含有するベクターでイネ科植物を形質転換することを特徴とする、請求項２記載の方法。

[請求項5] Ｏｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子の塩基配列の４７９位にチミンからシトシンへのヌクレオチド変異を導入することを特徴とする、請求項２記載の方法。

[請求項6] 配列番号２で示される塩基配列を含有するベクターでイネ科植物を形質転換することを特徴とする、請求項５記載の方法。

[請求項7] 配列番号４で示されるアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする塩基配列を含有するベクターでイネ科植物を形質転換することを特徴とする、請求項５記載の方法。

[請求項8] 配列番号６で示される塩基配列を含有するベクターでイネ科植物を形質転換することを特徴とする、請求項５記載の方法。

[請求項9] 配列番号８で示されるアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする塩基配列を含有するベクターでイネ科植物を形質転換することを特徴とする、請求項５記載の方法。

[請求項10] Ｏｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子の発現が抑制された、短稈イネ科植物。

[請求項11] 配列番号２で示される塩基配列を含む短稈遺伝子。

［請求項12］ 配列番号４で示されるアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする短稈遺伝子。

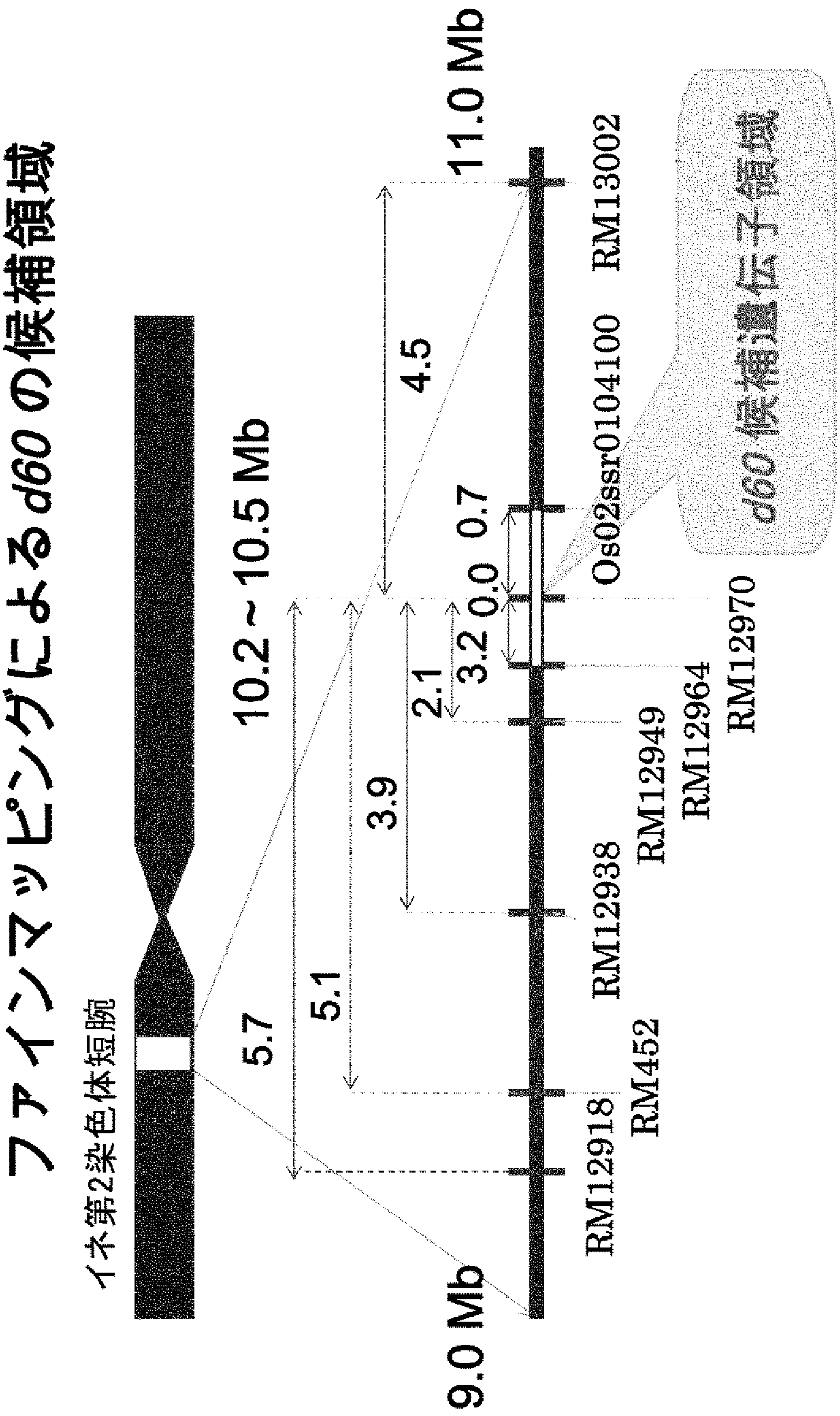
［請求項13］ Ｏｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子の全長ｃＤＮＡのアンチセンス配列からなるＤＮＡ。

［請求項14］ Ｏｓ０２ｇ０２８０２００遺伝子の第２エキソンのアンチセンス配列からなるＤＮＡ。

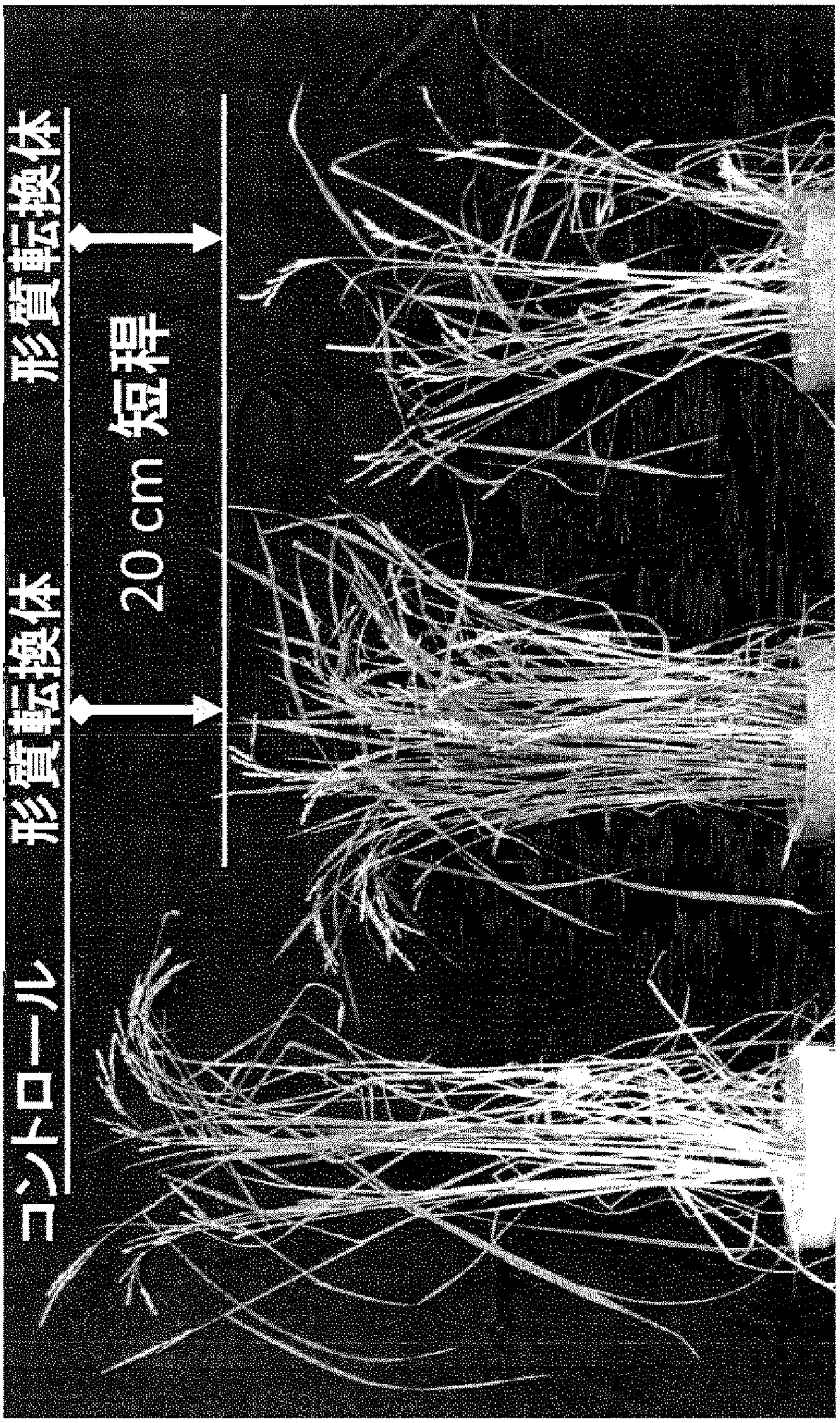
［請求項15］ 配列番号３で示されるアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする塩基配列のアンチセンス配列からなるＤＮＡ。

［請求項16］ 配列番号７で示されるアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする塩基配列のアンチセンス配列からなるＤＮＡ。

［図1］


ファインマッピングによるd60の候補領域
イネ第2染色体短腕
10.2～10.5 Mb
11.0 Mb
9.0 Mb
4.5
0.7
0.0
3.2
2.1
3.9
5.1
5.7
RM13002
Os02ssr0104100
RM12970
RM12964
RM12949
RM12938
RM452
RM12918
d60 候補遺伝子領域

[図2]

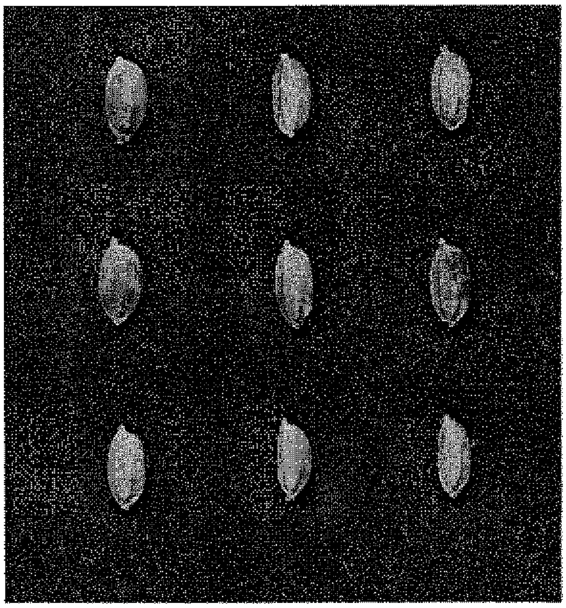


[図3]

コントロール

cDNA全長のアンチセンス遺伝子組換え

第2エキソンのアンチセンス遺伝子組換え



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2013/056339

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N15/09(2006.01)i, *A01H1/00*(2006.01)i, *A01H5/00*(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)
C12N15/00-15/90, A01H1/00, A01H5/00

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2013

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), GenBank/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	WO 2003/008540 A2 (SYNGENTA PARTICIPATIONS AG), 30 January 2003 (30.01.2003), & US 2006/0075523 A1 & EP 1402042 A2 & AU 2002341541 A	11-16/1-10
X/A	GenBank, 2009.02.05, Accession No.EAZ22584, "Hypothetical protein OsJ_06252" Published on 2009.02.05, Retreived on 2013.03.28 [on line] http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/125581653	13-16/1-12
A	JP 2008-237138 A (Tottori University), 09 October 2008 (09.10.2008), (Family: none)	1-16

☒ 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
28 March, 2013 (28.03.13)

Date of mailing of the international search report
09 April, 2013 (09.04.13)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/JP2013/056339

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2000-505290 A (Plant Bioscience Ltd.), 09 May 2000 (09.05.2000), & US 6307126 B1 & GB 9602796 A & EP 904290 A2 & WO 1997/029123 A2 & DE 69739539 D & AU 1799697 A & CA 2244229 A & CN 1228784 A	1-16
A	JP 2007-49994 A (Honda Motor Co., Ltd.), 01 March 2007 (01.03.2007), & US 2006/0123507 A1 & EP 1580270 A1 & WO 2004/044200 A1 & DE 60327254 D & CN 1742085 A & AU 2003301997 A	1-16
A	TANISAKA, T., et al., "Two useful semidwarfing genes in a short-culm mutant line HS90 of rice (*Oryza sativa* L.)" Breeding Sci., 1994, Vol.44, p.397-403	1-16
A	ITOH, H., et al., "Modification of rice plant height by suppressing the height-controlling gene, *D18*, in rice" Breeding Sci., 2002, Vol.52, p.215-218	1-16
A	Motonori TOMITA et al., "Shinki no Ine Tankan · Bansei QTL no Dotei to sono Idenshi Shindan", Breeding research, 23 September 2011 (23.09.2011), vol.13, separate volume no.2, page 18	1-16
A	JP 2003-260 A (Honda Motor Co., Ltd.), 07 January 2003 (07.01.2003), & US 2004/0250315 A1 & EP 1398382 A1 & WO 2003/006655 A1 & DE 60207714 D & CA 2451216 A & BR 210452 A & AT 311462 T & CN 1539016 A & AU 2002306308 B	1-16

国際調査報告	国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１３／０５６３３９

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N15/09(2006.01)i, A01H1/00(2006.01)i, A01H5/00(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（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N15/00-15/90, A01H1/00, A01H5/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１３年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１３年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１３年

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）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
GenBank/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 請求項の番号
X/A	WO 2003/008540 A2 (SYNGENTA PARTICIPATIONS AG) 2003.01.30, & US 2006/0075523 A1 & EP 1402042 A2 & AU 2002341541 A	11-16/1-10
X/A	GenBank, 2009.02.05, Accession No.EAZ22584, “Hypothetical protein OsJ_06252” Published on 2009.02.05, Retreived on 2013.03.28 [on line] http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/125581653	13-16/1-12
A	JP 2008-237138 A (国立大学法人鳥取大学) 2008.10.09, (ファミリ	1-16

☑　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	国際調査報告の発送日
２８．０３．２０１３	０９．０４．２０１３

国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官（権限のある職員）	４Ｂ	３５４１
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	水落　登希子 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
	ーなし)	
A	JP 2000-505290 A (プラント　バイオサイエンス　リミティド) 2000.05.09, & US 6307126 B1 & GB 9602796 A & EP 904290 A2 & WO 1997/029123 A2 & DE 69739539 D & AU 1799697 A & CA 2244229 A & CN 1228784 A	1-16
A	JP 2007-49994 A (本多技研工業株式会社) 2007.03.01, & US 2006/0123507 A1 & EP 1580270 A1 & WO 2004/044200 A1 & DE 60327254 D & CN 1742085 A & AU 2003301997 A	1-16
A	TANISAKA,T., et al., "Two useful semidwarfing genes in a short-culm mutant line HS90 of rice(*Oryza sativa* L.)" Breeding Sci., 1994, Vol.44, p.397-403	1-16
A	ITOH,H., et al.," Modification of rice plant height by suppressing the height-controlling gene, *D18*, in rice" Breeding Sci., 2002, Vol.52, p.215-218	1-16
A	富田因則　他　「新規のイネ短桿・晩生 QTL の同定とその遺伝子診断」育種学研究, 2011.09.23, 第１３桿　別冊２号, p.18	1-16
A	JP 2003-260 A (本田技研工業株式会社) 2003.01.07, & US 2004/0250315 A1 & EP 1398382 A1 & WO 2003/006655 A1 & DE 60207714 D & CA 2451216 A & BR 210452 A & AT 311462 T & CN 1539016 A & AU 2002306308 B	1-16