

(19) 日本国特許庁 (JP)

## (12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5770086号  
(P5770086)

(45) 発行日 平成27年8月26日 (2015. 8. 26)

(24) 登録日 平成27年7月3日 (2015. 7. 3)

(51) Int. Cl.

F I

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

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

C O 7 K 14/415 (2006. 01)

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

A O 1 H 1/02 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

A O 1 H 5/00 A

C O 7 K 14/415

C 1 2 Q 1/68 A

A O 1 H 1/02

請求項の数 31 (全 70 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2011-517785 (P2011-517785)  
 (86) (22) 出願日 平成21年7月9日 (2009. 7. 9)  
 (65) 公表番号 特表2011-527891 (P2011-527891A)  
 (43) 公表日 平成23年11月10日 (2011. 11. 10)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2009/005004  
 (87) 国際公開番号 W02010/006732  
 (87) 国際公開日 平成22年1月21日 (2010. 1. 21)  
 審査請求日 平成24年6月21日 (2012. 6. 21)  
 (31) 優先権主張番号 61/135, 230  
 (32) 優先日 平成20年7月17日 (2008. 7. 17)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 08075648. 9  
 (32) 優先日 平成20年7月18日 (2008. 7. 18)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 512135126  
 バイエル・クロップサイエンス・エヌ・ヴ  
 ェー  
 BAYER CROPSCIENCE N  
 . V.  
 ベルギー国、ペー ー 1 8 3 1 ディーゲム  
 、ヤン・エミール・モマルツラン 1 4  
 (74) 代理人 100117787  
 弁理士 勝沼 宏仁  
 (74) 代理人 100126099  
 弁理士 反町 洋  
 (74) 代理人 100172557  
 弁理士 鈴木 啓靖

微生物の受託番号 NCIMB NCIMB 41570

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 突然変異株 INDEHISCENTアレルを有するアブラナ属 (Brassica) 植物

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

少なくとも2つのIND遺伝子の少なくとも2つの内在性アレルが、野生型IND遺伝子の部分ノックアウト突然変異株INDアレルであり、部分ノックアウト突然変異株INDアレルが、下記：

- (a) 配列番号2の位置124に相当する位置のバリンが、メチオニンに置換されているINDタンパク質をコードする核酸、
- (b) 配列番号2の位置146に相当する位置のグリシンが、セリンに置換されているINDタンパク質をコードする核酸、
- (c) 配列番号2の位置159に相当する位置のアラニンが、バリンに置換されているINDタンパク質をコードする核酸、
- (d) 配列番号4の位置142に相当する位置のアルギニンが、システインに置換されているINDタンパク質をコードする核酸、
- (e) 配列番号4の位置136に相当する位置のスレオニンが、メチオニンに置換されているINDタンパク質をコードする核酸、および
- (f) 配列番号4の位置139に相当する位置のアラニンが、スレオニンに置換されているINDタンパク質をコードする核酸

からなる群より選択されることを特徴とする、少なくとも2つのIND遺伝子を含むアブラナ属 (Brassica) 植物。

## 【請求項 2】

前記野生型 I N D 遺伝子が、

( a ) 配列番号 1、配列番号 3 の 4 6 位のヌクレオチドから 6 3 3 位のヌクレオチドまで、配列番号 3、配列番号 5 または配列番号 7 との配列同一性が少なくとも 9 0 % である核酸分子と、

( b ) 配列番号 2、配列番号 4 の 1 6 位のアミノ酸から 2 1 0 位のアミノ酸までまたは配列番号 4 に対する配列同一性が少なくとも 9 0 % であるアミノ酸配列をコードする核酸分子と、

ここで、前記野生型 I N D 遺伝子は、野生型の機能的 I N D タンパク質をコードする、からなる群から選択される核酸分子を含む、請求項 1 に記載の植物。

【請求項 3】

前記部分ノックアウト突然変異株 I N D アレルが、下記：

- ( a ) 位置 3 7 0 の g が、a に置換されている配列番号 1 の核酸、
- ( b ) 位置 4 3 6 の g が、a に置換されている配列番号 1 の核酸、
- ( c ) 位置 4 7 6 の c が、t に置換されている配列番号 1 の核酸、
- ( d ) 位置 4 2 4 の c が、t に置換されている配列番号 3 の核酸、
- ( e ) 位置 4 0 7 の c が、t に置換されている配列番号 3 の核酸、および
- ( f ) 位置 4 1 5 の g が、a に置換されている配列番号 3 の核酸

からなる群から選択される、請求項 1 または 2 に記載の植物。

【請求項 4】

前記少なくとも 2 つの I N D 遺伝子のさらなる少なくとも 1 つの内在性アレルが、完全ノックアウト突然変異株 I N D アレルであり、前記完全ノックアウト突然変異株 I N D アレルが、塩基性ヘリックスループヘリックスドメインを欠く切断された I N D タンパク質の産生をもたらすか、または コンセンサス b H L H ドメイン配列の 1 0 位のアルギニンが芳香族のヒスチジンに置換されている I N D タンパク質の産生をもたらすか、または I N D タンパク質の産生をもたらさない突然変異を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の植物。

【請求項 5】

前記完全ノックアウト突然変異株 I N D アレルが、下記：

- ( a ) 位置 3 6 4 の c が、t に置換されている配列番号 1 の核酸、
- ( b ) 位置 3 0 7 および 3 8 0 の g が、a に置換されている配列番号 1 の核酸、
- ( c ) 位置 1 4 8 の c が、t に置換されている配列番号 3 の核酸、および
- ( d ) 位置 4 0 3 の c が、t に置換されている配列番号 3 の核酸

からなる群から選択される、請求項 4 に記載の植物。

【請求項 6】

前記部分および/または完全ノックアウト突然変異株 I N D アレルにとってホモ接合である、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の植物。

【請求項 7】

莢が、1 0 ~ 8 0 秒の不規則衝撃加振試験における莢試料の半減期を有する、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の植物。

【請求項 8】

莢が、2 0 ~ 6 0 秒の不規則衝撃加振試験における莢試料の半減期を有する、請求項 7 に記載の植物。

【請求項 9】

少なくとも 1 つの I N D 遺伝子の内在性アレルが、野生型 I N D 遺伝子の部分ノックアウト突然変異株アレルである、植物であって、

野生型 I N D 遺伝子が、野生型の機能的 I N D タンパク質をコードし、下記：

( a ) 配列番号 1、配列番号 3 の 4 6 位のヌクレオチドから 6 3 3 位のヌクレオチドまで、配列番号 3、配列番号 5 または配列番号 7 との配列同一性が少なくとも 9 0 % である核酸分子と、

( b ) 配列番号 2、配列番号 4 の 1 6 位のアミノ酸から 2 1 0 位のアミノ酸までまたは

10

20

30

40

50

配列番号 4 に対する配列同一性が少なくとも 90% であるアミノ酸配列をコードする核酸分子と、からなる群から選択される核酸分子を含み、

部分ノックアウト突然変異株アレルが、下記：

- (a) 配列番号 2 の位置 1 2 4 に相当する位置のバリンが、メチオニンに置換されている I N D タンパク質をコードする核酸、
  - (b) 配列番号 2 の位置 1 4 6 に相当する位置のグリシンが、セリンに置換されている I N D タンパク質をコードする核酸、
  - (c) 配列番号 2 の位置 1 5 9 に相当する位置のアラニンが、バリンに置換されている I N D タンパク質をコードする核酸、
  - (d) 配列番号 4 の位置 1 4 2 に相当する位置のアルギニンが、システインに置換されている I N D タンパク質をコードする核酸、
  - (e) 配列番号 4 の位置 1 3 6 に相当する位置のスレオニンが、メチオニンに置換されている I N D タンパク質をコードする核酸、および
  - (f) 配列番号 4 の位置 1 3 9 に相当する位置のアラニンが、スレオニンに置換されている I N D タンパク質をコードする核酸
- からなる群から選択される、植物。

10

#### 【請求項 10】

前記部分ノックアウト突然変異株 I N D アレルが、下記：

- (a) 位置 3 7 0 の g が、a に置換されている配列番号 1 の核酸、
  - (b) 位置 4 3 6 の g が、a に置換されている配列番号 1 の核酸、
  - (c) 位置 4 7 6 の c が、t に置換されている配列番号 1 の核酸、
  - (d) 位置 4 2 4 の c が、t に置換されている配列番号 3 の核酸、
  - (e) 位置 4 0 7 の c が、t に置換されている配列番号 3 の核酸、および
  - (f) 位置 4 1 5 の g が、a に置換されている配列番号 3 の核酸
- からなる群から選択される、請求項 9 に記載の植物。

20

#### 【請求項 11】

請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の植物から入手可能な種子莢。

#### 【請求項 12】

野生型 I N D 遺伝子が、野生型の機能的 I N D タンパク質をコードし、下記：

- (a) 配列番号 1、配列番号 3 の 4 6 位のヌクレオチドから 6 3 3 位のヌクレオチドまで、配列番号 3、配列番号 5 または配列番号 7 との配列同一性が少なくとも 90% である核酸分子と、
  - (b) 配列番号 2、配列番号 4 の 1 6 位のアミノ酸から 2 1 0 位のアミノ酸までまたは配列番号 4 に対する配列同一性が少なくとも 90% であるアミノ酸配列をコードする核酸分子と、からなる群から選択される核酸分子を含む、I N D 遺伝子の部分ノックアウト突然変異株アレルであって、部分ノックアウト突然変異株 I N D アレルが、下記：
  - (a) 配列番号 2 の位置 1 2 4 に相当する位置のバリンが、メチオニンに置換されている I N D タンパク質をコードする核酸、
  - (b) 配列番号 2 の位置 1 4 6 に相当する位置のグリシンが、セリンに置換されている I N D タンパク質をコードする核酸、
  - (c) 配列番号 2 の位置 1 5 9 に相当する位置のアラニンが、バリンに置換されている I N D タンパク質をコードする核酸、
  - (d) 配列番号 4 の位置 1 4 2 に相当する位置のアルギニンが、システインに置換されている I N D タンパク質をコードする核酸、
  - (e) 配列番号 4 の位置 1 3 6 に相当する位置のスレオニンが、メチオニンに置換されている I N D タンパク質をコードする核酸、および
  - (f) 配列番号 4 の位置 1 3 9 に相当する位置のアラニンが、スレオニンに置換されている I N D タンパク質をコードする核酸
- からなる群から選択される核酸分子を含む、野生型 I N D 遺伝子の部分ノックアウト突然変異株アレル。

30

40

50

**【請求項 1 3】**

下記：

- (a) 位置 3 7 0 の g が、a に置換されている配列番号 1 の核酸、
  - (b) 位置 4 3 6 の g が、a に置換されている配列番号 1 の核酸、
  - (c) 位置 4 7 6 の c が、t に置換されている配列番号 1 の核酸、
  - (d) 位置 4 2 4 の c が、t に置換されている配列番号 3 の核酸、
  - (e) 位置 4 0 7 の c が、t に置換されている配列番号 3 の核酸、および
  - (f) 位置 4 1 5 の g が、a に置換されている配列番号 3 の核酸
- からなる群から選択される、請求項 1 2 に記載の部分ノックアウト突然変異株アレル。

**【請求項 1 4】**

請求項 1 2 または 1 3 に記載の部分ノックアウト突然変異株アレルによってコードされる突然変異株 I N D タンパク質。

**【請求項 1 5】**

請求項 1 2 または 1 3 に記載の少なくとも 2 つの部分ノックアウト突然変異株 I N D アレルを 1 つの植物で組み合わせる方法であって、

(a) 各々少なくとも 1 つの部分ノックアウト突然変異株 I N D アレルを含む少なくとも 2 つの植物を同定するステップと、

(b) 前記少なくとも 2 つの植物を交雑させ、前記少なくとも 1 つの交雑種から F 1 ハイブリッド種子を採取するステップと、

(c) 任意に、少なくとも 2 つの部分ノックアウト突然変異株 I N D アレルを含む F 1 植物を同定するステップと、を含む、方法。

**【請求項 1 6】**

選択された前記突然変異株 I N D アレルの接合状態を判断することで、部分ノックアウト突然変異株 I N D アレルにとってホモ接合またはヘテロ接合である F 1 植物を同定するステップをさらに含む、請求項 1 5 に記載の方法。

**【請求項 1 7】**

少なくとも 1 つの部分ノックアウト突然変異株 I N D アレルを 1 つの植物から別の植物に移行するための方法であって、

(a) 少なくとも 1 つの部分ノックアウト突然変異株 I N D アレルを含む第 1 の植物を同定するか、あるいは、請求項 1 5 に従って少なくとも 2 つの部分ノックアウト突然変異株 I N D アレルを含む第 1 の植物を生成するステップと、

(b) 第 1 の植物を、前記少なくとも 1 つの部分ノックアウト突然変異株 I N D アレルを含まない第 2 の植物と交雑させ、前記交雑種から F 1 種子を採取するステップと、

(c) 任意に、少なくとも 1 つの部分ノックアウト突然変異株 I N D アレルを含む F 1 植物を同定するステップと、

(d) 前記少なくとも 1 つの部分ノックアウト突然変異株 I N D アレルを含む F 1 植物を、前記少なくとも 1 つの部分ノックアウト突然変異株 I N D アレルを含まない第 2 の植物と、少なくとも 1 世代 (x) 戻し交雑させ、前記交雑種から B C x 種子を採取するステップと、

(e) 前記少なくとも 1 つの部分ノックアウト突然変異株 I N D アレルを含む各世代の B C x 植物で同定するステップと、を含む、方法。

**【請求項 1 8】**

部分ノックアウト突然変異株 I N D アレルの接合状態を判断することで、前記部分ノックアウト突然変異株 I N D アレルにとってホモ接合またはヘテロ接合である B C x 植物を同定するステップをさらに含む、請求項 1 7 に記載の方法。

**【請求項 1 9】**

(a) 請求項 1 2 または 1 3 に記載の第 1 の部分ノックアウト突然変異株 I N D アレルをホモ接合状態で含む第 1 の植物と、請求項 1 2 または 1 3 に記載の第 2 の部分ノックアウト突然変異株 I N D アレルをホモ接合状態で含む第 2 の植物を、同定するステップと、

(b) 第 1 および第 2 の植物を交雑させ、交雑種から F 1 ハイブリッド種子を採取する

10

20

30

40

50

ステップと、を含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載のハイブリッドアブラナ属 ( *B r a s s i c a* ) 種子または植物を生成するための方法。

【請求項 20】

第 1 および第 2 の部分ノックアウト突然変異株 I N D アレルが同一である、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記第 1 の植物が第 1 の完全ノックアウト突然変異株 I N D アレルをホモ接合状態でさらに含み、前記第 2 の植物が第 2 の完全ノックアウト突然変異株 I N D アレルをホモ接合状態でさらに含み、前記完全ノックアウト突然変異株 I N D アレルが、塩基性ヘリックスループヘリックスドメインを欠く切断された I N D タンパク質の産生をもたらすか、または コンセンサス b H L H ドメイン配列の 10 位のアルギニンが芳香族のヒスチジンに置換 されている I N D タンパク質の産生をもたらすか、または I N D タンパク質の産生をもたらさない突然変異を含む、請求項 19 または 20 に記載の方法。

10

【請求項 22】

第 1 および第 2 の完全ノックアウト突然変異株 I N D アレルが同一である、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

N C I M B に受託番号 N C I M B 4 1 5 7 0 で寄託され、位置 3 7 0 の g が、a に置換されている配列番号 1 の核酸を含む種子、N C I M B に受託番号 N C I M B 4 1 5 7 1 で寄託され、位置 4 3 6 の g が、a に置換されている配列番号 1 の核酸を含む種子、N C I M B に受託番号 N C I M B 4 1 5 7 2 で寄託され、位置 4 7 6 の c が、t に置換されている配列番号 1 の核酸を含む種子、N C I M B に受託番号 N C I M B 4 1 5 7 5 で寄託され、位置 4 2 4 の c が、t に置換されている配列番号 3 の核酸を含む種子、N C I M B に受託番号 N C I M B 4 1 5 7 3 で寄託され、位置 4 0 7 の c が、t に置換されている配列番号 3 の核酸を含む種子、N C I M B に受託番号 N C I M B 4 1 5 7 4 で寄託され、位置 4 1 5 の g が、a に置換されている配列番号 3 の核酸を含む種子、これらの誘導体からなる群から選択される部分ノックアウト i n d アレルを含むアブラナ属 ( *B r a s s i c a* ) 種子。

20

【請求項 24】

請求項 23 に記載の種子から得られる、アブラナ属 ( *B r a s s i c a* ) 植物あるいは、その細胞、一部分、種子または後代。

30

【請求項 25】

請求項 23 に記載の種子から生育させたアブラナ属 ( *B r a s s i c a* ) 植物の繁殖および / または育種によって得られる、位置 3 7 0 の g が、a に置換されている配列番号 1 の核酸、位置 4 3 6 の g が、a に置換されている配列番号 1 の核酸、位置 4 7 6 の c が、t に置換されている配列番号 1 の核酸、位置 4 2 4 の c が、t に置換されている配列番号 3 の核酸、位置 4 0 7 の c が、t に置換されている配列番号 3 の核酸、または位置 4 1 5 の g が、a に置換されている配列番号 3 の核酸を自らのゲノムに含むアブラナ属 ( *B r a s s i c a* ) 植物あるいは、その細胞、一部分、種子または後代。

【請求項 26】

1 つの遺伝子座での少なくとも 2 つの I N D 遺伝子の 2 つの内在性アレルが、請求項 12 または 13 に記載の部分ノックアウト突然変異株 I N D アレルである、2 つの遺伝子座に少なくとも 2 つの I N D 遺伝子を含むアブラナ属 ( *B r a s s i c a* ) 植物。

40

【請求項 27】

前記 2 つの部分ノックアウト突然変異株 I N D アレルがホモ接合である、請求項 26 に記載の植物。

【請求項 28】

突然変異株 I N D アレルを含まない対応する植物によって産生される機能的 I N D タンパク質の量と比較して少なくとも 30 % 減少した量の機能的 I N D タンパク質を産生する、請求項 26 ~ 27 のいずれか 1 項に記載の植物。

50

## 【請求項 29】

突然変異株 I N D アレルを含まない対応する植物の種子収量に比して、植物の種子収量が高まる、請求項 26 ~ 28 のいずれか 1 項に記載の植物。

## 【請求項 30】

少なくとも 2 つの I N D 遺伝子の 2 つの突然変異ホモ接合 I N D アレルを内在的に導入することを含む、少なくとも 2 つの I N D 遺伝子を含むアブラナ属 ( B r a s s i c a ) 植物の収量を増すための方法。

## 【請求項 31】

請求項 1 ~ 10 または 26 ~ 29 のいずれか一項に記載の植物の細胞、一部分、種子または後代。

10

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は農業分野に関し、特に、分子生物学の技術を用いて、裂開種子植物、特にアブラナ科 ( B r a s s i c a c e a e )、特にアブラナ属 ( B r a s s i c a ) の種を変化させるおよび/または当該裂開種子植物の育種を加速することに関する。特に、本発明は、アブラナ科 ( B r a s s i c a c e a e ) 植物、特に種子生成用に生育されるアブラナ科 ( B r a s s i c a c e a e ) 植物などの植物において脱粒を低減または脱粒を収穫後まで遅らせつつ、同時に莢の農学的に妥当な脱穀性を維持するための改善された方法および手段に関する。また、裂開種子植物の個体群における脱粒低減または脱粒遅延と関連した分子マーカーを同定する方法も得られる。さらに、収量、特に穀物および種子の収量を高めるための方法および手段も得られる。収量増加表現型が、種子脱粒低減表現型または種子脱粒遅延表現型と切り離されていてよい。

20

## 【背景技術】

## 【0002】

アブラナ属 ( B r a s s i c a ) 植物の長角果または莢は、果実裂開と呼ばれるプロセスを介して種子を放出する。長角果は、縁辺と縁辺でつながった 2 枚の心皮からなる。縁辺間の縫線が隔膜と呼ばれる厚いリブを形成する。莢の成熟が近づくにつれて、2 つの朔片が莢の決められた弱い線に沿って少しずつ隔膜から離れ、最終的には隔膜に結合した種子のシャッタリングが生じる。朔片が分離する厳密な位置を裂開ゾーンと定義する。

30

## 【0003】

作物の収穫前または収穫時における成熟莢による種子の脱落(「種子脱粒」または「裂莢」とも呼ばれる)は、乾燥裂開果をつける作物に普遍的な現象である。未熟種子脱粒は種子の回収率を下げるが、これは搾油用アブラナ属 ( B r a s s i c a ) 植物、特にアブラナなど主に種子を取るために育てられている作物で問題となる。未熟な脱粒に関するもうひとつの問題として、翌穀物年度の自生成長の増加があげられる。アブラナでは、裂莢に伴う収量損失が平均 20 % である ( C h i l d e t a l . , 1998 , J E x p B o t 49 : 829 ~ 838 ) が、天候状態次第では最大 50 % に達することもある ( M a c L e o d , 1981 , H a r v e s t i n g i n O i l s e e d R a p e , p p . 107 ~ 120 , C a m b r i d g e A g r i c u l t u r a l P u b l i s h i n g , C a m b r i d g e ) 。

40

## 【0004】

現在流通しているアブラナの変異体は、極めてシャッタリングしやすい。既存のセイヨウアブラナ ( B . n a p u s ) 育種プログラムにはシャッタリングに対する耐性についてのバリエーションはほとんどないが、セイヨウアブラナ ( B . n a p u s ) の二倍体の親(キャベツ ( B . o l e r a c e a ) およびカブ ( B . r a p a ) ) ならびにアブラナ属 ( B r a s s i c a ) の属に含まれる他のメンバ、特にカラシナ ( B . j u n c e a )、アピシニアカラシ ( B . c a r i n a t a ) およびクロガラシ ( B . n i g r a ) で、耐性系統が見ついている。K a d k o l e t a l . ( 1986 , A u s t . J . B o t a n y 34 ( 5 ) : 595 ~ 601 ) は、長角朔片が隔

50

膜に結合される領域に分離層がないことに関連したハクサイ (*B. campestris*) の特定の到達種におけるシャッターリングに対する耐性の高まりを報告している。Prakash and Chopra (1988, Plant breeding 101: 167~168) は、非相同的な組換えによるカラシナ (*Brassica juncea*) からのセイヨウアブラナ (*Brassica napus*) のシャッターリングに対する耐性の浸透性交雑について説明している。Spence et al. (1996, J of Microscopy 181: 195~203) は、カラシナ (*Brassica juncea*) の系統によってはセイヨウアブラナ (*Brassica napus*) 系統よりもシャッターリングの傾向が低減されることについて説明している。Morgan et al., 1998 (Fields Crop Research 58, 153~165) は、合成セイヨウアブラナ (*B. napus*) から発育されたアブラナの系統間での耐裂莢性の遺伝的変異について説明し、莢を開くのに大きなエネルギーが必要な系統では裂開ゾーンの脈管化も増し、裂開ゾーン内での細胞壁の崩壊が減るように見えたと結論付けている。さらに彼らは、莢のくちばしの長さとおよび莢シャッターリングを引き起こすのに必要な力との間には有意な陰性相関があることも見出した。Child and Huttly (1999, Proc 10th Int. Rapeseed Congress) は、放射線誘発突然変異株セイヨウアブラナ (*B. napus*) およびその親品種である Jet Neuf の個体群での莢成熟のバリエーションについて説明しており、最も耐性のある野生型および突然変異株植物で裂開ゾーン全体にわたる細胞群の木化が多く認められ、突然変異株の裂開ゾーンの内縁の近くにある維管束の跡が、朔片を固定しておく助けになっていると説明されていた。Child et al. (2003, J Exp Botany 54 (389): 1919~1930) はさらに、再合成したセイヨウアブラナ (*Brassica napus*) 系統の耐裂莢性の増大とおよび莢の維管束構造の変化の関連性について説明している。しかしながら、従来の育種方法では、早期開花、成熟および黒脚病耐性などの他の望ましい特色に干渉せずにナタネ品種にシャッターリング耐性を導入することに成功していない (Prakash and Chopra, 1990, Genetical Research 56: 1~2)。

#### 【0005】

莢の裂開を促進または阻害するいくつかの遺伝子が、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の突然変異解析で同定されている。SHATTERPROOF1 (SHP1; 初期にはAGL1と呼ばれた) とSHATTERPROOF2 (SHP2; 初期にはAGL5と呼ばれた) の突然変異株の組み合わせで、非裂開長角果 (すなわち、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の成熟時に閉じたままの長角果) が得られた (Liljegren et al., 2000, Nature 404, 766~770)。同様に、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) におけるINDEHISCENT遺伝子 (IND1と呼ばれる) の突然変異株 (Liljegren et al., 2004, Cell 116: 843~853; 国際特許出願公開第WO01/79517号パンフレット) ならびにALCATRAZ (ALCと呼ばれる; Rajani et al., 2001, Current Biology 11, 1914~1922) における突然変異株が莢の裂開に干渉し、耐裂莢性となった。シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) におけるSHPおよびINDのリプレッサーであるFRUITFUL (FUL) の構成的発現でも、非裂開長角果が得られた (Ferrandiz et al., 2000, Science, 289, 436~438)。これらの転写因子は、朔片縁辺の独自性や裂莢を制御する非線形転写ネットワークを形成すると考えられている。Liljegren et al. (2004, Cell 116: 843~853) はさらに、INDすなわち非定型塩基性ヘリックスループヘリックス (bHLH) 遺伝子は、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) で朔片縁辺から分離層および木化層への分化を指令すると説明している。内果皮b層 (各朔片の単一の木化

10

20

30

40

50

細胞層)に沿った分離層に近い木化細胞の層で、乾燥しつつある果実の中ではねのようなねじれが生じ、そのおかげで莢が開く。朔片内果皮b層の木化には、朔片全体で発現されるIND、SHP、ALCおよびFUL、MADS-ドメイン転写因子の活動が必要である(Liljegren et al., 2004, 上掲; Mandel and Yanofsky, 1995, Plant Cell 7, 1763~1771)。FULおよび隔膜LESS(RPL)すなわち隔膜で発現されるホメオドメイン転写因子(Roeder et al., 2003, Curr Biol 13, 1630~1635)は、朔片縁辺の同一性をもたらす遺伝子の境界を定めることが見出されている(Guet al., 1998, Development 125, 1509~1517; Ferrandiz et al., 2000, Science, 289, 436~438; Roeder et al., 2003, 上掲)。最後に、2つのYABBYファミリー転写因子であるFILAMENTOUS FLOWER(FIL)およびYABBY3(YAB3)(Sawa et al., 1999, Genes Dev 13, 1079~1088; Siegfried et al., 1999, Development 126, 4117~4128)およびJAGGED(JAG)すなわちC2H2ジンクフィンガー転写因子(Dinneny et al., 2004, Development 131, 1101~1110; Ohno et al., 2004, Development 131, 1111~1122)が、領域特異的にFULおよびSHPの発現を促進することで、適切な朔片および朔片縁辺の発達に冗長的に寄与するとして同定された(Dinneny et al., 2005, Development 132, 4687-4696)。アブラナ属(Brassica)植物の莢におけるプログラムされた裂開ゾーンの破壊で莢の裂開時に何らかの役割を果たすエンドポリガラクトナーゼなどの多数の加水分解性酵素の遺伝子も、同定されている(国際特許出願公開第WO97/13865号パンフレット; Petersen et al., Plant. Mol. Biol., 1996, 31:517~527などを参照のこと)。

#### 【0006】

Liljegren et al. (2004, Cell 116: 843~853)は、シロイヌナズナ属(Arabidopsis)INDの5つの突然変異株アレルについて説明している。裂開ゾーンの木化細胞は、変異の重大性(重大なind突然変異株は野生型植物の朔片縁辺の内側部分に対応する領域に木化細胞を含まない)次第でこれらの突然変異株アレルを含む植物に存在しないか存在するかのいずれかであるが、どちらの場合も長角果は閉果である。Wu et al. (2006), Planta 224, 971~979)は、シロイヌナズナ属(Arabidopsis)INDの6つの突然変異株アレルについて説明している。この突然変異株アレルを含む植物には、朔片縁辺と隔膜の結合部分に木化細胞が認められず、7層の細胞からなる領域に細胞が少ししかなく、野生型植物で一般に知られている裂開ゾーンおよび隔膜境界に含まれ、この層では細胞質分裂が不完全であるように見えた。

#### 【0007】

米国特許出願第2005/0120417号明細書および同第2007/0006336号明細書には、セイヨウアブラナ(Brassica napus)由来の2つのIND1オルソログを同定および単離することについて記載されている。

#### 【0008】

国際特許出願公開第WO99/00503号パンフレット、同第WO01/79517号パンフレット、同第WO0159122号パンフレットには、遺伝子サイレンシング技術(アンチセンスサプレッションまたはコサプレッションなど)ならびに突然変異誘発を用いて、シロイヌナズナ属(Arabidopsis) ALC、IND、AGL1およびAGL5遺伝子ならびにこれらのオルソログの発現を下方制御することについて記載されている。

#### 【0009】



Vancanneyt et al., 2002 (XIII International Conference on Arabidopsis Research, Sevilla, Spain June 28 - July 2; 2002)には、アブラナのCaMV 35Sプロモーターの制御下におけるシロイヌナズナ (*A. thaliana*) からのFULの発現によって、多数の耐裂莢性形質転換体を得られたことが報告されていた。このような裂莢耐性系統の莢には裂開ゾーンがなく、相当な圧力を印加することで朔片を無作為に破断させたときにだけ莢を開くことができた。

【0010】

Vancanneyt et al., 2002 (XIII International Conference on Arabidopsis Research, Sevilla, Spain June 28 - July 2; 2002)には、いわゆるdsRNAサイレンシング技術を用いるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) におけるIND遺伝子のサイレンシングによって、ほぼ完全な耐裂莢性を得られることも報告されていた。トランスジェニックシロイヌナズナ属 (*Arabidopsis*) 系統の98パーセントで長角果が発育したが、これは朔片縫線に沿っては開かず、朔片に相当な圧力を印加することによってのみ開くことができた。

【0011】

アブラナの栽培では脱粒が重要な問題となるが、これは耐裂莢性系統を開発することで解決でき、究極的には、莢からの種子の分離が依然として求められる状態を実現することが重要である。通常の農業実務では、これはコンバインハーベスタによる莢の脱穀によって達成されている。コンバインハーベスタによる莢の脱穀は完全でなければならない、これによって放出される種子への損傷が最小限のもでなければならない。しかしながら、莢の強度が増すにつれて、その脱穀に必要なさらに激しい作用によって、種子に許容できないレベルの損傷が生じる。このため、耐裂莢性アブラナ科 (*Brassicaceae*) 植物の莢は、コンバインハーベスタで脱穀できないほど強いものであってはならない (Bruce et al., 2001, J. Agric. Engng Res., 80, 343 ~ 350)。

【0012】

国際特許出願公開第WO2004/113542号パンフレットには、アブラナ科 (*Brassicaceae*) 植物の莢の裂開ゾーンおよび朔片縁辺の発達に關与する遺伝子の適度なdsRNA遺伝子サイレンシングによって、耐裂莢性が高まり脱粒性が低くなったトランスジェニック系統を単離できるが、その莢は限られた物理的な力が加わることで依然として裂開ゾーンに沿って開いてしまうことがある旨が記載されている。

【0013】

国際特許出願公開第WO09/068313号パンフレット (欧州特許出願EP 07023052号の優先権を主張) には、少なくとも2つのIND遺伝子を含み、かつ3つの完全ノックアウト突然変異株INDアレルを自らのゲノムに含むアブラナ属 (*Brassica*) 植物、特にセイヨウアブラナ (*Brassica napus*) 植物であって、当該植物の耐裂莢性が突然変異株INDアレルを含まない植物の耐裂莢性に比して有意に高くなっているが、当該植物が好ましくは莢の農学的に妥当な脱穀性を維持する植物が開示されている。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

異なる実施形態、実施例、特許請求の範囲にて以下に述べる本発明は、裂開種子植物の裂開特性を調節するためのさらに改善された方法および手段を提供するものである。特に、本発明は、アブラナ科 (*Brassicaceae*) 植物、特に種子生成用に生育されるアブラナ科 (*Brassicaceae*) 植物などの植物において脱粒を低減または脱粒を収穫後まで遅らせつつ、同時に莢の農学的に妥当な脱穀性を維持するためのさらに改善された方法および手段について説明するものである。特に、本出願は、少なくとも2つ

10

20

30

40

50

のIND遺伝子を含み、2つの部分ノックアウト突然変異株INDアレルを自らのゲノムに含むか、あるいは2つの部分ノックアウト突然変異株INDアレルおよび2つの完全ノックアウト突然変異株INDアレルを含むアブラナ属(*Brassica*)植物、特にセイヨウアブラナ(*Brassica napus*)植物であって、当該植物の耐裂莢性が突然変異株INDアレルを含まない植物の耐裂莢性に比して有意に高くなっているが、当該植物が好ましくは莢の農学的に妥当な脱穀性を維持する植物を開示するものである。また、収量、特に穀物および種子の収量を高めるための方法および手段も得られる。収量増加表現型が、種子脱粒低減表現型または種子脱粒遅延表現型表現型と切り離されていてもよい。

【課題を解決するための手段】

10

【0015】

本発明者らは、次のことを見出した。3つの完全ノックアウト突然変異株INDアレルを組み合わせるのではなく、2つの部分ノックアウト突然変異株INDアレルを組み合わせる(2つの完全ノックアウト突然変異株INDアレルの有無を問わない)ことで、国際特許出願公開第WO09/068313号パンフレット(欧州特許出願第EP 07023052号の優先権を主張)に記載されたアブラナ属(*Brassica*)植物に似た裂莢表現型を有するセイヨウアブラナ(*Brassica napus*)植物すなわち、耐裂莢性の増大と莢の農学的に妥当な脱穀性との組み合わせを得ることも可能である。

【0016】

よって、第1の態様では、本発明は、自らのゲノムに少なくとも2つの部分ノックアウト突然変異株INDアレルを含むことを特徴とする、少なくとも2つのIND遺伝子を含むアブラナ属(*Brassica*)植物あるいは、その細胞、一部分、種子または後代を提供するものである。一実施形態では、IND遺伝子がIND-A1またはIND-C1遺伝子である。もうひとつの実施形態では、IND遺伝子が、配列番号1、配列番号3の46位のヌクレオチドから633位のヌクレオチドまで、配列番号3、配列番号5または配列番号7に対する配列同一性が少なくとも90%である核酸分子と、配列番号2、配列番号4の16位のアミノ酸から21位のアミノ酸までまたは配列番号4に対する配列同一性が少なくとも90%であるアミノ酸配列をコードする核酸分子と、からなる群から選択される核酸分子を含む。別の実施形態では、部分ノックアウト突然変異株INDアレルがIND-C1遺伝子の突然変異株INDアレルである。さらに別の実施形態では、部分ノックアウト突然変異株INDアレルが、ind-a1-EMS06、ind-a1-EMS09、ind-a1-EMS13、ind-c1-EMS04、ind-c1-EMS08、ind-c1-EMS09からなる群から選択される。さらに別の実施形態では、植物が、自らのゲノムに少なくとも1つの完全ノックアウト突然変異株INDアレルをさらに含む。さらに別の実施形態では、完全ノックアウト突然変異株INDアレルが、IND-C1遺伝子の突然変異株INDアレルである。もうひとつの実施形態では、完全ノックアウト突然変異株INDアレルが、ind-a1-EMS01、ind-a1-EMS05、ind-c1-EMS01、ind-c1-EMS03からなる群から選択される。さらにもうひとつの実施形態では、植物が、部分および/または完全ノックアウト突然変異株INDアレルにとってホモ接合である。さらにもうひとつの実施形態では、植物が、突然変異株INDアレルを含まない対応する植物によって産生される機能的INDタンパク質の量と比較して有意に低減された量の機能的INDタンパク質を産生する。別の実施形態では、植物の脱粒が、突然変異株INDアレルを含まない対応する植物の脱粒と比較して有意に低減または遅延される。なお一層別の実施形態では、植物が、莢の農学的に妥当な脱穀性を維持する。さらにもうひとつの実施形態では、植物が、アブラナ属(*Brassica*)作物種、好ましくはセイヨウアブラナ(*Brassica napus*)、カラシナ(*Brassica juncea*)、アビシニアカラシ(*Brassica carinata*)、カブ(*Brassica rapa*)またはキャベツ(*Brassica oleracea*)由来の植物である。さらにもうひとつの実施形態では、植物が、アブラナ属(*Brassica*)油糧種子種、好ましくはセイヨウアブラナ(*Br*

20

30

40

50

*assica napus*)、カラシナ(*Brassica juncea*)またはカブ(*Brassica rapa*)由来の植物である。

【0017】

もうひとつの態様では、本発明は、IND遺伝子が、配列番号1、配列番号3の46位のヌクレオチドから633位のヌクレオチドまで、配列番号3、配列番号5または配列番号7との配列同一性が少なくとも90%である核酸分子と、配列番号2、配列番号4の16位のアミノ酸から21位のアミノ酸までまたは配列番号4に対する配列同一性が少なくとも90%であるアミノ酸配列をコードする核酸分子と、からなる群から選択される核酸分子を含む、自らのゲノムにIND遺伝子の少なくとも1つの部分ノックアウト突然変異株アレルを含む植物あるいは、その細胞、一部分、種子または後代を提供するものである。一実施形態では、部分ノックアウト突然変異株INDアレルが、*ind-a1-EMS06*、*ind-a1-EMS09*、*ind-a1-EMS13*、*ind-c1-EMS04*、*ind-c1-EMS08*、*ind-c1-EMS09*からなる群から選択される。もうひとつの実施形態では、突然変異株INDアレルが、アブラナ属(*Brassica*)種の植物由来である。さらにもうひとつの実施形態では、植物がアブラナ属(*Brassica*)種由来の植物である。

10

【0018】

別の態様では、本発明の植物から入手可能な種子英が得られる。

【0019】

さらに別の態様では、IND遺伝子が、配列番号1、配列番号3の46位のヌクレオチドから633位のヌクレオチドまで、配列番号3、配列番号5または配列番号7との配列同一性が少なくとも90%である核酸分子と、配列番号2、配列番号4の16位のアミノ酸から21位のアミノ酸までまたは配列番号4に対する配列同一性が少なくとも90%であるアミノ酸配列をコードする核酸分子と、からなる群から選択される核酸分子を含む、IND遺伝子の部分ノックアウト突然変異株アレルが得られる。一実施形態では、突然変異株アレルが、*ind-a1-EMS06*、*ind-a1-EMS09*、*ind-a1-EMS13*、*ind-c1-EMS04*、*ind-c1-EMS08*、*ind-c1-EMS09*からなる群から選択される。もうひとつの実施形態では、突然変異株アレルが、アブラナ属(*Brassica*)種の植物、好ましくはアブラナ属(*Brassica*)作物種またはアブラナ属(*Brassica*)油糧種子種由来である。さらに別の態様では、本発明の突然変異株INDアレルによってコードされる突然変異株INDタンパク質が得られる。

20

30

【0020】

さらに別の態様では、生体試料に存在する核酸における突然変異株IND特異的領域の存在を判断することを含む、生体試料において本発明による突然変異株INDアレルを同定するための方法が得られる。一実施形態では、この方法は、一組の少なくとも2つのプライマーを用いて生体試料でポリメラーゼ連鎖反応アッセイを実施することをさらに含み、前記組が、一組のプライマーであって、前記プライマーの一方が突然変異株INDアレルの5'フランキング領域を特異的に認識し、前記プライマーの他方が突然変異株INDアレルの3'フランキング領域を特異的に認識する、一組のプライマーと、一組のプライマーであって、前記プライマーの一方が突然変異株INDアレルの5'または3'フランキング領域を特異的に認識し、前記プライマーの他方が突然変異株INDアレルの変異領域を特異的に認識する、一組のプライマーと、一組のプライマーであって、前記プライマーの一方が突然変異株INDアレルの5'または3'フランキング領域を特異的に認識し、前記プライマーの他方が突然変異株INDアレルの3'または5'フランキング領域と変異領域との間の連結領域をそれぞれ特異的に認識する、一組のプライマーと、からなる群から選択される。もうひとつの実施形態では、突然変異株INDアレルの5'または3'フランキング領域を特異的に認識するプライマーが、突然変異株INDアレルの5'または3'フランキング配列あるいはそれらの相補体から選択される17~200の連続したヌクレオチドからなるヌクレオチド配列からなるか、突然変異株INDアレルの変異領

40

50

域を特異的に認識するプライマーが、突然変異株 I N D アレルの変異配列あるいはそれらの相補体から選択される 17 ~ 200 の連続したヌクレオチドからなるヌクレオチド配列からなるか、突然変異株 I N D アレルの 5' または 3' フランキング領域と変異領域との間の連結領域を特異的に認識するプライマーが、突然変異株 I N D アレルの 5' または 3' フランキング領域と変異領域との間の連結領域の配列あるいはそれらの相補体から選択される 17 ~ 200 の連続したヌクレオチドからなるヌクレオチド配列からなるものであり、前記 17 ~ 200 の連続したヌクレオチドが、変異配列またはフランキング配列のいずれか一方だけから誘導されるものではない。さらに別の実施形態では、突然変異株 I N D アレルの 5' または 3' フランキング領域を特異的に認識するプライマーが、その 3' 10  
最末端に、突然変異株 I N D アレルの 5' または 3' フランキング配列あるいはそれらの相補体から選択される少なくとも 17 の連続したヌクレオチドからなるヌクレオチド配列を含むか、突然変異株 I N D アレルの変異領域を特異的に認識するプライマーが、その 3' 最末端に、突然変異株 I N D アレルの変異配列あるいはそれらの相補体から選択される少なくとも 17 の連続したヌクレオチドからなるヌクレオチド配列を含むか、突然変異株 I N D アレルの 5' または 3' フランキング領域と変異領域との間の連結領域を特異的に認識するプライマーが、その 3' 最末端に、突然変異株 I N D アレルの 5' または 3' フランキング領域と変異領域との間の連結領域の配列あるいはそれらの相補体から選択される少なくとも 17 の連続したヌクレオチドからなるヌクレオチド配列を含み、前記 3' に位置する 17 の連続したヌクレオチドが、変異配列またはフランキング配列のいずれか一方だけから誘導されるものではない。さらに別の実施形態では、この方法は、少なくとも 20  
1 つの特異的プローブを含む一組の特異的プローブを用いて生体試料でハイブリダイゼーションアッセイを実施することをさらに含み、前記組が、一組の特異的プローブであって、前記プローブの一方が突然変異株 I N D アレルの 5' フランキング領域を特異的に認識し、前記プローブの他方が突然変異株 I N D アレルの 3' フランキング領域を特異的に認識する、一組の特異的プローブと、一組の特異的プローブであって、前記プローブの一方が突然変異株 I N D アレルの 5' または 3' フランキング領域を特異的に認識し、前記プローブの他方が突然変異株 I N D アレルの変異領域を特異的に認識する、一組の特異的プローブと、一組の特異的プローブであって、前記プローブの一方が突然変異株 I N D アレルの 5' または 3' フランキング領域を特異的に認識し、前記プローブの他方が突然変異株 I N D アレルの 3' または 5' フランキング領域と変異領域との間の連結領域を特異的に認識する、一組の特異的プローブと、突然変異株 I N D アレルの 5' または 3' フランキング領域と変異領域との間の連結領域を特異的に認識する特異的プローブと、からなる群から選択される。さらに別の実施形態では、突然変異株 I N D アレルの 5' または 3' フランキング領域を特異的に認識するプローブが、突然変異株 I N D アレルの 5' または 3' フランキング配列あるいはそれらの相補体からそれぞれ選択される 13 ~ 1000 の連続したヌクレオチドからなるヌクレオチド配列あるいは、それとの配列同一性が少なくとも 80 % である配列からなるか、突然変異株 I N D アレルの変異領域を特異的に認識するプローブが、突然変異株 I N D アレルの変異配列あるいはそれらの相補体から選択される 13 ~ 1000 の連続したヌクレオチドからなるヌクレオチド配列あるいは、それとの配列同一性が少なくとも 80 % である配列からなるか、突然変異株 I N D アレルの 5' または 3' フランキング領域と変異領域との間の連結領域を特異的に認識するプローブが、突然変異株 I N D アレルの 5' または 3' フランキング領域と変異領域との間の連結領域の配列あるいはそれらの相補体からそれぞれ選択される 13 ~ 1000 の連続したヌクレオチドからなるヌクレオチド配列からなるものであり、前記 13 ~ 1000 の連続したヌクレオチドが、変異配列またはフランキング配列のいずれか一方、あるいはそれとの配列同一性が少なくとも 80 % である配列だけから誘導されるものではない。特定の実施形態では、突然変異株 I N D アレルの 5' または 3' フランキング領域を特異的に認識するプローブが、突然変異株 I N D アレルの 5' または 3' フランキング配列あるいはそれらそれぞれの相補体から選択される少なくとも 13 の連続したヌクレオチドからなるヌクレオチド配列を含むか、突然変異株 I N D アレルの変異領域を特異的に認識するプローブが、 50

突然変異株 I N D アレルの変異配列あるいはそれらそれぞれの相補体から選択される少なくとも 13 の連続したヌクレオチドからなるヌクレオチド配列を含むか、突然変異株 I N D アレルの 5' または 3' フランキング領域と変異領域との間の連結領域を特異的に認識するプローブが、突然変異株 I N D アレルの 5' または 3' フランキング領域と変異領域との間の連結領域の配列あるいはそれらそれぞれの相補体から選択される少なくとも 13 の連続したヌクレオチドからなるヌクレオチド配列を含み、前記少なくとも 13 の連続したヌクレオチドが、変異配列またはフランキング配列のいずれか一方だけから誘導されるものではない。もうひとつの特定の実施形態では、5' または 3' フランキング領域が、配列番号 5 のヌクレオチド 1 ~ 9 2 9 または 9 3 1 ~ 1 6 2 2 あるいはそれらそれぞれの相補体のヌクレオチド配列を含み、前記変異領域が、配列番号 5 のヌクレオチド 9 3 0 またはその相補体のヌクレオチド配列を有し、前記連結領域が、配列番号 5 のヌクレオチド 1 ~ 9 3 0 または 9 3 0 ~ 1 6 2 2 あるいはそれらそれぞれの相補体のヌクレオチド配列を含むか、5' または 3' フランキング領域が、配列番号 5 のヌクレオチド 1 ~ 9 9 5 または 9 9 7 ~ 1 6 2 2 あるいはそれらそれぞれの相補体のヌクレオチド配列を含み、前記変異領域が、配列番号 5 のヌクレオチド 9 9 6 またはその相補体のヌクレオチド配列を有し、前記連結領域が、配列番号 5 のヌクレオチド 1 ~ 9 9 6 または 9 9 6 ~ 1 6 2 2 あるいはそれらそれぞれの相補体のヌクレオチド配列を含むか、5' または 3' フランキング領域が、配列番号 5 のヌクレオチド 1 ~ 1 0 3 5 または 1 0 3 7 ~ 1 6 2 2 あるいはそれらそれぞれの相補体のヌクレオチド配列を含み、前記変異領域が、配列番号 5 のヌクレオチド 1 0 3 6 またはその相補体のヌクレオチド配列を有し、前記連結領域が、配列番号 5 のヌクレオチド 1 ~ 1 0 3 6 または 1 0 3 6 ~ 1 6 2 2 あるいはそれらそれぞれの相補体のヌクレオチド配列を含むか、5' または 3' フランキング領域が、配列番号 7 のヌクレオチド 1 ~ 9 0 2 または 9 0 4 ~ 1 5 9 3 あるいはそれらそれぞれの相補体のヌクレオチド配列を含み、前記変異領域が、配列番号 7 のヌクレオチド 9 0 3 またはその相補体のヌクレオチド配列を有し、前記連結領域が、配列番号 7 のヌクレオチド 1 ~ 9 0 3 または 9 0 3 ~ 1 5 9 3 あるいはそれらそれぞれの相補体のヌクレオチド配列を含むか、5' または 3' フランキング領域が、配列番号 7 のヌクレオチド 1 ~ 9 1 0 または 9 1 2 ~ 1 5 9 3 あるいはそれらそれぞれの相補体のヌクレオチド配列を含み、前記変異領域が、配列番号 7 のヌクレオチド 9 1 1 またはその相補体のヌクレオチド配列を有し、前記連結領域が、配列番号 7 のヌクレオチド 1 ~ 9 1 1 または 9 1 1 ~ 1 5 9 3 あるいはそれらそれぞれの相補体のヌクレオチド配列を含むか、5' または 3' フランキング領域が、配列番号 7 のヌクレオチド 1 ~ 9 1 9 または 9 2 1 ~ 1 5 9 3 あるいはそれらそれぞれの相補体のヌクレオチド配列を含み、前記変異領域が、配列番号 7 のヌクレオチド 9 2 0 またはその相補体のヌクレオチド配列を有し、前記連結領域が、配列番号 7 のヌクレオチド 1 ~ 9 2 0 または 9 2 0 ~ 1 5 9 3 あるいはそれらそれぞれの相補体のヌクレオチド配列を含む。さらにもうひとつの特定の実施形態では、一組のプローブが、配列番号 11 の配列を含む 1 つのプローブおよび / または配列番号 12 の配列を含む 1 つのプローブを含む一組のプローブと、配列番号 14 の配列を含む 1 つのプローブおよび / または配列番号 15 の配列を含む 1 つのプローブを含む一組のプローブと、配列番号 17 の配列を含む 1 つのプローブおよび / または配列番号 18 の配列を含む 1 つのプローブを含む一組のプローブと、配列番号 20 の配列を含む 1 つのプローブおよび / または配列番号 21 の配列を含む 1 つのプローブを含む一組のプローブと、配列番号 23 の配列を含む 1 つのプローブおよび / または配列番号 24 の配列を含む 1 つのプローブを含む一組のプローブと、配列番号 26 の配列を含む 1 つのプローブおよび / または配列番号 27 の配列を含む 1 つのプローブを含む一組のプローブと、からなる群から選択される。

#### 【0021】

さらに別の態様では、植物あるいは、その細胞、一部分、種子または後代において本発明による突然変異株 I N D アレルの接合状態を判断するための方法であって、前記植物あるいは、その細胞、一部分、種子または後代のゲノム D N A における突然変異株および / または対応する野生型 I N D 特異的領域の存在を判断することを含む、方法が得られる。

10

20

30

40

50

一実施形態では、この方法は、一組の少なくとも2つまたは少なくとも3つのプライマーを用いて前記植物あるいは、その細胞、一部分、種子または後代のゲノムDNAで、ポリメラーゼ連鎖反応アッセイを実施することを含む方法であって、前記プライマーの少なくとも2つが野生型INDアレルを特異的に認識し、前記少なくとも2つのプライマーが、突然変異株および野生型INDアレルの5'または3'フランキング領域をそれぞれ特異的に認識する第1のプライマーと、突然変異株および野生型INDアレルの3'または5'フランキング領域を特異的に認識する第2のプライマーと、突然変異株および野生型INDアレルの5'または3'フランキング領域を特異的に認識する第1のプライマーと、野生型INDアレルの変異領域を特異的に認識する第2のプライマーと、突然変異株および野生型INDアレルの5'または3'フランキング領域を特異的に認識する第1のプライマーと、野生型INDアレルの3'または5'フランキング領域と変異領域との間の連結領域をそれぞれ特異的に認識する第2のプライマーと、からなる群から選択され、前記プライマーの少なくとも2つが、突然変異株INDアレルを特異的に認識し、前記少なくとも2つのプライマーが、突然変異株および野生型INDアレルの5'または3'フランキング領域を特異的に認識する第1のプライマーと、突然変異株および野生型INDアレルの3'または5'フランキング領域をそれぞれ特異的に認識する第2のプライマーと、突然変異株および野生型INDアレルの5'または3'フランキング領域を特異的に認識する第1のプライマーと、突然変異株INDアレルの変異領域を特異的に認識する第3のプライマーと、突然変異株および野生型INDアレルの5'または3'フランキング領域を特異的に認識する第1のプライマーと、突然変異株INDアレルの3'または5'フランキング領域と変異領域との間の連結領域をそれぞれ特異的に認識する第3のプライマーと、からなる群から選択される。別の実施形態では、突然変異株および野生型INDアレルの5'または3'フランキング領域を特異的に認識するプライマーが、突然変異株および野生型INDアレルの5'または3'フランキング配列あるいはそれらそれぞれの相補体から選択される17~200の連続したヌクレオチドからなるヌクレオチド配列からなるか、突然変異株または野生型INDアレルの変異領域を特異的に認識するプライマーが、突然変異株または野生型INDアレルの変異配列あるいはそれらそれぞれの相補体から選択される17~200の連続したヌクレオチドからなるヌクレオチド配列からなるか、突然変異株または野生型INDアレルの5'または3'フランキング領域と変異領域との間の連結領域を特異的に認識するプライマーが、突然変異株または野生型INDアレルの5'または3'フランキング領域と変異領域との間の連結領域の配列あるいはそれらそれぞれの相補体から選択される17~200の連続したヌクレオチドからなるヌクレオチド配列からなり、前記17~200の連続したヌクレオチドが、変異領域またはフランキング配列のいずれか一方だけから誘導されるものではない。さらに別の実施形態では、突然変異株および野生型INDアレルの5'または3'フランキング領域を特異的に認識するプライマーが、その3'最末端に、突然変異株および野生型INDアレルの5'または3'フランキング配列あるいはそれらそれぞれの相補体から選択される17の連続したヌクレオチドからなるヌクレオチド配列を含むか、突然変異株または野生型INDアレルの変異領域を特異的に認識するプライマーが、その3'最末端に、突然変異株または野生型INDアレルの変異配列あるいはそれらそれぞれの相補体から選択される17の連続したヌクレオチドからなるヌクレオチド配列を含むか、突然変異株または野生型INDアレルの5'または3'フランキング領域と変異領域との間の連結領域を特異的に認識するプライマーが、その3'最末端に、突然変異株または野生型INDアレルの5'または3'フランキング領域と変異領域との間の連結領域にある配列あるいはそれらそれぞれの相補体から選択される17の連続したヌクレオチドからなるヌクレオチド配列を含み、前記3'に位置する17の連続したヌクレオチドが、変異部位あるいは変異領域またはフランキング配列のいずれか一方だけから誘導されるものではない。さらに別の実施形態では、この方法は、一組の少なくとも2つの特異的プローブを用いて前記植物あるいは、その細胞、一部分、種子または後代のゲノムDNAでハイブリダイゼーションアッセイを実施することをさらに含み、前記特異的プローブの少なくとも1つが野生型INDアレルを特異的に認

10

20

30

40

50

識し、前記少なくとも1つのプローブが、突然変異株および野生型INDアレルの5'または3'フランキング領域を特異的に認識する第1のプローブと、突然変異株および野生型INDアレルの3'および5'フランキング領域をそれぞれ特異的に認識する第2のプローブと、突然変異株および野生型INDアレルの5'または3'フランキング領域を特異的に認識する第1のプローブと、野生型INDアレルの変異領域を特異的に認識する第2のプローブと、突然変異株および野生型INDアレルの5'または3'フランキング領域を特異的に認識する第1のプローブと、野生型INDアレルの3'または5'フランキング領域と変異領域との間の連結領域をそれぞれ特異的に認識する第2のプローブと、野生型INDアレルの5'または3'フランキング領域と変異領域との間の連結領域を特異的に認識するプローブと、からなる群から選択され、前記特異的プローブの少なくとも1つが、突然変異株INDアレルを特異的に認識し、前記少なくとも1つのプローブが、突然変異株および野生型INDアレルの5'または3'フランキング領域をそれぞれ特異的に認識する第1のプローブと、突然変異株および野生型INDアレルの3'または5'フランキング領域を特異的に認識する第2のプローブと、突然変異株および野生型INDアレルの5'または3'フランキング領域を特異的に認識する第1のプローブと、突然変異株INDアレルの変異領域を特異的に認識する第3のプローブと、突然変異株および野生型INDアレルの5'または3'フランキング領域を特異的に認識する第1のプローブと、突然変異株INDアレルの5'または3'フランキング領域と変異領域との間の連結領域を特異的に認識する第3のプローブと、突然変異株INDアレルの5'または3'フランキング領域と変異領域との間の連結領域を特異的に認識するプローブと、からなる群から選択される。特定の実施形態では、突然変異株および野生型INDアレルの5'または3'フランキング領域を特異的に認識するプローブが、突然変異株または野生型INDアレルの5'または3'フランキング配列あるいはそれらそれぞれの相補体あるいは、それとの配列同一性が少なくとも80%である配列から選択される13~1000の連続したヌクレオチドからなるヌクレオチド配列からなるか、突然変異株または野生型INDアレルの変異領域を特異的に認識するプローブが、突然変異株または野生型INDアレルの変異領域の配列それぞれ、あるいは、それとの配列同一性が少なくとも80%である配列から選択される13~1000の連続したヌクレオチドからなるヌクレオチド配列からなるか、突然変異株または野生型INDアレルの5'または3'フランキング領域と変異領域との間の連結領域を特異的に認識するプローブが、突然変異株または野生型INDアレルの5'または3'フランキング領域と変異領域との間の連結領域の配列それぞれ、あるいは、それとの配列同一性が少なくとも80%である配列から選択される13~1000の連続したヌクレオチドからなるヌクレオチド配列からなり、前記13~1000の連続したヌクレオチドが、変異部位あるいは変異領域またはフランキング配列のいずれか一方だけから誘導されるものではない。もうひとつの特定の実施形態では、突然変異株および野生型INDアレルの5'または3'フランキング領域を特異的に認識するプローブが、突然変異株または野生型INDアレルの5'または3'フランキング配列あるいはそれらそれぞれの相補体から選択される少なくとも13の連続したヌクレオチドからなるヌクレオチド配列を含むか、突然変異株または野生型INDアレルの変異領域を特異的に認識するプローブが、突然変異株または野生型INDアレルの変異配列あるいはそれらの相補体から選択される少なくとも13の連続したヌクレオチドからなるヌクレオチド配列を含むか、突然変異株または野生型INDアレルの5'または3'フランキング領域と変異領域との間の連結領域を特異的に認識するプローブが、突然変異株または野生型INDアレルの5'または3'フランキング領域と変異領域との間の連結領域の配列あるいはそれらそれぞれの相補体から選択される少なくとも13の連続したヌクレオチドからなるヌクレオチド配列を含み、前記少なくとも13の連続したヌクレオチドが、変異配列またはフランキング配列のいずれか一方だけから誘導されるものではない。別の特定の実施形態では、5'または3'フランキング領域が、配列番号5のヌクレオチド1~929または931~1622あるいはそれらそれぞれの相補体のヌクレオチド配列を有し、野生型INDアレルの前記変異領域が配列番号5のヌクレオチド930またはその相補体のヌクレオチド配

10

20

30

40

50

列を含み、突然変異株 I N D アレルの前記変異領域が、配列 a またはその相補体を有し、野生型 I N D アレルの前記連結領域が、配列番号 5 のヌクレオチド 1 ~ 9 3 0 または 9 3 0 ~ 1 6 2 2 あるいはそれらそれぞれの相補体のヌクレオチド配列を含み、突然変異株 I N D アレルの前記連結領域が、配列番号 5 のヌクレオチド 1 ~ 9 2 9 に a が続くヌクレオチド配列または a に配列番号 5 のヌクレオチド 9 3 1 ~ 1 6 2 2 が続くヌクレオチド配列あるいはそれらそれぞれの相補体を含むか、5' または 3' フランキング領域が、配列番号 5 のヌクレオチド 1 ~ 9 9 5 または 9 9 7 ~ 1 6 2 2 あるいはそれらそれぞれの相補体のヌクレオチド配列を含み、野生型 I N D アレルの前記変異領域が、配列番号 5 のヌクレオチド 9 9 6 またはその相補体のヌクレオチド配列を有し、突然変異株 I N D アレルの前記変異領域が、配列 a またはその相補体を有し、野生型 I N D アレルの前記連結領域が、配列番号 5 のヌクレオチド 1 ~ 9 9 6 または 9 9 6 ~ 1 6 2 2 あるいはそれらそれぞれの相補体のヌクレオチド配列を含み、突然変異株 I N D アレルの前記連結領域が、配列番号 5 のヌクレオチド 1 ~ 9 9 5 に a が続くヌクレオチド配列または a に配列番号 5 のヌクレオチド 9 9 7 ~ 1 6 2 2 が続くヌクレオチド配列あるいはそれらそれぞれの相補体を含むか、5' または 3' フランキング領域が、配列番号 5 のヌクレオチド 1 ~ 1 0 3 5 または 1 0 3 7 ~ 1 6 2 2 あるいはそれらそれぞれの相補体のヌクレオチド配列を含み、野生型 I N D アレルの前記変異領域が配列番号 5 のヌクレオチド 1 0 3 6 またはその相補体のヌクレオチド配列を有し、突然変異株 I N D アレルの前記変異領域が配列 t またはその相補体を有し、野生型 I N D アレルの前記連結領域が、配列番号 5 のヌクレオチド 1 ~ 1 0 3 6 または 1 0 3 6 ~ 1 6 2 2 あるいはそれらそれぞれの相補体のヌクレオチド配列を含み、突然変異株 I N D アレルの前記連結領域が、配列番号 5 のヌクレオチド 1 ~ 1 0 3 5 に t が続くヌクレオチド配列または t に配列番号 5 のヌクレオチド 1 0 3 7 ~ 1 6 2 2 が続くヌクレオチド配列あるいはそれらそれぞれの相補体を含むか、5' または 3' フランキング領域が、配列番号 7 のヌクレオチド 1 ~ 9 0 2 または 9 0 4 ~ 1 5 9 3 あるいはそれら

それぞれの相補体のヌクレオチド配列を含み、野生型 I N D アレルの前記変異領域が、配列番号 7 のヌクレオチド 9 0 3 またはその相補体のヌクレオチド配列を有し、突然変異株 I N D アレルの前記変異領域が、配列 t またはその相補体を有し、野生型 I N D アレルの前記連結領域が、配列番号 7 のヌクレオチド 1 ~ 9 0 3 または 9 0 3 ~ 1 5 9 3 のヌクレオチド配列あるいはそれらそれぞれの相補体を含み、突然変異株 I N D アレルの前記連結領域が、配列番号 7 のヌクレオチド 1 ~ 9 0 2 に t が続くヌクレオチド配列または t に配列番号 7 のヌクレオチド 9 0 4 ~ 1 5 9 3 が続くヌクレオチド配列あるいはそれらそれぞれの相補体を含むか、5' または 3' フランキング領域が、配列番号 7 のヌクレオチド 1 ~ 9 1 0 または 9 1 2 ~ 1 5 9 3 あるいはそれらそれぞれの相補体のヌクレオチド配列を含み、野生型 I N D アレルの前記変異領域が、配列番号 7 のヌクレオチド 9 1 1 またはその相補体のヌクレオチド配列を有し、突然変異株 I N D アレルの前記変異領域が、配列 a またはその相補体を有し、野生型 I N D アレルの前記連結領域が、配列番号 7 のヌクレオチド 1 ~ 9 1 1 または 9 1 1 ~ 1 5 9 3 のヌクレオチド配列あるいはそれらそれぞれの相補体を含み、突然変異株 I N D アレルの前記連結領域が配列番号 7 のヌクレオチド 1 ~ 9 1 0 に a が続くヌクレオチド配列または a に配列番号 7 のヌクレオチド 9 1 2 ~ 1 5 9 3 が続くヌクレオチド配列あるいはそれらそれぞれの相補体を含むか、5' または 3' フランキング領域が、配列番号 7 のヌクレオチド 1 ~ 9 1 9 または 9 2 1 ~ 1 5 9 3 あるいはそれらそれぞれの相補体のヌクレオチド配列を含み、野生型 I N D アレルの前記変異領域が配列番号 7 のヌクレオチド 9 2 0 またはその相補体のヌクレオチド配列を有し、突然変異株 I N D アレルの前記変異領域が配列 t またはその相補体を有し、野生型 I N D アレルの前記連結領域が、配列番号 7 のヌクレオチド 1 ~ 9 2 0 または 9 2 0 ~ 1 5 9 3 のヌクレオチド配列あるいはそれらそれぞれの相補体を含み、突然変異株 I N D アレルの前記連結領域が、配列番号 7 のヌクレオチド 1 ~ 9 1 9 に t が続くヌクレオチド配列または t に配列番号 7 のヌクレオチド 9 2 1 ~ 1 5 9 3 が続くヌクレオチド配列あるいはそれらそれ



ぞれの相補体を含む。特定の実施形態では、少なくとも3つの特異的プローブの前記組が、配列番号11の配列を含む1つのプローブ、配列番号12の配列を含む1つのプローブおよび/または配列番号13の配列を含む1つのプローブを含む一組のプローブと、配列番号14の配列を含む1つのプローブ、配列番号15の配列を含む1つのプローブおよび/または配列番号16の配列を含む1つのプローブを含む一組のプローブと、配列番号17の配列を含む1つのプローブ、配列番号18の配列を含む1つのプローブおよび/または配列番号19の配列を含む1つのプローブを含む一組のプローブと、配列番号20の配列を含む1つのプローブ、配列番号21の配列を含む1つのプローブおよび/または配列番号22の配列を含む1つのプローブを含む一組のプローブと、配列番号23の配列を含む1つのプローブ、配列番号24の配列を含む1つのプローブおよび/または配列番号25の配列を含む1つのプローブを含む一組のプローブと、配列番号26の配列を含む1つのプローブ、配列番号27の配列を含む1つのプローブおよび/または配列番号28の配列を含む1つのプローブを含む一組のプローブと、からなる群から選択される。

10

#### 【0022】

生体試料において本発明による突然変異株INDアレルを同定するためのキットであって、上述したようなプライマーまたはプローブを含む植物あるいは、その細胞、一部分、種子または後代において本発明による突然変異株INDアレルの接合状態を判断するためのキットも得られ、さらに本発明による突然変異株INDアレルを1つの植物で組み合わせるための方法、本発明による突然変異株INDアレルを1つの植物から別の植物に移行させるための方法、本発明による植物または種子を生成(ハイブリダイズ)する方法も得られる。

20

#### 【0023】

本発明のもうひとつの実施形態では、本発明の突然変異株INDアレルは、アブラナ属(Brassica)植物の収穫される種子または穀物の収量を高めるために用いられる。収量が増すのは、脱粒が低減または遅延した結果かもしれないが、種子の脱粒の低減または遅延とは独立している可能性もある。特に、これらの植物が、本明細書に記載したような2つの突然変異株ホモ接合INDアレルを自らのゲノムに含むことを特徴とする、少なくとも2つのIND遺伝子を含むアブラナ属(Brassica)植物あるいは、その細胞、一部分、種子または後代が得られる。

#### 【0024】

30

#### 一般的定義

「耐裂莢性を高める」および「脱粒の低減」とは、本明細書で使用する場合、果実が通常は同時期に成熟せず順次成熟するため、収穫前や収穫時にいくつかの莢が開いて種子を脱粒するアブラナ属(Brassica)植物の種子脱粒傾向を低下させること、および/または脱粒タイミングを特に収穫後まで遅延させることを示す。裂莢に対する耐性レベルは、「引張分離試験」で莢を破るのに必要な力(Davies and Bruce, 1997, J Mat Sci 32: 5895~5899; Morgan et al., 1998, Fields Crop Research 58, 153-165)、「不規則衝撃加振試験」で20秒間経過した後に無傷の莢の数(「IP20」; Morgan et al., 1998, 上掲)、9.7秒間または17秒間など経過した後に無傷の莢の数(Bruce et al., 2002, Biosystems Eng 81(2): 179-184)、不規則衝撃加振試験での莢試料半減期(以下、「LD50」とも呼ぶ)すなわち被験莢試料で50%の莢を開かせるのに必要な処理時間、「シャッターリングの圃場スコア」(Morgan et al., 1998, 上掲)を判断することなどで測定可能であり、これらと陽性相関している。不規則衝撃加振試験(RIT)および当該RITで莢試料の半減期を規定するためのアルゴリズムについては、Bruce et al., 2002(上掲)、Morgan et al., 1998(上掲)ならびに以下の実施例に記載されている。これらの刊行物を両方とも参照により本明細書に援用する。簡単に説明すると、無傷の成熟莢の試料を鋼球と一緒に閉じたドラムに入れ、ドラムを時間をのばしながら(10秒間、20秒

40

50

間、40秒間、80秒間など)強く振盪攪拌する。それぞれの時間経過後、ドラムを開いて破れたり損傷を受けたりした莢を数える。線形×線形曲線を得られたすべてのデータにフィットさせ、試料内の莢の半分が破れるまでの時間(「莢試料半減期」または「LD50」)を推定することで、各系統のシャッタリング耐性レベルの最も正確な推定値を計算する。しかしながら、莢は主に裂開ゾーンに沿って開くため、非裂開莢で生じるような単純に粉碎された状態になるわけではない点は重要である。

#### 【0025】

「農学的に妥当な耐裂莢性の増大」とは、本明細書で使用する場合、裂莢に伴う収量の損失が、圃場でその植物に通常観察されるよりも低い結果となる、圃場(収穫前)の植物での耐裂莢性の増大を示す。アブラナでは、圃場での裂莢に伴う収量の損失は、成長条件が良好な時期で平均約11%、成長条件の悪い時期には平均で約25%であると報告されている。Bruce et al., 2002 (Biosystems Eng 81(2): 179~184)に記載されているような不規則衝撃加振試験では、これらの種子損失レベルと、9.7秒間および17秒間の処置した時点での種子損失レベルとの間には、それぞれ陽性相関が認められる。あるいは、植物での裂莢に対する耐性レベルが農学的に妥当か否かを判断するために、植物の莢試料半減期(「LD50」、上記参照)を、アブラナであれば、現在市販されているすべてのアブラナ変種など、耐裂莢性が平均レベルであることがわかっている植物の莢試料半減期と比較することが可能である。

#### 【0026】

本明細書で使用する場合、「裂莢または脱粒」または「果実または莢の裂開」とは、種子が成熟した後に果実で生じるプロセスを示し、それによって朔片が中央の隔壁から離れて種子を蒔くことになる。破れる領域(すなわち「裂開ゾーン」)は朔片と隔膜(外側の隔壁)の間で果実の長さ全体におよぶ。成熟時、「裂開ゾーン」は本質的に朔片の木化細胞の領域と隔膜との間の非木化層の細胞である。裂開ゾーンでの細胞壁のゆるみと、長角果の乾燥しつつある細胞の機械的特性の差がゆえに生じる張力とがあいまって、シャッタリングが生じる。

#### 【0027】

アブラナ属(Brassica)の「果実」とは、本明細書で使用する場合、融合心皮からなる雌しべから発達するアブラナ属(Brassica)植物の器官を示し、受精時に成長して発達する種子の入った「(種子)莢」または「長角果」になる。アブラナ属(Brassica)の「(種子)莢」または「長角果」は、隔壁によって隔てられた2つの子房室を囲む果皮(心皮)からなる。「裂開ゾーン」は、隔壁に隣接した心皮縁辺で発達し、長角果の長さ全体におよぶ。裂開ゾーンの細胞は最終的に劣化しはじめ、それによって心皮壁または朔片と隔壁との密着が弱くなる。細胞の接着性が失われるのは裂開ゾーンの細胞にかぎられており、中ほどのラメラが破壊される(Meakin and Roberts, 1990, J Exp Bot 41, 995~1011)。

#### 【0028】

「裂開ゾーン」とは、本明細書で使用する場合、二朔片莢植物、特にアブラナ属(Brassica)植物の両側にある縫線に含まれる単純な、柔組織細胞の層を示す。裂開ゾーンは、莢朔片の縁と、柄または小花柄への主な維管束を含む中央の隔膜との間にある。裂開ゾーンでの細胞の解離は莢の老化時に発生し、莢が完全に成熟するまでに終わる(Meakin and Roberts, 1990, 上掲)。その後、朔片を分離できるようになる。裂開ゾーンには莢壁から小花柄(柄)および隔膜まで走っている維管束の跡がある。朔片を分離させて種子を地面に落とせるように、裂莢のプロセスは外からの力によってデリケートな維管束の筋を破壊した後にしか起こらない。これは、収穫時にコンバインと接触するなどしてキャノピーが乱れたときに生じる。維管束組織には、厚くて木化した細胞が含まれており、これが誘導組織細胞に隣接して見られる細胞の厚角細胞群を形成する(Meakin and Roberts, 1990, 上掲)。これによって組織に捩り剛性が生まれ、おそらくは、破損に対するいくらかの耐性も生じる。

#### 【0029】

本明細書で使用する場合、「農学的に妥当な脱穀性」とは、コンバインハーベスタで用いられているような、種子への損傷は防ぎつつ莢を完全に開けるほどの物理的な力が加わると、莢が裂開ゾーンに沿って開いて種子が放出されてしまうことに対する莢、特にアブラナ莢の耐性を示す。不規則衝撃加振試験における莢試料の半減期（「LD50」）とその脱穀性との間には陽性相関が認められた。農学的に妥当な脱穀性に対応するアブラナ莢試料の半減期は、実施例で説明するようにして実施したRITで判断した場合に80秒を超えないようにする。市販のアブラナ変種での対照系統の一般的な試料半減期の値は約10秒である。よって、農学的に妥当な脱穀性を持ち、耐裂莢性が有意に高められた系統は、RITでの莢試料半減期が約10～約80秒、約10～約70秒、約15～約70秒、約10～約60秒、約10～約50秒、約20～約60秒、約20～約50秒、約40～約60秒、約57秒となる。

10

#### 【0030】

「裂開種子植物」は、開いて中にある種子を放出できる果皮を持つ乾燥裂開果をつける植物を意味する。裂開果には通常、複数個の種子が入っており、マメ科植物、朔果、長角果などとして知られる果実を含む。

#### 【0031】

「作物植物」とは、セイヨウアブラナ (*Brassica napus*) (AAC C、 $2n=38$ )、カラシナ (*Brassica juncea*) (AAB B、 $2n=36$ )、アビシニアカラシ (*Brassica carinata*) (BB C C、 $2n=34$ )、カブ (*Brassica rapa*) (syn. タアサイ (*B. campestris*)) (AA、 $2n=20$ )、キャベツ (*Brassica oleracea*) (CC、 $2n=18$ ) またはクロガラシ (*Brassica nigra*) (BB、 $2n=16$ ) などの作物として栽培される植物種を示す。この定義には、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) などの雑草は含まない。

20

#### 【0032】

「核酸配列」(または核酸分子)という用語は、一本鎖または二本鎖形態のDNAまたはRNA分子、特に本発明によるタンパク質またはタンパク質断片をコードするDNAを示す。「内在性核酸配列」とは、アブラナ属 (*Brassica*) 細胞の核ゲノム内に存在するIND遺伝子の内在性アレルなど植物細胞内の核酸配列を示す。「単離された核酸配列」は、たとえば *in vitro* または組換え細菌または植物宿主細胞などの天然の環境にはない核酸配列を示すのに用いられる。

30

#### 【0033】

「遺伝子」という用語は、調節領域(プロモーターなど)と作動的に連結された細胞のRNA分子に(イントロン配列を含む *pre-mRNA* (後でスプライスして成熟 *mRNA* にする)あるいは、イントロン配列なしで直接 *mRNA* に)に転写される領域(転写領域)を含むDNA配列を意味する。遺伝子は、プロモーター、翻訳開始に関与する配列などを含む5'リーダー配列、(タンパク質)コード領域(*cDNA*またはゲノムDNA)、転写終端部位などを含む3'非翻訳配列など、いくつかの作動的に結合された配列を含むものであってもよい。「内在性遺伝子」は、「外来遺伝子」、「導入遺伝子」または「キメラ遺伝子」と区別するために用いられ、特定の植物属、種または変種の植物由来の(変換でその植物に導入されていない(すなわち「導入遺伝子」されていない))が、通常はその属、種または変種の植物に存在するか、あるいは、通常はそれが存在する別の植物属、種または変種の植物から、通常の育種技術または超音波ハイブリダイゼーション、たとえばプロトプラスト融合などによってその植物に導入された遺伝子を示す。同様に、遺伝子の「内在性アレル」は、植物変換によっては植物または植物組織に導入されていないが、たとえば、植物の突然変異誘発および/または選択によって生成または植物の天然個体群をスクリーニングして得られる。

40

#### 【0034】

「遺伝子の発現」または「遺伝子発現」とは、適切な調節領域、特にプロモーターに対して作動的に結合されたDNA領域を、RNA分子に転写するプロセスを示す。次に、R

50

RNA スプライシングや翻訳開始およびアミノ酸鎖（タンパク質）への翻訳、翻訳停止コードンによる翻訳終端などで、RNA 分子が細胞内でさらに処理される（転写後プロセスによる）。「機能的に発現」という表現は、本明細書で使用する場合、機能的タンパク質を産生させることを示す；「機能的に発現させない」という表現は、機能性（生物活性）が有意に低減したかまったくないタンパク質を産生するか、タンパク質が産生されない（下記をさらに参照のこと）ことを示す。

#### 【0035】

「タンパク質」という用語は、特定の作用機構、サイズ、3次元構造または起源に言及することなく、アミノ酸の鎖からなる分子を示す。よって、IND タンパク質の「断片」または「一部」も、「タンパク質」と呼ぶことができる。「単離されたタンパク質」とは、その天然の環境にはない、たとえば *in vitro* または組換え細菌または植物宿主細胞にあるタンパク質を示す意図で用いる。「アミノ酸」は、タンパク質および酵素の主要なビルディングブロックである。アミノ酸はトランスファー RNA によって遺伝コードどおりにタンパク質に取り込まれるが、メッセンジャー RNA はリボソームによってデコードされる。タンパク質の最終アセンブリの途中と終了後には、アミノ酸含有量がタンパク質または酵素の空間的および生化学的特性を示す。アミノ酸骨格がタンパク質の一次配列を決めるが、タンパク質の特性は側鎖の性質によって決まる。「類似のアミノ酸」とは、本明細書で使用する場合、類似のアミノ酸側鎖を有するアミノ酸、すなわち、極性、非極性または実用上は中性の側鎖を有するアミノ酸を示す。「非類似のアミノ酸」とは、本明細書で使用する場合、たとえば、非極性側鎖を有するアミノ酸とは極性側鎖が似ていないアミノ酸など、異なるアミノ酸側鎖を有するアミノ酸を示す。極性側鎖は通常、細胞にみられる水性環境との間で相互作用できるタンパク質の表面に存在することが多い（「親水性」アミノ酸）。他方、「非極性」アミノ酸は、類似の非極性隣接物質と相互作用できるタンパク質内の中心付近にあることが多い（「疎水性」アミノ酸）。極性側鎖を有するアミノ酸の例としては、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸塩、システイン、グルタミン、グルタミン酸塩、ヒスチジン、リシン、セリン、トレオニン（疎水性であるシステイン以外はいずれも親水性）があげられる。非極性側鎖を有するアミノ酸の例としては、アラニン、グリシン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、トリプトファン（中性のグリシン以外はいずれも疎水性）があげられる。

#### 【0036】

「転写因子」という用語は、一緒に作用して標的遺伝子プロモーターからの転写開始速度を調節する少なくとも2つの離散的なドメインすなわち、DNA 結合ドメインと活性化または抑制ドメインとからなるタンパク質を示す意図で用いられる（Ptashne, 1988, Nature 335, 683~689）。「塩基性ヘリックスループヘリックス（bHLH）ドメイン転写因子」という表現は、bHLH DNA 結合ドメイン（Heim et al., 2003, Mol Biol Evol 20, 735~747; Toledo-Ortiz et al., 2003, Plant Cell 15, 1749~1770）すなわち、異なる種由来の関連のタンパク質においてアミノ酸レベルで保存できる遺伝子発現の調節に重要であることが知られているドメイン（Quong et al., 1993, Mol Cell Biol 13, 792~800）を含み、これとは別の転写因子を示す意図で用いられる。bHLH ドメインを含む転写調節因子は、塩基性領域の残基によってDNAと結合するのに対し、ヘリックスループヘリックスドメインは二量体化を促進し、ファミリーのメンバがヘテロ二量体またはホモ二量体を形成できるようにする（Murre et al., 1989, Cell 56, 777~783）。

#### 【0037】

「IND 遺伝子」という用語は、本明細書では、種子の分散に必要な塩基性ヘリックスループヘリックス（bHLH）ドメイン転写因子である、INDEHISCENT（IND）タンパク質をコードする核酸配列を示す（Liljegren et al., 2004, Cell 116: 843~853）。

## 【0038】

本明細書で使用する場合、単数または複数の「アレル」という用語は、特定の遺伝子座における1つ以上の別の形態の遺伝子のいずれかを意味する。生物体の二倍体（または複二倍体）細胞において、特定遺伝子のアレルは染色体上の特定の場所または遺伝子座（locus）（複数形は遺伝子座（loci））に存在する。一对の相同的な染色体の各染色体に1つのアレルが存在する。

## 【0039】

本明細書で使用する場合、「相同的な染色体」という用語は、同一の生物学的特徴についての情報を含み、同一の遺伝子座に同一の遺伝子を含むが、おそらくはこれらの遺伝子のアレルが異なる染色体を意味する。相同的な染色体は、減数分裂時に対合する染色体である。生物体のすべての生物学的特徴を表す「非相同的な染色体」は組を形成し、細胞内の組の数が倍数性と呼ばれる。二倍体の生物体は、2組の非相同的な染色体を持ち、各々の相同的な染色体が異なる親から継承される。複二倍体の種では、本質的に2組の二倍体ゲノムが存在し、2つのゲノムの染色体が「相同染色体」と呼ばれる（また、同様に、2つのゲノムの遺伝子座または遺伝子も相同遺伝子座または遺伝子と呼ばれる）。二倍体または複二倍体の植物種は、特定の遺伝子座に多数の異なるアレルを含むことがある。

## 【0040】

本明細書で使用する場合、「ヘテロ接合」という用語は、2つの異なるアレルが特定の遺伝子座にあるが、細胞における相同的な染色体の対応する対で個々に位置する遺伝子状態を意味する。逆に、本明細書で使用する場合、「ホモ接合」という用語は、2つの同じアレルが特定の遺伝子座にあるが、細胞における相同的な染色体の対応する対で個々に位置する遺伝子状態を意味する。

## 【0041】

本明細書で使用する場合、「遺伝子座」という用語（複数形はloci）は、たとえば遺伝子または遺伝子マーカーが見つかる染色体上の特定の場所または部位を意味する。たとえば、「IND-A1遺伝子座」は、Aゲノムの染色体上でIND-A1遺伝子（および2つのIND-A1アレル）を見つけられる位置を示し、「IND-C1遺伝子座」はCゲノムの染色体上でIND-C1遺伝子（および2つのIND-C1アレル）を見つけられる位置を示す。

## 【0042】

本発明による単数または複数の「植物」について言及する場合は常に、特に明記しないかぎり、植物の一部（細胞、組織または器官、種子莢、種子、根や葉、花、花粉といった分離された部分など）、ハイブリッド種子（2つの近交親系統を交雑させて得られる）、ハイブリッド植物および植物の一部といった自家受粉または交雑によって得られた種子などの親が持っていた区別できる特徴（特に果実裂開特性）が残っている植物の後代、これらに由来するものなども本明細書に包含されることは理解できよう。

## 【0043】

「分子アッセイ」（または試験）とは、本明細書では、一方または両方のIND遺伝子座（IND-A1またはIND-C1遺伝子座の一方または両方など）で1つ以上の特定のINDアレルの存在または非存在を（直接的にまたは間接的に）示すアッセイを示す。一実施形態では、これによって、個々の植物のいずれにおいても遺伝子座で特定の（野生型または突然変異株）INDアレルがホモ接合であるかヘテロ接合であるかを判断できるようになる。

## 【0044】

「野生型（wild type）」（「野生型（wild type）」または「野生型（wild-type）」とも表記される）とは、本明細書で使用する場合、天然に最も一般的に生じる植物または遺伝子の典型的な形態を示す。「野生型植物」とは、天然の個体群において当該植物の最も一般的な表現型を有する植物を示す。「野生型アレル」とは、野生型の表現型を産生するのに必要な遺伝子のアレルを示す。反対に、「突然変異株植物」とは、天然の個体群においてこのような植物の希な表現型が異なる植物あるいは、突

10

20

30

40

50

然変異誘発などによって人間が介入して創り出された植物を示し、「突然変異株アレル」は、突然変異株の表現型を生成するのに必要な遺伝子のアレルを示す。

【 0 0 4 5 】

本明細書で使用する場合、「野生型 I N D」という用語（野生型 I N D - A 1 または I N D - C 1 など）は、機能的 I N D タンパク質（それぞれ機能的 I N D - A 1 または I N D - C 1 など）をコードする植物、特にアブラナ科（ B r a s s i c a c e a e ）植物、特にアブラナ属（ B r a s s i c a ）植物に見られる天然に発生する I N D アレルを意味する。対照的に、「突然変異株 I N D」という用語（突然変異株 I N D - A 1 または I N D - C 1 など）は、本明細書で使用する場合、機能的 I N D タンパク質をコードしない I N D アレル、すなわち非機能的 I N D タンパク質（非機能的 I N D - A 1 または I N D - C 1、それぞれなど）（本明細書で使用する場合、対応する野生型の機能的 I N D タンパク質と比較して生物活性がないか生物活性が有意に低減された I N D タンパク質である）をコードするか、I N D タンパク質をまったくコードしない I N D アレルを示す。「完全ノックアウト」または「ヌル」突然変異株 I N D アレルは、本明細書で使用する場合、突然変異株 I N D アレルを示し、対応する野生型の機能的 I N D タンパク質と比較して生物活性のない I N D タンパク質をコードするか、タンパク質をまったくコードしない。このような「完全ノックアウト突然変異株 I N D アレル」は、たとえば、野生型 I N D アレルであり、1 つ以上のナンセンスまたはミスセンス変異などの 1 つ以上の変異を核酸配列に含む。特に、このような完全ノックアウト突然変異株 I N D アレルは野生型 I N D アレルであり、I N D タンパク質の生物活性が完全に除外されるか、あるいはそれによって変異が好ましくは I N D タンパク質を生成しないように、活性化ドメイン、DNA 結合ドメインおよび / または二量体化ドメインなどの少なくとも 1 つの機能ドメインを欠いているか、配列番号 2 の 1 2 7 位または配列番号 4 の 1 4 0 位のアルギニンあるいは配列番号 2 の 1 2 2 位または配列番号 4 の 1 3 5 位のグルタミンなどの DNA 結合に不可欠なアミノ酸など、その機能にとって不可欠な少なくとも 1 つのアミノ酸を欠いている I N D タンパク質の生成につながる変異を含むと好ましい。「部分ノックアウト」突然変異株 I N D アレルは、本明細書で使用する場合、突然変異株 I N D アレルを示し、対応する野生型の機能的 I N D タンパク質と比較して生物活性が有意に低減された I N D タンパク質をコードする。このような「部分ノックアウト突然変異株 I N D アレル」は、たとえば、1 つ以上のミスセンス変異などの 1 つ以上の変異を自らの核酸配列に含む野生型 I N D アレルである。特に、このような部分ノックアウト突然変異株 I N D アレルは、I N D タンパク質の生成につながると好ましい変異を含む野生型 I N D アレルであり、生物活性が有意に低減されるが完全にはなくならないように少なくとも 1 つの保存されたおよび / または機能的なアミノ酸が別のアミノ酸で置換される。このような完全または部分ノックアウト突然変異株 I N D アレルは、顕性不活性の I N D タンパク質もコードする。これは、同一細胞内の他の I N D タンパク質の生物活性に悪影響をおよぼし得る。このような顕性不活性の I N D タンパク質は、野生型 I N D タンパク質と同一の要素と相互作用できるが、その機能のいくつかの側面をブロックする I N D タンパク質であってもよい。顕性不活性 I N D タンパク質の例として、DNA 結合部位の細胞に存在する野生型および / または部分ノックアウト I N D タンパク質と競合することで、自らの生物活性を低減あるいは排除するだけでなく細胞全体での I N D 活性も落とすような形で、活性化ドメインおよび / または二量体化ドメインあるいは、活性化および / または二量体化に不可欠な特定のアミノ酸残基を欠いているが、依然として DNA 結合ドメインを含む I N D タンパク質があげられる。顕性不活性 I N D タンパク質の他の例として、少なくとも 1 つの機能ドメインを欠いたタンパク質二量体を生成することで、自らの生物活性を低減あるいは排除するだけでなく細胞全体での I N D 活性も落とすような形で、活性化ドメインおよび / または DNA 結合ドメインあるいは、活性化および / または DNA 結合に不可欠な特定のアミノ酸残基を欠いているが、依然として二量体化ドメインは含む I N D タンパク質があげられる。I N D タンパク質コード核酸配列の突然変異株アレルを本明細書では「i n d」と表記（それぞれ i n d - a 1 または i n d - c 1 など）する。突然変異株アレルは、天然に見られる（人間が

10

20

30

40

50

変異原を加えなくても自然発生的に生成される)突然変異株アレルである「天然の突然変異株」アレルであってもよいし、突然変異誘発などの人間の介入によって生成される「誘導された突然変異株」アレルであってもよい。

#### 【0046】

「有意に低減された量の機能的INDタンパク質」(機能的IND-A1またはIND-C1タンパク質など)は、突然変異株INDアレルを含む細胞によって産生される機能的INDタンパク質の量が、突然変異株INDアレルを含まない細胞によって生成される機能的INDタンパク質の量と比較して、少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%または100%低減される(すなわち、細胞によって機能的INDタンパク質が産生されない)ことを示す。この定義には、*in vivo*での生物活性を持たない「非機能的」INDタンパク質(切断されたINDタンパク質など)の生成、機能的INDタンパク質の絶対量の低減(IND遺伝子の変異がゆえに機能的INDタンパク質が作られないなど)、機能的な野生型INDタンパク質の活性と比較して、生物活性が有意に低減されたINDタンパク質の生成(下記にて例示するようにコードされたINDタンパク質の生物活性に不可欠な1つ以上のアミノ酸残基が、別のアミノ酸残基で置換されたINDタンパク質など)および/または他の機能的および/または部分的に機能的なINDタンパク質への顕性不活性INDタンパク質の悪影響も包含する。

#### 【0047】

「突然変異株INDタンパク質」という用語は、本明細書で使用する場合、突然変異株IND核酸配列(「indアレル」)によってコードされるINDタンパク質を示し、この変異の結果、非突然変異株の野生型IND配列(「INDアレル」)でコードされるINDタンパク質の活性と比較して、*in vivo*でのIND活性が有意に低減されるおよび/または消失する。

#### 【0048】

「突然変異誘発」とは、本明細書で使用する場合、植物細胞(複数のアブラナ属(*Brassica*)種子または花粉といった他の部分など)に対して、化学物質(エチルメチルスルホネート(EMS)、エチルニトロソウレア(ENU)など)や電離線(中性子(高速中性子突然変異誘発など)、 $\gamma$ 線、 $\alpha$ 線(Cobalt 60源から供給されるものなど)、X線、UV線など)といった変異原因子あるいは、これらの2つ以上の組み合わせに接触させるなど細胞のDNAに変異を誘発する技術をほどこすプロセスを示す。このため、1つ以上の植物組織をエチルメチルスルホネート(EMS)、エチルニトロソウレアなどに接触させるなどの化学的な手段を用いることや、 $\alpha$ 線などの物理的な手段を用いること、あるいはCobalt 60源から供給されるものなどの放射線によって、1つ以上のINDアレルの所望の突然変異誘発を達成できる。放射線によって創り出した変異は、転座または複雑な再配列など大きな欠失や他の肉眼的病変であることが多いが、化学的な変異原によって創り出した変異は点変異などの離散的な病変であることが多い。たとえば、塩基の不对合につながるEMSアルキレートグアニン塩基:アルキル化グアニンはチミン塩基と対をなし、主にG/CからA/Tへの遷移を生じる。突然変異誘発後、周知の技術を用いてアブラナ属(*Brassica*)植物を処理済みの細胞から再生させる。たとえば、得られたアブラナ属(*Brassica*)種子を従来の生育手順で植えた後、その植物に自家受粉種子を形成させる。あるいは、Coventry et al. (1988, Manual for Microspore Culture Technique for Brassica napus. Dep. Crop Sci. Techn. Bull. OAC Publication 0489. Univ. of Guelph, Guelph, Ontario, Canada)に記載されているように、倍加半数体小植物を抽出し、ホモ接合植物をすみやかに形成してもよい。現世代または以後の世代でのこのような自家受粉の結果として形成された追加の種子を収穫し、突然変異株INDアレルの存在をスクリーニングする。特定の突然変異株アレルのスクリーニングには、いくつかの技術が周知であり、たとえば、Deleteage ne(商標)など、(Delete-a-gene; Li et al., 2001

10

20

30

40

50

、Plant J 27: 235~242)では、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)アッセイを用いて、高速中性子突然変異誘発によって生成された欠失突然変異株をスクリーニングし、TILLING(targeted induced local lesions in genomes; McCallum et al., 2000, Nat Biotechnol 18: 455~457)ではEMS誘発点変異を同定するといった具合である。特定の突然変異株INDアレルの存在をスクリーニングする別の技術を、以下の実施例にあげておく。

#### 【0049】

本明細書で使用する場合、「非天然型の」または「栽培した」という表現は、植物について用いる場合、人間が改変したゲノムを有する植物を意味する。たとえば、トランスジェニック植物は、転写するとIND遺伝子などの内在性遺伝子の発現を低減できる生物学的に活性なRNA分子を生成する転写領域を含むキメラ遺伝子などの外来性の核酸分子を持ち、人間が遺伝的に改変した非天然型の植物である。また、変異原因子への曝露の結果として内在性IND遺伝子(調節要素またはコード配列など)の変異などの変異を内在性遺伝子に持つ植物も、非天然的な植物であるとみなされる。なぜなら、これも人間によって遺伝的に改変されているからである。さらに、該当する植物のカラシナ(Brassica juncea)やカブ(rapa)などの同一または別の種の植物とのマーカー利用育種および選択または浸透性交雑などの直接育種プロセスなどの結果として、該当する植物種で自然には生じない変異を内在性IND遺伝子などの内在性遺伝子に含むセイヨウアブラナ(Brassica napus)などの特定の種の植物も、非天然型の植物であるとみなす。対照的に、自然発生または天然に生じる変異しか含まない植物、すなわち人間によって遺伝的に改変されていない植物は、本明細書で定義するような「非天然型の植物」ではないため、本発明には包含されない。非天然型の植物は一般に、天然に生じる植物と比較すると変化したヌクレオチド配列を有するが、非天然型の植物でもメチル化パターンを変えるなどの方法でヌクレオチド配列を変えることなく人間によって遺伝的に改変可能である旨は当業者であれば理解できよう。

#### 【0050】

遺伝子またはタンパク質の「オルソログ」という用語は、本明細書では、遺伝子またはタンパク質と同一の機能を持つが、(通常は)その遺伝子を持っている種が分化した(すなわち、種分化によって共通の祖先から遺伝子が進化した)時点では配列の異なる、別の種に見られる相同遺伝子またはタンパク質を示す。このため、セイヨウアブラナ(Brassica napus)IND遺伝子のオルソログは、他の植物種(カラシナ(Brassica juncea)など)で、両方の配列の比較(配列全体または特定のドメインでの配列同一性のパーセンテージに基づくなど)および/または機能的解析によって、同定できる。

#### 【0051】

「変種」とは、本明細書では、UPOV条約に準拠して使用し、わかっている範囲で最低ランクの単一の植物分類に区分される植物を示す。この区分は、特定の遺伝子型または遺伝子型を組み合わせることで生じる特徴の表現によって定義可能であり、前記特徴のうちの少なくとも1つを表すことで他の植物分類と区別でき、変更なく(安定して)伝えるための適合性に関する単位としてみなされる。

#### 【0052】

「含む(comprising)」という用語は、表記の物品、ステップまたは構成要素の存在を指定するものとして解釈されるが、1つ以上の別の物品、ステップまたは構成要素の存在を除外するものではない。よって、特定の特色を含む植物が別の特色を含むこともあり得る。

#### 【0053】

ある単語を単数形で用いる(植物または根など)場合、本明細書には複数形も含まれる(複数の植物、複数の根など)旨は理解できよう。よって、不定冠詞「a」または「an」を用いる要素に対する言及は、文脈から明らかに1つであることが求められ、1つの要

10

20

30

40

50



素だけがある場合を除いて、2つ以上の要素が存在する可能性を除外するものではない。よって、不定冠詞「a」または「an」は通常、「少なくとも1つの」を意味する。

#### 【0054】

本発明の目的で、パーセンテージで表される、2つの関連するヌクレオチドまたはアミノ酸配列の「配列同一性」は、同じ残基（×100）を有する最適にアライメントされた2つの配列における位置の数を、比較した位置の数で割ったものである。ギャップすなわち、残基が一方の配列に存在するが他方には存在しないアライメントの位置を、非同一残基の位置とみなす。2つの配列の「最適なアライメント」は、NeedlemanおよびWunschグローバルアライメントアルゴリズムをデフォルトの設定（ギャップ開始ペナルティ=10（ヌクレオチドの場合）/10（タンパク質の場合）とギャップ伸張ペナルティ=0.5（ヌクレオチドの場合）/0.5（タンパク質の場合））で使用する、2つの配列を長さ方向全体でアライメントさせることで見出される（Needleman and Wunsch, 1970, J Mol Biol 48(3):443~53) in The European Molecular Biology Open Software Suite (EMBOSS, Rice et al., 2000, Trends in Genetics 16(6): 276277; <http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/index.html>などを参照のこと）。ヌクレオチドの場合、使用するデフォルトのスコアリングマトリクスはEDNAFULLであり、タンパク質の場合はEBLOSUM62がデフォルトのスコアリングマトリクスである。

#### 【0055】

「実質的に同一」または「本質的に類似の」とは、本明細書で使用する場合、上記にて定義したように最適な状態でアライメントした場合に、（下記にてさらに定義するような）少なくとも特定の最小パーセンテージの配列同一性を持つ配列を示す。

#### 【0056】

「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」は、特定のヌクレオチド配列と実質的に同一のヌクレオチド配列を同定するのに使用可能である。ストリンジェントな条件は、配列依存性であり、状況が変われば条件も異なる。通常、ストリンジェントな条件は、規定のイオン強度およびpHで、特定の配列の熱融点（ $T_m$ ）よりも約5℃低く選択される。 $T_m$ は、標的配列の50%が完全に同系のプローブとハイブリダイズする（規定のイオン強度およびpH下での）温度である。一般に、ストリンジェントな条件は、pH7で塩濃度が約0.02モル、温度が少なくとも60℃で選択される。塩濃度を下げるおよび/または温度を上げるとストリンジェンシーが高くなる。RNA-DNAハイブリダイゼーションのストリンジェントな条件（100ntなどのプローブを用いるノーザンブロット）は、たとえば、0.2×SSCで63℃、20分間の洗浄を少なくとも1回含むものなどあるいは、これと等価の条件である。

#### 【0057】

「高ストリンジェンシー条件」は、たとえば、6×SSC（20×SSCで、3.0MのNaCl、0.3Mのクエン酸Naを含有し、pH7.0）、5×デンハート（100×デンハートで、2% Ficoll、2% ポリビニルピロリドン、2% ウシ血清アルブミンを含有する）、0.5% ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）、非特異的競合体として20 μg/ml 変性キャリアDNA（一本鎖魚精子DNA、平均長120~3000ヌクレオチド）を含有する水溶液中、65℃でのハイブリダイゼーションで実施可能である。ハイブリダイゼーション後、いくつかのステップにわけて最終洗浄（約30分）をハイブリダイゼーション温度にて0.2~0.1×SSC、0.1% SDSとすることで、高ストリンジェンシーでの洗浄を実施できる。

#### 【0058】

「中程度のストリンジェンシー条件」とは、上述した溶液中であるが約60~62℃でのハイブリダイゼーションに相当する条件を示す。ハイブリダイゼーション温度にて1×SSC、0.1% SDSで、中程度のストリンジェンシーでの洗浄を実施できる。

## 【0059】

「低ストリンジェンシー」とは、上述した溶液にて約50～52℃でのハイブリダイゼーションに相当する条件を示す。ハイブリダイゼーション温度にて2×SSC、0.1% SDSで、低ストリンジェンシーでの洗浄を実施できる。Sambrook et al. (1989) and Sambrook and Russell (2001) も参照のこと。

## 【0060】

「収穫収量増大」または「種子または穀物収量増大」という表現は、突然変異株INDアレルを含まない同等数の同質遺伝子植物の種子または穀物の量と比較したときに、各々が本発明による突然変異株INDアレルを含む複数の植物から収穫される種子または穀物の量が増えていることを示す。収量は一般に、ブッシュ/エーカーまたはkg/haなど、表面単位あたりの収穫された種子の量の単位で表される。収量の増加は一般にパーセンテージで表される。その場合は基準植物または対照植物の収量を100%として、本発明による植物の収量を対照植物の収量に対する%で示す。本発明によるアブラナ属(Brassica)植物で観察される収量の増加は、少なくとも101%から少なくとも124%の範囲であり、さらに高い収量の増加が実現可能であると思われる。収量の増加は、104%から108%または105%から110%の範囲にもなり得る。

## 【発明を実施するための形態】

## 【0061】

国際特許出願公開第WO09/068313号パンフレット(欧州特許出願第EP 07023052号の優先権を主張)に記載されているように、それまでは、2つのIND遺伝子のうち的一方だけすなわちIND-A1またはIND-C1で完全ノックアウトindアレルにとってホモ接合であるセイヨウアブラナ(Brassica napus)植物では、突然変異株INDアレルを含まないセイヨウアブラナ(Brassica napus)植物と比較して耐裂莢性の有意な増大が認められず、両方のIND遺伝子で完全ノックアウトindアレルにとってホモ接合であるセイヨウアブラナ(Brassica napus)植物であれば、耐裂莢性が有意に増大するが、農学的に妥当な脱穀性を維持するには耐裂莢性のレベルが高すぎるが見出された。対照的に、2つのセイヨウアブラナ(Brassica napus)IND遺伝子の3つの完全ノックアウトindアレルを含むセイヨウアブラナ(Brassica napus)植物では、植物が莢の農学的に妥当な脱穀性を維持するレベルまで耐裂莢性が有意に増大した。

## 【0062】

本発明者らは、驚くべきことに、2つの部分ノックアウト突然変異株INDアレルを2つの完全ノックアウト突然変異株INDアレルと組み合わせれば、3つの完全ノックアウト突然変異株INDアレルを組み合わせなくても、国際特許出願公開第WO09/068313号パンフレット(欧州特許出願第EP 07023052号の優先権を主張)に記載のアブラナ属(Brassica)植物すなわち、耐裂莢性の高さと莢の農学的に妥当な脱穀性とを兼ね備える植物と類似の裂莢表現型を持つセイヨウアブラナ(Brassica napus)植物を得られることを見出した。また、IND-C1遺伝子の変異がIND-A1遺伝子の変異よりも一層大幅に耐裂莢性を増大させることも見出した。セイヨウアブラナ(Brassica napus)植物の耐裂莢性が一層大幅に増大することは、2つの完全ノックアウト突然変異株INDアレルがIND-A1遺伝子由来で、部分ノックアウト突然変異株INDアレルがIND-C1遺伝子由来である場合よりも、たとえば、2つの完全ノックアウト突然変異株INDアレルがIND-C1遺伝子由来の完全ノックアウト突然変異株INDアレルであり、2つの部分ノックアウト突然変異株INDアレルがIND-A1遺伝子由来の部分ノックアウト突然変異株INDアレルであるときに観察された。驚くべきことに、特にIND-C1遺伝子のものだけの2つの部分ノックアウト突然変異株INDアレルを導入することで、耐裂莢性の高さと莢の農学的に妥当な脱穀性とを兼ね備えたセイヨウアブラナ(Brassica napus)植物を得ることができた。

## 【0063】

よって、本発明の一実施形態では、特にIND-A1および/またはIND-C1遺伝子、好ましくはIND-C1遺伝子の2つの部分ノックアウト突然変異株INDアレルを自らのゲノムに含むことを特徴とする、少なくとも2つのIND遺伝子を含むアブラナ属(Brassica)植物、特にIND-A1およびIND-C1遺伝子を含むセイヨウアブラナ(Brassica napus)植物が本明細書で得られ、indアレルがゆえに、これらの突然変異株アレルと同等の野生型によってコードされるタイプの機能的INDタンパク質の量が有意に低減され、植物細胞、具体的には発達している種子莢でin vivoにて生成される機能的INDタンパク質の量が全体的に有意に低減される。

## 【0064】

もうひとつの実施形態では、ind-a1-ems01、ind-a1-ems05、ind-c1-ems01またはind-c1-ems03など、国際特許出願公開第WO09/068313号パンフレット(欧州特許出願第EP 07023052号の優先権を主張)に記載されているものなどのアブラナ属(Brassica)植物が、特にIND-C1および/またはIND-A1遺伝子、好ましくはIND-C1遺伝子の2つの完全ノックアウト突然変異株INDアレルを自らのゲノムにさらに含む。

## 【0065】

1つの植物、特にアブラナ属(Brassica)植物で特定の部分ノックアウト突然変異株INDアレルの十分なコピーを特定の完全ノックアウト突然変異株および/または野生型INDアレルの十分なコピーと組み合わせることで、生成する機能的INDタンパク質の量および/またはタイプを微調整することが可能であり、これによって植物の果実裂開特性に影響を与えられると考えられる。このように、収穫前または収穫時の脱粒を低減しつつ、種子莢の農学的に妥当な脱穀性を可能にできるだけの十分なINDタンパク質を産生する植物が得られるように、INDタンパク質の絶対量と相対量を調整することが可能である。

## 【0066】

よって、本発明のもうひとつの実施形態では、ind-a1-ems06、ind-a1-ems09、ind-a1-ems13、ind-c1-ems04、ind-c1-ems08またはind-c1-ems09など、後述するものなどの部分的に機能的なINDタンパク質をコードする少なくとも1つの部分ノックアウト突然変異株INDアレルを含む植物、特にアブラナ属(Brassica)植物が得られる一方で、残りのアレルは部分ノックアウトであってもよいし、完全ノックアウトおよび/または野生型INDアレルであってもよい。

## 【0067】

本発明の一態様では、少なくとも1つのアレルが少なくとも部分的に機能的なINDタンパク質を生成するように、少なくとも2つのIND遺伝子を含むアブラナ属(Brassica)植物、特にそのアブラナ属(Brassica)植物の2つのIND遺伝子、特にセイヨウアブラナ(Brassica napus)IND-A1および/またはIND-C1遺伝子、好ましくはIND-C1遺伝子の2つの部分ノックアウトindアレルおよびn組の完全ノックアウトindアレルを含むセイヨウアブラナ(Brassica napus)植物が得られ、n=2(n=0、1または2など)である。

## 【0068】

本発明の別の態様では、少なくとも2つのIND遺伝子を含むアブラナ属(Brassica)種、特にセイヨウアブラナ(Brassica napus)のホモ接合IND単一突然変異株(n=2、すなわち、1つのIND遺伝子の部分ノックアウト突然変異株アレルにとってホモ接合)および/またはホモ接合IND二重突然変異株(n=4、すなわち、2つのIND遺伝子の完全および/または部分ノックアウト突然変異株アレルにとってホモ接合)植物が得られ、それによって突然変異株アレルがそのアブラナ属(Brassica)植物の2つのIND遺伝子、特にIND-A1および/またはIND-C1遺伝子を含む突然変異株アレルである。このような突然変異株植物は、本発明によれば、

10

20

30

40

50

育種目的で使用できるものである。

【0069】

よって、本発明の一実施形態では、ホモ接合IND単一部分ノックアウト突然変異株セイヨウアブラナ (*Brassica napus*) 植物が本明細書で得られ、ここで、その植物の遺伝子型を  $ind - a1^P / ind - a1^P$ 、 $IND - C1 / IND - C1$  または  $IND - A1 / IND - A1$ 、 $ind - c1^P / ind - c1^P$  と表現することが可能である。本発明のもうひとつの実施形態では、ホモ接合IND二重部分突然変異株セイヨウアブラナ (*Brassica napus*) 植物が本明細書で得られ、ここで、その植物の遺伝子型を  $ind - a1^P / ind - a1^P$ 、 $ind - c1^P / ind - c1^P$  と表現することが可能である。本発明のさらに他の実施形態では、ホモ接合IND二重部分および完全突然変異セイヨウアブラナ (*Brassica napus*) 植物が本明細書で得られ、ここで、その植物の遺伝子型を  $ind - a1^F / ind - a1^F$ 、 $ind - c1^P / ind - c1^P$  または  $ind - a1^P / ind - a1^P$ 、 $ind - c1^F / ind - c1^F$  と表現することが可能である。

10

【0070】

本明細書でさらに得られるのは、アブラナ属 (*Brassica*) 種由来の部分ノックアウト突然変異株IND遺伝子/アレルの新規な核酸配列ならびに、部分ノックアウト突然変異株INDタンパク質である。また、特定の組み合わせで完全および部分ノックアウト突然変異株INDアレルを自らのゲノムに含むアブラナ属 (*Brassica*) 植物、ならびにアブラナ属 (*Brassica*) 植物および植物の一部で、部分ノックアウト突然変異株INDアレルを生成して組み合わせる方法も得られ、それによってこれらの植物の脱粒が低減される。これらの植物を用いて部分ノックアウト突然変異株INDアレルを他の植物に移行させることや、ここに記載の植物の植物産物も、本発明の実施形態である。また、IND遺伝子および/またはアレルを組み合わせまたは検出するためのマーカー利用選抜 (MAS) 用のキットおよび方法も得られる。本発明の各実施形態については、以下において詳細に説明する。

20

【0071】

脱粒が低減または遅延された本明細書で説明するアブラナ属 (*Brassica*) 植物では、収穫される種子の収量が増す。しかしながら、突然変異株INDアレルを含むアブラナ属 (*Brassica*) 植物には観察可能な種子脱粒表現型の低減または遅延がないにもかかわらず、突然変異株INDアレルを含まない同質遺伝子アブラナ属 (*Brassica*) 植物と比較した場合に、 $ind - c1 - 09$  アレルだけをホモ接合状態で含むアブラナ属 (*Brassica*) 植物から収穫される種子の収量 (観察可能な種子脱粒表現型の低減または遅延を示す) だけでなく、2つの突然変異株INDアレルだけをホモ接合状態で含むすなわち、植物の遺伝子型を  $ind - a1^P / ind - a1^P$ 、 $IND - C1 / IND - C1$  または  $IND - A1 / IND - A1$ 、 $ind - c1^P / ind - c1^P$  と表現可能な他のアブラナ属 (*Brassica*) 植物から収穫される種子の収量も有意に増加することが観察された。また、本発明は、少なくとも2つのアレルが機能的INDタンパク質を生成し、少なくとも2つのIND遺伝子を含むアブラナ属 (*Brassica*) 植物も提供するものであり、この植物のほうが種子収量が大きい。IND-A遺伝子座またはIND-C遺伝子座の2つの突然変異株アレルは、同一の突然変異株アレルであっても異なる突然変異株アレルであってもよいことは明らかであろう。

30

40

【0072】

本発明による核酸配列

得られるのは、アブラナ科 (*Brassicaceae*)、特にアブラナ属 (*Brassica*) 種、特にセイヨウアブラナ (*Brassica napus*) 由来であるが、他のアブラナ属 (*Brassica*) 作物種由来であってもよいIND遺伝子の部分的に機能的なINDタンパク質、すなわち生物活性が有意に低減されたINDタンパク質 (すなわち、コードされたINDタンパク質の生物活性が有意に低減される1つ以上の変異を含むIND核酸配列) をコードする部分ノックアウト突然変異株 *ind* 核酸配列である。

50

たとえば、Aおよび/またはCゲノムを含むアブラナ属 (*Brassica*) 種は、IND-A1またはIND-C1遺伝子のアレルを含むものであってもよく、これは本発明の部分ノックアウト突然変異株INDアレルと本質的に類似しており、同定して本発明による単一の植物で組み合わせることが可能である。また、突然変異誘発方法を利用して、野生型INDアレルに変異を生成し、これによって本発明で使用する、本発明の部分ノックアウト突然変異株INDアレルと本質的に類似の突然変異株indアレルを生成することが可能である。特異的INDアレルは、好ましくは交雑および選択によって植物で組み合わせられるが、一実施形態では、セイヨウアブラナ (*Brassica napus*) と交雑可能あるいは、「合成」セイヨウアブラナ (*Brassica napus*) 植物の生成に利用可能なアブラナ属 (*Brassica*) 植物、好ましくはアブラナ属 (*Brassica*) 植物など、植物内で(すなわち内在的に)ind核酸配列を得る。異なるアブラナ属 (*Brassica*) 種間のハイブリダイゼーションについては、Snowdon (2007, *Chromosome research* 15: 85~95) などにおいて従来技術で説明されている。種間ハイブリダイゼーションを使用すれば、たとえば遺伝子をセイヨウアブラナ (*B. napus*) のCゲノム(AACC)などからアビシニアカラシ (*B. carinata*) のCゲノム(BBCC)に、あるいはセイヨウアブラナ (*B. napus*) のCゲノム(AACC)などからカラシナ (*B. juncea*) のBゲノム(AABB)(CとBのゲノムの非正統的組換えの散発事象による)にすら移行可能である。「再合成」または「合成」セイヨウアブラナ (*Brassica napus*) 系統は、元の祖先であるブラシカ・オレラセア (*B. oleracea*) (CC)とカブ (*B. rapa*) (AA)を交雑させることで生成可能である。アブラナ属 (*Brassica*) 作物種とその近縁種との交雑では、胚救出技術またはプロトプラスト融合(上記のSnowdonなどを参照)によって、種間および属間の不適合性バリアをうまくかわすことが可能である。

#### 【0073】

しかしながら、単離されたind核酸配列(クローニングによって植物から単離またはDNA合成によって合成的に生成するなど)ならびにその変異体およびこれらのいずれかの断片も本明細書で提供され、これらを用いて、所望の組み合わせの部分および/または完全ノックアウト突然変異株INDアレルを有する植物を生成するために、特異的アレルの選択と1つの植物からもうひとつの植物への移行について、どの配列が植物または植物の一部に内在的に存在するか、配列が機能的、部分的に機能的、非機能的またはタンパク質なし(後述するような組換え宿主細胞での発現など)をコードするか否かを判断することができる。

#### 【0074】

野生型IND-A1およびIND-C1の新規な部分ノックアウト突然変異株IND核酸配列がセイヨウアブラナ (*Brassica napus*) から単離されている。国際特許出願公開第WO09/068313号パンフレット(欧州特許出願第EP 07023052号の優先権を主張)に記載されているような野生型IND配列を配列表の配列番号1、配列番号3、配列番号5および配列番号7に示し、一方これらの配列ならびにこれらと本質的に類似した配列の新規な部分ノックアウト突然変異株ind配列については、野生型IND配列を参照して本明細書の後段ならびに実施例で説明する。セイヨウアブラナ (*Brassica napus*) 由来のゲノムINDタンパク質コードDNAはイントロンを含まない。

#### 【0075】

本発明による「IND-A1核酸配列」または「IND-A1変異体核酸配列」は、配列番号2との配列同一性が少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、98%、99%または100%のアミノ酸配列をコードする核酸配列あるいは、配列番号1または配列番号5との配列同一性が少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、96%、97%、98%、99%または100%の核酸配列である。これらの核酸配列を、配列表に示すIN

D配列と「本質的に類似している」または「本質的に同一である」と呼ぶこともある。

【0076】

本発明による「IND-C1核酸配列」または「IND-C1突然変異株核酸配列」は、配列番号4 (IND-C1-long) または配列番号4の16位のアミノ酸から210位のアミノ酸まで (IND-C1-short) との配列同一性が少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、98%、99%または100%のアミノ酸配列をコードする核酸配列あるいは、配列番号3 (IND-C1-long)、配列番号3の46位のヌクレオチドから633位のヌクレオチドまで (IND-C1-short) または配列番号7との配列同一性が少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、96%、97%、98%、99%または100%の核酸配列である。これらの核酸配列を配列表に示すIND配列と「本質的に類似している」または「本質的に同一である」と呼ぶこともある。

10

【0077】

よって、本発明は、野生型、機能的IND-A1およびIND-C1タンパク質をコードする核酸配列の新規な部分ノックアウト変異核酸配列（（下記にてさらに定義するような）その変異体および断片を含む）を提供するものであり、それによって核酸配列の変異が、野生型INDタンパク質に比して好ましくは1つ以上のアミノ酸が挿入、欠失または置換されることにつながり、特に1つ以上のアミノ酸が置換され、それによってINDタンパク質の生物活性が有意に低減される。INDタンパク質の生物活性の有意な低減を本明細書では、対応する野生型INDタンパク質を発現している植物と比較して突然変異株INDタンパク質を発現している植物の耐裂莢性が高まるように、INDタンパク質のDNA結合活性、二量体化能および/または転写調節活性が低減されると表現する。

20

【0078】

植物、特にアブラナ属 (*Brassica*) 植物における特定のINDアレル/タンパク質の機能性を判断するには、特定のINDアレル/タンパク質を含む植物ならびに、Liljegren et al. (2004, 上掲) に記載されているように、あるいは以下の実施例で説明するように、シロイヌナズナ属 (*Arabidopsis*) の果実および花で実施するアッセイに似た、対応する野生型植物の果実および花について、巨視的、顕微鏡的、組織学的アッセイを実施して、植物の裂莢に対する耐性レベルを判断することが可能である。簡単に説明すると、裸眼で種子莢を検査して、朔片縁辺の存在または非存在あるいは莢のくちばしの長さを評価するといった巨視的試験など；莢を軽くねじったときに莢の開きやすさを評価することで、異なる突然変異株IND系統および対応する野生型系統間の耐裂莢性のレベルを比較する手動衝撃加振試験 (MIT)；これらの系統の莢試料の半減期を測定することで、異なる突然変異株IND系統および対応する野生型系統由来の植物からの種子莢の脱穀性を比較する不規則衝撃加振試験 (RIT)；および/または種子莢の朔片縁辺および裂開ゾーンの細胞がINDの変異に影響されるか否か、影響される場合はどのように影響されるのかなどを調べる顕微鏡試験などによって、耐裂莢性の変化を評価および/または測定することができる。INDタンパク質の二量体化パートナー（その機能がホモ二量体の形成に左右される場合はINDタンパク質自体、その機能がヘテロ二量体の形成に左右されるのであれば別のタンパク質など）および/または転写がINDタンパク質によって制御される遺伝子を同定してキャラクタライズし、特定のINDアレル/タンパク質の機能性を、二量体が形成可能である場合、二量体が制御された遺伝子のbHLH結合部位に結合可能である場合および/またはこれらの遺伝子の転写がこの結合によって制御されている場合に、宿主細胞（大腸菌 (*E. coli*) などの細菌など）で二量体の両方のパートナーを同時発現させて評価するなどの従来技術において周知の組換えDNA技術で評価することも可能である。

30

40

【0079】

内在性の核酸配列と単離した核酸配列の両方が、本明細書にて得られる。また、本発明のもうひとつの態様（詳細については下記参照）によるプライマーまたはプローブならびにキットの構成要素として用いられる先に定義した突然変異株IND配列および突然変異

50

株 I N D 変異体核酸配列の断片も得られる。i n d 核酸配列またはその変異体の「断片」(定義したとおり)は、I N D または i n d 配列(または変異体配列)の少なくとも 1 0、1 2、1 5、1 8、2 0、5 0、1 0 0、2 0 0、5 0 0、6 0 0 の連続したヌクレオチドなど、さまざまな長さであってもよい。

#### 【0080】

機能的 I N D タンパク質をコードする核酸配列

配列表に示される核酸配列は、セイヨウアブラナ (*Brassica napus*) 由来の野生型の機能的 I N D タンパク質をコードする。よって、これらの配列は、その単元となったセイヨウアブラナ (*Brassica napus*) 植物にとって内在性である。他のアブラナ属 (*Brassica*) 作物種、変種、育種系統または野生の到達種を、同一の I N D タンパク質またはその変異体をコードする他の I N D アレルについてスクリーニングしてもよい。たとえば、核酸ハイブリダイゼーション技術(ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件などを用いるサザンブロット解析など)または P C R ベースの技術を使用して、さまざまなセイヨウアブラナ (*Brassica napus*) 変種、系統または到達種などの他のアブラナ属 (*Brassica*) 植物に内在性の I N D アレルを同定してもよいが、カラシナ (*Brassica juncea*) (特に A - ゲノムの I N D アレル)、アビシニアカラシ (*Brassica carinata*) (特に C - ゲノムの I N D アレル)、カブ (*Brassica rapa*) (A - ゲノム)、キャベツ (*Brassica oleracea*) (C - ゲノム) 植物、器官および組織を、他の野生型 I N D アレルについてスクリーニングすることが可能である。このような植物、植物の器官または組織で I N D アレルの存在をスクリーニングするには、配列表に示す I N D 核酸配列あるいは、そのいずれかの変異体または断片を用いてもよい。たとえば全配列または断片をプローブまたはプライマーとして用いてもよい。たとえば特異的または変性プライマーを用いて、I N D タンパク質をコードする核酸配列を、植物、植物器官または組織のゲノム D N A から増幅してもよい。これらの I N D 核酸配列については、標準的な分子生物学技術によって単離および配列決定できる。その後、たとえばどの I N D アレルに配列が対応し、どの I N D タンパク質またはタンパク質変異体が配列によってコードされるのかを判断するために、パイオインフォマティクス解析を利用して、アレルをキャラクタライズすればよい。

#### 【0081】

核酸配列が機能的 I N D タンパク質をコードするか否かは、完全ノックアウト i n d 突然変異株アレルにとってホモ接合であるシロイヌナズナ属 (*Arabidopsis*) 植物あるいは、I N D - A 1 および I N D - C 1 遺伝子の両方の完全ノックアウト i n d 突然変異株アレルにとってホモ接合であるセイヨウアブラナ (*Brassica napus*) 植物などを用いる遺伝的相補性試験などの従来技術において周知のような組換え D N A 技術によって分析可能である。

#### 【0082】

また、本質的に類似の配列について核酸データベースをスクリーニングすることで、I N D 核酸配列およびその変異体(またはこれらのいずれかの断片)を i n s i l i c o で同定してもよいことは、理解できよう。同様に、核酸配列を化学的に合成してもよい。下記にてさらに説明する本発明による核酸分子の断片も得られる。断片は、b H L H ドメインだけをコードする核酸配列あるいは、塩基性ドメインまたは H L H ドメインなどの b H L H ドメインの一部を含むさらに小さな断片を含む。

#### 【0083】

突然変異株 I N D タンパク質をコードする核酸配列

本発明は、配列表の配列番号 1、3、5 および 7 で示す野生型 I N D 核酸配列に対して 1 つ以上のヌクレオチド欠失、挿入または置換を含む核酸配列を提供するものであり、核酸配列の当該変異によって、野生型 I N D タンパク質に比してコードされた I N D タンパク質の生物活性が有意に低減すなわち生物活性が部分ノックアウトされ、当該変異核酸分子の断片も提供するものである。このような変異核酸配列 (i n d <sup>P</sup> 配列と呼ぶ) は、以

下においてさらに説明するような周知のさまざまな方法を用いて生成および／または同定可能である。繰り返すが、このような核酸分子は、内在性の形態と単離された形態の両方で得られる。

#### 【0084】

基本的に、野生型INDタンパク質に対して少なくとも1つのアミノ酸の挿入、欠失および／または置換を含むINDタンパク質を生じる野生型IND核酸配列の変異はどのようなものであっても、生物活性を有意に低減または生物活性をなくすることができるものである。しかしながら、DNA結合ドメイン(「b」)、二量体化ドメイン(「HLH」)および／または転写調節ドメインなどの機能ドメインの有意な部分が欠けているか、5位、9位、13位のGln(Q)、Ala(A)、Arg(R)アミノ酸またはHeim 10  
et al. (2003, Mol Biol Evol 20, 735~747によって定義されたコンセンサスbHLHドメイン配列の10位および12位の塩基性アミノ酸残基(特にArg(R)残基);それぞれ配列番号10の123位、127位および131位、128位および130位に対応、表1参照)などのこれらのドメイン内の特定の不可欠なアミノ酸残基が欠けているか、あるいは好ましくは非類似または非保存アミノ酸で置換された変異など、INDタンパク質の特定の変異のほうがINDタンパク質の生物活性を完全に排除しやすいが、表1に示す保存されたアミノ酸など特定のアミノ酸の置換につながる変異など、INDタンパク質の他の変異のほうがINDタンパク質の生物活性の有意な低減につながりやすく、コードされたINDタンパク質の生物活性を完全に排除することなくDNA結合の効率が低く、二量体化の効率が低くおよび／または転写調節 20  
の効率が低いことは理解できよう。国際特許出願公開第WO09/068313号パンフレット(欧州特許出願第EP 07023052号の優先権を主張)には、たとえば、bHLHドメインのない切断されたINDタンパク質が生成されるナンセンス変異を含む完全ノックアウト突然変異株INDアレル、特にind-a1-em501、ind-c1-em501およびind-c1-em503ならびに、コンセンサスbHLHドメインの10位で保存されたArgが芳香族Hisで置換された、突然変異株INDタンパク質をコードする完全ノックアウト突然変異株INDアレル、特にind-a1-em505 30  
について記載されているのに対し、本発明は部分ノックアウト突然変異株INDアレル、特に、コンセンサスbHLHドメインの9位で保存されたAlaがThrで置換された、突然変異株INDタンパク質をコードするind-c1-em509ならびに、コンセンサスbHLHドメインの12位で保存されたArgがCysで置換された、突然変異株INDタンパク質をコードするind-c1-em504などについて説明するものである。

#### 【0085】

核酸分子は、以下にあげたものなどの1つ以上の変異を含むものであってもよい。

- アミノ酸と別のアミノ酸との置換につながる核酸配列の変化である「ミスセンス変異」;
- 未熟STOPコドンの導入と、よって翻訳の終端につながる核酸配列の変化である「ナンセンス変異」または「STOPコドン変異」(切断されたタンパク質につながる); 植物遺伝子は、翻訳停止コドン「TGA」(RNAではUGA)、「TAA」(RNAではUAA)、「TAG」(RNAではUAG)を含有する; よって(読み枠での)翻訳対象の成熟mRNAに含まれることになるこれらのコドンのうちの1つにつながるヌクレオチド置換、挿入、欠失であればどのようなものでも翻訳を終端させることになる;
- 1つ以上のコドンが核酸のコード配列に付加されたことによる1つ以上のアミノ酸の「挿入変異」;
- 1つ以上のコドンが核酸のコード配列で欠失したことによる1つ以上のアミノ酸の「欠失変異」;
- 変異下流の異なるフレームでの核酸配列の翻訳につながる「フレームシフト変異」。フレームシフト変異は、1つ以上のヌクレオチドの挿入、欠失または複製などのさまざまな原因を持ち得る。

10

20

30

40

50



## 【 0 0 8 6 】

表 1 は、配列番号 10 のシロイヌナズナ属 (*Arabidopsis*) IND タンパク質の長さ、配列番号 9 のシロイヌナズナ属 (*Arabidopsis*) IND コーディング DNA の長さ、配列番号 2 と 6 ならびに配列番号 4 と 8 のセイヨウアブラナ (*Brassica napus*) IND - A1 および IND - C1 タンパク質の長さ; The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR) データベース (<http://www.arabidopsis.org/>; 遺伝子座 At4g00120.1、参照により本明細書に援用; 配列番号 10) によるシロイヌナズナ属 (*Arabidopsis*) IND タンパク質における pfam ドメイン PF00010、smart ドメイン SM00353、prosite ドメイン PS50888、superfam ドメイン G3D.4.10.280.10 または SSF47459 の表記の位置に基づくセイヨウアブラナ (*Brassica napus*) IND - A1 および IND - C1 タンパク質における bHLH ドメインの位置; 参照により本明細書に援用する、Heim et al. (2003, Mol Biol Evol 20, 735~747)、Toledo-Ortiz et al. (2003, Plant Cell 15: 1749~1770)、Liljegren et al. (2004, Cell, 116, 843~853) に説明され、参照により本明細書に援用する国際特許出願公開第 WO09/068313 号パンフレット (欧州特許出願第 EP 07023052 号の優先権を主張) にもさらに記載された、シロイヌナズナ属 (*Arabidopsis*) IND タンパク質における bHLH ドメインおよび保存されたアミノ酸の表記の位置に基づくセイヨウアブラナ (*Brassica napus*) IND - A1 および IND - C1 タンパク質における bHLH ドメインおよび保存されたアミノ酸の位置; シロイヌナズナ属 (*Arabidopsis*) IND タンパク質における bHLH ドメインおよび保存されたアミノ酸の表記の位置に基づくセイヨウアブラナ (*Brassica napus*) IND - A1 および IND - C1 タンパク質における bHLH ドメインおよび保存されたアミノ酸の位置を示す。

## 【 0 0 8 7 】

## 【 表 1 】

表 1 IND タンパク質 - アミノ酸 (AA) 領域および位置

		AtIND1 (配列番号 10)	AtIND1 (配列番号 9)	BnIND-A1 (配列番号 2/6)	BnIND-C1a/b (配列番号 4/8 16~ 210 / 配列番号 4/8)
コーディング 領域	<u>TAIR:</u>	1-198 (198 AA)	1-594	1-185 (185 AA)	16-210 / 1-210 (195 / 210 AA)
	PF00010	121-168	361-504	120-167	133-180
	SM00353	124-173	370-519	123-172	136-185
	PS50888	112-168	334-504	111-167	124-180
	G3D.4.10.280.10	114-196	340-588	-	127-208
	SSF47459	114-198	340-594	-	127-210
	<u>Liljegren et al.</u>	30-198 (169 AA)	88-594		

## 【 0 0 8 8 】

【表 2】

bHLH:	<u>Heim et al.</u>	119-174	355-523	118-173	131-186
	<u>Toledo-Ortiz et al.</u>	115-167	343-501	114-166	127-179
	<u>Liljegren et al.</u>	119-167	355-501	118-166	131-179
b	Heim et al.	119-131	355-393	118-132	131-145
	Toledo-Ortiz et al.	115-131	343-393	114-132	127-145
	Liljegren et al.	119-131	355-393	118-132	131-145
H1	Heim et al.	132-146	394-438	133-145	146-158
	Toledo-Ortiz et al.	132-146	394-438	133-145	146-158
	Liljegren et al.	132-145	394-435	133-144	146-157
L	Heim et al.	147-152	439-456	146-151	159-164
	Toledo-Ortiz et al.	147-152	439-456	146-151	159-164
	Liljegren et al.	146-152	436-456	145-151	158-164
H2	Heim et al.	153-174	457-523	152-173	165-186
	Toledo-Ortiz et al.	153-167	457-501	152-166	165-179
	Liljegren et al.	153-167	457-501	152-166	165-179
保存された AA	N (1 <sup>T</sup> )	115	343-345	114	127
	V (2 <sup>T</sup> )	116	346-348	115	128
	Q (5 <sup>H</sup> )	123	367-379	122	135
	A (9 <sup>H</sup> - 13 <sup>T</sup> )	127	379-381	126	139
	R (10 <sup>H</sup> - 14 <sup>T</sup> )	128	382-384	127	140
	R (12 <sup>H</sup> - 16 <sup>T</sup> )	130	388-390	129	142
	R (13 <sup>H</sup> )	131	391-393	130	143
	I (16 <sup>H</sup> - 20 <sup>T</sup> )	134	400-403	133	146
	S ( 21 <sup>T</sup> )	135	404-406	134	147
	I (20 <sup>H</sup> - 24 <sup>T</sup> )	138	412-414	137	150
	L (23 <sup>H</sup> - 27 <sup>T</sup> )	141	421-423	140	153
	K ( 28 <sup>T</sup> )	142	424-426	141	154
	V (27 <sup>H</sup> )	145	433-435	144	157
	K (39 <sup>T</sup> )	150	448-450	149	162
	T (42 <sup>T</sup> )	153	460-463	152	165
	A (36 <sup>H</sup> )	154	460-462	153	166
	M (45 <sup>T</sup> )	156	466-468	155	168
	L (39 <sup>H</sup> -46 <sup>T</sup> )	157	469-471	156	169
	A (49 <sup>T</sup> )	160	478-480	159	172

10

20

30

40

【表 3】

	I (43 <sup>H</sup> -50 <sup>T</sup> )	161	481-483	160	173
	Y (52 <sup>T</sup> )	163	487-489	162	175
	T (53 <sup>T</sup> )	164	490-492	163	176
	L (49 <sup>H</sup> -56 <sup>T</sup> )	167	499-501	166	179
	V (53 <sup>H</sup> )	171	511-513	170	183
	L (56 <sup>H</sup> )	174	580-582	173 (A)	186
<i>ind</i> で	<i>ind</i> -5 (W13>STOP) <sup>L</sup>	42	124-126	25	41
	<i>ind</i> -2 (A26>FS) <sup>L</sup>	55	163-165	-	-
	<i>ind</i> -6 <sup>W</sup>	61 の後に 挿入	185 の後に 挿入	-	-
	<i>ind</i> -4 (Q63>STOP) <sup>L</sup>	92	274-276	91	104
	<i>ind</i> -3 (R99>H) <sup>L</sup>	128	382-384	127	140
	<i>ind</i> -1 (L112>F) <sup>L</sup>	141	421-423	140	153

10

Heim et al., <sup>H</sup>: Heim et al., 2003, Mol Biol Evol 20, 735~747; Toledo~Ortiz et al., <sup>T</sup>: Toledo-Ortiz et al., 2003, Plant Cell 15: 1749~1770; Liljegren et al., <sup>L</sup>: Liljegren et al., 2004, Cell, 116, 843~853; <sup>W</sup>: Wu et al., 2006, Planta 224, 971~979.

20

## 【 0 0 9 0 】

シロイヌナズナ属 ( *A r a b i d o p s i s* ) I N D 核酸 ( 配列番号 9 ) およびアミノ酸 ( 配列番号 1 0 ) 配列と I N D 核酸配列、特に本発明のアブラナ属 ( *B r a s s i c a* ) I N D 核酸 ( 配列番号 1 および 3 ) およびアミノ酸 ( 配列番号 2 および 4 ) 配列との最適なアライメントによって、これらのアブラナ属 ( *B r a s s i c a* ) 配列で対応する保存されたドメインおよびアミノ酸の位置を判断することができる ( 配列番号 1 ~ 4 のアブラナ属 ( *B r a s s i c a* ) I N D 配列についての表 1 参照 )。

## 【 0 0 9 1 】

30

よって、一実施形態では、上述した変異タイプの 1 つ以上を含む部分ノックアウト突然変異株 I N D 核酸配列が得られる。もうひとつの実施形態では、1 つ以上の停止コドン ( ナンセンス ) 変異、1 つ以上のミスセンス変異および / または 1 つ以上のフレームシフト変異を含む部分ノックアウト *i n d* 配列が得られる。上記の変異核酸配列のいずれも、当該配列を内在的に有する植物および植物の一部の場合と同様に、それ自体で ( 単離された形態で ) 得られる。以下に示す表では、最も好ましい *i n d* アレルを取り上げ、1 つ以上の *i n d* アレルを含むセイヨウアブラナ ( *B r a s s i c a n a p u s* ) 種子の種子デポジットを図示のように寄託した。

## 【 0 0 9 2 】

I N D アレルのナンセンス変異とは、本明細書で使用する場合、I N D アレルの変異であり、それによって 1 つ以上の翻訳停止コドンが対応する野生型 I N D アレルのコーディング DNA および対応する mRNA 配列に導入される。翻訳停止コドンは、T G A ( mRNA では U G A )、T A A ( U A A )、T A G ( U A G ) である。よって、コード配列におけるインフレームでの停止コドンの生成につながる変異 ( 欠失、挿入または置換 ) は、アミノ酸鎖の翻訳と切断を終端させることになる。一実施形態では、C A G から T A G、T G G から T A G、T G G から T G A または C A A から T A A への変異などの単一のヌクレオチド置換によってインフレームでの停止コドンが I N D コドン配列に導入されるナンセンス変異を含む部分ノックアウト突然変異株 I N D アレルが得られる。もうひとつの実施形態では、C A G から T A A、T G G から T A A または C G G から T A G または T G A への変異などの二重ヌクレオチド置換によってインフレームでの停止コドンが I N D コド

40

50

ン配列に導入されるナンセンス変異を含む部分ノックアウト突然変異株 I N D アレルが得られる。さらにもうひとつの実施形態では、C G G から T A A への変異などの三重ヌクレオチド置換によってインフレームでの停止コドンが I N D コドン配列に導入されるナンセンス変異を含む部分ノックアウト突然変異株 I N D アレルが得られる。切断されたタンパク質には、変異下流（すなわち I N D タンパク質の C 末端部分）のコーディング DNA によってコードされるアミノ酸が欠けており、変異上流（すなわち I N D タンパク質の N 末端部分）のコーディング DNA によってコードされるアミノ酸が維持される。一実施形態では、H 2 ドメインの保存された L e u 残基前の存在するナンセンス変異を含む部分ノックアウト突然変異株 I N D アレルが得られる（H e i m e t a l . , 2 0 0 3 によって説明されているようにコンセンサス b H L H ドメイン配列の 5 6 位、表 1 参照）ため、少なくとも保存された L e u 残基は欠けている。野生型 I N D タンパク質に比して突然変異株 I N D タンパク質の切断が進むにつれて、より多くの切断が I N D タンパク質の活性を有意に低下させることになり得る。突然変異株 I N D タンパク質が生物活性をいくらか保持するには、少なくとも DNA 結合（b）ドメインを含んでいる必要があると考えられる。よって、もうひとつの実施形態では、約 1 7 0 アミノ酸未満（保存された L e u を欠いている）、約 1 5 0 アミノ酸未満（H 2 ドメインを欠いている）、約 1 4 5 アミノ酸未満（L および H 2 ドメインを欠いている）または約 1 3 0 アミノ酸未満（H L H ドメインを欠いている）の切断されたタンパク質につながるナンセンス変異を含む部分ノックアウト突然変異株 I N D アレルが得られる（表 1 参照）。

10

【 0 0 9 3 】

20

以下の表は、本明細書に記載のセイヨウアブラナ（B r a s s i c a n a p u s ）I N D 配列における広範囲にわたる可能なナンセンス変異について説明するものである。

【 0 0 9 4 】

【表 4】

表 2a IND-A1 の潜在的な STOP コドン変異 (配列番号 1)

アミノ酸位置	ヌクレオチド位置	野生型→変異コドン	野生型→変異アミノ酸	
25	74	tgg → tag	TRP → STOP	
	75	tgg → tga	TRP → STOP	
	74+75	tgg → taa	TRP → STOP	
57	169	cag → tag	GLN → STOP	
	169+171	cag → taa	GLN → STOP	
91	271	caa → taa	GLN → STOP	10
98	292	cag → tag	GLN → STOP	
	292+294	cag → taa	GLN → STOP	
122	364	cag → tag	GLN → STOP	
	364+366	cag → taa	GLN → STOP	
128	382+383	cgg → tag	ARG → STOP	
	382+384	cgg → tga	ARG → STOP	
	382+383+384	cgg → taa	ARG → STOP	
138	412+413	cgg → tag	ARG → STOP	
	412+414	cgg → tga	ARG → STOP	
	412+413+414	cgg → taa	ARG → STOP	20
168	502+503	cgg → tag	ARG → STOP	
	502+504	cgg → tga	ARG → STOP	
	502+503+504	cgg → taa	ARG → STOP	
169	505	cag → tag	GLN → STOP	
	505+507	cag → taa	GLN → STOP	
181	542	tgg → tag	TRP → STOP	
	543	tgg → tga	TRP → STOP	
	542+543	tgg → taa	TRP → STOP	

【表 5】

表 2b IND-C1 の潜在的な STOP コドン変異 (配列番号 3)

アミノ酸位置	ヌクレオチド位置	野生型→変異コドン	野生型→変異アミノ酸	
41	122	tgg → tag	TRP → STOP	
	123	tgg → tga	TRP → STOP	
	122+123	tgg → taa	TRP → STOP	
50	148	caa → taa	GLN → STOP	
73	271	cag → tag	GLN → STOP	
	271+272	cag → taa	GLN → STOP	10
104	310	caa → taa	GLN → STOP	
111	331	cag → tag	GLN → STOP	
	331+333	cag → taa	GLN → STOP	
135	403	cag → tag	GLN → STOP	
	403+405	cag → taa	GLN → STOP	
141	421+422	cgg → tag	ARG → STOP	
	421+423	cgg → tga	ARG → STOP	
	421+422+423	cgg → taa	ARG → STOP	
151	451+452	cgg → tag	ARG → STOP	
	451+453	cgg → tga	ARG → STOP	20
	451+452+453	cgg → taa	ARG → STOP	
181	541+542	cgg → tag	ARG → STOP	
	541+543	cgg → tga	ARG → STOP	
	541+542+543	cgg → taa	ARG → STOP	
182	544	cag → tag	GLN → STOP	
	544+546	cag → taa	GLN → STOP	
187	559	cag → tag	GLN → STOP	
	559+561	cag → taa	GLN → STOP	
191	571	cag → tag	GLN → STOP	
	571+573	cag → taa	GLN → STOP	30

## 【 0 0 9 6 】

明らかに、変異は上記の表に示した 1 つに限定されるものではなく、配列表に示して上記の表にあげた i n d アレルに類似の S T O P 変異が存在してもよい旨は理解できよう。

## 【 0 0 9 7 】

I N D アレルのミスセンス変異は、本明細書で使用する場合、I N D アレルの変異（欠失、挿入または置換）であり、それによって 1 つ以上のコドンがコーディング DNA および対応する野生型 I N D アレルの対応する m R N A 配列に変化し、野生型 I N D タンパク質での 1 つ以上のアミノ酸が突然変異株 I N D タンパク質の 1 つ以上の他のアミノ酸で置換される結果につながる。一実施形態では、i n d - a 1 - E M S 0 6 アレル（表 3 a ）など、特にメチオニン（M e t ）残基による、配列番号 2 における I N D タンパク質の 1 2 4 位のバリリン（V a l ）残基あるいは本質的にこれと類似の配列の置換につながるミスセンス変異を含む部分ノックアウト突然変異株 I N D アレルが得られる。もうひとつの実施形態では、i n d - a 1 - E M S 0 9 アレル（表 3 a ）など、特にセリン（S e r ）残基による、配列番号 2 における I N D タンパク質の 1 4 6 位のグリシン（G l y ）残基あるいは本質的にこれと類似の配列の置換につながるミスセンス変異を含む部分ノックアウト突然変異株 I N D アレルが得られる。さらにもうひとつの実施形態では、i n d - a 1 - E M S 1 3 アレル（表 3 a ）など、特にバリリン（V a l ）残基による、配列番号 2 における I N D タンパク質の 1 5 9 位のアラニン（A l a ）残基あるいは本質的にこれと類似の配列の置換につながるミスセンス変異を含む部分ノックアウト突然変異株 I N D アレル

10

20

30

40

50

が得られる。さらにもうひとつの実施形態では、ind-c1-EMS08アレル(表3b)など、特にメチオニン(Met)残基による、配列番号4におけるINDタンパク質の136位のトレオニン(Thr)残基あるいは本質的にこれと類似の配列の置換につながるミスセンス変異を含む部分ノックアウト突然変異株INDアレルが得られる。別の実施形態では、ind-c1-EMS09アレル(表3b)など、特にトレオニン(Thr)残基による、配列番号4におけるINDタンパク質の139位のアラニン(Ala)残基あるいは本質的にこれと類似の配列の置換につながるミスセンス変異を含む部分ノックアウト突然変異株INDアレルが得られる。さらに別の実施形態では、ind-c1-EMS04アレル(表3b)など、特にシステイン(Cys)残基による、配列番号4におけるINDタンパク質の142位のアルギニン(Arg)残基あるいは本質的にこれと類似の配列の置換につながるミスセンス変異を含む部分ノックアウト突然変異株INDアレルが得られる。ind-a1-EMS06、ind-a1-EMS09、ind-a1-EMS13、ind-c1-EMS08、ind-c1-EMS09、ind-c1-EMS04アレルをホモ接合状態で含む基準種子については、NCIMB Limited (Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen, Scotland, AB21 9YA, UK)にて、2008年7月7日にそれぞれ受託番号NCIMB 41570、NCIMB 41571、NCIMB 41572、NCIMB 41573、NCIMB 41574、およびNCIMB 41575として寄託してある。

【0098】

【表6】

表 3a:IND-A1 のミスセンス変異

アミノ酸位置	ヌクレオチド位置		野生型 → 変異コドン	野生型 → 変異アミノ酸	アレル名	寄託番号
配列番号 2/6	配列番号1	配列番号5				
124	370	930	gtg → atg	VAL → MET	ind-a1-EMS06	NCIMB 41570
146	436	996	ggc → agc	GLY → SER	ind-a1-EMS09	NCIMB 41571
159*	476	1036	gcc → gtc	ALA → VAL	ind-a1-EMS13	NCIMB 41572

【0099】

【表7】

表 3b:IND-C1 のミスセンス変異

アミノ酸位置	ヌクレオチド位置		野生型 → 変異コドン	野生型 → 変異アミノ酸	アレル名	寄託番号
配列番号 4/8	配列番号3	配列番号7				
136	407	903	acg → atg	THR → MET	ind-c1-EMS08	NCIMB 41573
139*	415	911	gct → act	ALA → THR	ind-c1-EMS09	NCIMB 41574
142*	424	920	cgt → tgt	ARG → CYS	ind-c1-EMS04	NCIMB 41575

【0100】

もうひとつの実施形態では、部分ノックアウト突然変異株INDアレルind-a1-EMS13、ind-c1-EMS04、ind-c1-EMS09など、上述または表1に示す保存されたアミノ酸の1つ以上が置換され(表3では\*で示す)、INDタンパク質をコードするミスセンス変異を含む部分ノックアウト突然変異株INDアレルが得られる。Heim et al. (2003, Mol Biol Evol 20, 735~747)、Toledo-Ortiz et al. (2003, Plant Cell 15: 1749~1770)、Liljegren et al. (2004, Cell, 116, 843~853)ならびに国際特許出願公開第WO 09/068313号パンフレット(欧州特許出願第EP 07023052号の優先権を主張)に記載されているように、保存されたアミノ酸のいくつかはINDタンパク質の

生物活性が他のものよりも不可欠である。よって、たとえば、Heim et al. (上掲)によって定義されたコンセンサスbHLHドメイン配列の5位(ind-c1-EMS09など)、13位または10位(ind-a1-EMS05など)ならびに12位(ind-c1-EMS04など)でのアミノ酸などの置換につながるミスセンス変異は、INDタンパク質の標的DNAとの結合能が低下したため、活性の有意な低減につながりやすい。同様に、Heim et al. (上掲)によって定義されたコンセンサスbHLHドメイン配列の螺旋1の16位、20位、23位、27位または36位、39位、43位、49位(ind-a1-EMS13など)、螺旋2の53位および56位でのアミノ酸の置換などにつながるミスセンス変異も、INDタンパク質の二量体化能が低下することから、活性の有意な低減につながりやすい。

10

#### 【0101】

さらにもうひとつの実施形態では、本発明によって使用可能なミスセンス変異を含む部分ノックアウト突然変異株INDアレルは、シロイヌナズナ属(*Arabidopsis*)部分ノックアウトind-1(Liljegren et al., 2004, 上掲)アレルのミスセンス変異に対応するミスセンス変異を含むINDアレルである(表1参照)。

#### 【0102】

INDアレルのフレームシフト変異は、本明細書で使用する場合、変異下流の異なるフレームでの核酸配列の翻訳につながるINDアレルの変異(欠失、挿入、複製など)である。

20

#### 【0103】

本発明によるアミノ酸配列

得られるのは、アブラナ科(*Brassicaceae*)、特にアブラナ属(*Brassica*)の種、特にセイヨウアブラナ(*Brassica napus*)由来であるが、他のアブラナ属(*Brassica*)作物の種に由来するものでもある、部分ノックアウト突然変異株INDアミノ酸配列(すなわち、INDタンパク質の生物活性が有意に低減される1つ以上の変異を含むINDアミノ酸配列)である。たとえば、Aおよび/またはCゲノムを含むアブラナ属(*Brassica*)の種が、異なるIND-A1またはIND-C1アミノ酸をコードすることがあり、これらのアミノ酸は本発明の新規な部分ノックアウト突然変異株INDタンパク質と本質的に類似している。また、突然変異誘発方法を使用して、野生型INDアレルに変異を生成することで、本発明の部分ノックアウト突然変異株INDタンパク質と本質的に類似している別の突然変異株INDタンパク質をコード可能な突然変異株アレルを生成することが可能である。一実施形態では、アブラナ属(*Brassica*)植物内に突然変異株INDアミノ酸配列が得られる(すなわち内在性である)。しかしながら、本明細書では、単離状態のINDアミノ酸配列(植物から単離されるか、合成的に作られるなど)ならびにその変異体およびこれらのいずれかの断片も得られる。

30

#### 【0104】

本発明の新規な部分ノックアウト突然変異株INDタンパク質と本質的に類似しているアミノ酸配列は、本発明の部分ノックアウトINDアミノ酸配列のアミノ酸を、類似の特性(類似の疎水性、親水性、抗原性、螺旋構造またはシート構造を形成または破壊する傾向など)を有する他の他のアミノ酸で置換することによって得られる。保存された置換表は従来技術において周知である(たとえば、Creighton (1984) *Proteins*, W. H. Freeman and Companyおよび本特許出願の表4)。

40

#### 【0105】



【表 8】

表 4:保存されたアミノ酸置換の例

残基	同類置換	残基	同類置換
Ala	Ser	Leu	Ile, Val
Arg	Lys	Lys	Arg, Gln
Asn	Gln, His	Met	Leu, Ile
Asp	Glu	Phe	Met, Leu, Tyr
Gln	Asn	Ser	Thr, Gly
Cys	Ser	Thr	Ser, Val
Glu	Asp	Trp	Tyr
Gly	Pro	Tyr	Trp, Phe
His	Asn, Gln	Val	Ile, Leu
Ile	Leu, Val		

10

## 【0106】

野生型 IND - A1 および IND - C1 タンパク質の新規な部分ノックアウト突然変異株 IND アミノ酸配列がセイヨウアブラナ (*Brassica napus*) から単離されている。国際特許出願公開第 WO09/068313 号パンフレット (欧州特許出願第 EP 07023052 号の優先権を主張) に記載されているような野生型 IND 配列を配列番号 2 および配列番号 4 に示し、一方これらの配列ならびにこれらと本質的に類似した配列の新規な部分ノックアウト突然変異株 IND 配列については、野生型 IND 配列を参照して本明細書の後段ならびに実施例で説明する。上述したように、セイヨウアブラナ (*Brassica napus*) の野生型 IND タンパク質は、約 185 ~ 210 アミノ酸長であり、多数の構造的および機能的ドメインを含む。

20

## 【0107】

本発明による「IND - A1 アミノ酸配列」または「IND - A1 変異体アミノ酸配列」は、配列番号 2 との配列同一性が少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、98%、99% または 100% のアミノ酸配列である。これらのアミノ酸配列を、配列表に示す IND 配列と「本質的に類似している」または「本質的に同一である」と呼ぶこともある。

30

## 【0108】

本発明による「IND - C1 アミノ酸配列」または「IND - C1 変異体アミノ酸配列」は、配列番号 4 (IND - C1 - long) または配列番号 4 の 16 位のアミノ酸から 210 位のアミノ酸まで (IND - C1 - short) との配列同一性が少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、96%、97%、98%、99% または 100% のアミノ酸配列である。これらのアミノ酸配列を配列表に示す IND 配列と「本質的に類似している」または「本質的に同一である」と呼ぶこともある。

40

## 【0109】

よって、本発明は、アミノ酸配列の変異によって好ましくは対応する野生型 IND タンパク質の生物活性と比して IND タンパク質の生物活性を有意に低減する、野生型のアミノ酸配列の新規な部分ノックアウト突然変異株配列、機能的 IND - A1 および IND - C1 タンパク質 (その変異体および断片 (以下にてさらに定義) を含む) を提供するものである。IND タンパク質の生物活性の有意な低減とは、本明細書では、対応する野生型植物の耐裂莢性と比較して対応する野生型 IND タンパク質を発現している植物に比して、突然変異株 IND タンパク質を発現している植物の耐裂莢性が高まるように、DNA 結合活性、二量体化能および / または IND タンパク質の転写調節活性が低減されることを示す。

50

## 【0110】

内在性のアミノ酸配列と単離されたアミノ酸配列の両方が本明細書にて提供される。また、先に定義したIND変異体アミノ酸配列およびINDアミノ酸配列の断片も得られる。INDアミノ酸配列またはその変異体（先に定義したとおり）の「断片」は、IND配列（または変異体配列）の少なくとも10、12、15、18、20、50、100、150、175、180の連続したアミノ酸など、さまざまな長さであってもよい。

## 【0111】

機能的INDタンパク質のアミノ酸配列

配列表に示すアミノ酸配列は、セイヨウアブラナ (*Brassica napus*) 由来の野生型の機能的INDタンパク質である。よって、これらの配列は、単離元となったセイヨウアブラナ (*Brassica napus*) 植物にとっては内在性である。他のアブラナ属 (*Brassica*) 作物の種、変種、育種系統または野生到達種を、上述したようにアミノ酸配列が同一の他の機能的INDタンパク質またはその変異体についてスクリーニングしてもよい。

10

## 【0112】

また、本質的に類似の配列についてアミノ酸データベースをスクリーニングすることで、INDアミノ酸配列およびその変異体（またはこれらのいずれかの断片）をコンピュータで同定できる旨も理解されている。また、本発明によるアミノ酸分子の断片も得られる。断片としては、bHLHドメインのアミノ酸配列あるいは、bHLHドメインの一部を含むそれよりも小さな断片（基本ドメインまたはHLHドメインなど）があげられる。

20

## 【0113】

変異株INDタンパク質のアミノ酸配列

本発明は、配列表の配列番号2および4に示す野生型INDアミノ酸配列に対する1つ以上のアミノ酸の欠失、挿入または置換を含むアミノ酸配列を提供するものであり、こうしたアミノ酸配列の変異によって、野生型タンパク質に対してコードされたINDタンパク質ならびに当該変異アミノ酸分子の断片の生物活性が有意に低減すなわち、生物活性が部分ノックアウトされる。このような変異アミノ酸配列は、上述したように周知のさまざまな方法を用いて生成および/または同定可能である。繰り返すが、このようなアミノ酸分子は内在性の形態と単離された形態の両方で得られる。

## 【0114】

30

上述したように、基本的には、野生型INDタンパク質に対して少なくとも1つのアミノ酸の挿入、欠失および/または置換を含むINDタンパク質につながる野生型INDアミノ酸配列の変異によって、生物活性が有意に低減された状態または全くない状態につながる可能性がある。しかしながら、以下のことは理解できよう。タンパク質につながる変異など、INDタンパク質の特定の変異が他の変異よりもINDタンパク質の生物活性の完全排除につながりやすいため、DNA結合ドメイン（「b」）、二量体化ドメイン（「HLH」）および/または転写の調節に重要なアミノ酸（表1参照）などの機能ドメインの有意な部分が欠如するか変異することで、5位、9位、13位のGln (Q)、Ala (A)、Arg (R) アミノ酸またはHeim et al.（上掲；それぞれ配列番号10の123位、127位、131位および128位および130位に対応、表1参照）によって定義されたコンセンサスbHLHドメイン配列の10位および12位の塩基性アミノ酸残基（特にArg (R) 残基）など、これらのドメイン内にある特定の不可欠なアミノ酸残基が、好ましくは非類似または非保存アミノ酸によって欠如するか置換される一方で、表1に示す保存されたアミノ酸といった特定のアミノ酸の置換に至る変異など、タンパク質の他の変異は、INDタンパク質の生物活性の有意な低減につながりやすく、コードされたINDタンパク質の生物活性を完全に排除せずにより効率的でないDNA結合、効率のよくない二量体化および/またはあまり効率的でない転写調節を生じる。

40

## 【0115】

よって、一実施形態では、1つ以上の欠失または挿入変異を含むことで、欠失または挿入によって*in vivo*での活性が有意に低減された突然変異株タンパク質が生じる部

50

分ノックアウト突然変異株 I N D タンパク質が得られる。当該突然変異株 I N D タンパク質は、野生型 I N D タンパク質と比べて少なくとも 1、少なくとも 2、3、4、5、10、20、30、50、100、100、150、175、180 またはそれより多くのアミノ酸が欠失または挿入されることで、欠失または挿入が、i n v i v o での活性が有意に低減された突然変異株タンパク質につながる I N D タンパク質である。

#### 【0116】

もうひとつの実施形態では、切断されることで、この切断が i n v i v o での活性が有意に低減された突然変異株タンパク質につながる部分ノックアウト突然変異株 I N D タンパク質が得られる。このような切断された I N D タンパク質は、対応する野生型 I N D タンパク質の C 末端部分に機能的ドメインを欠いており、対応する野生型 I N D タンパク質の N 末端部分が維持された I N D タンパク質である。よって、一実施形態では、H2 ドメインの保存された L e u 残基 ( H e i m e t a l . , 2003 によって説明されているように、コンセンサス b H L H ドメイン配列の 56 位 ; 上記参照 ) までの対応する野生型 I N D タンパク質の N 末端部分を含む部分ノックアウト突然変異株 I N D タンパク質が得られる。野生型タンパク質との比較で突然変異株タンパク質が切断されればされるほど、一層多くの切断が I N D タンパク質の有意に低減された活性につながる可能性がある。突然変異株 I N D タンパク質が生物活性をいくらか維持するためには、少なくとも D N A 結合 ( b ) ドメインを含む必要があると考えられている。よって、もうひとつの実施形態では、第 2 の H ドメインの一部または全部を欠いたおよび / または L ドメインの一部または全部を欠いたおよび / または第 1 の H ドメインの一部または全部を欠いた ( 表 1 参照 ) 対応する野生型 I N D タンパク質の N 末端部分を含む部分ノックアウト突然変異株 I N D タンパク質が得られる。

#### 【0117】

さらにもうひとつの実施形態では、1つ以上の置換変異を含むことで、置換によって i n v i v o での活性が有意に低減された突然変異株タンパク質が得られる、部分ノックアウト突然変異株 I N D タンパク質が得られる。一実施形態では、i n d - a 1 - E M S 06 アレル ( 表 3 a ) によってコードされる部分ノックアウト突然変異株 I N D タンパク質など、特にメチオニン ( M e t ) 残基による、配列番号 2 における I N D タンパク質の 124 位のバリン ( V a l ) 残基あるいは本質的にこれと類似の配列の置換につながる置換変異を含む部分ノックアウト突然変異株 I N D タンパク質が得られる。もうひとつの実施形態では、i n d - a 1 - E M S 09 アレル ( 表 3 a ) によってコードされる部分ノックアウト突然変異株 I N D タンパク質など、特にセリン ( S e r ) 残基による、配列番号 2 における I N D タンパク質の 146 位のグリシン ( G l y ) 残基あるいは本質的にこれと類似の配列の置換につながる置換変異を含む部分ノックアウト突然変異株 I N D タンパク質が得られる。さらにもうひとつの実施形態では、i n d - a 1 - E M S 13 アレル ( 表 3 a ) によってコードされる部分ノックアウト突然変異株 I N D タンパク質など、特にバリン ( V a l ) 残基による、配列番号 2 における I N D タンパク質の 159 位のアラニン ( A l a ) 残基あるいは本質的にこれと類似の配列の置換につながる置換変異を含む部分ノックアウト突然変異株 I N D タンパク質が得られる。さらにもうひとつの実施形態では、i n d - c 1 - E M S 08 アレル ( 表 3 b ) によってコードされる部分ノックアウト突然変異株 I N D タンパク質など、特にメチオニン ( M e t ) 残基による、配列番号 4 における I N D タンパク質の 136 位のトレオニン ( T h r ) 残基あるいは本質的にこれと類似の配列の置換につながる置換変異を含む部分ノックアウト突然変異株 I N D タンパク質が得られる。別の実施形態では、i n d - c 1 - E M S 09 アレル ( 表 3 b ) によってコードされる部分ノックアウト突然変異株 I N D タンパク質など、特にトレオニン ( T h r ) 残基による、配列番号 4 における I N D タンパク質の 139 位のアラニン ( A l a ) 残基あるいは本質的にこれと類似の配列の置換につながる置換変異を含む部分ノックアウト突然変異株 I N D タンパク質が得られる。さらに別の実施形態では、i n d - c 1 - E M S 04 アレル ( 表 3 b ) によってコードされる部分ノックアウト突然変異株 I N D タンパク質など、特にシステイン ( C y s ) 残基による、配列番号 4 における I N D タンパク

質の142位のアルギニン(Arg)残基あるいは本質的にこれと類似の配列の置換につながる置換変異を含む部分ノックアウト突然変異株INDタンパク質が得られる。

#### 【0118】

もうひとつの実施形態では、ind-a1-EMS13、ind-c1-EMS04またはind-c1-EMS09(表3において\*で示す)によってコードされる部分ノックアウト突然変異株INDタンパク質など、上述したような、あるいは表1に示す、保存されたアミノ酸残基の置換につながる置換変異を含む部分ノックアウト突然変異株INDタンパク質が得られる。

#### 【0119】

本発明による方法

本発明のもうひとつの態様では、少なくとも1つの部分および/または少なくとも1つの完全ノックアウトindアレルを含有する裂開種子植物ならびにその細胞、一部分、種子および後代を生成および選択するための方法が得られる。特に、たとえばアブラナ属(Brassica)IND-A1およびIND-C1遺伝子の2つの異なる遺伝子座の少なくとも1つなど、ゲノムの少なくとも2つの異なるIND遺伝子座の少なくとも1つに少なくとも1つの部分および/または少なくとも1つの完全ノックアウトindアレルを含有する、少なくとも2つのIND遺伝子を含むアブラナ属(Brassica)植物、特にセイヨウアブラナ(Brassica napus)植物ならびにその細胞、一部分、種子および後代を生成および選択するための方法ならびに、裂開種子植物または植物の一部において完全ノックアウトindアレル、部分ノックアウトindアレルの存在と野生型INDアレルの存在とを区別する方法が得られる。よって、このようなindアレルを含む部分ノックアウトindアレルおよび/または完全ノックアウトindアレルまたは裂開種子植物または植物の一部を生成および/または同定するための(突然変異誘発および/またはマーカーによる選択など)方法ならびに、好適な数の部分ノックアウトindアレルおよび/または完全ノックアウトindアレルおよび/または異なるタイプの部分ノックアウトindアレルおよび/または完全ノックアウトindアレルを単一の裂開種子植物で組み合わせ、植物の果実裂開特性を変化させる、特に脱粒を低減または脱粒を収穫後まで遅延させると同時に、莢の農学的に妥当な脱穀性を維持するための方法が得られる。

#### 【0120】

本発明による部分および完全ノックアウト突然変異株indアレルは、たとえば、indゲノムまたはcDNAの一部または全部を増幅するためのPCRベースの方法を用いるなど、従来技術において周知の広範にわたる方法を用いて生成(たとえば突然変異誘発によって誘導)および/または同定できるものである。

#### 【0121】

突然変異誘発後、周知の技術を用いて、処理した種子から植物を生育させるか、処理した細胞から再生させる。たとえば、従来の生育手順で変異原化種子を蒔くと、以後はその植物に自家受粉種子を形成できる。あるいは、Coventry et al.(1988, Manual for Microspore Culture Technique for Brassica napus, Dep. Crop Sci. Techn. Bull. OAC Publication 0489, Univ. of Guelph, Guelph, Ontario, Canada)などによって説明されているように、処理した小孢子または花粉細胞から倍加半数体小植物を抽出し、ホモ接合植物をすみやかに形成してもよい。現段階または以後の生成においてこのような自家受粉の結果として形成される別の種子を収穫し、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)ベースの技術(indアレルの増幅)またはハイブリダイゼーションベースの技術(サザンブロット解析など)、BACライブラリスクリーニングなどおよび/またはindアレルの直接配列決定などの従来技術において周知の技術を用いて突然変異株INDアレルの存在をスクリーニングしてもよい。突然変異株INDアレルで点変異(いわゆる単一ヌクレオチド多型すなわちSNP)の存在をスクリーニングするには、たとえばオリゴライゲー

10

20

30

40

50

ションベースの技術、一塩基伸長ベースの技術あるいは、TILLINGなど制限部位における差異に基づく技術といった従来技術において周知のSNP検出方法を用いることが可能である。

#### 【0122】

上述したように、特定の野生型INDアレルの変異原化（自然ならびに誘導）によって、得られる突然変異株INDアレルに1つ以上の欠失、挿入または置換ヌクレオチド（以下、「変異領域」と呼ぶ）が生じる。よって、突然変異株INDアレルは、野生型INDアレルの1つ以上の欠失、挿入または置換ヌクレオチドの場所とコンフィギュレーションによってキャラクタライズ可能である。野生型INDアレルにおける1つ以上のヌクレオチドが挿入、欠失または置換された部位をそれぞれ、本明細書では「変異領域または配列」とも呼ぶ。「5'または3'フランキング領域または配列」とは、本明細書で使用する場合、1つ以上の欠失、挿入または置換ヌクレオチドを含有するDNAとは異なる、少なくとも20bp、好ましくは少なくとも50bp、少なくとも750bp、少なくとも1500bp、最大5000bpのDNAの突然変異株（または対応する野生型）INDアレルにおけるDNA領域または配列、好ましくは、突然変異株INDアレル（または対応する野生型INDアレル）の変異領域のすぐ上流に位置してこれと連続している（5'フランキング領域または配列）か、すぐ下流に位置してこれと連続している（3'フランキング領域または配列）突然変異株（または対応する野生型）INDアレル由来のDNAを示す。「連結領域」とは、本明細書で使用する場合、突然変異株（または対応する野生型）INDアレルの変異領域と5'または3'フランキング領域とが互いに結合されたDNA領域を示す。よって、「変異領域と5'または3'フランキング領域との間にまたがる連結領域の配列は、変異配列だけでなくこれと連続したフランキング配列も含む。

#### 【0123】

特定の突然変異株INDアレルあるいは、特定の突然変異株INDアレルを含む植物または植物材料、あるいは特定の突然変異株INDアレルを含む植物材料を含む生成物を同定するために開発された道具では、変異領域、分子マーカーまたはフランキングおよび/または変異領域の配列を含むゲノム領域の特定の制限地図など、対応する野生型INDアレルの特徴であるゲノムではなく、特定の突然変異株INDアレルの特徴である特定のゲノムを利用している。

#### 【0124】

特定の突然変異株INDアレルの配列を決定したら、分子生物学的な技術によって、試料の核酸（DNAまたはRNA）において突然変異株INDアレルの5'フランキング、3'フランキングおよび/または変異領域内の配列を特異的に認識するプライマーおよびプローブを開発することができる。たとえば、PCR法を開発し、生体試料（植物の試料、植物材料または植物材料を含む生成物など）における突然変異株INDアレルを同定することが可能である。このようなPCRでは、少なくとも2つの特異的「プライマー」すなわち、一方が突然変異株INDアレルの5'または3'フランキング領域内の配列を認識し、他方が突然変異株INDアレルの3'または5'フランキング領域内の配列を認識する；または一方が突然変異株INDアレルの5'または3'フランキング領域内の配列を認識し、他方が突然変異株INDアレルの変異領域内の配列を認識する；または一方が突然変異株INDアレルの5'または3'フランキング領域内の配列を認識し、他方が（以下においてさらに説明するような）特定の突然変異株INDアレルの3'または5'フランキング領域と変異領域との間の連結領域の配列を認識するものを利用している。

#### 【0125】

特定の突然変異株INDアレルを含む核酸試料から特定の断片（「突然変異株IND特異的断片」または識別用の単位複製配列）が増幅されるように、プライマーは、最適化したPCR条件下で、5'または3'フランキング領域内の配列、変異領域内の配列あるいは、特定の突然変異株INDアレルの3'または5'フランキングと変異領域との間の連結領域の配列を「特異的に認識する」15～35ヌクレオチドの配列を有するものであると好ましい。これは、最適化したPCR条件下では標的となる突然変異株INDアレルだ

けが増幅され、植物ゲノムの他の配列は増幅されないことを意味する。

【0126】

本発明に適したPCRプライマーは以下のものであり得る。

- 長さが17nt～約200ntの範囲で、特定の突然変異株INDアレルの5'または3'フランキング配列あるいはそれらの相補体(すなわち、上述したナンセンス、ミスセンスまたはフレームシフト変異を5'または3'フランキングする配列あるいは、上記の表に示すSTOPコドン変異を5'または3'フランキングする配列あるいは、上記にて示す置換変異またはそれらの相補体など、本発明の突然変異株INDアレルで欠失、挿入または置換された1つ以上のヌクレオチドを5'または3'フランキングする配列など)から選択される少なくとも17の連続したヌクレオチド、好ましくは20の連続したヌクレオチドからなるヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチド(5'フランキング配列を認識するプライマー);または

- 長さが17nt～約200ntの範囲で、特定の突然変異株INDアレルの変異領域の配列あるいはそれらの相補体(すなわち、本発明のIND遺伝子において挿入または置換されたヌクレオチドの配列あるいはそれらの相補体など)(変異配列を認識するプライマー)から選択される少なくとも17の連続したヌクレオチド、好ましくは20のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列。

【0127】

もちろん、プライマーは、上述した17の連続したヌクレオチドより長くてもよく、長さ18、19、20、21、30、35、50、75、100、150、200ntまたはそれよりも長くてもよい。プライマーは、全体がフランキング配列および変異配列の上述したヌクレオチド配列から選択されるヌクレオチド配列からなるものであってもよい。しかしながら、5'末端におけるプライマーのヌクレオチド配列(すなわち3'側にある17の連続したヌクレオチドの外)は、それほど不可欠ではない。よって、プライマーの5'配列は、適宜フランキング配列または変異配列から選択されるヌクレオチド配列からなるものであってもよいが、いくつかの(1、2、5、10など)ミスマッチを含むものであってもよい。プライマーの5'配列は、全体が制限酵素認識部位を表すヌクレオチド配列などのフランキング配列または変異配列とは無関係のヌクレオチド配列からなるものであってもよい。このような無関係の配列またはミスマッチを含むフランキングDNA配列は、好ましくは100ヌクレオチドを超えないものとし、一層好ましくは50ヌクレオチドまたは25ヌクレオチドすら超えないものとする。

【0128】

さらに、好適なプライマーは、ヌクレオチド配列が変異領域またはフランキング領域のいずれかだけに由来するものではないという条件で、フランキング配列と変異配列との間にある連結領域(すなわち、本発明の突然変異株INDアレルにおいて欠失、挿入または置換された1つ以上のヌクレオチドを5'または3'フランキングする配列と、挿入または置換された1つ以上のヌクレオチドの配列との間の連結領域あるいは、上述した本発明のIND遺伝子におけるナンセンス、ミスセンスまたはフレームシフト変異を5'または3'フランキングする配列と、ナンセンス、ミスセンスまたはフレームシフト変異の配列との間の連結領域など、欠失された1つ以上のヌクレオチドをそれぞれ3'または5'フランキングする配列あるいは、上記の表に示すような潜在的なSTOPコドン変異または上記にて示した置換変異を5'または3'フランキングする配列と潜在的なSTOPコドン変異または置換変異の配列との間の連結領域など)のヌクレオチド配列を含むまたはそれからなるものであってもよい。

【0129】

また、適切に選択したPCRプライマー対が互いに相補の配列を含まないものとすべき旨も、当業者であればすぐにわかるであろう。

【0130】

本発明の目的で、「配列番号Xで表されるヌクレオチド配列の相補体」は、シャルガフ則(A T; G C)に基づいてヌクレオチドを自らの相補的ヌクレオチドで置換し

10

20

30

40

50

、5'から3'方向すなわち表記のヌクレオチド配列とは逆方向に配列を読み取るすることで、表記のヌクレオチド配列由来となり得るヌクレオチド配列である。

【0131】

特定の突然変異株INDアレルを同定するのに適したプライマーの例については実施例で説明する。

【0132】

本明細書で使用する場合、「位置Xから位置Yの配列番号Zのヌクレオチド配列」とは、両方のヌクレオチド端点を含むヌクレオチド配列を示す。

【0133】

好ましくは、増幅された断片は、50～500ヌクレオチド長または100～350ヌクレオチド長など、長さが50～1000ヌクレオチドである。最適化したPCR条件下で、ミスマッチによってこれらのプライマーを用いる特定の突然変異株INDアレルの特異的同定が可能であるかぎり、特異的プライマーは、特定の突然変異株INDアレルの5'または3'フランキング領域内の配列、変異領域内の配列または3'または5'フランキング領域と変異領域との間の連結領域の配列と80～100%同一の配列を有するものであってもよい。しかしながら、許容可能なミスマッチの範囲は、実験によって容易に求められ、当業者間で周知である。

10

【0134】

「突然変異株IND特異的断片」の検出および/または同定は、ゲル電気泳動またはキャピラリー電気泳動後のサイズ推定または蛍光ベースの検出方法によるなど、さまざまな方法で起こり得る。また、突然変異株IND特異的断片を直接的に配列決定してもよい。増幅されたDNA断片を検出するための他の配列特異的方法も従来技術において周知である。

20

【0135】

標準PCRプロトコールについては、「PCR Applications Manual」(Roche Molecular Biochemicals, 2nd Edition, 1999)および他の参考文献など、従来技術において説明されている。特異的プライマーの配列をはじめとするPCRに最適な条件は、特定の突然変異株INDアレルそれぞれについての「PCR同定プロトコール」に指定されている。しかしながら、PCR同定プロトコールの多数のパラメータが、特定の実験室条件に合わせて調整を必要とする場合があり、類似の結果を得るのにわずかに修飾してもよいことは理解できよう。たとえば、DNAの調製に異なる方法を使用するには、使用するプライマーの量、ポリメラーゼ、MgCl<sub>2</sub>濃度またはアニーリング条件などの調整が必要な場合がある。同様に、他のプライマーを選択することで、PCR同定プロトコールに合った他の最適な条件を指示する場合もある。しかしながら、これらの調整は当業者間で周知であり、さらに、先に引用したものなどの現行のPCRアプリケーションマニュアルに一層詳細に説明されている。

30

【0136】

特定の突然変異株INDアレルを同定するためのPCR同定プロトコールの例については実施例で説明する。

40

【0137】

あるいは、特異的プライマーを用いて、生体試料における特定の突然変異株INDアレルを同定するための「特異的プローブ」として使用可能な突然変異株IND特異的断片を増幅することも可能である。プローブと核酸のその対応する断片とのハイブリダイゼーションを可能にする条件下で生体試料の核酸をプローブと接触させると、核酸/プローブハイブリッドが形成される。このハイブリッドの形成は、(核酸またはプローブの標識など)検出可能であり、このハイブリッドが形成されると特定の突然変異株INDアレルが存在していることがわかる。このような特異的プローブとのハイブリダイゼーションを利用した同定方法(固相キャリア上または溶液中のいずれか)については、従来技術において説明されている。特異的プローブは、好ましくは、最適化された条件下で、特定の突然変

50

異株 I N D アレルの 5' または 3' フランキング領域内および / または変異領域内の領域（以下、「突然変異株 I N D 特異的領域」と呼ぶ）に対して特異的にハイブリダイズする配列である。好ましくは、特異的プローブは、特定の領域のヌクレオチド配列に対して少なくとも 80 %、好ましくは 80 ~ 85 %、一層好ましくは 85 ~ 90 %、特に好ましくは 90 ~ 95 %、最も好ましくは 95 % ~ 100 % 同一（または相補的）である、10 ~ 1000 bp、50 ~ 600 bp、100 ~ 500 bp、150 ~ 350 bp の配列を含む。好ましくは、特異的プローブが、特定の突然変異株 I N D アレルの特定の領域に対して同一（または相補的）である約 13 ~ 約 100 の連続したヌクレオチドからなる配列を含む。

#### 【0138】

本発明に適した特異的プローブは以下のものであり得る。

- 長さが 13 nt ~ 約 1000 nt の範囲で、特定の突然変異株 I N D アレルの 5' または 3' フランキング配列あるいはそれらの相補体（すなわち、上述したナンセンス、ミスセンスまたはフレームシフト変異を 5' または 3' フランキングする配列あるいは、上記の表に示す潜在的な S T O P コドン変異を 5' または 3' フランキングする配列あるいは、上記にて示す置換変異など、本発明の突然変異株 I N D アレルで欠失、挿入または置換された 1 つ以上のヌクレオチドを 5' または 3' フランキングする配列など）あるいはそれに対して少なくとも 80 % 配列同一性の配列（5' フランキング配列を認識するプローブ）から選択される少なくとも 13 の連続したヌクレオチドからなるヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチド；または

- 長さが 13 nt ~ 約 1000 nt の範囲で、特定の突然変異株 I N D アレルの変異配列あるいはそれらの相補体（すなわち、本発明の I N D 遺伝子において挿入または置換されたヌクレオチドの配列あるいはそれらの相補体など）あるいはそれに対して少なくとも 80 % 配列同一性の配列（変異配列を認識するプローブ）から選択される少なくとも 13 の連続したヌクレオチドからなるヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチド。

#### 【0139】

プローブは、全体がフランキング配列および変異配列の上述したヌクレオチド配列から選択されるヌクレオチド配列からなるものであってもよい。しかしながら、その 5' または 3' 末端におけるプローブのヌクレオチド配列は、それほど不可欠ではない。よって、プローブの 5' または 3' 配列は、適宜フランキング配列または変異配列から選択されるヌクレオチド配列からなるものであってもよいが、フランキング配列または変異配列とは無関係のヌクレオチド配列からなるものであってもよい。このような無関係の配列は、好ましくは 50 ヌクレオチドより長くないものとし、一層好ましくは 25 ヌクレオチドより長くない、あるいは 20 または 15 ヌクレオチドより長くないものとする。

#### 【0140】

さらに、好適なプローブは、上述したヌクレオチド配列が変異領域またはフランキング領域のいずれかだけに由来するものではないという条件で、フランキング配列と変異配列との間にある連結領域（すなわち、本発明の突然変異株 I N D アレルにおいて欠失、挿入または置換された 1 つ以上のヌクレオチドを 5' または 3' フランキングする配列と、挿入または置換された 1 つ以上のヌクレオチドの配列との間の連結領域あるいは、上述した本発明の I N D 遺伝子におけるナンセンス、ミスセンスまたはフレームシフト変異を 5' または 3' フランキングする配列と、ナンセンス、ミスセンスまたはフレームシフト変異の配列との間の連結領域など、欠失された 1 つ以上のヌクレオチドをそれぞれ 3' または 5' フランキングする配列あるいは、上記の表に示すような潜在的な S T O P コドン変異または上記にて示した置換変異を 5' または 3' フランキングする配列と潜在的な S T O P コドンまたは置換変異の配列との間の連結領域など）のヌクレオチド配列を含むまたはそれからなるものであってもよい。

#### 【0141】

特定の突然変異株 I N D アレルを同定するのに適した特異的プローブについては実施例で説明する。



## 【0142】

特異的プローブとハイブリダイズされる「突然変異株IND特異的領域」の検出および/または同定は、ゲル電気泳動後のサイズ推定または蛍光ベースの検出方法によるなど、さまざまな方法で起こり得る。特異的プローブとハイブリダイズされる「突然変異株IND特異的領域」を検出するための他の配列特異的方法も従来技術において周知である。

## 【0143】

あるいは、高速中性子突然変異誘発によって生成される欠失突然変異株のスクリーニングにPCRを用いる「Delete-a-gene (商標)」方法 (Li and Zhang, 2002, *Funct Integr Genomics* 2:254~258) によって概説)、ヘテロ二本鎖解析で塩基対の変化を検出する変性高速液体クロマトグラフィ (DHPLC) を用いてEMS誘導点変異を同定するTILLING (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes) 方法 (McCallum et al., 2000, *Nat Biotech* 18:455およびMcCallum et al., 2000, *Plant Physiol.* 123, 439~442) によるなどの他の方法を用いて、1つ以上の突然変異株indアレルを含む植物または植物の一部を生成および同定することが可能である。上述したように、TILLINGでは変異の高スループットスクリーニングを使用する (突然変異株-野生型DNAヘテロ二本鎖のCell 1切断とシーケンシングゲルシステムでの検出を用いるなど)。よって、TILLINGを用いて1つ以上の突然変異株indアレルを含む植物または植物の一部を同定することならびに、当該植物、植物器官、組織および種子を生成および同定するための方法も本明細書に包含される。よって、一実施形態では、本発明による方法は、植物の種子を変異原化 (EMS突然変異誘発など) し、植物個体またはDNAをプールし、対象となる領域のPCR増幅、ヘテロ二本鎖形成および高スループット検出、突然変異株植物の同定、突然変異株PCR産物を配列決定するステップを含む。このような突然変異株植物の生成に他の突然変異誘発および選択方法も等しく使用できることは理解できよう。

## 【0144】

INDアレルに変異を誘導する代わりに、従来技術において周知の方法で天然の (自然な) 突然変異株アレルを同定してもよい。たとえば、ECOTILLINGを用いて (Henikoff et al., 2004, *Plant Physiology* 135 (2):630~6) 複数の植物または植物の一部で天然の突然変異株indアレルの存在をスクリーニングしてもよい。上記の突然変異誘発技術については、同定されるindアレルをあとで交雑 (種間または種内交雑) と選択によってセイヨウアブラナ (*Brassica napus*) などの他のアブラナ属 (*Brassica*) の種に導入できるように、Aおよび/またはCゲノムを含むアブラナ属 (*Brassica*) の種をスクリーニングすると好ましい。ECOTILLINGでは、育種系統または関連の種における天然の多型を上述したTILLING方法でスクリーニングするが、この場合は個々の植物または植物のプールを、ind標的のPCR増幅、ヘテロ二本鎖形成および高スループット解析に使用する。続いて、あとから所望の突然変異株アレルを取り込むための育種プログラムで使用可能な所望の変異を有する個々の植物を選択することができる。

## 【0145】

次に、同定された突然変異株アレルを配列決定することができ、その配列を野生型アレルと比較して変異を同定することができる。任意に、先に示したような官能性を試験しても構わない。この手法を使用して、複数の突然変異株indアレル (と、これらを1つ以上含むアブラナ属 (*Brassica*) 植物) を同定することが可能である。その後、以下においてさらに説明するような交雑および選択方法によって、所望の突然変異株アレルを所望の野生型アレルと組み合わせることができる。最後に、所望数の突然変異株indと所望数の野生型INDアレルとを含む単一の植物を生成する。

## 【0146】

特定の突然変異株INDアレルを検出するためのPCRプライマーまたは特異的プロー

ブとして適したオリゴヌクレオチドを使用して、特定の突然変異株 I N D アレルの接合状態を判断する方法を開発することも可能である。

【 0 1 4 7 】

特定の突然変異株 I N D アレルの接合状態を判断するには、P C R ベースのアッセイを開発して、突然変異株および / または対応する野生型 I N D 特異的アレルの存在を判断することが可能である。

【 0 1 4 8 】

特定の突然変異株 I N D アレルの接合状態を判断するのに、野生型 I N D アレルを特異的に認識する 2 つのプライマーが互いに指向して両プライマー間に存在する変異領域を有するように、これらのプライマーを設計してもよい。これらのプライマーは、それぞれ 5 ' および 3 ' フランキング配列を特異的に認識するプライマーであってもよい。この一組のプライマーによって、突然変異株ならびに対応する野生型 I N D アレルの同時診断 P C R 増幅が可能になる。

【 0 1 4 9 】

あるいは、特定の突然変異株 I N D アレルの接合状態を判断するのに、野生型 I N D アレルを特異的に認識する 2 つのプライマーが互いに指向し、そのうち一方が変異領域を特異的に認識するように、これらのプライマーを設計してもよい。これらのプライマーは、野生型 I N D アレルの 5 ' または 3 ' フランキング領域および変異領域の配列をそれぞれ特異的に認識するプライマーである。この一組のプライマーは、突然変異株 I N D アレルの変異領域の配列を特異的に認識する第 3 のプライマーと一緒に、突然変異株 I N D 遺伝子ならびに野生型 I N D 遺伝子の同時診断 P C R 増幅を可能にするものである。

【 0 1 5 0 】

あるいは、特定の突然変異株 I N D アレルの接合状態を判断するのに、野生型 I N D アレルを特異的に認識する 2 つのプライマーが互いに指向し、そのうち一方が 5 ' または 3 ' フランキング領域と変異領域との間の連結領域を特異的に認識するように、これらのプライマーを設計してもよい。これらのプライマーは、野生型 I N D アレルの 5 ' または 3 ' フランキング配列ならびに、変異領域と 3 ' または 5 ' フランキング領域との間の連結領域をそれぞれ特異的に認識するプライマーであってもよい。この一組のプライマーは、突然変異株 I N D アレルの変異領域と 3 ' または 5 ' フランキング領域との間の連結領域をそれぞれ特異的に認識する第 3 のプライマーと一緒に、突然変異株 I N D 遺伝子ならびに野生型 I N D 遺伝子の同時診断 P C R 増幅を可能にするものである。

【 0 1 5 1 】

あるいは、突然変異株および野生型 I N D アレルを特異的に認識する別のプライマーセットを用いて特定の突然変異株 I N D アレルの接合状態を判断することも可能である。

【 0 1 5 2 】

植物が突然変異株 I N D 遺伝子または対応する野生型 I N D 遺伝子にとってホモ接合である場合、上述した診断 P C R アッセイでは突然変異株または野生型 I N D アレルのいずれかに典型的、好ましくは長さの点で典型的な単一の P C R 産物を生じることになる。植物が突然変異株 I N D アレルにとってヘテロ接合である場合、突然変異株と野生型 I N D アレルの増幅の両方を反映して 2 つの特異的 P C R 産物が現れる。

【 0 1 5 3 】

野生型および突然変異株 I N D 特異的 P C R 産物の同定は、ゲル電気泳動またはキャピラリー電気泳動後のサイズ推定（野生型と突然変異株 I N D アレルから増幅された断片をゲル上で可視的に分離できるよう前記断片間のサイズ差につながる多数の挿入または欠失されたヌクレオチドを含む突然変異株 I N D アレルなど）；ゲル電気泳動またはキャピラリー電気泳動後に 2 つの異なる断片の存在または不在を評価する（それによって突然変異株 I N D アレルの診断 P C R 増幅を、任意に、野生型 I N D アレルの診断 P C R 増幅とは別に実施可能になる）；増幅された断片の直接配列決定；または蛍光ベースの検出方法によって起こり得る。

【 0 1 5 4 】

10

20

30

40

50

特定の突然変異株 I N D アレルの接合状態を判断するのに適したプライマーの例については実施例で説明する。

【 0 1 5 5 】

あるいは、特定の突然変異株 I N D アレルの接合状態を判断するのに、ハイブリダイゼーション - ベースのアッセイを開発し、突然変異株および / または対応する野生型 I N D 特異的アレルの存在を判断してもよい。

【 0 1 5 6 】

特定の突然変異株 I N D アレルの接合状態を判断するのに、各プローブが I N D 野生型アレル内の特異的に認識し、プローブによって認識された配列間に変異領域が存在するような形で、野生型 I N D アレルを認識する 2 つの特異的プローブを設計してもよい。これらのプローブは、5 ' および 3 ' フランキング配列をそれぞれ特異的に認識するプローブであってもよい。これらのプローブのうち的一方または好ましくは両方を用いると、突然変異株ならびに対応する野生型 I N D アレルの同時診断ハイブリダイゼーションが可能になる。

【 0 1 5 7 】

あるいは、特定の突然変異株 I N D アレルの接合状態を判断するのに、2 つの特異的プローブのうち的一方が変異領域の上流または下流、好ましくは変異領域の上流の I N D 野生型アレル内の配列を特異的に認識し、一方が変異領域を特異的に認識するように、野生型 I N D アレルを認識する 2 つの特異的プローブを設計してもよい。これらのプローブは、野生型 I N D アレルの 5 ' または 3 ' フランキング領域の配列、好ましくは 5 ' フランキング領域の配列と、変異領域とをそれぞれ特異的に認識するプローブであってもよい。これらのプローブのうち的一方または好ましくは両方を、任意に、突然変異株 I N D アレルにおける変異領域の配列を特異的に認識する第 3 のプローブと一緒に用いると、突然変異株および野生型 I N D 遺伝子の診断ハイブリダイゼーションが可能になる。

【 0 1 5 8 】

あるいは、特定の突然変異株 I N D アレルの接合状態を判断するのに、野生型 I N D アレルの 5 ' または 3 ' フランキング領域、好ましくは 5 ' フランキング領域と変異領域との間の連結領域を特異的に認識するプローブで、野生型 I N D アレルを認識する特異的プローブを設計してもよい。このプローブは、任意に、突然変異株 I N D アレルの 5 ' または 3 ' フランキング領域、好ましくは 5 ' フランキング領域と変異領域との間の連結領域を特異的に認識する第 2 のプローブと一緒に、突然変異株および野生型 I N D 遺伝子の診断ハイブリダイゼーションを可能にする。

【 0 1 5 9 】

あるいは、突然変異株および野生型 I N D アレルを特異的に認識する別のプローブの組を用いて特定の突然変異株 I N D アレルの接合状態を判断することも可能である。

【 0 1 6 0 】

植物が突然変異株 I N D 遺伝子または対応する野生型 I N D 遺伝子にとってホモ接合である場合、上述した診断ハイブリダイゼーションアッセイでは、突然変異株または野生型 I N D アレルのいずれかに典型的、好ましくは長さの点で典型的な、1 つ以上のハイブリダイズ用 D N A ( 制限 ) 断片などの単一の特異的ハイブリダイゼーション産物を生じることになる。植物が突然変異株 I N D アレルにとってヘテロ接合である場合、突然変異株と野生型 I N D アレルのハイブリダイゼーションの両方を反映して 2 つの特異的ハイブリダイゼーション産物が現れる。

【 0 1 6 1 】

野生型および突然変異株 I N D 特異的ハイブリダイゼーション産物の同定は、ゲル電気泳動またはキャピラリー電気泳動後のサイズ推定 ( 野生型と突然変異株 I N D アレル由来のハイブリダイズ用 D N A ( 制限 ) 断片をゲル上で可視的に分離できるよう前記断片間のサイズ差につながる多数の挿入または欠失されたヌクレオチドを含む突然変異株 I N D アレルなど ) ; ゲル電気泳動またはキャピラリー電気泳動後に 2 つの異なる特異的ハイブリダイゼーション産物の存在または不在を評価する ( それによって突然変異株 I N D アレル

の診断ハイブリダイゼーションを、任意に、野生型 I N D アレルの診断ハイブリダイゼーションとは別に実施可能になる) ; ハイブリダイズ用 D N A (制限)断片の直接配列決定 ; または蛍光ベースの検出方法によって起こり得る。

【 0 1 6 2 】

特定の突然変異株 I N D アレルの接合状態を判断するのに適したプローブの例については実施例で説明する。

【 0 1 6 3 】

さらに、本明細書に記載の特定の突然変異株 I N D アレル特異的配列情報を用いて、P C R - またはハイブリダイゼーションベースの増幅方法とは異なる特定の突然変異株 I N D アレルに特異的な検出方法を開発することも可能である。このような別の検出方法としては、Invader (商標) 技術 (参照により本明細書に援用する米国特許第 5 , 9 8 5 , 5 5 7 号明細書「Invasive Cleavage of Nucleic Acids」、同第 6 , 0 0 1 , 5 6 7 号明細書「Detection of Nucleic Acid sequences by Invader Directed Cleavage」などに記載) としても知られる特定の核酸構造の侵入切断を利用した線形シグナル増幅検出方法、Taqman などの R T - P C R ベースの検出方法、あるいは S N P l e x、S i n g l e B a s e 伸長 (S B E) といった他の検出方法などがあげられる。簡単に説明すると、Invader (商標) 技術では、標的変異配列を、たとえば変異配列または 5 ' フランキング領域と変異領域との間の連結領域の配列のヌクレオチド配列を含む標識した第 1 の核酸オリゴヌクレオチドならびに、変異配列のすぐ下流で変異配列と隣接した 3 ' フランキング配列を含む第 2 の核酸オリゴヌクレオチドとハイブリダイズすればよく、この場合、第 1 のおよび第 2 のオリゴヌクレオチドが少なくとも 1 つのヌクレオチド分だけオーバーラップする。このハイブリダイゼーションによって生成される二重鎖構造または三重鎖構造は、酵素 (C l e a v a s e (登録商標)) での選択的プローブ切断で標的配列を無傷のまま残すことを可能にする。その後、シグナルをさらに増幅させる中間ステップによって、切断された標識プローブを潜在的に検出する。

【 0 1 6 4 】

「キット」とは、本明細書で使用する場合、本発明の方法、特に、生体試料における特定の突然変異株 I N D アレルの同定または特定の突然変異株 I N D アレルを含む植物材料の接合状態の判断を実施するための一組の試薬を示す。特に、本発明のキットの好ましい実施形態は、特定の突然変異株 I N D アレルを同定するための上述したような少なくとも 2 つの特異的プライマーあるいは、接合状態を判断するための少なくとも 2 つまたは 3 つの特異的プライマーを含む。任意に、キットは、P C R 同定プロトコルにて本明細書に記載の他の試薬をさらに含むものであってもよい。あるいは、本発明のもうひとつの実施形態によれば、キットは、生体試料の核酸と特異的にハイブリダイズして、そこにある特定の突然変異株 I N D アレルの存在を同定する、特定の突然変異株 I N D アレルを同定するための上述したような少なくとも 1 つの特異的プローブを含むあるいは、接合状態を判断するための少なくとも 2 つまたは 3 つの特異的プローブを含むものであってもよい。任意に、キットは、特異的プローブを用いて生体試料における特定の突然変異株 I N D アレルを同定するための他の試薬 (ハイブリダイズ用緩衝液、標識などであるが、これに限定されるものではない) をさらに含むものであってもよい。

【 0 1 6 5 】

品質制御 (種子ロットの純度など)、植物材料あるいは、食品または飼料などであるが、これに限定されるものではない植物材料を含むまたは植物材料に由来する材料における特定の突然変異株 I N D アレルの存在または非存在の検出の目的で、本発明のキットを使用可能であり、その構成要素を具体的に調整可能である。

【 0 1 6 6 】

「プライマー」という用語は、本明細書で使用する場合、P C R などのテンプレート依存性プロセスでの新生核酸の合成を予備刺激できる核酸を包含する。一般に、プライマーは、10 ~ 30 ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドであるが、これよりも長い配列を用い

ることも可能である。プライマーは二本鎖の形態でも提供できるが、一本鎖の形態が好ましい。プローブをプライマーとして使用することも可能であるが、標的DNAまたはRNAと結合するように設計され、増幅プロセスで使用する必要はない。

#### 【0167】

「認識する」という表現は、特異的プライマーに言及して本明細書で使用する場合、特異的プライマーが、当該方法に記載の条件（PCR同定プロトコルの条件など）下で特定の突然変異株INDアレルにおける核酸配列と特異的にハイブリダイズされることで、陽性対照および陰性対照の存在によって特異性が判断される事実を示す。

#### 【0168】

「ハイブリダイズする」という表現は、特異的プローブに言及して本明細書で使用する場合、プローブが、標準的なストリンジェンシー条件下で特定の突然変異株INDアレルの核酸配列の特定の領域に結合するという事実を示す。標準的なストリンジェンシー条件とは、本明細書で使用する場合、本明細書に記載のハイブリダイゼーションの条件あるいは、Sambrook et al., 1989 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, NY)に記載されているような従来のハイブリダイズ条件を示す。後者は、たとえば、以下のステップを含み得る。1) 植物ゲノムDNA断片またはBACライブラリDNAをフィルターに固定化し、2) フィルターを、6×SSC、5×デンハート試薬、0.5% SDS、20 μg/ml変性キャリアDNAにて65 で1～2時間プレハイブリダイズし、3) 標識済みのハイブリダイゼーションプローブを加え、4) 16～24時間インキュベートし、5) フィルターを6×SSC、0.1% SDSにて68 で30分間洗浄し、6) フィルターを2×SSC、0.1% SDSにて68 で3回(30ml中30分間を2回、500ml中10分間を1回)洗浄し、7) フィルターを-70 でX線フィルムに4～48時間曝露する。

#### 【0169】

本明細書で使用する場合、「生体試料」は、植物、植物材料または植物材料を含む生成物の試料である。「植物」という用語には、成熟のあらゆる段階の植物組織ならびに、当該植物から採取または当該植物由来の細胞、組織または器官(限定することなく、種子、葉、茎、花、根、単細胞、配偶子、細胞培養物、組織培養物またはプロプラストを含む)を包含することを意図している。「植物材料」は、本明細書で使用する場合、植物から得られるまたは植物由来の材料を示す。植物材料を含む生成物は、植物材料を用いて生成されたまたは植物材料を混入させることが可能な食品、飼料または他の生成物に関する。本発明の文脈では、試料中での核酸の存在を暗示する特定の突然変異株INDアレルに特異的な核酸の存在について当該生体試料を試験する旨は理解できよう。よって、生体試料の特定の突然変異株INDアレルを同定するための本明細書にて示す方法は、特定の突然変異株INDアレルを含む核酸の生体試料での同定に関する。

#### 【0170】

また、本発明は、1つの植物における特定のINDアレルの組み合わせ、1つ以上の特定の突然変異株INDアレルを1つの植物から別の植物に移行させること、1つ以上の特定の突然変異株INDアレルを含む植物、これらの植物から得られる後代ならびに、これらの植物から得られる植物細胞、植物の一部および植物種子にも関する。

#### 【0171】

一実施形態では、好適な数の部分ノックアウトindアレルおよび/または完全ノックアウトindアレルおよび/または異なるタイプの部分ノックアウトindアレルおよび/または完全ノックアウトindアレルを単一の裂開種子植物で組み合わせ、植物の果実裂開特性を変化させる、特に脱粒を低減または脱粒を収穫後まで遅延させると同時に、莢の農学的に妥当な脱穀性を維持するための方法が得られる。

#### 【0172】

一態様では、少なくとも2つのIND遺伝子を含むアブラナ属(Brassica)植

物の果実裂開特性を変化させる、特に脱粒を低減または脱粒を収穫後まで遅延させると同時に、莢の農学的に妥当な脱穀性を維持するための方法であって、

- 少なくとも2つのIND遺伝子を含むアブラナ属 (*Brassica*) 植物を生成および/または選択するステップであって、少なくとも2つのIND遺伝子の少なくとも2つのアレルが、上述したような部分ノックアウトindアレルであるステップと、
- 果実裂開特性が変化した植物、特に脱粒が低減または収穫後まで遅延されると同時に、莢が農学的に妥当な脱穀性を維持する植物を選択するステップと、を含む、方法が得られる。

#### 【0173】

この態様の一実施形態では、少なくとも2つのIND遺伝子を含むアブラナ属 (*Brassica*) 植物が、IND-A1およびIND-C1遺伝子を含むセイヨウアブラナ (*Brassica napus*) 植物である。この実施形態の特定の態様では、少なくとも2つの部分ノックアウトindアレルが、IND-C1遺伝子の部分ノックアウトindアレルである。

#### 【0174】

もうひとつの態様では、この方法は、少なくとも2つのIND遺伝子を含むアブラナ属 (*Brassica*) 植物を生成および/または選択するステップをさらに含み、少なくとも2つのIND遺伝子の少なくとも2つの別のアレルが、上述したような完全ノックアウトindアレルである。一実施形態では、少なくとも2つのIND遺伝子を含むアブラナ属 (*Brassica*) 植物が、IND-A1およびIND-C1遺伝子を含むセイヨウアブラナ (*Brassica napus*) 植物である。この実施形態の特定の態様では、少なくとも2つの部分ノックアウトindアレルがIND-A1遺伝子の部分ノックアウトindアレルであり、少なくとも2つの完全ノックアウトindアレルがIND-C1遺伝子の完全ノックアウトindアレルである。

#### 【0175】

本発明のもうひとつの実施形態では、植物または種子から生育された植物の果実裂開特性が変更され、特に脱粒が低減または収穫後まで遅延されると同時に、莢が農学的に妥当な脱穀性を維持する、少なくとも2つのIND遺伝子を含むハイブリッドアブラナ属 (*Brassica*) 作物植物または種子、特にハイブリッドセイヨウアブラナ (*Brassica napus*) 植物または種子を生成するための方法であって、

- 上述したように、第1の部分ノックアウトindアレルをホモ接合状態で含む第1の植物と、第2の部分ノックアウトindアレルをホモ接合状態で含む第2の植物とを生成および/または同定するステップと、
- 第1および第2の植物を交雑させ、少なくとも2つのIND遺伝子の2つの部分ノックアウトindアレルを含む交雑種からF1ハイブリッド種子を採取するステップと、を含む方法。

#### 【0176】

本発明の別の実施形態では、上述したように、第1の植物が第1の完全ノックアウトindアレルをホモ接合状態でさらに含み、第2の植物が第2の完全ノックアウトindアレルをホモ接合状態でさらに含み、少なくとも2つのIND遺伝子の2つの部分ノックアウトindアレルおよび2つの完全ノックアウトindアレルを含むF1ハイブリッド種子が採取される。

#### 【0177】

部分および/または完全ノックアウトindアレルをホモ接合状態で含む親植物を用いて、脱粒が低減または遅延されると同時に莢の農学的に妥当な脱穀性が維持される植物を生育可能なハイブリッド種子を生成する可能性によって、2つの完全ノックアウトindアレルをホモ接合状態で含む1種類の親植物と、国際特許出願公開第WO09/068313号パンフレット (欧州特許出願第EP 07023052号の優先権を主張) に記載されたような1つの完全ノックアウトindアレル状態を含む1種類の親植物を使うよりも利点を得られる。これは、両方の親植物が農学的に妥当な脱穀性を示す莢を生成するの

10

20

30

40

50

に対し、ホモ接合状態の2つの完全ノックアウト *ind* アレルを含む親植物の莢では、種子を収穫しにくい筒状の莢が形成されるためである。

【0178】

本発明の一態様では、F1ハイブリッド種子が部分ノックアウト *ind* アレルにとってホモ接合となるように、第1と第2の部分ノックアウト *ind* アレルが同一である。本発明のもうひとつの態様では、F1ハイブリッド種子が完全ノックアウト *ind* アレルにとってホモ接合となるように、第1と第2の完全ノックアウト *ind* アレルが同一である。

【0179】

国際特許出願公開第WO09/068313号パンフレット（欧州特許出願第EP 07023052号の優先権を主張）に記載されているものなどの完全ノックアウト *ind* アレル（すなわち、機能的発現が完全に消失されたINDアレル）および/または本発明による部分ノックアウト *ind* アレル（すなわち、機能的発現が部分的に消失されたINDアレル）を、標準的な育種技術で組み合わせることが可能である。

【0180】

部分および/または完全ノックアウト *ind* アレルは、たとえば、  
 （a）部分ノックアウト *ind* アレルは上述したように、および完全ノックアウト *ind* アレルについては国際特許出願公開第WO09/068313号パンフレット（欧州特許出願第EP 07023052号の優先権を主張）において記述されるように、各々1つ以上の選択された部分および/または完全ノックアウト *ind* アレルを含む2つ以上の植物を生成および/または同定し、

（b）1つ以上の選択された部分および/または完全ノックアウト *ind* アレルを含む第1の植物を、1つ以上の他の選択された部分および/または完全ノックアウト *ind* アレルを含む第2の植物と交雑させ、交雑種からF1種子を採取し、任意に、上述したような第1の植物由来の1つ以上の選択された部分および/または完全ノックアウト *ind* アレルを、第2の植物由来の1つ以上の選択された部分および/または完全ノックアウト *ind* アレルとともに含むF1植物を同定し、

（c）任意に、選択されたすべての部分および/または完全ノックアウト *ind* アレルを含むF1植物が得られるまでステップ（b）を繰り返し、

（d）任意に、

- 上述したように、部分および国際特許出願公開第WO09/068313号パンフレット（欧州特許出願第EP 07023052号の優先権を主張）において、完全ノックアウト *ind* アレルについて、あるいは突然変異株INDアレルの接合状態を判断することで、選択された部分および/または完全ノックアウト *ind* アレルにとってホモ接合またはヘテロ接合であるF1植物を同定するか、あるいは、

- 以下のステップのうちの1つを実施することで、選択された部分および/または完全ノックアウト *ind* アレルのうちの1つ以上にとってホモ接合である植物を生成し、

- 上述したような1つ以上の選択された部分および/または完全ノックアウト *ind* アレルを含むF1植物の処理済みの小孢子または花粉細胞から倍加半数体植物を抽出し、

- 1つ以上の選択された部分および/または完全ノックアウト *ind* アレルを含むF1植物を1以上の世代（y）で自家受粉し、自家受粉種からF1 Sy 種子を採取し、上述したように1つ以上の部分および/または完全ノックアウト *ind* アレルにとってホモ接合であるF1 Sy 植物を同定することによって、単一の裂開種子植物で組み合わせることが可能である。

【0181】

部分および/または完全ノックアウト *ind* アレルは、たとえば、  
 （a）上述したような1つ以上の選択された部分および/または完全ノックアウト *ind* アレルを含む第1の植物を生成および/または同定するか、あるいは、上述したように1つ以上の選択された部分および/または完全ノックアウト *ind* アレルを1つの植物で組み合わせることで第1の植物を生成し（この場合、第1の植物は1つ以上の部分および/または完全ノックアウト *ind* アレルにとってホモ接合またはヘテロ接合である）、

(b) 1つ以上の部分および/または完全ノックアウト *ind* アレルを含む第1の植物を、1つ以上の部分および/または完全ノックアウト *ind* アレルを含まない第2の植物と交雑させ、F1種子を交雑種から採取し(この場合、第1の植物がその部分および/または完全ノックアウト *ind* アレルにとってホモ接合であれば、種子は部分および/または完全ノックアウト *ind* アレルにとってヘテロ接合であり、第1の植物がその部分および/または完全ノックアウト *ind* アレルにとってヘテロ接合であれば、種子の半分がヘテロ接合で種子の半分が不對である、すなわち、部分および/または完全ノックアウト *ind* アレルを含まない)、任意に、上述したような1つ以上の選択された部分および/または完全ノックアウト *ind* アレルを含むF1植物を同定し、

(c) 上述したような1つ以上の選択された部分および/または完全ノックアウト *ind* アレルを含むF1植物を、1つ以上の選択された部分および/または完全ノックアウト *ind* アレルを含まない第2の植物と1以上の世代(x)で戻し交雑させ、交雑種からBCx種子を採取し、1つ以上の選択された部分および/または完全ノックアウト *ind* アレルを含むBCx植物を各世代で同定し、

(d) 任意に、以下のステップのうちの1つを実施することで、1つ以上の選択された部分および/または完全ノックアウト *ind* アレルにとってホモ接合であるBCx植物を生成し、

- 上述したような1つ以上の所望の部分および/または完全ノックアウト *ind* アレルを含むBCx植物の処理済みの小胞子または花粉細胞から倍加半数体植物を抽出し、

- 1つ以上の所望の部分および/または完全ノックアウト *ind* アレルを含むBCx植物を1以上の世代(y)で自家受粉し、自家受粉種からBCx Sy種子を採取し、上述したように1つ以上の所望の部分および/または完全ノックアウト *ind* アレルにとってホモ接合であるBCx Sy植物を同定することによって、単一の裂開種子植物で組み合わせることが可能である。

#### 【0182】

第1および第2の裂開種子植物は、アブラナ科(*Brassicaceae*)植物、特にアブラナ属(*Brassica*)植物、特にセイヨウアブラナ(*Brassica napus*)植物または別のアブラナ属(*Brassica*)作物種由来の植物であってもよい。あるいは、第1の植物が、アブラナ科(*Brassicaceae*)植物、特にアブラナ属(*Brassica*)植物、特にセイヨウアブラナ(*Brassica napus*)植物または別のアブラナ属(*Brassica*)作物種由来の植物であってもよく、第2の植物が、アブラナ科(*Brassicaceae*)育種系統、特にアブラナ属(*Brassica*)育種系統、特にセイヨウアブラナ(*Brassica napus*)育種系統あるいは、別のアブラナ属(*Brassica*)作物種由来の育種系統由来の植物であってもよい。「育種系統」とは、本明細書で使用する場合、好ましくは、ハイブリッド子孫の生成に用いられる好ましい遺伝子型および/または表現型によって他の植物系統とは区別可能であるホモ接合植物系統である。

#### 【0183】

##### 配列

配列番号1: セイヨウアブラナ(*Brassica napus*)由来の野生型IND-A1タンパク質をコードするIND-A1遺伝子のコーディングDNA。

配列番号2: 配列番号1によってコードされる野生型IND-A1タンパク質。

配列番号3: セイヨウアブラナ(*Brassica napus*)由来の野生型IND-C1タンパク質をコードするIND-C1遺伝子のコーディングDNA。

配列番号4: 配列番号3によってコードされる野生型IND-C1タンパク質。

配列番号5: セイヨウアブラナ(*Brassica napus*)由来の野生型IND-A1タンパク質をコードするIND-A1遺伝子のゲノムDNA。

配列番号6: 配列番号5によってコードされる野生型IND-A1タンパク質。

配列番号7: セイヨウアブラナ(*Brassica napus*)由来の野生型IND-C1タンパク質をコードするIND-C1遺伝子のゲノムDNA。



配列番号 8 : 配列番号 7 によってコードされる野生型 IND - C 1 タンパク質。

配列番号 9 : シロイヌナズナ属 ( Arabidopsis ) IND 1 遺伝子のコーディング DNA

配列番号 10 : 配列番号 9 によってコードされるシロイヌナズナ属 ( Arabidopsis ) IND 1 タンパク質。

配列番号 11 : IND - A 1 - EMS 0 6 および - WT 検出用のオリゴヌクレオチド

配列番号 12 : IND - A 1 - EMS 0 6 検出用のオリゴヌクレオチド

配列番号 13 : IND - A 1 - WT 検出用のオリゴヌクレオチド

配列番号 14 : IND - A 1 - EMS 0 9 および - WT 検出用のオリゴヌクレオチド

配列番号 15 : IND - A 1 - EMS 0 9 検出用のオリゴヌクレオチド

10

配列番号 16 : IND - A 1 - WT 検出用のオリゴヌクレオチド

配列番号 17 : IND - A 1 - EMS 1 3 および - WT 検出用のオリゴヌクレオチド

配列番号 18 : IND - A 1 - EMS 1 3 検出用のオリゴヌクレオチド

配列番号 19 : IND - A 1 - WT 検出用のオリゴヌクレオチド

配列番号 20 : IND - C 1 - EMS 0 4 および - WT 検出用のオリゴヌクレオチド

配列番号 21 : IND - C 1 - EMS 0 4 検出用のオリゴヌクレオチド

配列番号 22 : IND - C 1 - WT 検出用のオリゴヌクレオチド

配列番号 23 : IND - C 1 - EMS 0 8 および - WT 検出用のオリゴヌクレオチド

配列番号 24 : IND - C 1 - EMS 0 8 検出用のオリゴヌクレオチド

配列番号 25 : IND - C 1 - WT 検出用のオリゴヌクレオチド

20

配列番号 26 : IND - C 1 - EMS 0 9 および - WT 検出用のオリゴヌクレオチド

配列番号 27 : IND - C 1 - EMS 0 9 検出用のオリゴヌクレオチド

配列番号 28 : IND - C 1 - WT 検出用のオリゴヌクレオチド

#### 【 0 1 8 4 】

実施例で特に明記しないかぎり、組換え DNA 技術はすべて、Sambrook and Russell (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY、Ausubel et al. (1994) Current Protocols in Molecular Biology, Current Protocols, USA の第 1 巻 および第 2 巻、Brown (1998) Molecular Biology Lab Fax, Second Edition, Academic Press (UK) の第 I 巻 および第 II 巻 に記載されているような標準的な分子生物学的技術に基づいて実施している。植物分子ワークの標準的な材料および方法については、BIOS Scientific Publications Ltd (UK) および Blackwell Scientific Publications, UK の共同出版である、R. D. D. Croy 著、Plant Molecular Biology Lab fax (1993) に記載されている。ポリメラーゼ連鎖反応の標準的な材料および方法は、Dieffenbach and Dveksler (1995) PCR Primer: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press および McPherson et al. (2000) PCR - Basics: From Background to Bench, First Edition, Springer Verlag, Germany に記載されている。AFLP 解析の標準的な手順は、Vos et al. (1995, NAR 23: 4407 ~ 4414) ならびに欧州特許出願公開第 EP 534858 号明細書に記載されている。

30

40

#### 【 実施例 】

#### 【 0 1 8 5 】

実施例 1 - 部分ノックアウト突然変異株 IND アレル ( ind ) の生成と単離

配列表の配列番号 1 または 3 および 5 または 7 に示す IND 遺伝子の変異を以下のように

50

にして生成および同定した。

- エリート春アブラナ育種系統から得た30,000個の種子(M0種子)を脱イオン水または蒸留水中で湿った濾紙の上で2時間かけて予備吸水させた。種子の半分を0.8%EMSに曝露し、半分を1%EMS(Sigma:M0880)に曝露して、4時間インキュベートした。

- 変異原化種子(M1種子)を3回すすぎ、ドラフトで一晩乾燥させた。30,000のM1植物を土壌で生育させ、自家受粉させてM2種子を生成した。個々のM1植物について各々M2種子を収穫した。

- 異なるM1植物由来の2x4800のM2植物を生育させ、CTAB法(Doyland Doyle, 1987, Phytochemistry Bulletin 19:11~15)で個々のM2植物それぞれの葉試料からDNA試料を調製した。

- 標準的な配列決定技術(Agowa)による直接配列決定と、NovoSNPソフトウェア(VIB Antwerp)を用いる点変異の存在についての配列の分析によって、INDタンパク質、特にINDタンパク質のbHLHドメインでアミノ酸の置換を引き起こすIND遺伝子における点変異の存在についてDNA試料をスクリーニングした。

- こうして、上記の表3aおよび表3bに示す部分ノックアウト突然変異株INDアレル(ind)を同定した。

#### 【0186】

結論として、上記の例は部分ノックアウト突然変異株INDアレルをどのようにして生成および単離可能であることを示している。また、以下の実施例で説明するように、このような突然変異株アレルを含む植物材料を使用して、選択した突然変異株INDアレルを植物で組み合わせることが可能である。

#### 【0187】

実施例2 - 部分ノックアウト突然変異アブラナ属(Brassica)INDアレルを含むアブラナ属(Brassica)植物の同定

実施例1で同定したIND遺伝子に変異を含むアブラナ属(Brassica)植物を以下のようにして同定した。

- M2植物のDNA試料で同定した各突然変異株IND遺伝子について、IND変異を含むM2植物と同一のM1植物に由来する少なくとも50のM2植物を生育させ、個々のM2植物それぞれの葉試料からDNA試料を調製した。

- 実施例1で説明したようにして、同定された点IND変異の存在についてDNA試料をスクリーニングした。

- 同一の変異を含むヘテロ接合およびホモ接合(電気泳動図に基づいて判断)M2植物を自家受粉させ、M3種子を収穫した。

#### 【0188】

実施例3 - 部分および/または完全ノックアウト突然変異アブラナ属(Brassica)IND遺伝子を含むアブラナ属(Brassica)植物の果実裂開特性の分析

アブラナ属(Brassica)植物における部分および/または完全ノックアウト突然変異株IND遺伝子の存在とアブラナ属(Brassica)植物の果実裂開特性との相関を判断するために、部分ノックアウト突然変異株IND遺伝子だけをホモ接合状態を含むセイヨウアブラナ(Brassica napus)植物と、部分および完全ノックアウト突然変異株IND遺伝子の両方をホモ接合状態で含むものの果実裂開特性を温室および圃場で分析し、国際特許出願公開第WO09/068313号パンフレット(欧州特許出願第EP 07023052号の優先権を主張)に記載されているような2~4の完全ノックアウトindアレルを含むセイヨウアブラナ(Brassica napus)植物の果実裂開特性と、以下のようにして比較した。

- 果実朔片縁辺と種子莢の裂開特性が部分および/または完全ノックアウト突然変異株IND遺伝子の存在に影響されるか否か、影響される場合はどのようにして影響されるのかについて調べるために、以下の肉眼試験を用いてind果実を野生型果実と比較した。

(a)異なる部分および/または完全ノックアウト突然変異株IND遺伝子の存在によ

10

20

30

40

50

て生じる莢および植物の表現型の差を判断するための裸眼での種子莢および植物の検査一般。莢の表現型の判断：莢が完全に成長して満ちていて、黄変直前の状態にある場合、5つの無作為に選んだ莢（1系統あたり複数の植物が手に入る場合は異なる植物由来）で両方の朔片がもう触れていない（莢の遠位端）ゾーンで朔片とくちばしの輪郭をなすゾーンの鋭さの度合いを評価し、0～10または1～5のスコアを付けた。0または1はそれぞれ、はっきりとしたくぼみと、朔片とくちばしとを分ける鋭利なゾーンがある場合である。1～3または2はそれぞれ、くぼみがいくらかあり、朔片をくちばしから隔てる明確ではあるが若干曖昧なゾーンがある場合である。4～6または3はそれぞれ、朔片とくちばしが2つの異なる組織として観察可能ではあるが、両者の切り替えがきわめて滑らかな場合である。7～9または4はそれぞれ、朔片とくちばしが辛うじて異なる組織として観察できる場合である。10または5はそれぞれ、朔片とくちばしとの切り替えが完全になめらかで両方の組織型の間に明確な差がない、すなわち、莢の遠位端で朔片とくちばしの間にくぼみが少ないほどスコアが高くなる。0または1のスコアはそれぞれ（朔片とくちばしの間にはっきりとしたくぼみ）、野生型の莢の表現型に対応し、特に裂莢が起こりやすい莢の表現型に対応している；スコア1～9または2～4はそれぞれ（朔片とくちばしとの間が徐々に切り替わっている）、耐裂莢性の莢の表現型に対応し、限られた物理的な力を加えることで裂開ゾーンに沿って莢を開くことができるように、脱粒が有意に低減または遅延されると同時に、莢の農学的に妥当な脱穀性が維持される。スコア10または5はそれぞれ（朔片とくちばしの間にくぼみがない）、耐裂莢性の莢の表現型に対応し、限られた物理的な力を加えるだけでは裂開ゾーンに沿って莢を開くことができないように、莢の農学的に妥当な脱穀性が生じない程度まで脱粒が低減または遅延される。

#### 【0189】

（b）異なる部分および/または完全ロックアウト突然変異株IND遺伝子の存在によって生じる耐裂莢性の増大を判断するための手動衝撃加振試験（MIT）：部分ロックアウト突然変異株IND遺伝子だけをホモ接合状態で含むか、部分および完全ロックアウト突然変異株IND遺伝子の両方をホモ接合状態で含むセイヨウアブラナ（*Brassica napus*）系統と、対応する野生型INDアレルを含むアブラナ属（*Brassica*）系統の耐裂莢性のレベルを、莢を手でねじって閉じた成熟莢を開くのに必要な物理的な力を判断することで、半定量的な方法で比較した。この物理的な力に基づいて、莢の耐裂莢性に1～5のスコアを付けた。1は最も小さなねじれで裂開ゾーンに沿って完全に開く莢、2～4は裂開ゾーンの基部だけが開き、完全に開くにはさらに強いねじれが必要な莢、5は破砕できるだけで、裂開ゾーンに沿っては開かない莢である。

#### 【0190】

（c）異なる部分および/または完全ロックアウト突然変異株IND遺伝子の存在によって引き起こされる耐裂莢性の増加を判断するための不規則衝撃加振試験（RIT）：部分ロックアウト突然変異株IND遺伝子だけをホモ接合状態で含むか、部分および完全ロックアウト突然変異株IND遺伝子の両方をホモ接合状態で含むセイヨウアブラナ（*Brassica napus*）系統と、対応する野生型INDアレルを含むアブラナ属（*Brassica*）系統の耐裂莢性のレベルを、Bruce et al.（2002, 上掲）に従って両系統由来の莢試料の半減期を判断することで、定量的に比較した。特に、各系統由来の20個の無傷の成熟莢の複製試料2つでRITを実施した。20個の莢を直径12.5mmの6個の鋼球と一緒に直径20cmの円筒形の容器に軸を垂直にして入れた。次に、この容器を、振動数4.98Hz、ストローク51mmで水平面にて単純に調和運動させた。試験前に健全性を確認しておいた莢を、10秒、20秒、40秒、さらには仮に50%を超える莢が無傷であれば80秒間の累積時間で振盪した。それぞれの時間経過後にドラムを開き、閉じた莢を数えた。莢を調べ、両方の朔片の裂開ゾーンが依然として閉じたままであれば「閉じた」に分類した。よって、1つまたは両方の朔片が離れたため種子が放出されてしまっていたら、莢を「開いた」に分類した。裂開ゾーンが開くことなく大多数の莢が破れたり損傷を受けたりした場合は、試料を「計数不能」とした（表5bでは\*で表示）。各点の重み付けを均等にするために、1を加えてlog10を取る

ことで、独立した変数である時刻でデータの間隔を等しくした。開いた莢のパーセンテージ  $p$  をロジット変換すなわち  $\logit\ p = \log e(p/100 - p)$  で変換した。次に、変換後の時刻とパーセンテージデータに線形モデルをフィットさせ、半減期の推測に用いた。

#### 【0191】

(d) 耐裂莢性、脱穀性および収量ならびに、植物における特定の突然変異株 IND アレルの存在の関係を判断するための圃場試験：突然変異株 IND アレルを含むアブラナ属 (*Brassica*) 系統と、対応する野生型 IND アレルを含むアブラナ属 (*Brassica*) 系統の耐裂莢性、脱穀性および収量のレベルを、脱粒 (SHAT)、コンバイナー収穫性 (CHA1) および脱穀性 (CHA2) のレベルを判断して比較することで半定量的に比較し、また、ind 植物でのプロットと野生型植物でのプロットとの間で、圃場にて刈り取り後のプロットごとの種子収量 (YLDP) および藁脱穀後の種子収量 (YLD S) を判断して比較することで定量的に比較した。プロットにある実用上すべての植物が収穫前にシャッタリングしたことを示すスコア 1 から、プロットにある実用上すべての植物が収穫前にシャッタリングしなかったことを示すスコア 9 まで、プロットにスコア 1 ~ 9 を付けて収穫前プロットの脱粒レベルを示した。プロットにスコア 1 ~ 5 を付け、コンバイナーでのプロットの収穫性レベルを示した。スコア 1 ~ 3 または 5 はそれぞれ、コンバイナーでのプロットの収穫が困難、実行可能または容易であったことを示す。プロットにスコア 1 ~ 5 を付け、プロットの脱穀性レベルを示した。スコア 1 ~ 3 または 5 はそれぞれ、コンバイナー収穫後に藁に残っている種子を手作業で収穫することが困難、実行可能または容易であったことを示す。プロットごとに種子をコンバインハーベスタで収穫し、種子を秤量することで、刈り取り後のプロットごとの種子収量 (YLDP; プロットごとのグラム単位で表示) を判断し、また、コンバインハーベスタでの種子収穫後に藁に残っている種子を手作業で収穫して藁脱穀後の種子収量 (YLD S; 藁の重量%で表示) を判断した。

#### 【0192】

- 種子藁の朔片縁辺の細胞が部分および/または完全ノックアウト突然変異株 IND 遺伝子の存在によって影響されるか否か、影響される場合はどのようにして影響されるのかを一層綿密に調べるために、種子莢の顕微鏡評価によって ind 果実の切片を野生型果実の切片と比較した。

- 外植体：似たような発達段階 (開花後 (DAA) 約 35 日目、目に見える果皮黄変が開始される時期と密接に対応する発達段階) にある莢の中心と遠位端から採取した約 3 mm の外植体とサイズを、温室で生育させた植物から収穫した (遺伝子型ごとに莢 3 つ)。1 つの裂開ゾーンを莢から切り取った。

#### 【0193】

- 固定：10%ホルマリンおよび0.25%グルタルアルデヒドを含む100 mMのK-リン酸緩衝液 (pH 7) 中で、合計4時間固定した。1時間後と2時間後に15分間の減圧浸潤を実施した。各減圧浸潤後に固定液を交換した。

#### 【0194】

- 脱水：標本を100 mMのK-リン酸緩衝液 (pH 7) で30分間、2回すすいだ。室温にて50%エタノールで60分間 (')、70%エタノールで90'、80%エタノールで90'、90%エタノールで90'、95%エタノールで90'、100%エタノールで90'、0.85%NaClの水溶液で希釈した工業用エタノールで脱水した。

#### 【0195】

- 包埋：3成分樹脂 (塩基性樹脂、活性化剤、硬化剤) キットである、Leica 7022-31731 HistoresinまたはKulzer Histo-Tech nik 7100 (Heraeus) 包埋キットで包埋した。3種類の成分を製造業者の指示どおりの割合で以下のように用いた。標本を50%エタノール/50%塩基性樹脂にて4時間、30%エタノール/70%塩基性樹脂 (任意に4' で) にて一晚、100%塩基性樹脂で2~4時間、塩基性樹脂と減圧浸潤を20' (任意に4' で) 交換後に100

%塩基性樹脂で1日、この媒質で20分間減圧浸潤後に塩基性樹脂+活性化剤(1%)(「浸潤剤」)で1日インキュベートした。標本を塩基性樹脂+活性化剤(1%)+硬化剤(15ml中1ml)(「包埋剤」)で洗浄した。フラット包埋型(AGARフラット包埋型G35311、キャビティ約300 $\mu$ l:長さ14mm×幅6mm×深さ4mm)に包埋した:包埋剤100~125 $\mu$ l/キャビティを加え、包埋剤を55℃で約1時間重合し、組織を重合後の包埋剤(外植体1つ/キャビティ)に乗せ、キャビティを包埋剤で包み、包埋剤を55℃で3~5時間重合し、型を冷却し、プラスチックブロックを型から取り除き、密閉容器(エッペンドルフチューブなど)に入れて室温で保管した。

#### 【0196】

- 切片化:プラスチックブロックの平らな側を1cm<sup>3</sup>のperpexブロックに糊付けし、標本の周りを四角にトリミングした。4 $\mu$ mの切片(遺伝子型1つあたり外植体3~4つ、外植体1つあたり切片約25個)をマイクロトームにてラルフガラスナイフで切り出した(切断角約6°で厚さ6mmのガラス棒を用いてReichert-Jungのhistoknifemakerの-1位置で作成)。Vectabond(Vector laboratories)で処理したスライドガラスに切片を貼り付けた。

#### 【0197】

- リグニンのデモンストレーション:蛍光用の装備を設けた顕微鏡(Zeissフィルターセット02付き)を用いて、Eukittにのせた未染色切片を調べた。リグニンは明るい青みがかった蛍光を発する。

#### 【0198】

- 組織像の評価:DIC-Normaskiまたは自己蛍光(Zeissフィルターセット18付き)-励起BP390-420;放出LP450)を用いて未染色切片を可視化した。

#### 【0199】

植物材料:

IND-A1遺伝子に完全ノックアウト変異を含む植物系統の後代(ind-a1<sup>F</sup>として示す)、特に国際特許出願公開第WO09/068313号パンフレット(欧州特許出願第EP07023052号の優先権を主張)に記載のind-a1-EMS01アレル(表5にind-a1-01として示す)ならびに、IND-C1遺伝子における部分ノックアウト変異(ind-c1<sup>P</sup>として示す)、特に表3bに示すind-c1-EMS04、-EMS08および-EMS09アレル(表5にind-c1-04、-08、-09として示す)で、遺伝子型ind-a1<sup>F</sup>/ind-a1<sup>F</sup>、ind-c1<sup>P</sup>/ind-c1<sup>P</sup>(すなわち、ホモ接合二重突然変異株植物)、IND-A1/IND-A1、ind-c1<sup>P</sup>/ind-c1<sup>P</sup>(すなわち、ホモ接合一重突然変異株植物)、IND-A1/IND-A1、IND-C1/IND-C1(すなわち、野生型植物)。

#### 【0200】

IND-A1遺伝子に部分ノックアウト変異を含む植物系統の後代(ind-a1<sup>P</sup>として示す)、特に表3aに示すind-a1-EMS06、-EMS09および-EMS13アレル(表5にind-a1-06、-09、-13として示す)ならびに、IND-C1遺伝子における完全ノックアウト変異(ind-c1<sup>F</sup>として示す)、特に国際特許出願公開第WO09/068313号パンフレット(欧州特許出願第EP07023052号の優先権を主張)に記載のind-c1-EMS01アレルおよびind-c1-EMS03アレル(表5にind-c1-01および-03として示す)で、遺伝子型ind-a1<sup>P</sup>/ind-a1<sup>P</sup>、ind-c1<sup>F</sup>/ind-c1<sup>F</sup>(すなわち、ホモ接合二重突然変異株植物)、IND-A1/IND-A1、ind-c1<sup>F</sup>/ind-c1<sup>F</sup>(すなわち、ホモ接合一重突然変異株植物)、IND-A1/IND-A1、IND-C1/IND-C1(すなわち、野生型植物)。

#### 【0201】

巨視的評価:

a) 種子莢および植物の裸眼での検査

- 遺伝子型  $ind - a1^F / ind - a1^F$ 、 $ind - c1^P / ind - c1^P$  または  $ind - a1^P / ind - a1^P$ 、 $ind - c1^F / ind - c1^F$  のホモ接合二重突然変異株 IND 同胞植物由来の英は、国際特許出願公開第 WO 09 / 068313 号パンフレット（欧州特許出願第 EP 07023052 号の優先権を主張）に記載の 1 つの完全ノックアウト  $ind$  アレルをホモ接合状態で含み、1 つの完全ノックアウト  $ind$  アレルをヘテロ接合状態で含む植物（遺伝子型： $ind - a1^F / ind - a1^F$ 、 $IND - C1 / ind - c1^F$  または  $IND - A1 / ind - a1^F$ 、 $ind - c1^F / ind - c1^F$  であり、 $ind - a1^F$  は完全ノックアウト  $ind - a1$  アレル、特に、国際特許出願公開第 WO 09 / 068313 号パンフレット（欧州特許出願第 EP 07023052 号の優先権を主張）に記載の  $ind - a1 - EMS01$  または  $ind - a1 - EMS05$  アレルであり、 $ind - c1^F$  は完全ノックアウト  $ind - c1$  アレル、特に、国際特許出願公開第 WO 09 / 068313 号パンフレット（欧州特許出願第 EP 07023052 号の優先権を主張）に記載の  $ind - c1 - EMS01$  または  $ind - c1 - EMS03$  アレル）由来の英と類似の表現型を示す。特に、これらの突然変異株 IND 同胞植物の英の朔片縁辺は通常、国際特許出願公開第 WO 09 / 068313 号パンフレット（欧州特許出願第 EP 07023052 号の優先権を主張）に記載のホモ接合二重完全ノックアウト突然変異株 IND 同胞植物（野生型 IND 同胞植物由来の英に比して、適切な朔片縁辺画定の欠如を示し、特に果実の近位端と遠位端の両方で顕著である）よりも明確に画定されているが、野生型同胞植物の英の遠位端における朔片とくちばしの間のはっきりとしたくぼみは、これらの突然変異株植物ではホモ接合二重完全ノックアウト  $ind$  同胞植物同様にかなり欠如しており、朔片とくちばし組織との間の切り替えもゆるやかであった（温室育成植物についての表 5 a ならびに圃場育成植物についての表 5 b に示す可視スコアも参照のこと）。

#### 【0202】

- ホモ接合一重突然変異株 IND 同胞植物由来の英（遺伝子型： $IND - A1 / IND - A1$ 、 $ind - c1^P / ind - c1^P$  または  $ind - a1^P / ind - a1^P$ 、 $IND - C1 / IND - C1$ ）は、遺伝子型  $ind - a1^F / ind - a1^F$ 、 $ind - c1^P / ind - c1^P$  または  $ind - a1^P / ind - a1^P$ 、 $ind - c1^F / ind - c1^F$  のホモ接合二重突然変異株 IND 同胞植物由来の英と類似の英の形態が変化した遺伝子型  $IND - A1 - EMS01 / IND - A1 - EMS01$ 、 $ind - c1 - EMS09 / ind - c1 - EMS09$  のホモ接合一重突然変異株 IND 同胞植物由来の英以外、英の形態が野生型 IND 同胞植物由来の英と類似していた（温室育成植物についての表 5 a ならびに圃場育成植物についての表 5 b に示す可視スコアも参照のこと）。植物におけるヘテロ接合状態での  $ind - c1 - EMS09$  アレルの存在（遺伝子型： $IND - A1 / IND - A1$ 、 $IND - C1 / ind - c1 - EMS09$ ）は、遺伝子型  $ind - a1^F / ind - a1^F$ 、 $ind - c1^P / ind - c1^P$  または  $ind - a1^P / ind - a1^P$ 、 $ind - c1^F / ind - c1^F$  のホモ接合二重突然変異株 IND 同胞植物由来の英と類似の形態が変化した英を生じるのに十分であったこともさらに観察された。塩基性 DNA 結合ドメインの保存されたアミノ酸に置換変異を含む  $ind - c1 - EMS09$  アレルは、まだ二量体を形成できるが、調節された遺伝子の bHLH 結合部位との結合はできない顕性不活性 IND タンパク質を産生できると考えられた。

#### 【0203】

b) 不規則衝撃加振試験：

- 表 5 は、完全ノックアウト  $ind - c1$  アレルをホモ接合状態で、部分ノックアウト  $ind - a1$  アレルをホモ接合状態で含む植物由来の英のほうが、完全ノックアウト  $ind - a1$  アレルをホモ接合状態で、部分ノックアウト  $ind - c1$  アレルをホモ接合状態で含む植物由来の英よりも通常は LD50 値が高めであることから、 $IND - C1$  アレルの変異のほうが  $IND - A1$  アレルの変異よりも耐裂英性に対する作用が強い可能性があることを示している。

#### 【0204】

【表 9】

表 5a

遺伝子型

	可視英 スコア (0-10)	LD50 (秒)	補正 95%未満	補正 95%を 超える
<i>IND-A1-06/IND-A1-06, IND-C1-01/IND-C1-01</i>	0	8.06	3.1	1.78
<i>ind-a1-06/ind-a1-06, IND-C1-01/IND-C1-01</i>	0	9.05	2.83	2.15
<i>ind-a1-06/ind-a1-06, ind-c1-01/ind-c1-01</i>	7	26.31	4.83	7.64
<i>IND-A1-06/IND-A1-06, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	0	8.86	*	*
<i>ind-a1-06/ind-a1-06, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	0	5.74	4.2	2.06
<i>ind-a1-06/ind-a1-06, ind-c1-03/ind-c1-03</i>	7	29.38	3.8	5.18
<i>IND-A1-09/IND-A1-09, IND-C1-01/IND-C1-01</i>	0	9.36	2.6	1.7
<i>ind-a1-09/ind-a1-09, IND-C1-01/IND-C1-01</i>	1	9.05	2.83	2.15
<i>ind-a1-09/ind-a1-09, ind-c1-01/ind-c1-01</i>	8	52.03	8.96	14.03
<i>IND-A1-09/IND-A1-09, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	0	8.44	2.74	2.26
<i>ind-a1-09/ind-a1-09, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	0	9.05	2.83	2.15
<i>ind-a1-09/ind-a1-09, ind-c1-03/ind-c1-03</i>	8.5	85.57	23.34	64.64
<i>IND-A1-13/IND-A1-13, IND-C1-01/IND-C1-01</i>	3	12.91	2.4	2.46
<i>ind-a1-13/ind-a1-13, IND-C1-01/IND-C1-01</i>	2	14.2	2.2	2.59
<i>ind-a1-13/ind-a1-13, ind-c1-01/ind-c1-01</i>	7	61.21	9.6	15.18
<i>IND-A1-13/IND-A1-13, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	0	8.86	*	*
<i>ind-a1-13/ind-a1-13, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	0	7.74	3.98	1.54
<i>ind-a1-13/ind-a1-13, ind-c1-03/ind-c1-03</i>	9	56.68	8.9	13.6
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, IND-C1-04/IND-C1-04</i>	0	7.89	2.88	2
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, ind-c1-04/ind-c1-04</i>	0	10.91	2.5	2
<i>ind-a1-01/ind-a1-01, ind-c1-04/ind-c1-04</i>	9	37.8	5.77	8.4
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, IND-C1-08/IND-C1-08</i>	0	8.94	2.78	2.38
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, ind-c1-08/ind-c1-08</i>	0	9.8	2.8	2.1
<i>ind-a1-01/ind-a1-01, ind-c1-08/ind-c1-08</i>	8.5	31.81	6.66	10.45
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, IND-C1-09/IND-C1-09</i>	0	7.22	3.56	1.82
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, ind-c1-09/ind-c1-09</i>	8.5	46.6	7.82	11.48
<i>ind-a1-01/ind-a1-01, ind-c1-09/ind-c1-09</i>	9	90.11	*	*

10

20

30

【 0 2 0 5 】

## 【表 10】

表 5b

遺伝子型

	可視莢 スコア (1-5)	閉じた成熟莢を 開くのに必要な 物理的な力に 基づくスコア (1-5)	LD50 (秒)	
			圃場 1	圃場 2
<i>IND-A1-06/IND-A1-06, IND-C1-01/IND-C1-01</i>	1	1	9.7	7.2
<i>ind-a1-06/ind-a1-06, IND-C1-01/IND-C1-01</i>	1	1	6.2	8.3
<i>ind-a1-06/ind-a1-06, ind-c1-01/ind-c1-01</i>	2	2	17.0	16.6
<i>IND-A1-06/IND-A1-06, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	1	1	6.5	6.6
<i>ind-a1-06/ind-a1-06, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	1	1	7.4	5.3
<i>ind-a1-06/ind-a1-06, ind-c1-03/ind-c1-03</i>	3	2	15.3	12.4
<i>IND-A1-09/IND-A1-09, IND-C1-01/IND-C1-01</i>	1	1	7.5	6.9
<i>ind-a1-09/ind-a1-09, IND-C1-01/IND-C1-01</i>	1	1	5.4	7.2
<i>ind-a1-09/ind-a1-09, ind-c1-01/ind-c1-01</i>	3	4	60.1	77.0
<i>IND-A1-09/IND-A1-09, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	1	1	6.6	6.2
<i>ind-a1-09/ind-a1-09, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	1	1	7.7	7.0
<i>ind-a1-09/ind-a1-09, ind-c1-03/ind-c1-03</i>	3	4	49.8	63.0
<i>IND-A1-13/IND-A1-13, IND-C1-01/IND-C1-01</i>	1	1	11.7	10.7
<i>ind-a1-13/ind-a1-13, IND-C1-01/IND-C1-01</i>	1	1	10.7	7.9
<i>ind-a1-13/ind-a1-13, ind-c1-01/ind-c1-01</i>	3	3	19.1	22.9
<i>IND-A1-13/IND-A1-13, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	1	1	5.4	5.7
<i>ind-a1-13/ind-a1-13, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	1	1	9.2	8.3
<i>ind-a1-13/ind-a1-13, ind-c1-03/ind-c1-03</i>	3	3	10.2	38.6
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, IND-C1-04/IND-C1-04</i>	1	1	6.5	7.4
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, ind-c1-04/ind-c1-04</i>	1	2	9.5	7.2
<i>ind-a1-01/ind-a1-01, ind-c1-04/ind-c1-04</i>	3	5	87.7	126.6
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, IND-C1-08/IND-C1-08</i>	1	1	9.7	8.3
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, ind-c1-08/ind-c1-08</i>	1	1	4.9	9.0
<i>ind-a1-01/ind-a1-01, ind-c1-08/ind-c1-08</i>	3	3	14.9	23.7
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, IND-C1-09/IND-C1-09</i>	1	1	9.1	8.3
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, ind-c1-09/ind-c1-09</i>	3	2	7.9	8.3
<i>ind-a1-01/ind-a1-01, ind-c1-09/ind-c1-09</i>	5	5	*	*

\*:計数不能

## 【0206】

## c) 圃場試験

表 5 c は、表記の *i n d* 植物および野生型植物を用いて圃場プロットについて上述したようにして判断した脱粒 (S H A T)、コンバイナー収穫性 (C H A 1)、脱穀性 (C H A 2)、刈り取り後のプロットあたりの種子収量 (Y L D P)、藁脱穀後の種子収量 (Y L D S) のレベルを示す。収量 W T S e g % 値は、Y L D P を 1 つの分離個体群内の野生型分離個体のパーセンテージで表したものである。

## 【0207】

10

20

30

40



【表 1 1】

表 5c

遺伝子型	SHAT (1-9)	CHA1 (1-5)	CHA2 (1-5)	YLDP (プロット ごとの グラム 単位)	Yield WTSeg %	YLDs (莢の wt%)
<i>IND-A1-06/IND-A1-06, IND-C1-01/IND-C1-01</i>	8.3	5.0	5.0	2263.3	100	0.4
<i>ind-a1-06/ind-a1-06, IND-C1-01/IND-C1-01</i>	8.4	4.6	5.0	2274.9	101	0.3
<i>ind-a1-06/ind-a1-06, ind-c1-01/ind-c1-01</i>	8.7	4.4	4.9	2525.1	112	1.1
<i>IND-A1-06/IND-A1-06, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	8.6	4.6	4.9	2102.0	100	0.5
<i>ind-a1-06/ind-a1-06, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	8.7	4.8	5.0	2292.7	109	0.4
<i>ind-a1-06/ind-a1-06, ind-c1-03/ind-c1-03</i>	8.8	4.1	4.6	2276.2	108	1.3
<i>IND-A1-09/IND-A1-09, IND-C1-01/IND-C1-01</i>	8.3	5.0	4.9	1964.2	100	0.3
<i>ind-a1-09/ind-a1-09, IND-C1-01/IND-C1-01</i>	8.0	4.7	5.0	1872.0	95	0.4
<i>ind-a1-09/ind-a1-09, ind-c1-01/ind-c1-01</i>	9.0	2.7	3.8	2323.3	118	5.7
<i>IND-A1-09/IND-A1-09, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	8.6	4.8	5.0	2168.9	100	0.5
<i>ind-a1-09/ind-a1-09, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	8.3	4.7	5.0	1985.6	92	0.4
<i>ind-a1-09/ind-a1-09, ind-c1-03/ind-c1-03</i>	9.0	1.9	3.6	1726.7	80	13.6
<i>IND-A1-13/IND-A1-13, IND-C1-01/IND-C1-01</i>	8.3	4.8	5.0	1977.1	100	0.4
<i>ind-a1-13/ind-a1-13, IND-C1-01/IND-C1-01</i>	8.4	4.2	4.9	1929.3	98	0.5
<i>ind-a1-13/ind-a1-13, ind-c1-01/ind-c1-01</i>	8.9	3.6	4.7	2445.6	124	2.0
<i>IND-A1-13/IND-A1-13, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	8.3	4.2	5.0	1885.1	100	0.4
<i>ind-a1-13/ind-a1-13, IND-C1-03/IND-C1-03</i>	8.3	4.8	5.0	2137.8	113	0.6
<i>ind-a1-13/ind-a1-13, ind-c1-03/ind-c1-03</i>	8.9	2.8	3.9	2120.9	113	4.8
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, IND-C1-04/IND-C1-04</i>	8.8	4.9	4.8	2120.4	100	0.6
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, ind-c1-04/ind-c1-04</i>	8.6	4.8	5.0	2136.4	101	0.6
<i>ind-a1-01/ind-a1-01, ind-c1-04/ind-c1-04</i>	9.0	1.8	2.8	1437.0	68	19.1
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, IND-C1-08/IND-C1-08</i>	8.0	4.8	5.0	2250.4	100	0.6
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, ind-c1-08/ind-c1-08</i>	8.3	4.3	4.9	2131.3	95	0.5
<i>ind-a1-01/ind-a1-01, ind-c1-08/ind-c1-08</i>	8.9	3.0	4.1	2385.1	106	2.5
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, IND-C1-09/IND-C1-09</i>	8.7	4.9	5.0	2080.0	100	0.4
<i>IND-A1-01/IND-A1-01, ind-c1-09/ind-c1-09</i>	8.7	4.6	4.6	2447.8	118	1.0
<i>ind-a1-01/ind-a1-01, ind-c1-09/ind-c1-09</i>	9.0	1.1	1.8	589.6	28	28.4

## 【0208】

顕微鏡評価：

- 遺伝子型 *ind-a1<sup>F</sup>/ind-a1<sup>F</sup>*、*ind-c1<sup>P</sup>/ind-c1<sup>P</sup>* または *ind-a1<sup>P</sup>/ind-a1<sup>P</sup>*、*ind-c1<sup>F</sup>/ind-c1<sup>F</sup>* のホモ接合二重突然変異株 IND 同胞植物由来の莢と、遺伝子型 *IND-A1-EMS01/IND-A1-EMS01*、*ind-c1-EMS09/ind-c1-EMS09* のホモ接合一重突然変異株 IND 同胞植物由来の莢を、温室条件下で生育させたところ、裂開ゾーン全体にわたって遠位端が木化し、維管束組織細胞などの隣接する細胞型からの裂開ゾーンの細胞の分化があまり起こらず、細胞の木化層は主に内側の莢壁（すなわち、*enb* 細胞）に見られた。莢の中心では、裂開ゾーン全体にわたって木化は発生しなかったが、莢には内側の莢壁が隔壁に結合する代わりに木化細胞の余分な層がわずかにあったことが示された。

## 【0209】

- 遺伝子型 *ind-a1-EMS01/ind-a1-EMS01*、*ind-c1-EMS09/ind-c1-EMS09* のホモ接合二重突然変異株 IND 同胞植物由来の莢では、莢の遠位端および中心の両方で、裂開ゾーン全体にわたって木化が認められ、維管束組織細胞などの隣接する細胞型からの裂開ゾーンの細胞の分化があまり起こらず、細胞の木化層は主に内側の莢壁（すなわち *enb* 細胞）に見られた。

## 【0210】

実施例 4 - 突然変異株 IND 遺伝子の検出および / または（エリート）アブラナ属（*Brassica*）系統への移行

突然変異株 IND 遺伝子を以下の方法で（エリート）アブラナ属（*Brassica*）育種系統に移行した：突然変異株 IND 遺伝子（ドナー植物）を含む植物を、（エリート）アブラナ属（*Brassica*）系統（エリート親／反復親）または突然変異株 IND 遺伝子を欠いた変種と交雑させた。以下の浸透性交雑スキームを使用する（突然変異株 IND 遺伝子を ind と略し、野生型を IND で示す）。

初期交雑：ind / ind（ドナー植物）× IND / IND（エリート親）

F1 植物：IND / ind

BC1 交雑：IND / ind × IND / IND（反復親）

BC1 植物：50% IND / ind および 50% IND / IND

突然変異株 IND アレル（ind）用の分子マーカー（AFLP、PCR、Invader（商標）など；下記も参照のこと）を用いて 50% IND / ind を選択する

【0211】

BC2 交雑：IND / ind（BC1 植物）× IND / IND（反復親）

BC2 植物：50% IND / ind および 50% IND / IND

突然変異株 IND アレル（ind）用の分子マーカーを用いて 50% IND / ind を選択する。

【0212】

BC3 から BC6 まで戻し交雑を繰り返す

BC3 ~ 6 植物：50% IND / ind および 50% IND / IND

突然変異株 IND アレル（ind）用の分子マーカーを用いて 50% IND / ind を選択する。戻し交雑回数を減らすために（BC6 ではなく BC3 までなど）、エリート親の遺伝子バックグラウンドに特異的な分子マーカーを用いることが可能である。

【0213】

BC3 ~ 6 S1 交雑：IND / ind × IND / ind

BC3 ~ 6 S1 植物：25% IND / IND および 50% IND / ind および 25% ind / ind

突然変異株 IND アレル（ind）用の分子マーカーを用いて、ind を含有する植物を選択する。突然変異株および野生型 IND アレル用の分子マーカーを用いて、突然変異株 IND アレル（ind / ind）にとってホモ接合である個々の BC3 ~ 6 S1 植物を選択する。その後、これらの植物を種子の生成に利用する。

【0214】

IND アレルに点変異を含む植物を選定するために、実施例 1 で説明したものなどの従来技術において周知の標準的な配列決定技術による直接配列決定を用いることが可能である。

【0215】

あるいは、IND アレルに特定の点変異を含む植物を、その特定の点変異を含まない植物と区別するための PCR アッセイを開発することも可能である。よって、以下の区別用 PCR アッセイを開発し、実施例 1 で同定した突然変異株 アレル（表 3 a および 3 b 参照）の存在または非存在ならびに接合状態を検出することが可能である。

- テンプレート DNA：

- ホモ接合またはヘテロ接合突然変異株 アブラナ属（*Brassica*）植物の葉材料から単離したゲノム DNA（以下「IND - Xx - EMSXX」と呼ぶ突然変異株 IND アレルを含む）。

- 野生型 DNA 対照：野生型 アブラナ属（*Brassica*）植物の葉材料から単離したゲノム DNA（以下「IND - Xx - WT」と呼ぶ突然変異株 IND アレルの野生型等価物を含む）。

- 陽性 DNA 対照：IND - Xx - EMSXX を含むことが知られているホモ接合突然変異株 アブラナ属（*Brassica*）植物の葉材料から単離したゲノム DNA。

【0216】

- 通常、各プライマーセットは、突然変異株と野生型標的遺伝子の両方に特異的な 1 つ

10

20

30

40

50

のプライマー (IND - A1 - EMS06 および IND - A1 - WT アレルの両方に特異的なプライマーなど) と、ヌクレオチド差に特異的な1つのプライマー (IND - A1 - EMS06 アレルまたは IND - A1 - WT アレルのいずれかに特異的なプライマーなど) からなる。一般に、後者のプライマーの最後のヌクレオチドがヌクレオチド差とマッチするが、1つ (またはそれより多く) の別の標的特異的なヌクレオチドを加えて、プライマーとその標的配列とのアニーリングを改善してもよい。

#### 【0217】

- PCRミックス: 2.5  $\mu$ l 10 $\times$  PCR緩衝液 (15 mM MgCl<sub>2</sub>)、0.25  $\mu$ l dNTP (20 mM)、1  $\mu$ l フォワードプライマー (10  $\mu$ M)、1  $\mu$ l リバースプライマー (10  $\mu$ M)、0.25  $\mu$ l Taq-ポリメラーゼ (5 U/ $\mu$ l)、19.5  $\mu$ l Milli-Q H<sub>2</sub>O、0.5  $\mu$ l DNA (20~50 ng/ $\mu$ l) = 合計容量 25  $\mu$ l ;

- サーマサイクルプロファイル: 95 で4分間; 30 $\times$  5 で1分間 (変性)、アニーリング温度で1分間、72 で2分間 (伸び率); 72 で5分間; 4 まで冷却。最適なアニーリング温度については、MJ Research thermocycler PTC-200 (Biozym) でアニーリング温度を57 ~ 70 などに変更できる温度勾配PCRによって判断することが可能である。野生型IND特異的なプライマーに最適なアニーリング温度は、野生型アブラナ属 (Brassica) 植物由来のDNA試料について (後述するような) 想定サイズの明確なPCR断片を検出可能であるが、突然変異株アブラナ属 (Brassica) 植物由来のDNA試料では検出できない温度である。突然変異株IND特異的なプライマーに最適なアニーリング温度は、突然変異株アブラナ属 (Brassica) 植物由来のDNA試料について (後述するような) 想定サイズの明確なPCR断片を検出可能であるが、野生型アブラナ属 (Brassica) 植物由来のDNA試料では検出できない温度である。

#### 【0218】

- 増幅後、5  $\mu$ l のローディング染料 (オレンジ染料) を15  $\mu$ l のPCR試料に加え、試料を1.5% アガロースゲルにロードする。

#### 【0219】

- 突然変異株アブラナ属 (Brassica) 植物のゲノムDNAの増幅後に得られる縞模様を以下のように評価する。

- 単一のPCRランと単一のPCRミックス内で突然変異株アブラナ属 (Brassica) 植物の葉材料から単離したDNA試料から得られたデータは、以下の条件が満たされるまで受け入れないものとする。

- 野生型DNA対照がIND - Xx - WT特異的なPCRアッセイで想定サイズのPCR断片を示し、IND - Xx - EMSXX特異的なPCRアッセイでは想定サイズのPCR断片がない

- 陽性DNA対照がIND - Xx - EMSXX特異的なPCRアッセイで想定サイズのPCR断片を示し、IND - Xx - WT特異的なPCRアッセイでは想定サイズのPCR断片がない

#### 【0220】

- IND - Xx - WT特異的なPCRアッセイで想定サイズのPCR産物を示さず、IND - Xx - EMSXX特異的なPCRアッセイで想定サイズのPCR断片を示すレーンは、ゲノムテンプレートDNAの調製元となった対応する植物がIND - Xx - EMSXXにとってホモ接合突然変異株であることを示している。

#### 【0221】

- IND - Xx - WT特異的なPCRアッセイおよびIND - Xx - EMSXX特異的なPCRアッセイで想定サイズのPCR断片を示すレーンは、ゲノムテンプレートDNAの調製元となった対応する植物が、IND - Xx - EMSXXにとってヘテロ接合突然変異株であることを示している。

#### 【0222】

- IND - X x - WT 特異的 PCR アッセイで想定サイズの PCR 断片を示し、IND - X x - EMS X X 特異的 PCR アッセイで想定サイズの PCR 産物を示さないレーンは、ゲノムテンプレート DNA の調製元となった対応する植物が野生型植物であることを示している。

#### 【0223】

あるいは、Invader (商標) 技術 (Third Wave Agbio) を用いて、IND アレルに特定の点変異を含む植物を、その特定の点変異を含まない植物と区別することも可能である。よって、以下の区別用 Invader (商標) プローブを開発し、実施例 4 で同定した突然変異株アレルの存在または非存在ならびに、接合状態を検出した (表 6 参照:

- 突然変異株または対応する野生型標的 IND 遺伝子に特異的なプローブ (それぞれ「5'フラップ1-x」および「5'フラップ2-x」として示す) ならびに、これらと併用可能な「侵入用」プローブを、表 6 に示す。通常、各プローブセットは、5'フラップ配列後の第1のヌクレオチドがヌクレオチド差とマッチする (表 6 の下線付きヌクレオチド) 突然変異株または野生型標的遺伝子に特異的な1つのプローブ (いわゆる「一次プローブ」; 配列番号12のプローブは IND - A1 - EMS06 に特異的であり、配列番号13のプローブは IND - A1 - WT に特異的であるなど) と、ヌクレオチド差の上流にあるヌクレオチドに特異的な1つのプローブ (いわゆる「invader (登録商標) oligo」; 配列番号11のプローブは IND - A1 - EMS06 と IND - A1 - WT との間のヌクレオチド差の上流にあるヌクレオチドに特異的であるなど)。後者のプライマーの最後のヌクレオチドは、突然変異株のヌクレオチド差とマッチすることがある (表 6 では太字ヌクレオチドで示す) が、一次プローブと invader (登録商標) oligo が標的 DNA へのハイブリダイズ時に単一塩基オーバーラップを形成して、Cleavase (登録商標) 酵素 (Third Wave Agbio) によって認識される特定の侵入構造を生成できれば、この最後のヌクレオチドには他のヌクレオチドも使用できる。

#### 【0224】

- 製造業者 (Third Wave Agbio) の指示どおりに Invader (商標) アッセイ手順とデータの解釈を実施する。簡単に説明すると、表 6 で「フラップ1」および「フラップ2」として示すヌクレオチド配列は、Invader (商標) アッセイの第一相で一次プローブから切断され、FRET (商標) カセット1および2の配列とそれぞれ相補的であるが標的突然変異株または野生型配列とは相補的ではない5'「フラップ」の配列を表している。第一相で一次プローブを切断し、フラップ1 - プローブおよび/またはフラップ2 - プローブが第二相で FRET (商標) カセット1および2とそれぞれハイブリダイズされると、それぞれ突然変異株または対応する野生型標的 IND 遺伝子の試料における存在を示すシグナルが生成される。

#### 【0225】

10

20

30

## 【表 1 2】

表 6

アレル番号	プローブ	
IND-A1-EMS06	5' CGTAAGGGTAAGCGACGACCCCTCAGACGT 3'	(配列番号 11)
	5' flap1- <u>A</u> TGGTGGCTCGTCG 3'	(配列番号 12)
IND-A1-WT	5' CGTAAGGGTAAGCGACGACCCCTCAGACGT 3'	(配列番号 11)
	5' flap2- <u>G</u> TGGTGGCTCGTC 3'	(配列番号 13)
IND-A1-EMS09	5' GGAGGCAGTGTCCATCTTTGCACCGCA 3'	(配列番号 14)
	5' flap1- <u>T</u> TGGCACCATCCTCT 3'	(配列番号 15)
IND-A1-WT	5' GGAGGCAGTGTCCATCTTTGCACCGCA 3'	(配列番号 14)
	5' flap2- <u>C</u> TGGCACCATCCTCT 3'	(配列番号 16)
IND-A1-EMS13	5' CCTGCCGTTTCAAGAACTTGGTGTAGCGGATGT 3'	(配列番号 17)
	5' flap1- <u>A</u> CTTCGTCGAGCATG 3'	(配列番号 18)
IND-A1-WT	5' GGAGGCAGTGTCCATCTTTGCACCGCA 3'	(配列番号 17)
	5' flap2- <u>G</u> CTTCGTCGAGCATG 3'	(配列番号 19)
IND-C1-EMS04	5' CATCCTCTTCAATATCCGGATCTTCTCGCTTATCC TTTCTCTACT 3'	(配列番号 20)
	5' flap1- <u>A</u> CCGACGAGCCAC 3'	(配列番号 21)
IND-C1-WT	5' CATCCTCTTCAATATCCGGATCTTCTCGCTTATCC TTTCTCTACT 3'	(配列番号 20)
	5' flap2- <u>G</u> CCGACGAGCCAC 3'	(配列番号 22)
IND-C1-EMS08	5' CGTAAGGGTAAGCGAGGACCCCCAGA 3'	(配列番号 23)
	5' flap1- <u>T</u> GGTGGTGGCTCG 3'	(配列番号 24)
IND-C1-WT	5' CGTAAGGGTAAGCGAGGACCCCCAGA 3'	(配列番号 23)
	5' flap2- <u>C</u> GGTGGTGGCTCG 3'	(配列番号 25)
IND-C1-EMS09	5' CGAGGACCCCCAGACGGTGGTGT 3'	(配列番号 26)
	5' flap1- <u>A</u> CTCGTCGGCGTAG 3'	(配列番号 27)
IND-C1-WT	5' CGAGGACCCCCAGACGGTGGTGT 3'	(配列番号 26)
	5' flap2- <u>G</u> CTCGTCGGCGT 3'	(配列番号 28)

10

20

## 【配列表】

0005770086000001.app

30

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
**A 0 1 H 5/10 (2006.01)** A 0 1 H 5/10  
**C 1 2 N 5/10 (2006.01)** C 1 2 N 5/00 1 0 3

微生物の受託番号 NCIMB NCIMB 41571  
 微生物の受託番号 NCIMB NCIMB 41572  
 微生物の受託番号 NCIMB NCIMB 41573  
 微生物の受託番号 NCIMB NCIMB 41574  
 微生物の受託番号 NCIMB NCIMB 41575

(72)発明者 ラハ, ベンヤミン  
 ベルギー国、ペー - 8 7 5 0 ウィンゲネ、ラークストラート 4  
 (72)発明者 デンブール, バルト  
 ベルギー国、ペー 9 8 2 0 メーレルベーク、ウィルヘンストラート 2 1  
 (72)発明者 ランベルト, バルト  
 ベルギー国、ペー - 8 9 0 0 レーペル、マールサルク・ハイフラーン 2 7、ブス 4 アー

審査官 荒木 英則

(56)参考文献 国際公開第 2 0 0 6 / 0 0 9 6 4 9 (WO, A 1)  
 米国特許出願公開第 2 0 0 5 / 0 1 2 0 4 1 7 (US, A 1)  
 国際公開第 2 0 0 4 / 1 1 3 5 4 2 (WO, A 1)  
 特表 2 0 1 1 - 5 0 4 7 3 5 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
 C 1 2 N 5 / 0 0 - 5 / 1 0  
 C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 0 9  
 C 0 7 K 1 4 / 0 0 - 1 4 / 4 1 5  
 A 0 1 H 1 / 0 0 - 5 / 1 0  
 C 1 2 Q 1 / 0 0 - 1 / 6 8  
 C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S ( S T N )  
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
 G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q