

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001年6月28日 (28.06.2001)

PCT

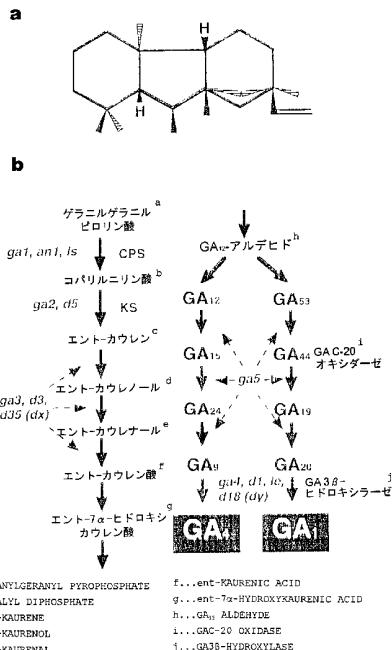
(10) 国際公開番号  
**WO 01/46434 A1**

- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12N 15/53,  
15/29, 9/02, 5/10, A01H 5/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/09037
- (22) 国際出願日: 2000年12月20日 (20.12.2000)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願平11/361608  
1999年12月20日 (20.12.1999) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 農林水産省農業生物資源研究所長が代表する日本国 (JAPAN)
- as represented by DIRECTOR GENERAL OF MINISTRY OF AGRICULTURE, FORESTRY AND FISHERIES NATIONAL INSTITUTE OF AGROBIOLOGICAL RESOURCES) [JP/JP]; 〒305-8602 茨城県つくば市観音台2-1-2 Ibaraki (JP). 理化学研究所 (RIKEN) [JP/JP]; 〒351-0198 埼玉県和光市広沢2番1号 Saitama (JP).
- (72) 発明者; および  
(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 田中宥司 (TANAKA, Hiroshi) [JP/JP]. 萱野暁明 (KAYANO, Toshiaki) [JP/JP]. 矢野昌裕 (YANO, Masahiro) [JP/JP]; 〒305-8602 茨城県つくば市観音台2-1-2 農林水産省農業生物資源研究所内 Ibaraki (JP). 松岡信 (MATSUOKA, Makoto) [JP/JP]; 〒464-0814 愛知県名古屋市千種区不老町 名古屋大学生物分子応答

[続葉有]

(54) Title: RICE-ORIGIN GIBBERELLIN 3 $\beta$ -HYDROXYLASE GENES AND UTILIZATION THEREOF

(54) 発明の名称: イネ由来のジベレリン3 $\beta$ 水酸化酵素遺伝子およびその利用



(57) Abstract: Genomic DNA and cDNA encoding GA3 $\beta$ -hydroxylase are isolated from rice. When the expression of these genes is inhibited in rice plants, dwarf plants, compared with the wild type plants, are obtained.

(57) 要約:

WO 01/46434 A1

イネから GA3 $\beta$ -ヒドロキシラーゼをコードするゲノム DNA および cDNA を単離した。イネ植物体において該遺伝子の発現を抑制した結果、野生型植物体と比較して矮性化した。



研究センター内 Aichi (JP). 小林正智 (KOBAYASHI, Masatomo) [JP/JP]; 〒305-0074 茨城県つくば市高野台3-1-1 理化学研究所 筑波研究所内 Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsuhi et al.) ; 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).

(81) 指定国 (国内): AU, CA, CN, KR, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

添付公開書類:  
— 國際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

- 1 -

## 明細書

### イネ由来のジベレリン $3\beta$ 水酸化酵素遺伝子およびその利用

#### 技術分野

本発明は、ジベレリンの生合成に関与するイネ由来の遺伝子および該遺伝子の利用に関する。

#### 背景技術

多細胞生物は、集合して機能的単位を形成する多数の専門器官や組織で構成される。生物の様々な部分の協調は化学伝達物質を通じて行なわれており、これら物質に対してホルモンという語が用いられている。植物ホルモンは、生長を刺激したり阻害したりする、または何らかの生長プログラムを制御するシグナルとして作用する天然に存在する物質であり、少量でも非常に有効である。今日、一般に植物ホルモンとして認識されている物質としては、オーキシン類、ジベレリン類、サイトカイニン類、アブシジン酸、ブラシノライド、およびエチレンが挙げられる。

動物ではホルモンは、通常、特殊な腺で合成され、血流を通じて生体全体に送られる。このようにして、ホルモンは反応する準備ができている標的や反応組織に到達し、特異的な制御プロセスを誘発する。当初、動物について展開されたホルモンに対するこのような古典的な考え方は、高等植物に応用された。多くの場合、植物ホルモンは特異的標的組織において活性を示すが、それらはホルモンが産生される組織とは異なることが多い。しかし、植物ホルモンは全て、多細胞植物の多くの部位で検出することができる。これは、合成部位と植物ホルモン作用部位との間にしばしば絶対的な分離がないことを示している。必要であれば、ホルモンは、ホルモンが形成される細胞と同じ細胞（組織）に作用を及ぼすことが

- 2 -

可能である。このように、植物ホルモン合成の調節を理解することは、合成と作用との関係を決定する上で重要である。

ジベレリン (GA) は、当初、1920 年代に日本人植物病理学者によって植物毒素として発見された。植物病原性真菌であるジベレラ (*Gibberella fujikuroi*) は、イネ科植物に感染し、病理的な縦方向の生長を引き起こす化合物を分泌する (馬鹿苗病 ("mad seedling disease"))。1935~1938 年の間にこの化合物は単離され、活性物質が結晶化されて、これを「ジベレリン」と呼んだ。後の研究によって、GA が高等植物によっても生成され、生長の制御と分化プロセスにおいて非常に重要なことが示された。

1992 年までに同定された約 80 個の GA の基本構造は、エント・ジベレラン (ent-gibberellin) の 4 環式系である (図 1a)。GA は、主にメバロン酸からゲラニルゲラニルピロ磷酸の環状化を通じて生成されるジテルペノイドカルボン酸を含むが (図 1b)、そのほとんどは植物の生長促進には不活性である。多くの植物において、植物生長制御物質として作用する生物学的に活性な GA は、GA<sub>1</sub> および GA<sub>4</sub> である。それらは、種子の発芽、茎の伸長、開花そして結実などの様々な生長プロセスを調節することができる。このため、GA の生合成を改変することで、産業上有用な様々な改変植物を作出することが可能であると考えられる。

環境刺激のメディエータとしての GA の役割は、十分に確立されている。光や温度のような物理的要因は、代謝経路の特定の段階を通じて、その流量を変化させることにより GA 代謝を修飾することができる。例えば、光の性質 (赤色または赤外線) と強度 (強いまたは弱い) は、GA 生合成に影響を及ぼす。レタスの種子やササゲの上胚軸では、GA<sub>20</sub> の 3 β ヒドロキシル化は、遠赤色線による処置によって増強される (Toyomasu et al. (1992) Plant Cell Physiol. 33, 695-701)。さらに、エンドウの実生を低放射度 (40 μmol/m<sup>2</sup> · s) で生長させると、GA<sub>20</sub> 含量は、高放射度 (386 μmol/m<sup>2</sup> · s) で生長する植物と比較して 7 倍増加

- 3 -

するが、暗所で生長させた植物の  $GA_{20}$  含量は高放射度の場合の含量へと減少する (Gawronska et al. (1995) *Plant Cell Physiol.* 36, 1361-1367)。

フィトクロムや光の強度による生長速度の変化と GA 代謝との関係を解明しようとした試みは数多く為されてきたが、それを支持する証拠はいまだ乏しい。これらの制御プロセスの基礎となるメカニズムは、GA 生合成の分子生物学における現在の進歩の結果として理解されるであろう。

また、少なからぬ努力にも関わらず生物活性 GA の合成部位と特定の細胞や組織におけるそれらの作用様式は明らかにされていない。植物に  $^{14}C$ -標識 GA を加えた実験から、それらは植物の中を非極性的に移動すると考えられている。最近、矮性のエンドウ植物と野生型のエンドウ植物の接木実験から、生物活性 GA である  $GA_1$  が、その前駆体である  $GA_{20}$  とは異なり輸送されないことが示された (Proebsting et al. (1992) *Plant Physiol.* 100, 1354-1360、Reid et al. (1983) *J. Exp. Bot.* 34, 349-364)。矮性エンドウ植物について GC-MS とバイオアッセイを用いた定量的分析から、GA が主に茎端、若葉そして花のような活発に生長伸長しつつある組織に存在することが明らかになった (Jones and Phillips (1996) *Plant Physiol.* 41, 1381-1386、Potts et al. (1982) *Physiol. Plant.* 55, 323-328、Kobayashi et al. (1988) *Agric. Biol. Chem.* 52, 1189-1194)。しかし、ほとんどの GA はごく少量しか存在せず、ほとんどが生物活性でないため、特定の組織に存在する各 GA の正確な量は測定することが難しい。したがって、生物活性 GA の合成部位を明らかにするためには、新しいアプローチが必要である。

分子生物学と遺伝子戦略の進歩に伴って、現在では、GA 生合成酵素をコードする遺伝子のほとんどが様々な植物種からクローニングされている。これらの試験から、それぞれの GA 反応性矮性変異体が GA 生合成酵素を欠損することが示された (図 1b)。その発現プロフィールは、経路が生長時に厳密に制御されていることを示している。これらの遺伝子のうち、GA 生合成の初期に活性な酵素であるコパリル 2 磷酸シンターゼ (CPS) をコードするシロイヌナズナの GA1 は、

- 4 -

例えば、茎端、根端そして花などの急速に生長しつつある組織において高度に発現されている (Silverstone et al. (1997) Plant J. 12, 9-19)。GA 生合成経路の後期段階を触媒し、小さい遺伝子ファミリーを構成する GA C-20 オキシダーゼは、生長のために GA が必要であるシロイヌナズナ、エンドウそしてインゲンの茎や生長しつつある種子に特異的に発現し、それらは GA<sub>3</sub>処理によって負の制御を受ける (Phillips et al. (1995) Plant Physiol. 108, 1049-1057、Garcia-Martinez et al. (1997) Plant Mol. Biol. 33, 1073-1084)。

これらの観察により、本発明者らは、様々な器官における GA の作用は存在する内因性 GA の量に依存し、内因性 GA 量は、生物活性 GA の GA 作用部位への移動ではなくて、GA 生合成酵素の発現の制御に依存するのではないかと推測するに至った。しかし、生物活性 GA は、GA3 $\beta$ -ヒドロキシラーゼによって触媒される 3 $\beta$ ヒドロキシル化によって合成されるため、CPS または GA C-20 オキシダーゼの発現を分析しても、生物活性 GA の合成部位や生物活性 GA 量の制御に関する直接的な証拠は得られないと考えた。

上記のように、3 $\beta$ -ヒドロキシラーゼは、生物活性 GA 生成の最終段階でそれぞれ、GA<sub>20</sub> と GA<sub>9</sub> の GA<sub>1</sub> と GA<sub>4</sub> への変換を触媒する (図 1b)。3 $\beta$ -ヒドロキシラーゼの酵素学はまだ完全には解明されていないが、2-オキソグルタル酸結合領域がその活性に必須であり、このことは GA3 $\beta$ -ヒドロキシラーゼが 2-オキソグルタル酸依存的ジオキシゲナーゼの典型的な特性を有することを示している。特定の GA3 $\beta$ ヒドロキシラーゼは多機能性である可能性があり、カボチャの胚乳は、2 $\beta$  と 3 $\beta$  の双方のヒドロキシル化を触媒する (Lange et al. (1997) Plant Cell, 9, 1459-1467)。トウモロコシ矮性体の 1, 3 $\beta$ ヒドロキシラーゼもまた、多機能性であると考えられており、トウモロコシ GA 生合成経路における 3 つのヒドロキシル化段階を触媒する (Spray et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. 93, 10515-10518)。しかし、これらの GA3 $\beta$ ヒドロキシラーゼの本質はまだ十分に解明されていない。

## 発明の開示

本発明は、イネ由来の新規な  $GA3\beta$ -ヒドロキシラーゼ遺伝子およびその利用、特に草型が改変された植物体の作出のための該遺伝子の利用を提供する。

本発明者等は、イネ由来の  $GA3\beta$ -ヒドロキシラーゼ遺伝子を単離するために、まず、双子葉植物の  $GA3\beta$ -ヒドロキシラーゼの保存領域を基に設計した縮重プライマーを用いて、イネのゲノム DNA を鑄型に PCR を行なった。次いで、これにより得られた  $GA3\beta$ -ヒドロキシラーゼをコードするゲノム DNA 断片をプローブとしてイネのゲノムライブラリのスクリーニングを行ない、いくつかのクローンを得た。これらのゲノムクローンを制限マップに基づいて 2 群に分類し、各群の中の 1 つにつき完全に塩基配列の決定を行なった。その結果、本発明者等は、これらクローンが、それぞれイネの  $GA3\beta$ -ヒドロキシラーゼをコードしていることを見出した。

次ぎに、各クローンの配列に基づき、cDNA 断片を得るために、実生（イネの茎端）または未開の花から単離した総 RNA を用いて RT-PCR を実施した。これにより、 $GA3\beta$ -ヒドロキシラーゼをコードする完全な大きさの cDNA クローンを得た（それぞれのクローンを「 $Os3\beta-1$ 」と「 $Os3\beta-2$ 」と名付けた）。さらに、本発明者等は、得られたゲノム DNA の配列を基に設計したプライマーを用いて、イネの実生（茎端）または未開の花から単離した総 RNA を鑄型に逆転写 PCR (RT-PCR) を行ない、完全なイネ  $GA3\beta$ -ヒドロキシラーゼをコードする cDNA クローンを取得することに成功した。

イネにおいては GA 反応性の矮性種として d18 変異体が知られているため、本発明者等は、単離されたイネ  $GA3\beta$ -ヒドロキシラーゼクローンが D18 遺伝子に対応するか否かの検討を行なった。RFLP (制限断片長多型) 分析および d18 対立遺伝子の塩基配列の直接的な分析を行なった結果、単離した 2 つのイネ遺伝子のうち、 $Os3\beta-2$  遺伝子が d18 変異の原因となる遺伝子であることが判明した。ま

- 6 -

た、 $0s3\beta$ -2 遺伝子との発現部位の相違から、 $0s3\beta$ -1 タンパク質が  $0s3\beta$ -2 タンパク質と生物活性 GA の異なる経路に関与していることが示唆された。

さらに、本発明者等は、 $0s3\beta$ -2 遺伝子に対するアンチセンス DNA を利用して、イネ植物体における  $0s3\beta$ -2 遺伝子の発現を抑制することにより、野生型植物体と比較して矮性化した植物体を作出することに成功した。

即ち、本発明者等は、イネから新規な GA 3  $\beta$ -ヒドロキシラーゼ遺伝子を単離することに成功し、さらに該遺伝子の発現を抑制することで野生型植物体と比較して草型が改変された植物体を作出し得ることを見出した。

本発明は、より詳しくは、

(1) ジベレリン 3  $\beta$  水酸化酵素活性を有するタンパク質をコードする、下記

(a) から (c) のいずれかに記載の DNA、

(a) 配列番号：1 または 2 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする DNA、

(b) 配列番号：3 または 4 に記載の塩基配列のコード領域を含む DNA、

(c) 配列番号：1 または 2 に記載のアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする DNA、

(2) (1) に記載の DNA またはその転写産物と相補的なアンチセンス RNA をコードする DNA、

(3) (1) に記載の DNA の転写産物を特異的に開裂するリボザイム活性を有する RNA をコードする DNA、

(4) 植物細胞における発現時に、共抑制効果により、内因性の (1) に記載の DNA の発現を抑制する RNA をコードする DNA、

(5) (1) から (4) のいずれかに記載の DNA を含むベクター、

(6) (1) から (4) のいずれかに記載の DNA を発現可能に保持する形質転換植物細胞、

- (7) (6) に記載の形質転換植物細胞を含む形質転換植物体、
- (8) (7) に記載の形質転換植物体の繁殖材料、
- (9) (1) に記載の DNA によりコードされるタンパク質、
- (10) (1) に記載の DNA を発現可能に保持する形質転換細胞を培養し、該細胞またはその培養上清から発現させたタンパク質を回収する工程を含む、  
(9) に記載のタンパク質の製造方法、
- (11) 植物細胞内において (1) に記載の DNA の発現量を調節することを特徴とする、植物の生長を改变する方法、
- (12) 植物細胞内において (1) に記載の DNA の発現量を調節することを特徴とする、植物の草型を改变する方法、を提供するものである。

本発明は、イネから単離された、新規な GA3 $\beta$ -ヒドロキシラーゼおよび該酵素をコードする DNA を提供する。本発明の DNA に含まれる、本発明者らにより単離されたイネ由来の GA3 $\beta$ -ヒドロキシラーゼ遺伝子 0s3 $\beta$ -1 および 0s3 $\beta$ -2 の cDNA の塩基配列をそれぞれ配列番号：3 および 4 に、ゲノム DNA の塩基配列をそれぞれ配列番号：5 および 6 に示す。また、「0s3 $\beta$ -1」タンパク質および「0s3 $\beta$ -2」タンパク質のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号：1 および 2 に示す。

イネ由来の「0s3 $\beta$ -1」タンパク質および「0s3 $\beta$ -2」タンパク質は、3 $\beta$ ヒドロキシラーゼの 2-オキソグルタル酸依存的ジオキシゲナーゼ (2-ODD) としてのこれまでの分類と一致して、植物の 2-ODD に特徴的な全てのドメインを含んでいた (Prescott, (1993) J.Exp.Bot. 44, 849-861; de Carolis and Luca, (1994) Phytochemistry, 36, 1093-1107)。公表された全ての配列の中で、双方のクローンのコード領域は GA3 $\beta$ -ヒドロキシラーゼと最も高い相同意を示す。特に、鉄と共に因子である 2-オキソグルタル酸の結合として作用する可能性がある領域は、高度に保存されている (0s3 $\beta$ -1 では 240~247 位と 302~307 位、0s3 $\beta$ -2 では 222~229 位と 285~290 位)。それらはまた、GA3 $\beta$ -ヒドロキシラーゼ (0s3 $\beta$ -1 では 144~150 位、0s3 $\beta$ -2 では 127~133 位) に独自の保存モチーフ (Me

t-Trp-X-Glu-Gly-X-Thr) を有する。双子葉植物の GA<sub>3</sub>β-ヒドロキシラーゼやその他のジオキシゲナーゼとの配列の比較から、本発明者等により単離されたクローンは、イネの GA<sub>3</sub>β-ヒドロキシラーゼをコードしていると考えられる。

Os<sub>3</sub>β-2 のマッピングとゲノムサザン分析から、Os<sub>3</sub>β-2 が D18 遺伝子に対応することが示された。イネの d18 変異体は GA 反応性の矮性種であり、多数の対立遺伝子、すなわち豊雪-矮性 (Hosetu-waisei) 、秋晴-矮性 (Akibare-waisei) 、小丈-玉錦 (Kotake-tamanishiki) 、そして矮稈-C (Waito-C) 、がこれまでに確認されている (図 2)。Os<sub>3</sub>β-2 タンパク質もまた、生物活性 GA 合成を介して、植物の節間伸長に関与していると考えられる。

様々な生長段階で異なる器官における内因性 GA 量に関する分析から、13-ヒドロキシジベレリン (GA<sub>19</sub>、GA<sub>20</sub>、GA<sub>1</sub>) は栄養生長器官では優性であるが、非 13-ヒドロキシル化ジベレリン (GA<sub>24</sub>、GA<sub>9</sub>、GA<sub>4</sub>) は再生生長器官、特に葦に蓄積することが明らかになっている。このことは、生物活性 GA の生合成経路が器官特異的であることを示している (Kurogouchi et al. (1979) *Planta*, 146, 185-191、Kobayashi et al. (1984) *Agric.Biol.Chem.* 48, 2725-2729、Kobayashi et al. (1988) *Agric.Biol.Chem.* 52, 1189-1194)。Os<sub>3</sub>β-2 (D18) と Os<sub>3</sub>β-1 の発現パターンはこの推測と一致する。実際、Os<sub>3</sub>β-2 mRNA は茎、若葉、そして花序分裂組織において高く、Os<sub>3</sub>β-1 mRNA は花において特に認められた。これらの一貫性は、Os<sub>3</sub>β-2 と Os<sub>3</sub>β-1 の産物がそれぞれ、GA<sub>20</sub> と GA<sub>9</sub> に対する基質特異性を有する可能性を示している。

Os<sub>3</sub>β-2 と Os<sub>3</sub>β-1 の発現はまた、イネにおける生物活性 GA の分布とも一致する。育種分析と定量的分析により、GA<sub>1</sub> は、ジベレリン生合成の最も活発な部位である若葉組織では高く (Choi et al. (1995) *Physiol.* 36(6), 997-1001)、Os<sub>3</sub>β-2 の最も高い発現も若葉において認めた。興味深いことに、茎端における Os<sub>3</sub>β-2 の発現は他の器官と比較して中等度のレベルであるが、それにも関わらず、シロイヌナズナの GA1 やタバコの Nty などの多くの GA 生合成遺伝子は、活

- 9 -

発に分裂伸長しつつある組織、例えば茎端と根に強く発現している (Silverstone et al. (1997) Plant J. 12, 9-19)。この相違は、GA を合成する器官活性が单子葉植物と双子葉植物では異なる可能性があることを示唆している。一方、内因性の GA<sub>4</sub>量は、開花段階での薬において非常に高く (Kobayashi et al. (1988) Agric.Biol.Chem. 52, 1189-1194、Kobayashi et al. (1990) Plant Cell Physiol. 31(2), 289-293)、この事実は花における Os3β-1 の特異的発現とよく一致する。この一致は GA<sub>4</sub> が Os3β-1 タンパク質の作用により薬において合成されることを示しているのかも知れない。従って、Os3β-2 タンパク質と Os3β-1 タンパク質は、生物活性 GA の異なる経路に関係している可能性がある。

実際、Os3β-1 タンパク質は GA<sub>9</sub> を基質として、GA<sub>4</sub> (3β 水酸化)、GA<sub>7</sub> (2, 3 位の不飽和化および 3β 水酸化)、GA<sub>34</sub> (2β 水酸化) を生成し (図 9)、GA<sub>20</sub> を基質とした場合にも同様な結果が得られた。また GA<sub>5</sub>、GA<sub>44</sub> を基質とした時にはそれに対応する 3β 水酸化ジベレリン (GA<sub>3</sub>、GA<sub>88</sub>) を生成した。また、Os3β-2 タンパク質は、GA<sub>5</sub>、GA<sub>9</sub>、GA<sub>20</sub>、GA<sub>44</sub> を基質として、それに対応する 3β 水酸化ジベレリン (GA<sub>3</sub>、GA<sub>4</sub>、GA<sub>1</sub>、GA<sub>38</sub>) を生成した (図 10) (実施例 5)。

生物活性 GA が、茎の伸長のみならず、他の様々な植物生長過程に必要であることに関しては、その他いくつかの報告例がある。例えば、花の器官に関しては、シロイヌナズナの GA 欠損変異体である ga1-3 が雄性不稔表現型を示すという報告 (Koornneef and Van der Veen, (1980) Theor.Appl.Genet. 58, 257-263) やトマトの stamenless-2 や gib-1 が、初期段階で薬の生長を停止し、生存花粉粒を形成しないという報告 (Sawhney, (1974) J.Exp.Bot. 25, 1004-1009、Jacobsen and Olszewski, (1996) Proc.Natl.Acad.Sci. 93, 9292-9296) がなされている。

本発明のこれらタンパク質は、いずれも生物活性 GA の生成に関与していると考えられるため、生物活性 GA の製造に用いることが可能である。また、後述す

- 10 -

るようすに、植物体内においてこれらタンパク質の発現量を調節することにより、植物の生長を改変させ、例えば、野生型とは異なる草型の植物体を製造することも可能である。

本発明のタンパク質は、当業者に公知の方法により、遺伝子組み換え技術を利用して調製した組み換えタンパク質として、また天然のタンパク質として調製することができる。組み換えタンパク質は、後述するが、例えば、本発明のタンパク質をコードする DNA（例えば、配列番号：3、4）を適当な発現ベクターに挿入し、該ベクターを適当な細胞に導入し、該形質転換細胞から精製することにより調製することが可能である。また、天然のタンパク質は、例えば、調製した組み換えタンパク質若しくはその部分ペプチドを適当な免疫動物に免疫することにより調製した抗体を結合したアフィニティーカラムに、本発明のタンパク質を発現しているタバコやイネの組織などから調製した抽出液を接触させて、該カラムに結合するタンパク質を精製することにより調製することができる。

本発明のタンパク質には、野生型タンパク質（配列番号：1、2）の機能を保持したまま、その一部のアミノ酸を改変したタンパク質が含まれる。このようなタンパク質を調製するための当業者によく知られた方法としては、例えば、site-directed mutagenesis 法 (Kramer, W. & Fritz, H.-J. Oligonucleotide-directed construction of mutagenesis via gapped duplex DNA. Methods in Enzymology, 154: 350-367, 1987) が挙げられる。また、アミノ酸の変異は自然界において生じることもある。本発明のタンパク質には、このように天然型のタンパク質の GA<sub>3</sub>β-ヒドロキシラーゼ活性を保持したまま、そのアミノ酸配列において 1 もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および/または挿入されたタンパク質も含まれる。タンパク質におけるアミノ酸の改変部位および改変個数は、改変後のタンパク質が GA<sub>3</sub>β-ヒドロキシラーゼ活性を有する限り、特に制限はない。アミノ酸の改変は、一般的には、50 アミノ酸以内であり、好ましくは 30 アミノ

- 1 1 -

酸以内であり、さらに好ましくは 10 アミノ酸以内であり、さらに好ましくは 3 アミノ酸以内である。

本発明において「GA<sub>3</sub>β-ヒドロキシラーゼ活性」とは、反応基質である GA<sub>20</sub> または GA<sub>9</sub> を与えた際に、補因子である鉄イオン、2 オキソグルタル酸の存在下で GA<sub>1</sub> または GA<sub>4</sub> を反応生成物として合成する活性を指す。該活性は、例えば、次ぎのようにして検出することができる。一般的には、発現ベクターに得られた cDNA を挿入し、融合タンパク質として大腸菌内で過剰発現させる。その結果、得られる細胞抽出液を酵素液として、反応基質である GA<sub>20</sub> または GA<sub>9</sub>、および補因子である鉄イオン、2 オキソグルタル酸の存在下で反応を *in vitro* で行なわせ、最終的に反応生成物 (GA<sub>1</sub> または GA<sub>4</sub>) を GC-MS によって確認する。

本発明においては、これらタンパク質をコードする cDNA およびゲノム DNA が単離された。従って、本発明のタンパク質をコードする DNA には、これらタンパク質をコードしうる限り、cDNA およびゲノム DNA の双方が含まれる。Os<sub>3</sub>β-2 タンパク質や Os<sub>3</sub>β-1 タンパク質をコードする DNA は、cDNA であれば、それぞれ配列番号：3 および 4 に記載の塩基配列情報を基に設計したプライマーを用い、実生（イネの茎端）または未開の花から単離した総 RNA を鑄型とした逆転写 PCR を行なうことにより調製することができる。また、ゲノム DNA は、それぞれ配列番号：5 および 6 に記載の塩基配列情報を基に設計したプライマーを用い、イネのゲノム DNA を鑄型に PCR を行なうことにより調製することができる。

これら本発明のタンパク質をコードする DNA は、例えば、組換えタンパク質の製造に用いることができる。組換えタンパク質の製造は、例えば、下記のようにして行なうことができる。まず、pMAL-c2 発現ベクター (NEB 社) のマルチクローニングサイトに対し、予め制限酵素サイトを設けたプライマーを用いて RT-PCR により合成した全長 cDNA をサブクローニングする。この構築物を、定法により、BL21 (プロテアーゼ欠失株) に形質転換する。これにより得られる形質転換体を用いてタンパク質の誘導を行う。大腸菌は、2 x YT、0.2% グルコースの培地

- 1 2 -

で 37°C 振とう培養する。OD<sub>600</sub> が 0.6 前後になったところで、IPTG を最終濃度 1mM となるように加え、更に 18°C で 24 時間培養する。酵素液の抽出に関しては、培養後、集菌し、これを suspend buffer(50mM Tris-HCl, pH8.0, 10%グリセロール, 2mM DTT, 1mg/ml リゾチーム)に溶かす。懸濁液を 4 °C にて 30 分放置後、-80°C にて、凍結するまでインキュベートする。凍結した懸濁液を解凍し、SONICATOR(HEAT SYSTEMS-ULTRASONICS, INC. MODEL W-225R)を用いて、MAX レベルにて、30 秒間、5 分のインターバルをおき、2 回超音波処理を行う。処理した懸濁液を遠心 (15,000rpm, 4°C, 20 分) し、その上清を粗酵素液とすることができる。

また、精製タンパク質の調製は、例えば、本発明のタンパク質をヒスチジンタグ、マルトース結合タンパク質、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) と融合した形態で大腸菌などで発現させ、これをそれぞれニッケルカラム、アミロースカラム、GST-グルタチオンカラムにて精製することにより行なうことができる。さらに、精製後は、必要に応じて、スロンビンやファクターXa などの制限プロテアーゼを利用して上記タグを切り離すこともできる。

上記したように、本発明者等により単離された遺伝子は、生物活性 GA の生産を通じて植物の生長に関係していると考えられ、従って、これら遺伝子の発現を調節することにより、植物の成長を制御することができると言える。特に 0s3β-2 は、植物の節間の生長に関与していると考えられるため、植物の草丈の制御などに利用することができる。植物の草丈を制御することには、産業上の種々の利点が存在する。

例えば、植物体内における本発明の遺伝子の発現を抑制して、草丈を減少させることにより、植物を倒れにくくすることができ、その結果、子実重量を増加させることが可能となる。また、草丈を減少させ、1 株あたりの植物体の形をよりコンパクトにすることにより、単位面積あたりに作付できる植物体の個体数を増加させることができる。このことは、特に、イネをはじめ、ムギ、トウモロコシなどの農作物の生産において大きな意義を有する。また本発明のタンパク質をコ

- 13 -

ードする DNA は、矮性花卉などへの応用、矮性果樹などへの応用も考えられる。 $Os3\beta-1$  に関しては、花における発現を抑制することにより、雄性不稔形質を誘導できる可能性がある。

一方、植物体内における本発明の遺伝子の発現を増加させて、草丈を増加させることにより、植物体全体の収量を増加させることも考えられる。このことは、特に、飼料用作物全体の収穫量を向上させる上で有意義である。

本発明において、植物の生長を制御するために、本発明の遺伝子の発現を抑制する方法としては、当業者に公知の種々の方法を用いることができる。ここで「遺伝子の発現の抑制」には、遺伝子の転写の抑制、タンパク質への翻訳の抑制が含まれる。また、遺伝子発現の完全な停止のみならず発現の減少も含まれる。

植物における特定の内在性遺伝子の発現を抑制する方法としては、アンチセンス技術を利用する方法が当業者に最もよく利用されている。植物細胞におけるアンチセンス効果は、エッカーラが一時的遺伝子発現法を用いて、電気穿孔法で導入したアンチセンス RNA が植物においてアンチセンス効果を發揮することで初めて実証した(J.R. Ecker および R.W. Davis, Proc. Natl. Acad. USA. 83:5372, 1986)。その後、タバコやペチュニアにおいても、アンチセンス RNA の発現によって標的遺伝子の発現を低下させる例が報告されており(A.R. van der Krol ら Nature 333:866, 1988)、現在では植物における遺伝子発現を抑制させる手段として確立している。

アンチセンス核酸が標的遺伝子の発現を抑制する作用としては、以下のような複数の要因が存在する。すなわち、三重鎖形成による転写開始阻害、RNA ポリメラーゼによって局部的に開状ループ構造がつくられた部位とのハイブリッド形成による転写抑制、合成の進みつつある RNA とのハイブリッド形成による転写阻害、イントロンとエキソンとの接合点でのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、スプライソーム形成部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、mRNA とのハイブリッド形成による核から細胞質への移行抑制、キャッピング部

- 14 -

位やポリ(A)付加部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、翻訳開始因子結合部位とのハイブリッド形成による翻訳開始抑制、開始コドン近傍のリボソーム結合部位とのハイブリッド形成による翻訳抑制、mRNAの翻訳領域やポリソーム結合部位とのハイブリッド形成によるペプチド鎖の伸長阻止、および核酸とタンパク質との相互作用部位とのハイブリッド形成による遺伝子発現抑制などである。これらは、転写、スプライシング、または翻訳の過程を阻害して、標的遺伝子の発現を抑制する(平島および井上「新生化学実験講座2 核酸IV 遺伝子の複製と発現」,日本生化学会編,東京化学同人,pp.319-347,1993)。

本発明で用いられるアンチセンス配列は、上記のいずれの作用で標的遺伝子の発現を抑制してもよい。一つの態様としては、遺伝子のmRNAの5'端近傍の非翻訳領域に相補的なアンチセンス配列を設計すれば、遺伝子の翻訳阻害に効果的であろう。しかし、コード領域もしくは3'側の非翻訳領域に相補的な配列も使用し得る。このように、遺伝子の翻訳領域だけでなく非翻訳領域の配列のアンチセンス配列を含むDNAも、本発明で利用されるアンチセンスDNAに含まれる。使用されるアンチセンスDNAは、適当なプロモーターの下流に連結され、好ましくは3'側に転写終結シグナルを含む配列が連結される。このようにして調製されたDNAは、公知の方法で、所望の植物へ形質転換できる。アンチセンスDNAの配列は、形質転換する植物が持つ内在性遺伝子(若しくはその相同遺伝子)またはその一部と相補的な配列であることが好ましいが、遺伝子の発現を有効に阻害できる限り、完全に相補的でなくてもよい。転写されたRNAは、標的とする遺伝子の転写産物に対して好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の相補性を有する。アンチセンス配列を用いて、効果的に標的遺伝子の発現を阻害するには、アンチセンスDNAの長さは、少なくとも15塩基以上であり、好ましくは100塩基以上であり、さらに好ましくは500塩基以上である。通常、用いられるアンチセンスDNAの長さは5kbよりも短く、好ましくは2.5kbよりも短い。

- 1 5 -

内在性遺伝子の発現の抑制は、また、リボザイムをコードする DNA を利用して行うことも可能である。リボザイムとは触媒活性を有する RNA 分子のことという。リボザイムには種々の活性を有するものがあるが、中でも RNA を切断する酵素としてのリボザイムの研究により、RNA の部位特異的な切断を目的とするリボザイムの設計が可能となった。リボザイムには、グループ I イントロン型や、RNaseP に含まれる M1RNA のように 400 ヌクレオチド以上の大きさのものもあるが、ハンマーへッド型やヘアピン型と呼ばれる 40 ヌクレオチド程度の活性ドメインを有するものもある(小泉誠および大塚栄子,蛋白質核酸酵素,35:2191,1990)。

例えば、ハンマーへッド型リボザイムの自己切断ドメインは、G13U14C15 の C15 の 3' 側を切断するが、活性には U14 が 9 位の A と塩基対を形成することが重要とされ、15 位の塩基は C の他に A または U でも切断されることが示されている(M.Koizumi ら,FEBS Lett.228:225,1988)。リボザイムの基質結合部を標的部位近傍の RNA 配列と相補的になるように設計すれば、標的 RNA 中の UC、UU または UA という配列を認識する制限酵素的な RNA 切断リボザイムを作出することが可能である(M.Koizumi ら,FEBS Lett. 239:285,1988, 小泉誠および大塚栄子,蛋白質核酸酵素,35:2191,1990, M.Koizumi ら, Nucleic Acids Res. 17:7059,1989)。本発明者等により単離された Nty 遺伝子、0s3 $\beta$ -1 遺伝子、0s3 $\beta$ -2 遺伝子(配列番号：3、4) 中にはリボザイムの標的となりうる部位が多数存在する。

また、ヘアピン型リボザイムも、本発明の目的のために有用である。ヘアピン型リボザイムは、例えばタバコリングススポットウイルスのサテライト RNA のマイナス鎖に見出される(J.M.Buzayan Nature 323:349,1986)。このリボザイムも、標的特異的な RNA 切断を起こすように設計できることが示されている(Y.Kikuchi および N.Sasaki Nucleic Acids Res. 19:6751,1992, 菊池洋,化学と生物 30:12,1992)。

標的を切断できるよう設計されたリボザイムは、植物細胞中で転写されるよう にカリフラワーモザイクウイルスの 35S プロモーターなどのプロモーターおよび

- 1 6 -

転写終結配列に連結される。しかし、その際、転写された RNA の 5' 末端や 3' 末端に余分な配列が付加されているとリボザイムの活性が失われてしまうことがある。このようなとき、転写されたリボザイムを含む RNA からリボザイム部分だけを正確に切り出すために、リボザイム部分の 5' 側や 3' 側に、トリミングを行うためのシスに働く別のトリミングリボザイムを配置させることも可能である(K.Taira ら, Protein Eng. 3:733, 1990, A.M.Dzianott および J.J.Bujarski Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 86:4823, 1989, C.A.Grosshans および R.T.Cech Nucleic Acids Res. 19:3875, 1991, K.Taira ら Nucleic Acids Res. 19:5125, 1991)。また、このような構成単位をタンデムに並べ、標的遺伝子内の複数の部位を切断できるようにして、より効果を高めることもできる(N.Yuyama ら Biochem.Biophys.Res.Commun.186:1271, 1992)。このようなリボザイムを用いて本発明で標的となる遺伝子の転写産物を特異的に切断し、該遺伝子の発現を抑制することができる。

内在性遺伝子の発現の抑制は、さらに、標的遺伝子配列と同一もしくは類似した配列を有する DNA の形質転換によってもたらされる共抑制によっても達成される。「共抑制」とは、植物に標的内在性遺伝子と同一若しくは類似した配列を有する遺伝子を形質転換により導入すると、導入する外来遺伝子および標的内在性遺伝子の両方の発現が抑制される現象のことをいう。共抑制の機構の詳細は明らかではないが、植物においてはしばしば観察される(Curr.Biol.7:R793, 1997, Curr.Biol.6:810, 1996)。例えば、本発明の遺伝子が共抑制された植物体を得るために、本発明の遺伝子若しくはこれと類似した配列を有する DNA を発現できるように作製したベクターDNA を目的の植物へ形質転換すればよい。共抑制に用いる遺伝子は、標的遺伝子と完全に同一である必要はないが、好ましくは 70% 以上、さらに好ましくは 80% 以上、さらに好ましくは 90% 以上（例えば、95% 以上）の配列の同一性を有する。

アミノ酸配列や塩基配列の同一性は、Karlin and Altschul によるアルゴリズム BLAST(Proc. Natl. Acad. Sei. USA 90:5873-5877, 1993)によって決定する

- 17 -

ことができる。このアルゴリズムに基づいて、BLASTN や BLASTX と呼ばれるプログラムが開発されている(Altschul et al. J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990)。BLAST に基づいて BLASTN によって塩基配列を解析する場合には、パラメーターはたとえば score = 100、wordlength = 12 とする。また、BLAST に基づいて BLASTX によってアミノ酸配列を解析する場合には、パラメーターはたとえば score = 50、wordlength = 3 とする。BLAST と Gapped BLAST プログラムを用いる場合には、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov.>)。

本発明の遺伝子の発現を抑制する機能を有する DNA を利用して、植物の生長を改変するためには、該 DNA を適当なベクターに挿入して、これを植物細胞に導入し、これにより得られた形質転換植物細胞を再生させればよい。用いられるベクターとしては、植物細胞内で挿入遺伝子を発現させることが可能なものであれば特に制限はない。

例えば、本発明者等により単離された遺伝子のプロモーターを用いることが可能である。また、植物細胞内の恒常的な遺伝子発現を行うためのプロモーター（例えば、カリフラワーモザイクウイルスの 35S プロモーター）を有するベクターを用いることが可能である。また、植物の組織特異的なプロモーターを用いれば、植物の特定の組織、例えば、葉や花、実などを特異的に改変させることができるものもあるかもしれない。組織特異的プロモーターとしては、種子特異的プロモーターとしてインゲンマメの  $\beta$ -ファセオリン (Bustos ら (1991) EMBO J. 10:1469-1479) やダイズのグリシニン (Lelievre ら (1992) Plant Physiol. 98:387-391) 、葉特異的プロモーターとしてはエンドウの RbcS 遺伝子 (Lam and Chua (1990) Science 248:471-474) やコムギの Cab1 遺伝子 (Gotorn ら (1993) Plant J. 3:509-518) 、根特異的なプロモーターとしてはタバコの TobRB7 遺伝子 (Yamamoto ら (1991) Plant Cell 3:371-382) やアグロバクテリウム・リゾゲネスの rold 遺伝子 (Elmayan and Tepfer (1995) Transgenic Res 4:388-396) が挙

- 1 8 -

げられる。また、外的な刺激により誘導的に活性化されるプロモーターを有するベクターを用いることも可能である。

ベクターを挿入する植物細胞としては、特に制限はないが、本発明等により単離された遺伝子が由来するイネやタバコが特に好ましい。なお、ここでいう「植物細胞」には、種々の形態の植物細胞、例えば、懸濁培養細胞、プロトプラスト、葉の切片、カルスなどが含まれる。植物細胞へのベクターの導入は、ポリエチレングリコール法、電気穿孔法（エレクトロポーレーション）、アグロバクテリウムを介する方法、パーティクルガン法など当業者に公知の種々の方法を用いることができる。形質転換植物細胞からの植物体の再生は公知の方法により行なうことが可能である。これにより形質転換植物体が作出されれば、該植物体からその繁殖媒体（例えば、種子、塊茎、切穂など）を得て、これを基に本発明の形質転換植物体を量産することができる。

また、本発明においては、本発明者らにより単離されたDNAの発現を促進することで、植物の生長を増大させることも可能であるかもしれない。この場合、該DNAを適当なベクターに挿入して、これを植物細胞に導入し、これにより得られた形質転換植物細胞を再生させればよい。植物細胞内で発現させるために利用されるベクター、ベクターの導入される植物細胞、植物体の再生などの方法は、上記アンチセンスなどを用いる場合と同様である。

#### 図面の簡単な説明

図1は、

a：ジベレリン（エント・ジベレリン）の一般構造を示す図である。

b：高等植物における主要なGA生合成経路を示す図である。

イタリック体は、特異的GA生合成経路を欠損するGA反応性矮性変異体を示す。それぞれ、シロイスナズナのga1、ga2、ga3、ga5、そしてga4；トウモロコシの

- 1 9 -

an1、d5、d3、そして d1、エンドウの ls および le、イネの d35 (dx) および d18 (dy)。

図2は、d18 矮性植物の様々な表現型を示す写真である。左から右へ、台中-65 (WT : 最終段階で約 1m)、古丈玉錦矮性体 (d18<sup>k</sup> : 約 65 cm)、矮稲-C (約 55 cm)、そして豊雪矮性矮性体 (d18<sup>h</sup> : 約 15 cm)、秋晴矮性矮性体 (バー=10 cm) である。

図3は、各 GA3  $\beta$ -ヒドロキシラーゼ (0s3 $\beta$ -1 と 0s3 $\beta$ -2) 遺伝子の位置と様々な RFLP マーカーをイネの第1染色体と第5染色体について示す図である。

図4は、a : D18 と d18 対立遺伝子の RFLP 分析の結果を示す電気泳動写真である。DNA は D18 (シオカリとアキバレ) と d18 対立遺伝子 (d18<sup>h</sup>、1d18<sup>k</sup> そして d18-AD) 植物の葉組織から単離した。DNA を ApaI で消化し、電気泳動で分離して、ナイロンフィルターに結合させ、ハイブリダイズさせた。分子の長さのマーカーを左側にキロベースで示す。

b : ゲノム 0s3 $\beta$ -2 クローンとそのサブクローンの制限マップを示す図である。ゲノムクローンは PCR 産物をプローブとして用いたゲノムライブラリのスクリーニングに由来した。2.3 kb の BglII 断片のサブクローンは D18 の全コード領域を含む。

図5は、野生型 *O. sativa* 植物における GA3  $\beta$ -ヒドロキシラーゼの発現パターンを示す電気泳動写真である。3 $\beta$ -ヒドロキシラーゼ cDNA D18 と 0s3 $\beta$ -1 の、SA (茎端)、ST (茎)、LB (葉身)、Ra (葉軸)、FL (花)、YL (若葉)、IFM (花序分裂組織)、そして Sh (2週齢の実生) から抽出した総 RNA 10  $\mu$ g を含むノザンプロットとのハイブリダイゼーションの結果である。

図6は、0s3 $\beta$ -2 (D18) cDNA をアンチセンス向きにアクチンプロモーターの制御下で恒常に発現させた形質転換植物体を示す写真である。写真左は野生型の日本晴、写真中央は半矮性植物体、写真右は矮性植物体を示す。

- 2 0 -

図7は、 $0s3\beta$ -2の全長cDNAが挿入されたプラスミド、pBS-SK<sup>+</sup>を示す図である。

図8は、 $0s3\beta$ -2(D18)遺伝子のアンチセンスが挿入されたプラスミド、pAct-NOS/Hm2を示す図である。

図9は、 $0s3\beta$ -1の融合蛋白質がGA<sub>9</sub>を基質としたときGA<sub>4</sub>、GA<sub>7</sub>、GA<sub>34</sub>を生成することを示した図である。

図10は、 $0s3\beta$ -2の融合蛋白質が、GA<sub>5</sub>、GA<sub>9</sub>、GA<sub>20</sub>、GA<sub>44</sub>を基質としたときにそれに対応する3 $\beta$ 水酸化ジベレリン(GA<sub>3</sub>、GA<sub>4</sub>、GA<sub>1</sub>、GA<sub>38</sub>)を生成することを示した図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。なお、イネの種子(*Oryza sativa*、ジャポニカ型栽培品種：「ニッポンバレ」、「アキバレ」、「シオカリ」、そしてその他)を1%NaClOで1時間消毒して、滅菌蒸留水で十分にすすぎ、土壤で発芽させて、温室で生育させた。

[実施例1] GA3 $\beta$ -ヒドロキシラーゼをコードするcDNAクローンの単離  
单子葉植物のGA3 $\beta$ -ヒドロキシラーゼを単離したという報告例はない。いくつかのGA3 $\beta$ -ヒドロキシラーゼは双子葉植物からクローニングされている(Chiangら、1995; Martinら、1997; Lesterら、1997)。

GA3 $\beta$ -ヒドロキシラーゼをコードする部分的断片を単離するために、イネのゲノムDNAを鑄型として、報告された双子葉植物のGA3 $\beta$ -ヒドロキシラーゼ配列における保存領域からデザインした縮重プライマー(5'-プライマー: 5'-GTNGTN AARGTNGGNGARRT-3' / 配列番号: 7、3'プライマー: 5'-AYYTARTCRTGGANGTNAC-3' / 配列番号: 8)を用いてPCRを行なった。その結果、報告されたGA3 $\beta$ -ヒドロキシラーゼ配列から予想されるサイズに対応する210 bpのDNA断片を得た。

- 2 1 -

次ぎに、全長のクローンを単離するため、この断片をプローブとしてイネのゲノムライブラリをスクリーニングした。その結果、いくつかのクローンを単離し、各ゲノムクローンの制限マップに基づいて2群に分類した。最後に各群の1つを完全にシークエンシングして、それぞれのクローンを 0s3 $\beta$ -1 と 0s3 $\beta$ -2 (0s3 $\beta$ -1 と 0s3 $\beta$ -2 ; *Oriza sativa* GA3 $\beta$ -ヒドロキシラーゼ-1、-2) と名付けた。それぞれのクローンの塩基配列を配列番号：5 および 6 に示す。0s3 $\beta$ -1 はプローブとして用いた断片と共に通する配列を有したが、0s3 $\beta$ -2 は断片からの対応する領域で異なる配列を含んでいた。

次ぎに、各クローンの配列に基づき、cDNA 断片を得るために、実生（イネの茎端）または未開の花から単離した総 RNA を用いて RT-PCR を実施した。これにより、GA3 $\beta$ -ヒドロキシラーゼをコードする完全な大きさの cDNA クローンを得た。0s3 $\beta$ -1cDNA および 0s3 $\beta$ -2 cDNA はそれぞれ 379 残基および 373 残基のポリペプチドをコードするオープンリーディングフレームを含んでいた。それぞれのクローンの塩基配列を配列番号：3 および 4 に示す。0s3 $\beta$ -2 ゲノム DNA は、短いサイズ (110 bp) の単一のイントロンを含み、イントロンは双子葉植物においてこれまでに報告された GA3 $\beta$ -ヒドロキシラーゼと同じ位置に存在していた。0s3 $\beta$ -1 ゲノム DNA は2つのイントロンを含んでいた。1つは 0s3 $\beta$ -2 ゲノム DNA と同じ位置に存在し、これはほぼ同程度の大きさであった (110 bp)。もう一つは、共因子である 2-オキソグルタル酸 (400 bp) の結合部位に存在した（データは示していない）。両クローンの推定アミノ酸配列は、他の GA3 $\beta$ -ヒドロキシラーゼと高度の類似性を示したが、それらは互いに対しても高度の類似性を示した (56.6% の同一性と 88.2% の類似性)。

なお、塩基配列は、自動シークエンシングシステム (ABI373A) を用いたジデオキシヌクレオチド・チェーン・ターミネーション法により決定した。また、配列の解析は、GENETYX コンピューターソフトウェア (Software Kaihatu Co., 日本) を用いて実施した。

- 2 2 -

### [実施例 2] d18 対立遺伝子の同定と特徴付け

矮性イネ植物に関する定量的分析とバイオアッセイから、D18 遺伝子が GA 3  $\beta$ -ヒドロキシラーゼをコードすることが示されている。D18 座は第 1 染色体上で同定され、この染色体の下端で FS-2 座に隣接する。単離された GA 3  $\beta$ -ヒドロキシラーゼクローニングが D18 遺伝子に対応することを調べるために、RFLP（制限断片長多型）分析を用いてイネのゲノム上に 2 つのクローニングをマッピングした。

Os3 $\beta$ -1 または Os3 $\beta$ -2 の RFLP は、EcoRI または ApaI でそれぞれ消化したアソミノリ（ジャポニカ種のイネ）と IR 24（インディカ種のイネ）DNA の間に存在した。アソミノリと IR24 の交配の F2 子孫の消化したゲノム DNA について連鎖分析を行った。Os3 $\beta$ -1 と Os3 $\beta$ -2 はそれぞれ、第 5 染色体の上端と第 1 染色体の下端にマッピングされる（図 3）。この結果は、Os3 $\beta$ -2 が D18 座に対応することを示唆している。

Os3 $\beta$ -2 が D18 座であることを確認するためにさらなる分析を行った。D18 遺伝子の機能喪失によって生じた 4 つの独立した通常変異体が存在する。これらの変異は、 $\gamma$ 線照射を用いた変異誘発による D18 遺伝子の DNA 転位および／または欠失によって生じる可能性がある。従って、野生型とこれらの変異体の間の Os3 $\beta$ -2 位での RFLP は、Os3 $\beta$ -2 が D18 遺伝子であれば認められる可能性がある。

野生型（シオカリまたはアキバレ）と d18 対立遺伝子（ld18<sup>k</sup>、ld18<sup>h</sup> そして d18-AD）からのゲノム DNA について DNA ゲルプロット分析を行った。ld18<sup>k</sup> と ld18<sup>h</sup> は、シオカリ系の同種同系株で、d18-AD はエチレンイミン（EI）によるアキバレの変異誘発から単離した。DNA ゲルプロット分析においては、まず、イネのゲノム DNA（レーンあたり 1  $\mu$ g）を制限酵素で消化させ、アガロースゲル電気泳動によって分離して、ハイボンド N+ナイロンメンブレン（Amersham 社）に移した（Sambrook ら、1989）。ハイブリダイゼーションは、0.25 M Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub>、1 mM EDTA そして 7% SDS 中で 65°C で実施した。フィルターは、2×SSC、0.1% SDS

- 2 3 -

中で 65°Cで 15 分の洗浄を 2 回、そして 0.1×SSC、0.1%SDS 中で 65°Cで 15 分の洗浄を 1 回行った。

8 個の酵素 (BamHI、Bg/II、ApaI、Kpn I、DraI、EcoRV、EcoRI、そして HindI II) を用いてこれらのゲノム DNA を消化して、野生型植物と変異体の間の RFLP を探索した結果、d18-AD と Id18<sup>h</sup>からの DNA を ApaI で消化した際に多型性が認められた。一方、Id18<sup>k</sup>は試した如何なる酵素でも多型性を示さなかった (図 4)。

RFLP 分析の結果は、d18-AD が D18 座に長い欠失を有することを示唆しており、Id18<sup>h</sup>は ApaI 部位を含む短い欠失を有する。この検討を確認するため、全ての d18 対立遺伝子の全コード配列を直接分析して、これらを野生型の 0s3 $\beta$ -2 の配列と比較した。

具体的には、D18 の 5' と 3' 非コード配列に由来するオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、D18、d18<sup>h</sup>、d18<sup>k</sup>そして d18-w からの全コード領域を含む 1.6 kb 断片を增幅し、次に增幅された断片をシークエンシングした。

その結果、予想通り、全ての d18 対立遺伝子は、様々な位置でその 0s3 $\beta$ -2 コード配列を変化させていたが (表 1)、d18-AD は PCR 産物を生成しなかった。

- 2 4 -

表 1

対立遺伝子	変異体の特性	コード配列における位置	変異の結果
d18-AD (秋晴矮性)	7-kb欠失		D18オープンリーディングフレームの全長が欠失
d18 <sup>h</sup> (豊雪矮性)	GGG to GG, 1 塩基欠失	Gly <sup>251</sup>	フレームシフトにより 38の新規なアミノ酸が 付加し、ポリペプチドの 先端が切除された
d18 <sup>k</sup> (古丈玉錦)	<u>C</u> GC to <u>T</u> GC	Arg <sup>145</sup>	AspからCysにアミノ酸が 置換することにより、 産物が改変された
d18-w (矮稭-C)	9 塩基欠失	Val <sup>57</sup> to Arg <sup>59</sup>	インフレーム欠失により アミノ酸 3 個の 部分的残基が欠失し、 産物が改変された

<sup>a</sup> 下線を施した部分は d18<sup>k</sup> 対立遺伝子におけるヌクレオチドの置換を示している

このことはこの対立遺伝子がほぼ完全にそのコード配列を失っているという上記推測を支持するものである（データは示していない）。ld18<sup>k</sup>からの配列では、開始コドンから 433 位の塩基での C から T への置換によって、アルギニン-168 がシスチンに変化した。d18-w では、169~177 位での 9 個の塩基のインフレーム欠失により、バリン 57 からアルギニン 59 までのアミノ酸 3 個が欠失した。ld18<sup>h</sup> では、塩基 G の欠失によって読みとり枠がシフトしている。これらの結果は、0s3 $\beta$ -2 遺伝子が D18 座であり、GA3 $\beta$ -ヒドロキシラーゼをコードすることを証明する。

[実施例 3] 0s3 $\beta$ -2 (D18) そして 0s3 $\beta$ -1 遺伝子の生長過程での制御植物の生長過程での D18 と 0s3 $\beta$ -1 遺伝子の発現を調べるために、RNA ゲルプロット分析を実施した。RNA ゲルプロット分析においては、標準的な方法 (Samb

- 2 5 -

rook ら、1989) にしたがって、総 RNA を様々な器官または組織から調製した。RNA (試料あたり 10  $\mu$ g) をゲル電気泳動で分離して、ハイボンド N+ナイロンメンブレン (Amersham 社) に移した。ハイブリダイゼーションは、5×SSC、10% (w/v) 硫酸デキストラン、0.5% (w/v) SDS、0.1 mg/ml 変性サケ精子 DNA を含む溶液中で 65°C で実施した。フィルターは、2×SSC、0.1% SDS 中で 65°C で 15 分洗浄を 2 回、そして 0.1×SSC、0.1% SDS 中で 65°C で 15 分洗浄を 1 回行った。プローブとしては、D18 全長の cDNA からの BssHII-PvuII (519 bp) 断片、および 0s3 $\beta$ -1 からの KpnI-PvuII 断片 (310 bp) を用いた。

その結果、D18 遺伝子は調べたあらゆる器官に発現していた (図 5)。発現レベルは茎、若葉、そして花序分裂組織で高く、葉身と葉軸で低かった。対照的に、0s3 $\beta$ -1 mRNA 発現は花では特に高く、葉身と葉軸では低かった。

また、D18 と 0s3 $\beta$ -1 は高度の配列類似性を共有するため、ゲノムサザン分析によるクロス-ハイブリダイゼーションの程度を調べた。それぞれの特定のプローブをゲノムサザンハイブリダイゼーションにプローブとして用いた結果、クロス-ハイブリダイゼーションは検出されなかった (データは示していない)。

[実施例 4] 0s3 $\beta$ -2 (D18) 遺伝子の発現抑制による矮性化植物体の作出  
0s3 $\beta$ -2 の全長 cDNA は、pBS-SK<sup>+</sup>に BamHI-HindIII 部位にクローニングされており (図 7)、BamHI-HindIII 処理による該ベクターの切断により該 cDNA を取り出した後、平滑末端化した。0s3 $\beta$ -2 遺伝子のアンチセンスを発現するベクターは、この平滑末端化した全長 cDNA を、pAct-NOS/Hm2 の SmaI 部位に挿入することにより構築した (図 8)。

これをエレクトロポレーション法によりアグロバクテリア EHA101 株にトランスフォームした。イネ発芽種子に該アグロバクテリアを共存させた後、カナマイシン及びハイグロマイシンを含む選抜培地で 3 週間培養して細胞を選抜後、再分化培地に移植して、数十個体の形質転換植物体を得た。その結果、0s3 $\beta$ -2 遺伝

- 2 6 -

子のアンチセンスを発現する植物体は、野生型植物体と比較して矮性化していた（図6）。

[実施例5] 組み替え GA<sub>3</sub>βヒドロキシラーゼの機能

Os<sub>3</sub>β-1遺伝子およびOs<sub>3</sub>β-2遺伝子について、蛋白をコードすることが予想される部分のcDNAを、pMAL-c2発現ベクター（New England Biolabs, Beverly, MA）へと翻訳融合体としてセンス方向で挿入した。得られた構築物pMAL-Os<sub>3</sub>β-1およびpMAL-Os<sub>3</sub>β-2を、大腸菌株JM109内で発現させた。細菌細胞を、100mg/Lアンピシリンを含有する2xYT培地で一晩37°Cで振盪培養した。一晩培養したあと、培養物を100mg/Lアンピシリンを含有する新鮮な2xYT培地で100倍希釈し、30°Cで振盪培養した。4時間後、IPTGを最終濃度1mMとなるように添加し、17°Cで更に18時間振盪培養した。培養終了後細菌細胞を集め、洗浄バッファー（50mM Tris-HCl、pH8.0、10%[w/v]グリセロール、2mM DTT）で洗浄し、リゾチーム（1mg/ml）を含む洗浄バッファーに懸濁して氷上で30分間静置した。

これにより得られた溶菌液を超音波処理して遠心し、その上清をSDS-PAGEにかけて融合蛋白の発現を確認した。Os<sub>3</sub>β-1の融合蛋白質の活性を検定するために、この上清を用いて広範なジベレリン類およびコファクター類（アスコルビン酸、2価鉄、2-ケトグルタル酸）とともにインキュベーションを行った。Os<sub>3</sub>β-2の融合蛋白質の活性検定のためには、この上清をアミロースレジンを用いたカラムでカタログに記載された方法により精製し、この精製蛋白液を用いて同様のインキュベーションを行った。代謝されたジベレリン類は、GC-MSを用いて同定した。その結果、Os<sub>3</sub>β-1の融合蛋白質はGA<sub>9</sub>を基質としたときGA<sub>4</sub>（3β水酸化）、GA<sub>7</sub>（2,3位の不飽和化および3β水酸化）、GA<sub>34</sub>（2β水酸化）の生成が確認された（図9）。生成物の中ではGA<sub>4</sub>とGA<sub>7</sub>が主要な産物であった。GA<sub>20</sub>を基質とした場合にも同様な結果が得られた。またGA<sub>5</sub>、GA<sub>44</sub>を基質とした時にはそれぞれに対応する3β水酸化ジベレリン（GA<sub>3</sub>、GA<sub>88</sub>）のみを得た。一方、Os

- 2 7 -

$3\beta$ -2 の融合蛋白質は、GA<sub>5</sub>、GA<sub>9</sub>、GA<sub>20</sub>、GA<sub>44</sub> を基質としたときにそれぞれに対応する  $3\beta$  水酸化ジベレリン (GA<sub>3</sub>、GA<sub>4</sub>、GA<sub>1</sub>、GA<sub>38</sub>) を生成した (図 10)。

この結果、0s  $3\beta$ -1 遺伝子は  $3\beta$  水酸化のほかに 2,3 位の不飽和化、 $2\beta$  水酸化の核反応を触媒する酵素をコードする遺伝子であることが明らかとなった。また 0s  $3\beta$ -2 遺伝子は、 $3\beta$  水酸化反応を触媒する酵素をコードする遺伝子であることが明らかとなった。

### 産業上の利用の可能性

本発明により、植物のジベレリンの活性化に関する新規なタンパク質および遺伝子、並びに該遺伝子の発現を調節することにより植物体内におけるジベレリン活性が改変された植物が提供された。本発明により、植物体内のジベレリン活性化を改変させ、植物の草型を人為的に改変することが可能となった。植物体内のジベレリン活性化を抑制することにより、特に伸長生長の抑制によって引き起こされる植物の矮性を誘起できる。このため、例えば、イネにおいては多肥料によって生育を促しても背丈が伸びすぎて倒伏してしまうこともなくなる。また、葉の受光量の効率が上昇するため収量の大幅な増加が期待できる。さらに収穫や生育管理の作業の効率化も図ることが可能である。また、植物体内における本発明の遺伝子の発現を増加させて、植物体内のジベレリン活性化を促進することにより、植物体全体の収量を増加させることも考えられる。このことは、特に、飼料用作物全体の収穫量を向上させる上で有意義である。

## 請求の範囲

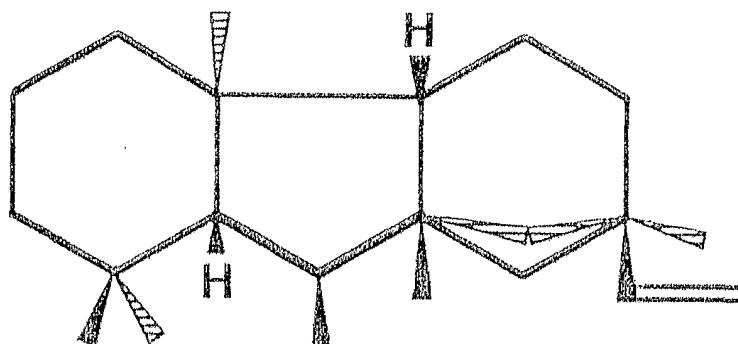
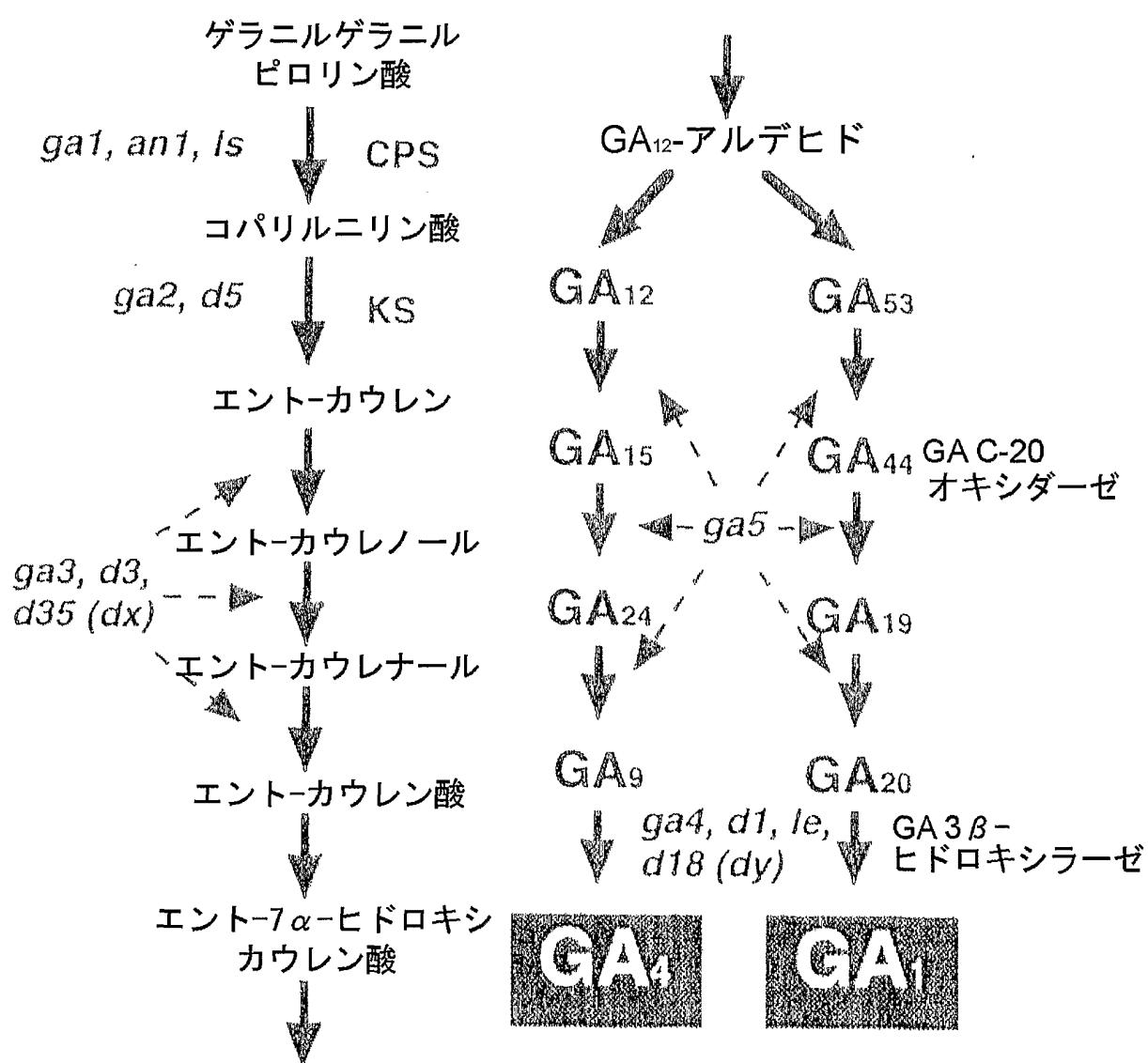
1. ジベレリン 3  $\beta$  水酸化酵素活性を有するタンパク質をコードする、下記(a)から(c)のいずれかに記載の DNA。
  - (a) 配列番号：1 または 2 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする DNA。
  - (b) 配列番号：3 または 4 に記載の塩基配列のコード領域を含む DNA。
  - (c) 配列番号：1 または 2 に記載のアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする DNA。
2. 請求項 1 に記載の DNA またはその転写産物と相補的なアンチセンス RNA をコードする DNA。
3. 請求項 1 に記載の DNA の転写産物を特異的に開裂するリボザイム活性を有する RNA をコードする DNA。
4. 植物細胞における発現時に、共抑制効果により、内因性の請求項 1 に記載の DNA の発現を抑制する RNA をコードする DNA。
5. 請求項 1 から 4 のいずれかに記載の DNA を含むベクター。
6. 請求項 1 から 4 のいずれかに記載の DNA を発現可能に保持する形質転換植物細胞。
7. 請求項 6 に記載の形質転換植物細胞を含む形質転換植物体。
8. 請求項 7 に記載の形質転換植物体の繁殖材料。
9. 請求項 1 に記載の DNA によりコードされるタンパク質。
10. 請求項 1 に記載の DNA を発現可能に保持する形質転換細胞を培養し、該細胞またはその培養上清から発現させたタンパク質を回収する工程を含む、請求項 9 に記載のタンパク質の製造方法。

- 2 9 -

11. 植物細胞内において請求項1に記載のDNAの発現量を調節することを特徴とする、植物の生長を改変する方法。
12. 植物細胞内において請求項1に記載のDNAの発現量を調節することを特徴とする、植物の草型を改変する方法。

1 / 10

図 1

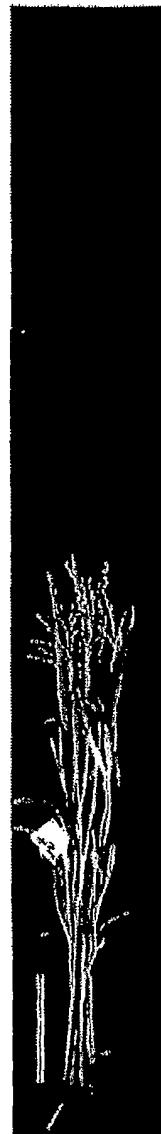
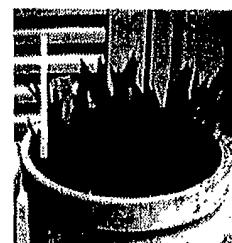
**a****b**

2 / 10

図 2

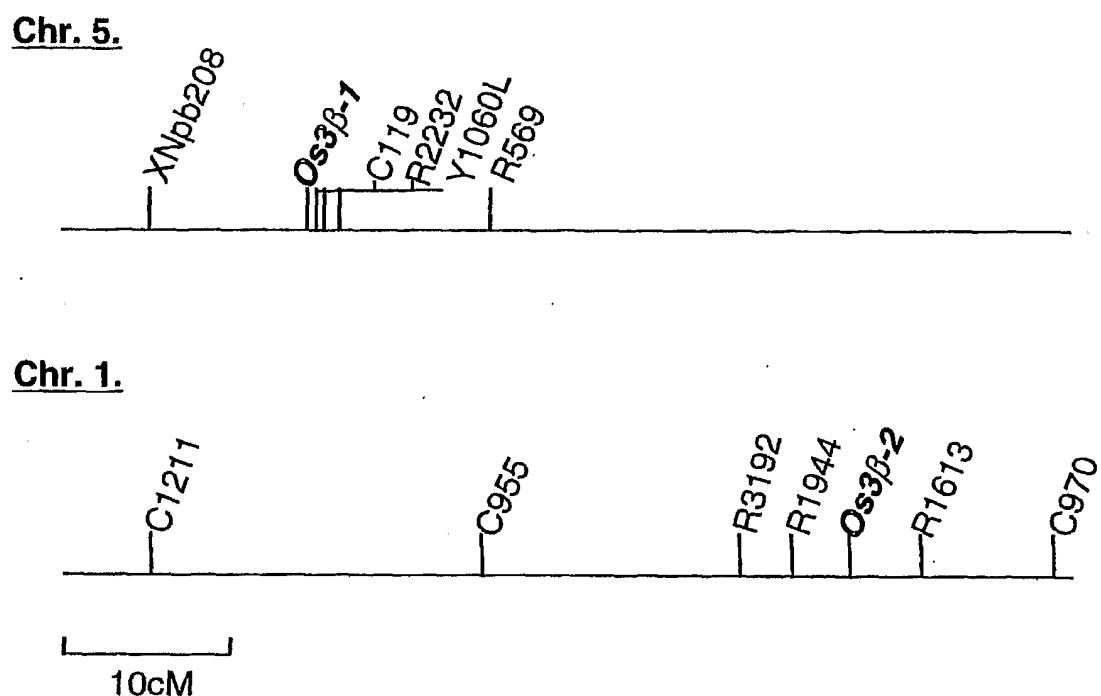


T-65

古丈玉錦  
d18k矮稻-C  
d18-w豊雪矮性  
d18-h秋晴矮性  
d18-AD

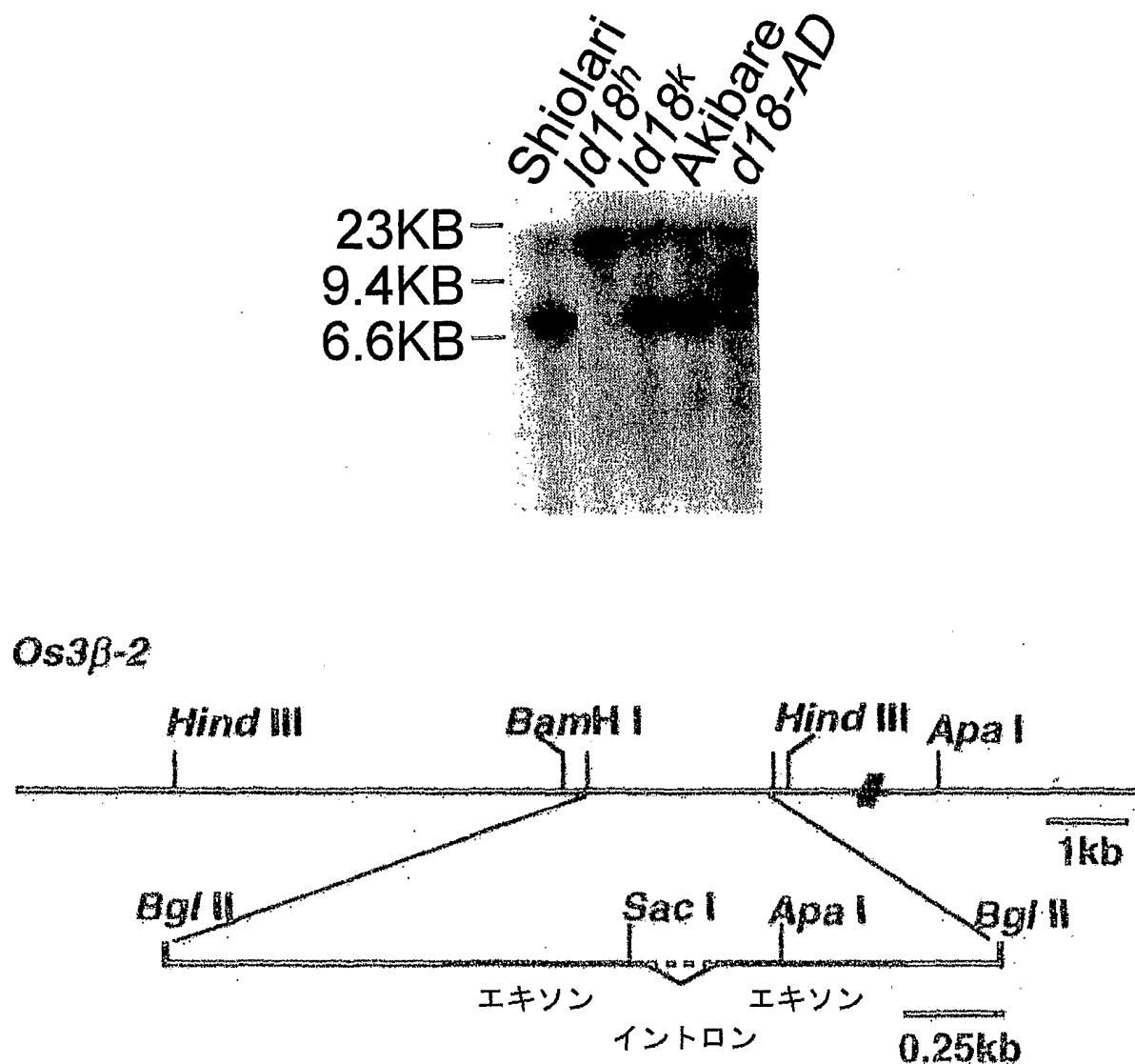
3 / 10

図 3



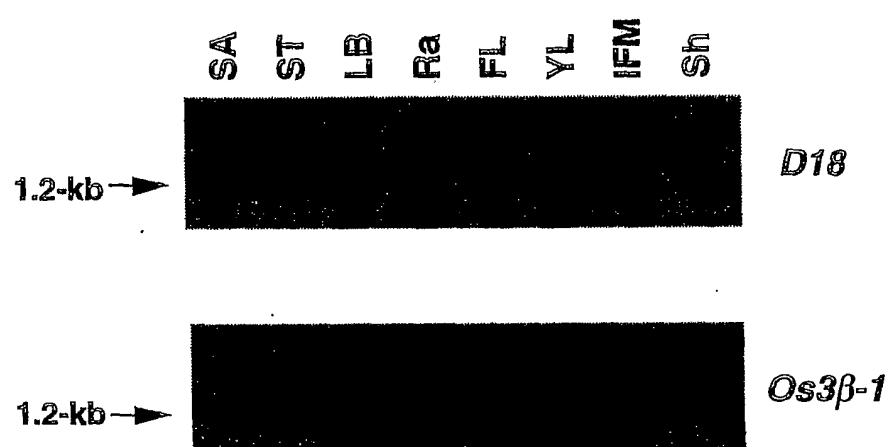
4 / 10

図 4



5 / 10

図 5



6 / 10

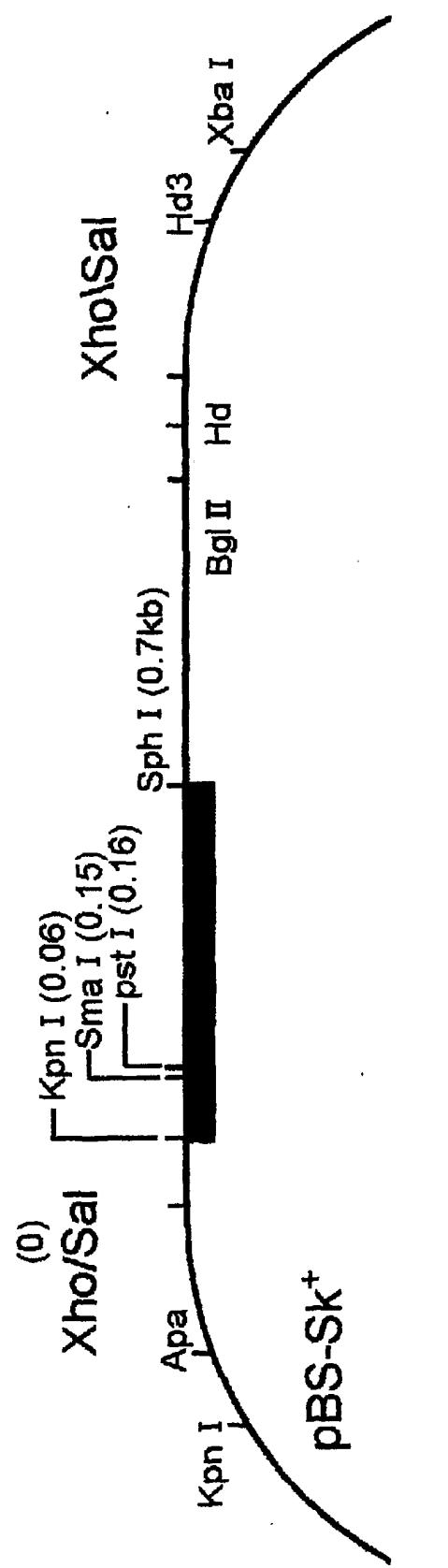
図・6



対照                    アンチセンス  $3\beta$  水酸化酵素  
(日本晴)            遺伝子導入の組換え体

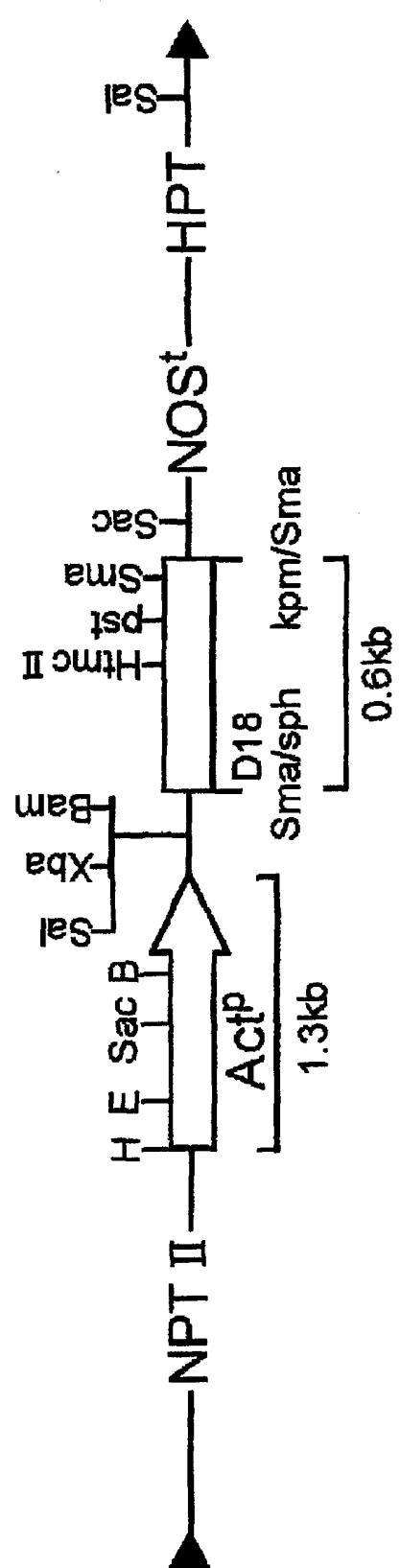
7 / 10

図 7



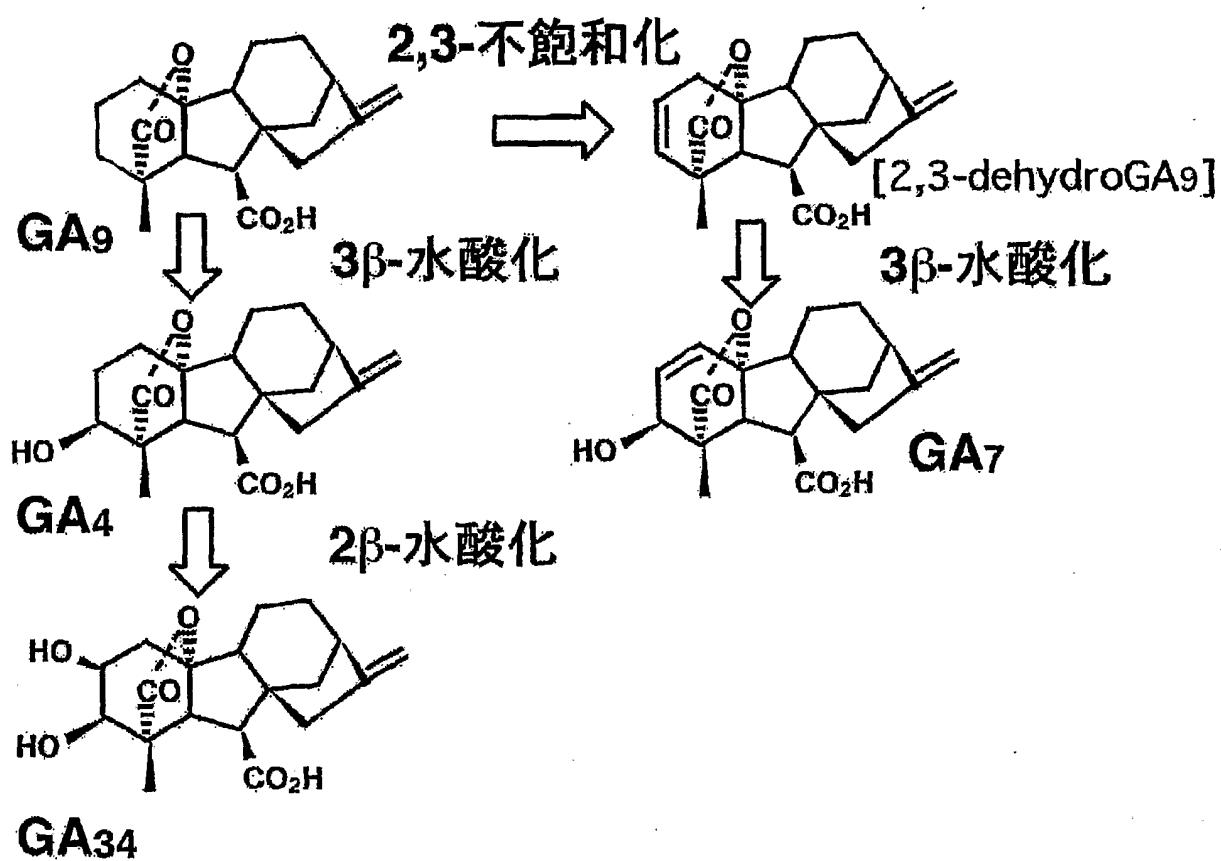
8 / 10

図 8



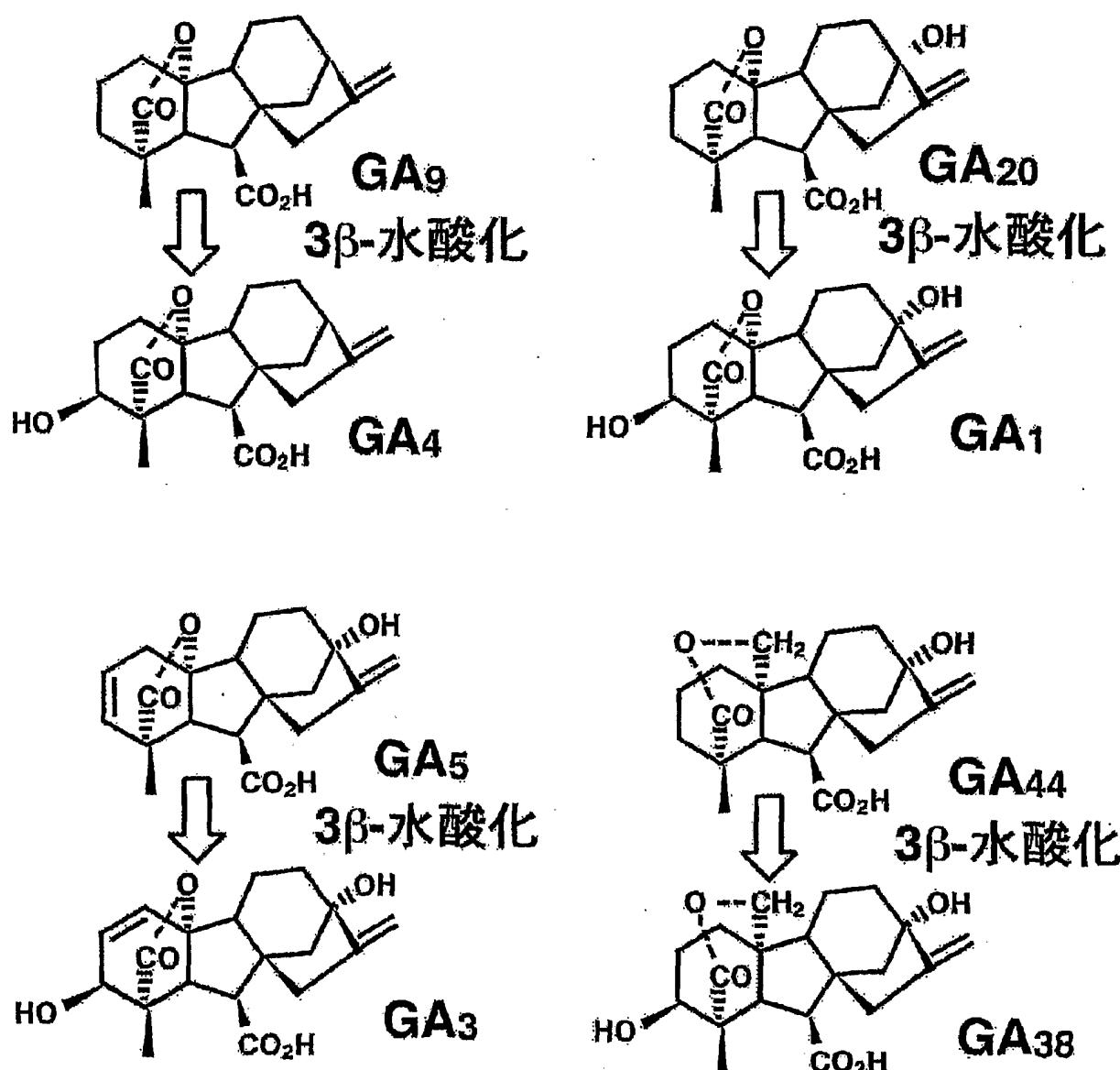
9 / 10

図 9



10 / 10

図 10



1

SEQUENCE LISTING

<110> JAPAN as represented by Director General of Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, National Institute of Agrobiological Resources

RIKEN

<120> Rice gibberellin 3beta-hydroxylase genes and their use

<130> MOA-103PCT

<140>

<141>

<150> JP 1999-361608

<151> 1999-12-20

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 379

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 1

Met Thr Ser Ser Ser Thr Ser Pro Thr Ser Pro Leu Ala Ala Ala Ala

2

1 5 10 15

His Asn Gly Val Thr Ala Ala Tyr Phe Asn Phe Arg Gly Ala Glu Arg

20 25 30

Val Pro Glu Ser His Val Trp Lys Gly Met His Glu Lys Asp Thr Ala

35 40 45

Pro Val Ala Ala Ala Asp Ala Asp Gly Gly Asp Ala Val Pro Val Val

50 55 60

Asp Met Ser Gly Gly Asp Asp Ala Ala Val Ala Ala Val Ala Arg Ala

65 70 75 80

Ala Glu Glu Trp Gly Gly Phe Leu Leu Val Gly His Gly Val Thr Ala

85 90 95

Glu Ala Leu Ala Arg Val Glu Ala Gln Ala Ala Arg Leu Phe Ala Leu

100 105 110

Pro Ala Asp Asp Lys Ala Arg Gly Ala Arg Arg Pro Gly Gly Asn

115 120 125

Thr Gly Tyr Gly Val Pro Pro Tyr Leu Leu Arg Tyr Pro Lys Gln Met

130 135 140

Trp Ala Glu Gly Tyr Thr Phe Pro Pro Pro Ala Ile Arg Asp Glu Phe  
145 150 155 160

Arg Arg Val Trp Pro Asp Ala Gly Asp Asp Tyr His Arg Phe Cys Ser  
165 170 175

Ala Met Glu Glu Tyr Asp Ser Ser Met Arg Ala Leu Gly Glu Arg Leu  
180 185 190

Leu Ala Met Phe Phe Lys Ala Leu Gly Leu Ala Gly Asn Asp Ala Pro  
195 200 205

Gly Gly Glu Thr Glu Arg Lys Ile Arg Glu Thr Leu Thr Ser Ser Thr  
210 215 220

Ile His Leu Asn Met Phe Pro Arg Cys Pro Asp Pro Asp Arg Val Val  
225 230 235 240

Gly Leu Ala Ala His Thr Asp Ser Gly Phe Phe Thr Phe Ile Leu Gln  
245 250 255

Ser Pro Val Pro Gly Leu Gln Leu Leu Arg His Arg Pro Asp Arg Trp  
260 265 270

Val Thr Val Pro Gly Thr Pro Gly Ala Leu Ile Val Val Val Gly Asp  
275 280 285

Leu Phe His Val Leu Thr Asn Gly Arg Phe His Ser Val Phe His Arg

290

295

300

Ala Val Val Asn Arg Glu Arg Asp Arg Ile Ser Met Pro Tyr Phe Leu

305

310

315

320

Gly Pro Pro Ala Asp Met Lys Val Thr Pro Leu Val Ala Ala Gly Ser

325

330

335

Pro Glu Ser Lys Ala Val Tyr Gln Ala Val Thr Trp Pro Glu Tyr Met

340

345

350

Ala Val Arg Asp Lys Leu Phe Gly Thr Asn Ile Ser Ala Leu Ser Met

355

360

365

Ile Arg Val Ala Lys Glu Glu Asp Lys Glu Ser

370

375

<210> 2

<211> 373

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 2

Met Pro Thr Pro Ser His Leu Lys Asn Pro Leu Cys Phe Asp Phe Arg

1

5

10

15

Ala Ala Arg Arg Val Pro Glu Thr His Ala Trp Pro Gly Leu Asp Asp

20

25

30

His Pro Val Val Asp Gly Gly Gly Gly Gly Glu Asp Ala Val Pro

35

40

45

Val Val Asp Val Arg Ala Gly Asp Ala Ala Ala Arg Val Ala Arg Ala

50

55

60

Ala Glu Gln Trp Gly Ala Phe Leu Leu Val Gly His Gly Val Pro Ala

65

70

75

80

Ala Leu Leu Ser Arg Val Glu Glu Arg Val Ala Arg Val Phe Ser Leu

85

90

95

Pro Ala Ser Glu Lys Met Arg Ala Val Arg Gly Pro Gly Glu Pro Cys

100

105

110

Gly Tyr Gly Ser Pro Pro Ile Ser Ser Phe Phe Ser Lys Leu Met Trp

115

120

125

Ser Glu Gly Tyr Thr Phe Ser Pro Ser Ser Leu Arg Ser Glu Leu Arg

130

135

140

Arg Leu Trp Pro Lys Ser Gly Asp Asp Tyr Leu Leu Phe Cys Asp Val  
145                    150                    155                    160

Met Glu Glu Phe His Lys Glu Met Arg Arg Leu Ala Asp Glu Leu Leu  
165                    170                    175

Arg Leu Phe Leu Arg Ala Leu Gly Leu Thr Gly Glu Glu Val Ala Gly  
180                    185                    190

Val Glu Ala Glu Arg Arg Ile Gly Glu Arg Met Thr Ala Thr Val His  
195                    200                    205

Leu Asn Trp Tyr Pro Arg Cys Pro Glu Pro Arg Arg Ala Leu Gly Leu  
210                    215                    220

Ile Ala His Thr Asp Ser Gly Phe Phe Thr Phe Val Leu Gln Ser Leu  
225                    230                    235                    240

Val Pro Gly Leu Gln Leu Phe Arg Arg Gly Pro Asp Arg Trp Val Ala  
245                    250                    255

Val Pro Ala Val Ala Gly Ala Phe Val Val Asn Val Gly Asp Leu Phe  
260                    265                    270

His Ile Leu Thr Asn Gly Arg Phe His Ser Val Tyr His Arg Ala Val

275                    280                    285

Val Asn Arg Asp Arg Asp Arg Val Ser Leu Gly Tyr Phe Leu Gly Pro

290                    295                    300

Pro Pro Asp Ala Glu Val Ala Pro Leu Pro Glu Ala Val Pro Ala Gly

305                    310                    315                    320

Arg Ser Pro Ala Tyr Arg Ala Val Thr Trp Pro Glu Tyr Met Ala Val

325                    330                    335

Arg Lys Lys Ala Phe Ala Thr Gly Gly Ser Ala Leu Lys Met Val Ser

340                    345                    350

Thr Asp Ala Ala Ala Ala Asp Glu His Asp Asp Val Ala Ala Ala

355                    360                    365

Ala Asp Val His Ala

370

<210> 3

<211> 1187

<212> DNA

<213> Oryza sativa

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1137)

&lt;400&gt; 3

atg aca tcg tcg tcg acc tcg ccg acc tcg ccg ctg gcc gcc gca 48  
Met Thr Ser Ser Ser Thr Ser Pro Thr Ser Pro Leu Ala Ala Ala  
1 5 10 15

cac aat ggc gtc acc gcc tac ttc aac ttc cgc ggg gcg gag cgc 96  
His Asn Gly Val Thr Ala Ala Tyr Phe Asn Phe Arg Gly Ala Glu Arg  
20 25 30

gtg ccg gag tcg cac gtg tgg aag ggg atg cac gag aag gac acc gcg 144  
Val Pro Glu Ser His Val Trp Lys Gly Met His Glu Lys Asp Thr Ala  
35 40 45

ccg gtg gcg gcg gac gac gac ggc ggc gac gac gcg gtg ccg gtg gtg 192  
Pro Val Ala Ala Ala Asp Ala Asp Gly Gly Asp Ala Val Pro Val Val  
50 55 60

gac atg agc ggc ggc gac gac gcc gcg gtg gcg gcg gtg gcg cgc gcg 240  
Asp Met Ser Gly Gly Asp Asp Ala Ala Val Ala Ala Val Ala Arg Ala  
65 70 75 80

gcg gag gag tgg ggc ggg ttc ctg ctc gtc ggg cac ggc gtg acc gcg 288

Ala Glu Glu Trp Gly Gly Phe Leu Leu Val Gly His Gly Val Thr Ala

85

90

95

gag gcc ctg gcg cgc gtc gag gcg cag gcg gcg cgg ctg ttc gcg ctg 336

Glu Ala Leu Ala Arg Val Glu Ala Gln Ala Ala Arg Leu Phe Ala Leu

100

105

110

ccg gcg gac gac aag gcg cgc ggg gcg cgg cgg ccc ggc ggc ggg aac 384

Pro Ala Asp Asp Lys Ala Arg Gly Ala Arg Arg Pro Gly Gly Asn

115

120

125

acc ggc tac ggc gtg ccg ccg tac ctc ctc cgg tac ccg aag cag atg 432

Thr Gly Tyr Gly Val Pro Pro Tyr Leu Leu Arg Tyr Pro Lys Gln Met

130

135

140

tgg gcc gag ggc tac acc ttc cct ccc cct gcc atc cgc gac gag ttc 480

Trp Ala Glu Gly Tyr Thr Phe Pro Pro Pro Ala Ile Arg Asp Glu Phe

145 150 155 160

cgc cgc gtc tgg ccc gac gcc ggc gac gac tac cac cgc ttc tgc tcc 528

Arg Arg Val Trp Pro Asp Ala Gly Asp Asp Tyr His Arg Phe Cys Ser

165

170

175

gcc atg gag gag tac gac tcg tcg atg aga gct ctg ggc gag agg ctc 576

Ala Met Glu Glu Tyr Asp Ser Ser Met Arg Ala Leu Gly Glu Arg Leu

180

185

190

1 0

ctc gcc atg ttc ttc aag gcg ctc ggg ctc gcc ggc aac gat gcc ccc 624

Leu Ala Met Phe Phe Lys Ala Leu Gly Leu Ala Gly Asn Asp Ala Pro

195

200

205

ggc ggc gag acc gag cg<sup>g</sup> aag atc cgc gaa acg ttg acg tcg tcg acg 672

Gly Gly Glu Thr Glu Arg Lys Ile Arg Glu Thr Leu Thr Ser Ser Thr

210

215

220

att cac ctc aac atg ttc cct agg tgt cca gat cca gac cg<sup>g</sup> gtg gtc 720

Ile His Leu Asn Met Phe Pro Arg Cys Pro Asp Pro Asp Arg Val Val

225

230

235

240

ggg ctg gcg gcg cac acg gac tca ggc ttc ttc acc ttc atc ctg cag 768

Gly Leu Ala Ala His Thr Asp Ser Gly Phe Phe Thr Phe Ile Leu Gln

245

250

255

agc ccc gtg ccg ggg ttg cag ctg ctc cgc cac cg<sup>g</sup> ccg gac cg<sup>g</sup> tgg 816

Ser Pro Val Pro Gly Leu Gln Leu Leu Arg His Arg Pro Asp Arg Trp

260

265

270

gtg acg gtt ccg ggg acg ccg ggg gcg ctc atc gtc gtc ggc gat 864

Val Thr Val Pro Gly Thr Pro Gly Ala Leu Ile Val Val Val Gly Asp

275

280

285

ctc ttc cat gtg ctc acc aac ggg cgc ttc cac agc gtg ttc cac cgc 912

1 1

Leu Phe His Val Leu Thr Asn Gly Arg Phe His Ser Val Phe His Arg

290

295

300

gcc gtc gtg aac cgg gag aga gac cgg atc tcc atg ccc tac ttc ctc 960

Ala Val Val Asn Arg Glu Arg Asp Arg Ile Ser Met Pro Tyr Phe Leu

305

310

315

320

ggt ccg ccg gcc gac atg aag gtg aca cct ctc gtg gcg gcg ggg tcg 1008

Gly Pro Pro Ala Asp Met Lys Val Thr Pro Leu Val Ala Ala Gly Ser

325

330

335

ccg gag agc aag gcc gtg tat cag gcc gtg aca tgg ccg gag tac atg 1056

Pro Glu Ser Lys Ala Val Tyr Gln Ala Val Thr Trp Pro Glu Tyr Met

340

345

350

gct gta agg gat aag ttg ttc ggg aca aat ata tcg gcg ttg agc atg 1104

Ala Val Arg Asp Lys Leu Phe Gly Thr Asn Ile Ser Ala Leu Ser Met

355

360

365

att cga gta gcg aag gaa gag gac aag gag agt tagaactatg gtatgattgc 1157

Ile Arg Val Ala Lys Glu Glu Asp Lys Glu Ser

370

375

aattatccat gcagaaaaaa aaaaaaaaaa 1187

1 2

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 1122

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Oryza sativa

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1119)

&lt;400&gt; 4

atg ccg acg ccg tcg cac ttg aag aac ccg ctc tgc ttc gac ttc cgg 48

Met Pro Thr Pro Ser His Leu Lys Asn Pro Leu Cys Phe Asp Phe Arg

1

5

10

15

gcg gcg agg cgg gtg ccg gag acg cac gcg tgg ccg ggg ctg gac gac 96

Ala Ala Arg Arg Val Pro Glu Thr His Ala Trp Pro Gly Leu Asp Asp

20

25

30

cac ccg gtg gtg gac ggc ggc ggc ggc gag gac gcg gtg ccg 144

His Pro Val Val Asp Gly Gly Gly Gly Glu Asp Ala Val Pro

35

40

45

gtg gtg gac gtc agg gcg ggc gac gcg gcg gcg cgg gtg gcg cgg gcg 192

Val Val Asp Val Arg Ala Gly Asp Ala Ala Ala Arg Val Ala Arg Ala

50

55

60

1 3

gct gag cag tgg ggc gct ttc ctt ctg gtc ggg cac ggc gtg ccg gct 240  
Ala Glu Gln Trp Gly Ala Phe Leu Leu Val Gly His Gly Val Pro Ala  
65 70 75 80

gct ctg ctg tcg cgc gtc gag gag cgc gtc gcc cgc gtg ttc tcc ctg 288  
Ala Leu Leu Ser Arg Val Glu Glu Arg Val Ala Arg Val Phe Ser Leu  
85 90 95

ccg gct tcg gag aag atg cgc gcc gtc cgc ggc ccc ggc gag ccc tgc 336  
Pro Ala Ser Glu Lys Met Arg Ala Val Arg Gly Pro Gly Glu Pro Cys  
100 105 110

ggc tac ggc tcg ccg ccc atc tcc tcc ttc ttc tcc aag ctc atg tgg 384  
Gly Tyr Gly Ser Pro Pro Ile Ser Ser Phe Phe Ser Lys Leu Met Trp  
115 120 125

tcc gag ggc tac acc ttc tcc cct tcc tcc ctc cgc tcc gag ctc cgc 432  
Ser Glu Gly Tyr Thr Phe Ser Pro Ser Ser Leu Arg Ser Glu Leu Arg  
130 135 140

cgc ctc tgg ccc aag tcc ggc gac gac tac ctc ctc ttc tgt gac gtg 480  
Arg Leu Trp Pro Lys Ser Gly Asp Asp Tyr Leu Leu Phe Cys Asp Val  
145 150 155 160

atg gag gag ttt cac aag gag atg cgg cgg cta gcc gac gag ttg ctg 528  
Met Glu Glu Phe His Lys Glu Met Arg Arg Leu Ala Asp Glu Leu Leu

1 4

165 170 175

agg ttg ttc ttg agg gcg ctg ggg ctc acc ggc gag gag gtc gcc gga 576  
Arg Leu Phe Leu Arg Ala Leu Gly Leu Thr Gly Glu Glu Val Ala Gly

180 185 190

gtc gag gcg gag agg agg atc ggc gag agg atg acg gcg acg gtg cac 624  
Val Glu Ala Glu Arg Arg Ile Gly Glu Arg Met Thr Ala Thr Val His

195 200 205

ctc aac tgg tac ccg agg tgc ccg gag ccg cgg cga gcg ctg ggg ctc 672  
Leu Asn Trp Tyr Pro Arg Cys Pro Glu Pro Arg Arg Ala Leu Gly Leu

210 215 220

atc gcg cac acg gac tcg ggc ttc ttc acc ttc gtg ctc cag agc ctc 720  
Ile Ala His Thr Asp Ser Gly Phe Phe Thr Phe Val Leu Gln Ser Leu  
225 230 235 240

gtc ccg ggg ctg cag ctg ttc cgt cga ggg ccc gac cgg tgg gtg gcg 768  
Val Pro Gly Leu Gln Leu Phe Arg Arg Gly Pro Asp Arg Trp Val Ala  
245 250 255

gtg ccg gcg gtg gcg ggg gcc ttc gtc gtc aac gtc ggc gac ctc ttc 816  
Val Pro Ala Val Ala Gly Ala Phe Val Val Asn Val Gly Asp Leu Phe  
260 265 270

1 5

cac atc ctc acc aac ggc cgc ttc cac agc gtc tac cac cgc gcc gtc 864

His Ile Leu Thr Asn Gly Arg Phe His Ser Val Tyr His Arg Ala Val

275

280

285

gtg aac cgc gac cgc gac cgg gtc tcg ctc ggc tac ttc ctc ggc ccg 912

Val Asn Arg Asp Arg Asp Arg Val Ser Leu Gly Tyr Phe Leu Gly Pro

290

295

300

ccg ccg gac gcc gag gtg gcg ccg ctg ccg gag gcc gtg ccg gcc ggc 960

Pro Pro Asp Ala Glu Val Ala Pro Leu Pro Glu Ala Val Pro Ala Gly

305

310

315

320

cgg agc ccc gcc tac cgc gct gtc acg tgg ccg gag tac atg gcc gtc 1008

Arg Ser Pro Ala Tyr Arg Ala Val Thr Trp Pro Glu Tyr Met Ala Val

325

330

335

cgc aag aag gcc ttc gcc acc ggc ggc tcc gcc ctc aag atg gtc tcc 1056

Arg Lys Lys Ala Phe Ala Thr Gly Gly Ser Ala Leu Lys Met Val Ser

340

345

350

acc gac gcc gcc gcc gcc gac gaa cac gac gac gtc gcc gcc gcc 1104

Thr Asp Ala Ala Ala Ala Asp Glu His Asp Asp Val Ala Ala Ala

355

360

365

gcc gac gtc cac gca taa 1122

Ala Asp Val His Ala

1 6

370

<210> 5

<211> 1948

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<220>

<223> genomic DNA sequence

<220>

<221> intron

<222> (811)..(909)

<220>

<221> intron

<222> (1072)..(1461)

<400> 5

ctcgaggatc gaaaccaaaa ttaagggagc acaaaaaact atgacaaatg ttttagttctg 60

acaatgaact aaattagaac aaagcttgat ccgatcctat ccatttctga ttttgtgccg 120

aacgatgcgg agagaagtta gtttttgta gataatgcaa gcccaaattt agccatgcta 180

1 7

tctcgttatt aatcacgcga aagaaatggt catgccaaca aattaattta tcgtacatca 240

ctagtcacag gcttttgtgc gttagccaac gagttcatgc agatcatgac atcgtcgtcg 300

acctcgccga cctcgaccgc tggccgccgc cgcacacaat ggcttcaccg ccgcctactt 360

caacttccgc gggcgaggc gcgtgccgga gtcgcacgtg tggaagggga tgcacgagaa 420

ggacaccgcg ccggtgtggcgg cggcggacgc ggacggcggc gacgggtgc cggtggtgga 480

catgagcggc ggcgacgacg ccgcggtgtgc ggcggtgtggc cgcgccgg aggagtgggg 540

cgggttcctg ctctcgccgc acggcgtgac cgccggaggcc ctggcgccgc tcgaggcga 600

ggcggcgcgg ctgttcgcgc tgccggcggc cgacaaggcg cgccggcgcg ggccggccgg 660

cgccgggaac accggctacg gcgtgccgccc gtacccctc cggtaaccga agcagatgtg 720

ggccgagggc tacacccctcc ctccccctgc catccgcgac gagttccgccc gcgtctggcc 780

cgacgcggc gacgactacc accgcttctg gtacgcgttt accggccgate gatcgatcga 840

tccgcccattt ctgtcatgca actaaccttag ctagcttccg cgctgtttcg tccgatccgg 900

cccgccaggc tccgcccatttgg aggagttacga ctcgtcgatg agagctctgg gcgagaggct 960

1 8

cctcgccatg ttcttcaagg cgctcggct cgccggcaac gatcccccg gcggcgagac 1020

cgagcgaag atccgcgaaa cgttgacgtc gtgcacgatt cacctaaca tgtatgtaaa 1080

ctcatatgga tgtggatttt ctatgcatacg atgccatagc actgcaccca tcatttacat 1140

acgattttga gaaaatataa gtttataaac aagctatatt taatctacaa ctaaaaaaac 1200

aaaaataata aaatcaggca ataaatacta gtaaaatttg ttattttac ttcgtgtgt 1260

ggtcgaattt aattttacat atttatatacg tgtttatac tattattgtt atctatctta 1320

tcaaattcta tgattttta taactattta aactacatgt atgatacaca attagaaaat 1380

acttttccat acaaatatat cttcacatgc aatggtgttt ggagctgatc gacacgtgtc 1440

actctgacat gcccacacgc aggtcccta ggtgtccaga tccagaccgg gtggcgcc 1500

tggcgccgca cacggactca ggcttcttca cttcatcct gcagagcccc gtggcgcc 1560

tgtagctgct ccgccaccgg ccggaccgggt gggtgacgggt tccggggacg ccggggcg 1620

tcatcgctgt cgtcgccgat ctcttccatg tgctcaccaa cggcgcttc cacagcgtgt 1680

tccaccgcgc cgtcgtaac cgggagagag accggatctc catgccctac ttccctcggtc 1740

1 9

cgecgccgca catgaagggtg acacctctcg tggcggcggg gtcgcggag agcaaggccg 1800

tgtatcaggc cgtgacatgg ccggagtaca tggctgtaag ggataagttg ttcccggacaa 1860

atatatcggc gttgagcatg attcgagtag cgaaggaaga ggacaaggag agttagaact 1920

atggtatgat tgcaattatc catgccag 1948

<210> 6

<211> 2112

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<220>

<223> genomic DNA sequence

<220>

<221> intron

<222> (789)..(899)

<400> 6

ttttttcctc tccaaattcta ttaattaatg atccatttca atttttcatc actgatttat 60

tcaccaatta attctctttt tttttttctt tccactaacgc tcacaaactt ctctccctat 120

20

atataacctct cccttgtact tgtccagttc ttacactcgt ctcactttac tactcattcc 180

actattgtaa agtcatagaa aaaatttata tagagagaaa aaatttagtgt ttgttattgt 240

tactggcttt ctgccagacg agacgagcga gcgcgcgagt gtgttcctct ctgagtcata 300

tgcgtcgatcgatgc gacgcgtcg cgcttgaaga acccgctctg cttcgacttc 360

cgggcggcga ggcgggtgcc ggagacgcac gcgtggccgg ggctggacga ccacccggtg 420

gtggacggcg gcccggcgg cggcgaggac gcgggtgccgg tggtggacgt cagggcggc 480

gacgcggcgg cgcgggtggc gcggggcggcga gagcagtggg gcgcgttcct tctggtcggg 540

cacggcgtgc cggcgccgct gctgtcgccgc gtcgaggagc gcgtcgcccg cgtgttctcc 600

ctgcccggcgt cggagaagat gcgcgccgtc cgcggccccg gcgagccctg cggctacggc 660

tgcggccca tctcctcctt cttctccaag ctcatgtggt ccgagggcta cacttctcc 720

ccttcctccc tcgcgtccga gctccgcgc ctctggccca agtccggcga cgactacctc 780

ctttctggat atatatacat atatatatac tctccatgc attccatgca catacactct 840

acgtatatac taccatcac gtatatact acgtattgtt ctacgtataa tatacgcagt 900

2 1

gacgtgatgg aggagttca caaggagatg cggcggctag ccgacgagtt gctgagggtt 960

ttcttgaggg cgctggggct caccggcgag gaggtcgccg gagtcgaggc ggagaggagg 1020

atcggcgaga ggatgacggc gacggtgtcac ctcaactggt acccgaggtt cccggagccg 1080

cggcgagcgc tgggctcat cgccacacg gactcggct tttcacctt cgtgctccag 1140

agcctcggtcc cggggctgca gctgtccgt cgagggcccg accgggtgggt ggccgtgccc 1200

gcgggtggcgg gggcattcgt cgtcaacgtc ggcgacctt tccacatcct caccaacggc 1260

cgcttccaca gcgtctacca ccgcgccgtc gtgaaccgacg accgcgaccg ggtctcgctc 1320

ggctacttcc tcggcccgcc gccggacgcc gaggtggcgc cgctgccgga ggccgtgccc 1380

gccggccgga gccccgccta ccgcgtgtc acgtggccgg agtacatggc cgtccgcaag 1440

aaggcattcg ccaccggcgg ctccggccctc aagatggtct ccaccgacgc cgccgccgccc 1500

gccgacgaac acgacgacgt cgccggccgcc gccgacgtcc acgcataaagc tatagtact 1560

agctacactcg atctcacgca aaaaaaaaaaa gaaacaatta atagagcaaa aaaaaaaaaaaga 1620

aacaattaat agagcaaaaaa aaaaaagaag agaaaatggt ggtacttgtt tttaggttt 1680

2 2

cctccatgca aaatggttt catgcattgca tgcaaagcta gcatctgcag ctgcaagaat 1740

tacaagagca gagaaggcaga cagctagatg gagataatta attaattaat taatctaatt 1800

aagcatgcaa taattaagat tattattctg atttcagaac tgaaaaaaaaa agtgtggta 1860

attaattatt gtttaggctt aattttatct agatgtagaa aaagaatcaa gatcttcaag 1920

caagagagaa gaggatcgaa gaagaaggaa aaaaaacga aaaggacatg ctgtgttgc 1980

tcttctagtt gtaccctggc tgctgattaa gtgcgttgc ttgttgctgc aagcttgcg 2040

ttactgatta ttagtttagtt atgcattctaa ttgattaaac taatctgttt ggcattttgg 2100

ctcgaggctcg ac 2112

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

2 3

<400> 7

gtngtnaarg tnggngarrt

20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 8

ayytartcrt tggangtnac

20

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/09037

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
 Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/53, 15/29, 9/02, 5/10, A01H5/00

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

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
 Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/53, 15/29, 9/02, 5/10, A01H5/00

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
 WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST FILE (JOIS)  
 EMBL/Genbank/DDBJ/GenSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, 98/59057, A1 (The General Hospital Corporation), 30 December, 1998 (30.12.98), Figs. 1A, 1B, 6A, 6B, 8A, 8B, 9 (Family: none)	1-12
X	The Plant Cell, Vol. 9, No. 8, (August, 1997), Lange T., et al. "Cloning and Expression of a Gibberellin 2 $\beta$ ,3 $\beta$ -Hydroxylase cDNA from Pumpkin Endosperm", pp. 1459-1467	1-12
X	Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Vol. 94, No. 16, (August, 1997), Martin D., et al. "Mendel's dwarfing gene: cDNAs from the Le alleles and function of the expressed proteins", pp. 8907-8911	1-12
X	The Plant Cell, Vol. 7, No. 2, (February, 1995), Chiang H.H., et al. "Isolation of the Arabidopsis GA4 Locus", pp. 195-201	1-12
P, A	Kagaku to Seibutsu, Vol. 38, No. 2, (February, 2000), Tomoaki SAKAMOTO, et al., "Giberellin Seigousei Kouso	1-12

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

- \* Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 24 January, 2001 (24.01.01)	Date of mailing of the international search report 06 February, 2001 (06.02.01)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/09037

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	Idenshi no Hatsugen Chousetsu ni yoru Ine Kusagata no Jiniteki Seigyo", pp.131-139	
A	Journal of Experimental Botany, Vol. 50, No. 334, (May, 1999), Hedden P. "Recent advances in gibberellin biosynthesis", pp. 553-563	1-12
A	Kagaku to Seibutsu, Vol. 34, No. 6, (June, 1996), Shinjiro YAMAGUCHI, "Gibberellin no Seigousei Kenkyu; Saishin no Shinpo(1)", pp.402-410	1-12
A	Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Vol. 91, No. 18, (August, 1994), Lange T., et al. "Expression cloning of a gibberellin 20-oxidase, a multifunctional enzyme involved in gibberellin biosynthesis", pp. 8552-8556	1-12

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP00/09037

## A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. C17 C12N15/53, 15/29, 9/02, 5/10, A01H5/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. C17 C12N15/53, 15/29, 9/02, 5/10, A01H5/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICSTファイル (JOIS)  
EMBL/Genbank/DDBJ/GenSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO, 98/59057, A1 (The General Hospital Corporation), 30.12月.1998 (30.12.98), FIG. 1A, 1B, 6A, 6B, 8A, 8B, 9 (ファミリーなし)	1-12
X	The Plant Cell, Vol. 9, No. 8, (8月.1997), Lange T., et al. "Cloning and Expression of a Gibberellin 2β,3β-Hydroxylase cDNA from Pumpkin Endosperm", p. 1459-1467	1-12

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

24. 01. 01

国際調査報告の発送日

06.02.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

北村 弘樹

4B 9349  


電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Vol. 94, No. 16, (8月.1997), Martin D., et al. "Mendel's dwarfing gene: cDNAs from the <i>Le</i> alleles and function of the expressed proteins", p. 8907-8911	1-12
X	The Plant Cell, Vol. 7, No. 2, (2月.1995), Chiang H.H., et al. "Isolation of the Arabidopsis <i>GA4</i> Locus", p. 195-201	1-12
P, A	化学と生物, Vol. 38, No. 2, (2月.2000), 坂本知昭, 他「ジベレリン生合成酵素遺伝子の発現調節によるイネ草型の人為的制御」, p. 131-139	1-12
A	Journal of Experimental Botany, Vol. 50, No. 334, (5月.1999), Hedden P. "Recent advances in gibberellin biosynthesis", p. 553-563	1-12
A	化学と生物, Vol. 34, No. 6, (6月.1996), 山口信次郎「ジベレリンの生合成研究—最近の進歩(1)」, p. 402-410	1-12
A	Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Vol. 91, No. 18, (8月.1994), Lange T., et al. "Expression cloning of a gibberellin 20-oxidase, a multifunctional enzyme involved in gibberellin biosynthesis", p. 8552-8556	1-12