

(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
2011 年 4 月 28 日(28.04.2011)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2011/049243 A1

- (51) 国際特許分類:
A01H 1/00 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/069229
- (22) 国際出願日: 2010 年 10 月 22 日(22.10.2010)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2009-244595 2009 年 10 月 23 日(23.10.2009) JP
61/291,300 2009 年 12 月 30 日(30.12.2009) US
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人理化学研究所 (RIKEN) [JP/JP]; 〒3510198 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): 榊原 均 (SAKAKIBARA, Hitoshi) [JP/JP]; 〒2300045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1 丁目 7 番 2 2 号独立行政法人理化学研究所 横浜研究所内 Kanagawa (JP). 中道 範人 (NAKAMICHI, Norihito) [JP/JP]; 〒2300045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1 丁目 7 番 2 2 号独立行政法人理化学研究所 横浜研究所内 Kanagawa (JP). 榎田 庸絵 (MAKITA, Nobue) [JP/JP]; 〒2300045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1 丁目 7 番 2 2 号独立行政法人理化学研究所 横浜研究所内 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 平木 祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒1050001 東京都港区虎ノ門 4 丁目 3 番 20 号 神谷町 MT ビル 19 階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
 - 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: TRANSGENIC PLANT HAVING INCREASED BIOMASS AND IMPROVED ENVIRONMENTAL STRESS RESISTANCE, AND PROCESS FOR PRODUCTION THEREOF

(54) 発明の名称: バイオマスが増大し、かつ環境ストレス耐性が向上した形質転換植物およびその作出方法

(57) Abstract: Disclosed is a transgenic plant imparted with a useful trait, which is produced by carrying out the regulation of the expression of pseudo-response regulator (PRR) genes by an approach different from the deletion of the PRR genes. Specifically disclosed is a transgenic plant characterized by having, introduced therein, a polynucleotide that encodes a protein comprising a pseudo-receiver domain (which is a common motif among plant pseudo-response regulator (PRR) genes) and a CCT motif, a fusion polynucleotide that is a fusion of the polynucleotide and a polynucleotide encoding a transcription activation domain for at least one transcriptional factor, or a recombinant vector carrying the polynucleotide or the fusion polynucleotide.

(57) 要約: 本発明は、疑似レスポンスレギュレータ (PRR) 遺伝子群の欠損とは異なるアプローチで PRR 遺伝子群の発現制御を行ない、有用形質を付与した形質転換植物を提供することを課題とする。本発明によれば、植物の疑似レスポンスレギュレータ (Pseudo-Response-Regulator) 遺伝子の共通モチーフである疑似レシーバードメイン (Pseudo-Receiver domain) および CCT モチーフ (CCT-motif) を含むタンパク質をコードするポリヌクレオチド、あるいは、該ポリヌクレオチドと少なくとも 1 種の転写因子の転写活性化ドメインをコードするポリヌクレオチドとの融合ポリヌクレオチド、または該ポリヌクレオチド若しくは融合ポリヌクレオチドを含む組み換えベクターを導入したことを特徴とする、形質転換植物が提供される。



WO 2011/049243 A1

明 細 書

バイオマスが増大し、かつ環境ストレス耐性が向上した形質転換植物
およびその作出方法

技術分野

本発明は、植物一個体あたりのバイオマスが増大し、かつ環境ストレスに対する耐性が向上した形質転換植物、およびその作出方法に関する。

背景技術

シロイヌナズナの概日時計システムは、バイオマスの増大や開花時期の決定、環境ストレス応答に関わることが示唆されている(非特許文献1)。植物の時計関連遺伝子については、シロイヌナズナを用いた研究で、CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED1 (CCA1)、LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY)、TIMING OF CAB EXPRESSION1 (TOC1)という3つの遺伝子が発見され、植物の概日リズムの機構は、これらの複数の遺伝子の転写フィードバックループに基づいていることが明らかとなっている。このうち TOC1 遺伝子は、疑似レスポンスレギュレータ (Pseudo-Response-Regulator) 遺伝子の1つである。シロイヌナズナでは現在、TOC1 (PRR1) を含め、PRR3、PRR5、PRR7、PRR9 の計5つが疑似レスポンスレギュレータ (Pseudo-Response-Regulator) 遺伝子として同定されており、PRR9、PRR7、PRR5、PRR3、PRR1 (TOC1) の順に、夜明けとともに位相段階的に夕方にかけて発現量が上昇・減衰していく。

本発明者らは、シロイヌナズナの prr9 prr7 prr5 三重変異株 (d975 変異株) に注目して研究を行ってきた。これまでの研究より、d975 変異株は、概日時計システムの崩壊に加えて(非特許文献2)、産業上有用な形質、例えば花茎の伸長(非特許文献3)、開花の遅延(非特許文献2)、低温や乾燥に対してより強い耐性 (非特許文献4)を示すことがわかった。しかし、3つの PRR 遺伝子群は、互いに機能を補完しあうので、単一変異株では目立った形質は示さない(非特許文献2)。また、3つの PRR 遺伝子群の欠損をターゲットにした有用形質の付与は、多重変異体の作成という困難を伴う。さらに PRR9、PRR7、PRR5 タンパク質の生化学的な機能は未知であるため、低分子化合物などによる PRR タン

パク質群の機能抑制も、手法としては現実的ではない。

一方、低温や乾燥耐性を付与できる技術として、シロイヌナズナの乾燥ストレス応答性プロモーターの支配下で DREB1A 遺伝子あるいは類似の遺伝子群の発現を誘導する方法が挙げられる(特許文献 1 および非特許文献 5)。この方法は、ストレス耐性の付与としては充分であるが、バイオマスの増大については述べられていない。

バイオマスの増大は、時計関連遺伝子の GIGANTEA の変異体 (gi) によって観察されるが(非特許文献 6)、この変異体は低温ストレスにより感受性であるため(非特許文献 7)、この遺伝子の機能欠損をターゲットとした方法では、バイオマスの増大かつ環境ストレスへ耐性を持つ植物は作成できない。

また時計関連遺伝子の CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) と LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY) の若干の発現低下がバイオマスの増大と相関があるとされるが(非特許文献 8)、CCA1 と LHY 遺伝子の完全な発現抑制株 (cca1 lhy 二重変異体) は逆にバイオマスが低下しており(非特許文献 9)、これらの遺伝子をターゲットとしたバイオマスの増大は難しいと考えられる。

また長日性植物と短日性植物の生物時計はほぼ同じながらも(非特許文献 10)、それを利用した季節応答性は異なることが知られており(非特許文献 11)、長日性植物シロイヌナズナの時計遺伝子の改変を用いた有用形質の付与が、短日性植物にどの程度有効かは不明である。

(特許文献 1) 特開 2000-116260 号公報

(非特許文献 1) Harmer, S.L., Hogenesch, J.B., Straume, M., Chang, H.S., Han, B., Zhu, T., Wang, X., Kreps, J.A., and Kay, S.A. 2000. Orchestrated transcription of key pathways in Arabidopsis by the circadian clock. *Science* 290(5499): 2110-2113.

(非特許文献 2) Nakamichi, N., Kita, M., Ito, S., Yamashino, T., and Mizuno, T. 2005. PSEUDO-RESPONSE REGULATORS, PRR9, PRR7 and PRR5, together play essential roles close to the circadian clock of Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol* 46(5): 686-698.

(非特許文献 3) Yamashino, T., Ito, S., Niwa, Y., Kunihiro, A., Nakamichi, N., and Mizuno, T. 2008. Involvement of Arabidopsis clock-associated pseudo-response

regulators in diurnal oscillations of gene expression in the presence of environmental time cues. *Plant Cell Physiol* 49(12): 1839-1850.

(非特許文献 4) Nakamichi, N., Kusano, M., Fukushima, A., Kita, M., Ito, S., Yamashino, T., Saito, K., Sakakibara, H., and Mizuno, T. 2009. Transcript profiling of an *Arabidopsis* PSEUDO RESPONSE REGULATOR arrhythmic triple mutant reveals a role for the circadian clock in cold stress response. *Plant Cell Physiol* 50(3): 447-462.

(非特許文献 5) Kasuga, M., Liu, Q., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. 1999. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nat Biotechnol* 17(3): 287-291.

(非特許文献 6) Redei, G. 1960. Supervital mutants of *Arabidopsis*. *Genetics* 47: 443-460.

(非特許文献 7) Cao, S., Ye, M., and Jiang, S. 2005. Involvement of GIGANTEA gene in the regulation of the cold stress response in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep* 24(11): 683-690.

(非特許文献 8) Ni, Z., Kim, E.D., Ha, M., Lackey, E., Liu, J., Zhang, Y., Sun, Q., and Chen, Z.J. 2009. Altered circadian rhythms regulate growth vigour in hybrids and allopolyploids. *Nature* 457(7227): 327-331.

(非特許文献 9) Mizoguchi, T., Wheatley, K., Hanzawa, Y., Wright, L., Mizoguchi, M., Song, H.R., Carre, I.A., and Coupland, G. 2002. LHY and CCA1 are partially redundant genes required to maintain circadian rhythms in *Arabidopsis*. *Dev Cell* 2(5): 629-641.

(非特許文献 10) Murakami M, Tago Y, Yamashino T, Mizuno T. 2007 Comparative overviews of clock-associated genes of *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*. *Plant Cell Physiol*. 48(1):110-121

(非特許文献 11) Hayama R, Yokoi S, Tamaki S, Yano M, Shimamoto K. 2003 Adaptation of photoperiodic control pathways produces short-day flowering in rice. *Nature*. 422(6933):719-722

発明の開示

従って、本発明の課題は、疑似レスポンスレギュレータ (PRR) 遺伝子群の欠損とは異なるアプローチで PRR 遺伝子群の機能制御を行ない、有用形質を付与した形質転換植物を提供することにある。

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、植物の概日時計システムに関与する疑似レスポンスレギュレータ (PRR) と、転写因子の転写活性化ドメインの融合タンパク質を長日性植物のシロイヌナズナで強制発現させることにより、バイオマスの増大と環境ストレス耐性の向上が同時に達成できることを見出した。また、短日性植物のイネでは、疑似レスポンスレギュレータ (PRR) のみを強制発現させることにより、バイオマスの増大と環境ストレス耐性の向上が得られることを見出した。本発明はかかる知見により完成されたものである。

即ち、本発明は以下の発明を包含する。

(1) 植物の疑似レスポンスレギュレータ (Pseudo-Response-Regulator) 遺伝子の共通モチーフである疑似レシーバードメイン (Pseudo-Receiver domain) および CCT モチーフ (CCT-motif) を含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドと、少なくとも 1 種の転写因子の転写活性化ドメインをコードするポリヌクレオチドとの融合ポリヌクレオチド、または該融合ポリヌクレオチドを含む組み換えベクターを導入したことを特徴とする、形質転換植物。

(2) 植物の疑似レスポンスレギュレータ (Pseudo-Response-Regulator) 遺伝子の共通モチーフである疑似レシーバードメイン (Pseudo-Receiver domain) および CCT モチーフ (CCT-motif) を含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドが、以下の (a) ~ (c) のいずれかのポリヌクレオチドである、(1) に記載の形質転換植物。

(a) 配列番号 1、3、5、7、又は 9 に示す塩基配列からなるポリヌクレオチド

(b) 配列番号 1、3、5、7、又は 9 に示す塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY (late elongated hypocotyl) 遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

(c) 配列番号 1、3、5、7、又は 9 に示す塩基配列に対して 70% 以上の相同性を

有する塩基配列からなり、かつ CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY (late elongated hypocotyl) 遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

(3) 植物の疑似レスポンスレギュレータ (Pseudo-Response-Regulator) 遺伝子の共通モチーフである擬似レシーバードメイン (Pseudo-Receiver domain) および CCT モチーフ (CCT-motif) を含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドが、以下の (d) ~ (f) のいずれかのタンパク質をコードするポリヌクレオチドである、(1) に記載の形質転換植物。

(d) 配列番号 2、4、6、8、又は 10 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質

(e) 配列番号 2、4、6、8、又は 10 に示すアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY (late elongated hypocotyl) 遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質

(f) 配列番号 2、4、6、8、又は 10 に示すアミノ酸配列に対して 70% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY (late elongated hypocotyl) 遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質

(4) 転写因子の転写活性化ドメインをコードするポリヌクレオチドが、以下の (g) ~ (i) のいずれかのポリヌクレオチドである、(1) ~ (3) のいずれかに記載の形質転換植物。

(g) 配列番号 11 に示す塩基配列からなるポリヌクレオチド

(h) 配列番号 11 に示す塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ PRR ポリヌクレオチドに融合させることにより CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY (late elongated hypocotyl) 遺伝子の転写抑制解除活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

(i) 配列番号 11 に示す塩基配列に対して 70% 以上の相同性を有する塩基配列からなり、かつ PRR ポリヌクレオチドに融合させることにより CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY (late elongated hypocotyl) 遺伝子の転写抑制解除活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

(5) 植物が長日性植物である、(1) ~ (4) のいずれかに記載の形質転換植物。

(6) 植物の疑似レスポンスレギュレータ (Pseudo-Response-Regulator) 遺伝子の共通モチーフである擬似レシーバードメイン (Pseudo-Receiver domain) および CCT モチーフ (CCT-motif) を含むタンパク質をコードするポリヌクレオチド、または該ポリヌクレオチドを含む組み換えベクターを導入したことを特徴とする、形質転換植物。

(7) 植物の疑似レスポンスレギュレータ (Pseudo-Response-Regulator) 遺伝子の共通モチーフである擬似レシーバードメイン (Pseudo-Receiver domain) および CCT モチーフ (CCT-motif) を含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドが、以下の(a)～(c)のいずれかのポリヌクレオチドである、(6)に記載の形質転換植物。

(a) 配列番号 1、3、5、7、又は 9 に示す塩基配列からなるポリヌクレオチド

(b) 配列番号 1、3、5、7、又は 9 に示す塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY (late elongated hypocotyl) 遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

(c) 配列番号 1、3、5、7、又は 9 に示す塩基配列に対して 70%以上の相同性を有する塩基配列からなり、かつ CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY (late elongated hypocotyl) 遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

(8) 植物の疑似レスポンスレギュレータ (Pseudo-Response-Regulator) 遺伝子の共通モチーフである擬似レシーバードメイン (Pseudo-Receiver domain) および CCT モチーフ (CCT-motif) を含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドが、以下の(d)～(f)のいずれかのタンパク質をコードするポリヌクレオチドである、(6)に記載の形質転換植物。

(d) 配列番号 2、4、6、8、又は 10 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質

(e) 配列番号 2、4、6、8、又は 10 に示すアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY (late elongated hypocotyl) 遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質

(f) 配列番号 2、4、6、8、又は 10 に示すアミノ酸配列に対して 70%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝

子または LHY(late elongated hypocotyl)遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質

(9) 植物が短日性植物である、(6)～(8)のいずれかに記載の形質転換植物。

(10) バイオマスが増量した、(1)～(9)のいずれかに記載の形質転換植物。

(11) 環境ストレス耐性が付与された、(1)～(9)のいずれかに記載の形質転換植物。

(12) 環境ストレスが、乾燥ストレス、低温ストレス、及び塩ストレスから成る群から選択される少なくとも1種以上である、(11)に記載の形質転換植物。

(13) 植物の疑似レスポンスレギュレータ (Pseudo-Response-Regulator) 遺伝子の共通モチーフである擬似レシーバードメイン (Pseudo-Receiver domain) および CCT モチーフ (CCT-motif) を含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドと、少なくとも1種の転写因子の転写活性化ドメインをコードするポリヌクレオチドとの融合ポリヌクレオチド、または該融合ポリヌクレオチドを含む組み換えベクターを植物細胞に導入し、該植物細胞から植物体を再生することを特徴とする、形質転換植物の作出方法。

(14) 植物の疑似レスポンスレギュレータ (Pseudo-Response-Regulator) 遺伝子の共通モチーフである擬似レシーバードメイン (Pseudo-Receiver domain) および CCT モチーフ (CCT-motif) を含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドが、以下の(a)～(c)のいずれかのポリヌクレオチドである、(13)に記載の方法。

(a) 配列番号1、3、5、7、又は9に示す塩基配列からなるポリヌクレオチド

(b) 配列番号1、3、5、7、又は9に示す塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY(late elongated hypocotyl)遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

(c) 配列番号1、3、5、7、又は9に示す塩基配列に対して70%以上の相同性を有する塩基配列からなり、かつ CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY(late elongated hypocotyl)遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

(15) 植物の疑似レスポンスレギュレータ (Pseudo-Response-Regulator) 遺伝子の共通モチーフである擬似レシーバードメイン (Pseudo-Receiver domain) および CCT モチーフ (CCT-motif) を含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドが、以下の(d)～(f)のいずれかのタンパク質をコードするポリヌクレオチドである、(13)に記載の方法。

- (d) 配列番号 2、4、6、8、又は 10 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質
- (e) 配列番号 2、4、6、8、又は 10 に示すアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY(late elongated hypocotyl)遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質
- (f) 配列番号 2、4、6、8、又は 10 に示すアミノ酸配列に対して 70%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY(late elongated hypocotyl)遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質
- (16) 転写因子の転写活性化ドメインをコードするポリヌクレオチドが、以下の (g) ~ (i) のいずれかのポリヌクレオチドである、(13) ~ (15) のいずれかに記載の方法。
- (g) 配列番号 11 に示す塩基配列からなるポリヌクレオチド
- (h) 配列番号 11 に示す塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ PRR ポリヌクレオチドに融合させることにより CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY(late elongated hypocotyl)遺伝子の転写抑制解除活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド
- (i) 配列番号 11 に示す塩基配列に対して 70%以上の相同性を有する塩基配列からなり、かつ PRR ポリヌクレオチドに融合させることにより CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY(late elongated hypocotyl)遺伝子の転写抑制解除活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド
- (17) 植物が長日性植物である、(13) ~ (16) のいずれかに記載の方法。
- (18) 植物の疑似レスポンスレギュレータ (Pseudo-Response-Regulator) 遺伝子の共通モチーフである疑似レシーバードメイン (Pseudo-Receiver domain) および CCT モチーフ (CCT-motif) を含むタンパク質をコードするポリヌクレオチド、または該ポリヌクレオチドを含む組み換えベクターを植物細胞に導入し、該植物細胞から植物体を再生することを特徴とする、形質転換植物の作出方法。
- (19) 植物の疑似レスポンスレギュレータ (Pseudo-Response-Regulator) 遺伝子の共通モチーフである疑似レシーバードメイン (Pseudo-Receiver domain) および CCT モチーフ (CCT-motif) を含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドが、以下の (a) ~ (c)

のいずれかのポリヌクレオチドである、(18)に記載の方法。

(a) 配列番号 1、3、5、7、又は 9 に示す塩基配列からなるポリヌクレオチド

(b) 配列番号 1、3、5、7、又は 9 に示す塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY (late elongated hypocotyl) 遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

(c) 配列番号 1、3、5、7、又は 9 に示す塩基配列に対して 70%以上の相同性を有する塩基配列からなり、かつ CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY (late elongated hypocotyl) 遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

(20) 植物の疑似レスポンスレギュレータ (Pseudo-Response-Regulator) 遺伝子の共通モチーフである疑似レシーバードメイン (Pseudo-Receiver domain) および CCT モチーフ (CCT-motif) を含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドが、以下の (d)～(f) のいずれかのタンパク質をコードするポリヌクレオチドである、(18)に記載の方法。

(d) 配列番号 2、4、6、8、又は 10 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質

(e) 配列番号 2、4、6、8、又は 10 に示すアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY (late elongated hypocotyl) 遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質

(f) 配列番号 2、4、6、8、又は 10 に示すアミノ酸配列に対して 70%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY (late elongated hypocotyl) 遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質

(21) 植物が短日性植物である、(18)～(20)のいずれかに記載の方法。

(22) 形質転換植物が、バイオマスが増量した形質転換植物である、(13)～(21)のいずれかに記載の方法。

(23) 形質転換植物が、環境ストレス耐性を有する形質転換植物である、(13)～(21)のいずれかに記載の方法。

(24) 環境ストレスが、乾燥ストレス、低温ストレス、及び塩ストレスから成る群から選択される少なくとも 1 種以上である、(23)に記載の方法。

(25) 植物の疑似レスポンスレギュレータ (Pseudo-Response-Regulator) 遺伝子の共通モチーフである擬似レシーバードメイン (Pseudo-Receiver domain) および CCT モチーフ (CCT-motif) を含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドと、少なくとも 1 種の転写因子の転写活性化ドメインをコードするポリヌクレオチドとの融合ポリヌクレオチドを植物内で過剰発現させることを特徴とする、植物のバイオマスを増大させる方法。

(26) 植物の疑似レスポンスレギュレータ (Pseudo-Response-Regulator) 遺伝子の共通モチーフである擬似レシーバードメイン (Pseudo-Receiver domain) および CCT モチーフ (CCT-motif) を含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドが、以下の (a) ~ (c) のいずれかのポリヌクレオチドである、(25) に記載の方法。

(a) 配列番号 1、3、5、7、又は 9 に示す塩基配列からなるポリヌクレオチド

(b) 配列番号 1、3、5、7、又は 9 に示す塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY (late elongated hypocotyl) 遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

(c) 配列番号 1、3、5、7、又は 9 に示す塩基配列に対して 70% 以上の相同性を有する塩基配列からなり、かつ CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY (late elongated hypocotyl) 遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

(27) 植物の疑似レスポンスレギュレータ (Pseudo-Response-Regulator) 遺伝子の共通モチーフである擬似レシーバードメイン (Pseudo-Receiver domain) および CCT モチーフ (CCT-motif) を含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドが、以下の (d) ~ (f) のいずれかのタンパク質をコードするポリヌクレオチドである、(25) に記載の方法。

(d) 配列番号 2、4、6、8、又は 10 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質

(e) 配列番号 2、4、6、8、又は 10 に示すアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY (late elongated hypocotyl) 遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質

(f) 配列番号 2、4、6、8、又は 10 に示すアミノ酸配列に対して 70% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝

子または LHY(late elongated hypocotyl)遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質

(28) 転写因子の転写活性化ドメインをコードするポリヌクレオチドが、以下の (g) ~ (i) のいずれかのポリヌクレオチドである、(25) ~ (27) のいずれかに記載の方法。

(g) 配列番号 11 に示す塩基配列からなるポリヌクレオチド

(h) 配列番号 11 に示す塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ PRR ポリヌクレオチドに融合させることにより CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY(late elongated hypocotyl)遺伝子の転写抑制解除活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

(i) 配列番号 11 に示す塩基配列に対して 70%以上の相同性を有する塩基配列からなり、かつ PRR ポリヌクレオチドに融合させることにより CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY(late elongated hypocotyl)遺伝子の転写抑制解除活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

(29) 植物が長日性植物である、(25) ~ (28) のいずれかに記載の方法。

(30) 植物の疑似レスポンスレギュレータ (Pseudo-Response-Regulator) 遺伝子の共通モチーフである擬似レシーバードメイン (Pseudo-Receiver domain) および CCT モチーフ (CCT-motif) を含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドを植物内で過剰発現させることを特徴とする、植物のバイオマスを増大させる方法。

(31) 植物の疑似レスポンスレギュレータ (Pseudo-Response-Regulator) 遺伝子の共通モチーフである擬似レシーバードメイン (Pseudo-Receiver domain) および CCT モチーフ (CCT-motif) を含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドが、以下の (a) ~ (c) のいずれかのポリヌクレオチドである、(30)に記載の方法。

(a) 配列番号 1、3、5、7、又は 9 に示す塩基配列からなるポリヌクレオチド

(b) 配列番号 1、3、5、7、又は 9 に示す塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY(late elongated hypocotyl)遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

(c) 配列番号 1、3、5、7、又は 9 に示す塩基配列に対して 70%以上の相同性を有する塩基配列からなり、かつ CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または

LHY(late elongated hypocotyl)遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

(32) 植物の疑似レスポンスレギュレータ (Pseudo-Response-Regulator) 遺伝子の共通モチーフである擬似レシーバードメイン (Pseudo-Receiver domain) および CCT モチーフ (CCT-motif) を含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドが、以下の(d)～(f)のいずれかのタンパク質をコードするポリヌクレオチドである、(30)に記載の方法。

(d) 配列番号 2、4、6、8、又は 10 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質

(e) 配列番号 2、4、6、8、又は 10 に示すアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY(late elongated hypocotyl)遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質

(f) 配列番号 2、4、6、8、又は 10 に示すアミノ酸配列に対して 70%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY(late elongated hypocotyl)遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質

(33) 植物が短日性植物である、(30)～(32)のいずれかに記載の方法。

(34) 植物の疑似レスポンスレギュレータ (Pseudo-Response-Regulator) 遺伝子の共通モチーフである擬似レシーバードメイン (Pseudo-Receiver domain) および CCT モチーフ (CCT-motif) を含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドと、少なくとも 1 種の転写因子の転写活性化ドメインをコードするポリヌクレオチドとの融合ポリヌクレオチドを植物内で過剰発現させることを特徴とする、植物に環境ストレス耐性を付与する方法。

(35) 植物の疑似レスポンスレギュレータ (Pseudo-Response-Regulator) 遺伝子の共通モチーフである擬似レシーバードメイン (Pseudo-Receiver domain) および CCT モチーフ (CCT-motif) を含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドが、以下の(a)～(c)のいずれかのポリヌクレオチドである、(34)に記載の方法。

(a) 配列番号 1、3、5、7、又は 9 に示す塩基配列からなるポリヌクレオチド

(b) 配列番号 1、3、5、7、又は 9 に示す塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY(late elongated hypocotyl)遺伝子の転写抑制

活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

(c) 配列番号 1、3、5、7、又は 9 に示す塩基配列に対して 70%以上の相同性を有する塩基配列からなり、かつ CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY (late elongated hypocotyl) 遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

(36) 植物の疑似レスポンスレギュレータ (Pseudo-Response-Regulator) 遺伝子の共通モチーフである疑似レシーバードメイン (Pseudo-Receiver domain) および CCT モチーフ (CCT-motif) を含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドが、以下の (d) ~ (f) のいずれかのタンパク質をコードするポリヌクレオチドである、(34)に記載の方法。

(d) 配列番号 2、4、6、8、又は 10 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質

(e) 配列番号 2、4、6、8、又は 10 に示すアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY (late elongated hypocotyl) 遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質

(f) 配列番号 2、4、6、8、又は 10 に示すアミノ酸配列に対して 70%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY (late elongated hypocotyl) 遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質

(37) 転写因子の転写活性化ドメインをコードするポリヌクレオチドが、以下の (g) ~ (i) のいずれかのポリヌクレオチドである、(34) ~ (36) のいずれかに記載の方法。

(g) 配列番号 11 に示す塩基配列からなるポリヌクレオチド

(h) 配列番号 11 に示す塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ PRR ポリヌクレオチドに融合させることにより CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY (late elongated hypocotyl) 遺伝子の転写抑制解除活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

(i) 配列番号 11 に示す塩基配列に対して 70%以上の相同性を有する塩基配列からなり、かつ PRR ポリヌクレオチドに融合させることにより CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY (late elongated hypocotyl) 遺伝子の転写抑制解除活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

(38) 植物が長日性植物である、(34)～(37)のいずれかに記載の方法。

(39) 植物の疑似レスポンスレギュレータ (Pseudo-Response-Regulator) 遺伝子の共通モチーフである疑似レシーバードメイン (Pseudo-Receiver domain) および CCT モチーフ (CCT-motif) を含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドを植物内で過剰発現させることを特徴とする、植物に環境ストレス耐性を付与する方法。

(40) 植物の疑似レスポンスレギュレータ (Pseudo-Response-Regulator) 遺伝子の共通モチーフである疑似レシーバードメイン (Pseudo-Receiver domain) および CCT モチーフ (CCT-motif) を含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドが、以下の (a)～(c) のいずれかのポリヌクレオチドである、(39)に記載の方法。

(a) 配列番号 1、3、5、7、又は 9 に示す塩基配列からなるポリヌクレオチド

(b) 配列番号 1、3、5、7、又は 9 に示す塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY (late elongated hypocotyl) 遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

(c) 配列番号 1、3、5、7、又は 9 に示す塩基配列に対して 70%以上の相同性を有する塩基配列からなり、かつ CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY (late elongated hypocotyl) 遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

(41) 植物の疑似レスポンスレギュレータ (Pseudo-Response-Regulator) 遺伝子の共通モチーフである疑似レシーバードメイン (Pseudo-Receiver domain) および CCT モチーフ (CCT-motif) を含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドが、以下の (d)～(f) のいずれかのタンパク質をコードするポリヌクレオチドである、(39)に記載の方法。

(d) 配列番号 2、4、6、8、又は 10 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質

(e) 配列番号 2、4、6、8、又は 10 に示すアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY (late elongated hypocotyl) 遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質

(f) 配列番号 2、4、6、8、又は 10 に示すアミノ酸配列に対して 70%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝

子または LHY (late elongated hypocotyl) 遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質

(42) 植物が短日性植物である、(39)～(41)のいずれかに記載の方法。

(43) 環境ストレスが、乾燥ストレス、低温ストレス、及び塩ストレスから成る群から選択される少なくとも 1 種以上である、(34)～(42)のいずれかに記載の方法。

図面の簡単な説明

図 1 は、疑似レスポンスレギュレータ遺伝子の PRR1 (TOC1)、PRR3、PRR5、PRR7、PRR9 遺伝子の共通構造を示す。

図 2 は、PRR5、PRR7、PRR9 の CCA1::LUC 比活性 (CCA1 プロモーター活性) への影響を示す。

図 3 は、pBS-35S::PRR5-VP32 ベクターの構造を示す。

図 4 は、TOC1-VP32、PRR3-VP32、PRR5-VP32、PRR7-VP32、および PRR9-VP32 の CCA1::LUC 比活性 (CCA1 プロモーター活性) への影響を示す。

図 5 は、PRR5-VP32 発現植物体、野生株、および prr9 prr7 prr5 三重変異体の花芽が出るまでの日数、花芽が出た時点での葉の枚数を示す。

図 6 は、PRR5-VP32 発現植物体および野生株の花芽形成時 (生育ステージが同じ) の形態を示す。

図 7 は、PRR5-VP32 発現植物体および野生株の発芽 38 日後 (生育日数が同じ) の形態 (上段)、および葉の面積 (下段) を示す。

図 8 は、PRR5-VP32 発現植物体および野生株の花茎の断面図を示す。

図 9 は、PRR5-VP32 発現植物体および野生株の塩ストレス耐性テストの結果を示す。

図 10 は、PRR5-VP32 発現植物体および野生株の乾燥ストレス耐性テストの結果を示す。

図 11 は、PRR5-VP32 発現植物体および野生株の低温ストレス耐性テストの結果を示す。

図 12 は、PRR5 発現植物体 (イネ) の形態を示す。

本願は、2009 年 10 月 23 日に出願された日本国特許出願 2009-244595 号、および 2009 年 12 月 30 日に出願された米国仮出願 61/291,300 号の優先権を主張するものであり、該

特許出願の明細書に記載される内容を包含する。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

1. ポリヌクレオチド

本発明の形質転換植物を作出するのに使用するポリヌクレオチドは、植物の疑似レスポンスレギュレータ (Pseudo-Response-Regulator) 遺伝子の共通モチーフである擬似レシーバードメイン (Pseudo-Receiver domain) および CCT モチーフ (CCT-motif) を含むタンパク質をコードするポリヌクレオチド、あるいは、当該ポリヌクレオチドと、少なくとも 1 種の転写因子の転写活性化ドメインをコードするポリヌクレオチドとの融合ポリヌクレオチドである。

上記の擬似レシーバードメイン (Pseudo-Receiver domain) および CCT モチーフ (CCT-motif) を含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドとして、例えば、疑似レスポンスレギュレータ (Pseudo-Response-Regulator) 遺伝子である PRR1(TOC1)、PRR3、PRR5、PRR7、PRR9 遺伝子が挙げられる。これら PRR1(TOC1)、PRR3、PRR5、PRR7、PRR9 遺伝子は図 1 に示す共通構造を有する。

PRR1(TOC1)、PRR3、PRR5、PRR7、PRR9 遺伝子の塩基配列を配列番号 1、3、5、7、9 に、またそれらによりコードされるアミノ酸配列を配列番号 2、4、6、8、10 にそれぞれ示す。

上記の擬似レシーバードメイン (Pseudo-Receiver domain) は、疑似レスポンスレギュレータ遺伝子に共通して見出されるモチーフであり、タンパク質間の相互作用能を有することが知られている。PRR1(TOC1)、PRR3、PRR5、PRR7、PRR9 遺伝子の擬似レシーバードメインのアミノ酸配列はそれぞれ配列番号 12、13、14、15、16 で表わされる。

また、上記の CCT モチーフ (CCT-motif) は、植物タンパク質中によくみられる構造で、塩基性アミノ酸に富み、約 45 アミノ酸からなる。シロイヌナズナの CONSTANS (CO) タンパク質の CCT モチーフは、核局在とタンパク質間の相互作用に関与することが知られている。PRR1(TOC1)、PRR3、PRR5、PRR7、PRR9 遺伝子の CCT モチーフのアミノ酸配列はそれぞれ配列番号 17、18、19、20、21 で表わされる。

上記の擬似レシーバードメインと CCT モチーフを含むタンパク質をコードするポリヌクレオチド（以下、「PRR ポリヌクレオチド」という）は、植物界に広く分布すると考えられ、由来は問わないが、例えば、シロイヌナズナ（アブラナ科）のほか、イネ（イネ科）、ポプラ（ヤナギ科）、ブドウ（ブドウ科）、トマト（ナス科）、キャッサバ（トウダイグサ科）、ダイズ（マメ科）、裸子植物、シダ類、コケ類などが挙げられる。

本発明においては、PRR ポリヌクレオチドとして、配列番号 1、3、5、7、又は 9 に示す塩基配列からなるポリヌクレオチドのほか、当該ポリヌクレオチドと同等の機能を有する限り、配列番号 1、3、5、7、又は 9 に示す塩基配列と類似する塩基配列からなるポリヌクレオチドを使用することもできる。従って、本発明において用いる PRR ポリヌクレオチドは、上記配列番号の塩基配列と類似する塩基配列からなり、CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY (late elongated hypocotyl) 遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドを包含する。このようなポリヌクレオチドは、天然から調製されたものでも人工的に調製されたものでもよい。例えば、上記配列番号の塩基配列のホモログ（オーソログ、パラログを含む）、人工的に変異をいれたものであってもよい。

具体的には、次のポリヌクレオチドが挙げられる。

(i) 配列番号 1、3、5、7、又は 9 に示す塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY (late elongated hypocotyl) 遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

(ii) 配列番号 1、3、5、7、又は 9 に示す塩基配列に対して 70%以上の相同性を有する塩基配列からなり、かつ CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY (late elongated hypocotyl) 遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

(iii) 配列番号 2、4、6、8、又は 10 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド

(iv) 配列番号 2、4、6、8、又は 10 に示すアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY (late elongated hypocotyl) 遺伝

子の転写抑制活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

(v) 配列番号 2、4、6、8、又は 10 に示すアミノ酸配列に対して 70%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY (late elongated hypocotyl) 遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

上記の「CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子」は、概日時計システムを構成し、朝に発現量が最大となる朝方位遺伝子 (morning gene) である。「CCA1 遺伝子の転写抑制活性」は、当該遺伝子の転写を抑制して、その発現量を減少させる活性をいう。また、「LHY (late elongated hypocotyl) 遺伝子」は CCA1 遺伝子の機能的に相同な遺伝子である。

ここでいう「ストリンジェントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。上記のストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、当業者であれば、Sambrook ら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory (2001) を参照し、適宜選択することができる。一例を示せば、25%ホルムアミド、よりストリンジェントな条件では 50%ホルムアミド、4×SSC、50mM HEPES (pH7.0)、10×デンハルト溶液、20 µg/ml 変性サケ精子 DNA を含むハイブリダイゼーション溶液中、42℃で一晩プレハイブリダイゼーションを行った後、標識したプローブを添加し、42℃で一晩保温することによりハイブリダイゼーションを行う。その後の洗浄における洗浄液および温度条件は、「1×SSC、0.1% SDS、37℃」程度であり、よりストリンジェントな条件としては「0.5×SSC、0.1% SDS、42℃」程度であり、さらにストリンジェントな条件としては「0.2×SSC、0.1% SDS、65℃」程度である。温度が高いほど、塩濃度が低いほどストリンジェンシーは高くなり、より相同性の高いポリヌクレオチドを単離できる。

但し、上記 SSC、SDS および温度の条件の組み合わせは例示であり、当業者であれば、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーを決定する上記若しくは他の要素（例えば、プローブ濃度、プローブの長さ、ハイブリダイゼーション反応時間など）を適宜組み合わせることにより、上記と同様のストリンジェンシーを実現することが可能である。

上記のストリンジェントな条件下でのハイブリダイゼーションにより得られるポリヌクレオチドは、配列番号 1、3、5、7、又は 9 のいずれかに示す塩基配列により示さ

れる DNA と通常高い相同性を有する。ここで、高い相同性とは、上記配列番号の塩基配列と 70%以上、好ましくは 80%以上、85%以上、より好ましくは 90%以上、さらに好ましく 95%以上、もっとも好ましくは 97%以上（例えば、98 から 99%）の配列の相同性をいう。

また、前記の「1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列」について、欠失、置換若しくは付加されてもよいアミノ酸の数としては、部位特異的突然変異誘発法等の公知の変異タンパク質作製法により欠失、置換、若しくは付加できる程度の数をいい、前記した活性を保持する限り、その個数は制限されないが、通常は、たとえば、1～20 個、好ましくは 1～10 個、より好ましくは 1～5 個をいう。また、ここにいう「変異」は、主には公知の変異タンパク質作製法により人為的に導入された変異を意味するが、天然に存在する同様の変異であってもよい。

また、前記のアミノ酸配列に関し、「70%以上の相同性」とは、好ましくは 80%以上、85%以上、より好ましくは 90%以上、さらに好ましく 95%以上、もっとも好ましくは 97%以上（例えば、98 から 99%）の配列の相同性をいう。配列（アミノ酸配列、塩基配列）の同一性は、FASTA 検索や BLAST 検索により決定することができる。

本発明に用いる PRR ポリヌクレオチドは、公知技術によって調製することができる。例えば、シロイヌナズナ組織抽出物から total mRNA を調製し、上記配列番号の塩基配列をもとにプライマーを設計し、RACE 法等を行って上記配列番号の塩基配列の完全長 cDNA を得ることができる。またはシロイヌナズナ組織抽出物から cDNA ライブラリーを作製し、上記配列番号の塩基配列をもとにプローブを設計し、ハイブリダイゼーション法によって得ることもできる。さらには、上記配列番号の塩基配列をもとに、人工的に合成してもよい。

また、当業者であれば、Molecular Cloning (Sambrook, J. et al., Molecular Cloning : a Laboratory Manual 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 10 Skyline Drive Plainview, NY (2001)) 等を参照することにより、PRR ポリヌクレオチドのホモログを容易に取得することができる。

たとえば、アミノ酸の欠失、付加、及び置換は、上記タンパク質をコードする遺伝子に、当該技術分野で公知の手法によって変異を導入することによって行うことができる。遺伝子に変異を導入するには、Kunkel 法または Gapped duplex 法等の公知手法またはこ

れに準ずる方法により行うことができ、例えば部位特異的突然変異誘発法を利用した変異導入用キット（例えば Mutant-K (TAKARA 社製) や Mutant-G (TAKARA 社製)）、TAKARA 社の LA PCR in vitro Mutagenesis シリーズキットを利用することができる。あるいは、上記配列番号の塩基配列に変異を導入した配列を、市販の核酸合成装置によって合成することも可能である。

一方、PRR ポリヌクレオチドに融合させる少なくとも 1 種の転写因子の転写活性化ドメインをコードするポリヌクレオチドは、PRR ポリヌクレオチドによる CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY (late elongated hypocotyl) 遺伝子の転写抑制を解除し、その転写を活性化させる機能を有する。転写因子の転写活性化ドメインは転写活性化能をもつものであれば如何なるものでもよく、具体例としては、ヘルペスウイルス VP16 タンパク質の転写活性化ドメイン、酵母由来 GAL4 タンパク質の転写活性化ドメインが挙げられる。当該転写活性化ドメインは少なくとも 1 種あればよく、同種または異種の転写活性化ドメインを 2 種以上組み合わせてもよい。また、ヘルペスウイルス VP16 タンパク質の転写活性化ドメインをコードするポリヌクレオチドは配列番号 11 に示されるが、PRR ポリヌクレオチドに融合させることにより CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY (late elongated hypocotyl) 遺伝子の転写抑制を解除し、その転写を活性化させる機能を有する限り、配列番号 11 に示す塩基配列と類似する塩基配列からなるポリヌクレオチドであってもよい。例えば、配列番号 11 に示す塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ PRR ポリヌクレオチドに融合させることにより CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY (late elongated hypocotyl) 遺伝子の転写抑制解除活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドや、配列番号 11 に示す塩基配列に対して 70% 以上の相同性を有する塩基配列からなり、かつ PRR ポリヌクレオチドに融合させることにより CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY (late elongated hypocotyl) 遺伝子の転写抑制解除活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドが挙げられる。「ストリンジェント」や「相同性」の意味は、前記に定義したとおりである。

2. 組換えベクター

植物形質転換に用いる本発明の組換えベクターは、上記のポリヌクレオチドまたは融合ポリヌクレオチド（以下、目的遺伝子という）を適当なベクターに導入することにより構築することができる。ここで、ベクターとしては、例えば、アグロバクテリウムを介して植物に目的遺伝子を導入することができる、pBI 系、pPZP 系、pSMA 系、pCAMBIA 系のベクターなどが好適に用いられる。特に pBI 系のバイナリーベクター又は中間ベクター系が好適に用いられ、例えば、pBI121、pBI101、pBI101.2、pBI101.3 等が挙げられる。バイナリーベクターとは大腸菌 (*Escherichia coli*) 及びアグロバクテリウムにおいて複製可能なシャトルベクターで、バイナリーベクターを保持するアグロバクテリウムを植物に感染させると、ベクター上にある LB 配列と RB 配列より成るボーダー配列で囲まれた部分の DNA を植物核 DNA に組み込むことが可能である。一方、pUC 系のベクターは、植物に遺伝子を直接導入することができ、例えば、pUC18、pUC19、pUC9 等が挙げられる。また、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV)、インゲンマメモザイクウイルス (BGMV)、タバコモザイクウイルス (TMV) 等の植物ウイルスベクターも用いることができる。

バイナリーベクター系プラスミドを用いる場合、上記のバイナリーベクターの境界配列 (LB, RB) 間に、目的遺伝子を挿入し、この組換えベクターを大腸菌中で増幅する。次いで、増幅した組換えベクターを *Agrobacterium tumefaciens* GV3101、C58、LBA4404、EHA101、EHA105 あるいは *Agrobacterium rhizogenes* LBA1334 等に、エレクトロポレーション法等により導入し、該アグロバクテリウムを植物の形質導入に用いる。

また、上記の方法以外にも、三者接合法 (Nucleic Acids Research, 12 : 8711(1984)) によって、目的遺伝子を含む植物感染用アグロバクテリウムを調製することができる。すなわち、目的遺伝子を含むプラスミドを保有する大腸菌、ヘルパープラスミド (例えば、pRK2013 等) を保有する大腸菌、及びアグロバクテリウムを混合培養し、リファンピシリン及びカナマイシンを含む培地上で培養することにより植物感染用の接合体アグロバクテリウムを得ることができる。

ベクターに目的遺伝子を挿入するには、まず、精製された DNA を適当な制限酵素で切断し、適当なベクター DNA の制限酵素部位又はマルチクローニングサイトに挿入してベクターに連結する方法などが採用される。

また、目的遺伝子は、当該遺伝子の機能が発揮されるようにベクターに組み込まれる

ことが必要である。そこで、ベクターには、目的遺伝子上流、内部、あるいは下流に、プロモーター、エンハンサー、ターミネーター、バイナリーベクター系を使用するための複製開始点 (Ti 又は Ri プラスミド由来の複製開始点など)、選抜マーカー遺伝子などを連結することができる。

「プロモーター」としては、植物細胞において機能し、植物の特定の組織内あるいは特定の発育段階において発現を導くことのできる DNA であれば、植物由来のものでなくてもよい。具体例としては、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35S プロモーター、ノパリン合成酵素遺伝子のプロモーター (Pnos)、トウモロコシ由来ユビキチンプロモーター、イネ由来のアクチンプロモーター、タバコ由来 PR タンパク質プロモーター等が挙げられる。また、特定器官について特に目的遺伝子を発現させたい場合は、組織特異的に発現するプロモーターを用いることもできる。例えば、花茎特異的遺伝子あるいは茎頂特異的遺伝子のプロモーターを用いれば、本発明のポリヌクレオチドのバイオマス増量効果を効率的に取得することも可能である。

エンハンサーとしては、例えば、目的遺伝子の発現効率を高めるために用いられ、CaMV35S プロモーター内の上流側の配列を含むエンハンサー領域などが挙げられる。

ターミネーターとしては、プロモーターにより転写された遺伝子の転写を終結できる配列であればよく、例えば、ノパリン合成酵素 (NOS) 遺伝子のターミネーター、オクトピン合成酵素 (OCS) 遺伝子のターミネーター、CaMV 35S RNA 遺伝子のターミネーター等が挙げられる。

選抜マーカー遺伝子としては、例えば、アンピシリン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、ピアラホス耐性遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子などが挙げられる。

また、選抜マーカー遺伝子は、上記のように目的遺伝子とともに同一のプラスミドに連結させて組換えベクターを調製してもよいが、あるいは、選抜マーカー遺伝子をプラスミドに連結して得られる組換えベクターと、目的遺伝子に連結して得られる組換えベクターとを別々に調製してもよい。別々に調製した場合は、各ベクターを宿主にコトランスフェクト (共導入) する。

3. 形質転換植物及びその作出方法

本発明の形質転換植物は、上記ポリヌクレオチド若しくは融合ポリヌクレオチド又は組換えベクター（以下、これらを総称して目的遺伝子という）を対象植物に導入することによって作出することができる。本発明において「遺伝子の導入」とは、例えば公知の遺伝子工学的手法により、目的遺伝子を上記宿主植物の細胞内に発現可能な形で導入することを意味する。ここで導入された遺伝子は、宿主植物のゲノム DNA 中に組み込まれてもよいし、外来ベクターに含有されたままで存在していてもよい。

上記目的遺伝子を植物中に導入する方法としては、既に報告され、確立されている種々の方法を適宜利用することができ、例えば、アグロバクテリウム法、PEG-リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、リポソーム法、パーティクルガン法、マイクロインジェクション法等が挙げられる。アグロバクテリウム法を用いる場合は、プロトプラストを用いる場合、組織片を用いる場合、及び植物体そのものを用いる場合（in planta 法）がある。プロトプラストを用いる場合は、Ti プラスミドないしは Ri プラスミドをもつアグロバクテリウム（それぞれ *Agrobacterium tumefaciens* 又は *Agrobacterium rhizogenes*）と共存培養する方法、スフェロプラスト化したアグロバクテリウムと融合する方法（スフェロプラスト法）、組織片を用いる場合は、対象植物の無菌培養葉片（リーフディスク）に感染させる方法やカルス（未分化培養細胞）に感染させる等により行うことができる。また種子あるいは植物体を用いる in planta 法を適用する場合、すなわち植物ホルモン添加の組織培養を介さない系では、吸水種子、幼植物（芽生え）、鉢植え植物などへのアグロバクテリウムの直接処理等にて実施可能である。これらの植物形質転換法は、「島本功、岡田清孝 監修、新版 モデル植物の実験プロトコール 遺伝学的手法からゲノム解析まで（2001）、秀潤社」などの一般的な教科書の記載に従って行うことができる。

目的遺伝子が植物体に組み込まれたか否かの確認は、PCR 法、サザンハイブリダイゼーション法、ノーザンハイブリダイゼーション法、ウェスタンブロッティング法等により行うことができる。例えば、形質転換植物から DNA を調製し、目的遺伝子特異的プライマーを設計して PCR を行う。PCR を行った後は、増幅産物についてアガロースゲル電気泳動、ポリアクリルアミドゲル電気泳動又はキャピラリー電気泳動等を行い、臭化エチジウム、SYBR Green 液等により染色し、そして増幅産物を 1 本のバンドとして検出することにより、形質転換されたことを確認することができる。また、予め蛍光色素等に

より標識したプライマーを用いて PCR を行い、増幅産物を検出することもできる。さらに、マイクロプレート等の固相に増幅産物を結合させ、蛍光又は酵素反応等により増幅産物を確認する方法でもよい。さらに、その植物細胞からタンパク質を抽出し、2次元電気泳動を行って分画し、目的遺伝子がコードするタンパク質のバンドを検出することにより、植物細胞に導入された目的遺伝子が発現されていること、すなわちその植物が形質転換されていることを確認してもよい。

あるいは、種々のレポーター遺伝子、例えばベータグルクロニダーゼ (GUS)、ルシフェラーゼ (LUC)、Green fluorescent protein (GFP)、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT)、ベータガラクトシダーゼ (LacZ) 等の遺伝子を目的遺伝子の下流域に連結したベクターを作製し、該ベクター導入したアグロバクテリムを用いて上記と同様にして植物を形質転換させ、該レポーター遺伝子の発現を測定することによっても確認できる。

本発明において形質転換に用いられる植物としては単子葉植物又は双子葉植物あるいは短日性植物又は長日性植物のいずれであってもよいが、短日性植物 (例えば、イネ、トウモロコシ、ダイズ、キク、アサガオ、コスモスなど) の場合は、前述の植物の疑似レスポンスレギュレータ (Pseudo-Response-Regulator) 遺伝子の共通モチーフである疑似レシーバードメイン (Pseudo-Receiver domain) および CCT モチーフ (CCT-motif) を含むタンパク質をコードするポリヌクレオチド、長日性植物 (例えば、シロイヌナズナ、コムギ、オオムギ、ハウレンソウ、ポプラなど) の場合は、該ポリヌクレオチドと、少なくとも1種の転写因子の転写活性化ドメインをコードするポリヌクレオチドとの融合ポリヌクレオチドを導入して形質転換する。本発明において形質転換に用いられる植物としては、例えば、アブラナ科 (シロイヌナズナ、キャベツ、ナタネ等)、イネ科 (イネ、トウモロコシ、オオムギ、コムギ、スイッチグラス、サトウキビ、ソルガム等)、ナス科 (トマト、ナス、ジャガイモ、タバコ等)、マメ科 (ダイズ、エンドウ、インゲン等)、ヒルガオ科 (サツマイモ等)、キク科 (ヒマワリ等)、トウダイグサ科 (キャツサバ、ヤトロファ等)、バラ科 (イチゴ等)、ヤナギ類 (ポプラ等) 等に属する植物が挙げられるが、これらの植物に限定されるものではなく、裸子植物、シダ類、コケ類をも含む陸生植物全般に汎用可能である。

本発明において、形質転換の対象とする植物材料としては、茎、葉、種子、胚、胚珠、

子房、茎頂等の植物器官、葯、花粉等の植物組織やその切片、未分化のカルス、それを酵素処置して細胞壁を除いたプロプラスト等の植物培養細胞のいずれであってもよい。また in planta 法適用の場合、吸水種子や植物体全体を利用できる。

本発明において、形質転換植物とは、植物体全体、植物器官(例えば葉、花卉、茎、根、穀実、種子等)、植物組織(例えば表皮、師部、柔組織、木部、維管束等)、又は植物培養細胞(例えばカルス)のいずれをも意味するものである。

植物培養細胞を対象とする場合において、得られた形質転換細胞から形質転換体を再生させるためには既知の組織培養法により器官又は個体を再生させればよい。このような操作は、植物細胞から植物体への再生方法として一般的に知られている方法により、当業者であれば容易に行うことができる。植物細胞から植物体への再生については、例えば、以下のように行うことができる。

まず、形質転換の対象とする植物材料として植物組織又はプロトプラストを用いた場合、これらが無機要素、ビタミン、炭素源、エネルギー源としての糖類、植物生長調節物質(オーキシシン、サイトカイニン、ジベレリン、アブシジン酸、エチレン、ブラシノステロイド等の植物ホルモン)等を加えて滅菌したカルス形成用培地中で培養し、不定形に増殖する脱分化したカルスを形成させる(以下「カルス誘導」という)。このように形成されたカルスをオーキシシン等の植物生長調節物質を含む新しい培地に移しかえて更に増殖(継代培養)させる。

カルス誘導は寒天等の固型培地で行い、継代培養は例えば液体培養で行うと、それぞれの培養を効率良くかつ大量に行うことができる。次に、上記の継代培養により増殖したカルスを適当な条件下で培養することにより器官の再分化を誘導し(以下、「再分化誘導」という)、最終的に完全な植物体を再生させる。再分化誘導は、培地におけるオーキシシン等の植物生長調節物質、炭素源等の各種成分の種類や量、光、温度等を適切に設定することにより行うことができる。かかる再分化誘導により、不定胚、不定根、不定芽、不定茎葉等が形成され、更に完全な植物体へと育成させる。あるいは、完全な植物体になる前の状態(例えばカプセル化された人工種子、乾燥胚、凍結乾燥細胞及び組織等)で貯蔵等を行ってもよい。

本発明の形質転換植物は、当該遺伝子を導入した植物体(形質転換された細胞やカルスから再生された植物体を含む)の有性生殖又は無性生殖により得られる子孫の植物体、

及びその子孫植物体の組織や器官等の一部（種子、プロトプラストなど）も包含するものとする。本発明の形質転換植物は、前記目的遺伝子を導入して形質転換した植物体から、種子、プロトプラストなどの繁殖材料を取得し、それを栽培又は培養することによって量産することができる。

上記のようにして得られる形質転換植物は、前記融合ポリヌクレオチドの発現により植物一個体当たりのバイオマスが増量する。本発明においては、「バイオマス」とは、ある時点に任意の空間内に存在する植物体またはその部分の量をいい、当該植物体またはその部分を由来とする物質、食料、資材、燃料、資源などをも含む意味で用いる。具体的には、バイオマスの増量は、地下茎（根茎、球茎、塊茎、鱗茎）・地上茎・花茎・蔓の肥大、種子の肥大、茎丈・草丈、稈丈、穂丈の伸長促進、葉などのソース器官の増大をいう。

また、上記のようにして得られる形質転換植物は、環境ストレス耐性をも有する。「環境ストレス」とは、一般には非生物的ストレスを意味し、例えば乾燥ストレス、低温ストレス、高塩濃度ストレス等をいう。「乾燥」とは水分が欠乏した状態を意味し、「低温」とはそれぞれの生物種の生活至適温度よりも低い温度にさらされた状態（例えばシロイヌナズナの場合 $-20\sim+21^{\circ}\text{C}$ の温度を継続的に1時間～数週間さらすことをいう。また、「高塩濃度」とは、 $50\text{mM}\sim 600\text{mM}$ の濃度のNaClを継続的に0.5時間～数週間処理したときの状態を意味する。これらの環境ストレスは、1種類のものを負荷してもよく、複数種類のものを負荷してもよい。

以下、実施例によって本発明を更に具体的に説明するが、これらの実施例は本発明を限定するものでない。

（実施例1）pBS-35S::PRR9-FLAG、pBS-35S::PRR7-FLAG、pBS-35S::PRR5-FLAGの作成と転写活性化能の検定

pBlueScript (Stratagene社製)にカリフラワーモザイクウイルス由来35S転写プロモーター、FLAGペプチド、Nos転写ターミネーターが組み込まれたベクター（本ベクターを「pBS-35S::FLAG」と呼ぶ）[Biosci Biotechnol Biochem 68(9): 1966 (2004)]を用いて、35S転写プロモーター支配下で、シロイヌナズナのPRR9 (TAIR locus: At2g46790、配列番号9)、PRR7 (TAIR locus: At5g02810、配列番号7)、あるいはPRR5 (TAIR locus:

At5g24479、配列番号 5) と FLAG ペプチド (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys : 配列番号 2 2) をタンデムな形で連結させ、融合タンパク質を発現できるベクター (pBS-35S::PRR9-FLAG、pBS-35S::PRR7-FLAG、pBS-35S::PRR5-FLAG) を以下のようにして構築した。

PRR5 遺伝子は、夜明けより 6 時間後に発現ピークを迎えるため、その時間にシロイヌナズナを凍結サンプリングし、そこから mRNA および cDNA の作成を行った。植物からの RNA の抽出は、RNeasy Plant Minikit (Qiagen 社製) によって行った。逆転写反応による cDNA の合成は、SuperScript II (Invitrogen 社製) を用いて、オリゴ dT20 をプライマーとして行った。その cDNA プールを鋳型にし、プライマー (5' -ACACTCTAGAATGACTAGTAGCGAGGAAGTAG-3' : 配列番号 2 3、5' -GTTGGATCCTCTGGAGCTTGTGTGGATTGG-3' : 配列番号 2 4) によって、PRR5 の cDNA を PCR 反応により増幅した。PCR 反応は Prime Star 酵素を用い、94°C で 2 分間おいた後、94°C、15 秒間、55°C、20 秒間、72°C、2 分間を 1 サイクルとして、35 サイクル行った。増幅した PRR5cDNA 断片は、制限酵素 Xba I (Takara 社製) と BamH I (Takara 社製) で 37°C にて 5 時間処理した。また pBS-35S::FLAG も Xba I と BamH I で同様に処理した。制限酵素処理した PRR5cDNA と pBS-35S::FLAG をライゲーション反応によって連結し、大腸菌 DH5 α (Takara 社製) に形質転換し、形質転換体よりベクター (pBS-35S::PRR5-FLAG) を回収した。

同様に、pBS-35S::PRR7-FLAG、pBS-35S::PRR9-FLAG を作成した。尚、クローニングにもちいた mRNA は、夜明けより 3 時間後のシロイヌナズナであり、PRR7 の cDNA は、プライマー (5' -CTTATCTAGAATGAATGCTAATGAGGAGGG-3' : 配列番号 2 5、5' -GAGTCCATGGTGCTATCCTCAATGTTTTTATGTC-3' : 配列番号 2 6)、PRR9 の cDNA はプライマー (5' -CAAATCTAGAATGGGGGAGATTGTGG-3' : 配列番号 2 7、5' -GAAGTCCATGGTTGATTTGTAGACGCTCTG-3' : 配列番号 2 8) をもちいて PCR 反応によって増幅した。増幅した PRR7cDNA と PRR9cDNA 断片は、制限酵素 Xba I (Takara 社製) と Nco I (Takara 社製) で 37°C にて 5 時間処理した。また pBS-35S::FLAG も Xba I と Nco I で同様に処理した。制限酵素処理した PRR9cDNA あるいは PRR7cDNA と pBS-35S::FLAG をライゲーション反応によって連結し、大腸菌 DH5 α (Takara 社製) に形質転換し、形質転換体よりベクター (pBS-35S::PRR9-FLAG、pBS-35S::PRR7-FLAG) を回収した。

シロイヌナズナでの一過的な発現系を用いて、PRR9、PRR7、PRR5 タンパク質が CCA1 プロモーターをどのように制御するかを観察した。pBS-35S::PRR9-FLAG、pBS-35S::PRR7-FLAG、pBS-35S::PRR5-FLAG ベクター(エフェクターベクター)と、CCA1 プロモーター支配下でLuciferase 遺伝子を発現させるベクター CCA1::LUC (レポーターベクター)、35S プロモーター支配下で Renilla Luciferase を発現させるベクター 35S::RLUC (リファレンスベクター)をそれぞれ 0.8 μ g ずつ混合し、1 μ m 直径の金粒子にコーティングし、Particle Bombardment (GE Healthcare)を用いて、発芽後 2 週間、12 時間明(白色光) 12 時間暗で生育したシロイヌナズナに一過的に導入した。導入後 12 時間以降の特定の時間(明期に入ってから 2 時間後)で、Luciferase 活性と Renilla Luciferase 活性を Yamaguchi らの方法に従って測定し [The Plant Journal, 55: 652 (2008)]、Luciferase 活性/Renilla Luciferase 活性 (Control 実験値を 1 とする)を CCA1 プロモーター活性として評価した。その結果、PRR9-FLAG、PRR7-FLAG、PRR5-FLAG タンパク質の導入は、FLAG タンパク質の導入時 (Control)よりも CCA1 プロモーターを抑制化することが分かった (図 2)。なお、植物体内で PRR9、PRR7、PRR5 タンパク質は CCA1 プロモーターに物理的に相互作用しているため (The Plant Cell vol. 22, 594-605, 2010)、PRR9、PRR7、PRR5 タンパク質は CCA1 プロモーターに対して転写抑制化因子として機能していると考えられる。

(実施例 2) PRR5-VP32、PRR9-VP32、PRR7-VP32、PRR3-VP32、および PRR1-VP32 の作成と転写活性化能の検定

pBlueScript (Stratagene 社製)にカリフラワーモザイクウイルス由来 35S 転写プロモーターと Nos 転写ターミネーターが組み込まれたベクター (本ベクターを「pBS-35S」と呼ぶ) [Biosci Biotechnol Biochem 68(9): 1966 (2004)]を用いて、35S 転写プロモーター支配下で、シロイヌナズナの PRR5 (TAIR locus: At5g24479、配列番号 5)とヘルペスウイルス由来の転写因子の転写活性化ドメイン VP16 (GeneBank: ACM62271 のアミノ酸配列の 413 位から 490 位までのアミノ酸配列によりコードされる塩基配列 (配列番号 11)) をタンデムな形で連結させ、融合タンパク質を発現できるベクター (pBS-35S::PRR5-VP32)を以下のようにして構築した。

VP16 の cDNA は、pVP16 (Clontech 社製)を鋳型にし、プライマー A

(5' -GTTTACCATGGTGAAAGTCGCCCCCCCCG-3' : 配列番号 29 と 5' -CTTTAAGCTTCGGGAATTCCCCACCGTACTCGTC-3' : 配列番号 30)あるいはプライマー B (5' -CTTTAAGCTTAAAGTCGCCCCCCCCG-3' : 配列番号 31 と 5' -CGAGAAAGCGGCCGCTTACGGGAATTCCCCACCGTACTCGTC-3' : 配列番号 32)によって PCR 反応により増幅した。前者の VP16 の cDNA を便宜的に VP16-1、後者を VP16-2 と呼ぶ。反応は Prime Star 酵素 (Takara 社製)を用い、94°C で 2 分間おいた後、94°C、15 秒間、55°C、20 秒間、72°C、30 秒間を 1 サイクルとして、35 サイクル行った。増幅した VP16-1 を制限酵素 Nco I (Takara 社製)と Hind III (Takara 社製)で、VP16-2 を Hind III と Not I (Takara 社製)で 37°C にて 5 時間処理した。また pBS-35S を Nco I と Not I で 37°C にて 5 時間処理した。制限酵素処理した VP16-1、VP16-2、pBS-35S をライゲーション反応で連結させた。ライゲーション反応は、Ligation High ver2 (Takara 社製)を用い、条件は添付書類に従った。ライゲーションした DNA 溶液を大腸菌 DH5 α にヒートショック法によって形質転換した。形質転換された DH5 α の選抜は、アンピシリン (50 μ g/mL) を含む Luria-Bertani 寒天培地で行った。得られた形質転換体をアンピシリン (50 μ g/mL) を含む Luria-Bertani 液体培地で培養した後、それよりベクター (本ベクターを「pBS-35S::VP32」とする) を回収した。

PRR5 遺伝子は、夜明けより 6 時間後に発現ピークを迎えるため、その時間にシロイヌナズナを凍結サンプリングし、そこから mRNA および cDNA の作成を行った。植物から RNA の抽出は、RNeasy Plant Minikit (Qiagen 社製)によって行った。逆転写反応による cDNA の合成は、SuperScript II (Invitrogen 社製)を用いて、オリゴ dT20 をプライマーとして行った。その cDNA プールを鋳型にし、プライマー (5' -ACACTCTAGAATGACTAGTAGCGAGGAAGTAG-3' : 配列番号 23 、 5' -GTTGGATCCTCTGGAGCTTGTGTGGATTGG-3' : 配列番号 24)によって、PRR5 の cDNA を PCR 反応により増幅した。PCR 反応は Prime Star 酵素を用い、94°C で 2 分間おいた後、94°C、15 秒間、55°C、20 秒間、72°C、2 分間を 1 サイクルとして、35 サイクル行った。増幅した PRR5cDNA 断片は、制限酵素 Xba I (Takara 社製)と BamH I (Takara 社製)で 37°C にて 5 時間処理した。また pBS-35S::VP32 も Xba I と BamH I で同様に処理した。制限酵素処理した PRR5cDNA と pBS-35S::VP32 をライゲーション反応によって連結し、大腸菌 DH5 α (Takara 社製)に形質転換し、形質転換体よりベクター (pBS-35S::PRR5-VP32、

図 3)を回収した。

次に、シロイヌナズナでの一過的な発現系を用いて、PRR5-VP32 タンパク質が CCA1 プロモーターをどのように制御するかを観察した。pBS-35S::PRR5-VP32 ベクター(エフェクターベクター)と、CCA1 プロモーター支配下で Luciferase 遺伝子を発現させるベクター CCA1min-35S::LUC [レポーターベクター: CCA1 プロモーターの -406nt から -299nt(0nt は 翻訳 開 始 点) ま で を プ ラ イ マ ー 5' -ACGCCAAGCTAAGCTTCTAGTATGTTGACATATGGC-3' (配列番号 35)、5' -GAAGGGTCTTGCATATCGCTACGGAAATGGAGAAATC-3' (配列番号 36)を用いて増幅して CCA1min を得、CCA1min を Infusion 反応 (Takara 社製)によって、CaMV35S プロモーター最小領域の上流 Hind III と EcoR V 制限酵素サイトにクローニングすることによって作製]、35S プロモーター支配下で Renilla Luciferase を発現させるベクター 35S::RLUC (リファレンスベクター)をそれぞれ 0.8μg ずつ混合し、1μM 直径の金粒子にコーティングし、Particle Bombardment (GE Healthcare)を用いて、発芽後 2 週間、12 時間明(白色光): 12 時間暗で生育したシロイヌナズナに一過的に導入した。導入後 12 時間以降の特定の時間(明期に入ってから 2 時間後)で、Luciferase 活性と Renilla Luciferase 活性を Yamaguchi らの方法に従って測定し [The Plant Journal, 55: 652 (2008)]、Luciferase 活性/Renilla Luciferase 活性を CCA1 プロモーター活性として評価した。その結果、PRR5-VP32 タンパク質の導入は、VP32 タンパク質の導入時よりも効果的に CCA1 プロモーターを活性化することが分かった (図 4)。なお、植物体内で PRR5 タンパク質は CCA1 プロモーターに物理的に相互作用しているため(The Plant Cell vol. 22, 594-605, 2010)、PRR5-VP32 タンパク質は CCA1 プロモーターに対して転写活性化因子として機能していると考えられる。

PRR5 遺伝子の相同遺伝子は、シロイヌナズナにおいて 4 種類存在する (PRR9, PRR7, PRR3, TOC1)。そこで、これらの遺伝子のコードするタンパク質に VP32 を融合させたもの (PRR-VP32) も PRR5-VP32 と同様に CCA1 プロモーターを活性化できるかどうかを実験した。

PRR9 はプライマー (5' -CACCATGGGGGAGATTGTGGTTTTAAG-3' : 配列番号 37、5' -TGATTTTGTAGACGCGTCTG-3' : 配列番号 38)を用いて PCR 反応で増幅し、pENTR-DTOPO ベクター (Invitrogen 社製)に TOPO クローニングした (ベクター名: pENTR-DTOPO-PRR9)。

PRR7 はプライマー (5' -CACCATGAATGCTAATGAGGAGGG-3' : 配列番号 39、5' -GCTATCCTCAATGTTTTTATGTC-3' : 配列番号 40) を用いて PCR 反応で増幅し、pENTR-DTOPO にクローニングした (ベクター名: pENTR-DTOPO-PRR7)。

PRR3 はプライマー (5' -CACCATGTGTTTAAATAACATTGAACTGGTGATG-3' : 配列番号 41、5' -ATTGTCTTCACTTCCTGATTATGATC-3' : 配列番号 42) を用いて、PCR 反応で増幅し、pENTR-DTOPO にクローニングした (ベクター名: pENTR-DTOPO-PRR3)。

TOC1 はプライマー (5' - CACCATGGATTGTAACGGTGAGTG-3' : 配列番号 43、5' - AGTTCCCAAAGCATCATCC-3' : 配列番号 44) を用いて PCR 増幅し、pENTR-DTOPO にクローニングした (ベクター名: pENTR-DTOPO-TOC1)。

一方、pBS-35S::PRR5-VP32 を Xba I / Bam HI で消化し、PRR5 配列をゲル泳動法によって除いたのち、ベクター部分 (pBS-35S::VP32) を T4 ポリメラーゼ (Takara 社製) によって平滑化した。その平滑末端に Gateway Vector Conversion System を用いて Reading Frame Cassette B DNA 断片をライゲーション反応によって導入した (pBS-35S::VP32-GW)。LR 反応キット (Invitrogen 社製) を用いて、上記で作成した各 pENTR-DTOPO-PRR から各 PRR 遺伝子配列を、pBS-35S::VP32-GW にクローニングした (pBS-35S::PRR-VP32)。これらをエフェクターベクターとし、シロイヌナズナの一過的発現系を用いて CCA1 プロモーター活性を検定した。その結果、PRR9-VP32、PRR7-VP32、TOC1-VP32 は一過的な過剰発現は CCA1 プロモーターを活性化できた (図 4)。

(実施例 3) PRR5-VP32 発現シロイヌナズナの取得

上記の pBS-35S::PRR5-VP32 ベクター DNA を、Xba I と Not I で 37°C にて 5 時間処理し、アガロースゲル内で電気泳動した。ゲル内の PRR5-VP32 断片は、EtBr 染色により、UV 光下で可視化し、その断片を含むゲルをカミソリで切り出した。ゲルから DNA を NucleoSpin (Macherey-Nagel 社製) を用いて精製した。その PRR5-VP32 断片をバイナリーベクター pSK1 [DNA Res. 6: 407, (1999)] の Xba I と Not I 制限酵素サイトにクローニングし、得られたベクター (pSK1-35S::PRR5-VP32) をアグロバクテリウム・チュメファシエンス EHA105 にヒートショック法で形質転換した。形質転換体の選抜は、リファンピシリン (25 µg/mL) とカナマイシン (25 µg/mL) を含む Luria-Bertani 寒天培地で行った。得られた形質転換 EHA105 をリファンピシリン (25 µg/mL) とカナマイシン (25 µg/mL) を含む Luria-Bertani

液体培地で30℃、24時間培養し、シロイヌナズナに感染させた。感染はバキュームインフイルトレーション法 [CR Acad. Sci. Paris, Life Science, 316 :1194 (1993)] を採用した。バーミュキュライトと培養土を1:1で混合した土壌で、シロイヌナズナを生育させ、その花芽分裂組織を中心にpSK1-35S::PRR5-VP32を保持するEHA105培養液を直接浸し、デシケーターに入れ、バキュームポンプで60～70mmHgになるまで吸引後、10分間、室温に放置した。鉢をトレーに移しラップで覆い湿度を保った。翌日ラップを取り、植物をそのまま生育させ種子を収穫した。その種子をハイグロマイシン 25 µg/mLを含むMurashige-Skoog寒天培地に蒔種し、生育可能な個体を形質転換植物として取得した。取得した植物のうち、PRR5-VP32のmRNAの発現が過剰に認められる植物を選抜した。

mRNAの定量は、以下の方法で行った。植物からRNAの抽出は、RNeasy Plant Minikitによって行った。逆転写反応によるcDNAの合成は、SuperScript IIによって行った。定量的PCRは、SYBR Green Extaq II (Takara社製)を反応mixtureとし、プライマー(5' -CTTCATCCTTCTAGTGCC-3' : 配列番号 3 3 と5' - GTCGTTTCTTCTTGGAGC-3' : 配列番号 3 4)を用いて行い、PCR産物の検出と定量は、ABI PRISM 7000 sequence detection system (ABI社製)を用いた。選抜したPRR5-VP32発現組み換え体を、自家受粉させ、組み換えDNA部位をホモに持つ植物をさらに選抜した。選抜は、ハイグロマイシン 25 µg/mLを含むMurashige-Skoog寒天培地で生育する植物を指標として行った。

(実施例4) PRR5-VP32 発現シロイヌナズナのバイオマス

35S::PRR5-VP32 が相同染色体にホモで形質転換されたシロイヌナズナ、*prp9 prp7 prp5* 三重変異体、および野生株を 16 時間明／8 時間暗条件下、1/2 希釈した MGRL 水耕液 [Plant Physiol., 99: 263, (1992)]を用いて、ロックウール上で生育させた。35S::PRR5-VP32 発現体の花芽形成時期は、野生株より若干遅れ、花芽が形成時の葉の枚数は増加していたが、*prp9 prp7 prp5* 三重変異体ほどではなかった(図5)。花芽形成時期の大幅な遅延が起こらないことは、植物の成熟の遅延が起こらないことを意味し、バイオマテリアルの獲得にとっては有益な形質であるといえる。

また、35S::PRR5-VP32 が相同染色体にホモで形質転換されたシロイヌナズナと、野生株を 16 時間明／8 時間暗条件下、1/2 希釈した MGRL 水耕液 [Plant Physiol., 99: 263, (1992)]を用いて、ロックウール上で生育させ、花茎の高さが8cmになった時点(生育ス

テージが同じ) でこれらの植物体の写真を撮影した。一個体あたりの葉の合計面積を、Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) を用いて測定したところ、35S::PRR5-VP32 発現植物体は野生株に比べて葉面積が約 2 倍大きかった(図 6)。また、発芽後 38 日の時点(生育日数が同じ) で一個体あたりの葉の合計面積を、Image J を用いて測定したところ、PRR5-VP32 発現植物体の葉の面積は、野生型のそれに比べて 1.7~1.8 倍増加していた(図 7)。さらに花茎が 20cm ほどになった時点で、地上にもっとも近い腋芽から二番目の腋芽の間をカミソリで切断し、染色液 (0.5% アルシアンブルー、1.0% サフラニン) に 5 分間浸し、水で脱色した後、断面を顕微鏡下で観察した (図 8)。花茎の断面積を、Image J を用いて測定したところ、PRR5-VP32 発現植物体の花茎の断面積は、野生型のそれに比べて 4 倍以上に増えていた。その原因として、花茎をつくる細胞数の増大、さらには花茎そのものをつくる茎頂分裂組織の増大が示唆される。なお、これらの表現型は、独立した形質転換体 (組み替え DNA 部位が染色体上で異なる系統) で同様に観察された。

(実施例 5) PRR5-VP32 発現シロイヌナズナの環境ストレス耐性

(1) PRR5-VP32 発現体の塩ストレス耐性

35S::PRR5-VP32 が相同染色体にホモで形質転換されたシロイヌナズナと、野生株を 16 時間明/8 時間暗条件下、MS 培地で 6 日間生育させた後、塩ストレス培地に移した。用いた培地は、通常 MS 培地あるいは 0.2M NaCl を含んだ MS 培地である。移植後 5 日目でそれらの植物体の写真を撮影した。野生株の葉は白化していたが、35S::PRR5-VP32 は未だ緑のままであった。つまり、35S::PRR5-VP32 は野生株と比較してより強い塩耐性能を持つことがわかった(図 9)。

(2) PRR5-VP32 発現体の乾燥ストレス耐性

35S::PRR5-VP32 が相同染色体にホモで形質転換されたシロイヌナズナと、野生株を 16 時間明/8 時間暗条件下、パーミュキュライトと培養土を 1:1 で混合した土壌で 38 日間生育させた。その植物体の本葉を切り取り、25°C の室内に 14 時間放置した後、それらの植物体の写真を撮影した。35S::PRR5-VP32 の切除葉は野生株のそれと比べて、水分を多く含んだ状態であった(図 10)。

(3) PRR5-VP32 発現体の低温ストレス耐性

35S::PRR5-VP32 が相同染色体にホモで形質転換されたシロイヌナズナと、野生株を 16

時間明／8時間暗条件下、パーミュキュライトと培養土を1:1で混合した土壌で26日間生育させ、-5℃に設定した恒温恒湿器(SANYO, Atmos Chamber)に24時間入れた後、再度通常生育条件に戻した。その5日後に植物体の写真を撮影した。35S::PRR5-VP32は、野生株に比べて低温ストレスにも耐性になっていた(図11)。

(実施例6) PRR5 発現イネの取得

実施例1で作成した pBS-35S::PRR5-FLAG を鋳型とし、プライマー(5'-AGAAGTCGACTCTAGATGACTAGTAGCGAGGAAG-3' : 配列番号 45) と (5'-TCGAGCTCGGTACCCTTACTTGTGTCGTCATCGTCTTG-3' : 配列番号 46)、Prime Star 酵素を用い、PCR 反応によって、PRR5-FLAG 配列を増幅し、Infusion 反応(Takara 社製)で、pACT ベクター(Hirose et al., Plant Cell Physiol., vol. 48, 523-539, 2007)の Xba I と Sma I 制限酵素サイトの間に入れた(pACT::PRR5-FLAG)。

pACT::PRR5-FLAG ベクターをアグロバクテリウム EHA105 に形質転換した。形質転換されたアグロバクテリウムをアグロバクテリウム法により、イネのカルスに感染させた。初を取り除いた完熟種子 100~120 粒を、次亜塩素酸ナトリウムを含む滅菌用溶液に浸して 30 分ゆっくり攪拌し、滅菌した。滅菌水で十分に洗浄した種子を無菌的にカルス誘導培地(N6D 培地:Hirose et al., Plant Cell Physiol., vol. 48, 523-539, 2007)に 10 種子/シャーレで置床し、28℃, 12.5 時間明/24℃, 11.5 時間暗で培養した。3 週間後、種子の胚乳とシュート部分を除去し、胚盤由来カルスのみを新たなカルス誘導培地(N6D 培地)へ移し、3 日間培養した。同日に、形質転換されたアグロバクテリウムをカナマイシン 50µg/ml を含む AB 培地(Hirose et al., Plant Cell Physiol., vol. 48, 523-539, 2007)に塗布し、28℃、遮光下で培養した。3 日後、AB 培地上で増殖したアグロバクテリウムをかき取り、アセトシリンゴン 20µg/ml を含む共存培地(AAM 液:Hirose et al., Plant Cell Physiol., vol. 48, 523-539, 2007)に懸濁し、OD600=0.15~0.2 に調整した。3 日間前培養したカルスをこのアグロバクテリウム懸濁液に浸して、1.5 分間転倒攪拌した。余分なアグロバクテリウム懸濁液を除いた後、アセトシリンゴン 20µg/ml を含む共存培養培地(2N6-AS 培地:Hirose et al., Plant Cell Physiol., vol. 48, 523-539, 2007)上に 10 カルス/シャーレで置床した。28℃、遮光下で培養し、アグロバクテリウムとカルスを共存培養した。3 日後、増殖したアグロバクテリウムを除去するために、カ

ルスを 50ml チューブ 2 本に集め、滅菌水を注ぎ、ローテーターで攪拌 (5 分間) を 3 回、カルベニシリン 500 μ g/ml を含む滅菌水で攪拌 (5 分間) を 3 回行った。これをカルベニシリン 500 μ g/ml、ハイグロマイシン 50 μ g/ml を含む選抜培地 (N6D 培地) へ 10 カルス/シャーレで置床し、28 $^{\circ}$ C、3 週間培養した。その後、全てのカルスをカルベニシリン 250 μ g/ml、ハイグロマイシン 50 μ g/ml を含む再分化培地に移し、再分化してくるまで 3 週間毎に培地を更新した。再分化培地へ移してから約 1 ヶ月半後、2cm 前後に再分化したシュートが得られた。これをカルベニシリン 200 μ g/ml、ハイグロマイシン 50 μ g/ml を含むホルモンフリー培地を注ぎ固めたアグリポットに移して発根を促し、約 12cm 前後まで生育させた。

このシュートの細胞の核ゲノムには、ACT-PRR5-FLAG が導入されており、実際に PRR5-FLAG タンパクが発現していることをウェスタンブロッティングで確認した。同様に pACT ベクターがゲノムに導入されたシュートを得た。

(実施例 7) PRR5 発現イネのバイオマス

pACT-PRR5-FLAG または pACT が導入されたシュートを、同時期に土 (赤玉土、緩行性肥料でまいらず 1g/1 個体) に植え替え、その後短日条件下 (12 月から 3 月)、30 $^{\circ}$ C、12 時間明/25 $^{\circ}$ C、12 時間暗の温室で生育させた。光は日光と電灯の混合とした。pACT-PRR5-FLAG が導入されたイネは、pACT が導入されたイネよりも茎の数が多く、背丈が高い形質を示した (図 1 2)。つまりバイオマスが増大していた。なおこの表現型は、独立した形質転換体 (組み替え DNA 部位が染色体上で異なる系統) で同様に観察された。

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

産業上の利用可能性

本発明によれば、バイオマスが増大し、かつ環境ストレス耐性が向上した形質転換植物が得られる。植物のバイオマスの増大は、バイオ燃料の増産につながり、また、環境ストレス耐性の付与は、過酷な環境下 (乾燥、低温、高塩など) での植物の生育を可能にさせる。また、本発明の形質転換体は、PRR 遺伝子群の多重変異体の煩雑な作成工程を

行なうことなく、簡便かつ容易に作出できる。

請 求 の 範 囲

1. 植物の疑似レスポンスレギュレータ (Pseudo-Response-Regulator) 遺伝子の共通モチーフである擬似レシーバードメイン (Pseudo-Receiver domain) および CCT モチーフ (CCT-motif) を含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドと、少なくとも1種の転写因子の転写活性化ドメインをコードするポリヌクレオチドとの融合ポリヌクレオチド、または該融合ポリヌクレオチドを含む組み換えベクターを導入したことを特徴とする、形質転換植物。

2. 植物の疑似レスポンスレギュレータ (Pseudo-Response-Regulator) 遺伝子の共通モチーフである擬似レシーバードメイン (Pseudo-Receiver domain) および CCT モチーフ (CCT-motif) を含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドが、以下の(a)～(c)のいずれかのポリヌクレオチドである、請求項1に記載の形質転換植物。

(a) 配列番号1、3、5、7、又は9に示す塩基配列からなるポリヌクレオチド

(b) 配列番号1、3、5、7、又は9に示す塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY (late elongated hypocotyl) 遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

(c) 配列番号1、3、5、7、又は9に示す塩基配列に対して 70%以上の相同性を有する塩基配列からなり、かつ CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY (late elongated hypocotyl) 遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

3. 植物の疑似レスポンスレギュレータ (Pseudo-Response-Regulator) 遺伝子の共通モチーフである擬似レシーバードメイン (Pseudo-Receiver domain) および CCT モチーフ (CCT-motif) を含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドが、以下の(d)～(f)のいずれかのタンパク質をコードするポリヌクレオチドである、請求項1に記載の形質転換植物。

(d) 配列番号2、4、6、8、又は10に示すアミノ酸配列からなるタンパク質

(e) 配列番号2、4、6、8、又は10に示すアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ CCA1

(circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY(late elongated hypocotyl)遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質

(f) 配列番号 2、4、6、8、又は 10 に示すアミノ酸配列に対して 70%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY(late elongated hypocotyl)遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質

4. 転写因子の転写活性化ドメインをコードするポリヌクレオチドが、以下の(g)~(i)のいずれかのポリヌクレオチドである、請求項 1~3 のいずれかに記載の形質転換植物。

(g) 配列番号 11 に示す塩基配列からなるポリヌクレオチド

(h) 配列番号 11 に示す塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ PRR ポリヌクレオチドに融合させることにより CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY(late elongated hypocotyl)遺伝子の転写抑制解除活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

(i) 配列番号 11 に示す塩基配列に対して 70%以上の相同性を有する塩基配列からなり、かつ PRR ポリヌクレオチドに融合させることにより CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY(late elongated hypocotyl)遺伝子の転写抑制解除活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

5. 植物が長日性植物である、請求項 1~4 のいずれかに記載の形質転換植物。

6. 植物の疑似レスポンスレギュレータ (Pseudo-Response-Regulator) 遺伝子の共通モチーフである疑似レシーバードメイン (Pseudo-Receiver domain) および CCT モチーフ (CCT-motif) を含むタンパク質をコードするポリヌクレオチド、または該ポリヌクレオチドを含む組み換えベクターを導入したことを特徴とする、形質転換植物。

7. 植物の疑似レスポンスレギュレータ (Pseudo-Response-Regulator) 遺伝子の共通モチーフである疑似レシーバードメイン (Pseudo-Receiver domain) および CCT モチーフ (CCT-motif) を含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドが、以下の(a)~(c)のいずれかのポリヌクレオチドである、請求項 6 に記載の形質転換植物。

(a) 配列番号 1、3、5、7、又は 9 に示す塩基配列からなるポリヌクレオチド

(b) 配列番号 1、3、5、7、又は 9 に示す塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ CCA1 (circadian

clock-associated 1) 遺伝子または LHY(late elongated hypocotyl)遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

(c) 配列番号 1、3、5、7、又は 9 に示す塩基配列に対して 70%以上の相同性を有する塩基配列からなり、かつ CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY(late elongated hypocotyl)遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

8. 植物の疑似レスポンスレギュレータ (Pseudo-Response-Regulator) 遺伝子の共通モチーフである疑似レシーバードメイン (Pseudo-Receiver domain) および CCT モチーフ (CCT-motif) を含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドが、以下の (d) ~ (f) のいずれかのタンパク質をコードするポリヌクレオチドである、請求項 6 に記載の形質転換植物。

(d) 配列番号 2、4、6、8、又は 10 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質

(e) 配列番号 2、4、6、8、又は 10 に示すアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY(late elongated hypocotyl)遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質

(f) 配列番号 2、4、6、8、又は 10 に示すアミノ酸配列に対して 70%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY(late elongated hypocotyl)遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質

9. 植物が短日性植物である、請求項 6 ~ 8 のいずれかに記載の形質転換植物。

10. バイオマスが増量した、請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の形質転換植物。

11. 環境ストレス耐性が付与された、請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の形質転換植物。

12. 環境ストレスが、乾燥ストレス、低温ストレス、及び塩ストレスから成る群から選択される少なくとも 1 種以上である、請求項 11 に記載の形質転換植物。

13. 植物の疑似レスポンスレギュレータ (Pseudo-Response-Regulator) 遺伝子の共通モチーフである疑似レシーバードメイン (Pseudo-Receiver domain) および CCT モチーフ (CCT-motif) を含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドと、少なくとも 1 種の転写因子の転写活性化ドメインをコードするポリヌクレオチドとの融合ポリヌクレオ

チド、または該融合ポリヌクレオチドを含む組み換えベクターを植物細胞に導入し、該植物細胞から植物体を再生することを特徴とする、形質転換植物の作出方法。

14. 植物の疑似レスポンスレギュレータ (Pseudo-Response-Regulator) 遺伝子の共通モチーフである疑似レシーバードメイン (Pseudo-Receiver domain) および CCT モチーフ (CCT-motif) を含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドが、以下の(a)~(c)のいずれかのポリヌクレオチドである、請求項13に記載の方法。

(a) 配列番号1、3、5、7、又は9に示す塩基配列からなるポリヌクレオチド

(b) 配列番号1、3、5、7、又は9に示す塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY (late elongated hypocotyl) 遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

(c) 配列番号1、3、5、7、又は9に示す塩基配列に対して 70%以上の相同性を有する塩基配列からなり、かつ CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY (late elongated hypocotyl) 遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

15. 植物の疑似レスポンスレギュレータ (Pseudo-Response-Regulator) 遺伝子の共通モチーフである疑似レシーバードメイン (Pseudo-Receiver domain) および CCT モチーフ (CCT-motif) を含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドが、以下の(d)~(f)のいずれかのタンパク質をコードするポリヌクレオチドである、請求項13に記載の方法。

(d) 配列番号2、4、6、8、又は10に示すアミノ酸配列からなるタンパク質

(e) 配列番号2、4、6、8、又は10に示すアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY (late elongated hypocotyl) 遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質

(f) 配列番号2、4、6、8、又は10に示すアミノ酸配列に対して 70%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY (late elongated hypocotyl) 遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質

16. 転写因子の転写活性化ドメインをコードするポリヌクレオチドが、以下の(g)

～(i)のいずれかのポリヌクレオチドである、請求項13～15のいずれかに記載の方法。

(g) 配列番号11に示す塩基配列からなるポリヌクレオチド

(h) 配列番号11に示す塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつPRRポリヌクレオチドに融合させることによりCCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子またはLHY(late elongated hypocotyl)遺伝子の転写抑制解除活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

(i) 配列番号11に示す塩基配列に対して70%以上の相同性を有する塩基配列からなり、かつPRRポリヌクレオチドに融合させることによりCCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子またはLHY(late elongated hypocotyl)遺伝子の転写抑制解除活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

17. 植物が長日性植物である、請求項13～16のいずれかに記載の方法。

18. 植物の疑似レスポンスレギュレータ (Pseudo-Response-Regulator) 遺伝子の共通モチーフである擬似レシーバードメイン (Pseudo-Receiver domain) およびCCTモチーフ (CCT-motif) を含むタンパク質をコードするポリヌクレオチド、または該ポリヌクレオチドを含む組み換えベクターを植物細胞に導入し、該植物細胞から植物体を再生することを特徴とする、形質転換植物の作出方法。

19. 植物の疑似レスポンスレギュレータ (Pseudo-Response-Regulator) 遺伝子の共通モチーフである擬似レシーバードメイン (Pseudo-Receiver domain) およびCCTモチーフ (CCT-motif) を含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドが、以下の(a)～(c)のいずれかのポリヌクレオチドである、請求項18に記載の方法。

(a) 配列番号1、3、5、7、又は9に示す塩基配列からなるポリヌクレオチド

(b) 配列番号1、3、5、7、又は9に示す塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつCCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子またはLHY(late elongated hypocotyl)遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

(c) 配列番号1、3、5、7、又は9に示す塩基配列に対して70%以上の相同性を有する塩基配列からなり、かつCCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子またはLHY(late elongated hypocotyl)遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質をコードする

ポリヌクレオチド

20. 植物の疑似レスポンスレギュレータ (Pseudo-Response-Regulator) 遺伝子の共通モチーフである擬似レシーバードメイン (Pseudo-Receiver domain) および CCT モチーフ (CCT-motif) を含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドが、以下の(d)～(f)のいずれかのタンパク質をコードするポリヌクレオチドである、請求項18に記載の方法。

(d) 配列番号2、4、6、8、又は10に示すアミノ酸配列からなるタンパク質

(e) 配列番号2、4、6、8、又は10に示すアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY(late elongated hypocotyl)遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質

(f) 配列番号2、4、6、8、又は10に示すアミノ酸配列に対して 70%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY(late elongated hypocotyl)遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質

21. 植物が短日性植物である、請求項18～20のいずれかに記載の方法。

22. 形質転換植物が、バイオマスが増量した形質転換植物である、請求項13～21のいずれかに記載の方法。

23. 形質転換植物が、環境ストレス耐性を有する形質転換植物である、請求項13～21のいずれかに記載の方法。

24. 環境ストレスが、乾燥ストレス、低温ストレス、及び塩ストレスから成る群から選択される少なくとも1種以上である、請求項23に記載の方法。

25. 植物の疑似レスポンスレギュレータ (Pseudo-Response-Regulator) 遺伝子の共通モチーフである擬似レシーバードメイン (Pseudo-Receiver domain) および CCT モチーフ (CCT-motif) を含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドと、少なくとも1種の転写因子の転写活性化ドメインをコードするポリヌクレオチドとの融合ポリヌクレオチドを植物内で過剰発現させることを特徴とする、植物のバイオマスを増大させる方法。

26. 植物の疑似レスポンスレギュレータ (Pseudo-Response-Regulator) 遺伝子の共通モチーフである擬似レシーバードメイン (Pseudo-Receiver domain) および CCT モチーフ (CCT-motif) を含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドが、以下の(a)～(c)

のいずれかのポリヌクレオチドである、請求項 25 に記載の方法。

(a) 配列番号 1、3、5、7、又は 9 に示す塩基配列からなるポリヌクレオチド

(b) 配列番号 1、3、5、7、又は 9 に示す塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY (late elongated hypocotyl) 遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

(c) 配列番号 1、3、5、7、又は 9 に示す塩基配列に対して 70% 以上の相同性を有する塩基配列からなり、かつ CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY (late elongated hypocotyl) 遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

27. 植物の疑似レスポンスレギュレータ (Pseudo-Response-Regulator) 遺伝子の共通モチーフである擬似レシーバードメイン (Pseudo-Receiver domain) および CCT モチーフ (CCT-motif) を含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドが、以下の (d) ~ (f) のいずれかのタンパク質をコードするポリヌクレオチドである、請求項 25 に記載の方法。

(d) 配列番号 2、4、6、8、又は 10 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質

(e) 配列番号 2、4、6、8、又は 10 に示すアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY (late elongated hypocotyl) 遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質

(f) 配列番号 2、4、6、8、又は 10 に示すアミノ酸配列に対して 70% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY (late elongated hypocotyl) 遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質

28. 転写因子の転写活性化ドメインをコードするポリヌクレオチドが、以下の (g) ~ (i) のいずれかのポリヌクレオチドである、請求項 25 ~ 27 のいずれかに記載の方法。

(g) 配列番号 11 に示す塩基配列からなるポリヌクレオチド

(h) 配列番号 11 に示す塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ PRR ポリヌクレオチドに融合させることにより CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY (late elongated

hypocotyl)遺伝子の転写抑制解除活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

(i) 配列番号 11 に示す塩基配列に対して 70%以上の相同性を有する塩基配列からなり、かつ PRR ポリヌクレオチドに融合させることにより CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY(late elongated hypocotyl)遺伝子の転写抑制解除活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

29. 植物が長日性植物である、請求項 25～28 のいずれかに記載の方法。

30. 植物の疑似レスポンスレギュレータ (Pseudo-Response-Regulator) 遺伝子の共通モチーフである疑似レシーバードメイン (Pseudo-Receiver domain) および CCT モチーフ (CCT-motif) を含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドを植物内で過剰発現させることを特徴とする、植物のバイオマスを増大させる方法。

31. 植物の疑似レスポンスレギュレータ (Pseudo-Response-Regulator) 遺伝子の共通モチーフである疑似レシーバードメイン (Pseudo-Receiver domain) および CCT モチーフ (CCT-motif) を含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドが、以下の(a)～(c)のいずれかのポリヌクレオチドである、請求項 30 に記載の方法。

(a) 配列番号 1、3、5、7、又は 9 に示す塩基配列からなるポリヌクレオチド

(b) 配列番号 1、3、5、7、又は 9 に示す塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY(late elongated hypocotyl)遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

(c) 配列番号 1、3、5、7、又は 9 に示す塩基配列に対して 70%以上の相同性を有する塩基配列からなり、かつ CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY(late elongated hypocotyl)遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

32. 植物の疑似レスポンスレギュレータ (Pseudo-Response-Regulator) 遺伝子の共通モチーフである疑似レシーバードメイン (Pseudo-Receiver domain) および CCT モチーフ (CCT-motif) を含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドが、以下の(d)～(f)のいずれかのタンパク質をコードするポリヌクレオチドである、請求項 30 に記載の方法。

(d) 配列番号 2、4、6、8、又は 10 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質

(e) 配列番号 2、4、6、8、又は 10 に示すアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY(late elongated hypocotyl)遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質

(f) 配列番号 2、4、6、8、又は 10 に示すアミノ酸配列に対して 70%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY(late elongated hypocotyl)遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質

33. 植物が短日性植物である、請求項 30～32 のいずれかに記載の方法。

34. 植物の疑似レスポンスレギュレータ (Pseudo-Response-Regulator) 遺伝子の共通モチーフである擬似レシーバードメイン (Pseudo-Receiver domain) および CCT モチーフ (CCT-motif) を含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドと、少なくとも 1 種の転写因子の転写活性化ドメインをコードするポリヌクレオチドとの融合ポリヌクレオチドを植物内で過剰発現させることを特徴とする、植物に環境ストレス耐性を付与する方法。

35. 植物の疑似レスポンスレギュレータ (Pseudo-Response-Regulator) 遺伝子の共通モチーフである擬似レシーバードメイン (Pseudo-Receiver domain) および CCT モチーフ (CCT-motif) を含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドが、以下の (a)～(c) のいずれかのポリヌクレオチドである、請求項 34 に記載の方法。

(a) 配列番号 1、3、5、7、又は 9 に示す塩基配列からなるポリヌクレオチド

(b) 配列番号 1、3、5、7、又は 9 に示す塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY(late elongated hypocotyl)遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

(c) 配列番号 1、3、5、7、又は 9 に示す塩基配列に対して 70%以上の相同性を有する塩基配列からなり、かつ CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY(late elongated hypocotyl)遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

36. 植物の疑似レスポンスレギュレータ (Pseudo-Response-Regulator) 遺伝子の共

通モチーフである擬似レシーバードメイン (Pseudo-Receiver domain) および CCT モチーフ (CCT-motif) を含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドが、以下の (d) ~ (f) のいずれかのタンパク質をコードするポリヌクレオチドである、請求項 34 に記載の方法。

(d) 配列番号 2、4、6、8、又は 10 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質

(e) 配列番号 2、4、6、8、又は 10 に示すアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY (late elongated hypocotyl) 遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質

(f) 配列番号 2、4、6、8、又は 10 に示すアミノ酸配列に対して 70% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY (late elongated hypocotyl) 遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質

37. 転写因子の転写活性化ドメインをコードするポリヌクレオチドが、以下の (g) ~ (i) のいずれかのポリヌクレオチドである、請求項 34 ~ 36 のいずれかに記載の方法。

(g) 配列番号 11 に示す塩基配列からなるからなるポリヌクレオチド

(h) 配列番号 11 に示す塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ PRR ポリヌクレオチドに融合させることにより CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY (late elongated hypocotyl) 遺伝子の転写抑制解除活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

(i) 配列番号 11 に示す塩基配列に対して 70% 以上の相同性を有する塩基配列からなり、かつ PRR ポリヌクレオチドに融合させることにより CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY (late elongated hypocotyl) 遺伝子の転写抑制解除活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

38. 植物が長日性植物である、請求項 34 ~ 37 のいずれかに記載の方法。

39. 植物の疑似レスポンスレギュレータ (Pseudo-Response-Regulator) 遺伝子の共通モチーフである擬似レシーバードメイン (Pseudo-Receiver domain) および CCT モチーフ (CCT-motif) を含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドを植物内で過剰発現させることを特徴とする、植物に環境ストレス耐性を付与する方法。

40. 植物の疑似レスポンスレギュレータ (Pseudo-Response-Regulator) 遺伝子の共通モチーフである擬似レシーバードメイン (Pseudo-Receiver domain) および CCT モチーフ (CCT-motif) を含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドが、以下の(a)~(c)のいずれかのポリヌクレオチドである、請求項39に記載の方法。

(a) 配列番号1、3、5、7、又は9に示す塩基配列からなるポリヌクレオチド

(b) 配列番号1、3、5、7、又は9に示す塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY (late elongated hypocotyl) 遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

(c) 配列番号1、3、5、7、又は9に示す塩基配列に対して 70%以上の相同性を有する塩基配列からなり、かつ CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY (late elongated hypocotyl) 遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

41. 植物の疑似レスポンスレギュレータ (Pseudo-Response-Regulator) 遺伝子の共通モチーフである擬似レシーバードメイン (Pseudo-Receiver domain) および CCT モチーフ (CCT-motif) を含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドが、以下の(d)~(f)のいずれかのタンパク質をコードするポリヌクレオチドである、請求項39に記載の方法。

(d) 配列番号2、4、6、8、又は10に示すアミノ酸配列からなるタンパク質

(e) 配列番号2、4、6、8、又は10に示すアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY (late elongated hypocotyl) 遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質

(f) 配列番号2、4、6、8、又は10に示すアミノ酸配列に対して 70%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ CCA1 (circadian clock-associated 1) 遺伝子または LHY (late elongated hypocotyl) 遺伝子の転写抑制活性を有するタンパク質

42. 植物が短日性植物である、請求項39~41のいずれかに記載の方法。

43. 環境ストレスが、乾燥ストレス、低温ストレス、及び塩ストレスから成る群から選択される少なくとも1種以上である、請求項34~42のいずれかに記載の方法。

図 1

PRR1(TOC1), PRR3, PRR5, PRR7, PRR9

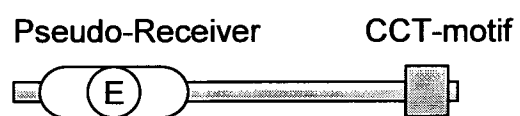


図 2

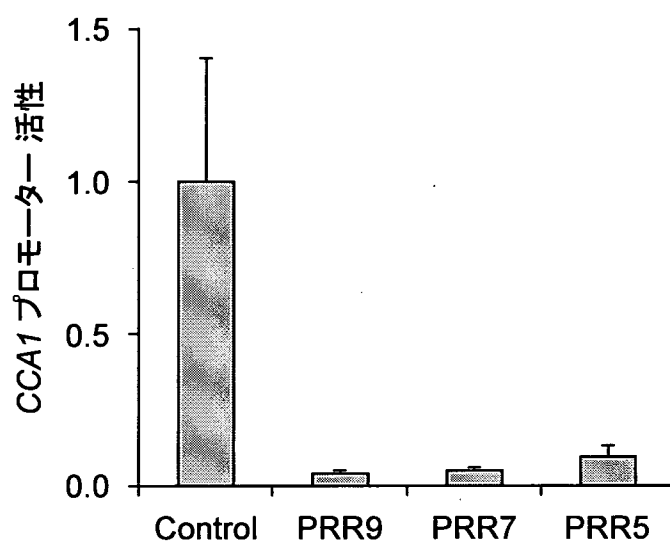


図 3

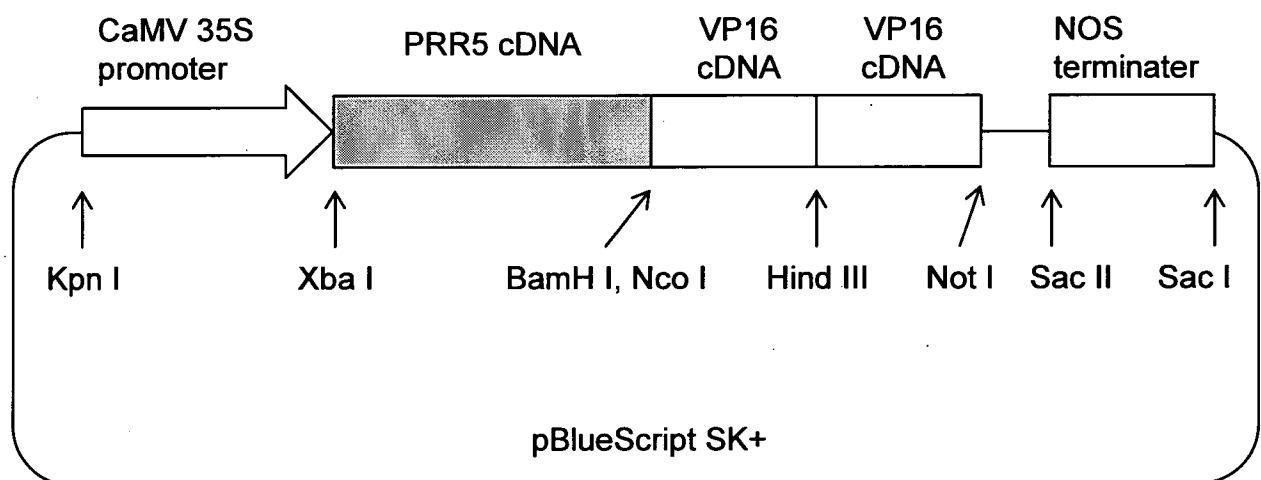


図 4

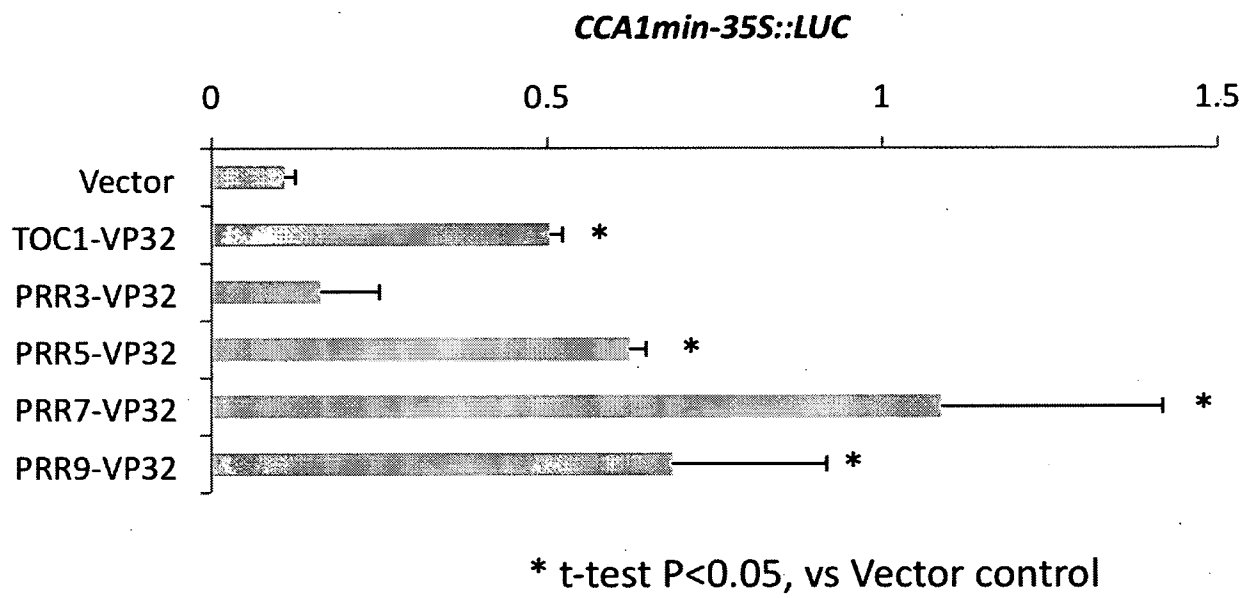


図 5

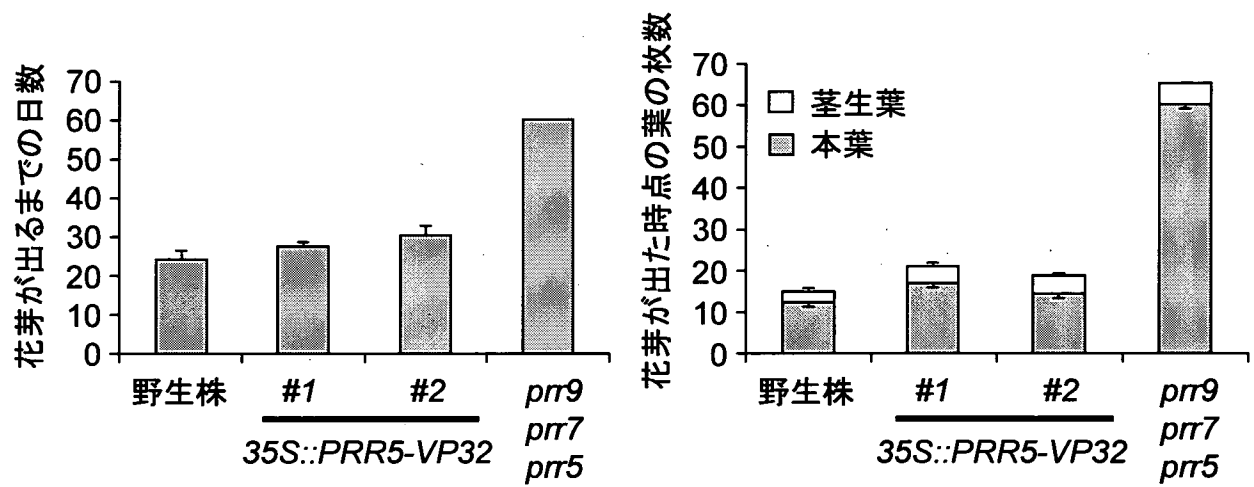


図 6



1cm 野生株



35S::PRR5-VP32 1cm

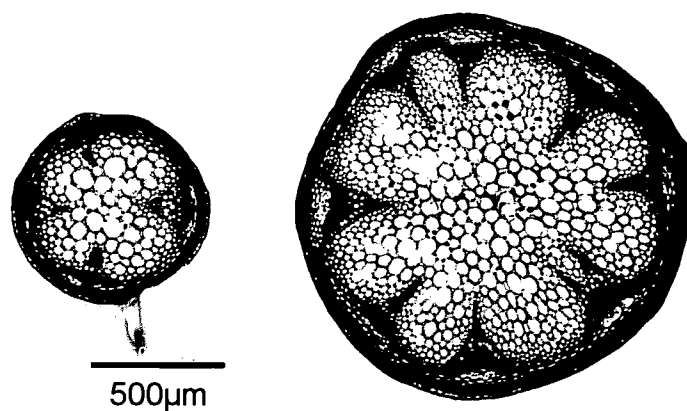
図 7



野生株 35S::
PRR5-VP32



図 8



野生株

35S::PRR5-VP32

図 9

高NaClテスト (0.2M NaCl, 5days)

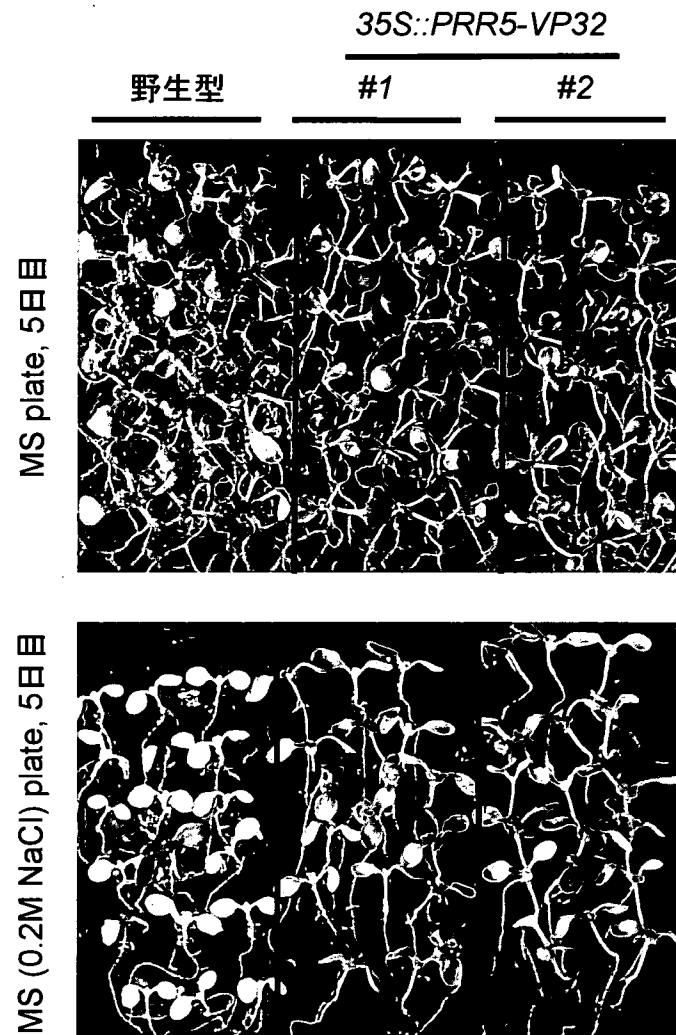


図 10

乾燥ストレステスト (切除葉を室内に14時間放置)

野生型

35S::
PRR5-VP32

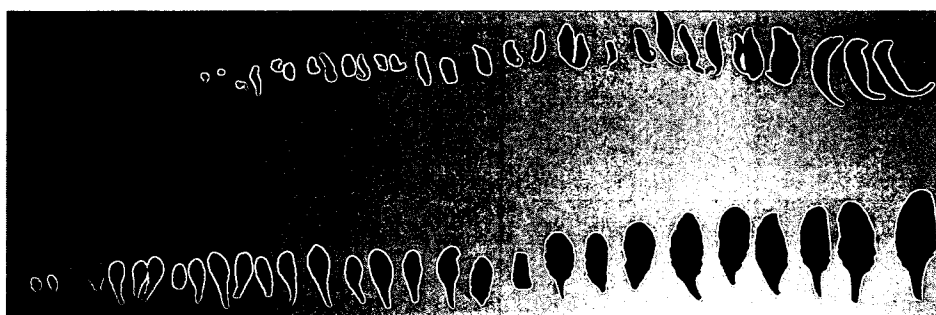
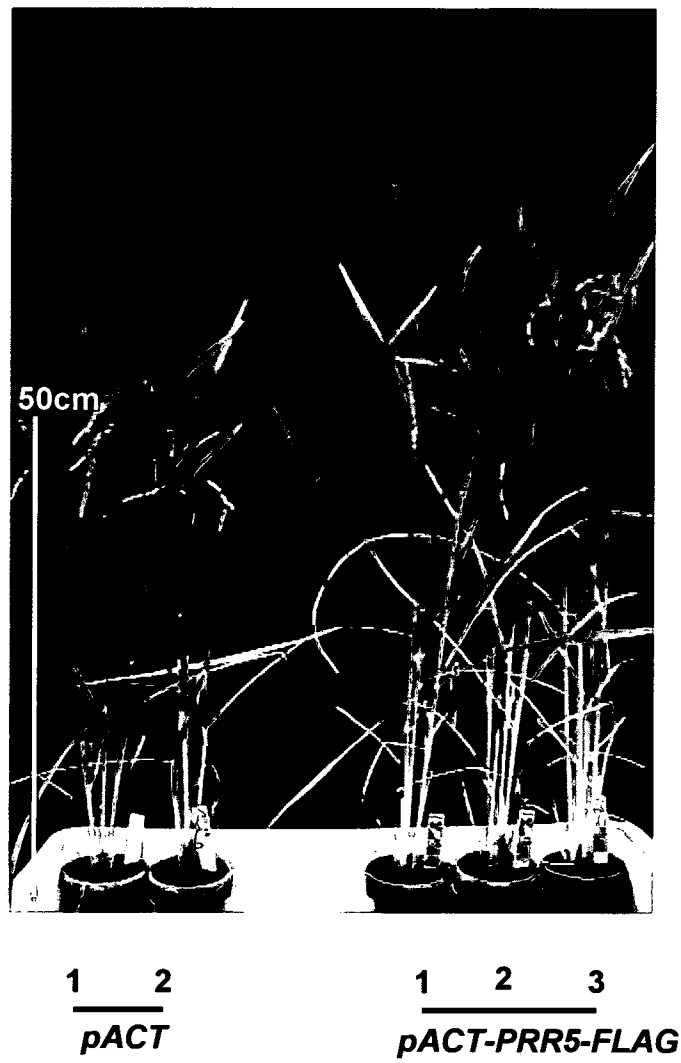


図 1 1

低温ストレステスト (-5°C, 1 day)



図 1 2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/069229

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A01H1/00(2006.01)i, A01H5/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A01H1/00, A01H5/00, C12N15/09

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)

CAPLUS/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus (JDreamII), PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	MAKINO S., et al., The APRR1/TOC1 quintet implicated in circadian rhythms of Arabidopsis thaliana: I. Characterization with APRR1-overexpressing plants., Plant Cell Physiol., 2002, Vol. 43, No. 1, pp. 58-69	6-12, 18-24, 30-33, 39-43/ 1-5, 13-17, 25-29, 34-38
X/A	MATSUSHIKA A., et al., Characterization of Circadian-associated pseudo-response regulators: I. Comparative studies on a series of transgenic lines misexpressing five distinctive PRR Genes in Arabidopsis thaliana., Biosci.Biotechnol. Biochem., 2007, Vol. 71, No. 2, pp. 527-534	6-12, 18-24, 30-33, 39-43/ 1-5, 13-17, 25-29, 34-38



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
17 November, 2010 (17.11.10)Date of mailing of the international search report
30 November, 2010 (30.11.10)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/069229

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FUJIMORI T., et al., PRR5 (PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 5) plays antagonistic roles to CCA1 (CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED 1) in Arabidopsis thaliana., Biosci.Biotechnol.Biochem., 2005, Vol. 69, No. 2, pp. 426-430	1-43
A	MAKINO S., et al., Genes encoding pseudo-response regulators: insight into His-to-Asp phosphorelay and circadian rhythm in Arabidopsis thaliana., Plant Cell Physiol., 2000, Vol. 41, No. 6, pp. 791-803	1-43
A	Takeshi MIZUNO, "Molecular bases for plant circadian clock and flowering: How does the quintet tell the time?", Protein, nucleic acid and enzyme, 2002, vol.47, no.11, pages 1421 to 1428	1-43
A	SAKAI H., et al., Arabidopsis ARR1 and ARR2 response regulators operate as transcriptional activators., Plant J., 2000, Vol. 24, No. 6, pp. 703-711	1-43
P,A	Norihito NAKAMICHI et al., "Shiroinunazuna no Giji Response Regulator wa Seibutsudokei de Kino suru Tensha Yokusei Inshi de aru", Proceedings of the 51st Annual Meeting of the Japanese Society of Plant Physiologists, 12 March 2010 (12.03.2010), page 170, 3pC15(274)	1-43

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/069229

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
See extra sheet.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/069229

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet (2)

The invention described in claim 1, the invention described in claim 6, the invention described in claim 13, the invention described in claim 18, the invention described in claim 25, the invention described in claim 30, the invention described in claim 34 and the invention described in claim 39 share a common technical feature "a transgenic plant produced by introducing, into a plant, a polynucleotide which encodes a protein containing both a pseudo-receiver domain that is a common motif among plant pseudo-response regulator genes and a CCT motif". However, the technical feature does not make a contribution over the prior art in light of document 1 (Plant Cell Physiol., 2002, vol. 43, no. 1, pp. 58-69) which discloses a transgenic plant APPR1-ox that can overexpress APPR1/TOC1. Therefore, the technical feature cannot be regarded as a special technical feature. Further, there is no other same or corresponding special technical feature among these inventions. The claims include the following five inventions.

(Invention 1) The inventions described in claims 1-5, 13-17, 25-29 and 34-38.

A transgenic plant produced by introducing, into a plant, a fusion polynucleotide of a polynucleotide which encodes a protein containing both a pseudo-receiver domain that is a common motif among plant pseudo-response regulator genes and a CCT motif and a polynucleotide which encodes a transcription activation domain of a transcription factor.

(Invention 2) The inventions described in claims 6-12.

A transgenic plant produced by introducing, into a plant, a polynucleotide which encodes a protein containing both a pseudo-receiver domain that is a common motif among plant pseudo-response regulator genes and a CCT motif.

(Invention 3) The inventions described in claims 18-24.

A process for producing a transgenic plant by introducing, into a plant, a polynucleotide which encodes a protein containing both a pseudo-receiver domain that is a common motif among plant pseudo-response regulator genes and a CCT motif.

(Invention 4) The inventions described in claims 30-33.

A method for increasing a plant biomass by overexpressing a polynucleotide which encodes a protein containing both a pseudo-receiver domain that is a common motif among plant pseudo-response regulator genes and a CCT motif in a plant.

(Invention 5) The inventions described in claims 39-43.

A method for imparting environmental stress resistance to a plant by overexpressing a polynucleotide which encodes a protein containing both a pseudo-receiver domain that is a common motif among plant pseudo-response regulator genes and a CCT motif in the plant.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

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

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. A01H1/00, A01H5/00, C12N15/09

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）

CAPLUS/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN),
JSTPlus(JDreamII),
PubMed

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/ A	MAKINO S., et al., The APRR1/TOC1 quintet implicated in circadian rhythms of Arabidopsis thaliana: I. Characterization with APRR1-overexpressing plants., Plant Cell Physiol., 2002, Vol. 43, No. 1, pp. 58-69	6-12, 18-24, 30-33, 39-43/ 1-5, 13-17, 25-29, 34-38

☒ 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

17. 11. 2010

国際調査報告の発送日

30. 11. 2010

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

千葉 直紀

4 N

3 4 3 4

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/ A	MATSUSHIKA A., et al., Characterization of Circadian-associated pseudo-response regulators: I. Comparative studies on a series of transgenic lines misexpressing five distinctive PRR Genes in <i>Arabidopsis thaliana</i> ., Biosci.Biotechnol.Biochem., 2007, Vol. 71, No. 2, pp. 527-534	6-12, 18-24, 30-33, 39-43/ 1-5, 13-17, 25-29, 34-38
A	FUJIMORI T., et al., PRR5 (PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 5) plays antagonistic roles to CCA1 (CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED 1) in <i>Arabidopsis thaliana</i> ., Biosci.Biotechnol.Biochem., 2005, Vol. 69, No. 2, pp. 426-430	1-43
A	MAKINO S., et al., Genes encoding pseudo-response regulators: insight into His-to-Asp phosphorelay and circadian rhythm in <i>Arabidopsis thaliana</i> ., Plant Cell Physiol., 2000, Vol. 41, No. 6, pp. 791-803	1-43
A	水野猛, 花時計と花暦の分子基盤 時を告げるシロイヌナズナ時計遺伝子の五重奏, 蛋白質 核酸 酵素, 2002, Vol. 47, No. 11, pp. 1421-1428	1-43
A	SAKAI H., et al., <i>Arabidopsis</i> ARR1 and ARR2 response regulators operate as transcriptional activators., Plant J., 2000, Vol. 24, No. 6, pp. 703-711	1-43
P, A	中道範人, 他, シロイヌナズナの疑似レスポンスレギュレーターは生物時計で機能する転写抑制因子である, 第 51 回日本植物生理学会年会要旨集, 2010.3.12, pp. 170, 3pC15(274)	1-43

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（P C T 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってP C T 規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。
特別ページ参照。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

請求項 1 に係る発明、請求項 6 に係る発明、請求項 1 3 に係る発明、請求項 1 8 に係る発明、請求項 2 5 に係る発明、請求項 3 0 に係る発明、請求項 3 4 に係る発明、請求項 3 9 に係る発明は、それぞれ、植物の疑似レスポンスレギュレータ遺伝子の共通モチーフである疑似レシーバードメイン及び C C T モチーフを含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドを植物内に導入した形質転換植物という共通の技術的特徴を有している。しかしながら、当該技術的特徴は、APRR1/TOC1 を過剰発現する形質転換植物 APPR1-ox を開示する文献 1 (Plant Cell Physiol., 2002, Vol. 43, No. 1, pp. 58-69) に照らして、先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、当該技術的特徴は、特別な技術的特徴であるとはいえない。また、これらの発明の間には、ほかに同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。そして、請求の範囲には以下に示す 5 の発明が含まれる。

(発明 1) 請求項 1 - 5、1 3 - 1 7、2 5 - 2 9、3 4 - 3 8 に係る発明

植物の疑似レスポンスレギュレータ遺伝子の共通モチーフである疑似レシーバードメイン及び C C T モチーフを含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドと転写因子の転写活性化ドメインをコードするポリヌクレオチドとの融合ポリヌクレオチドを植物内に導入した形質転換植物に関するもの。

(発明 2) 請求項 6 - 1 2 に係る発明

植物の疑似レスポンスレギュレータ遺伝子の共通モチーフである疑似レシーバードメイン及び C C T モチーフを含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドを植物内に導入した形質転換植物。

(発明 3) 請求項 1 8 - 2 4 に係る発明

植物の疑似レスポンスレギュレータ遺伝子の共通モチーフである疑似レシーバードメイン及び C C T モチーフを含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドを植物内に導入した形質転換植物の製造方法。

(発明 4) 請求項 3 0 - 3 3 に係る発明

植物の疑似レスポンスレギュレータ遺伝子の共通モチーフである疑似レシーバードメイン及び C C T モチーフを含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドを植物内で過剰発現させて、植物バイオマスを増大させる方法。

(発明 5) 請求項 3 9 - 4 3 に係る発明

植物の疑似レスポンスレギュレータ遺伝子の共通モチーフである疑似レシーバードメイン及び C C T モチーフを含むタンパク質をコードするポリヌクレオチドを植物内で過剰発現させて、植物に環境ストレス耐性を付与する方法。