

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2007-515167

(P2007-515167A)

(43) 公表日 平成19年6月14日(2007.6.14)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	2 B O 3 O
A O 1 H 5/00 (2006.01)	A O 1 H 5/00	4 B O 2 4
	Z N A A	
	A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 34 頁)

(21) 出願番号	特願2006-544469 (P2006-544469)	(71) 出願人	505283555
(86) (22) 出願日	平成16年12月22日 (2004.12.22)		クroppデザイン エヌ. ブイ.
(85) 翻訳文提出日	平成18年6月20日 (2006.6.20)		ベルギー国 ビー-9052 ツウィジュ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2004/053683		ナーデ, テクノロジーパーク 3
(87) 国際公開番号	W02005/061702	(74) 代理人	100078282
(87) 国際公開日	平成17年7月7日 (2005.7.7)		弁理士 山本 秀策
(31) 優先権主張番号	60/532, 287	(74) 代理人	100062409
(32) 優先日	平成15年12月22日 (2003.12.22)		弁理士 安村 高明
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹
		(72) 発明者	フランカード, バレリー
			ベルギー国 ビー-1180 ブリュッセル,
			リュ デ パーク 78

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 収穫高の増加した植物およびこの植物を作製するための方法

(57) 【要約】

本発明は、好ましくはサイクリン A タンパク質をコードするサイクリン A 核酸を植物に導入することにより植物の収穫を増加させるための方法に関し、このサイクリン A 核酸は、種子優先プロモーターに作動可能に連結されている。この方法を用いることにより、植物の収穫は、最適成長条件および最適には及ばない成長条件で増加され得る。この方法は、対応する野生型植物に対して、そして構成的にサイクリン A を発現するトランスジェニック植物に対して収穫を増加させた植物を生じる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

植物の収穫高を増加させるための方法であって、サイクリン A 核酸、好ましくはサイクリン A タンパク質をコードするサイクリン A 核酸を植物に導入する工程を包含し、ここで、サイクリン A 核酸は、種子優先プロモーターに作動可能に連結される、方法。

【請求項 2】

前記植物の収穫高が、それぞれ対応するコントロール植物に対する種子重量の増加、詰まった種子の数の増加、種子数の増加、種子の大きさの増加、収穫指数の増加、千粒重の増加および種子組成の改変の一種以上から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記サイクリン A タンパク質が、W L V / I E V S / A D / E D / E Y K / R / T L からなるモチーフを含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記サイクリン A 核酸が、サイクリン A 2 ; 1、サイクリン A 2 ; 2、サイクリン A 2 ; 3 およびサイクリン A 2 ; 4 から選択されるサイクリン A 2 である、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

前記サイクリン A 2 が、W L V / I E V S / A D / E D / E Y K / R / T L からなるモチーフ、および

【化 1】

(-T---F--F--)

の残基のうち少なくとも 2 つを有する

【化 2】

E L I L V / I T / M D / E / M Y T / S / H / P / G E R / L L / R / K / N E L P S

からなるモチーフを含む、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法であって、前記サイクリン A が、以下：

(i) サイクリン A 核酸の機能性部分；

(i i) サイクリン A 核酸 / 遺伝子にハイブリダイズし得る配列；

(i i i) サイクリン A 核酸 / 遺伝子の選択的スプライシング改変体；

(i v) サイクリン A 核酸 / 遺伝子の対立遺伝子改変体；

(v) 遺伝コードの縮重に起因する改変体；および

(v i) サイクリン A タンパク質のホモログ、誘導体および活性フラグメント

から選択される、改変体サイクリン A 配列である、方法。

【請求項 7】

(i) ~ (v) の改変体サイクリン A が、W L V / I E V S / A D / E D / E Y K / R / T L からなるモチーフ、および

【化 3】

(-T---F--F--)

の残基のうち少なくとも 2 つを有する

【化 4】

E L I L V / I T / M D / E / M Y T / S / H / P / G E R / L L / R / K / N E L P S

からなるモチーフを含むタンパク質をコードし得る、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記 (v i) の改変体サイクリン A が、W L V / I E V S / A D / E D / E Y K / R / T L からなるモチーフ、および

10

20

30

40

【化 5】
(-T---F-F--)

の残基のうち少なくとも 2 つを有する

【化 6】
E L I L V / I / T / M D / E / M Y T / S / H / P / G E R / L L / R / K / N E L P S

からなるモチーフを含む、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 9】

前記種子優先プロモーターが、内胚乳で活性なプロモーターである、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 10】

前記プロモーターが、プロラミンプロモーターである、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記収穫高の増加が、最適成長条件および最適には及ばない成長条件で達成される、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

前記最適には及ばない成長条件が、塩ストレスなどの非生物的なストレス条件を包含する、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記植物が、イネ、トウモロコシ、コムギ、オオムギ、ダイズ、ヒマワリ、キャノーラ、サトウキビ、アルファルファ、キビ、オオムギ、菜種、モロコシおよび綿から選択される、請求項 1 ~ 12 のいずれかに記載の方法。

20

【請求項 14】

請求項 1 ~ 13 のいずれかに記載の方法により得られる植物。

【請求項 15】

以下：

(i) W L V / I E V S / A D / E D / E Y K / R / T L からなるモチーフ、および必要に応じて加えて、

【化 7】

(-T---F-F--)

30

の残基のうち少なくとも 2 つを有する

【化 8】
E L I L V / I / T / M D / E / M Y T / S / H / P / G E R / L L / R / K / N E L P S

からなるモチーフを含むタンパク質をコードする、核酸；

(i i) 種子優先プロモーター；および必要に応じて

(i i i) 転写終結配列

を含む、構築物。

【請求項 16】

前記種子優先プロモーターが、内胚乳で活性なプロモーターである、請求項 15 に記載の構築物。

40

【請求項 17】

前記プロモーターが、プロラミンプロモーターである、請求項 16 に記載の構築物。

【請求項 18】

種子優先プロモーターの制御下で、サイクリン A を発現する植物であって、該サイクリン A は、W L V / I E V S / A D / E D / E Y K / R / T L からなるモチーフ、および必要に応じて加えて、

【化 9】
 (—T—F—F—)

の残基のうち少なくとも 2 つを有する

【化 10】
 E L I L V / I / T / M D / E / M Y T / S / H / P / G E R / L L / R / K / N E L P S

からなるモチーフを含み、該植物は、対応する野生型植物に対して、そして構成的にサイクリン A を発現するトランスジェニック植物に対して収穫高を増加させた、植物。

【請求項 19】

前記種子優先プロモーターが、内胚乳でプロモーター活性である、請求項 18 に記載の植物。

【請求項 20】

前記プロモーターが、プロラミンプロモーターである、請求項 19 に記載の植物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、一般に分子生物学の分野に関連し、植物の収穫高を増加させるための方法に関する。より詳細には、本発明は、好ましくはサイクリン A タンパク質をコードするサイクリン A 核酸を植物に導入することによる植物の収穫高を増加させるための方法に関し、この核酸は、種子優先プロモーターに作動可能に連結される。本発明はまた、植物種子組織においてサイクリン A 核酸の増加した発現および / または植物種子組織でのサイクリン A タンパク質の調節された活性および / またはレベルを有する植物に関し、この植物は、対応する野生型植物に対して、そしてサイクリン A が構成的に発現される対応するトランスジェニック植物に対して、収穫高が増加している。

【背景技術】

【0002】

これまでに、世界の人口は増加し、農業のために利用可能な耕作に適した土地の供給は次第に減少することが、農業の効率の改善に向けた農業研究を活気づける。作物および園芸学的な改良のための従来の手段は、所望の特徴を有する植物を同定するための選択的育種技術を利用する。しかし、このような選択的な育種技術は、いくつかの欠点を有する。すなわち、これらの技術は、代表的に、労働集約的であり、多くの場合、親植物から伝えられる所望の特性を常に生じるわけではない異種の遺伝子成分を含む植物を生じる。分子生物学における利点は、人類が、動物および植物の生殖質を改変することを可能にさせた。植物の遺伝子操作は、遺伝物質（代表的には、DNA または RNA の形態）の単離および操作、およびその後の遺伝物質の植物への導入を必要とする。このような技術は、種々の改良された経済的、作物学的、または園芸学的な特性を有する作物または植物を実現させる能力を有する。特定の経済的な目的の特性は、収穫高である。収穫高は、通常、作物からの経済的な値の測定可能な結果として定義される。収穫高は、量および / または品質に関して定義され得る。収穫高は、いくつかの因子（例えば、器官の数および大きさ、枝の数などの植物の構造、種子の産生など）に直接的に依存する。根の発達、栄養分の吸収およびストレス耐性も、収穫高の決定における重要な因子である。作物の収穫高は、上記の因子の一つの最適化により増加し得、これは、植物の固有の成長機構を改変することによってなされ得る。

【0003】

植物の固有の成長機構は、「細胞周期」として集合的に知られる高度に規制された順序の事象に存在する。この細胞周期を介した発達は、全ての多細胞生物の成長および発生に対する基礎であり、細胞増殖に非常に重要である。この細胞周期の主要な構成要素は、酵母、哺乳動物および植物で高度に保存されている。細胞周期は、代表的に、以下の連続的な期：G0 期 - G1 期 - S 期 - G2 期 - M 期に分けられる。DNA の複製または合成は、

10

20

30

40

50

一般に、S期(「S」は、DNA合成(DNA synthesis)のSである)の間に生じ、染色体の有糸分裂の分離は、M期(「M」は、有糸分裂(mitosis)のMである)の間に生じ、その間にギャップ期、G1(DNA複製前の細胞成長の間)およびG2(分裂のために細胞が準備する間のDNA複製の後の期間)がある。細胞分裂は、M期の最後の工程である細胞質分裂の後に完了する。細胞周期を示し、静止した細胞は、G0期にあるといわれる。この期の細胞は、G1期で細胞周期に再び入るように刺激され得る。G1、G2およびG0における「G」は、「ギャップ(gap)」を意味する。細胞周期の進行の完了は、各娘細胞に細胞分裂の間に、親ゲノムの完全コピーを受容させることである。

【0004】

細胞分裂は、二つの主要な細胞周期の事象(すなわち、DNA合成の開始)および有糸分裂の開始によって制御される。これらの重要な事象のそれぞれへの移行は、特異的なタンパク質複合体(DNA複製および分裂に参与する)により代表されるチェックポイントにより制御される。G1期/S期の境界でのDNA合成に必要な遺伝子の発現は、哺乳動物細胞および植物細胞における転写因子のE2ファミリーによって調節される(La Thangue、1994; Mullerら、2001; DeVeylderら、2002)。細胞周期への移行は、シグナルを統合し、細胞周期遺伝子の転写の活性化を可能にするE2F/Rb複合体によって調節され/誘発される。細胞周期の異なる期の間の移行、従って細胞周期を通じた進行は、種々のヘテロ二量体のセリン/スレオニンプロテインキナーゼ(一般には、サイクリン依存性キナーゼ(CDK)といわれる)の形成および活性化により駆動されている。これらのキナーゼの活性に対する予め必要な条件は、特定のサイクリンとの物理的な会合、主にサイクリン発現に依存する活性化の時期である。サイクリンの結合は、CDKに会合するN末端突出部における立体配座の変化を誘導し、複合体の局在化および基質特異性に寄与する。単量体のCDKは、サイクリンと会合される場合に活性化され、従ってキナーゼ活性を有する。サイクリンタンパク質レベルは、細胞周期中で変動し、従って、CDK活性化の決定時期における主要な因子を表す。サイクリンおよびCDKを含むこれらの複合体の細胞周期の間の周期的な活性化は、細胞周期移行の一時的な調節(チェックポイント)を仲介する。CDK活性を調節するほかの因子としては、CDKインヒビター(CKIまたはICK、KIP、CIP、INK)、CDK活性化キナーゼ(CAK)、CDKホスファターゼ(Cdc25)およびCDKサブユニット(CKS)が挙げられる(Mironovら、1999; Reed 1996)。

【0005】

アラビドプシスA型サイクリンの3つの異なるサブクラス(A1、A2およびA3)(10個のサイクリンを含む)が記載される。2個のA1型遺伝子(CYCA1; 1およびCYCA1; 2)、4個のA2型遺伝子(CYCA2; 1、CYCA2; 2、CYCA2; 3およびCYCA2; 4)および4個のA3型遺伝子(CYCA3; 1、CYCA3; 2、CYCA3; 3およびCYCA3; 4)が、Vande poeleらによって報告されている(非特許文献1)。

【0006】

特許文献1は、サイクリンAを含むいくつかの細胞周期タンパク質を記載する。その特許文献は、例えば、成長速度、特定の組織もしくは器官の大きさ、植物の構造もしくは形態、作物収獲高の増加、環境ストレス条件(例えば、乾燥、塩、温度または栄養分の欠乏)に対する耐性の改善、細胞周期を乱す植物病原体に対する耐性の改善などの植物の成長特性を改善するため、または除草剤もしくは植物成長調節剤として有用であり得るCCPのインヒビターまたはアクチベーターの同定を促進するための標的として、細胞周期タンパク質が農業において使用され得ることを述べている。

【0007】

収獲高は、いくつかは驚くべき多くの方法で増加され得る。例えば、1960年代(いわゆる緑の革命)における小麦およびイネの収獲高の増大に寄与する主要な要因は、植物の高さの低減である(非特許文献2)。窒素肥料の多量の使用、過度に高く、倒れやすく

10

20

30

40

50

成長した当時の伝統的な変種は、顕著な収穫高の減少につながった。それに対して、その短い丈に起因して緑の革命の半矮性の変種は、倒状耐性を提供し、2倍の作物収穫高を生じた。

【0008】

驚くべきことに、現在植物収穫高は、サイクリンA核酸を植物に導入することによって増加され得ることが見出されていて、このサイクリンA核酸は好ましくはサイクリンAタンパク質をコードし、サイクリンA核酸は、作動可能に種子優先プロモーターに連結されている。種子優先プロモーターの制御下でのサイクリンA核酸の発現は、植物中で構成的に発現するサイクリンAの発現に基づいて得られる収穫高より多い収穫高を生じる。

【特許文献1】国際公開第01/85946号パンフレット

10

【非特許文献1】Vandepoelenら、「The Plant Cell」、2002年4月、第14巻、p.903-916

【非特許文献2】SakamotoおよびMatsuoka、「Current Opinion in Biotechnology」、2004年、第15巻、p.144-147

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0009】

従って、本発明の一実施形態に従って、植物収穫高を増加させるための方法が提供され、その方法は、植物にサイクリンA核酸、好ましくはサイクリンAタンパク質をコードするサイクリンA核酸を導入する工程を包含し、このサイクリンA核酸は、種子優先プロモーターに作動可能に連結されている。

20

【0010】

本発明に従った方法の実行は、植物の収穫高を増加させる。用語「収穫高の増加」は、本明細書中で定義される場合、コントロール植物の生物体量に対する植物の一つ以上の部分における生物体量（重量）の増加を包含する。この用語はまた、種子収穫高の増加も包含し、種子収穫高の増加は、コントロール植物に対する種子の生物体量（種子重量）の増加および/または種子数（詰まった）の増加および/または種子の大きさの増加および/または種子体積の増加を包含する。種子の大きさおよび/または種子体積の増加はまた、種子の組成に影響を及ぼす。種子収穫高の増加は、花の数の増加および/または花の大きさの増加から生じ得る。収穫高の増加はまた、収穫指数を増加させ得、収穫指数は、収穫可能な部分（例えば、種子）の収穫高に対する全生物体量の割合として表される。収穫高の増加はまた、千粒重（TKW）を増加させ得、千重粒は、計数した詰まった種子の数およびその全重量から推定される。

30

【0011】

例としてトウモロコシを取り上げると、収穫高の増加は、特に、以下の一種以上として明らかにされ得る：1ヘクタールまたは1エーカーあたりの植物の数の増加、植物あたりの穂の数の増加、作条の数の増加、作条あたりの穀粒の増加、穀粒重量、千穀重、穂の長さ/直径。例としてイネを取り上げると、収穫高の増加は、特に、以下の一種以上における増加によって明らかにされ得る：1ヘクタールまたは1エーカーあたりの植物の数、植物あたりの円錐花序の数、円錐花序あたりの小穂の数、円錐花序あたりの花の数、詰まった種子の割合の増加、千粒重の増加。

40

【0012】

収穫高は、ハイブリッド植物でさらに増加され得るか、または収穫高は、ハイブリッド植物でさらに評価され得る。トウモロコシなどの作物は、代表的にハイブリッドとして市販されている。フィールドでの作物育種の狙いは、種々の所望の特性を、単一の品種またはハイブリッドに合わせることである。育種は、植物の受粉方法（イネの場合には、自家受粉、またはトウモロコシの場合には、他家受粉）を利用する種々の技術を介して生じる。穀類の育種は、多くの場合、自家受粉工程および他家受粉工程を包含する。例としてトウモロコシを取り上げると、新しい品種の作製は、多くの場合、特定の所望の特徴を有す

50

るハイブリッドトウモロコシを作製するために後に使用される近交系の親株の発生、選択および作製を必要とする。従って、トウモロコシハイブリッドの開発は、同型接合の近交株の開発、これらの株の交配およびこれらの交雑種（ハイブリッド）の評価を必要とする。所望の特徴の導入は次いで、交雑（遺伝子の導入）または形質転換技術を介した分子の導入によりなされ得る。産物の圃場性能を決定するために、新しい作物の評価は、同型接合近交系植物の同型遺伝子の集団、または二つの同型近交株の間のハイブリッドでなされ得る。上述の技術は、当該分野で周知である。

【0013】

より詳細には、収穫高の増加は、以下の一種以上として明らかになる：それぞれコントロール植物に対して、種子重量の増加、詰まった種子の数の増加、種子数の増加、種子の大きさの増加、収穫指数の増加、千粒重の増加および種子組成の改変。従って、本発明に従って、植物の収穫高を増加させるための方法が提供され、その増加した植物の収穫高は、以下の一種以上から選択される：それぞれコントロール植物に対して、種子重量の増加、詰まった種子の数の増加、種子数の増加、種子の大きさの増加、収穫指数の増加、千粒重の増加および種子組成の改変。この方法は、植物にサイクリン A 核酸、好ましくはサイクリン A タンパク質をコードするサイクリン A 核酸導入する工程を包含し、このサイクリン A 核酸は、種子優先プロモーターに作動可能に連結されている。

10

【0014】

本発明に従ったトランスジェニック植物は、収穫高が増加しているので、これらの植物は、その生活周期における対応する段階で、コントロール植物の成長速度に対して、成長速度の増加（少なくともその生活周期の一部の間）を示す。この成長速度の増加は、一種以上の植物の部分（種子を含む）に特異的であり得るか、または、その植物の実質的に全体にわたってであり得る。種子の場合、特に穀類の種子では種子の成熟は、植物上でインタクトなときの種子の含水量と関連し得る。含水量は、種子の成熟の指標を与え、従ってまたコントロール植物に比較した種子の成長速度の一つの指標を与える。当業者は、任意の所定の植物種について、含水量が種子が収穫の時期であることを示すことに気付く。含水量は、公知の技術を使用して測定され得る。

20

【0015】

さらに、成長速度における増加は、植物の生活周期における一種以上の段階、またはその植物の実質的に全生活周期の間に生じ得る。植物の生活周期の初期段階の間の成長速度の増加は、増強された成長力を反映し得る。

30

【0016】

成長速度の増加は、他の方法で可能であるよりも遅く蒔き、そして／または早く収穫されることを可能にするよう植物の収穫周期を変化させ得る。用語「収穫周期」は、本明細書中で規定される場合、植物の播種と収穫との間の時間を意味するように取り上げられる。成長速度が十分に増加する場合、同じ植物種のさらなる種子の播種（例えば、全て1度の従来の成長期間内での、イネ植物の播種および収穫の後のさらなるイネ植物の播種および収穫）を可能にし得る。同様に、成長速度が十分に増加する場合、異なる植物種のさらなる種子を播種する可能性を生じさせ得る（例えば、イネ植物を播種し、収穫した後に、例えば、大豆、ジャガイモまたは任意の他の適した植物を播種し、そして必要に応じて収穫する）。いくつかの植物の場合、同じ根茎からの収穫が、その年の次の年に生じ得る。植物の収穫周期を変化させる可能性は、1エーカーあたりの年間の生物体量の増加（任意に特定の植物が生長し、収穫され得る回数（例えば、1年間の）の増加に起因する）を生じ得る。成長速度の増加はまた、その植物の野生型の対応植物より広い地理的な領域でのトランスジェニック植物の栽培を可能にする。なぜならば、作物の成長に対する地域的な制限は、多くの場合、植える時期（先の季節）または収穫の時期（後の季節）のいずれかで不都合な環境条件によって決定されるからである。このような不都合な条件は、収穫周期が短くなれば、避けられ得る。

40

【0017】

成長速度は、成長実験をプロットする成長曲線から種々のパラメータを導くことによっ

50

て決定され得、このようなパラメータは、特に例えば、以下：T - M i d（植物が、その最大の大きさの50%に達するのに要する時間）およびT - 90（植物が、その最大の大きさの90%に達するのに要する時間）であり得る。

【0018】

本発明に従うと、本発明の方法の実施は、改変された成長速度を有する植物を生じる。従って、本発明に従って、植物の成長速度を増加させるための方法が提供され、この方法は、植物にサイクリンA核酸、好ましくはサイクリンAタンパク質をコードするサイクリンA核酸を導入する工程を包含し、このサイクリンA核酸は、種子優先プロモーターに作動可能に連結される。

【0019】

収穫高および/または成長速度の増加はまた、コントロール植物と比較して非ストレス条件下、ならびにストレス条件下での植物のよりよい生産力を包含する。植物は代表的に、成長をよりゆっくりにすることによってストレスへの曝露に応答する。過酷なストレスの条件下では、植物は、成長を完全に止め得る。それに対して、穏やかなストレスは、植物が成長を完全には止めない任意のストレスであると本明細書中で定義される。農業の実施（灌漑、施肥、農薬処理）における進歩に起因して、厳しいストレスは、多くの場合、栽培した作物植物ではあまり遭遇しない。結果として、穏やかなストレスにより誘導された損なわれた成長は、多くの場合、農業には望ましくない特徴である。穏やかなストレスは、植物が曝露され得る代表的なストレスである。これらのストレスは、植物が曝露される毎日の生物ストレスおよび/または非生物（環境）ストレスであり得る。代表的な非生物ストレスすなわち環境ストレスとしては、異常に高い温度または異常に寒い/凍るほどの温度によって引き起こされる温度ストレス、塩ストレス、水ストレス（水の欠乏または過剰な水）が挙げられる。非生物ストレスはまた、化学物質によって引き起こされ得る。生物ストレスは、代表的に、病原体（例えば、細菌、ウイルス、真菌および昆虫）によって引き起こされるストレスである。

【0020】

本発明の一実施形態において、植物に導入されるサイクリンAは、A2型サイクリン、好ましくはサイクリンA2；2である。

【0021】

「サイクリンA核酸」は、本明細書中で定義される場合、その天然の形態がモチーフ1を含むタンパク質をコードする核酸を意味すると解釈され、そのモチーフ1は、W L V / I E V S / A D / E D / E Y K / R / T L（モチーフ1）と表され、ここでバックスラッシュ（/）は、「または」を意味し、すなわち、「V / I」は、VまたはIを意味する。アミノ酸配列中のモチーフ1の存在は、その配列が、任意の他の型のサイクリンではなく、サイクリンAとして同定されることを可能にする。

【0022】

用語「サイクリンA2核酸」は、本明細書中で定義される場合、その天然の形態が上記で同定されるモチーフ1およびさらにモチーフ2を含むタンパク質をコードする任意の核酸であり、このモチーフ2は、

【0023】

ELILVI/T/M D/E/M Y T/S/H/P/G ER/L L/R/K/N EL P S

（モチーフ2）として表され、ここで、同定された残基

【0024】

【化12】

(-T---F-F-)

（および上記の下線）のうちの少なくとも二つの存在は、その配列が任意の他のサイクリンAではなく、サイクリンA2型として同定されることを可能にする。上記ダッシュ（-

10

20

30

40

50

) は、アミノ酸残基を表し、一つのダッシュは、モチーフ 2 の対応する位置における一つのアミノ酸残基と等しい。

【 0 0 2 5 】

用語「サイクリン A 2 ; 2 核酸」は、本明細書中で定義される場合、好ましくは配列番号 2 によって表されるアミノ酸配列と少なくとも 6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 % または 9 5 % の次数で増加した配列同一性または配列類似性を有するタンパク質をコードする任意のサイクリン A 核酸である。

【 0 0 2 6 】

「サイクリン A アミノ酸」または「サイクリン A タンパク質」は、本明細書中で定義される場合、その天然の形態が、モチーフ 1 を含むアミノ酸を意味すると解釈され、このモチーフ 1 は、W L V / I E V S / A D / E D / E Y K / R / T L (モチーフ 1) とし表され、ここで、バックスラッシュ (/) は、「または」を意味し、すなわち、「V / I」は、V または I を意味する。アミノ酸配列中のモチーフ 1 の存在は、その配列が、任意の他の型のサイクリンではなく、サイクリン A として同定されることを可能にする。

【 0 0 2 7 】

用語「サイクリン A 2 アミノ酸」または「サイクリン A 2 タンパク質」は、本明細書中で定義される場合、その天然の形態が、上で同定されるモチーフ 1 およびさらにモチーフ 2 を含む任意のアミノ酸であり、モチーフ 2 は、

【 0 0 2 8 】

【 化 1 3 】

E L I L V / I T / M D / E / M Y T / S / H / P / G E R / L L / R / K / N E L P S

(モチーフ 2) として表され、ここで、同定された残基

【 0 0 2 9 】

【 化 1 4 】

(-T---F-F--)

(および上記の下線) のうちの少なくとも二つの存在は、その配列が、任意の他のサイクリン A ではなく、サイクリン A 2 型として同定されることを可能にする。上記ダッシュ (-) は、アミノ酸残基を表し、一つのダッシュは、モチーフ 2 の対応する位置における一つのアミノ酸残基と等しい。

【 0 0 3 0 】

用語「サイクリン A 2 ; 2 アミノ酸」または「サイクリン A 2 ; 2 タンパク質」は、本明細書中で定義される場合、好ましくは、配列番号 2 として表されるアミノ酸配列と少なくとも 6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 % または 9 5 % の次数で増加した相同性を有するサイクリン A タンパク質を意味する。

【 0 0 3 1 】

植物に導入されるサイクリン A 核酸は、任意の供給源に由来し得、但し、その核酸は、植物種子組織中で過剰発現される場合、植物の収穫高の増加をもたらす。植物に導入される核酸は、微生物供給源 (例えば、細菌、酵母または真菌)、または植物供給源、藻類供給源または動物供給源から単離され得る。この核酸は、組成物中でその天然の形態から、および / または計画的な人の操作を介した遺伝環境から実質的に改変され得る。その核酸配列は、好ましくは、同じ植物種であるにせよ異なる植物種であるにせよ、相同な核酸配列、すなわち植物から得られた核酸配列である。その核酸配列は、単子葉種または双子葉種から、好ましくはアブラナ属 (B r a s s i c a c e a e) ファミリーから、さらに好ましくは、A r a b i d o p s i s t h a l i a n a から単離され得る。最も好ましくは、サイクリン A は、サイクリン A 2 型のサイクリン A (例えば、サイクリン A 2 ; 1、サイクリン A 2 ; 2、サイクリン A 2 ; 3 またはサイクリン A 2 ; 4) である。特に好ましい実施形態において、このサイクリン A 2 ; 2 は、配列番号 1 および配列番号 2 によっ

10

20

30

40

50

て表されるとおりである。

【0032】

本発明は、配列番号1によって表される核酸および配列番号2によって表されるアミノ酸を用いて例証されるが、本発明の方法はまた、改変サイクリンAアミノ酸および改変サイクリンA核酸を使用して実施され得る。

【0033】

本発明に従う方法を実施するのに有用である改変核酸配列および改変アミノ酸配列としては、以下、

(i) サイクリンA核酸の機能性部分

(ii) サイクリンA核酸/遺伝子にハイブリダイズし得る配列

(iii) サイクリンA核酸/遺伝子の選択的スプライシング改変体

(iv) サイクリンA核酸/遺伝子の対立遺伝子改変体

(v) 遺伝コードの縮重に起因する改変体；および

(vi) サイクリンAタンパク質のホモログ、誘導体および活性フラグメント

が挙げられる。

【0034】

用語「核酸」は、本明細書中で使用される場合、相補鎖および対応するRNA、DNA、cDNAおよびゲノムDNAを包含する。核酸は二本鎖または一本鎖であり得る。

【0035】

全長サイクリンA DNA配列は、本発明に従う方法を実施するために必要ではないが、サイクリンA核酸の機能性部分も使用され得ることが、当業者に明らかである。機能性部分とは、元の(より大きい)DNA分子に由来するか、またはそれから調製されるDNA断片をいい、そのDNA部分は、植物に導入され、発現する場合、収穫高の増加した植物を与える。その部分は、さらなる調節エレメントと一緒に、またはさらなる調節エレメントなしで多数の遺伝子を含み得るか、または、単にスペーサー配列を含み得る。本発明に従った方法における使用に適した部分は、慣例的な技術を使用して容易に決定され得る。例えば、本発明に従う方法において実行するための能力に影響を及ぼすことなく、一つ以上の欠失および/または短縮が配列番号1の核酸配列になされ得る。本発明に従う方法に使用するのに適した部分は、慣例的な技術を使用して(例えば、サイクリンA活性をアッセイすることによって、および/または、単に実際の実施例で使用される配列を機能性について試験されるべき部分と置き換えることにより実施例の節に記載される方法に従うことによって)容易に決定され得る。本発明の方法に使用するための好ましい部分は、モチーフ1および好ましくはさらにモチーフ2を含むタンパク質をコードし得る。さらに好ましくは、その部分は、配列番号1により表されるサイクリンA核酸の一部である。

【0036】

従って、本発明の別の実施形態に従って、植物の収穫高を増加させるための方法が提供され、この方法は、植物にサイクリンA核酸、好ましくは配列番号1によって表されるサイクリンA核酸の機能性部分を植物に導入する工程を包含し、この機能性部分は、種子優先プロモーターに作動可能に連結している。

【0037】

サイクリンA核酸(例えば、配列番号1によって表される核酸)にハイブリダイズし得る配列はまた、本発明に従う方法を実施するのに有用であり得る。用語「ハイブリダイゼーション」は、本明細書中で定義される場合、実質的に相同な相補的なヌクレオチド配列が互いにアニーリングするプロセスである。ハイブリダイゼーションプロセスは、完全に溶液中で生じる(すなわち、相補的な核酸は、両方とも溶液中に存在する)。このようなプロセスに依存する分子生物学におけるツールとしては、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR；およびそれに基づく全ての方法)、差引きハイブリダイゼーション、ランダムプライマー伸長、ヌクレアーゼS1マッピング、プライマー伸長、逆転写、cDNA合成、RNAのディファレンシャルディスプレイ、およびDNA配列決定が挙げられる。ハイブリダイゼーションプロセスはまた、磁気ビーズ、セファロースビーズまたは任意の他の樹脂のよ

10

20

30

40

50

うなマトリクスに固定された相補的な核酸の一つを用いて生じ得る。このようなプロセスに依存する分子生物学におけるツールとしては、ポリ(A+) mRNAの単離が挙げられる。ハイブリダイゼーションプロセスはさらに、ニトロセルロース膜またはナイロン膜のような固体支持体に固定された相補的な核酸、または例えば、フォトリソグラフィにより例えばケイ酸含有ガラス支持体に固定された相補的な核酸の一つを用いて生じ得る(後者は、核酸アレイもしくはマイクロアレイとして、または核酸チップとして公知である)。このようなプロセスに依存する分子生物学におけるツールとしては、RNAゲルブロット分析およびDNAゲルブロット分析、コロニーハイブリダイゼーション、プラークハイブリダイゼーション、インサイチュハイブリダイゼーションおよびマイクロアレイハイブリダイゼーションが挙げられる。ハイブリダイゼーションを生じさせることを可能にするために、核酸分子は、一般的に熱的に、または化学的に変性され、二本鎖を二つの一本鎖にされ、そして/または一本鎖核酸からヘアピン構造または他の二次構造を取り除かれる。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは、温度、塩濃度およびハイブリダイゼーション緩衝組成物のような条件によって影響を受ける。ハイブリダイゼーションの高ストリンジェンシーの条件としては、高温および/または低塩濃度(塩としては、NaClおよびクエン酸三ナトリウムが挙げられる)および/またはハイブリダイゼーション緩衝液中へのホルムアミドの含有および/またはハイブリダイゼーション緩衝液中の化合物(例えば、SDS(界面活性剤))の濃度の低下および/またはハイブリダイゼーション緩衝液からの化合物(例えば、硫酸デキストランまたはポリエチレングリコール(分子の集合を促進する))の除去が挙げられる。従来のハイブリダイゼーション条件は、例えば、Sambrook(2001)、Molecular Cloning: a laboratory manual、第3版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、C SH、New Yorkに記載されるが、当業者は、多数の異なるハイブリダイゼーション条件が、その核酸配列の公知または予測される相溶性および/または長さの関数で設計され得る。低ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件は、前に定義される本発明のDNA配列に非相同な核酸を単離するために、特に、好ましい。低ストリンジェンシー条件の例は、 $4 \sim 6 \times \text{SSC} / 0.1 \sim 0.5\% (\text{w/v})$ SDSで、 $37 \sim 45$ にて2~3時間である。ハイブリダイゼーションに含まれる核酸の供給源および濃度に依存して、代替的なストリンジェンシーの条件(例えば、中程度のストリンジェントな条件)が使用され得る。中程度のストリンジェントな条件の例としては、 $1 \sim 4 \times \text{SSC} / 0.25\% (\text{w/v})$ SDSで、 45 以上にて2~3時間が挙げられる。高ストリンジェンシーの条件の例としては、 $0.1 \sim 1 \times \text{SSC} / 0.1\% (\text{w/v})$ SDSで、 60 にて1~3時間が挙げられる。当業者は、ハイブリダイゼーションおよび洗浄の間に換えられ得、そのストリンジェンシー条件を維持するか、または変化させるかのいずれかである種々のパラメータに気付く。異種構造に寄与する要素としては、対立性、遺伝コードの縮重および好ましいコドンユースの差異が挙げられる。

【0038】

サイクリンA核酸にハイブリダイズし得る好ましい配列(例えば、配列番号1として表される配列)は、モチーフ1および好ましくはさらにモチーフ2を含むタンパク質をコードし得る配列にハイブリダイズする配列である。本発明に従った方法における使用に適したハイブリダイズする配列は、慣例的な技術(例えば、サイクリンA活性をアッセイすることにより、そして/または単に実際の実施例で使用される配列を機能性について試験されるべきハイブリダイズする配列と置き換えることによって実施例の節に記載される方法に従うことにより)を使用して容易に決定され得る。

【0039】

従って、本発明の別の実施形態に従って、植物の収穫高を増加させるための方法が提供され、この方法は、上に定義されるサイクリンA核酸、好ましくは配列番号1により表されるサイクリンA核酸にハイブリダイズし得る核酸を植物に導入する工程を包含し、このハイブリダイズする配列は、種子優先プロモーターに作動可能に連結される。

【 0 0 4 0 】

本発明に従う方法は、また、サイクリン A 核酸（例えば、配列番号 1 によって表されるサイクリン A 核酸）の選択的スプライシング改変体を使用して実施され得る。用語「選択的スプライシング改変体」は、本明細書中で使用される場合、選択されたイントロンおよび／またはエキソンが、切除されるか、置換されるか、または付加された核酸配列の改変体を包含する。このような改変体は、そのタンパク質の生物学的な活性が影響されないままである改変体であり、この改変体は、上記核酸によりコードされるタンパク質の機能性部分を選択的に保持することにより達成され得る。このようなスプライシング改変体は、天然に見出され得るか、または人工の改変体であり得る。このようなスプライシング改変体を作製するための方法は、当該分野で周知である。好ましいスプライシング改変体は、モチーフ 1 および好ましくはさらにモチーフ 2 を含むタンパク質をコードする。本発明に従った方法における使用に適したサイクリン A 核酸のスプライシング改変体は、慣例的な技術を使用して（例えば、サイクリン A 活性をアッセイすることにより、および／または単に実際の実施例で使用される配列を機能性について試験されるべきスプライシング改変体と置き換えることにより実施例の節に記載される方法に従うことによって）容易に決定され得る。

【 0 0 4 1 】

従って、本発明の別の実施形態に従って、植物の収穫高を増加させるための方法が提供され、この方法は、植物にサイクリン A 核酸のスプライシング改変体、好ましくは配列番号 1 によって表される核酸配列のスプライシング改変体を植物に導入する工程を包含し、このスプライシング改変体は、種子優先プロモーターに作動可能に連結している。

【 0 0 4 2 】

本発明に従う方法はまた、サイクリン A 核酸の対立遺伝子改変体、好ましくは配列番号 1 によって表されるサイクリン A の核酸の対立遺伝子改変体を使用して有利に実施され得る。対立遺伝子改変体は、天然に存在し、これらの天然の対立遺伝子の使用は、本発明の方法に包含される。対立遺伝子改変体は、一塩基多型（SNP）および短い塩基の挿入／欠失多型（INDEL）を含む。INDEL の大きさは、通常 100 bp 未満である。SNP および INDEL は、ほとんどの生物の天然に存在する多型株における最も大きな組の配列改変体を形成する。好ましい対立遺伝子改変体は、モチーフ 1 および好ましくはさらにモチーフ 2 を含むタンパク質をコードする。本発明に従う方法における使用に適したサイクリン A 核酸の対立遺伝子改変体は、慣例的な技術を使用して（例えば、サイクリン A 活性をアッセイすることによって、および／または、単に実際の実施例で使用される配列を機能性について試験されるべき対立遺伝子改変体と置き換えることにより実施例の節に記載される方法に従うことによって）容易に決定され得る。

【 0 0 4 3 】

従って、本発明の別の局面に従って、植物の収穫高を増加させるための方法が提供され、この方法は、植物にサイクリン A 核酸の対立遺伝子改変体、好ましくは配列番号 1 によって表されるサイクリン A 核酸の対立遺伝子改変体を導入する工程を包含し、この対立遺伝子改変体は、種子優先プロモーターに作動可能に連結している。

【 0 0 4 4 】

改変体サイクリン A アミノ酸の例としては、配列番号 2 によって表されるサイクリン A のホモログ、誘導体および活性なフラグメントが挙げられる。

【 0 0 4 5 】

サイクリン A タンパク質の「ホモログ」は、未改変のそのタンパク質に対してアミノ酸置換、欠失および／または挿入を有し、そのホモログが由来する未改変のタンパク質と類似する生物学的活性および機能的活性を有するペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチド、タンパク質および酵素を包含する。このようなホモログを作製するために、そのタンパク質のアミノ酸が、類似した性質（例えば、類似した疎水性、親水性、抗原性、 α ヘリックス構造または β シート構造を形成するか、または破壊する性質）を有する他のアミノ酸によって置換され得る。保存的置換の表は、当該分野で周知である（例えば、C r e i g

hton (1984) Proteins. W. H. Freeman and Company を参照のこと)。好ましくは、ホモログは、配列番号 2 によって表されるサイクリン A に対して少なくとも 40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% もしくは 99% またはそれより大きい次数で増加する配列同一性（機能的同一性）を有する。少なくとも 40% の配列同一性を有するホモログは、いかなる他のサイクリンクラスも網羅することなく、サイクリン A を包含する。

【0046】

相同性の二つの特別な形態である、オーソログおよびパラログは、遺伝子の先祖の関係を記載するために使用される進化の概念である。用語「パラログ」は、パラログス遺伝子を生じる種のゲノム中の遺伝子の重複に関連する。用語「オーソログ」は、先祖の関係に起因する異なる生物の相同な遺伝子に関する。

10

【0047】

例えば、単子葉植物種におけるオーソログは、いわゆる相互ブラスト検索を行なうことによって容易に見出され得る。これは、当該配列（配列番号 1 または配列番号 2）を、任意の配列データベース（例えば、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> にて見出され得る公に利用可能な NCBI データベース）に対してブラストする（blast）工程を包含する最初のブラストによってなされ得る。イネにおいてオーソログが求められる場合、当該配列は、例えば、NCBI から入手可能な *Oryza sativa* 日本晴れ（Nipponbare）由来の全長 28,469 の cDNA クローンに対してブラストされる。ヌクレオチドから開始する場合、BLASTn が使用され得るか、またはタンパク質から開始する場合、標準デフォルト値（期待値 10、アラインメント 50）を用いて TBLASTX が使用され得る。このブラストの結果は、フィルタをかけられ得る。フィルタをかけた結果またはフィルタをかけなかった結果のどちらかの全長配列は、次いで、当該配列（配列番号 1 または配列番号 2）に対して再度ブラストされる（2 番目のブラスト）。次いで、この最初のブラストおよび二番目のブラストの結果を比較する。大きいファミリーの場合、ClustalW を使用し、その後、クラスター化を可視化するのを補助するために、近縁を結合する系図化を行なう。サイクリン A オーソログの例としては、以下の登録番号の下で受託されている配列が挙げられる：タンパク質登録番号 AK106653 の下で受託されているイネのオーソログ（サイクリン A 2 型）、タン 30
パク質登録番号 BAA86628 の下で受託されているイネのオーソログ（サイクリン A 1 型）および登録番号 AAC50013 の下で受託されているトウモロコシのオーソログ。

20

30

【0048】

用語「ホモログ」はまた、本明細書中で使用される場合、本発明に従う方法に有用であるタンパク質のパラログおよびオーソログを包含する。

【0049】

タンパク質の「置換改変体」は、アミノ酸配列中の少なくとも一つの残基が取り除かれるか、またはその位置に異なる残基が挿入されたタンパク質である。アミノ酸置換は、代表的に、単一の残基であるが、ポリペプチド上に配置される機能的制約に依存してクラスター化され得、挿入は、通常約 1 ~ 10 アミノ酸残基の次数であり、欠失は、約 1 ~ 20 残基の範囲である。好ましくは、アミノ酸置換は、保存的アミノ酸置換を含む。

40

【0050】

タンパク質の「挿入改変体」は、一種以上のアミノ酸残基が、タンパク質の所定の部位に導入されたタンパク質である。挿入は、アミノ末端融合および/またはカルボキシ末端融合ならびに単一または複数のアミノ酸の配列内挿入を包含し得る。一般に、アミノ酸配列内の挿入は、約 1 ~ 10 残基の次数の、アミノ末端融合またはカルボキシ末端融合より小さい。アミノ末端融合またはカルボキシ末端融合の、タンパク質またはペプチドの例としては、酵母ツーハイブリッドシステムに使用される転写アクチベーターの結合ドメインまたは活性化ドメイン、ファージコートタンパク質、（ヒスチジン）6 - タグ、グルタチ 50

オン S - トランスフェラーゼ - タグ、プロテイン A、マルトース結合タンパク質、ジヒドロ葉酸レダクターゼ、タグ 100 エピトープ、c - myc エピトープ、FLAG (登録商標) エピトープ、lacZ、CMP (カルモジュリン結合ペプチド)、HA エピトープ、プロテイン C エピトープおよび VSV エピトープが挙げられる。

【0051】

タンパク質の「欠失改変体」は、そのタンパク質からの一つ以上のアミノ酸の除去により特徴づけられる。タンパク質のアミノ酸改変体は、固相ペプチド合成などの当該分野で周知のペプチド合成技術を使用して、または組換え DNA 操作により容易に作製され得る。タンパク質の置換改変体、挿入改変体または欠失改変体を生成するための DNA 配列の操作のための方法は、当該分野で周知である。例えば、DNA の所定の部位に置換変異を作製するための技術は、当業者に周知であり、M13 変異誘発プロトコル、T7 - Gen 10
インビトロ変異誘発 (USB、Cleveland、OH) プロトコル、Quick Change Site Directed 変異誘発プロトコル (Stratagene、San Diego、CA)、PCR 媒介部位特異的変異誘発プロトコル、または他の部位特異的変異誘発プロトコルが挙げられる。

【0052】

サイクリン A ホモログの探索および同定のための方法は、十分に当業者の範囲内である。比較のための配列のアラインメントのための方法は、当該分野で周知であり、このような方法としては、GAP、BESTFIT、BLAST、FASTA および TFasta が挙げられる。GAP は、適合の数を最大化し、ギャップの数を最小化する二つの完全 20
配列のアラインメントを見出すために、Needleman および Wunsch (J. Mol. Biol. 48: 443 ~ 453、1970) のアルゴリズムを使用する。BLAST アルゴリズムは、配列同一性を計算し、二つの配列の間の類似性の統計的分析を行なう。BLAST 分析を行なうためのソフトウェアは、the National Centre for Biotechnology Information を通じて公的に利用可能である。

【0053】

用語「誘導体」は、サイクリン A アミノ酸配列 (例えば、配列番号 2 によって表されるサイクリン A アミノ酸配列) と比べて天然に存在するアミノ酸残基および天然には存在しないアミノ酸残基の置換、欠失または付加を含み得るペプチド、オリゴペプチド、ポリペ 30
プチド、タンパク質および酵素をいう。サイクリン A タンパク質の「誘導体」は、ポリペプチドの天然に存在する形態のアミノ酸配列と比べて天然に存在する変化したアミノ酸残基、グリコシル化したアミノ酸残基、アシル化したアミノ酸残基、または天然には存在しないアミノ酸残基を含み得るペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチド、タンパク質および酵素を包含する。誘導体はまた、その誘導体が由来するアミノ酸配列と比較して一つ以上の非アミノ酸置換 (例えば、そのアミノ酸配列に共有結合したか、または非共有結合したレポーター分子または他のリガンド (例えば、誘導体の検出を容易にするように結合するレポーター分子、および天然に存在するタンパク質のアミノ酸配列に対して天然には存在しないアミノ酸残基)) を含み得る。

【0054】

サイクリン A タンパク質の「活性フラグメント」は、少なくともモチーフ 1 を含み、好ましくはさらに、モチーフ 2 を含み、天然に存在するそのタンパク質に対して類似した生物学的活性および / または機能活性を保持する。

【0055】

植物は、目的の配列 (すなわち、サイクリン A 核酸) を含むベクターを用いて形質転換され得、この配列は、種子優先プロモーターに作動可能に連結される。

【0056】

従って、本発明の別の実施形態に従って、以下：

(i) サイクリン A 核酸；

(ii) 種子優先プロモーター；および必要に応じて

10

20

30

40

50

(i i i) 転写終結配列
を含む構築物が提供される。

【 0 0 5 7 】

サイクリン A 核酸は、サイクリン A 改変体配列を含む前述のサイクリン A 配列のいずれかであり得る。好ましい種子優先プロモーターは、以下に規定される。

【 0 0 5 8 】

用語「調節エレメント」「コントロール配列」および「プロモーター」は、全て本明細書中で相互変換可能に使用され、広い文脈では、それらがライゲーションされる配列の発現をもたらし得る調節核酸配列をいうようにとられるべきである。用語「作動可能に連結した」は、本明細書中で使用される場合、プロモーター配列と目的の遺伝子との間の機能的結合をいい、そのプロモーター配列は、目的の遺伝子の転写を開始し得る。 10

【 0 0 5 9 】

伝統的な真核生物ゲノム遺伝子 (C C A A T ボックス配列を含むか、または C C A A T ボックス配列なしで、正確な転写開始に必要である T A T A ボックスを含む)、ならびに発生および / または外部刺激に対する応答して、または組織特異的様式で、遺伝子の発現を変えるさらなる調節エレメント (すなわち、上流の活性化配列、エンハンサーおよびサイレンサー) に由来する転写調節配列が、前述の用語に包含される。伝統的な原核生物遺伝子の転写調節配列もまた、その用語に含まれ、その場合、その転写調節配列は、 - 3 5 ボックス配列および / または - 1 0 ボックス転写調節配列を含み得る。用語「調節エレメント」はまた、合成融合分子または誘導体を包含し、それらは、細胞、組織または器官内で核酸分子の発現を与えるか、活性化するか、または増強する。 20

【 0 0 6 0 】

本発明の方法は、任意の種子優先プロモーターを使用して有利に実施され得る。本発明の文脈における種子優先プロモーターは、種子組織内で、主に活性であるが、種子組織内のみで極度に活性である必要はない。種子組織としては、種皮、アリューロン層、胚乳 (単子葉植物および胚乳の双子葉植物について)、胚 (単子葉植物については、胚盤、胚盤葉上層、幼芽、幼根、双子葉植物については、子葉、胚軸および幼根) を含む種子の任意の部分が挙げられる。本発明に従った方法を実施するための好ましいプロモーターは、胚乳内で活性であるプロモーター (例えば、イネの α グロブリンプロモーター、カラスムギのグロブリンプロモーター、イネまたはコムギのグルテリンプロモーター、 b 1 z 2、イネの転写因子 R I S B Z 1) である。胚乳内で活性であるプロモーターが特に好ましく、このプロモーターは、好ましくは発芽の間および発芽の後に活性であり、例えば、イネ由来のプロラミンプロモーターである。 30

【 0 0 6 1 】

本発明の方法を実施するための適切なプロモーターの例は、以下の表 1 に提供される。

【 0 0 6 2 】

【表 1 - 1】

表 1 : 種子優先プロモーター

遺伝子供給源	発現パターン	参考文献
種子特異的遺伝子	種子	Simon, <i>et al.</i> , <i>Plant Mol. Biol.</i> 5: 191, 1985; Scofield, <i>et al.</i> , <i>J. Biol. Chem.</i> 262: 12202, 1987.; Baszczynski, <i>et al.</i> , <i>Plant Mol. Biol.</i> 14: 633, 1990.
ブラジルナッツアルブミン	種子	Pearson, <i>et al.</i> , <i>Plant Mol. Biol.</i> 18: 235-245, 1992.
レグミン	種子	Ellis, <i>et al.</i> , <i>Plant Mol. Biol.</i> 10: 203-214, 1988.
グルテリン (イネ)	種子	Takaiwa, <i>et al.</i> , <i>Mol. Gen. Genet.</i> 208: 15-22, 1986; Takaiwa, <i>et al.</i> , <i>FEBS Letts.</i> 221: 43-47, 1987.
ゼイン	種子	Matzke <i>et al</i> <i>Plant Mol Biol</i> , 14(3):323-32 1990
napA	種子	Stalberg, <i>et al</i> , <i>Planta</i> 199: 515 -519, 1996.

10

20

【 0 0 6 3 】

【表 1 - 2】

コムギ LMWおよびHMW グルテニン-1	内胚乳	Mol Gen Genet 216:81-90, 1989; NAR 17:461-2, 1989
コムギ SPA	種子	Albani <i>et al</i> , Plant Cell, 9: 171-184, 1997
コムギ α, β, γ -グリアジン	内胚乳	EMBO 3:1409-15, 1984
オオムギ <i>Hr1</i> プロモーター	内胚乳	
オオムギ B 1, C, D, ホル デイン	内胚乳	Theor Appl Gen 98:1253-62, 1999; Plant J 4:343-55, 1993; Mol Gen Genet 250:750-60, 1996
オオムギ DOF	内胚乳	Mena <i>et al</i> , The Plant Journal, 116(1): 53-62, 1998
<i>blz2</i>	内胚乳	EP99106056.7
合成プロモーター	内胚乳	Vicente-Carbajosa <i>et al.</i> , Plant J. 13: 629-640, 1998.
イネプロラミン NRP 33	内胚乳	Wu <i>et al</i> , Plant Cell Physiology 39(8) 885-889, 1998
イネ α -グロブリン G I b-1	内胚乳	Wu <i>et al</i> , Plant Cell Physiology 39(8) 885-889, 1998
イネ OSH 1	胚	Sato <i>et al</i> , Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 8117-8122, 1996
イネ α -グロブリン REB /OHP-1	内胚乳	Nakase <i>et al</i> . Plant Mol. Biol. 33: 513- 522, 1997
イネ ADP-グルコース PP	内胚乳	Trans Res 6:157-68, 1997
トウモロコシ ESR 遺伝子ファミリー	内胚乳	Plant J 12:235-46, 1997
モロコシ γ -カフィリン	内胚乳	PMB 32:1029-35, 1996
KNOX	胚	Postma-Haarsma <i>et al</i> , Plant Mol. Biol. 39:257-71, 1999
イネ オレオシン	胚およびアリューロン	Wu <i>et al</i> , J. Biochem., 123:386, 1998
ヒマワリ オレオシン	種子 (胚および乾燥種子)	Cummins, <i>et al.</i> , Plant Mol. Biol. 19: 873-876, 1992
推定イネ 40S リボソーム タンパク質	内胚乳において弱い	
イネ α グロブリン	内胚乳において強い	
イネ アラニンアミノトランスフェラーゼ	内胚乳において弱い	
トリブシンインヒビター ITRI (オオムギ)	内胚乳において弱い	
イネ WSI 18	胚+ストレス	
イネ RAB 21	胚+ストレス	
イネ オレオシン 18 k d	アリューロン+胚	

必要に応じて、一つ以上の終結配列もまた、植物に導入された構築物中で使用され得る。用語「終結」は、一次転写物の 3' プロセッシングおよびポリアデニル化ならびに転写の終結のシグナルを送る転写ユニットの末端の DNA 配列であるコントロール配列を包含する。さらなる調節エレメントは、転写エンハンサーおよび翻訳エンハンサーを包含し得る。当業者は、本発明を実施するのに使用するのに適し得る終結配列およびエンハンサー配列に気付く。このような配列は、公知であるか、または当業者により容易に入手され得る。

【0064】

本発明の遺伝子構築物は、特定の細胞型の維持および／または複製に必要な複製配列起点をさらに含み得る。一つの例は、遺伝子構築物が、エピソームの遺伝的要素（例えば、プラスミド分子またはコスミド分子）として細菌細胞内で維持されることが必要である場合である。好ましい複製の開始点としては、*f1-ori*および*colE1*が挙げられるが、これらに限定されない。

【0065】

遺伝子構築物は、必要に応じて選択的マーカー遺伝子を含み得る。本明細書中で使用される場合、用語「選択的マーカー遺伝子」は、本発明の核酸構築物を用いてトランスフェクトされるか、形質転換される細胞の同定および／または選択を容易にするために発現される細胞に、表現型を与える任意の遺伝子を包含する。適切なマーカーは、抗生物質耐性もしくは除草剤耐性を与えるマーカー、または新規の代謝特性を導入するマーカーまたは視覚による選択を可能にするマーカーから選択され得る。従って、組換えDNAを含む細胞は、形質転換されていない細胞を死滅させる抗生物質濃度または除草剤濃度の存在下で、生存し得る。選択的マーカー遺伝子の例としては、除草剤*Basta*に対する耐性を提供する*bar*遺伝子、抗生物質カナマイシンに対する耐性を与える*neo^r*遺伝子、ハイグロマイシン耐性を与える*hpt*遺伝子が挙げられる。視覚マーカー（例えば、緑色蛍光タンパク質（*GFP*、*Haseloff*ら、1997）、 β -グルクロニダーゼ（*GUS*）またはルシフェラーゼもまた選択的なマーカーとして使用され得る。

10

【0066】

本発明に従う方法に有用である構築物は、当業者に周知の組換えDNA技術を使用して構築され得る。遺伝子構築物は、ベクターに挿入され得、そのベクターは、市販され得、植物への形質転換に適切であり、形質転換された細胞内での目的の遺伝子の発現に適している。

20

【0067】

サイクリンAタンパク質それ自体および／またはサイクリンA核酸それ自体は、植物細胞に直接導入され得るか、または植物それ自体に直接導入（植物の組織、器官または任意の他の部分への導入が挙げられる）され得る。本発明の好ましい特徴に従って、核酸は、好ましくは、形質転換により植物に導入される。

【0068】

用語「形質転換」は、本明細書中で言われる場合、伝達のために使用される方法にかかわらず外因性のポリヌクレオチドの宿主細胞内への伝達を包含する。器官形成または胚形成のどちらかにより後にクローン増殖し得る植物組織は、本発明の遺伝子構築物を用いて形質転換され得、そこから植物全体が再発生する。選択した特定の組織は、形質転換される特定の種に利用可能かつ最も適したクローン増殖系に依存して変わる。例示的な組織標的としては、葉、花粉、胚、子葉、胚軸、大配偶体、カルス組織、既存の分裂組織（例えば、頂端分裂組織、腋芽および根端分裂組織）および誘導された分裂組織（例えば、子葉分裂組織および胚軸分裂組織）が挙げられる。ポリヌクレオチドは、宿主細胞内に一過性に、または安定して導入され得、例えば、プラスミドとして、組み込まれないで維持され得る。あるいは、ポリヌクレオチドは、宿主ゲノム内に組み込まれ得る。生じた形質転換した植物細胞は次いで、当業者に公知の様式で形質転換された植物を再生させるために使用され得る。

30

40

【0069】

植物種の形質転換は、現在かなり慣例的な技術である。任意のいくつかの形質転換方法が、目的の遺伝子を適切な祖先細胞に導入するために有利に使用され得る。形質転換方法としては、リボソームの使用、エレクトロポレーションの使用、遊離DNAの取り込みを増加させる化学物質の使用、植物へのDNAの直接の注入、パーティクルガンボンバードメントの使用、ウイルスまたは花粉を使用する形質転換およびマイクロプロジェクションの使用が挙げられる。方法は、プロトプラストのためのカルシウム／ポリエチレングリコール法（*Krens, F. A.*ら、1982、*Nature* 296、72-74；*Negrutiu I.*ら、1987年6月、*Plant Mol. Biol.* 8、363-

50

373)、プロトプラストのエレクトロポレーション(Shillito R.D.ら、1985 Bio/Technol 3、1099-1102);植物材料へのマイクロインジェクション(Crossway A.ら、1986、Mol. Gen. Genet 202、179-185);DNAまたはRNA被覆粒子ボンバードメント(Klein T.M.ら、1987、Nature 327、70)、(非組込み)ウイルスを用いた感染などから選択され得る。本発明に従う好ましい方法は、イネの形質転換の事例におけるHi e iら、1994に従ったプロトコルである。トウモロコシの形質転換については、トウモロコシ組織のアグロバクテリウムベースの形質転換を包含する方法が、これまでに、EP0604662、EP0672752、EP0971578、EP0955371、EP0558676などに記載されている。高効率で、トウモロコシを形質転換するための好ましい方法は、Ishidaら(High efficiency transformation of maize (Zea mays L.) mediated by Agrobacterium tumefaciens. Nat Biotechnol. 1996年6月;14(6):745-50)およびFrameら(Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of maize embryos using a standard binary vector system. Plant Physiol. 2002年5月;129(1):13-22)に記載されるプロトコルである。

10

【0070】

一般に形質転換の後、植物細胞または植物細胞の群が、目的の遺伝子と一緒に同時に移される植物で発現可能な遺伝子によってコードされる一種以上のマーカの存在について選択され、その後形質転換された材料は、植物体全体に再生する。

20

【0071】

DNAを移し、再生した後に、形質転換したと推定される植物は、目的の遺伝子の存在、コピー数および/またはゲノム組織について、例えば、サザン分析を用いて評価され得る。あるいは、またはさらに、新たに導入したDNAの発現レベルは、ノーザン分析および/またはウエスタン分析を用いてモニタリングされ得、両方の技術とも当業者に周知である。

【0072】

作製された形質転換植物は、種々の手段(例えば、クローン増殖または伝統的な育種技術)により増殖され得る。例えば、一番目の世代(すなわちT1)の形質転換した植物は、自家受粉して同型接合の二番目の世代(すなわちT2)形質転換体を生じ、T2植物は、伝統的な育種技術を介してさらに増殖され得る。

30

【0073】

作製された形質転換生物は、種々の形態をとり得る。例えば、それらは、形質転換した細胞と形質転換していない細胞とのキメラ、クローンの形質転換体(例えば、発現カセットを含むように形質転換される全ての細胞)、形質転換した組織と形質転換していない組織との接木(例えば、植物において、形質転換していない接ぎ穂に接ぎ木した形質転換した台木)であり得る。

【0074】

本発明は、本明細書中に記載されるいずれかの方法により作製されたいずれの植物細胞またはいずれの植物、および全ての植物の部分およびその零余子にまで明白に及ぶ。本発明は、一次形質転換したか、または一次トランスフェクトした細胞の子孫、組織の子孫、器官の子孫または前述の方法のいずれかにより作製された植物全体をさらに包含する範囲に及び、唯一の必要なことは、子孫が、本発明に従った方法により親で生成された特徴と同じ遺伝的特徴および/または表現型の特徴を示すことである。本発明はまた、好ましくはサイクリンAタンパク質をコードする単離サイクリンA核酸分子を含む宿主細胞を包含する。本発明に従った好ましい宿主細胞は、植物細胞である。本発明はまた、植物の収獲可能な部分(例えば、種子、葉、果実、花、茎培養物、茎、根茎、根、塊茎および鱗茎であるが、これらに限定されない)に及ぶ。

40

50

【 0 0 7 5 】

用語「植物」は、本明細書中で使用される場合、植物全体、植物および植物の一部（種子、苗条、茎、根（塊茎を含む）、植物細胞、植物組織および植物器官が挙げられる）の祖先および子孫を包含する。従って、用語「植物」はまた、懸濁培養物、胚、分裂組織領域、カルス組織、葉、種子、根、苗条、配偶体、胞子体、花粉および小胞子を包含する。

【 0 0 7 6 】

本発明の方法に特に有用である植物としては上科緑色植物門に属する全ての植物、特に単子葉植物および双子葉植物が挙げられ、それらとしては、中でも以下を含む一覧

【 0 0 7 7 】

【 化 1 5 】

Acacia 亜種, *Acer* 亜種, *Actinidia* 亜種, *Aesculus* 亜種, *Agathis australis*, *Albizia amara*, *Alsophila tricolor*, *Andropogon* 亜種, *Arachis* 亜種, *Areca catechu*, *Astelia fragrans*, *Astragalus cicer*, *Baikiaea plurijuga*, *Betula* 亜種, *Brassica* 亜種, *Bruguiera gymnorhiza*, *Burkea africana*, *Butea frondosa*, *Cadaba farinosa*, *Calliandra* 亜種, *Camellia sinensis*, *Canna indica*, *Capsicum* 亜種, *Cassia* 亜種, *Centroema pubescens*, *Chaenomeles* 亜種, *Cinnamomum cassia*, *Coffea arabica*, *Colophospermum mopane*, *Coronilla varia*, *Cotoneaster serotina*, *Crataegus* 亜種, *Cucumis* 亜種, *Cupressus* 亜種, *Cyathea dealbata*, *Cydonia oblonga*, *Cryptomeria japonica*, *Cymbopogon* 亜種, *Cynthea dealbata*, *Cydonia oblonga*, *Dalbergia monetaria*, *Davallia divaricata*, *Desmodium* 亜種, *Dicksonia squarosa*, *Diheteropogon amplexans*, *Dioclea* 亜種, *Dolichos* 亜種, *Dorycnium rectum*, *Echinochloa pyramidalis*, *Ehrhartia* 亜種, *Eleusine coracana*, *Eragrostis* 亜種, *Erythrina* 亜種, *Eucalyptus* 亜種, *Euclea schimperii*, *Eulalia villosa*, *Fagopyrum* 亜種, *Feijoa sellowiana*, *Fragaria* 亜種, *Flemingia* 亜種, *Freycinetia banksii*, *Geranium thunbergii*, *Ginkgo biloba*, *Glycine javanica*, *Gliricidia* 亜種, *Gossypium hirsutum*, *Grevillea* 亜種, *Guibourtia coleosperma*, *Hedysarum* 亜種, *Hemarthria altissima*, *Heteropogon contortus*, *Hordeum vulgare*, *Hyparrhenia rufa*, *Hypericum erectum*, *Hyperthelia dissoluta*, *Indigo incarnata*, *Iris* 亜種, *Leptarrhena pyrolifolia*, *Lespedeza* 亜種, *Lettuca* 亜種, *Leucaena leucocephala*, *Loudetia simplex*, *Lotonus bainesii*, *Lotus* 亜種, *Macrotyloma axillare*, *Malus* 亜種, *Manihot esculenta*, *Medicago sativa*, *Metasequoia glyptostroboides*, *Musa sapientum*, *Nicotianum* 亜種, *Onobrychis* 亜種, *Ornithopus* 亜種, *Oryza* 亜種, *Peltophorum africanum*, *Pennisetum* 亜種, *Persea gratissima*, *Petunia* 亜種, *Phaseolus* 亜種, *Phoenix canariensis*, *Phormium cookianum*, *Photinia* 亜種, *Picea glauca*, *Pinus* 亜種, *Pisum sativum*, *Podocarpus totara*, *Pogonarthria fleckii*, *Pogonarthria squarrosa*, *Populus* 亜種, *Prosopis cineraria*, *Pseudotsuga menziesii*, *Pterolobium stellatum*, *Pyrus communis*, *Quercus* 亜種, *Rhaphiolepis umbellata*, *Rhopalostylis sapida*, *Rhus natalensis*, *Ribes grossularia*, *Ribes* 亜種, *Robinia pseudoacacia*, *Rosa* 亜種, *Rubus* 亜種, *Salix* 亜種, *Schyzachyrium sanguineum*, *Sciadopitys verticillata*, *Sequoia sempervirens*, *Sequoiadendron giganteum*, *Sorghum bicolor*, *Spinacia* 亜種, *Sporobolus fimbriatus*, *Stiburus alopecuroides*, *Stylosanthos humilis*, *Tadehagi* 亜種, *Taxodium distichum*, *Themeda triandra*, *Trifolium* 亜種, *Triticum* 亜種, *Tsuga heterophylla*, *Vaccinium* 亜種, *Vicia* 亜種, *Vitis vinifera*, *Watsonia pyramidata*, *Zantedeschia aethiopica*, *Zea mays*

、アマランス、チョウセンアザミ、アスパラガス、ブロッコリ、芽キャベツ、キャベツ、キャノーラ、ニンジン、カリフラワー、セロリ、コラードの緑葉、アマ、ケール、レンズマメ、アブラナ、オクラ、タマネギ、ジャガイモ、イネ、ダイズ、イチゴ、サトウダイコン、サトウキビ、ヒマワリ、トマト、カボチャ (s q u a s h t e a)、樹木および藻類から選択される飼料 (f o d d e r) 豆科植物または飼料 (f o r a g e) 豆科植物、観賞植物、食用作物、または木挙げられる。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 8 】

本発明の好ましい特徴に従って、植物は、トマト、ジャガイモ、タバコ、ライムギ、ダイズ、ヒマワリ、キャノーラ、アルファルファ、菜種または綿を含む作物である。さらに好ましくは、本発明に従う植物は、サトウキビのような単子葉植物である。最も好ましくは、植物は、カラスムギ、ライムギ、イネ、トウモロコシ、コムギ、キビ、モロコシまたはオオムギのような穀類である。

【 0 0 7 9 】

本発明はまた、本発明に従う方法により入手可能な植物を包含する。従って、本発明は、本発明に従った方法により入手可能な植物を提供し、その植物は、コントロール植物に対して収穫高が増加する。その植物はまた、植物の種子組織中でサイクリン A の優先的な発現を有する。

10

【 0 0 8 0 】

本発明の別の実施形態に従って、コントロール植物に対して収穫高が増加したトランスジェニック植物の作製のための方法が提供され、その方法は、種子優先プロモーターに作動可能に連結したサイクリン A 核酸を植物に導入する工程を包含する。サイクリン A は、配列番号 1 に従う核酸であり得るか、または、上に定義される改変サイクリン A 核酸のいずれか一つであり得るか、または、上に定義されるサイクリン A 核酸の定義の範囲内であるいずれかの核酸であり得る。

【 0 0 8 1 】

ここで、本発明は、以下の図面を参照して記載される。

20

【 0 0 8 2 】

(配列の記述)

配列番号 1 は、本発明に従った方法に使用されるサイクリン A 2 ; 2 核酸を表す。これは、二つの置換を除いて登録番号 NM _ 1 2 1 1 6 8 の下で受託された配列のコード配列と同一であり、その二つの置換の内、一番目は、8 5 1 位の C が G に置換され、二番目は、1 2 9 5 位の C が T に置換されている。これらの変化は、あまり重要であるとは考えられない。

【 0 0 8 3 】

配列番号 2 は、配列番号 1 の核酸によりコードされるサイクリン A 2 ; 2 アミノ酸を表す。それは、二つのアミノ酸置換を含むことを除いて登録番号 NP _ 5 6 8 2 4 8 の下で受託された配列と同一であり、その二つの置換の内、一番目は、2 8 4 位のプロリンがアルギニンに置換され、二番目は、4 3 2 位のセリンがフェニルアラニンに置換されている。これらの変化は、あまり重要であるとは考えられない。

30

【 0 0 8 4 】

配列番号 3 は、イネ由来のプロラミンプロモーターを表す。

【 0 0 8 5 】

配列番号 4 および配列番号 5 は、遺伝子クローニングに使用されるプライマーの配列を表す。

【 実施例 】

【 0 0 8 6 】

本発明は、以下の実施例を参照してここで記載され、この実施例は、例証のためのみのものである。

40

【 0 0 8 7 】

(DNA 操作)

他に述べない限り、組換え DNA 技術は、Sambrook (2 0 0 1) Molecular Cloning : a laboratory manual、第 3 版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、C S H、New York) または Ausubel ら、(1 9 8 4)、Current Protocols in Molecular Biology、Current Protocols の第 1 巻および第 2 巻に記載される標準的なプロトコルに従って実施される。植物の分

50

子的な研究のための標準的な材料および方法は、B I O S S c i e n t i f i c P u b l i c a t i o n s L t d (U K) および B l a c k w e l l S c i e n t i f i c P u b l i c a t i o n s (U K) により発行されている R . D . D . C r o y による P l a n t M o l e c u l a r B i o l o g y L a b f a s e (1 9 9 3) に記載されている。

【 0 0 8 8 】

(実施例 1 : 遺伝子クローニング)

A r a b i d o p s i s t h a l i a n a の芽生えの c D N A ライブラリー (I n v i t r o g e n , P a i s l e y , U K) をテンプレートとして用いた P C R により、A r a b i d o p s i s t h a l i a n a のサイクリン A 2 ; 2 (内部基準 C D S 9 5) を増幅した。芽生えから抽出した R N A の逆転写の後、その c D N A を p C M V S p o r t 6 . 0 にクローニングした。バンクの平均挿入サイズは、1 . 5 k b であり、クローニングの元の数、 1.59×10^7 c f u であった。元の力価を、 6×10^{11} c f u / m l の最初の増幅の後 9.6×10^5 c f u / m l であると決定した。プラスミド抽出後、2 0 0 n g のテンプレートを 5 0 μ l の P C R 混合物中で使用した。プライマー p r m 5 8 2 (センス、開始コドンに太字で、A t t B 1 部位をイタリック体で表す

10

【 0 0 8 9 】

【 化 1 6 】

5' *ggggacaagttgtacaaaaagca* **ggcttcacaatgtattgctctcttcga**gc 3'

20

) およびプライマー p r m 5 8 3 (リバース、相補的、終止コドンに太字で、A t t B 2 部位をイタリック体で表す

【 0 0 9 0 】

【 化 1 7 】

5' *ggggaccactttgtacaagaagc***gggtgcttgggtgcattcttgaga**atag 3'

) は、G a t e w a y (登録商標) 組換えのための A t t B 部位を含み、これらのプライマーを P C R 増幅のために使用した。P C R を、標準条件下で、H i f i T a q D N A ポリメラーゼを使用して行った。1 3 1 1 b p の P C R フラグメントを増幅し、標準的な方法を使用して精製した。P C R フラグメントをインビボで p D O N R 2 0 1 プラスミドで組換えて G a t e w a y (登録商標) 専門用語に従って「エントリークローン」p 7 5 4 を生成する間に、G a t e w a y (登録商標) 手順の最初の工程 (B P 反応) を行なった。プラスミド p D O N R 2 0 1 を、G a t e w a y (登録商標) 技術の一部として I n v i t r o g e n から購入した。

30

【 0 0 9 1 】

(実施例 2 : ベクター構築)

その後、サイクリン A 2 . 2 を含むエントリークローン p 7 5 4 を、O r y z a s a t i v a 形質転換のために使用する目的ベクターを用いた L R 反応で使用した。このベクターは、T - D N A ボーダー内に機能性要素として、植物選択マーカー、視覚マーカーおよびエントリークローンに既にクローニングされた目的の配列での L R インビボ組換えを意図する G a t e w a y (登録商標) カセットを含む。過剰発現のための P R O L A M I N プロモーター (P R O 9 0) を、この G a t e w a y カセットの上流に配置する。

40

【 0 0 9 2 】

L R 組換え工程の後、図 2 に示される得られた発現ベクター (サイクリン A 2 ; 2 : プロラミン - アップレギュレーション) をアグロバクテリウムに形質転換し、その後、O r y z a s a t i v a 植物に形質転換した。形質転換したイネ植物を成長させ、次いで、実施例 3 に記載されるパラメータについて試験した。

【 0 0 9 3 】

(実施例 3 : 評価および結果)

(A . 統計分析 - F 検定)

50

植物の表現型特徴の全体の評価のための統計モデルとして、二元配置 A N O V A (変異の分析) を使用した。本発明の遺伝子を用いて形質転換した全ての事象の全ての植物の測定した全てのパラメータに対して F 検定を行なった。全ての形質転換事象に対する遺伝子の効果の検査のため、および「包括的遺伝子効果 (g l o b a l g e n e e f f e c t) 」としても公知である遺伝子の全体的な効果を検証するために F 検定を行なう。F 検定の値が、そのデータが有意であることを示す場合、「遺伝子」効果が存在すると結論され、そのことは、表現型における差異を引き起こす遺伝子の存在または位置だけではないことを意味する。真の包括的遺伝子効果に対する有意性の閾値は、F 検定の 5 % の可能性のレベルにて設定される。

【 0 0 9 4 】

10

(B . 評価プロトコル)

約 1 5 ~ 2 0 の独立した T 0 イネ形質転換体を作製した。成長させ、T 1 種子を収穫するために、第 1 の形質転換体を組織培養チャンバから温室に移した。T 1 子孫が導入遺伝子の存在 / 非存在に関して 3 : 1 に分離したいくつかの事象を保持した。これらの事象のそれぞれについて、導入遺伝子を含む約 1 0 の T 1 芽生え (ヘテロ接合体およびホモ接合体) および導入遺伝子を欠く約 1 0 の T 1 芽生え (ヌル接合体) を選択した。

【 0 0 9 5 】

((i) 植物の成長の測定)

選択した T 1 植物 (導入遺伝子を有する約 1 0 個体および導入遺伝子を有さない約 1 0 個体) を温室に移した。各植物に、表現型を表すデータに対応する植物に明らかに結びつける固有のバーコード標識をつけた。選択した T 1 植物を、以下の環境設定で 1 0 c m の直径のポットで土壌で成長させた : 明期 = 1 1 . 5 時間、日光強度 = 3 0 , 0 0 0 ルクス以上、日中温度 = 2 8 以上、夜間温度 = 2 2 、相対湿度 = 6 0 ~ 7 0 % 。トランスジェニック植物およびその対応するヌル接合体を、無作為の位置で隣り合わせで成長させた。播種の段階から成熟の段階まで、各植物を、数回デジタル画像化キャビネットを通して画像化した。各時点で、各植物のデジタル画像 (2 0 4 8 × 1 5 3 6 ピクセル、1 6 0 0 万色) を、少なくとも 6 つの異なる角度から撮った。地上部分のようなパラメータは、画像分析ソフトウェアを用いた自動化した方法で、全ての植物のデジタル画像から導いた。

20

【 0 0 9 6 】

((i i) 種子の関連したパラメータの測定)

30

成熟した最初の円錐花序を収穫し、袋に詰め、バーコード標識し、次いで、3 7 にて、乾燥器内で 3 日間乾燥させた。次いで、その円錐花序を脱穀し、全ての種子を収集し、計数した。詰まった殻を送風デバイスを使用して空の殻から分離した。その空の殻を廃棄し、残る画分を再度計数した。詰まったさやを化学天秤にて秤量した。この手順により、以下に記載する種子に関連したパラメータのセットを得た。

【 0 0 9 7 】

((a) 総種子数)

総種子数を、植物から収穫した殻の数を計数することにより測定した。種子優先プロモーター (プロラミン) の制御下でサイクリン A 2 ; 2 を発現する植物由来の総種子数の結果を以下の表 2 に示す。

40

【 0 0 9 8 】

【 表 2 】

表 2 : 総種子数サイクリン A 2 ; 2 : 種子優先プロモーター (プロラミン)

総種子数					
株	TR	ヌル	差	差 (%)	p 値
全体	549.8	437.6	112.25	26	0.0397

構成的プロモーターの制御下でサイクリン A 2 ; 2 を発現する植物の総種子数 (データは示さず) は、プロラミンプロモーターにより駆動されるサイクリン A 2 ; 2 遺伝子を発現する植物から得た種子の総数より少なかった (上に示されることは、全体的遺伝子効果

50

を示す F 検定から有意な p 値を与えた)。

【 0 0 9 9 】

((b) 詰まった種子の数)

分離工程の後に残った詰まった殻の数を計数することにより、詰まった種子の数を決定した。種子優先プロモーター (プロラミン) の制御下でサイクリン A 2 ; 2 を発現する植物由来の詰まった種子の数に対する結果 (T 1 植物に対しては表 3 および T 2 植物に対しては表 4) を、構成的プロモーターの制御下でサイクリン A 2 ; 2 を発現する植物由来の詰まった種子の数に対する結果 (表 5) に対して以下に示す。

【 0 1 0 0 】

【 表 3 】

10

表 3 : T 1 評価 - 詰まった種子の数 サイクリン A 2 ; 2 : p プロラミン

詰まった種子の数					
株	TR	ヌル	差	差 (%)	p 値
全体	412.9	322.9	89.98	28	0.0261

この結果は、有意な全体的な遺伝子効果を示す (F 検定から有意な p 値を有する)。T 1 トランスジェニック植物は、コントロール植物に対して、詰まった種子の数の有意な増加を示す。

【 0 1 0 1 】

【 表 4 】

20

表 4 : T 2 評価 - 詰まった種子の数 サイクリン A 2 ; 2 : p プロラミン

詰まった種子の数					
株	TR	ヌル	差	差 (%)	p 値
全体	438.4	315.1	123.32	39	0.0139

この結果は、有意な全体的な遺伝子効果を示す (F 検定から有意な p 値を有する)。T 2 トランスジェニック植物は、コントロール植物に対して、詰まった種子の数の有意な増加を示す。

【 0 1 0 2 】

【 表 5 】

30

表 5 : 詰まった種子の数 サイクリン A 2 ; 2 : p GOS 2

詰まった種子の数					
株	TR	ヌル	差	差 (%)	p 値
全体	256.8	241.4	15.41	6	0.1007

この結果は、コントロール植物に対して、構成的プロモーターの制御下でサイクリン A 2 ; 2 を発現する植物の詰まった種子の数が増加していることを示すが、プロラミンプロモーターの制御下でサイクリン A 2 ; 2 を発現する植物は、より多い数の詰まった種子を示す (上記表 3 および表 4 を参照のこと)。

【 0 1 0 3 】

40

((c) 総種子収穫高)

植物あたりの総種子収穫高を、植物から収穫した全ての詰まった殻を秤量することにより測定した。p GOS 2 の制御下でサイクリン A 2 ; 2 を発現する植物由来の総種子収量 (表 8 を参照のこと) に対する p プロラミンの制御下でサイクリン A 2 ; 2 を発現する植物の総種子収量の結果 (T 1 の評価結果については、表 6 を、T 2 の評価結果については、表 7 を参照のこと) を、以下に示す。

【 0 1 0 4 】

【表 6】

表 6 : T 1 評価—総種子収穫高 サイクリン A 2 ; 2 : p プロラミン

詰まった種子の数					
株	TR	ヌル	差	差(%)	p 値
全体	9	6.9	2.07	30	0.0211

T 1 評価の結果は、F 検定の有意な p 値を伴って全体的遺伝子効果を示す。

【0 1 0 5】

【表 7】

表 7 : T 2 評価—総種子収穫高 サイクリン A 2 ; 2 : p プロラミン

詰まった種子の数					
株	TR	ヌル	差	差(%)	p 値
全体	9.5	6.6	2.85	43	0.0128

T 2 評価の結果は、F 検定の有意な p 値を伴って全体的遺伝子効果を示す。

【0 1 0 6】

【表 8】

表 8 : 総種子収穫高 サイクリン A 2 ; 2 : p GOS 2

詰まった種子の数					
株	TR	ヌル	差	差(%)	p 値
全体	6.3	5.7	0.6	11	0.0803

表 8 に示すように、サイクリン A 2 ; 2 を構成的に発現する植物の総種子収穫高は、種子優先発現に対する結果ほど良好ではない（上記表 6 および表 7 を参照のこと）。

【0 1 0 7】

（（d）収穫指数）

収穫指数を、本明細書中では、総種子収穫高と地上部分（ mm^2 ）との間の比に係数 10^6 を掛けたものとして定義する。種子優先プロモータープロラミンの制御下でサイクリン A 2 ; 2 を発現する植物の収穫指数を以下の表 9 に示す。

【0 1 0 8】

【表 9】

表 9 : 収穫指数 サイクリン A 2 ; 2 : p プロラミン

収穫指数					
株	TR	ヌル	差	差(%)	p 値
全体	103.7	83.4	20.29	24	0.0711

サイクリン A 2 ; 2 : p プロラミンを発現する植物の収穫指数は、全体的遺伝子効果が存在したことを示す（F 検定の p 値を参照のこと）。構成的プロモーターの制御下でサイクリン A 2 ; 2 を発現する植物に対する収穫指数（結果は示さず）は、上記表 9 に示される結果ほど良好ではなかった。

【0 1 0 9】

（（e）千穀重（TKW））

TKW を、計数した詰まった種子の数およびその総重量から推定する。サイクリン A 2 ; 2 : p GOS 2 を発現する植物の TKW（表 11 を参照のこと）に対するサイクリン A 2 ; 2 : p プロラミンを発現する植物の TKW の結果（表 10 を参照のこと）を以下に示す。

【0 1 1 0】

10

20

30

40

【表 1 0】

表 1 0 : TKW サイクリン A 2 ; 2 : p プロラミン

TKW					
株	TR	ヌル	差	差(%)	p 値
全体	21.1	19.9	1.26	6	0.108

全体的遺伝子効果は、F 検定の有意な p 値を示す上記表から明らかである。

【0 1 1 1】

【表 1 1】

表 1 1 : TKW サイクリン A 2 ; 2 : p G O S 2

TKW					
株	TR	ヌル	差	差(%)	p 値
全体	24	23.3	0.7	3	0.1509

10

サイクリン A 2 ; 2 : p G O S 2 に対する T K W の結果は、T K W の増加を示すが、その増加は、上の表 1 0 に示す増加ほど大きくはない。

【0 1 1 2】

((i i i) ストレス評価 : サイクリン A 2 ; 2 : p プロラミン)

種子を播種し、10 日後、芽生えを湿らせた砂とパーミキュライトの 1 : 1 混合物で満たした直径 10 c m のポットに移した。この直径 10 c m のポットを、担体が浸出するのを防止するために、一層のプラスチッククロスを二つのポットの間に備えて、直径 12 c m のポットに挿入した。次いで、このポットを、移植前に新鮮な水で浸漬した。移植後一日で、芽生えを塩条件に供した。このポットを一日あたり 4 回、午前 8 時、午前 12 時、午後 4 時および午後 9 時に、以下の成分を含有する栄養溶液を含む水で塩ストレスを与えた：

20

・ N P K 栄養分混合物、1 k g / m³ の濃度にて 20 - 20 - 20 P e t e r s p r o f e s s i o n a l (S c o t t s)

・ マグネシウムキレート薬、333 . 33 m l / m³ にて C h e l a l M g (B M S 、 B o r n e m 、 B e l g i u m)

・ イオンキレート薬、21 . 67 g / m³ にて L i b f e r (C I B A 、 B r a d f o r d 、 U K)

30

・ N a C l 1 . 425 k g / m³ 。

【0 1 1 3】

塩濃度を、週一回の頻度で、必要な場合追加してモニタリングした。種子が満ち始めるまで、植物を塩ストレス条件下で成長させた。この時点で、それらを温室の異なる区画に移動させ、そこでは、種子の収穫まで新鮮な水を毎日与えた。次いで、以下のパラメータを測定し、上記 (a) ~ (e) に示されるストレスを与えていない植物についても同様に記録した。

【0 1 1 4】

【表 1 2】

表 1 2 : 総種子収穫高 サイクリン A 2 ; 2 : p プロラミン

総種子重量					
株	TR	ヌル	差	差(%)	p 値
全体	1.3	0.9	0.47	55	0.0217

40

表 1 2 に示す結果は、塩ストレスによって例示されるストレス条件下でのサイクリン A 2 ; 2 : p プロラミンに対する F 検定の p 値から有意な遺伝子効果が明らかであることを示す。

【0 1 1 5】

【表 1 3】

表 1 3 : 詰まった種子の数 サイクリン A 2 ; 2 : p プロラミン

詰まった種子の数					
株	TR	ヌル	差	差(%)	p 値
全体	70.8	48.5	22.33	46	0.0396

表 1 3 に示す結果は、塩ストレスによって例示されるストレス条件下でのサイクリン A 2 ; 2 : p プロラミンに対する F 検定の p 値から有意な遺伝子効果が明らかであることを示す。

【0 1 1 6】

【表 1 4】

表 1 4 : 総種子数 サイクリン A 2 ; 2 : p プロラミン

総種子数					
株	TR	ヌル	差	差(%)	p 値
全体	140.7	105.1	35.55	34	0.0594

表 1 4 に示す結果は、コントロール植物に対する種子総数の増加を示す。

【0 1 1 7】

【表 1 5】

表 1 5 : 収穫指数 サイクリン A 2 ; 2 : p プロラミン

収穫指数					
株	TR	ヌル	差	差(%)	p 値
全体	62.1	30.4	31.64	104	0.3522

表 1 5 に示す結果は、コントロール植物に対する収穫指数の増加を示す。

【0 1 1 8】

【表 1 6】

表 1 6 : TKW サイクリン A 2 ; 2 : p プロラミン

TKW					
株	TR	ヌル	差	差(%)	p 値
全体	18.4	17.4	0.98	6	0.0269

表 1 6 に示す結果は、塩ストレスによって例示されるストレス条件下でのサイクリン A 2 ; 2 : p プロラミン植物に対する F 検定の p 値から有意な遺伝子効果が明らかであることを示す。

【0 1 1 9】

(実施例 4 : トウモロコシにおける本発明の適用)

本明細書に記載される本発明はまたトウモロコシに使用され得る。アグロバクテリウム媒介トウモロコシ形質転換に適した植物形質転換ベクター内の種子優先プロモーターの制御下でサイクリン A をクローニングする。このようなベクターおよびトウモロコシを形質転換するための方法は、文献 (欧州特許第 0 6 0 4 6 6 2 号、欧州特許第 0 6 7 2 7 5 2 号、欧州特許第 0 9 7 1 5 7 8 号、欧州特許第 0 9 5 5 3 7 1 号、欧州特許第 0 5 5 8 6 7 6 号、Ishida ら、1996 ; Frame ら、2002) に記載されている。

【0 1 2 0】

これらの方法により作製したトランスジェニック植物を、T1 種子産生のために温室で成長させる。導入遺伝子の遺伝可能性およびコピー数を、定量的リアルタイム PCR およびサザンブロット分析により調べ、その導入遺伝子の発現レベルを、リバース PCR およびノーザン分析により決定する。導入遺伝子の 1 コピーの挿入を有するトランスジェニック株、および導入遺伝子の発現のレベルが異なるトランスジェニック株を、T2 種子生成物について選択する。子孫の種子を発芽させ、温室内で、トウモロコシに適した条件 (1

10

20

30

40

50

6 : 8 光周期、日中温度 26 ~ 28 、夜間温度 22 ~ 24)、その上、水が不十分かつ、窒素が不十分かつ過剰な NaCl 条件下で成長させる。

【0121】

自家受粉の場合、同じ親株由来のヌル分離個体および同じ品種の野生型植物をコントロールとして使用する。自家受粉または交配により生じる子孫の植物を、種々の生物体量および成長パラメータ(植物の高さ、茎(stalk)/茎(stem)の太さ、葉の数、地上部分全体、葉の緑色、成熟までの時間、開花するまでの時間、開花時期、穂の数、穂の長さ、作条の数、穀粒の数、穀粒のサイズ、穀粒の油分含量、種子の成熟度、収穫時期が挙げられる)について評価する。上記パラメータのいずれかについて最も顕著に改善する株を、さらなる屋外試験および屋外で確認されたトランスジェニック特性を市販の生殖質に移す目的のマーカーにより補助された育種のために選択する。屋外での成長および収穫高に関連するパラメータについてトウモロコシを試験するための方法は、当該分野で十分確立されており、ある生殖質から別の生殖質に特定の遺伝子座(例えば、導入遺伝子を含む遺伝子座)を遺伝子移入ための技術のとおりである。この技術は、また、形質転換した近交系株から目的の特性を、所望の付加された作物学的な有用性または栄養的な有用性または医学的な有用性を有する市販のハイブリッドに移す工程を包含する。

10

【図面の簡単な説明】

【0122】

【図1】図1は、いくつかの全長サイクリンAタンパク質配列のアラインメントにより表した系統発生樹である(一部分のイネ配列を除く)。デフォルトの設定を用いたクラスタリングプログラムを使用してアラインメントし、系統発生図として視覚化した。示すように、4つの主要な群の配列クラスターが示される。

20

【図2】図2は、PROLAMINプロモーターの制御の下でのArabidopsis thalianaのサイクリンA2;2遺伝子のOryza sativa内での発現のためのバイナリーベクターである。このベクターは、レフトボーダー(LBリピート、LB-Ti-C58)およびライトボーダー(RBリピート、RB-Ti-C58)により限定されるTiプラスミド由来のT-DNAを含む。

【図3】図3は、サイクリンAに見出される種を越えて保存されるモチーフを示す表である。モチーフ1は、サイクリンAを他のいずれかの型のサイクリンから識別するために使用され得、モチーフ1およびモチーフ2は一緒に、A2サイクリンAを他のいずれかのA型のサイクリンから識別するために使用され得る。コントロールとして、サイクリンB;1に見出されるモチーフを示す。

30

【図4-1】図4は、本発明の方法に使用される配列の一覧である。

【図4-2】図4は、本発明の方法に使用される配列の一覧である。

【図 1】

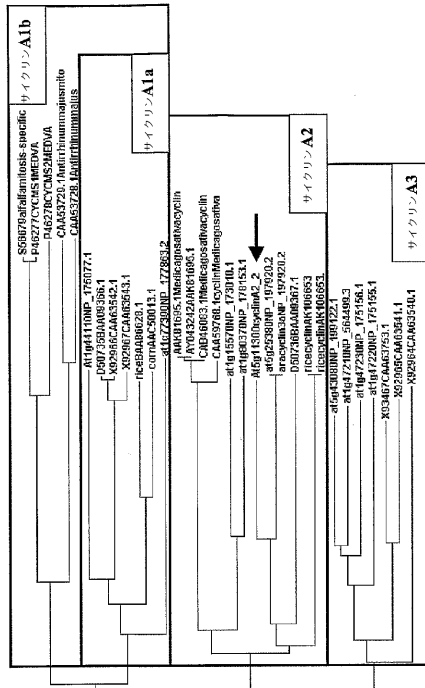


FIGURE 1

【図 2】

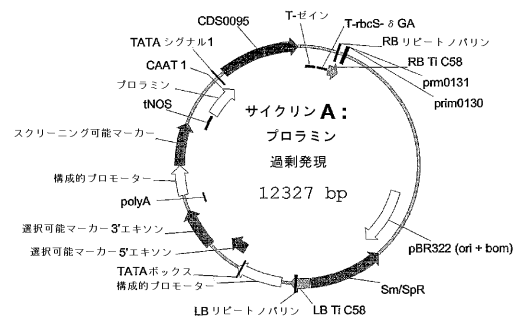


FIGURE 2

【図 3】

遺伝子名	植物登録	モチーフ1	モチーフ2
サイクリン A2:1	アラビドプシス At5g25380	WLVEVSEYKLVSDT	ELTLTEYTFRLFLPS
サイクリン A2:2	アラビドプシス At5g11300	WLVEVSDDYKLVSDT	ELTLVEYSFLRLFLPS
サイクリン A2:3	アラビドプシス At1g15570	WLVEVSEYTLASDT	ELTLIDYHFLKFLPS
サイクリン A2:4	アラビドプシス At5g43080	WLVEVSEYTLVPDT	ELTLMIDYFLKFLPS
サイクリン A2型	イネ AK106653	WLVEVSEYKLVSDT	ELTLIDYSFLKFLPS
サイクリン A2型	ウマゴヤシ AAK81695	WLVEVSEYKLVQANT	ELTLMNYGFLNFLPS
サイクリン A2型	タバコ BAA09367	WLVEVSEYRLVPDT	ELTLVDYGFLLKFLPS
サイクリン A1:1	アラビドプシス At1g44110	WLVEVSEYRLVPET	ELSLLLEYTMLSHPSPS
サイクリン A1:2	アラビドプシス At1g77390	WLVEVAEEYRLSPET	ELSLLDYAMLRYAPS
サイクリン A3:1	アラビドプシス at5g43080	WLVEVAEEYKLLSDT	ELSMLDYQSVKFLPS
サイクリン A1.1型	イネ BAA86628	WLVEVAEEYRLVPDT	ELSLLLEYNLLSYPPS
サイクリン B1:1	アラビドプシス At4g37490	WLIDVHVRFLNPET	ELGVMHYDTMIMFSPS

FIGURE 3

【図 4 - 1】

配列表

配列番号 1: サイクリン A2; 2 の DNA 配列 (851 位の C (四角で囲う) の代わりに G を含み、そして 1295 位の C (四角で囲う) の代わりに G を含む登録番号 NM_121168 の下で受託された配列のコード配列の改変体)

```

atgtattgtctctcttcgatgcatacaaatgcaacacaaagaaatatctctacttcagatgt
acaggagagttttgtacgaataacagagatcacgagctaaaaaagcattgggaagaggagat
caatacctccacacaaacacctctctttaaagcagcaaaagagacgtgcagctacttaaggatgtg
agtaatacctctgcagatattatttattcagaacttcgaagggaggagcaacatcaaggcaaa
cagaaaaatgtctaaaagagcctaaaaaagcagcaaaaggaaggtgctaacagtgccatggata
ttctggtagatgatgcatacagaaaaatcaaaattagcagaagatttgcagatcaggatg
gctgaagcccaagatgtctctctcttcaaacctttaaagatgaagaaattactgagcaacaaga
agatggtcagggtgctaatgaggttacttcaagttgtagatattgattccaaagtcgaagatc
cacagtggtgcagcttgcagatgatgatgatgatgatgatgatgatgatgatgatgatgatgat
caacgaccccttggcctaattatagggagcttgcagcagagatgcagccagacatgagaaa
gattctgattgactgcttgcagaaagttctgcagacacacagctgggttcagatagcgttt
accttaagtgaaatcttatcgacgggttctgtccaaagttacattgaaggaagcagactc
cagctcccltgggtctctcttcgatgcttatagcttcaaaaatgaagagcttccgcacagg
gggtggaggagtttgcctcattacggccacacacacacacacacacacacacacacacacacac
agattcaaatctaaattttgtgcactttagattatcgttctccacacacacacacacacacacac
aggcgttctattaaagcagctcaagctcgtlacaaggtgcttctcattgactgaggtatctt
agcaactatctgcggcaatgcagcgttgcaggttgcaggttgcaggttgcaggttgcaggttgc
taattgctgcttcagctgttttcttcagcggcgttgcaggttgcaggttgcaggttgcaggttgc
aacctactctgcacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacac
catggaggagacttgcagctcaacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacac
acacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacac
tcaagatga

```

配列番号 2: サイクリン A2; 2 のタンパク質配列 (284 位のプロリン (四角で囲う) の代わりにアルギニンを含み、そして 432 位のセリン (四角で囲う) の代わりにフェニルアラニンを含む登録番号 NP_568248 の下で受託された配列の改変体)

```

MYCSSSMIPNANKENISTSDVQESFVRITRSRAKKAMGRGVSIPTPKFSFKQKKRAVLKDV
SNTSADIYSELKRGGNKANKRKLKEPKKAKEGANSAMDILVDMHTEKSKLAEDLSKIRM
AEQDVSLNFKDEELTEQQEDSGVMELLQVVDIDSNVEDPCCSLYAADIYDNIHVAELQ
QRPLANMYELVQDIDPDMRKILIDWLVEVSDDYKLVDPDTLYLVNLDIFLSNYSYTERQRL
QLLGVSCLMIASKYEELSPGVVEFCFITANTYTRPEVLSMEIQILNFVHFLSVPTTKTFI
RRFIKAAQASYKVPFIELEYLANLAEITLVEYSFLRFLPSLIAASAVFLRWTLDTQTHPW
NPTLQHYTRYEVELKNTVLANEDLQNTSGCTLAATREKYNPKRFSVAKLTSKPRVLSLE
SR

```

FIGURE 4

【 図 4 - 2 】

配列番号 3 : プロラミンプロモーターの DNA 配列

```
cttctacatcggttaggtgtagcaacacgacttattattattattattattattatt  
atttacaaaaatataaaatagatcagtcctcaccacaagtagagcaagttggtgagttat  
tgtaagttctacaaagctaatttaaaagtattgcatcttatttctattacaaacaa  
gagtgtcaatggaacaatgaaacccatgacatactataatttggtttttattattgaaat  
tatataattcaaagagaataaaatccacatagccgttaaagttctacatgtggtgcattaccaa  
aatatataatagcttacaaaaacatgacaagcttagtttgaaaaattgcaatccttatcacatt  
gacacataaagttagtgatgagtcataatattatttcttggctaccatcatgtatatatg  
atagccacaagttactttgagtgaatatacaagaacatttttaggtgcacctaacagaat  
atocaaataatatgactcacttagatcataatagagcatcaagtaaaactaacactctaaag  
caaccgatgggaagcatctataaatagacaagcacaatgaaaatcctcatcatccttcac  
acaattcaaatattatagttgaagcatagtagta
```

配列番号 4 : プライマー配列 (プライマー PRM582)

ggggacaagtttgtacaaaaagcaggcttcacaatgtattgctcttctctgatgc

配列番号 5 : プライマー配列 (プライマー PRM583)

ggggaccactttgtacaagaagctgggtgcttggtgtoatttgagaatag

FIGURE 4 (続き)

【 配 列 表 】

2007515167000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/053683

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/82 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) IPC 7 C12N A01H		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search, EMBL		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/85946 A (CROPDESIGN N.V.; INZE, DIRK; BOUDOLF, VERONIQUE; DE VEYLDER, LIEVEN; AC) 15 November 2001 (2001-11-15) page 72 - page 74 examples 3,5 figure 10	1-20
X	WO 00/65040 A (PIONEER HI-BRED INTERNATIONAL, INC) 2 November 2000 (2000-11-02) examples 5,6 SEQ ID NO: 25 & 26	14-16, 18,19
A	WO 98/03631 A (THE SALK INSTITUTE FOR BIOLOGICAL STUDIES) 29 January 1998 (1998-01-29) the whole document	1-20
-/-		
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in 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		Date of mailing of the international search report
11 July 2005		28/07/2005
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Bucka, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP2004/053683

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	COCKCROFT C E ET AL: "CYCLIN D CONTROL OF GROWTH RATE IN PLANTS" NATURE, MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, GB, vol. 405, no. 6786, 2000, pages 575-579, XP000938947 ISSN: 0028-0836 the whole document -----	1-20
A	CHAUBET-GIGOT N: "PLANT A-TYPE CYCLINS" PLANT MOLECULAR BIOLOGY, NIJHOFF PUBLISHERS, DORDRECHT, NL, vol. 43, no. 5-6, August 2000 (2000-08), pages 659-675, XP001180004 ISSN: 0167-4412 the whole document -----	1-20
A	YU YU ET AL: "The tobacco A-type cyclin, Nicta;CYCA3;2, at the nexus of cell division and differentiation." PLANT CELL, vol. 15, no. 12, December 2003 (2003-12), pages 2763-2777, XP002335384 ISSN: 1040-4651 the whole document -----	1-20
A	WYRZYKOWSKA JOANNA ET AL: "Manipulation of leaf shape by modulation of cell division" DEVELOPMENT (CAMBRIDGE), vol. 129, no. 4, February 2002 (2002-02), pages 957-964, XP002335385 ISSN: 0950-1991 the whole document -----	1-20
A	ROUDIER FRANCOIS ET AL: "The Medicago species A2-type cyclin is auxin regulated and involved in meristem formation but dispensable for endoreduplication-associated developmental programs." PLANT PHYSIOLOGY (ROCKVILLE), vol. 131, no. 3, March 2003 (2003-03), pages 1091-1103, XP002335386 ISSN: 0032-0889 the whole document -----	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/053683

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0185946	A	15-11-2001	AU 7093601 A CA 2408038 A1 EP 1311680 A2 WO 0185946 A2 JP 2003532421 T	20-11-2001 15-11-2001 21-05-2003 15-11-2001 05-11-2003
WO 0065040	A	02-11-2000	AU 4459100 A WO 0065040 A2	10-11-2000 02-11-2000
WO 9803631	A	29-01-1998	US 6252139 B1 AU 742968 B2 AU 3960597 A BR 9710872 A CA 2260287 A1 EP 0929663 A1 JP 2000515020 T NZ 333767 A WO 9803631 A1 US 6166293 A US 6696623 B1 US 2001002490 A1 ZA 9706381 A	26-06-2001 17-01-2002 10-02-1998 17-08-1999 29-01-1998 21-07-1999 14-11-2000 28-02-2000 29-01-1998 26-12-2000 24-02-2004 31-05-2001 20-05-1997

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 ミロノブ, ブラディマー

ベルギー国 ビー - 9 0 0 0 ジェント, ゼブラストラート 1 1

Fターム(参考) 2B030 AD07 CA17 CB02

4B024 AA08 BA79 CA04 DA01 DA05 EA04 FA02 GA11 HA20