

(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
2017 年 1 月 5 日(05.01.2017)



(10) 国際公開番号
WO 2017/002945 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *A01H 5/02* (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/069536
- (22) 国際出願日: 2016 年 6 月 30 日(30.06.2016)
- (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 2015-133069 2015 年 7 月 1 日(01.07.2015) JP
- (71) 出願人: 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構(NATIONAL AGRICULTURE AND FOOD RESEARCH ORGANIZATION) [JP/JP]; 〒3058517 茨城県つくば市観音台 3-1-1 Ibaraki (JP). サントリーホールディングス株式会社(SUNTORY HOLDINGS LIMITED) [JP/JP]; 〒5300004 大阪府大阪市北区堂島浜二丁目 1 番 4 0 号 Osaka (JP).
- (72) 発明者: 野田 尚信(NODA, Naonobu); 〒3058519 茨城県つくば市観音台 3-1-1 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 野菜花き研究部門内 Ibaraki (JP). 間 竜太郎(AIDA, Ryutaro); 〒3050852 茨城県つくば市藤本 2-1 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 野菜花き研究部門内 Ibaraki (JP). 本郷 智(HONGO, Satoshi); 〒3050852 茨城県つくば市藤本 2-1 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 野菜花き研究部門内 Ibaraki (JP). 佐藤 早苗(SATO, Sanae); 〒3050852 茨城県つくば市藤本 2-1 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 野菜花き研究部門内 Ibaraki (JP). 田中 良和(TANAKA, Yoshikazu); 〒6190284 京都府相楽郡精華町精華台 8-1-1

サントリー ワールド リサーチセンター サントリーグローバルイノベーションセンター株式会社内 Kyoto (JP).

(74) 代理人: 青木 篤, 外(AOKI, Atsushi et al.); 〒1058423 東京都港区虎ノ門三丁目 5 番 1 号 虎ノ門 3 7 森ビル 青和特許法律事務所 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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, 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: METHOD FOR CONSTRUCTING CHRYSANTHEMUM WITH BLUE FLOWER COLOR

(54) 発明の名称: 青系花色を有するキクの作出方法

(57) Abstract: Provided are a transformed chrysanthemum plant having blue flower color, a self-fertilization posterity or a cross-fertilization posterity thereof, a vegetatively reproduced body thereof, and a part, a tissue or a cell of the plant body. Anthocyanin 3',5'-O-glucosyltransferase gene (CtA3'5'GT) originated from *Clitoria ternatea* and flavonoid 3',5'-hydroxylase gene derived from *Campanula* (CamF3'5'H) are coexpressed in chrysanthemum petals.

(57) 要約: 青系花色を有する形質転換キク植物、又はその自殖もしくは他殖後代、あるいはそれらの栄養繁殖体、植物体の一部、組織、又は細胞を提供する。 チョウマメ由来アントシアニン 3',5'-O-グルコシル基転移酵素遺伝子(CtA3'5'GT) 及びカンパニュラ由来フラボノイド 3',5'-水酸化酵素遺伝子 (CamF3'5'H) をキク花卉で共発現させる。



WO 2017/002945 A1

明 細 書

発明の名称：青系花色を有するキクの作出方法

技術分野

[0001] 本発明は、チョウマメ由来アントシアニン3',5'-O-グルコシル基転移酵素遺伝子(CtA3' 5' GT) 及びカンパニュラ由来フラボノイド3',5'-水酸化酵素遺伝子(CamF3' 5' H) をキク花卉で共発現させるための発現カセット、該発現カセットを含むベクター及び形質転換キク植物、又はその自殖もしくは他殖後代、あるいはそれらの栄養繁殖体、植物体の一部（特に切り花）もしくはその加工品（特に切り花加工品）、組織又は細胞、ならびに青系花色を有する形質転換キク植物を作製するための方法に関する。

背景技術

[0002] キク、バラ、カーネーション、ユリ等は世界的に産業上重要な花きである。特にキクは世界の花き産業においてバラに次ぐ市場規模を有し、日本国内では切り花産出量の4割、産出額の3割を占める第1位の花きである。しかしながら、上記主要花きでは、交雑可能な近縁種に青系の花色の野生種が無いなどの問題により、従来の交雑育種や突然変異育種では、青系花色を有する品種の作出は困難であった。全く新しい青系花色の創出は、花きの利用場面の拡大に伴う新たな需要を喚起し、生産や消費の拡大に繋がる。そこで、遺伝子工学的手法により青系花色をもつ花きが作出され、カーネーションとバラでは市販されるに至っている。ただ、これまでの青系花色を目指した花色改変では、紫色（RHSカラーチャート色相グループ：Purpleグループ）や青紫色（Purple-Violetグループ、Violetグループ）が限界であり、紫青色（Violet-Blueグループ）や青色（Blueグループ）の花色をもつ青色の花きは作出されていない。したがって、青色の花きは、リンドウ、デルフィニウムやブルースターなどに現在も限られており、真に青色の花色をもつ花きの作出を可能にするための青色発現制御技術の開発が依然として望まれている。

[0003] 花の青色化を目指した花色改変において、導入される遺伝子としてはF3' 5

' Hが知られている（特許文献1）。F3' 5' H単独または、内在性のF3' HやDFRの発現を抑制するコンストラクトと共に導入し、花卉のアントシアニンをデルフィニジン型にすることで青色方向に花色を改変できる（図1）。キクではCamF3' 5' H（非特許文献1，特許文献2）を導入すると、色相角315°程度の紫色（RHSカラーチャート Violetグループ 83）または青紫色（Violetグループ 88）に改変されることが知られている（特許文献3，非特許文献2）。また、パンジーF3' 5' H（特許文献1）の発現と内在性F3' Hの抑制で得られるキクでは、紫色（Purple-Violetグループ N82）や青紫色（Violetグループ 84）になることが知られている（特許文献4，非特許文献3）。さらに、A3' 5' OMT（特許文献5）とCamF3' 5' Hを共発現してマルビジン型アントシアニンを合成・蓄積させると、より青色側の色相角305°～315°（青紫色）を示すキクが得られる（非特許文献4）。カーネーション（非特許文献5）、バラ（特許文献6，非特許文献6）、ユリ（特許文献7）、ダリア（非特許文献7）、コチョウラン（特許文献8，特許文献9）でも同様に紫色や青紫色の花を持つ形質転換体を作出できることが報告されている。

[0004] F3' 5' H、A3' 5' OMT等を用いた従来の青色化技術では、紫色や青紫色の花色を作出できるが、Violet-BlueグループやBlueグループで色相角230°～290°を示す本当に青色の花色をもつ形質転換体は作出できない。また花の様々な青色発現機構が解明され（非特許文献8）、それらに關与する遺伝子として、分子内会合を引き起こす芳香族有機酸によるアントシアニンのポリアシル化（図2）（特許文献10，特許文献11，特許文献12，特許文献13，特許文献14，非特許文献9）、分子間会合を引き起こすアントシアニンと補助色素（コピグメント）の合成（特許文献15，特許文献16，特許文献17）、液胞内pHの調整（特許文献18，特許文献19）、液胞への金属イオンの輸送（特許文献20，非特許文献10）、金属錯体構成フラボンの合成（特許文献21）等を担う遺伝子も報告されているが、これらを導入した花きの青色化の成功例はない。また、芳香族有機酸によるポリアシル化はアントシアニンの糖残基に起きるが、この糖残基の付与を担うチョウマメ由

来アントシアニン3', 5'-O-グルコシル基転移酵素遺伝子(CtA3' 5' GT) が報告されている(特許文献22)。かかる遺伝子をデルフィニジン3-グルコシドを蓄積する藤色のロベリアに導入した結果、青色に花色が変化したことが報告されているが、花卉に蓄積しているアントシアニンの約70%は、ロベリア内在性の3'-アシル基転移酵素(3' AT)および5' ATの働きにより、3'位, 5'位のグルコシル基が芳香族アシル基により修飾されていた。このポリアシル化アントシアニンの蓄積がロベリアの青色への花色改変の要因であることから、CtA3' 5' GT導入による青色花の作出には、Ct3' ATなどの芳香族アシル基転移酵素遺伝子を共発現させることの必要性が示されている(非特許文献11)。事実、キクにCtA3' 5' GTだけ導入したとしても、青色化は達成されないことが判明している(参考例1, 2)。

青色発現機構を再現するためには複数の遺伝子を組み合わせて、その全ての遺伝子を機能させる必要があるが、導入する宿主で機能するとは限らないため、青色発現機構の解明やそれを担う遺伝子の報告例だけでは、真に青色の花を作出できるとは言えない。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：国際公開第2004/020637号

特許文献2：国際公開第2013/157502号

特許文献3：国際公開第2010/122849号

特許文献4：国際公開第2009/062253号

特許文献5：国際公開第2003/062428号

特許文献6：国際公開第2005/017147号

特許文献7：国際公開第2012/036290号

特許文献8：特許第5285304号公報

特許文献9：国際公開第2008/136434号

特許文献10：特許第4853853号公報

特許文献11：特許第4982782号公報

特許文献12：国際公開第1996/025500号

特許文献13：国際公開第2006/046780号

特許文献14：国際公開第2011/016260号

特許文献15：国際公開第2008/156211号

特許文献16：国際公開第2008/156214号

特許文献17：国際公開第2008/156206号

特許文献18：国際公開第2001/14560号

特許文献19：特許第507282号公報

特許文献20：特許第4958247号公報

特許文献21：国際公開第2012/096307号

特許文献22：特許第4418865号公報

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Biosci. Biotechnol. Biochem. (2003) 67:161

非特許文献2：Plant Cell Physiol (2013) 54:1684

非特許文献3：Plant Cell Physiol (2013) 54:1696

非特許文献4：ICP2014:251

非特許文献5：Phytochemistry (2003) 63:15

非特許文献6：Plant Cell Physiol (2007) 48:1589

非特許文献7：農耕と園藝(2012)10月号 p.42, 農業技術体系追録第15号330の1の192

非特許文献8：Nat Prod Rep (2009) 26:857

非特許文献9：Plant Cell Physiol (2015) 56:28

非特許文献10：Plos one (2012)7:e43189

非特許文献11：日本植物細胞分子生物学会つくば大会・シンポジウム講演要旨集 (2006) p.40

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明が解決しようとする課題は、青系花色を有する形質転換キク植物、

又はその自殖もしくは他殖後代、あるいはそれらの栄養繁殖体、植物体の一部、組織、又は細胞を提供することである。

課題を解決するための手段

[0008] 本願発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討し、実験を重ねた結果、チョウマメ由来アントシアニン3', 5' -O-グルコシル基転移酵素遺伝子(CtA3' 5' GT) 及びカンパニュラ由来フラボノイド3', 5' -水酸化酵素遺伝子(Ca mF3' 5' H) をキク花卉で共発現させると、従来得られなかった青系花色(RH Sカラーチャート第5版: Violet-Blueグループ/Blueグループかつ/または色相角: 230° ~290°) を有する形質転換キク植物が得られることを発見し、本発明を完成するに至った。

[0009] すなわち、本発明は、以下の通りである。

[1] 以下の(1-a) ~ (1-e) :

(1-a) 配列番号1の塩基配列からなるポリヌクレオチド;

(1-b) 配列番号1の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条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、アントシアニンの3' 位及び5' 位の水酸基に糖を転移する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;

(1-c) 配列番号2の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;

(1-d) 配列番号2のアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、及び/又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、アントシアニンの3' 位及び5' 位の水酸基に糖を転移する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; 及び

(1-e) 配列番号2のアミノ酸配列に対して90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ、アントシアニンの3' 位及び5' 位の水酸基に糖を転移する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; からなる群から選択される第1のポリヌクレオチド、及び

以下の(2-a) ~ (2-e) :

(2-a) 配列番号3の塩基配列からなるポリヌクレオチド；

(2-b) 配列番号3の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条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、フラボノイドの3'位及び5'位を水酸化する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；

(2-c) 配列番号4の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；

(2-d) 配列番号4のアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、フラボノイドの3'位及び5'位を水酸化する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；及び

(2-e) 配列番号4のアミノ酸配列に対して90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ、フラボノイドの3'位及び5'位を水酸化する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；

からなる群から選択される第2のポリヌクレオチドを含む、発現カセット。

[2] 前記第1のポリヌクレオチドに作動可能に連結された第1のプロモーター及び第1のターミネーター、ならびに前記第2のポリヌクレオチドに作動可能に連結された第2のプロモーター及び第2のターミネーターをさらに含む、[1]に記載の発現カセット。

[3] 前記第1のプロモーターがキクF3Hプロモーターであり、そして前記第1のターミネーターがアラビドプシスHSPターミネーター又はアグロバクテリウムnosターミネーターである、[2]に記載の発現カセット。

[4] 前記第2のプロモーターがキクF3Hプロモーターであり、そして前記第2のターミネーターがアラビドプシスHSPターミネーター又はアグロバクテリウムnosターミネーターである、[2]又は[3]に記載の発現カセット。

[5] [1]～[4]のいずれかに記載の発現カセットを含むベクター。

[6] [1]～[4]のいずれかに記載の発現カセットを含む形質転換キク植物、又はその自殖もしくは他殖後代、あるいはそれらの栄養繁殖体、植物体の

一部、組織、又は細胞。

[7] 花卉においてチョウマメ由来アントシアニン3',5'-O-グルコシル基転移酵素遺伝子(CtA3'5'GT)及びカンパニュラ由来フラボノイド3',5'-水酸化酵素遺伝子(CamF3'5'H)が共発現している、[6]に記載の形質転換キク植物、又はその自殖もしくは他殖後代、あるいはそれらの栄養繁殖体、植物体の一部、組織、又は細胞。

[8] デルフィニジン3-(6'-'-マロニル)グルコシド-3'5'-ジグルコシド(テルナチンC5)及び/またはデルフィニジン3,3',5'-トリグルコシド(プレテルナチンC5)を含有する、[6]又は[7]に記載の形質転換キク植物、又はその自殖もしくは他殖後代、あるいはそれらの栄養繁殖体、植物体の一部、組織、又は細胞。

[9] [6]～[8]に記載の形質転換キク植物又はその自殖もしくは他殖後代の切り花、あるいは該切り花から作成された加工品。

[10] 青系花色を有する形質転換キク植物を作製するための方法であって、

宿主に以下の(1-a)～(1-e)：

(1-a) 配列番号1の塩基配列からなるポリヌクレオチド；

(1-b) 配列番号1の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ント条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、アントシアニンの3'位及び5'位の水酸基に糖を転移する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；

(1-c) 配列番号2の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；

(1-d) 配列番号2のアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、及び/又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、アントシアニンの3'位及び5'位の水酸基に糖を転移する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；及び

(1-e) 配列番号2のアミノ酸配列に対して90%以上の同一性を有す

るアミノ酸配列を有し、かつ、アントシアニンの3'位及び5'位の水酸基に糖を転移する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；

からなる群から選択される第1のポリヌクレオチド、及び／又は

以下の(2-a)～(2-e)：

(2-a) 配列番号3の塩基配列からなるポリヌクレオチド；

(2-b) 配列番号3の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ント条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、フラボノイドの3'位及び5'位を水酸化する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；

(2-c) 配列番号4の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；

(2-d) 配列番号4のアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、フラボノイドの3'位及び5'位を水酸化する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；及び

(2-e) 配列番号4のアミノ酸配列に対して90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ、フラボノイドの3'位及び5'位を水酸化する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；

からなる群から選択される第2のポリヌクレオチドを導入する工程を含む、方法。

[11] [1]～[4]のいずれかに記載の発現カセット又は[5]に記載のベクターで宿主を形質転換することによって行われる、[10]に記載の方法。

[12] 前記青系花色が、RHSカラーチャートでBlueグループ又はViolet-Blueグループ、かつ／又はCIEL*a*b*表色系の色相角で230°～290°を示す、[11]に記載の方法。

[13] [10]～[12]のいずれかに記載の方法によって作成された形質転換キク植物、又はその自殖もしくは他殖後代、あるいはそれらの栄養繁殖体、植物体の一部、組織、又は細胞。

[14] [13]に記載の形質転換キク植物又はその自殖もしくは他殖後代の切り花、あるいは該切り花から作成された加工品。

発明の効果

[0010] 本発明により得られた青色花形質をもつキク形質転換体の花卉アントシアニン进行分析した結果、新たに合成された主要アントシアニンは、デルフィニジン3-(6' '-マロニル)グルコシド-3' 5' -ジグルコシド (テルナチンC5)、微量アントシアニンは、デルフィニジン3,3',5' -トリグルコシド (プレテルナチンC5)、デルフィニジン3-(3' ',6' '-ジマロニル)グルコシド-3' 5' -ジグルコシド、デルフィニジン3-(6' '-マロニル)グルコシド-3' -グルコシド、シアニジン3-(6' '-マロニル)グルコシド-3' -グルコシドであり、分子内会合により青色発現をする芳香族有機酸でポリアシル化されたアントシアニンなどは検出されなかった。すなわち、本発明により、アントシアニン3' 位及び5' 位を水酸化及び配糖化するだけで、キクに青色の花形質を付与することができる。本発明は、青色発現に必要とされてきた芳香族アシル基によるポリアシル化を必要としない従来の理論や技術とは全く異なる青色発現制御技術に基づく。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]F3' 5' H導入によりキク花卉で合成されるデルフィニジン配糖体を示す。

[図2]分子内会合を引き起こす芳香族有機酸によるアントシアニンのポリアシル化 (チョウマメのテルナチン生合成の例) を示す。

[図3]青色キク花卉に含まれる主要アントシアニンのHPLC-MS分析結果を示す。

[図4]青色キク花卉に含まれる主要アントシアニンの化学構造とLC-MS/MS分析結果を示す。

[図5]CamF3' 5' H及びCtA3' 5' GTを導入したキク花色の青色化を示す写真、及び青色キク花卉に含まれる主要アントシアニンのHPLC分析結果である。

[図6]CtA3' 5' GTを導入したキク花色を示す写真である。

[0012] 本発明は、以下の（１－ａ）～（１－ｅ）：

（１－ａ）配列番号１の塩基配列からなるポリヌクレオチド；

（１－ｂ）配列番号１の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条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、アントシアニンの３′位及び５′位の水酸基に糖を転移する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；

（１－ｃ）配列番号２の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；

（１－ｄ）配列番号２のアミノ酸配列において、１又は数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、アントシアニンの３′位及び５′位の水酸基に糖を転移する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；及び

（１－ｅ）配列番号２のアミノ酸配列に対して９０％以上の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ、アントシアニンの３′位及び５′位の水酸基に糖を転移する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；
からなる群から選択される第１のポリヌクレオチド、及び

以下の（２－ａ）～（２－ｅ）：

（２－ａ）配列番号３の塩基配列からなるポリヌクレオチド；

（２－ｂ）配列番号３の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条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、フラボノイドの３′位及び５′位を水酸化する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；

（２－ｃ）配列番号４の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；

（２－ｄ）配列番号４のアミノ酸配列において、１又は数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、フラボノイドの３′位及び５′位を水酸化する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；及び

(2-e) 配列番号4のアミノ酸配列に対して90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ、フラボノイドの3'位及び5'位を水酸化する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；
からなる群から選択される第2のポリヌクレオチドを含む、発現カセット、に関する。

[0013] 本明細書中、用語「ポリヌクレオチド」は、DNA又はRNAを意味し、本発明の発現カセットにおいて、第1のポリヌクレオチドは、チョウマメ由来アントシアニン3',5'-O-グルコシル基転移酵素又はその類似体をコードし、そして、第2のポリヌクレオチドは、カンパニュラ由来フラボノイド3',5'-水酸化酵素又はその類似体をコードする。ここで、「コードする」とは、着目のタンパク質をその活性を備えた状態で発現させるということを意味している。また、「コードする」とは、着目のタンパク質を連続する構造配列（エクソン）としてコードすること、又は介在配列（イントロン）を介してコードすることの両者の意味を含んでいる。

[0014] アントシアニン3',5'-O-グルコシル基転移酵素は、アントシアニンの3'位及び5'位水酸基に糖を逐次的に転移する反応を触媒する酵素であり、チョウマメの青色花卉から見出されている。チョウマメの花弁は、アントシアニンの水酸基のうち3'位及び5'位がともに配糖化され、さらに芳香族アシル基による修飾を受けたポリアシル化デルフィニジンが蓄積することにより、青色に発色していると考えられている。また、フラボノイド3',5'-水酸化酵素は、フラボノイドの3'位及び5'位を水酸化する酵素であり、カンパニュラの青色花卉などから見出されている。F3'5'Hが発現した花卉では、デルフィニジン型アントシアニンが多く蓄積し、これにより藤色、紫色、青紫色や青色に発色することが可能になっていると考えられている。しかしながら、キク植物は、アントシアニン3',5'-O-グルコシル基転移酵素をコードする遺伝子およびフラボノイド3',5'-水酸化酵素をコードする遺伝子をもとに有していない。また、キクは六倍体という高次倍数性を有し、かつゲノムサイズも大きいことから、形質転換効率が低いのに加えて、導入遺伝子の

サイレンシング（不活化）が起こることもあり、これらの遺伝子を導入して、安定に発現する遺伝子組換えキクを得ることは容易ではない。さらに、CtA 3' 5' GT又はCamF3' 5' Hのいずれかを導入したとしても、花卉の青色化は生じず、これまでに青系花色を有する形質転換キク植物は知られていない。

[0015] 本明細書中、用語「ストリンジェント条件」とは、ポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドと、ゲノムDNAとの選択的かつ検出可能な特異的結合を可能とする条件である。ストリンジェント条件は、塩濃度、有機溶媒（例えば、ホルムアミド）、温度、及びその他公知の条件の適当な組み合わせによって定義される。すなわち、塩濃度を減じるか、有機溶媒濃度を増加させるか、又はハイブリダイゼーション温度を上昇させるかによってストリンジェンシー（stringency）は増加する。さらに、ハイブリダイゼーション後の洗浄の条件もストリンジェンシーに影響する。この洗浄条件もまた、塩濃度と温度によって定義され、塩濃度の減少と温度の上昇によって洗浄のストリンジェンシーは増加する。したがって、用語「ストリンジェント条件」とは、各塩基配列間の「同一性」の程度が、例えば、全体の平均で約80%以上、好ましくは約90%以上、より好ましくは約95%以上、さらに好ましくは97%以上、最も好ましくは98%以上であるような、高い同一性を有する塩基配列間のみで、特異的にハイブリダイズするような条件を意味する。「ストリンジェント条件」としては、例えば、温度60℃～68℃において、ナトリウム濃度150～900mM、好ましくは600～900mM、pH6～8であるような条件を挙げることができ、具体例としては、5×SSC（50mM NaCl、75mM クエン酸三ナトリウム）、1%SDS、5×デンハルト溶液50%ホルムアルデヒド、及び42℃の条件でハイブリダイゼーションを行い、0.1×SSC（15mM NaCl、1.5mM クエン酸三ナトリウム）、0.1%SDS、及び55℃の条件で洗浄を行うものを挙げることができる。

[0016] ハイブリダイゼーションは、例えば、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー（Current protocols in molecular biology (edited by Frederick M. Ausubel et al., 1987)）に記載の方法等、当業界

で公知の方法あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。このようなハイブリダイゼーションによって選択される遺伝子としては、天然由来のもの、例えば、植物由来のもの、植物由来以外のものであってもよい。また、ハイブリダイゼーションによって選択される遺伝子はcDNAであってもよく、ゲノムDNAであっても化学合成したDNAでもよい。

[0017] 上記「1又は数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列」とは、例えば1～20個、好ましくは1～5個、より好ましくは1～3個の任意の数のアミノ酸が欠失、置換、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列を意味する。遺伝子工学的手法の一つである部位特異的変異誘発法は特定の位置に特定の変異を導入できる手法であることから有用であり、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989等に記載の方法に準じて行うことができる。この変異DNAを適切な発現系を用いて発現させることにより、1又は数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質を得ることができる。

また、ポリヌクレオチドは、当業者に公知の方法、例えば、ホスホアミダイド法等により化学的に合成する方法、植物の核酸試料を鋳型とし、目的とする遺伝子のヌクレオチド配列に基づいて設計したプライマーを用いる核酸増幅法などによって得ることができる。

[0018] 本明細書中、用語「同一性」とは、ポリペプチド配列（又はアミノ酸配列）あるいはポリヌクレオチド配列（又は塩基配列）における2本の鎖の間で該鎖を構成している各アミノ酸残基同志又は各塩基同志の互いの適合関係において同一であると決定できるようなものの量（数）を意味し、二つのポリペプチド配列又は二つのポリヌクレオチド配列の間の配列相関性の程度を意味するものであり、「同一性」は容易に算出できる。二つのポリヌクレオチド配列又はポリペプチド配列間の同一性を測定する方法は数多く知られてお

り、用語「同一性」は、当業者には周知である（例えば、Lesk, A. M. (Ed.) , Computational Molecular Biology, Oxford University Press, New York, (1988); Smith, D. W. (Ed.), Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Academic Press, New York, (1993); Griffin, A. M. & Griffin, H. G. (Ed.), Computer Analysis of Sequence Data: Part I, Human Press, New Jersey, (1994); von Heinje, G., Sequence Analysis in Molecular Biology, Academic Press, New York, (1987); Gribskov, M. & Devereux, J. (Ed.), Sequence Analysis Primer, M-Stockton Press, New York, (1991)等参照）。

[0019] また、本明細書に記載される「同一性」の数値は、特に明示した場合を除き、当業者に公知の同一性検索プログラムを用いて算出される数値であってよいが、好ましくは、MacVectorアプリケーション（バージョン9.5 Oxford Molecular Ltd., Oxford, England）のClustalWプログラムを用いて算出される数値である。本発明において、各アミノ酸配列間の「同一性」の程度は、例えば、約80%以上、好ましくは約90%以上、より好ましくは約95%以上、さらに好ましくは約97%以上、最も好ましくは約98%以上である。

[0020] 生来の塩基配列を有する遺伝子は、例えば、DNAシーケンサーによる解析によって得られる。また、修飾されたアミノ酸配列を有する酵素をコードするポリヌクレオチドは生来の塩基配列を有するポリヌクレオチドを基礎として、常用の部位特定変異誘発やPCR法を用いて合成することができる。例えば、修飾したいポリヌクレオチド断片を生来のcDNA又はゲノムDNAの制限酵素処理によって得て、これを鋳型にして、所望の変異を導入したプライマーを用いて部位特定変異誘発やPCR法を実施し、所望の修飾したポリヌクレオチド断片を得る。その後、この変異を導入したポリヌクレオチド断片を目的とする酵素の他の部分をコードするDNA断片と連結すればよい。

あるいは短縮されたアミノ酸配列からなる酵素をコードするポリヌクレオチドを得るには、例えば、目的とするアミノ酸配列より長いアミノ酸配列、

例えば、全長アミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを所望の制限酵素により切断し、その結果得られたポリヌクレオチド断片が目的とするアミノ酸配列の全体をコードしていない場合は、不足部分の配列からなるDNA断片を合成し、連結すればよい。

[0021] また、得られたポリヌクレオチドを大腸菌及び酵母での遺伝子発現系を用いて発現させ、酵素活性を測定することにより、得られたポリヌクレオチドが所望の活性を有するタンパク質をコードすることを確認することができる。さらに、当該ポリヌクレオチドを発現させることにより、ポリヌクレオチド産物である所望の活性を有するタンパク質を得ることができる。あるいは、配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドに対する抗体を用いても、アントシアニンの3'位及び5'位の水酸基に糖を転移する活性を有するタンパク質を取得することができ、かかる抗体を用いて他の生物由来のアントシアニンの3'位及び5'位の水酸基に糖を転移する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クローン化することもできる。同様に、配列番号4に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドに対する抗体を用いても、フラボノイドの3'位及び5'位を水酸化する活性を有するタンパク質を取得することができ、かかる抗体を用いて他の生物由来のフラボノイドの3'位及び5'位を水酸化する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クローン化することもできる。

[0022] 本明細書中、「発現カセット」は、ポリヌクレオチドにプロモーターとターミネーターが任意に連結したポリヌクレオチド断片を意味する。本発明の発現カセットは、チョウマメ由来アントシアニン3',5'-O-グルコシル基転移酵素又はその類似体をコードする第1のポリヌクレオチド、及びカンパニュラ由来フラボノイド3',5'-水酸化酵素又はその類似体をコードする第2のポリヌクレオチドに、それぞれ、作動可能に連結された第1のプロモーター及び／又は第1のターミネーター、ならびに、前記第2のポリヌクレオチドに作動可能に連結された第2のプロモーター及び／又は第2のターミネーターをさらに含むことができる。

[0023] 本発明の発現カセットに用いられるプロモーター及びターミネーターは、
チョウマメ由来アントシアニン3′, 5′-O-グルコシル基転移酵素遺伝子(CtA3′, 5′ GT) 及びカンパニュラ由来フラボノイド3′, 5′-水酸化酵素遺伝子(CamF3′, 5′ H) をキク花卉で共発現させることができる限り特に制限されないが、
前記第1のプロモーターは、好ましくはキクF3Hプロモーター、特にキクF3H1k及びキクF3H500であり、前記第1のターミネーターは、好ましくはアラビドプシスHSPターミネーター又はアグロバクテリウムnosターミネーターであり、
前記第2のプロモーターは、好ましくはキクF3Hプロモーターであり、
そして前記第2のターミネーターは、好ましくはアラビドプシスHSPターミネーター又はアグロバクテリウムnosターミネーターである。

[0024] 本発明は、前記発現カセットを含む（組換え）ベクター、特に発現ベクター、さらに該ベクターによって形質転換されたキク植物にも関する。

[0025] さらに、本発明は、アントシアニンの3′位及び5′位の水酸基に糖を転移する活性を有するタンパク質をコードする前記第1のポリヌクレオチド、及び／又はフラボノイドの3′位及び5′位を水酸化する活性を有するタンパク質をコードする前記第2のポリヌクレオチドを外因性ポリヌクレオチドとして宿主に導入することによって得られる形質転換キク植物、又はその自殖もしくは他殖後代、あるいはそれらの栄養繁殖体、植物体の一部、組織、又は細胞に関する。ポリヌクレオチドの導入は、宿主を本発明の発現カセット又はベクターで形質転換することによって達成できる。あるいは、宿主において、チョウマメ由来アントシアニン3′, 5′-O-グルコシル基転移酵素遺伝子(CtA3′, 5′ GT) 又はカンパニュラ由来フラボノイド3′, 5′-水酸化酵素遺伝子(CamF3′, 5′ H) のいずれかが発現している場合には、前記第1のポリヌクレオチド又は第2のポリヌクレオチドのうち、一方を宿主に導入するだけでよい。

[0026] 現在の技術水準の下では、植物にポリヌクレオチドを導入し、そのポリヌクレオチドを構成的又は組織特異的に発現させるために、当業者に公知の方法、例えば、アグロバクテリウム法、バイナリーベクター法、エレクトロポ

レーション法、PEG法、パーティクルガン法等によって行なうことができる。

[0027] 本明細書中、用語「キク植物（単に「キク」ともいう）」とは、キク科（*Asteraceae*）のキク属（*Chrysanthemum*）の植物を意味する。キク属（*Chrysanthemum*）には、一般に野菊と呼ばれる、ノジギク（*C. japonense*）、チョウセンノギク（*C. zawadskii* var. *latilobum*）、ハイシマカンギク（*C. indicum* var. *procumbens*）、イワギク（*C. zawadskii*）、イソギク（*C. pacificum*）などがある。そして一般にイエギクや栽培ギクとも呼ばれ、野生種間の交雑などによりスプレー菊、大菊、小菊などの多様に品種改良された、キク（*Chrysanthemum morifolium*；旧種小名：*Dendranthema grandiflora*, *Chrysanthemum grandiflorum*）がある。本発明において宿主に用いられるキク植物の種類については特に制限されず、スプレー菊、輪菊、ポットマムなど仕立て用途の違いで選抜・育種された様々なキクの品種・系統や、アネモネ咲き、デコラ咲き、ポンポン咲き、デージー咲き（一重咲き）など花形の違いを有する多様なキクの品種・系統を用いることができる。以下の実施例においても、宿主としてセイショール（S39）、大平、T27、セイアラベラ（T34）、T37、カンデラティエラ、T10、T24、T44、T57といった多様な品種・系統（色相角の平均値：55°程度～0°（360°）～337°程度；RHSカラーチャート：49C-DのRedグループ～Red-Purpleグループ～75B-CのPurpleグループ）においても、RHSカラーチャート第5版（英国王立園芸協会）でBlueグループもしくはViolet-Blueグループ、又は色彩色差計や色彩分光計などで測定して得られるCIEL*a*b*表色系の色相角で230°～290°の青系花色を示すことが実証されている。

[0028] 宿主に用いたRedグループ、Red-Purpleグループ及びPurpleグループの花色を示すキク植物の主要アントシアニンは、シアニジン3-(6'-マロニル)グルコシド及びシアニジン3-(3',6'-ジマロニル)グルコシドである。カンパニュラなどのF3'5'H遺伝子を導入し機能させることで得られる形質転換キクの主要アントシアニン、デルフィニジン3-(6'-マロニル)グルコ

シドであり、微量のデルフィニジン3-(3' ', 6' ' -ジマロニル)グルコシドも含まれる。シアニジン3-(6' ' -マロニル)グルコシド及びシアニジン3-(3' ', 6' ' -ジマロニル)グルコシドの可視吸収極大波長は518nmであるのに対し、デルフィニジン3-(6' ' -マロニル)グルコシドでは527nmである。この長波長側へのシフトによってデルフィニジン3-(6' ' -マロニル)グルコシドを主に含む形質転換キクは紫色や青紫色を示す。一方、カンパニュラF3' 5' H遺伝子とともにチョウマメA3' 5' GT遺伝子をキク花卉で発現させることにより作出された青いキクは、主要色素としてデルフィニジン3-(6' ' -マロニル)グルコシド-3' , 5' -ジグルコシド (テルナチンC5) を含み、微量色素としてテルナチンC5の脱マロニル体であるデルフィニジン3, 3' , 5' -トリグルコシド (プレテルナチンC5) 、デルフィニジン3-(3' ', 6' ' -ジマロニル)グルコシド-3' 5' -ジグルコシド、デルフィニジン3-(6' ' -マロニル)グルコシド-3' -グルコシド、そしてシアニジン3-(6' ' -マロニル)グルコシド-3' -グルコシドを含むことが判明した。青いキクの主要アントシアニンであるデルフィニジン3-(6' ' -マロニル)グルコシド-3' , 5' -ジグルコシド (テルナチンC5) は、可視吸収極大波長が512nmであり、もとの赤やピンク色の主要アントシアニンであるシアニジン3-(6' ' -マロニル)グルコシドよりも短波長側にシフトしていた。これは、デルフィニジン3-(6' ' -マロニル)グルコシド-3' , 5' -ジグルコシド (テルナチンC5) はもとの色素よりも赤いにもかかわらず、キクの花弁を青色にしていることを意味する。したがって、デルフィニジン3-(6' ' -マロニル)グルコシド-3' , 5' -ジグルコシド (テルナチンC5) とキクの内在性のコピグメント物質などが相互作用することなどにより、花卉は青色発現していると考えられるが、デルフィニジン3-(6' ' -マロニル)グルコシド-3' , 5' -ジグルコシド (テルナチンC5) のようなアントシアニンB環の3' 位及び5' 位水酸基がともに配糖化された赤色アントシアニンが青色発現をする例はこれまで報告されておらず、本発明は、青色発現に必要とされてきた芳香族アシル基によるポリアシル化を必要としない従来の理論や技術とは全く異なる青色発現制御技術に基づくものである。

[0029] さらに、本発明は、上記で得られた形質転換キク植物又はその自殖もしくは他殖後代の切り花、あるいは該切り花から作成された加工品（特に切花加工品）にも関する。ここで、切花加工品としては、当該切花を用いた押し花、プリザードフラワー、ドライフラワー、樹脂密封品などを含むが、これに限定されるものではない。

[0030] 以下、実施例により、本発明を具体的に説明する。

分子生物学的手法は特に断らない限り、Molecular Cloning (Sambrook and Russell, 2001)に依った。増幅したPCR産物やクローニングにより得られたプラスミドはDNA配列にエラーがないことを塩基配列を確認することにより決定した。

実施例

[0031] [実施例1：キク品種「大平」へのpB423の導入（キクF3Hプロモーター1kとアグロバクテリウムnosターミネーター制御下でのチョウマメA3' 5' GT遺伝子及びキクF3Hプロモーター1kとアラビドプシスHSPターミネーター制御下でのカンパニュラF3' 5' H遺伝子の共発現）]

[1] ベクターの構築

鋳型にpBluescript SK- gF3H9(菅野ら (2001) 園学雑70 (別2) 193)を用い、HANS-F3Hpro1k-Fd (5' -CCAAGCTTGGCGCGCCGCGCGCATTTAAATTTACAAAACCA TGTGCAAGAATG-3' ; 下線部はF3Hプロモーター領域を含むDNAとアニールする配列である ; 配列番号5) とSNM-F3Hpro-Rv (5' -ACTAGTGCTAGCAGCGTTTTTTA TTTTTCTTCACACACTTG-3' ; 下線部はF3Hプロモーター領域を含むDNAとアニールする配列である ; 配列番号6) をプライマーに用いたPCRにより、5' 側にHindIII, AscI, NotI, SmaI制限酵素サイト、3' 側にSpeI, NheI制限酵素サイトを付加したCmF3Hプロモーター1kを含むDNA断片を増幅し、pGEM-T easy (Promega) にTAクローニングした後、HindIIIとSpeIで消化してDNA断片を得た。

pBI221を鋳型に、SSS-NOSter-Fd (5' -GAGCTCACTAGTGTGACGATCGTTCAAACAT TTGCAATAAAG-3' ; 下線部はNOSターミネーター領域を含むDNAとアニールす

る配列である；配列番号 7) と ESP-NOSter-Rv (5' -CGAATTCAGGCCTGTTTAAACG ATCTAGTAACATAGATGACAC-3'；下線部は NOS ターミネーター領域を含む DNA とアニールする配列である；配列番号 8) をプライマーに用いた PCR により、5' 側に SacI, EcoICRI (Ecl136II), SpeI, SalI 制限酵素サイト、3' 側に PmeI, SrfI, EcoRI 制限酵素サイトを付加した アグロバクテリウム nos ターミネーターを含む DNA 断片を増幅し、pCR2.1 (Invitrogen) に TA クローニングした後、SacI と EcoRI で消化し、アグロバクテリウム nos ターミネーターを含む DNA 断片を得た。

制限酵素サイトを付加した CmF3H プロモーター 1k の DNA 断片及び NOS ターミネーターの DNA 断片それぞれを、pBI221 の CaMV 35S プロモーターを含む HindIII-XbaI 領域、NOS ターミネーターを含む SacI-EcoRI 領域に入れ替えた後、HindIII と EcoRI で消化して得られる HANS-CmF3Hp1k:GUS:NOS^t-PSE カセットと、pSPOR T2 (Invitrogen) を HindIII と EcoRI で消化して得られるプラスミド断片を連結して、バイナリーベクターに連続的に遺伝子発現カセットを結合させるためのエントリーベクターである pMCE5 を得た。

[0032] バイナリーベクターに連続的に遺伝子発現カセットを連結させるためのエントリーベクター pMCE5 のプロモーター 5' 側の制限酵素サイトを HindIII, FseI, AscI, StuI, SwaI に改変するとともに、ターミネーターを アグロバクテリウム nos ターミネーターから アラビドプシス heat shock proteins (HSP) 18.2 ターミネーター (AtHSP^{ter}, Plant Cell Physiol. 51(2): 328-332 (2010)；配列番号 37) に入れ替えた pMCE5-2 を作製した。AtHSP^{ter} の 5' 側には EcoICRI, SacI, SpeI, SalI 制限酵素サイトを 3' 側には SrfI, SmaI, PmeI, EcoRI, KpnI を付与した。

pBluescript SK- gF3H9 を鋳型に、hFAS^tSw-proCmF3H-Fd (5' -AAGCTTGGCCG GCCTAGGCGCGCCAGGCCTATTTAAATTTACAAAACCATGTGCAAGAATG-3'；下線部は F3H プロモーター領域の DNA にアニールする配列である；配列番号 9) と SNM-F3Hpro-Rv (5' -ACTAGTGCTAGCACGCGT TTTTTATTTTTCTTCACACACTTG-3'；下線部は F3H プロモーター領域の DNA にアニールする配列である；配列番号 6) をプライマ

ーに用いたPCRにより増幅したDNA断片をpCR-BluntII-TOPO (Life Technologies) にクローニングし、pCR-FASS-CmF3Hpro1k を得た。このプラスミドをHindIIIとNheIで消化して得られるFASS-CmF3Hpro1kのDNA断片と、pMCE5をHindIIIとSpeIで消化して得られるプラスミドのDNA断片を連結して、pMCE5-FASSを得た。

pCR-HSPを鋳型に、SSS-terHSP-Fd (5' -GAGCTCACTAGTGTGACATATGAAGATGAAGATGAAAT-3' ; 下線部はAtHSPterとアニールするDNA配列である ; 配列番号 10) とKESP-terHSP-Rv (5' -GGTACCGGTCCGGAATTCGTTTAAACGCCCGGCCTTATCTTTAATCATATTCCATAGTCC-3' ; 下線部はAtHSPterとアニールするDNA配列である ; 配列番号 11) をプライマーに用いたPCRで増幅したDNA断片をpCR-BluntII-TOPO (Life Technologies) にクローニングし、pCR-SSS-AtHSPter-PSEKを得た。このプラスミドをKpnIとSacIで消化して得たAtHSPterのDNA断片をpMCE5-FASSをSacIとKpnIで消化したベクターDNA断片と連結し、pMCE5-2を得た。

[0033] pMCE5-2をNheIとEcoICRIで消化して得られるプラスミドのDNA断片と、pCR ADHNF-Campanula F3' 5' H (特許5697040号) のKpnI消化産物を平滑末端化した後に、XbaIで消化して得られる約1.7kbのDNA断片を連結し、pMCE5-2 ADHNF-CamF3' 5' Hを得た。このプラスミドをAscIとPmeIで消化して得られる発現カセットのDNA断片と、参考例2で得たpB249をAscIとSwaIで消化し得られるバイナリーベクターのDNA断片を連結することで、pB423 (pBCtA3' 5' GT+Cam F3' 5' H) を得た。

[0034] [2] 形質転換体の獲得及びその花色の測定

pB423を導入したアグロバクテリウムEHA105 (Hood, E.E. et al. (1993) New Agrobacterium helper plasmids for gene transfer to plants. Transgenic Res. 2, 208-218, Dr. Elizabeth E. Hood氏より分譲) を用いて、ピンク色系で中輪ギクのキク品種「大平」(花き研で無菌培養により維持している遺伝資源を供試) を形質転換し、46系統の形質転換体を得た。色彩分光計 (CD100, 横河インスツルメンツ) とRHSカラーチャートでの測色を行った結果、26系統 (57%) で青色方向への花色の変化が認められた。色彩分光計によ

る測定は最低3花弁を測定し、その平均値を算出した。色相角 (Hue°) は $\arctan(b^*/a^*)$ 、彩度 (C*値) は $(a^2 + b^2)^{1/2}$ で算出した。そのうちの22系統 (全体の48%) で、色相角290° 以下の青色を示し、また22系統 (全体の48%) で、RHSカラーチャートのViolet-Blueグループの花色を示した。このCamF3' 5' HをキクF3HプロモーターとアラビドプシスHSPターミネーターで発現させるとともに、チョウマメA3' 5' GTをキクF3Hプロモーターで発現させるpB423が、最も単純な遺伝子導入コンストラクトであり、48%という高い割合で青いキクを得られた。また、カンパニュラ由来F3' 5' H遺伝子のターミネーターをアラビドプシスHSPにすることで、アグロバクテリウムnosターミネーターを用いた場合 (実施例4, 12-18) と比べて高い割合で青いキクが作出された。

[0035] 青色形質を付与されたキク品種「大平」に含まれるアントシアニンを液体クロマトグラフ・質量スペクトル (ACQUITY UPLC・タンデム四重極MS ACQUITY TQD, 日本ウォーターズ) により分析した。溶媒Aに1%ギ酸含有蒸留水、溶媒Bに1%ギ酸含有アセトニトリルを用いた。溶媒の流速を0.1ml/分とし、0-5分間に溶媒Bを0から5%にし、5-20分間に5%から35%にし、その後20-25分間35%を維持するグラジエント溶出を行った。カラムにはガードカラムVanGuard (日本ウォーターズ) を連結した、ACQUITY UPLC BEH C18 1.7 μ m (2.1 i.d. $\times$ 100mm; 日本ウォーターズ) を用い、カラム温度35°Cで分析した。フォトダイオードアレイで得られたスペクトルデータを530nmで解析した結果、保持時間約9分 (ピーク1)、10.5分 (ピーク2)、12.7分 (ピーク3) にアントシアニンのピークが認められた (図3)。それぞれの質量 ($[M+H]^+$) は、最も主要なピーク2がm/z 875、ピーク1がm/z 789、ピーク3がm/z 697であった。また、各ピークの吸収スペクトル測定、チョウマメより調整した標品との比較、LC-MS/MS分析 (図4) などの結果より、ピーク1はデルフィニジン3,3',5'-トリグルコシド (プレテルナチンC5)、ピーク2はデルフィニジン3-(6'-マロニル)グルコシド-3',5'-ジグルコシド (テルナチンC5)、ピーク3はシアニジン3-(6'-マロニル)グルコシド-3'-グルコシドであり、導

入したカンパニュラF3' 5' HとチョウマメA3' 5' GTの発現により目的とするアントシアニンの構造に改変された。また、主要色素であるデルフィニジン3-(6' '-マロニル)グルコシド-3' ,5' -ジグルコシド (テルナチンC5) とデルフィニジン3,3' ,5' -トリグルコシド (プレテルナチンC5) の蓄積によりキクは青色を発現した。

デルフィニジン3-(6' '-マロニル)グルコシド-3' ,5' -ジグルコシド (テルナチンC5) 、デルフィニジン3,3' ,5' -トリグルコシド (プレテルナチンC5) 、シアニジン3-(6' '-マロニル)グルコシド-3' -グルコシドなど新たに合成されたアントシアニンの蓄積は、薄層クロマトグラフィー (TLC) によっても検出された。TLC Cellulose Glass Plate (10 X 20 cm, Millipore)の下から1.5cmの位置に10%酢酸花卉抽出液をスポットし、風乾後、展開溶媒BAW (ブタノール : 酢酸 : 水 = 4:1:2 (v/v/v)) を入れた展開槽中で、原点から7cmの位置まで展開した。展開後、プレートを乾燥させ、蛍光灯下およびUV光 (C SN-15AC, コスモバイオ, 254/360nm) 下で検出した。各アントシアニンのRf値は以下の通りであった。デルフィニジン3-(6' '-マロニル)グルコシド-3' ,5' -ジグルコシド (テルナチンC5) : 0.15、デルフィニジン3,3' ,5' -トリグルコシド (プレテルナチンC5) : 0.11、シアニジン3-(6' '-マロニル)グルコシド-3' -グルコシド : 0.30

花色の青色方向への改変が確認された形質転換体の測色値を以下の表 1 に示す。

[表1]

[表 1]

系統番号	CIEL*a*b*表色系					RHSカラーチャート	
	L*値	a*値	b*値	色相角 (hue°)	彩度 (C*値)	チャート番号	色グループ
大平 野生型*	79.5	9.7	-2.0	356.6	11.1	65B, N74C, 75B	Red-Purple /Purple
大平 形質転換体							
1728-05	74.0	8.6	-6.6	322.4	10.8	N82C-D	Purple-Violet
1728-06	60.8	3.4	-19.6	279.9	19.9	97A	Violet-Blue
1728-07	57.4	4.1	-20.7	281.3	21.1	96B	Violet-Blue
1728-10	61.3	6.9	-20.7	288.4	21.9	94B	Violet-Blue
1728-12	63.3	3.6	-19.9	280.3	20.3	95C	Violet-Blue
1728-13	61.1	5.4	-18.9	285.9	19.7	94C-D	Violet-Blue
1728-17	68.3	1.1	-13.1	274.9	13.1	96D	Violet-Blue
1728-21	63.4	3.8	-20.7	280.3	21.0	97A	Violet-Blue
1728-23	69.6	3.5	-13.1	284.9	13.6	92B-C	Violet-Blue
1728-27	65.4	2.9	-13.8	281.7	14.1	96C-D	Violet-Blue
1728-28	59.9	4.2	-18.6	282.8	19.1	96C-D	Violet-Blue
1728-29	73.3	3.1	-7.6	292.6	8.2	85C-D	Violet
1728-30	66.4	4.5	-13.8	287.9	14.5	94C-D	Violet-Blue
1728-31	63.8	2.8	-17.8	279.0	18.0	97A-B	Violet-Blue
1728-32	43.0	7.7	-28.8	285.0	29.8	95C	Violet-Blue
1728-33	59.5	4.1	-18.4	282.5	18.8	96C-D	Violet-Blue
1728-35	71.7	-0.1	-11.3	269.5	11.3	97A	Violet-Blue
1728-36	63.8	1.3	-19.5	273.9	19.6	97A	Violet-Blue
1728-37	64.7	7.5	-15.4	295.8	17.1	97B-C	Violet-Blue
1728-38	65.9	3.0	-15.4	280.8	15.7	97A-B	Violet-Blue
1728-43	72.7	4.3	-9.6	294.1	10.5	91B	Violet-Blue
2027-01	69.9	1.5	-14.1	276.1	14.2	97A/100C	Violet-Blue /Blue
2027-09	70.9	3.5	-14.8	283.2	15.2	96D	Violet-Blue
2027-10	73.8	3.0	-10.4	285.8	10.8	NA	NA
2027-11	66.7	4.2	-17.0	283.9	17.5	96C	Violet-Blue
2027-12	72.7	1.8	-12.2	278.2	12.3	NA	NA

NA: 分析・測定せず

*平均値 (n=23)

[0036] [実施例2: キク品種「セイアラベラ」(系統番号T34)へのpB423の導入(キクF3Hプロモーター1kとアグロバクテリウムnosターミネーター制御下でのチョウマメA3' 5' GT遺伝子及びキクF3Hプロモーター1kとアラビドプシスHSPターミネーター制御下でのカンパニュラF3' 5' H遺伝子の共発現)]

[1] ベクターの構築

実施例 1 に従い、pB423 (pBCtA3' 5' GT+CamF3' 5' H) を作製した。

[0037] [2] 形質転換体の獲得及びその花色の測定

pB423を導入したアグロバクテリウムEHA105 (Dr. Elizabeth E. Hood氏より分譲) を用いて、サーモンピンク色系で中輪デコラ咲きのキク品種「セイアラベラ」((有)イノチオ精興園; 系統番号T34) を形質転換し、47系統の形質転換体を得た。色彩分光計 (CD100, 横河インスツルメンツ) とRHSカラーチャートでの測色を行った結果、34系統 (72%) で青色方向への花色の変化が確認された。そのうちの27系統では、主要アントシアニンとしてデルフィニジン3-(6' '-マロニル)グルコシド-3' , 5' -ジグルコシド (テルナチンC5) 及びデルフィニジン3, 3' , 5' -トリグルコシド (プレテルナチンC5) の蓄積を確認できた。これらの系統では花色がRHSカラーチャートのBlueグループまたはViolet-Blueグループの色へと改変された。「大平」と同様に「セイアラベラ」でも72%という高い割合で青いキクを得られた。花色の青色方向への改変が確認された形質転換体の測色値を以下の表 2 に示す。

[表2]

[表 2]

系統番号	CIEL*a*b*表色系					RHSカラーチャート	
	L*値	a*値	b*値	色相角 (hue°)	彩度 (C*値)	チャート番号	色グループ
セイアラペラ 野生型	77.7	15.0	-1.4	354.6	15.1	73A-B	Red-Purple
セイアラペラ 形質転換体							
1916-01	65.3	2.3	-14.3	279.1	14.5	97A	Violet-Blue
1916-02	52.4	2.6	-21.4	276.9	21.5	95C, 97A	Violet-Blue
1916-03	62.2	15.1	-13.5	318.3	20.3	84A	Violet
1916-04	46.6	5.9	-25.9	282.8	26.6	95C	Violet-Blue
1916-05	55.0	5.1	-18.3	285.4	19.0	92B	Violet-Blue
1916-06	67.3	3.4	-11.5	286.6	12.0	92B-C	Violet-Blue
1916-10	45.4	32.3	-22.9	324.7	39.6	N81A-B	Purple-Violet
1916-12	56.9	5.9	-17.3	289.0	18.3	94B	Violet-Blue
1916-15	57.8	1.9	-16.7	276.6	16.8	97A-B	Violet-Blue
1916-16	44.9	30.6	-23.2	322.9	38.4	N81B-C	Purple-Violet
1916-17	57.6	3.0	-22.9	277.5	23.1	96D	Violet-Blue
1916-18	66.6	1.5	-7.3	281.6	7.4	85B	Violet
1916-19	60.7	4.2	-19.6	282.1	20.0	95C	Violet-Blue
1916-20	51.9	3.4	-21.3	279.2	21.6	95C-D	Violet-Blue
1916-21	72.2	3.0	-7.5	291.7	8.1	91C	Violet-Blue
1916-22	56.8	2.0	-18.7	276.1	18.8	95C-D	Violet-Blue
1916-23	52.7	4.4	-23.8	280.6	24.3	100B-C	Blue
1916-24	69.3	1.7	-9.7	280.1	9.9	92C	Violet-Blue
1916-26	59.9	1.5	-15.8	275.5	15.9	96D	Violet-Blue
1916-27	50.9	2.8	-23.2	276.8	23.4	96D	Violet-Blue
1988-02	78.3	-2.6	-0.2	274.0	2.6	95D	Violet-Blue
1988-01	64.3	13.6	-11.3	320.1	17.7	84A	Violet
2072-02	72.2	-0.8	-7.6	263.9	7.7	NA	NA
2072-04	62.5	-1.8	-16.1	263.6	16.2	NA	NA
2072-05	75.1	-1.2	-8.8	442.3	8.9	NA	NA
2072-06	68.0	-0.5	-12.8	267.6	12.8	NA	NA
2072-10	65.3	13.8	-6.6	334.6	15.3	NA	NA
2072-14	57.3	1.9	-22.1	274.9	22.2	NA	NA
2072-17	61.7	-0.3	-16.0	268.9	16.0	NA	NA
2072-18	68.8	2.1	-7.7	285.4	8.0	NA	NA
2072-25	66.0	0.1	-12.2	270.6	12.2	NA	NA
2072-26	58.4	0.2	-17.9	270.8	17.9	NA	NA
2072-29	71.2	5.5	-6.2	311.2	8.3	NA	NA
2072-30	67.8	0.2	-10.9	271.0	10.9	NA	NA

NA: 分析・測定せず

[0038] [実施例3: キク系統「T37」へのpB423の導入 (キクF3Hプロモーター1kとアグロバクテリウムnosターミネーター制御下でのチョウマメA3' 5' GT遺伝子

及びキクF3Hプロモーター1kとアラビドプシスHSPターミネーター制御下でのカンパニユラF3' 5' H遺伝子の共発現)]

[1] ベクターの構築

実施例 1 に従い、pB423 (pBCtA3' 5' GT+CamF3' 5' H) を作製した。

[0039] [2] 形質転換体の獲得及びその花色の測定

pB423を導入したアグロバクテリウムEHA105 (Dr. Elizabeth E. Hood氏より分譲) を用いて、ピンク色系で小輪ポンポン咲きのキク系統「T37」 ((有) 精興園より提供を受けた育成系統を供試) を形質転換し、97系統の形質転換体を得た。色彩分光計 (CD100, 横河インスツルメンツ) とRHSカラーチャートでの測色を行った結果、58系統 (60%) で青色方向への花色の変化が確認された。そのうちの9系統を用いて、主要アントシアニンとしてデルフィニジン3-(6' ' -マロニル) グルコシド-3' , 5' -ジグルコシド (テルナチンC5) 及びデルフィニジン3, 3' , 5' -トリグルコシド (プレテルナチンC5) の蓄積を確認した。それらの花色はViolet-Blueグループへと改変された。「太平」「セイアラベラ」と同様に「T37」でも60%という高い割合で青いキクを得られた。花色の青色方向への改変が確認された形質転換体の測色値を以下の表 3 に示す。

[表3]

系統番号	CIE L*a*b*表色系					RHSカラーチャート	
	L*値	a*値	b*値	色相角 (hue°)	彩度 (C*値)	チャート番号	色グループ
T37 野生型	48.9	38.9	-14.1	340.1	41.4	N74B	Red-Purple
T37 形質転換体							
1921-01	47.9	9.8	-19.3	297.0	21.7	94B-C	Violet-Blue
1921-02	45.7	10.3	-22.1	295.1	24.4	93C-D	Violet-Blue
1921-03	50.8	8.5	-22.5	290.8	24.1	96B	Violet-Blue
1921-04	58.4	3.7	-17.8	281.7	18.1	96C	Violet-Blue
1921-05	44.8	6.1	-22.9	285.0	23.7	96B-C	Violet-Blue
1921-06	55.4	5.4	-16.4	288.4	17.3	93C-D	Violet-Blue
1939-01	51.1	20.9	-16.6	321.5	26.7	N81B	Purple-Violet
1939-02	50.0	5.6	-21.3	284.8	22.0	96B	Violet-Blue
1939-03	42.3	8.1	-24.4	288.3	25.7	96B	Violet-Blue
1939-04	50.7	6.8	-23.2	286.2	24.2	96B	Violet-Blue
1972-03	57.4	5.5	-18.1	287.0	18.9	96C-D	Violet-Blue
1972-05	86.7	-0.1	2.0	93.5	2.0	91D	Violet-Blue
1989-01	61.7	19.1	-12.9	325.9	23.1	84A	Violet
1989-02	64.1	4.9	-13.1	290.4	14.0	92C	Violet-Blue
1990-05	56.8	4.8	-16.8	286.0	17.5	96D	Violet-Blue
2013-03	56.3	6.2	-18.9	288.1	19.9	96D	Violet-Blue
2013-04	63.7	4.1	-14.2	286.2	14.8	96D	Violet-Blue
2013-06	69.4	1.5	-12.1	276.9	12.1	97A	Violet-Blue
2013-07	68.3	1.0	-11.4	275.2	11.5	96C	Violet-Blue
2013-08	65.1	0.1	-12.1	270.3	12.1	96C	Violet-Blue
2018-01	67.2	3.9	-11.1	289.2	11.8	94D	Violet-Blue
2018-02	70.6	5.5	-9.8	299.4	11.2	91B	Violet-Blue
2018-03	72.7	4.6	-9.1	296.9	10.2	91C	Violet-Blue
2018-04	69.6	6.5	-9.9	303.1	11.8	85A-B	Violet
2018-05	73.8	6.4	-7.3	310.9	9.7	85B-C	Violet
2018-06	57.5	2.2	-17.4	277.1	17.5	96B	Violet-Blue
2018-08	63.2	4.7	-10.8	293.5	11.8	91B	Violet-Blue
2018-09	71.3	2.3	-10.1	282.8	10.4	93D	Violet-Blue
2018-10	64.2	3.3	-14.9	282.5	15.3	92B	Violet-Blue
2018-11	64.5	3.4	-15.6	282.3	16.0	96D	Violet-Blue
2018-12	62.9	4.8	-11.9	292.1	12.8	91A-B	Violet-Blue
2018-13	72.9	7.4	-3.3	335.8	8.1	84B-C	Violet
2018-14	59.1	7.8	-13.1	300.6	15.3	92B-C	Violet-Blue
2018-15	67.6	3.6	-8.7	292.8	9.4	92C	Violet-Blue
2036-02	52.5	8.7	-20.0	293.4	21.8	NA	NA
2036-05	64.4	5.3	-4.1	322.8	6.7	92C	Violet-Blue
2036-06	75.2	5.3	-7.7	304.5	9.4	85C	Violet
2036-11	60.2	4.2	-17.7	283.4	18.2	97AB	Violet-Blue
2036-14	50.1	8.6	-20.5	292.7	22.2	NA	NA
2036-15	70.1	3.6	-12.5	286.0	13.0	94D	Violet-Blue
2036-19	61.3	5.1	-16.5	287.1	17.3	NA	NA
2036-20	67.3	3.9	-12.8	286.9	13.4	96D	Violet-Blue
2036-24	66.1	3.3	-14.3	283.0	14.7	96D	Violet-Blue
2036-27	70.3	2.8	-11.2	284.2	11.5	92CD	Violet-Blue
2036-32	68.0	7.0	-11.5	301.3	13.4	N88C	Violet
2036-33	63.8	4.8	-15.5	287.2	16.2	93D	Violet-Blue
2036-36	61.0	6.5	-17.2	290.6	18.4	94C-D	Violet-Blue
2047-02	65.3	7.9	-11.1	305.5	13.6	85A	Violet
2047-03	58.2	5.0	-19.3	284.6	19.9	96C-D	Violet-Blue
2047-04	62.8	3.6	-14.7	283.8	15.1	NA	NA
2047-05	51.2	11.8	-20.9	299.5	24.0	92A-90C	Violet-Blue
2047-07	54.0	13.2	-15.9	309.7	20.7	90C-92A	Violet-Blue
2047-08	63.9	5.9	-13.6	293.3	14.8	94C-D	Violet-Blue
2047-09	57.1	5.1	-20.8	283.6	21.4	97A	Violet-Blue
2047-10	54.3	7.4	-22.5	288.1	23.7	96C-D	Violet-Blue
2047-11	60.8	9.5	-16.2	300.4	18.8	90D	Violet-Blue
2047-12	59.0	5.8	-15.8	290.2	16.8	94C	Violet-Blue
2047-15	63.9	13.5	-11.3	320.1	17.6	76A	Purple

NA: 分析・測定せず

[0040] [実施例4: キク品種「大平」へのpB425の導入 (キクF3Hプロモーター1k及びアラビドプシスHSPターミネーター制御下でのチョウマメA3' 5' GT遺伝子及びキクF3Hプロモーター1k及びアグロバクテリウムnosターミネーター制御

下でのカンパニユラF3' 5' H遺伝子の共発現]

[1] ベクターの構築

キクF3' H抑制カセット、CtAGS、CtA3' 5' GT、DFR発現カセットなど複数の遺伝子抑制／発現カセットを連結するための、カンパニユラF3' 5' H発現バイナリーベクターpB315 (pBCam2) を作製した。pBI121-FASS-CmF3H1kをSpe IとEcoICRIで消化して得られるバイナリーベクターのDNA断片とpCR ADHNF-Campanula F3' 5' H (特許5697040号) のKpnI消化産物を平滑末端化した後に、XbaIで消化して得られる約1.7kbのDNA断片を連結し、pB315 (pBI121-FASS-CmF3Hpro1k:NtADH-5' UTR-カンパニユラF3' 5' H:NOster ; pBCam2) を得た。

[0041] 参考例1で得たpBSII-ADH-CtA3' 5' GTをNheIとEcoICRIで消化して得られるDNA断片と、pMCE5-2 (FASS-CmF3Hp-AtHSPt) をNheIとEcoICRIで消化して得られるベクターの断片を連結し、pMCE5-2 ADHNF-CtA3' 5' GTを得た。pMCE5-2 ADHNF-CtA3' 5' GT をFseIとPmeIで消化して得られる CmF3Hp1k:ADHNF-CtA3' 5' GT:AtHSPtカセットと、pB315をFseIとSwaIで消化し得られるバイナリーベクターのDNA断片を連結することで、pB425 (pBCam2+CtA3' 5' GT) を得た。

[0042] [2] 形質転換体の獲得及びその花色の測定

pB425を導入したアグロバクテリウム (Dr. Elizabeth E. Hood氏より分譲) を用いて、ピンク色系で中輪ギクのキク品種「大平」(花き研で無菌培養により維持している遺伝資源を供試) を形質転換し、42系統の形質転換体を得た。色彩分光計 (CD100, 横河インスツルメンツ) とRHSカラーチャートでの測色を行った結果、23系統 (55%) で青色方向への花色の変化が認められた。そのうちの11系統 (全体の26%) で、色相角290° 以下の青色を示した。また12系統 (全体の29%) で、RHSカラーチャートのViolet-Blueグループの花色を示した。これら青色花形質を有する系統では、主要アントシアニンとしてデルフィニジン3-(6' '-マロニル)グルコシド-3' ,5' -ジグルコシド (テルナチンC5) 及びデルフィニジン3,3' ,5' -トリグルコシド (プレテルナチンC5) の蓄積を確認した。このように、チョウマメ由来A3' 5' GT遺伝子とカン

パニュラ由来F3' 5' H遺伝子の2つの遺伝子を発現することで青いキクを作出することができる。花色の青色方向への改変が確認された形質転換体の測色値を以下の表4に示す。

[表4]

[表 4]

系統番号	CIEL*a*b*表色系					RHSカラーチャート	
	L*値	a*値	b*値	色相角 (hue°)	彩度 (C*値)	チャート番号	色グループ
大平 野生型*	79.5	9.7	-2.0	356.6	11.1	65B, N74C, 75B	Red-Purple /Purple
大平 形質転換体							
1729-08	72.9	3.2	-10.8	286.3	11.3	94B	Violet-Blue
1729-09	76.7	3.2	-6.1	297.3	6.9	85C	Violet
1729-11	76.6	6.1	-6.8	311.8	9.1	94D	Violet-Blue
1729-12	65.2	4.7	-19.7	283.5	20.3	97B	Violet-Blue
1729-14	77.7	1.1	-6.9	279.0	7.0	97B-C	Violet-Blue
1729-17	79.2	1.0	-3.4	285.9	3.5	94D	Violet-Blue
1729-18	69.5	5.2	-11.3	294.6	12.5	85B	Violet
1729-19	75.9	2.9	1.4	361.4	3.2	92D	Violet-Blue
1729-24	61.9	4.2	-19.9	282.0	20.3	97A/96D	Violet-Blue
1729-25	76.9	0.6	-3.1	280.3	3.2	85C-D	Violet
1729-26	83.2	1.6	2.0	411.5	2.5	85D	Violet
1729-27	66.0	4.1	-17.2	283.5	17.6	96D	Violet-Blue
1729-28	75.4	3.5	-6.3	298.9	7.1	85C	Violet
1729-29	77.6	8.1	-3.9	334.1	9.0	N80D	Purple-Violet
1729-33	79.5	2.8	-2.3	321.5	3.6	NA	NA
1729-37	71.9	2.6	-4.3	301.0	5.0	85C	Violet
1729-38	81.8	3.6	-2.8	322.3	4.6	NA	NA
1729-39	69.1	0.8	-9.3	275.2	9.3	95D	Violet-Blue
1729-40	72.0	-0.2	-9.3	269.1	9.3	97A-B	Violet-Blue
1729-41	65.7	2.7	-14.7	280.4	15.0	96C-D	Violet-Blue
1729-44	68.6	5.5	-7.8	305.1	9.5	85A-B	Violet
1729-45	66.9	4.6	-13.8	288.4	14.5	92A-B	Violet-Blue
1729-46	72.7	6.3	-8.3	306.9	10.4	85A	Violet

*平均値 (n=23)

NA: 分析・測定せず

[0043] [実施例5: キク品種「大平」へのpB433の導入 (キクF3Hプロモーター1kとアグロバクテリウムnosターミネーター制御下でのチョウマメA3' 5' GT遺伝子、キクF3Hプロモーター1kとアラビドプシスHSPターミネーター制御下でのカンパニュラF3' 5' H遺伝子及びダッチアイリスDFR遺伝子の共発現]

[1] ベクターの構築

ダッチアイリス (*Iris hollandica*) 花被片由来のDFR遺伝子 (Plant Cell Physiol 48 (2007) 1589, AB332098) を含むプラスミドpSPB909を鋳型に、IrisDFR_ADH_ORF_Fd (5' -CAAGAAAAATAAATGATGAGCCCCGTTGTC-3' , 下線部はIhDFRとアニールする配列; 配列番号 1 2) とIrisDFR_NdeI_Rv (5' -CATATGTACCTCCCGTTCGCTTC-3' ; 配列番号 1 3) をプライマーに用いたPCRで増幅したDNA断片と、pBI221 ADH-221を鋳型にXbaI-ADH-Fd (5' -ACGCGTTCTAGAGTCTATTTAACTCAGTATTC-3' ; 下線部はNtADH-5' UTR 94bpとアニールする配列である; 配列番号 1 4) とIrisDFR_ORF_ADH_Rv (5' -GGGGCTCATCATTTATTTTCTTGATTTCCTTCAC-3' ; 下線部はNtADH-5' UTR 94bpとアニールする配列である; 配列番号 1 5) をプライマーに用いたPCRで増幅したDNA断片の二種類を混合して鋳型に用い、XbaI-ADH-Fd (5' -ACGCGTTCTAGAGTCTATTTAACTCAGTATTC-3' ; 下線部はNtADH-5' UTR 94bpとアニールする配列である; 配列番号 1 4) とIrisDFR_NdeI_Rv (5' -CATATGTACCTCCCGTTCGCTTC-3' ; 配列番号 1 3) をプライマーに用いたPCRにより、タバコADH-5' UTR 94bpがダッチアイリスDFR遺伝子の開始コドンに直結したDNA断片を増幅し、pCR-bluntII-TOPOにクローニングして、pCR-ADHNF-IhDFR-5' を得た。このプラスミドをSalIとEcoRVで消化して得られるDNA断片とpSPB909をSalIとEcoRVで消化して得られるプラスミドのDNA断片を連結することで、pUC E12-35Sp:ADHNF-IrisDFR:D8tを得た。このプラスミドのXhoI消化産物を平滑末端化した後に、NheIで消化したDNA断片と、pMCE5-2をNheIとEcoICRIで消化して得られるプラスミドのDNA断片を連結してpMCE5-2 ADHNF-IhDFRを得た。pMCE5-2-ADHNF-IhDFRをAscIとPmeIで消化して得られる発現カセットと、AscIとSwaIで消化して得られるpB423バイナリーベクターのDNA断片を連結し、pB433 (pBCtA3' 5' GT+CamF3' 5' H+IhDFR) を得た。

[0044] [2] 形質転換体の獲得及びその花色の測定

pB433を導入したアグロバクテリウムEHA105 (Dr. Elizabeth E. Hood氏より分譲) を用いてピンク色系で中輪ギクのキク品種「大平」(花き研で無菌

培養により維持している遺伝資源を供試)を形質転換し、55系統の形質転換体を得た。色彩分光計(CD100, 横河インスツルメンツ)とRHSカラーチャートでの測色を行った結果、青色方向への花色の変化が認められた39系統(71%)のうちの31系統(全体の56%)で、色相角 290° 以下の青色を示した。また33系統(全体の60%)でRHSカラーチャートのViolet-Blueグループの花色を示した。これら青色花形質を有する系統では、主要アントシアニンとしてデルフィニジン3-(6'- α -マロニル)グルコシド-3', 5'-ジグルコシド(テルナチンC5)及びデルフィニジン3, 3', 5'-トリグルコシド(プレテルナチンC5)の蓄積を確認した。カンパニュラ由来F3' 5' H遺伝子のターミネーターをアラビドプシスHSPにすることで、アグロバクテリウムnosターミネーターを用いた場合(実施例4, 12-18)と比べて高い割合で青いキクが作出された。花色の青色方向への改変が確認された形質転換体の測色値を以下の表5に示す。

[表5]

[表 5]

系統番号	CIE L*a*b*表色系					RHSカラーチャート	
	L*値	a*値	b*値	色相角 (hue°)	彩度 (C*値)	チャート番号	色グループ
大平 野生型*	79.5	9.7	-2.0	356.6	11.1	65B, N74C, 75B	Red-Purple /Purple
大平 形質転換体							
1737-01	53.2	6.8	-23.9	285.9	24.8	96A-B	Violet-Blue
1737-03	63.6	5.8	-18.6	287.4	19.5	94B-C	Violet-Blue
1737-04	57.4	3.9	-19.9	281.1	20.3	96B-C	Violet-Blue
1737-05	62.1	5.0	-20.6	283.6	21.2	96B-C	Violet-Blue
1737-06	80.2	3.9	-5.1	307.4	6.4	85B-C	Violet
1737-07	53.6	7.4	-27.4	285.0	28.3	96B-C	Violet-Blue
1737-08	49.7	8.4	-28.7	286.4	29.9	96B-C	Violet-Blue
1737-10	64.8	10.4	-15.1	304.4	18.3	90C	Violet-Blue
1737-11	63.7	4.6	-17.8	284.6	18.4	96C-D	Violet-Blue
1737-12	58.8	3.9	-19.4	281.3	19.8	96B	Violet-Blue
1737-13	62.7	5.8	-18.0	287.7	18.9	NA	NA
1737-17	70.4	3.3	-14.8	282.5	15.2	96C-D	Violet-Blue
1737-18	72.3	4.0	-11.2	289.6	11.9	92A-B	Violet-Blue
1737-19	53.2	7.9	-30.3	284.7	31.3	96B	Violet-Blue
1737-24	62.5	3.3	-19.7	279.5	20.0	95C	Violet-Blue
1737-25	66.5	3.3	-17.2	280.9	17.5	96C-D	Violet-Blue
1737-26	57.4	3.2	-20.0	279.1	20.3	95C	Violet-Blue
1737-28	61.2	4.1	-22.1	280.6	22.4	95C	Violet-Blue
1737-29	55.7	7.5	-22.6	288.3	23.8	96A-B	Violet-Blue
1737-30	65.5	1.3	-17.4	274.3	17.4	97A-B	Violet-Blue
1737-36	59.4	6.0	-22.5	284.9	23.2	96B	Violet-Blue
1737-38	61.3	8.1	-23.0	289.3	24.3	94B	Violet-Blue
1737-41	61.0	5.5	-20.8	284.7	21.5	96B	Violet-Blue
1737-42	61.7	4.8	-18.3	284.6	18.9	94B	Violet-Blue
1737-44	63.6	9.0	-19.1	295.2	21.1	93C	Violet-Blue
1737-45	66.5	1.2	-10.9	276.4	10.9	97A-B	Violet-Blue
1737-47	59.9	4.5	-20.0	282.6	20.5	96D	Violet-Blue
1737-48	59.6	6.8	-20.1	288.7	21.2	96B-C	Violet-Blue
1737-50	79.5	3.4	-4.5	307.3	5.6	85C-D	Violet
1737-51	59.9	5.3	-6.8	308.1	8.6	96D	Violet-Blue
1737-53	36.9	11.1	-36.0	287.1	37.7	95B-C	Violet-Blue
1737-54	78.5	3.1	-5.0	302.3	5.9	N82D	Violet
1737-55	72.1	3.9	-5.2	306.7	6.5	N88C	Violet
1737-56	57.2	5.6	-23.3	283.4	24.0	95B-C	Violet-Blue
1737-57	81.8	1.1	-3.8	285.9	3.9	91CD	Violet-Blue
1737-58	58.9	4.8	-20.0	283.6	20.5	95C	Violet-Blue
1737-59	50.2	8.3	-28.1	286.5	29.3	96B	Violet-Blue
1737-61	71.1	6.3	-13.6	295.0	15.0	N88C	Violet
1737-62	53.7	4.4	-22.2	281.3	22.6	95C	Violet-Blue

*平均値 (n=23)

NA: 分析・測定せず

[0045] [実施例 6 : キク品種「大平」へのpB434の導入 (キクF3Hプロモーター1kとアグロバクテリウムnosターミネーター制御下でのチョウマメA3' 5' GT遺伝子、キクF3Hプロモーター1kとアラビドプシスHSPターミネーター制御下での

カンパニユラF3' 5' H遺伝子及びデルフィニウムDFR遺伝子の共発現]

[1] ベクターの構築

デルフィニウム (*Delphinium* × *belladonna* 'Volkerfrieden') のがく片由来のDFR遺伝子を含むプラスミドpDbDFR4-8 (GenBank accession no. AB221083) を鋳型に、DbDFR_ADH_ORF_Fd (5' -CAAGAAAAATAAAATGACTGTAGAACTGTTTGTG-3' ; 下線部はDbDFRとアニールする配列である ; 配列番号 1 6) とDbDFR_NcoI_Rv (5' -CCATGGTGTACTTATAGTTGAATCC-3' ; 配列番号 1 7) をプライマーに用いたPCRで増幅したDNA断片と、pBI221 ADH-221を鋳型にXbaI-ADH-Fd (5' -ACGCGTTCTAGAGTCTATTTAACTCAGTATTC-3' ; 下線部はNtADH-5' UTR 94bpとアニールする配列である ; 配列番号 1 4) とDbDFR_ORF_ADH_Rv (5' -TTCTACAGTCATTTATTTTCTTGATTTCTTCAC-3' ; 下線部はNtADH-5' UTR 94bpとアニールする配列である ; 配列番号 1 8) をプライマーに用いたPCRで増幅したDNA断片の二種類を混合して鋳型に用い、XbaI-ADH-Fd (5' -ACGCGTTCTAGAGTCTATTTAACTCAGTATTC-3' ; 下線部はNtADH-5' UTR 94bpとアニールする配列である ; 配列番号 1 4) とDbDFR_NcoI_Rv (5' -CCATGGTGTACTTATAGTTGAATCC-3' ; 下線部はNtADH-5' UTR 94bpとアニールする配列である ; 配列番号 1 7) をプライマーに、DNAポリメラーゼにPrimeStar (タカラバイオ) を用いたPCRにより、タバコADH-5' UTR 94bpがデルフィニウムDFR遺伝子の開始コドンに直結したDNA断片を得た。この平滑末端の増幅産物にdAを付加する反応を行った後、pCR2.1 (Invitrogen) にTAクローニングして、pCR-ADHNF-DbDFR-5' を得た。このプラスミドをSmaIとNcoIで消化して得られる断片と、pDbDFR4-8をSmaIとNcoIで消化して得られるプラスミドのDNA断片を連結し、pBS-ADHNF-DbDFRを得た。このプラスミドのXhoI消化産物を平滑末端化した後に、SpeIで消化したDNA断片と、pMCE5-2をNheIとEcoICRIで消化して得られるプラスミドのDNA断片を連結してpMCE5-2 ADHNF-DbDFRを得た。pMCE5-2 ADHNF-DbDFRをAscIとPmeIで消化して得られる発現カセットと、AscIとSwaIで消化して得られるpB423バイナリーベクターのDNA断片を連結し、pB434 (pBCtA3' 5' GT+CamF3' 5' H+DbDFR) を得た。

[0046] [2] 形質転換体の獲得及びその花色の測定

pB434を導入したアグロバクテリウムEHA105 (Dr. Elizabeth E. Hood氏より分譲) を用いてピンク色系で中輪ギクのキク品種「大平」(花き研で無菌培養により維持している遺伝資源を供試) を形質転換し、12系統の形質転換体を得た。色彩分光計 (CD100, 横河インスツルメンツ) とRHSカラーチャートでの測色を行った結果、8系統 (67%) で青色方向への花色の変化が認められ、8系統 (全体の67%) が色相角 290° 以下の青色を示した。また7系統 (全体の58%) が、RHSカラーチャートのViolet-Blueグループの花色を示した。これら青色花形質を有する系統では、主要アントシアニンとしてデルフィニジン3-(6'- α -マロニル)グルコシド-3', 5'-ジグルコシド (テルナチンC5) 及びデルフィニジン3, 3', 5'-トリグルコシド (プレテルナチンC5) の蓄積を確認した。カンパニュラ由来F3' 5' H遺伝子のターミネーターをアラビドプシスHSPにすることで、アグロバクテリウムnosターミネーターを用いた場合 (実施例4, 12-18) と比べて高い割合で青いキクが作出された。花色の青色方向への改変が確認された形質転換体の測色値を以下の表6に示す。

[表6]

[表6]

系統番号	CIEL*a*b*表色系					RHSカラーチャート	
	L*値	a*値	b*値	色相角 (hue $^{\circ}$)	彩度 (C*値)	チャート番号	色グループ
大平 野生型*	79.5	9.7	-2.0	356.6	11.1	65B, N74C, 75B	Red-Purple /Purple
大平 形質転換体							
1744-02	62.8	2.3	-14.7	278.7	14.9	NA	NA
1744-03	62.7	2.6	-12.9	281.4	13.1	96D	Violet-Blue
1744-07	65.9	0.2	-15.4	270.8	15.4	97A-B	Violet-Blue
1744-08	56.6	5.9	-25.7	282.9	26.4	96B	Violet-Blue
1744-09	55.3	7.8	-22.4	289.2	23.7	94B	Violet-Blue
1744-14	66.1	3.4	-14.9	282.7	15.3	92A-B	Violet-Blue
1744-19	62.9	1.9	-16.8	276.3	16.9	97A	Violet-Blue
1753-03	65.1	2.7	-18.4	278.3	18.6	97A	Violet-Blue

*平均値 (n=23)

NA: 分析・測定せず

[0047] [実施例7: キク品種「大平」へのpB435の導入 (キクF3Hプロモーター1kと

アグロバクテリウムnosターミネーター制御下でのチョウマメA3' 5' GT遺伝子、キクF3Hプロモーター1kとアラビドプシスHSPターミネーター制御下でのカンパニュラF3' 5' H遺伝子及びチョウマメDFR遺伝子の共発現]

[1] ベクターの構築

チョウマメ (*Clitoria ternatea* 'Double Blue') の花卉由来のDFR遺伝子を含むプラスミドpBSCtDFR20 (GenBank accession no. AB185901) を鋳型に、CtDFR_ADH_ORF_Fd (5' -CAAGAAAAATAAATGGATTGAGCAGCTGAAGTG-3' ; 下線部はCtDFRとアニールする配列である ; 配列番号 19) とCtDFR_SphI_Rv (5' -GCATGCTCTCATTATGTCAAG-3' ; 配列番号 20) をプライマーに用いたPCRで増幅したDNA断片と、pBI221 ADH-221を鋳型にXbaI-ADH-Fd (5' -ACGCGTTCTAGAGTCTATTTAACTCAGTATTC-3' ; 下線部はNtADH-5' UTR 94bpとアニールする配列である ; 配列番号 14) とCtDFR_ORF_ADH_Rv (5' -TGCTGAATCCATTTATTTTCTTGATTTCTTCAC-3' ; 下線部はNtADH-5' UTR 94bpとアニールする配列である ; 配列番号 21) をプライマーに用いたPCRで増幅したDNA断片の二種類を混合して鋳型に用い、XbaI-ADH-Fd (5' -ACGCGTTCTAGAGTCTATTTAACTCAGTATTC-3' ; 下線部はNtADH-5' UTR 94bpとアニールする配列である ; 配列番号 14) とCtDFR_SphI_Rv (5' -GCATGCTCTCATTATGTCAAG-3' ; 配列番号 20) をプライマーに、DNAポリメラーゼにPrimeStar (タカラバイオ) を用いたPCRにより、タバコADH-5' UTR 94bpがチョウマメDFR遺伝子の開始コドンに直結したDNA断片を得た。この平滑末端の増幅産物にdAを付加する反応を行った後、pCR2.1 (Invitrogen) にTAクローニングして、pCR-ADHNF-CtDFR-5' を得た。このプラスミドをXbaIとSphIで消化して得られる断片と、pBSCtDFR20をXbaIとSphIで消化して得られるプラスミドのDNA断片を連結し、pBS-ADHNF-CtDFRを得た。このプラスミドのXhoI消化産物を平滑末端化した後に、XbaIで消化したDNA断片(090616-2)と、pMCE5-2をNheIとEcoICRIで消化して得られるプラスミドのDNA断片を連結してpMCE5-2 ADHNF-CtDFRを得た。pMCE5-2 ADHNF-CtDFRをAscIとPmeIで消化して得られる発現カセットと、AscIとSwaIで消化して得られるpB423バイナリーベクターのDNA断片を連結し、pB435 (pBCtA3' 5' GT+CamF3'

5' H+CtDFR) を得た。

[0048] [2] 形質転換体の獲得及びその花色の測定

pB435を導入したアグロバクテリウムEHA105 (Dr. Elizabeth E. Hood氏より分譲) を用いてピンク色系で中輪ギクのキク品種「大平」(花き研で無菌培養により維持している遺伝資源を供試) を形質転換し、34系統の形質転換体を得た。色彩分光計 (CD100, 横河インスツルメンツ) とRHSカラーチャートでの測色を行った結果、28系統 (82%) で青色方向への花色の変化が認められた。23系統 (全体の68%) が色相角 290° 以下の青色を示し、また22系統 (全体の65%) RHSカラーチャートでの測色でBlueグループまたはViolet-Blueグループの花色を示した。これら青色花形質を有する系統では、主要アントシアニンとしてデルフィニジン3-(6'- α -マロニル)グルコシド-3', 5'-ジグルコシド (テルナチンC5) 及びデルフィニジン3, 3', 5'-トリグルコシド (プレテルナチンC5) の蓄積を確認した。カンパニュラ由来F3' 5' H遺伝子のターミネーターをアラビドプシスHSPにすることで、アグロバクテリウムnosターミネーターを用いた場合 (実施例4, 12-18) と比べて高い割合で青いキクが作出された。花色の青色方向への改変が確認された形質転換体の測色値を以下の表7に示す。

[表7]

[表 7]

系統番号	CIEL*a*b*表色系					RHSカラーチャート	
	L*値	a*値	b*値	色相角 (hue°)	彩度 (C*値)	チャート番号	色グループ
大平 野生型*	79.5	9.7	-2.0	356.6	11.1	65B, N74C, 75B	Red-Purple /Purple
大平 形質転換体							
1745-01	61.7	1.4	-18.9	274.2	18.9	95B-C	Violet-Blue
1745-02	67.1	2.0	-15.3	277.4	15.5	97A-B	Violet-Blue
1745-03	49.5	7.1	-29.6	283.6	30.4	99B-C	Blue
1745-04	52.1	7.8	-28.7	285.2	29.8	96B-C	Violet-Blue
1745-06	52.0	5.2	-25.1	281.7	25.6	95C	Violet-Blue
1745-07	58.3	4.9	-22.3	282.5	22.8	96B-C	Violet-Blue
1745-09	63.6	7.1	-16.9	292.7	18.4	N88B	Violet
1745-10	57.3	6.8	-26.9	284.1	27.8	95C	Violet-Blue
1745-11	61.0	4.7	-22.6	281.9	23.1	95C	Violet-Blue
1745-12	48.4	20.0	-22.1	312.2	29.8	N87A-B	Violet
1745-13	67.7	8.7	-14.1	301.7	16.6	90C-D	Violet-Blue
1745-14	48.3	7.1	-27.2	284.6	28.1	96C	Violet-Blue
1745-15	52.4	7.9	-27.2	286.1	28.3	96A-B	Violet-Blue
1745-16	64.7	3.1	-17.5	279.9	17.8	96B-C	Violet-Blue
1745-19	65.5	4.8	-16.3	286.4	17.0	92B	Violet-Blue
1745-20	59.2	4.8	-21.5	282.5	22.1	96B-C	Violet-Blue
1745-22	NA	NA	NA	NA	NA	85A-B	Violet
1745-23	59.0	6.4	-20.3	287.5	21.3	92A	Violet-Blue
1745-28	65.5	3.0	-9.6	287.3	10.1	85B	Violet
1745-29	60.4	3.9	-20.1	281.0	20.5	95C	Violet-Blue
1754-01	59.6	4.7	-19.8	283.5	20.4	96B-C	Violet-Blue
1754-02	66.8	6.5	-11.0	300.7	12.8	N88C	Violet
1754-03	58.9	3.6	-19.2	280.6	19.6	96C-D	Violet-Blue
1754-05	57.7	3.7	-19.3	280.8	19.7	96C	Violet-Blue
1754-06	64.8	1.8	-14.9	277.0	15.0	96C	Violet-Blue
1754-09	51.0	5.0	-21.2	283.2	21.8	96B	Violet-Blue
1754-10	71.3	2.1	-10.5	281.1	10.7	NA	NA
1754-11	55.4	3.5	-19.7	280.1	20.0	96C-D	Violet-Blue

*平均値 (n=23)

NA: 分析・測定せず

[0049] [実施例8: キク品種「セイショール」((有)精興園より提供を受けた品種を供試; 系統番号S39)へのpB428の導入(キクF3Hプロモーター1k及びアグロバクテリウムnosターミネーター制御下でキク内在性F3' H遺伝子を抑制するとともに、キクF3Hプロモーター1k及びアラビドプシスHSPターミネーター

制御下でカンパニュラF3' 5' H遺伝子及びチョウマメA3' 5' GT遺伝子を共発現)]

[1] ベクターの構築

キク ‘アリエッタ’ 舌状花卉由来cDNAを鋳型に、CmF3' H_full_ORF_F (5' -ATGAACATTTTACCTTTCTGATTTTATG-3' ; 配列番号 2 2) とCmF3' H_full_ORF_R (5' -TTAAATACTTTTCATATACGTGGG-3' ; 配列番号 2 3) をプライマーに、DNAポリメラーゼにLA Taqを用いたPCRで増幅したキクF3' H ORFをpCR2.1にTAクローニングし、pCR2.1-CmF3' H-ORF1を得た。このプラスミドを鋳型に、CmF3' H_3' -Fd for dsRNA (5' -CACCCCGAACTCATTGTCATCCAC-3' ; 配列番号 2 4) とCmF3' H_3' -Rv for dsRNA (5' -TCAATCCATACGCTTCTTCCATG-3' ; 配列番号 2 5) をプライマーに用いたPCRにより増幅したRNAiのトリガーとなるDNA断片 (配列番号 3 8) をpENTR-D/TOPO (Invitrogn) に連結して、pENTR-CmF3' H-Cを得た。pENTR-CmF3' H-CとpANDA35K (http://bsw3.naist.jp/simamoto/pANDA/real/pANDA_top.htm) をLR反応し、pANDA- CmF3' H-C IRを得た。このプラスミドをXbaIとEcoICRIで消化して得られる約2.5kbのDNA断片とpBI121-FASS-CmF3H1kをSpeIとEcoICRIで消化して得られるバイナリーベクターのDNA断片を連結し、pB319 (pBF3' H-Ci) を得た。

pMCE5-2をNheIとEcoICRIで消化して得られるプラスミドのDNA断片と、pCRADHNF-Campanula F3' 5' H (特許5697040号) のKpnI消化産物を平滑末端化した後に、XbaIで消化して得られる約1.7kbのDNA断片を連結し、pMCE5-2 ADHNF-CamF3' 5' Hを得た。このプラスミドをFseIとPmeIで消化して得られる発現カセットと、FseIとSwaIで消化して得られるpB319のバイナリーベクター断片を連結し、pB332 (pBF3' H-Ci+CamF3' 5' H) を得た。

[0050] pB332 (pBF3' H-Ci+CamF3' 5' H) をFseIとSwaIで消化して得られるバイナリーベクターのDNA断片とpMCE5-2 ADHNF-CtA3' 5' GT をFseIとPmeIで消化して得られる CmF3Hp1k:ADHNF-CtA3' 5' GT:AtHSPtカセットを連結してpB428 (pBF3' H-Ci+CamF3' 5' H+CtA3' 5' GT) を得た。

[0051] pB428を導入したアグロバクテリウムEHA105 (Dr. Elizabeth E. Hood氏よ

り分譲)を用いてピンク系で大輪デコラ咲きのキク品種「セイショール」(有)精興園より提供を受けた品種;系統番号S39)を形質転換し、10系統の形質転換体を得た。色彩分光計(CD100,横河インスツルメンツ)とRHSカラーチャートでの測色を行った結果、6系統(60%)で青色方向への花色の変化が確認され、3系統(全体の30%)で、デルフィニジン3-(6'-マロニル)グルコシド-3',5'-ジグルコシド(テルナチンC5)及びデルフィニジン3,3',5'-トリグルコシド(プレテルナチンC5)の蓄積を確認でき、花色はBlueグループまたはViolet-Blueグループへと改変された(図5)。カンパニュラ由来F3'5'H遺伝子のターミネーターをアラビドプシスHSPにすることで、アグロバクテリウムnosターミネーターを用いた場合(実施例4,12-18)と比べて高い割合で青いキクが作出された。花色の青色方向への改変が確認された形質転換体の測色値を以下の表8に示す。

[表8]

[表8]

系統番号	CIEL*a*b*表色系					RHSカラーチャート	
	L*値	a*値	b*値	色相角(hue°)	彩度(C*値)	チャート番号	色グループ
S39 野生型	70.6	24.0	-4.8	348.6	24.5	73B	Red-Purple
S39 形質転換体							
1870-01	66.1	4.3	-12.7	288.8	13.4	93C	Violet-Blue
1870-02	75.7	0.7	-9.5	274.5	9.5	100D	Blue
1891-01	66.3	6.6	-12.3	298.1	14.0	85B	Violet
1891-02	58.8	4.8	-19.1	284.0	19.7	96D	Violet-Blue
1891-03	69.1	10.6	-6.7	327.7	12.6	N82C	Purple-Violet
1891-04	66.1	14.6	-10.5	324.1	18.0	N81C	Purple-Violet

[0052] [実施例9:キク系統「T27」へのpB428の導入(キクF3Hプロモーター1k及びアグロバクテリウムnosターミネーター制御下でキク内在性F3'H遺伝子を抑制するとともに、キクF3Hプロモーター1k及びアラビドプシスHSPターミネーター制御下でカンパニュラF3'5'H遺伝子及びチョウマメA3'5'GT遺伝子を共発現)]

[1] ベクターの構築

実施例8にしたがい、pB428(pBF3'H-Ci+CamF3'5'H+CtA3'5'GT)を作

製した。

[0053] [2] 形質転換体の獲得及びその花色の測定

pB428を導入したアグロバクテリウムEHA105 (Dr. Elizabeth E. Hood氏より分譲) を用いて、ピンク色系で小輪ポンポン咲きのキク系統「T27」 ((有) 精興園より提供を受けた育成系統を供試) を形質転換し、10系統の形質転換体を得た。色彩分光計 (CD100, 横河インスツルメンツ) とRHSカラーチャートでの測色を行った結果、6系統 (60%) で青色方向への花色の変化が確認された。そのうちの4系統 (全体の40%) で、主要アントシアニンとしてデルフィニジン3-(6'-'-マロニル)グルコシド-3', 5'-ジグルコシド (テルナチンC5) 及びデルフィニジン3, 3', 5'-トリグルコシド (プレテルナチンC5) の蓄積を確認できた (図5)。これらの系統では花色がViolet-Blueグループへと改変された。カンパニュラ由来F3' 5' H遺伝子のターミネーターをアラビドプシスHSPにすることで、アグロバクテリウムnosターミネーターを用いた場合 (実施例4, 12-18) と比べて高い割合で青いキクが作出された。青色方向への花色改変が確認された形質転換体の測色値を以下の表9に示す。

[表9]

系統番号	CIEL*a*b*表色系					RHSカラーチャート	
	L*値	a*値	b*値	色相角 (hue°)	彩度 (C*値)	チャート番号	色グループ
T27 野生型	74.2	14.7	-3.3	347.5	15.1	N74C	Red-Purple
T27 形質転換体							
1805-01	76.2	1.9	-1.2	327.6	2.2	85D	Violet
1805-02	80.5	-2.0	6.0	108.9	6.3	85D	Violet
1872-01	65.2	5.3	-12.8	292.6	13.8	94D	Violet-Blue
1872-03	69.8	2.7	-10.6	284.4	10.9	94D	Violet-Blue
1872-04	67.6	2.5	-12.1	281.6	12.4	96C	Violet-Blue
1872-05	56.2	5.9	-22.0	284.9	22.8	96C	Violet-Blue

[0054] [実施例10: キク品種「セイアラベラ」 (系統番号T34) へのpB428の導入 (キクF3Hプロモーター1k及びアグロバクテリウムnosターミネーター制御下でキク内在性F3' H遺伝子を抑制するとともに、キクF3Hプロモーター1k及び

アラビドプシスHSPターミネーター制御下でカンパニュラF3' 5' H遺伝子及び
 チョウマメA3' 5' GT遺伝子を共発現)]

[1] ベクターの構築

実施例8にしたがい、pB428 (pBF3' H-Ci+CamF3' 5' H+CtA3' 5' GT) を作
 製した。

[0055] [2] 形質転換体の獲得及びその花色の測定

pB428を導入したアグロバクテリウムEHA105 (Dr. Elizabeth E. Hood氏より分譲) を用いて、サーモンピンク色系で中輪デコラ咲きのキク品種「セイアラベラ」 ((有) イノチオ精興園; 系統番号T34) を形質転換し、3系統の形質転換体を得た。色彩分光計 (CD100, 横河インスツルメンツ) とRHSカラーチャートでの測色を行った結果、3系統(100%)で青色方向への花色の変化が確認された。そのうちの2系統 (全体の67%) で、主要アントシアニンとしてデルフィニジン3-(6-マロニル)グルコシド 3' , 5' -ジグルコシド (テルナチンC5) 及びデルフィニジン 3, 3' , 5' -トリグルコシド (プレテルナチンC5) の蓄積を確認できた (図5) 。これらの系統の花色はViolet-Blueグループへと改変された。カンパニュラ由来F3' 5' H遺伝子のターミネーターをアラビドプシスHSPにすることで、アグロバクテリウムnosターミネーターを用いた場合 (実施例4, 12-18) と比べて高い割合で青いキクが作出された。花色の青色方向への改変が確認された形質転換体の測色値を以下の表10に示す。

[表10]

[表10]

系統番号	CIE L*a*b*表色系					RHSカラーチャート	
	L*値	a*値	b*値	色相角 (hue°)	彩度 (C*値)	チャート番号	色グループ
セイアラベラ 野生型	84.3	0.4	8.0	87.4	8.0	49C	Red
セイアラベラ 形質転換体							
1804-01	70.9	-2.7	-4.4	238.4	5.2	97C	Violet-Blue
1804-02	72.1	7.5	-6.9	317.5	10.2	N82D	Purple-Violet
1804-03	53.5	-2.8	2.3	140.7	3.7	97D	Violet-Blue

[0056] [実施例 1 1 : キク系統「T57」へのpB428の導入（キクF3Hプロモーター1k及びアグロバクテリウムnosターミネーター制御下でキク内在性F3' H遺伝子を抑制するとともに、キクF3Hプロモーター1k及びアラビドプシスHSPターミネーター制御下でカンパニュラF3' 5' H遺伝子及びチョウマメA3' 5' GT遺伝子を共発現）]

[1] ベクターの構築

実施例 8 にしたがって、pB428 (pBF3' H-Ci+CamF3' 5' H+CtA3' 5' GT) を作製した。

[0057] [2] 形質転換体の獲得及びその花色の測定

pB428を導入したアグロバクテリウムEHA105 (Dr. Elizabeth E. Hood氏より分譲) を用いて、サーモンピンク色系で中輪デコラ咲きのキク系統「T57」((有)精興園より提供を受けた育成系統を供試) を形質転換し、1系統の形質転換体を得た。色彩分光計 (CD100, 横河インスツルメンツ) とRHSカラーチャートでの測色を行った結果、青色方向への花色の変化が確認され、主要アントシアニンとしてデルフィニジン3-(6-マロニル)グルコシド 3' , 5' -ジグルコシド (テルナチンC5) 及びデルフィニジン 3, 3' , 5' -トリグルコシド (プレテルナチンC5) の蓄積を確認できた。この系統の花色はViolet-Blueグループへと改変されており、測色値を以下の表 1 1 に示す。

[表11]

[表 1 1]

系統番号	CIEL*a*b*表色系					RHSカラーチャート	
	L*値	a*値	b*値	色相角 (hue°)	彩度 (C*値)	チャート番号	色グループ
T57 野生型	61.5	31.6	-13.3	337.1	34.2	74B-C	Red-Purple
T57 形質転換体							
1890-01	56.5	7.3	-22.5	288.0	23.6	94A	Violet-Blue

[0058] [実施例 1 2 : キク品種「大平」へのpB436の導入（キクF3Hプロモーター1k及びアグロバクテリウムnosターミネーター制御下でカンパニュラF3' 5' H遺伝子、キクF3Hプロモーター1k及びアラビドプシスHSPターミネーター制御下

でチョウマメA3' 5' GT遺伝子及びダッチアイリスDFR遺伝子を共発現)]

[1] ベクターの構築

実施例 5 で得たpMCE5-2 ADHNF-IhDFRをAscIとPmeIで消化して得られる発現カセットと、AscIとSwaIで消化して得られるpB425バイナリーベクターのDNA断片を連結し、pB436 (pBCam2+CtA3' 5' GT+IhDFR) を得た。

[0059] [2] 形質転換体の獲得及びその花色の測定

pB436を導入したアグロバクテリウムEHA105 (Dr. Elizabeth E. Hood氏より分譲) を用いて、ピンク色系で中輪ギクのキク品種「大平」(花き研で無菌培養により維持している遺伝資源を供試) を形質転換し、57系統の形質転換体を得た。色彩分光計 (CD100, 横河インスツルメンツ) とRHSカラーチャートでの測色を行った結果、32系統 (56%) で青色方向への花色の変化が認められた。16系統 (全体の28%) で、色相角 290° 以下の青色を示し、また14系統 (全体の25%) でRHSカラーチャートでViolet-Blueグループの花色を示した。これら青色花形質を有する系統では、主要アントシアニンとしてデルフィニジン3-(6' ' -マロニル)グルコシド-3' , 5' -ジグルコシド (テルナチンC5) 及びデルフィニジン3, 3' , 5' -トリグルコシド (プレテルナチンC5) の蓄積を確認した。青色方向への花色改変が確認された形質転換体の測色値を以下の表 1 2 に示す。

[表12]

[表 1 2]

系統番号	CIEL*a*b*表色系					RHSカラーチャート	
	L*値	a*値	b*値	色相角 (hue°)	彩度 (C*値)	チャート番号	色グループ
大平 野生型*	79.5	9.7	-2.0	356.6	11.1	65B, N74C, 75B	Red-Purple /Purple
大平 形質転換体							
1738-01	81.0	7.1	-0.8	353.9	7.1	84B	Violet
1738-02	76.6	1.8	-5.9	287.2	6.2	96D	Violet-Blue
1738-03	74.3	6.0	-9.2	303.3	11.0	N82D	Purple-Violet
1738-05	70.6	3.7	-12.5	286.3	13.0	93D	Violet-Blue
1738-06	77.5	4.1	-6.3	302.8	7.5	85B	Violet
1738-08	69.5	2.7	-11.8	282.9	12.1	91C	Violet-Blue
1738-09	68.1	2.9	-15.4	280.7	15.7	96C-D	Violet-Blue
1738-11	78.8	0.6	-3.3	280.0	3.4	96D	Violet-Blue
1738-12	69.1	4.9	-12.0	292.1	12.9	91B	Violet-Blue
1738-15	77.4	3.8	-6.4	300.9	7.5	85A-B	Violet
1738-16	70.5	5.8	-11.6	296.4	13.0	N88C-D	Violet
1738-21	53.2	4.8	-24.6	280.9	25.1	95C	Violet-Blue
1738-23	81.3	2.1	-2.6	309.6	3.4	N88C-D	Violet
1738-24	71.2	3.1	-11.6	284.9	12.0	91B-C	Violet-Blue
1738-25	77.0	2.8	-7.9	289.3	8.4	85B	Violet
1738-27	81.1	2.3	-3.9	300.7	4.5	85D	Violet
1738-28	60.9	3.3	-20.7	279.0	20.9	97A	Violet-Blue
1738-30	58.4	5.9	-16.9	289.2	17.9	94B	Violet-Blue
1738-31	77.6	1.9	-5.5	288.8	5.8	NA	NA
1738-32	70.0	4.9	-9.3	297.6	10.5	N88C-D	Violet
1738-33	70.8	6.1	-11.3	298.5	12.9	85B	Violet
1738-35	71.2	5.9	-10.5	299.2	12.0	85B	Violet
1738-38	68.4	2.0	-8.9	282.8	9.1	NA	NA
1738-41	71.6	2.1	-9.8	282.0	10.0	95D	Violet-Blue
1738-52	74.8	4.1	-7.7	298.0	8.7	85B	Violet
1738-53	75.3	5.7	-7.4	307.5	9.4	85B-C	Violet
1738-54	77.3	4.4	-5.2	310.1	6.8	85B	Violet
1738-57	73.0	4.6	-8.6	298.4	9.7	85B	Violet
1738-58	67.8	1.5	-12.5	277.0	12.6	95D	Violet-Blue
1738-60	76.9	0.2	-7.6	271.3	7.6	97C	Violet-Blue
1738-62	65.9	1.5	-13.2	276.6	13.3	96C-D	Violet-Blue
1738-63	77.4	3.1	-5.8	298.1	6.6	85B	Violet

*平均値 (n=23)

NA: 分析・測定せず

[0060] [実施例 1 3 : キク品種「大平」へのpB437の導入 (キクF3Hプロモーター1k
及びアグロバクテリウムnosターミネーター制御下でカンパニユラF3' 5' H遺
伝子、キクF3Hプロモーター1k及びアラビドプシスHSPターミネーター制御下

でチョウマメA3' 5' GT遺伝子及びデルフィニウムDFR遺伝子を共発現)]

[1] ベクターの構築

実施例 6 で得た pMCE5-2 ADHNF-DbDFR を AscI と PmeI で消化して得られる発現カセットと、AscI と SwaI で消化して得られる pB425 バイナリーベクターの DNA 断片を連結し、pB437 (pBCam2+CtA3' 5' GT+DbDFR) を得た。

[0061] [2] 形質転換体の獲得及びその花色の測定

pB437 を導入したアグロバクテリウム EHA105 (Dr. Elizabeth E. Hood 氏より分譲) を用いて、ピンク色系で中輪ギクのキク品種「大平」(花き研で無菌培養により維持している遺伝資源を供試) を形質転換し、38 系統の形質転換体を得た。色彩分光計 (CD100, 横河インスツルメンツ) と RHS カラーチャートでの測色を行った結果、21 系統 (55%) で青色方向への花色の変化が認められた。そのうちの 9 系統 (全体の 24%) で、色相角 290° 以下の青色を示し、また 8 系統 (全体の 21%) で RHS カラーチャートで Violet-Blue グループの花色を示した。これら青色花形質を有する系統では、主要アントシアニンとしてデルフィニジン 3-(6' '-マロニル)グルコシド-3' , 5' -ジグルコシド (テルナチン C5) 及びデルフィニジン 3, 3' , 5' -トリグルコシド (プレテルナチン C5) の蓄積を確認した。青色方向への花色改変が確認された形質転換体の測色値を以下の表 1 3 に示す。

[表13]

[表 1 3]

系統番号	CIEL*a*b*表色系					RHSカラーチャート	
	L*値	a*値	b*値	色相角 (hue°)	彩度 (C*値)	チャート番号	色グループ
大平 野生型*	79.5	9.7	-2.0	356.6	11.1	65B, N74C, 75B	Red-Purple /Purple
大平 形質転換体							
1746-03	68.8	7.0	-12.8	298.8	14.6	N88C	Violet
1746-08	76.4	1.3	-4.9	284.7	5.1	NA	NA
1746-10	79.5	3.2	-5.2	302.0	6.1	85C	Violet
1746-11	70.6	4.0	-9.0	294.0	9.9	N82D	Purple-Violet
1746-12	76.2	-0.3	-5.9	267.1	5.9	92C-D	Violet-Blue
1746-13	76.0	1.7	-6.4	285.0	6.7	92C-D	Violet-Blue
1746-23	67.6	3.2	-9.8	287.9	10.3	85B	Violet
1746-25	76.7	2.8	-4.7	300.7	5.5	85C	Violet
1746-28	73.5	3.0	-5.1	300.1	5.9	85A-B	Violet
1746-30	NA	NA	NA	NA	NA	N82D	Purple-Violet
1746-31	71.2	3.8	-10.5	289.8	11.1	92B	Violet-Blue
1746-32	73.9	2.6	-6.1	293.4	6.6	91B	Violet-Blue
1746-34	72.1	3.1	-10.6	286.5	11.1	91B	Violet-Blue
1746-35	72.4	2.5	-9.4	284.7	9.7	92B	Violet-Blue
1746-36	72.5	7.5	-11.2	303.7	13.5	85A	Violet
1746-37	74.5	11.2	-7.6	325.8	13.5	N80C	Purple-Violet
1746-38	64.8	4.7	-15.1	287.4	15.8	94B	Violet-Blue
1762-03	69.9	2.4	-11.2	282.0	11.5	91B-C	Violet-Blue
1762-06	74.2	7.6	-5.5	324.2	9.3	N80D	Purple-Violet
1762-11	78.9	1.6	-2.8	299.2	3.2	85D	Violet
1762-17	77.8	5.4	-5.6	313.9	7.8	N88D	Violet

*平均値 (n=23)

NA: 分析・測定せず

[0062] [実施例 1 4 : キク品種「大平」へのpB438の導入 (キクF3Hプロモーター1k 及びアグロバクテリウムnosターミネーター制御下でカンパニユラF3' 5' H遺伝子、キクF3Hプロモーター1k及びアラビドプシスHSPターミネーター制御下でチョウマメA3' 5' GT遺伝子及びチョウマメDFR遺伝子を共発現)]

[1] ベクターの構築

実施例 7 で得たpMCE5-2 ADHNF-CtDFRをAscIとPmeIで消化して得られる発現カセットと、AscIとSwaIで消化して得られるpB425バイナリーベクターのDNA断片を連結し、pB438 (pBCam2+CtA3' 5' GT+CtDFR) を得た。

[0063] [2] 形質転換体の獲得及びその花色の測定

pB438を導入したアグロバクテリウムEHA105 (Dr. Elizabeth E. Hood氏より分譲) を用いて、ピンク色系で中輪ギクのキク品種「大平」(花き研で無菌培養により維持している遺伝資源を供試) を形質転換し、55系統の形質転換体を得た。色彩分光計 (CD100, 横河インスツルメンツ) とRHSカラーチャートでの測色を行った結果、34系統 (62%) で青色方向への花色の変化が認められた。そのうちの13系統 (全体の24%) で、色相角 290° 以下の青色を示した。また18系統 (全体の33%) で、RHSカラーチャートのViolet-Blueグループの花色を示した。これら青色花形質を有する系統では、主要アントシアニンとしてデルフィニジン3-(6'- α -マロニル)グルコシド-3', 5'-ジグルコシド (テルナチンC5) 及びデルフィニジン3, 3', 5'-トリグルコシド (プレテルナチンC5) の蓄積を確認した。青色方向への花色改変が確認された形質転換体の測色値を以下の表 1 4 に示す。

[表14]

[表 1 4]

系統番号	CIEL*a*b*表色系					RHSカラーチャート	
	L*値	a*値	b*値	色相角 (hue°)	彩度 (C*値)	チャート番号	色グループ
大平 野生型*	79.5	9.7	-2.0	356.6	11.1	65B, N74C, 75B	Red-Purple /Purple
大平 形質転換体							
1747-01	71.8	7.2	-8.6	309.6	11.2	N82D	Purple-Violet
1747-02	69.5	2.0	-11.2	280.1	11.4	96D	Violet-Blue
1747-04	64.2	2.2	-14.9	278.6	15.1	96D	Violet-Blue
1747-05	71.8	2.5	-13.6	280.5	13.8	96D	Violet-Blue
1747-07	80.1	0.8	-4.2	280.4	4.3	91B-C	Violet-Blue
1747-08	71.1	7.4	-9.0	309.4	11.7	N82C	Purple-Violet
1747-09	78.0	7.6	-2.9	339.2	8.2	N80D	Purple-Violet
1747-11	74.8	11.9	-7.6	327.5	14.1	N80D	Purple-Violet
1747-13	71.9	4.7	-9.3	296.5	10.4	91A-B	Violet-Blue
1747-14	69.2	8.0	-12.1	303.5	14.5	N88C	Violet
1747-15	65.2	4.1	-16.7	283.8	17.2	96C-D	Violet-Blue
1747-16	70.1	12.2	-7.5	328.5	14.3	N80C	Purple-Violet
1747-17	66.9	2.6	-11.7	282.3	12.0	92B	Violet-Blue
1747-19	77.0	-0.4	-5.4	274.0	5.4	92C-D	Violet-Blue
1747-22	78.7	5.3	-4.5	319.7	6.9	85A	Violet
1747-23	72.1	3.9	-9.0	293.3	9.8	N88C	Violet
1747-24	77.2	4.1	-5.0	309.4	6.4	N82D	Purple-violet
1747-29	72.4	7.2	-6.7	317.1	9.9	N87C-D	Violet
1747-34	68.0	4.6	-9.9	295.2	10.9	91A-B	Violet-Blue
1747-35	71.0	1.9	-12.0	279.0	12.2	97A	Violet-Blue
1747-43	67.3	7.0	-10.3	304.2	12.5	85A	Violet
1747-44	63.2	5.0	-18.6	284.9	19.3	93D	Violet-Blue
1747-45	71.1	3.8	-9.3	292.2	10.0	85B	Violet
1747-46	60.5	2.4	-16.3	278.5	16.4	96C-D	Violet-Blue
1747-47	75.4	3.6	-7.3	295.9	8.1	85B-C	Violet
1747-48	65.4	2.8	-13.7	281.7	14.0	96D	Violet-Blue
1747-49	69.5	4.5	-10.1	294.2	11.1	91A-B	Violet-Blue
1747-52	73.5	5.6	-10.6	297.9	12.0	91A	Violet-Blue
1747-53	67.5	3.2	-13.0	283.9	13.4	96D	Violet-Blue
1747-55	62.6	9.7	-17.7	298.6	20.2	92A	Violet-Blue
1747-56	73.5	5.0	-7.8	302.7	9.3	N88D	Violet
1747-59	71.3	4.2	-8.6	296.1	9.6	85B	Violet
1747-60	62.4	2.8	-17.8	278.8	18.0	96D	Violet-Blue
1747-63	80.4	5.2	-1.3	345.9	5.4	N81D	Purple-Violet

*平均値 (n=23)

[0064] [実施例 1 5 : キク品種「大平」へのpB426の導入 (キクF3Hプロモーター1k
及びアグロバクテリウムnosターミネーター制御下でカンパニユラF3' 5' H遺
伝子、キクF3Hプロモーター1k及びアラビドプシスHSPターミネーター制御下

でデルフィニウムDFR遺伝子及びチョウマメA3' 5' GT遺伝子を共発現)]

[1] ベクターの構築

実施例 6 で得た pMCE5-2 ADHNF-DbDFR を FseI と PmeI で消化して得られる発現カセットと、FseI と SwaI で消化して得られる pB315 バイナリーベクターの DNA 断片を連結し、pBCam2+DbDFR を得た。このバイナリーベクターを FseI と SwaI で消化して得られる DNA 断片と pMCE5-2 ADHNF-CtA3' 5' GT を FseI と PmeI で消化して得られる CmF3Hp1k:ADHNF-CtA3' 5' GT:AtHSPt カセットを連結し、pB426 (pBCam2+DbDFR+CtA3' 5' GT) を得た。

[0065] [2] 形質転換体の獲得及びその花色の測定

pB426 を導入した アグロバクテリウム EHA105 (Dr. Elizabeth E. Hood 氏より分譲) を用いて、ピンク色系で中輪ギクのキク品種「大平」(花き研で無菌培養により維持している遺伝資源を供試) を形質転換し、47 系統の形質転換体を得た。色彩分光計 (CD100, 横河インスツルメンツ) と RHS カラーチャートでの測色を行った結果、28 系統 (60%) で青色方向への花色の変化が認められた。そのうちの 9 系統 (全体の 19%) で、色相角 290° 以下の青色を示し、また 10 系統 (全体の 21%) で RHS カラーチャートでの測色では Violet-Blue グループの花色を示した。これら青色花形質を有する系統では、主要アントシアニンとしてデルフィニジン 3-(6' '-マロニル)グルコシド-3' , 5' -ジグルコシド (テルナチン C5) 及びデルフィニジン 3, 3' , 5' -トリグルコシド (プレテルナチン C5) の蓄積を確認した。青色方向への花色改変が確認された形質転換体の測色値を以下の表 15 に示す。

[表15]

[表 15]

系統番号	CIEL*a*b*表色系					RHSカラーチャート	
	L*値	a*値	b*値	色相角 (hue°)	彩度 (C*値)	チャート番号	色グループ
大平 野生型*	79.5	9.7	-2.0	356.6	11.1	65B, N74C, 75B	Red-Purple /Purple
大平 形質転換体							
1742-02	71.2	2.2	-10.1	282.3	10.3	NA	NA
1742-03	71.5	10.4	-9.9	316.4	14.3	N82C-D	Purple-Violet
1742-04	60.3	3.9	-14.7	284.9	15.3	92A-B	Violet-Blue
1742-05	74.7	2.5	-10.3	283.9	10.6	91B	Violet-Blue
1742-07	79.4	4.5	-4.7	314.0	6.5	76B	Purple
1742-08	69.7	3.0	-10.7	285.5	11.1	92B	Violet-Blue
1742-10	79.4	3.6	-4.0	312.0	5.4	N82D	Purple-Violet
1742-13	54.0	2.8	-19.6	278.2	19.8	96B	Violet-Blue
1742-14	59.6	12.5	-14.4	310.9	19.0	N87B	Violet
1742-18	75.9	2.0	-7.3	284.9	7.6	92B	Violet-Blue
1742-20	68.3	7.5	-9.4	308.4	12.1	N87C-D	Violet
1742-22	70.8	3.9	-9.0	293.3	9.8	91B	Violet-Blue
1742-23	60.9	5.3	-21.2	284.0	21.9	96C-D	Violet-Blue
1742-24	61.8	5.2	-16.5	287.4	17.3	92B	Violet-Blue
1742-25	73.5	5.5	-9.1	301.2	10.6	N88C	Violet
1742-26	66.4	11.5	-8.8	322.6	14.4	N80C	Purple-Violet
1742-28	74.9	8.4	-5.7	326.0	10.1	84B-C	Violet
1742-30	74.5	8.1	-7.5	317.1	11.0	N82D	Purple-Violet
1742-31	66.7	6.9	-15.6	293.8	17.1	92A-B	Violet-Blue
1742-33	76.8	5.0	-4.4	318.6	6.6	76B	Purple
1742-34	75.7	2.8	-6.6	293.1	7.1	85B	Violet
1742-36	65.5	5.2	-9.4	299.0	10.8	85B-C	Violet
1742-37	72.5	5.8	-8.9	303.1	10.6	85B	Violet
1742-38	72.7	6.0	-8.4	305.5	10.3	N82D	Purple-Violet
1742-39	66.7	3.1	-15.0	281.9	15.3	96C-D	Violet-Blue
1742-44	74.4	5.8	-6.7	310.7	8.8	N87C	Violet
1761-07	74.9	9.1	-9.7	313.1	13.3	85A	Violet
1761-08	74.0	7.3	-6.3	318.9	9.6	76A	Purple

*平均値 (n=23)

NA: 分析・測定せず

[0066] [実施例 16: キク品種「大平」へのpB427の導入 (キクF3Hプロモーター1k及びアグロバクテリウムnosターミネーター制御下でカンパニユラF3' 5' H遺伝子、キクF3Hプロモーター1k及びアラビドプシスHSPターミネーター制御下でチョウマメDFR遺伝子及びチョウマメA3' 5' GT遺伝子を共発現)]

[1] ベクターの構築

実施例7で得たpMCE5-2 ADHNF-CtDFRをFseIとPmeIで消化して得られる発現カセットと、FseIとSwaIで消化して得られるpB315バイナリーベクターのDNA断片を連結し、pBCam2+CtDFRを得た。このバイナリーベクターをFseIとSwaIで消化して得られるDNA断片とpMCE5-2 ADHNF-CtA3' 5' GTをFseIとPmeIで消化して得られるCmF3Hp1k:ADHNF-CtA3' 5' GT:AtHSPtカセットを連結し、pB427 (pBCam2+CtDFR+CtA3' 5' GT) を得た。

[0067] [2] 形質転換体の獲得及びその花色の測定

pB427を導入したアグロバクテリウムEHA105 (Dr. Elizabeth E. Hood氏より分譲) を用いて、ピンク色系で中輪ギクのキク品種「大平」(花き研で無菌培養により維持している遺伝資源を供試) を形質転換し、24系統の形質転換体を得た。色彩分光計 (CD100, 横河インスツルメンツ) とRHSカラーチャートでの測色を行った結果、15系統 (63%) で青色方向への花色の変化が認められた。そのうちの4系統 (全体の17%) で、色相角 290° 以下の青色を示し、RHSカラーチャートのViolet-Blueグループの花色を示した。これら青色花形質を有する系統では、主要アントシアニンとしてデルフィニジン3-(6' '-マロニル)グルコシド-3', 5' -ジグルコシド (テルナチンC5) 及びデルフィニジン3, 3', 5' -トリグルコシド (プレテルナチンC5) の蓄積を確認した。青色方向への花色改変が確認された形質転換体の測色値を以下の表16に示す。

[表16]

[表 16]

系統番号	CIEL*a*b*表色系					RHSカラーチャート	
	L*値	a*値	b*値	色相角 (hue°)	彩度 (C*値)	チャート番号	色グループ
大平 野生型*	79.5	9.7	-2.0	356.6	11.1	65B, N74C, 75B	Red-Purple /Purple
大平 形質転換体							
1743-10	74.2	6.2	-6.5	313.6	9.0	N78C	Purple
1743-31	76.7	2.4	-5.0	295.5	5.5	85B	Violet
1743-32	72.8	3.2	-5.8	299.1	6.6	NA	NA
1743-36	71.0	4.5	-7.8	300.3	9.0	85A	Violet
1743-38	75.8	2.4	-6.2	291.5	6.7	85B	Violet
1743-40	70.9	9.5	-12.7	307.0	15.9	85A	Violet
1743-41	67.4	8.2	-13.3	301.6	15.6	85A	Violet
1743-43	60.9	4.0	-18.4	282.4	18.8	94B	Violet-Blue
1743-44	77.5	2.9	-3.5	309.7	4.6	N82D	Violet
1743-46	75.2	7.2	-6.7	317.2	9.8	76A-B	Purple
1743-47	73.6	8.8	-9.1	313.9	12.7	85A	Violet
1743-48	68.5	6.6	-11.4	300.3	13.2	85A	Violet
1743-49-1	64.9	4.2	-17.0	283.8	17.5	94B	Violet-Blue
1743-49-2	62.8	3.5	-15.7	282.5	16.1	96D	Violet-Blue
1743-50	75.4	-0.6	-5.2	264.0	5.3	97B-C	Violet-Blue

*平均値 (n=23)

NA: 分析・測定せず

[0068] [実施例 17: キク品種「大平」へのpB419の導入 (キクF3Hプロモーター1k 及びアグロバクテリウムnosターミネーター制御下でカンパニュラF3' 5' H遺伝子、キクF3Hプロモーター1k及びアラビドプシスHSPターミネーター制御下でチョウマメAGS遺伝子及びチョウマメA3' 5' GT遺伝子を共発現)]

[1] ベクターの構築

pBSII-ADH-CtA3' 5' GTをNheIとEcoICRIで消化して得られるDNA断片と、pMCE5-2 (FASS-CmF3Hp-AtHSPt) をNheIとEcoICRIで消化して得られるベクターの断片を連結し、pMCE5-2 ADHNF-CtA3' 5' GTを得た。このプラスミドをFseIとPmeIで消化して得られる発現カセットと、FseIとSwaIで消化して得られるpB420 (pBCam2+CtAGS; 参考例4) のバイナリーベクター断片を連結し、pB419 (pBCam2+CtAGS+CtA3' 5' GT) を得た。

[0069] [2] 形質転換体の獲得及びその花色の測定

pB419を導入したアグロバクテリウムEHA105 (Dr. Elizabeth E. Hood氏より分譲) を用いて、ピンク色系で中輪ギクのキク品種「大平」(花き研で無菌培養により維持している遺伝資源を供試) を形質転換し、20系統の形質転換体を得た。色彩分光計 (CD100, 横河インスツルメンツ) とRHSカラーチャートでの測色を行った結果、12系統(60%)で青色方向への花色の変化が認められた。そのうちの5系統(全体の25%)で、色相角 290° 以下の青色を示した。また、3系統(全体の15%)でRHSカラーチャートでViolet-Blueグループの花色を示した。これら青色花形質を有する系統では、主要アントシアニンとしてデルフィニジン3-(6'- α -マロニル)グルコシド-3', 5'-ジグルコシド (テルナチンC5) 及びデルフィニジン3, 3', 5'-トリグルコシド (プレテルナチンC5) の蓄積を確認した。青色方向への花色改変が確認された形質転換体の測色値を以下の表17に示す。

[表17]

[表17]

系統番号	CIEL*a*b*表色系					RHS カラーチャート	
	L*値	a*値	b*値	色相角 (hue $^{\circ}$)	彩度 (C*値)	チャート番号	色グループ
大平 野生型*	79.5	9.7	-2.0	356.6	11.1	65B, N74C, 75B	Red-Purple /Purple
大平 形質転換体							
1732-01	64.7	3.3	-15.3	282.3	15.6	96C-D	Violet-Blue
1732-04	75.2	4.2	-6.8	301.9	8.0	85A	violet
1732-06	75.5	3.3	-6.4	297.2	7.2	85B	Violet
1732-08	72.4	2.4	-9.0	285.1	9.3	85B	Violet
1732-11	74.7	9.3	-6.3	325.6	11.2	N80C-D	Purple-Violet
1732-12	61.9	3.9	-18.5	281.9	18.9	96C-D	Violet-Blue
1732-13	72.7	6.0	-6.5	312.9	8.9	85A-B	Violet
1732-14	72.6	6.9	-8.5	309.0	11.0	85A	Violet
1732-15	73.4	2.8	-8.9	287.4	9.3	91B	Violet-Blue
1732-16	73.1	5.9	-7.8	307.3	9.8	85A-B	Violet
1732-17	73.6	3.3	-9.9	288.3	10.4	NA	NA
1732-21	80.6	9.0	-4.1	335.6	9.9	N80D	Purple-Violet

*平均値 (n=23)

NA: 分析・測定せず

[0070] [実施例18: キク品種「大平」へのpB432の導入 (キクF3Hプロモーター1k

及びアグロバクテリウムnosターミネーター制御下でカンパニュラF3' 5' H遺伝子、キクF3Hプロモーター1k及びアラビドプシスHSPターミネーター制御下でチョウマメAGS遺伝子、チョウマメA3' 5' GT遺伝子及びダッチアイリスDFR遺伝子を共発現)]

[1] ベクターの構築

pMCE5-2- ADHNF-DbDFRをFseIとPmeIで消化して得られる発現カセットと、FseIとSwaIで消化して得られるpB419 (pBCam2+CtAGS+CtA3' 5' GT) のバイナリーベクター断片を連結し、pB432 (pBCam2+CtAGS+CtA3' 5' GT+IhDFR) を得た。

[0071] [2] 形質転換体の獲得及びその花色の測定

pB432を導入したアグロバクテリウムEHA105 (Dr. Elizabeth E. Hood氏より分譲) を用いて、ピンク色系で中輪ギクのキク品種「大平」(花き研で無菌培養により維持している遺伝資源を供試) を形質転換し、47系統の形質転換体を得た。色彩分光計 (CD100, 横河インスツルメンツ) とRHSカラーチャートでの測色を行った結果、23系統 (49%) で青色方向への花色の変化が認められた。そのうちの12系統 (全体の26%) で、色相角 290° 以下の青色を示した。また13系統 (全体の28%) でRHSカラーチャートのBlueグループまたはViolet-Blueグループの色を示した。これら青色花形質を有する系統では、主要アントシアニンとしてデルフィニジン3-(6' '-マロニル)グルコシド-3' , 5' -ジグルコシド (テルナチンC5) 及びデルフィニジン3, 3' , 5' -トリグルコシド (プレテルナチンC5) の蓄積を確認した。青色方向への花色改変が確認された形質転換体の測色値を以下の表 18 に示す。

[表18]

[表 18]

系統番号	CIEL*a*b*表色系					RHSカラーチャート	
	L*値	a*値	b*値	色相角 (hue°)	彩度 (C*値)	チャート番号	色グループ
大平 野生型*	79.5	9.7	-2.0	356.6	11.1	65B, N74C, 75B	Red-Purple /Purple
大平 形質転換体							
1740-02	64.8	3.6	-16.5	282.2	16.9	96C-D	Violet-Blue
1740-03	69.0	13.2	-11.7	318.5	17.7	N81B-C	Purple-Violet
1740-05	68.0	2.3	-12.0	280.9	12.3	91B-C	Violet-Blue
1740-08	74.2	7.7	-2.2	344.1	8.0	N80C	Purple-Violet
1740-09	66.8	4.8	-14.4	288.4	15.2	94B	Violet-Blue
1740-10	72.4	5.3	-10.9	295.8	12.1	92B	Violet-Blue
1740-18	58.9	5.3	-21.0	284.1	21.7	96D	Violet-Blue
1740-19	49.9	23.7	-22.1	316.9	32.4	N82A-B	Purple-Violet
1740-20	67.4	11.3	-10.7	316.4	15.6	N82B	Purple-Violet
1740-21	71.0	7.0	-9.5	306.4	11.8	N88C	Violet
1740-22	70.3	6.3	-12.4	296.8	13.9	N88C-D	Violet
1740-23	72.5	3.2	-10.2	287.2	10.7	91A-B	Violet-Blue
1740-24	61.9	13.0	-8.1	328.0	15.4	N80C	Purple-Violet
1740-25	75.2	3.9	-7.6	296.9	8.6	85B	Violet
1740-26	67.9	6.0	-6.4	312.9	8.8	N88C	Violet
1740-29	61.5	4.1	-14.7	285.7	15.3	94B-C	Violet-Blue
1740-35	64.6	4.2	-16.1	284.6	16.6	94B-C	Violet-Blue
1740-37	64.8	2.2	-16.6	277.4	16.7	96D	Violet-Blue
1740-38	72.0	2.8	-11.4	284.0	11.7	94C-D	Violet-Blue
1740-40	74.3	0.6	-9.5	273.5	9.5	96D	Violet-Blue
1740-43	50.5	4.2	-24.7	279.7	25.0	99B-C	Blue
1740-54	43.1	28.0	-23.6	319.8	36.6	83B	Violet
1740-57	63.5	3.7	-18.9	281.1	19.3	96B-C	Violet-Blue

*平均値 (n=23)

[0072] [実施例 19 : キク品種「セイショール」へのpB423の導入 (キクF3Hプロモーター1kとアグロバクテリウムnosターミネーター制御下でのチョウマメA3' 5' GT遺伝子及びキクF3Hプロモーター1kとアラビドプシスHSPターミネーター制御下でのカンパニユラF3' 5' H遺伝子の共発現)]

[1] ベクターの構築

実施例 1 に従い、pB423 (pBCtA3' 5' GT+CamF3' 5' H) を作製した。

[0073] [2] 形質転換体の獲得及びその花色の測定

pB423を導入したアグロバクテリウムEHA105 (Dr. Elizabeth E. Hood氏よ

り分譲)を用いて、ピンク色系で大輪デコラ咲きのキク品種「セイショール」((有)イノチオ精興園)を形質転換し、2系統の形質転換体を得た。色彩分光計(CD100, 横河インスツルメンツ)とRHSカラーチャートでの測色を行った結果、1系統(50%)で色相角290°以下でRHSカラーチャートのViolet-Blueグループを示す青いキクが作出された。花色の青色方向への改変が確認された形質転換体の測色値を以下の表19に示す。

[表19]

系統番号	CIEL*a*b*表色系					RHSカラーチャート	
	L*値	a*値	b*値	色相角 (hue°)	彩度 (C*値)	RHCCC	Color group
セイショール 野生型	80.5	11.4	-1.1	354.5	11.5	N74C	Red-Purple
セイショール 形質転換体							
2022-01	83.0	0.5	-2.2	282.2	2.3	NA	NA

NA: 分析・測定せず

[0074] [実施例20: キク品種「カンデラティエラ」へのpB423の導入(キクF3Hプロモーター1kとアグロバクテリウムnosターミネーター制御下でのチョウマメA3' 5' GT遺伝子及びキクF3Hプロモーター1kとアラビドプシスHSPターミネーター制御下でのカンパニユラF3' 5' H遺伝子の共発現)]

[1] ベクターの構築

実施例1に従い、pB423(pBCtA3' 5' GT+CamF3' 5' H)を作製した。

[0075] [2] 形質転換体の獲得及びその花色の測定

pB423を導入したアグロバクテリウムEHA105(Dr. Elizabeth E. Hood氏より分譲)を用いて、ピンク色系でデコラ咲きのキク品種「カンデラティエラ」((有)イノチオ精興園)を形質転換し、3系統の形質転換体を得た。色彩分光計(CD100, 横河インスツルメンツ)とRHSカラーチャートでの測色を行った結果、1系統(33%)でRHSカラーチャートのViolet-Blueグループを示す青いキクが作出された。花色の青色方向への改変が確認された形質転換体の測色値を以下の表20に示す。

[表20]

[表 2 0]

系統番号	CIEL*a*b*表色系					RHSカラーチャート	
	L*値	a*値	b*値	色相角 (hue°)	彩度 (C*値)	チャート番号	色グループ
カンデラティエラ 野生型	54.7	30.9	-12.0	338.8	33.1	71B	Red-Purple
カンデラティエラ 形質転換体							
1946-03	56.8	8.3	-21.8	290.8	23.3	96B	Violet-Blue
1985-04	53.3	7.5	-17.4	293.2	19.0	NA	NA
2052-07	54.2	14.4	-19.0	307.1	23.8	NA	NA

NA: 分析・測定せず

[0076] [実施例 2 1 : キク系統「T10」へのpB423の導入（キクF3Hプロモーター1kとアグロバクテリウムnosターミネーター制御下でのチョウマメA3' 5' GT遺伝子及びキクF3Hプロモーター1kとアラビドプシスHSPターミネーター制御下でのカンパニユラF3' 5' H遺伝子の共発現）]

[1] ベクターの構築

実施例 1 に従い、pB423（pBCtA3' 5' GT+CamF3' 5' H）を作製した。

[0077] [2] 形質転換体の獲得及びその花色の測定

pB423を導入したアグロバクテリウムEHA105（Dr. Elizabeth E. Hood氏より分譲）を用いて、紅色系でデコラ咲きのキク系統「T10」（（有）イノチオ精興園より提供を受けた育成系統を供試）を形質転換し、3系統の形質転換体を得た。色彩分光計（CD100, 横河インスツルメンツ）とRHSカラーチャートでの測色を行った結果、1系統（33%）でRHSカラーチャートのViolet-Blueグループを示す青いキクが作出された。花色の青色方向への改変が確認された形質転換体の測色値を以下の表 2 1 に示す。

[表21]

[表 2 1]

系統番号	CIE L*a*b*表色系					RHSカラーチャート	
	L*値	a*値	b*値	色相角 (hue°)	彩度 (C*値)	チャート番号	色グループ
T10 野生型	31.1	43.1	-10.3	346.5	44.3	71A	Red-Purple
T10 形質転換体							
1945-01	32.0	16.1	-31.2	297.3	35.1	N89B	Violet-Blue
2051-01	21.9	25.5	-16.0	327.9	30.1	NA	NA

NA: 分析・測定せず

[0078] [実施例 2 2 : キク系統「T24」へのpB423の導入（キクF3Hプロモーター1kとアグロバクテリウムnosターミネーター制御下でのチョウマメA3' 5' GT遺伝子及びキクF3Hプロモーター1kとアラビドプシスHSPターミネーター制御下でのカンパニュラF3' 5' H遺伝子の共発現）]

[1] ベクターの構築

実施例 1 に従い、pB423 (pBCtA3' 5' GT+CamF3' 5' H) を作製した。

[0079] [2] 形質転換体の獲得及びその花色の測定

pB423を導入したアグロバクテリウムEHA105 (Dr. Elizabeth E. Hood氏より分譲) を用いて、ピンク色系で大輪咲きの厚物キク系統「T24」((有)イノチオ精興園より提供を受けた育成系統を供試) を形質転換し、4系統の形質転換体を得た。色彩分光計 (CD100, 横河インスツルメンツ) とRHSカラーチャートでの測色を行った結果、1系統 (25%) で色相角290° 以下でRHSカラーチャートのViolet-Blueグループを示す青いキクが作出された。花色の青色方向への改変が確認された形質転換体の測色値を以下の表 2 2 に示す。

[表22]

[表 2 2]

系統番号	CIEL*a*b*表色系					RHSカラーチャート	
	L*値	a*値	b*値	色相角 (hue°)	彩度 (C*値)	チャート番号	色グループ
T24 野生型	44.6	39.3	-14.6	339.6	41.9	N74B-C	Red-Purple
T24 形質転換体							
1999-01	65.1	1.5	-17.5	274.9	17.6	100D	Blue
2044-01	60.0	6.4	-13.0	296.0	14.5	NA	NA
1999-02	68.1	9.6	-6.5	325.9	11.6	82D	Purple-Violet
2019-01	76.8	10.7	-1.3	353.1	10.8	NA	NA

NA: 分析・測定せず

[0080] [実施例 2 3 : キク系統「T27」へのpB423の導入 (キクF3Hプロモーター1kとアグロバクテリウムnosターミネーター制御下でのチョウマメA3' 5' GT遺伝子及びキクF3Hプロモーター1kとアラビドプシスHSPターミネーター制御下でのカンパニュラF3' 5' H遺伝子の共発現)]

[1] ベクターの構築

実施例 1 に従い、pB423 (pBCtA3' 5' GT+CamF3' 5' H) を作製した。

[0081] [2] 形質転換体の獲得及びその花色の測定

pB423を導入したアグロバクテリウムEHA105 (Dr. Elizabeth E. Hood氏より分譲) を用いて、ピンク色系でポンポン咲きのキク系統「T27」 ((有) イノチオ精興園より提供を受けた育成系統を供試) を形質転換し、21系統の形質転換体を得た。色彩分光計 (CD100, 横河インスツルメンツ) とRHSカラーチャートでの測色を行った結果、11系統 (52%) で色相角290° 以下を示し、17系統 (81%) でRHSカラーチャートのViolet-Blueグループを示す青いキクが作出された。花色の青色方向への改変が確認された形質転換体の測色値を以下の表 2 3 に示す。

[表23]

[表 2 3]

系統番号	CIEL*a*b*表色系					RHSカラーチャート	
	L*値	a*値	b*値	色相角 (hue°)	彩度 (C*値)	チャート番号	色グループ
T27 野生型	75.1	16.9	-4.6	344.8	17.5	73B	Red-Purple
T27 形質転換体							
1964-01	60.3	3.8	-16.4	283.2	16.8	96C	Violet-Blue
1964-04	72.9	6.3	-4.8	323.0	7.9	84A-B	Violet
1964-05	62.9	4.3	-16.2	284.9	16.7	96C-D	Violet-Blue
1964-06	62.0	6.2	-16.3	290.6	17.5	94B	Violet-Blue
1964-07	62.0	6.7	-15.7	293.2	17.1	92A	Violet-Blue
1964-08	65.5	4.9	-12.0	292.2	12.9	96C-D	Violet-Blue
1964-09	57.4	3.7	-14.8	284.1	15.3	96C-D	Violet-Blue
1964-10	66.5	2.9	-4.6	301.8	5.5	96C-D	Violet-Blue
1964-11	55.2	4.4	-17.3	284.4	17.8	96D	Violet-Blue
1964-12	61.9	7.5	-11.1	304.0	13.4	91A	Violet-Blue
1964-13	62.1	4.5	-11.7	290.8	12.5	85B-C	Violet
1974-01	55.9	2.0	-11.4	279.9	11.6	97A	Violet-Blue
1974-02	61.9	4.0	-16.2	283.8	16.7	97A	Violet-Blue
1974-03	62.2	4.2	-13.1	287.8	13.8	93C-D	Violet-Blue
1974-04	71.4	2.4	-5.6	293.7	6.1	94B-C	Violet-Blue
1974-06	63.0	0.8	-8.5	275.0	8.6	94B	Violet-Blue
1974-07	59.2	3.5	-15.7	282.5	16.1	94C	Violet-Blue
1974-08	68.8	4.1	-6.9	300.9	8.0	85B-C	Violet
1974-09	72.3	12.4	-9.2	323.3	15.4	N81C-D	Purple-Violet
1974-12	59.9	2.0	-8.4	283.4	8.6	91B	Violet-Blue
2006-03	69.1	2.5	-10.6	283.3	10.9	96D	Violet-Blue

[0082] [実施例24：キク系統「T44」へのpB423の導入（キクF3Hプロモーター1kとアグロバクテリウムnosターミネーター制御下でのチョウマメA3' 5' GT遺伝子及びキクF3Hプロモーター1kとアラビドプシスHSPターミネーター制御下でのカンパニュラF3' 5' H遺伝子の共発現）]

[1] ベクターの構築

実施例1に従い、pB423（pBCtA3' 5' GT+CamF3' 5' H）を作製した。

[0083] [2] 形質転換体の獲得及びその花色の測定

pB423を導入したアグロバクテリウムEHA105（Dr. Elizabeth E. Hood氏より分譲）を用いて、ピンク色系でボンボン咲きのキク系統「T44」（（有）イノチオ精興園より提供を受けた育成系統を供試）を形質転換し、12系統の形質転換体を得た。色彩分光計（CD100，横河インスツルメンツ）とRHSカラーチャートでの測色を行った結果、4系統（33%）で色相角290°以下を示し、3

系統（25%）でRHSカラーチャートのViolet-Blueグループを示す青いキクが作出された。花色の青色方向への改変が確認された形質転換体の測色値を以下の表24に示す。

[表24]

[表 2 4]

系統番号	CIEL*a*b*表色系					RHSカラーチャート	
	L*値	a*値	b*値	色相角 (hue°)	彩度 (C*値)	チャート番号	色グループ
T44 野生型	74.2	12.5	-2.7	347.8	12.8	74D-75A	Red-Purple
T44 形質転換体							
2032-02	70.1	2.8	-3.5	309.1	4.5	85B-C	Violet
2032-04	65.1	4.8	-10.5	294.9	11.5	93C-D	Violet-Blue
2032-05	72.7	2.5	-6.1	292.4	6.6	92B-C	Violet-Blue
2032-06	71.3	5.1	-3.4	326.7	6.1	85B-C	Violet
2050-01	73.2	1.9	-4.9	290.6	5.3	NA	NA
2050-04	78.1	0.5	-4.0	276.7	4.1	95C-D	Violet-Blue
2067-05	49.2	5.6	-11.4	296.1	12.7	NA	NA
2067-01	68.2	1.6	-7.1	282.3	7.3	NA	NA
2067-02	60.0	3.9	-11.9	288.3	12.5	NA	NA
2050-06	43.6	6.3	-12.5	296.6	14.0	NA	NA
2067-06	57.2	6.1	-7.7	308.5	9.8	NA	NA
2067-07	69.1	3.5	-11.6	286.9	12.1	NA	NA

NA: 分析・測定せず

[0084] [実施例25: キク系統「T57」へのpB423の導入（キクF3Hプロモーター1kとアグロバクテリウムnosターミネーター制御下でのチョウマメA3' 5' GT遺伝子及びキクF3Hプロモーター1kとアラビドプシスHSPターミネーター制御下でのカンパニュラF3' 5' H遺伝子の共発現）]

[1] ベクターの構築

実施例1に従い、pB423（pBCtA3' 5' GT+CamF3' 5' H）を作製した。

[0085] [2] 形質転換体の獲得及びその花色の測定

pB423を導入したアグロバクテリウムEHA105（Dr. Elizabeth E. Hood氏より分譲）を用いて、ピンク色系でデコラ咲きのキク系統「T57」（（有）イノチオ精興園より提供を受けた育成系統を供試）を形質転換し、2系統の形質転換体を得た。色彩分光計（CD100, 横河インスツルメンツ）とRHSカラーチャートでの測色を行った結果、2系統(100%)で色相角290°以下を示し、RHSカラーチャートのViolet-Blueグループを示す青いキクが作出された。花色の青

色方向への改変が確認された形質転換体の測色値を以下の表 25 に示す。

[表25]

[表 25]

系統番号	CIEL*a*b*表色系					RHSカラーチャート	
	L*値	a*値	b*値	色相角 (hue°)	彩度 (C*値)	チャート番号	色グループ
T57 野生型	74.4	16.9	-5.5	341.9	17.8	N74C	Red-Purple
T57 形質転換体							
2037-01	58.8	6.0	-20.2	286.4	21.1	94B	Violet-Blue
2037-02	60.4	5.8	-19.2	286.9	20.0	94A	Violet-Blue

[0086] [参考例 1 : キク系統「94-765」へのpB248の導入 (キクF3Hプロモーター500
及びアグロバクテリウムnosターミネーターの制御下で、チョウマメ由来A3'
5' GT遺伝子を発現)]

[1] ベクターの構築

チョウマメA3' 5' GT遺伝子を含む、特許第4418865号に記載のpBSCtBGT1DB
24プラスミドを鋳型に、ADH-3' 5' GT-Fd (5' -CAAGAAAAATAAAATGGAAAACAATAA
GCATGTC-3' ; 下線部はCt3' 5' GTコード領域とアニールする配列である ; 配
列番号 2 6) とHind-Ct3' 5' GT-Rv (5' -AAGCTTGCGTTTTTAGCATCATTTC-3' ;
配列番号 2 7) をプライマーに用いてPCRで増幅したDNA断片と、pBI221 ADH-
221を鋳型にXbaI-ADH-Fd (5' -ACGCGTTCTAGAGTCTATTTAACTCAGTATTTC-3' ; 下
線部はNtADH-5' UTR 94bpとアニールする配列である ; 配列番号 1 4) とCt3'
' 5' GT-ADH-Rv (5' -ATTGTTTTCCATTTATTTTTCTTGATTTTCCTTCAC-3' ; 下線部は
NtADH-5' UTR 94bpとアニールする配列である ; 配列番号 2 8) をプライマー
に用いてPCRで増幅したDNA断片の二種類を混合して鋳型に用い、XbaI-ADH-Fd
とHind-Ct3' 5' GT-Rvをプライマーに用いたPCRにより、タバコADH-5' UTR 9
4bpがチョウマメA3' 5' GT遺伝子の開始コドンに直結したDNA断片を得た。こ
のDNA断片をpCR2.1にTAクローニングした後に、XbaIとHindIIIで消化して得
られる約600bpのDNA断片を、pBlueScript II SK (+)をXbaIとHindIIIで消化
して得られるベクターのDNA断片と連結して、pBSII-ADH-5' -CtBGT1-HindIII
を得た。このプラスミドをHindIIIとXhoIで消化して得られるプラスミドのDN

A断片と、pBSCtBGT1DB24をHindIIIとXhoIで消化して得られるDNA断片を連結し、pBSII-ADH-CtA3' 5' GTを得た。このプラスミドを鋳型に、NheI-ADH-Fd2 (5' -GCTAGCGTCTATTTAACTCAGTATTCAGAAAC-3' ; 下線部はNtADH-5' UTR 94bpとアニールする配列である ; 配列番号 29)とCt3' 5' GT-SacI-Rv(5' -GAGCTCTTAGCTAGAGGAAATCATTTCAC-3' ; 下線部はCt3' 5' GTコード領域とアニールする配列である ; 配列番号 30)をプライマーに用いてPCRにより増幅した平滑末端のDNA産物を、pCR-Blunt II-TOP0 (Invitrogen) にクローニングしてpCR ADHNF-CtA3' 5' GTを得た。このプラスミドをNheIとEcoICRIで消化して得られる約1450bpのADHNF-CtA3' 5' GT DNA断片と、pBI121 HANS-CmF3Hp500-X (特許第5697040号) をXbaIとEcoICRIで消化し得られるバイナリーベクターのDNA断片を連結して、pB248 (pBI121 CmF3Hp500:ADHNF-チョウマメA3' 5' GT:NOSst) を得た。

[0087] [2] 形質転換体の獲得及びその花色の測定

pB248を導入したアグロバクテリウムEHA105 (Dr. Elizabeth E. Hood氏より分譲) を用いて、濃赤色系で中輪ギクのキク系統「94-765」 ((有) 精興園より提供を受けた育成系統を供試) を形質転換し、23系統の形質転換体を得た。そのうち、15系統の舌状花卉に含まれるアントシアニン色素を高速液体クロマトグラフィーを用いて以下の条件で分析した。カラムはInertsil OD S-2 (粒径5 μ m, 4.6 $\times$ 250mm, ジーエルサイエンス) を用い、流速0.8ml/minで、移動相は1.5%リン酸を含む、5%酢酸、6.25%アセトニトリルから20%酢酸、25%アセトニトリルの直線濃度勾配20分間の後、1.5%リン酸および20%酢酸を含む25%アセトニトリルで5分間のイソクラティック溶出を行った。検出はAgilent 1100 シリーズ ダイオードアレイ検出器 (ジーエルサイエンス) を用い、250nmから600nmの波長領域を検出した。分析の結果、12系統で、宿主花卉の主要アントシアニンであるシアニジン3-(6'- β -マロニル) グルコシド及びシアニジン3-(3'- β , 6'- β -ジマロニル) グルコシドそれぞれにグルコシル基が1つ結合したと考えられる2つの主要色素、シアニジン3-(6-マロニル) グルコシド-3'-グルコシド及びシアニジン3-(3'- β , 6'- β -ジマロニル) グ

ルコシド-3' -グルコシド（それぞれのHPLC分析の溶出時間（tR）：9.4分及び7.2分）をもつことが確認された。しかし、もとの94-765と大きく花色の変化した系統は得られず、いずれの形質転換系統もRHSカラーチャートのRed-Purpleグループの花色を示した（表26）。キクF3Hプロモーター500（長さ約500b）でチョウマメのA3' 5' GT遺伝子を発現させるだけでは青いキクは得られなかった（図6）。

[表26]

[表26]

系統番号		HPLC*		RHSカラーチャート		CIEL*a*b*表色系				
感染番号	個体番号	9.4 tR	7.2 tR	チャート番号	色グループ	L*値	a*値	b*値	色相角(hue°)	彩度(C*値)
94-765	野生型**	-	-	64A-B 71A-B	Red-Purple	34.5	38.0	-7.0	350.1	38.7
94-765 形質転換体										
1355-	1	+	+	71A	Red-Purple	32.6	38.1	-8.8	347.0	39.1
1355-	3	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1355-	4	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1355-	6	+	+	72B	Red-Purple	45.2	33.9	-15.0	336.1	37.1
1355-	7	+	+	72B	Red-Purple	44.1	37.3	-13.6	340.0	39.7
1355-	9	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1355-	11	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1355-	12	+	+	70A-B	Red-Purple	50.7	31.7	-12.8	338.0	34.2
1355-	13	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1355-	14	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1355-	17	-	-	71A	Red-Purple	NA	NA	NA	NA	NA
1355-	18	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1355-	19	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1355-	20	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1355-	23	+	+	72A-B	Red-Purple	33.9	37.4	-15.8	337.1	40.5

*: +: 検出, trace: 微量, -: 非検出, 9.4 tR: シアニジン3-(3,6-ジマロニル) グルコシド-3'-グルコシド, 7.2 tR: シアニジン3-(3-マロニル) グルコシド-3'-グルコシド

** : 平均値 (n=14)

NA : 分析、測定せず

[0088] [参考例2：キク系統「94-765」へのpB249の導入（キクF3Hプロモーター1k及びアグロバクテリウムnosターミネーターの制御下で、チョウマメ由来A3' 5' GT遺伝子を発現）]

[1] ベクターの構築

pBI121 HANS-CmF3Hp1k-S（特許第5697040号）をSpeIとEcoICRIで消化し得

られるバイナリーベクターのDNA断片と、pCR ADHNF-CtA3' 5' GTをNheIとEcoICRIで消化して得られる、ADHNF-チョウマメA3' 5' GTのDNA断片を連結してpB249 (pBI121 CmF3Hp1k:ADHNF-チョウマメA3' 5' GT:N0St) を得た。

[0089] [2] 形質転換体の獲得及びその花色の測定

pB249を導入したアグロバクテリウムEHA105 (Dr. Elizabeth E. Hood氏より分譲) を用いて、濃赤色系で中輪ギクのキク系統「94-765」 ((有) 精興園より提供を受けた育成系統を供試) を形質転換し、25系統の形質転換体を得た。そのうち、18系統で舌状花卉に含まれるアントシアニン色素を参考例1の方法で分析した結果、17系統で、シアニジン3-(6' '-マロニル) グルコシド及びシアニジン3-(3' ', 6' '-ジマロニル) グルコシドそれぞれにグルコシル基が1つ結合したと考えられる2つの主要色素をもつことが確認された。また、もとの94-765と大きく花色の変化した系統は得られず、いずれもRed-Purpleグループの花色を示した (表27)。F3Hプロモーター1k (長さ約1 kb) でチョウマメのA3' 5' GT遺伝子を発現させるだけでは青いキクは得られなかった (図6)。

[表27]

[表 27]

系統番号		HPLC*		RHSカラーチャート		CIEL*a*b*表色系				
感染番号	個体番号	9.4 tR	7.2 tR	チャート番号	色グループ	L*値	a*値	b*値	色相角 (hue°)	彩度 (C*値)
94-765 野生型**		-	-	64A-B 71A-B	Red-Purple	34.5	38.0	-7.0	350.1	38.7
94-765 形質転換体										
1356-	1	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1356-	2	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1356-	4	+	trace	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1356-	6	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1356-	8	trace	trace	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1356-	9	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1356-	10	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1356-	12	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1356-	15	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1356-	17	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1356-	18	+	trace	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1356-	19	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1356-	20	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1356-	21	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1356-	22	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1356-	23	+	+	72B/74C-D	Red-Purple	42.5	35.8	-15.7	336.3	39.1
1356-	24	+	+	70A-B	Red-Purple	42.7	37.5	-14.8	338.5	40.3
1356-	25	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

*: +: 検出, trace: 微量, -非検出, 9.4 tR: シアニジン3-(3,6-ジマロニル) グルコシド-3'-グルコシド, 7.2 tR: シアニジン3-(3-マロニル) グルコシド-3'-グルコシド

** : 平均値 (n=14)

NA : 分析、測定せず

[0090] [参考例3 : キク系統「94-765」へのpB250の導入 (キクF3Hプロモーター1k及びアグロバクテリウムnosターミネーターの制御下で、チョウマメ由来A3' 5' GT遺伝子、チョウマメ由来AGS遺伝子、及びチョウマメ由来A3' AT遺伝子を共発現)]

[1] ベクターの構築

チョウマメ1-0-アシルグルコース合成酵素 (CtAGS, UDP-グルコース : ヒドロキシ桂皮酸1-0-グルコシル基転移酵素, 図2) をコードするCtAGS遺伝子を含む、特許第4418865号に記載のpBSII-CtGT11-4-14を鋳型に、ADH-CtHCAGT-Fd (5' -CAAGAAAAATAAATGGGGTCTGAAGCTTCGTTTC-3' ; 下線部はCtAGS遺伝子コ

ード領域とアニールする配列である；配列番号 3 1)とStuI-CtHCAGT-Rv (5' - AGGCCTCATGTTTCAAACTTC-3' ；配列番号 3 2) をプライマーに用いてPCRで増幅したDNA断片と、pBI221 ADH-221を鋳型に、XbaI-ADH-Fd (5' -ACGCGTTCTAGAGTCTATTTAACTCAGTATTC-3' ；下線部はNtADH-5' UTR 94bpとアニールする配列である；配列番号 1 4) とCtHCAGT-ADH-Rv (5' -TTCAGACCCCATTTATTTTCTTGATTTCTTCAC-3' ；下線部はNtADH-5' UTR 94bpとアニールする配列である；配列番号 3 3) をプライマーに用いてPCRで増幅したDNA断片の二種類を混合して鋳型に用い、XbaI-ADH-Fd (配列番号 1 4) とStuI-CtHCAGT-Rv (配列番号 3 2) をプライマーに用いたPCRにより、タバコADH-5' UTR 94bpがCtAGS遺伝子の開始コドンに直結したDNA断片を得た。このDNA断片を、pCR2.1 (Invitrogen) にTAクローニングした後に、XbaIとStuIで消化して得られる約850bpのDNA断片と、pBSII-CtGT11-4-14をXbaIとStuIで消化して得られるベクター断片を連結し、pBSII-ADH-CtAGSを得た。このプラスミドのXhoI消化産物を平滑末端化した後に、XbaIで消化して得られるDNA断片と、pMCE5をNheIとEcoICRIで消化して得られるベクター断片を連結して、pMCE5-ADH-AGSを得た。このプラスミドをAscIとPmeIで消化して得られる、遺伝子発現カセットAscI-CmF3Hp1k:NtADH-5' UTR:CtAGS:nost-PmeIのDNA断片と、pB249 (pBI121 CmF3Hp1k:ADHNF-チヨウマメA3' 5' GT:N0St) をSwaIとAscIで消化して得られるバイナリーベクターDNA断片pMCE5-ADH-CtAGSを連結し、pBI121-CtBGT+AGSを得た。

[0091] 3' AT活性および5' AT活性 (図 2) をもつと考えられるチヨウマメA3' AT遺伝子を含む特許第4418865号に記載のCtSCPL1 cDNAクローンの 1 つであるpBSII-CtAT1-19を鋳型に、ADH-CtAT1-Fd (5' -CAAGAAAAATAAATGGCAGCCTTCAGTTCAAC-3' ；下線部はCtAT1にアニールする領域である；配列番号 3 4) とPst-CtAT1-Rv (5' -CTGCAGCATCTGTTCTAGCATAA-3' ；配列番号 3 5) をプライマーに用いてPCRで増幅したDNA断片と、pBI221 ADH-221を鋳型に、XbaI-ADH-Fd (5' -ACGCGTTCTAGAGTCTATTTAACTCAGTATTC-3' ；下線部はNtADH-5' UTR 94bpとアニールする配列である；配列番号 1 4) とCtAT1-ADH-Rv (5' -GAAGGCTGCCATTTATTTTCTTGATTTCTTCAC-3' ；下線部はNtADH-5' UTR 94bpとアニールする

配列である；配列番号36）をプライマーに用いてPCRで増幅したDNA断片の二種類を混合して鋳型に用い、XbaI-ADH-Fd（配列番号14）とPst-CtAT1-Rv（配列番号35）をプライマーに用いたPCRにより、NtADH-5' UTR 94bpがCtAT遺伝子の開始コドンに直結したDNA断片を増幅した。このDNA断片をXbaIとPstIで消化し、pBSII-CtAT1-19をSpeIとPstIで消化して得られるDNA断片と連結してpBSII-ADHNF-CtAT1-19を得た。このプラスミドをNotIとXhoIで消化して得られる約1.6kbのDNA断片と、EcoRIで消化した後にセルフライゲーションして環状化させたpCR2.1をNotIとXhoIで消化して得られるプラスミド断片を連結して、pCR-ADHNF-CtAT1-19を得た。また、pBSII-ADHNF-CtAT1-19をEcoICRIとSalIで消化して得られる約1.6kbのDNA断片と、SmaIとSalIで消化したpMCE5プラスミドのDNA断片を連結して、pMCE5-ADH-CtAT1を得た。

[0092] pBI121-CtBGT+AGSをSwaIとAscIで消化して得られるバイナリーベクターのDNA断片とpMCE5-ADH-CtAT1をAscIとPmeIで消化して得られる、発現カセット（AscI-CmF3Hp1k:NtADH-5' UTR:Ct3' AT:nost-PmeI）のDNA断片を連結し、キクF3Hプロモーター1kとアグロバクテリウムnosターミネーターの制御によりチョウマメA3' 5' GT、チョウマメAGS及びチョウマメ3' ATを共発現させるためのバイナリーベクターpB250を得た。

[0093] [2] 形質転換体の獲得及びその花色の測定

pB250を導入したアグロバクテリウムEHA105（Dr. Elizabeth E. Hood氏より分譲）を用いて、濃赤色系で中輪ギクのキク系統「94-765」（（有）精興園より提供を受けた育成系統を供試）を形質転換し、11系統の形質転換体を得た。そのうち、9系統で舌状花卉にもとのアントシアニン色素、シアニジン3-(6'-'-マロニル)グルコシド及びシアニジン3-(3'-',6'-'-ジマロニル)グルコシドそれぞれにグルコシル基が1つ結合したと考えられる2つの主要色素をもつことが参考例1と同じ分析方法で確認されたが、チョウマメ由来AGS、及びチョウマメ由来A3' ATの遺伝子産物の働きにより、芳香族アシル基による修飾を受けたシアニジン配糖体を花卉に蓄積した系統は得られなかった。また、もとの94-765と大きく花色の変化した系統は得られず、いずれ

もRed-Purpleグループの花色を示した（表28）。キクF3HプロモーターでチョウマメのA3' 5' GT遺伝子、アシルグルコース合成酵素遺伝子、及びA3' AT遺伝子を発現させる方法では青いキクは得られなかった（図6）。

[表28]

[表28]

系統番号		HPLC*		RHSカラーチャート		CIEL*a*b*表色系				
感染番号	個体番号	9.4 tR	7.2 tR	チャート番号	色グループ	L*値	a*値	b*値	色相角 (hue°)	彩度 (C*値)
94-765		-	-	64A-B	Red-Purple	34.5	38.0	-7.0	350.1	38.7
野生型**				71A-B						
94-765 形質転換体										
1357-	1	-	-	71A-B	Red-Purple	22.5	38.6	-1.2	358.2	38.7
1357-	2	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1357-	3	+	trace	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1357-	4	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1357-	5	+	trace	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1357-	6	+	+	72B	Red-Purple	33.1	39.2	-13.6	340.8	41.5
1357-	7	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1357-	8	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1357-	9	+	+	70A-B	Red-Purple	40.7	38.2	-14.7	338.9	40.9
1357-	10	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1357-	11	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

*: +: 検出, trace: 微量, -非検出, 9.4 tR: シアニジン3-(3,6-ジマロニル) グルコシド-3'-グルコシド, 7.2 tR: シアニジン3-(3-マロニル) グルコシド-3'-グルコシド

** : 平均値 (n=14)

NA : 分析、測定せず

[0094] [参考例4 : キク品種「大平」へのpB420の導入（キクF3Hプロモーター1kとアグロバクテリウムnosターミネーターの制御下で、カンパニュラ由来F3' 5' H遺伝子とチョウマメ由来AGS遺伝子を共発現）]

[1] ベクターの構築

参考例3で得たpBSII-ADH-CtAGSをXhoIで消化した後に平滑末端処理をし、その後XbaIで消化して得られるDNA断片と、pMCE5-2 (FASS-CmF3Hp-AtHSPt) をNheIとEcoICRIで消化して得られるベクターの断片を連結し、pMCE5-2 ADHN F-CtAGSを得た。このプラスミドをFseIとPmeIで消化して得られる発現カセットと、FseIとSwaIで消化して得られるpB315 (pBCam2) のバイナリーベクター断片を連結し、pB420 (pBCam2+CtAGS) を得た。

[0095] [2] 形質転換体の獲得及びその花色の測定

pB420を導入したアグロバクテリウムEHA105 (Dr. Elizabeth E. Hood氏より分譲) を用いて、ピンク色系で中輪ギクのキク品種「大平」(花き研で無菌培養により維持している遺伝資源を供試) を形質転換し、40系統の形質転換体を得た。色彩分光計 (CD100, 横河インスツルメンツ) とRHSカラーチャートでの測色を行った結果、17系統で青色方向への花色の変化が認められた。しかし、最も青みの強い系統でも色相角317度で、RHSカラーチャートのPurple-Violetグループの花色を示し、F3' 5' H遺伝子のみ発現させた場合と同程度であった(表29)。F3' 5' H遺伝子にチョウマメ由来のアシルグルコース合成酵素遺伝子 (CtAGS) を共発現させる導入遺伝子コンストラクトでは、色相角230° ~290° かつ/又はViolet-Blueグループ/Blueグループの花色を示す青いキクは得られなかった。

[表29]

[表 29]

系統番号	CIEL*a*b*表色系					RHSカラーチャート	
	L*値	a*値	b*値	色相角 (hue°)	彩度 (C*値)	チャート番号	色グループ
大平 野生型*	79.5	9.7	-2.0	356.6	11.1	65B, N74C, 75B	Red-Purple /Purple
大平 形質転換体							
1731-03	60.5	18.2	-17.0	317.0	24.9	N82C	Purple-Violet
1731-06	66.3	12.9	-12.0	317.1	17.7	N82B	Purple-Violet
1731-07	57.6	21.5	-18.4	319.6	28.3	N81B	Purple-Violet
1731-10	56.8	20.2	-18.3	317.7	27.2	N82B	Purple-Violet
1731-12	75.8	8.4	-4.2	333.6	9.4	N80D	Purple-Violet
1731-13	73.5	9.4	-8.3	318.6	12.6	N81C-D	Purple-Violet
1731-20	62.8	17.9	-13.1	323.8	22.1	N81B-C	Purple-Violet
1731-21	58.8	17.8	-14.9	320.0	23.2	N81A-B	Purple-Violet
1731-24	68.9	20.0	-6.2	342.8	20.9	N81B-C	Purple-Violet
1731-26	68.3	11.9	-11.2	316.9	16.4	N80C	Purple-Violet
1731-27	75.3	9.5	-3.8	338.2	10.3	N81C-D	Purple-Violet
1731-28	72.4	12.1	-10.2	319.9	15.8	N80C	Purple-Violet
1731-30	54.8	23.1	-21.0	317.8	31.2	N82B	Purple-Violet
1731-33	55.8	21.7	-19.4	318.2	29.1	N81B	Purple-Violet
1731-35	60.0	19.2	-15.8	320.5	24.9	N81B-C	Purple-Violet
1731-38	66.0	18.3	-14.2	322.3	23.2	N81B-C	Purple-Violet
1731-40	60.4	15.5	-13.8	318.3	20.7	NA	NA

NA : 分析、測定せず

*平均値 (n=23)

[0096] [参考例5 : キク品種「大平」へのpB430の導入 (キクF3Hプロモーター1kおよびアグロバクテリウムnosターミネーターの制御下で、カンパニュラ由来F3' 5' H遺伝子、チョウマメ由来AGS遺伝子、及びダッチアイリス由来DFR遺伝子を共発現)]

[1] ベクターの構築

pMCE5-2- ADHNF-DbDFRをFseIとPmeIで消化して得られる発現カセットと、FseIとSwaIで消化して得られるpB420 (pBCam2+CtAGS) のバイナリーベクター断片を連結し、pB430 (pBCam2+CtAGS+IhDFR) を得た。

[0097] [2] 形質転換体の獲得及びその花色の測定

pB430を導入したアグロバクテリウムEHA105 (Dr. Elizabeth E. Hood氏よ

り分譲)を用いて、ピンク色系で中輪ギクのキク品種「太平」(花き研で無菌培養により維持している遺伝資源を供試)を形質転換し、54系統の形質転換体を得た。色彩分光計(CD100, 横河インスツルメンツ)とRHSカラーチャートでの測色を行った結果、33系統(63%)で青色方向への花色の変化が認められた。しかし、最も青みの強い系統の色相角は315度で、RHSCCでの測色でもVioletグループまたはPurple-Violetグループの系統しか得られず、F3' 5' H遺伝子のみ発現させた場合と花色の変化は変わらなかった(表30)。F3' 5' H遺伝子にチョウマメ由来のアシルグルコース合成酵素遺伝子(CtAGS)及びダッチアイリス由来DFR遺伝子を共発現させる導入遺伝子コンストラクトでは、色相角230° ~290° かつ/又はViolet-Blueグループ/Blueグループの花色を示す青いキクは得られなかった。

[表30]

[表 30]

系統番号	CIEL*a*b*表色系					RHSカラーチャート	
	L*値	a*値	b*値	色相角 (hue°)	彩度 (C*値)	チャート番号	色グループ
大平 野生型*	79.5	9.7	-2.0	356.6	11.1	65B, N74C, 75B	Red-Purple /Purple
大平 形質転換体							
1739-01	NA	NA	NA	NA	NA	N82C	Purple-Violet
1739-06	53.4	18.3	-17.1	316.8	25.0	N87B	Violet
1739-07	53.2	17.2	-16.5	316.2	23.9	N87B	Violet
1739-08	50.8	23.1	-20.5	318.3	30.9	N82A	Purple-Violet
1739-10	63.4	17.7	-13.1	323.5	22.0	N82B-C	Purple-Violet
1739-11	50.1	22.8	-22.4	315.5	31.9	NA	NA
1739-12	59.5	19.5	-17.6	318.0	26.3	N82A-B	Purple-Violet
1739-15	NA	NA	NA	NA	NA	N87A-B	Violet
1739-17	47.2	20.8	-18.5	318.3	27.8	N87A	Violet
1739-18	60.0	21.1	-16.3	322.4	26.6	83C-D	Violet
1739-21	63.3	12.6	-5.3	337.1	13.7	83C-D	Violet
1739-22	55.3	18.9	-18.5	315.6	26.5	N82A-B	Purple-Violet
1739-25	79.0	6.6	-4.5	326.0	8.0	N81C	Purple-Violet
1739-26	54.5	18.5	-16.4	318.5	24.8	N83C-D	Violet
1739-28	36.3	30.1	-26.0	319.2	39.7	N87A-B	Violet
1739-30	63.9	17.4	-10.8	328.2	20.4	N81C-D	Purple-Violet
1739-32	56.1	25.6	-16.9	326.5	30.7	N81B	Purple-Violet
1739-33	56.3	18.0	-16.2	318.1	24.2	N82B	Purple-Violet
1739-42	69.3	13.0	-11.5	318.4	17.3	N82B	Purple-Violet
1739-44	55.7	23.1	-20.2	318.9	30.7	N82A	Purple-Violet
1739-46	61.2	18.8	-15.1	321.4	24.1	N81B-C	Purple-Violet
1739-47	47.2	22.5	-20.3	317.9	30.3	N87B	Violet
1739-48	71.4	13.5	-11.3	320.2	17.6	N80C	Purple-Violet
1739-50	49.3	21.0	-20.6	315.4	29.4	83B-C	Violet
1739-54	50.2	21.3	-21.1	315.3	29.9	N87A	Violet
1739-56	66.9	15.7	-10.2	327.1	18.7	N81B-C	Purple-Violet
1739-60	70.6	12.6	-11.3	318.0	16.9	84A-B	Violet
1739-65	70.3	16.0	-8.1	333.1	18.0	N81B-C	Purple-Violet
1739-67	67.7	14.7	-11.7	321.4	18.8	N81B	Purple-Violet
1739-68	66.8	14.3	-9.7	326.0	17.3	N80B-C	Purple-Violet
1739-69	71.6	14.7	-9.8	326.3	17.7	N81C	Purple-Violet
1739-72	60.0	20.8	-17.7	319.7	27.3	83C-D	Violet
1739-80	60.7	20.3	-15.4	322.8	25.5	N81B	Purple-Violet

NA: 分析・測定せず

*平均値 (n=23)

[0098] [参考例6: キク品種「大平」へのpB249の導入 (キクF3Hプロモーター1k及びアグロバクテリウムnosターミネーターの制御下で、チョウマメ由来A3' 5' GT遺伝子を発現)]

[1] ベクターの構築

参考例 2 に従って、pB249 (pBI121 CmF3Hp1k:ADHNF-チョウマメ A3' 5' GT: NOST) を得た。

[0099] [2] 形質転換体の獲得及びその花色の測定

pB249を導入したアグロバクテリウムEHA105 (Dr. Elizabeth E. Hood氏より分譲) を用いて、ピンク色系で中輪ギクのキク品種「大平」を形質転換し、26系統の形質転換体を得た。もとの「大平」と大きく花色の変化した系統は得られず、やや花色の変化が認められた系統でもPurpleグループ75の花色を示した (表 3 1) 。参考例 2 の「94-765」の場合と同じく、F3Hプロモーター1k (長さ約1kb) でチョウマメのA3' 5' GT遺伝子を発現させるだけでは青いキクは得られなかった。

[表31]

[表 3 1]

系統番号	CIEL*a*b*表色系					RHSカラーチャート	
	L*値	a*値	b*値	色相角 (hue°)	彩度 (C*値)	チャート番号	色グループ
大平 野生型	73.1	16.4	-5.1	342.9	17.2	74C	Red-Purple
大平 形質転換体							
1979-01	84.4	5.6	1.0	370.3	5.7	NA	NA
1979-02	79.4	8.0	-0.6	355.7	8.0	NA	NA
1979-03	82.9	5.2	1.6	377.4	5.4	NA	NA
1979-04	79.0	7.6	0.2	361.6	7.6	NA	NA
1979-05	82.0	7.1	-1.2	350.5	7.2	NA	NA
1979-06	79.6	9.4	-1.8	349.2	9.5	NA	NA
1979-07	79.5	7.7	-0.8	353.9	7.7	NA	NA
1979-08	79.5	6.9	-0.1	358.8	6.9	NA	NA
1979-09	82.8	6.4	-0.2	358.6	6.4	NA	NA
1979-11	77.2	10.7	-0.7	356.3	10.7	NA	NA
1979-12	85.8	2.2	2.9	412.0	3.6	NA	NA
1979-13	78.9	6.7	0.3	362.8	6.7	75A-C	Purple
1979-15	78.1	7.9	-0.6	355.4	7.9	NA	NA
1979-16	78.3	7.1	-0.2	358.4	7.1	75A-B	Purple
1979-18	83.5	3.8	1.1	376.4	4.0	75C	Purple
1979-19	78.6	10.7	-1.6	351.8	10.8	NA	NA
1979-20	74.3	11.8	-3.0	345.7	12.2	77D/75A	Purple
1979-21	81.2	6.7	0.3	362.2	6.8	NA	NA
1979-22	75.3	10.2	-2.0	348.9	10.4	NA	NA
1979-23	81.0	7.9	-1.4	350.2	8.0	NA	NA
1979-24	77.9	7.6	-1.2	351.2	7.7	NA	NA
1979-25	84.0	5.1	0.8	368.9	5.1	NA	NA
1979-26	79.8	4.3	1.1	374.2	4.4	75B-C	Purple
1979-27	86.4	3.6	1.8	386.8	4.1	75C	Purple
1979-28	79.7	6.0	1.8	376.4	6.2	75C-D	Purple
1979-29	82.4	4.9	2.2	384.6	5.3	NA	NA

NA: 分析・測定せず

請求の範囲

[請求項1]

以下の(1-a)～(1-e)：

(1-a) 配列番号1の塩基配列からなるポリヌクレオチド；

(1-b) 配列番号1の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条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、アントシアニンの3'位及び5'位の水酸基に糖を転移する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；

(1-c) 配列番号2の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；

(1-d) 配列番号2のアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、アントシアニンの3'位及び5'位の水酸基に糖を転移する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；及び

(1-e) 配列番号2のアミノ酸配列に対して90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ、アントシアニンの3'位及び5'位の水酸基に糖を転移する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；

からなる群から選択される第1のポリヌクレオチド、及び

以下の(2-a)～(2-e)：

(2-a) 配列番号3の塩基配列からなるポリヌクレオチド；

(2-b) 配列番号3の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条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、フラボノイドの3'位及び5'位を水酸化する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；

(2-c) 配列番号4の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；

(2-d) 配列番号4のアミノ酸配列において、1又は数個のアミ

ノ酸が欠失、置換、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、フラボノイドの3'位及び5'位を水酸化する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；及び

(2-e) 配列番号4のアミノ酸配列に対して90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ、フラボノイドの3'位及び5'位を水酸化する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；

からなる群から選択される第2のポリヌクレオチドを含む、発現カセット。

[請求項2] 前記第1のポリヌクレオチドに作動可能に連結された第1のプロモーター及び第1のターミネーター、ならびに前記第2のポリヌクレオチドに作動可能に連結された第2のプロモーター及び第2のターミネーターをさらに含む、請求項1に記載の発現カセット。

[請求項3] 前記第1のプロモーターがキクF3Hプロモーターであり、そして前記第1のターミネーターがアラビドプシスHSPターミネーター又はアグロバクテリウムnosターミネーターである、請求項2に記載の発現カセット。

[請求項4] 前記第2のプロモーターがキクF3Hプロモーターであり、そして前記第2のターミネーターがアラビドプシスHSPターミネーター又はアグロバクテリウムnosターミネーターである、請求項2又は3に記載の発現カセット。

[請求項5] 請求項1～4のいずれか1項に記載の発現カセットを含むベクター。

[請求項6] 請求項1～4のいずれか1項に記載の発現カセットを含む形質転換キク植物、又はその自殖もしくは他殖後代、あるいはそれらの栄養繁殖体、植物体の一部、組織、又は細胞。

[請求項7] 花卉においてチョウマメ由来アントシアニン3',5'-O-グルコシル基転移酵素遺伝子(CtA3'5'GT)及びカンパニュラ由来フラボノイド

3' , 5' -水酸化酵素遺伝子 (CamF3' 5' H) が共発現している、請求項6に記載の形質転換キク植物、又はその自殖もしくは他殖後代、あるいはそれらの栄養繁殖体、植物体の一部、組織、又は細胞。

[請求項8] デルフィニジン3-(6' ' -マロニル)グルコシド-3' 5' -ジグルコシド (テルナチンC5) 及び／またはデルフィニジン3, 3' , 5' -トリグルコシド (プレテルナチンC5) を含有する、請求項6又は7に記載の形質転換キク植物、又はその自殖もしくは他殖後代、あるいはそれらの栄養繁殖体、植物体の一部、組織、又は細胞。

[請求項9] 請求項6～8のいずれか1項に記載の形質転換キク植物又はその自殖もしくは他殖後代の切り花、あるいは該切り花から作成された加工品。

[請求項10] 青系花色を有する形質転換キク植物を作製するための方法であって、

宿主に以下の (1-a) ～ (1-e) :

(1-a) 配列番号1の塩基配列からなるポリヌクレオチド ;

(1-b) 配列番号1の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条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、アントシアニンの3' 位及び5' 位の水酸基に糖を転移する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 ;

(1-c) 配列番号2の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 ;

(1-d) 配列番号2のアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、アントシアニンの3' 位及び5' 位の水酸基に糖を転移する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 ; 及び

(1-e) 配列番号2のアミノ酸配列に対して90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ、アントシアニンの3' 位及び5

’ 位の水酸基に糖を転移する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；

からなる群から選択される第1のポリヌクレオチド、及び／又は以下の(2-a)～(2-e)：

(2-a) 配列番号3の塩基配列からなるポリヌクレオチド；

(2-b) 配列番号3の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ジेंट条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、フラボノイドの3’位及び5’位を水酸化する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；

(2-c) 配列番号4の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；

(2-d) 配列番号4のアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、フラボノイドの3’位及び5’位を水酸化する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；及び

(2-e) 配列番号4のアミノ酸配列に対して90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ、フラボノイドの3’位及び5’位を水酸化する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；

からなる群から選択される第2のポリヌクレオチドを導入する工程を含む、方法。

[請求項11] 請求項1～4のいずれか1項に記載の発現カセット又は請求項5に記載のベクターで宿主を形質転換することによって行われる、請求項10に記載の方法。

[請求項12] 前記青系花色が、RHSカラーチャートでBlueグループもしくはViolet-Blueグループ、かつ／又はCIEL*a*b*表色系の色相角で230°～290°を示す、請求項10又は11に記載の方法。

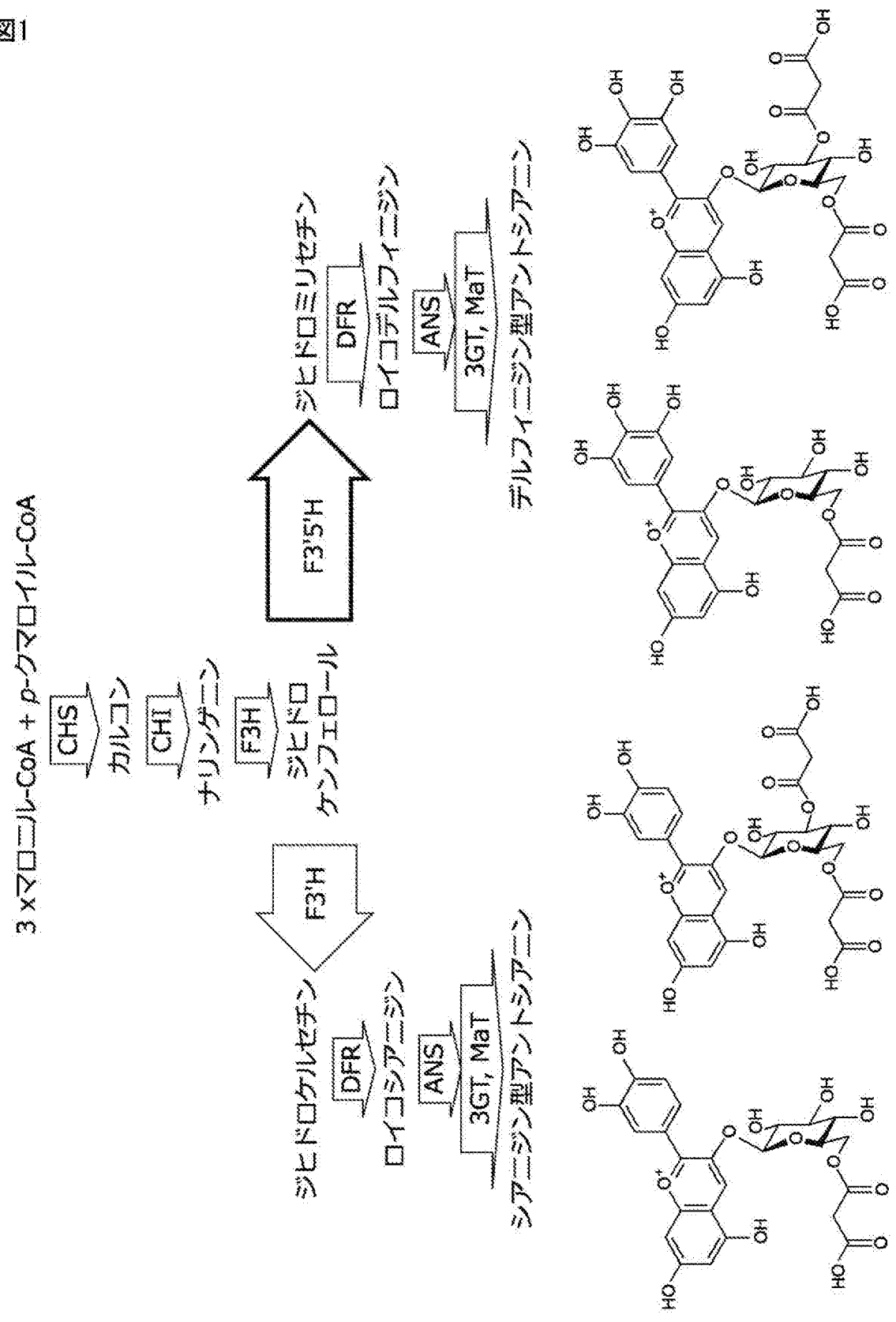
[請求項13] 請求項10～12のいずれか1項に記載の方法によって作成された

形質転換キク植物、又はその自殖もしくは他殖後代、あるいはそれらの栄養繁殖体、植物体の一部、組織、又は細胞。

[請求項14] 請求項 1 3 に記載の形質転換キク植物又はその自殖もしくは他殖後代の切り花、あるいは該切り花から作成された加工品。

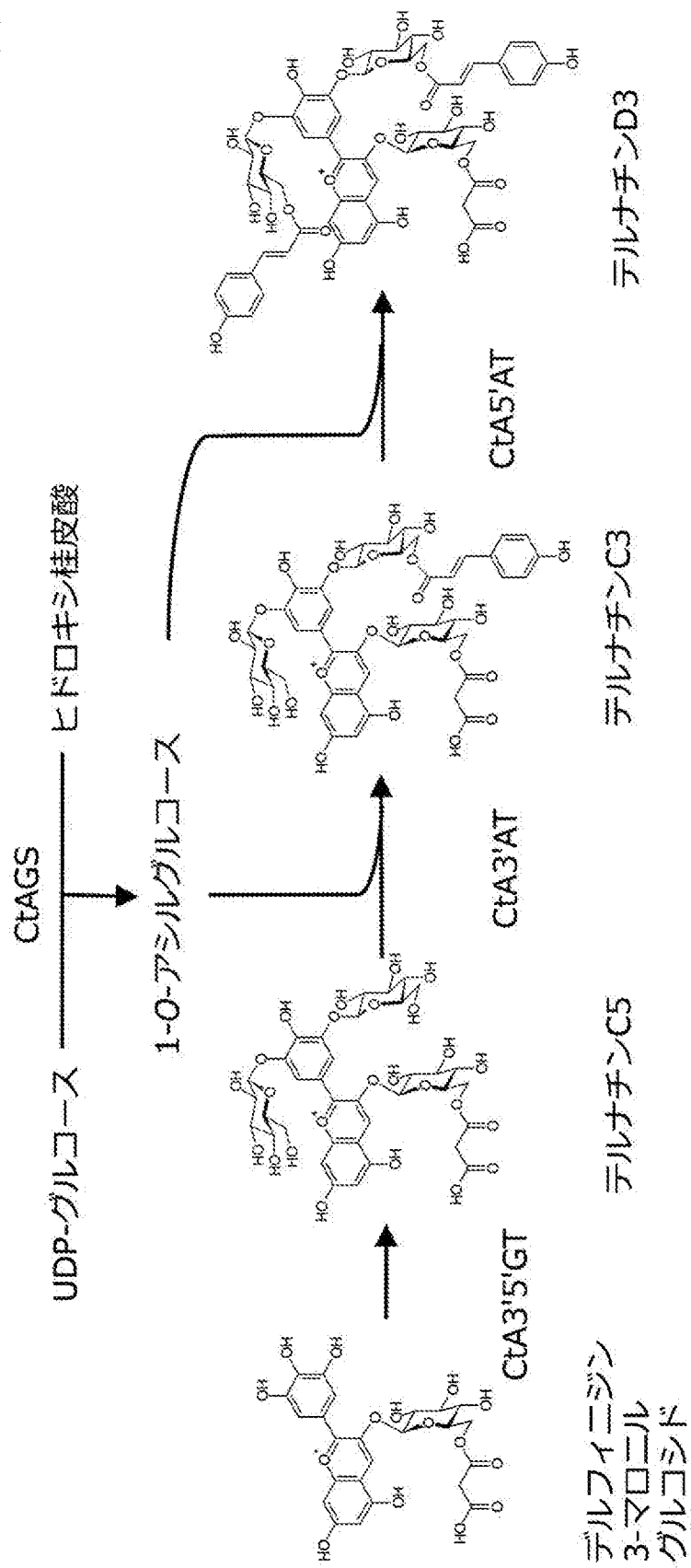
[図1]

図1



[図2]

図2

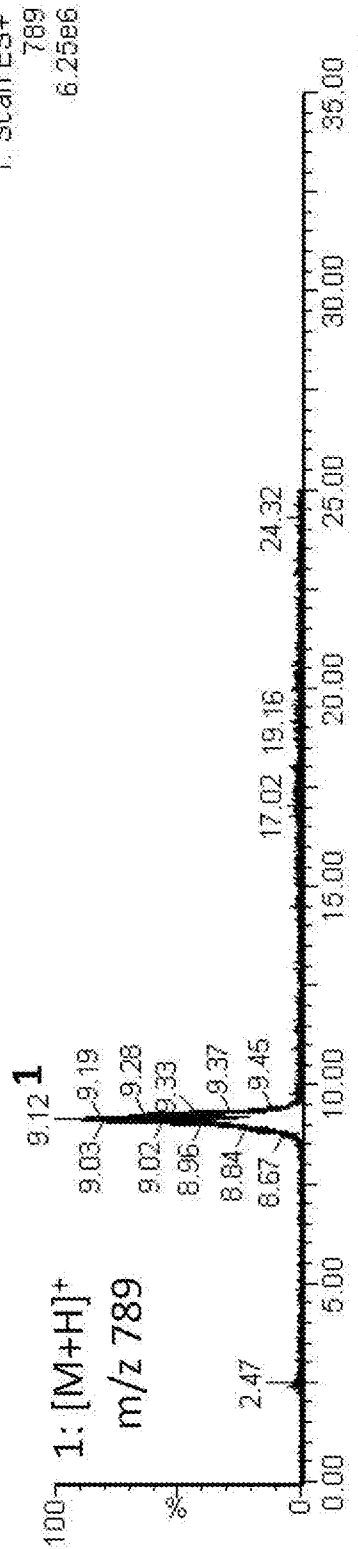


[X] 3

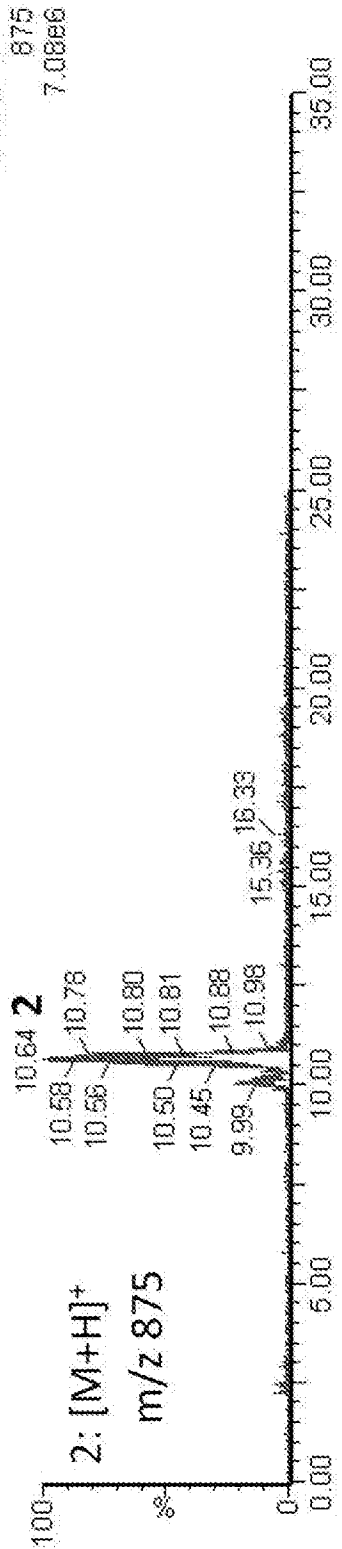
3

1575-17Ct

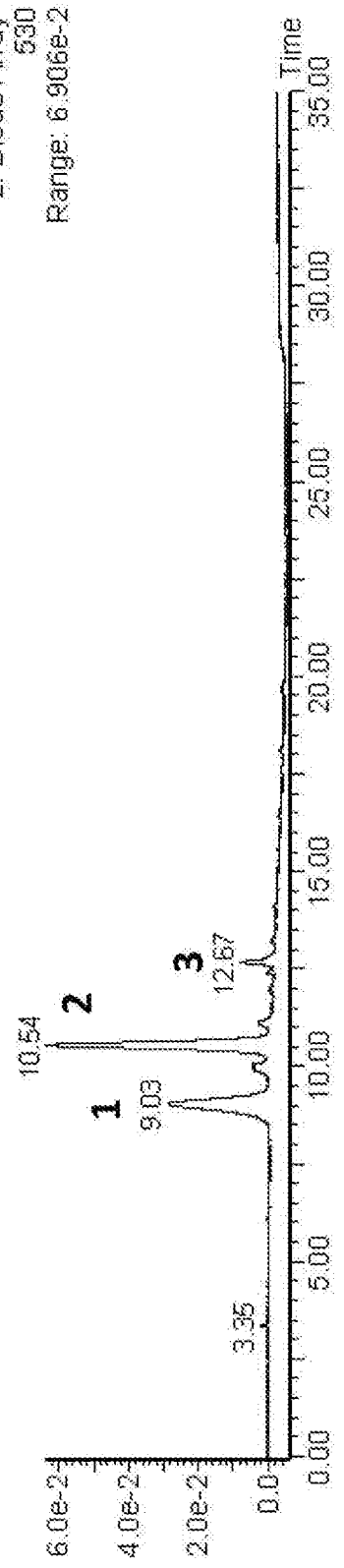
1: Scan ES+
789
6.25e6



1: Scan ES+
875
7.08e6



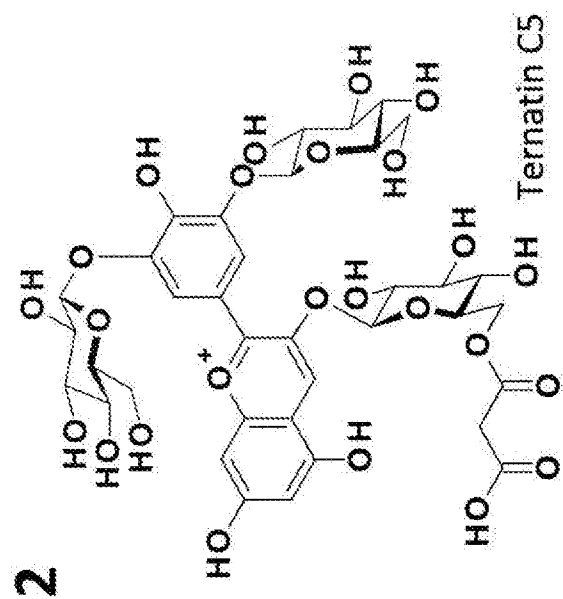
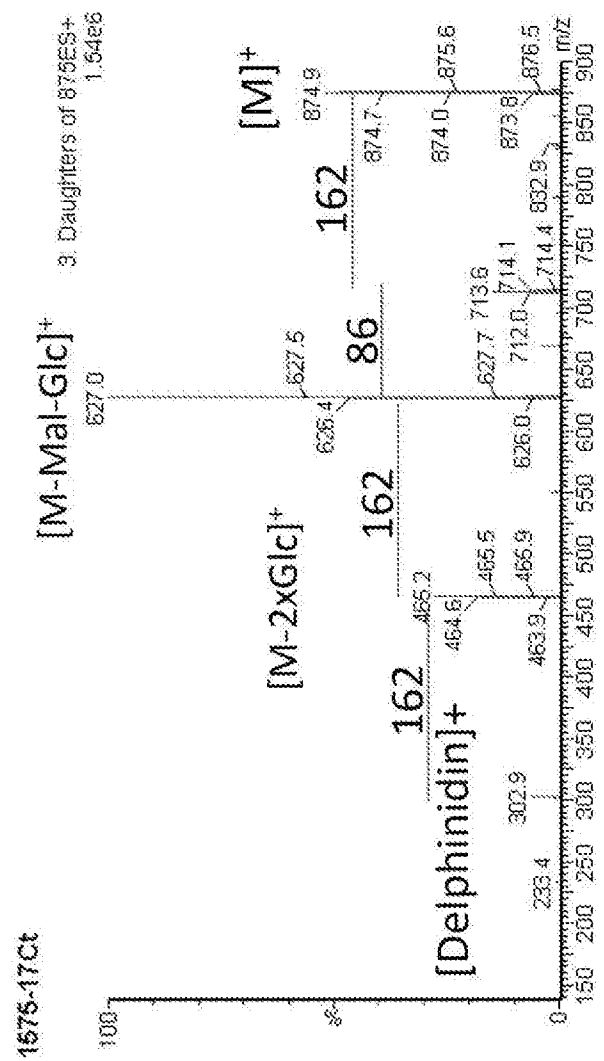
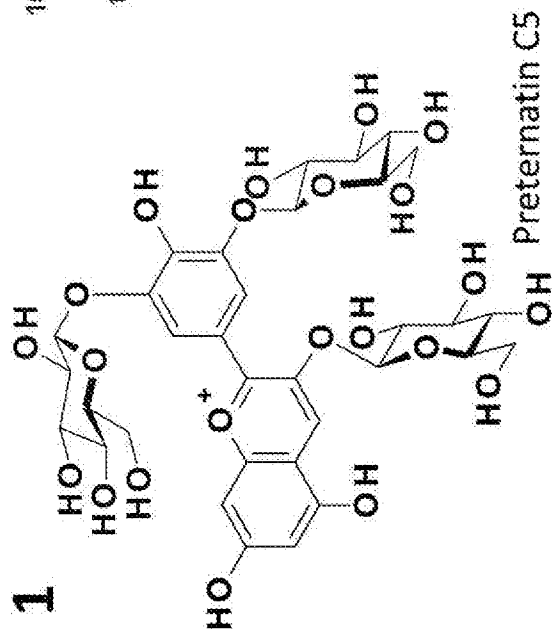
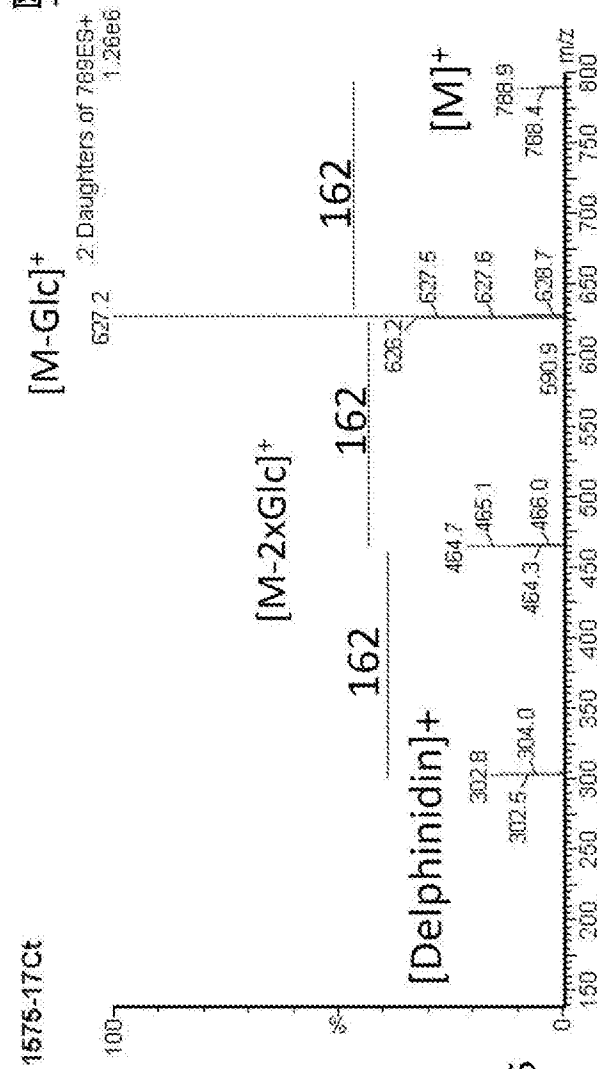
2: Diode Array
530
Range: 6.906e-2



2

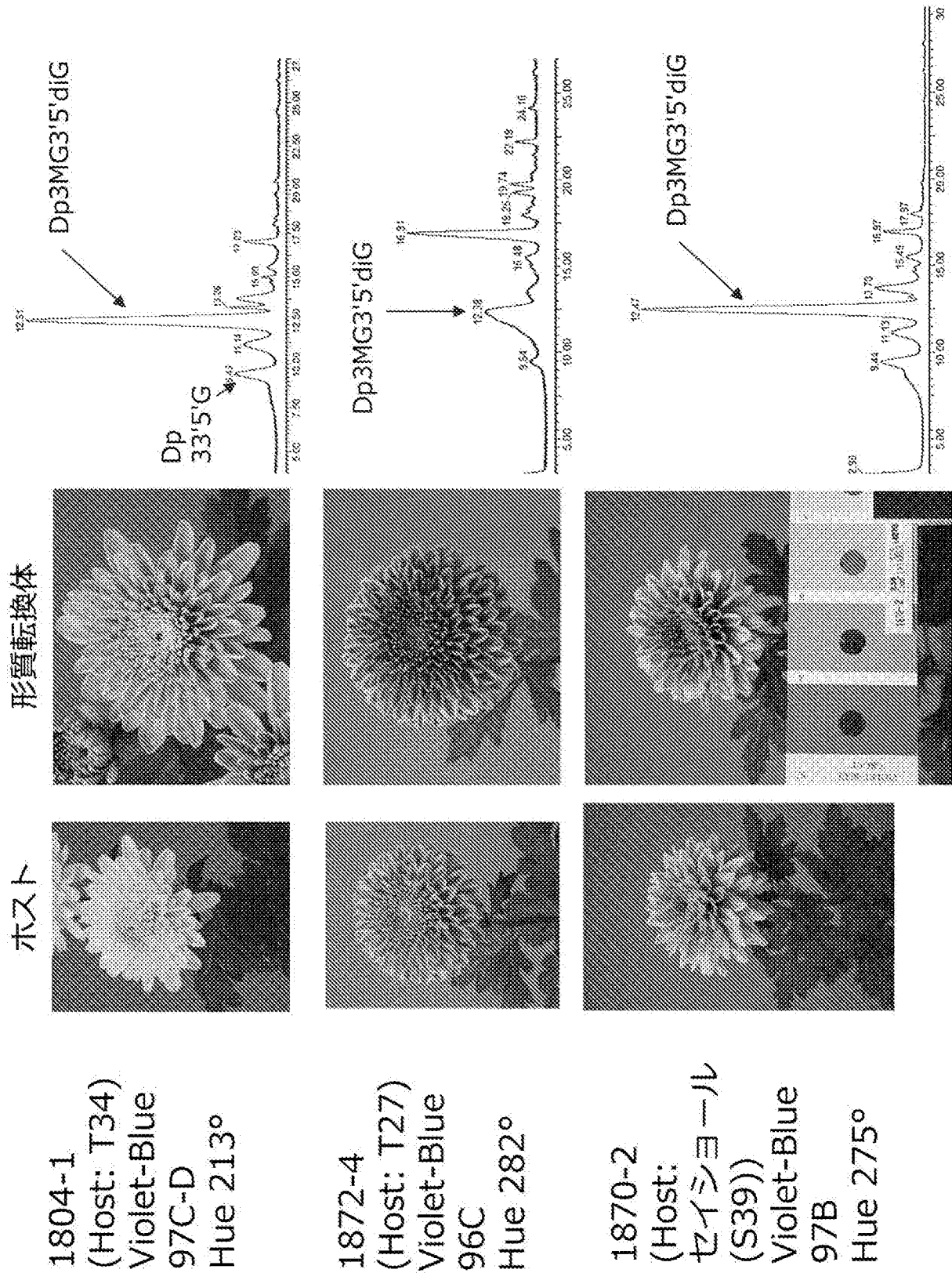
[圖4]

[圖4]



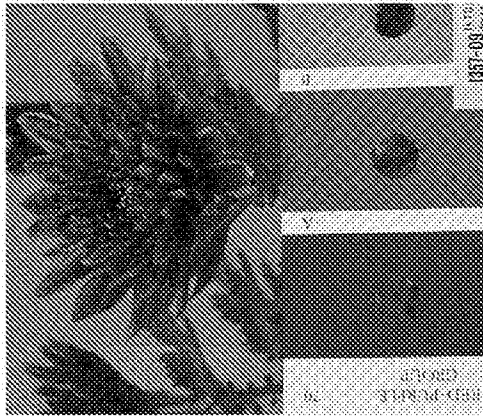
[図5]

図5

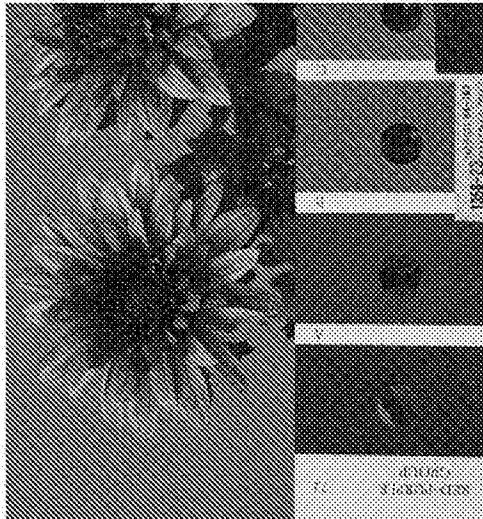


[図6]

図6



1357-09



1356-23



94-765(野生型:左), 1355-23(右)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/069536

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, A01H5/00(2006.01)i, A01H5/02(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/09, A01H5/00, A01H5/02, C12N5/10

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CApplus/MEDLINE/BIOSIS(STN), WPIDS(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2010/122849 A1 (National Agriculture and Food Research Organization), 28 October 2010 (28.10.2010), a whole document; paragraphs [0007], [0015]; example 2 & JP 5697040 B & US 2012/0096589 A1 whole document; paragraphs [0009], [0042]; example 2 & EP 2423312 A1 & CA 2759258 A & CN 102421903 A & KR 10-2012-0068758 A & CO 6460696 A	1-14

☒ 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
20 September 2016 (20.09.16)

Date of mailing of the international search report
27 September 2016 (27.09.16)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/069536

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	NODA, Naonobu et al., Genetic Engineering of Novel Bluer-Colored Chrysanthemums Produced by Accumulation of Delphinidin-Based Anthocyanins, Plant Cell Physiology, 2013, Vol. 54, No. 10, p. 1684-1695, a whole document, abstract, Table 2, 3, p. 1688 Flavonoids in transgenic chrysanthemums	1-14
Y	Yoshiaki KANNO et al., "Chomame Yurai Anthocyanin 3',5'-O-Glucosyl-ki Ten'i Koso Idenshi o Donyu shita Keishitsu Tenkan Lobelia no Kaiseki", Japanese Society for Plant Cell and Molecular Biology Tsukuba Taikai Symposium Koen Yoshishu, 2006, vol.24, page 40, 1Aa-10, whole document	1-14
Y	JP 2005-95005 A (Aomori-Ken), 14 April 2005 (14.04.2005), a whole document; paragraph [0014] (Family: none)	1-14
A	YOSHIDA, Kumi et al., Blue flower color development by anthocyanins: from chemical structure to cell physiology, Natural Product Reports, 2009, Vol. 26, p. 884-915	1-14
A	SASAKI, Nobuhiro et al., Achievements and Perspectives in Biochemistry Concerning Anthocyanin Modification for Blue Flower Coloration, Plant Cell Physiology, 2015.01, 2015, Vol. 56, No. 1, p. 28-40	1-14

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A01H5/00(2006.01)i, A01H5/02(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/09, A01H5/00, A01H5/02, C12N5/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2016年
日本国実用新案登録公報	1996-2016年
日本国登録実用新案公報	1994-2016年

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/MEDLINE/BIOSIS (STN), WPIDS (STN)

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
Y	W0 2010/122849 A1 (独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構) 2010.10.28, 全体、[0007]、[0015]段落、実施例2 & JP 5697040 B & US 2012/0096589 A1 whole document, [0009], [0042], Example 2 & EP 2423312 A1 & CA 2759258 A & CN 102421903 A & KR 10-2012-0068758 A & CO 6460696 A	1-14

☑ 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

20.09.2016

国際調査報告の発送日

27.09.2016

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/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)

濱田 光浩

4 N

3 7 6 3

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
Y	NODA, Naonobu et al., Genetic Engineering of Novel Bluer-Colored Chrysanthemums Produced by Accumulation of Delphinidin-Based Anthocyanins, Plant Cell Physiology, 2013, Vol. 54, No. 10, p. 1684-1695, 全体, abstract, Table 2, 3, p. 1688 Flavonoids in transgenic chrysanthemums	1-14
Y	菅野善明他, チョウマメ由来アントシアニン 3', 5'-O-グルコシル基転移酵素遺伝子を導入した形質転換ロベリアの解析, 日本植物細胞分子生物学会つくば大会・シンポジウム講演要旨集, 2006, Vol. 24, p. 40, 1Aa-10, 全体	1-14
Y	JP 2005-95005 A (青森県) 2005.04.14, 全体、[0014]段落 (ファミリーなし)	1-14
A	YOSHIDA, Kumi et al., Blue flower color development by anthocyanins: from chemical structure to cell physiology, Natural Product Reports, 2009, Vol. 26, p. 884-915	1-14
A	SASAKI, Nobuhiro et al., Achievements and Perspectives in Biochemistry Concerning Anthocyanin Modification for Blue Flower Coloration, Plant Cell Physiology, 2015.01, 2015, Vol. 56, No. 1, p. 28-40	1-14