

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2009年2月12日 (12.02.2009)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2009/020101 A1

- (51) 国際特許分類:
A01H 5/00 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01) C12N 15/29 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2008/063973
- (22) 国際出願日: 2008年8月4日 (04.08.2008)
- (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2007-204253 2007年8月6日 (06.08.2007) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人筑波大学 (UNIVERSITY OF TSUKUBA) [JP/JP]; 〒3058577 茨城県つくば市天王台一丁目1番1 Ibaraki (JP). 独立行政法人産業技術総合研究所 (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒1008921 東京都千代田区霞が関一丁目3番1号 Tokyo (JP). 北興化学工業株式会社 (HOKKO CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1038341 東京都中央区日本橋本石町四丁目4番20号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 小野 道之 (ONO, Michiyuki) [JP/JP]; 〒3058577 茨城県つくば市天王台一丁目1-1 国立大学法人筑波大学遺伝子実験センター内 Ibaraki (JP). 寺川 輝彦 (TERAKAWA, Teruhiko) [JP/JP]; 〒2430023 神奈川県厚木市戸田2165番地
- (74) 代理人: 川口 嘉之, 外 (KAWAGUCHI, Yoshiyuki et al.); 〒1030004 東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 アクロポリス21ビル6階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, 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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING PLANT WITH MODIFIED FLOWER MORPHOLOGY

(54) 発明の名称: 花の形態が改変された植物体の生産方法

(57) Abstract: A plant with modified flower morphology is produced by suppressing the function of a transcription factor related to the polarity determination of the plant. More particularly, a plant with modified flower morphology is produced through the steps of: obtaining a transformed cell by introducing into a plant cell a chimeric DNA obtained by fusing a DNA encoding a transcription factor related to the polarity determination to a DNA encoding a functional peptide for converting a transcription factor into a transcription suppressor; and regenerating a transgenic plant from the transformed cell.

(57) 要約: 植物の極性決定に関与する転写因子の機能を抑制することにより、花の形態が改変された植物体を生産する。より詳しくは、極性決定に関与する転写因子をコードするDNAと転写因子を転写抑制因子に転換する機能性ペプチドをコードするDNAとを融合させたキメラDNAを植物細胞に導入して形質転換細胞を得る工程と、前記形質転換細胞から形質転換植物体を再生させる工程により、花の形態が改変された植物体を生産する。

WO 2009/020101 A1

明 細 書

花の形態が改変された植物体の生産方法

技術分野

[0001] 本発明は、花の形態が改変された植物体の生産方法およびこれを用いて得られる植物体に関するものであり、特に極性決定に関与する転写因子の機能を抑制することによる花の形態が改変された植物体の生産方法およびこれを用いて得られる植物体に関する。

背景技術

[0002] 花の形態は園芸植物の観賞性における重要な要素の一つである。花の発生は、花序分裂組織から花原基として分化するところから始まり、花原基に含まれる花芽分裂組織から、がく片、花びら、雄しべ、雌しべの4種類の花器官が分化する。その後、分化した花器官を含む複合器官として成熟した花が形成される。花の形態が改変された植物は、新規な園芸植物の創出や、新規な形態を持つ果実の創出に利用できる等、農業上の有用性が高い。

[0003] これまで、植物の花の形態の改変は、一般に植物の品種を掛け合わせる交配育種により行われている。しかし、従来の交配育種では、目的とする形態を有する植物を生産するためには、長い年月と、熟練者の経験が必要であるため、簡易かつ確実に花の形態を改変する方法が求められている。

[0004] 高等植物における花の形態の発生は一般にABCモデルによって説明されており、このモデルはMADSボックスファミリーに属するA、B、Cのクラスの遺伝子の転写制御を介して花の形態が変化すると考えられている(酒井一, 花の形態形成の分子遺伝学, 新版「植物の形を決める分子機構」(秀潤社)150-163 (2000))。MADSボックスファミリー遺伝子は、MADSボックスと呼ばれる保存性領域を含む転写因子をコードする遺伝子で、30以上の遺伝子からなる遺伝子ファミリーを形成している。例えばAPETALA1 (AP1)、APETALA (AP2)などのAクラス遺伝子、APETALA3 (AP3)、PISTILLATA (PI)などのBクラス遺伝子、そしてAGAMOUS (AG)のCクラス遺伝子など転写因子が挙げられ、これらの変異体で花の形態の変化が確認されている。

[0005] 一方で、相対的に平坦な組織である被子植物の葉の基本構造は、一般に、近位－遠位、内側－外側、及び向軸性－背軸性という3つの軸に基づいて説明することができる。これらの極性を決定する転写因子としてYABBY1 (YAB1)、YABBY3 (YAB3)などのYABBYグループ、PHABULOSA (PHB)などのHDグループ及びKANADI (KAN)などのKANADIグループなどが挙げられ、これらは葉身における極性決定に関与していることが知られている(非特許文献1～3)。

[0006] これまでに、遺伝子工学的に花の形態を改変する方法として本発明者は、任意の転写因子を転写抑制因子に転換するペプチドを利用する方法を見出している(例えば、特許文献1～7)。このペプチドは、Class II ERF (Ethylene Responsive Element Binding Factor)タンパク質や植物のジンクフィンガータンパク質 (Zinc Finger Protein、例えばシロイヌナズナSUPERMANタンパク質等)から切り出されたもので、極めて単純な構造を有している。そして、本発明者は、種々の転写因子と上記ペプチドとを融合させた融合タンパク質(キメラタンパク質)をコードする遺伝子を植物体内に導入することより、転写因子が転写抑制因子に転換され、該転写因子が転写を促進する標的遺伝子の発現が抑制された植物体を生産することに成功している。具体的には、上記のMADSボックスファミリー遺伝子であるシロイヌナズナのAP3遺伝子やAG遺伝子の発現を、それぞれの遺伝子のプロモーター領域に結合するリプレッサーを用いて抑制し、雄性不稔体の生産方法や花の形態が改変する方法を確立している(特許文献8～9)。

しかし、植物の葉の極性決定に関与する転写因子(YAB1、KAN、PHB)を転写抑制因子に転換したキメラリプレッサーを組換え植物内で過剰発現させることにより、植物器官の極性決定に関与する転写因子の機能を抑制することによって花の形態が改変されることは知られていない。

特許文献1:特開2001-269177公報(平成13年(2001)10月2日公開)

特許文献2:特開2001-269178公報(平成13年(2001)10月2日公開)

特許文献3:特開2001-292776公報(平成13年(2001)10月2日公開)

特許文献4:特開2001-292777公報(平成13年(2001)10月23日公開)

特許文献5:特開2001-269176公報(平成13年(2001)10月2日公開)

特許文献6:特開2001-269179公報(平成13年(2001)10月2日公開)

特許文献7:国際公開第WO03/055903号パンフレット(平成15年(2003)7月10日公開)

特許文献8:特開2005-192483公報(平成17年(2005)7月21日公開)

特許文献9:特開2006-42729公報(平成18年(2006)2月16日公開)

非特許文献1:Eshed Y, Baum SF, Perea JV, Bowman JL.Curr Biol. 2001 Aug 21;11(16):1251-60.

非特許文献2:Eshed Y, Izhaki A, Baum SF, Floyd SK, Bowman JL.Development.2004 Jun;131(12):2997-3006.

非特許文献3:Kidner CA, Timmermans MC.Curr Opin Plant Biol. 2007 Feb;10(1):13-20

発明の開示

[0007] 従来、花の形態に関与するMADSボックスファミリーに属するA、B、Cのクラスの転写因子以外の遺伝子を制御して花の形態を改変する技術は知られていなかった。一方、上述のように、植物の極性を決定する転写因子として知られているYAB1、YAB3、PHB及びKANなどの転写因子は花の形態に対する機能は未知であるものの、当該転写因子を転写抑制因子に転換したキメラタンパク質を組換え植物内で過剰発現させることにより、花の正常な形態形成に関与する転写因子の機能を抑制できれば、従来の一般的なMADSボックスファミリー転写因子の制御によるものとは異なった花の形態を効率的に改変することができるのではないかと考えた。

[0008] 本発明は、上記課題に鑑みなされたものであって、その目的は、極性決定に関与する転写因子の機能を抑制することによって、簡易かつ確実に、新規な花の形態が改変された植物体を生産する方法を提供することにある。

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討した。そして後述される植物の極性決定に関与する転写因子をコードするDNAと転写因子を転写抑制因子に転換する機能性ペプチドをコードするDNAとを融合させたキメラDNAを植物細胞に導入して形質転換細胞を得る工程と、前記形質転換細胞から形質転換植物体を再生させる工程からなる、花の形態が改変された植物体の生産方法並びに花の形態が改変さ

れた形質転換体を得る事に成功した。

[0009] すなわち、本発明の要旨とするところは、以下のとおりである。本発明は、植物の極性決定に関与する転写因子の機能を抑制することにより、植物体の花の形態を改変させることを特徴とする花の形態が改変された植物体の生産方法を提供する。

さらに、本発明は、前記転写因子をコードするDNAと前記機能性ペプチドをコードするDNAとを融合させたキメラDNAを植物細胞に導入して形質転換細胞を得る工程と、前記形質転換細胞から形質転換植物体を再生させる工程を含む、花の形態が改変された植物体の生産方法を提供する。

また、さらに、本発明は、前記転写因子が、

- (1) 配列番号2に記載のアミノ酸配列をコードするDNA
- (2) 配列番号1に記載の塩基配列を含むDNA
- (3) 配列番号2に記載のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入及び/又は付加したアミノ酸配列をコードするDNA
- (4) 配列番号1に記載の塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA
- (5) 配列番号2に記載のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列をコードするDNAから選択されることを特徴とする花の形態が改変された植物体の生産方法を提供する。

さらに、本発明は、前記転写因子が、

- (1) 配列番号4に記載のアミノ酸配列をコードするDNA
- (2) 配列番号3に記載の塩基配列を含むDNA
- (3) 配列番号4に記載のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入及び/又は付加したアミノ酸配列をコードするDNA
- (4) 配列番号3に記載の塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA
- (5) 配列番号4に記載のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列をコードするDNAから選択されることを特徴とする花の形態が改変された植物体の生産方法を提供する。

さらに、本発明は、前記転写因子が、

- (1) 配列番号6に記載のアミノ酸配列をコードするDNA
- (2) 配列番号5に記載の塩基配列を含むDNA
- (3) 配列番号6に記載のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入及び/又は付加したアミノ酸配列をコードするDNA
- (4) 配列番号5に記載の塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA
- (5) 配列番号6に記載のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列をコードするDNAから選択されることを特徴とする花の形態が改変された植物体の生産方法を提供する。

さらに、本発明は、前記機能性ペプチドが、配列番号7から配列番号46のいずれかに示されるアミノ酸配列を有するペプチドであることを特徴とする花の形態が改変された植物体の生産方法を提供する。

また、本発明は、前記いずれかの生産方法により生産された植物体にも関する。

- [0010] 本発明に係る植物体の生産方法は、以上のように、植物の極性決定に関与する転写因子の機能を抑制することにより、植物体の花の形態を改変させる構成を備えているので、上記のYAB1及びKAN1、PHBなどの転写因子の機能が抑制され、簡便に花の形態を改変することができるという効果を奏する。より具体的には、花びらや雌しべ等に形態変化を持つ花卉植物を作製することができるため、新規な園芸品種を創出することができるという効果を有する。また、果樹においては果実の形態を変化させることができるため、新規な形態を持つ果実を創出することができるという効果を有する。さらに、本発明は、交配育種によるよりも簡易かつ確実に花の形態を改変することができるため、労働力を削減することができるという効果を有する。

図面の簡単な説明

- [0011] [図1]ATKAN1SRDX形質転換アサガオ(b)または野生型アサガオ(a)を示す写真。
[図2]ATYAB1SRDX形質転換アサガオ(b)または野生型アサガオ(a)を示す写真。
[図3]ATPHBSRDX形質転換アサガオ(b)または野生型アサガオ(a)を示す写真。

発明を実施するための最良の形態

[0012] 以下に、本発明を詳細に説明する。なお、本発明はこれに限定されるものではない。

植物の極性決定に関与する転写因子の機能を抑制する方法は特に限定されるものではなく、転写抑制因子を植物に導入して内在性の転写因子の活性を抑制する方法や、遺伝子破壊やRNA干渉(RNAi)などにより転写因子をコードする遺伝子の発現を抑制する方法が例示されるが、この中では、上記転写因子と、任意の転写因子を転写抑制因子に転換する機能性ペプチドとを融合させたキメラタンパク質を、植物体で生産させることが好ましい。これによって得られる植物体では、上記転写因子の機能が抑制されるため、花の形態が改変された植物体を生産することができる。つまり、上記転写因子は、植物器官の極性、例えば葉の表裏、対称性など、正常な形態形成に不可欠なものであるため、上記転写因子が転写抑制因子に転換されることにより、花の形態形成に異常が引き起こされる。

なお、本方法においては、上記転写因子が標的とする遺伝子は特定される必要がない。結果として、花の形態が改変されることから、上記標的遺伝子は、花の形成過程において、花の形態に影響を与える機能を有する遺伝子であることが推定されるが、その機能や構造の特定がされていなくても、本方法においては、その転写抑制を有効に行うことができる。

[0013] 以降の説明では、本発明にかかる花の形態が改変された植物体の生産方法に用いられるキメラタンパク質、本発明にかかる植物体の生産方法の一例、これにより得られる植物体とその有用性、並びにその利用についてそれぞれ説明する。

[0014] (I)キメラタンパク質の構築

上述したように、本発明で用いられるキメラタンパク質は、上記転写因子と、任意の転写因子を転写抑制因子に転換する機能性ペプチドとを融合させたものである。そこで、上記転写因子および機能性ペプチドそれぞれについて説明する。

[0015] (I) - 1 植物の極性決定に関与する転写因子

植物の極性決定に関与する転写因子としては、例えば、シロイヌナズナのKAN1タンパク質、KAN2タンパク質、KAN3タンパク質、KAN4タンパク質、YAB1タンパク質、YAB3タンパク質、PHBタンパク質等を挙げることができるが、植物の極性決定に関与

する転写因子である限り、特に限定されるものではない。

[0016] 本発明で用いられる転写因子の代表的な一例としては、好ましくは、シロイヌナズナのKAN1タンパク質またはYAB1タンパク質またはPHBタンパク質を挙げることができる。KAN1タンパク質は、配列番号2に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質である。YAB1タンパク質は、配列番号4に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質である。PHBタンパク質は、配列番号6に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質である。

後述する実施例においては、このKAN1タンパク質およびYAB1タンパク質、PHBタンパク質に後述する機能性ペプチドを融合させることにより、転写因子であるKAN1タンパク質およびYAB1タンパク質、PHBタンパク質を転写抑制因子に転換させている。

[0017] ただし、上記転写因子は、配列番号2、4または6に限定されるものではなく、同等の機能を有するホモログであってもよい。具体的には、配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1個又は数個のアミノ酸が置換、欠失、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であっても、下記転写抑制転換ペプチドとのキメラタンパク質として植物に導入したときに植物の花の形態を改変しうるものであれば本発明にて用いることができる。また、配列番号4に示されるアミノ酸配列において、1個又は数個のアミノ酸が置換、欠失、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であっても、下記転写抑制転換ペプチドとのキメラタンパク質として植物に導入したときに植物の花の形態を改変しうるものであれば本発明にて用いることができる。また、配列番号6に示されるアミノ酸配列において、1個又は数個のアミノ酸が置換、欠失、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であっても、下記転写抑制転換ペプチドとのキメラタンパク質として植物に導入したときに植物の花の形態を改変しうるものであれば本発明にて用いることができる。

[0018] なお、上記の配列番号2および4、6に示されるアミノ酸配列において、1個又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列における「1個又は数個」の範囲は特に限定されないが、例えば、1から20個、好ましくは1から10個、より好ましくは1から7個、さらに好ましくは1個から5個、特に好ましくは1個から3個を意味する。

- [0019] 本発明で用いられるキメラタンパク質を生産する際には、後述するように、公知の遺伝子組換え技術を好適に用いることができる。そこで、本発明にかかる植物体の生産方法には、上記転写因子をコードする遺伝子が好適に用いることができる。
- [0020] 例えば、転写因子としてKAN1タンパク質を用いる場合には、このKAN1タンパク質をコードする遺伝子(説明の便宜上、KAN1遺伝子と称する)を挙げることができる。KAN1遺伝子の具体的な一例としては、配列番号1に示される塩基配列をオープンリーディングフレーム(ORF)として含むポリヌクレオチドを挙げることができる。また、例えば、転写因子としてYAB1タンパク質を用いる場合には、このYAB1タンパク質をコードする遺伝子(説明の便宜上、YAB1遺伝子と称する)を挙げることができる。YAB1遺伝子の具体的な一例としては、配列番号3に示される塩基配列をオープンリーディングフレーム(ORF)として含むポリヌクレオチドを挙げることができる。また、例えば、転写因子としてPHBタンパク質を用いる場合には、このPHBタンパク質をコードする遺伝子(説明の便宜上、PHB遺伝子と称する)を挙げることができる。PHB遺伝子の具体的な一例としては、配列番号5に示される塩基配列をオープンリーディングフレーム(ORF)として含むポリヌクレオチドを挙げることができる。
- [0021] もちろん、本発明で用いられる転写因子をコードするDNAとしては、上記の例に限定されるものではなく、配列番号1、3または5に示される塩基配列と相同性を有するDNAであってもよい。具体的には、例えば、配列番号1、3または5に示される塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ、転写抑制転換ペプチドとのキメラタンパク質として植物に導入したときに植物の花の形態を改変しうるタンパク質をコードするDNA等を挙げることができる。なお、ここでストリンジントな条件でハイブリダイズするとは、好ましくは60°Cで2×SSC洗浄条件下で結合することを意味し、より好ましくは60°Cで0.1×SSC洗浄条件下で結合することを意味する。また、配列番号2、4または6に記載のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列をコードするDNA等を挙げることができる。
- [0022] 上記ハイブリダイゼーションは、J. Sambrook et al. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory(1989)に記載されている方法等、従来公知の方法で行うことができる。通常、温度が高いほど、塩濃度が低いほどストリ

ンジェンシーは高くなる(非特異DNAはハイブリダイズしがたくなる)。

[0023] 上記転写因子をコードするDNAを取得する方法は特に限定されるものではなく、従来公知の方法により、多くの植物から単離することができる。例えば、既知の転写因子の塩基配列に基づき作製したプライマー対を用いることができる。このプライマー対を用いて、植物のcDNA又はゲノミックDNAを鋳型としてPCRを行うこと等により上記DNAを得ることができる。また、上記転写因子をコードするDNAは、従来公知の方法により化学合成して得ることもできる。

[0024] (I) - 2 転写因子を転写抑制因子に転換する機能性ペプチド

本発明で用いられる、任意の転写因子を転写抑制因子に転換する機能性ペプチド(説明の便宜上、転写抑制転換ペプチドと称する)としては、特に限定されるものではなく、転写因子と融合させたキメラタンパク質を形成させることにより、当該転写因子の機能を抑制することができるペプチドであればよい。具体的には、例えば、本発明者によって見出された転写抑制転換ペプチド(特許文献1~7)を挙げることができる。

[0025] 本発明者は、Class II ERF遺伝子群の一つであるシロイヌナズナ由来のAtERF3タンパク質、AtERF4タンパク質、AtERF7タンパク質、AtERF8タンパク質を転写因子に結合させたタンパク質が、転写因子を転写抑制因子に転換して標的転写因子の機能を顕著に抑制するとの知見を得た。そこで、上記タンパク質をそれぞれコードするDNAおよびこれから切り出したDNAを含むエフェクタープラスミドを構築し、これを植物細胞に導入することにより、実際に転写因子の機能を抑制することに成功した(例えば特許文献1~4参照)。また、Class II ERF遺伝子群の一つであるタバコERF3タンパク質(例えば特許文献5参照)、イネOsERF3タンパク質(例えば特許文献6参照)をコードする遺伝子、及び、ジンクフィンガータンパク質の遺伝子群の一つであるシロイヌナズナZAT10、同ZAT11をコードする遺伝子についても上記と同様な試験を行ったところ、転写因子を転写抑制因子に転換して標的転写因子の機能を抑制することを見出している。さらに本発明者は、これらタンパク質は、カルボキシル基末端領域に、アスパラギン酸-ロイシン-アスパラギン(DLN)を含む共通のモチーフを有することを明らかにした。そして、この共通モチーフを有するタンパク質につ

いて検討した結果、転写因子の機能を抑制するタンパク質は極めて単純な構造のペプチドであってもよく、これら単純な構造を有するペプチドが、任意の転写因子を転写抑制因子に変換する機能を有することを見出している。

[0026] また、本発明者は、シロイヌナズナSUPERMANタンパク質は、上記の共通のモチーフと一致しないモチーフを有するが、任意の転写因子を転写抑制因子に変換する機能を有すること、また該SUPERMANタンパク質をコードするDNAを、転写因子のDNA結合ドメイン又は転写因子をコードするDNAに結合させたキメラDNAは、強力な転写抑制能を有するタンパク質を産生することも見出している(Ohta,M., Matsui,K., Hiratsu,K., Shinshi,H. and Ohme-Takagi,M.,The Plant Cell, Vol.13,1959-1968,August,2001、Hiratsu,K., Ohta,M., Matsui,K., Ohme-Takagi,M., FEBS Letters, 514, 351-354 (2002))。

[0027] したがって、本発明において用いられる転写抑制転換ペプチドの一例として、本実施の形態では、Class II ERFタンパク質であるシロイヌナズナ由来のAtERF3タンパク質、同AtERF4タンパク質、同AtERF7タンパク質、同AtERF8タンパク質、タバコERF3タンパク質、イネOsERF3タンパク質、ジンクフィンガータンパク質の一つであるシロイヌナズナZAT10タンパク質、同ZAT11タンパク質等のタンパク質、同SUPERMANタンパク質、これらから切り出したペプチドや、上記機能を有する合成ペプチド等を挙げるができる。

[0028] 上述した転写抑制転換ペプチドのより具体的な例としては、例えば、配列番号7～46のいずれかに示されるアミノ酸配列を有するペプチドを挙げるができる。これらオリゴペプチドは、本発明者が上記転写抑制転換ペプチドであることを見出したものである。

[0029] (I) - 3 キメラタンパク質の生産方法

上記(I) - 2で説明した各種転写抑制転換ペプチドは、上記(I) - 1で説明した転写因子と融合してキメラタンパク質とすることにより、当該転写因子を転写抑制因子とすることができる。したがって、本発明では、上記転写抑制転換ペプチドをコードするポリヌクレオチドを用いて、転写因子をコードするDNAとのキメラDNAを得れば、キメラタンパク質を生産させることができる。

[0030] 具体的には、上記転写抑制転換ペプチドをコードするポリヌクレオチド(説明の便宜上、転写抑制転換ポリヌクレオチドと称する)と上記転写因子をコードするDNAとを連結することによりキメラDNAを構築して、植物細胞に導入する。これによりキメラタンパク質を生産させることができる。なお、キメラDNAを植物細胞に導入する具体的な方法については、後述する(II)の項で詳細に説明する。

[0031] 上記転写抑制転換ポリヌクレオチドの具体的な塩基配列は特に限定されるものではなく、遺伝暗号に基づいて、上記転写抑制転換ペプチドのアミノ酸配列に対応する塩基配列を含んでいればよい。また、必要に応じて、上記転写抑制転換ポリヌクレオチドは、転写因子DNAと連結するための連結部位となる塩基配列を含んでいてもよい。さらに、上記転写抑制転換ポリヌクレオチドのアミノ酸読み枠と転写因子DNAの読み枠とが一致しないような場合に、これらを一致させるための付加的な塩基配列を含んでいてもよい。

[0032] 本発明で用いられるキメラタンパク質は、転写因子をコードするDNAと転写抑制転換ポリヌクレオチドとを連結した上記キメラDNAから得ることができる。したがって、上記キメラタンパク質は、上記転写因子と、上記転写抑制転換ペプチドとが含まれていればよく、その構成は特に限定されるものではない。例えば、転写因子と転写抑制転換ペプチドとの間をつなぐためのリンカー機能を有するポリペプチドや、HisやMyc、Flag等のようにキメラタンパク質をエピトープ標識するためのポリペプチド等、各種の付加的なポリペプチドが含まれていてもよい。さらに上記キメラタンパク質には、必要に応じて、ポリペプチド以外の構造、例えば、糖鎖やイソプレノイド基等が含まれていてもよい。なお、キメラタンパク質において、転写因子と転写抑制転換ペプチドの順番は特に制限されず、いずれをアミノ末端側にしてもよい。

[0033] (II)植物体の生産方法

本発明にかかる植物体の生産方法は、上記(I)で説明したキメラタンパク質を植物体で生産させ、花の形態を改変する過程を含んでいれば特に限定されるものではないが、本発明にかかる植物体の生産方法を具体的な工程で示せば、例えば、発現ベクター構築工程、形質転換工程、選抜工程等の工程を含む生産方法として挙げるることができる。このうち、本発明では、少なくとも形質転換工程が含まれていればよい

。以下、各工程について具体的に説明する。

[0034] (II) - 1 発現ベクター構築工程

本発明において行われる発現ベクター構築工程は、上記(I) - 1で説明した転写因子をコードするDNAと、上記(I) - 2で説明した転写抑制転換ポリヌクレオチドと、プロモーターとを含む組換え発現ベクターを構築する工程であれば特に限定されるものではない。

[0035] 上記組換え発現ベクターの母体となるベクターとしては、従来公知の種々のベクターを用いることができる。例えば、プラスミド、ファージ、またはコスミド等を用いることができ、導入される植物細胞や導入方法に応じて適宜選択することができる。具体的には、例えば、pBR322、pBR325、pUC19、pUC119、pBluescript、pBluescriptSK、pBI系のベクター等を挙げることができる。特に、植物体へのベクターの導入法がアグロバクテリウムを用いる方法である場合には、pBI系のバイナリーベクターを用いることが好ましい。pBI系のバイナリーベクターとしては、具体的には、例えば、pBIG、pBIN19、pBI101、pBI121、pBI221等を挙げることができる。

[0036] 上記プロモーターは、植物体内で遺伝子を発現させることが可能なプロモーターであれば特に限定されるものではなく、公知のプロモーターを好適に用いることができる。かかるプロモーターとしては、例えば、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター(CaMV35S)、アクチンプロモーター、ノパリン合成酵素のプロモーター、タバコのPR1a遺伝子プロモーター、トマトのリブローズ1、5-ニリン酸カルボキシラーゼ・オキシダーゼ小サブユニットプロモーター等を挙げることができる。この中でも、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターまたはアクチンプロモーターをより好ましく用いることができる。上記各プロモーターを用いれば、得られる組換え発現ベクターでは、植物細胞内に導入されたときに任意の遺伝子を強く発現させることが可能となる。

[0037] 上記プロモーターは、転写因子をコードするDNAと転写抑制転換ポリヌクレオチドとを連結したキメラDNAを発現しうるように連結され、ベクター内に導入されていればよく、組換え発現ベクターとしての具体的な構造は特に限定されるものではない。

[0038] 上記組換え発現ベクターは、上記プロモーターおよび上記キメラDNAに加えて、さ

らに他のDNAセグメントを含んでいてもよい。当該他のDNAセグメントは特に限定されるものではないが、ターミネーター、選別マーカ、エンハンサー、翻訳効率を高めるための塩基配列等を挙げることができる。また、上記組換え発現ベクターは、さらにT-DNA領域を有していてもよい。T-DNA領域は特にアグロバクテリウムを用いて上記組換え発現ベクターを植物体に導入する場合に遺伝子導入の効率を高めることができる。

- [0039] ターミネーターは転写終結部位としての機能を有していれば特に限定されるものではなく、公知のものであってもよい。例えば、具体的には、ノパリン合成酵素遺伝子の転写終結領域(Nosターミネーター)、カリフラワーモザイクウイルス35Sの転写終結領域(CaMV35Sターミネーター)等を好ましく用いることができる。この中でもNosターミネーターをより好ましく用いることができる。
- [0040] 上記形質転換ベクターにおいては、ターミネーターを適当な位置に配置することにより、植物細胞に導入された後に、不必要に長い転写物を合成したり、強力なプロモーターがプラスミドのコピー数を減少させたりするような現象の発生を防止することができる。
- [0041] 上記選別マーカとしては、例えば薬剤耐性遺伝子を用いることができる。かかる薬剤耐性遺伝子の具体的な一例としては、例えば、ハイグロマイシン、ブレオマイシン、カナマイシン、ゲンタマイシン、クロラムフェニコール等に対する薬剤耐性遺伝子を挙げることができる。これにより、上記抗生物質を含む培地中で生育する植物体を選択することによって、形質転換された植物体を容易に選別することができる。
- [0042] 上記組換え発現ベクターの構築方法についても特に限定されるものではなく、適宜選択された母体となるベクターに、上記プロモーター、転写因子をコードするDNA、および転写抑制転換ポリヌクレオチド、並びに必要なに応じて上記他のDNAセグメントを所定の順序となるように導入すればよい。例えば、転写因子をコードするDNAと転写抑制転換ポリヌクレオチドとを連結してキメラDNAを構築し、次に、このキメラDNAとプロモーターと(必要なに応じてターミネーター等)とを連結して発現カセットを構築し、これをベクターに導入すればよい。
- [0043] キメラDNAの構築および発現カセットの構築では、例えば、各DNAセグメントの切

断部位を互いに相補的な突出末端としておき、ライゲーション酵素で反応させることで、当該DNAセグメントの順序を規定することが可能となる。なお、発現カセットにターミネーターが含まれる場合には、上流から、プロモーター、上記キメラDNA、ターミネーターの順となっていればよい。また、組換え発現ベクターを構築するための試薬類、すなわち制限酵素やライゲーション酵素等の種類についても特に限定されるものではなく、市販のものを適宜選択して用いればよい。

[0044] また、上記組換え発現ベクターの増殖方法(生産方法)も特に限定されるものではなく、従来公知の方法を用いることができる。一般的には大腸菌を宿主として当該大腸菌内で増殖させればよい。このとき、ベクターの種類に応じて、好ましい大腸菌の種類を選択してもよい。

[0045] (II) - 2 形質転換工程

本発明において行われる形質転換工程は、上記(II) - 1で説明した組換え発現ベクターを植物細胞に導入して、上記(I)で説明したキメラタンパク質を生産させるようになっていけばよい。

[0046] 上記組換え発現ベクターを植物細胞に導入する方法(形質転換方法)は特に限定されるものではなく、植物細胞に応じた適切な従来公知の方法を用いることができる。具体的には、例えば、アグロバクテリウムを用いる方法や直接植物細胞に導入する方法を用いることができる。組換え発現ベクターを直接植物細胞に導入する方法としては、例えば、マイクロインジェクション法、エレクトロポレーション法(電気穿孔法)、ポリエチレングリコール法、パーティクルガン法、プロトプラスト融合法、リン酸カルシウム法等を用いることができる。

[0047] 上記組換え発現ベクターが導入される植物細胞としては、例えば、花、葉、根等の植物器官における各組織の細胞、カルス、不定胚、懸濁培養細胞等を挙げることができる。

[0048] ここで、本発明にかかる植物体の生産方法においては、上記組換え発現ベクターは、生産しようとする種類の植物体に合わせて適切なものを適宜構築してもよいが、汎用的な組換え発現ベクターを予め構築しておき、それを植物細胞に導入してもよい。

[0049] (II) - 3 選抜及び植物体再生工程

本発明にかかる植物体の生産方法においては、上記形質転換工程が含まれていればよく、さらに上記組換え発現ベクター構築工程が含まれていてもよいが、さらに他の工程が含まれていてもよい。具体的には、形質転換後の植物体から適切な形質転換体を選抜する選抜工程等を挙げることができる。

[0050] 選抜の方法は特に限定されるものではなく、例えば、ハイグロマイシン耐性等の薬剤耐性を基準として選抜してもよいし、形質転換体を育成した後に、植物体そのものの花の形態から選抜してもよい。例えば、花の形態から選抜する例としては、形質転換体の花の形態を、形質転換していない植物体の花の形態と比較する方法を挙げることができる(後述の実施例参照)。特に花の形態は、単に比較するだけでも選抜が可能になるとともに、花の形態の改変という本発明の効果そのものも確認することができる。

[0051] 上記の選抜工程で選抜された細胞、不定芽、不定胚などの組織を育成して生育させることにより目的の形質転換植物体を得ることができる。

[0052] 上記の工程で得られた形質転換植物体に目的とする転写因子をコードするDNAと転写抑制転換ポリヌクレオチドとを連結した上記キメラDNAが組み込まれていることの確認は、これらの組織から常法に従ってDNAを抽出し、公知のPCR (Polymerase Chain Reaction) 法もしくはサザンハイブリダイゼーション法により行うことができる。

[0053] 本発明において「花の形態」が改変されているとは、花の形態に関する形質が改変されていれば、特に限定されるものではない。花の形態としては、例えば、花柄の長さ、花びらの形状、花びらの模様、花びらの色、がくの形状、さやの形状、雄しべの形状、雌しべの形状等を挙げることができ、果実の形態も含まれるが、これらに限定されるものではない。また、花の形態が改変されるとは、単独の形態が改変される場合と、複数の形態が同時に改変される場合を含む。

[0054] 本発明にかかる植物体の生産方法では、上記キメラDNAを植物体に導入するため、該植物体から、有性生殖または無性生殖により花の形態が改変された子孫を得ることが可能となる。また、該植物体やその子孫から植物細胞や、種子、果実、株、カルス、塊茎、切穂、塊等の繁殖材料を得て、これらを基に該植物体を量産することも可

能となる。したがって、本発明にかかる植物体の生産方法では、選抜後の植物体を繁殖させる繁殖工程(量産工程)が含まれていてもよい。

[0055] なお、本発明における植物体とは、成育した植物個体、植物細胞、植物組織、カルス、種子の少なくとも何れかが含まれる。つまり、本発明では、最終的に植物個体まで成育させることができる状態のものであれば、全て植物体と見なす。また、上記植物細胞には、種々の形態の植物細胞が含まれる。かかる植物細胞としては、例えば、懸濁培養細胞、プロトプラスト、葉の切片等が含まれる。これらの植物細胞を増殖・分化させることにより植物体を得ることができる。なお、植物細胞からの植物体の再生は、植物細胞の種類に応じて、従来公知の方法を用いて行うことができる。したがって、本発明にかかる植物体の生産方法では、植物細胞から植物体を再生させる再生工程が含まれていてもよい。

[0056] ここで、本発明にかかる花の形態が改変された植物体の具体的な種類は特に限定されるものではなく、花の形態の改変によりその有用性が高まる植物を挙げることができる。かかる植物は、被子植物であってもよいし裸子植物であってもよい。また、被子植物としては、単子葉植物であってもよいし、双子葉植物であってもよいが、双子葉植物であることがより好ましい。双子葉植物としては、離弁花亜綱であってもよいし、合弁花亜綱であってもよい。合弁花亜綱としては、例えば、リンドウ目、ナス目、シソ目、アワゴケ目、オオバコ目、キキョウ目、ゴマノハグサ目、アカネ目、マツムシソウ目、キク目を挙げることができる。また、離弁花亜綱としては、例えば、ビワモドキ目、ツバキ目、アオイ目、サガリバナ目、ウツボカズラ目、スマレ目、ヤナギ目、フウチョウソウ目、ツツジ目、イワウメ目、カキノキ目、サクラソウ目、モクレン目、クスノキ目、コショウ目、ウマノスズクサ目、シキミ目、スイレン目、キンポウゲ目、ケシ目、ヤマグルマ目、マンサク目、ユズリハ目、ブナ目、ナデシコ目、タデ目、バラ目、マメ目、ヤマモガシ目、カワゴケソウ目、アリノウグサ目、フトモモ目、ミズキ目、ビャクダン目、ラフレシア目、ニシキギ目、トウダイグサ目、クロウメモドキ目、アマ目、ムクロジ目、フウロソウ目、セリ目等を挙げることができる。

[0057] 以下に、本発明の実施例の例示により具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらに限定されるものではない。以下の実験操作の手順は特に記述しない限り、「モレ

キユラー クローニング (Molecular Cloning) 第2版」(J. Sambrookら、Cold Spring Harbor Laboratory press, 1989年)に記載されている方法に従った。

実施例

[0058] <形質転換用ベクター構築用ベクターの構築>

形質転換用ベクター構築用ベクターであるp35SGを、以下の工程(1)～(4)のとおり構築した。

[0059] (1)インビトロジェン社製pENTRベクター上のattL1、attL2のそれぞれの領域をプライマーattL1-F(配列番号47)、attL1-R(配列番号48)、attL2-F(配列番号49)、attL2-R(配列番号50)を用いてPCRにて増幅した。得られたattL1断片を制限酵素HindIII、attL2断片をEcoRIで消化し、精製した。PCR反応の条件は、変性反応94°C1分、アニール反応47°C2分、伸長反応74°C1分を1サイクルとして、25サイクル行った。以下すべてのPCR反応は同じ条件で行った。

[0060] (2)クローンテック社製(Clontech社、USA)のプラスミドpBI221を制限酵素XbaIとSacIで切断した後、アガロースゲル電気泳動でGUS(β -グルクロニダーゼ)遺伝子を除き、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター(以下の説明では、便宜上、CaMV35Sと称する)とノパリン合成酵素遺伝子の転写終止領域(以下の説明では、便宜上、Nos-terと称する)を含む35S-Nosプラスミド断片DNAを得た。

[0061] (3)以下の配列番号51、52の配列を有するDNA断片を合成し、90°Cで2分間加熱した後、60°Cで1時間加熱し、その後室温(25°C)で2時間静置してアニーリングさせ2本鎖を形成させた。これを上記35S-Nosプラスミド断片DNAのXbaI-SacI領域にライゲーションし、p35S-Nosプラスミドを完成させた。配列番号51、52の配列を有するDNA断片には、5'末端にBamHI制限酵素部位、翻訳効率を高めるタバコモザイクウイルス由来のomega配列、及び制限酵素部位SmaI、Sall、SstIがこの順に含まれる。

5'-ctagaggatccacaattaccaacaacaacaacaacaacattacaattacagatcccgggggtaccgtcgcgagctc-3'(配列番号51)

5'-cgtcgacggtacccccgggatctgtaattgtaatggtgtttgtttgtttgtttggttaattgtggatcct-3'(配列番号52)

[0062] (4)このp35S-Nosプラスミドを制限酵素HindIIIで消化し、上記attL1断片を挿入した。さらにこれをEcoRIで消化し、attL2断片を挿入して、ベクターp35SGを完成させた。

[0063] <転写抑制転換ペプチドをコードするポリヌクレオチドを組み込んだ構築用ベクターの構築>

転写抑制転換ペプチドをコードするポリヌクレオチドを組み込んだ構築用ベクターであるp35SSRDXGを、以下の工程(1)~(2)のとおり構築した。

(1)12アミノ酸転写抑制転換ペプチドLDLDLELRGFA(SRDX:配列番号23)をコードし、3'末端に終止コドンTAAを持つように設計した、以下の配列を有するDNAをそれぞれ合成し、70°Cで10分加温した後、自然冷却によりアニールさせて2本鎖DNAとした。

5'-gggcttgatctggatctagaactccgtttgggttcgcttaag-3'(配列番号53)

5'-tcgacttaagcgaaacccaaacggagttctagatccagatcaagccc-3'(配列番号54)

[0064] (2)p35SGを制限酵素SmaI、SalIで消化し、この領域に上記のSRDXをコードする2本鎖DNAを挿入して、p35SSRDXGを構築した。

[0065] <形質転換用ベクターの構築>

構築用ベクターのatt部位で挟まれたDNA断片と組換えるための、2つのatt部位を有する植物形質転換用ベクターであるpBIGCKHを、以下の工程(1)から(3)のとおり構築した。

[0066] (1)米国ミシガン州立大学より譲渡されたpBIG(Becker, D. Nucleic Acids Res. 18:203,1990)を制限酵素HindIII、EcoRIで消化し、GUS、Nos領域を電気泳動で除いた。

[0067] (2)インビトロジェン社から購入したGateway(登録商標)ベクターコンバージョンシステムのFragmentAをプラスミドpBluscriptのEcoRVサイトに挿入した。これをHindIII-EcoRIで消化し、FragmentA断片を回収した。

[0068] (3)回収したFragmentA断片を上記のpBIGプラスミド断片とライゲーションを行い、pBIGCKHを構築した。これらは大腸菌DB3.1(インビトロジェン社)でのみ増殖可能で、クロラムフェニコール耐性、カナマイシン耐性である。

[0069] <構築用ベクターへのKAN1遺伝子の組み込み>

上記構築用ベクターp35SSRDYGにシロイヌナズナ由来の転写因子KAN1タンパク質をコードする遺伝子を以下の工程(1)～(3)のとおり組み込んだ。

(1)シロイヌナズナcDNAライブラリーから、以下のプライマーを用いて、終止コドンを除くシロイヌナズナKAN1遺伝子(遺伝子ID No. AT5G16560)のコード領域のみを含むDNA断片をPCRにて増幅した。

プライマー1(KAN1-F)

5'-atgtctatgg aagtggtttt tcagagaa-3'(配列番号55)

プライマー2

(KAN1-R stopless)5'-tttctcgtgccaatctggtctgcctaatgt -3'(配列番号56)

KAN1遺伝子のcDNAおよびコードするアミノ酸配列をそれぞれ配列番号1および2に示す。

[0070] (2)得られたKAN1コード領域のDNA断片を、予め制限酵素SmaIで消化しておいた構築用ベクターp35SSRDYGのSmaI部位にライゲーションした。

[0071] (3)このプラスミドで大腸菌を形質転換し、プラスミドを調製して、塩基配列を決定し、順方向に挿入されたクローンを単離し、SRDXとのキメラ遺伝子となったp35SKAN1SRDXGを得た。

[0072] <構築用ベクターへのYAB1遺伝子の組み込み>

上記構築用ベクターp35SSRDYGにシロイヌナズナ由来の転写因子YAB1タンパク質をコードする遺伝子を以下の工程(1)～(3)のとおり組み込んだ。

[0073] (1)シロイヌナズナcDNAライブラリーから、以下のプライマーを用いて、終止コドンを除くシロイヌナズナYAB1遺伝子(遺伝子ID No.AT2G45190)のコード領域のみを含むDNA断片をPCRにて増幅した。

プライマー1(YAB1-F)

5'-atgtctatgt cgtctatgtc cccttc-3'(配列番号57)

プライマー2(YAB1-R stopless)

5'-ataagga gtcacaccaacgtagcagctgc -3'(配列番号58)

YAB1遺伝子のcDNAおよびコードするアミノ酸配列をそれぞれ配列番号3および

4に示す。

[0074] (2)得られたYAB1コード領域のDNA断片を、予め制限酵素SmaIで消化しておいた構築用ベクターp35SSRDXGのSmaI部位にライゲーションした。

[0075] (3)このプラスミドで大腸菌を形質転換し、プラスミドを調製して、塩基配列を決定し、順方向に挿入されたクローンを単離し、SRDXとのキメラ遺伝子となったp35SYAB1SRDXGを得た。

[0076] <構築用ベクターへのPHB遺伝子の組み込み>

上記構築用ベクターp35SSRDXGにシロイヌナズナ由来の転写因子PHBタンパク質をコードする遺伝子を以下の工程(1)～(3)のとおり組み込んだ。

[0077] (1)シロイヌナズナcDNAライブラリーから、以下のプライマーを用いて、終止コドンを除くシロイヌナズナPHB遺伝子(遺伝子ID No.AT2G34710)のコード領域のみを含むDNA断片をPCRにて増幅した。

プライマー1 (PHB-F)

5'- atgatgatgg tccattcgatgagcagaga -3' (配列番号59)

プライマー2 (PHB-R stopless)

5'- aacgaacgaccaattcacgaacatgaaagc -3' (配列番号60)

PHB遺伝子のcDNAおよびコードするアミノ酸配列をそれぞれ配列番号5および6に示す。

[0078] (2)得られたPHBコード領域のDNA断片を、予め制限酵素SmaIで消化しておいた構築用ベクターp35SSRDXGのSmaI部位にライゲーションした。

[0079] (3)このプラスミドで大腸菌を形質転換し、プラスミドを調製して、塩基配列を決定し、順方向に挿入されたクローンを単離し、SRDXとのキメラ遺伝子となったp35SPHBSRDXGを得た。

[0080] <組換え発現ベクターの構築>

上記の構築用ベクター上にあるCaMV35Sプロモーター、キメラ遺伝子、Nos-terminator等を含むDNA断片を、植物形質転換用ベクターpBIGCKHに組換えることにより、植物を宿主とする発現ベクターを構築した。組換え反応はインビトロジェン社のGateway(登録商標)LR clonase(登録商標)を用いて以下の工程(1)～(3)のとおりに行っ

た。

[0081] (1)まず、p35SKAN1SRDXGまたはp35SYAB1SRDXGまたはp35SPHBSRDXXの各々1.5 μ L(約300ng)とpBIGCKH4.0 μ L(約600ng)に5倍希釈したLR buffer 4.0 μ LとTE緩衝液(10mM TrisCl pH7.0、1mM EDTA)5.5 μ Lを加えた。

[0082] (2)この溶液にLR clonase4.0 μ Lを加えて25°Cで60分間インキュベートした。続いて、proteinaseK2 μ Lを加えて37°Cで10分間インキュベートした。

[0083] (3)その後、この溶液1~2 μ Lを大腸菌(DH5 α 等)に形質転換し、カナマイシンで選択した。

これにより、植物形質転換用ベクターp35SATKAN1SRDXおよびp35SATYAB1SRDX、p35SATPHBSRDXXを得た。

[0084] <アサガオの組織へのキメラ遺伝子の導入>

アサガオ(品種:ムラサキ)の開花後2週間目の未熟果を有効塩素濃度が2%の次亜塩素酸ナトリウム液で15分間浸漬し滅菌後、長さが2mm~8mmの未熟胚をとりだして、MS基本培地、ショ糖6%、ナフタレン酢酸(NAA)3mg/L、ゲランガム0.2%(pH5.8)に置床して、25°C、明所で培養することにより、不定胚の形成を行い、遺伝子導入用組織とした。

[0085] 上記で得られた形質転換用ベクターp35SATKAN1SRDXおよびp35SATYAB1SRDX、p35SATPHBSRDXXを包含するアグロバクテリウム・ツメファシエンシ菌(p35SLBA4404-ATKAN1SRDX、p35SLBA4404-ATYAB1SRDX、p35SLBA4404-ATPHBSRDXX)をLB培地で28°Cで一晩培養した培養液に上記に記載のアサガオの不定胚100個を5分間浸漬処理した。浸漬処理後、MS基本培地にショ糖6%、植物ホルモンとしてNAA0.5mg/l、アセトシリゴン10mg/lをそれぞれ加え、pH5.8として、ゲルライト0.2%を加えた固体培地に置床した。25°Cの温度条件下で暗所にて2日間共存培養を行った。

[0086] 共存培養後の不定胚100個を、MS培地にショ糖6%、植物ホルモンとしてNAA0.5mg/l、オーグメンチン((スミスクライン・ビーチャム、田辺社製)アモキシシリン250mg/l、クラブラン酸カリウム 50mg/lを含有する)、カナマイシン25mg/lをそれぞれ

れ加え、pH5.8として、ゲルライト0.2%を加えた固体選抜培地に置床した。25°Cの温度条件下で暗所にて1ヶ月毎に新しい選抜培地に移植した。

[0087] <形質転換アサガオの再生>

上記選抜培地に移植後、1ヶ月後に上記の不定胚をMS培地にシヨ糖3%、植物ホルモンとしてIAA 2mg/l、BA 2mg/l、オーグメンチン((スミスクライン・ビーチャム、田辺社製) アモキシシリン 250mg/l、クラブラン酸カリウム 50mg/lを含有する)、カナマイシン25mg/lをそれぞれ加え、pH5.8として、寒天1.2%を加えた固体再生培地に置床した。

[0088] 再生培地に移植後、約2ヶ月で形質転換不定胚から形質転換された植物体を再生させた。これらの再生植物体は、1/2無機塩濃度のMS培地にオーグメンチン((スミスクライン・ビーチャム、田辺社製) アモキシシリン 250mg/l、クラブラン酸カリウム 50mg/lを含有する)、カナマイシン25mg/lをそれぞれ加え、pH5.8として、寒天1.2%を加えた育成培地に置床した。

25°Cの温度条件下で明所(1000ルクス、16時間照明)培養した。その結果、ATKAN1SRDXが形質転換されたアサガオ植物体が25個体、ATYAB1SRDXが形質転換されたアサガオ植物体が11個体、ATPHBSRDXが形質転換されたアサガオ植物体が25個体得られた。

これらの植物体はすべて、順化、鉢上げを行った。

[0089] 上記で得られた形質転換植物の葉を遺伝子解析用の材料とし、PCR法によりATKAN1SRDX、ATYAB1SRDX、ATPHBSRDX遺伝子が導入されていることを確認した。

また、上記で鉢上げされたATKAN1SRDXが形質転換されたアサガオ植物体が25個体、ATYAB1SRDXが形質転換されたアサガオ植物体が11個体、ATPHBSRDXが形質転換されたアサガオ植物体が25個体の葉を用いて、各々のキメラ遺伝子の植物体内での発現についてリバーstransクリプションPCR(RT-PCR: 公知の方法)によって解析した結果、すべての形質転換体において発現が確認できた。

[0090] ATKAN1SRDXで形質転換されたアサガオの表現型を野生型の表現型と比較した結果を図1に示す。図1は、花びらの形態を示したものである。図1の(a)は野生型の植物体、

(b)はATKAN1SRDXで形質転換された植物体である。図1から明らかなように、ATKAN1SRDXで形質転換されたアサガオは、野生型に比べて花卉の凹凸が激しくなり、星咲きを有していた。

[0091] ATYAB1SRDXで形質転換されたアサガオの表現型を野生型の表現型と比較した結果を図2に示す。図2は、花びらの形態と大きさを示したものである。図2の(a)は野生型の植物体、(b)はATYAB1SRDXで形質転換された植物体である。図2から明らかなように、ATYAB1SRDXで形質転換されたアサガオは、野生型に比べて花卉の凹凸が激しくなり、星咲きを有していた。さらに、ATYAB1SRDXで形質転換されたアサガオは、野生型に比べて花卉の大きさが縮小されて小型化していた。

[0092] ATPHBSRDXで形質転換されたアサガオの表現型を野生型の表現型と比較した結果を図3に示す。図3は、花びらの形態を示したものである。図3の(a)は野生型の植物体、(b)はATPHBSRDXで形質転換された植物体である。図3から明らかなように、ATPHBSRDXで形質転換されたアサガオは、野生型に比べて花卉の凹凸が激しくなり、星咲きを有していた。

[0093] [配列表の説明]

配列番号1:KAN1タンパク質をコードする塩基配列

配列番号2:KAN1タンパク質のアミノ酸配列

配列番号3:YAB1タンパク質をコードする塩基配列

配列番号4:YAB1タンパク質のアミノ酸配列

配列番号5:PHBタンパク質をコードする塩基配列

配列番号6:PHBタンパク質のアミノ酸配列

配列番号7:転写抑制転換ペプチドのアミノ酸配列

配列番号8:転写抑制転換ペプチドのアミノ酸配列

配列番号9:転写抑制転換ペプチドのアミノ酸配列

配列番号10:転写抑制転換ペプチドのアミノ酸配列

配列番号11:転写抑制転換ペプチドのアミノ酸配列

配列番号12:転写抑制転換ペプチドのアミノ酸配列

配列番号13:転写抑制転換ペプチドのアミノ酸配列

配列番号14: 転写抑制転換ペプチドのアミノ酸配列
配列番号15: 転写抑制転換ペプチドのアミノ酸配列
配列番号16: 転写抑制転換ペプチドのアミノ酸配列
配列番号17: 転写抑制転換ペプチドのアミノ酸配列
配列番号18: 転写抑制転換ペプチドのアミノ酸配列
配列番号19: 転写抑制転換ペプチドのアミノ酸配列
配列番号20: 転写抑制転換ペプチドのアミノ酸配列
配列番号21: 転写抑制転換ペプチドのアミノ酸配列
配列番号22: 転写抑制転換ペプチドのアミノ酸配列
配列番号23: 転写抑制転換ペプチドのアミノ酸配列
配列番号24: 転写抑制転換ペプチドのアミノ酸配列
配列番号25: 転写抑制転換ペプチドのアミノ酸配列
配列番号26: 転写抑制転換ペプチドのアミノ酸配列
配列番号27: 転写抑制転換ペプチドのアミノ酸配列
配列番号28: 転写抑制転換ペプチドのアミノ酸配列
配列番号29: 転写抑制転換ペプチドのアミノ酸配列
配列番号30: 転写抑制転換ペプチドのアミノ酸配列
配列番号31: 転写抑制転換ペプチドのアミノ酸配列
配列番号32: 転写抑制転換ペプチドのアミノ酸配列
配列番号33: 転写抑制転換ペプチドのアミノ酸配列
配列番号34: 転写抑制転換ペプチドのアミノ酸配列
配列番号35: 転写抑制転換ペプチドのアミノ酸配列
配列番号36: 転写抑制転換ペプチドのアミノ酸配列
配列番号37: 転写抑制転換ペプチドのアミノ酸配列
配列番号38: 転写抑制転換ペプチドのアミノ酸配列
配列番号39: 転写抑制転換ペプチドのアミノ酸配列
配列番号40: 転写抑制転換ペプチドのアミノ酸配列
配列番号41: 転写抑制転換ペプチドのアミノ酸配列

配列番号42:転写抑制転換ペプチドのアミノ酸配列

配列番号43:転写抑制転換ペプチドのアミノ酸配列

配列番号44:転写抑制転換ペプチドのアミノ酸配列

配列番号45:転写抑制転換ペプチドのアミノ酸配列

配列番号46:転写抑制転換ペプチドのアミノ酸配列

配列番号47:attL1領域増幅用フォワードプライマー

配列番号48:attL1領域増幅用リバースプライマー

配列番号49:attL2領域増幅用フォワードプライマー

配列番号50:attL2領域増幅用リバースプライマー

配列番号51:BamHI制限酵素部位、タバコモザイクウイルス由来のomega配列、及び制限酵素部位SmaI、SalI、SstIを含むオリゴヌクレオチド(センス鎖)

配列番号52:BamHI制限酵素部位、タバコモザイクウイルス由来のomega配列、及び制限酵素部位SmaI、SalI、SstIを含むオリゴヌクレオチド(アンチセンス鎖)

配列番号53:転写抑制転換ペプチドSRDXをコードするオリゴヌクレオチド(センス鎖)

配列番号54:転写抑制転換ペプチドSRDXをコードするオリゴヌクレオチド(アンチセンス鎖)

配列番号55:KAN1増幅用フォワードプライマー

配列番号56:KAN1増幅用リバースプライマー

配列番号57:YAB1増幅用フォワードプライマー

配列番号58:YAB1増幅用リバースプライマー

配列番号59:PHB増幅用フォワードプライマー

配列番号60:PHB増幅用リバースプライマー

産業上の利用可能性

[0094] 本発明では、KAN1、YAB1、PHBなどの転写因子の機能を抑制することによって花の形態が改変された植物体を得ることができる。それゆえ、本発明は、各種農業や園芸、アグリビジネス、さらには農産物を加工する産業や食品産業等に利用可能であり、しかも非常に有用であると考えられる。

請求の範囲

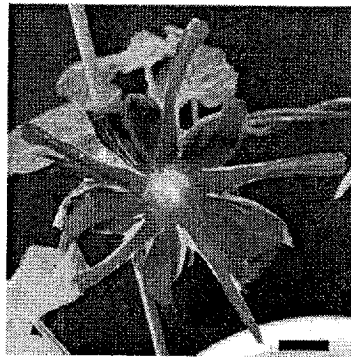
- [1] 植物の極性決定に関与する転写因子の機能を抑制することにより、植物体の花の形態を改変させることを特徴とする花の形態が改変された植物体の生産方法。
- [2] 前記転写因子をコードするDNAと転写因子を転写抑制因子に転換する機能性ペプチドをコードするDNAとを融合させたキメラDNAを植物細胞に導入して形質転換細胞を得る工程と、前記形質転換細胞から形質転換植物体を再生させる工程を含む、請求項1に記載の花の形態が改変された植物体の生産方法。
- [3] 前記転写因子をコードするDNAが、
- (1) 配列番号2に記載のアミノ酸配列をコードするDNA
 - (2) 配列番号1に記載の塩基配列を含むDNA
 - (3) 配列番号2に記載のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入及び/又は付加したアミノ酸配列をコードするDNA
 - (4) 配列番号1に記載の塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAにストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズするDNA
 - (5) 配列番号2に記載のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列をコードするDNAから選択されることを特徴とする、請求項2に記載の花の形態が改変された植物体の生産方法。
- [4] 前記転写因子をコードするDNAが、
- (1) 配列番号4に記載のアミノ酸配列をコードするDNA
 - (2) 配列番号3に記載の塩基配列を含むDNA
 - (3) 配列番号4に記載のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入及び/又は付加したアミノ酸配列をコードするDNA
 - (4) 配列番号3に記載の塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAにストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズするDNA
 - (5) 配列番号4に記載のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列をコードするDNAから選択されることを特徴とする、請求項2に記載の花の形態が改変された植物体の生産方法。
- [5] 前記転写因子をコードするDNAが、

- (1) 配列番号6に記載のアミノ酸配列をコードするDNA
 - (2) 配列番号5に記載の塩基配列を含むDNA
 - (3) 配列番号6に記載のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入及び/又は付加したアミノ酸配列をコードするDNA
 - (4) 配列番号5に記載の塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA
 - (5) 配列番号6に記載のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列をコードするDNAから選択されることを特徴とする、請求項2に記載の花の形態が改変された植物体の生産方法。
- [6] 前記機能性ペプチドが、配列番号7から配列番号46のいずれかに示されるアミノ酸配列を有するペプチドであることを特徴とする、請求項2～5のいずれか一項に記載の花の形態が改変された植物体の生産方法。
- [7] 請求項1～6のいずれか1項に記載の生産方法により生産された植物体。

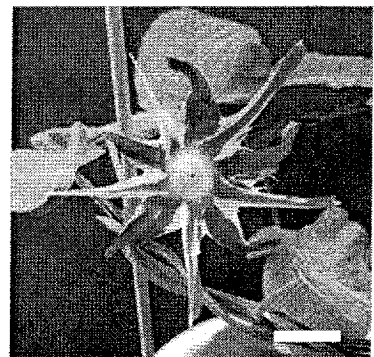
[図1]



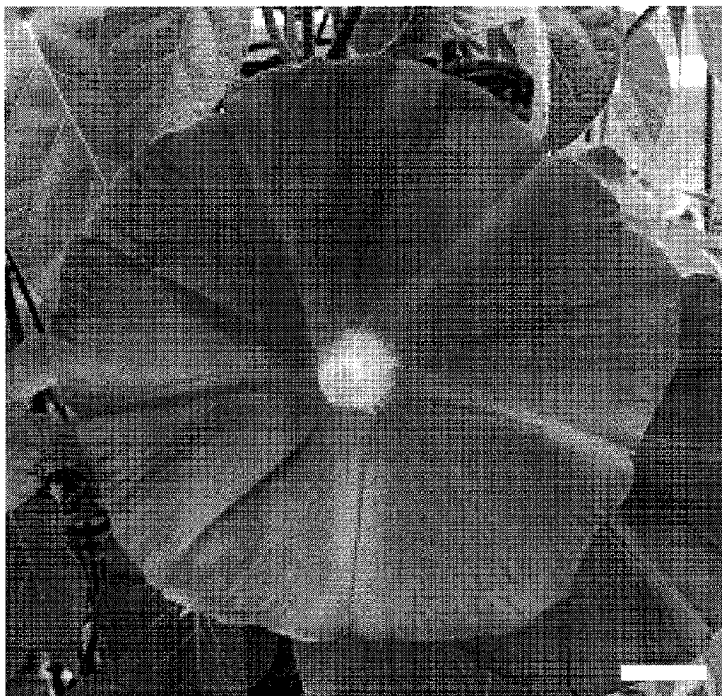
(a) 野生型



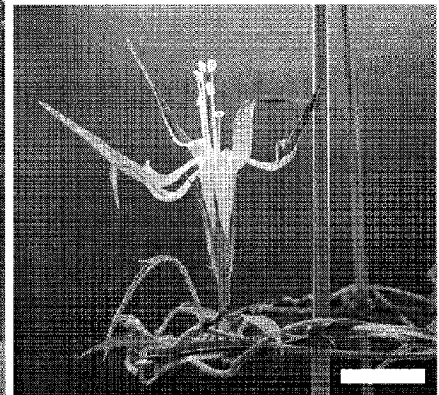
(b) 形質転換型



[図2]



(a) 野生型

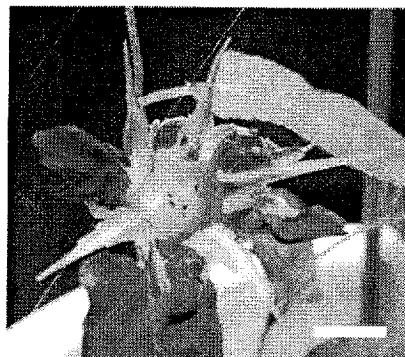


(b) 形質転換型

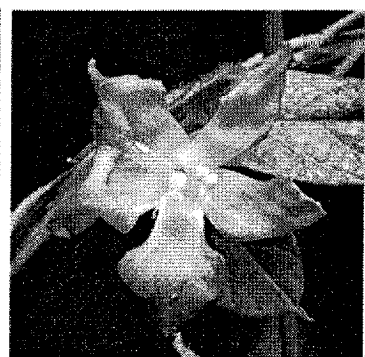
[図3]



(a) 野生型



(b) 形質転換型



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/063973

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A01H5/00(2006.01)i, C07K19/00(2006.01)n, C12N5/10(2006.01)n, C12N15/29(2006.01)n		
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) A01H5/00, C07K19/00, C12N5/00-5/10, C12N15/00-15/90		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN), SCISEARCH (STN), CONFSCI (STN), WPIDS (STN), JSTPlus (JDreamII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	ALVAREZ J P et al., Endogenous and synthetic microRNAs stimulate simultaneous, efficient, and localized regulation of multiple targets in diverse species., Plant Cell, 2006, vol. 18, p. 1134-1151 (particularly, p. 1135, 1137-1138, 1143, Fig. 1M, 1N, 4C, Table 1)	1, 7/1-7
X/Y	DAI M et al., A WUSCHEL-LIKE HOMEBOX gene represses a YABBY gene expression required for rice leaf development., Plant Physiol., 2007.05, vol. 144, p. 380-390 (particularly, Summary, p. 382-383)	1, 7/1-7
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 28 August, 2008 (28.08.08)		Date of mailing of the international search report 09 September, 2008 (09.09.08)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/063973

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	IWASAKI M and NITASAKA E, The FEATHERED gene is required for polarity establishment in lateral organs especially flowers of the Japanese morning glory (<i>Ipomoea nil</i>)., <i>Plant Mol. Biol.</i> , 2006, vol. 62, p. 913-925 (particularly, p. 914, 917-919)	1-7
Y	JP 2006-42729 A (Japan Science and Technology Agency, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 16 February, 2006 (16.02.06), & WO 2005/065446 A1 & EP 1702508 A1 (particularly, Claims; Par. No. [0009])	1-7
A	JP 2005-295879 A (Japan Science and Technology Agency, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 27 October, 2005 (27.10.05), (Family: none)	1-7
P,X	Tomomi HIYAMA et al., "CRES-T Ho ni yoru Hanagata Kaihen -Henka Asagao ni Semaru-", BMB2007 (Dai 30 Kai Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Dai 80 Kai The Japanese Biochemical Society Taikai Godo Nenkai) Koen Yoshishu, 25 November, 2007 (25.11.07), page 537 (Abstract 2P-1421)	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/063973

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

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

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

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

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

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The method of claim 1 was known before the priority date of this application. That is, the invention described in claim 1 does not have a special technical feature over the prior art. Therefore, claim 1 includes different inventions which correspond to the respective molecular species of transcription factors capable of modifying the flower morphology of a plant by suppressing the function thereof and do not satisfy the requirement of unity.

In the description, it is described that the transcription factors of the sequences represented by SEQ IDNOS: 2, 4, and 6 are targeted and their functions are suppressed. Accordingly, in the claims of this application, three inventions corresponding to these molecular (continued to extra sheet)

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

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

Remark on Protest
the

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/063973

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

species are considered to be substantially included.

Document 1: Plant Cell (2006) vol. 18, pp. 1134-1151

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. A01H5/00(2006.01)i, C07K19/00(2006.01)n, C12N5/10(2006.01)n, C12N15/29(2006.01)n		
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. A01H5/00, C07K19/00, C12N5/00 - 5/10, C12N15/00 - 15/90		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） CA(STN), BIOSIS(STN), MEDLINE(STN), SCISEARCH(STN), CONFSCI(STN), WPIDS(STN), JSTPlus(JDreamII)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y	ALVAREZ J P et al., Endogenous and synthetic microRNAs stimulate simultaneous, efficient, and localized regulation of multiple targets in diverse species., Plant Cell, 2006, vol. 18, p. 1134-1151 (特に、p. 1135, 1137-1138, 1143, Fig. 1M, 1N, 4C, Table 1)	1, 7/1-7
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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 28.08.2008	国際調査報告の発送日 09.09.2008	
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） 中村 正展 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 3537

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

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

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

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

請求の範囲1の方法は、文献1に記載されており、本願優先日前に公知であった。すなわち、請求の範囲1に記載された発明は、先行技術に対する特別な技術的特徴を有していない。そうすると、請求の範囲1には、その機能を抑制させることで植物体の花の形態を改変させることが可能な転写因子の分子種それぞれに対応した、互いに単一性の要件を満たさない別異の発明が包含されていると言える。

明細書には、配列番号2、4及び6に示される配列の転写因子を標的としてその機能を抑制することが記載されているから、本願の特許請求の範囲には、これらの分子種に対応する3つの発明が実質的に包含されていると認められる。

文献1 : Plant Cell (2006) vol. 18, p. 1134-1151

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

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

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

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y	DAI M et al., A WUSCHEL-LIKE HOMEBOX gene represses a YABBY gene expression required for rice leaf development., Plant Physiol., 2007.05, vol. 144, p. 380-390 (特に、Summary, p. 382-383)	1, 7/1-7
Y	IWASAKI M and NITASAKA E, The FEATHERED gene is required for polarity establishment in lateral organs especially flowers of the Japanese morning glory (Ipomoea nil)., Plant Mol. Biol., 2006, vol. 62, p. 913-925 (特に、p. 914, 917-919)	1-7
Y	JP 2006-42729 A (独立行政法人科学技術振興機構、独立行政法人産 業技術総合研究所) 2006.02.16, & WO 2005/065446 A1 & EP1702508 A1 (特に、特許請求の範囲、【0009】段落)	1-7
A	JP 2005-295879 A (独立行政法人科学技術振興機構、独立行政法人 産業技術総合研究所) 2005.10.27, (ファミリーなし)	1-7
PX	檜山 智美、他, CRES-T 法による花形改変 -変化朝顔に迫る-, BMB2007 (第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同年会) 講演要旨集, 2007.11.25, p. 537 (Abstract 2P-1421)	1-7