

(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
2010年7月1日(01.07.2010)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2010/073697 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/00 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
A01H 1/00 (2006.01) A01H 5/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2009/007243
- (22) 国際出願日: 2009年12月25日(25.12.2009)
- (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 2008-333915 2008年12月26日(26.12.2008) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人農業生物資源研究所(NATIONAL INSTITUTE OF AGROBIOLOGICAL SCIENCES) [JP/JP]; 〒3058602 茨城県つくば市観音台2-1-2 Ibaraki (JP). 国立大学法人 奈良先端科学技術大学院大学(NARA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒6300192 奈良県生駒市高山町8916-5 Nara (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 土岐精一(TOKI, Seiichi) [JP/JP]; 〒3058602 茨城県つくば市観音台2-1-2 独立行政法人農業生物資源研究所内 Ibaraki (JP). 雑賀啓明(SAIGA, Yoshiaki) [JP/JP]; 〒3058602 茨城県つくば市観音台2-1-2 独立行政法人農業生物資源研究所内 Ibaraki (JP). 中山繁樹(NAKAYAMA, Shigeki) [JP/JP]; 〒3058602 茨城県つくば市観音台2-1-2 独立行政法人農業生物資源研究所内 Ibaraki (JP). 遠藤真咲(ENDO, Masaki) [JP/JP]; 〒3058602 茨城県つくば市観音台2-1-2 独立行政法人農業生物資源研究所内 Ibaraki (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス(SIKS & Co.); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目8番7号 京橋日殖ビル8階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, 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, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第21条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))



WO 2010/073697 A1

(54) Title: AGENT CAPABLE OF DOUBLING RICE PLANT NUCLEAR CHROMOSOME, AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: イネ科植物の核内の染色体を倍化させる薬剤及びその利用

(57) Abstract: Disclosed is an agent for doubling a rice plant nuclear chromosome, which has a smaller influence on human bodies compared to conventional products and can be applied only to a specific tissue or cell in a rice plant. Specifically disclosed is an agent for doubling a rice plant nuclear chromosome, which comprises at least a part of a nucleotide sequence encoding cyclin-dependent kinase B2 (CDKB2) or a nucleic acid comprising a sequence of which at least a part is complementary to the nucleotide sequence encoding CDKB2 as an active ingredient.

(57) 要約: 従来技術と比べて人体への影響が少なく、かつイネ科植物の特定の組織や細胞に限定して処理できる、イネ科植物の核内の染色体を倍加させるための薬剤を提供すること。サイクリン依存性キナーゼB2 (CDKB2) をコードする塩基配列の少なくとも一部の配列、又は、前記CDKB2をコードする塩基配列と少なくとも一部が相補的な配列を含む核酸を有効成分として含む、イネ科植物の核内の染色体を倍加させるための薬剤。

明 細 書

発明の名称：

イネ科植物の核内の染色体を倍化させる薬剤及びその利用

関連出願の相互参照

[0001] 本出願は、2008年12月26日出願の日本特願2008-333915号の優先権を主張し、その全記載は、ここに特に開示として援用される。

技術分野

[0002] 本発明は、サイクリン依存性キナーゼB2（CDKB2）の発現を抑制する物質を有効成分として含むイネ科植物の核内の染色体を倍加させるための薬剤、並びに該薬剤を利用したイネ科植物の核内の染色体を倍加させる方法及び核内の染色体が倍加した形質転換イネ科植物の製造方法に関する。

背景技術

[0003] 将来において人口が増加して食糧危機が起こることが予想されるために、イネ（米）、コムギ（小麦）、トウモロコシ、オオムギ、ライムギなどのイネ科植物を中心とする穀物の収量増加を図ることが求められている。穀物増産のためのアプローチの一つとして、穀物を肥大化させる試みがある。穀物の肥大化は、穀物を種子とする植物の核内の染色体を倍加させることなどによって起こる現象である。植物の核酸を倍加させる方法としては、植物をコルヒチンなどの薬剤で処理することにより植物の染色体数を倍加させる方法が知られている（非特許文献1）。

[0004] 上記方法において、コルヒチンは植物の核酸を倍加させるための薬剤として働き、細胞分裂において紡錘系形成を阻害する。コルヒチンで処理された植物は、細胞分裂の際に紡錘系が形成されないことから、複製された核酸が核内に残り、結果として核内の染色体量が2倍になる。これが繰り返されることにより、核内の染色体が倍加した植物が得られる。

[非特許文献1] P. S. Rao and P. Suprasanna 1996, In Vitro Haploid Production in Higher Plants, 1, 317-339

上記非特許文献 1 の全記載は、ここに特に開示として援用される。

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] しかし、コルヒチンは人体に対して有害である。コルヒチンを摂取した人体はヒ素中毒に類似した中毒症状が現れ、摂取後 2～5 時間で口腔・咽頭灼熱感、発熱、嘔吐、下痢、背部疼痛、腎不全などの症状が現れ、さらには呼吸不全により死亡することもある。コルヒチン中毒に対する解毒剤はこれまでに知られていない。したがって、コルヒチン処理により核内の染色体を倍加させる方法は、処理時に作業者が、治療が困難なコルヒチン中毒に罹患する可能性のある方法である。

[0006] さらに、コルヒチン処理は植物に対して非特異的な処理しかできず、植物の特定の組織や細胞に限定して処理することが困難であった。したがって、肥大化した種子を得るといった目的でイネ科植物をコルヒチンで処理すると、イネ科植物そのものを肥大化させることとなり、結果としてイネ科植物の作付面積が拡大するという新たな問題が生じる。

[0007] そこで、本発明は、従来技術と比べて人体への影響が少なく、かつイネ科植物の特定の組織や細胞に限定して処理できる、イネ科植物の核内の染色体を倍加させるための薬剤を提供することを解決すべき課題とした。さらに、本発明は、この薬剤を用いた、イネ科植物の核内の染色体を倍加させる方法及び核内の染色体が倍加したイネ科植物を作製する方法を提供することを解決すべき課題とした。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を進めた結果、植物に特異的に発現し、かつ細胞周期の進行に関与するサイクリン依存性キナーゼ B 2 (CDKB2) の発現を抑制することにより、イネ科植物の核内の染色体を倍加させ得ることを見出した。さらに、本発明者らは、イネ科植物において、CDKB2 をコードする mRNA を薬剤選択的に RNA i 効果により分解することができる系を構築し、該系を用いることによってイネ科植物の特定

の細胞の核内の染色体を倍化させることに成功した。本発明は上記知見に基づいて完成された発明である。

[0009] したがって、本発明によれば、サイクリン依存性キナーゼB2（CDKB2）をコードする塩基配列の少なくとも一部の配列、又は、前記CDKB2をコードする塩基配列と少なくとも一部が相補的な配列を含む核酸を有効成分として含む、イネ科植物の核内の染色体を倍加させるための薬剤が提供される。

[0010] 本発明の薬剤の好ましい態様は、前記核酸が、下記 [a] ~ [e] :

[a] プロモーター ;

[b] サイクリン依存性キナーゼB2（CDKB2）をコードする塩基配列の少なくとも一部の配列、又は、前記CDKB2をコードする塩基配列と少なくとも一部が相補的な配列 ;

[c] スペーサー ;

[d] 前記 [b] の配列の少なくとも一部に対する逆方向反復配列 ; 及び

[e] ターミネーター

を含む。

[0011] 本発明の薬剤の好ましい態様は、前記核酸が、前記 [a] ~ [e] を、下記 [f] 及び [g] :

[f] 右側境界配列 (Right Border) ; 及び

[g] 左側境界配列 (Left Border)

の間に含む。

[0012] 本発明の薬剤の好ましい態様は、前記プロモーターが、薬剤誘導型プロモーターである。

[0013] 本発明の薬剤の好ましい態様は、前記薬剤誘導型プロモーターが、glucocorticoid receptor誘導型プロモーター、estrogen receptor誘導型プロモーター、及びecdysone receptor誘導型プロモーターからなる群から選ばれる少なくとも一種のプロモーターである。

[0014] 本発明の薬剤の好ましい態様は、前記イネ科植物が、イネである。

- [0015] 本発明の薬剤の好ましい態様は、前記CDKB2をコードする塩基配列の少なくとも一部の配列が、配列表の配列番号1に記載の塩基配列の62～91位の配列、165～247位の配列、289～302位の配列、318～349位の配列、468～490位の配列、652～670位の配列、及び728～803位の配列からなる群から選ばれる少なくとも1種の配列を含む、少なくとも25塩基の配列である。
- [0016] 本発明の薬剤の好ましい態様は、前記CDKB2をコードする塩基配列と少なくとも一部が相補的な配列が、配列表の配列番号1に記載の塩基配列の62～91位の配列、165～247位の配列、289～302位の配列、318～349位の配列、468～490位の配列、652～670位の配列、及び728～803位の配列からなる群から選ばれる少なくとも1種の配列を含む、少なくとも25塩基の塩基配列と相補的な配列である。
- [0017] 本発明の薬剤の好ましい態様は、前記CDKB2をコードする塩基配列の少なくとも一部の配列が、配列表の配列番号2に記載の塩基配列である。
- [0018] 本発明の別の側面によれば、イネ科植物の核内に、本発明の薬剤を導入して、形質転換イネ科植物を得る工程；及び前記形質転換イネ科植物を、前記導入された薬剤に含まれる核酸を鋳型として、前記植物内でRNA転写産物が生成し得る条件下に置く工程を含む、イネ科植物の核内の染色体を倍加させる方法が提供される。
- [0019] 本発明のイネ科植物の核内の染色体を倍加させる方法の別の態様は、
下記[a]～[e]：
[a] プロモーター；
[b] サイクリン依存性キナーゼB2（CDKB2）をコードする塩基配列の少なくとも一部の配列、又は、前記CDKB2をコードする塩基配列と少なくとも一部が相補的な配列；
[c] スペーサー；
[d] 前記[b]の配列の少なくとも一部に対する逆方向反復配列；及び
[e] ターミネーター

が、下記 [f] 及び [g] :

[f] 右側境界配列 (Right Border) ; 及び

[g] 左側境界配列 (Left Border)

の間に配置されている塩基配列を含む核酸を含有するベクターを得る工程 ;
アグロバクテリウム (Agrobacterium) 属細菌に、前記ベクターを導入して、形質転換アグロバクテリウム属細菌を得る工程 ;

イネ科植物に、前記形質転換アグロバクテリウム属細菌を接触させて、前記核酸が導入された形質転換イネ科植物を得る工程 ; 及び

前記形質転換イネ科植物を、前記導入された薬剤に含まれる核酸を鋳型として、前記植物内で RNA 転写産物が生成し得る条件下に置く工程を含む。

[0020] 本発明のイネ科植物の核内の染色体を倍加させる方法の好ましい態様は、前記プロモーターが、薬剤誘導型プロモーターである。

[0021] 本発明のイネ科植物の核内の染色体を倍加させる方法の好ましい態様は、前記薬剤誘導型プロモーターが、glucocorticoid receptor 誘導型プロモーター、estrogen receptor 誘導型プロモーター、及びecdysone receptor 誘導型プロモーターからなる群から選ばれる少なくとも一種のプロモーターである。

[0022] 本発明のイネ科植物の核内の染色体を倍加させる方法の好ましい態様は、前記イネ科植物が、イネである。

[0023] 本発明のイネ科植物の核内の染色体を倍加させる方法の好ましい態様は、前記 CDKB2 をコードする塩基配列の少なくとも一部の配列が、配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列の 62 ~ 91 位の配列、165 ~ 247 位の配列、289 ~ 302 位の配列、318 ~ 349 位の配列、468 ~ 490 位の配列、652 ~ 670 位の配列、及び 728 ~ 803 位の配列からなる群から選ばれる少なくとも 1 種の配列を含む、少なくとも 25 塩基の配列である。

[0024] 本発明のイネ科植物の核内の染色体を倍加させる方法の好ましい態様は、前記 CDKB2 をコードする塩基配列と少なくとも一部が相補的な配列が、

配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列の 6 2 ~ 9 1 位の配列、1 6 5 ~ 2 4 7 位の配列、2 8 9 ~ 3 0 2 位の配列、3 1 8 ~ 3 4 9 位の配列、4 6 8 ~ 4 9 0 位の配列、6 5 2 ~ 6 7 0 位の配列、及び 7 2 8 ~ 8 0 3 位の配列からなる群から選ばれる少なくとも 1 種の配列を含む、少なくとも 2 5 塩基の塩基配列と相補的な配列である。

[0025] 本発明のイネ科植物の核内の染色体を倍加させる方法の好ましい態様は、前記 CDKB2 をコードする塩基配列の少なくとも一部の配列が、配列表の配列番号 2 に記載の塩基配列である。

[0026] 本発明の別の側面によれば、イネ科植物を、本発明のイネ科植物の核内の染色体を倍加させる方法に供することによって、核内の染色体が倍加した形質転換イネ科植物を得る工程を含む、核内の染色体が倍加した形質転換イネ科植物の製造方法が提供される。

[0027] 本発明の別の側面によれば、イネ科植物細胞のカルスに請求項 10 ~ 17 のいずれか 1 項に記載のイネ科植物の核内の染色体を倍加させる方法に供することによって核内の染色体が倍加したカルスを得る工程、および前記核内の染色体が倍加したカルスを再分化させることで、核内の染色体が倍加した形質転換イネ科植物を得る工程を含む、核内の染色体が倍加した形質転換イネ科植物の製造方法が提供される。

[0028] 上記方法では、再分化工程は、カルスが有する OsCDKB2 の発現抑制を解除した状態で実施することができ、また、再分化工程では、核内の染色体を倍加したカルスを得る工程で使用する発現誘導剤を用いないことができる。

発明の効果

[0029] 本発明の薬剤は、植物に特異的に発現する CDKB2 の発現を抑制するものであり、人体で発現している酵素の発現を抑制するものではない。したがって、本発明の薬剤は、人体に対して影響の少ない薬剤である。本発明の薬剤に有効成分として含まれる核酸は、発現誘導型プロモーター等と組み合わせることによって、特定の部位において、特定の期間に発現させることができる。その結果として、本発明の薬剤によれば、イネ科植物において特定の

組織や細胞、例えば、種子近傍の組織や細胞の核内の染色体を倍化させることにより、種子を肥大化させることが可能となる。

[0030] 本発明の核内の染色体が倍加した形質転換イネ科植物の製造方法によれば、イネ科植物、特に種子が肥大化したイネ科植物を製造することができる。したがって、本発明の製造方法によれば、作付面積をそのままに、穀物の収穫量を向上させることが可能となる。

図面の簡単な説明

[0031] [図1] 図1は、細胞周期とCDKの関係を表した概略図を示す。

[図2] 図2は、pDONR221ベクター（インビトロジェン(invitrogen))のサイトマップを示す。

[図3] 図3は、pANDAベクターのサイトマップを示す。

[図4] 図4は、pANDAベクターにおけるRNAi効果を生じる配列の局在を示す。

[図5] 図5は、pER8ベクターのサイトマップを示す。ApaIとSpeIの間にpANDAのヘアピンカセットが入っている。

[図6] 図6は、Northern blotによるOsCDKB2発現低下の確認結果を示す。

[図7] 図7は、組換えpANDAベクターを用いた形質転換カルスにおける核相の変化を示す。

[図8] 図8は、組換えpANDAベクターを用いた形質転換カルスにおいて、核相が変化した系統における染色体数の観察結果を示す。

[図9] 図9は、組換えpANDAベクターを用いた形質転換カルスにおいて、核相が変化した系統における細胞増殖の確認結果を示す。

[図10] 図10は、pANDAI（誘導型RNAi）形質転換カルスにおける β -estradiolによる核相増加の誘導結果を示す。

[図11] 図11は、Agrobacteriumを介した植物への遺伝子導入の概略図を示す。

[図12] 図12は、イネ(*Oryza sativa*)及びシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)のCDK系統樹を示す。

[図13] 図13は、高次倍数化が誘導されたカルスを β -estradiolを含まない再分化培地に移植し約一ヶ月後に得られた植物体の写真を示す。

[図14] 図14は、図13に写真を示す葉の核相の測定結果である。

発明を実施するための形態

[0032] 以下、本発明について、詳細に説明する。

本発明のイネ科植物の核内の染色体を倍加させるための薬剤は、サイクリン依存性キナーゼB2 (CDKB2) をコードする塩基配列の少なくとも一部の配列、又は、前記CDKB2をコードする塩基配列と少なくとも一部が相補的な配列を含む核酸を有効成分として含む。なお、本明細書において、「配列」とは、特に説明がない限り、塩基配列をいう。また、塩基配列は、その塩基配列からなる核酸分子を含む広い概念で解釈されるべきものである。

[0033] CDKB2は、植物において、細胞増殖や細胞分裂に関与している因子であるセリン/スレオニン・タンパク質キナーゼであるサイクリン依存性キナーゼ (CDK) の一種である。CDKBは、植物に特異的に発現するCDKであり、PSTAIRE配列を持つ。CDKBの発現は厳格に細胞周期の制御下にあり、CDKB1はS期の末期からM期にかけて発現し、CDKB2はG2期からM期にかけて発現する。さらに、CDKB2の発現は細胞周期依存的な転写制御を受けるのみならず、ユビキチンプロテアソーム系によって分解されることによっても、その量が調節されることが知られている (梅田正明「器官形成による細胞分裂の制御機構」蛋白質 核酸 酵素、2002年、Vol. 47、pp. 1628-1632、この文献の全記載は、ここに特に開示として援用される。)。

[0034] CDKの酵素触媒活性はサイクリンとの結合により制御され、サイクリンはCDKのいわば調節サブユニットに相当している。CDKは細胞周期の進行の鍵となるキナーゼであり、細胞分裂はCDKとサイクリンが活性型の複合体を形成することにより進行する。サイクリン/サイクリン依存性キナーゼ系は、細胞分裂の制御系の一つであって、サイクリン/サイクリン依存性キナーゼ系による細胞分裂の制御機構の詳細については、いくつかの総説に

において解説されている（梅田正明、「サイクリン依存性キナーゼによる細胞周期の制御と分裂組織の維持機構」、「細胞工学」別冊 植物細胞工学シリーズ 13、秀潤社、pp. 37-48、この文献の全記載は、ここに特に開示として援用される。）。

- [0035] CDKB2の発現を抑制する物質は、CDKB2をコードする遺伝子（CDKB2遺伝子ともいう）及び該遺伝子によって転写されたmRNA（CDKB2-mRNAともいう）のいずれか又は両方に作用して、これらに基づく転写又は翻訳を阻害する物質をいう。さらに、上記mRNAによって翻訳されたCDKB2に作用して、CDKB2のキナーゼ活性を阻害する物質もまた、CDKB2の発現を抑制する物質に含まれる。CDKB2の発現を抑制する物質としては、例えば、CDKB2遺伝子を鋳型とする転写を阻害し得るCDKB2をコードする塩基配列と少なくとも一部が相補的な配列を含む核酸、CDKB2-mRNAに基づく翻訳を阻害し得るCDKB2をコードする塩基配列の少なくとも一部の配列を含む核酸などを挙げることができる。CDKB2をコードする塩基配列の少なくとも一部の配列とは、CDKB2をコードする塩基配列の一部又は全部をいい、例えば、CDKB2をコードする塩基配列の10～981塩基、好ましくは15～800塩基、より好ましくは20～500塩基、さらに好ましくは25～400塩基、なおさらに好ましくは30～300塩基程度の塩基をいう。

- [0036] 本発明の薬剤の作用や機構について、いかなる特定の理論にも拘泥されるわけではないが、以下のように推測され得る。

本発明者らは、イネ科植物の核内の染色体を倍化させるための研究を進めていくうちに、細胞周期のG2期からM期に移行する際に、なんらかの処置を施せば、イネ科植物における細胞分裂に変化をもたらし、次いで核内の染色体になんらかの変化をもたらすことができるのではないかと推測した。そこで、本発明者らは、さらに研究を進めた結果、まずCDKに着目した。

- [0037] イネ科植物のCDKにおいて、CDKAとCDKBは、アミノ酸配列において相同性があるが、異なるクラスターに分類される（図12を参照）。イ

ネ科植物において、CDKAは、細胞周期を通じて発現し、G1/S期の移行とG2/M期の移行の双方に働くとされる。これに対して、CDKBは、細胞周期特異的に転写、翻訳され、M期に移行した後に素早く分解される。イネ科植物において、CDKBのうち特にCDKB2がG2/M期の移行にのみ働く。これらの知見を基に、本発明者らは、イネ科植物において、G2/M期の移行阻害に関係し得るCDKB2に着目し、CDKB2の発現抑制を行った。その結果、本発明者らは、イネ科植物のCDKB2の発現を抑制することにより、イネ科植物は通常の細胞周期の過程として染色体を倍化させるが、その後の細胞分裂の速度を減少させることを見出した。その結果、本発明者らは、染色体が通常の2倍体ではなく、4倍体、6倍体、8倍体又は12倍体などに倍化したイネ科植物を得ることに成功した。本発明者らは、このメカニズムについて、イネ科植物のCDKB2の発現を抑制することによって、細胞周期における紡錘系の形成、及びその後続く細胞分裂が阻害されて、結果として染色体倍加体を得られるのではないかと推測している。

[0038] 上記推測を概略図式化したものを図1に示す。図1に示す通り、イネ科植物のCDKB2の発現を抑制することにより、G2/M期の移行が阻害され、次いで複製して2倍量(4C)となった染色体DNAが二分割されず、4Cのまま停滞する。次いで細胞は、M期をスキップして、G1、S期に進行し、さらなる染色体DNA量の倍加(6C以上の細胞の出現)が起こる。なお、CDKは、Cyclin dependent kinase (CDK)はCyclin (Cyc)と結合することによって細胞周期を正に制御する。

[0039] 以上の推測に基づき、本発明の薬剤は、イネ科植物のCDKB2の発現を抑制する核酸の作用によって、イネ科植物の核内の染色体を倍加させるために使用することができる。

[0040] 本発明の薬剤の使用対象となる生物は、イネ科植物である。イネ科植物とは、イネ科に属する植物であれば特に制限されず、成体である植物だけでなく、植物を構成する細胞、カルス、器官、組織や、種、芽、茎、葉などを含

む広い概念で解釈されるべきである。イネ科に属する植物とは、学術的に分類されたイネ科植物だけでなく、慣例的にイネ科植物とみなされている被子植物単子葉類を含み、例えば、イネ、スズタケ、コムギ、ライムギ、ヒエ、キビ、ススキ、ハトムギ、トウモロコシなどを挙げることができるが、これらに限定されるものではない。これらのイネ科植物のうち、本発明の薬剤の使用対象となるものは、イネであることが好ましい。

[0041] 本発明の薬剤に有効成分として含まれる核酸は、好ましくは、植物内、特に植物の核内や染色体内に挿入された場合に、自立的に複製し得る最小の構成単位を含むことが望ましい。したがって、本発明の薬剤に有効成分として含まれる核酸の好ましい態様として、例えば、下記 [a] ~ [e] : [a] プロモーター ; [b] サイクリン依存性キナーゼ B 2 (CDKB2) をコードする塩基配列の少なくとも一部の配列、又は、前記 CDKB2 をコードする塩基配列と少なくとも一部が相補的な配列 ; [c] スペーサー ; [d] 前記 [b] の配列の少なくとも一部に対する逆方向反復配列 ; 及び [e] ターミネーターを含む核酸を挙げることができる。

[0042] プロモーターは、イネ科植物において転写の開始に関連する配列であれば特に制限されないが、例えば、イネ科植物において RNA ポリメラーゼが結合して転写を開始する配列を有するものを挙げることができ、常時転写を開始させ得る非誘導型プロモーターでも、なんらかの作用によって誘導的に転写を開始させる誘導型プロモーターでもどちらでもよい。ただし、特定の部位や時期などで CDKB2 の発現を抑制する物質を転写させるためには、誘導型プロモーターが好ましく、簡便なことから薬剤誘導型プロモーターがより好ましく、glucocorticoid receptor 誘導型プロモーター、estrogen receptor 誘導型プロモーター、及び ecdyson receptor 誘導型プロモーターがさらに好ましい。薬剤誘導型プロモーターの好ましい例は、LexA であるが、これに限定されるものではない。プロモーターは、適宜 1 種又は 2 種以上を用いることができる。

[0043] スペーサーは、リンカーともいい、サイクリン依存性キナーゼ B 2 (CD

KB2) をコードする塩基配列の少なくとも一部の配列、又は、前記CDKB2をコードする塩基配列と少なくとも一部が相補的な配列と、この配列の逆方向反復配列との間に配置されて、一本鎖時にステムループ構造をとり得る配列である。任意の配列とスペーサーを介して連結したこの任意の配列に対して逆方向反復配列を含む一本鎖核酸は、スペーサーがループ構造を形成することにより、鎖内で二本鎖のステムループ構造を形成することができる。スペーサーは、ステムループ形成時にDNAの二次構造をとりうる配列でなければ特に制限されるものではないが、好ましくは10~2000塩基、より好ましくは50~1500塩基、さらに好ましくは100~1300塩基、なおさらに好ましくは300~1000塩基程度の配列である。スペーサーは、本発明の薬剤に有効成分として含まれる核酸を鋳型とする転写を抑制しない配列であることが望ましい。

[0044] 逆方向反復配列はInverted Repeatともいわれ、例えば、任意の塩基配列に対する逆方向反復配列とは、任意の塩基配列が第一の塩基配列(例; ATCG)である場合、第一の塩基配列を逆方向(3' → 5')から読んだ第二の塩基配列(例; GCTA)の各塩基を相補的な塩基で読み替えた第三の塩基配列(例; CGAT)をいう。例えば、任意の塩基配列、スペーサー、及び任意の塩基配列に対する逆方向反復配列を一本鎖に含むDNAが転写されると、分子内で二本鎖を形成した二本鎖RNAが取得され得る。本発明の薬剤に有効成分として含まれる核酸の逆方向反復配列は、CDKB2をコードする塩基配列の少なくとも一部の配列、又は、前記CDKB2をコードする塩基配列と少なくとも一部が相補的な配列の一部又は全部に対する逆方向反復配列であれば特に制限されるものではないが、例えば、CDKB2をコードする塩基配列の少なくとも一部の配列、又は、前記CDKB2をコードする塩基配列と少なくとも一部が相補的な配列の80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは99%以上、さらに好ましくは100%の相同性のある塩基配列に対する逆方向反復配列である。

[0045] ターミネーターは、イネ科植物において転写の終結に関する配列であれば

特に制限されないが、例えば、イネ科植物において転写を終了させる終止コドンを持つものを挙げることができ、より具体的にはアグロバクテリウムNosターミネーターなどの配列が挙げられるがこれに限定されるものではない。

[0046] CDKB2をコードする塩基配列の少なくとも一部の配列は、イネ科植物のCDKB2の発現を抑制するために、イネ科植物のCDKB2をコードする塩基配列と相同性の高い配列であることが望ましく、例えば、イネのCDKB2をコードする塩基配列である配列表の配列番号1に記載の塩基配列の62～91位の配列、165～247位の配列、289～302位の配列、318～349位の配列、468～490位の配列、652～670位の配列、及び728～803位の配列からなる群から選ばれる1種又は2種以上の配列を含むことが好ましい。また、CDKB2をコードする塩基配列の少なくとも一部の配列は、上記群から選ばれるいずれかの配列における全ての塩基配列だけではなく、一部の塩基配列が含まれていてもよい。例えば、CDKB2をコードする塩基配列の少なくとも一部の配列が上記165～247位の配列のうち165～200位の配列のみを含んでいてもよい。ただし、CDKB2をコードする塩基配列の少なくとも一部の配列は、上記した長さ、一例を挙げると、25～400塩基程度の長さの塩基配列であることが好ましい。

[0047] CDKB2をコードする塩基配列と少なくとも一部が相補的な配列についても同様であり、CDKB2の発現を抑制するために、イネ科植物のCDKB2をコードする塩基配列と相同性の高い配列と相補的な配列、例えば、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列からなることが望ましい。このような配列は、CDKB2をコードする塩基配列と70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは93%以上、なおさらに好ましくは95%以上、特に好ましくは98%以上の相補性を有する塩基配列である。

[0048] 「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」とは、DNAをプローブとして使用し、コロニーハイブリダイゼーション法、プラークハイブリ

ダイゼーション法、サザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAの塩基配列を意味し、例えば、コロニーあるいはプラーク由来のDNA又は該DNAの断片を固定化したフィルターを用いて、0.7~1.0MのNaCl存在下、65°Cでハイブリダイゼーションを行った後、0.1~2×SSC溶液（1×SSC溶液は、150mM塩化ナトリウム、15mMクエン酸ナトリウム）を用い、65°C条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNA等を挙げることができる。ハイブリダイゼーションは、Molecular Cloning: A laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY., 1989、Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1~38, John Wiley & Sons (1987-1997)（この文献の全記載は、ここに特に開示として援用される。）などに記載されている方法に準じて行うことができる。

[0049] ただし、CDKB2をコードする塩基配列と少なくとも一部が相補的な配列は、イネ科植物の他のCDKをコードする塩基配列に対して、CDKB2をコードする塩基配列として特異性の高い配列と相補的であることが望ましく、例えば、イネのCDKB2をコードする塩基配列である配列表の配列番号1に記載の塩基配列の62~91位の配列、165~247位の配列、289~302位の配列、318~349位の配列、468~490位の配列、652~670位の配列、及び728~803位の配列からなる群から選ばれる1種又は2種以上の配列に相補的な配列を含むことが好ましい。塩基の長さについては、上記した通りである。

[0050] CDKB2をコードする塩基配列の少なくとも一部の配列の好ましい態様としては、例えば、配列表の配列番号2に記載の塩基配列を挙げることができるが、これに限定されるものではない。さらに、CDKB2をコードする塩基配列と少なくとも一部が相補的な配列の好ましい態様としては、例えば、配列表の配列番号2に記載の塩基配列と相補的な塩基配列を挙げることが、これに限定されるものではない。シロイヌナズナではCDKB1及びCDKB2はそれぞれ2コピー存在するのに対し、イネ科では各1コピーしか存

在しない（図 1 2）。したがって、配列表の配列番号 2 に記載の塩基配列は、イネ科植物の CDKB 2 中の約 300 塩基と完全に一致することから、非常に強力に CDKB 2 の発現を抑制することが期待できる。

[0051] イネ科植物の核内の染色体を倍加させるためには、本発明の薬剤とイネ科植物とを直接的又は間接的に接触させて、最終的に本発明の薬剤に有効成分として含まれる核酸がイネ科植物の核内に導入されることを要する。この核酸は、イネ科植物の核内に導入されると、自立的に又はイネ科植物の核内のゲノム（染色体）に組み込まれる。このようにして形質転換イネ科植物が得られる。この形質転換イネ科植物において、本発明の薬剤に有効成分として含まれる核酸を鋳型として転写されて得られる RNA 転写産物は、イネ科植物における CDKB 2 をコードする塩基配列又は CDKB 2-mRNA に作用して CDKB 2 の発現を抑制し、結果としてイネ科植物の核内の染色体を倍加させることができる。

[0052] 本発明のイネ科植物の核内の染色体を倍加させる方法は、イネ科植物の核内に、本発明の薬剤を導入して、形質転換イネ科植物を得る工程；及び前記形質転換イネ科植物を、前記導入された薬剤に含まれる核酸を鋳型として、前記植物内で RNA 転写産物が生成し得る条件下に置く工程を含むことを特徴とする。

[0053] 本発明の薬剤をイネ科植物に直接的に接触させて、本発明の薬剤に有効成分として含まれる核酸をイネ科植物の核内に導入するためには、本発明の薬剤をイネ科植物の核内に直接導入することが望ましい。この直接導入の方法としては、これまでに知られている任意の物質を植物の核内に導入する方法を制限なく用いることができる、例えば、パーティクルガン法が利用され得る。パーティクルガン法は、遺伝子銃ともよばれ、金やタングステンなどの金属の微粒子に核酸（DNA）をコーティングしたものを弾丸として、高速で射出して細胞内に DNA を導入する方法である。パーティクルガン法を用いた本発明の薬剤をイネ科植物に導入させる具体的な手順としては、本発明の薬剤を金などの微粒子にまぶし、次いで該微粒子をガスなどの圧力でイネ

科植物の葉や茎などの組織や細胞に打ち込む。その結果、本発明の薬剤がイネ科植物の細胞や核内に導入される。

[0054] 本発明の薬剤をイネ科植物に間接的に接触させて、本発明の薬剤に有効成分として含まれる核酸をイネ科植物の核内に導入する方法としては、例えば、アグロバクテリウム属細菌 (Agrobacterium) を利用した方法がある。アグロバクテリウム属細菌は、土壌中にある細菌で、この細菌の中にはプラスミドがあり、その一部に T-DNA と呼ばれる遺伝子領域がある。アグロバクテリウム属細菌は、接触した植物の細胞に、自己の T-DNA を相手の植物に送り込む性質を有している。T-DNA を組み込まれた植物は、腫瘍であるこぶ状の塊 (クラウンゴールともいう) や無数の根などを生じ、アグロバクテリウム属細菌の生存に必要な栄養素 (アミノ酸など) を作る。このようにアグロバクテリウム属細菌の T-DNA は、遺伝情報に従い、接触した相手の植物にアミノ酸と植物ホルモンを合成させる働きがある。そこで、アグロバクテリウム属細菌が持つプラスミドの T-DNA を除去し、そこに発現させたい目的の遺伝子を組み込めば、目的の遺伝子をアグロバクテリウム属細菌を介して植物に導入することができる。

[0055] アグロバクテリウム属細菌による遺伝子導入を模式化した図 11 を用いてさらに詳細に説明する。アグロバクテリウム属細菌における T_i プラスミド上の左側の境界配列 (Left border ; LB) と右側の境界配列 (Right border ; RB) との間に、所望の遺伝子 (好ましくは導入の成否を確認するために選択マーカーを含む) をクローニングする。クローニングした組換え T_i プラスミドを、エレクトロポレーション法などの公知の細菌細胞への遺伝子導入法により、アグロバクテリウム属細菌に導入する。次いでアグロバクテリウム属細菌を植物に感染させると、アグロバクテリウム属細菌内において、LB と RB に囲まれた配列 (T-DNA) が切り出され、該 T-DNA が植物細胞の核内に運ばれる。次いで T-DNA は核内のゲノム中にランダムに挿入される。

[0056] アグロバクテリウム属細菌を利用して本発明の薬剤に有効成分として含ま

れる核酸をイネ科植物の核内に導入するためには、該核酸の両端が左側境界配列及び右側境界配列を有しているT-DNAであることが好ましい。そこで、本発明の薬剤の好ましい態様として、[f] 右側境界配列 (Right Border) ; [a] プロモーター ; [b] サイクリン依存性キナーゼB2 (CDKB2) をコードする塩基配列の少なくとも一部の配列、又は、前記CDKB2をコードする塩基配列と少なくとも一部が相補的な配列 ; [c] スペーサー ; [d] 前記 [b] の配列の少なくとも一部に対する逆方向反復配列 ; [e] ターミネーター ; 及び [g] 左側境界配列 (Left Border) からなる、T-DNAとして機能し得る核酸を有効成分として含む薬剤がある。ここで、上記T-DNAにおいて、[f] 右側境界配列 (Right Border) と [g] 左側境界配列 (Left Border) は、互いに入れ替わってもよい。

[0057] アグロバクテリウム属細菌を利用した、本発明のイネ科植物の核内の染色体を倍加させる方法の好ましい態様としては、例えば、上記T-DNAを含有するベクターを得て、次いでアグロバクテリウム属細菌に、前記ベクターを導入して、形質転換アグロバクテリウム属細菌を得て、次いでイネ科植物に、前記形質転換アグロバクテリウム属細菌を接触させて、前記核酸が導入された形質転換イネ科植物を得て、次いで前記形質転換イネ科植物において、前記核酸を鋳型としてRNA転写産物を得ることを含む方法を挙げることができる。

[0058] 具体的には、本発明のイネ科植物の核内の染色体を倍加させる方法は、[f] 右側境界配列 (Right Border) ; [a] プロモーター ; [b] サイクリン依存性キナーゼB2 (CDKB2) をコードする塩基配列の少なくとも一部の配列、又は、前記CDKB2をコードする塩基配列と少なくとも一部が相補的な配列 ; [c] スペーサー ; [d] 前記 [b] の配列の少なくとも一部に対する逆方向反復配列 ; [e] ターミネーター ; 及び [g] 左側境界配列 (Left Border) を含む核酸を含有するベクターを得る工程 ; アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 属細菌に、前記ベクターを導入して、形質転換アグロバクテリウム属細菌を得る工程 ; イネ科植物に、前記形質転換アグロバクテ

リウム属細菌を接触させて、前記核酸が導入された形質転換イネ科植物を得る工程；及び前記形質転換イネ科植物を、前記導入された薬剤に含まれる核酸を鋳型として、前記植物内でRNA転写産物が生成し得る条件下に置く工程を含む。

- [0059] 本発明のイネ科植物の核内の染色体を倍加させる方法に供され得るアグロバクテリウム属細菌としては、自身が有するT-DNAを植物に導入させ得るアグロバクテリウム属細菌であれば特に制限されないが、例えば、Agrobacterium tumefaciens、Agrobacterium rhizogenesisなどが好ましく、Agrobacterium tumefaciensがより好ましい。
- [0060] 本発明のイネ科植物の核内の染色体を倍加させる方法に供され得るベクターとしては、アグロバクテリウム属細菌内において自己複製が可能であり、かつT-DNAを保持し得るものであれば特に制限されないが、例えば、Tiプラスミド、pANDAベクター、pPZP系ベクター、pBI系ベクターなどが好ましく、各種機能配列が組み込まれたpANDAベクターがより好ましい。
- [0061] 上記ベクターは選択マーカ含有することが好ましい。選択マーカとしては、例えば、薬剤耐性マーカ、栄養要求マーカを使用することができる。選択マーカの具体例としては、アンピシリン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子などがあり、これらを単独又は組み合わせて用いてもよい。
- [0062] 本発明のイネ科植物の核内の染色体を倍加させる方法に供され得るベクターの構築にはGateway法を使用することができるが、これに限定されるものではない。以下に、Gateway法を利用した上記ベクターを構築する具体例について説明する。
- [0063] まず、イネのCDKB2 (cdc20s3)のオープンリーディングフレーム (ORF；配列表の配列番号1)の増幅を行なう。このORFがクローニングされているプラスミドを鋳型として、該ORFを増幅し得るフォワード及びリバー

スのプライマーを用いてPCRを行なう。該PCRは、通常知られるPCRの条件を適宜調整して実施することができるが、例えば、反応系が50 μ lであれば、 $\times 5$ PrimeStar buffer 10 μ l、2.5mM dNTP 4 μ l、10 μ M forward primer 1 μ l、10 μ M reverse primer 1 μ l、PrimeStar DNA polymerase 0.5 μ l、dH₂O 32.5 μ l、Plasmid DNA 1 μ lの組成で、PCR programを94 $^{\circ}$ C 1min \rightarrow (98 $^{\circ}$ C 10 sec \rightarrow 55 $^{\circ}$ C 5 sec \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 1min)を30 cycle \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 7min \rightarrow 4 $^{\circ}$ Cとして実施することができる。ここで、例えば、配列表の配列番号5及び6に記載の配列からなるプライマーを用いると、上記ORF内の302塩基が増幅される。次いでこのPCR産物に組み込むべきベクターに適したアダプターを結合させる。これは一回目のPCRで得られたPCR産物を鋳型として、アダプター配列を5'末端に連結させたプライマーセットを用いてPCRを行なうことにより達成される。該PCRは、通常知られるPCRの条件を適宜調整して実施することができるが、例えば、反応系が50 μ lであれば、 $\times 5$ PrimeStar buffer 10 μ l、2.5mM dNTP 4 μ l、10 μ M attB1-adaptor primer 1 μ l、10 μ M attB2-adaptor primer 1 μ l、PrimeStar DNA polymerase 0.5 μ l、dH₂O 32.5 μ l、1st PCR product 1 μ lの組成で、PCR programを94 $^{\circ}$ C 1min \rightarrow (98 $^{\circ}$ C 10 sec \rightarrow 55 $^{\circ}$ C 5 sec \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 1min)を30 cycle \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 7min \rightarrow 4 $^{\circ}$ Cとして実施することができる。このようなプライマーセットとして、attB1及びattB2配列が5'末端に連結した配列表の配列番号7及び8に記載の配列からなるプライマーセットが挙げられる。

[0064] BP反応及びLR反応は、 λ ファージで見出された部位特異的組み換え反応である。特定の配列間で組換えが生じることを利用すると、制限酵素サイトを利用せずにクローニングが行える。BP clonase及びLR clonaseは、例えば、Invitrogen社から提供されている。これらの酵素を用いたBP反応及びLR反応については、同社のホームページ (<http://www.invitrogen.co.jp/gateway/summary.shtml>) 上で、その仕組みの概要が紹介されている。

[0065] BP反応及びLR反応の概略について以下に述べる。上記2回のPCRによって、例えば、両末端にattB1及びattB2配列が付加されたCDKB2遺伝子断

片増幅産物が得られる。このPCR産物とattP1配列とattP2配列を持つドナーベクターを混合してBP clonaseを加えると、attB1-attP1間及びattB2-attP2間が組換わり、PCR産物がベクター中に取り込まれたエンタリークローンが完成する。エンタリークローンでは、attBの一部とattRの一部が連結され、attL配列（より詳細にはattL1とattL2）が作られる。このattL配列はLR clonaseによりattR配列と組み換えられる。次いでattL1-CDKB2遺伝子断片-attL2を有するエンタリークローンと、attR1-ccdB-attR2-linker-attR2-ccdB-attR1を持つデスティネーションベクター（図3のpANDA vectorのattRの拡大部分を参照）を混合することにより、エンタリークローン上のPCR産物をデスティネーションベクターに組み換えることが可能である。詳しくは、2個のエンタリーベクターの2個のattL1-CDKB2遺伝子断片-attL2と、1個のデスティネーションベクターのattR1-ccdB-attR2とattR2-ccdB-attR1とが組み換わり、最終的にはCDKB2遺伝子断片とlinkerを介して連結されたCDKB2遺伝子断片の逆方向反復配列（これらを、RNAi領域ともいう）が入ったベクターが作製される（図4を参照）。なお、この図4のpANDAベクターは、RNAi領域の両末端にRB領域とLB領域があり、このRBとLBに挟まれた領域をT-DNA領域として使用できる。

[0066] 以上の方法により作製された組換えpANDAベクターは、恒常的に二本鎖のCDKB2-RNAを発現してRNAi効果によりCDKB2の発現を抑制し得る、恒常的CDKB2発現抑制型ベクターのpANDAベクターである。

[0067] また、作製した恒常的CDKB2発現抑制型ベクターのRNAiを及ぼす領域を切り出して、他のベクターの発現誘導型プロモーターの下流に挿入することにより、誘導的CDKB2発現抑制型ベクターを作製し得る。例えば、組換えpANDAベクターをApaI (pANDA vector siteA)及びSpeI (pANDA vector siteB)の制限酵素で処理し、RNAi領域を切り出す（図4）。次いでこの切り出したRNAi領域をApaI及びSpeIで予め処理したpER8ベクター（図5）に挿入する。このようにして作製されたベクター（pANDA1ベクター）は、誘導的CDKB2発現抑制型ベクターである。

- [0068] 上記したプライマーの作製、PCR、PCR産物の回収や精製、制限酵素処理などは通常知られる方法を制限なく用いることができ、例えば、上記したMolecular Cloning: A laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY., 1989、Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1~38, John Wiley & Sons (1987-1997) (この文献の全記載は、ここに特に開示として援用される。)などに記載されている方法に準じて行うことができる。
- [0069] 上記の方法によって作製をしたベクターをアグロバクテリウム属細菌に導入することにより、形質転換アグロバクテリウム属細菌が得られる。ベクターを導入してアグロバクテリウム属細菌を形質転換する方法は、これまでに知られている細菌にベクターを導入して細菌を形質転換する方法を制限なく用いることができ、例えば、プロトプラスト法、エレクトロポレーション法、カルシウムイオンを用いる方法などを挙げることができるが、好ましくはエレクトロポレーション法である。例えば、上記の組換えpANDAベクター及びpANDA1ベクターを、エレクトロポレーション法によりAgrobacterium (EHA105)に形質転換することができる。
- [0070] イネ科植物に、上記形質転換アグロバクテリウム属細菌を接触させることにより、二本鎖のCDKB2-RNAを転写し得る核酸が導入された形質転換イネ科植物を得ることができる。この形質転換イネ科植物を得る方法は、通常知られているアグロバクテリウム属細菌を植物に接触させる方法を制限なく用いることができ、例えば、Toki S (Plant Mol. Biol. Rep. 1997)やToki S (Plant J. 2006) (この文献の全記載は、ここに特に開示として援用される。)などの文献に記載の方法に従って実施することができるが、これらに限定されるものではない。以下に、上記文献に記載の方法の詳細について説明する。
- [0071] 脱粒した完熟種子を70%エタノール、2.5%次亜塩素酸ナトリウム、滅菌水により洗浄する。滅菌した種子をN6D培地に置床し、カルスを誘導する。形質転換に用いるアグロバクテリウム (例えば、組換えpANDAベクター又はpANDA1

ベクターを有する *Agrobacterium* EHA105株) をAB培地に塗布し、暗所、28°Cで3日間培養する。誘導後1週間から3週目のカルスにアグロバクテリウムを感染させる。暗所、25°Cで3日間共存培養した後、滅菌水でカルスを洗浄し、アグロバクテリウムの除菌を行う。除菌したカルスを選抜培地に置床し、形質転換細胞の選抜を行う。イネ種子からのカルスの誘導は、通常知られる薬剤や方法で実施することができるが、例えば、植物ホルモン等を含む固形培地上に滅菌した種子を置床して胚盤が脱分化し、細胞増殖したものをカルスとすることができる。

- [0072] 選抜培地は、ベクターに挿入した選択マーカ―遺伝子に対応した選択マーカ―を含む培地であれば特に制限されず、例えば、上記選択マーカ―遺伝子がハイグロマイシン耐性遺伝子であれば、ハイグロマイシン入りN6D固形培地を使用することができる。選抜マーカ―遺伝子と培地に入れる薬剤の組み合わせのその他の具体例としては、HPT (hygromycin phosphotransferase) とハイグロマイシン、NPTII (neomycin phosphotransferase II) とG418、Bar (phosphinotrycin acetyltransferase) とピアラホスなどが挙げられる。
- [0073] 形質転換細胞として選抜されたハイグロマイシン耐性カルスは、再分化培地に移植され、植物体への再生が行われ得る。
- [0074] 形質転換イネ科植物において、挿入した核酸を鋳型として二本鎖のCDKB2-RNAを転写させることにより、イネ科植物の核内の染色体を倍加させることができる。この転写は、挿入された核酸が恒常的CDKB2発現抑制型ベクター（例えば、pANDAベクター）に由来するものであれば、イネ科植物を生育に適した条件に置くことにより行なうことができる。挿入された核酸が誘導的CDKB2発現抑制型ベクター（例えば、pANDA1ベクター）に由来する場合は、イネ科植物の生育に適した条件に置き、かつこのベクターの転写を促す物質を加えることにより行なうことができる。
- [0075] 形質転換イネ科植物におけるCDKB2発現抑制は、例えば、形質転換イネ科植物におけるCDKB2-mRNAの量、CDKB2の量、染色体量、サイズ（マス）などを、形質転換していない野生型のイネ科植物と対比する

ことにより確認することができる。

[0076] 形質転換イネ科植物のCDKB2-mRNAの量は以下のNorthern blotによる方法によって確認することができる。形質転換イネカルスからRNeasy Plant Mini kit (QIAGEN)を用いてTotal RNAを回収する。回収したRNAのうち10 μ gを電気泳動し、次いで電気泳動後の各RNAバンドをNylon membrane positively charged (Roche)メンブレンへ吸着させた後に、PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche)を用いて作成したCDKB2-mRNAに相補的なプローブ（例えば、配列表の配列番号9）を該メンブレン上のRNAとハイブリダイズする。ハイブリダイゼーションは、まずプレハイブリダイゼーションを50°C、8時間を実施し、次いでハイブリダイゼーションを50°C、20時間を実施する。ハイブリバッファの組成は、5x SSC、50%ホルムアミド、0.1% N-ラウリルイルサルコシン、7% SDS、2% blocking buffer、50mM リン酸ナトリウム (pH7.0)である。ハイブリダイゼーションの確認方法は、2x SSC及び0.1x SSCでメンブレンを洗浄した後に、DIG抗体を加え、メンブレン上の上記DIG labeled probeとDIG抗体を結合させる。マレイン酸でメンブレンを洗浄し、余剰DIG抗体を除いた後、発光試薬CDP star (Roche)により化学発光させ、molecular imagerにより発光を検出する。

[0077] 形質転換イネ科植物の染色体量は以下の方法により確認することができる。CyStain UV precise P (PARTEC)を用いて、形質転換イネカルスから核を溶出し、DAPIにより核の染色を行う。5mm²四方のカルスにExtraction bufferをスポイトで1滴垂らし、該カルスをカミソリで刻む。Nuclei extraction buffer 400 μ lを追加し、核をbuffer中に遊離させる。遊離核を含むNuclei extraction bufferをメッシュで濾し、残渣を除く。Test tubeにろ液を入れ、Staining buffer 1.6mlを加えて1分間程度インキュベートした後に、Partec CyFlow Ploidy Analyzer (PARTEC) にサンプルをセットし、核内の染色体量を測定する。

[0078] また、染色体の観察は以下の方法により実施することができる。一昼夜以上、3:1のメタノール酢酸混合液で固定したイネカルスを水で洗浄した後、染

染色体標本作製用酵素混合液（0.4% セルラーゼ“オノズカ”RS、0.15%マセロチームR-200、0.07%ペクトリアーゼ Y-23、0.1mM EDTA、pH 4.2）で50から60分間程度反応させる。このカルスを水洗し、スライドガラス上に移動した後、3:1のメタノール酢酸混合液を用いスライドガラス上に細胞を展開する。これを風乾させ、1.5 μ g/mlのDAPI（4',6-diamidino-2-phenylindole）を含むVECTASHIELD Mounting Medium with DAPI（Vector Laboratories, CA）溶液で染色する。DAPIにより染色された染色体を#01もしくはCascade blueフィルターセットを搭載した蛍光顕微鏡（Axioplan2, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany）と冷却CCDカメラ（Pentamax, Princeton Instruments, NJ）を用いて観察する。

[0079] イネ科植物を、本発明のイネ科植物の核内の染色体を倍加させる方法に供することによって、核内の染色体が倍加した形質転換イネ科植物を得る工程を含む、核内の染色体が倍加した形質転換イネ科植物を製造する方法もまた、本発明の範囲内である。形質転換イネ科植物の確認方法は、上記と同様の方法を用いることができる。

[0080] より具体的には、イネ科植物細胞のカルスを本発明のイネ科植物の核内の染色体を倍加させる方法に供することによって核内の染色体が倍加したカルスを得る工程、および前記核内の染色体が倍加したカルスを再分化させることで、核内の染色体が倍加した形質転換イネ科植物を得る工程を含む方法で、核内の染色体が倍加した形質転換イネ科植物を製造する。この方法では、再分化工程において、核内の染色体を倍加したカルスを得る工程で使用する発現誘導剤を用いないことが、再分化を容易にするという観点から適当である。

[0081] 核内の染色体が倍加した形質転換イネ科植物を製造する方法は、具体的には、核内の染色体が倍加した形質転換イネ科植物をイネ科植物の生育に適した条件に置くことで実施できる。その際、核内の染色体が倍加した形質転換イネ科植物を製造するために用いた、ベクターの転写を促す物質（発現誘導剤）を用いないことが、イネ科植物の生育に適した条件としては適当である。

。核内の染色体が倍加した形質転換イネ科植物を製造するためには、形質転換により導入された核酸を発現させてRNA転写産物を生成させる。その際、本発明では、ベクターの転写を促す物質（発現誘導剤）を用いることが適当である。このようにして得られた、核内の染色体が倍加した形質転換イネ科植物は、例えば、カルスである場合には、次いで、植物体に再分化する。植物体に再分化するには、根端、茎頂分裂組織で規則的な細胞分裂が生じることが必要であるが、体細胞分裂に働くOsCDKB2を恒常的に発現抑制は生長阻害を及ぼすと考えられる。そこで、カルスの段階ではRNA転写産物を生成させることでOsCDKB2の発現抑制を行ない、倍加させた後、再分化の段階では、発現誘導剤を使用せず、RNA転写産物の生成を抑制して、OsCDKB2の発現抑制を解除することが、植物体に再分化するには適当である。これにより、4C, 8Cの体細胞分裂を繰り返す事が可能となり、倍数化した植物体を得られる。

[0082] 以下、本発明を実施例によりさらに説明するが、本発明はこれらの実施例のみによって限定されるものではない。

実施例

[0083] 実施例 1

1. 材料

イネ（日本晴）及びアグロバクテリウム属細菌（EHA105）を用いた。

[0084] 2. 方法

（1）OsCDKB2 RNAiベクターの構築

イネCDKB2（cdc20s3）ORFがクローニングされているプラスミドをテンプレートに配列表の配列番号5及び6に記載の配列からなるprimerを用いて1st PCRを行った。増幅領域は、配列表の配列番号1に記載の塩基配列の203～504位である。PCRでは、OsCDKB2 Coding region内の302bpを増幅した。

[0085] PCR産物をテンプレートに配列表の配列番号7及び8に記載の配列からなるprimerを用いて2nd PCRを行った。

[0086] 1stPCR条件：

反応系 (50 μ l) 組成 x5 PrimeStar buffer 10 μ l, 2.5mM dNTP 4 μ l, 10 μ M forward primer 1 μ l, 10 μ M reverse primer 1 μ l, PrimeStar DNA polymerase 0.5 μ l, dH₂O 32.5 μ l, Plasmid DNA 1 μ l

PCR program 94°C 1min \rightarrow (98°C 10 sec \rightarrow 55°C 5 sec \rightarrow 72°C 1min) x 30 cycle \rightarrow 72°C 7min \rightarrow 4°C

[0087] 2ndPCR条件 :

反応系 (50 μ l) 組成 x5 PrimeStar buffer 10 μ l, 2.5mM dNTP 4 μ l, 10 μ M attB1-adaptor primer 1 μ l, 10 μ M attB2-adaptor primer 1 μ l, PrimeStar DNA polymerase 0.5 μ l, dH₂O 32.5 μ l, 1st PCR product 1 μ l

PCR program 94°C 1min \rightarrow (98°C 10 sec \rightarrow 55°C 5 sec \rightarrow 72°C 1min) x 30 cycle \rightarrow 72°C 7min \rightarrow 4°C

[0088] attB配列が付加された2nd PCRフラグメントを精製し、BP反応によりエントリーベクター (pDONR221 ; 図2) に挿入した。図2に示すベクターサイトマップの詳細情報を以下に示す。

Comments for:	pDONR TM 221 4762 nucleotides	pDONR TM 22zeo 4291 nucleotides
rrnB T2 transcription termination sequence (c):	268-296	268-296
rrnB T1 transcription termination sequence (c):	427-470	427-470
M13 Forward (-20) priming site:	537-552	537-552
attP1:	570-601	570-601
ccdB gene (c):	1197-1502	1197-1502
Chloramphenicol resistance gene (c):	1847-2506	1847-2506
attP2 (c):	2754-2985	2754-2985
T7 Promoter/priming site (c):	3000-3019	3000-3022
M13 Reverse priming site:	3027-3043	3027-3043
Kanamycin resistance gene:	3156-3985	---
EM7 promoter (c):	---	3486-3562
Zeocin resistance gene (c):	---	3111-3485
pUC origin:	4086-4759	3816-4288

LR反応によりエントリーベクター上のCDKB2遺伝子断片と、pANDA元ベクター (図3) 上のCm^R-ccdB配列を入れ替えて、恒常的OsCDKB2発現抑制型ベクターである組換えpANDAベクターを作製した。図3に示すベクターサイトマップの詳細情報を以下に示す。

LB: left border
 RB: right border
 NPT II: Kanamycin resistance gene
 HPT: Hygromycin resistance gene
 Ubg pro.: Maize ubiquitin1 promoter + 1st intron & splicing acceptor site
 attR: LR clonase recombination cassette (Invitrogen, Cat. No. 11828-019, rFA)
 attR1 & attR2: LR clonase recombination sites
 Cm^r: Chloramphenicol resistance gene
 ccdB: ccdB gene
 NOST: NOS terminator
 Vector size: about 20 Kbp
 Back bone: pBI101
 Host *E. coli* strain: DS 3.1
 Kpn I and Sac I are unique restriction enzyme sites, others are not unique.

Site A

RB---BamHI, SmaI, Kpn I, Apa I, Xho I---LB

Site B

RB---Cla I, Hind III, EcoRV---LB

Site C

RB---EcoRI, Pst I, SmaI, BamHI, Xho I, Not I, EcoRV, Pst I, EcoRI---LB

Site D

RB---EcoRI, Spe I, BamHI, Sac I---LB

[0089] 作製した組換えpANDAベクターをApaI (pANDA vector siteA)及びSpeI (pANDA vector siteB)で制限酵素処理し、RNAi領域を切り出した(図4)。次いでApaI及びSpeIで処理をしたpER8ベクター(図5)に挿入した。これにより、誘導的OsCDKB2発現抑制型ベクターであるpANDA1ベクターを作製した。

[0090] (2) OsCDKB2RNAi ベクター (pANDA, pANDA1)形質転換イネの作出

上記(1)で作製した組換えpANDAベクター及びpANDA1ベクターを、エレクトロポレーション法によりAgrobacterium (EHA105)に形質転換した。

[0091] イネへの形質転換は、Toki S (Plant Mol. Biol. Rep. 1997)、Toki S (Plant J. 2006)の方法に従って実施した。概略を説明すると、脱粒した完熟イネ(日本晴)種子を70%エタノール、2.5%次亜塩素酸ナトリウム、滅菌水により洗浄した。滅菌した種子をN6D培地に置床し、カルスを誘導した。形質転換に用いるアグロバクテリウムをAB培地(NH₄Cl 1000 mg; MgSO₄ · 7H₂O 296 mg; CaCl₂ · 2H₂O 10 mg; NaH₂PO₄ · 2H₂O 1300 mg; K₂HPO₄ 3000 mg; KCl 150 mg; FeSO₄ · 7H₂O 2.5 mg; Glucose 5 g; Bacto Agar 15 g; 水 1L、pH=7.2)に塗布し、暗所、28°Cで3日間培養した。誘導後3週目のカルスに組換えpA

NDAベクター又はpANDA1 ベクターを有するAgrobacteriumを感染させた。イネカルスとAgrobacteriumを暗所、25°Cで3日間共存培養し、次いで滅菌水でカルスを洗浄してAgrobacteriumを除菌した後に、イネカルスを選抜培地(ハイグロマイシン入りN6D固形培地)に置床し、形質転換カルスの選抜を行った。ハイグロマイシン耐性カルスを再分化培地に移植し、植物体への再生を行った。なお、胚盤が脱分化し、細胞増殖したものをカルスとした。

[0092] (3) Northern blotによるOsCDKB2発現抑制の確認

組換えpANDAベクター(恒常的OsCDKB2発現抑制型ベクター)形質転換カルスからRNeasy Plant Mini kit (QIAGEN)を用いてTotal RNAを調製した。RNA10 μ gを電気泳動し、Nylon membrane positively charged (Roche)メンブレンへRNAを転写した後に、PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche)を用いて作成したprobe(配列表の配列番号9)を用いてNorthern blotを行った。

[0093] Northern hybridization 条件:

プレハイブリダイゼーション50°C 8時間, ハイブリダイゼーション 50°C 20時間;

ハイブリバッファー組成:

5x SSC, 50% ホルムアミド、0.1% N-ラウリルイルサルコシン、7% SDS、2% blocking buffer、50mM リン酸ナトリウム(pH7.0);

ハイブリダイゼーションの確認方法:

2x SSC, 0.1x SSCでメンブレンを洗浄後、DIG抗体を加え、メンブレン上のDIG labeled probeとDIG抗体を結合させた。マレイン酸でメンブレンを洗浄し、余剰DIG抗体を除いた後、発光試薬GDP star (Roche)により化学発光させ、molecular imagerにより発光を検出した。

[0094] (4) 核相測定

CyStain UV precise P (PARTEC)を用いて、イネカルスから核を溶出し、核の染色を行った。5mm²四方のカルスにExtraction buffer をスポイトで1滴垂らし、カミソリで刻んだ。Nuclei extraction buffer 400 μ lを追加し、核をbuffer中に遊離させた。遊離核を含むNuclei extraction bufferをメッシュ

で濾し、残渣を除いた。Test tubeにろ液を入れ、Staining buffer 1.6mlを加えて1分間程度インキュベートした後に、Partec CyFlow Ploidy Analyzer (PARTEC) にサンプルをセットし、核相を測定した。

[0095] (5) 染色体観察

固定された直径5mm前後のカルスを水洗した後、37°Cの染色体標本作製用酵素混合液で50から60分程度反応させた。このカルスをシャーレ内で水洗し、エタノールで洗浄し風乾したスライドガラス上に移動させる。濾紙片を用いカルスの水分を除去した後、新たに作製した3:1のメタノール酢酸混合液とピンセットを用いスライドガラス上に細胞を展開した。これを風乾させた後、VECTASHIELD Mounting Medium with DAPIで染色し、蛍光顕微鏡と冷却CCDカメラを用いて染色体を観察した。

[0096] 3. 結果

Northern blotの結果、組換えpANDAベクター(0sCDKB2恒常的発現抑制型RNAi)を導入したカルスでは、0sCDKB2の転写量が低下していることが確認された(図6)。核相を測定した結果、pANDAベクター形質転換カルスでは、野生型と比較してDNA量が顕著に倍加している系統(pANDA-5, 10, 17)が存在していた(図7)。pANDA-5, 10, 17のカルスの染色体を観察したところ、いずれの系統においても染色体数が増加している細胞が観察された(図8)。DNA量および染色体数が増加している系統のカルスでも細胞増殖に異常は見られなかった(図9)。

[0097] pANDA1ベクター(0sCDKB2誘導的発現抑制型RNAi)を導入したカルスにおいては、 β -estradiolを含む培地に置床することにより核相の増加が誘導され、 β -estradiolを含まない培地に戻す事により、DNA量の増加誘導が停止する系統(pANDA1-21)が得られた(図10)。尚、図10においては、核相測定のタイミングとして図示するように、以下の1~4のタイミングで核相を測定した。

1 : β -estradiol 含有培地で6日間培養した後、 β -estradiolを含有しない培地で10日間培養した後に核相を測定

2 : β -estradiol 含有培地で6日間培養した後、さらに β -estradiol 含有培地で10日間培養した後に核相を測定

3 : 2の後に、11日間培養した後に核相を測定した

4 : 2の後、 β -estradiolを含有しない培地で11日間培養した後に核相を測定

図10に示すように、 β -estradiol を培地に入れ続けることで核相増加は継続的に生じ(2→3)、 β -estradiolを培地中から除去することで核相増加は停止した(2→4)。この結果から、培地への β -estradiolの含有の有無で誘導的RNAi (pANDA I) の誘導をONとOFFできることが分かる。

[0098] 実施例2

以下の操作により、4倍体“植物”を獲得した。

1) 野生型イネ(2倍体)からカルスを誘導し、OsCDKB2誘導型RNAiを形質転換する。

2) ハイグロマイシン耐性細胞を選抜することにより、RNAiコンストラクトが形質転換された細胞を選抜する。

上記1)および2)は、実施例1と同様に行った。

[0099] 3) 上記2)で選抜されたRNAiコンストラクト形質転換細胞を、 β -estradiolを含むN6D固形培地であるカルス化培地に移植し、OsCDKB2RNAiの発現を誘導する。移植後、6日目に核相を測定したところ、2C 65%, 4C 32%, 8C 3%の系統(pANDA I 3rd-1)が確認された。野生型カルスでは2C82%, 4C 18%であったので、pANDA I 3rd-1はRNAi発現が誘導され、高次倍数化が誘導されていると考えた。その後、pANDA I 3rd-1を3ヶ月間、 β -estradiolを含むカルス化培地上で継続培養した。

[0100] 4) 再分化時にRNAiを発現させ続けると根端分裂組織、茎頂分裂組織における細胞分裂が阻害され、生育阻害が生じると考え、 β -estradiolを含まない再分化培地に移植した。約一ヶ月に、得られた植物体の葉(図13に写真を示す)の核相を測定したところ、4C細胞を含む個体=倍数体が存在していた(図14)。

[0101] 考察

カルスの増殖とは異なり、形態形成を伴う再分化時はOsCDKB2の正常な発現が必要である。従来、恒常的RNAi (pANDA)において倍数体が得られなかった原因の一つが、再分化時にもOsCDKB2の発現が抑制されていたからであると本発明者らは推察した。上記実験では、誘導的RNAiが機能し、 β -estradiolによる発現誘導のON/OFFが可能となったことで倍数体が獲得できたと考えている。

[0102] 上記発現のON/OFFについては、具体的には以下のように考えられる。植物体に再分化するには、根端、茎頂分裂組織で規則的な細胞分裂が生じることが必要であるため、体細胞分裂に働くOsCDKB2を恒常的の発現抑制は生長阻害を及ぼすと考えられる。そこで、カルスの段階でOsCDKB2の発現抑制を行ない、倍加させた後、再分化の段階ではOsCDKB2の発現抑制を解除した。その結果、4C, 8Cの体細胞分裂を繰り返す事が可能となり、倍数化した植物体が得られた考察される。

産業上の利用可能性

[0103] 植物は果実の肥大時等、急速な組織の成長を必要とする際、細胞当たりのDNA含量を増大させることが知られている。しかしながら、その過程を制御するメカニズムについては明らかではない。本発明の薬剤を利用すれば、イネにおける胚乳発達を制御し、収量性を高めることや、イネの特定の器官の発達を制御し、バイオマス特性を向上させることが可能になる。したがって、本発明の薬剤は、イネ産業において非常に利用可能性の高い薬剤である。

請求の範囲

- [請求項1] サイクリン依存性キナーゼB2 (CDKB2) をコードする塩基配列の少なくとも一部の配列、又は、前記CDKB2をコードする塩基配列と少なくとも一部が相補的な配列を含む核酸を有効成分として含む、イネ科植物の核内の染色体を倍加させるための薬剤。
- [請求項2] 前記核酸が、下記 [a] ~ [e] :
- [a] プロモーター ;
 - [b] サイクリン依存性キナーゼB2 (CDKB2) をコードする塩基配列の少なくとも一部の配列、又は、前記CDKB2をコードする塩基配列と少なくとも一部が相補的な配列 ;
 - [c] スペーサー ;
 - [d] 前記 [b] の配列の少なくとも一部に対する逆方向反復配列 ;
- 及び
- [e] ターミネーター
- を含む、請求項1に記載の薬剤。
- [請求項3] 前記核酸が、前記 [a] ~ [e] を、下記 [f] 及び [g] :
- [f] 右側境界配列 (Right Border) ; 及び
 - [g] 左側境界配列 (Left Border)
- の間に含む、請求項2に記載の薬剤。
- [請求項4] 前記プロモーターが、薬剤誘導型プロモーターである、請求項2又は3に記載の薬剤。
- [請求項5] 前記薬剤誘導型プロモーターが、glucocorticoid receptor誘導型プロモーター、estrogen receptor誘導型プロモーター、及びecdysone receptor誘導型プロモーターからなる群から選ばれる少なくとも一種のプロモーターである、請求項4に記載の薬剤。
- [請求項6] 前記イネ科植物が、イネである、請求項1~5のいずれか1項に記載の薬剤。

- [請求項7] 前記CDKB2をコードする塩基配列の少なくとも一部の配列が、配列表の配列番号1に記載の塩基配列の62～91位の配列、165～247位の配列、289～302位の配列、318～349位の配列、468～490位の配列、652～670位の配列、及び728～803位の配列からなる群から選ばれる少なくとも1種の配列を含む、少なくとも25塩基の配列である、請求項1～6のいずれか1項に記載の薬剤。
- [請求項8] 前記CDKB2をコードする塩基配列と少なくとも一部が相補的な配列が、配列表の配列番号1に記載の塩基配列の62～91位の配列、165～247位の配列、289～302位の配列、318～349位の配列、468～490位の配列、652～670位の配列、及び728～803位の配列からなる群から選ばれる少なくとも1種の配列を含む、少なくとも25塩基の塩基配列と相補的な配列である、請求項1～7のいずれか1項に記載の薬剤。
- [請求項9] 前記CDKB2をコードする塩基配列の少なくとも一部の配列が、配列表の配列番号2に記載の塩基配列である、請求項1～8のいずれか1項に記載の薬剤。
- [請求項10] イネ科植物の核内に、請求項1～9のいずれか1項に記載の薬剤を導入して、形質転換イネ科植物を得る工程；及び
前記形質転換イネ科植物を、前記導入された薬剤に含まれる核酸を鋳型として、前記植物内でRNA転写産物が生成し得る条件下に置く工程
を含む、イネ科植物の核内の染色体を倍加させる方法。
- [請求項11] 下記[a]～[e]：
[a] プロモーター；
[b] サイクリン依存性キナーゼB2（CDKB2）をコードする塩基配列の少なくとも一部の配列、又は、前記CDKB2をコードする塩基配列と少なくとも一部が相補的な配列；

[c] スペーサー；

[d] 前記 [b] の配列の少なくとも一部に対する逆方向反復配列；
及び

[e] ターミネーター

が、下記 [f] 及び [g]：

[f] 右側境界配列 (Right Border)；及び

[g] 左側境界配列 (Left Border)

の間に配置されている塩基配列を含む核酸を含有するベクターを得る
工程；

アグロバクテリウム (Agrobacterium) 属細菌に、前記ベクターを導入し
て、形質転換アグロバクテリウム属細菌を得る工程；

イネ科植物に、前記形質転換アグロバクテリウム属細菌を接触させて
、前記核酸が導入された形質転換イネ科植物を得る工程；及び

前記形質転換イネ科植物を、前記導入された薬剤に含まれる核酸を鋳
型として、前記植物内で RNA 転写産物が生成し得る条件下に置く工
程

を含む、イネ科植物の核内の染色体を倍加させる方法。

[請求項12] 前記プロモーターが、薬剤誘導型プロモーターである、請求項10
又は11に記載のイネ科植物の核内の染色体を倍加させる方法。

[請求項13] 前記薬剤誘導型プロモーターが、glucocorticoid receptor誘導型
プロモーター、estrogen receptor誘導型プロモーター、及びecdysone
receptor誘導型プロモーターからなる群から選ばれる少なくとも一
種のプロモーターである、請求項12に記載のイネ科植物の核内の染
色体を倍加させる方法。

[請求項14] 前記イネ科植物が、イネである、請求項10～13のいずれか1項
に記載のイネ科植物の核内の染色体を倍加させる方法。

[請求項15] 前記CDKB2をコードする塩基配列の少なくとも一部の配列が、
配列表の配列番号1に記載の塩基配列の62～91位の配列、165

～247位の配列、289～302位の配列、318～349位の配列、468～490位の配列、652～670位の配列、及び728～803位の配列からなる群から選ばれる少なくとも1種の配列を含む、少なくとも25塩基の配列である、請求項10～13のいずれか1項に記載のイネ科植物の核内の染色体を倍加させる方法。

[請求項16] 前記CDKB2をコードする塩基配列と少なくとも一部が相補的な配列が、配列表の配列番号1に記載の塩基配列の62～91位の配列、165～247位の配列、289～302位の配列、318～349位の配列、468～490位の配列、652～670位の配列、及び728～803位の配列からなる群から選ばれる少なくとも1種の配列を含む、少なくとも25塩基の塩基配列と相補的な配列である、請求項10～15のいずれか1項に記載のイネ科植物の核内の染色体を倍加させる方法。

[請求項17] 前記CDKB2をコードする塩基配列の少なくとも一部の配列が、配列表の配列番号2に記載の塩基配列である、請求項10～16のいずれか1項に記載のイネ科植物の核内の染色体を倍加させる方法。

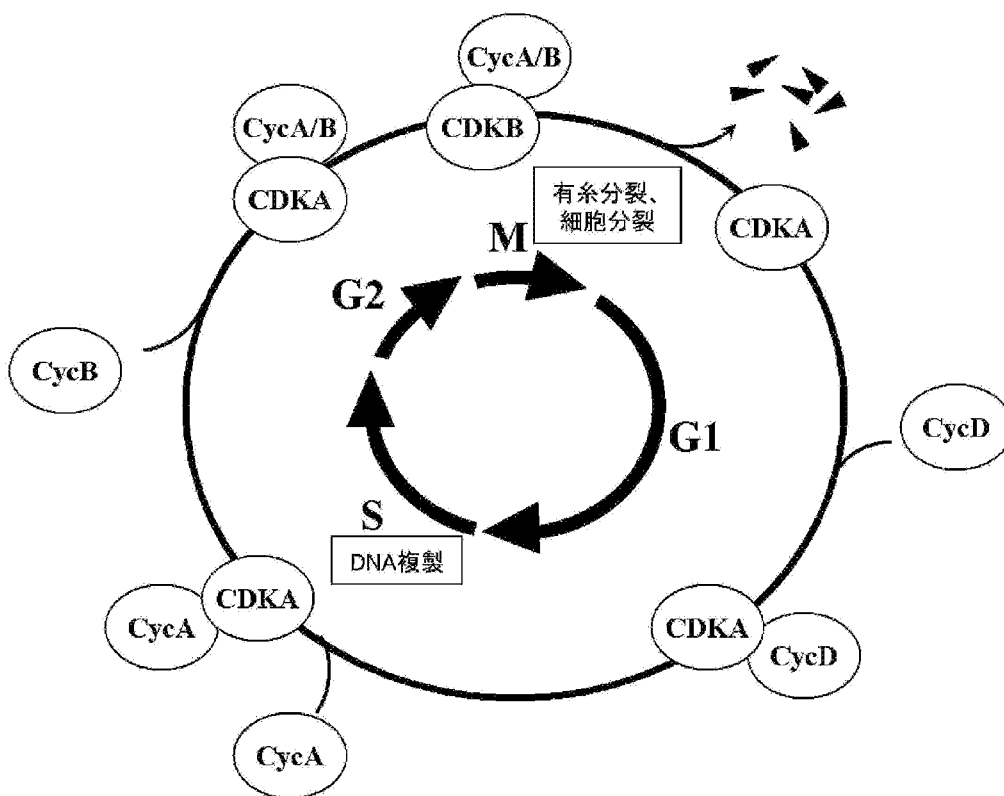
[請求項18] イネ科植物を、請求項10～17のいずれか1項に記載のイネ科植物の核内の染色体を倍加させる方法に供することによって、核内の染色体が倍加した形質転換イネ科植物を得る工程を含む、核内の染色体が倍加した形質転換イネ科植物の製造方法。

[請求項19] イネ科植物細胞のカルスを請求項10～17のいずれか1項に記載のイネ科植物の核内の染色体を倍加させる方法に供することによって核内の染色体が倍加したカルスを獲得工程、および前記核内の染色体が倍加したカルスを再分化させることで、核内の染色体が倍加した形質転換イネ科植物を得る工程を含む、核内の染色体が倍加した形質転換イネ科植物の製造方法。

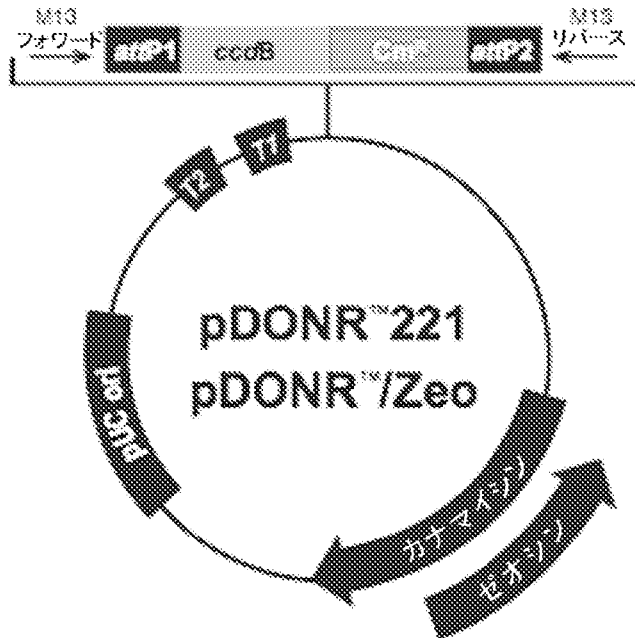
[請求項20] 前記再分化工程は、カルスが有するOsCDKB2の発現抑制を解除した状態で実施する、請求項19に記載の製造方法。

[請求項21] 前記再分化工程では、核内の染色体を倍加したカルスを得る工程で使用する発現誘導剤を用いない、請求項19または20に記載の製造方法。

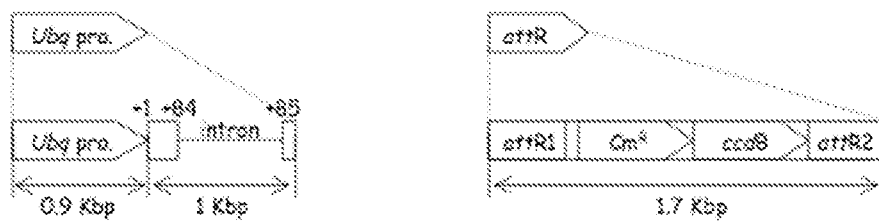
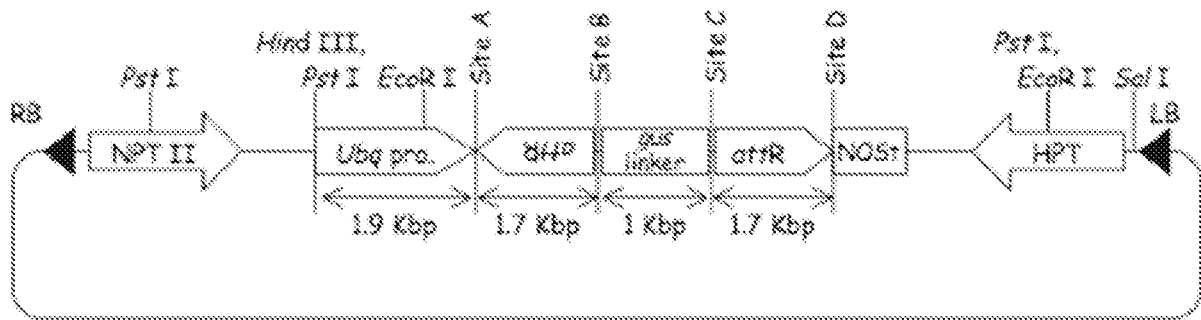
[図1]



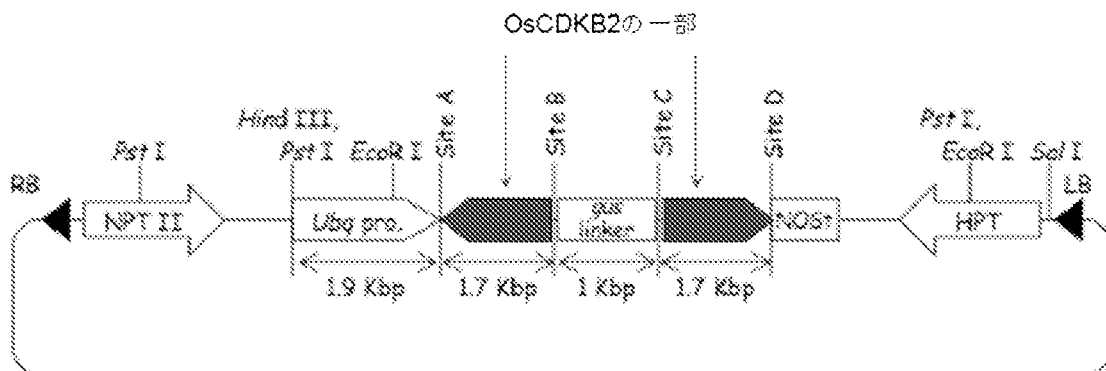
[図2]



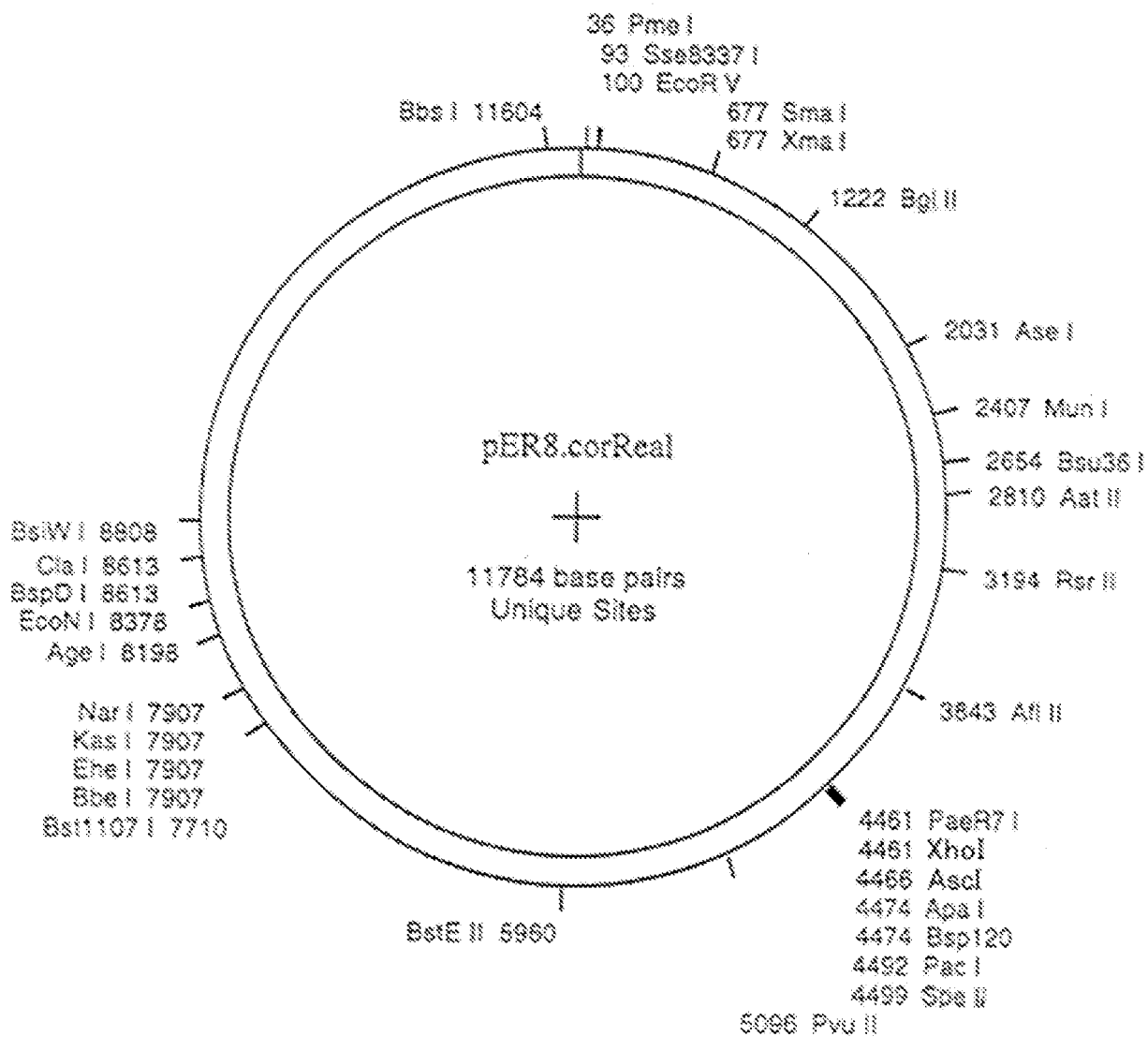
[図3]



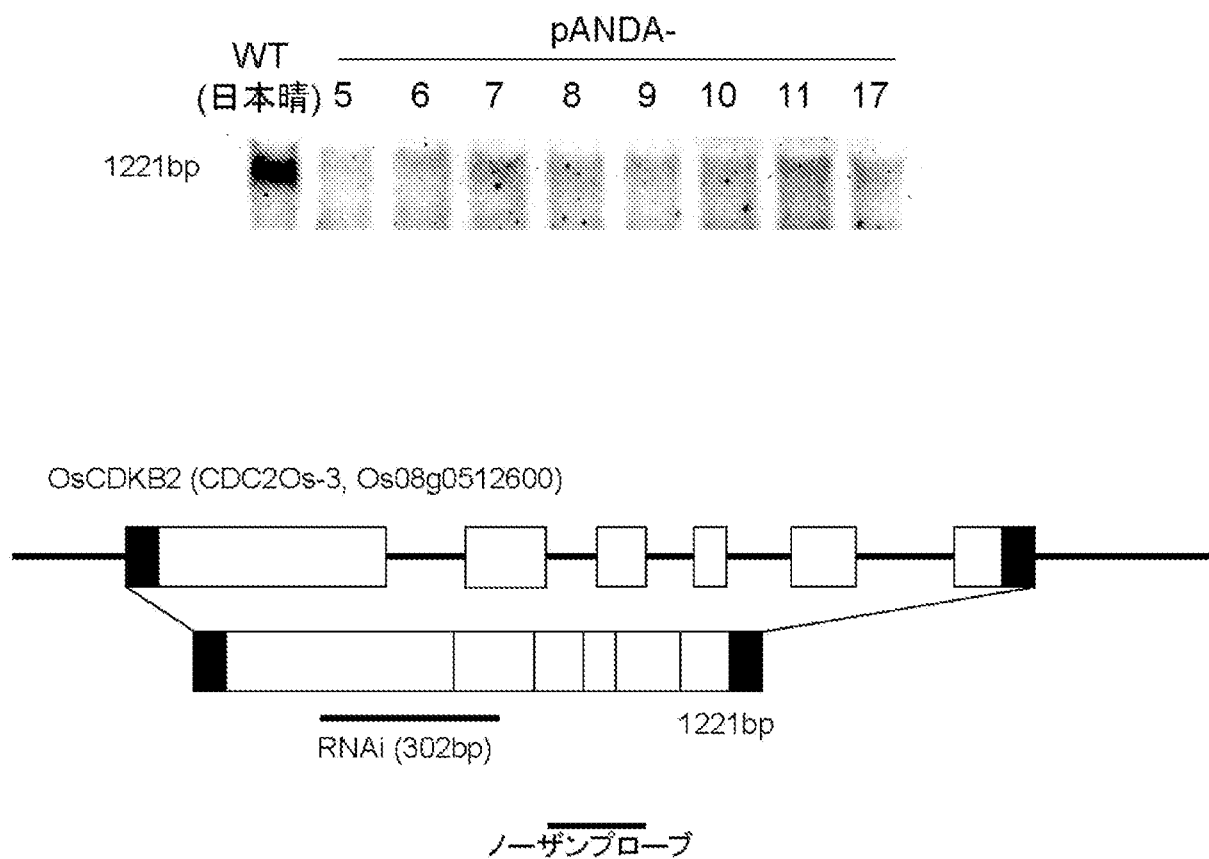
[図4]



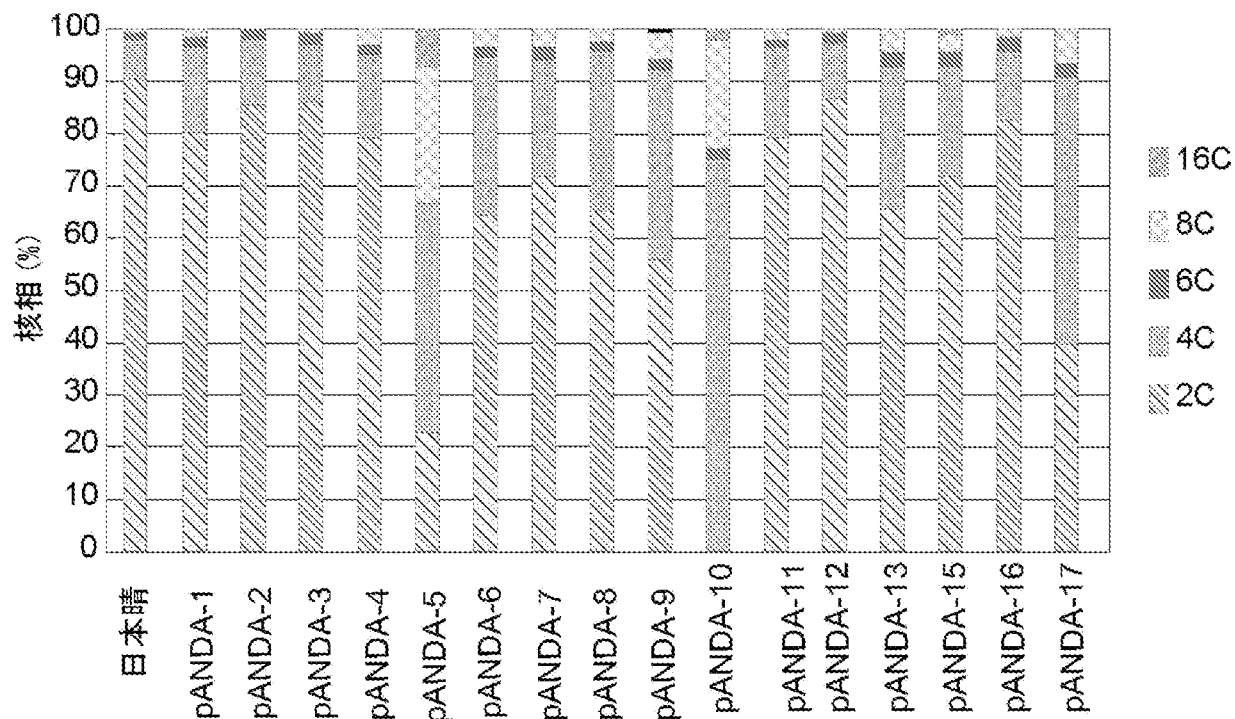
[図5]



[図6]

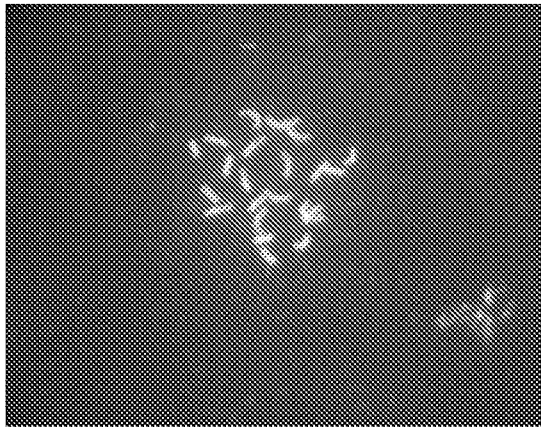


[図7]

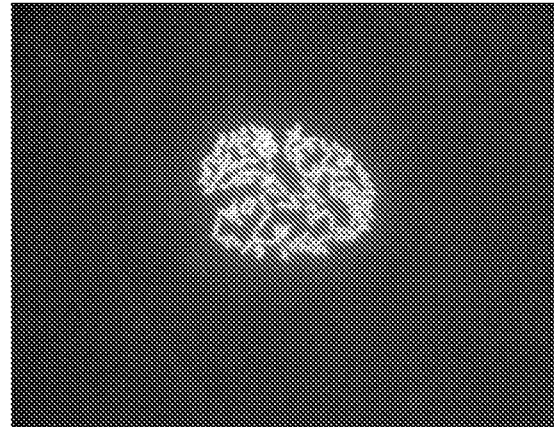


[図8]

pANDA-5



2n=2xの細胞 (染色体数24本)

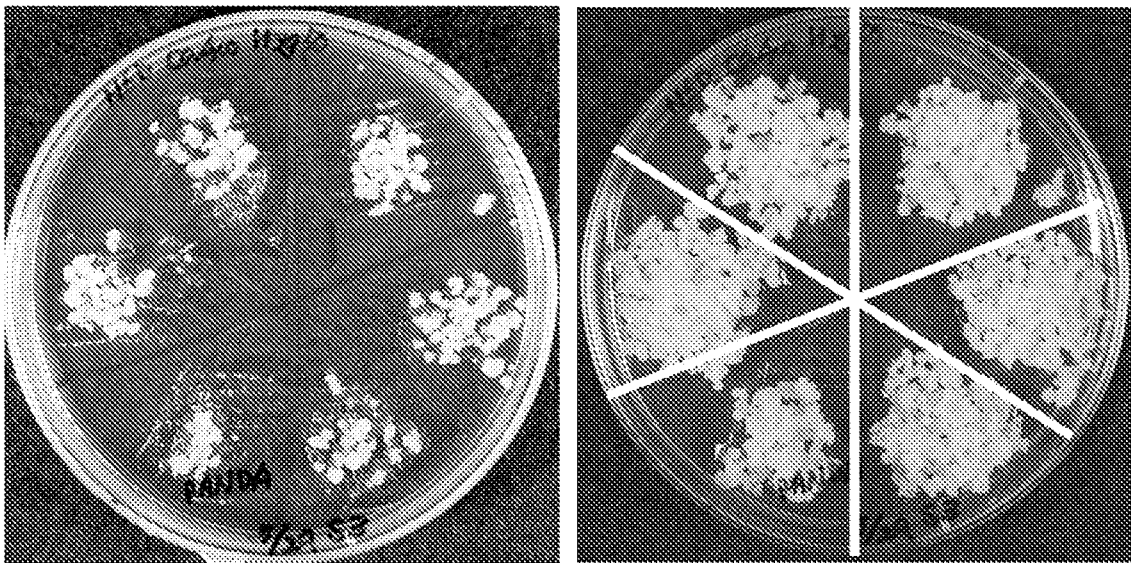


2n=8xの細胞 (染色体数96本)

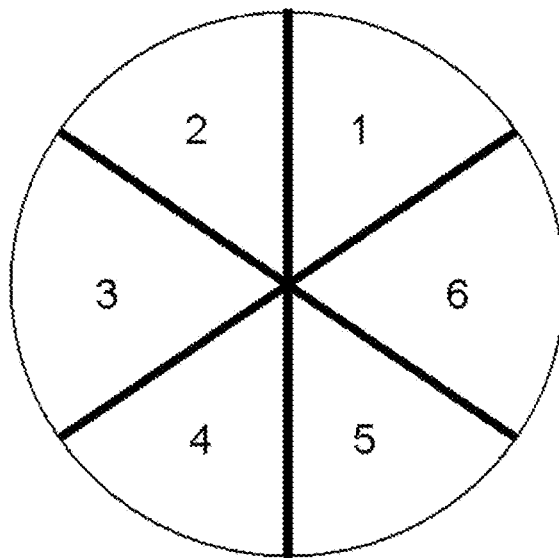
[図9]

移植 0日目

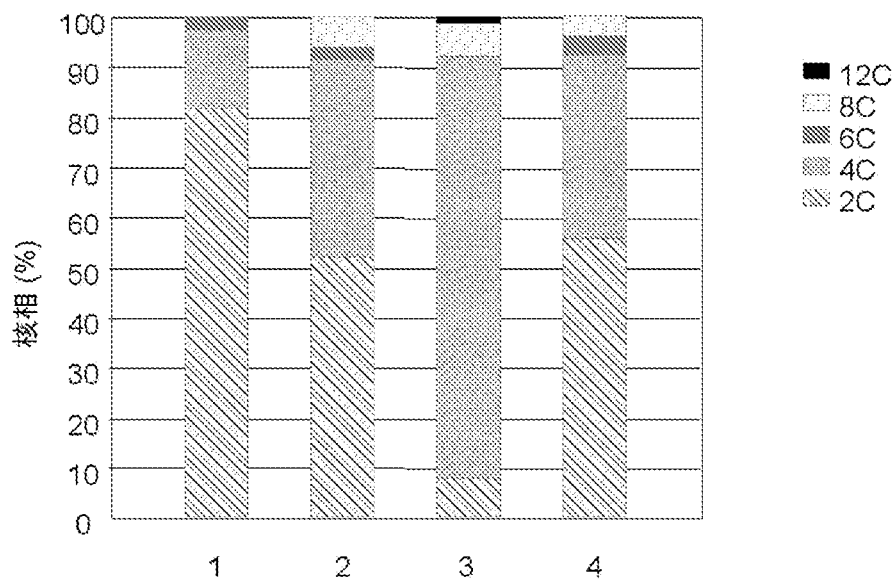
移植 12日目



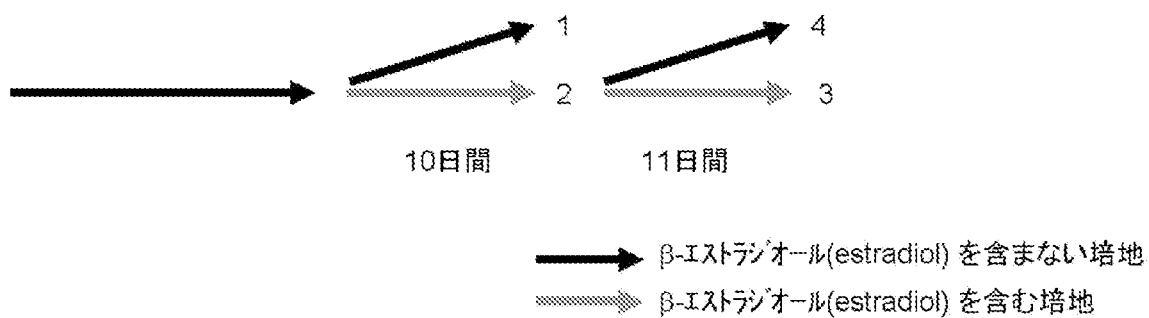
pANDA
1-6



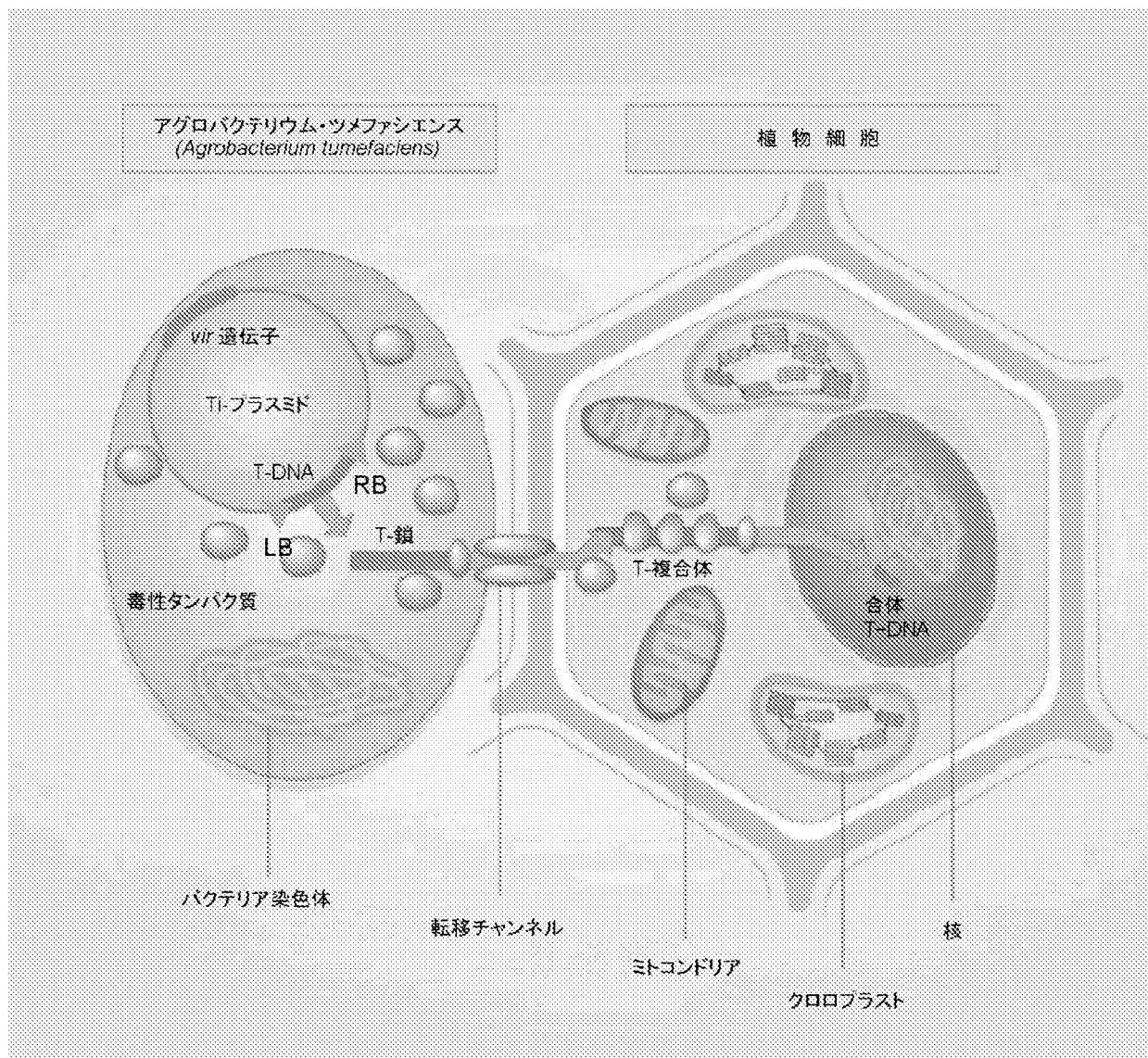
[図10]



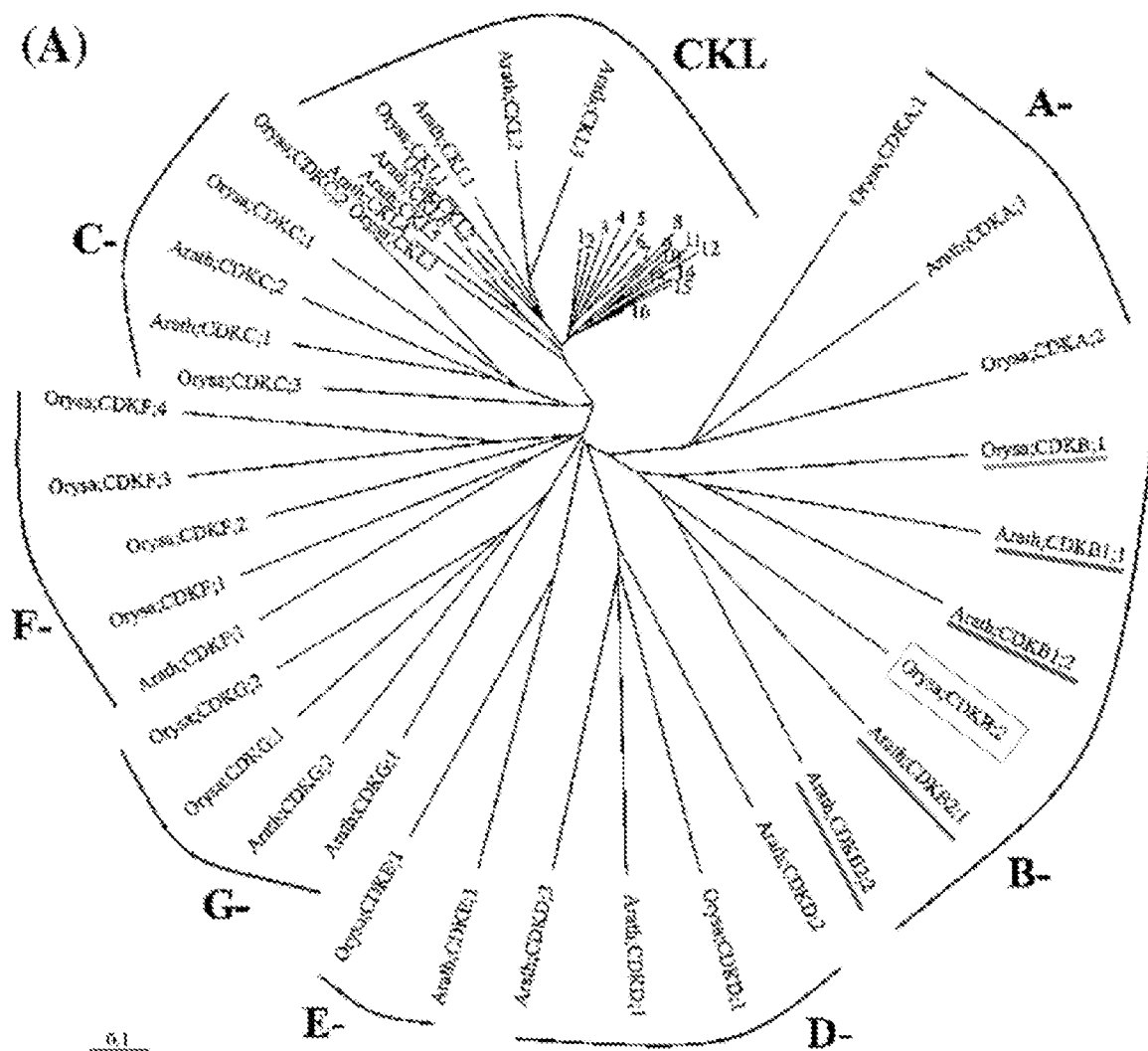
核相測定タイミング



[図11]

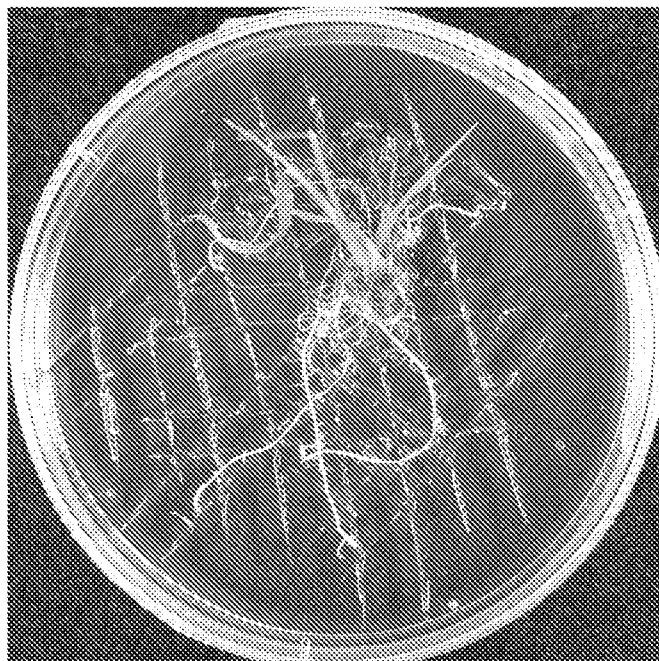


[图12]

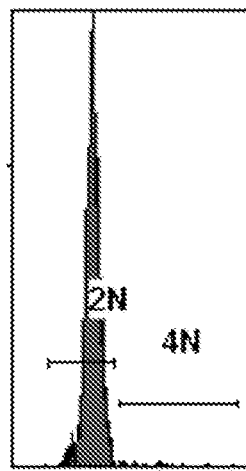


Guo et al., (2007) Plant Mol. Biol.

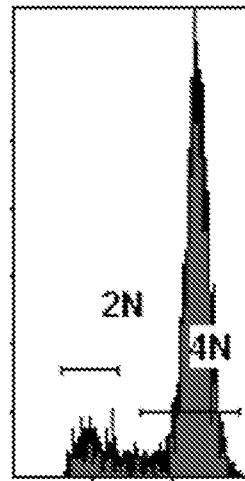
[图13]



[圖14]



野生型 (2倍体)



誘導的RNAi再分化個体(4倍体)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/007243

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

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

C12N15/00-15/90, A01H1/00-5/00

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	1996-2010
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2010	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2010

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), CA/REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2004-305051 A (President of The University of Tokyo), 04 November 2004 (04.11.2004), (Family: none)	1-21
A	JEONGKYUNG, J., et al., "Cell cycle function of a rice B2-type cyclin interacting with B-type cyclin-dependent kinase" Plant J., 2003, Vol.34, p.417-425	1-21
A	KONO, A., et al., "Arabidopsis D-type cyclin CYCD4;1 is a novel cyclin partner of B2-type cyclin-dependent kinase" Plant Physiol., 2003, Vol.132, p.1315-1321	1-21

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
29 January, 2010 (29.01.10)

Date of mailing of the international search report
09 February, 2010 (09.02.10)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/007243

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ZHIPONOVA, M.K., et al., "Mitosis-specific promoter of the alfalfa cyclin-dependent kinase gene (<i>Medsa;CDKB2;1</i>) is activated by wounding and ethylene in non-cell division-dependent manner ^{1[W]} ." <i>Plant Physiol.</i> , 2006, Vol.140, p.693-703	1-21
A	PETTKO-SZANDTNER, A., et al., "Activation of an alfalfa cyclin-dependent kinase inhibitor by calmodulin-like domain protein kinase" <i>Plant J.</i> , 2006, Vol.46, p.111-123	1-21
A	ANDERSEN.S.U., et al., "Requirement of B2-type cyclin-dependent kinases for meristem integrity in <i>Arabidopsis thaliana</i> ." <i>Plant Cell</i> , 2008.01, Vol.20, p.88-100	1-21

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. C12N15/00(2006.01)i, A01H1/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, A01H5/00(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. C12N15/00-15/90, A01H1/00-5/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの
 日本国実用新案公報 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2010年
 日本国実用新案登録公報 1996-2010年
 日本国登録実用新案公報 1994-2010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(JDreamII)
 GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
 BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), CA/REGISTRY (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
A	JP 2004-305051 A (東京大学長) 2004. 11. 04, ファミリーなし	1-21
A	JEONGKYUNG, J., et al., "Cell cycle function of a rice B2-type cyclin interacting with B-type cyclin-dependent kinase" Plant J., 2003, Vol. 34, p. 417-425	1-21
A	KONO, A., et al., "Arabidopsis D-type cyclin CYCD4;1 is a novel cyclin partner of B2-type cyclin-dependent kinase" Plant Physiol., 2003, Vol. 132, p. 1315-1321	1-21

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。

<p>* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な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</p>	<p>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</p>
---	---

国際調査を完了した日 29. 01. 2010	国際調査報告の発送日 09. 02. 2010
----------------------------	----------------------------

国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 水落 登希子	4B	3541
	電話番号 03-3581-1101 内線 3448		

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	ZHIPONOVA, M. K., et al., " Mitosis-specific promoter of the alfalfa cyclin-dependent kinase gene (<i>Medsa</i> ; CDKB2;1) is activated by wounding and ethylene in non-cell division-dependent manner ^{1[W]} ." <i>Plant Physiol.</i> , 2006, Vol.140, p. 693-703	1-21
A	PETTKO-SZANDTNER, A., et al., " Activation of an alfalfa cyclin-dependent kinase inhibitor by calmodulin-like domain protein kinase" <i>Plant J.</i> , 2006, Vol.46, p.111-123	1-21
A	ANDERSEN, S. U., et al., " Requirement of B2-type cyclin-dependent kinases for meristem integrity in <i>Arabidopsis thaliana</i> ." <i>Plant Cell</i> , 2008.01, Vol.20, p. 88-100	1-21