

(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  
2012年6月14日(14.06.2012)



(10) 国際公開番号  
WO 2012/077664 A1

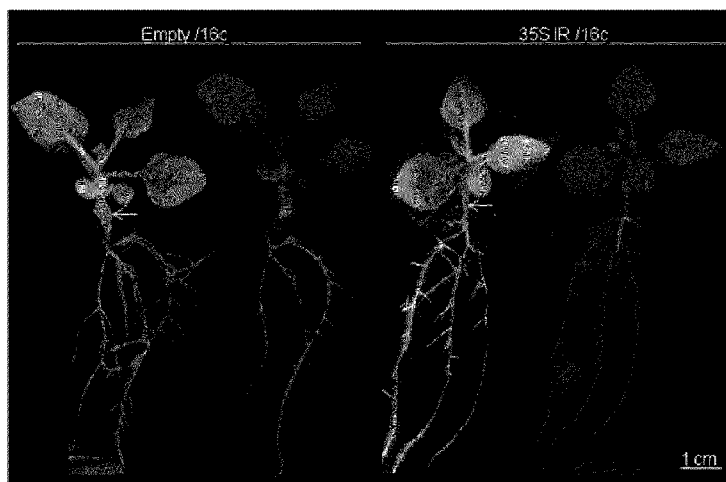
- (51) 国際特許分類:  
C12N 15/09 (2006.01) C12N 15/113 (2010.01)  
A01H 1/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/078150
- (22) 国際出願日: 2011年12月6日(06.12.2011)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2010-271452 2010年12月6日(06.12.2010) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 国立  
大学法人弘前大学 (HIROSAKI UNIVERSITY)  
[JP/JP]; 〒0368560 青森県弘前市文京町1番地 Aomori (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 原田 竹雄  
(HARADA Takeo) [JP/JP]; 〒0368560 青森県弘前市  
文京町1番地 国立大学法人弘前大学内 Aomori  
(JP). 葛西 厚史(KASAI Atsushi) [JP/JP]; 〒0368560  
青森県弘前市文京町1番地 国立大学法人弘前  
大学内 Aomori (JP). 山田 かおり(YAMADA  
Kaori) [JP/JP]; 〒0368560 青森県弘前市文京町1番
- 地 国立大学法人弘前大学内 Aomori (JP). 白  
松齡(BAI Songling) [CN/JP]; 〒0208550 岩手県盛岡  
市上田三丁目18番8号 国立大学法人岩手大  
学内 Iwate (JP).
- (74) 代理人: 辻田 幸史, 外(TSUJITA Takashi et al.);  
〒1710033 東京都豊島区高田3-11-12 K  
Tビル4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,  
QA, RO, RS, RU, RW, 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, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシ  
ア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨー  
ロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,  
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,

[続葉有]

(54) Title: PLANT TRANSFORMATION METHOD PERFORMED VIA GRAFTING OF ROOTSTOCK AND SCION

(54) 発明の名称: 台木と穂木の接ぎ木を介して行う植物の形質転換方法

[図2]



(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing a method for performing plant transformation via grafting a rootstock and scion, using siRNA for activating transcriptional gene silencing. This plant transformation method performed via grafting of a rootstock and scion, serving as a solution therefor, is characterized in that siRNA for activating transcriptional gene silencing is produced in a scion, the siRNA having been produced in the scion is transported to a rootstock via grafting, and the rootstock is transformed by the activation of the transcriptional gene silencing in the rootstock.

(57) 要約: 本発明の課題は、転写型遺伝子サイレンシングを発動させるための siRNA を用い、台木と穂木の接ぎ木を介して植物の形質転換を行う方法を提供することである。その解決手段としての本発明の台木と穂木の接ぎ木を介して行う植物の形質転換方法は、転写型遺伝子サイレンシングを発動させるための siRNA を穂木において産生せしめ、穂木において産生された siRNA を接ぎ木を介して台木に輸送し、転写型遺伝子サイレンシングを台木において発動させることによって台木の形質転換を行うことを特徴とする。



WO 2012/077664 A1

MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, 添付公開書類:  
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, — 國際調查報告 (條約第 21 條(3))  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

## 明 細 書

発明の名称：

台木と穂木の接ぎ木を介して行う植物の形質転換方法

技術分野

[0001] 本発明は、台木と穂木の接ぎ木を介して行う植物の形質転換方法に関する。

背景技術

[0002] 植物の品種改良の手段として、特定の標的遺伝子の発現を抑制することで植物の形質転換を行う方法が有効であることは当業者に周知の通りであり、近年、その方法の一つとして、遺伝子の発現機能を阻害する遺伝子サイレンシングが注目されている。遺伝子サイレンシングは、遺伝子の転写レベルで作用する転写型遺伝子サイレンシング (Transcriptional Gene Silencing: TGS) と、転写後に作用する転写後型遺伝子サイレンシング (Post-Transcriptional Gene Silencing: PTGS) に分類されるが、いずれも siRNA (short interference RNA) によって発動できることが知られている。siRNAは、20~25bpの低分子RNAであり、細胞内で形成された二本鎖RNA (dsRNA: double-strand RNA) がダイサーによって分断されて生成し、ヘリカーゼによって一本鎖に解離したものは、RNA誘導型サイレンシング複合体 (RISC) を形成して標的のmRNAに結合し、これを切断することができるものであって、siRNAはこの機能によってPTGSを発動する。また、siRNAは、標的遺伝子のプロモーター領域のメチル化を誘導し (RNA-directed DNA Methylation: RdDM)、さらにその領域のヒストンタンパク質の修飾などにも関与して、その領域をリモデリング化することで、TGSを発動する。TGSはエピジェネティック変異と称され、サイレンシングが体細胞分裂や減数分裂を経ても維持されて後代へ遺伝す

ることが知られている。

[0003] siRNAは、伴細胞 (companion cell) から篩管 (phloem) への原形質連絡輸送を介して長距離輸送されることが知られており、こうした輸送は接ぎ木を介しても行われる。siRNAのこの性質を利用して、PTGSを発動させるためのsiRNAを穂木において産生せしめ、穂木において産生されたsiRNAを接ぎ木を介して台木に輸送し、PTGSを台木において発動させることによって台木の形質転換を行う方法が非特許文献1に記載されている。しかしながら、TGSを発動させるためのsiRNAを用いた場合の報告はこれまで存在せず、その作用は未だ不明のままである。

### 先行技術文献

### 非特許文献

[0004] 非特許文献1: Molnar A. ら、Science 328: 872-875, 2010

### 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0005] そこで本発明は、TGSを発動させるためのsiRNAを用い、台木と穂木の接ぎ木を介して植物の形質転換を行う方法を提供することを目的とする。

### 課題を解決するための手段

[0006] 上記の点に鑑みてなされた本発明の台木と穂木の接ぎ木を介して行う植物の形質転換方法は、請求項1記載の通り、TGSを発動させるためのsiRNAを穂木において産生せしめ、穂木において産生されたsiRNAを接ぎ木を介して台木に輸送し、TGSを台木において発動させることによって台木の形質転換を行うことを特徴とする。

また、請求項2記載の方法は、請求項1記載の方法において、TGSを発動させるためのsiRNAを穂木において産生せしめる方法として、標的遺

伝子のプロモーター領域に相同な配列を有する s i R N A を産生することができる、C o Y M V プロモーターを用いたベクターを導入したアグロバクテリウムを穂木に感染させる方法を用いることを特徴とする。

また、本発明の植物の形質転換個体の取得方法は、請求項 3 記載の通り、請求項 1 記載の方法によって台木の形質転換を行った後、台木の主根の側根からの再分化個体を形質転換個体として取得することを特徴とする。

### 発明の効果

[0007] 本発明によれば、T G S を発動させるための s i R N A を用い、台木と穂木の接ぎ木を介して植物の形質転換を行う方法を提供することができる。

### 図面の簡単な説明

[0008] [図1]実施例における s i R N A 産生ベクター ( s i l e n c e r ) とその標的遺伝子産生ベクター ( t a r g e t ) のコンストラクトの主要部の概略図である。

[図2]同、接ぎ木個体の T G S 発動の観察結果である。

[図3]同、台木の主根からの側根の分岐部分の T G S 発動の観察結果である。

[図4]同、側根の先端の T G S 発動の観察結果である。

### 発明を実施するための形態

[0009] 本発明の台木と穂木の接ぎ木を介して行う植物の形質転換方法は、T G S を発動させるための s i R N A を穂木において産生せしめ、穂木において産生された s i R N A を接ぎ木を介して台木に輸送し、T G S を台木において発動させることによって台木の形質転換を行うことを特徴とするものである。

[0010] 本発明において、T G S を発動させるための s i R N A を穂木において産生せしめる方法としては、標的遺伝子のプロモーター領域に相同な配列を有する s i R N A を産生することができるベクターを、例えば、A g r o b a c t e r i u m t u m e f a c i e n c e E H A 1 0 5 株などのアグロバクテリウムに導入した後、s i R N A 産生ベクターを保持したアグロバクテリウムを穂木として用いる植物の葉片に自体公知の方法で感染させ、ベク

ター内のT-DNAの挿入によって目的とする形質転換が行われた細胞から再分化個体を取得し、この再分化個体を育成して穂木として用いる方法が挙げられる（必要であれば例えばBurrow, M. D. ら、Plant Mol. Biol. Rep. 8:124-139, 1990やRatchliff, F. C.G. ら、Plant Cell 11:1207-1216, 1999などを参照のこと）。

[0011] siRNA産生ベクターとしては、プロモーターとターミネーターの間に、標的遺伝子のプロモーター領域のセンス鎖配列（部分的であってもよい）とそのアンチセンス鎖配列との逆位方向反復塩基配列（Inverted Repeat Sequence）構造を組み込んだ構成を有するものが挙げられる（逆位方向反復塩基配列構造の間にスペーサーを連結してもよい）。穂木において産生されたsiRNAを篩管を通して台木に効率的に輸送するためには、プロモーターは、篩管輸送の起点である伴細胞で特異的に機能するプロモーター、例えば、CoYMV（Commelina yellow mottle virus）プロモーターを用いることが望ましい。なお、ターミネーターとしては、植物体内でターミネーターとして機能する例えばNOSターミネーターなどが挙げられる。

[0012] 本発明の適用対象となる植物は、台木と穂木のいずれについても接ぎ木が成立する植物であれば特段の制限はない。接ぎ木の手法は自体公知の手法であってよい。本発明によれば、ソース力が強い穂木からシンク力が強い台木に接ぎ木を介してsiRNAを輸送させることで、台木においてTGSが効果的に発動され、台木を形質転換することができる。台木において発動されたTGSは後代に遺伝するので、台木の主根の篩管に隣接する内鞘細胞（pericycle cell）が分裂して形成される側根から組織培養を通して再分化個体を取得したり、いわゆる「ひこばえ」が見られる植物（例えばブルーベリーやリンゴなどの果樹）においては根系不定芽体（Root sucker）を再分化個体として取得したりすれば、これらはサイレンシングが維持された形質転換個体であるので、品種改良個体として育成するこ

とができる。

## 実施例

[0013] 以下、本発明を実施例によって詳細に説明するが、本発明は以下の記載に限定して解釈されるものではない。

[0014] (1) TGS発動s i R N Aを穂木において産生させるためのs i R N A産生ベクターの作製

CaMV 35Sプロモーターの-32~-342bpの領域 (Okano Y. ら、Plant Journal 53:65-77, 2008) とそのアンチセンス鎖配列との逆位方向反復塩基配列構造の間にCAT1 (カタラーゼ) 遺伝子由来のイントロン (配列長: 201bp、Ohta S. ら、Plant and Cell Physiology 31:805-813, 1990) をスペーサーとして連結して組み込んだ。このユニットをバイナリーベクターpE2113-GUS (Mitsuhara I. ら、Plant Cell Physiology 37:49-59, 1996.) のBamHI/SacI部位のGUS (beta-glucuronidase) 遺伝子と入れ換えて35S:35S-IRを構築した。次に、伴細胞で特異的に機能するプロモーターであるCoYMVpをpCOI (Matsuda, Y. ら、Protoplasma 220:51-58, 2002) によりPCR増幅し、これを35S:35S-IRのSalI/BamHI部位と入れ換えることで、目的のs i R N A産生ベクター (CoYMV:35S-IR) を得た (図1のsilencerを参照)。

[0015] (2) s i R N A産生ベクターのアグロバクテリウムへの導入

アグロバクテリウムとしてAgrobacterium tumefaciens EHA105株を用い、その単一コロニーをLB培地 (組成は表1参照) に抗生物質 (50mg/LのRifampicin) を添加した培地に植え付け、28℃で24時間振盪培養し、継代してさらに12時間振盪培養した。その後、4℃にて6000rpmで10分間遠心し、回収した菌を滅菌水および10%グリセロールで洗浄した。この菌のペレットを10

%グリセロール1 mLで懸濁し、そのうちの40  $\mu$ Lを(1)で作製した *siRNA* 産生ベクター0.5~1.0  $\mu$ gと混合し、混合液をキュベットに移し、20 kV/cm, 6 msの条件でエレクトロポレーションすることで、*siRNA* 産生ベクターをアグロバクテリウムに導入した。電圧をかけたキュベット内の反応液にLB培地1 mLを加え、1.5 mLチューブに回収し、28°Cで24時間培養した。抗生物質(50 mg/LのRifampicinおよび50 mg/LのKanamycin)を含むLB寒天培地上に培養液を塗布し、28°Cで3日間培養した。得られたコロニーを新しいLB培地で培養し、アグロバクテリウム感染に用いた。

[0016] [表1]

LB培地組成	
トリプトン	10 g/l
酵母抽出物	5 g/l
NaCl	5 g/l
pH	7.3

[0017] (3) *siRNA* 産生ベクターを保持するアグロバクテリウムのタバコ科植物への感染

LB培地5 mLに抗生物質(50 mg/LのRifampicinおよび50 mg/LのKanamycin)を添加し、*siRNA* 産生ベクターを保持するアグロバクテリウムを28°Cで一晩培養し、継代してさらに12時間振盪培養した。その後、室温にて3000 rpmで20分間遠心し、回収した菌をOD600=1.0になるように懸濁液培地(組成は表2参照)に懸濁した。こうして調製した*siRNA* 産生ベクターを保持するアグロバクテリウムの懸濁液に、明所条件下で無菌的に栽培した発芽後15日目の*Nicotiana benthamiana*の個体の葉片を浸漬することでアグロバクテリウム感染を行った後、常法に従って目的とする形質転換が行われた細胞から再分化個体を取得した。

[0018]



[表2]

アグロバクテリウム懸濁液組成	
硫酸マグネシウム	4.314 mg/l
MSビタミン	10 ml/l
アセトシリンゴン	30 g/l

## [0019] (4) 台木と穂木の接ぎ木

明所条件下の温室にてMS agar (0.7%) で栽培した発芽後7日目の *Nicotiana benthamiana* 16C (図1の target に示されるこの実施例における標的遺伝子産生ベクターである 35S:mGFP が導入された緑色蛍光タンパク質産生形質転換体。Jones L. ら、Plant Cell 11:2291-2301, 1999) の個体の胚軸部位 (子葉より約5mm下) を水平に剃刀で切断し、この根側を台木とした。一方、(3) で siRNA 産生ベクターを保持するアグロバクテリウムを感染させた発芽後7日目の *Nicotiana benthamiana* の個体にも同様の処置を行い、この子葉側を穂木とした。両者の胚軸部位をシリコンチューブ (長さ: 2mm×外径: 0.5mm×内径0.4mm) 内にて密着させて接ぎ木した。全ての操作は無菌的に顕微鏡下で行った。接ぎ木した個体は、無菌シャーレ内のアガロース (3mmキューブ) を利用して正立させた。7日後にチューブを外してロックウール (Nitto Boseki Co.) にて液体肥料 (Otsuka House Nos. 1 and 2, Otsuka Chemical Co.) を用いて栽培した。

## [0020] (5) TGS発動の観察

接ぎ木した7日後に行った。可視光下とUV下において接ぎ木個体を観察した結果を図2に示す (35SIR/16c: 左が可視光下で右がUV下。←は接ぎ木点)。なお、図2には、siRNA発現ユニットを含まないベクターを用いて同様の操作を行って得た接ぎ木個体の可視光下とUV下において観察した結果をあわせて示す (Empty/16c: 左が可視光下で右が

UV下。←は接ぎ木点)。また、それぞれの接ぎ木個体のサンプルを7%低融点アガロースブロックに包埋し、ビブラトーム (Series 1500 Leica, St. Louis, MO) を用いて100 $\mu$ m厚の切片を作製し、共焦点レーザー顕微鏡 (Confocal laser scanning microscopy system Fluoview 1000, Olympus, Tokyo) を用いて台木の主根からの側根の分岐部分を観察した結果を図3に、側根の先端を観察した結果を図4にそれぞれ示す (図3の右側と図4の下側が可視光下で図3の左側と図4の上側がUV下)。図2から明らかなように、siRNA産生ベクターを用いて得た接ぎ木個体 (35SIR/16c) は、siRNA発現ユニットを含まないベクターを用いて得た接ぎ木個体 (Empty/16c) と異なり、接ぎ木点付近に若干の緑色蛍光が認められたが、この部分を除けば緑色蛍光は認められず、穂木において産生されたsiRNAが篩管を通して長距離輸送されて台木においてTGSを効果的に発動したことがわかった。また、図3と図4から明らかなように、siRNA産生ベクターを用いて得た接ぎ木個体では、台木の主根の篩管周辺でTGSが顕著に発動されること (別途の実験による主根の断面のTGS発動の観察によっても確認済み)、ここから形成される側根は全体にわたってTGSが発動していることがわかった。なお、TGSが発動している側根の切片を用いた組織培養によって得られたカルス由来の再分化個体について緑色蛍光の有無を確認したところ、TGSが後代に遺伝し、サイレンシングが維持されていることで、緑色蛍光は認められなかった。なお、比較実験として、台木において産生されたsiRNAを接ぎ木を介して穂木に輸送した場合、穂木の展開葉においてTGS発動が認められたが、TGSの発動部位は葉身全域ではなく葉脈に沿った箇所に限られていた。腋芽のシンク力を高めるための切り戻しを行っても葉身全域でのTGS発動は認められなかった。よって、穂木において産生されたsiRNAを接ぎ木を介して台木に輸送することによる台木におけるTGS発動の方が、台木において産生されたsiRNAを接ぎ木を介して穂木に輸送することによる穂木に

おける T G S 発動よりも効果的であり、サイレンシングが維持された形質転換個体を取得する上においても有利であることがわかった。

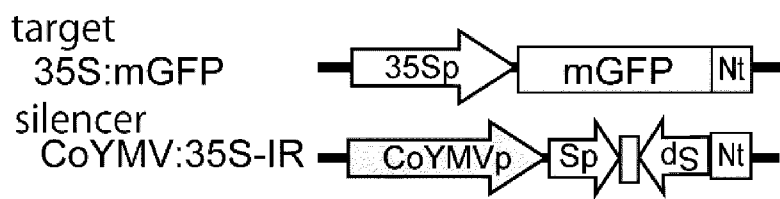
### 産業上の利用可能性

[0021] 本発明は、T G S を発動させるための s i R N A を用い、台木と穂木の接ぎ木を介して植物の形質転換を行う方法を提供することができる点において産業上の利用可能性を有する。

## 請求の範囲

- [請求項1] 台木と穂木の接ぎ木を介して行う植物の形質転換方法であって、転写型遺伝子サイレンシングを発動させるための s i R N A を穂木において産生せしめ、穂木において産生された s i R N A を接ぎ木を介して台木に輸送し、転写型遺伝子サイレンシングを台木において発動させることによって台木の形質転換を行うことを特徴とする方法。
- [請求項2] 転写型遺伝子サイレンシングを発動させるための s i R N A を穂木において産生せしめる方法として、標的遺伝子のプロモーター領域に相同な配列を有する s i R N A を産生することができる、C o Y M V プロモーターを用いたベクターを導入したアグロバクテリウムを穂木に感染させる方法を用いることを特徴とする請求項1記載の方法。
- [請求項3] 植物の形質転換個体の取得方法であって、請求項1記載の方法によって台木の形質転換を行った後、台木の主根の側根からの再分化個体を形質転換個体として取得することを特徴とする方法。

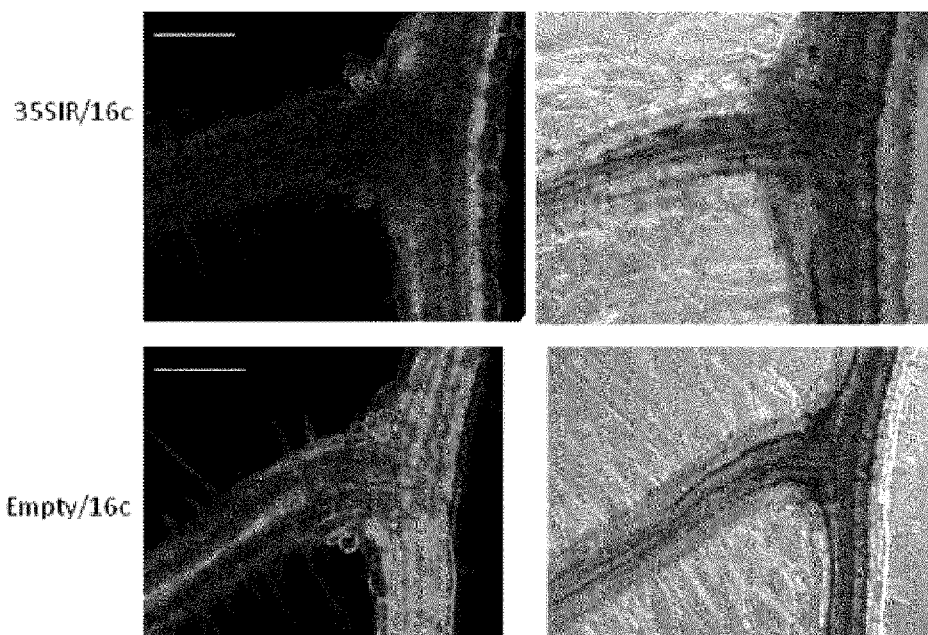
[図1]



[図2]

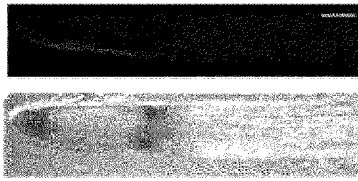


[図3]

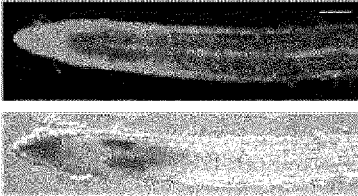
Bar = 200  $\mu$ m

[図4]

355IR/16c



Empty/16c

Bar = 100  $\mu$ m

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2011/078150

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

C12N15/09(2006.01) i, A01H1/00(2006.01) i, C12N15/113(2010.01) 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, A01H1/00, C12N15/113

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	1996-2012
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2012	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2012

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

CA/BIOSIS/MEDLINE (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), PubMed, WPI

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	MOLNAR, A. et al., Small silencing RNAs in plants are mobile and direct epigenetic modification in recipient cells., Science, 2010.05.14, Vol.328, No.5980, pp.872-5, entire text	1/2-3
Y	GITTINS, J.R. et al., Transgene expression in the vegetative tissues of apple driven by the vascular-specific rolC and CoYMV promoters., Transgenic Res., 2003.08, Vol.12, No.4, pp.391-402, entire text	1-3
A	DUNOYER, P. et al., An endogenous, systemic RNAi pathway in plants., EMBO J., 2010.05.19, Vol.29, No.10, pp.1699-712, entire text	1-3

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  
08 February, 2012 (08.02.12)

Date of mailing of the international search report  
21 February, 2012 (21.02.12)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/078150

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DUNOYER, P. et al., Intra- and intercellular RNA interference in <i>Arabidopsis thaliana</i> requires components of the microRNA and heterochromatic silencing pathways., <i>Nat. Genet.</i> , 2007.07, Vol.39, No.7, pp.848-56, entire text	1-3
P,X	BAI, S. et al., A mobile signal transported over a long distance induces systemic transcriptional gene silencing in a grafted partner., <i>J. Exp. Bot.</i> , 2011.08, Vol.62, No.13, pp.4561-70, entire text	1-3
P,X	MELNYK, C.W. et al., Mobile 24 nt small RNAs direct transcriptional gene silencing in the root meristems of <i>Arabidopsis thaliana</i> ., <i>Curr. Biol.</i> , 2011.10.11, Vol.21, No.19, pp.1678-83, entire text	1-3



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, A01H1/00(2006.01)i, C12N15/113(2010.01)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, A01H1/00, C12N15/113

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 1971-2012年  
 日本国実用新案登録公報 1996-2012年  
 日本国登録実用新案公報 1994-2012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)  
 CA/BIOSIS/MEDLINE (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), PubMed, WPI

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/Y	MOLNAR, A. et al., Small silencing RNAs in plants are mobile and direct epigenetic modification in recipient cells., Science, 2010.05.14, Vol.328, No.5980, pp.872-5, 全文	1/2-3
Y	GITTINS, J.R. et al., Transgene expression in the vegetative tissues of apple driven by the vascular-specific rolC and CoYMV promoters., Transgenic Res., 2003.08, Vol.12, No.4, pp.391-402, 全文	1-3

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 08.02.2012	国際調査報告の発送日 21.02.2012
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) 幸田 俊希 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
A	DUNOYER, P. et al., An endogenous, systemic RNAi pathway in plants., EMBO J., 2010.05.19, Vol.29, No.10, pp.1699-712, 全文	1-3
A	DUNOYER, P. et al., Intra- and intercellular RNA interference in Arabidopsis thaliana requires components of the microRNA and heterochromatic silencing pathways., Nat. Genet., 2007.07, Vol.39, No.7, pp.848-56, 全文	1-3
P, X	BAI, S. et al., A mobile signal transported over a long distance induces systemic transcriptional gene silencing in a grafted partner., J. Exp. Bot., 2011.08, Vol.62, No.13, pp.4561-70, 全文	1-3
P, X	MELNYK, C.W. et al., Mobile 24 nt small RNAs direct transcriptional gene silencing in the root meristems of Arabidopsis thaliana., Curr. Biol., 2011.10.11, Vol.21, No.19, pp.1678-83, 全文	1-3