

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5177807号  
(P5177807)

(45) 発行日 平成25年4月10日(2013.4.10)

(24) 登録日 平成25年1月18日(2013.1.18)

(51) Int.Cl.		F I	
<b>C 1 2 N</b>	<b>15/09</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A
<b>C 1 2 N</b>	<b>15/113</b>	<b>(2010.01)</b>	C 1 2 N 15/00 G
<b>C 1 2 N</b>	<b>5/10</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 5/00 1 O 3
<b>A O 1 H</b>	<b>1/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A O 1 H 1/00 A

請求項の数 13 (全 37 頁)

(21) 出願番号	特願2006-334667 (P2006-334667)	(73) 特許権者	501167644 独立行政法人農業生物資源研究所 茨城県つくば市観音台2丁目1-2
(22) 出願日	平成18年12月12日(2006.12.12)	(73) 特許権者	501203344 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 茨城県つくば市観音台3-1-1
(65) 公開番号	特開2008-142038 (P2008-142038A)	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(43) 公開日	平成20年6月26日(2008.6.26)	(74) 代理人	100128048 弁理士 新見 浩一
審査請求日	平成21年8月19日(2009.8.19)	(72) 発明者	杉本 和彦 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
(出願人による申告)平成18年度農林水産技術会議事務局「ゲノム育種による効率的品種育成技術の開発」委託事業、産業活力再生特別措置法第30条の適用を受ける特許出願		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 植物の種子休眠を制御する S d r 4 遺伝子およびその利用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

植物の種子休眠を制御する機能を有する植物由来のタンパク質をコードする、下記(a)から(h)のいずれかに記載のDNAを植物細胞に導入し、該植物細胞から植物体を再生させる工程を含む、種子休眠が制御された形質転換植物体の製造方法。

(a) 配列番号：3 または 6 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA

(b) 配列番号：1 に記載の塩基配列における69～1100位、配列番号：2 に記載の塩基配列における1675～2706位、配列番号：4 に記載の塩基配列における69～1097位または配列番号：5 の塩基配列における1678～2706位を含むDNA

(c) 配列番号：3 または 6 に記載のアミノ酸配列において1～30個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列を含むタンパク質をコードするDNA

(d) 配列番号：1、2、4 または 5 に記載の塩基配列からなるDNAと90%以上の配列同一性を有するDNA

(e) 配列番号：9 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA

(f) 配列番号：8 に記載の塩基配列における1930～2994位を含むDNA

(g) 配列番号：9 に記載のアミノ酸配列において1～30個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列を含むタンパク質をコードするDNA

(h) 配列番号：8 に記載の塩基配列からなるDNAと90%以上の配列同一性を有するDNA

【請求項2】

植物が単子葉植物または双子葉植物である、請求項1に記載の製造方法。

10

20

## 【請求項3】

下記(A)又は(C)に記載のDNAを植物細胞に導入し、該植物細胞から植物体を再生させる工程を含む、種子休眠が制御された形質転換植物体の製造方法。

(A) 植物の種子休眠を制御する機能を有する植物由来のタンパク質をコードする下記(a)から(h)のいずれかに記載のDNAの転写産物と相補的な15塩基以上のアンチセンスRNAをコードするDNA;

(a) 配列番号：3または6に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA

(b) 配列番号：1に記載の塩基配列における69～1100位、配列番号：2に記載の塩基配列における1675～2706位、配列番号：4に記載の塩基配列における69～1097位または配列番号：5の塩基配列における1678～2706位を含むDNA

(c) 配列番号：3または6に記載のアミノ酸配列において1～30個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列を含むタンパク質をコードするDNA

(d) 配列番号：1、2、4または5に記載の塩基配列からなるDNAと90%以上の配列同一性を有するDNA

(e) 配列番号：9に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA

(f) 配列番号：8に記載の塩基配列における1930～2994位を含むDNA

(g) 配列番号：9に記載のアミノ酸配列において1～30個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列を含むタンパク質をコードするDNA

(h) 配列番号：8に記載の塩基配列からなるDNAと90%以上の配列同一性を有するDNA

(C) 配列番号：10に示されるDNA

## 【請求項4】

植物の種子休眠を制御するために用いる、請求項1から3のいずれかに記載の方法。

## 【請求項5】

植物の種子休眠を制御する機能が欠損した植物由来のタンパク質をコードする、下記(a)または(b)に記載のDNAを植物細胞に導入し、該植物細胞から植物体を再生させる工程を含む、形質転換植物体の製造方法。

(a) 配列番号：7に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA

(b) 配列番号：7に記載のアミノ酸配列において1～30個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列を含むタンパク質をコードするDNA

## 【請求項6】

前記DNAを含むベクターを植物細胞に導入する、請求項1から5のいずれかに記載の方法。

## 【請求項7】

前記形質転換植物体の子孫またはクローンを得る工程を更に含む、請求項1から6のいずれかに記載の方法。

## 【請求項8】

植物の種子休眠を制御する機能を有する植物由来のタンパク質をコードする、下記(a)から(d)のいずれかに記載のDNAを植物体の細胞内で発現させることを特徴とする、植物の発芽を抑制する方法。

(a) 配列番号：3または6に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA

(b) 配列番号：1に記載の塩基配列における69～1100位、配列番号：2に記載の塩基配列における1675～2706位、配列番号：4に記載の塩基配列における69～1097位または配列番号：5の塩基配列における1678～2706位を含むDNA

(c) 配列番号：3または6に記載のアミノ酸配列において1～30個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列を含むタンパク質をコードするDNA

(d) 配列番号：1、2、4または5に記載の塩基配列からなるDNAと90%以上の配列同一性を有するDNA

## 【請求項9】

植物の細胞内における、内因性の、植物の種子休眠を制御する機能を有する植物由来のタンパク質をコードする、下記(a)から(d)のいずれかに記載のDNAの発現を抑制す

10

20

30

40

50

ることを特徴とする、植物の発芽を促進する方法。

(a) 配列番号：3 または 6 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA

(b) 配列番号：1 に記載の塩基配列における69～1100位、配列番号：2 に記載の塩基配列における1675～2706位、配列番号：4 に記載の塩基配列における69～1097位または配列番号：5 の塩基配列における1678～2706位を含むDNA

(c) 配列番号：3 または 6 に記載のアミノ酸配列において1～30個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列を含むタンパク質をコードするDNA

(d) 配列番号：1、2、4 または 5 に記載の塩基配列からなるDNAと90%以上の配列同一性を有するDNA

【請求項10】

下記(A)又は(C)に記載のDNAを植物に導入することを特徴とする、請求項9に記載の方法。

(A) 植物の種子休眠を制御する機能を有する植物由来のタンパク質をコードする下記(a)から(d)のいずれかに記載のDNAの転写産物と相補的な15塩基以上のアンチセンスRNAをコードするDNA;

(a) 配列番号：3 または 6 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA

(b) 配列番号：1 に記載の塩基配列における69～1100位、配列番号：2 に記載の塩基配列における1675～2706位、配列番号：4 に記載の塩基配列における69～1097位または配列番号：5 の塩基配列における1678～2706位を含むDNA

(c) 配列番号：3 または 6 に記載のアミノ酸配列において1～30個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列を含むタンパク質をコードするDNA

(d) 配列番号：1、2、4 または 5 に記載の塩基配列からなるDNAと90%以上の配列同一性を有するDNA

(C) 配列番号：10 に示されるDNA

【請求項11】

植物の種子休眠を制御する機能を有する植物由来のタンパク質をコードする、下記(e)から(h)のいずれかに記載のDNAを植物体の細胞内で発現させることを特徴とする、植物の発芽を促進する方法。

(e) 配列番号：9 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA

(f) 配列番号：8 に記載の塩基配列における1930～2994位を含むDNA

(g) 配列番号：9 に記載のアミノ酸配列において1～30個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列を含むタンパク質をコードするDNA

(h) 配列番号：8 に記載の塩基配列からなるDNAと90%以上の配列同一性を有するDNA

【請求項12】

植物の細胞内における、内因性の、植物の種子休眠を制御する機能を有する植物由来のタンパク質をコードする、下記(e)から(h)のいずれかに記載のDNAの発現を抑制することを特徴とする、植物の発芽を抑制する方法。

(e) 配列番号：9 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA

(f) 配列番号：8 に記載の塩基配列における1930～2994位を含むDNA

(g) 配列番号：9 に記載のアミノ酸配列において1～30個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列を含むタンパク質をコードするDNA

(h) 配列番号：8 に記載の塩基配列からなるDNAと90%以上の配列同一性を有するDNA

【請求項13】

下記(A)に記載のDNAを植物に導入することを特徴とする、請求項12に記載の方法。

(A) 植物の種子休眠を制御する機能を有する植物由来のタンパク質をコードする、下記(e)から(h)のいずれかに記載のDNAの転写産物と相補的な15塩基以上のアンチセンスRNAをコードするDNA;

(e) 配列番号：9 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA

(f) 配列番号：8 に記載の塩基配列における1930～2994位を含むDNA

(g) 配列番号：9 に記載のアミノ酸配列において1～30個のアミノ酸が置換、欠失、

10

20

30

40

50

挿入、および/または付加したアミノ酸配列を含むタンパク質をコードするDNA

(h) 配列番号: 8に記載の塩基配列からなるDNAと90%以上の配列同一性を有するDNA

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、植物の種子休眠を制御するSdr4遺伝子およびその利用に関する。

【背景技術】

【0002】

植物の種子は、成熟にともないその発芽能力を獲得すると、適当な栽培環境（温度や光）が提供されるまで、みずから発芽を抑制する機能をもつ。一般に、この現象を種子休眠という。種子休眠は、作物が栽培化されるにしたがって、その程度が小さくなり、最近の品種・系統では、種子休眠性が弱くなったものが多い。種子休眠性が弱くなると、収穫前の種子でも、発芽に好ましい温度や水分が与えられることで、発芽がおこる（穂発芽性）。イネでは、穂発芽が生じることにより玄米品質の低下が生じることが問題となっている。また、乾燥した気候を好むムギ類の場合、降雨量の多い日本における栽培は穂発芽による品質の劣化が特に重要な問題となっている。このように穂発芽した種子は品質が大きく低下することから、農業上大きな問題となっており、穂発芽耐性の付与は穀類の育種上重要な目標となっている。

【0003】

種子休眠性（穂発芽性）の遺伝研究は、トウモロコシの易穂発芽変異体の解析により進展し、Vp1などの穂発芽変異体遺伝子が単離されてきた（非特許文献1）。植物ではアブシジン酸（ABA）により種子の発芽が抑制されることが知られており、これまでにシロイヌナズナのABA非感受性変異（abi）、発芽時にABA感受性が高まった変異（ahg）、ABA応答性の高まった変異（era）やABA合成異常（aba）の原因遺伝子が単離されてきた（非特許文献2）。またシロイヌナズナではジベレリン（GA）が発芽を促進することから、GAに対する感受性や生合成に関しても解析が進められ、関連する遺伝子が単離されてきた（非特許文献3）。これら変異体は種子休眠性以外にも変化が見られるが、より休眠性に特異的な変異体としてrdo1-4なども報告されている（非特許文献4）。近年は、休眠性の強いシロイヌナズナエコタイプであるCviからの休眠性関連遺伝子の同定が進み、休眠性に関わる14のQTL（DOG: Delay of Germination）の存在が報告されているが（非特許文献5）、さらに最近になりDOG1の遺伝子単離が報告された（非特許文献6）。DOG1は休眠性に関わる遺伝子であるが、Sdr4とは全く類似性を示さない遺伝子であった。

【0004】

イネにおいても穂発芽耐性あるいは種子休眠性に関わる遺伝子同定の取り組みがなされ、易穂発芽突然変異を用いて関与遺伝子が単離されている。すなわちイネミュータントパネルから単離されたシロイヌナズナaba1変異体に相当するゼオキサントニンエポキシダーゼ（ZEP）の変異体である（非特許文献7）。また、自然変異を用いた穂発芽性の遺伝解析により、5つのQTL（量的形質遺伝子座）が報告されている（非特許文献8）。その他、ジャポニカに近縁の雑草イネとインディカの組み合わせ、あるいは近縁野生種を利用した遺伝解析により、複数のQTLが見いだされている（非特許文献9 - 11）。これらの背景のもと、イネの種子休眠性（穂発芽性）の理解を深め、さらには穂発芽耐性改良にむけた品種育成を効率化するためには、自然変異を用いた遺伝子単離とそれによる種子休眠性の分子レベルでの理解が不可欠となっている。

【0005】

なお、本出願の発明に関連する先行技術文献情報を以下に示す。

【非特許文献1】McCarty Annual Review Plant Physiology & Plant Molecular Biology 46:71-93, 1995

【非特許文献2】総説、Gubler et al. Current Opinion in Plant Biology 8:183-187, 2005

【非特許文献3】総説、Peng and Harberd Current Opinion in Plant Biology 5:376-38

10

20

30

40

50

1, 2002

【非特許文献4】Peeters et al. *Physiologia Plantarum* 115:604-612, 2002

【非特許文献5】Alonso-Blanco et al. *Genetics* 164:711-729

【非特許文献6】Bentsink et al. *Proc Natl Acad Sci USA*. 103, 17042-17047

【非特許文献7】Agrawal et al. *Plant Physiology* 125:1248-1257, 2001

【非特許文献8】Lin et al. *TAG* 96:997-1003, 1998; Takeuchi et al. *TAG* 107:1174-1180, 2003

【非特許文献9】Gu et al. *Genetics* 166:1503-1516, 2004

【非特許文献10】*TAG* 110:1108-1118, 2005

【非特許文献11】Cai and Morishima *TAG* 100:840-846

【非特許文献12】Lin et al. *TAG* 96:997-1003, 1998

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、その目的は、植物の種子休眠を制御する新規な遺伝子を提供することにある。また、本発明は、該遺伝子を利用して植物の種子休眠を制御する方法を提供することを目的とする。さらに、被検植物の穂発芽耐性を検出する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】

【0007】

Sdr4遺伝子座は日本晴を反復親としたインディカであるKasalathの戻し交雑後代系統を用いたQTL解析により、イネ第7染色体長腕に見いだされたQTLである（非特許文献12）。本発明者らは、穂発芽耐性遺伝子であるSdr4を広大な染色体の領域から単離するために、マップベースクローニング法を利用して鋭意研究を行い、その塩基配列を単離・同定することに成功した。

【0008】

具体的には、まず、日本晴とKasalathの戻し交雑後代からSdr4領域がヘテロ型となり、他のゲノム領域の大部分が日本晴に置換された個体を選抜した。選抜個体の自殖後代100個体（F2集団相当）とその後代検定による連鎖解析、次いでマップベースクローニングに不可欠な大規模分離集団2,515個体（F2集団相当）によるSdr4領域の連鎖解析を行なった。得られた28個体の後代系統（F3系統相当）の出穂後6週間での穂発芽性程度を調べた結果、Sdr4遺伝子は、マーカーSdr4-SNP24およびSdr4-SNP28で挟まれた8.7kbpの領域に絞り込まれた。さらにこの候補遺伝子領域の解析を行なった結果、穂での発現が見られる2つの候補遺伝子が得られ、相補試験、ノックダウン系統による機能解析、ミュータントの単離によりSdr4の本体が候補遺伝子2であること、日本晴のSdr4にも発芽抑制能があることが示された。

【0009】

また、イネSdr4遺伝子と相同性の高いシロイヌナズナの遺伝子を検索した結果、最も相同性の高いAtSdr4L1は、発芽を制御する機能を有することを見出した。

さらに、Kasalath由来のSdr4をもつNIL(Sdr4)はその反復親である日本晴よりも高い穂発芽耐性を示したことから、Kasalath由来のSdr4の方が発芽抑制能が高いことが判明した。栽培イネ60種には、Sdr4遺伝子のハプロタイプは日本晴型とKasalath型の2つと、ごく一部でキメラ型が見られるだけであることから、日本晴型とKasalath型のSdr4遺伝子を判別することで穂発芽性難の遺伝子を選べるDNAマーカーとして使用できることを見出した。

【0010】

即ち、本発明者らは、穂発芽耐性遺伝子であるSdr4をマップベースクローニング法によりその塩基配列を単離・同定することに成功した。さらにイネの休眠性を容易に改変する手法を開発することに成功し、これにより本発明を完成するに至った。

【0011】

10

20

30

40

50

本発明は、より具体的には以下の〔 1 〕～〔 27 〕を提供するものである。

〔 1 〕 植物の種子休眠を制御する機能を有する植物由来のタンパク質をコードする、下記 ( a ) から ( h ) のいずれかに記載のDNA。

( a ) 配列番号： 3 または 6 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA

( b ) 配列番号： 1、 2、 4 または 5 に記載の塩基配列のコード領域を含むDNA

( c ) 配列番号： 3 または 6 に記載のアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および / または付加したアミノ酸配列を含むタンパク質をコードするDNA

( d ) 配列番号： 1、 2、 4 または 5 に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNA

( e ) 配列番号： 9 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA

( f ) 配列番号： 8 に記載の塩基配列のコード領域を含むDNA

( g ) 配列番号： 9 に記載のアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および / または付加したアミノ酸配列を含むタンパク質をコードするDNA

( h ) 配列番号： 8 に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNA

〔 2 〕 植物が単子葉植物または双子葉植物である、〔 1 〕に記載のDNA。

〔 3 〕 下記 ( a ) から ( d ) のいずれかに記載のDNA。

( a ) 〔 1 〕 または 〔 2 〕 に記載のDNAの転写産物と相補的なアンチセンスRNAをコードするDNA

( b ) 〔 1 〕 または 〔 2 〕 に記載のDNAの転写産物を特異的に開裂するリボザイム活性を有するRNAをコードするDNA

( c ) 植物細胞における発現時に、RNAi効果により、〔 1 〕 または 〔 2 〕 に記載のDNAの発現を抑制するRNAをコードするDNA

( d ) 植物細胞における発現時に、共抑制効果により、〔 1 〕 または 〔 2 〕 に記載のDNAの発現を抑制するRNAをコードするDNA

〔 4 〕 植物の種子休眠を制御するために用いる、〔 1 〕 から 〔 3 〕 のいずれかに記載のDNA。

〔 5 〕 〔 1 〕 に記載のタンパク質の変異体であって、植物の種子休眠を制御する機能が欠損した植物由来のタンパク質をコードする、下記 ( a ) または ( b ) に記載のDNA。

( a ) 配列番号： 7 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA

( b ) 配列番号： 7 に記載のアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および / または付加したアミノ酸配列を含むタンパク質をコードするDNA

〔 6 〕 〔 1 〕 から 〔 5 〕 のいずれかに記載のDNAを含むベクター。

〔 7 〕 〔 1 〕 から 〔 5 〕 のいずれかに記載のDNAまたは 〔 6 〕 に記載のベクターを保持する形質転換植物細胞。

〔 8 〕 〔 7 〕 に記載の形質転換植物細胞を含む形質転換植物体。

〔 9 〕 〔 8 〕 に記載の形質転換植物体の子孫またはクローンである、形質転換植物体。

〔 10 〕 〔 8 〕 または 〔 9 〕 に記載の形質転換植物体の繁殖材料。

〔 11 〕 〔 8 〕 または 〔 9 〕 に記載の形質転換植物体の製造方法であって、〔 1 〕 から 〔 5 〕 のいずれかに記載のDNAまたは 〔 6 〕 に記載のベクターを植物細胞に導入し、該植物細胞から植物体を再生させる工程を含む方法。

〔 12 〕 〔 1 〕 ( a ) から ( d ) のいずれかに記載のDNAを植物体の細胞内で発現させることを特徴とする、植物の発芽を抑制する方法。

〔 13 〕 植物の細胞内における、内因性の〔 1 〕 ( a ) から ( d ) のいずれかに記載のDNAの発現を抑制することを特徴とする、植物の発芽を促進する方法。

〔 14 〕 〔 3 〕 に記載のDNAを植物に導入することを特徴とする、〔 13 〕 に記載の方法。

〔 15 〕 〔 1 〕 ( e ) から ( h ) のいずれかに記載のDNAを植物体の細胞内で発現させることを特徴とする、植物の発芽を促進する方法。

10

20

30

40

50

〔 1 6 〕 植物の細胞内における、内因性の〔 1 〕( e ) から( h ) のいずれかに記載のDNAの発現を抑制することを特徴とする、植物の発芽を抑制する方法。

〔 1 7 〕 〔 3 〕 に記載のDNAを植物に導入することを特徴とする、〔 1 6 〕 に記載の方法。

〔 1 8 〕 被検植物について、〔 1 〕 に記載のDNAに相当する部位における変異を検出することを特徴とする、被検植物の穂発芽耐性を検出する方法。

〔 1 9 〕 変異が、一塩基多型変異である、〔 1 8 〕 に記載の方法。

〔 2 0 〕 以下の工程( a ) および( b ) を含む、被検植物について、穂発芽耐性を検出する方法。

( a ) 被検植物における〔 1 〕 に記載のDNAに相当する部位における多型部位の塩基種を決定する工程

( b ) ( a ) で決定された多型部位の塩基種において、配列番号： 4 または 5 と同型となる変異が検出された場合に、被検植物は穂発芽耐性を有すると判定する工程

〔 2 1 〕 多型部位が、配列番号： 2 に記載の塩基配列における、223位、297位、531位、1145位、1156-1157位、1411位、1624位、1945位、2027位、2182-2184位、2188位、2190位、2191位、2193位、2194位、2195位、2280位、2494位、3092位から選択される少なくとも一つの多型部位に相当する部位である、〔 1 8 〕 から〔 2 0 〕 のいずれかに記載の方法。

〔 2 2 〕 多型部位の塩基種の変異が、配列番号： 2 に記載の塩基配列における、223位の塩基種がGからA、297位の塩基種がAからG、530位と531位間への1塩基(A)の挿入、1145位の塩基種がAからG、1156-1157位の2塩基の欠失、1411位における4塩基(ACCC)の挿入、1624位の塩基種がCからG、1945位の塩基種がGからT、2027位の塩基種がAからG、2182-2184位の3塩基(CGG)の欠失、2188位の塩基種がCからG、2190位の塩基種がGからC、2191位の塩基種がCからA、2193位の塩基種がGからC、2194位の塩基種がGからT、2195位の塩基種がAからC、2280位の塩基種がCからT、2494位の塩基種がGからC、3092位の塩基種がCからT、から選択される少なくとも一つの変異である場合に、被検植物の穂発芽耐性がより高いと判定する、〔 2 1 〕 に記載の方法。

〔 2 3 〕 〔 1 〕 に記載のDNAとストリンジェントな条件で特異的にハイブリダイズし、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するオリゴヌクレオチドを含む、穂発芽耐性を検出するためのプライマー。

〔 2 4 〕 配列番号： 1 1 または 1 2 に記載の塩基配列からなる、〔 2 3 〕 に記載のプライマー。

〔 2 5 〕 〔 1 〕 に記載のDNAとストリンジェントな条件で特異的にハイブリダイズし、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するオリゴヌクレオチドを含む、穂発芽耐性を検出するためのプローブ。

〔 2 6 〕 〔 2 1 〕 に記載の多型部位を含む領域に特異的にハイブリダイズすることを特徴とする、〔 2 5 〕 に記載のプローブ。

〔 2 7 〕 以下の( a ) および( b ) に記載の工程を含む、種子休眠を制御する機能を有する植物を選抜する方法；

( a ) 穂発芽耐性を有する植物と任意の機能を有する植物とが交配された品種を作製する工程、

( b ) 〔 1 8 〕 に記載の方法により、工程( a ) で作製された植物の穂発芽耐性を検出する工程。

【発明の効果】

【 0 0 1 2 】

本遺伝子の過剰発現あるいはKasalath型または日本晴型Sdr4の導入によりイネの穂発芽耐性を強くすることが可能である。形質転換に要する期間は交配による遺伝子移入に比較してきわめて短期間であり、他の形質の変化を伴わないままに穂発芽耐性の向上に資することが可能であり、イネ品種の育成に貢献出来る。

【 0 0 1 3 】

10

20

30

40

50

また、シロイヌナズナにおけるSdr4の同祖遺伝子AtSdr4L1も発芽制御に関わることが明らかになったことから、本発明で明らかとなったSdr4遺伝子は、単子葉植物から双子葉植物に至るまで植物全般において発芽の調節を行っている因子であるといえる。したがって、本遺伝子は、イネ科作物であるオオムギやコムギの穂発芽耐性を向上するためにも有用である。

【0014】

〔発明の実施の形態〕

本発明は、植物の種子休眠を制御する新規な遺伝子Sdr4、および該遺伝子を利用して植物の種子休眠を制御する方法に関する。本発明者らにより種子休眠との関係が明らかになった、日本晴のSdr4遺伝子のcDNAの塩基配列を配列番号：1に、ゲノムDNAの塩基配列を配列番号：2に、これら遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列を配列番号：3に示す。KasalathのSdr4遺伝子のcDNAの塩基配列を配列番号：4に、ゲノムDNAの塩基配列を配列番号：5に、これら遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列を配列番号：6に示す。また、シロイヌナズナのAtSdr4L1遺伝子のゲノムDNAの塩基配列を配列番号：8に、該遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列を配列番号：9に示す。

10

【0015】

イネの量的形質遺伝子座(QTL)のSdr4は、これまでイネの種子休眠に関与する遺伝子座として、イネ第7染色体長腕という広大な領域のいずれかの場所に存在するものとして知られていた。本発明者らは、マップベースクローニングの手法を利用することにより、イネ第7染色体におけるSdr4遺伝子の存在領域の絞り込みを行い、遂に単一の遺伝子として同定することに成功した。さらに、Sdr4遺伝子と相同性の高いシロイヌナズナのAtSdr4L1遺伝子が種子休眠に関与することを見出した。

20

【0016】

本発明において「種子休眠」とは、植物の種子が適当な栽培環境が提供されるまで、自ら発芽を抑制する機能をいう。言い換えると、種子休眠を抑制することで発芽は促進される。適当な栽培環境として好ましくは、発芽に適した温度、光、水分の供給等が挙げられるが、これに限定されるものではない。

【0017】

本発明は、植物の種子休眠を制御する機能を有する植物由来のSdr4遺伝子およびAtSdr4L1遺伝子に関する。

30

本発明のSdr4遺伝子としては、具体的には、植物の種子休眠を促進する機能を有する植物由来のタンパク質をコードする、下記(a)から(d)のいずれかに記載のDNAが含まれる。

(a) 配列番号：3または6に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA。

(b) 配列番号：1、2、4または5に記載の塩基配列のコード領域を含むDNA。

(c) 配列番号：3または6に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列を含むタンパク質をコードするDNA。

(d) 配列番号：1、2、4または5に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA。

40

【0018】

また、本発明のAtSdr4L1遺伝子としては、具体的には、植物の種子休眠を抑制する機能を有する植物由来のタンパク質をコードする、下記(e)から(h)のいずれかに記載のDNAが含まれる。

(e) 配列番号：9に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA。

(f) 配列番号：8に記載の塩基配列のコード領域を含むDNA。

(g) 配列番号：9に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列を含むタンパク質をコードするDNA。

(h) 配列番号：8に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブ

50



リサイズするDNA。

【0019】

本発明のSdr4遺伝子またはAtSdr4L1遺伝子を利用することにより、例えば、組み換えタンパク質の調製や発芽能が改変された形質転換植物体を作成することなどが可能となる。

本発明において、本発明の遺伝子が由来する植物としては、特に制限はないが、例えばイネ、トウモロコシ、コムギ、オオムギ、エンバク、ハトムギ、イタリアンライグラス、ペレニアルライグラス、チモシー、メドーフェスク、キビ、アワ、サトウキビ、パールミレット等の単子葉植物や、ナタネ、ダイズ、ワタ、トマト、ジャガイモ等の双子葉植物が挙げられる。また例えば花卉植物としては、キク、バラ、カーネーション、シクラメン等が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の遺伝子が由来する植物として、好ましくは単子葉植物または双子葉植物が挙げられ、より好ましくは、イネ、コムギ、シロイヌナズナを挙げることができる。

10

【0020】

本発明の「Sdr4遺伝子」、「AtSdr4L1遺伝子」はそれぞれ、「Sdr4タンパク質」、「AtSdr4L1タンパク質」をコードしうるものであれば、その形態に特に制限はなく、「Sdr4遺伝子」、「AtSdr4L1遺伝子」にはそれぞれ、cDNAの他、ゲノムDNA、化学合成DNAなども含まれる。また、Sdr4遺伝子はSdr4タンパク質を、AtSdr4L1遺伝子はAtSdr4L1タンパク質をコードするものであれば、遺伝暗号の縮重に基づく任意の塩基配列を有するDNAが含まれる。

【0021】

本発明の遺伝子のコード領域は、例えば、配列番号：1に記載の塩基配列における69～1100位、配列番号：2に記載の塩基配列における1675～2706位、配列番号：4に記載の塩基配列における69～1097位、配列番号：5の塩基配列における1678～2706位、配列番号：8に記載の塩基配列における1930～2994位の領域を挙げることができる。

20

【0022】

ゲノムDNAおよびcDNAの調製は、当業者にとって常套手段を利用して行うことが可能である。ゲノムDNAは、例えば、植物からゲノムDNAを抽出し、ゲノミックライブラリー（ベクターとしては、プラスミド、ファージ、コスミド、BAC、PACなどが利用できる）を作成し、これを展開して、Sdr4遺伝子（例えば、配列番号：1、2、4または5のいずれかに記載のDNA）またはAtSdr4L1遺伝子（例えば、配列番号：8に記載のDNA）を基に調製したプローブを用いてコロニーハイブリダイゼーションあるいはブランクハイブリダイゼーションを行うことにより調製することが可能である。また、Sdr4遺伝子またはAtSdr4L1遺伝子に特異的なプライマーを作成し、これを利用したPCRをおこなうことにより調製することも可能である。また、cDNAは、例えば、植物から抽出したmRNAを基にcDNAを合成し、これをZAP等のベクターに挿入してcDNAライブラリーを作成し、これを展開して、上記と同様にコロニーハイブリダイゼーションあるいはブランクハイブリダイゼーションを行うことにより、また、PCRを行うことにより調製することが可能である。

30

【0023】

さらに、Sdr4遺伝子またはAtSdr4L1遺伝子は広く植物界に存在すると考えられるため、Sdr4遺伝子またはAtSdr4L1遺伝子には、種々の植物に存在する相同遺伝子も含まれる。ここで「相同遺伝子」とは、種々の植物において、イネまたはシロイヌナズナにおけるSdr4遺伝子産物またはAtSdr4L1遺伝子産物と機能的に同等なタンパク質をコードする遺伝子を指す。このようなタンパク質には、例えば、Sdr4タンパク質またはAtSdr4L1タンパク質の変異体、アレル、バリエーション、ホモログ、Sdr4タンパク質またはAtSdr4L1タンパク質の部分ペプチド、または、他のタンパク質との融合タンパク質などが挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0024】

本発明におけるSdr4タンパク質またはAtSdr4L1タンパク質の変異体としては、配列番号：3、6または9に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列からなる天然由来のタンパク質であって、

50

配列番号：3、6または9に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質を挙げることが出来る。また、配列番号：1、2、4、5または8に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズする天然由来のDNAよりコードされるタンパク質であって、配列番号：1、2、4、5または8に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質も、Sdr4タンパク質またはAtSdr4L1タンパク質の変異体として挙げることができる。

#### 【0025】

本発明において、変異するアミノ酸数は特に制限されないが、通常、30アミノ酸以内であり、好ましくは15アミノ酸以内であり、さらに好ましくは5アミノ酸以内（例えば、3アミノ酸以内）であると考えられる。変異するアミノ酸残基においては、アミノ酸側鎖の性質が保存されている別のアミノ酸に変異されることが望ましい。例えばアミノ酸側鎖の性質としては、疎水性アミノ酸（A、I、L、M、F、P、W、Y、V）、親水性アミノ酸（R、D、N、C、E、Q、G、H、K、S、T）、脂肪族側鎖を有するアミノ酸（G、A、V、L、I、P）、水酸基含有側鎖を有するアミノ酸（S、T、Y）、硫黄原子含有側鎖を有するアミノ酸（C、M）、カルボン酸及びアミド含有側鎖を有するアミノ酸（D、N、E、Q）、塩基含有側鎖を有するアミノ酸（R、K、H）、芳香族含有側鎖を有するアミノ酸（H、F、Y、W）を挙げることができる（括弧内はいずれもアミノ酸の一文字標記を表す）。あるアミノ酸配列に対する1又は複数個のアミノ酸残基の欠失、付加及び/又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列を有するポリペプチドがその生物学的活性を維持することはすでに知られている。

#### 【0026】

本発明において「機能的に同等」とは、対象となるタンパク質が、Sdr4タンパク質またはAtSdr4L1タンパク質と同等の生物学的機能や生化学的機能を有することを指す。本発明において、Sdr4タンパク質の生物学的機能や生化学的機能としては、例えば種子休眠性、AtSdr4L1タンパク質の生物学的機能や生化学的機能としては、例えば種子発芽性を挙げることができる。生物学的な性質には発現する部位の特異性や、発現量等も含まれる。

#### 【0027】

相同遺伝子を単離するための当業者によく知られた方法としては、ハイブリダイゼーション技術（Southern, E. M., Journal of Molecular Biology, Vol. 98, 503, 1975）やポリマーゼ連鎖反応（PCR）技術（Saiki, R. K., et al. Science, vol. 230, 1350-1354, 1985, Saiki, R. K. et al. Science, vol.239, 487-491,1988）が挙げられる。即ち、当業者にとっては、Sdr4遺伝子の塩基配列（例えば、配列番号：1、2、4または5のいずれかに記載のDNA）またはAtSdr4L1遺伝子の塩基配列（例えば、配列番号：8に記載のDNA）もしくはその一部をプローブとして、またSdr4遺伝子またはAtSdr4L1遺伝子に特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドをプライマーとして、種々の植物からSdr4遺伝子またはAtSdr4L1遺伝子の相同遺伝子を単離することは通常行いうることである。

#### 【0028】

このような相同遺伝子をコードするDNAを単離するためには、通常ストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーション反応を行なう。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は当業者であれば、適宜選択することができる。一例を示せば、25%ホルムアミド、より厳しい条件では50%ホルムアミド、4xSSC、50mM Hepes pH7.0、10xデンハルト溶液、20µg/ml変性サケ精子DNAを含むハイブリダイゼーション溶液中、42℃で一晩プレハイブリダイゼーションを行った後、標識したプローブを添加し、42℃で一晩保温することによりハイブリダイゼーションを行う。その後の洗浄における洗浄液および温度条件は、「1xSSC、0.1% SDS、37℃」程度で、より厳しい条件としては「0.5xSSC、0.1% SDS、42℃」程度で、さらに厳しい条件としては「0.2xSSC、0.1% SDS、65℃」程度で実施することができる。このようにハイブリダイゼーションの洗浄の条件が厳しくなるほどプローブ配列と高い相同性を有するDNAの単離を期待しうる。但し、上記SSC、SDSおよび温度の条件の組み合わせは例示であり、当業者であれば、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーを決定する上記若しくは他の要素（例えば、プローブ濃度、プローブの長さ、ハイ

ブリダイゼーション反応時間など)を適宜組み合わせることにより、上記と同様のストリンジェンシーを実現することが可能である。

【0029】

単離されたDNAの相同性は、アミノ酸配列全体で、少なくとも50%以上、さらに好ましくは70%以上、さらに好ましくは90%以上(例えば、95%、96%、97%、98%、99%以上)の配列の同一性を有する。配列の相同性は、BLASTN(核酸レベル)やBLASTX(アミノ酸レベル)のプログラム(Altschul et al. J. Mol. Biol., 215: 403-410, 1990)を利用して決定することができる。該プログラムは、Karlin及びAltschulによるアルゴリズムBLAST (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:2264-2268, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 5873-5877, 1993)に基づいている。BLASTNによって塩基配列を解析する場合には、パラメーターは例えばscore = 100、wordlength = 12とする。また、BLASTXによってアミノ酸配列を解析する場合には、パラメーターは例えばscore = 50、wordlength = 3とする。また、Gapped BLASTプログラムを用いて、アミノ酸配列を解析する場合は、Altschulら (Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402, 1997)に記載されているように行うことができる。BLASTとGapped BLASTプログラムを用いる場合には、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である。

10

【0030】

また、本発明は植物の種子休眠を制御するために用いるDNAであって下記(a)から(d)のいずれかに記載のDNAを提供する。

(a) Sdr4遺伝子またはAtSdr4L1遺伝子の転写産物と相補的なアンチセンスRNAをコードするDNA。

20

(b) Sdr4遺伝子またはAtSdr4L1遺伝子の転写産物を特異的に開裂するリボザイム活性を有するRNAをコードするDNA。

(c) 植物細胞における発現時に、RNAi効果により、Sdr4遺伝子またはAtSdr4L1遺伝子の発現を抑制するRNAをコードするDNA。

(d) 植物細胞における発現時に、共抑制効果により、Sdr4遺伝子またはAtSdr4L1遺伝子発現を抑制するRNAをコードするDNA。

【0031】

本発明において、Sdr4遺伝子またはAtSdr4L1遺伝子の発現を抑制する植物には特に制限はなく、植物の種子休眠を制御させたい所望の植物を用いることができるが、産業的な観点からは農作物が好適である。有用農作物としては、特に制限はないが、例えばイネ、トウモロコシ、コムギ、オオムギ、エンバク、ハトムギ、イタリアンライグラス、ペレニアルライグラス、チモシー、メドーフェスク、キビ、アワ、サトウキビ、パールミレット等の単子葉植物や、ナタネ、ダイズ、ワタ、トマト、ジャガイモ等の双子葉植物が挙げられる。

30

【0032】

本明細書における「Sdr4遺伝子またはAtSdr4L1遺伝子の発現を抑制」には、遺伝子の転写の抑制およびタンパク質への翻訳の抑制が含まれる。また、DNAの発現の完全な停止のみならず発現の減少も含まれる。

【0033】

「Sdr4遺伝子またはAtSdr4L1遺伝子の発現を抑制するために用いるDNA」の一つの態様は、Sdr4遺伝子またはAtSdr4L1遺伝子と相補的なアンチセンスRNAをコードするDNAである。植物細胞におけるアンチセンス効果は、一時的遺伝子発現法を用いて、電気穿孔法で導入したアンチセンスRNAが植物においてアンチセンス効果を発揮することにより、初めて実証された(Ecker and Davis, Proc. Natl. Acad. USA, 83: 5372, 1986)。その後、タバコやペチュニアにおいても、アンチセンスRNAの発現によって標的遺伝子の発現を低下させる例が報告されており(Krol et. al., Nature 333: 866, 1988)、現在では植物における遺伝子発現を抑制させる手段として確立している。

40

【0034】

アンチセンス核酸が標的遺伝子の発現を抑制する作用としては、以下のような複数の要

50

因が存在する。すなわち、三重鎖形成による転写開始阻害、RNAポリメラーゼによって局部的に開状ループ構造がつくられた部位とのハイブリッド形成による転写抑制、合成の進みつつあるRNAとのハイブリッド形成による転写阻害、イントロンとエキソンとの接合点でのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、スプライソソーム形成部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、mRNAとのハイブリッド形成による核から細胞質への移行抑制、キャッピング部位やポリ(A)付加部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、翻訳開始因子結合部位とのハイブリッド形成による翻訳開始抑制、開始コドン近傍のリボソーム結合部位とのハイブリッド形成による翻訳抑制、mRNAの翻訳領域やポリソーム結合部位とのハイブリッド形成によるペプチド鎖の伸長阻止、および核酸とタンパク質との相互作用部位とのハイブリッド形成による遺伝子発現抑制などである。これらは、転写、スプライシング、または翻訳の過程を阻害して、標的遺伝子の発現を抑制する(平島および井上「新生化学実験講座2 核酸IV 遺伝子の複製と発現」,日本生化学会編,東京化学同人, pp.319-347, 1993)。

10

## 【0035】

本発明で用いられるアンチセンス配列は、上記のいずれの作用で標的遺伝子の発現を抑制してもよい。一つの態様としては、遺伝子のmRNAの5'端近傍の非翻訳領域に相補的なアンチセンス配列を設計すれば、遺伝子の翻訳阻害に効果的であろう。しかし、コード領域もしくは3'側の非翻訳領域に相補的な配列も使用し得る。このように、遺伝子の翻訳領域だけでなく非翻訳領域の配列のアンチセンス配列を含むDNAも、本発明で利用されるアンチセンスDNAに含まれる。使用されるアンチセンスDNAは、適当なプロモーターの下流に連結され、好ましくは3'側に転写終結シグナルを含む配列が連結される。

20

## 【0036】

アンチセンスDNAは、例えば、配列番号：1、2、4、5または8に記載のDNAの配列情報を基にホスホロチオネート法(Stein, *Nucleic Acids Res.*, 16: 3209-3221, 1988)などにより調製することが可能である。調製されたDNAは、公知の方法で、所望の植物へ形質転換できる。アンチセンスDNAの配列は、形質転換する植物が持つ内因性遺伝子の転写産物と相補的な配列であることが好ましいが、遺伝子の発現を有効に阻害できる限り、完全に相補的でなくてもよい。転写されたRNAは、標的とする遺伝子の転写産物に対して好ましくは90%以上(例えば、95%、96%、97%、98%、99%以上)の相補性を有する。アンチセンス配列を用いて、効果的に標的遺伝子の発現を阻害するには、アンチセンスDNAの長さは、少なくとも15塩基以上であり、好ましくは100塩基以上であり、さらに好ましくは500塩基以上である。通常、用いられるアンチセンスDNAの長さは5kbよりも短く、好ましくは2.5kbよりも短い。

30

## 【0037】

内因性のSdr4遺伝子またはAtSdr4L1遺伝子の発現の抑制は、リボザイムをコードするDNAを利用して行うことも可能である。リボザイムとは触媒活性を有するRNA分子のことをいう。リボザイムには種々の活性を有するものがあるが、中でもRNAを切断する酵素としてのリボザイムの研究により、RNAの部位特異的な切断を目的とするリボザイムの設計が可能となった。リボザイムには、グループIイントロン型や、RNasePに含まれるM1RNAのように400ヌクレオチド以上の大きさのものもあるが、ハンマーヘッド型やヘアピン型と呼ばれる40ヌクレオチド程度の活性ドメインを有するものもある(小泉誠および大塚栄子、蛋白質核酸酵素, 35: 2191, 1990)。

40

## 【0038】

例えば、ハンマーヘッド型リボザイムの自己切断ドメインは、G13U14C15のC15の3'側を切断するが、活性にはU14が9位のAと塩基対を形成することが重要とされ、15位の塩基はCの他にAまたはUでも切断されることが示されている(Koizumi et. al., *FEBS Lett.* 228: 225, 1988)。リボザイムの基質結合部を標的的部位近傍のRNA配列と相補的になるように設計すれば、標的RNA中のUC、UUまたはUAという配列を認識する制限酵素的なRNA切断リボザイムを作出することが可能である(Koizumi et. al., *FEBS Lett.* 239: 285, 1988、小泉誠および大塚栄子、蛋白質核酸酵素, 35: 2191, 1990、Koizumi et. al., *Nucleic Acids.*

50

Res. 17: 7059, 1989)。

【 0 0 3 9 】

また、ヘアピン型リボザイムも、本発明の目的のために有用である。ヘアピン型リボザイムは、例えばタバコリングスポットウイルスのサテライトRNAのマイナス鎖に見出される(Buzayan, Nature 323: 349, 1986)。このリボザイムも、標的特異的なRNA切断を起こすように設計できることが示されている(Kikuchi and Sasaki, Nucleic Acids Res. 19: 67 51, 1992, 及び菊池洋, 化学と生物 30: 112, 1992)。

【 0 0 4 0 】

標的を切断できるよう設計されたりボザイムは、植物細胞中で転写されるようにカリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーターなどのプロモーターおよび転写終結配列に連結される。しかし、その際、転写されたRNAの5'末端や3'末端に余分な配列が付加されていると、リボザイムの活性が失われてしまうことがある。このようなとき、転写されたりボザイムを含むRNAからリボザイム部分だけを正確に切り出すために、リボザイム部分の5'側や3'側に、トリミングを行うためのシスに働く別のトリミングリボザイムを配置させることも可能である (Taira et. al., Protein Eng. 3: 733, 1990、Dzianott and Bujarski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 4823, 1989、Grosshans and Cech, Nucleic Acids Res. 19: 3875, 1991、Taira et. al., Nucleic Acids Res. 19: 5125, 1991)。

【 0 0 4 1 】

また、このような構成単位をタンデムに並べ、標的遺伝子内の複数の部位を切断できるようにして、より効果を高めることもできる(Yuyama et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 186: 1271, 1992)。このようなリボザイムを用いて本発明で標的となる遺伝子の転写産物を特異的に切断し、該遺伝子の発現を抑制することができる。

【 0 0 4 2 】

内在性遺伝子の発現の抑制はさらに、標的遺伝子配列と同一もしくは類似した配列を有するDNAの形質転換によってもたらされる「共抑制」によっても達成される。「共抑制」とは、植物に標的内在性遺伝子と同一若しくは類似した配列を有する遺伝子を形質転換により導入すると、導入する外来遺伝子および標的内在性遺伝子の両方の発現が抑制される現象のことをいう。共抑制の機構の詳細は明らかではないが、植物においてはしばしば観察される(Curr. Biol. 7: R793, 1997、Curr. Biol. 6: 810, 1996)。

【 0 0 4 3 】

例えば、Sdr4遺伝子またはAtSdr4L1遺伝子が共抑制された植物体を得るためには、Sdr4遺伝子またはAtSdr4L1遺伝子若しくはこれと類似した配列を有するDNAを発現できるように作製したベクターDNAを目的の植物へ形質転換し、得られた植物体からSdr4変異体またはAtSdr4L1変異体の形質を有する植物を選択すればよい。共抑制に用いる遺伝子は、標的遺伝子と完全に同一である必要はないが、少なくとも70%以上、好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上(例えば、95%、96%、97%、98%、99%以上)の配列の同一性を有する。

【 0 0 4 4 】

さらに、本発明における内在性遺伝子の発現の抑制は、標的遺伝子のドミナントネガティブの形質を有する遺伝子を植物へ形質転換することによっても達成することができる。ドミナントネガティブの形質を有する遺伝子とは、該遺伝子を発現させることによって、植物体が本来持つ内在性の野生型遺伝子の活性を消失もしくは低下させる機能を有する遺伝子のことをいう。

【 0 0 4 5 】

「Sdr4遺伝子またはAtSdr4L1遺伝子の発現を抑制するために用いるDNA」の他の一つの態様は、内因性のSdr4遺伝子またはAtSdr4L1遺伝子の転写産物と相補的なdsRNAをコードするDNAである。RNAiは、標的遺伝子配列と同一もしくは類似した配列を有する二重鎖RNA(以下dsRNA)を細胞内に導入すると、導入した外来遺伝子および標的内在性遺伝子の発現がいずれも抑制される現象である。細胞に約40~数百塩基対のdsRNAが導入されると、ヘリカーゼドメインを持つダイサー(Dicer)と呼ばれるRNaseIII様のヌクレアーゼがATP存

10

20

30

40

50

在下で、dsRNAを3'末端から約21~23塩基対ずつ切り出し、siRNA (short interference RNA) を生じる。このsiRNAに特異的なタンパク質が結合して、ヌクレアーゼ複合体 (RISC : RNA-induced silencing complex) が形成される。この複合体はsiRNAと同じ配列を認識して結合し、RNaseIII様の酵素活性によってsiRNAの中央部で標的遺伝子のmRNAを切断する。また、この経路とは別にsiRNAのアンチセンス鎖がmRNAに結合してRNA依存性RNAポリメラーゼ (RsRP) のプライマーとして作用し、dsRNAが合成される。このdsRNAが再びダイサーの基質となって、新たなsiRNAを生じて作用を増幅する経路も考えられている。

【0046】

本発明のRNAは、標的遺伝子mRNAのいずれかの領域に対するアンチセンスRNAをコードしたアンチセンスコードDNAと、標的遺伝子mRNAのいずれかの領域のセンスRNAをコードした

10

【0047】

本発明のdsRNAの発現システムを、ベクター等に保持させる場合の構成としては、同一のベクターからアンチセンスRNA、センスRNAを発現させる場合と、異なるベクターからそれぞれアンチセンスRNA、センスRNAを発現させる場合がある。例えば、同一のベクターからアンチセンスRNA、センスRNAを発現させる構成としては、アンチセンスコードDNAおよびセンスコードDNAの上流にそれぞれpolIII系のような短いRNAを発現し得るプロモーターを連結させたアンチセンスRNA発現カセット、センスRNA発現カセットをそれぞれ構築し、

これらカセットを同方向にあるいは逆方向にベクターに挿入することにより構成することが

できる。また、異なる鎖上に対向するようにアンチセンスコードDNAとセンスコードDNAと逆向きに配置した発現システムを構成することもできる。この構成では、アンチセンスRNAコード鎖とセンスRNAコード鎖とが対となった一つの二本鎖DNA (siRNAコードDNA) が

備えられ、その両側にそれぞれの鎖からアンチセンスRNA、センスRNAとを発現し得るよう

にプロモーターを対向して備えられる。この場合には、センスRNA、アンチセンスRNAの下

流に余分な配列が付加されることを避けるために、それぞれの鎖 (アンチセンスRNAコード鎖、

センスRNAコード鎖) の3'末端にターミネーターをそれぞれ備えることが好ましい。このターミネーターは、A (アデニン) 塩基を4つ以上連続させた配列などを用いることができる。また、このパリンドロームスタイルの発現システムでは、二つのプロモーターの種類を異ならせることが好ましい。

20

30

【0048】

また、異なるベクターからアンチセンスRNA、センスRNAを発現させる構成としては、例えば、アンチセンスコードDNAおよびセンスコードDNAの上流にそれぞれ polIII系のような短いRNAを発現し得るプロモーターを連結させたアンチセンスRNA発現カセット、センスRNA発現カセットをそれぞれ構築し、これらカセットを異なるベクターに保持させることにより構成することができる。

【0049】

本発明のRNAiにおいては、dsRNAとしてsiRNAが使用されたものであってもよい。「siRNA」は、細胞内で毒性を示さない範囲の短鎖からなる二重鎖RNAを意味し、例えば、15~49塩基対と、好適には15~35塩基対と、さらに好適には21~30塩基対とすることができる。あるいは、発現されるsiRNAが転写され最終的な二重鎖RNA部分の長さが、例えば、15~49塩基対、好適には15~35塩基対、さらに好適には21~30塩基対とすることができる。RNAiに用いるDNAは、標的遺伝子と完全に同一である必要はないが、少なくとも70%以上、好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の配列の相同性を有する。本発明のsiRNAとして、具体的には、配列番号：10に記載のsiRNAを挙げることができる。

40

【0050】

dsRNAにおけるRNA同士が対合した二重鎖RNAの部分は、完全に対合しているものに限らず、ミスマッチ (対応する塩基が相補的でない)、バルジ (一方の鎖に対応する塩基がない) などにより不対合部分が含まれていてもよい。本発明においては、dsRNAにおけるRNA

50

同士が対合する二重鎖RNA領域中に、バルジおよびミスマッチの両方が含まれていてもよい。

【0051】

本発明は、植物の種子休眠を制御する機能が欠損したSdr4変異体またはAtSdr4L1変異体を含む。

Sdr4変異体またはAtSdr4L1変異体は、それぞれSdr4タンパク質またはAtSdr4L1タンパク質のアミノ酸配列におけるアミノ酸残基を置換することにより変異を導入して作製される。具体的には、Sdr4タンパク質またはAtSdr4L1タンパク質のアミノ酸配列を公知の分子モデリングプログラム、たとえば、WHATIF (Vriend et al., J. Mol. Graphics (1990) 8, 52-56) を用いてその二次構造を予測し、さらに置換されるアミノ酸残基の全体に及ぼす影響を評価することにより行われる。適切な置換アミノ酸残基を決定した後、Sdr4タンパク質またはAtSdr4L1タンパク質をコードする塩基配列を含むベクターを鋳型として、通常行われるPCR法によりアミノ酸が置換されるように変異を導入することにより、Sdr4変異体またはAtSdr4L1変異体をそれぞれコードする遺伝子が得られる。

10

【0052】

本発明のSdr4変異体として、より具体的には、植物の種子休眠を制御する機能が欠損したSdr4変異体であって、植物由来のタンパク質をコードする、下記(a)または(b)に記載のDNAを挙げることができる。

(a) 配列番号：7に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA。

(b) 配列番号：7に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列を含むタンパク質をコードするDNA。

20

該Sdr4変異体は、発芽率の低い品種の発芽力を向上させるために使用することができる。言い換えれば、該変異体により休眠性の強い品種の発芽力を向上させることができる。

【0053】

なお、本発明者らにより、該Sdr4変異体は、配列番号：3に記載のアミノ酸配列における309~315位、または配列番号：6に記載のアミノ酸配列における308~314位に相当する7アミノ酸を欠失していることが判明した。従って、本発明のSdr4タンパク質は該7アミノ酸を有していることが好ましい。

【0054】

また本発明は、Sdr4遺伝子、AtSdr4L1遺伝子、またはSdr4遺伝子もしくはAtSdr4L1遺伝子の発現を抑制するDNAを含むベクターならびに形質転換植物細胞を提供する。

30

【0055】

本発明のベクターには、上述のRNAiを誘導するために構築されたベクターが含まれる。本発明のベクターは、本発明のDNAが含まれるため、細胞に導入された場合には該細胞において転写によって形成される一本鎖RNAが分子内で対合してdsRNAを形成する。このようなRNAiを誘導するために構築されたベクターは、結果として内在性遺伝子の転写活性化を誘導することができる。

【0056】

本発明のベクターとしては、内在性遺伝子の転写活性化に用いられる上記ベクターの他、形質転換体作製のために細胞内で本発明のDNAを発現させるベクター、例えば形質転換植物体作製のために植物細胞内で本発明のDNAを発現させるためのベクターも含まれる。植物細胞の形質転換に用いられるベクターとしては、該細胞内で挿入遺伝子が発現させることが可能なものであれば特に制限はない。例えばプラスミド、ファージ、またはコスミドなどを例示することができる。

40

また上記「植物細胞」には、種々の形態の植物細胞、例えば、懸濁培養細胞、プロトプラスト、葉の切片、カルス等が含まれる。

【0057】

本発明のベクターは、本発明のDNAを恒常的または誘導的に発現させるためのプロモーターを含有してもよい。

当業者においては、所望のDNAを有するベクターを、一般的な遺伝子工学技術によって

50

、適宜、作製することが可能である。通常、市販の種々のベクターを利用することができる。

本発明のベクターは、宿主細胞内において本発明のDNAを保持したり、発現させるためにも有用である。

【0058】

本発明におけるDNAは、通常、適当なベクターへ担持（挿入）され、宿主細胞へ導入される。即ち本発明は、本発明のDNAまたはベクターを保持する宿主細胞を提供する。該ベクターとしては、挿入したDNAを安定に保持するものであれば特に制限されず、例えば宿主に大腸菌を用いるのであれば、クローニング用ベクターとしてpBluescriptベクター（Stratagene社製）などが好ましいが、市販の種々のベクターを利用することができる。本発明のDNAを内在性遺伝子を有する細胞内に導入および発現させる目的としてベクターを用いる場合には、特に発現ベクターが有用である。発現ベクターとしては、試験管内、大腸菌内、培養細胞内、生物個体内でDNAを発現するベクターであれば特に制限されないが、例えば、試験管内発現であればpBESTベクター（プロメガ社製）、大腸菌であればpETベクター（Invitrogen社製）、培養細胞であればpME18S-FL3ベクター（GenBank Accession No. AB009864）、生物個体であればpME18Sベクター（Mol Cell Biol. 8:466-472(1988)）、植物個体であればpBINPLUSベクター（van Engelen, F.A. et al., (1995). pBINPLUS: an improved plant transformation vector based on pBIN19. Transgenic Res. 4, 288-290.）などを例示することができる。ベクターへの本発明のDNAの挿入は、常法（Molecular Cloning, 5.61-5.63）により、例えば、制限酵素サイトを用いたりリガーゼ反応により行うことができる。

【0059】

上記宿主細胞としては特に制限はなく、目的に応じて種々の宿主細胞が用いられる。本発明のDNAを発現させるための細胞としては、例えば、細菌細胞（例：ストレプトコッカス、スタフィロコッカス、大腸菌、ストレプトミセス、枯草菌）、昆虫細胞（例：ドロソフィラS2、スポドプテラSF9）、動物細胞（例：CHO、COS、HeLa、C127、3T3、BHK、HEK293、Bowesメラノーマ細胞）および植物細胞を例示することができる。

【0060】

また、生体内で本発明のDNAを発現させる方法としては、本発明のDNAを適当なベクターに組み込み、例えば、ポリエチレングリコール法、エレクトロポレーション法、アグロバクテリウム法、リポソーム法、カチオニックリポソーム法、リン酸カルシウム沈殿法、電気パルス穿孔法（エレクトロポレーション）（Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 9.1-9.9）、リポフェクション法（GIBCO-BRL社製）、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法などの当業者に公知の方法により生体内に導入する方法などが挙げられる。

植物体内への投与は、ex vivo法であっても、in vivo法であってもよい。

【0061】

また、植物体内へ本発明のDNAを導入する場合、DNAは、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、ポリエチレングリコール法等を用いて、植物細胞に直接導入することもできるが、植物への遺伝子導入用プラスミドに組み込み、これをベクターとして、植物感染能のあるウイルスあるいは細菌を介して、間接的に植物細胞に導入することもできる。かかるウイルスとしては、例えば代表的なウイルスとして、カリフラワーモザイクウイルス、タバコモザイクウイルス、ジェミニウイルス等が挙げられ、細菌としては、アグロバクテリウム等が挙げられる。アグロバクテリウム法により、植物への遺伝子導入を行う場合には、市販のプラスミドを用いることができる。このようなベクターを用いて、植物体内へ本発明のDNAを導入する場合の方法としては、好ましくは、アグロバクテリウムを介して遺伝子を導入するリーフディスク法（Jorgensen, R.A. et al., (1996). Chalcone synthase cosuppression phenotypes in petunia flowers: comparison of sense vs. antisense constructs and single-copy vs. complex T-DNA sequences. Plant Mol Biol. 31, 957-973.）が挙げられる。



なおこれら上述の形質転換方法は、宿主となる植物などの種類（例えば単子葉植物、双子葉植物）に応じて適宜選択することが好ましい。

【0062】

本発明において「植物」とは、特に制限されないが、例えばイネ、トウモロコシ、コムギ、オオムギ、エンバク、ハトムギ、イタリアンライグラス、ペレニアルライグラス、チモシー、メドーフェスク、キビ、アワ、サトウキビ、パールミレット等の単子葉植物や、ナタネ、ダイズ、ワタ、トマト、ジャガイモ等の双子葉植物が挙げられる。花卉植物としては、キク、バラ、カーネーション、シクラメン等を挙げるができる。

【0063】

また、本発明は、本発明のDNAまたは本発明のベクターを保持する植物細胞を提供する。さらに本発明は、本発明の植物細胞を含む形質転換植物体を提供する。本発明のDNAまたは本発明のベクターが導入される細胞には、形質転換植物体作製のための植物細胞が含まれる。植物細胞としては特に制限はない。

本発明の植物細胞には、培養細胞の他、植物体中の細胞も含まれる。また、プロトプラスト、苗条原基、多芽体、毛状根も含まれる。

【0064】

形質転換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当業者に公知の方法で行うことが可能である。例えば、形質転換植物体を作成する手法については、ポリエチレングリコールによりプロトプラストへ遺伝子導入し植物体を再生させる方法、電気パルスによりプロトプラストへ遺伝子導入し植物体を再生させる方法、パーティクルガン法により細胞へ遺伝子を直接導入し、植物体を再生させる方法、およびアグロバクテリウムを介して遺伝子を導入し、植物体を再生させる方法などを挙げることができるが、特に制限されるものではない。いくつかの技術については既に確立し、本願発明の技術分野において広く用いられている。本発明においては、これらの方法を好適に用いることができる。

【0065】

本発明のDNAを含むベクターの導入により形質転換した植物細胞を効率的に選択するために、上記組み換えベクターは、適当な選抜マーカー遺伝子を含む、もしくは選抜マーカー遺伝子を含むプラスミドベクターと共に植物細胞へ導入することが好ましい。この目的に使用される選抜マーカー遺伝子は、例えば抗生物質カナマイシンまたはゲンタマイシンに耐性であるネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子、ハイグロマイシンに耐性であるハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子、および除草剤ホスフィノスリシンに耐性であるアセチルトランスフェラーゼ遺伝子等が挙げられる。

組み換えベクターを導入した植物細胞は、導入された選抜マーカー遺伝子の種類に従って適当な選抜用薬剤を含む公知の選抜用培地に置床し培養する。これにより形質転換された植物培養細胞を得ることができる。

【0066】

形質転換された植物細胞は、再分化させることにより植物体を再生させることが可能である。再分化の方法は植物細胞の種類により異なるが、例えばイネであればFujimuraら（Plant Tissue Culture Lett. 2:74 (1995)）の方法が挙げられ、トウモロコシであればShillitoら（Bio/Technology 7:581 (1989)）の方法やGorden-Kammら（Plant Cell 2:603(1990)）が挙げられ、ジャガイモであればVisserら（Theor. Appl. Genet 78:594 (1989)）の方法が挙げられ、タバコであればNagataとTakebe（Planta 99:12(1971)）の方法が挙げられ、シロイヌナズナであればAkamara（Plant Cell Reports 12:7-11 (1992)）の方法が挙げられ、ユーカリであれば土肥ら（特開平8-89113号公報）の方法が挙げられる。

【0067】

なお、このように再生され、かつ栽培した形質転換植物体中の導入された外来DNAの存在は、公知のPCR法やサザンハイブリダイゼーション法によって、または植物体中のDNAの塩基配列を解析することによって確認することができる。

この場合、形質転換植物体からのDNAの抽出は、公知のJ.Sambrookらの方法（Molecular Cloning、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989）に準じて実施するこ

10

20

30

40

50

とができる。

【0068】

再生させた植物体中に存在する本発明のDNAよりなる外来遺伝子を、PCR法を用いて解析する場合には、上記のように再生植物体から抽出したDNAを鋳型として増幅反応を行う。また、本発明のDNA、あるいは本発明により改変されたDNAの塩基配列に従って適当に選択された塩基配列をもつ合成したオリゴヌクレオチドをプライマーとして用い、これらを混合させた反応液中において増幅反応を行うこともできる。増幅反応においては、DNAの変性、アニーリング、伸張反応を数十回繰り返すと、本発明のDNA配列を含むDNA断片の増幅生成物を得ることができる。増幅生成物を含む反応液を例えばアガロース電気泳動にかけると、増幅された各種のDNA断片が分画されて、そのDNA断片が本発明のDNAに対応することを確認することが可能である。

10

【0069】

一旦、ゲノム内に本発明のDNAが導入された形質転換植物体を得られれば、該植物体から有性生殖または無性生殖により子孫を得ることが可能である。また、該植物体やその子孫あるいはクローンから繁殖材料（例えば、種子、果実、切穂、塊茎、塊根、株、カルス、プロトプラスト等）を得て、それらを基に該植物体を量産することも可能である。本発明には、本発明のDNAまたはベクターが導入された植物細胞、該細胞を含む植物体、該植物体の子孫およびクローン、並びに該植物体、その子孫、およびクローンの繁殖材料が含まれる。これらの植物細胞、該細胞を含む植物体、該植物体の子孫およびクローン、並びに該植物体、その子孫およびクローンの繁殖材料は、植物の種子休眠を制御する方法に使用することが可能である。

20

【0070】

本発明においては、植物のSdr4遺伝子の発現を促進することで、植物の発芽を抑制することができる。本発明の方法で作製した植物は、例えば有用農作物において穂発芽耐性を強くすることが可能である。

さらに、外来性のSdr4遺伝子を植物に導入することにより、植物の発芽抑制を図ることが考えられる。外来性のSdr4遺伝子が導入された植物の形質転換体の作製は、上記した方法により行うことができる。即ち、植物細胞内で機能するベクターに該遺伝子を挿入し、該ベクターを植物細胞に導入し、該植物細胞から植物体を再生させることにより、目的の形質転換植物体を作出することができる。

30

【0071】

さらに、Sdr4遺伝子の配列情報を基に、植物の内因性のSdr4遺伝子の発現を抑制するために用いる、アンチセンスRNAをコードするDNA、dsRNAをコードするDNA、リボザイム活性を有するRNAをコードするDNA、さらに共抑制効果を有するRNAをコードするDNA等を作製することも可能である。作製されたDNAは、植物の発芽を促進させるために使用できる。

【0072】

一方、本発明においては、植物のAtSdr4L1遺伝子の発現を促進することで、植物の発芽を促進することができる。本発明の方法で作製した植物は、例えば有用農作物、鑑賞用植物において発芽の促進を図ることができる。

【0073】

さらに、外来性のAtSdr4L1遺伝子を植物に導入することにより、植物の発芽促進を図ることが考えられる。外来性のAtSdr4L1遺伝子が導入された植物の形質転換体の作製は、上記した方法により行うことができる。即ち、植物細胞内で機能するベクターに該遺伝子を挿入し、該ベクターを植物細胞に導入し、該植物細胞から植物体を再生させることにより、目的の形質転換植物体を作出することができる。該方法により、穂発芽耐性の高い形質転換植物体を得ることができる。

40

【0074】

さらに、AtSdr4L1遺伝子の配列情報を基に、植物の内因性のAtSdr4L1遺伝子の発現を抑制するために用いる、アンチセンスRNAをコードするDNA、dsRNAをコードするDNA、リボザイム活性を有するRNAをコードするDNA、さらに共抑制効果を有するRNAをコードするDNA等

50

を作製することも可能である。作製されたDNAは、植物の発芽を抑制させるために使用できる。

【0075】

本発明者らは、Kasalath由来のSdr4遺伝子をもつNIL(Sdr4)はその反復親である日本晴よりも高い穂発芽耐性を示したことから、Kasalath由来のSdr4タンパク質の方が、発芽抑制能が高いことを見出した。従って、日本晴型とKasalath型のSdr4遺伝子を判別することで穂発芽性難の遺伝子を選択することができる。

【0076】

上記の知見に基づき本発明は、被検植物について、植物の種子休眠を制御する機能を有する植物由来のタンパク質をコードする、下記(a)から(h)のいずれかに記載のDNAに相当する部位における変異を検出することを特徴とする、被検植物の穂発芽耐性を検出する方法を提供する。

(a) 配列番号：3または6に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA

(b) 配列番号：1、2、4または5に記載の塩基配列のコード領域を含むDNA。

(c) 配列番号：3または6に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列を含むタンパク質をコードするDNA。

(d) 配列番号：1、2、4または5に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズするDNA。

(e) 配列番号：9に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA。

(f) 配列番号：8に記載の塩基配列のコード領域を含むDNA。

(g) 配列番号：9に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列を含むタンパク質をコードするDNA。

(h) 配列番号：8に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズするDNA。

【0077】

なお、本発明において「いずれかに記載の塩基配列」とは、上記DNAのいずれか少なくとも1以上の塩基配列を意味する。即ち、上記DNAの複数の塩基配列もしくはそれら各遺伝子の近傍DNA領域における変異を検出することによって、穂発芽耐性を検出する場合も、本発明に含まれる。

【0078】

また、上記(a)から(h)のいずれかに記載のDNAに「相当する部位」とは、種々の植物において、当該植物に存在する上記遺伝子の相同遺伝子における対応する部位をいう。

【0079】

本発明において「穂発芽耐性の検出」とは、穂発芽耐性が高いか低いかを判定するための検査が含まれる。本発明の方法においては、上記配列番号：4または5の遺伝子もしくは該遺伝子の近傍DNA領域において、配列番号：4または5と同型の変異が検出された場合には、穂発芽耐性がより高いと判定される。一方、上記配列番号：1または2の遺伝子もしくは該遺伝子の近傍DNA領域において、配列番号：1または2と同型の変異が検出された場合には、穂発芽耐性が低いと判定される。

【0080】

本発明において、穂発芽耐性が高いか否かは、公知の方法により判定することが可能である。一例としては、植物の種子の発芽率を測定する方法が挙げられる。イネ品種における穂発芽性難(穂発芽耐性が高い)の基準となる品種であるコシヒカリは、成熟後9日、すなわち出穂後50日における発芽率が47%であるのに対し、穂発芽性やや易であるキヌヒカリは97%であった(文献：藤田ら、香川県における水稻品種の穂発芽性とその発生要因。香川県農試研報44:1-11)。これに対して出穂後49日目の日本晴(穂発芽性やや易)が89%±0.8%の発芽率を示し、日本晴を背景としSdr4を持つNIL(Sdr4

10

20

30

40

50

)が15.5%±2.3%と低い値、すなわち、コシヒカリ以上に強い穂発芽耐性を示した。

#### 【0081】

本発明の方法により、被検植物における変異を検出することで、実際に穂発芽耐性を観察しなくても、被検植物の穂発芽耐性が高いか否かを判定することができる。

本発明における「遺伝子の近傍DNA領域」とは、通常、該遺伝子の近傍の染色体上の領域を指す。近傍とは、特に制限されるものではないが、通常、本発明の多型部位を含むDNA領域である。

#### 【0082】

上記本発明の検出方法における「変異」の位置は、予め規定することは困難であるが、通常、上記遺伝子のORF中、あるいは上記遺伝子の発現を制御する領域（例えば、プロモーター領域、エンハンサー領域等）中に存在するが、これらに限定されるものではない。また、この「変異」とは、上記遺伝子の発現量を変化させる、mRNAの安定性等の性質を変化させる、あるいは上記遺伝子によってコードされるタンパク質の有する活性を変化させるような変異であることが多いが、特に制限されない。本発明の変異としては、例えば、塩基の付加、欠失、置換、挿入変異等を挙げることができる。

#### 【0083】

本発明者らは、被検植物における、植物の種子休眠を制御する機能を有する植物由来のタンパク質をコードする、下記(a)から(h)のいずれかに記載のDNA領域において、穂発芽耐性に対して有意に関連する多型変異を見出すことに成功した。

(a) 配列番号：3または6に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA。

(b) 配列番号：1、2、4または5に記載の塩基配列のコード領域を含むDNA。

(c) 配列番号：3または6に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列を含むタンパク質をコードするDNA。

(d) 配列番号：1、2、4または5に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA。

(e) 配列番号：9に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA。

(f) 配列番号：8に記載の塩基配列のコード領域を含むDNA。

(g) 配列番号：9に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列を含むタンパク質をコードするDNA。

(h) 配列番号：8に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA。

従って、上記のいずれかに記載の塩基配列もしくは該遺伝子の近傍DNA領域上の多型部位について変異の有無を指標とする（塩基種を決定する）ことにより、穂発芽耐性を検出することが可能である。

#### 【0084】

なお、上記の「遺伝子の近傍DNA領域」とは、通常該遺伝子の近傍の染色体上の領域を指す。近傍とは特に制限されるものではないが、通常、本発明の多型部位を含むDNA領域であり、好ましくは多型部位または多型部位を含むLDブロック(連鎖不平衡ブロック)の末端部位から10kb以内の領域を指す。

#### 【0085】

前後10kbすなわち20kb以内の範囲にある多型は、Gabrielらの報告の通り、連鎖している可能性が高い(Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H et al. The structure of haplotype blocks in the human genome. Science 296, 2225-9. 2002)。

#### 【0086】

多型とは、遺伝学的には、1%以上の頻度で存在している1遺伝子におけるある塩基の変化と一般的に定義されるが、本発明における「多型」は、この定義に制限されない。本発明における多型の種類としては、例えば、一塩基多型、一から数十塩基(時には数千塩基

10

20

30

40

50

)が欠失あるいは挿入している多型等が挙げられる。さらに、多型部位の数も、1個に限定されず、複数個の多型であってもよい。

【0087】

また本発明は、被検者について、植物の種子休眠を制御する機能を有する植物由来のタンパク質をコードする、下記(a)から(h)のいずれかに記載のDNA領域に相当する塩基配列もしくは該塩基配列の近傍DNA領域における多型部位の塩基種を決定することを特徴とする、穂発芽耐性を検出する方法を提供する。

- (a) 配列番号：3または6に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA。
- (b) 配列番号：1、2、4または5に記載の塩基配列のコード領域を含むDNA。 10
- (c) 配列番号：3または6に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列を含むタンパク質をコードするDNA。
- (d) 配列番号：1、2、4または5に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジेंटな条件下でハイブリダイズするDNA。
- (e) 配列番号：9に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA。
- (f) 配列番号：8に記載の塩基配列のコード領域を含むDNA。
- (g) 配列番号：9に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列を含むタンパク質をコードするDNA。
- (h) 配列番号：8に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジेंटな条件下でハイブリダイズするDNA。 20

【0088】

本発明の穂発芽耐性を検出する方法における「多型部位」は、上記DNAのいずれかに記載の塩基配列もしくは該塩基配列の近傍DNA領域に存在する多型であれば、特に制限されない。具体的には、本発明の穂発芽耐性を検出する方法に利用可能な多型部位として、配列番号：2に記載の塩基配列における、223位、297位、531位、1145位、1156-1157位、1411位、1624位、1945位、2027位、2182-2184位、2188位、2190位、2191位、2193位、2194位、2195位、2280位、2494位、3092位から選択される少なくとも一つの多型部位に相当する多型部位を挙げることができる。(なお、本明細書においては、これらの多型部位を単に『本発明の多型部位』と記載する場合がある)。 30

【0089】

上記表中に示した多型部位の塩基種は配列表に示した配列に対して相補鎖側にある塩基種を示している場合があるが、本明細書において記載された前後配列を用いれば異同を確認することは当業者にとって容易であり、検出を行うにあたってはプラス鎖とマイナス鎖のどちらを調べても必然的にもう一方の結果を決定することができる。

【0090】

本発明の好ましい態様においては、上述した多型部位における塩基種の変異が、配列番号：2に記載の塩基配列における、223位の塩基種がGからA、297位の塩基種がAからG、530位と531位間への1塩基(A)の挿入、1145位の塩基種がAからG、1156-1157位の2塩基の欠失、1411位における4塩基(ACCC)の挿入、1624位の塩基種がCからG、1945位の塩基種がGからT、2027位の塩基種がAからG、2182-2184位の3塩基(CGG)の欠失、2188位の塩基種がCからG、2190位の塩基種がGからC、2191位の塩基種がCからA、2193位の塩基種がGからC、2194位の塩基種がGからT、2195位の塩基種がAからC、2280位の塩基種がCからT、2494位の塩基種がGからC、3092位の塩基種がCからT、である場合に、穂発芽耐性を有する、または穂発芽体制が高いと判定される。 40

【0091】

以上のように、本発明により、穂発芽耐性に関連する遺伝子上の領域が明らかになったことにより、当業者に過度の負担を強いることなく、被検植物の穂発芽耐性の検出を行うことができる。

本発明の多型部位における塩基種の決定は、当業者においては種々の方法によって行う 50

ことができる。一例を示せば、本発明の多型部位を含むDNAの塩基配列を直接決定することによって行うことができる。

【0092】

本発明の検出方法に供する「被検植物」としては、特に制限されないが、好ましくはイネ、さらに好ましくはイネの日本晴品種、Kasalath品種が挙げられる。

本発明の検出方法に供する被検試料は、通常、予め被検植物から取得された生体試料であることが好ましい。生体試料としては、例えばDNA試料を挙げることができる。本発明におけるDNA試料は、例えば被検植物の組織または細胞等から抽出した染色体DNA、あるいはRNAを基に調製することができる。

即ち本発明は、通常、被検者由来の生体試料（予め被検植物から取得された生体試料）を被検試料として検査に供する方法である。

当業者においては、公知の技術を用いて、適宜、生体試料の調製を行うことができる。例えば、DNA試料は、本発明の多型部位を含むDNAにハイブリダイズするプライマーを用いて、染色体DNA、あるいはRNAを鋳型としたPCR等によって調製することができる。

【0093】

本方法においては、次いで、単離したDNAの塩基配列を決定する。単離したDNAの塩基配列の決定は、当業者においては、DNAシーケンサー等を用いて容易に実施することができる。

予め塩基のバリエーションが明らかにされている多型部位について、その塩基種を決定するための様々な方法が公知である。本発明の塩基種の決定方法は、特に限定されない。例えば、PCR法を応用した解析方法として、TaqMan PCR法、AcycloPrime法、およびMALDI-TOF/MS法等が実用化されている。またPCRに依存しない塩基種の決定法としてInvader法やRCA法が知られている。更にDNAアレイを使って塩基種を決定することもできる。ここに述べた方法は、いずれも本発明における多型部位の塩基種の決定に応用できる。

【0094】

これらの方法はいずれも多量のサンプルを高速にジェノタイピングするために開発された方法である。MALDI-TOF/MSを除けば、通常、いずれの方法にも何らかの形で標識プローブなどを用意する必要がある。これに対して、標識プローブなどに頼らない塩基種決定法も古くから行われている。このような方法の一つとして、例えば、制限酵素断片長多型（Restriction Fragment Length Polymorphism / RFLP）を利用した方法やPCR-RFLP法等が挙げられる。

【0095】

RFLPは、制限酵素の認識部位の変異、あるいは制限酵素処理によって生じるDNA断片内における塩基の挿入または欠失が、制限酵素処理後に生じる断片の大きさの変化として検出できることを利用している。検出対象となる多型を含む塩基配列を認識する制限酵素が存在すれば、RFLPの原理によって多型部位の塩基を知ることができる。

また、CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) マーカーあるいはプライマーに変異を導入し、制限酵素サイトを作り出すdCAPS (derived CAPS) マーカーを使用することもできる。dCAPSマーカーは、PCRのプライマーにテンプレートのDNAとミスマッチを起こして、PCR産物上に制限酵素サイトを作り出すという手法である（特開2003-259898）。

【0096】

標識プローブを必要としない方法として、DNAの二次構造の変化を指標として塩基の違いを検出する方法も公知である。PCR-SSCPでは、1本鎖DNAの二次構造がその塩基配列の相違を反映することを利用している(Cloning and polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism analysis of anonymous Alu repeats on chromosome 11. Genomics. 1992 Jan 1; 12(1): 139-146.、Detection of p53 gene mutations in human brain tumors by single-strand conformation polymorphism analysis of polymerase chain reaction products. Oncogene. 1991 Aug 1; 6(8): 1313-1318.、Multiple fluorescence-based PCR-SSCP analysis with postlabeling.、PCR Methods Appl. 1995 Apr 1; 4(5): 275-282.)。PCR-SSCP法は、PCR産物を1本鎖DNAに解離させ、非変性ゲル上で分

10

20

30

40

50

離する工程により実施される。ゲル上の移動度は、1本鎖DNAの二次構造によって変動するので、もしも多型部位における塩基の相違があれば、移動度の違いとして検出することができる。

【0097】

その他、標識プローブを必要としない方法として、例えば、変性剤濃度勾配ゲル(denaturing gradient gel electrophoresis: DGGE法)等を例示することができる。DGGE法は、変性剤の濃度勾配のあるポリアクリルアミドゲル中で、DNA断片の混合物を泳動し、それぞれの不安定性の違いによってDNA断片を分離する方法である。ミスマッチのある不安定なDNA断片が、ゲル中のある変性剤濃度の部分まで移動すると、ミスマッチ周辺のDNA配列はその不安定性のために、部分的に1本鎖へと解離する。部分的に解離したDNA断片の移動度は、非常に遅くなり、解離部分のない完全な二本鎖DNAの移動度と差がつくことから、両者を分離することができる。

10

【0098】

更にDNAアレイを使って塩基種を決定することもできる(細胞工学別冊「DNAマイクロアレイと最新PCR法」,秀潤社,2000.4/20発行,pp97-103「オリゴDNAチップによるSNPの解析」,梶江慎一)。DNAアレイは、同一平面上に配置した多数のプローブに対してサンプルDNA(あるいはRNA)をハイブリダイズさせ、当該平面をスキャンすることによって、各プローブに対するハイブリダイズが検出される。多くのプローブに対する反応を同時に観察することができることから、例えば、多数の多型部位について同時に解析するには、DNAアレイは有用である。

20

【0099】

上記の方法以外にも、特定部位の塩基を検出するために、アリル特異的オリゴヌクレオチド(Allele Specific Oligonucleotide/ASO)ハイブリダイゼーション法が利用できる。アリル特異的オリゴヌクレオチド(ASO)は、検出すべき多型部位が存在する領域にハイブリダイズする塩基配列で構成される。ASOを試料DNAにハイブリダイズさせるとき、多型によって多型部位にミスマッチが生じるとハイブリッド形成の効率が低下する。ミスマッチは、サザンブロット法や、特殊な蛍光試薬がハイブリッドのギャップにインターカレーションすることにより消光する性質を利用した方法等によって検出することができる。また、リボヌクレアーゼAミスマッチ切断法によって、ミスマッチを検出することもできる。

30

【0100】

上記オリゴヌクレオチドのうち、配列番号:2に記載の塩基配列における、223位、297位、531位、1145位、1156-1157位、1411位、1624位、1945位、2027位、2182-2184位、2188位、2190位、2191位、2193位、2194位、2195位、2280位、2494位、3092位から選択される少なくとも一つの多型部位に相当する多型部位のいずれかに記載の多型部位を含むDNAにハイブリダイズし、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するオリゴヌクレオチドは、穂発芽耐性を検出するための試薬(検査薬)として利用できる。これは遺伝子発現を指標とする検査、または遺伝子多型を指標とする検査に使用される。

【0101】

該オリゴヌクレオチドは、本発明の上記多型部位のいずれかの多型部位を含むDNAに特異的にハイブリダイズするものである。ここで「特異的にハイブリダイズする」とは、通常のハイブリダイゼーション条件下、好ましくはストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下(例えば、サムブルックら,Molecular Cloning,Cold Spring Harbour Laboratory Press,New York,USA,第2版1989に記載の条件)において、他のタンパク質をコードするDNAとクロスハイブリダイゼーションを有意に生じないことを意味する。特異的なハイブリダイズが可能であれば、該オリゴヌクレオチドは、検出する遺伝子もしくは該遺伝子の近傍DNA領域における、上記植物の種子休眠を制御する機能を有する植物由来のタンパク質をコードするDNA塩基配列に対し、完全に相補的である必要はない。

40

【0102】

該オリゴヌクレオチドは、上記本発明の検査方法におけるプローブやプライマーとして

50

用いることができる。該オリゴヌクレオチドをプライマーとして用いる場合、その長さは、通常15bp～100bpであり、好ましくは17bp～30bpである。プライマーは、本発明の上記配列番号：2に記載の塩基配列における、223位、297位、531位、1145位、1156-1157位、1411位、1624位、1945位、2027位、2182-2184位、2188位、2190位、2191位、2193位、2194位、2195位、2280位、2494位、3092位から選択される少なくとも一つの多型部位に相当する多型部位のうち、いずれかの多型部位を含むDNAの少なくとも一部を増幅しうるものであれば、特に制限されない。

**【0103】**

本発明は、本発明の多型部位を含む領域を増幅するためのプライマー、および多型部位を含むDNA領域にハイブリダイズするプローブを提供する。

10

**【0104】**

本発明において、多型部位を含む領域を増幅するためのプライマーには、多型部位を含むDNAを鋳型として、多型部位に向かって相補鎖合成を開始することができるプライマーも含まれる。該プライマーは、多型部位を含むDNAにおける、多型部位の3'側に複製開始点を与えるためのプライマーと表現することもできる。プライマーがハイブリダイズする領域と多型部位との間隔は任意である。両者の間隔は、多型部位の塩基の解析手法に応じて、好適な塩基数を選択することができる。たとえば、DNAチップによる解析のためのプライマーであれば、多型部位を含む領域として、20～500、通常50～200塩基の長さの増幅産物が得られるようにプライマーをデザインすることができる。当業者においては、多型部位を含む周辺DNA領域についての塩基配列情報を基に、解析手法に応じたプライマーをデザインすることができる。本発明のプライマーを構成する塩基配列は、ゲノムの塩基配列に対して完全に相補的な塩基配列のみならず、適宜改変することができる。

20

**【0105】**

本発明のプライマーには、ゲノムの塩基配列に相補的な塩基配列に加え、任意の塩基配列を付加することができる。例えば、IIs型の制限酵素を利用した多型の解析方法のためのプライマーにおいては、IIs型制限酵素の認識配列を付加したプライマーが利用される。このような、塩基配列を修飾したプライマーは、本発明のプライマーに含まれる。更に、本発明のプライマーは、修飾することができる。例えば、蛍光物質や、ビオチンまたはジゴキシンのような結合親和性物質で標識したプライマーが各種のジェノタイプピング方法において利用される。これらの修飾を有するプライマーも本発明に含まれる。

30

本発明のプライマーの具体的な例としては、配列番号：11または12に記載のプライマーが挙げられるが、本発明のプライマーはこれに限定されるものではない。

本発明は、上記プライマーを有効成分として含有する、本発明の多型部位の検査薬またはキットも提供する。

**【0106】**

一方本発明において、多型部位を含む領域にハイブリダイズするプローブとは、多型部位を含む領域の塩基配列を有するポリヌクレオチドとハイブリダイズすることができるプローブを言う。より具体的には、プローブの塩基配列中に多型部位を含むプローブは本発明のプローブとして好ましい。あるいは、多型部位における塩基の解析方法によっては、プローブの末端が多型部位に隣接する塩基に対応するように、デザインされる場合もある。従って、プローブ自身の塩基配列には多型部位が含まれないが、多型部位に隣接する領域に相補的な塩基配列を含むプローブも、本発明における望ましいプローブとして示すことができる。

40

**【0107】**

言い換えれば、ゲノムDNA上の本発明の多型部位、または多型部位に隣接する部位にハイブリダイズすることができるプローブは、本発明のプローブとして好ましい。本発明のプローブには、プライマーと同様に、塩基配列の改変、塩基配列の付加、あるいは修飾が許される。例えば、Invader法に用いるプローブは、フラップを構成するゲノムとは無関係な塩基配列が付加される。このようなプローブも、多型部位を含む領域にハイブリダイズする限り、本発明のプローブに含まれる。本発明のプローブを構成する塩基配列は、ゲ

50



ノムにおける本発明の多型部位の周辺DNA領域の塩基配列をもとに、解析方法に応じてデザインすることができる。

【0108】

本発明のプライマーまたはプローブは、それを構成する塩基配列をもとに、任意の方法によって合成することができる。本発明のプライマーまたはプローブの、ゲノムDNAに相補的な塩基配列の長さは、通常15～100、一般に15～50、通常15～30である。与えられた塩基配列に基づいて、当該塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを合成する手法は公知である。更に、オリゴヌクレオチドの合成において、蛍光色素やビオチンなどで修飾されたヌクレオチド誘導体を利用して、オリゴヌクレオチドに任意の修飾を導入することもできる。あるいは、合成されたオリゴヌクレオチドに、蛍光色素などを結合する

10

【0109】

本発明のプローブの具体的な例としては、それぞれ配列番号：2に記載の塩基配列における、223位の塩基種がGからA、297位の塩基種がAからG、530位と531位間への1塩基(A)の挿入、1145位の塩基種がAからG、1156-1157位の2塩基の欠失、1411位における4塩基(ACC C)の挿入、1624位の塩基種がCからG、1945位の塩基種がGからT、2027位の塩基種がAからG、2182-2184位の3塩基(CGG)の欠失、2188位の塩基種がCからG、2190位の塩基種がGからC、2191位の塩基種がCからA、2193位の塩基種がGからC、2194位の塩基種がGからT、2195位の塩基種がAからC、2280位の塩基種がCからT、2494位の塩基種がGからC、3092位の塩基種がCからT、のいずれかの多型部位に相当する多型部位を含む領域にハイブリダイズするプ

20

【0110】

本発明はまた、本発明の穂発芽耐性を検出する方法に使用するための試薬(検査薬)を提供する。本発明の試薬は、前記本発明のプライマーおよび/またはプローブを含む。穂発芽耐性の検出においては上記、本発明の多型部位のいずれかに記載の多型部位を含むDNAを増幅するためのプライマーおよび/またはプローブを用いる。

【0111】

本発明の試薬には、塩基種の決定方法に応じて、各種の酵素、酵素基質、および緩衝液などを組み合わせることができる。酵素としては、DNAポリメラーゼ、DNAリガーゼ、あるいはHls制限酵素などの、上記の塩基種決定方法として例示した各種の解析方法に必要な

30

酵素を示すことができる。緩衝液は、これらの解析に用いる酵素の活性の維持に好適な緩衝液が、適宜選択される。更に、酵素基質としては、例えば、相補鎖合成用の基質等が用いられる。

さらに、本発明における試薬の別の態様は、本発明の多型部位を含むDNAとハイブリダイズするヌクレオチドプローブが固定された固相からなる、穂発芽耐性を検出するための試薬である。

これらは本発明の多型部位を指標とする検査に使用される。これらの調製方法に関しては、当業者に公知の方法で行なうことができる。

【0112】

本発明は、以下の(a)および(b)に記載の工程を含む、種子休眠を制御する機能を有する植物を選抜する方法を提供する。

40

(a) 穂発芽耐性を有する植物と任意の機能を有する植物とが交配された品種を作製する工程

(b) 上述の方法により、工程(a)で作製された植物の穂発芽耐性を検出する工程  
上記方法により、高い穂発芽耐性を有する植物を選抜することができる。

【実施例】

【0113】

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

〔実施例1〕 Sdr4遺伝子座について

50

量的形質遺伝子座 (QTL) のSdr4は第7染色体上、RFLPマーカーであるR1245近傍に見いだされた(Lin et al. TAG 96:997-1003, 1998)。生理実験の実験材料として用いた準同質遺伝子系統は以下の通り作成した。日本晴 / KasalathのF1に日本晴を4回戻し交雑し、1回の自殖を行ったBC4F2系統の中から第7染色体83.0~94.5cMの領域のみがヘテロ型になっている個体(98F2-23-140)を選抜した。次に98F2-23-140の自殖種子を99F2-50(n=50)を展開し、第7染色体83.0~94.5cMの領域のみがホモ型になっている個体(99F2-50-14)を選抜し、これを準同質遺伝子系統[NIL (Sdr4)]として用いた。準同質遺伝子系統[NIL(Sdr4)]と日本晴、そして、Kasalathの発芽率の変化を経時的に比較したところ、日本晴あるいはKasalathに比べてNIL(Sdr4)は5週目から8週目に至るまで発芽を強く抑制し、深い休眠性を付与する効果が認められた(図1)。

10

【0114】

〔実施例2〕 高精度連鎖解析

連鎖解析用の集団は日本晴とKasalathの戻し交雑後代系統世代を用いた。戻し交雑後代からSdr4領域がヘテロ型となり、他のゲノム領域の大部分が日本晴に置換された個体を選抜した。はじめに選抜個体の自殖後代100個体(F2集団相当)とその後代検定による連鎖解析を行った結果、Sdr4領域は、InDelマーカーであるSdr4-IND3(プライマー5'-TTTGGTTTCCCCGTGAGGTT-3'(配列番号:13)およびプライマー5'-GTCATAATTAAGCAGCCTATGGGTC-3'(配列番号:14))とSdr4-IND8(プライマー5'-ACACACCATTGTTCCAAGCA-3'(配列番号:15)およびプライマー5'-GGTCACAACCTGATAGGCCAAC-3'(配列番号:16))の間に位置づけられた(図2B)。次にマップベースクローニングに不可欠な大規模分離集団によるSdr4領域の連鎖解析を行った。Sdr4の分離集団2,515個体(F2集団相当)から、Sdr4を挟むマーカーであるRM3753とRM6042を用いてSdr4近傍に生じた組換え染色体を持つ60個体を選抜した。Sdr4の候補ゲノム領域内での組換え個体を同定するために、選抜した60個体についてSdr4-IND3とSdr4-IND8によるタイピングを行い、マッピングに利用できる個体をさらに28個体に絞り込んだ。これら28個体の後代系統(F3系統相当)を圃場に展開し、組み換え染色体ならびに非組み換え染色体がホモ化した個体をそれぞれ選抜した。遺伝子領域を狭めるために、日本晴ゲノム塩基配列とホールゲノムショットガン法により読まれたインディカ93-11の塩基配列を比較し、日本晴/Kasalath間で多型が出ることが予想される断片が増幅出来るプライマーを合成し、マッピングを行った。これによりRM3753とRM6042の間に19個のPCRマーカーを作成した。これらの固定系統(F4系統相当)を圃場

20

30

【0115】

〔実施例3〕 候補遺伝子領域の解析

KasalathのBACライブラリーからSdr4の候補領域を含むBACをPCRによりスクリーニングし、Sdr4の候補領域8.7kbpを含むNruI断片11.6kbpをクローン化するとともに塩基配列を決定した。日本晴とKasalathの間の一塩基多型は72箇所、挿入欠失は4箇所で見られた。この候補領域を含むゲノム塩基配列をRiceGAAS(<http://ricegaas.dna.affrc.go.jp/>)により解析した結果、3つの予測遺伝子が存在した(図3A)。3つの候補遺伝子を対象とし、ノーザンプロットあるいはRT-PCRによる発現の解析を行った結果、候補遺伝子1(Sdr4C1)と候補遺伝子2(Sdr4C2)は穂での発現が見られた(図4)。両候補遺伝子ともに、日本晴とKasalathの間でアミノ酸置換を伴う一塩基多型は認められるものの、機能の喪失が容易に予測されるような塩基多型は見出すことができなかった。

40

【0116】

〔実施例4〕 Sdr4遺伝子の特定のための相補試験

50

Sdr4候補領域8.7kbpとその前後を含むKasalath由来のNrul断片11.6kbpと候補遺伝子1の転写開始点と第一エキソンを含む0.4kbpの領域を欠失した断片をpPZP2H-lac(Fuse et al. Plant Biotechnology 18:219-222, 2001)に組み込み、アグロバクテリウムを介して日本晴に導入した。形質転換体の後代(T1)のDNAを抽出しサザンハイブリダイゼーションにより導入遺伝子をホモに持つ固定系統を選抜した。固定系統の種子の発芽試験を行った結果、11.6kbpのKasalath断片を導入した系統では発芽率が低下した(図3B)。また、候補遺伝子1の欠失変異体を導入した系統でも発芽率の低下が見られた。この結果から、Sdr4は11.6kbp断片上に存在するが、候補遺伝子1ではないことが明らかとなった。つぎに、候補遺伝子2を持つKasalath由来の3.3kbpの断片を用いた相補試験を行った。形質転換当代(T0)の種子(T1)を用い、発芽試験を行った結果、ベクターコントロールに比べ発芽率が低下していた(図3C)。この結果から、Sdr4の本体は候補遺伝子2であることが明らかとなった。オリゴキャップ法による5'RACEおよび3'RACEにより完全長cDNAを得た。アミノ酸配列は予測遺伝子と同じものであった(図5)。

#### 【0117】

##### 〔実施例5〕 Sdr4遺伝子のノックダウン系統による機能解析

候補遺伝子2がSdr4本体であることを証明するとともに日本晴およびKasalathのSdr4遺伝子の機能を比較するために、RNAiによるSdr4遺伝子のノックダウン系統を作成した。T1個体に入った種子について、出穂後5週間での発芽率を調べた結果、ベクターコントロールに比べて発芽率が上昇していた。この発芽率の増加は、日本晴のノックダウン系統ならびにNIL(Sdr4)のノックダウン系統ともに観察されたことから、日本晴、およびKasalathいずれのSdr4遺伝子も発芽抑制の機能を持つことが示された(図6)。Kasalath由来のSdr4をもつNIL(Sdr4)はその反復親である日本晴よりも高い穂発芽耐性を示したことから、Kasalath由来のSdr4の方が発芽抑制能が高いことが推測される。本実施例で使用したsiRNAの配列を配列番号:10に示す。

#### 【0118】

##### 〔実施例6〕 易穂発芽系統からのSdr4ミュータントの単離

ミュータントパネルから選抜した12種類の易穂発芽変異系統のDNAを鋳型としてSdr4遺伝子のコード領域の塩基配列を決定した。その結果、3つの系統においてSdr4遺伝子上に同じ21塩基の欠失変異が見いだされた(図5、M25)。見出されたそれぞれの系統のうち、欠失変異をヘテロにもつ個体に入った種子を、圃場で栽培し、出穂後5週間目の種子の発芽率を調べた結果、分離した野生型Sdr4を持つ系統では2~5%の発芽率を示すのに対して、欠失変異をヘテロに持った変異系統に入った種子の発芽率は31~33%であった(図7)。さらに、日本晴が1.9%の発芽率を示すのに対し、分離した変異をホモに持つ系統の自殖種子の発芽率はM25系統で100%、M100系統で99.3%もの発芽率を示した。これらの結果からも、Sdr4の本体が候補遺伝子2であること、日本晴のSdr4にも発芽抑制能があることが示された。

#### 【0119】

##### 〔実施例7〕 シロイヌナズナ同祖体遺伝子の解析

Sdr4のアミノ酸配列をクエリーとしてシロイヌナズナの類似の遺伝子を検索した結果、7つの類似の遺伝子が見いだされた(図8A)。もっとも類似性の高い、遺伝子名が記載されていないため、AtSdr4L1と命名した(図8B)。AtSdr4L1のT-DNAタグラインを得て、挿入変異をヘテロにもつ系統、ホモに持つ系統をPCRにより選抜し、それぞれの遺伝子型毎の発芽率を調べた結果、分離した野生型では平均95%の発芽率を示すのに対してT-DNAの挿入によりAtSdr4L1が破壊された系統は発芽率が14%に低下することが示された。また、変異をヘテロに持つ系統は80%の発芽率を示した(図8C)。イネのSdr4は発芽を抑制しているが、シロイヌナズナでもっとも類似性の高い遺伝子、AtSdr4L1は逆の機能を有することが示された。

#### 【0120】

##### 〔実施例8〕 日本晴型Sdr4とKasalath型Sdr4を判別するマーカー

日本晴型Sdr4(配列番号:2)の2280番目のシトシン(C)はKasalath型ではチミン(T

10

20

30

40

50

)となる一塩基多形が存在する。当該部位を含む領域は、2280番目の塩基がTの場合には、PstIの制限酵素認識部位(CTGCAG)となる(図9)。そこで、当該領域をプライマー2229F:5' CCACGTCGAGTCAGTCCAC 3'(配列番号:11)および2622R:5' CGAAGACGTAGTCCCTCGAC 3'(配列番号:12)を用いてPCRにより増幅した後、PstI処理を行なった。

その結果、カサラー型Sdr4を持つイネのPCR増幅断片はPstIにより切断され、360bpとなったが、日本晴型Sdr4を持つイネは切断されず、413bpのPCR産物が検出された(図9)。以上より、日本晴型Sdr4(配列番号:2)の2280番目のシトシンが、日本晴型Sdr4とKasalath型Sdr4を判別するマーカーとして使用できることが明らかとなった。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0121】

【図1】日本晴、Kasalath、準同質遺伝子系統NIL(Sdr4)の出穂後4週から8週目までの発芽率を示す図である。日本晴、Kasalath、NIL(Sdr4)の出穂後4週から8週目までの種子をサンプリングし、発芽試験を行なった。Kasalath由来のSdr4に染色体が置き換わったNIL(Sdr4)は発芽率が低下し、種子休眠性が強いことが示された。

【図2AB】Sdr4のマッピングの図および穂発芽感受性および耐性イネの写真である。A)LinらによるQTL解析の結果、Sdr4はR1245に存在することが示された。B)両マーカー間に新たにマーカーを作成し、組換え系統のタイピングを行なった結果、Sdr4-SNP11とSdr4-SNP8の間、108kbpまで候補領域を狭めることが出来た。

【図2C】図2ABの続きの図および写真である。C)大規模集団(n=2515)を用いた高精度連鎖解析を行なった。Sdr4-IND3とSdr4-IND8の間で組換えを起こした28系統の発芽率を調査した結果、Sdr4はRM1365とSdr4-IND5間に位置した。候補領域内に新たなマーカーを作成し、タイピングを行なった結果、Sdr4の候補領域はSdr4-SNP24からSdr4-SNP28の間8.7kbpであることが示された。

【図3A】Sdr4の候補遺伝子と相補試験の結果を示す図である。A)RiceGAASによる遺伝子予測の結果3つの予測遺伝子のORFが候補領域内に存在した。バーはInDelまたはSNPの位置を表す。候補領域8.7kbpを含むKasalathゲノムNruI断片(11.6kbp)、予測遺伝子1(Sdr4C1)のエキソン1を欠失した変異体、候補遺伝子2(Sdr4C2)のみを持つ3.3kbpのNruI-AlaI断片をバイナリーベクターであるpZP2H-Lacに挿入し、日本晴を形質転換した。

【図3BC】Sdr4の候補遺伝子と相補試験の結果を示す図である。B)野生型NruI断片および、欠失変異を持つNruI断片ともに日本晴の発芽率を低下させた。この結果、NruI断片上にSdr4が存在するが、Sdr4C1ではないことが示された。C)さらに、NruI-AlaI断片を用いた結果、発芽率の低下が見られた。これらの結果から、Sdr4C2がSdr4であることが示された。

【図4】Sdr4候補遺伝子の発現解析の結果を示す写真である。A)候補遺伝子1(Sdr4C1)の発現をノーザンプロット法により解析した。成葉、出穂後それぞれ0、3、7、14、28、42日後の穂(上段)と出穂後6週間目の吸水後0、0.3、1、3、9、24、48、72時間後の種子、吸水の際にABAとGA3を加えた種子(下段)からRNAを抽出し、解析した。B)候補遺伝子2(Sdr4C2)の発現をRT-PCRにより解析した。コントロールとしてUbq2遺伝子を用いた。

【図5】Sdr4蛋白のアミノ酸配列の比較を示す図である。Kasalath由来(Kas)、日本晴由来(M25)のアミノ酸配列を示す。日本晴由来のSdr4アミノ酸配列と異なるアミノ酸残基を四角で囲った。

【図6A】ノックダウン系統の解析結果を示す図および写真である。A)グルクロニダーゼ遺伝子(GUS)の一部をループとするRNAiコンストラクトを作成した。

【図6BC】ノックダウン系統の解析結果を示す図および写真である。B)日本晴及びNIL(Sdr4)にベクターコントロール(pZP2H2)およびRNAiコンストラクトを導入したアグロバクテリウムにより形質転換した。自殖後代からサザンプロット法により固定系統を選抜し、3個体から得た穂由来の出穂後5週目の種子を用いて発芽試験を行なった。C)発芽試験の結果をグラフ化した。

【図7】ミュータントパネルから見出されたSdr4変異系統の解析結果を示す図である。A

10

20

30

40

50

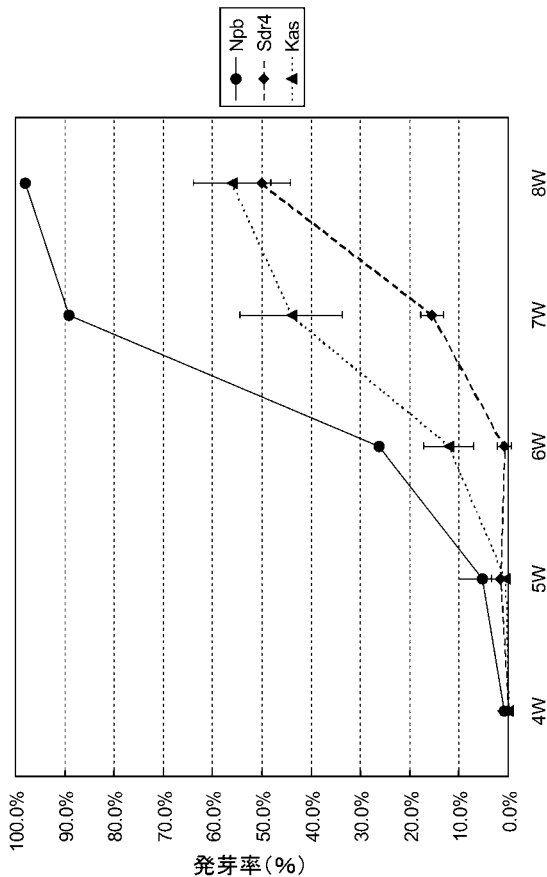
易穂発芽変異系統のSdr4遺伝子の塩基配列の解読により、Sdr4遺伝子の変異系統を得た。系統毎の発芽率（上段）とそれぞれの遺伝子型を調べた。Wは野生型Sdr4、Hは変異型Sdr4をヘテロに持つことを示す（下段）。B）遺伝子毎の発芽率をグラフ化した。

【図8 A B】シロイヌナズナの類縁体の解析結果を示す図である。A）Sdr4のアミノ酸配列をクエリーにし、シロイヌナズナゲノム内に存在する類縁体を調べた。その結果、7つの類縁体が見出された。これらの類縁関係をNJ法により表示した。Sdr4にもっとも類似したORFには遺伝子名が無く、AtSdr4L-1と命名した。B）AtSdr4L-1のT-DNAタグライン（SA LK\_022729）の遺伝子型をPCRにより解析し、分離した野生型（+/+）、ヘテロ型（+/-）、ホモ型（-/-）の発芽率を解析した。登熟後1週間の種子を吸水させ、その1週間後の発芽率をカウントした。

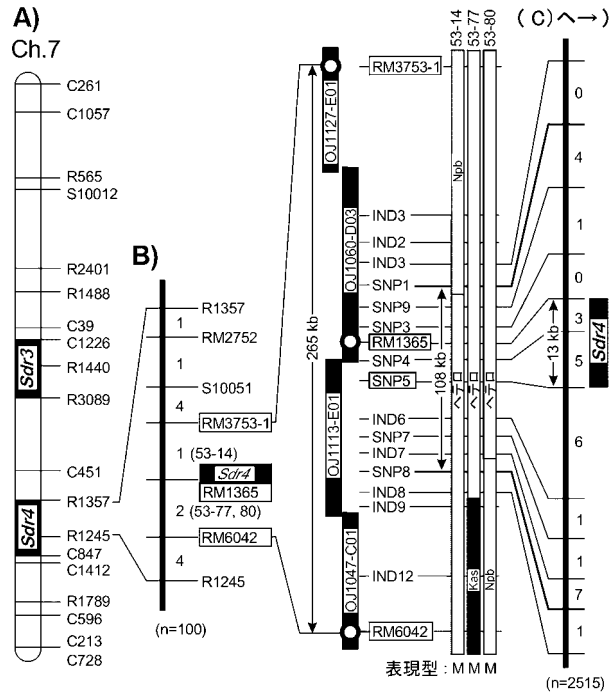
【図8 C】シロイヌナズナの類縁体の解析結果を示す図である。C）Sdr4とAtSdr4L-1のアミノ酸配列を比較した。

【図9】日本晴型Sdr4とKasalath型Sdr4を判別するマーカーの一例を示す図および写真である。

【図1】



【図2 A B】

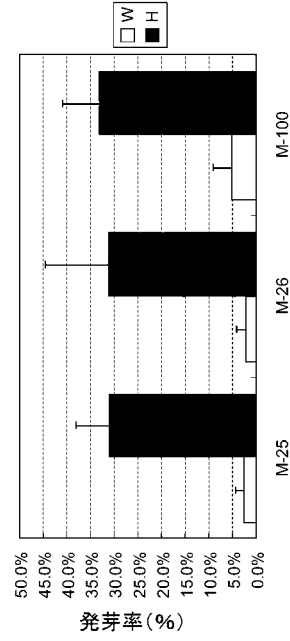




【 7 】

種子番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
ND2054	4%	1%	36%	21%	30%	2%	38%	28%	25%	3%	1%	44%	4%	5%	31%	27%
	W	W	H	H	H	W	H	H	H	W	W	H	W	W	H	H
ND2126	39%	2%	2%	0%	5%	6%	0%	2%	16%	2%	5%	1%	0%	4%	0%	39%
	H	W	W	W	W	W	W	W	H	W	W	W	W	W	W	H
NE2331	32%	29%	11%	31%	47%	32%	22%	36%	29%	47%	26%	38%	30%	2%	4%	5%
	H	H	W	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	W	W	W

A)



B)

【 8 C 】

Sdr4N 1 : M-----AMV QPVDMAVKAN EIMARFRP IA PKPVLIP-AAA AGVTGGGDCA AAVAATNRVL  
 AtSdr4L-1 1 : MIKILNPHSH HSQTTLKTA EILSKYRP IA PKPGTPRYND DDPSSMSHK ISQSPYLRL

54 : -COLGSRPQR ARKRQR----PS----VVPDV SPAGAKRKR APAYPI--PV AP LRCAYAVAT  
 61 : WPQLGARPTRI TRRRRGGMG PSSLAMKRPK SSGCSSSTST ISTRNLGP I KTLFQA-FIT

104 : ATRARYSVWV VPAPESAGGV SALAPYSPSA GDSTRLSPTV VEVEDEEER GV-----  
 120 : HRLPNILPQV GYCFE--NGV SSTLVTLPLL QCS--PPSS KOMEPEIKCK GVIDLNKTAE

156 : MVERDLRK LLEP-----RKLLER AVRPVCGSTIH MESVHIDVGR TTAATAAAAP  
 175 : VIGERDFITQ LQCPITITTTI ATTSRVISEIQ PIRPYCKSKIN V--AVINPLT NPSPTSQTSK

207 : KTAEEVEAEL ESDSLPAWVS DSSNRVRLVN DAYKRWVGGP ECPNLDAVAT AASRRITSGEV  
 233 : KSPREVEEDV ESDDLPSVIT DSNRVRLVN SAYKEMMGQP EGSWLD--SN VRGRITCGEV

267 : ALVVEPAAA AAALPETCKG FSCSAKIWE RDGKWSVHA PGDVTRLQCE SPDYVFAWRF  
 291 : MINFCE---S KIPVMTENNC FSCWVRIDMG RDGKEEYMHIA FGDVTKLQCD SKDYVFTMRF

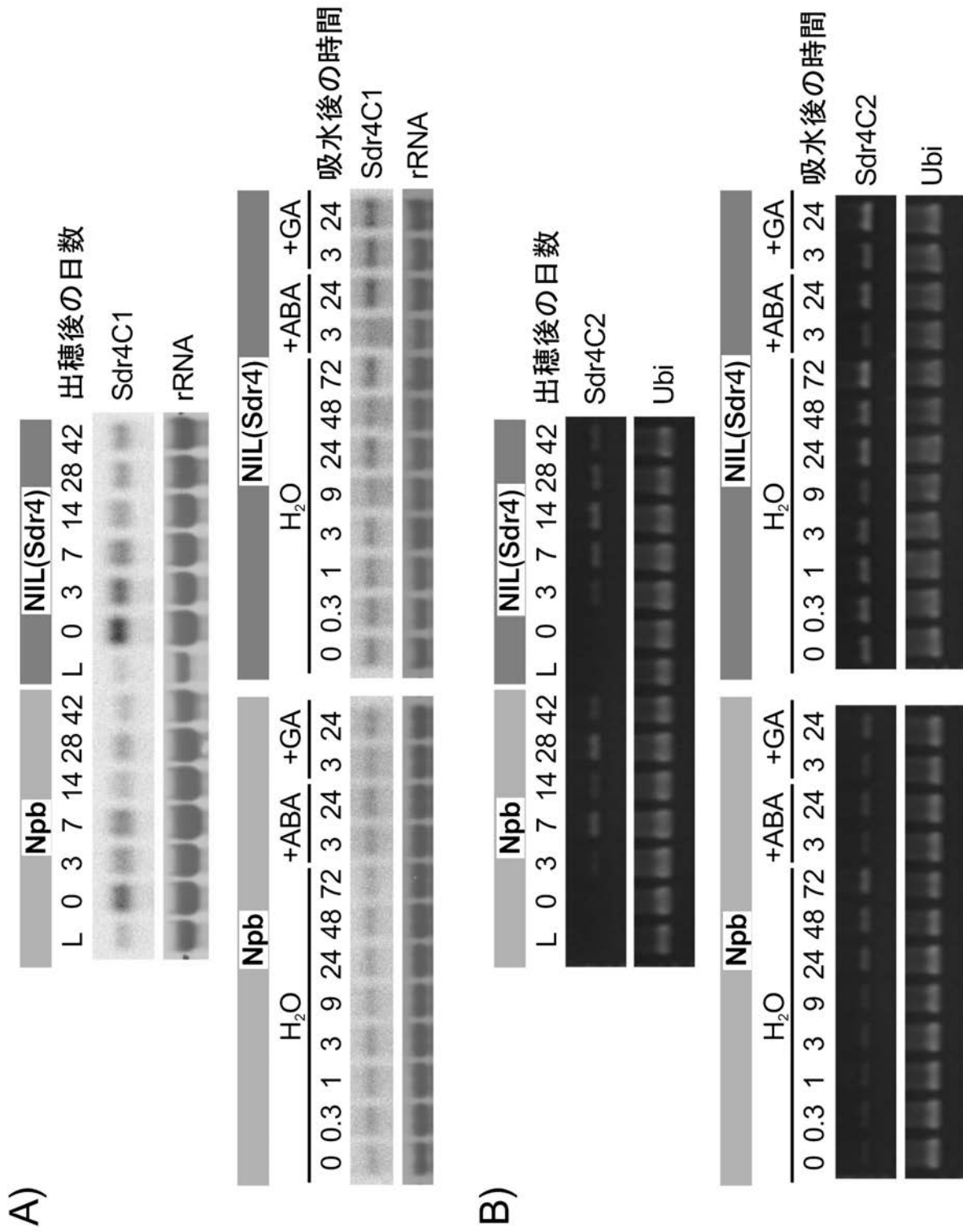
327 : RAAGDECMTH RRAAGDA (SEQ ID NO:3)  
 348 : -----HTTID RR-----\* (SEQ ID NO:9)

C)

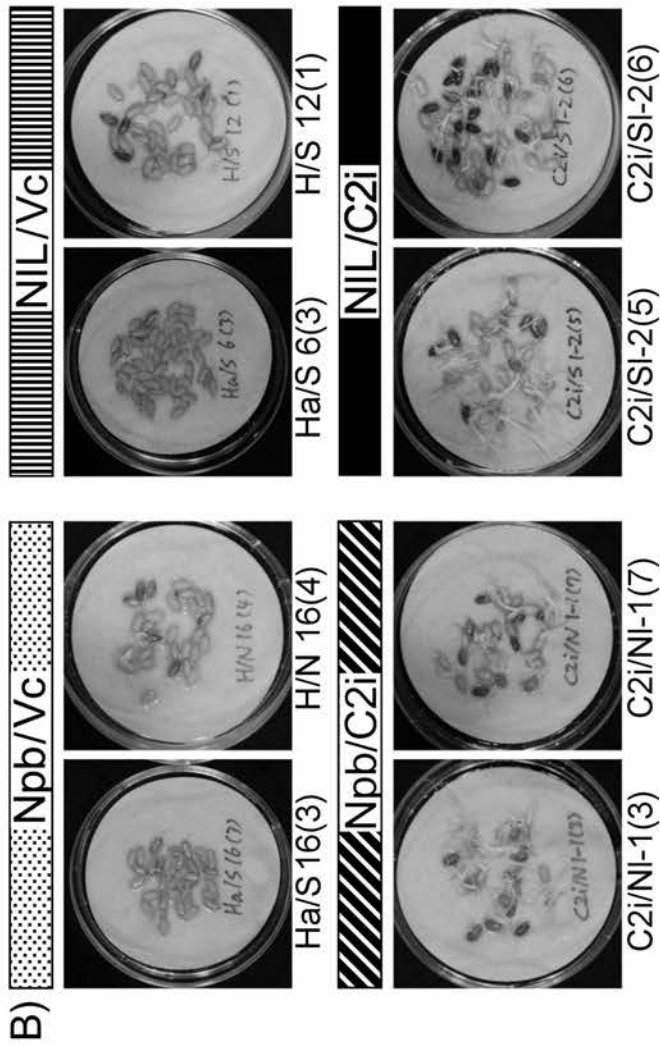
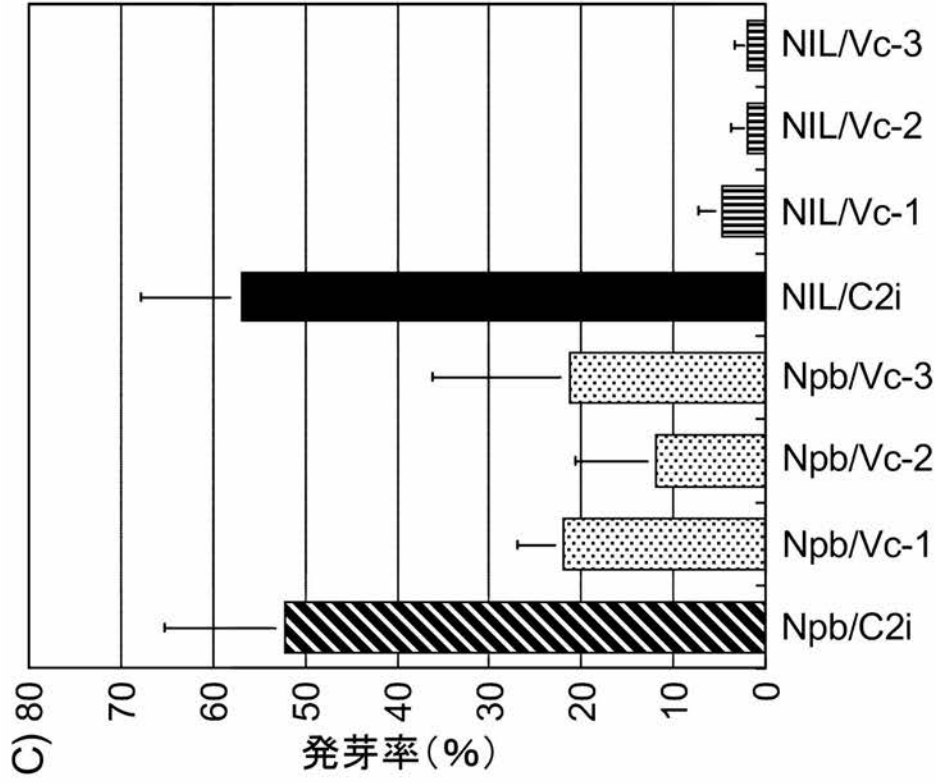




【 図 4 】

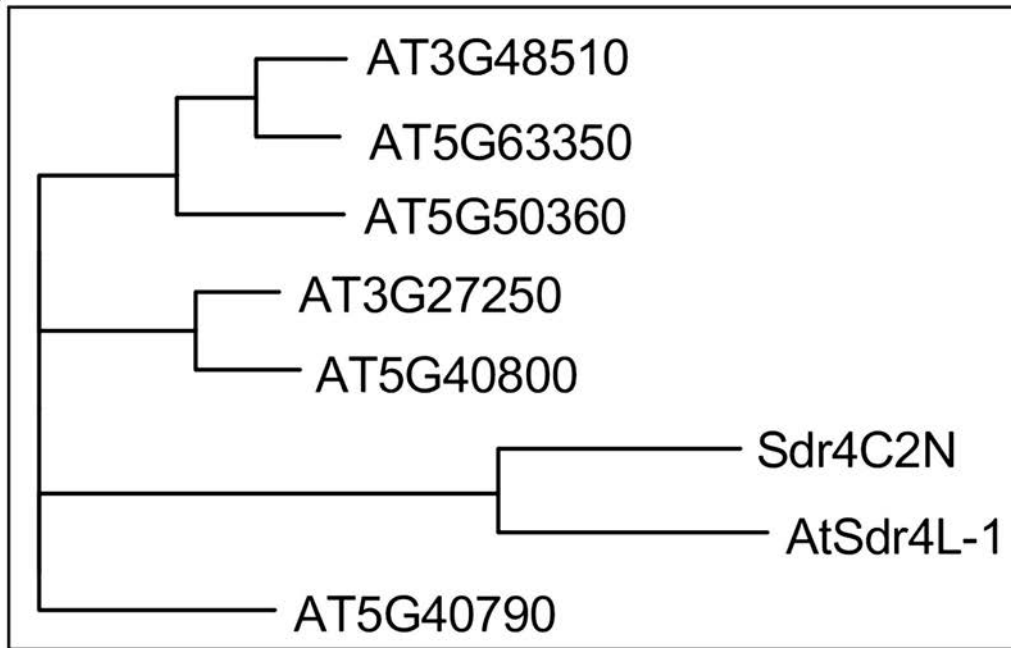


【 図 6 B C 】

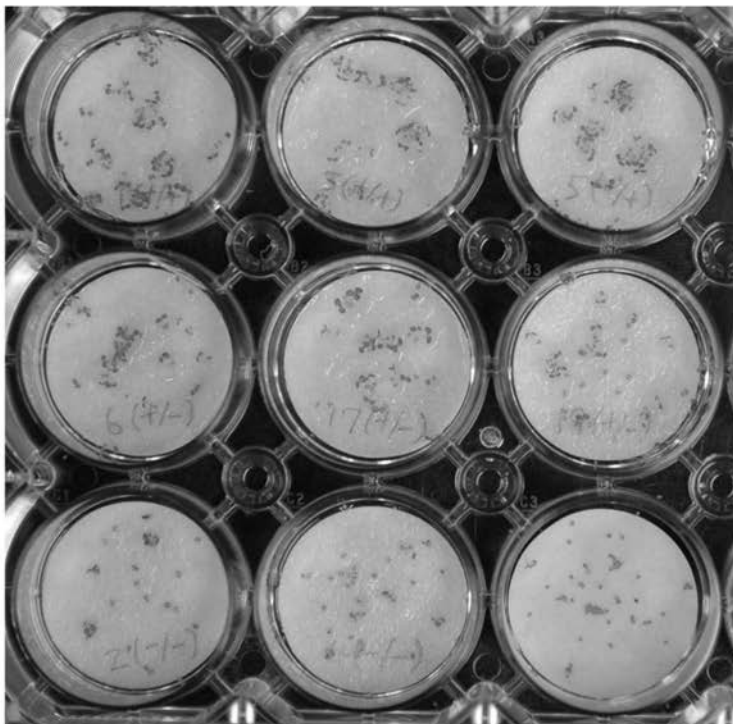


【 8 A B 】

A)



B)

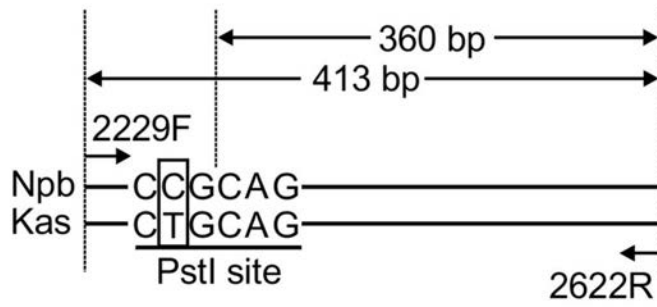


(+/+)  
95%

(+/-)  
80%

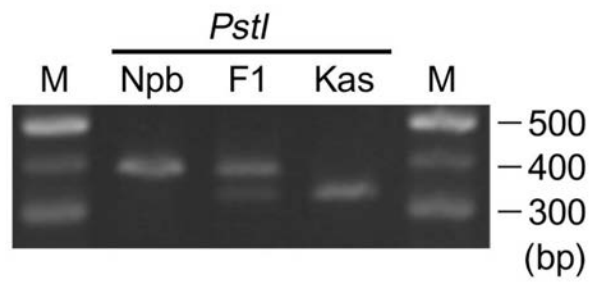
(-/-)  
14%

【 図 9 】



2229F : 5' CCACGTCGAGTCAGTCCAC 3' (SEQ ID NO:11)

2622R : 5' CGAAGACGTAGTCCCTCGAC 3' (SEQ ID NO:12)



【 配列表 】

[0005177807000001.app](#)

## フロントページの続き

(72)発明者 矢野 昌裕

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

(72)発明者 竹内 善信

茨城県つくば市観音台2 - 1 - 18 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構作物研究所内

審査官 上條 肇

(56)参考文献 米国特許出願公開第2004/0123343 (US, A1)

Rosa T.J.L. et al., PAT\_MRT4530\_15659C.1, Publication Site for Issued and Published Sequences (PSIPS)[online], United States Patent and Trademark Office, 2004年 6月24日, SEQ ID No.9222 & 111705, URL, <http://seqdata.uspto.gov/?pageRequest=viewSequence&DocID=20040123343&seqID=9222%2C111705>

中村義一 編, 遺伝子医学MOOK RNAと創薬, 株式会社 メディカル ドゥ, 2006年 1月31日, p.132-137,143-151,158-164

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/29

C12N 15/113

A01H 1/00

C12N 5/10

GenBank/EMBL/DDBJ/GenSeq

UniProt/GenSeq