

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

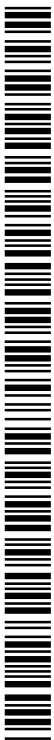
(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2014年7月31日(31.07.2014)



(10) 国際公開番号
WO 2014/115680 A1

- (51) 国際特許分類:
A01H 1/02 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/050958
- (22) 国際出願日: 2014年1月20日(20.01.2014)
- (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 2013-011504 2013年1月24日(24.01.2013) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人 奈良先端科学技術大学院大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION NARA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒6300192 奈良県生駒市高山町8916番地の5 Nara (JP).
- (72) 発明者: 高山 誠司(TAKAYAMA, Seiji); 〒6300192 奈良県生駒市高山町8916番地の5 国立大学法人 奈良先端科学技術大学院大学内 Nara (JP). 宇野 栄子(UNO, Eiko); 〒6300192 奈良県生駒市高山町8916番地の5 国立大学法人 奈良先端科学技術大学院大学内 Nara (JP).
- (74) 代理人: 山田 威一郎, 外(YAMADA, Iichiro et al.); 〒5300005 大阪府大阪市北区中之島6-2-40 中之島インテス21階 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第21条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))



WO 2014/115680 A1

(54) Title: METHOD FOR BREEDING *BRASSICA RAPA* PLANT HAVING SELF-COMPATIBILITY

(54) 発明の名称: 自家和合性を有するアブラナ科植物の作出方法

(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing a technology that converts a *Brassica rapa* plant having self-incompatibility to having self-compatibility. The problem is solved by causing a pollen factor (SP11) to be inactive at a self-incompatibility gene locus for a *Brassica rapa* plant, while maintaining the inverted repeat sequence (SMI) on a class-I dominant S haplotype.

(57) 要約: 本発明は、自家不和合性のアブラナ科植物を自家和合性に変換する技術を提供することを主な課題とする。前記課題は、アブラナ科植物の自家不和合性遺伝子座において、クラスIに属する優性側Sハプロタイプ上の逆位反復配列(SMI)を保持させつつ、花粉因子SP11を不活性化させることにより解決される。

明 細 書

発明の名称：自家和合性を有するアブラナ科植物の作出方法

技術分野

[0001] 本発明は、自家不和合性のアブラナ科植物を自家和合性に変換することを可能とする技術に関する。

背景技術

[0002] アブラナ科植物には、アブラナ、カブ、コマツナ、ハクサイ、チンゲンサイ、ダイコン等の植物体の全てが食用とされる植物が多く含まれるが、例えばアブラナはなたね油の原料として種子に高い利用価値を有する植物も含まれる。従来、なたね油は食用や灯火燃料とされてきたが、近年ではバイオディーゼルの原料としても注目されている。

[0003] 現在、なたね油の生産には、主に西洋アブラナ (*Brassica napus*) が利用されている。西洋アブラナは、自家和合性であり種子生産性にも優れていることから、北米やカナダでは盛んに栽培されているが、他の地域での生育・生産効率は良好とは言えず品種改良が必要とされている。しかしながら、西洋アブラナはアブラナ (*Brassica rapa*) とキャベツ類 (*Brassica oleracea*) が自然交配して生じた複二倍体種であるとされており、遺伝的多様性に乏しいため、交配によって有益な遺伝子を導入する従来の育種法を適用することは困難であった。

[0004] 一方、我が国においては古来なたね油の原料としてアブラナ (*Brassica rapa*) が利用されてきた。アブラナは遺伝的多様性に富み、環境適合性や種子生産性の向上等の観点で有利な株を作出できる可能性を有している。しかし、アブラナは自家不和合性であるため単独系統で種子をつけることがなく、集団栽培で昆虫等の自然交配に頼って系統を維持する必要があることから、安定的に特定の系統を維持することが難しい。また、種子をつけるには他個体との交配が必要であるため種子生産性が低く、交配を行う集団全体に品種改良を加えなければならず、優良系統の育種は困難であった

。

[0005] このような背景から、アブラナをはじめとする自家不和合性のアブラナ科植物を自家和合性に変換することによって自殖種子稔性を付与し、その遺伝的多様性を利用して効率的に優良品種を作出、維持することが可能な技術が求められていた。

[0006] ここで、自家不和合性とは、植物が持つ自家受粉を抑制する機構の1つである。この機構がはたらくことによって、受粉の際に雌ずいと花粉の間で自他の認識反応が起き、他個体の花粉のみ受精が可能となる。即ち、自家不和合性の植物では、雌しべと花粉の遺伝子型が同じ場合、花粉が柱頭に到達しても花粉の発芽、粉管の伸長、胚珠の受精、受精胚の生育のいずれかの段階が停止するため、種子が形成されない。多くの植物において、このような自家不和合性の機構は、自家不和合性遺伝子座（S 遺伝子座）上に連鎖して存在する一連の複対立遺伝子群（ S_1 、 S_2 、 \dots S_n ハプロタイプ）によって制御されている。アブラナ科植物においては、Sハプロタイプはリガンドとなる花粉因子SP11と、レセプターとして機能する雌ずい因子SRKをコードしており、同一S遺伝子上のSP11とSRKが特異的に相互作用することによって自己の花粉が識別され、不和合反応が生じる。更に、S遺伝子座上には、SRKタンパク質と非常に類似した塩基配列を持っており、共同レセプターとして機能して自家不和合性反応を拡大するとされている柱頭タンパク質（SLG: S locus glycoprotein）が存在していることも知られている。

[0007] アブラナ科植物には100以上ものSハプロタイプが存在し、中には2つのハプロタイプ間で優劣の関係が生じる場合がある。このような場合、クラスIとして分類される優性側Sハプロタイプ上の逆位転写配列（SMI）の影響により、クラスIIとして分類される劣性側Sハプロタイプ上のSP11発現調節領域がDNAメチル化を受け、劣性側Sハプロタイプの発現が完全に抑制されることが明らかとなっている（例えば、非特許文献1及び2、ならびに図1を参照）。

[0008] このように、自家不和合性のメカニズムについて様々な知見が得られているが、自家不和合性のアブラナ科植物を効率的に自家和合性に変換するための実用的で簡便な手法については知られていなかった。

先行技術文献

非特許文献

[0009] 非特許文献1: Hiroshi Shiba et al., *Developmental Growth Differ.* (2012) 54, 120-128

非特許文献2: Yoshiaki Tarutani et al., *Nature*, Vol. 466, 19 August 2010, 983-986

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] 本発明は、自家不和合性のアブラナ科植物を自家和合性に変換する技術を提供することを主な課題とする。

課題を解決するための手段

[0011] 本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討を行い、アブラナの自家和合性変異株を解析した結果、アブラナ科植物における自家不和合性遺伝子座（S遺伝子座）上のクラスIに属するSハプロタイプにおいて、逆位反復配列（SMI）を保持したまま花粉因子SP11を欠失したS₀ハプロタイプ（S₀株）を見出した。更に、本発明者らはこのS₀ハプロタイプを持つ株と、自家不和合性遺伝子座上のクラスIIに属するSハプロタイプを有する自家不和合性アブラナ科植物を交配させることにより、F1後代は花粉因子を発現しない自家和合性株となり、自殖種子稔性を有するアブラナが得られることを見出した。

[0012] 本発明は以上の知見に基づいて更に研究を重ねた結果完成されたものである。即ち、本発明は以下に掲げる態様の自家和合性アブラナ科植物の作出方法及び育種方法、アブラナ科植物のF1ハイブリッド育種用親株の育種方法、自家和合性アブラナ科植物のスクリーニング方法、ならびにスクリーニン

グ用キット等を提供する。

[0013] 項 1. 自家不和合性アブラナ科植物から自家和合性アブラナ科植物を作出する方法であって、アブラナ科植物の自家不和合性遺伝子座において、クラス I に属する S_I ハプロタイプの逆位反復配列 (SMI) を保持させつつ、花粉因子 SP11 を不活性化させることを含む、前記作出方法。

項 2. 前記アブラナ科植物が *Brassica* 属植物である、項 1 に記載の作出方法。

項 3. 前記 *Brassica* 属植物が、アブラナ、ハクサイ、カブ、コマツナ、ミズナ、チンゲンサイ、ノザワナ及びパクチョイからなる群より選択されるいずれか 1 種の *Brassica rapa* である、項 2 に記載の作出方法。

項 4. 下記工程 (1 a) を含む自家和合性アブラナ科植物の育種方法：

(1 a) アブラナ科植物の自家不和合性遺伝子座において、クラス I に属し、且つ逆位反復配列を保持しつつ花粉因子 SP11 が不活性化された S_0 ハプロタイプを有する株と、クラス II に属する S_{II} ハプロタイプを有する株とを交配し、自家和合性株を得る工程。

項 5. 下記工程 (2 a) を更に含む、項 4 に記載の育種方法：

(2 a) 前記工程 (1 a) で得られた自家和合性株のアブラナ科植物を自殖すること、又は S ハプロタイプに関して同じ遺伝子型の株を用いて近親交配を行うことにより、 S_0 ハプロタイプに関してホモ接合体である株を選択する工程。

項 6. 前記工程 (2 a) を 5 ~ 7 回繰り返す、項 5 に記載の育種方法。

項 7. 下記工程 (1 b) ~ (3 b) を含む、アブラナ科植物の F1 ハイブリッド育種用親株の育種方法：

(1 b) アブラナ科植物の自家不和合性遺伝子座において、クラス I に属し、且つ逆位反復配列を保持しつつ花粉因子 SP11 が不活性化された S_0 ハプロタイプを有する株と、クラス II に属する S_{II} ハプロタイプを有する株とを交配し、自家和合性株を得る工程；

(2 b) 前記工程 (1 b) で得られた自家和合性のアブラナ科植物を自殖する、又はSハプロタイプに関して同じ遺伝子型の株を用いて近親交配を行う工程；及び

(3 b) 前記工程 (2 b) において得られた株からクラス I に属する S_{II}ハプロタイプに関してホモ接合体である株を選択する工程。

項 8. 前記工程 (2 b) を 5 ~ 7 回繰り返す、項 7 に記載の育種方法。

項 9. 下記工程 (1 c) ~ (3 c) を含む、自家和合性アブラナ科植物のスクリーニング方法であって、

(1 c) 被験アブラナ科植物から DNA 試料を調製する工程；

(2 c) 前記工程 (1 c) で調製された DNA 試料から、逆位反復配列及び SP 1 1 をコードする塩基配列を含む DNA 断片を増幅する工程；及び

(3 c) 前記工程 (2 c) で増幅した DNA 断片の分子量又は塩基配列に基づいて、アブラナ科植物の自家不和合性遺伝子座において、クラス I に属し、且つ逆位反復配列を保持しつつ花粉因子 SP 1 1 が不活性化されている株を選択する工程。

項 10. 自家和合性アブラナ科植物のスクリーニング用キットであって、

アブラナ科植物における自家不和合性遺伝子座上のクラス I に属する S_Iハプロタイプにおいて、

(i) 逆位反復配列 (SM I) を保持していることを検出可能な試薬；及び

(ii) 花粉因子 SP 1 1 が不活性化されていることを検出可能な試薬を含む、前記キット。

項 11. 自家不和合性遺伝子座において、クラス I に属し、且つ逆位反復配列を保持しつつ花粉因子 SP 1 1 が不活性化された S₀ハプロタイプを有するアブラナ科植物の株と、自家不和合性遺伝子座において、クラス I に属する S_{II}ハプロタイプを有するアブラナ科植物の株の、自家和合性アブラナ科植物の作出のための使用。

発明の効果

[0014] 本発明によれば、クラス I に属する S_{II}ハプロタイプの SP 1 1 遺伝子に

対する逆位反復配列（SMI）は保持されるためにクラスII-SP11遺伝子の発現が抑制され、且つクラスIに属するS_IハプロタイプのSP11遺伝子が不活性化されていることから、いずれの花粉因子SP11も発現しないため自家和合性を有する株を得ることができる。また、本発明においては、クラスIのSP11遺伝子を標的として不活性化させるため、クラスIIに属するS_{II}ハプロタイプを有する株を交配相手として交配を重ねる毎に自家和合性株が得られる割合が高くなる。従って、本発明の自家和合性アブラナ科植物の作出方法によれば、効率的且つ確実に自家和合性株に変換することが可能である。

[0015] また、本発明の自家和合性アブラナ科植物の育種方法によれば、F1世代株が自家和合性を有することから、1回の交配によって自家和合性のアブラナ科植物（S₀S_{II}株）を得ることができる。このようにして得られる自家和合性アブラナ科植物は一般に雑種強勢により生育が良好であり、鞘が大きく、種子生産性の高いものとなる。そのため、本発明の技術を遺伝子資源に富む自家不和合性のアブラナ科植物に適用し、その中から種子生産性の高い自家和合性株を選抜することによって、食用およびバイオディーゼルの原料用に従来よりも少ない労力で効率よくナタネ種子を提供することができる。

[0016] なお、種子生産性の高い株の選抜の過程においては、自家和合性を有することから蕾受粉などの受粉作業は必要とせず、自然に単独で種子をつける株の中から生産性の高い株を選抜することができる。単独で種子をつける自家和合性株の選抜を5～7世代に渡り繰り返すことにより、種子生産性などの形質を固定できると共にS₀ハプロタイプに関してホモ接合体である自家和合性株（S₀S₀株）の割合が増加することが期待され、得られたS₀S₀株は、以降自家和合性を保持し自殖によって単独系統で維持することが可能となる。

[0017] また、本発明をアブラナ科植物のF1ハイブリッド育種用親株の育種によれば、蕾受粉によらず、劣性側Sハプロタイプをホモで有する近交系統を得ることができる。このような劣性側Sハプロタイプをホモで有する近交系統は、雑種強勢を目的としたF1ハイブリッド種子生産のための親株として利

用することができる。

- [0018] 更に、本発明によれば、効率的に自家和合性株をスクリーニングすることが可能な自家和合性アブラナ科植物のスクリーニング方法、及び当該スクリーニング方法を簡便に実施することができるキットが提供される。

図面の簡単な説明

- [0019] [図1] S P 11対立遺伝子間の優劣性制御機構を表す図である。
[図2] S₀ハプロタイプによる自家和合性発現機構を表す図である。
[図3] 自殖種子稔性を持つアブラナの作出例を示す代表写真である。
[図4] 実施例において作出されたアブラナにおいて1鞘あたりに採取された種子数を表すグラフ、及び各株の代表写真である。

発明を実施するための形態

[0020] (1) 自殖種子稔性アブラナ科植物の作出方法

本発明の自殖種子稔性アブラナ科植物の作出方法は、アブラナ科植物の自家不和合性遺伝子座（S遺伝子座）において、クラスIに属する優性側Sハプロタイプの逆位反復配列（SMI）を保持させつつ、花粉因子SP11を不活性化させることを特徴とし、これにより自家不和合性のアブラナ科植物を自家和合性に変換し、自殖種子稔性を付与することができる。

- [0021] 本発明においてアブラナ科植物（Brassicaceae）とは、双子葉植物に分類され、十字状に並んだ4枚の花弁を有することを特徴とする植物を指す。本発明においてアブラナ科植物としては、例えばBrassica（アブラナ）属植物、Raphanus（ダイコン）属植物、Wasabia（ワサビ）属植物、Nasturtium（オランダガラシ）属植物等が挙げられ、好ましくはBrassica属植物が例示される。

- [0022] Brassica属植物としてより具体的には、アブラナ（在来ナタネ）、ハクサイ、カブ、コマツナ、ミズナ、チンゲンサイ、ノザワナ、パクチョイ等のBrassica rapa；キャベツ、ブロッコリー、カリフラワー、メキャベツ等のBrassica oleracea；セイヨウカラシナ、タカナ等のBrassica junceaが例示される。また、Rp

hanus属植物としては、ダイコン、ハツカダイコン等が例示され、Wasabia属植物としてはワサビ等が例示され、Nasturtium属植物としてはクレソン等が例示される。

[0023] これらの植物の中でも、遺伝的多様性に富むことからBrassicarapaがより好ましいものとして挙げられ、アブラナ（在来なたね）が更に好ましい植物として例示される。

[0024] 本発明においてアブラナ科植物としては、植物全体、花粉、種子；葉、茎、根、花器、成長点、種子、胚芽等の器官；表皮、師部、柔組織、木部、維管束等の組織；プロトプラスト、カルス等の植物培養細胞又は組織等のいずれもが包含される。

[0025] 逆位反復配列（SMI）とは、花粉因子SP11をコードする遺伝子の近傍（例えば、SP11遺伝子上流又は下流約100kb内）に存在する下記配列番号1で示される24塩基を含む配列を指す。

5'-ATGTTTACGTGTAATAAGTTACA-3'（配列番号1）

[0026] 例えば、S₉ハプロタイプやS₁₂ハプロタイプについては、遺伝子上での逆位反復配列の位置が特定されており、S₉ハプロタイプについてはSLG遺伝子の非翻訳領域（utr）から3.6kb下流、S₁₂ハプロタイプについてはSLG遺伝子の非翻訳領域（utr）から3kb下流に存在している。その他のSハプロタイプについては未だ位置が特定されていないが、前記配列番号1で示される24塩基の存在に基づいて判別することが可能である。

[0027] アブラナ科植物のSハプロタイプ間の優劣関係は次のようなメカニズムにより生じると考えられている。即ち、クラスI S_Iハプロタイプ上に存在する逆位反復配列に基づいて24ヌクレオチドからなる低分子RNAが作られ、相同性を有するクラスIIに属するS_{II}ハプロタイプのSP11遺伝子発現調節領域がメチル化を受けて、クラスII SP11の発現が数万分の1に抑制される。一方、クラスII S_{II}ハプロタイプの逆位反復配列からもクラスI S_IハプロタイプのSP11遺伝子発現調節領域に相同な低分子RNAが合成されるものの、1塩基置換によって標的部位との相同性が低下してお

り、SP11 遺伝子発現調節領域をメチル化しない。この機構により自他識別反応において優劣関係が生じる（図1を参照）。

[0028] 本明細書において、クラスIに属するS_Iハプロタイプを優性側Sハプロタイプと表記することがある。また、クラスIIに属するS_{II}ハプロタイプを劣性側Sハプロタイプと表記することがある。

[0029] 花粉因子SP11は葯タペト組織に発現し、レセプターである雌ずい因子SRKによって認識され、両者が同一の遺伝子型である場合に自家不和合性となる。花粉因子SP11をコードする遺伝子のS遺伝子座上の位置や転写方向は各Sハプロタイプによって異なっており、明確に特定されていないものが多いが、例えば、S₈、S₉、S₁₂ハプロタイプについてはSP11遺伝子のS遺伝子座上における位置が特定されており、いずれも雌ずい因子SRKとSLGの間に存在する（Takayama et al., PNAS, vol. 97, no. 4, 2000, 1920-1925を参照）。SP11遺伝子の各Sハプロタイプの塩基配列は既に特定されており、公知のデータベースに登録されている。例えば、S₈ハプロタイプについてはアクセッション番号：AB035504.1、S₉ハプロタイプについてはアクセッション番号：AB022078.1、S₁₂ハプロタイプについてはアクセッション番号：AB035503.1、S₅₂ハプロタイプについてはアクセッション番号：AB035505.1、S₆₀ハプロタイプについてはアクセッション番号：AB067446.1として、NCBI (National Center for Biotechnology Information, US) に登録されている。従って、これらの登録されている配列に基づいてSP11遺伝子のS遺伝子座上の位置等を特定することができる。

[0030] 花粉因子SP11の不活性化の態様は、SP11がSRKに認識されない態様である限り特に限定されないが、本発明においてはSP11遺伝子又はタンパク質の発現低下は含まれず、SP11遺伝子が発現しない又は正常なSP11タンパク質が生成されないことを指すものとする。花粉因子SP11の不活性化は、従来公知の遺伝子工学的手法に基づいてSP11をコード

する遺伝子を改変することにより実現され得る。遺伝子改変は、遺伝子そのものに対して行われてもよいが、転写、転写後調節、翻訳、翻訳後修飾等の任意の段階について行うことができる。SP11の不活性化の態様としては、例えばSP11をコードする遺伝子をノックアウト（若しくはノックイン）する場合、SP11を構成するアミノ酸配列に変異が導入された結果、SP11がSRKに認識されない場合等が挙げられる。

[0031] SP11遺伝子をノックアウト（若しくはノックイン）する手段としては、SP11遺伝子からのmRNAの転写が起こらないものであれば特に限定されず、従来公知の方法を採用することができるが、例えば以下の方法が挙げられる。即ち、遺伝子改変の対象となる植物（即ち、少なくとも逆位反復配列（SMI）とSP11遺伝子を有している自家不和合性アブラナ科植物）から常法に従ってSP11遺伝子（ゲノムDNA）を単離し、（a）SP11遺伝子のプロモーター領域やエクソン部分に選択マーカー遺伝子（例えば、薬剤耐性遺伝子やレポーター遺伝子等）を含むDNA断片を挿入してプロモーター又はエクソンの機能を破壊する方法；（b）ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFNs）やTranscription Activator-Like Effector Nuclease（TALENs）などを利用してSP11遺伝子を切断し当該遺伝子に変異を導入させる方法；（c）SP11タンパク質をコードする領域中に終始コドン（Start Codon）を挿入して完全なタンパク質の翻訳を不能にする方法；（d）転写領域中への転写終結シグナル（例えば、ポリアデニル化シグナル等）を挿入して、完全なmRNAの合成を不能にするように構築されたDNA断片を野生株の遺伝子座に組み込ませる方法等が挙げられるが、これらに限定されない。

[0032] また、変異原処理によってSP11遺伝子に対して点突然変異、欠失又はフレームシフト突然変異等の機能欠損変異を導入することにより、遺伝子レベルでSP11を不活性化することができる。変異原処理は公知の手段を採用すればよいが、放射線照射（X線、γ線等）、重イオンビーム等の照射；メタンスルホン酸メチル（EMS）、エチルニトロソウレア、ニトロソグア

ニジン、ベンゾピレン等の薬剤による処理が例示される。本発明においては、SP11遺伝子を欠失させる遺伝子改変手段を採用することが望ましい。

[0033] SP11を構成するアミノ酸配列に変異を導入して、SP11がSKRに認識されないようにする方法としては、Sハプロタイプ間で保存性の高いアミノ酸残基に変異を導入する方法が挙げられる。SP11タンパク質を構成するアミノ酸残基においては、8つのシステイン残基、及び2つのアミノ酸残基（具体的には、N末から第2番目のシステイン残基の2残基前にあるグリシン残基と、同第3番目のシステイン残基の4残基後にある芳香族アミノ酸残基（フェニルアラニン残基又はチロシン残基））が高度に保存されている（例えば、Mishima, M., et al., J. Biol. Chem. 278, 36389-36396, 2003等を参照）。従って、当該箇所をコードする塩基配列に変異を導入することによって、完全なSP11タンパク質の合成が阻害され、SP11が不活性化され得ると考えられる。変異の導入方法は、SP11が不活性化され得る限り特に限定されず、従来公知の方法に従えばよいが、例えば部位特異的変異導入法等が挙げられる。

[0034] 各SハプロタイプのSP11タンパク質について、アミノ酸配列は既に特定されており、公知のデータベースに登録されている。例えば、S₈、S₉、S₁₂、S₅₂、S₆₀ハプロタイプについて以下にアミノ酸配列を具体的に示す。

[0035] S8-SP11 (Gen Bank; BAA92246.1 : 配列番号2) ;

MKSAVYALLCFIFIVSGHIQELEANLMKRCTRGFRKLGKCTTLEEEKCKTLYPRGQCTCSDSKMNTHSC
DCKSC

S9-SP11 (Gen Bank; BAA85458.1 : 配列番号3) ;

MKSAIYALLCFIFIVSSHVQEVEANLRKTCVHRLNSGGSCGKSGQHDCEAFYTNKTNQKAFYCNCTSPF
RTRYCDCAIKCKVR

S12-SP11 (Gen Bank; BAA92245.1 : 配列番号4) ;

MKSAIYALLCFIFIILSRSELTEVGADKQQCKKNFPGHCETSERCENTYKRLNKKVFDCHCQPFRRR
LCTCKC

S52-SP11 (Gen Bank; BAA92247.1 : 配列番号5) ;

MKSVLYALLCFIFIVSSHAQDVEANLMNRCTRELFPFGGKGSSSEDGGCIKLYSSEKKLHPSRCECEPRY
KARFCRCKIC

S60-SP11 (Gen Bank; BAB86353.1 : 配列番号 6) ;

MRYATSIYTFLTNIHYLCFIFLILTYVQALDVGAWKCPEGIVYVPSISPGRCINSRSTECKKHYEVEGQN
VTNCRCDTYSMQNPARITCYCCKVKS

[0036] 前記アミノ酸配列中に示される「C」はSハプロタイプ間で保存されている8つのシステイン残基を表し、「G」及び「Y」はSハプロタイプ間で保存されているグリシン残基及びチロシン残基をそれぞれ表す。

[0037] 上述のような保存性の高いアミノ酸配列に変異を有するSP11をコードするDNA断片を含む発現ベクターにより形質転換を行い、花粉因子SP11が不活性化されたアブラナ科植物を得ることができる。当該発現ベクターにおいては、変異が導入されたSP11をコードするDNA断片がプロモーターに発現可能に連結されていてもよい。

[0038] SP11遺伝子を遺伝子工学的手法により改変させるためには葯タペート組織において発現させる必要がある。従って、対象植物の細胞において機能し得るプロモーターとしては、植物体の葯のタペート組織で発現する遺伝子プロモーターであれば特に限定されず、例えばSP11プロモーターが挙げられる。また、発現ベクターは、必要に応じて公知のターミネーター領域、エンハンサー等のシス調節エレメント、薬剤耐性遺伝子等を有していてもよい。また、当該発現ベクターは、大量調製を容易にするため、大腸菌での自立複製を可能にする複製起点、大腸菌での選択マーカー（アンピシリン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子等）等を含んでいてもよい。

[0039] 植物を形質転換する方法として、従来公知の方法を採用することができ、例えば、形質転換の対象となる植物にセルラーゼ、ヘミセルラーゼ等の細胞壁分解酵素処理を行って、対象植物の細胞からプロトプラストを単離し、これにPEG法、リポソーム法、エレクトロポレーション法等により目的のDNA断片を導入してプロトプラストから植物体へ再分化させることにより形質転換された植物体を得ることができる。また、細胞壁を有する対象植物の

細胞に対し、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法等の直接導入法を用いてもよい。更に、アグロバクテリウムによる感染を利用して形質転換を行うこともできる。目的のDNA断片を導入する場合、細胞が由来する植物体の部位は特に限定されず、採用する導入方法に従って適切な器官、組織、又は細胞を選択すればよいが、例えば、胚、胚軸切片、単離した成長点等が挙げられる。例えば、アグロバクテリウムによる感染を利用する形質転換方法としては、Takasaki et al., (1997) Breeding Science 47:127-13に記載される方法を採用することができる。

[0040] 本発明の作出方法により得られる自家和合性アブラナ科植物は、従来公知の生育条件に従って生育させることができ、使用する土壌、肥料等について植物の種類、生育状況に応じて適宜選択することができる。

[0041] アブラナ科植物を生育させる条件としては、例えば、温度4～30℃、好ましくは20～23℃；光量400～100,000Lux、好ましくは1,000～50,000Lux；照射時間8～24時間、好ましくは12～14時間；生育日数20～150日、好ましくは30～90日が挙げられる。

[0042] また、アブラナ科植物の種子を播種する前に種子に対して消毒、予備吸水等の前処理を行ってもよい。消毒処理は、従来公知の方法に従えばよいが、例えば5%次亜塩素酸ソーダ溶液中に、18～25℃で10～30分間浸漬することにより行うことができる。予備給水処理についても従来の方法に従って行うことができるが、例えば、18～25℃において水に1～24時間浸漬する方法が挙げられる。予備給水は、種子に水分を散布することにより行ってもよく、18～25℃の水を種子100粒当たり10～100ml散布し、1～24時間放置してもよい。また、必要に応じて低温処理を行ってもよい。低温処理の条件についても従来公知の条件から適宜設定され得るが、例えば、種子を1～5℃の環境下で1～2か月間生育させることにより実施することができる。

- [0043] このようにして作出される自家和合性アブラナ科植物において、逆位反復配列を保持しつつ、花粉因子SP11が不活性化されていることを確認する方法としては、得られた植物個体から常法に従ってDNA試料を調製し、これを鋳型としてプライマーにより逆位反復配列及びSP11をそれぞれコードするDNA断片の増幅反応を行い、得られた増幅産物から分子量及び塩基配列に基づいて判定する方法が挙げられる。
- [0044] 植物個体からのDNA試料の調製は公知の方法を適宜使用して実施することができ、例えば、フェノール抽出及びエタノール沈殿による方法、ガラスビーズを用いる方法等が挙げられる。より簡便には、市販のDNA抽出試薬又はDNA抽出キットを使用して調製してもよい。DNA試料を調製する際に使用される植物体の部位は特に限定されないが、例えば葉等が挙げられる。
- [0045] 調製されたDNA試料から逆位反復配列及びSP11をコードするDNA断片を得る方法についても、従来公知の方法に従えばよく、プライマーを利用して逆位反復配列及びSP11をコードするDNA断片を特異的に増幅させて得ることができる。
- [0046] プライマーは、標的のDNA断片の少なくとも一部に特異的にハイブリダイズして当該DNA断片を増幅することが可能な特有の配列を有するオリゴヌクレオチドであればよい。このようなプライマーは、BLAST、FASTA等のプログラム及びデータベースを利用して標的とする遺伝子の配列情報を取得し、これに基づいて適宜設計、合成することができる。プライマーの塩基配列長としては、通常300~1500bp、好ましくは300~1000bp、更に好ましくは300~500bpが挙げられる。
- [0047] クラスIに属するS₁ハプロタイプについて、逆位転写配列(SM1)が保持されつつSP11遺伝子が不活性化されていることを確認するために使用されるプライマー配列の例を以下に示す。なお、SP11遺伝子については、S₈ハプロタイプのSP11遺伝子に対するプライマーを例に具体的な塩基配列を以下に示す。

[0048] S₈ハプロタイプのSP11遺伝子の存在を確認するプライマーセット

S8sp11-genome-Forward (配列番号 7) ; 5'-CTGCAAGTAAAAGAGAGAATCTTTTATCA
C-3'

S8sp11-genome-Reverse (配列番号 8) ; 5'-GCACCGCTTCATCAGATTTGC-3'

クラスI (S₉, S₈, S₁₂, S₅₂) のSMI配列の存在を確認するプライマーセット

(Tarutani, et al., (2010) Nature, vol. 466 (19), 983-986 Supplementary Table 5を参照)

SL-Forward 1 (配列番号 9) ; 5'-ACACCTCGGACTARAWTTTATGTATTYTTTC-3'

SL-Reverse 1 (配列番号 10) ; 5'-TCATTAATATTTTATATGCACTAATCGTTTTG-3'

[0049] また、クラスIIに属するS_{II}ハプロタイプのSP11遺伝子又は逆位反復配列について、具体的には以下のプライマーセットによりそれぞれ確認することができる。

クラスII (S₄₄, S₆₀, S₄₀, S₂₉) のSP11遺伝子の存在を確認するプライマーセット

クラスII-SP11-Forward (配列番号 11) ; 5'-CGTGTGAAATAGGCAATTAAGTGAAG-3'

クラスII-SP11-Reverse (配列番号 12) ; 5'-CTTTGCAACAGTAGCAAGTAATCCTC-3'

クラスIIのSMI配列 (S₄₄, S₆₀, S₄₀, S₂₉) の存在を確認するプライマーセット

(Tarutani, et al., (2010) Nature, vol. 466 (19), 983-986 Supplementary Table 5を参照)

SL-Forward 2 (配列番号 13) ; 5'-TAACCATAGAAAAATATTCGTGTTTC-3'

SL-Reverse 1 (配列番号 10) ; 5'-TCATTAATATTTTATATGCACTAATCGTTTTG-3'

[0050] これらのプライマーを用いたDNA断片の増幅反応によって得られる増幅産物の分子量又は塩基配列に基づいて、逆位反復配列を保持し、SP11が不活性化されていることを確認することができる。DNA断片の増幅については、従来公知の方法を採用することができ、特に限定されないが、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法が挙げられ、より具体的にはRT-P

CR、ネステッドPCR、リアルタイムPCR、競合PCRが例示される。

[0051] クラスIに属するS_IハプロタイプについてSP11が不活性化していることの確認は、例えば、増幅されたDNA断片を制限酵素で切断し、切断されたDNA断片の大きさを電気泳動等により正常なSP11を発現する植物体から得られたDNA断片の分子量と比較することにより行うことができる。両者の分子量が一致しなければ、SP11が不活性化されていると判定することができる。更に、SP11遺伝子を欠失させた場合には、シーケンシングによって該当する配列が存在しないことを確認すればよい。また、DNA断片に対してシーケンシングを行うことによって逆位反復配列が保持されていることを確認することができる。

[0052] なお、クラスIに属するSハプロタイプのSP11遺伝子は、Sハプロタイプ(S₉、S₈、S₁₂、S₅₂等)によって遺伝子長(主にイントロンの長さ)が異なり、アミノ酸配列で保存性の高い部分が第1エクソンのシグナル配列に限られるため共通のプライマーを設計してクラスIに属するほぼ全てのSP11遺伝子の存在を確認することが困難である。従って、クラスIのSP11遺伝子が不活性化されていることの確認は、クラスIに属する各SハプロタイプのSP11遺伝子の塩基配列に基づいてプライマーを設計し、当該プライマーにより増幅させたDNA断片をシーケンシングすることによって実施することが望ましい。

[0053] 一方、クラスIIに属するSハプロタイプのSP遺伝子及び逆位反復配列(SM1)については上記配列番号11~14で示される共通のプライマーセットを用いたPCR法によりSP11遺伝子や逆位反復配列を増幅させ、その分子量や塩基配列に基づいて存在を確認することができる。

[0054] 本発明の作出方法により得られる自家和合性アブラナ科植物(S₀株)は、天然に存在するアブラナ科植物の自家和合性変異株より、取得することもできる。このような変異株は、具体的には、東北大学Brassica種子バンクにBrassica rapa C634として登録されているものが挙げられる。前記S₀株は、Brassica rapa C634のS54

ハプロタイプを起源とするものである。

[0055] また、下記配列番号15～18で示されるプライマーセットを用いて S_0 ハプロタイプについてヘテロ接合体であるか、ホモ接合体であるかの確認を行うこともできる。即ち、配列番号14及び15で示されるプライマーセットを用いることにより、 S_0 ハプロタイプを含むほぼ全てのクラスIに属するSLG (S-locus glycoprotein) が増幅される (クラスIIのSLGは増幅されない)。

SLGI-Forward : 5'-AGAACACTTGTATCTCCCGGT-3' (配列番号14)

SLGI-Reverse : 5'-CATAGTCGGATCCGTGTTTT-3' (配列番号15)

[0056] 下記配列番号16及び17で示されるプライマーセットを用いることにより、クラスIIのSLGが増幅される (クラスIのSLGは増幅されない)。

SLGII-Forward : 5'-ATGAAAGGGGTACAGAACAT-3' (配列番号16)

SLGII-Reverse : 5'-CTCAAGTCCCCTGCTGCGG-3' (配列番号17)

[0057] これらのプライマーセットを用いたPCR法により、得られた植物体が S_0 ハプロタイプ又は S_{II} ハプロタイプについてホモ接合体であるか、ヘテロ接合体であるかを判別することができる。更に、必要に応じてシーケンシングによる塩基配列の確認を行ってもよい。

[0058] 本発明の作出方法により得られたアブラナ科植物は、自家和合性に変換された自殖種子稔性植物である。 S_0 ハプロタイプを持つ株をクラスIIに属する S_{II} ハプロタイプを持つ株と交配させて得た株 (S_0S_{II} 株) については、自家和合性を保持し、且つ雑種強勢により生育が良好であって種子生産性の高いものである。例えば、本発明の方法により S_0 ハプロタイプを持つ株との交配により得られる自家和合性を有するナタネは、多くの場合親株に比べて、鞘の大きさや数、茎の太さや長さ、花の数、1鞘当たりの種子数が多いことを特徴とする。

[0059] (2) 自家和合性を有するアブラナ科植物の育種方法

本発明は、自家和合性アブラナ科植物の育種方法を提供する。当該育種方

法は、下記工程を含むことを特徴とする。

(1 a) アブラナ科植物の自家不和合性遺伝子座において、クラス I に属し、且つ逆位反復配列を保持しつつ花粉因子 S P 1 1 が不活性化された S₀ハプロタイプを有する株と、クラス II に属する S ハプロタイプを有する株とを交配し、自家和合性株を得る工程。

[0060] 工程 (1 a) における親株としては、S 遺伝子について S₀ハプロタイプを有する株と、クラス II に属する S_{II}ハプロタイプを有する株との組み合わせとなるように選択すればよく、各親株は S 遺伝子についてホモ接合体又はヘテロ接合体のいずれであってもよく、自家和合性又は自家不和合性のいずれであってもよい。

[0061] 工程 (1 a) において行われる「交配」とは、由来の異なる 2 株のアブラナ科植物について、片方の株の花粉がもう片方の株の柱頭に受粉し、その後受精、種子形成が進むことを指す。交配の方法としては、例えば、由来の異なる 2 株の植物全体を網袋で覆い、袋内にハチ等の昆虫を放って昆虫が蜜を採取する過程で受粉が行われる方法が挙げられる。また、人の手によって筆やピンセットを用いて人工的に授粉させてもよい。更に、ビニルハウス等に由来の異なる 2 集団の複数の株を育成し、ハウス内に昆虫を放って受粉させる方法 (集団交配) を採用してもよい。

[0062] また、工程 (1 a) で行われる交配において、親株として使用される S₀ハプロタイプを有する株又は S_{II}ハプロタイプを有する株は S 遺伝子以外の遺伝的バックグラウンドについては特に限定されず、交配により所望の表現型を有し且つ自家和合性の株が得られるように適宜調整すればよい。例えば、油脂等の植物貯蔵物質の産生量の増加、種子生産性の向上、害虫抵抗性、菌類抵抗性、ウイルス抵抗性、細菌抵抗性、環境ストレス抵抗性 (例えば耐寒性等)、窒素固定能の向上等の表現型が発現され得る遺伝子を有する株を親株として選択することにより、これらの有用な表現型を有するアブラナ科植物を自家和合性に変換して自殖種子稔性を付与することができる。

[0063] より具体的な例を挙げると、耐寒性を有する S₀ハプロタイプを有する株 (

S_0 株)と害虫抵抗性を有する S_{II} ハプロタイプを有する株(S_{II} 株)を交配して耐寒性及び害虫抵抗性を有する自家和合性 S_0S_{II} 株を得ることができる。或いは、 S_0 株と耐寒性を有する S_{II} 株を交配して耐寒性を有する自家和合性 S_0S_{II} 株を得て、更に当該 S_0S_{II} 株を親株として害虫抵抗性を有する S_{II} 株と交配して耐寒性及び害虫抵抗性を有する自家和合性 S_0S_{II} 株を得てもよい。

[0064] また、本発明の自家和合性アブラナ科植物の育種方法は、前記工程(1a)の後に、前記工程(1a)で得られた自家和合性株のアブラナ科植物を自殖する、又は S ハプロタイプに関して同じ遺伝子型の株を用いて近親交配を行うことにより、 S_0 ハプロタイプに関してホモ接合体である株を選択する工程(2a)を更に含んでもよい。前記工程(1a)で得られる自家和合性アブラナ科植物は S_0 ハプロタイプに関してヘテロ接合体であることから、当該株を自殖又は近親交配することによって S_0 ハプロタイプに関してホモ接合体である株を得ることができる。本方法がアブラナに対して適用された場合、得られた植物(アブラナ)は自殖種子稔性を有しており種子を収穫できることから油脂(なたね油)生産用に好適に使用され得る。

[0065] ここで「自殖」とは、同一花において雄ずいの花粉が雌ずいの柱頭に受粉し、又はある株の花の花粉が同じ株の別の花の柱頭に受粉し、その後受精、種子形成が進むことを指す。自殖の方法としては、例えば、1若しくは複数の花序(花の集合体)又は1つの株全体を網袋で覆い、袋内にハチ等の昆虫を放って受粉させる方法が挙げられる。また、前述のように人工的に授粉させてもよい。また、ビニルハウス等に同じ親株に由来するアブラナ科植物を複数株育成し、ハウス内に昆虫を放って複数株間で受粉を行う方法(集団採種)を採用してもよい。

[0066] また、本明細書において「近親交配」とは、同じ親株から作出された兄弟株間で交配を行うことを指す。交配の方法は、前記自殖で採用される方法に準じて行うことができ、例えば同じ親株から作出された兄弟株をビニルハウス等に入れ、人工的な授粉や昆虫を介した受粉により行う方法が挙げられる。

[0067] 本発明の自家和合性アブラナ科植物の育種方法において、工程（2 a）で行われる自家和合性株のアブラナ科植物の自殖を、5～7回、好ましくは6～7回繰り返してもよい。当該技術分野においては、7回自殖を繰り返すことにより、ゲノム上の99.9%の遺伝子がホモ接合体になるとされている。自殖又は近親交配を繰り返す場合には、最後の自殖又は近親交配で得られた株の中から S_0 ハプロタイプに関してホモ接合体である株を選択すればよい。

[0068] 従って、工程（1 a）で得られるヘテロ接合体（ S_0S_{II} ）の株を自殖又は近親交配し、その中で自家和合性株を選択し、それを更に自殖又は近親交配して自家和合性株を選択するという操作を繰り返すことにより、ほとんどの株が S_0 ハプロタイプに関してホモ接合体（ S_0S_0 ）となる。そのためホモ接合体の判別において遺伝子型の確認を必ずしも必要としないが、遺伝子型に基づいて判別する場合には、例えば前記「（1）自殖種子稔性アブラナ科植物の作出方法」に記載されるクラスⅠⅠ-SP11（ S_{44} 、 S_{60} 、 S_{40} 、 S_{29} ）の存在を確認するプライマーセットを用いたPCR法により、得られた自家和合性株（即ち、遺伝子型は S_0S_0 又は S_0S_{II} のいずれか）がクラスⅠⅠの S ハプロタイプを有していないことを確認することで S_0 ハプロタイプに関してホモ接合体であると判定できる。

[0069] （3）F1ハイブリッド育種用親株の育種方法

本発明は、更にアブラナ科植物のF1ハイブリッド育種用親株の育種方法を提供する。

当該育種方法は、下記工程を含むことを特徴とする。

（1 b）アブラナ科植物の自家不和合性遺伝子座において、クラスⅠに属し、且つ逆位反復配列を保持しつつ花粉因子SP11が不活性化された S_0 ハプロタイプを有する株と、クラスⅠⅠに属する S_{II} ハプロタイプを有する株とを交配し、自家和合性株を得る工程；

（2 b）前記工程（1 b）で得られた自家和合性のアブラナ科植物を自殖する、又は S ハプロタイプに関して同じ遺伝子型の株を用いて近親交配を行う

工程；及び

(3 b) 前記工程 (2 b) において得られた株からクラス I I に属する S_{II} ハプロタイプに関してホモ接合体である株を選択する工程。

[0070] 工程 (1 b) は、前記「(2) 自家和合性アブラナ科植物の育種方法」における工程 (1 a) と同様である。また、工程 (2 b) においては、前記工程 (1 b) で得られた自家和合性のアブラナ科植物を自殖する、又は S ハプロタイプに関して同じ遺伝子型の株を用いて近親交配を行い、自殖又は近親交配については前記「(2) 自家和合性を有するアブラナ科植物の育種方法」に記載される通りである。

[0071] 工程 (2 b) においては、自殖又は近親交配を行って得られた株の中から、S₀ ハプロタイプと S_{II} ハプロタイプをヘテロで有する自家和合性株を選択する。また、工程 (2 b) においては自殖又は近親交配を繰り返して行ってもよく、これによって遺伝的に均質な近交系を作出することができる。本工程 (2 b) において自殖又は近親交配を通常 5 ~ 7 回行い、好ましくは 6 ~ 7 回繰り返し行うことにより遺伝的に均質な株が作出される。

[0072] 更に、工程 (3 b) において、前記工程 (2 b) における最後の自殖又は近親交配の結果得られた株の中から S_{II} ハプロタイプに関してホモ接合体である自家不和合性株を選択する。このようにして、得られた自家不和合性株を F1 ハイブリッド育種用親株として利用することができる。

[0073] S_{II} ハプロタイプに関してヘテロ接合体あるいはホモ接合体である株の選択については、S_{II} ハプロタイプの公知の配列に基づいて設計されたプライマーを用いて行うことができる。S_{II} ハプロタイプとしては、例えば S₄₄、S₆₀、S₄₀、S₂₉ 等が挙げられ、これらの配列については例えば、K a k i z a k i e t a l . , (2 0 0 6) G e n e s G e n e t . S y s t . 8 1 , 6 3 - 6 7 に開示されている。S_{II} ハプロタイプに関してヘテロ接合体あるいはホモ接合体であることの確認方法についてより具体的には、前記「(1) 自殖種子稔性アブラナ科植物の作出方法」に記載される、クラス I I - S P 1 1 (S₄₄、S₆₀、S₄₀、S₂₉) の存在を確認するプライマーセットを用いた P

C R法により判別することができる。

[0074] 本発明のF₁ハイブリッド育種用親株の育種方法によれば、工程（1 b）で得られる自家和合性株を自殖又は近親交配することによって劣性側S_{II}ハプロタイプに関してホモ接合体である株を得ることから、従来多大な労力を必要としていた蕾受粉が不要となり、簡便且つ効率よくF₁ハイブリッド育種用親株を育種することができる。蕾受粉は未開花の蕾の未熟な雌ずいに対して人工的に授粉することを指し、自家不和合性の植物であっても柱頭が未熟であるために自己の認識が行われず受粉から種子形成が行われることを利用する方法である。

[0075] （４）自家和合性アブラナ科植物のスクリーニング方法

本発明は、自家和合性アブラナ科植物のスクリーニング方法を提供する。当該スクリーニング方法は、下記工程（1 c）～（3 c）を含むことを特徴とする。

（1 c）被験アブラナ科植物からDNA試料を調製する工程；

（2 c）前記工程（1 c）で調製されたDNA試料から逆位反復配列及びSP11配列を含むDNA断片を増幅する工程；及び

（3 c）前記工程（2 c）で増幅したDNA断片の分子量または塩基配列に基づいて、アブラナ科植物の自家不和合性遺伝子座においてクラスIに属し、且つ逆位反復配列（SMI）を保持しつつ、花粉因子SP11が不活性化されている株を選択する工程。

[0076] 工程（1 c）における被験アブラナ科植物からのDNA試料の調製、工程（2 c）におけるDNA断片を増幅する方法、工程（3 c）における逆位反復配列（SMI）を保持しつつ、花粉因子SP11が不活性化されている株を選択する方法については、前記「（1）自家和合性アブラナ科植物の作出方法」に記載の通りである。

[0077] （５）自家和合性アブラナ科植物のスクリーニング用キット

前述するように、アブラナ科植物の自家不和合性遺伝子座においてクラスIに属し、且つ逆位反復配列（SMI）を保持しつつ、花粉因子SP11が

不活性化されているアブラナ科植物の株は、自家和合性であり、自殖種子稔性を有することが見出されている。かかる知見に基づいて、本発明は、更に自家和合性アブラナ科植物をスクリーニングする際に使用されるキットを提供する。当該キットには、アブラナ科植物における自家不和合性遺伝子座上のクラスIに属するS_Iハプロタイプにおいて、(i) 逆位反復配列(SMI)を保持していることを検出可能な試薬；及び(ii) 花粉因子SP11が不活性化されていることを検出可能な試薬が含まれる。

[0078] このような試薬としては、逆位反復配列、及びSP11をコードするDNA断片を特異的に増幅するプライマーが挙げられる。本発明のキットに含まれる試薬として具体的には前記「(1) 自殖種子稔性アブラナ科植物の作出方法」において記載されるプライマー等が挙げられる。

[0079] 本発明のスクリーニング用キットには、緩衝液、塩、安定化剤、防腐剤等を更に含んでもよく、従来公知の方法に従い、製剤化されていてもよい。また、本発明のキットには、前記試薬の他に、検出を実施するために必要とされ得る、反応希釈液、洗浄剤、反応停止液、コントロール試料等を含んでもよい。

実施例

[0080] 以下、試験例を挙げて、本発明を説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

[0081] 1. 自家和合性アブラナ科植物の育種

(1) 自家和合性変異株(S₀株)の取得

自家和合性変異株(Brassica rapa C634, 東北大学Brassica種子バンクより入手可能)は、M遺伝子座とS遺伝子座の両方に変異を持つ自家和合性株である(Murase et al., Science 303, 1516-1519, 2004; Fujimoto et al., Plant Mol. Biol. 61, 577-587, 2006を参照)。ここで、M遺伝子とは、MLPK(M locus protein kinase)と名付けられた膜結合型のセリン/スレオニン型

蛋白質キナーゼをコードしている。当該膜結合型のセリン／スレオニン型蛋白質キナーゼは、SP11のシグナルがレセプターであるSRKに受容された後に自家不和合性の情報を正に伝達する情報伝達因子とされている。

[0082] 本株におけるS遺伝子座においては、S54-SRK（雌ずい因子）の第1イントロンにおける塩基挿入及びS54-SP11プロモーター領域における塩基欠失が存在することが確認されている。また、本株は、クラスIに属するSハプロタイプ（S54ハプロタイプ）を有し、SP11の発現が抑制されていることが示されていた。さらに、登録されているゲノム配列（GenBank：AB190354.1）の解析により、クラスIのSMI配列を保持していることが明らかとなった。

[0083] そこでまず、本株 S_0S_0mm と自家不和合性の野生株 S_8S_8MM を交配してF1株 S_0S_8Mm を作出し、本F1株を蓄受粉により自殖することによってF2株を取得した。F2株の中には、自家和合性の株（ S_0S_0MM 、 S_0S_0Mm 、 S_0S_0mm 、 S_0S_8mm 、 S_8S_8mm ）が含まれていたが、それらの中からM遺伝子座に変異を持たない株（ S_0S_0MM ）を、ゲノムPCR法を用いて選抜し、当該株をさらに自殖を5回繰り返して S_0 株を取得した。 S_0 株は、 S_0 ハプロタイプはクラスIIに属する劣性Sハプロタイプの機能をドミナントに抑制することによって、自家和合性に変換されていると考えられる（図2を参照）。

[0084] ゲノムDNAの抽出には、DNeasy Plant Mini Kit（QIAGEN製）を使用し、植物体の葉片をサンプルとし、添付のプロトコール通りに抽出した。Mとmの判別プライマーには、下記配列番号18及び19で示されるプライマーセットを使用した。

MLPK-Forward : 5'-GCTACGAAAATGTCTTCGCCAATC-3'（配列番号18）

MLPK-Reverse : 5'-CCTAGAATTTGAAAGGCTGGATGC-3'（配列番号19）

[0085] また、PCR反応条件については以下の通りである。

95℃で解離20秒、55℃でアニーリング20秒、68℃で伸長60秒を35サイクル繰り返した。当該PCR条件のもとMの場合約300bp、m

の場合約900bpが増幅される。

[0086] (2) 自家不和合性アブラナ科植物 ($S_{60}S_{60}$ 株) の取得

$S_{60}S_{60}$ 株は、*Brassica rapa* cv. *Osome* (タキイ種苗(株)より入手)の $S_{52}S_{60}$ 株を蕾受粉により自殖させ、 $S_{60}S_{60}$ 遺伝子型を有する株をゲノムPCR法を用いて選抜し、当該株をさらに自殖を3回繰り返したものを本実施例で使用した。

[0087] S_{60} を増幅させるプライマーセットは以下の通りである。当該プライマーセットを使用したPCR法により約2kbが増幅される。なお、PCR条件については前述の通りである。

S_{60} -sp11pro-Forward : 5'-CCGAAGCTTGACAACAAAGACGGTTCTGATC-3' (配列番号20)

S_{60} -sp11pro-Reverse : 5'-CAGCCATGGCTTATGAGTATATAAGATTTTCGC-3' (配列番号21)

[0088] また、 S_{52} を増幅させるプライマーセットは以下の通りである。当該プライマーセットを使用したPCR法により約600bpが増幅される。なお、PCR条件については前述の通りである。

S_{52} -Smi-Forward : 5'-CCATGCACCAAATAAATTTCTATGG-3' (配列番号22)

S_{52} -Smi-Reverse : 5'-GAATACACCAAGATTGTGTAGAG-3' (配列番号23)

[0089] (3) 培養条件

アブラナの種子は、水で湿らせたガーゼを入れたシャーレ上で発芽させ、2~3cmの大きさになった段階で、メトロミックス (Metro Mix 250 : 株式会社ハイポネックスジャパン製) を入れたプラグトレイに移植する。本葉が7~8枚になった段階で、有機培養土 (花と野菜の有機培養土 : (株)プロトリーフ製) を入れた黒ポット (9cm径) に移植し、一か月間低温室 (温度4~5℃、光照度200~300Lux) で低温処理した。その後、ひゅうが土 (中粒) (ひゅうが土販売株式会社製) を1/3ほど敷き詰め、有機培養土 (花と野菜の有機培養土 : (株)プロトリーフ製) を入れた7号鉢に移植して、除草剤噴霧などを適宜行いながら栽培した。 S_0 株

又は S_{60} 株として、人工気象室（温度23度、光照度約1000Lux（明時）、照射時間12時間/日）で培養していた播種後2～5ヶ月のものを使用した。なお、 S_0 株についてはラピッドサイクル（RC）という早咲きになる遺伝子型で固定された品種を使用したため、低温処理を行わずに栽培した。

[0090] (4) S_0 株と S_{60} 株の交配

上記 S_0 株（ S_0S_0 ）のアブラナと自家不和合性（ $S_{60}S_{60}$ ）株のアブラナを人工授粉により交配（1回）し、得られた種子を前記培養条件下で90日間栽培した。交配に使用した親株及び交配の結果得られた自家和合性株の代表写真を図3に示す。

[0091] (5) 結果

このようにして得られたアブラナ科植物（ S_0S_{60} 株）は自家不和合性を喪失しており、自殖種子稔性であった。また、1つの鞘当たりの種子の数について比較すると、 S_0S_0 株よりも S_{60} と s_0 をヘテロで有する株の方が1鞘当たりの種子の数が多いことが示された（図4を参照）。比較対照として、クラスI Sハプロタイプをホモで有する株（ S_8S_8 株）とクラスII Sハプロタイプをホモで有する株（ $S_{60}S_{60}$ 株）の1つの鞘当たりの種子数も併せてグラフに示す。これらの株は自家不和合性であるため種子が形成されない。

[0092] また、 S_0S_{60} 株の鞘の大きさ、数、茎の太さや長さ、花の数について $S_{60}S_{60}$ 株や S_0S_0 株と比較すると、いずれについても明らかに生育が良好であった。このような表現型は雑種強勢の結果と考えられる（図3を参照）。

配列表フリーテキスト

[0093] 配列番号7は、S8sp11-genome-Forwardプライマーの塩基配列である。

配列番号8は、S8sp11-genome-Reverseプライマーの塩基配列である。

配列番号9は、SL-Forward 1プライマーの塩基配列である。

配列番号10は、SL-Reverse 1プライマーの塩基配列である。

配列番号11は、クラスII-SP11-Forwardプライマーの塩基配列である。

配列番号12は、クラスII-SP11-Reverseプライマーの塩基配列である。

配列番号13は、SL-Forward 2プライマーの塩基配列である。

- 配列番号 14 は、SLGI-Forwardプライマーの塩基配列である。
- 配列番号 15 は、SLGI-Reverseプライマーの塩基配列である。
- 配列番号 16 は、SLGII-Forwardプライマーの塩基配列である。
- 配列番号 17 は、SLGII-Reverseプライマーの塩基配列である。
- 配列番号 18 は、MLPK-Forwardプライマーの塩基配列である。
- 配列番号 19 は、MLPK-Reverseプライマーの塩基配列である。
- 配列番号 20 は、S₆₀-sp11pro-Forwardプライマーの塩基配列である。
- 配列番号 21 は、S₆₀-sp11pro-Reverseプライマーの塩基配列である。
- 配列番号 22 は、S₅₂-Smi-Forwardプライマーの塩基配列である。
- 配列番号 23 は、S₅₂-Smi-Reverseプライマーの塩基配列である。

請求の範囲

- [請求項1] 自家不和合性アブラナ科植物から自家和合性アブラナ科植物を作出する方法であって、
- アブラナ科植物の自家不和合性遺伝子座において、クラスⅠに属する S_I ハプロタイプの逆位反復配列(SMI)を保持させつつ、花粉因子SP11を不活性化させることを含む、前記作出方法。
- [請求項2] 前記アブラナ科植物がBrassica属植物である、請求項1に記載の作出方法。
- [請求項3] 前記Brassica属植物が、アブラナ、ハクサイ、カブ、コマツナ、ミズナ、チンゲンサイ、ノザワナ及びパクチョイからなる群より選択されるいずれか1種のBrassica rapaである、請求項2に記載の作出方法。
- [請求項4] 下記工程(1a)を含む自家和合性アブラナ科植物の育種方法：
- (1a) アブラナ科植物の自家不和合性遺伝子座において、クラスⅠに属し、且つ逆位反復配列を保持しつつ花粉因子SP11が不活性化された S_0 ハプロタイプを有する株と、クラスⅡに属する S_{II} ハプロタイプを有する株とを交配し、自家和合性株を得る工程。
- [請求項5] 下記工程(2a)を更に含む、請求項4に記載の育種方法：
- (2a) 前記工程(1a)で得られた自家和合性株のアブラナ科植物を自殖すること、又は S ハプロタイプに関して同じ遺伝子型の株を用いて近親交配を行うことにより、 S_0 ハプロタイプに関してホモ接合体である株を選択する工程。
- [請求項6] 前記工程(2a)を5～7回繰り返す、請求項5に記載の育種方法。
- [請求項7] 下記工程(1b)～(3b)を含む、アブラナ科植物のF1ハイブリッド育種用親株の育種方法：
- (1b) アブラナ科植物の自家不和合性遺伝子座において、クラスⅠに属し、且つ逆位反復配列を保持しつつ花粉因子SP11が不活性化

された S_0 ハプロタイプを有する株と、クラスⅠⅠに属する S_{II} ハプロタイプを有する株とを交配し、自家和合性株を得る工程；

(2 b) 前記工程(1 b)で得られた自家和合性のアブラナ科植物を自殖する、又は S ハプロタイプに関して同じ遺伝子型の株を用いて近親交配を行う工程；及び

(3 b) 前記工程(2 b)において得られた株からクラスⅠⅠに属する S_{II} ハプロタイプに関してホモ接合体である株を選択する工程。

[請求項8] 前記工程(2 b)を5～7回繰り返す、請求項7に記載の育種方法。

[請求項9] 下記工程(1 c)～(3 c)を含む、自家和合性アブラナ科植物のスクリーニング方法であって、

(1 c) 被験アブラナ科植物からDNA試料を調製する工程；

(2 c) 前記工程(1 c)で調製されたDNA試料から、逆位反復配列及びSP11をコードする塩基配列を含むDNA断片を増幅する工程；及び

(3 c) 前記工程(2 c)で増幅したDNA断片の分子量又は塩基配列に基づいて、アブラナ科植物の自家不和合性遺伝子座において、クラスⅠに属し、且つ逆位反復配列を保持しつつ花粉因子SP11が不活性化されている株を選択する工程。

[請求項10] 自家和合性アブラナ科植物のスクリーニング用キットであって、アブラナ科植物における自家不和合性遺伝子座上のクラスⅠに属する S_I ハプロタイプにおいて、

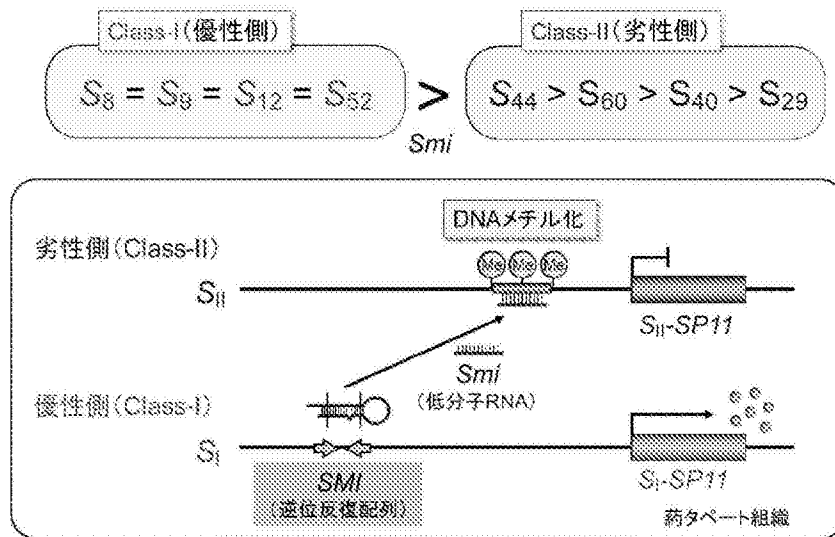
(i) 逆位反復配列(SMI)を保持していることを検出可能な試薬；及び

(ii) 花粉因子SP11が不活性化されていることを検出可能な試薬を含む、前記キット。

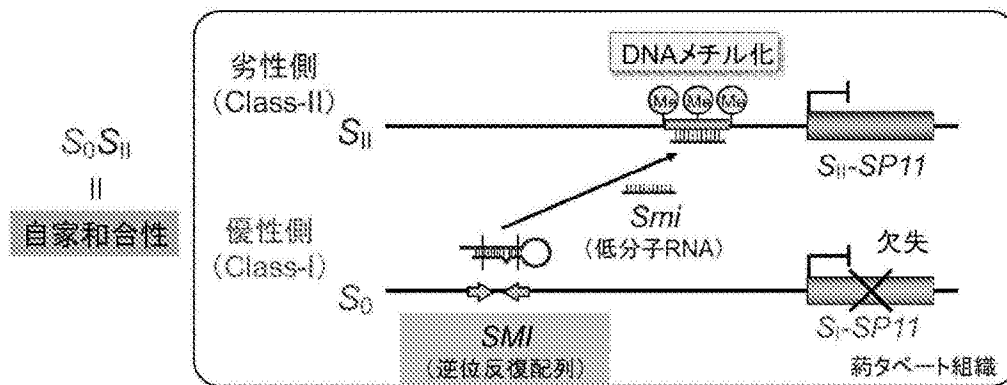
[請求項11] 自家不和合性遺伝子座において、クラスⅠに属し、且つ逆位反復配

列を保持しつつ花粉因子SP11が不活性化されたS₀ハプロタイプを有するアブラナ科植物の株と、自家不和合性遺伝子座において、クラスIIに属するS_{II}ハプロタイプを有するアブラナ科植物の株の、自家和合性アブラナ科植物の作出のための使用。

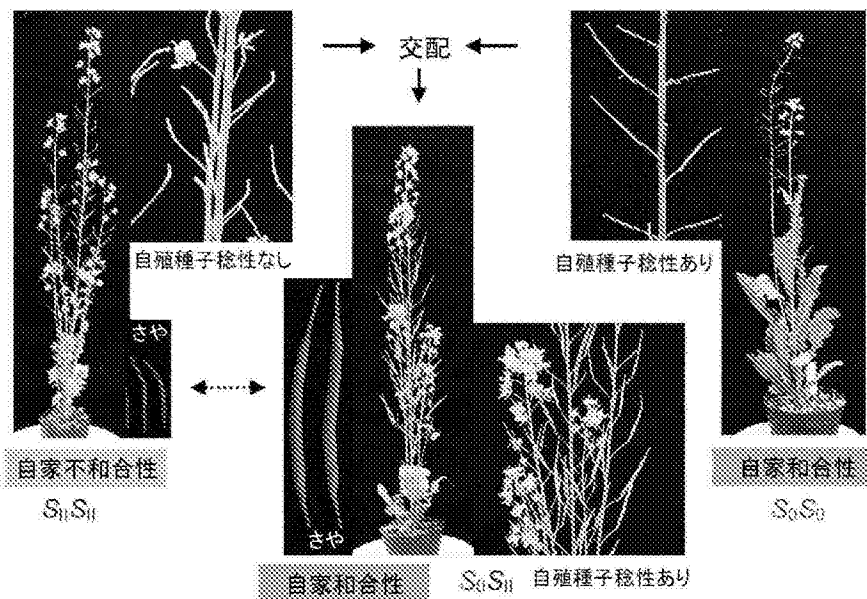
[図1]



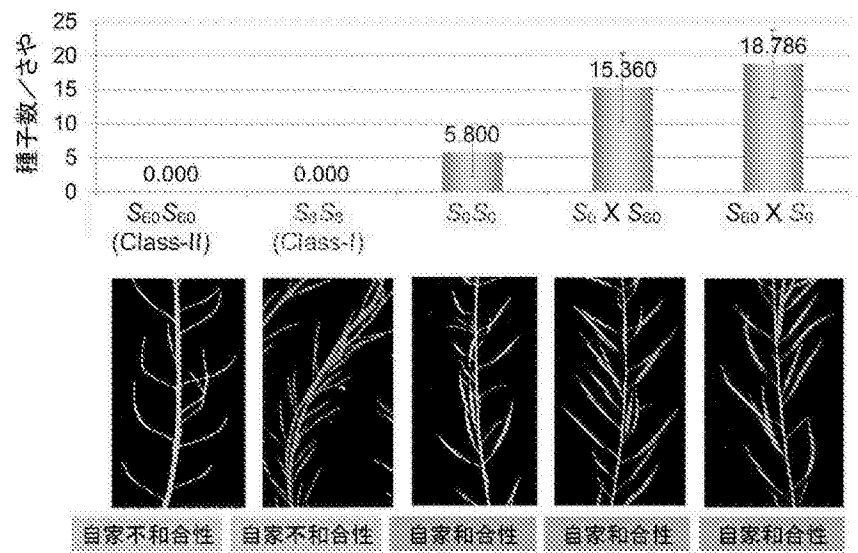
[図2]



[図3]



[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2014/050958

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
A01H1/02(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, C12N15/09(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)
A01H1/02, C12Q1/68, C12N15/09

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII), Thomson Innovation

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	OKAMOTO S. et al., Self-compatibility in Brassica napus is caused by independent mutations in S-locus genes, Plant J., 2007, Vol.50, p.391-400	1-3 4-11
A	TARUTANI Y. et al., Trans-acting small RNA determines dominance relationships in Brassica self-incompatibility., Nature, 2010, Vol.466, Iss.7309, p.983-986	4-11
A	SHIBA H. et al., Epigenetic regulation of monoallelic gene expression., Dev. Growth Differ., 2012, Vol.54, No.1, p.120-128	4-11

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 17 March, 2014 (17.03.14)	Date of mailing of the international search report 25 March, 2014 (25.03.14)
--	---

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/050958

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Yoshiaki TARUTANI et al., "Aburana no Jikafuwagosei ni Okeru small RNA o Kaishita Yuretsusei Kiko", Cell technology, 2010, vol.29, no.12, pages 1254 to 1256	4-11
A	Yoshiaki TARUTANI et al., "New Molecular Mechanism Underlying Dominance Relation-ships", Seibutsu to Kagaku, 2011, vol.49, no.10, pages 678 to 682	4-11
A	FUJIMOTO R. et al., Molecular mechanisms of epigenetic variation in plants., Int. J. Mol. Sci., 2012, Vol.13, No.8, p.9900-9922	4-11
A	OSABE K. et al., Multiple mechanisms and challenges for the application of allopolyploidy in plants., Int. J. Mol. Sci., 2012, Vol.13, No.7, p.8696-8721	4-11
A	ZHANG X. et al., Progress on characterization of self-incompatibility in Brassica napus L., Euphytica, 2011, Vol.182, p.147-155	4-11
A	FINNEGAN EJ. et al., Self-incompatibility: Smi silences through a novel sRNA pathway., Trends Plant Sci., 2011, Vol.16, No.5, p.238-241	4-11

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. A01H1/02(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n</p>		
<p>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. A01H1/02, C12Q1/68, C12N15/09</p>		
<p>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</p>		
<p>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） CAplus/MEDLINE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), Thomson Innovation</p>		
<p>C. 関連すると認められる文献</p>		
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 A	OKAMOTO S. et al., Self-compatibility in Brassica napus is caused by independent mutations in S-locus genes, Plant J., 2007, Vol.50, p.391-400	1-3 4-11
A	TARUTANI Y. et al., Trans-acting small RNA determines dominance relationships in Brassica self-incompatibility., Nature, 2010, Vol.466, Iss.7309, p.983-986	4-11
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>		
<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</p>		
国際調査を完了した日 17.03.2014	国際調査報告の発送日 25.03.2014	
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） 吉森 晃 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 3633

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	SHIBA H. et al., Epigenetic regulation of monoallelic gene expression., <i>Dev. Growth Differ.</i> , 2012, Vol. 54, No. 1, p. 120-128	4-11
A	樽谷芳明, 他, アブラナの自家不和合性における <i>sma11</i> RNA を介した優劣性機構, <i>細胞工学</i> , 2010, Vol. 29, no. 12, p. 1254-1256	4-11
A	樽谷芳明, 他, 優性遺伝子が劣性遺伝子に勝つ新たな仕組み メンデルの遺伝の法則に新たな視点, <i>生物と化学</i> , 2011, Vol. 49, No. 10, p. 678-682	4-11
A	FUJIMOTO R. et al., Molecular mechanisms of epigenetic variation in plants., <i>Int. J. Mol. Sci.</i> , 2012, Vol. 13, No. 8, p. 9900-9922	4-11
A	OSABE K. et al., Multiple mechanisms and challenges for the application of allopolyploidy in plants., <i>Int. J. Mol. Sci.</i> , 2012, Vol. 13, No. 7, p. 8696-8721	4-11
A	ZHANG X. et al., Progress on characterization of self-incompatibility in <i>Brassica napus</i> L., <i>Euphytica</i> , 2011, Vol. 182, p. 147-155	4-11
A	FINNEGAN EJ. et al., Self-incompatibility: <i>Smi</i> silences through a novel sRNA pathway., <i>Trends Plant Sci.</i> , 2011, Vol. 16, No. 5, p. 238-241	4-11