

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5835832号
(P5835832)

(45) 発行日 平成27年12月24日 (2015. 12. 24)

(24) 登録日 平成27年11月13日 (2015. 11. 13)

(51) Int. Cl.	F 1					
C 1 2 N	15/09	(2006. 01)	C 1 2 N	15/00	Z N A A	
A O 1 H	1/00	(2006. 01)	A O 1 H	1/00	A	
A O 1 H	5/00	(2006. 01)	A O 1 H	5/00	A	

請求項の数 12 (全 24 頁)

(21) 出願番号	特願2010-203501 (P2010-203501)	(73) 特許権者	591060980
(22) 出願日	平成22年9月10日 (2010. 9. 10)		岡山県
(65) 公開番号	特開2012-55266 (P2012-55266A)		岡山県岡山市北区内山下2丁目4番6号
(43) 公開日	平成24年3月22日 (2012. 3. 22)	(74) 代理人	110000338
審査請求日	平成25年6月17日 (2013. 6. 17)		特許業務法人HARAKENZO WORLD PATENT & TRADEMARK
特許法第30条第1項適用	第51回日本植物生理学会年会要旨集 (平成22年3月12日) 第51回日本植物生理学会年会委員会発行 第215ページに発表	(72) 発明者	後藤 弘爾
特許権者において、権利譲渡・実施許諾の用意がある。			岡山県加賀郡吉備中央町吉川7549-1 岡山県農林水産総合センター 生物科学研究所内
		(72) 発明者	花野 滋
			岡山県加賀郡吉備中央町吉川7549-1 岡山県農林水産総合センター 生物科学研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 花序形態が制御された植物体の生産方法、開花時期が制御された植物体の生産方法、およびこれらを用いて得られる植物体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号1に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子と、
転写活性化ドメインまたは転写抑制化ドメインをコードするポリヌクレオチドと、
からなるキメラ遺伝子を含む組換え発現ベクターを、植物細胞に導入する形質転換工程を含んでおり、

上記転写活性化ドメインまたは転写抑制化ドメインとして、それぞれ、配列番号3または5に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを用いることを特徴とする、花序形態が制御された植物体の生産方法。

【請求項2】

上記タンパク質をコードする遺伝子として、配列番号2に示される塩基配列をオープンリーディングフレーム領域として有する遺伝子を用いることを特徴とする請求項1に記載の植物体の生産方法。

【請求項3】

上記転写活性化ドメインまたは転写抑制化ドメインをコードするポリヌクレオチドとして、それぞれ、配列番号4または6に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを用いることを特徴とする請求項1または2に記載の植物体の生産方法。

【請求項4】

上記タンパク質をコードする遺伝子と配列番号3に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとからなるキメラ遺伝子を含む組換え発現ベクター

一を、植物細胞に導入する形質転換工程を含むことにより、無限性花序形態を有限性花序形態に変化させることを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の植物体の生産方法。

【請求項 5】

上記タンパク質をコードする遺伝子と配列番号 5 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとからなるキメラ遺伝子を含む組換え発現ベクターを、植物細胞に導入する形質転換工程を含むことにより、有限性花序形態を無限性花序形態に変化させることを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の植物体の生産方法。

【請求項 6】

配列番号 1 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子と、転写活性化ドメインまたは転写抑制化ドメインをコードするポリヌクレオチドと、からなるキメラ遺伝子を含む組換え発現ベクターを、植物細胞に導入する形質転換工程を含んでおり、

上記転写活性化ドメインまたは転写抑制化ドメインとして、それぞれ、配列番号 3 または 5 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを用いることを特徴とする、開花時期が制御された植物体の生産方法。

【請求項 7】

上記タンパク質をコードする遺伝子として、配列番号 2 に示される塩基配列をオープンリーディングフレーム領域として有する遺伝子を用いることを特徴とする請求項 6 に記載の植物体の生産方法。

【請求項 8】

上記転写活性化ドメインまたは転写抑制化ドメインをコードするポリヌクレオチドとして、それぞれ、配列番号 4 または 6 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを用いることを特徴とする請求項 6 または 7 に記載の植物体の生産方法。

【請求項 9】

上記タンパク質をコードする遺伝子と配列番号 3 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとからなるキメラ遺伝子を含む組換え発現ベクターを、植物細胞に導入する形質転換工程を含むことにより、開花時期を早めることを特徴とする請求項 6 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の植物体の生産方法。

【請求項 10】

上記タンパク質をコードする遺伝子と配列番号 5 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとからなるキメラ遺伝子を含む組換え発現ベクターを、植物細胞に導入する形質転換工程を含むことにより、開花時期を遅らせることを特徴とする請求項 6 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の植物体の生産方法。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の生産方法により生産された植物体。

【請求項 12】

配列番号 1 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子と、配列番号 3 に示されるアミノ酸配列からなるペプチドまたは配列番号 5 に示されるアミノ酸配列からなるペプチドをコードするポリヌクレオチドと、からなるキメラ遺伝子。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、花序形態が制御された植物体の生産方法、開花時期が制御された植物体の生産方法、およびこれらを用いて得られる植物体に関するものであり、特に、大量の農作物にも時間とコストとをかけずに適用可能な、花序形態が制御された植物体の生産方法、開花時期が制御された植物体の生産方法、およびこれらを用いて得られる植物体に関する。

【背景技術】

【0002】

10

20

30

40

50

植物の器官はメリステムと呼ばれる幹細胞群から発生する。地上部においては茎頂メリステムから様々な組織が形成されるが、その制御機構については不明な部分が多く残されている。一般に、植物は発芽後の栄養生長から生殖生長に移行すると、それまで葉を形成していたメリステムから花が形成されるようになる。この栄養生長から生殖成長への移行を「花成」と呼ぶ。また、花の付き方を「花序」と呼び、顕花植物においては、無限花序または有限花序のうちのどちらかの花序構成となる。無限花序とは花序軸の先端に花をつけない花序をいい、有限花序とは花序軸の先端に花をつける花序をいう。

【0003】

TERMINAL FLOWER 1遺伝子 (T F L 1 遺伝子、以下本明細書において「 T F L 1 遺伝子」と称する。) は、シロイヌナズナの開花早化変異体である *tf11* 変異体の原因遺伝子として見出された。また、このシロイヌナズナの *tf11* 変異体では、野生型の無限花序が有限花序に変換される。これまでの研究から、 T F L 1 遺伝子は開花を遅延させ、花序メリステムを維持する働きを持っていることが知られている。一方、 T F L 1 遺伝子に対し 59% のアミノ酸配列が保存されている FLOWERING LOCUS T 遺伝子 (F T 遺伝子) は開花を促進させる。 T F L 1 遺伝子と相同性をもつ遺伝子は、シロイヌナズナ以外の植物からも見出されており、これを T F L 1 ファミリーと称する。イネ (*Oryza sativa*) 由来の *Hd3a* 遺伝子は F T 遺伝子と類似しており、花成を促進することが知られている。

10

【0004】

F T は F D が存在すると核内に存在することが知られていることから、 F T は b Z I P 転写因子である F D に結合し、拮抗的に機能調節を行うというモデルが提唱されている。一方、 F T と高い相同性を持つが機能的には反対である T F L 1 については、そのメカニズムの詳細は明らかとなっていない。両者は異なるメカニズムで花成に関わる遺伝子の転写調節に関わっている可能性がある。

20

【0005】

農作物の生産において、花序形態の制御は、着花数と直接的に関わっており、作物の増産に繋がっている。現実の農作業現場では、摘心という茎頂を切断する作業によって、末端の花序形態を変化させ、収量や品質の向上に取り組んでいる。通常では、摘心は人手で行うため大量の農作物に適用するには、膨大な時間とコストがかかる。また、花成の制御は作物の収穫時期や収穫量の調節において非常に重要なポイントである。

30

【0006】

上述したように、花序形態や花成の決定に関わる遺伝子のいくつかは同定されており、それらを使用した発明が公開されている (例えば、特許文献1参照)。しかし、その詳細なメカニズムは依然として明らかにされておらず、上記遺伝子のホモログのゲノム配列が未知である植物での使用は難しい。

【0007】

ところで、転写活性化ドメインを用いて、植物を形質転換する方法が知られている (例えば、非特許文献1参照)。非特許文献1には、花芽分裂組織決定遺伝子として知られている A P 1 (A P E T A L A 1) と、転写活性化ドメインである V P 1 6 との融合タンパク質を過剰発現させたことが報告され、形質転換体を評価することによって A P 1 の機能を解析した結果が開示されている。なお、 A P 1 は、転写因子である M A D S ドメインを有していることが知られている。

40

【0008】

また、転写抑制化ドメインを用いて、植物を形質転換する方法も知られており、例えば、植物において環境応答や形態形成を制御する転写因子と、転写抑制化ドメインとを融合させたキメラタンパク質を植物体で生産させ、花芽形成に関与する遺伝子の発現を抑制することによって、花芽形成遅延植物体を生産する方法が開示されている (例えば、特許文献2参照)。

【先行技術文献】

【特許文献】

50

【 0 0 0 9 】

【特許文献 1】特開 2 0 0 7 - 2 0 2 4 4 1 号公報 (2 0 0 7 年 8 月 1 6 日公開)

【特許文献 2】特開 2 0 0 5 - 2 9 5 8 7 8 号公報 (2 0 0 5 年 1 0 月 2 7 日公開)

【非特許文献】

【 0 0 1 0 】

【非特許文献 1】The Plant Cell, Vol. 13, 739 753, April 2001

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 1 1 】

上記したように農作物の生産において、花序形態や花成の制御は、収量や品質の向上、
或いは作物の収穫時期や収穫量の調節に重要であるが、人手で行っているのが現状であり、
膨大な時間とコストがかかるという問題がある。

10

【 0 0 1 2 】

本発明は、上記の問題点に鑑みてなされたものであり、その目的は、大量の農作物にも
時間とコストとをかけずに適用可能な、花序形態が制御された植物体の生産方法、開花時
期が制御された植物体の生産方法、およびこれらを用いて得られる植物体を実現すること
にある。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 3 】

本発明に係る植物体の生産方法は、花序形態が制御された植物体の生産方法であり、上
記課題を解決するために、以下の (i) 又は (i i) 記載のタンパク質：

20

(i) 配列番号 1、17 または 19 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、

(i i) 配列番号 1、17 または 19 に示されるアミノ酸配列において、1 個又は数個
のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び/又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つ、開
花を遅延させ、花序メリステムを維持する機能を有するタンパク質、をコードする遺伝子
と、転写活性化ドメインまたは転写抑制化ドメインをコードするポリヌクレオチドと、か
らなるキメラ遺伝子を含む組換え発現ベクターを、植物細胞に導入する形質転換工程を含
んでいることを特徴としている。

【 0 0 1 4 】

上記の構成によれば、既存の方法とは異なり、TFL1 と同様の機能を有するホモログ
のゲノム遺伝子情報が未知の生物種においても、本発明のキメラ遺伝子を導入することで
、花序形態の制御が可能となるという効果を奏する。

30

【 0 0 1 5 】

本発明に係る植物体の生産方法では、上記転写活性化ドメインは、配列番号 3 に示され
るアミノ酸配列からなるペプチドであり、上記転写抑制化ドメインは、配列番号 5 に示さ
れるアミノ酸配列からなるペプチドであることが好ましい。

【 0 0 1 6 】

本発明に係る植物体の生産方法では、上記 (i) 又は (i i) 記載のタンパク質をコー
ドする遺伝子として、以下の (a) 又は (b) 記載の遺伝子：

(a) 配列番号 2、18 または 20 に示される塩基配列をオープンリーディングフレー
ム領域として有する遺伝子、

40

(b) 配列番号 2、18 または 20 に示される塩基配列からなる遺伝子と相補的な塩基
配列からなる遺伝子とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、且つ、開花を遅延さ
せ、花序メリステムを維持する機能を有するタンパク質をコードする遺伝子、を用いるこ
とが好ましい。

【 0 0 1 7 】

本発明に係る植物体の生産方法では、上記転写活性化ドメインまたは転写抑制化ドメイ
ンをコードするポリヌクレオチドとして、それぞれ、配列番号 4 または 6 に示される塩基
配列からなるポリヌクレオチドを用いることが好ましい。

【 0 0 1 8 】

50

本発明に係る植物体の生産方法では、上記(i)又は(ii)記載のタンパク質をコードする遺伝子と上記転写活性化ドメインをコードするポリヌクレオチドとからなるキメラ遺伝子を含む組換え発現ベクターを、植物細胞に導入する形質転換工程を含むことにより、無限性花序形態を有限性花序形態に変化させてもよい。

【0019】

上記構成により、無限性花序をもつ植物に対し、本発明を適用することで、有限花序を持つ新品種の創出が可能となる。花序形態の変化は、着花数も増大させ、収量の向上が期待できるというさらなる効果を奏する。

【0020】

本発明に係る植物体の生産方法では、上記(i)又は(ii)記載のタンパク質をコードする遺伝子と上記転写抑制化ドメインをコードするポリヌクレオチドとからなるキメラ遺伝子を含む組換え発現ベクターを、植物細胞に導入する形質転換工程を含むことにより、有限性花序形態を無限性花序形態に変化させてもよい。

10

【0021】

上記構成により、本来有限花序である植物を無限花序に変化させることにより、植物は栄養生長を続けることができるようになるという効果を奏する。

【0022】

本発明に係る植物体の生産方法は、開花時期が制御された植物体の生産方法であり、上記課題を解決するために、以下の(i)又は(ii)記載のタンパク質：

(i) 配列番号1、17または19に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、

20

(ii) 配列番号1、17または19に示されるアミノ酸配列において、1個又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び/又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つ、開花を遅延させ、花序メリステムを維持する機能を有するタンパク質、をコードする遺伝子と、転写活性化ドメインまたは転写抑制化ドメインをコードするポリヌクレオチドと、からなるキメラ遺伝子を含む組換え発現ベクターを、植物細胞に導入する形質転換工程を含んでいることを特徴としている。

【0023】

上記の構成によれば、既存の方法とは異なり、TFL1と同様の機能を有するホモログのゲノム遺伝子情報が未知の生物種においても、本発明のキメラ遺伝子を導入することで、開花時期の制御が可能となるという効果を奏する。

30

【0024】

本発明に係る植物体の生産方法では、上記転写活性化ドメインは、配列番号3に示されるアミノ酸配列からなるペプチドであり、上記転写抑制化ドメインは、配列番号5に示されるアミノ酸配列からなるペプチドであることが好ましい。

【0025】

本発明に係る植物体の生産方法では、上記(i)又は(ii)記載のタンパク質をコードする遺伝子として、以下の(a)又は(b)記載の遺伝子：

(a) 配列番号2、18または20に示される塩基配列をオープンリーディングフレーム領域として有する遺伝子、

(b) 配列番号2、18または20に示される塩基配列からなる遺伝子と相補的な塩基配列からなる遺伝子とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、且つ、開花を遅延させ、花序メリステムを維持する機能を有するタンパク質をコードする遺伝子、を用いることが好ましい。

40

【0026】

本発明に係る植物体の生産方法では、上記転写活性化ドメインまたは転写抑制化ドメインをコードするポリヌクレオチドとして、それぞれ、配列番号4または6に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを用いることが好ましい。

【0027】

本発明に係る植物体の生産方法では、上記(i)又は(ii)記載のタンパク質をコードする遺伝子と上記転写活性化ドメインをコードするポリヌクレオチドとからなるキメラ

50

遺伝子を含む組換え発現ベクターを、植物細胞に導入する形質転換工程を含むことにより、開花時期を早めてもよい。

【0028】

上記構成により、開花時期を早めて、作物の収穫時期や収穫量を調節することができるというさらなる効果を奏する。

【0029】

本発明に係る植物体の生産方法では、上記(i)又は(ii)記載のタンパク質をコードする遺伝子と上記転写抑制化ドメインをコードするポリヌクレオチドとからなるキメラ遺伝子を含む組換え発現ベクターを、植物細胞に導入する形質転換工程を含むことにより、開花時期を遅らせてもよい。

10

【0030】

上記構成により、開花時期を遅らせて、作物の収穫時期や収穫量を調節することができるというさらなる効果を奏する。

【0031】

本発明に係る植物体は、上記の生産方法により生産されたものであることが好ましい。

【0032】

本発明に係るキメラ遺伝子は、以下の(i)又は(ii)記載のタンパク質：

(i) 配列番号1、17または19に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、

(ii) 配列番号1、17または19に示されるアミノ酸配列において、1個又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び/又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つ、開花を遅延させ、花序メリステムを維持する機能を有するタンパク質、をコードする遺伝子と、転写活性化ドメインまたは転写抑制化ドメインをコードするポリヌクレオチドと、からなることを特徴としている。

20

【0033】

本発明に係るキメラ遺伝子では、上記転写活性化ドメインは、配列番号3に示されるアミノ酸配列からなるペプチドであり、上記転写抑制化ドメインは、配列番号5に示されるアミノ酸配列からなるペプチドであることが好ましい。

【発明の効果】

【0034】

本発明に係る花序形態が制御された植物体の生産方法、および、開花時期が制御された植物体の生産方法は、以上のように、上記(i)又は(ii)記載のタンパク質をコードする遺伝子と、転写活性化ドメインまたは転写抑制化ドメインをコードするポリヌクレオチドと、からなるキメラ遺伝子を含む組換え発現ベクターを、植物細胞に導入する形質転換工程を含んでいるので、既存の方法とは異なり、TFL1と同様の機能を有するホモログのゲノム遺伝子情報が未知の生物種においても、本発明のキメラ遺伝子を導入することで、花序形態の制御が可能となるという効果を奏する。

30

【図面の簡単な説明】

【0035】

【図1】実施例1において、TFL1:VP16MおよびTFL1:SRDXを導入した植物の形態を示す図である。

40

【図2】実施例1において、TFL1:VP16MおよびTFL1:SRDXを導入した植物の花茎が抽臺(抽だい)したときのロゼット葉の数と花芽の数とを示す図である。

【図3】参考例において使用したシロイヌナズナ $tf11$ 変異体のアミノ酸置換部位を示した図である。

【図4】参考例の結果を示す図であり、Aは、野性型植物および $tf11$ 変異体における花茎が抽臺したときのロゼット葉の数を示す図であり、Bは、野性型植物および $tf11$ 変異体における花芽の数を示す図である。

【図5】実施例において用いる発現ベクターの作製方法を示す工程図である。

【図6】VP16をコードするポリヌクレオチドの塩基配列を示す図である。

【図7】実施例において用いるベクターの構造を示す図である。

50

【発明を実施するための形態】

【0036】

本発明の一実施形態について説明すると以下の通りである。なお、本発明はこれに限定されるものではない。

【0037】

本発明者らは上記本発明の課題を解決するために、シロイヌナズナのTF L 1遺伝子または、タバコのTF L 1遺伝子のホモログをタバコで過剰発現させたが、TF L 1遺伝子単独では、開花時期や花序形態を殆ど変化させることはできなかった。そこで、従来、転写因子との融合タンパク質として、形質転換に用いられていた転写活性化ドメインおよび転写抑制化ドメインをコードするポリヌクレオチドと、転写因子として特徴的なドメインを有さないTF L 1タンパク質をコードする遺伝子とからなるキメラ遺伝子を植物細胞に導入したところ、驚くべきことに花序形態が制御された形質転換体を得ることができることを見出した。さらに、当該キメラ遺伝子を導入することにより、開花時期を調節することもできることを見出し、本発明を完成させるに至った。

10

【0038】

上述したように、TF L 1遺伝子には転写因子が含まれないことから、TF L 1遺伝子に、転写活性化ドメインおよび転写抑制化ドメインをコードするポリヌクレオチドを融合させるという前例はなかった。理由は明らかではないが、TF L 1遺伝子と、転写活性化ドメインおよび転写抑制化ドメインをコードするポリヌクレオチドとからなるキメラ遺伝子を導入することにより、開花時期や花序形態を制御することができる。

20

【0039】

上記知見より、TF L 1タンパク質と相同性を有するとともに、同様の機能、すなわち、開花を遅延させ、花序メリステムを維持する機能を有するタンパク質をコードする遺伝子を用いた場合にも同様の効果を得ることができると考えられる。すなわち、本発明に係る植物体の生産方法は、花序形態が制御された植物体および開花時期が制御された植物体の生産方法であり、以下の(i)又は(ii)記載のタンパク質：

(i) 配列番号1、17または19に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、

(ii) 配列番号1、17または19に示されるアミノ酸配列において、1個又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び/又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つ、開花を遅延させ、花序メリステムを維持する機能を有するタンパク質、をコードする遺伝子と、転写活性化ドメインまたは転写抑制化ドメインをコードするポリヌクレオチドと、からなるキメラ遺伝子を含む組換え発現ベクターを、植物細胞に導入する形質転換工程を含んでいる。

30

【0040】

本発明によれば、既存の方法とは異なり、TF L 1と同様の機能を有するホモログのゲノム遺伝子情報が未知の生物種においても、本発明のキメラ遺伝子を導入することで、機能欠損株の作製、開花時期の制御、および、花序形態の制御が可能となる。

【0041】

また、従来遺伝子変異体とは異なり、植物が本来もっている機能遺伝子も植物内に残っているので、基本的な生長における影響を最小限に抑えることができる。また、本発明によるキメラ遺伝子を空間および時期特異的なプロモーターを用いて発現させることで、空間および時期特異的に開花遺伝子の機能を欠失させることができ、より精密なコントロールが可能になる。

40

【0042】

さらに、本発明による方法は、植物が本来持っている内生の遺伝子産物に対し拮抗的に作用しうると考えられるので、当該ホモログの変異体が存在していない植物や、当該ホモログの遺伝子配列が未知である植物においても、同様の効果が期待できる。

【0043】

(I) (i) 又は(ii) 記載のタンパク質をコードする遺伝子

本発明において、上記(i) 又は(ii) 記載のタンパク質は、シロイヌナズナのTF

50

L1タンパク質、または、TFL1と相同性を有するとともに、TFL1タンパク質と同様に、開花を遅延させ、花序メリステムを維持する機能を有するタンパク質であれば特に限定されるものではない。

【0044】

このようなタンパク質としては、シロイヌナズナのTFL1タンパク質の他に、例えば、キンギョソウのCENタンパク質、トマトのSPタンパク質等を挙げることができる。

【0045】

本発明で用いられる、シロイヌナズナのTFL1タンパク質は、配列番号1に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質であり、キンギョソウのCENタンパク質は配列番号17に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質であり、トマトのSPタンパク質は配列番号19に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質である。

10

【0046】

また、上記タンパク質としては、配列番号1、17または19に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質に限定されるものではなく、配列番号1、17または19に示されるアミノ酸配列において、それぞれ、1個又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び/又は付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であっても、上記機能を有していれば本発明にて用いることができる。なお、上記の「配列番号1、17または19に示されるアミノ酸配列において、1個又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び/又は付加されたアミノ酸配列」における「1個又は数個」の範囲は特に限定されないが、例えば、1から20個、好ましくは1から10個、より好ましくは1から7個、さらに好ましくは1個から5個、特に好ましくは1個から3個を意味する。

20

【0047】

上記機能を有するタンパク質のアミノ酸配列は、種の異なる数多くの植物間において保存性が高いものであることが知られている。そのため、花序形態や開花時期を制御したい個々の植物体において、TFL1タンパク質と相同性を有するとともに、同様の機能を有するタンパク質をコードする遺伝子を必ずしも単離する必要はない。すなわち、上記(i)又は(ii)記載のタンパク質をコードする遺伝子を用いたキメラ遺伝子を、他の植物に導入することにより、さまざまな種の植物において簡便に花序形態や開花時期が制御された植物体を生産することができる。

【0048】

本発明に係る植物体の生産方法は、上記(i)又は(ii)記載のタンパク質をコードする遺伝子と、転写活性化ドメインまたは転写抑制化ドメインをコードするポリヌクレオチドと、からなるキメラ遺伝子を含む組換え発現ベクターを、植物細胞に導入する形質転換工程を含んでおり、当該方法により形質転換された植物体においては、上記(i)又は(ii)記載のタンパク質と、転写活性化ドメインまたは転写抑制化ドメインとからなるキメラタンパク質が生産される。

30

【0049】

上記(i)又は(ii)記載のタンパク質をコードする遺伝子としては特に限定されるものではなく、遺伝暗号に基づいて、上記(i)又は(ii)記載のタンパク質のアミノ酸配列に対応するものであればよい。具体的な一例としては、例えば、上記タンパク質としてTFL1タンパク質を用いる場合には、このTFL1タンパク質をコードする遺伝子(説明の便宜上、TFL1遺伝子と称する)を挙げることができる。TFL1遺伝子の具体的な一例としては、例えば、配列番号2に示される塩基配列をオープンリーディングフレーム(ORF)として含むポリヌクレオチドを挙げることができる。また、上記タンパク質としてCENタンパク質を用いる場合には、このCENタンパク質をコードする遺伝子(説明の便宜上、CEN遺伝子と称する)を挙げることができる。CEN遺伝子の具体的な一例としては、例えば、配列番号18に示される塩基配列をオープンリーディングフレーム(ORF)として含むポリヌクレオチドを挙げることができる。また、上記タンパク質としてSPタンパク質を用いる場合には、このSPタンパク質をコードする遺伝子(説明の便宜上、SP遺伝子と称する)を挙げることができる。SP遺伝子の具体的な一例

40

50

としては、例えば、配列番号20に示される塩基配列をオープンリーディングフレーム(ORF)として含むポリヌクレオチドを挙げることができる。

【0050】

もちろん、本発明で用いられるTFL1タンパク質、CENタンパク質またはSPタンパク質をコードする遺伝子としては、上記の例に限定されるものではなく、それぞれ、配列番号2、18または20に示される塩基配列と同一性を有する遺伝子であってもよい。具体的には、例えば、配列番号2、18または20に示される塩基配列からなる遺伝子と相補的な塩基配列からなる遺伝子とストリンジентな条件でハイブリダイズし、かつ、上記開花を遅延させ、花序メリステムを維持する機能を有するタンパク質をコードする遺伝子を挙げることができる。なお、本明細書において「ストリンジентな条件」とは、

10

【0051】

上記ハイブリダイゼーションは、J. Sambrook et al. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory (1989)に記載されている方法等、従来公知の方法で行うことができる。通常、温度が高いほど、塩濃度が低いほどストリンジエンシーは高くなる(ハイブリダイズし難くなる)。

【0052】

20

上記(i)又は(ii)記載のタンパク質をコードする遺伝子を取得する方法は特に限定されるものではなく、従来公知の方法により、多くの植物から単離することができる。例えば、既知のTFL1タンパク質、CENタンパク質またはSPタンパク質をコードする遺伝子の塩基配列に基づき作製したプライマー対を用いることができる。このプライマー対を用いて、植物のcDNA又はゲノミックDNAを鋳型としてPCRを行うこと等により上記遺伝子を得ることができる。また、TFL1タンパク質、CENタンパク質またはSPタンパク質をコードする遺伝子は、従来公知の方法により化学合成して得ることもできる。

【0053】

(II)転写活性化ドメインをコードするポリヌクレオチド、転写抑制化ドメインをコードするポリヌクレオチド

30

本発明で用いられる、転写活性化ドメインとしては、転写活性化ドメインとして知られているものであれば特に限定されるものではなく、公知の転写活性化ドメインを用いることができる。より具体的には、例えば、ヘルペスウイルス由来VP16タンパク質の転写活性化ドメインであるVP16を好適に用いることができる。また、Gal4、Oaf1、Leu3、Rtg3、Pho4、Gln3、Gcn4、p53、NFAT、NF-Bなどに共通にみられる、9アミノ酸からなるトランスアクティベーションドメインを持つ、転写活性化領域も上記転写活性化ドメインとして用いることができる。

【0054】

VP16は、具体的には、配列番号3に示されるアミノ酸配列からなるペプチドである。また、上記転写活性化ドメインは、配列番号3に示されるアミノ酸配列において、1個又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び/又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つ、転写活性化ドメインとしての機能を有するペプチドであってもよい。なお、上記の「配列番号3に示されるアミノ酸配列において、1個又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び/又は付加されたアミノ酸配列」における「1個又は数個」の範囲は、例えば、1個から7個、より好ましくは1個から5個、さらに好ましくは1個から3個を意味する。

40

【0055】

また、本発明で用いられる、転写抑制化ドメインとしても、転写抑制化ドメインとして知られているものであれば特に限定されるものではなく、公知の転写抑制化ドメインを用

50

いることができる。より具体的には、例えば、SRDXを好適に用いることができる。また、engrailed遺伝子、アデノウイルスE1A、Lacリプレッサーなどに含まれるリプレッサードメインも上記転写抑制化ドメインとして用いることができる。

【0056】

SRDXは、具体的には、配列番号5に示されるアミノ酸配列からなるペプチドである。また、上記転写抑制化ドメインは、配列番号5に示されるアミノ酸配列において、1個又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び/又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つ、転写抑制化ドメインとしての機能を有するペプチドであってもよい。なお、上記の「配列番号5に示されるアミノ酸配列において、1個又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び/又は付加されたアミノ酸配列」における「1個又は数個」の範囲は、例えば、1個から3個、より好ましくは1個から2個を意味する。

10

【0057】

転写活性化ドメインをコードするポリヌクレオチドおよび転写抑制化ドメインをコードするポリヌクレオチドの具体的な塩基配列は特に限定されるものではなく、遺伝暗号に基づいて、それぞれ、転写活性化ドメインおよび転写抑制化ドメインのアミノ酸配列に対応する塩基配列を含んでいればよい。

【0058】

上記転写活性化ドメインをコードするポリヌクレオチドの具体例としては、例えば、配列番号4に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを挙げることができる。このポリヌクレオチドは、配列番号3に示されるアミノ酸配列に対応するものである。また、上記転写活性化ドメインをコードするポリヌクレオチドは、配列番号4に示される塩基配列からなる遺伝子と相補的な塩基配列からなる遺伝子とストリンジントな条件でハイブリダイズし、且つ、転写活性化ドメインとしての機能を有するペプチドをコードする遺伝子であってもよい。

20

【0059】

また、上記転写抑制化ドメインをコードするポリヌクレオチドの具体例としては、例えば、配列番号6に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを挙げることができる。このポリヌクレオチドは、配列番号5に示されるアミノ酸配列に対応するものである。また、上記転写抑制化ドメインをコードするポリヌクレオチドは、配列番号6に示される塩基配列からなる遺伝子と相補的な塩基配列からなる遺伝子とストリンジントな条件でハイブリダイズし、且つ、転写抑制化ドメインとしての機能を有するペプチドをコードする遺伝子であってもよい。

30

【0060】

(III)キメラ遺伝子

本発明において用いられる上記キメラ遺伝子は、上記(i)又は(ii)記載のタンパク質をコードする遺伝子と、転写活性化ドメインまたは転写抑制化ドメインをコードするポリヌクレオチドと、からなるキメラ遺伝子であればよく、その結合の順序は、上記(i)又は(ii)記載のタンパク質をコードする遺伝子が上流側で、転写活性化ドメインまたは転写抑制化ドメインをコードするポリヌクレオチドが下流側であってもよいし、転写活性化ドメインまたは転写抑制化ドメインをコードするポリヌクレオチドが上流側で上記(i)又は(ii)記載のタンパク質をコードする遺伝子が下流側であってもよい。

40

【0061】

また、上記キメラ遺伝子では、転写活性化ドメインをコードするポリヌクレオチドおよび転写抑制化ドメインをコードするポリヌクレオチドと、上記(i)又は(ii)記載のタンパク質をコードする遺伝子とが、リンカーとなる塩基配列により連結されていることがより好ましい。すなわち、上記キメラ遺伝子には、転写活性化ドメインをコードするポリヌクレオチドおよび転写抑制化ドメインをコードするポリヌクレオチドと、上記(i)又は(ii)記載のタンパク質をコードする遺伝子との間に、これらを連結するためのリンカーとなる塩基配列が含まれることがより好ましい。

【0062】

50

かかる場合、上記キメラ遺伝子は、上記(i)又は(ii)記載のタンパク質をコードする遺伝子と、転写活性化ドメインまたは転写抑制化ドメインをコードするポリヌクレオチドと、リンカーとなる塩基配列とからなるとも言える。上記リンカーとなる塩基配列としては特に限定されるものではないが、GGGT、すなわち、Gly-Gly-Gly-Thr(配列番号15)で表されるアミノ酸配列からなるペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むリンカーを好適に用いることができる。当該ペプチドをコードするポリヌクレオチドとしては特に限定されるものではなく、遺伝暗号に基づいて、GGGTに対応するものであればよい。具体的な一例としては、例えば、配列番号16に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを挙げることができる。

【0063】

GGGTで表されるアミノ酸配列からなるペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むリンカーを用いることにより、好適に本発明の効果を得ることができる。

【0064】

また、かかるリンカーとなる塩基配列は、さらに制限酵素サイト、CTC配列等を含んでいてもよく、さらに、上記転写活性化ドメイン又は転写抑制化ドメインをコードするポリヌクレオチドのアミノ酸読み枠と、上記(i)又は(ii)記載のタンパク質をコードする遺伝子の読み枠とが一致しないような場合に、これらを一致させるための付加的な塩基配列を含んでいてもよい。

【0065】

そして、リンカーとなる塩基配列によって連結されたキメラ遺伝子を含む組換え発現ベクターにより形質転換された植物体においては、上記(i)又は(ii)記載のタンパク質と、転写活性化ドメインまたは転写抑制化ドメインとが、リンカーとなるペプチドによって連結されたキメラタンパク質が生産される。上記リンカーとなるペプチドは、GGGT、すなわち、Gly-Gly-Gly-Thrで表されるアミノ酸配列を含むことが好ましい。

【0066】

本発明では、上記キメラ遺伝子を植物細胞に導入することにより、花序形態または開花時期が制御された形質転換体を得ることができる。それゆえ、本発明には、上記キメラ遺伝子も含まれる。

【0067】

本発明にかかるキメラ遺伝子は、上記(i)又は(ii)記載のタンパク質をコードする遺伝子と、上記転写活性化ドメインまたは上記転写抑制化ドメインをコードするポリヌクレオチドとからなるものであればよい。また、本発明にかかるキメラ遺伝子は、さらに、上記(i)又は(ii)記載のタンパク質をコードする遺伝子と、上記転写活性化ドメインまたは上記転写抑制化ドメインをコードするポリヌクレオチドとが、上記リンカーとなる塩基配列によって連結されているものであることがより好ましい。

【0068】

(IV)花序形態が制御された植物体

本発明において、「花序形態が制御された」とは、無限性花序形態を有限性花序形態に変化させること、および、有限性花序形態を無限性花序形態に変化させることの両方を含む。

【0069】

ここで、無限性花序形態を有限性花序形態に変化させるとは、花序軸の先端に花をつけない花序を、花序軸の先端に花をつける花序に変換するものであればよい。したがって、必ずしも花芽の数が1個となるように変換される必要はなく、花芽の数が有意に減少すればよい。なおここで、花芽の数が有意に減少するとは、花芽の数が変換前の80%以下となっていればよいが、より好ましくは変換前の50%以下であり、さらに好ましくは変換前の20%以下であり、特に好ましくは変換前の10%以下である。なお、変換後の花芽の数の下限は1個である。

【0070】

10

20

30

40

50

また、有限性花序形態を無限性花序形態に変化させるとは、花序軸の先端に花をつける花序を、花序軸の先端に花をつけない花序に変換するものであればよい。したがって、必ずしももともと花芽の数が1個であるものを変換する場合に限定されるものではなく、花芽の数が有意に増加すればよい。なおここで、花芽の数が有意に増加するとは、花芽の数が好ましくは、変換前の110%以上であり、より好ましくは120%以上である。

【0071】

無限性花序をもつ植物に対し、本発明を適用することで、有限花序を持つ新品種の創出が可能となる。花序形態の変化は、着花数も増大させ、収量の向上が期待できる。

【0072】

農業の現場では、高品質、多収穫を目的に、摘心という作業を行っている。本発明によるキメラ遺伝子の導入・利用によって、摘心と同様の効果が得られ得ることから、農作業の軽減・品質向上などに繋がる。

【0073】

また、本来有限花序である植物を無限花序に変化させることにより、植物は栄養生長を続けることができるようになる。

【0074】

例えば、無限性花序形態を有する植物体の植物細胞に、上記(i)又は(ii)記載のタンパク質をコードする遺伝子と上記転写活性化ドメインをコードするポリヌクレオチドとからなるキメラ遺伝子を含む組換え発現ベクターを、導入することにより、無限性花序形態を有限性花序形態に変化させることができる。

【0075】

また、逆に、有限性花序形態を有する植物体の植物細胞に、上記(i)又は(ii)記載のタンパク質をコードする遺伝子と上記転写抑制化ドメインをコードするポリヌクレオチドとからなるキメラ遺伝子を含む組換え発現ベクターを、導入することにより、有限性花序形態を無限性花序形態に変化させることができる。

【0076】

(V)花序形態が制御された植物体の生産方法の一例

本発明に係る花序形態が制御された植物体の生産方法は、上記(i)又は(ii)記載のタンパク質をコードする遺伝子と、転写活性化ドメインまたは転写抑制化ドメインをコードするポリヌクレオチドと、からなるキメラ遺伝子を含む組換え発現ベクターを、植物細胞に導入する形質転換工程を含んでいれば特に限定されるものではないが、本発明にかかる植物体の生産方法を具体的な工程で示せば、例えば、発現ベクター構築工程、形質転換工程、選抜工程等のその他の工程を含む生産方法として挙げるることができる。このうち、本発明では、少なくとも形質転換工程が含まれていればよい。以下、各工程について具体的に説明する。

【0077】

(V-1)発現ベクター構築工程

本発明に係る植物体の生産方法に含まれる発現ベクター構築工程は、上記(I)で説明した上記(i)又は(ii)記載のタンパク質をコードする遺伝子と、上記(II)で説明した上記転写活性化ドメイン又は転写抑制化ドメインをコードするポリヌクレオチドと、プロモーターとを含む組換え発現ベクターを構築する工程であれば特に限定されるものではない。

【0078】

上記組換え発現ベクターの母体となるベクターとしては、従来公知の種々のベクターを用いることができる。例えば、プラスミド、ファージ、またはコスミド等を用いることができ、導入される植物細胞や導入方法に応じて適宜選択することができる。具体的には、例えば、pBR322、pBR325、pUC19、pUC119、pBluescript、pBluescriptSK、pCGN、pBI等のベクター等を挙げるることができる。特に、植物体へのベクターの導入法がアグロバクテリウムを用いる方法である場合には、例えばpCGN1547等のpCGN系のバイナリーベクター；例えばpBIG、

10

20

30

40

50

pBIN19、pBI101、pBI121、pBI221等のpBI系のバイナリーベクターを好適に用いることができる。

【0079】

上記プロモーターは、植物体内で遺伝子を発現させることが可能なプロモーターであれば特に限定されるものではなく、公知のプロモーターを好適に用いることができる。かかるプロモーターとしては、例えば、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター(CaMV35S)、各種アクチン遺伝子プロモーター、各種ユビキチン遺伝子プロモーター等を挙げることができる。

【0080】

さらに、上記プロモーターとしては、過剰発現プロモーター以外にもデキサメタゾン(DEX)誘導性プロモーターなどの薬物誘導性プロモーターや、FDなどの花序メリステムに特異的に発現する遺伝子のプロモーターのような、器官特異的に発現するプロモーターなどを用いることができる。

10

【0081】

本発明では、上述した様々なプロモーターを用いることにより、その発現制御を時間的・空間的に調節することも可能である。そして、これにより、作物等の収穫時期を任意に調節することが可能になる。

【0082】

上記プロモーターは、上記(i)又は(ii)記載のタンパク質をコードする遺伝子と、上記転写活性化ドメイン又は転写抑制化ドメインをコードするポリヌクレオチドとを連結したキメラ遺伝子を発現しうるように連結され、ベクター内に導入されていればよく、組換え発現ベクターとしての具体的な構造は特に限定されるものではない。

20

【0083】

上記組換え発現ベクターは、上記プロモーターおよび上記キメラ遺伝子に加えて、さらに他のDNAセグメントを含んでいてもよい。当該他のDNAセグメントは特に限定されるものではないが、ターミネーター、エンハンサー、選抜マーカー、翻訳効率を調節するための塩基配列等を挙げることができる。

【0084】

ターミネーターは転写終結部位としての機能を有していれば特に限定されるものではなく、公知のものであってもよい。例えば、具体的には、ノパリン合成酵素遺伝子の転写終結領域(Nosターミネーター)、カリフラワーモザイクウイルスの35Sのターミネーター(CaMV35Sターミネーター)等を好ましく用いることができる。

30

【0085】

上記選抜マーカーとしては、例えば薬剤耐性遺伝子を用いることができる。かかる薬剤耐性遺伝子の具体的な一例としては、例えば、カナマイシン、ハイグロマイシン、プレオマイシン、ゲンタマイシン、クロラムフェニコール等に対する薬剤耐性遺伝子を挙げることができる。これにより、上記抗生物質を含む培地中で生育する植物体を選択することによって、形質転換された植物体を容易に選抜することができる。

【0086】

上記組換え発現ベクターの構築方法についても特に限定されるものではなく、適宜選択された母体となるベクターに、上記プロモーター、上記(i)又は(ii)記載のタンパク質をコードする遺伝子、および上記転写活性化ドメイン又は転写抑制化ドメインをコードするポリヌクレオチド、並びに必要なに応じて、上記リンカー、上記他のDNAセグメントを所定の順序となるように導入すればよい。例えば、上記(i)又は(ii)記載のタンパク質をコードする遺伝子と上記転写活性化ドメイン又は転写抑制化ドメインをコードするポリヌクレオチドとを、必要なに応じて上記リンカーを用いて連結してキメラ遺伝子を構築し、次に、このキメラ遺伝子とプロモーターと(必要なに応じてターミネーター等)とを連結して発現カセットを構築し、これをベクターに導入すればよい。

40

【0087】

キメラ遺伝子の構築および発現カセットの構築では、例えば、各DNAセグメントの切

50

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

【0088】

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

10

【0089】

（V-2）形質転換工程

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

【0090】

上記組換え発現ベクターを植物細胞に導入する方法（形質転換方法）は特に限定されるものではなく、植物細胞に応じた適切な従来公知の方法を用いることができる。具体的には、例えば、アグロバクテリウムを用いる方法や直接植物細胞に導入する方法を用いることができる。アグロバクテリウムを用いる方法としては、例えば、Plant J. 1998 Dec;16 (6):735-43に記載のfloral dipping法を用いることができる。

20

【0091】

組換え発現ベクターを直接植物細胞に導入する方法としては、例えば、マイクロインジェクション法、エレクトロポレーション法（電気穿孔法）、ポリエチレングリコール法、パーティクルガン法、プロトプラスト融合法、リン酸カルシウム法等を用いることができる。

【0092】

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

【0093】

（V-3）その他の工程、その他の方法

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

30

【0094】

選抜の方法は特に限定されるものではなく、例えば、カナマイシン耐性等の薬剤耐性を基準として選抜してもよいし、形質転換体を育成した後に、花芽の数や、花茎が抽臺するときのロゼット葉の数の状況から選抜してもよい。

【0095】

本発明にかかる植物体の生産方法では、上記キメラ遺伝子を植物体に導入するため、該植物体から、花序形態が制御された子孫を得ることが可能となる。また、該植物体やその子孫から植物細胞や、種子、果実、株、カルス、塊茎、切穂、塊等の繁殖材料を得て、これらを基に該植物体を量産することも可能となる。したがって、本発明にかかる植物体の生産方法では、選抜後の植物体を繁殖させる繁殖工程（量産工程）が含まれていてもよい。

40

【0096】

なお、本発明における植物体とは、成育した植物個体、植物細胞、植物組織、カルス、種子の少なくとも何れかが含まれる。つまり、本発明では、最終的に植物個体まで成育させることができる状態のものであれば、全て植物体と見なす。

50

【0097】

(VI) 開花時期が制御された植物体の生産方法

また、本発明に係る植物体の生産方法によれば、開花時期が制御された植物体を生産することができる。すなわち、本発明に係る植物体の生産方法には、開花時期が制御された植物体の生産方法であり、上記(i)又は(ii)記載のタンパク質をコードする遺伝子と、転写活性化ドメインまたは転写抑制化ドメインをコードするポリヌクレオチドと、からなるキメラ遺伝子を含む組換え発現ベクターを、植物細胞に導入する形質転換工程を含む方法も含まれる。

【0098】

本発明にかかる開花時期が制御された植物体を生産する方法において用いられる上記(i)又は(ii)記載のタンパク質をコードする遺伝子、転写活性化ドメインをコードするポリヌクレオチド、転写抑制化ドメインをコードするポリヌクレオチド、キメラ遺伝子、植物体の生産方法の一例については、上記(I)-(III)および(V)に記載したとおりであるのでここでは説明を省略する。

10

【0099】

本発明において、開花時期が制御された植物体とは、開花時期を早めること、および、開花時期を遅らせることの両方を含む。ここで、開花時期を早めるように制御されたこと、および、開花時期を遅らせるように制御されたことは、播種から開花するまでの時間を観察することにより容易に確認することができる。また、開花時期を早めるように制御されたことは、花茎が抽臺するときのロゼット葉の枚数が有意に減少することによっても確認でき、開花時期を遅らせるように制御されたことは、花茎が抽臺するときのロゼット葉の枚数が有意に増加することによっても確認できる。

20

【0100】

例えば、植物体の植物細胞に、上記(i)又は(ii)記載のタンパク質をコードする遺伝子と上記転写活性化ドメインをコードするポリヌクレオチドとからなるキメラ遺伝子を含む組換え発現ベクターを、導入することにより、開花時期を早めることができる。

【0101】

また、逆に、植物体の植物細胞に、上記(i)又は(ii)記載のタンパク質をコードする遺伝子と上記転写抑制化ドメインをコードするポリヌクレオチドとからなるキメラ遺伝子を含む組換え発現ベクターを、導入することにより、開花時期を遅らせることができる。

30

【0102】

(VII) 本発明により得られる植物体

本発明にかかる植物体の生産方法は、上記(i)又は(ii)記載のタンパク質をコードする遺伝子と、転写活性化ドメインまたは転写抑制化ドメインをコードするポリヌクレオチドと、からなるキメラ遺伝子を含む組換え発現ベクターを、植物細胞に導入することによる。したがって、本発明には、上記植物体の生産方法により得られる植物体も含まれる。

【0103】

ここで、本発明に係る植物体の具体的な種類は特に限定されるものではなく、被子植物であってもよいし裸子植物であってもよい。裸子植物としては、例えば、マツ、スギ、イチヨウ等を挙げることができる。また、被子植物としては、単子葉植物であってもよいし、双子葉植物であってもよい。

40

【0104】

双子葉植物としては、シロイヌナズナ、タバコ、トマト、ペチュニア、キンギョソウ等に限定されるものではなく、例えばアサガオ属植物(アサガオ)、ヒルガオ属植物(ヒルガオ、コヒルガオ、ハマヒルガオ)、サツマイモ属植物(グンバイヒルガオ、サツマイモ)、ネナシカズラ属植物(ネナシカズラ、マメダオシ)が含まれるひるがお科植物、ナデシコ属植物(カーネーション等)、ハコベ属植物、タカネツメクサ属植物、ミミナグサ属植物、ツメクサ属植物、ノミノツヅリ属植物、オオヤマフスマ属植物、ワチガイソウ属植

50

物、ハマハコベ属植物、オオツメクサ属植物、シオツメクサ属植物、マンテマ属植物、センノウ属植物、フシグロ属植物、ナンバンハコベ属植物が含まれるなでしこ科植物、もくまもう科植物、どくだみ科植物、こしょう科植物、せんりょう科植物、やなぎ科植物、やまもも科植物、くるみ科植物、かばのき科植物、ぶな科植物、にれ科植物、くわ科植物、いらくさ科植物、かわごけそう科植物、やまもがし科植物、ぼろぼろのき科植物、びやくだん科植物、やどりぎ科植物、うまのすずくさ科植物、やっこそう科植物、つちとりもち科植物、たで科植物、あかざ科植物、ひゆ科植物、おしろいばな科植物、やまとぐさ科植物、やまごぼう科植物、つるな科植物、すべりひゆ科植物、もくれん科植物、やまぐるま科植物、かつら科植物、すいれん科植物、まつも科植物、きんぼうげ科植物、あけび科植物、めぎ科植物、つづらふじ科植物、ろうばい科植物、くすのき科植物、けし科植物、ふうちょうそう科植物、あぶらな科植物、もうせんごけ科植物、うつぼかずら科植物、べんけいそう科植物、ゆきのした科植物、とべら科植物、まんさく科植物、すずかけのき科植物、ばら科植物、まめ科植物、かたばみ科植物、ふうろそう科植物、あま科植物、はまびし科植物、みかん科植物、にがき科植物、せんだん科植物、ひめはぎ科植物、とうだいぐさ科植物、あわごけ科植物、つげ科植物、がんこうらん科植物、どくうつぎ科植物、うるし科植物、もちのき科植物、にしきぎ科植物、みつぼうつぎ科植物、くろたきかずら科植物、かえで科植物、とちのき科植物、むくろじ科植物、あわぶき科植物、つりふねそう科植物、くろうめもどき科植物、ぶどう科植物、ほとどのき科植物、しなのき科植物、あおい科植物、あおぎり科植物、さるなし科植物、つばき科植物、おとぎりそう科植物、みぞはこべ科植物、ぎょりゅう科植物、すみれ科植物、いいぎり科植物、きぶし科植物、とけいそう科植物、しゅうかいどう科植物、さぼてん科植物、じんちょうげ科植物、ぐみ科植物、みそはぎ科植物、ざくろ科植物、ひるぎ科植物、うりのき科植物、のぼたん科植物、ひし科植物、あかばな科植物、ありのとうぐさ科植物、すぎなも科植物、うこぎ科植物、せり科植物、みずき科植物、いわうめ科植物、りょうぶ科植物、いちやくそう科植物、つつじ科植物、やぶこうじ科植物、さくらそう科植物、いそまつ科植物、かきのき科植物、はいのき科植物、えごのき科植物、もくせい科植物、ふじうつぎ科植物、りんどう科植物、きょうちくとう科植物、ががいも科植物、はなしのぶ科植物、むらさき科植物、くまつづら科植物、しそ科植物、なす科植物、ごまのはぐさ科植物、のうぜんかずら科植物、ごま科植物、はまうつぼ科植物、いわたばこ科植物、たぬきも科植物、きつねのまご科植物、はまじんちょう科植物、はえどくそう科植物、おおばこ科植物、あかね科植物、すいかずら科植物、れんぷくそう科植物、おみなえし科植物、まつむしそう科植物、うり科植物、ききょう科植物、きく科植物等を例示することができる。

10

20

30

【0105】

また、単子葉植物としては、例えばウキクサ属植物（ウキクサ）及びアオウキクサ属植物（アオウキクサ、ヒンジモ）が含まれる、うきくさ科植物、カトレア属植物、シンビジウム属植物、デンドロビウム属植物、ファレノプシス属植物、パンダ属植物、パフィオペディラム属植物、オンシジウム属植物等が含まれる、らん科植物、がま科植物、みくり科植物、ひるむしろ科植物、いばらも科植物、ほろむいそう科植物、おもだか科植物、とちかがみ科植物、ほんごうそう科植物、いね科植物（イネ、トウモロコシ）、かやつりぐさ科植物、やし科植物、さといも科植物、ほしぐさ科植物、つゆくさ科植物、みずあおい科植物、いぐさ科植物、びやくぶ科植物、ゆり科植物（ユリ）、ひがんばん科植物、やまのいも科植物、あやめ科植物、ばしょう科植物、しょうが科植物、かな科植物、ひなのしゃくじょう科植物等を例示することができる。

40

【実施例】

【0106】

以下、参考例、実施例及び図1ないし図6に基づいて本発明をより詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【0107】

〔参考例1〕

TFL1タンパク質は植物の花成と花序形態の調節において重要であることが知られて

50

おり、*tf11* 変異体は早咲きとなり、また野生型の無限花序が有限花序に変換されて花序軸の先端に花をつける末端花序の表現型を示すことが知られている(Bradleyら、1997)。そこでまず、*tf11* 変異体として、*tf11-1*、*tf11-11*、*tf11-13*、*tf11-14*、および*tf11-17*を用いて、これらの表現型を確認した。

【0108】

tf11 変異体の種子はArabidopsis Biological Resource Center (ABRC) より入手した。変異体系統のうち、*tf11-1*、*tf11-11*、*tf11-13*、および*tf11-14*のバックグラウンドは野性型*Col-0*である。これらの*tf11* 変異体系統は、図3に示す位置のアミノ酸が置換することによって生じたものである。また、*tf11-17*はRNA *null*の変異体である(Mimida et al. 2001. Genes to Cells, 6, 327-336)。

10

【0109】

上記*tf11* 変異体は、野生型の無限花序が有限花序に変換されて、全て、花序軸の先端に花をつける末端花序となり、またその花茎は短くなった。図4のBは、野性型植物および*tf11* 変異体における花芽の数を示す図である。図4のBのグラフにおいて縦軸は花芽の数を示す。

【0110】

図4のBに示すように野性型植物(図4中、「*Col*」と表示)では、花芽が20個以上つくのに対し、*tf11* 変異体ではすべて花芽は5個以下であり、*tf11-17*では、花芽は1個以下という結果となった。このように、*tf11* 変異体は、野生型の無限花序が有限花序に変換されて末端花序の表現型を示し、花芽の数が少なくなることが確認された。

20

【0111】

また、*tf11* 変異体の開花時期を解析するために、花茎が抽薹したときのロゼット葉の数を数えた。結果を図4のAに示す。図4のAにおいて、縦軸は花茎が抽薹したときのロゼット葉の数を示し、白色は22における結果を、黒色は16における結果を示す。

なお、ここで、抽薹とは、花芽形成非誘導条件下でロゼット形を保ち栄養成長を続けていた植物が、誘導条件下で花芽形成を行うとともに急激な花茎の伸長を示す現象をいう。図4のAに示すように、*tf11* 変異体では、早咲きとなるため、野生型植物と比較して、ロゼット葉の数が少ないことが確認された。*tf11* 変異体では、早咲きとなるため、花茎の抽薹が早く起こるが、22では、抽薹の時期の違いはわずかであった。*tf11* 変異体の早咲きが16で増強したように見えるのは、16では野生型の抽薹が遅れるからである。また、22では、*tf11-17*は野生型に比べて僅かに早咲きになったが、16と22とにおいて大きな変化が見られなかった。このことから、*TF11*の機能が欠損することによって、植物の温度感受性が低下することが示唆される。

30

【0112】

〔実施例1〕

TF11 遺伝子に転写活性化ドメインをコードするポリヌクレオチドを結合したキメラ遺伝子を、シロイヌナズナの野生型*Col-0*と、*TF11*の*null*変異体である*tf11-17*に導入した形質転換体を作製した。

40

【0113】

また、*TF11* 遺伝子に転写抑制化ドメインをコードするポリヌクレオチドを結合したキメラ遺伝子を、同様に、*Col-0*と*tf11-17*に導入した形質転換体を作製した。

【0114】

具体的には、*TF11* 遺伝子の下流に、転写活性化ドメインである*VP16*または転写抑制化ドメインである*SRDX*をコードするポリヌクレオチドを結合したキメラ遺伝子を、それぞれ、カリフラワーモザイクウイルス(*CaMV*) 35Sプロモーターの制御下において発現させる発現ベクター*TF11:VP16M*または*TF11:SRDX*を作製し

50

た。そしてこれらの発現ベクターをシロイヌナズナにアグロバクテリウム法を用いて導入することにより、シロイヌナズナを形質転換した。

【0115】

< T F L 1 : V P 1 6 M 発現ベクターの作製 >

T F L 1 遺伝子に転写活性化ドメインをコードするポリヌクレオチドを結合したキメラ遺伝子を発現させるための発現ベクターとして、p C G N 3 5 S : T F L 1 : V P 1 6 M N O S を作製した。以下に発現ベクターの作製方法を図5に基づいて説明する。

【0116】

まず、p V P 1 6 C 1 (N o v a g e n) を鋳型に、下記プライマー V P 1 6 F W S m a I と V P 1 6 M R V とからなるプライマーセット、および V P 1 6 M F W と V P 1 6 R V S a l I とからなるプライマーセットを用いて、それぞれ P C R を行い、それぞれの P C R で増幅された断片をアニーリングさせた。

【0117】

それぞれの P C R で増幅された断片をアニーリングさせたものを鋳型にして、さらに P C R を行うことによって V P 1 6 の S m a I サイトを C C C G G G から C C C A G G に置換した V P 1 6 M 断片を増幅した。なお、図6に V P 1 6 をコードするポリヌクレオチドの塩基配列を示す。図6中、下線を付した部分が S m a I サイトである。p V P 1 6 C 1 では下線部の元配列は C C C G G G (S m a I サイト) であるが、P C R で S m a I サイトを C C C A G G に代えた。これによるアミノ酸配列の変化はない。また、P C R で増幅させた V P 1 6 M 断片はその両端に S m a I サイトと S a l I サイトを持つことになる。

この P C R 産物をブルースクリプト I I S K + プラスミドベクター (p B l u e s c r i p t I I S K + : ストラタジーン社製) に組み込み、p B S V P 1 6 M とした。

【0118】

増幅した V P 1 6 M の断片を制限酵素 S m a I および S a l I で切断し、Plant Biotech J. 2006; 4: 325-332. (Mitsuda N, Hiratsu K, Todaka D, Nakashima K, Yamaguchi-S h i n o z a k i K, Ohme-Takagi M., Efficient production of male and female sterile plants by expression of a chimeric repressor in Arabidopsis and rice.) に記載されている p E N T R Y S R D X N O S ベクターの S m a I S a l I 部位にある S R D X 配列と入れ替えることによって、p E N T R Y V P 1 6 M N O S ベクターを作製した。

【0119】

V P 1 6 F W S m a I 5' -AGATCCCGGGCTCGCCCCCGACCGATGTC-3' (配列番号7)

V P 1 6 R V S a l I 5' -GCTCGTCGACCTACCCACCGTACTCGTCAAT-3' (配列番号8)

V P 1 6 M F W 5' -CGGGGATTCCCCAGGTCCGGGA-3' (配列番号9)

V P 1 6 M R V 5' -TCCCGGACCTGGGAATCCCCG-3' (配列番号10)

T F L 1 については、シロイヌナズナの c D N A クローンを鋳型に制限酵素部位を含むリンカー配列を末端に付加したプライマーを用いて、終止コドンを除くコード領域のみを含む D N A 断片を P C R にて増幅した。T F L 1 遺伝子の c D N A をコードする塩基配列を配列番号2に示す。また、用いたリンカーの塩基配列およびアミノ酸配列を以下に示す。

なお、以下の塩基配列において5'末端から第13番目の塩基から第18番目の塩基まで (C C C G G G) は制限酵素部位であり、リンカーは制限酵素部位に加えてさらに C T C 配列を含む。

【0120】

リンカー塩基配列 5' -GGAGGAGGTACCCCCGGGCTC-3' (配列番号11)

リンカーアミノ酸配列 GGGTPGL (配列番号12)

また、使用したプライマーを以下に示す。増幅された D N A 断片を X b a I および S m a I で切断し、p E N T R Y V P 1 6 M N O S の S p e I S m a I 部位にクローニングすることにより、p E N T R Y T F L 1 : V P 1 6 M N O S を作製した。なお、ここでリンカーは、T F L 1 と V P 1 6 M との間に連結される。これにより、T F L 1 : V P 1 6 M は T F L 1 : G G G T P G L : V P 1 6 M タンパク質をコードする。

【0121】

10

20

30

40

50

ここで作製したエントリークローンのTFL1:VP16M領域をGateway(登録商標)Cloningキット(Invitrogen)のLR反応によりpCGN35S:GW:NOSベクターに移した。尚、pCGN35S:GW:NOSはCaMV35Sプロモーター配列とpCGN1547由来のNOSターミネーターを含んでいる植物発現ベクターである。pCGN35S:GW:NOSの構造を図7に示す。

TFL1XbaIFW5'-GGATCTAGAATGGAGAATATGGGAAGTAGAGTG-3'(配列番号13)
TFL1(linker)SmaIRV5'-CATCCCGGGGTACCTCCTCCGCGTTTGCCTGCAGCGTTTCTC-3'(配列番号14)

<TFL1:SRDX発現ベクターの作製>

TFL1遺伝子に転写抑制化ドメインをコードするポリヌクレオチドを結合したキメラ遺伝子を発現させるための発現ベクターとして、pCGN35S:TFL1:SRDXNOSを作製した。以下に発現ベクターの作製方法を図5に基づいて説明する。

【0122】

TFL1については、TFL1:VP16M発現ベクターの作製の場合と同様にして、cDNAクローンを鋳型に制限酵素部位を含むリンカー配列を末端に付加したプライマーを用いて増幅した。

【0123】

増幅されたDNA断片をXbaI及びSmaIで切断し、pENTRYSRDXNOSベクターのSpeISmaI部位にクローニングすることにより、pENTRYTFL1:SRDXNOSを作製した。ここで作製したエントリークローンのTFL1:SRDX領域をGateway(登録商標)Cloningキット(Invitrogen)のLR反応によりpCGN35S:GW:NOSベクターに移した。尚、pCGN35S:GW:NOSはCaMV35Sプロモーター配列とpCGN1547由来のNOSターミネーターを含んでいる植物発現ベクターである。

【0124】

<形質転換工程>

次に、作製したpCGN35S:TFL1:VP16M:NOSプラスミドおよびpCGN35S:TFL1:SRDXNOSプラスミドをそれぞれ用いて、シロイヌナズナの野生型植物およびtfl1変異体に導入し、形質転換体を生産した。作製したpCGN35S:TFL1:VP16M:NOSプラスミドおよびpCGN35S:TFL1:SRDXNOSプラスミドは、それぞれ、エレクトポレーション法によりアグロバクテリウムC58株に導入した。導入した菌を30℃で培養した。シロイヌナズナへの遺伝子導入は、Plant J. 1998 Dec;16(6):735-43. Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. Clough SJ, Bent AFに従ってfloral dipping法により行い、それぞれ10系統以上を作製した。

【0125】

形質転換した植物の選抜は、50µg/mlのカナマイシンを加えた1%スクロースを含むムラシゲスクーグ寒天培地(0.8% Agar)上に、播種・発芽させることで行った。抗生物質耐性のない植物は生長が著しく阻害されるのに対し、形質転換されている植物は抗生物質上でも、通常通りに発芽・生育することができる。なお、導入した選抜マーカーによっては、カナマイシンの他にもハイグロマイシン等の他の抗生物質を用いることもできる。

【0126】

また、形質転換体においてTFL1:SRDXおよびTFL1:VP16Mが発現していることは、RT-PCRにより確認した。

【0127】

<形質転換体の評価>

pCGN35S:TFL1:VP16M:NOSプラスミドおよびpCGN35S:TFL1:SRDXNOSプラスミドをそれぞれ用いて、シロイヌナズナの野生型植物およびtfl1変異体に導入することにより得られた形質転換体について、開花時期および花序

10

20

30

40

50

形態を評価した。

【0128】

図1のAは、コントロールである野生型植物とTFL1のnull変異体であるtfl1-17、ならびに、野生型植物とtfl1-17とのそれぞれにTFL1:VP16MまたはTFL1:SRDXを導入した形質転換体の播種後6週目の様子を示している。図1のAに示されるように、TFL1:SRDXを導入した植物では、それぞれのコントロールに対し開花が遅れることが分かった。また、図1のBはTFL1:SRDXを導入した植物を2か月生育させたものであるが、ここに示すように、TFL1:SRDXを導入した植物を継続して育てると、野生型バックグラウンドでもtfl1-17のバックグラウンドでも無限花序をもつ花茎が抽薹した。これは、TFL1:SRDXを導入することによって、tfl1変異体の特徴である有限花序を無限花序に変換して、末端花序の表現型を野生型植物の花序形態に回復させることができることを示している。

10

【0129】

これに対し、野生型植物にTFL1:VP16Mを導入すると、図1のAおよびCに示すように、得られる形質転換体は、野生型植物の特徴である無限花序を有限花序に変換して、末端花序の表現型を示した。なお、図1のCは、野生型植物にTFL1:VP16Mを導入した形質転換体をさらに続けて生育させた後の様子を示している。かかる結果より、TFL1:VP16Mの過剰発現は、TFL1のドミナントネガティブとなることが明らかとなった。次に、pCGN35S TFL1:VP16M NOSプラスミドおよびpCGN35S TFL1:SRDX NOS プラスミドをそれぞれ、シロイヌナズナの野生型植物およびtfl1変異体に導入することによる形質転換体が、開花時期にどのような影響を示すかを解析した。

20

【0130】

開花時期を調べるために、22の温度条件下で、花芽の数と、花茎が抽薹するときのロゼット葉の枚数とを数えた。結果を図2に示す。図2中、Aは野生型植物にpCGN35S TFL1:VP16M NOSプラスミドおよびpCGN35S TFL1:SRDX NOS プラスミドをそれぞれ導入することにより得られた形質転換体と、野生型バックグラウンドにおける、花芽の数と、花茎が抽薹するときのロゼット葉の枚数を示す図である。また、図2中、Bはtfl1-17にpCGN35S TFL1:VP16M NOSプラスミドおよびpCGN35S TFL1:SRDX NOS プラスミドをそれぞれ導入することにより得られた形質転換体と、tfl1-17のバックグラウンドにおける、花芽の数と、花茎が抽薹するときのロゼット葉の枚数を示す図である。なお、図2のAおよびBにおいて、縦軸は花芽の数を、横軸はロゼット葉の枚数を示す。また、黒丸および黒三角はそれぞれコントロールを、四角はpCGN35S TFL1:VP16M NOSプラスミドを導入することにより得られた形質転換体を、ダイヤモンドはpCGN35S TFL1:SRDX NOS プラスミドを導入することにより得られた形質転換体を示す。

30

【0131】

図2のAに示すように、野生型植物にTFL1:SRDXを導入した形質転換体では、図4に示す野生型植物の花芽の数と比較して、花芽の数はほとんど変わらないが、花茎が抽薹するときのロゼット葉の枚数は増えていることから、遅咲きになっていることがわかった。これに対して、野生型植物にTFL1:VP16Mを発現させた形質転換体では、末端花序となるために、花芽の数は大きく減少するが、開花時期には大きな変化はなかった。

40

【0132】

tfl1-17は、野生型植物に比べ、花芽の数が大幅に減少するが、このtfl1-17にTFL1:SRDXを発現させた形質転換体では、有限花序が無限花序となり花芽の数が増加した。また、開花時期は遅くなり、野生型植物にTFL1:SRDXを導入したときと、ほぼ同じであった。tfl1-17にTFL1:VP16Mを導入すると、花芽の数はほぼ変わらないまま、開花時期が早まる結果となった。

50

【 0 1 3 3 】

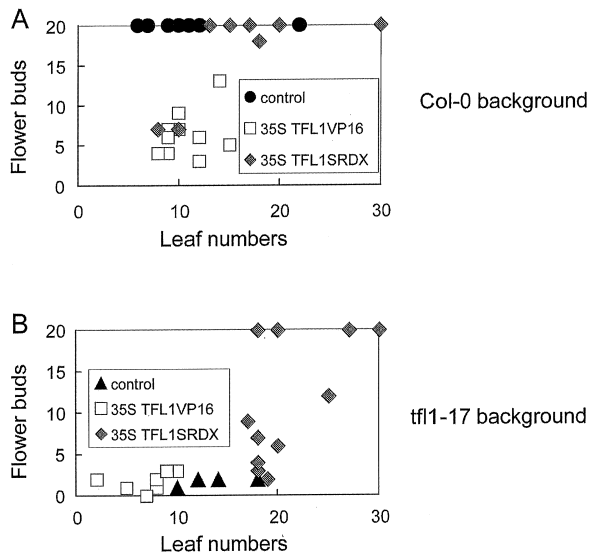
これらの結果から、TFL1に転写活性化ドメインあるいは抑制化ドメインを結合させることで、花序の形態だけでなく、花芽の数や開花時期を調節することが可能であることが分かった。

【 産業上の利用可能性 】

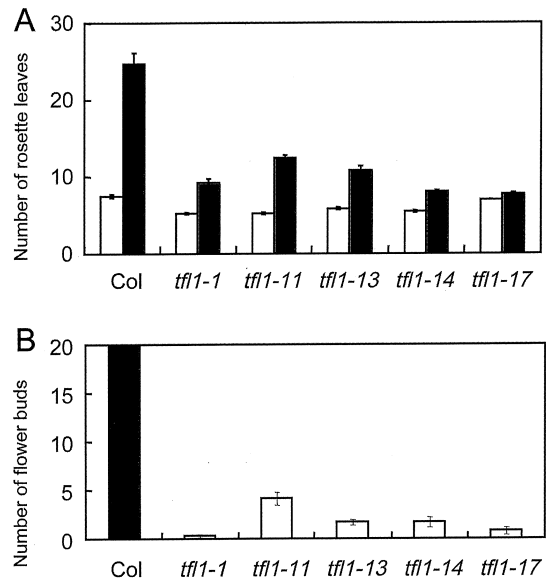
【 0 1 3 4 】

本発明によれば、植物の花序形態や開花時期をコントロールすることができるだけでなく、着果数の向上なども期待することができる。従って、園芸分野においては新品種の創出、農作物の収量増などが期待できる。さらに、従来の摘心にかわる効果があるので、農作業の効率化につながる。それゆえ、本発明は、各種農業や林業、アグリビジネス、さらには農産物を加工する産業や食品産業等に利用可能であり、しかも非常に有用であると考えられる。

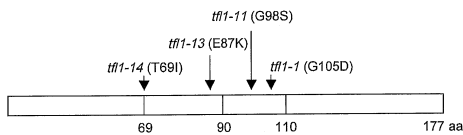
【 図 2 】



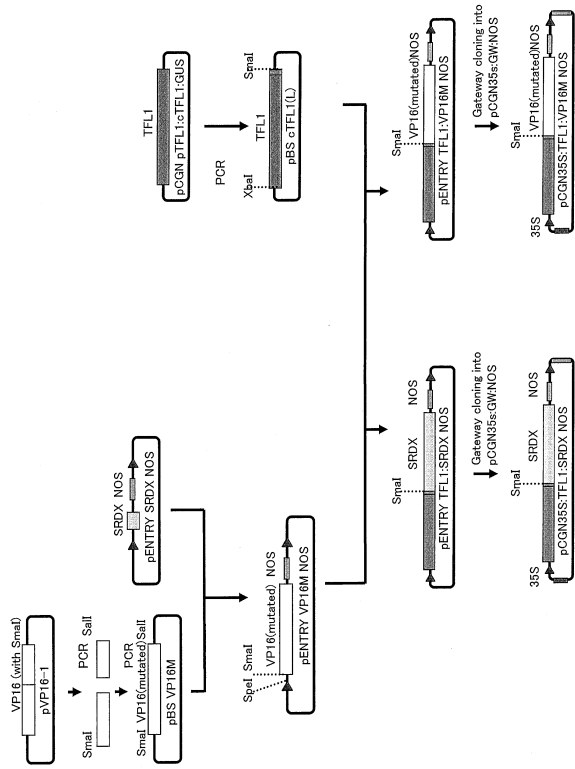
【 図 4 】



【 図 3 】



【 5 】



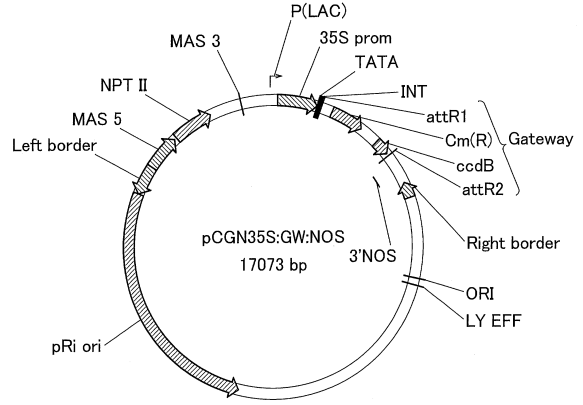
【 6 】

VP16 の塩基配列

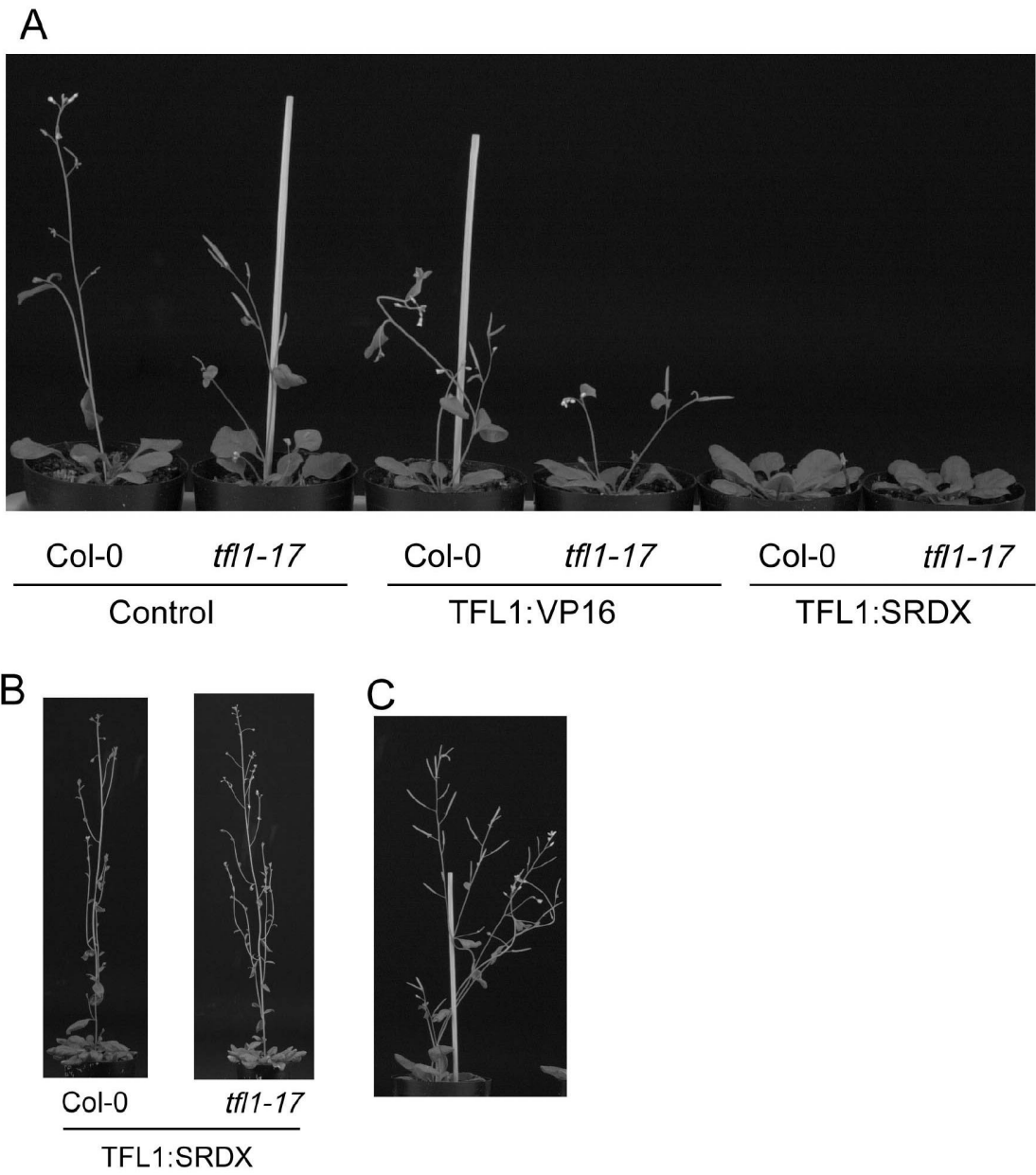
```

GCCCCCCCACCGATGTCAGCCTGGGGGACGAGCTCCACTTCGACGGCGAGGACGTGG
CGATGGCCGATGCCGACGGCTAGACGATTCGATCTGACATGTTGGGGGACGGGGA
TTCGCCAGGTCGGGGATTTACCCCCACGACTCCGCCCTACGGCGCTCTGGATATG
GCCGACTTCGAGTTTGACGAGATGTTTACCGATGCCCTTGAATTGACGAGTACGGTG
GGTAG
    
```

【 7 】



【 図 1 】



【 配列表 】

[0005835832000001.app](#)

フロントページの続き

審査官 鈴木 崇之

- (56)参考文献 特開2005-295878(JP,A)
国際公開第03/055903(WO,A1)
Science, 2005年, Vol. 309, P. 1056-1059
EMBO J., 2006年, Vol. 25, No. 3, P. 605-614
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2005年, Vol. 102, No. 21, P. 7748-7753
Plant Biotechnol. J., 2006年, Vol. 4, P. 325-332
Plant J., 2003年, Vol. 34, P. 733-739

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

A01H 1/00

A01H 5/00

CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

PubMed