

(19) 日本国特許庁(JP)

**再公表特許(A1)**

(11) 国際公開番号

**W02007/020898**

発行日 平成21年2月26日(2009.2.26)

(43) 国際公開日 **平成19年2月22日(2007.2.22)**

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A O 1 H 1/00 (2006.01)</b>	A O 1 H 1/00 Z N A A	2 B O 3 O
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 2 4
<b>C 1 2 Q 1/68 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/68 A	4 B O 6 3

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 38 頁)

出願番号 特願2007-530982 (P2007-530982)	(71) 出願人 504147243 国立大学法人 岡山大学 岡山県岡山市津島中一丁目1番1号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2006/315959	
(22) 国際出願日 平成18年8月11日(2006.8.11)	
(31) 優先権主張番号 特願2005-238030 (P2005-238030)	(74) 代理人 110000338 特許業務法人原謙三国際特許事務所
(32) 優先日 平成17年8月18日(2005.8.18)	
(33) 優先権主張国 日本国(JP)	(72) 発明者 馬 建鋒 日本国岡山県倉敷市中央二丁目20番1号 国立大学法人岡山大学資源生物科学研究 所内
	Fターム(参考) 2B030 AA02 AB03 AD09 AD20 CA14 CB02 4B024 AA08 AA11 BA79 BA80 CA01 DA01 GA11 HA12 HA20
	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ケイ素吸収に関与する遺伝子、およびその利用

## (57) 【要約】

ケイ素吸収能力が低いイネ変異体(1s i 2変異体)から、ポジショナルクローニングによりケイ素吸収に関与する遺伝子を同定し、新規遺伝子として単離した。ケイ素吸収を促進する遺伝子を導入した形質転換体は、生育を阻害するストレスに対して抵抗性を示す。本発明では、これまでに同定されていないケイ素吸収に関与する遺伝子と、その遺伝子の利用方法とを提供することができる。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

ケイ素吸収を抑制するポリヌクレオチドであって、

下記の (a) または (b) のポリヌクレオチド：

(a) 配列番号 1 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチド；

(b) 以下の (i) もしくは (i i) のいずれかとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド：

(i) 配列番号 1 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチド；もしくは

(i i) 配列番号 1 に示される塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチド。

10

**【請求項 2】**

ケイ素吸収を抑制するポリペプチドであって、

下記の (a) または (b) のポリペプチド：

(a) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列；

(b) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列において、1 個もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、もしくは付加されたアミノ酸配列。

**【請求項 3】**

請求項 2 に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

**【請求項 4】**

請求項 1 または 3 に記載のポリヌクレオチドからなる形質転換体選抜用マーカー遺伝子。

20

**【請求項 5】**

請求項 1 または 3 に記載のポリヌクレオチドを含む組換え発現ベクター。

**【請求項 6】**

請求項 1 または 3 に記載のポリヌクレオチド、または、請求項 5 に記載の組換え発現ベクターが導入されており、かつ、ケイ素吸収に関与するポリペプチドを発現してなる形質転換体。

**【請求項 7】**

下記の (a) または (b) のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと、(c) または (d) のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとが導入されており、かつ、ケイ素吸収を促進するポリペプチドを発現してなる形質転換体。

30

(a) 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列；

(b) 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列において、1 個もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、もしくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(c) 配列番号 8 に示されるアミノ酸配列；

(d) 配列番号 8 に示されるアミノ酸配列において、1 個もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、もしくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチド。

**【請求項 8】**

請求項 6 または 7 に記載の形質転換体を含む食品。

**【請求項 9】**

少なくとも請求項 1 または 3 に記載のポリヌクレオチド、あるいは、請求項 5 に記載の組換え発現ベクターのいずれかを含むことを特徴とする形質転換キット。

40

**【請求項 10】**

請求項 1 または 3 に記載のポリヌクレオチドを、発現可能に導入することを特徴とするケイ素吸収が抑制された形質転換体の生産方法。

**【請求項 11】**

下記の (a) ~ (d) のいずれかのポリヌクレオチドを、発現可能に導入することを特徴とするケイ素吸収が促進された形質転換体の生産方法。

(a) 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド；

(b) 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列において、1 個もしくは数個のアミノ酸が置

50

換、欠失、挿入、もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、ケイ素吸収を促進するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(c) 配列番号3に示される塩基配列からなるポリヌクレオチド；

(d) 以下の(iii)もしくは(iv)のいずれかとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド；

(iii) 配列番号3に示される塩基配列からなるポリヌクレオチド；もしくは、

(iv) 配列番号3に示される塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、植物の生育および硬さを調節するケイ素の吸収に関与する遺伝子およびその利用に関するものである。

【背景技術】

【0002】

イネやコムギなどの単子葉植物は、ケイ素(Si)を多量に吸収する代表的な植物である。ケイ素は、植物の必須元素ではないものの、ケイ素の蓄積量の違いによって、植物の性質は、大きく異なる。

【0003】

例えば、ケイ素は、植物の生育に関与しており、ケイ素の蓄積量が多くなると、(a) 病害および虫害に対する抵抗性(例えば、イネのいもち病、紋枯病、および、ごま葉枯病に対する抵抗性)

20

(b) 耐塩性および耐乾性の向上

(c) ミネラルストレスに対する耐性(例えば、アルミニウム、および、マンガンなどの無機物による毒性の軽減、または、植物体内でのリン酸の有効利用度の向上など)

等の性質を、植物に与える。

【0004】

とりわけ、ケイ素の蓄積量の増加によって、病害や虫害に対する抵抗性が強化されることは、植物の生育が促進される大きな原因となっている。

【0005】

30

従って、ケイ素の蓄積量を増加させることは、植物の健全な生育、および、安定した収量の確保のために、有効であるといえる。また、ケイ素蓄積量の増加は、生物的ストレス、および、非生物的ストレスなどの種々のストレスの軽減にも、有効であるといえる。

【0006】

なお、このような複合的なストレスに対する耐性は、葉、茎、または果実の表面などの組織に、大量に蓄積したケイ素によって、発揮されるとされている。

【0007】

また、ケイ素は、植物の硬さにも関与しており、ケイ素の蓄積量が少なくなると、植物は、やわらかくなる。例えば、やわらかいイネは、ケイ素の蓄積量が低い。これは、細胞のケイ素蓄積量が増加するとポリマー(シリカ)が形成され、このポリマーが、細胞を硬くするためである。

40

【0008】

従って、ケイ素の蓄積量を減少させることは、植物の硬さを変える(やわらかくする)ために、有効であるといえる。

【0009】

このように、植物のケイ素吸収を促進してケイ素の含有量を高くすれば、複合的なストレスに対する耐性を植物に付与し、植物の生育を促進することができる。一方、植物のケイ素吸収を抑制してケイ素の含有量を低くすれば、硬い植物をやわらかくすることができる。

50

## 【 0 0 1 0 】

しかしながら、ケイ素吸収に關与する遺伝子は、本願発明者によって、イネから *L s i 1* 遺伝子しか同定されておらず（特許文献 1）、植物のケイ素吸収メカニズムも、ほとんど解明されていない。

【特許文献 1】日本国公開特許公報「特開 2 0 0 6 - 1 8 7 2 0 9 号公報（公開日：2 0 0 6 年 7 月 2 0 日）」

【非特許文献 1】Ma, J. F., Tamai, K., Yamaji, N., Mitani, N., Konishi, S., Katsuhara, M., Ishiguro, M., Murata, Y., and Yano, M., 2006, Silicon transporter in rice., *Nature* 440, 688-691.

【非特許文献 2】山地直樹, 馬建鋒; イネのケイ酸吸収機構; 化学と生物; 4 4 : 4 5 3 - 4 5 8 ( 2 0 0 6 ) . 10

【非特許文献 3】Ma, J. F., and Yamaji, N., 2006, Silicon uptake and accumulation in higher plants., *Trends in Plant Sci.* doi ; 10, 1016.

## 【発明の開示】

## 【 0 0 1 1 】

本発明の目的は、これまでに同定されていないケイ素吸収に關与する遺伝子を同定し、その遺伝子の利用方法を提供することにある。

## 【 0 0 1 2 】

本発明者等は、これまでに取得されていなかったケイ素吸収に關与する遺伝子について鋭意に検討した。その結果、野生型に比べてケイ素吸収能が低い突然変異体（*l s i 2* 変異体）と、カサラス（*Kasalath*）との交配によって得られた F 2 集団個体を用いたマップベースクローニングによって、当該遺伝子を同定し、その配列を特定することに成功して、本発明を完成させるに至った。 20

## 【 0 0 1 3 】

本発明にかかるポリヌクレオチドは、ケイ素吸収を抑制するポリヌクレオチドであって、

下記の ( a ) または ( b ) のポリヌクレオチド：

( a ) 配列番号 1 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチド；

( b ) 以下の ( i ) もしくは ( i i ) のいずれかとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド； 30

( i ) 配列番号 1 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチド；もしくは

( i i ) 配列番号 1 に示される塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチド、であることを特徴としている。

## 【 0 0 1 4 】

ここで、本発明において、「ケイ素吸収」とは、ケイ素およびケイ素を含む化合物（ケイ酸など）を吸収することを示すものとする。例えば、植物は、通常、ケイ酸としてケイ素を吸収する。

## 【 0 0 1 5 】

上記ポリヌクレオチドは、ケイ素吸収に關与するポリヌクレオチドのうち、ケイ素吸収を抑制するポリヌクレオチドである。 40

## 【 0 0 1 6 】

上記のポリヌクレオチドによれば、ケイ素吸収を抑制するポリペプチドを翻訳産物として得ることができる。

## 【 0 0 1 7 】

すなわち、上記 ( a ) または ( b ) のポリヌクレオチドによれば、ケイ素吸収を抑制するポリペプチドを翻訳産物として得ることができる。

## 【 0 0 1 8 】

本発明にかかるポリペプチドは、ケイ素吸収を抑制するポリペプチドであって、

下記の ( a ) または ( b ) のアミノ酸配列からなるポリペプチド：

( a ) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列； 50

(b) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列において、1 個もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、もしくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであることを特徴としている。

【0019】

上記のポリペプチドによれば、ケイ素吸収を抑制することができる。

【0020】

すなわち、上記(a)または(b)のポリペプチドによれば、ケイ素吸収を抑制することができる。

【0021】

このような、ケイ素吸収に関与するポリペプチドは、例えば、イネでは、第3染色体に座乗する遺伝子にコードされるアミノ酸を含む領域に存在する。イネは、ケイ素吸収能が高い。すなわち、イネは、ケイ素吸収を促進するポリペプチド(ポリヌクレオチド)を有している。しかし、この領域にコードされる親水性アミノ酸(特に好ましくは水酸基を含有する脂肪族アミノ酸)が、別の親水性アミノ酸(特に好ましくはアミド基を有する脂肪族アミノ酸)に置換されているポリペプチドは、ケイ素吸収をほとんどしない。

10

【0022】

また、本発明にかかるポリヌクレオチドは、上記いずれかのポリペプチドをコードするものであってもよい。

【0023】

上記のポリヌクレオチドによれば、ケイ素吸収を抑制するポリペプチドを、翻訳産物として得ることができる。なお、このポリヌクレオチドとしては、例えば、前述した、上記(a)または(b)のポリヌクレオチド等が挙げられる。

20

【0024】

本発明にかかる形質転換体選抜用マーカー遺伝子は、上記の何れかのポリヌクレオチドからなるものである。

【0025】

本発明にかかるポリヌクレオチドは、それが発現している細胞(特に植物細胞)に、ケイ素吸収を抑制する機能を付与することができる。

【0026】

すなわち、ケイ素吸収を抑制することによって、その細胞のケイ素蓄積量を、減少させることができる。これにより、ケイ素吸収を抑制するポリペプチドが発現している細胞は、やわらかくなる。そのため、ケイ素吸収を抑制するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドからなるマーカー遺伝子は、ケイ素吸収を抑制するポリペプチドを発現している形質転換細胞を選抜するためのマーカー遺伝子として利用することができる。

30

【0027】

また、これらのマーカー遺伝子は、ケイ素吸収活性が弱い品種を選抜するためにも、利用することができる。

【0028】

本発明にかかる組換え発現ベクターは、上記の何れかのポリヌクレオチドを含むものである。上記の組換え発現ベクターは、本発明にかかるポリヌクレオチドを細胞に導入するための組換え発現ベクターとして利用できるだけでなく、本発明にかかるポリヌクレオチドを選抜用マーカーとして用いた場合には、他の遺伝子を細胞に導入するための組換え発現ベクターとしても利用できる。

40

【0029】

本発明にかかる形質転換体は、上記のポリヌクレオチドまたは上記の組換え発現ベクターが導入されており、かつ、ケイ素吸収に関与するポリペプチドを発現しているものである。ここで、上記ポリヌクレオチドは、ケイ素吸収に関与するポリヌクレオチドであるため、上記形質転換体は、植物(形質転換植物)であることが好ましい。この形質転換体は、上記ポリヌクレオチドまたは組換え発現ベクターが、ケイ素吸収を抑制するポリペプチドの発現を促進させるプロモーターとともに導入されている。このため、ケイ素吸収を

50

抑制するポリペプチドを発現させることによって、この形質転換体のケイ素の蓄積量を、減少させることができる。

【0030】

家畜は、硬い飼料を食べずに残す傾向にあるため、硬い植物を飼料に適用することは好ましくない。ケイ素吸収が抑制された形質転換体は、ケイ素蓄積量の減少により、やわらかくなる。従って、ケイ素吸収が抑制された形質転換体は、家畜飼料として好適に利用することができる。

【0031】

本発明にかかる別の形質転換体は、下記の(a)または(b)のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと、下記の(c)または(d)のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとが導入されており、かつ、ケイ素吸収を促進するポリペプチドを発現してなることを特徴としている。

10

【0032】

(a) 配列番号4に示されるアミノ酸配列；

(b) 配列番号4に示されるアミノ酸配列において、1個もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、もしくは付加されたアミノ酸配列；

(c) 配列番号8に示されるアミノ酸配列；

(d) 配列番号8に示されるアミノ酸配列において、1個もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、もしくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチド。

【0033】

20

この形質転換体は、ケイ素吸収メカニズムが異なるケイ素吸収を促進するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが導入されており、かつ、ケイ素吸収を促進するポリペプチドを発現している。このため、この形質転換体は、ケイ素吸収を促進するポリペプチドを発現させることによって、ケイ素の蓄積量を、増加させることができる。

【0034】

本発明にかかる食品は、上記形質転換体を含むものである。すなわち、この食品は、ケイ素吸収が抑制または促進された形質転換体を含むものである。

【0035】

ケイ素吸収が抑制された形質転換体は、やわらかいため、その形質転換体を含む食品は、特に、家畜飼料として好適に利用することができる。

30

【0036】

一方、ケイ素吸収が促進された形質転換体は、農薬を極力使用せずに栽培できる。このため、その形質転換体を含む食品は、より安全性の高い食料として提供することができる。

【0037】

本発明にかかる形質転換キットは、少なくとも上記のポリヌクレオチド、あるいは、上記の組換え発現ベクターのいずれかを含むことを特徴とするものである。上記の形質転換キットを用いれば、本発明にかかるポリペプチドを発現する形質転換体を簡便かつ効率的に得ることができる。

【0038】

40

本発明にかかるケイ素吸収が抑制された形質転換体の生産方法は、前記いずれかに記載のケイ素吸収を抑制するポリヌクレオチドを、発現可能に導入することを特徴としている。

【0039】

また、本発明にかかるケイ素吸収が促進された形質転換体の生産方法は、下記の(a)~(d)のいずれかのポリヌクレオチドを、発現可能に導入することを特徴としている。

(a) 配列番号4に示されるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド；

(b) 配列番号4に示されるアミノ酸配列において、1個もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、ケイ素吸収を促進するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

50

(c) 配列番号 3 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチド；  
 (d) 以下の (i i i) もしくは (i v) のいずれかとストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド：

(i i i) 配列番号 3 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチド；もしくは  
 (i v) 配列番号 3 に示される塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチド。

#### 【0040】

以上のように、本発明にかかるポリヌクレオチドによれば、ケイ素吸収に関与するポリペプチドを産生することによって、ケイ素吸収を抑制または促進させることができる。そして、本発明のポリヌクレオチドまたは当該ポリヌクレオチドを含む組換え発現ベクターがポリペプチドの発現を促進させるプロモーターとともに導入された本発明の形質転換体では、ケイ素吸収が抑制または促進され、その蓄積量を減少または増加させることができる。

10

#### 【0041】

ケイ素蓄積量の減少は、硬い植物をやわらかくする。このため、ケイ素吸収を抑制した形質転換植物は、家畜飼料に利用することができる。これに対し、ケイ素蓄積量の増加は、病害および虫害などの種々のストレスに対する耐性（抵抗性）を付与し、生育を促進させる。このため、ケイ素吸収を促進した形質転換植物を利用すれば、農薬および化学肥料を極力使用せずに、より安全性の高い形質転換植物を栽培することができる。

20

#### 【0042】

本発明のさらに他の目的、特徴、および優れた点は、以下に示す記載によって十分わかるであろう。また、本発明の利益は、添付図面を参照した次の説明で明白になるであろう。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0043】

【図 1】本発明にかかる L s i 2 遺伝子およびその遺伝子にコードされるアミノ酸配列を示す模式図である。

【図 2 a】l s i 1 変異体、l s i 2 変異体、および野生型のケイ素取り込み量を示すグラフである。

【図 2 b】l s i 1 変異体、l s i 2 変異体、および野生型のケイ素取り込み量を示すグラフである。

30

【図 3 a】l s i 1 変異体、l s i 2 変異体、l s i 1 変異体と l s i 2 変異体との交雑体、および野生型の、ケイ素取り込み量を示すグラフである。

【図 3 b】l s i 1 変異体、l s i 2 変異体、l s i 1 変異体と l s i 2 変異体との交雑体、および野生型の、水取り込み量を示すグラフ（図 3 (b)）である。

【図 4】Kasalath BAC (K0315E16) に含まれる L s i 2 遺伝子領域を示す模式図である。

【図 5】l s i 2 変異体、野生型、および野生型 L s i 2 遺伝子を導入した形質転換体のウェスタンプロットである。

【図 6】l s i 2 変異体、野生型、および野生型 L s i 2 遺伝子を導入した形質転換体のケイ素取り込み量を示すグラフである。

40

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0044】

本発明の実施の形態について説明すれば、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。なお、配列番号 1 は、変異型イネの L s i 2 遺伝子 (c D N A) の塩基配列である。配列番号 2 は、配列番号 1 の変異型イネの L s i 2 遺伝子にコードされるアミノ酸配列である。配列番号 3 は、野生型イネ (台中) の L s i 2 遺伝子 (c D N A) の塩基配列である。配列番号 4 は、配列番号 3 の野生型イネ (台中) の L s i 2 遺伝子にコードされるアミノ酸配列である。

#### 【0045】

(1) 本発明にかかるポリヌクレオチド

50

本発明にかかるポリヌクレオチドは、ケイ素吸収に關与するポリペプチドをコードするものである。

【0046】

ここで、上記「ポリヌクレオチド」は、「核酸」または「核酸分子」とも換言でき、ヌクレオチドの重合体が意図されている。また、「塩基配列」は、「核酸配列」または「ヌクレオチド配列」とも換言でき、デオキシリボヌクレオチド（A、G、CおよびTと省略される）の配列として示される。また、「配列番号1に示される塩基配列からなるポリヌクレオチド」とは、配列番号1の各デオキシヌクレオチドA、G、Cおよび/またはTによって示される配列からなるポリヌクレオチドを示している。

【0047】

本発明にかかるポリヌクレオチドは、RNA（例えば、mRNA）の形態、またはDNAの形態（例えば、cDNAまたはゲノムDNA）で存在し得る。DNAは、二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。一本鎖DNAまたはRNAは、コード鎖（センス鎖としても知られる）であっても、非コード鎖（アンチセンス鎖としても知られる）であってもよい。

【0048】

本発明にかかるポリヌクレオチドは、ケイ素吸収に關与するポリヌクレオチドであって、下記の（a）～（d）のいずれかのポリヌクレオチドである。

【0049】

- （a）配列番号1に示される塩基配列からなるポリヌクレオチド；
- （b）以下の（i）もしくは（ii）のいずれかとストリンジентな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド：
  - （i）配列番号1に示される塩基配列からなるポリヌクレオチド；もしくは
  - （ii）配列番号1に示される塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチド；
- （c）配列番号3に示される塩基配列からなるポリヌクレオチド；または
- （d）以下の（iii）もしくは（iv）のいずれかとストリンジентな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド：
  - （iii）配列番号3に示される塩基配列からなるポリヌクレオチド；もしくは
  - （iv）配列番号3に示される塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチド。

【0050】

上記（a）または（b）のポリヌクレオチドは、ケイ素吸収を抑制するポリヌクレオチドである。上記（c）または（d）のポリヌクレオチドは、ケイ素吸収を促進するポリヌクレオチドである。

【0051】

上記「ストリンジентな条件」とは、少なくとも90%の同一性、好ましくは少なくとも95%の同一性、最も好ましくは少なくとも97%の同一性が配列間に存在するときのみハイブリダイゼーションが起こることを意味し、例えば、60 で2×SSC 洗浄条件下で結合することを意味する。上記ハイブリダイゼーションは、「Molecular Cloning (Third Edition)」(J. Sambrook & D. W. Russell, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001)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。

【0052】

上記のポリヌクレオチドのうち、配列番号1および3に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドは、植物界において初めて同定された、ケイ素吸収に關与する遺伝子である。

【0053】

配列番号1のポリヌクレオチドは、イネの変異体（lsi2変異体）由来の変異型 L s i 2 遺伝子の塩基配列（cDNA配列）である。lsi2変異体は、野生型のイネに比べ

10

20

30

40

50



てケイ素吸収能が低い突然変異体である。また、L s i 2 変異体は、ケイ素蓄積量が少ないため、野生型に比べて、やわらかい。このように、配列番号 1 は、ケイ素吸収能が低い L s i 2 変異体由来のケイ素吸収を抑制するポリヌクレオチド（変異型 L s i 2 遺伝子）である。

【 0 0 5 4 】

配列番号 3 のポリヌクレオチドは、野生型イネにおいて発現している、野生型イネ（台中）由来の L s i 2 遺伝子の塩基配列（cDNA）である。イネは、ケイ素を多量に吸収する代表的な植物である。イネは、ケイ素蓄積量が多いため、病害や虫害に対する抵抗性、耐塩性および耐乾性、およびミネラルストレスに対する耐性を有している。このように、配列番号 3 は、ケイ素吸収能が高い野生型イネ由来のケイ素吸収を促進するポリヌクレオチド（野生型 L s i 2 遺伝子）である。

10

【 0 0 5 5 】

また、本発明にかかるポリヌクレオチドは、ケイ素吸収に関与するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであって、以下の（a）～（d）のいずれかのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドである。

【 0 0 5 6 】

（a）配列番号 2 に示されるアミノ酸配列；

（b）配列番号 2 に示されるアミノ酸配列において、1 個もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、もしくは付加されたアミノ酸配列；

（c）配列番号 4 に示されるアミノ酸配列；または

（d）配列番号 4 に示されるアミノ酸配列において、1 個もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、もしくは付加されたアミノ酸配列。

20

【 0 0 5 7 】

上記「1 個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、もしくは付加された」とは、部位特異的突然変異誘発法等の公知の変異ポリペプチド作製法により欠失、置換、もしくは付加ができる程度の数（例えば 20 個以下、好ましくは 10 個以下、より好ましくは 7 個以下、さらに好ましくは 5 個以下、特に好ましくは 3 個以下）のアミノ酸が置換、欠失、もしくは付加されることを意味する。このような変異ポリペプチドは、公知の変異ポリペプチド作製法により人為的に導入された変異を有するポリペプチドに限定されるものではなく、天然に存在する同様の変異ポリペプチドを単離精製したものであってもよい。

30

【 0 0 5 8 】

本発明者は、後述する実施例に示すように、本発明にかかるポリヌクレオチドの 1 つであるイネのケイ素吸収に関与するポリヌクレオチドが、イネの第 3 染色体に座乗することを明らかにした。

【 0 0 5 9 】

配列番号 4 に示されるアミノ酸配列において、115 番目のアミノ酸が、セリンからアスパラギンに置換されると、ケイ酸の吸収活性が低下する。なお、配列番号 2 に示すポリペプチドは、本願発明者が見出した、変異型 L s i 2 遺伝子にコードされるケイ素吸収を抑制するポリペプチドである。配列番号 4 に示すポリペプチドは、野生型 L s i 2 遺伝子にコードされるケイ素吸収を促進するポリペプチドである。

40

【 0 0 6 0 】

このようなアミノ酸の変異は、本発明にかかるポリヌクレオチドの変異（欠失、置換、もしくは付加）によって生じる。例えば、本発明にかかるポリヌクレオチドの 1 つは、野生型イネのケイ素吸収に関与するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが、一塩基置換（SNP）されたものと表現することもできる。例えば、配列番号 3 に示されるポリヌクレオチドは、データベース上に公開されている台中-65（野生型）の cDNA クローンの塩基配列（DDBJ Accession No. AB222273）と一致している。そして、配列番号 1 に示されるポリヌクレオチドは、配列番号 3 に示される遺伝子の塩基配列において、344 番目の塩基が、G（グアニン）から A（アデニン）へ、一塩基置換されたものである（図 1 も参照）。この一塩基置換により、配列番号 2 に示されるポリペプチド（配列番号 1 の塩基配

50

列の翻訳産物)は、115番目のアミノ酸が、配列番号4(配列番号3の塩基配列の翻訳産物)のセリンから、アスパラギンに変異する。なお、図1に示すように、この一塩基置換は、第4膜貫通ドメイン(TM4)に生じている。

【0061】

本発明にかかるポリヌクレオチドは、上記ポリヌクレオチドのフラグメントであるオリゴヌクレオチドであってもよい。

【0062】

本発明にかかるポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、2本鎖DNAのみならず、それを構成するセンス鎖(コード鎖)およびアンチセンス鎖(非コード鎖)といった各1本鎖DNAやRNA(例えば、mRNA)を包含する。また、DNAには例えばクローニングや化学合成技術またはそれらの組み合わせで得られるようなcDNAやゲノムDNAなどが含まれる。本発明にかかるポリヌクレオチドの一例である、配列番号1に示す塩基配列は、配列番号2に示すポリペプチドのcDNA配列の塩基配列である。

10

【0063】

さらに、本発明にかかるポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、非翻訳領域(UTR)の配列やベクター配列(発現ベクター配列を含む)などの配列を含むものであってもよい。

【0064】

本発明にかかるポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、アンチセンスRNAメカニズムによる遺伝子発現操作のためのツールとして使用することができる。アンチセンスRNA技術は、標的遺伝子に対して相補的なRNA転写体を生成するキメラ遺伝子の導入を基本原理とする。その結果として得られる表現型は、内因性遺伝子に由来する遺伝子産物の減少である。つまり、本発明にかかるオリゴヌクレオチドであるアンチセンスRNAを導入することによって、ケイ素吸収を調節することができる。

20

【0065】

例えば、ケイ素吸収を促進するポリヌクレオチドのアンチセンスRNA断片を導入することにより、ケイ素吸収の機能が低下し、植物中のケイ素の含量を低下させることができる。これにより、例えば、ケイ素含量を低くした飼料イネを作製することができる。飼料イネは、やわらかいため、家畜飼料に好適に利用できる。

【0066】

本発明にかかるポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを取得する方法として、公知の技術により、本発明にかかるポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを含むDNA断片を単離し、クローニングする方法が挙げられる。例えば、本発明におけるポリヌクレオチドの塩基配列の一部と特異的にハイブリダイズするプローブを調製し、ゲノムDNAライブラリーやcDNAライブラリーをスクリーニングすればよい。このようなプローブとしては、本発明にかかるポリヌクレオチドの塩基配列またはその相補配列の少なくとも一部に特異的にハイブリダイズするプローブであれば、いずれの配列および/または長さのものを用いてもよい。

30

【0067】

また、本発明にかかるポリヌクレオチドを取得する方法として、PCR等の増幅手段を用いる方法を挙げることができる。例えば、本発明におけるポリヌクレオチドのcDNAのうち、5'側および3'側の配列(またはその相補配列)の中からそれぞれプライマーを調製し、これらプライマーを用いてゲノムDNA(またはcDNA)等を鋳型にしてPCR等を行い、両プライマー間に挟まれるDNA領域を増幅することで、本発明にかかるポリヌクレオチドを含むDNA断片を大量に取得できる。また、例えば、公知の日本晴の配列情報に基づいて、Lsi2遺伝子領域を増幅できるようなプライマーを設計し、そのプライマーを用いて、ゲノムDNA(またはcDNA)またはRT-PCR産物を鋳型にして、Lsi2遺伝子領域を増幅することによっても、本発明にかかるポリヌクレオチドを取得することができる。

40

【0068】

50

本発明にかかるポリヌクレオチドを取得するための供給源としては、特に限定されないが、イネ科植物であることが好ましい。後述する実施例においては、イネの変異体 (L s i 2 変異体) から本発明にかかるポリヌクレオチドの一つである変異型の L s i 2 遺伝子を取得しているが、これに限定されるものではない。

【0069】

なお、本発明にかかるポリヌクレオチドは、これまでに明らかにされてこなかった、植物によるケイ素の吸収メカニズムの解明に利用することができる。

【0070】

(2) 本発明にかかるポリペプチド

本発明にかかるポリペプチドは、上記(1)に記載したポリヌクレオチドの翻訳産物であり、少なくともケイ素吸収に關与するものである。

10

【0071】

ここで、上記「ポリペプチド」は、「ペプチド」または「タンパク質」とも換言できる。また、ポリペプチドの「フラグメント」は、当該ポリペプチドの部分断片を示している。

【0072】

本発明にかかるポリペプチドは、天然供給源より単離されても、化学合成されてもよい。ここで、「単離された」ポリペプチドまたはタンパク質は、その天然の環境から取り出されたポリペプチドまたはタンパク質を示す。例えば、宿主細胞中で発現された組換え産生されたポリペプチドおよびタンパク質は、任意の適切な技術によって実質的に精製されている天然または組換えのポリペプチドおよびタンパク質と同様に、単離されたものとする。

20

【0073】

本発明にかかるポリペプチドは、天然の精製産物、化学合成手順の産物、および原核生物宿主または真核生物宿主(例えば、細菌細胞、酵母細胞、高等植物細胞、昆虫細胞、および哺乳動物細胞を含む)から組換え技術によって産生された産物を含む。組換え産生手順において用いられる宿主によっては、本発明にかかるポリペプチドは、グリコシル化など、糖鎖修飾される場合もある。本発明にかかるポリペプチドには、このような修飾されたポリペプチドも含まれる。

【0074】

本発明にかかるポリペプチドとしては、例えば、少なくともケイ素吸収に關与するポリペプチドであって、以下の(a)~(d)のいずれかのポリペプチドである。

30

【0075】

(a) 配列番号2に示されるアミノ酸配列;

(b) 配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1個もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、もしくは付加されたアミノ酸配列、からなるポリペプチドである。

【0076】

(c) 配列番号4に示されるアミノ酸配列;または

(d) 配列番号4に示されるアミノ酸配列において、1個もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、もしくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチド。

40

【0077】

上記(a)または(b)のポリペプチドは、ケイ素吸収を抑制するポリペプチドである。一方、上記(c)または(d)のポリペプチドは、ケイ素吸収を促進するポリペプチドである。

【0078】

なお、上記ポリペプチドは、アミノ酸がペプチド結合してなるポリペプチドであればよいが、これに限定されるものではなく、ポリペプチド以外の構造を含むものであってもよい。ここでいうポリペプチド以外の構造としては、糖鎖やイソプレノイド基等を挙げることができるが、特に限定されるものではない。

【0079】

50

配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドは、配列番号 1 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドの翻訳産物である。また、このポリペプチドは、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列（野生型 L S I 2 タンパク質）において、115 番目のアミノ酸が、セリンからアスパラギンに置換されているポリペプチド（変異型 L S I 2 タンパク質）である。

#### 【0080】

##### （3）形質転換用マーカー遺伝子

本発明にかかるポリヌクレオチドは、形質転換用マーカー遺伝子として利用することができる。すなわち、本発明にかかる形質転換体選抜用マーカー遺伝子は、上記（1）に記載した本発明にかかるポリヌクレオチドからなるものであればよい。本発明にかかるポリヌクレオチドは、ケイ素吸収を抑制または促進する。このため、本発明にかかるポリヌクレオチドを導入された細胞は、ケイ素蓄積量が減少または増加する。従って、ケイ素の蓄積量（ケイ素吸収量）を測定することにより、当該ポリヌクレオチドが導入された細胞を選抜することができる。つまり、ケイ素吸収が促進された細胞と、ケイ素吸収が抑制された細胞とを、それぞれ選抜することができる。

10

#### 【0081】

また、ケイ素吸収を促進させた細胞は、ケイ素を多く含む。ゲルマニウム（Ge）は、ケイ素と同族元素であるため、植物は、ゲルマニウムとケイ素とを区別せずに吸収する。しかし、ゲルマニウムは、ケイ素とは異なり、毒性の強い元素である。このため、ケイ素吸収が促進された細胞は、ゲルマニウム培地では生きられない。これに対して、ケイ素吸収が抑制された細胞は、ゲルマニウム培地でも生きられる。従って、ゲルマニウムを培地に添加することにより、ケイ素吸収が抑制された細胞のみを選抜することが可能となる。

20

#### 【0082】

具体的には、本発明にかかるポリヌクレオチドを形質転換用マーカー遺伝子として利用するには、例えば、当該ポリヌクレオチドを組み込んだ発現ベクターを構築し、当該発現ベクターを目的の細胞に導入する。当該発現ベクターが導入され、ケイ素吸収を抑制するポリペプチドが発現している細胞のケイ素蓄積量は減少する。これに対し、ケイ素吸収を促進するポリペプチドが発現している細胞のケイ素蓄積量は増加する。従って、ケイ素存在下で培養して、発現ベクターの導入前後のケイ素蓄積量を測定することによって、ケイ素吸収に関与しているポリヌクレオチドが発現している細胞を選抜することができる。また、例えば、ケイ素吸収活性が強い品種、または、ケイ素吸収活性が弱い品種を選抜することもできる。

30

#### 【0083】

上述の例では、本発明にかかるポリヌクレオチドを形質転換細胞に発現させる遺伝子とマーカー遺伝子との両方の目的で用いているが、本発明にかかるポリヌクレオチドをマーカー遺伝子としてのみ用いることも可能である。また、例えば、植物のカルス細胞に特異的な転写プロモーターを使用することにより、本発明にかかるポリヌクレオチドの選択マーカーとしての発現時期の制御も可能である。この場合は、さらに目的の細胞内で発現させたいタンパク質をコードする遺伝子を挿入した発現ベクターを構築し、当該発現ベクターを用いて形質転換すればよい。また、本発明にかかるポリヌクレオチドを組み込んだ発現ベクターを構築せずに、本発明にかかるポリヌクレオチドを単独で目的の細胞に導入することも可能である。

40

#### 【0084】

なお、本発明には、上記本発明にかかるマーカー遺伝子または以下に説明する組換え発現ベクターを細胞に導入することにより、生育を阻害するストレス（例えば、病害および虫害、耐塩性および耐乾性、および、ミネラルストレスなど）に対する耐性を細胞に付与し、生育が促進された細胞を選抜する形質転換細胞の選抜方法も含まれる。

#### 【0085】

また、前述のように、配列番号 1 に示されるポリヌクレオチドは、配列番号 3 に示される遺伝子の塩基配列において、344 番目の塩基が、G（グアニン）から A（アデニン）へ、

50

一塩基置換されたものである。このため、配列番号1に示される塩基配列において、344番目の塩基を含む20～100個の連続した塩基からなるポリヌクレオチドは、本発明にかかるマーカー遺伝子として利用することができる。

【0086】

一方、配列番号3に示されるポリヌクレオチドにおいて、344番目の塩基を含む20～100個の連続した塩基からなるポリヌクレオチドは、ケイ素吸収を促進する細胞を選抜するために利用することができる。

【0087】

すなわち、これらのポリヌクレオチドは、ケイ素吸収に関与する細胞を選抜するためのマーカー遺伝子として利用することができる。

【0088】

(4)本発明にかかる組換え発現ベクターおよび形質転換キット

本発明にかかる組換え発現ベクターは、上記(1)に記載した本発明にかかるポリヌクレオチドを含むものであれば、特に限定されるものではない。例えば、配列番号1または3に示すcDNAが挿入された組換え発現ベクターが挙げられる。組換え発現ベクターの作製には、プラスミド、ファージ、またはコスミドなどを用いることができるが特に限定されるものではない。また、作製方法も公知の方法を用いて行えばよい。

【0089】

ベクターの具体的な種類は特に限定されるものではなく、宿主細胞中で発現可能なベクターを適宜選択すればよい。すなわち、宿主細胞の種類に応じて、確実に遺伝子を発現させるために適宜プロモーター配列を選択し、これと本発明にかかるポリヌクレオチドを各種プラスミド等に組み込んだものを発現ベクターとして用いればよい。

【0090】

本組換え発現ベクターは、本発明にかかるポリペプチドを発現させるために用いることができることはいうまでもないが、本発明にかかるポリヌクレオチドをマーカー遺伝子として利用し、他の遺伝子を組み込んで当該他の遺伝子がコードするタンパク質を発現させるための組換え発現ベクターとしても利用できる。

【0091】

本発明にかかるポリヌクレオチドが宿主細胞に導入されたか否か、さらには宿主細胞中で確実に発現しているか否かを確認するために、各種マーカーを用いてもよい。例えば、ハイグロマイシンのような抗生物質に抵抗性を与える薬剤耐性遺伝子をマーカーとして用い、このマーカーと本発明にかかるポリヌクレオチドとを含むプラスミド等を発現ベクターとして宿主細胞に導入する。これによってマーカー遺伝子の発現から本発明の遺伝子の導入を確認することができる。

【0092】

上記宿主細胞は、ケイ素吸収能を有する細胞、生物であれば、特に限定されるものではなく、従来公知の各種細胞を好適に用いることができる。具体的には、例えば、イネ、きゅうり、アブラナ、またはトマト等を挙げることができるが、特に限定されるものではない。

【0093】

上記発現ベクターを宿主細胞に導入する方法、すなわち形質転換方法も特に限定されるものではなく、アグロバクテリウム感染法、電気穿孔法(エレクトロポレーション法)、リン酸カルシウム法、プロトプラスト法、酢酸リチウム法、およびパーティクルガン法等の従来公知の方法を好適に用いることができる。

【0094】

本発明にかかる形質転換キットは、上記(1)に記載した本発明にかかるポリヌクレオチド、または、本発明にかかる組換え発現ベクターの少なくともいずれかを含むものであればよい。その他の具体的な構成については特に限定されるものではなく、必要な試薬や器具等を適宜選択してキットの構成とすればよい。当該形質転換キットを用いることにより、簡便かつ効率的に形質転換細胞を得ることができる。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 9 5 】

( 5 ) 本発明にかかる形質転換体

本発明にかかる形質転換体は、上記 ( 1 ) に記載した本発明にかかるポリヌクレオチド、または、上記 ( 4 ) に記載の組換え発現ベクターが導入されており、かつ、ケイ素吸収に關与するポリペプチドが発現している形質転換体であれば、特に限定されるものではない。ここで「形質転換体」とは、細胞・組織・器官のみならず、生物個体を含む意味である。

## 【 0 0 9 6 】

また、ここで、「ポリヌクレオチドが導入された」とは、公知の遺伝子工学的手法（遺伝子操作技術）により、対象細胞（宿主細胞）内に発現可能に導入されることを意味するが、本発明では、これに加えてゲノム中に含まれる本発明のポリヌクレオチドが生体内で発現している場合も含むものとする。このゲノム中に含まれる本発明のポリヌクレオチドが生体内で発現している例としては、上述の *l s i 2* 変異体が挙げられる。

10

## 【 0 0 9 7 】

形質転換体の作製方法（生産方法）は特に限定されるものではないが、例えば、上述した組換え発現ベクターを宿主細胞に導入して形質転換する方法を挙げることができる。また、ケイ素吸収能を有する細胞、生物であれば、形質転換の対象となる生物も特に限定されるものではなく、上記 ( 4 ) において宿主細胞として例示した植物細胞等を挙げることができる。

## 【 0 0 9 8 】

本発明にかかる形質転換体は、植物細胞または植物体であることが好ましい。このような形質転換植物は、細胞内または植物体内において、ケイ素の含有量（蓄積量）を減少または増加することができる。そして、上記ポリヌクレオチドまたは組み換え発現ベクターが、ポリペプチドの発現を促進させるプロモーターとともに導入された上記形質転換体では、ケイ素の吸収が抑制または促進され、ケイ素の蓄積量を減少または増加させることができる。

20

## 【 0 0 9 9 】

本発明の形質転換植物は、本発明にかかるポリヌクレオチドを導入されているため、ケイ素吸収が、抑制または促進されている。

## 【 0 1 0 0 】

ケイ素吸収が抑制された形質転換体（特に形質転換植物）は、ケイ素蓄積量の減少により、やわらかくなる。従って、ケイ素吸が抑制された形質転換体は、家畜飼料として好適に利用することができる。

30

## 【 0 1 0 1 】

一方、ケイ素吸収が促進された形質転換体（特に形質転換植物）は、ケイ素蓄積量の増加により、病害や虫害に対する抵抗性、耐塩性および耐乾性、およびミネラルストレスに対する耐性が向上する。このため、ケイ素吸収が促進された形質転換体は、形質転換植物の生育を、促進させることができる。

## 【 0 1 0 2 】

さらに、ケイ素吸収が促進された形質転換植物は、病害や虫害に対する抵抗性が向上しているため、農薬を極力使用せずに、形質転換植物を栽培することができる。従って、有機栽培および無農薬栽培などが可能となり、より安全性の高い形質転換植物を、食料として提供することができる。

40

## 【 0 1 0 3 】

なお、本発明者は、既に、イネにおけるケイ素吸収に關与する別の遺伝子（*L s i 1*）を単離し、その塩基配列を特定している（特許文献 1）。

## 【 0 1 0 4 】

配列番号 5 は、変異型イネの *L s i 1* 遺伝子（*c D N A*）の塩基配列である。配列番号 6 は、配列番号 5 の変異型イネの *L s i 1* 遺伝子にコードされるアミノ酸配列である。配列番号 7 は、野生型イネ（オオチカラ）の *L s i 1* 遺伝子（*c D N A*）の塩基配列である

50

。配列番号 8 は、配列番号 7 の野生型イネ（オオチカラ）の L s i 1 遺伝子にコードされるアミノ酸配列である。

【 0 1 0 5 】

L s i 1 遺伝子は、イネの第 2 染色体に存在する。そして、この遺伝子の第 3 エクソンの変異によって、ケイ素吸収活性が、大きく変化する。

【 0 1 0 6 】

このような変異としては、配列番号 8 に示されるアミノ酸配列において、132 番目のアミノ酸が、アラニンからスレオニンに置換されていること、などが挙げられる。なお、配列番号 6 に示すポリペプチドは、本願発明者が先に見出した、変異型 L s i 1 遺伝子にコードされるケイ素吸収を抑制するポリペプチドである。配列番号 8 に示すポリペプチドは、野生型 L s i 1 遺伝子にコードされるケイ素吸収を促進するポリペプチドである。

10

【 0 1 0 7 】

また、配列番号 9 は、野生型イネ（日本晴）における L s i 1 遺伝子のゲノム配列である。配列番号 9 は、イネ（野生型）の第 2 染色体のゲノム配列の一部である。配列番号 9 に示されるポリヌクレオチドは、データベース上に公開されている（DDBJ Accession No. AK069842）日本晴（野生型）の c D N A クロンの塩基配列と一致している。そして、配列番号 5 に示されるポリヌクレオチドは、配列番号 7 に示される遺伝子の塩基配列において、510 番目の塩基が、G（グアニン）から A（アデニン）へ、一塩基置換されたものである。この一塩基置換により、配列番号 6 に示されるポリペプチド（配列番号 5 の塩基配列の翻訳産物）は、132 番目のアミノ酸が、配列番号 8（配列番号 7 の塩基配列の翻訳産物）のアラニンから、スレオニンに変異する。

20

【 0 1 0 8 】

なお、配列番号 9 の配列は、イネゲノム配列の 101780 番目～105388 番目のゲノム配列に対応する。イネゲノム配列の 104018 番目～104212 番目の塩基、すなわち、配列番号 9 の 2240 番目～2435 番目の塩基に相当する。なお、配列番号 9 において、第 1 エクソンは 117 番目～268 番目の塩基、第 2 エクソンは 411 番目～635 番目の塩基、第 4 エクソンは 2540 番目～2555 番目の塩基、および第 5 エクソンは 2950 番目～3213 番目の塩基に、それぞれ相当する。なお、前述した第 3 エクソンにおける 1 塩基置換は、配列番号 7 における 2257 番目の塩基に生じている。

【 0 1 0 9 】

また、L s i 1 タンパク質と L s i 2 タンパク質とは、ケイ素吸収メカニズムが異なる。すなわち、L s i 2 タンパク質は、細胞の中から細胞外へ、ケイ素を輸送するトランスポーターであるのに対し、L s i 1 タンパク質は、細胞内にケイ素を取り込むトランスポーターである。

30

【 0 1 1 0 】

このように、L s i 1 遺伝子および L s i 2 遺伝子は、いずれも、ケイ素吸収に関与する遺伝子である。このため、L s i 1 遺伝子および L s i 2 遺伝子の少なくともいずれか一方を、植物に導入すれば、植物にケイ素吸収能を付与することができる。

【 0 1 1 1 】

さらに、L s i 1 遺伝子と L s i 2 遺伝子とは、ケイ素吸収のメカニズムが異なる。このため、L s i 1 遺伝子および L s i 2 遺伝子の両方を導入することによって、一方の遺伝子を導入した場合よりも、複合ストレスに対して強い耐性を有する植物を作製することができる。

40

【 0 1 1 2 】

すなわち、ケイ素吸収能を促進してケイ素の含有量を高めれば、複合的なストレスに対する耐性を植物に付与し、生育が促進された植物を作製できる。

【 0 1 1 3 】

一方、ケイ素吸収を抑制してケイ素の含有量を低くすれば、軟らかく飼料に適した植物（飼料イネ等）を作製できる。

【 0 1 1 4 】

50

なお、ケイ素吸収能を促進する場合は、野生型 *L s i 1* 遺伝子および野生型 *L s i 2* 遺伝子の少なくとも一方を導入すればよい。

【0115】

また、ケイ素吸収能を抑制する場合は、野生型 *L s i 1* 遺伝子および野生型 *L s i 2* 遺伝子の少なくとも一方の発現を抑制すればよい。これらの遺伝子発現の抑制は、例えば、アンチセンスRNAの導入、RNA干渉などの手法により行うことができる。

【0116】

本発明の形質転換体は、ケイ素吸収メカニズムの異なるケイ素吸収を促進するポリペプチドを複数導入し、ケイ素吸収が促進されたものであってもよい。

【0117】

すなわち、本発明にかかる形質転換体は、下記の (a) または (b) のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと、下記の (c) または (d) のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとが導入されており、かつ、ケイ素吸収を促進するポリペプチドを発現してなるものであってもよい。

【0118】

(a) 配列番号4に示されるアミノ酸配列；

(b) 配列番号4に示されるアミノ酸配列において、1個もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、もしくは付加されたアミノ酸配列；

(c) 配列番号8に示されるアミノ酸配列；

(d) 配列番号8に示されるアミノ酸配列において、1個もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、もしくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチド。

【0119】

上記 (a) および (b) のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、野生型の *L s i 2* 遺伝子であり、(c) および (d) のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、野生型の *L s i 1* 遺伝子である。いずれの遺伝子にコードされるポリペプチドも、ケイ素吸収を促進するポリペプチドである。このため、この形質転換体は、ケイ素吸収を促進するポリペプチドを発現させることによって、ケイ素の蓄積量を、増加させることができる。従って、前述と同様に、この形質転換体（特に形質転換植物）は、ケイ素蓄積量の増加により、病害や虫害に対する抵抗性、耐塩性および耐乾性、およびミネラルストレスに対する耐性が向上する。このため、ケイ素吸収が促進された形質転換体は、形質転換植物の生育を、促進させることができる。

【0120】

なお、植物体の形質転換に用いられる組換え発現ベクターは、当該植物細胞内で挿入遺伝子を発現させることが可能なものであれば、特に限定されるものではない。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、pBI系等のバイナリーベクターを用いることが好ましい。バイナリーベクターとしては、具体的には、例えば、pBIG、pBIN19、pBI101、pBI121、pBI221等を挙げることができる。また、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を有するベクターであることが好ましい。プロモーターとしては公知のプロモーターを好適に用いることができ、具体的には、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)、ユビキチンプロモーターやアクチンプロモーターを挙げることができる。なお、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、カルスなどが含まれる。

【0121】

植物細胞への組み換え発現ベクターの導入には、アグロバクテリウム感染法、電気穿孔法 (エレクトロポレーション法)、リン酸カルシウム法、プロトプラスト法、酢酸リチウム法、およびパーティクルガン法等、従来公知の方法を用いることができる。また、形質転換細胞から植物体の再生は、植物細胞の種類に応じて公知の方法で行うことが可能である。

【0122】

10

20

30

40

50



ゲノム内に本発明にかかるポリヌクレオチドが導入された形質転換植物体があったん得られれば、当該植物体から得られる種子にも当該ポリヌクレオチドが導入されている。本発明には、形質転換植物から得られる種子も含まれる。

【0123】

(6) 本発明にかかる食品

本発明の食品は、本発明にかかる形質転換体を含むものである。すなわち、この食品は、ケイ素吸収が抑制または促進された形質転換体を含むものである。

【0124】

家畜は、硬い飼料を食べずに残す傾向にあるため、硬い植物を飼料に適用することは好ましくない。ケイ素吸収が抑制された形質転換体は、やわらかいため、その形質転換体を含む食品は、特に、家畜飼料として好適に利用することができる。

10

【0125】

一方、ケイ素吸収が促進された形質転換体は、農薬および化学肥料を極力使用せずに栽培できる。このため、その形質転換体を含む食品は、より安全性の高い食料として提供することができる。

【0126】

このように、この食品には、ヒトが摂取するものはもちろん、家畜に与える飼料なども含まれる。

【0127】

近年、食の安全性に関心が寄せられており、より安全性の高い食品が、望まれている。このため、農薬を全くまたは極力使用せずに栽培する有機栽培および無農薬（減農薬）栽培によって生産された農産物が、注目されている。

20

【0128】

コメは、日本ばかりではなく、世界各地で主食とされている消費量の多い植物である。また、果物や野菜も、生産量および消費量が多い。このため、これらの農作物は、特に安全性が重要視される。

【0129】

従って、ケイ素吸収が促進された形質転換体を含む食品は、コメ、野菜、および果物のような農産物であることが好ましい。これにより、安全性が高く、有用な米（イネ）、野菜、および果物の栽培を実現できる。

30

【0130】

なお、1 s i 2 変異体は、形質転換体ではなく、体細胞変異体であるため、1 s i 2 変異体を、そのまま栽培に利用することができる。また、1 s i 2 変異体は、直接従来 of 交雑育種に利用することもできる。

【0131】

従って、本発明の食品には、このような体細胞変異体を用いて、交雑育種によって得られた植物も含まれる。

【0132】

本発明は、以下のように表現することもできる。

【0133】

本発明にかかるポリヌクレオチドは、ケイ素吸収に関与するポリヌクレオチドであって、

40

下記の (a) ~ (d) のいずれかのポリヌクレオチド：

(a) 配列番号 1 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチド；

(b) 以下の (i) もしくは (i i) のいずれかとストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド：

(i) 配列番号 1 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチド；もしくは

(i i) 配列番号 1 に示される塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチド；

(c) 配列番号 3 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチド；または

50

(d) 以下の (iii) もしくは (iv) のいずれかとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド：

(iii) 配列番号 3 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチド；もしくは  
(iv) 配列番号 3 に示される塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドであってもよい。

【0134】

上記のポリヌクレオチドによれば、ケイ素吸収に関与するポリペプチドを翻訳産物として得ることができる。

【0135】

すなわち、上記 (a) または (b) のポリヌクレオチドによれば、ケイ素吸収を抑制するポリペプチドを翻訳産物として得ることができる。一方、上記 (c) または (d) のポリヌクレオチドによれば、ケイ素吸収を促進するポリペプチドを翻訳産物として得ることができる。

10

【0136】

本発明にかかるポリペプチドは、ケイ素吸収に関与するポリペプチドであって、下記の (a) ~ (d) のいずれかのポリペプチド：

(a) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列；

(b) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列において、1 個もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、もしくは付加されたアミノ酸配列；

(c) 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列；または

20

(d) 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列において、1 個もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、もしくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであってもよい。

【0137】

上記のポリペプチドによれば、ケイ素吸収を抑制または促進することができる。

【0138】

すなわち、上記 (a) または (b) のポリペプチドによれば、ケイ素吸収を抑制することができる。一方、上記 (c) または (d) のポリペプチドによれば、ケイ素吸収を促進することができる。

【0139】

30

このような、ケイ素吸収に関与するポリペプチドは、例えば、イネでは、第 3 染色体に座乗する遺伝子にコードされるアミノ酸を含む領域に存在する。イネは、ケイ素吸収能が高い。すなわち、イネは、ケイ素吸収を促進するポリペプチド (ポリヌクレオチド) を有している。しかし、この領域にコードされる親水性アミノ酸 (特に好ましくは水酸基を含有する脂肪族アミノ酸) が、別の親水性アミノ酸 (特に好ましくはアミド基を有する脂肪族アミノ酸) に置換されているポリペプチドは、ケイ素吸収をほとんどしない。例えば、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列において、115 番目のアミノ酸が、セリンからアスパラギンへ置換されているポリペプチド等は、ケイ素吸収をほとんどしない。なお、配列番号 4 に示されるポリペプチドは、イネのケイ素吸収に関与する (ケイ素吸収を促進する) ポリペプチドのアミノ酸配列である。

40

【0140】

また、本発明にかかるポリヌクレオチドは、上記いずれかのポリペプチドをコードするものであってもよい。上記のポリヌクレオチドによれば、ケイ素吸収に関与するポリペプチドを、翻訳産物として得ることができる。なお、このポリヌクレオチドとしては、例えば、前述した、上記 (a) ~ (d) のポリヌクレオチド等が挙げられる。

【0141】

本発明にかかる形質転換体選抜用マーカー遺伝子は、上記の何れかのポリヌクレオチドからなるものである。

【0142】

本発明にかかるポリヌクレオチドは、それが発現している細胞 (特に植物細胞) に、ケ

50

イ素吸収を抑制または促進する機能を付与することができる。

【0143】

すなわち、ケイ素吸収を抑制することによって、その細胞のケイ素蓄積量を、減少させることができる。これにより、ケイ素吸収を抑制するポリペプチドが発現している細胞は、やわらかくなる。そのため、ケイ素吸収を抑制するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドからなるマーカー遺伝子は、ケイ素吸収を抑制するポリペプチドを発現している形質転換細胞を選抜するためのマーカー遺伝子として利用することができる。

【0144】

また、ケイ素吸収を促進することによって、その細胞のケイ素蓄積量を、増加させることができる。これにより、ケイ素吸収を促進するポリペプチドが発現している細胞は、病害および虫害などの種々のストレスに対する耐性が向上する。そのため、ケイ素吸収を促進するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドからなるマーカー遺伝子は、ケイ素吸収を促進するポリペプチドを発現している形質転換細胞を選抜するためのマーカー遺伝子として利用することができる。

10

【0145】

また、これらのマーカー遺伝子は、ケイ素吸収活性が強い品種、または、ケイ素吸収活性が弱い品種を選抜するためにも、利用することができる。

【0146】

本発明にかかる組換え発現ベクターは、上記の何れかのポリヌクレオチドを含むものである。上記の組換え発現ベクターは、本発明にかかるポリヌクレオチドを細胞に導入するための組換え発現ベクターとして利用できるだけでなく、本発明にかかるポリヌクレオチドを選抜用マーカーとして用いた場合には、他の遺伝子を細胞に導入するための組換え発現ベクターとしても利用できる。

20

【0147】

本発明にかかる形質転換体は、上記のポリヌクレオチドまたは上記の組換え発現ベクターが導入されており、かつ、ケイ素吸収に関与するポリペプチドを発現しているものである。ここで、上記ポリヌクレオチドは、ケイ素吸収に関与するポリヌクレオチドであるため、上記形質転換体は、植物（形質転換植物）であることが好ましい。

【0148】

この形質転換体は、上記ポリヌクレオチドまたは組換え発現ベクターが、ケイ素吸収に関与するポリペプチドの発現を促進させるプロモーターとともに導入されている。このため、ケイ素吸収を抑制または促進するポリペプチドを発現させることによって、この形質転換体のケイ素の蓄積量を、減少または増加させることができる。

30

【0149】

家畜は、硬い飼料を食べずに残す傾向にあるため、硬い植物を飼料に適用することは好ましくない。ケイ素吸収が抑制された形質転換体は、ケイ素蓄積量の減少により、やわらかくなる。従って、ケイ素吸収が抑制された形質転換体は、家畜飼料として好適に利用することができる。

【0150】

また、ケイ素吸収が促進された形質転換体は、ケイ素の蓄積量の増加により、病害や虫害に対する抵抗性、耐塩性および耐乾性、およびミネラルストレスに対する耐性が向上する。このため、形質転換植物の生育を、促進させることができる。

40

【0151】

さらに、ケイ素吸収が促進された形質転換植物は、病害や虫害に対する抵抗性が向上しているため、農薬および化学肥料を極力使用せずに、形質転換植物を栽培することができる。従って、有機栽培および無農薬栽培などが可能となり、より安全性の高い形質転換植物を、食料として提供することができる。

【0152】

本発明にかかる別の形質転換体は、下記の（a）または（b）のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと、下記の（c）または（d）のポリペプチドをコードするポリヌ

50

クレオチドとが導入されており、かつ、ケイ素吸収を促進するポリペプチドを発現してなることを特徴としている。

【0153】

- (a) 配列番号4に示されるアミノ酸配列；
- (b) 配列番号4に示されるアミノ酸配列において、1個もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、もしくは付加されたアミノ酸配列；
- (c) 配列番号8に示されるアミノ酸配列；
- (d) 配列番号8に示されるアミノ酸配列において、1個もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、もしくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチド。

【0154】

この形質転換体は、ケイ素吸収メカニズムが異なるケイ素吸収を促進するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが導入されており、かつ、ケイ素吸収を促進するポリペプチドを発現している。このため、この形質転換体は、ケイ素吸収を促進するポリペプチドを発現させることによって、ケイ素の蓄積量を、増加させることができる。

【0155】

本発明にかかる食品は、上記形質転換体を含むものである。すなわち、この食品は、ケイ素吸収が抑制または促進された形質転換体を含むものである。

【0156】

ケイ素吸収が抑制された形質転換体は、やわらかいため、その形質転換体を含む食品は、特に、家畜飼料として好適に利用することができる。

【0157】

一方、ケイ素吸収が促進された形質転換体は、農薬を極力使用せずに栽培できる。このため、その形質転換体を含む食品は、より安全性の高い食料として提供することができる。

【0158】

本発明にかかる形質転換キットは、少なくとも上記のポリヌクレオチド、あるいは、上記の組換え発現ベクターのいずれかを含むことを特徴とするものである。上記の形質転換キットを用いれば、本発明にかかるポリペプチドを発現する形質転換体を簡便かつ効率的に得ることができる。

【0159】

〔実施例1〕

本実施例では、大規模分離集団を用いたマップベースクローニングにより、ケイ素吸収に關与する遺伝子(Lsi2遺伝子)領域の詳細な連鎖解析を行った。

【0160】

(a) 連鎖解析用の集団の作製

イネ変異体(Lsi2変異体)のLsi2遺伝子をマッピングするための集団を作製した。

【0161】

すなわち、まず、ケイ素と同族元素のゲルマニウムを用い(50mg/kg soil, 1ヶ月)、NMU(N-メチル-N-ニトロソ尿素)により変異原処理したイネ(品種:台中-65(T-65))のM2の種子から、ケイ酸の吸収が少ない突然変異系統(Lsi2変異体)を選別した。そして、このLsi2突然変異系統と、インド型品種カサラス(Kasalath)との交配からF1個体を得た。そして、このF1集団を、自殖させF2集団を得た。なお、図示していないが、Lsi2変異体は、ケイ素吸収能が低いため、野生型に比べて、生育状態が悪いことも確認された。

【0162】

次に、このF2集団個体を、EST-PCRマーカー、および、SSRマーカー(いわゆるマイクロサテライトマーカー)により解析し、Lsi2遺伝子をマッピングした。その結果、Lsi2遺伝子は、第3染色体に座乗していることが明らかとなった。また、Lsi2遺伝子のフランキング(flancking)マーカーは、RM3894であった。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 6 3 】

なお、マーカーRM3894は、GRAMENEホームページ (<http://dev.gramene.org/microsat/sr.html>) に公開されている。

## 【 0 1 6 4 】

なお、イネゲノムプロジェクトで公開されている分子マーカーのマップは、「日本晴」と「カサラス」の交雑集団が用いられている。これらは、日本型イネとインド型イネという異なる生態型イネの交雑であるため、日本型イネ同士の交雑による集団よりも多型検出（塩基配列の違いを反映しているため、これを検出することでゲノムの特定部分がどちらの親から由来するか判定できる）が容易である。また、カサラスのゲノムシーケンスの一部はイネゲノムプロジェクトで公開されており、新たな分子マーカーを容易に作成することができる。以上のことから、カサラスを本実施例におけるマップ集団作成の花粉親に用いた。

10

## 【 0 1 6 5 】

## ( b ) L s i 2 遺伝子のマップベースクロニング

精度の高い L s i 2 遺伝子領域の遺伝地図を作成するために、さらに、F 2 集団個体 ( 1 2 0 0 個体 ) を用いて、連鎖解析を行った。この解析では、SSRマーカーおよびCAPS ( Cleaved Amplified Polymorphic Sequence ) マーカーを用いた。そして、F 2 集団の各個体について、ケイ素の吸収量を測定し、ケイ素を吸収しない劣勢ホモ個体 ( 計 2 9 8 個体 ) を選択した。その後、L s i 2 遺伝子の両側に存在する、SSRマーカー ( RM3894 ) 、および、新規に作成したCAPSマーカー ( lsi2-a ) を利用して、L s i 2 遺伝子近傍の染色体組み換え個体を選抜した。その結果、27個体の組み換え個体を選抜できた。

20

## 【 0 1 6 6 】

## ( c ) L s i 2 遺伝子の絞込み

次に、( b ) で選抜した組み換え個体を用いて、以下のマーカーによる詳細な連鎖地図を作成した。

## 【 0 1 6 7 】

すなわち、L s i 2 遺伝子座近傍に存在するマーカーRM3894およびlsi2-a間の塩基配列を利用して、新規のPCR多型マーカーおよびCAPSマーカーを作成した。そして、これらのマーカーを用いて、( b ) で選抜した組み換え個体を選抜して、L s i 2 遺伝子の候補領域を絞り込んだ。その結果、L s i 2 遺伝子は、マーカー-lsi2-b ( 5 ' - CCGCTACTAGTTTCG GATGG -3 ' ; 配列番号 1 0 ) / ( 5 ' - TGCTGCAGAAAGAGTGAGAGTT -3 ' ; 配列番号 1 1 ) 、および、マーカー-lsi2-c ( 5 ' - GGGTGATGGAGAGGAACATC -3 ' ; 配列番号 1 2 ) / ( 5 ' - AACCGGTTTCACAAACCCTA -3 ' ; 配列番号 1 3 ) に挟まれる約 1 0 7 k b ゲノム領域に存在することが明らかとなった。

30

## 【 0 1 6 8 】

また、PACクローン ( AC113930 ) が、L s i 2 遺伝子座を含むことが明らかとなった。このようにして、L s i 2 遺伝子の座上位置を、特定した。

## 【 0 1 6 9 】

## ( d ) 塩基配列解析による L s i 2 遺伝子の特定

マーカー-lsi2-bと、マーカー-lsi2-cとの間の塩基配列解析を行なった。塩基配列解析は、既に得られている日本晴の塩基配列情報から、該当部分を増幅できるプライマーを設計し、ゲノムPCRを行った。

40

## 【 0 1 7 0 】

l s i 2 変異体と野生型の塩基配列を比較した結果、1塩基置換が見出された。この置換は、L s i 2 遺伝子のゲノム上の構造における第2エクソンに存在した。すなわち、突然変異体 ( l s i 2 変異体 ) では、図1および配列番号3に示すように、L s i 2 遺伝子のcDNA配列第4膜貫通ドメインが存在する334番目の塩基が、グアニンから、アデニンに置換されていた。

## 【 0 1 7 1 】

この塩基置換により、これらの遺伝子にコードされるアミノ酸が、野生型 ( 配列番号 4

50

)のセリンから、変異型(配列番号2)のアスパラギンへ置換される。

【0172】

なお、cDNA配列の絞込みは、まず、F2集団を用いて、Lsi2遺伝子を含む領域を絞り込み、次に、RiceGAAS (Rice Genome Automated Annotation system : <http://ricegaas.dna.affrc.go.jp/>)を用いて遺伝子予測を行った。その結果、その領域に、17つの遺伝子が予測された。これらの遺伝子について塩基配列決定を行った。

【0173】

なお、略同様にして、Lsi1変異体を取得し、イネ変異体(Lsi1変異体)のLsi1遺伝子をマッピングしたところ、Lsi1遺伝子は、第2染色体に座乗していることが明らかとなった。また、Lsi1変異体では、Lsi1遺伝子のcDNA配列の512番目の塩基が、野生型(配列番号7)のG(グアニン)から、変異型(配列番号5)のA(アデニン)へ置換されていた。

【0174】

この1塩基置換により、これらの遺伝子にコードされるアミノ酸が、野生型(配列番号8)のアラニンから、変異型(配列番号9)のスレオニンへ置換される。

【0175】

Lsi1変異体、野生型Lsi1遺伝子、および変異型Lsi1遺伝子の、取得方法および各塩基配列の同定方法については、特許文献1に詳細に記載されている。

【0176】

〔実施例2〕Lsi1変異体およびLsi2変異体のケイ素取り込み量の比較

次に、Lsi1変異体、Lsi2変異体、および野生型イネ(T-65)のケイ素取り込み量を比較した。0.15mMまたは1.0mMのケイ素を含む培養液にて、それぞれのイネを栽培し、根から吸収されるケイ素量を、3時間ごとに12時間測定した。

【0177】

図2(a)および図2(b)は、ケイ素取り込み量を示すグラフである。図2(a)および図2(b)に示すように、Lsi1変異体(図中Lsi1)およびLsi2変異体(図中Lsi2)は、野生型(図中WT)に比べて、ケイ素取り込み量が少なかった。

【0178】

また、Lsi1変異体とLsi2変異体との交雑により、Lsi1×Lsi2を作製し、同様に、ケイ素取り込み量および水取り込み量を測定した。図3(a)は、ケイ素取り込み量を示すグラフであり、図3(b)は、水取り込み量を示すグラフである。これらの図に示すように、Lsi1変異体、Lsi2変異体は、野生型に比べてケイ素取り込み量が少ないことが確認された。しかし、Lsi1変異体とLsi2変異体との交雑体は、野生型と同等の吸収量を示した。また、水取り込み量は、いずれも同程度であった。

【0179】

〔実施例3〕Lsi2遺伝子を導入した形質転換体の作製

まず、Lsi2遺伝子の相補性試験を行うために、約47000個体のKasalathのBACより、Lsi2遺伝子領域を含むクローンの選抜を行った。その結果、Kasalath BAC (K0315E16)のプラスミドが、Lsi2遺伝子領域を十分に含むことを確認した。図4は、Kasalath BAC (K0315E16)に含まれるLsi2遺伝子領域を示す模式図である。図4には、配列番号16~21に示される各プライマーにより増幅される領域も示されている。なお、図4における、14Lは配列番号14に、14Uは配列番号15に、15Lは配列番号16に、15Uは配列番号17に、32Lは配列番号18に、37Uは配列番号19に、40Lは配列番号20に、40Uは配列番号21に、それぞれ対応する。

【0180】

次に、このクローンからプラスミドDNAを抽出し、制限酵素処理を行った後、ベクターのpPZP2H-lacに組み込んだ。そのLsi2遺伝子領域を含んだpPZP2H-lacを、アグロバクテリウム(EHA101)へ導入し、アグロバクテリウム法を用いてLsi2変異体に導入し、形質転換体を作製した。なお、図5に示すウェスタンブロットにより、この形質転換体への野生型Lsi2遺伝子の導入を確認した。

10

20

30

40

50

## 【0181】

また、図6に示すように、この形質転換体のケイ素吸収量を測定した結果、野生型 *L s i 2* 遺伝子を導入した *l s i 2* 変異体のケイ素吸収量は、野生型と略同程度まで上昇した。このように、*l s i 2* 変異体に野生型 *L s i 2* 遺伝子を導入すると、ケイ素吸収量は促進されることが確認された。

## 【0182】

本発明は上述した実施形態に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能である。すなわち、請求項に示した範囲で適宜変更した技術的手段を組み合わせ得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。

## 【産業上の利用可能性】

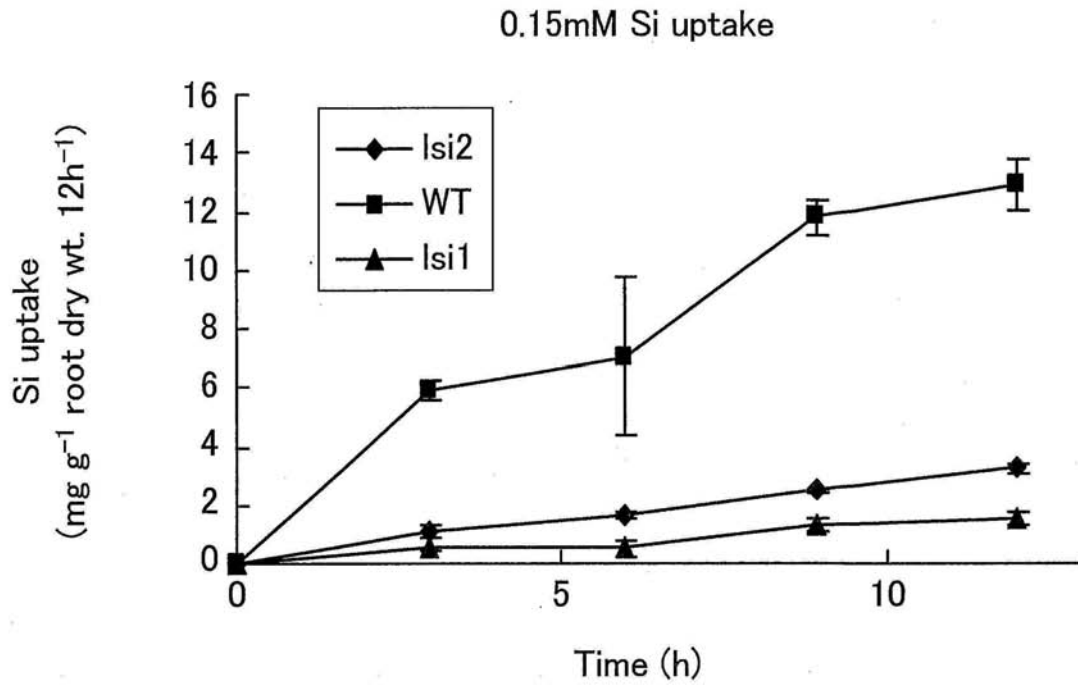
## 【0183】

本発明のポリヌクレオチドは、植物において初めて同定された、ケイ素吸収に関与する遺伝子である。ケイ素蓄積量の減少は、硬い植物をやわらかくする。ケイ素蓄積量の増加は、病害および虫害などの種々のストレスに対する耐性（抵抗性）を付与し、生育を促進させる。それゆえ、本発明は、特に農業、および食品産業に、好適に利用することができる。

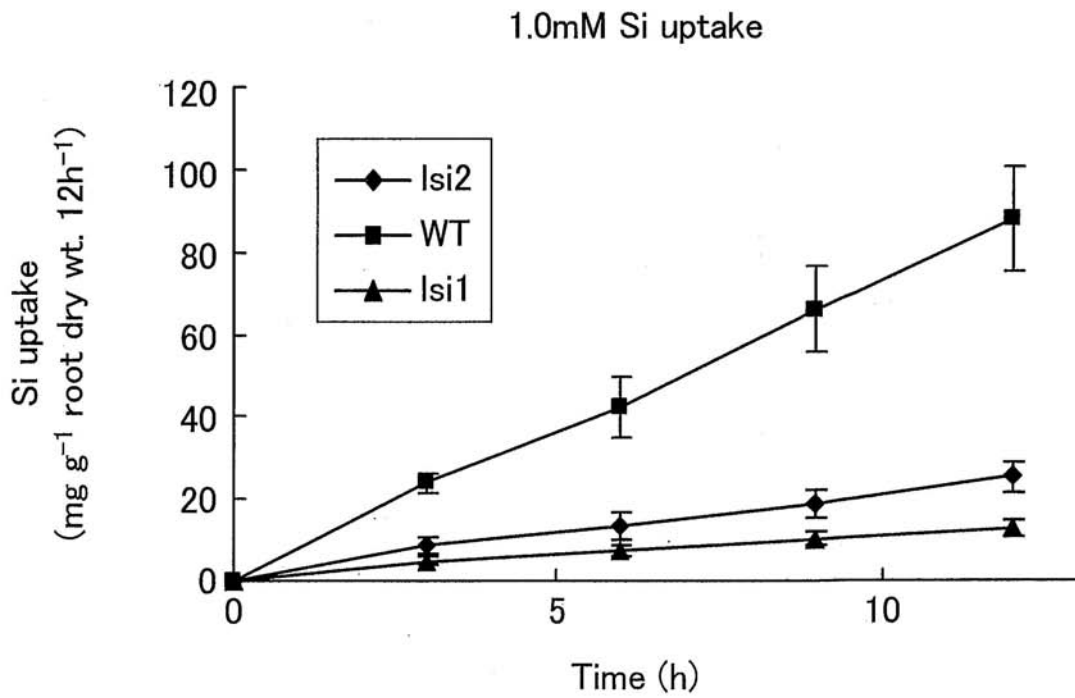




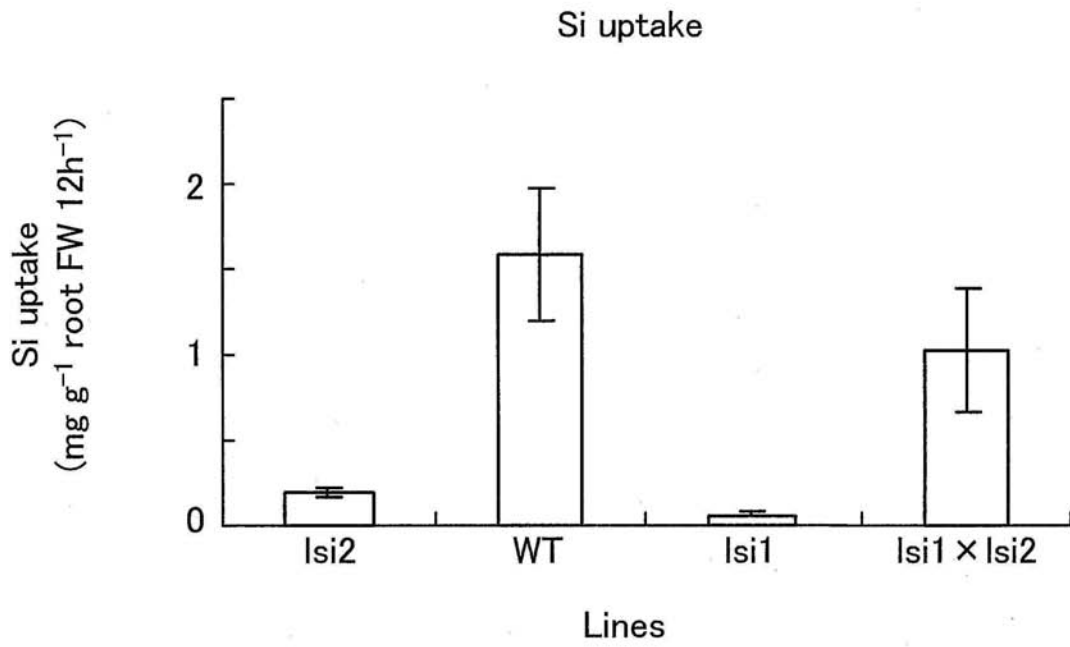
【 図 2 a 】



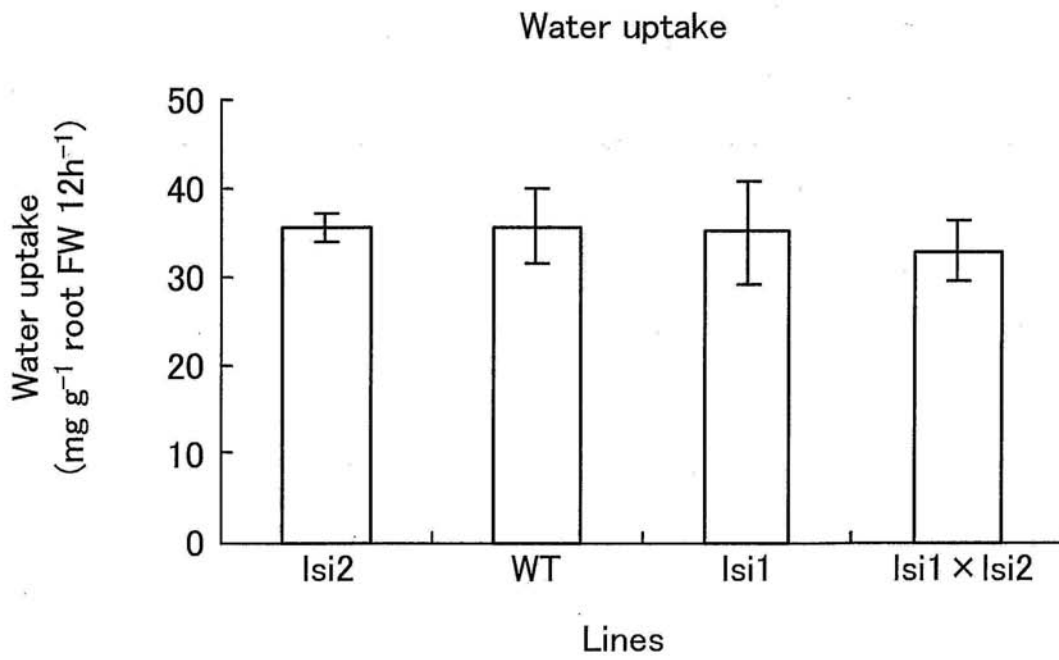
【 図 2 b 】



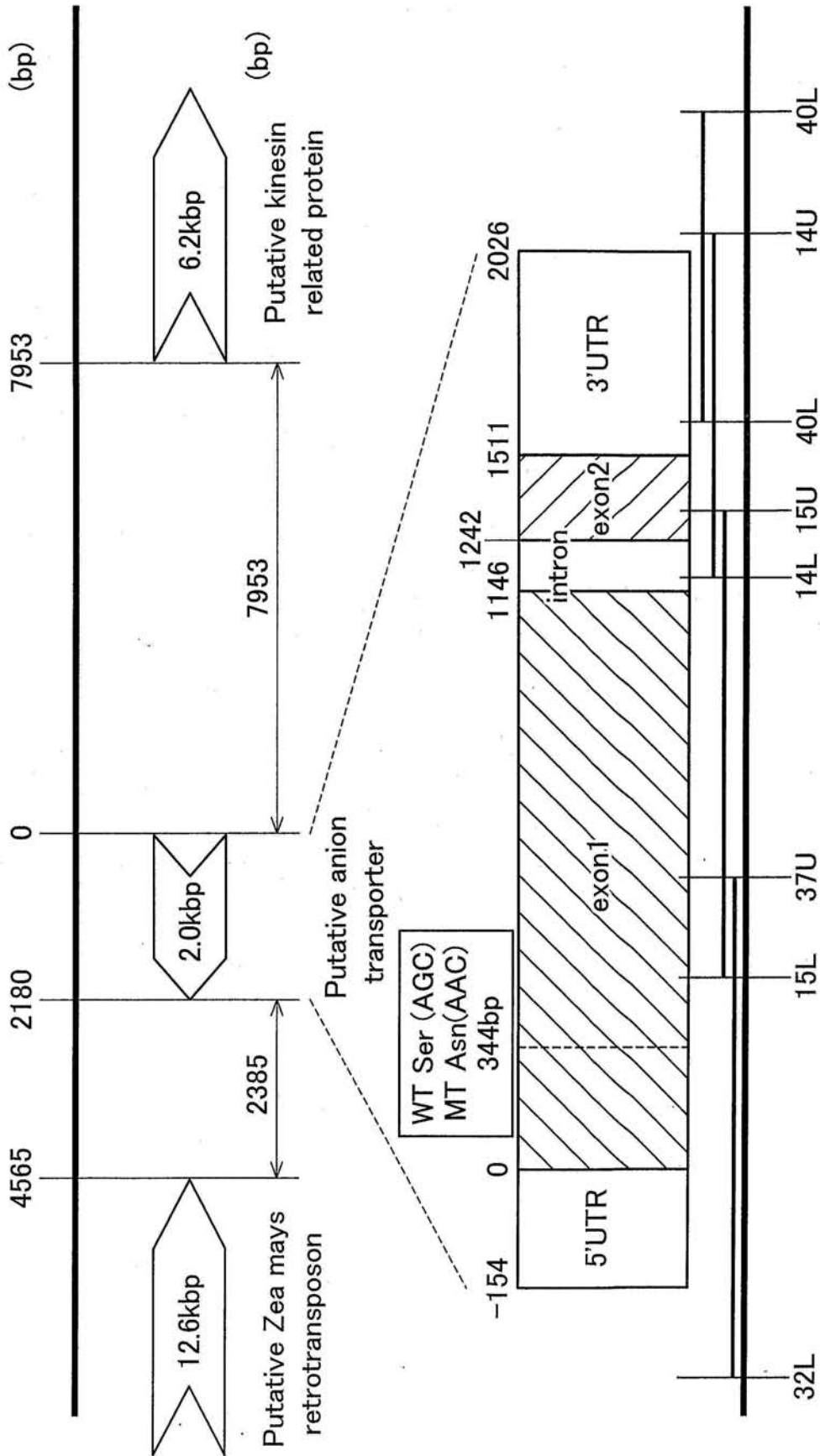
【 図 3 a 】



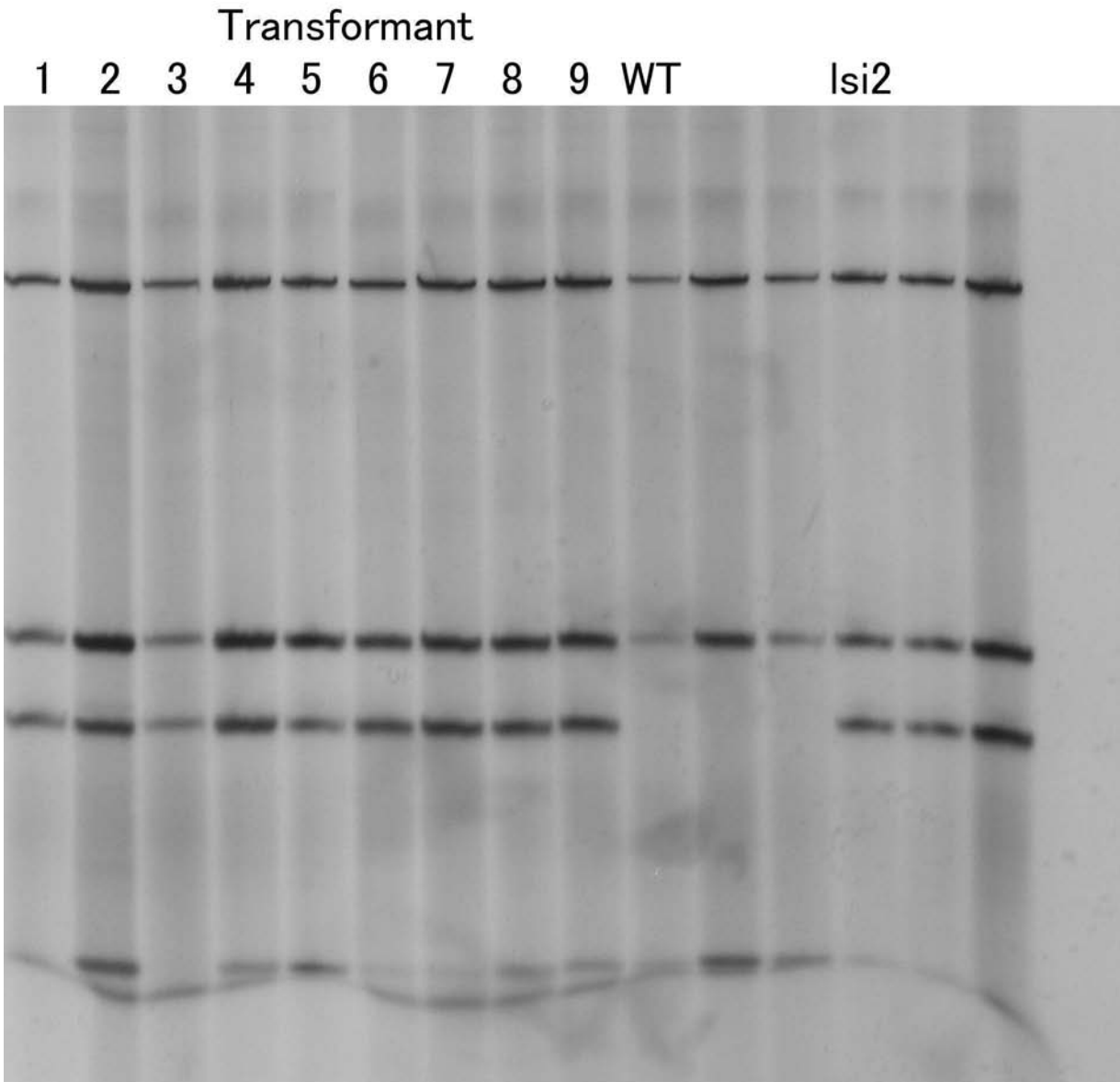
【 図 3 b 】



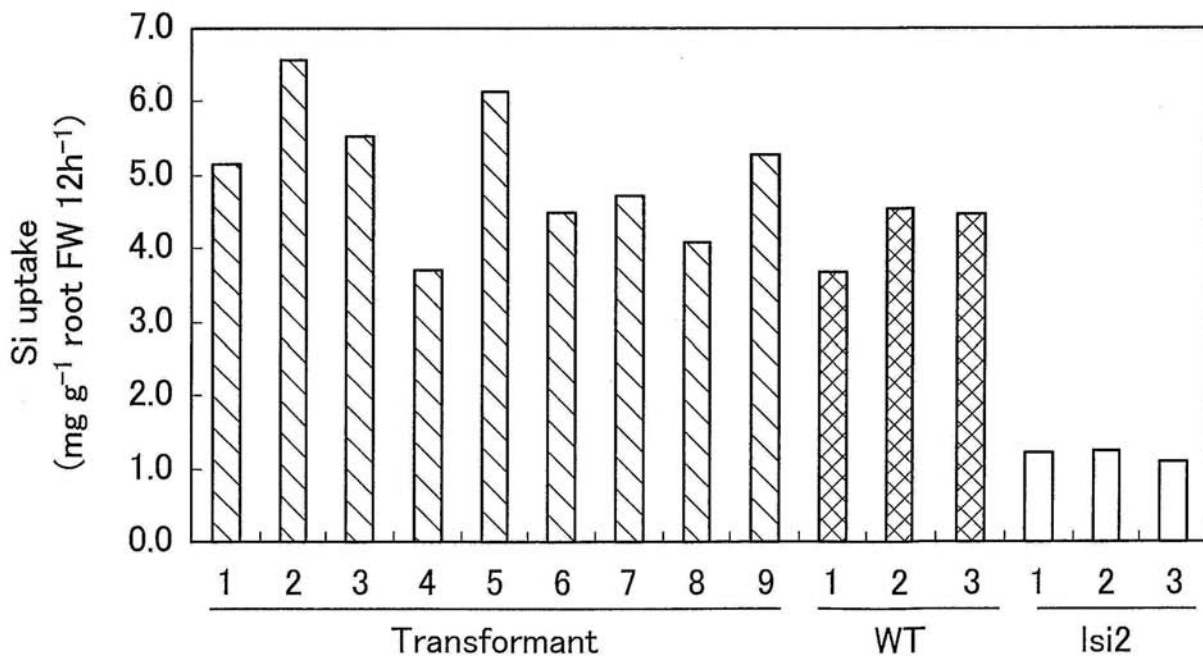
【 図 4 】



【 図 5 】



【図6】



## 【配列表】

2007020898000001.app

## 【手続補正書】

【提出日】平成19年12月20日(2007.12.20)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

下記の(a)~(d)のいずれかのポリヌクレオチドを、発現可能に導入することを特徴とするケイ素吸収が抑制された植物の生産方法。

(a) 配列番号2に示されるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド；

(b) 配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1個もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、ケイ素吸収を抑制するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(c) 配列番号1に示される塩基配列からなるポリヌクレオチド；

(d) 以下の(i)もしくは(ii)のいずれかとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド；

(i) 配列番号1に示される塩基配列からなるポリヌクレオチド；もしくは

(ii) 配列番号1に示される塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチド

## 【請求項2】

下記の(a)~(d)のいずれかのポリヌクレオチドを、発現可能に導入することを特徴とするケイ素吸収が促進された植物の生産方法。

(a) 配列番号4に示されるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド；

(b) 配列番号4に示されるアミノ酸配列において、1個もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、ケイ素吸収を促進するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

- (c) 配列番号 3 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチド；
- (d) 以下の (iii) もしくは (iv) のいずれかとストリンジントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド；
- (iii) 配列番号 3 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチド；もしくは、
- (iv) 配列番号 3 に示される塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチド

【請求項 3】

下記の (a) ~ (d) のいずれかのポリヌクレオチドの発現を抑制することを特徴とするケイ素吸収が抑制された植物の生産方法。

- (a) 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド；
- (b) 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列において、1 個もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、ケイ素吸収を促進するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；
- (c) 配列番号 3 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチド；
- (d) 以下の (iii) もしくは (iv) のいずれかとストリンジントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド；
- (iii) 配列番号 3 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチド；もしくは、
- (iv) 配列番号 3 に示される塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチド

【請求項 4】

下記の (a) または (b) のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと、(c) または (d) のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとを発現可能に導入することを特徴とするケイ素吸収が促進された植物の生産方法。

- (a) 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列；
- (b) 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列において、1 個もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、ケイ素吸収を促進するポリペプチド；
- (c) 配列番号 8 に示されるアミノ酸配列；
- (d) 配列番号 8 に示されるアミノ酸配列において、1 個もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、ケイ素吸収を促進するポリペプチド。

【請求項 5】

下記の (a) ~ (d) のいずれかのポリヌクレオチドの有無に基づいて、ケイ素吸収活性が弱い植物を判定することを特徴とするケイ素吸収が抑制された植物の選抜方法。

- (a) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド；
- (b) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列において、1 個もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、ケイ素吸収を抑制するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；
- (c) 配列番号 1 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチド；
- (d) 以下の (i) もしくは (ii) のいずれかとストリンジントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド；
- (i) 配列番号 1 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチド；もしくは
- (ii) 配列番号 1 に示される塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチド

【請求項 6】

下記の (a) ~ (d) のいずれかのポリヌクレオチドとハイブリダイズするポリヌクレオチドの有無に基づいて、ケイ素吸収活性が弱い植物を判定することを特徴とするケイ素吸収が抑制された植物の選抜方法。

- (a) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド；
- (b) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列において、1 個もしくは数個のアミノ酸が置

換、欠失、挿入、もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、ケイ素吸収を抑制するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(c) 配列番号 1 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチド；

(d) 以下の (i) もしくは (ii) のいずれかとストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド；

(i) 配列番号 1 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチド；もしくは

(ii) 配列番号 1 に示される塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチド

【請求項 7】

下記の (a) ~ (d) のいずれかのポリヌクレオチドの有無に基づいて、ケイ素吸収活性が強い植物を判定することを特徴とするケイ素吸収が促進された植物の選抜方法。

(a) 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド；

(b) 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列において、1 個もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、ケイ素吸収を促進するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(c) 配列番号 3 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチド；

(d) 以下の (iii) もしくは (iv) のいずれかとストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド；

(iii) 配列番号 3 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチド；もしくは、

(iv) 配列番号 3 に示される塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチド

【請求項 8】

下記の (a) ~ (d) のいずれかのポリヌクレオチドとハイブリダイズするポリヌクレオチドの有無に基づいて、ケイ素吸収活性が強い植物を判定することを特徴とするケイ素吸収が促進された植物の選抜方法。

(a) 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド；

(b) 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列において、1 個もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、ケイ素吸収を促進するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(c) 配列番号 3 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチド；

(d) 以下の (iii) もしくは (iv) のいずれかとストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド；

(iii) 配列番号 3 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチド；もしくは、

(iv) 配列番号 3 に示される塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチド

【請求項 9】

下記の (a) または (b) のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、および、下記の (c) または (d) のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの有無に基づいて、ケイ素吸収活性が強い植物を判定することを特徴とするケイ素吸収が促進された植物の選抜方法。

(a) 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列；

(b) 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列において、1 個もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、ケイ素吸収を促進するポリペプチド；

(c) 配列番号 8 に示されるアミノ酸配列；

(d) 配列番号 8 に示されるアミノ酸配列において、1 個もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、ケイ素吸収を促進するポリペプチド。

【請求項 10】

下記の (a) または (b) のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとハイブリダ

イズするポリヌクレオチド、および、下記の(c)または(d)のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとハイブリダイズするポリヌクレオチドの有無に基づいて、ケイ素吸収活性が強い植物を判定することを特徴とするケイ素吸収が促進された植物の選抜方法。

(a) 配列番号4に示されるアミノ酸配列；

(b) 配列番号4に示されるアミノ酸配列において、1個もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、ケイ素吸収を促進するポリペプチド；

(c) 配列番号8に示されるアミノ酸配列；

(b) 配列番号8に示されるアミノ酸配列において、1個もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、ケイ素吸収を促進するポリペプチド。



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2006/315959
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> C12N15/09(2006.01)i, C07K14/415(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, A01H5/00(2006.01)n  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N15/09, C07K14/415, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, A01H5/00  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2006 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2006 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2006  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/Geneseq, JMEDPlus (JDream2), JST7580 (JDream2), JSTPlus (JDream2), BIOSIS/WPIDS/MEDLINE/CA (STN)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	YUKO TAKEOKA et al., "Shinki Tei-Silicic Acid Ganryo Ine Totsuzen Hen'itai (LSi2) no Tanri to Kaiseki", Japanese Society of Soil Science and Plant Nutrition Koen Yoshishu, 2004, Vol.50, page 92, 9-84	1-6,9-11/7,8
X/Y	TAMAI K et al, Characterization of a novel rice mutant defective in Si uptake., The Japanese Society of Plant Physiologists Nenkai Oyobi Symposium Koen Yoshishu, Mar.2005, Vol.46 <sup>th</sup> , page 160, 234	1-6,9-11/7,8
X	KIKUCHI S et al, Collection, mapping, and annotation of over 28,000 cDNA clones from japonica rice., Science, 2003, Vol. 301, No. 5631, p.376-379, Accession no. AK069842, AK101092	7,8,11
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 01 November, 2006 (01.11.06)		Date of mailing of the international search report 14 November, 2006 (14.11.06)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/315959

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MA J F et al, Characterization of the silicon uptake system and molecular mapping of the silicon transporter gene in rice., Plant Physiology, 2004, Vol. 136, No. 2, p. 3284-3289	7, 8
Y	MITANI N et al, Identification of the silicon form in xylem sap of rice ( <i>Oryza sativa</i> L.), Plant and Cell Physiology, Feb. 2005, Vol. 46, No. 2, p. 279-283	7, 8
P, X	Kazunori TAMAI et al., "Shinki Ine Silicic Acid Kyushu Kanren Idenshi <i>Lsi2</i> no Tanri to Kaiseki", Japanese Society of Soil Science and Plant Nutrition Koen Yoshishu, Sep. 2005., Vol. 51, page 66, 9-25	1-6, 9-11
P, X	Naoki YAMACHI et al., "Ine Silicic Acid Kyushu Kanren Idenshi <i>Lsi2</i> no Kino Kaiseki", The Japanese Society of Plant Physiologists Nenkai Oyobi Symposium Koen Yoshishu, Mar. 2006, Vol. 47 <sup>th</sup> , pages 139, 149	1-6, 9-11
P, X	Kazunori TAMAI et al., "Ine Shinki Silicic Acid Kyushu Kanren Idenshi <i>Lsi2</i> no Cloning", The Japanese Society of Plant Physiologists Nenkai Oyobi Symposium Koen Yoshishu, Mar. 2006, Vol. 47 <sup>th</sup> , pages 139, 148	1-6, 9-11
P, Y	MA J F et al, A silicon transporter in rice, Nature, Mar. 2006, Vol. 440, No. 7084, p. 688-691	7, 8
P, Y	JP 2006-187209 A (Kagawa University), 20 July, 2006 (20.07.06), & WO 2006/077736 A1	7, 8
A	MA J F et al, A rice mutant defective in Si uptake., Plant Physiology, 2002, Vol. 130, No. 4, p. 2111-2117	1-11
A	MA J F et al, Role of root hairs and lateral roots in silicon uptake by rice., Plant Physiology, 2001, Vol. 127, No. 4, p. 1773-1780	1-11
A	US 2004/0034888 A1 (LA ROSA THOMAS), 19 February, 2004 (19.02.04), & US 2004/031072 A1 & US 2004/214272 A1 & US 2004/216190 A1 & US 2006/236419 A1	1-6, 9-11

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 6 / 3 1 5 9 5 9									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C07K14/415(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, A01H5/00(2006.01)n											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09, C07K14/415, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, A01H5/00											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2006年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2006年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2006年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2006年	日本国実用新案登録公報	1996-2006年	日本国登録実用新案公報	1994-2006年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2006年										
日本国実用新案登録公報	1996-2006年										
日本国登録実用新案公報	1994-2006年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/Geneseq, JMEDPlus(JDream2), JST7580(JDream2), JSTPlus(JDream2), BIOSIS/WPIDS/MEDLINE/CA(STN)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号									
X/Y	武岡祐子他, 新規低ケイ酸含量イネ突然変異体(LSi2)の単離と解析, 日本土壤肥科学会講演要旨集, 2004, Vol. 50, p. 92, 9-84	1-6, 9-11/7, 8									
X/Y	TAMAI K et al, Characterization of a novel rice mutant defective in Si uptake., 日本植物生理学会年会およびシンポジウム講演要旨集, Mar. 2005, Vol. 46 <sup>th</sup> , p. 160, 234	1-6, 9-11/7, 8									
<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。									
* 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		の日に後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献									
国際調査を完了した日 01.11.2006	国際調査報告の発送日 14.11.2006										
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) 六笠 紀子 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B	9735								

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2006/315959

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 請求の範囲の番号
X	KIKUCHI S et al, Collection, mapping, and annotation of over 28,000 cDNA clones from <i>japonica</i> rice., Science, 2003, Vol. 301, No. 5631, p. 376-379, Accession no. AK069842, AK101092	7, 8, 11
Y	MA J F et al, Characterization of the silicon uptake system and molecular mapping of the silicon transporter gene in rice., Plant Physiology, 2004, Vol. 136, No. 2, p. 3284-3289	7, 8
Y	MITANI N et al, Identification of the silicon form in xylem sap of rice ( <i>Oryza sativa</i> L.), Plant and Cell Physiology, Feb. 2005, Vol. 46, No. 2, p. 279-283	7, 8
P, X	玉井一規他, 新規イネケイ酸吸収関連遺伝子 <i>Lsi2</i> の単離と解析, 日本土壤肥料学会講演要旨集, Sep. 2005., Vol. 51, p. 66, 9-25	1-6, 9-11
P, X	山地直樹他, イネケイ酸吸収関連遺伝子 <i>Lsi2</i> の機能解析, 日本植物生理学会年会およびシンポジウム講演要旨集, Mar. 2006, Vol. 47 <sup>th</sup> , p. 139, 149	1-6, 9-11
P, X	玉井一規他, イネ新規ケイ酸吸収関連遺伝子 <i>Lsi2</i> のクローニング, 日本植物生理学会年会およびシンポジウム講演要旨集, Mar. 2006, Vol. 47 <sup>th</sup> , p. 139, 148	1-6, 9-11
P, Y	MA J F et al, A silicon transporter in rice, Nature, Mar. 2006, Vol. 440, No. 7084, p. 688-691	7, 8
P, Y	JP 2006-187209 A (国立大学法人 香川大学) 2006.07.20 & WO 2006/077736 A1	7, 8
A	MA J F et al, A rice mutant defective in Si uptake., Plant Physiology, 2002, Vol. 130, No. 4, p. 2111-2117	1-11
A	MA J F et al, Role of root hairs and lateral roots in silicon uptake by rice., Plant Physiology, 2001, Vol. 127, No. 4, p. 1773-1780	1-11

様式 PCT/ISA/210 (第2ページの続き) (2005年4月)

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 6 / 3 1 5 9 5 9

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 請求の範囲の番号
A	US 2004/0034888 A1 (LA ROSA THOMAS) 2004.02.19 & US 2004/031072 A1 & US 2004/214272 A1 & US 2004/216190 A1 & US 2006/236419 A1	1-6, 9-11

様式PCT/ISA/210 (第2ページの続き) (2005年4月)

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA17 QA18 QA20 QQ04 QQ43 QQ79 QR08 QR32 QR42  
QR55 QR62 QS25 QS34 QX02

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。