

(19)日本国特許庁 ( J P )

## (12) 公開特許公報 ( A )

(11)特許出願公開番号

# 特開2000 - 4884

( P 2 0 0 0 - 4 8 8 4 A )

(43)公開日 平成12年 1月11日 (2000.1.11)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード <sup>*</sup>	(参考)
C12N 15/09	ZNA	C12N 15/00	ZNA	A 2B030
A01H 5/00		A01H 5/00		A 4B024
C12N 5/10		C12N 5/00		C 4B065
//(C12N 15/09	ZNA			
C12R 1:91 )				

審査請求 有 請求項の数 8 F D (全16頁)

(21)出願番号 特願平10 - 189773

(22)出願日 平成10年 6月19日 (1998.6.19)

(71)出願人 591127076

農林水産省農業生物資源研究所長  
茨城県つくば市観音台 2丁目 1 - 2

(71)出願人 593027587

社団法人農林水産先端技術産業振興センタ  
ー  
東京都港区赤坂 1丁目 9番13号

(72)発明者 芦苺 基行

茨城県つくば市松代 4 - 8 県営手代木ア  
パート426 - 102

(74)代理人 100102978

弁理士 清水 初志 (外 1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】植物を矮性化させる方法

(57)【要約】

【課題】 本発明は、植物の矮性に関与する遺伝子の発現を抑制することによる植物を矮性化させる方法、および植物の矮性化に利用するための分子を提供することを課題とする。

【解決手段】 マップベースクローニングの手法を用いることにより、イネに矮性の異常をもたらすd1変異の原因となる単一の遺伝子を広大な染色体領域において同定し、単離した。単離したd1遺伝子の塩基配列を決定し、これと構造的に関連した遺伝子のデータベース検索を行った結果、d1遺伝子は、植物のGタンパク質 サブユニットとしてこれまで知られてきたイネのRGA1遺伝子として特徴づけられていた遺伝子と同一遺伝子であった。RGA1遺伝子が植物の矮性に関与するという報告はこれまでになされておらず、本発明者らは、d1(RGA1)遺伝子を利用することにより、植物を矮性化させることが可能であることを見出した。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 植物を矮性化するために用いる、下記 ( a ) から ( c ) のいずれかに記載の DNA の転写産物と相補的なアンチセンス RNA をコードする DNA。

( a ) 配列番号： 1 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする DNA。

( b ) 配列番号： 2 に記載の塩基配列からなる DNA。

( c ) 配列番号： 2 に記載の塩基配列からなる DNA とハイブリダイズする DNA であって、配列番号： 1 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードする DNA。

【請求項 2】 植物を矮性化するために用いる、請求項 1 の ( a ) から ( c ) のいずれかに記載の DNA の転写産物を特異的に開裂するリボザイム活性を有する RNA をコードする DNA。

【請求項 3】 植物細胞における発現時に、共抑制効果により、請求項 1 の ( a ) から ( c ) のいずれかに記載の DNA の発現を抑制させる RNA をコードする DNA。

【請求項 4】 植物細胞内において請求項 1 の ( a ) から ( c ) のいずれかに記載の DNA の発現を抑制することを特徴とする、植物を矮性化する方法。

【請求項 5】 請求項 1 から 3 のいずれかに記載の DNA を植物細胞内で発現させることにより、請求項 1 の ( a ) から ( c ) のいずれかに記載の DNA の発現を抑制する、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】 請求項 1 から 3 のいずれかに記載の DNA を発現可能に保持するトランスジェニック植物細胞。

【請求項 7】 請求項 6 に記載の細胞を含む矮性化したトランスジェニック植物体。

【請求項 8】 請求項 7 に記載の植物体の繁殖媒体。

## 【発明の詳細な説明】

## 【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】本発明は、植物を矮性化させる方法および該方法に用いられる分子に関する。

## 【 0 0 0 2 】

【従来の技術】植物体を小型化することは、農業や園芸において様々な意義を有する。例えば、草丈またはかん長を小型化することで、新たな美的価値を有する観賞用植物を作出することが可能であり、また、野菜や果実を小型化することで一口サイズなどの新たな商品価値を有する作物を作ることでもできる。また、このような産業上の利用以外でも、例えば、実験用植物の小型化は、その取り扱いやすさのみならず、植物の栽培空間の減少による実験空間の有効利用の観点から重要である。

【 0 0 0 3 】植物の小型化において、特に植物の草丈あるいはかん長が野生型（正常型）より短くなる特性は矮性と呼ばれる。この特性を示すイネ品種や系統は、一線や化学物質による突然変異誘起処理において数多く見出し出されており、それらの遺伝解析も古くから進められてきた。これまでに 60 種類以上の遺伝子がこの矮性に関与

することが知られている（Rice Genetic Newsletter Vol.12 : 30-32 (1995)）。しかしながら、なぜ矮性形質を表現するのかについての知見は少なく、少数の矮性変異体が植物成長ホルモンであるジベレリンの生合成に関与する遺伝子の変異によって生じていることがあきらかになっているにすぎない。

【 0 0 0 4 】イネ矮性変異体のなかでも大黒型矮性は、特に第 2 節間の伸長を抑制し、その結果として草丈を正常型の半分以下にするばかりでなく、粒が小円型になる特徴があることで知られている（明峰正夫 日本学術会報告 1 巻：108-314 (1925)、中山 包 信州大文理学部紀要 4 巻：1-31 (1954)、高橋萬右衛門・武田和義北大農邦文紀要 7 巻：32-43 (1969)）。また、この大黒型矮性は遺伝解析の結果、イネ第 5 染色体上の単一の劣性遺伝子 d1 によって支配されていることが明らかとなっている（Nagao and Takahashi J. Fac. Agr., Hokkaido Univ. 53 : 72-130 (1963)、Iwata and Omura Jpn.J.Gen et. 51 : 135-137 (1976)）。d1 遺伝子の変異体においては、植物ホルモンの一種であるジベレリンの含量は高く正常型とほぼ同じであり、外生ジベレリンの処理によっては草丈は回復しない（Suge, H. and Y. Murakami Plant and Cell Physiol., 9, 411-414 (1968)）。この特徴から、d1 遺伝子は植物体内でのジベレリン生合成に関与するのではなく、ジベレリンの受容体あるいはそれ以降のシグナル転移に関与する遺伝子座であることが推定されている（Mitsunaga, S., T. Tashiro, and J. Yamaguchi Theor. Appl. Genet. 87 : 705-712 (1994)）。

【 0 0 0 5 】このため、大黒型矮性遺伝子 d1 を単離し、その遺伝子産物の機能を明らかにすることは、植物における形態形成過程を明らかにする上で重要となるばかりでなく、その知見を利用して植物の大きさの人工的な制御をおこなう上で極めて重要であると考えられる。

## 【 0 0 0 6 】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、植物の矮性に関与する d1 遺伝子を単離することを課題とする。さらに本発明は、d1 遺伝子の発現を制御することにより植物を矮性化する方法および d1 遺伝子の発現を制御するための分子を提供することを課題とする。

## 【 0 0 0 7 】

【課題を解決するための手段】イネ矮性遺伝子 d1 は、イネの矮性に関与するタンパク質をコードする遺伝子として、これまでイネ第 5 染色体という広大な領域にいずれかの場所に存在するものとして知られていた。本発明者らは、d1 遺伝子を広大な染色体の領域から単離するために、マップベースクローニングの手法を利用して鋭意研究を行い d1 遺伝子その存在領域を解明し、遂に所期の遺伝子を単離することに成功した。具体的には、まず、分子マーカーを用いた連鎖解析を行い、d1 遺伝子が存在する染色体上の領域を特定の分子マーカーで挟まれる領域に絞り込んだ。次いで、絞り込んだ遺伝子周辺の領域に

つき、YACクローンの整列化による物理的地図の作成を行い、これらクローンに対してESTマッピングを行った結果、1つのcDNAクローン「ST5933」をd1遺伝子の候補として同定することに成功した。

【0008】同定されたクローンST5933の塩基配列(362塩基対)はイネゲノム解析研究において解析されており、遺伝子配列をデータベースに対して類似性検索を行った結果、同一の塩基配列を有する遺伝子をデータベース上に見出した。この遺伝子は、植物のGタンパク質のサブユニットとして特徴づけられていた。しかしながら、これまで該遺伝子と植物の矮性との関わりは全く知られていなかった。

【0009】Gタンパク質はヒトを含めた生物においてホルモン等の受容体あるいは受容体からのシグナル伝達に関与する因子として機能することが知られており、イネ矮性遺伝子d1は植物ホルモンであるジベレリンの受容体あるいはそれ以降のシグナル転移に関与する可能性が示唆されている。従って、この種の機能を有するGタンパク質遺伝子は、イネのみならず幅広く植物界に存在することが予想され、本発明者らは、d1遺伝子若しくは他の植物の相同遺伝子の発現を抑制することにより、幅広く植物の矮性化を行うことが可能であることを見出した。

【0010】即ち、本発明は、植物の矮性に関与するd1遺伝子若しくはその相同遺伝子の発現を抑制することによる植物を矮性化する方法、およびこれら遺伝子の発現を抑制するために用いられる分子に関し、より具体的には、(1) 植物を矮性化するために用いる、下記(a)から(c)のいずれかに記載のDNAの転写産物と相補的なアンチセンスRNAをコードするDNA、(a) 配列番号：1に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA、(b) 配列番号：2に記載の塩基配列からなるDNA、(c) 配列番号：2に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAであって、配列番号：1に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードするDNA。

(2) 植物を矮性化するために用いる、(1)の(a)から(c)のいずれかに記載のDNAの転写産物を特異的に開裂するリボザイム活性を有するRNAをコードするDNA、(3) 植物細胞における発現時に、共抑制効果により、(1)の(a)から(c)のいずれかに記載のDNAの発現を抑制させるRNAをコードするDNA、

(4) 植物細胞内において(1)の(a)から(c)のいずれかに記載のDNAの発現を抑制することを特徴とする、植物を矮性化する方法、(5) (1)から(3)のいずれかに記載のDNAを植物細胞内で発現させることにより、請求項1の(a)から(c)のいずれかに記載のDNAの発現を抑制する、(6) (1)から(3)のいずれかに記載のDNAを発

現可能に保持するトランスジェニック植物細胞、(7) (6)に記載の細胞を含む矮性化したトランスジェニック植物体、(8) (7)に記載の植物体の繁殖媒体、に関する。

【0011】

【発明の実施の形態】本発明は、d1遺伝子若しくはその相同遺伝子の発現を抑制することによる植物を矮性化する方法、およびこれら遺伝子の発現を抑制するために用いられる分子に関する。本発明者らによりイネの矮性との関係が明らかにされたd1遺伝子のcDNAの塩基配列を配列番号：2に、ゲノムDNAの塩基配列を配列番号：3に、これら遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列を配列番号：1に示す(これら配列は、Seoら Plant.Mol.Biol.27:1119-1131,1995、Ishikawara Plant.Cell.Phyiol.36(2):353-359,1995を参照した)。

【0012】d1遺伝子は、これまでイネに矮性の表現型を付与する遺伝子として、イネ第5染色体という広大な領域にいずれかの場所に存在するものとして知られていた。本発明者らは、マップベースクローニングの手法を利用することにより、イネ第5染色体におけるd1遺伝子の存在領域の絞り込みを行い、遂に単一の遺伝子として同定することに成功した。この遺伝子は、細胞内へのシグナル伝達に関与する三量体Gタンパク質サブユニットをコードする遺伝子として、これまでに単離され特徴づけられていたが(Seoら Plant.Mol.Biol.27:1119-1131,1995、Ishikawara Plant.Cell.Phyiol.36(2):353-359,1995)、本発明者らにより初めて植物の矮性との関係が証明された。ノーザンハイブリダイゼーション解析の結果、d1遺伝子は、正常型においては発現していたが、d1突然変異系統においてはその発現は検出されなかった(実施例5)。これら事実から、本発明者らは、d1遺伝子の発現を抑制することにより、植物において矮性化の表現型を誘導することが可能であることを見出した。

【0013】本発明において、発現を抑制し植物を矮性化させるための標的遺伝子としては、イネd1遺伝子に限定されない。機能的に同等なタンパク質をコードする限り、イネd1遺伝子以外の他の植物由来の遺伝子も標的遺伝子として利用することが可能である。ここで「機能的に同等なタンパク質」とは、d1遺伝子がコードするタンパク質以外のタンパク質であって、その発現の抑制により、植物の矮性化が誘導されるGタンパク質を指す。イネ矮性遺伝子d1は三量体Gタンパク質サブユニットをコードし、植物ホルモンであるジベレリンの受容体あるいはそれ以降のシグナル転移に関与する可能性が示唆され、その相同遺伝子がイネのみならず幅広く植物界に存在することが容易に予想される。本発明においては、このような相同遺伝子を利用してイネ以外の植物を矮性化することも可能である。本発明において矮性化の標的とするイネ以外の植物としては、これらに制限されないが、例えば、コムギ、オオムギ、トウモロコシ、トマ

ト、エンドウ、ダイズ等が挙げられる。

【0014】イネd1遺伝子がコードするタンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードする遺伝子を単離するための当業者によく知られた方法としては、ハイブリダイゼーション技術 (Southern, E.M.: Journal of Molecular Biology, Vol. 98, 503, 1975) やポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 技術 (Saiki, R. K. et al. Science, vol. 230, 1350-1354, 1985, Saiki, R. K. et al. Science, vol. 239, 487-491, 1988) が挙げられる。即ち、当業者にとっては、イネd1遺伝子の塩基配列 (配列番号: 2) もしくはその一部をプローブとして、またd1遺伝子 (配列番号: 2) に特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドをプライマーとして、イネ以外の植物からd1遺伝子の相同遺伝子を単離することは通常行いうることである。

【0015】本発明における植物の矮性は、植物の内在性のd1遺伝子若しくはその相同遺伝子の発現を抑制することにより行う。本発明における「遺伝子の発現の抑制」には、遺伝子の転写の抑制、タンパク質への翻訳の抑制が含まれる。また、遺伝子発現の完全な停止のみならず発現の減少も含まれる。

【0016】植物における特定の内在性遺伝子の発現を抑制する方法としては、アンチセンス技術を利用する方法が当業者に最もよく利用されている。植物細胞におけるアンチセンス効果は、エッカーらが一時的遺伝子発現法を用いて、電気穿孔法で導入したアンチセンスRNAが植物においてアンチセンス効果を発揮することで初めて実証した (J.R.EckerおよびR.W.Davis, Proc.Natl.Acad.USA. 83:5372, 1986)。その後、タバコやペチュニアにおいても、アンチセンスRNAの発現によって標的遺伝子の発現を低下させる例が報告されており (A.R.van der Kroonら Nature 333:866, 1988)、現在では植物における遺伝子発現を抑制させる手段として確立している。アンチセンス核酸が標的遺伝子の発現を抑制する作用としては、以下のような複数の要因が存在する。すなわち、三重鎖形成による転写開始阻害、RNAポリメラーゼによって局部的に開状ループ構造がつけられた部位とのハイブリッド形成による転写抑制、合成の進みつつあるRNAとのハイブリッド形成による転写阻害、イントロンとエキソンとの接合点でのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、スプライソソーム形成部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、mRNAとのハイブリッド形成による核から細胞質への移行抑制、キャッピング部位やポリ(A)付加部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、翻訳開始因子結合部位とのハイブリッド形成による翻訳開始抑制、開始コドン近傍のリボソーム結合部位とのハイブリッド形成による翻訳抑制、mRNAの翻訳領域やポリソーム結合部位とのハイブリッド形成によるペプチド鎖の伸長阻止、および核酸とタンパク質との相互作用部位とのハイブリッド形成による遺伝子発現抑

制などである。これらは、転写、スプライシング、または翻訳の過程を阻害して、標的遺伝子の発現を抑制する (平島および井上「新化学実験講座2 核酸IV 遺伝子の複製と発現」, 日本生化学会編, 東京化学同人, pp.319-347, 1993)。本発明で用いられるアンチセンス配列は、上記のいずれの作用で標的遺伝子の発現を抑制してもよい。一つの態様としては、遺伝子のmRNAの5'端近傍の非翻訳領域に相補的なアンチセンス配列を設計すれば、遺伝子の翻訳阻害に効果的であろう。しかし、コード領域もしくは3'側の非翻訳領域に相補的な配列も使用し得る。このように、遺伝子の翻訳領域だけでなく非翻訳領域の配列のアンチセンス配列を含むDNAも、本発明で利用されるアンチセンスDNAに含まれる。使用されるアンチセンスDNAは、適当なプロモーターの下流に連結され、好ましくは3'側に転写終結シグナルを含む配列が連結される。このようにして調製されたDNAは、公知の方法で、所望の植物へ形質転換できる。アンチセンスDNAの配列は、形質転換する植物が持つ内在性d1遺伝子 (若しくはその相同遺伝子) またはその一部と相補的な配列であることが好ましいが、遺伝子の発現を有効に阻害できる限り、完全に相補的でなくてもよい。転写されたRNAは、標的とする遺伝子の転写産物に対して好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の相補性を有する。アンチセンス配列を用いて、効果的に標的遺伝子の発現を阻害するには、アンチセンスDNAの長さは、少なくとも15塩基以上であり、好ましくは100塩基以上であり、さらに好ましくは500塩基以上である。通常、用いられるアンチセンスDNAの長さは5kbよりも短く、好ましくは2.5kbよりも短い。

【0017】内在性遺伝子の発現の抑制は、また、リボザイムをコードするDNAを利用して行うことも可能である。リボザイムとは触媒活性を有するRNA分子のことをいう。リボザイムには種々の活性を有するものがあるが、中でもRNAを切断する酵素としてのリボザイムの研究により、RNAの部位特異的な切断を目的とするリボザイムの設計が可能となった。リボザイムには、グループIイントロン型や、RNasePに含まれるM1RNAのように400ヌクレオチド以上の大きさのものもあるが、ハンマーヘッド型やヘアピン型と呼ばれる40ヌクレオチド程度の活性ドメインを有するものもある (小泉誠および大塚栄子, 蛋白質核酸酵素, 35:2191, 1990)。

【0018】例えば、ハンマーヘッド型リボザイムの自己切断ドメインは、G13U14C15のC15の3'側を切断するが、活性にはU14が9位のAと塩基対を形成することが重要とされ、15位の塩基はCの他にAまたはUでも切断されることが示されている (M.Koizumiら, FEBS Lett. 228:225, 1988)。リボザイムの基質結合部を標的部位近傍のRNA配列と相補的になるように設計すれば、標的RNA中のUC、UUまたはUAという配列を認識する制限酵素的なRNA切断リボザイムを作出することが可能である (M.Koizumi

ら, FEBS Lett. 239:285, 1988, 小泉誠および大塚栄子, 蛋白質核酸酵素, 35:2191, 1990, M.Koizumiら, Nucleic Acids Res. 17:7059, 1989)。例えば, d1遺伝子のコード領域(配列番号: 2)中には標的となりうる部位が100カ所以上存在する。

【0019】また、ヘアピン型リボザイムも、本発明の目的のために有用である。ヘアピン型リボザイムは、例えばタバコリングスポットウイルスのサテライトRNAのマイナス鎖に見出される(J.M.Buzayan Nature 323:349, 1986)。このリボザイムも、標的的特異的なRNA切断を起こすように設計できることが示されている(Y.KikuchiおよびN.Sasaki Nucleic Acids Res. 19:6751, 1992, 菊池洋, 化学と生物 30:112, 1992)。

【0020】標的を切断できるように設計されたリボザイムは、植物細胞中で転写されるようにカリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーターなどのプロモーターおよび転写終結配列に連結される。しかし、その際、転写されたRNAの5'末端や3'末端に余分な配列が付加されていると、リボザイムの活性が失われてしまうことがある。このようなとき、転写されたリボザイムを含むRNAからリボザイム部分だけを正確に切り出すために、リボザイム部分の5'側や3'側に、トリミングを行うためのシスに働く別のトリミングリボザイムを配置させることも可能である(K.Tairaら, Protein Eng. 3:733, 1990, A.M.DzianottおよびJ.J.Bujarski Proc.Natl.Acad.Sci.US A. 86:4823, 1989, C.A.GrosshansおよびR.T.Cech Nucleic Acids Res. 19:3875, 1991, K.Tairaら Nucleic Acids Res. 19:5125, 1991)。また、このような構成単位をタンデムに並べ、標的遺伝子内の複数の部位を切断できるようにして、より効果を高めることもできる(N.Yuyamaら Biochem.Biophys.Res.Commun.186:1271, 1992)。このようなリボザイムを用いて本発明で標的となる遺伝子の転写産物を特異的に切断し、該遺伝子の発現を抑制することができる。

【0021】内在性遺伝子の発現の抑制は、さらに、標的遺伝子配列と同一もしくは類似した配列を有するDNAの形質転換によってもたらされる共抑制によっても達成される。「共抑制」とは、植物に標的内在性遺伝子と同一若しくは類似した配列を有する遺伝子を形質転換により導入すると、導入する外来遺伝子および標的内在性遺伝子の両方の発現が抑制される現象のことをいう。共抑制の機構の詳細は明らかではないが、植物においてはしばしば観察される(Curr.Biol.7:R793, 1997, Curr.Biol.6:810, 1996)。例えば、d1遺伝子が共抑制された植物体を得るためには、d1遺伝子若しくはこれと類似した配列を有するDNAを発現できるように作製したベクターDNAを目的の植物へ形質転換し、得られた植物体からd1変異体の形質を有する植物、即ち矮性となった植物を選択すればよい。共抑制に用いる遺伝子は、標的遺伝子と完全に同一である必要はないが、好ましくは90%以上の配列

の同一性を有する。

【0022】さらに、本発明における内在性遺伝子の発現の抑制は、標的遺伝子のドミナントネガティブの形質を有する遺伝子を植物へ形質転換することによっても達成することができる。ドミナントネガティブの形質を有する遺伝子とは、該遺伝子を発現させることによって、植物体が本来持つ内在性の野生型遺伝子の活性を消失もしくは低下させる機能を有する遺伝子のことをいう。本発明で利用されるd1遺伝子は、ヘテロ3量体Gタンパク質のサブユニットとして知られる。一般的に、サブユニット中のGTP/GDP結合活性やGTPアーゼ活性に重要な領域に変異を入れ、ヘテロ3量体の形成やレセプターとの結合に重要な領域は野生型のままにした変異体タンパク質を発現させれば、該タンパク質は他のサブユニットやレセプターと複合体を形成するが、GTPによって活性化されないため、ドミナントネガティブの形質を持つと考えられる。例えば、Gタンパク質のサブユニットによく保存されているアミノ酸配列(-Asp-Val-Gly-Gly-Gln-)は、GTPの1位のリン酸基と相互作用する部位と考えられている。例えば、このアミノ酸配列中の一つ目のGlyをThrへ置換したあるGタンパク質サブユニットの変異体タンパク質は、COS-1細胞中で発現させるとドミナントネガティブの形質を示すことが示されている(j.Biol.Chem. 266:4673, 1991)。こうした変異を入れたドミナントネガティブタンパク質を発現するように形質転換された植物は、標的遺伝子の機能が阻害されると考えられる。

【0023】本発明で利用される、遺伝子の発現を抑制する機能を有する上記のようなDNAを利用して矮性化した形質転換植物体を作製する場合には、該DNAを適当なベクターに挿入して、これを植物細胞に導入し、これにより得られた形質転換植物細胞を再生させる。用いられるベクターとしては、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制限はない。例えば、植物細胞内での恒常的な遺伝子発現を行うためのプロモーター(例えば、カリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーター)を有するベクターを用いることが可能である。また、植物の組織特異的なプロモーターを用いれば、組織特異的な矮性化、例えば、葉や花、実など植物の特定の部分を矮性化することが可能であるかもしれない。組織特異的なプロモーターとしては、種子特異的なプロモーターとしてインゲンマメのーファセオリン(Bustosら (1991) EMBO J. 10:1469-1479)やダイズのグリシニン(Lelievreら (1992) Plant Physiol. 98:387-391)、葉特異的なプロモーターとしてはエンドウのRbcS遺伝子(Lam and Chua (1990) Science 248:471-474)やコムギのCab1遺伝子(Gotornら (1993) Plant J. 3:509-518)、根特異的なプロモーターとしてはタバコのTobRB7遺伝子(Yamamotoら (1991) Plant Cell 3:371-382)やアグロバクテリウム・リゾゲネスのrolD遺伝子

(Elmayan and Tepfer (1995) Transgenic Res 4:388-396) が挙げられる。また、外的な刺激により誘導的に活性化されるプロモーターを有するベクターを用いることも可能である。ベクターを挿入する植物細胞としては、特に制限はないが、イネ以外に、例えば、トウモロコシ、トマト、ダイズ、ナタネ、ポプラ、リンゴ等が挙げられる。植物は針葉樹、広葉樹、双子葉植物、単子葉植物などいずれでもよい。なお、ここでいう「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。植物細胞へのベクターの導入は、ポリエチレングリコール法、電気穿孔法（エレクトロポレーション）、アグロバクテリウムを介する方法、パーティクルガン法など当業者に公知の種々の方法を用いることができる。形質転換植物細胞からの植物体の再生は、植物細胞の種類に応じて当業者に公知の方法で行うことが可能である (Tokirā (1995) Plant Physiol. 100:1503-1507 参照)。

【0024】作出された植物体またはその繁殖媒体（例えば、種子、塊茎、切穂など）から得た植物体は、野生型の植物体と比較して、標的遺伝子の発現が抑制され、これにより植物体が矮性化する。本発明における植物の矮性化には、植物体全体の矮性化のみならず、植物体の部分の矮性化を含む。

【0025】なお、本発明者らにより単離されたイネd1遺伝子もしくは他の植物の相同遺伝子を野生型の植物に導入して発現させることにより、植物の成長を増大させることも可能であるかもしれない。この場合、植物細胞内に導入する遺伝子としては、具体的には、①配列番号：1に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA、②配列番号：1に記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失および/もしくは付加したアミノ酸配列を有し、配列番号：1に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードするDNA、③配列番号：2に記載の塩基配列のコード領域を含むDNA、④配列番号：2に記載の塩基配列からなるDNAと相補的にハイブリダイズするDNAであって、配列番号：1に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードするDNAが含まれる。植物細胞内で発現させるために利用されるベクター、ベクターの導入される植物細胞、植物体の再生などの方法は、上記矮性化の場合と同様に行うことが可能である。

【0026】

【実施例】以下に本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

【0027】[実施例1] 矮性遺伝子d1の低精度連鎖解析

インド型品種IR24にd1遺伝子をもつ日本型標識遺伝子系

統FL2を交配したF2集団100個体を育成し、各個体毎にDNAを抽出した。d1は第5染色体に座乗することが明らかにされていたことから、d1遺伝子と第5染色体に座乗するRFLPマーカーとの連鎖解析を行い、連鎖地図を作成した。さらにより正確な座乗位置を決定するために、プールサンプリング法 (Churchillら, Proc.Natl.Acad.Sci.USA.90:16-20,1993) による連鎖解析を行なった。すなわち標識遺伝子系統FL2にIR24を反復親として戻し交雑を行って得られたBC3F2集団約2600個体を幼苗期に選抜し、644個の矮性（劣性ホモ）個体を育成した。この個体群に対してd1遺伝子近傍のマーカーを用いたRFLP解析を行い、より正確な連鎖地図を作成した。その結果、d1遺伝子はRFLPマーカーC309, S2351と組換え頻度約0.8%で連鎖していることが明らかになった (図1)。しかしながらd1近傍に存在すると推定されるDNAマーカーの大部分が利用した分離集団の親系統間で多型を示さなかったことから、解析集団を変更した。

【0028】[実施例2] 矮性遺伝子d1の高精度連鎖地図の作成

DNAマーカーの多型を確実に得るために、分離集団の親系統にSL18を選定した。この系統は水稻品種日本晴の遺伝的背景（12種類の染色体）のうち、第5染色体のみをインド型品種カサラーサ (Kasalath) の染色体に置換した系統である。SL18とFL2を交配して得られたF2種子約13000個を播種した後、幼苗期に3185個の矮性個体（劣性ホモ型）を選抜して圃場に移植した。5個体を1プールとして葉のサンプリングを行い、637個のプールからDNAを抽出し、RFLP分析に供した。その結果、第5染色体のd1座近傍に位置づけられたRFLPマーカーV147では37個のプールが、G5004では71個のプールが組換え個体を含み、d1座をV147とG5004に挟まれた領域（1.8cM）に位置づけた (図2)。組換え個体を含むプールから組換え個体を同定するために、540個体（5個体×108プール）のDNAを抽出後、RFLP分析によりd1とV147の間で、またd1とG5004の間で組換えを起こしている個体を選定した。

【0029】[実施例3] 矮性遺伝子d1を含むYACクローンの選定とそれらの整列化地図の作成

さらにd1座を含むゲノミッククローンを同定するために、V147およびG5004を用いてYACライブラリーをスクリーニングした (Umeharaら, Molecular Breeding, 1:79-89, 1995)。その結果、V147およびG5004の塩基配列を含むYACクローンをそれぞれ3および2種類選定することができた。またカセット-PCR法を用いて調製した各YACクローンの末端DNA断片を用いて、YACクローンの重複の確認と染色体歩行を行うとともに連鎖地図上へのマッピングを行った。V147で選抜されたYACクローンのうち1つのYACクローンY5483の末端DNA断片がd1座に0.03cMで密接に連鎖し、d1座とG5004との間に位置づけられることが判明した。以上の結果より、このYACクローンがd1座を含むことが明らかになった。さらにこのYACクローン

の末端DNA断片を基に再度YACクローンの選択を行なったところ、新たに3種類のYACクローン ( Y1988、Y3745およびY4488 ) を選抜した。これらのYACクローンの重なりをハイブリダイゼーション法あるいはPCR法により確認したところ、4種類のYACクローンがd1遺伝子を含むことが明らかとなった。

【 0 0 3 0 】 [実施例 4] 矮性遺伝子d1の候補遺伝子の同定

イネゲノム解析研究プログラムにおいて、ESTマッピング ( YACクローンに対するcDNAクローンの直接的な位置付け ) が進められている。これまでに蓄積された情報を基にして、前述のYACクローンの存在するcDNAクローンの有無を調査したところ、ST5933の存在が明らかとなった。このクローンをプローブに、高精度連鎖解析により特定できたd1近傍の組換え個体に対してゲノミックサザンハイブリダイゼーションによるRFLP解析を行なった。その結果、ST5933から生じる9.6kbのバンド ( 日本晴 ) はd1遺伝子と共分離することが判明した ( 図 2 )。

【 0 0 3 1 】 さらに、分子マーカーST5933をプローブとしたd1突然変異系統のゲノミックサザンハイブリダイゼーションを行った ( 図 3 )。その結果、2種の正常型イネ品種日本晴 ( Japonica ) とカサラーサ ( Indica ) では約9.6kbのバンドが見られたが、9種のd1突然変異系統のうち7系統 ( FL2, H0532, H0533, H0537, H0538, H0541, H0552 ) で正常型イネとは違うサイズのバンドが検出された。一般に日本晴 ( 日本型品種 ) とカサラーサ ( インド型品種 ) との間ではRFLPが検出されやすく、日本型品種間では多型が極めて出にくい傾向がある。しかし、この結果では、日本型品種の遺伝背景をもつd1突然変異系統間で多型が検出された。このことは d1突然変異系統

10 【 0 0 3 2 】 [実施例 5] ST5933 の発現パターンの解析

ゲノミックサザンハイブリダイゼーションにより候補遺伝子ST5933に構造変異が認められた4種のd1突然変異系統と2つの正常型 ( 日本晴, カサラーサ ) よりRNAを抽出し, ST5933をプローブとしてノーザンハイブリダイゼーションを行った ( 図 4 )。その結果、2つの正常型では1.8kbのバンドが検出されたが、4種のd1突然変異系統ではバンドは検出されなかった。この結果から、候補遺伝子ST5933が矮性形質d1の原因遺伝子であることが支持される。

20 【 0 0 3 3 】

【発明の効果】本発明により、植物の矮性化に関与するイネd1遺伝子若しくは他の植物の相同遺伝子の発現を抑制することにより植物を矮性化させる方法が提供された。これにより、例えば、新たな新たな商品価値を有する観賞用植物や農作物を作出することが可能であり、特に農業や園芸の分野において有益である。

【 0 0 3 4 】

【配列表】

( 1 ) 出願人氏名又は名称 : 農林水産省農業生物資源研究所長 中川原 捷洋  
社団法人 農林水産先端技術産業振興センター

( 2 ) 発明の名称 : 植物を矮性化させる方法

( 3 ) 整理番号 : MOA - 0 0 3

( 4 ) 出願番号 :

( 5 ) 出願日 :

( 6 ) 配列の数 : 3

配列番号 : 1

配列の長さ :

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

配 列

Met Gly Ser Ser Cys Ser Arg Ser

1 5

His Ser Leu Ser Glu Ala Glu Thr Thr Lys Asn Ala Lys Ser Ala Asp

10 15 20

Ile Asp Arg Arg Ile Leu Gln Glu Thr Lys Ala Glu Gln His Ile His

25 30 35 40

13  
 Lys Leu Leu Leu Leu Gly Ala Gly Glu Ser Gly Lys Ser Thr Ile Phe  
                           45                          50                          55  
 Lys Gln Ile Lys Leu Leu Phe Gln Thr Gly Phe Asp Glu Ala Glu Leu  
                           60                          65                          70  
 Arg Ser Tyr Thr Ser Val Ile His Ala Asn Val Tyr Gln Thr Ile Lys  
                           75                          80                          85  
 Ile Leu Tyr Glu Gly Ala Lys Glu Leu Ser Gln Val Glu Ser Asp Ser  
                           90                          95                          100  
 Ser Lys Tyr Val Ile Ser Pro Asp Asn Gln Glu Ile Gly Glu Lys Leu  
 105                          110                          115                          120  
 Ser Asp Ile Asp Gly Arg Leu Asp Tyr Pro Leu Leu Asn Lys Glu Leu  
                           125                          130                          135  
 Val Leu Asp Val Lys Arg Leu Trp Gln Asp Pro Ala Ile Gln Glu Thr  
                           140                          145                          150  
 Tyr Leu Arg Gly Ser Ile Leu Gln Leu Pro Asp Cys Ala Gln Tyr Phe  
                           155                          160                          165  
 Met Glu Asn Leu Asp Arg Leu Ala Glu Ala Gly Tyr Val Pro Thr Lys  
                           170                          175                          180  
 Glu Asp Val Leu Tyr Ala Arg Val Arg Thr Asn Gly Val Val Gln Ile  
 185                          190                          195                          200  
 Gln Phe Ser Pro Val Gly Glu Asn Lys Arg Gly Gly Glu Val Tyr Arg  
                           205                          210                          215  
 Leu Tyr Asp Val Gly Gly Gln Arg Asn Glu Arg Arg Lys Trp Ile His  
                           220                          225                          230  
 Leu Phe Glu Gly Val Asn Ala Val Ile Phe Cys Ala Ala Ile Ser Glu  
                           235                          240                          245  
 Tyr Asp Gln Met Leu Phe Glu Asp Glu Thr Lys Asn Arg Met Met Glu  
                           250                          255                          260  
 Thr Lys Glu Leu Phe Asp Trp Val Leu Lys Gln Arg Cys Phe Glu Lys  
 265                          270                          275                          280  
 Thr Ser Phe Ile Leu Phe Leu Asn Lys Phe Asp Ile Phe Glu Lys Lys  
                           285                          290                          295  
 Ile Gln Lys Val Pro Leu Ser Val Cys Glu Trp Phe Lys Asp Tyr Gln  
                           300                          305                          310  
 Pro Ile Ala Pro Gly Lys Gln Glu Val Glu His Ala Tyr Glu Phe Val  
                           315                          320                          325  
 Lys Lys Lys Phe Glu Glu Leu Tyr Phe Gln Ser Ser Lys Pro Asp Arg  
                           330                          335                          340  
 Val Asp Arg Val Phe Lys Ile Tyr Arg Thr Thr Ala Leu Asp Gln Lys  
 345                          350                          355                          360  
 Leu Val Lys Lys Thr Phe Lys Leu Ile Asp Glu Ser Met Arg Arg Ser  
                           365                          370                          375  
 Arg Glu Gly Thr  
                           380

配列番号 : 2

配列の長さ : 1461

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA



15

16

## 配列の特徴

特徴を表す記号 : CDS

存在位置 : 91 .. 1230

特徴を決定した方法 : S

## 配 列

GACGTCAACG TGCTTCCTGG AAAGAGAGAG GCTCAGGCAT GAGAGCATAC CTCTAAAATA	60
ATGTCCGTGC TTACCTGTGT GCTTGATAAC ATG GGC TCA TCC TGT AGC AGA TCT	114
Met Gly Ser Ser Cys Ser Arg Ser	
1 5	
CAT TCT TTA AGT GAG GCT GAA ACA ACC AAA AAT GCA AAA TCT GCA GAC	162
His Ser Leu Ser Glu Ala Glu Thr Thr Lys Asn Ala Lys Ser Ala Asp	
10 15 20	
ATT GAC AGG CGA ATT TTG CAA GAG ACA AAA GCA GAG CAA CAC ATC CAC	210
Ile Asp Arg Arg Ile Leu Gln Glu Thr Lys Ala Glu Gln His Ile His	
25 30 35 40	
AAG CTC TTA CTT CTT GGT GCG GGA GAA TCA GGG AAG TCT ACG ATA TTT	258
Lys Leu Leu Leu Leu Gly Ala Gly Glu Ser Gly Lys Ser Thr Ile Phe	
45 50 55	
AAA CAG ATT AAG CTC CTT TTC CAA ACT GGC TTT GAT GAG GCA GAA CTT	306
Lys Gln Ile Lys Leu Leu Phe Gln Thr Gly Phe Asp Glu Ala Glu Leu	
60 65 70	
AGG AGC TAC ACA TCA GTT ATC CAT GCA AAC GTC TAT CAG ACA ATT AAA	354
Arg Ser Tyr Thr Ser Val Ile His Ala Asn Val Tyr Gln Thr Ile Lys	
75 80 85	
ATA CTA TAT GAA GGA GCA AAA GAA CTC TCA CAA GTG GAA TCA GAT TCC	402
Ile Leu Tyr Glu Gly Ala Lys Glu Leu Ser Gln Val Glu Ser Asp Ser	
90 95 100	
TCA AAG TAT GTT ATA TCC CCA GAT AAC CAG GAA ATT GGA GAA AAA CTA	450
Ser Lys Tyr Val Ile Ser Pro Asp Asn Gln Glu Ile Gly Glu Lys Leu	
105 110 115 120	
TCA GAT ATT GAT GGC AGG TTG GAT TAT CCA CTG CTG AAC AAA GAA CTT	498
Ser Asp Ile Asp Gly Arg Leu Asp Tyr Pro Leu Leu Asn Lys Glu Leu	
125 130 135	
GTA CTC GAT GTA AAA AGG TTA TGG CAA GAC CCA GCC ATT CAG GAA ACT	546
Val Leu Asp Val Lys Arg Leu Trp Gln Asp Pro Ala Ile Gln Glu Thr	
140 145 150	
TAC TTA CGT GGA AGT ATT CTG CAA CTT CCT GAT TGT GCA CAA TAC TTC	594
Tyr Leu Arg Gly Ser Ile Leu Gln Leu Pro Asp Cys Ala Gln Tyr Phe	
155 160 165	
ATG GAA AAT TTG GAT CGA TTA GCT GAA GCA GGT TAT GTG CCA ACA AAG	642
Met Glu Asn Leu Asp Arg Leu Ala Glu Ala Gly Tyr Val Pro Thr Lys	
170 175 180	
GAG GAT GTG CTT TAT GCA AGA GTA CCG ACA AAT GGT GTT GTA CAA ATA	690
Glu Asp Val Leu Tyr Ala Arg Val Arg Thr Asn Gly Val Val Gln Ile	
185 190 195 200	
CAA TTT AGT CCT GTT GGA GAA AAC AAA AGA GGT GGA GAG GTA TAT AGG	738
Gln Phe Ser Pro Val Gly Glu Asn Lys Arg Gly Gly Glu Val Tyr Arg	
205 210 215	
TTG TAT GAT GTA GGA GGC CAG AGG AAT GAG AGG AGA AAG TGG ATT CAT	786
Leu Tyr Asp Val Gly Gly Gln Arg Asn Glu Arg Arg Lys Trp Ile His	

17				18	
	220	225	230		
	CTT TTT GAA GGT GTT AAT GCG GTA ATC TTT TGT GCT GCC ATT AGC GAA			834	
	Leu Phe Glu Gly Val Asn Ala Val Ile Phe Cys Ala Ala Ile Ser Glu				
	235	240	245		
	TAT GAT CAG ATG CTA TTT GAA GAT GAG ACA AAA AAC AGA ATG ATG GAG			882	
	Tyr Asp Gln Met Leu Phe Glu Asp Glu Thr Lys Asn Arg Met Met Glu				
	250	255	260		
	ACC AAG GAA CTC TTT GAC TGG GTT TTA AAG CAA AGA TGT TTT GAG AAA			930	
	Thr Lys Glu Leu Phe Asp Trp Val Leu Lys Gln Arg Cys Phe Glu Lys				
	265	270	275	280	
	ACA TCA TTC ATT CTG TTT CTC AAC AAA TTT GAT ATA TTC GAG AAG AAA			978	
	Thr Ser Phe Ile Leu Phe Leu Asn Lys Phe Asp Ile Phe Glu Lys Lys				
	285	290	295		
	ATA CAA AAG GTT CCT TTA AGT GTG TGC GAG TGG TTT AAA GAC TAC CAG			1026	
	Ile Gln Lys Val Pro Leu Ser Val Cys Glu Trp Phe Lys Asp Tyr Gln				
	300	305	310		
	CCT ATT GCA CCT GGG AAA CAG GAG GTT GAA CAT GCA TAT GAG TTT GTC			1074	
	Pro Ile Ala Pro Gly Lys Gln Glu Val Glu His Ala Tyr Glu Phe Val				
	315	320	325		
	AAG AAG AAG TTT GAA GAG CTC TAC TTC CAG AGC AGC AAG CCT GAC CGT			1122	
	Lys Lys Lys Phe Glu Glu Leu Tyr Phe Gln Ser Ser Lys Pro Asp Arg				
	330	335	340		
	GTG GAC CGC GTC TTC AAA ATC TAC AGA ACT ACG GCC CTA GAC CAG AAA			1170	
	Val Asp Arg Val Phe Lys Ile Tyr Arg Thr Thr Ala Leu Asp Gln Lys				
	345	350	355	360	
	CTT GTA AAG AAG ACA TTC AAG TTG ATT GAT GAG AGC ATG AGA CGC TCC			1218	
	Leu Val Lys Lys Thr Phe Lys Leu Ile Asp Glu Ser Met Arg Arg Ser				
	365	370	375		
	AGG GAA GGA ACT TGATTCAGAG CTAAGACTAG GTTGTAAGTC ACACAGGGAA			1270	
	Arg Glu Gly Thr				
	380				
	GGTAATTAGG ACGGCGAGAG GAACAAAGTT TCACACTGTC ACAGCTTTAT CTGTTGTAAT			1330	
	TCTTTTACAC GTGGACCATT GATTGATCTT TTGGTTCTTA CTGTGGGCTG TTCAGGTCTG			1390	
	TACCCTATTT TTTGTTCTCT AGTTAGCCAT TGTGCAAATT TTCCTTGAAT CAGATTCTCT			1450	
	ACCTGTTGTC T			1461	
	配列番号 : 3				
	配列の長さ : 8107				
	配列の型 : 核酸				
	鎖の数 : 二本鎖				
	トポロジー : 直鎖状				
	配列の種類 : Genomic DNA				
	配 列				
	GAATTTCAT GTCTGTAAC TCATTTTAA GCCATAGAAA TCTAGTTCCA TCCAAACAC			60	
	CAAAACGGAT GGTGTTTAC AGTAGCTTGT CATATGCTTT TAGGCGAGCT TACTAGTCTA			120	
	TTTTTCATAA TACTTTTTCA CAATTTTGAA AGGCCTAGGG AGTAATATTT AATGGTGCAA			180	
	AAGGGACGAG TTTTGAAACA TTTGTTTGTC GCAGAAGCAC CAGACCATTC TGATTGTTAT			240	
	TGTAAGCTGT AACATCAAAG TTTTGGCAGC AGGTTTTCAT GTGCTCTTAA GCGTTGGGGG			300	
	TTTGTTCCGT TTGGTTTTCA ACTGTATGCT AGCTTTCTCT ATTAGCCAAT GTAATGGCAG			360	
	TTGCAAAATC TGTTGTAGTG CAGGCGTGCA GCTAAATGCA GTATAGCTGA CTGTAACTT			420	
	TAAGCTGATT GTCCCATGCA TGTCCAGTA AAAGGACAGT CAGGAATGAG TCTCATGGGT			480	

19	20	
CAATATATGG	TGCAGACATG	TCAGTAGGAT ATAGGAGTAT TACATTATAG TTTTTTCAGC 540
TTCAATAACG	TTCATGTTAG	CTTGTACATT GTATGGCAAC CCTTCCATAC TTGCGTTAGC 600
ACAAAAGTTC	ACCATGTTAG	CTTGGCTTTA GATCAGTTTA AACTGTCCTT TAATAGCAAA 660
TTAATAATCC	ATAAAATGAA	ATTTTACTTC CACTGTTTAC CAGTGCTACT ACTGTTCTAC 720
CTCCAGCGTT	CAACAGCTGA	GAAACGTGAG GAGTCCAGCA CCAGCAGTAT CATTTACTGC 780
AATGCGAGAG	AGATGTTCTC	CGTTTCCTCC TTCACTGAGG CTTAGGAGTA GGAGGAGTAG 840
TAGTGATTTT	TTCGTGTCGA	CTTGTTTAAAC ATTATCATTACACCATCAA GTGTCAATGC 900
CAGTAGGCTG	CTGCTTCTAA	TCATTTCTTC CTTCCCTCTT CTAACGCCAT TATCGTTTTA 960
TCTCACCTTG	CATTTATGTT	CAAGTGACCA TGGTCTTGA CAGAAGCAGC CCTTGTCTT 1020
TCCTGTCCCT	TTGTTTGTTC	AGTACGCTAT TATTCTCTTG GGTACTAGAC CTTGTATAAA 1080
CCGTTGTGTA	AATCCTCAAT	CAAATAAAAG TTAACCTCGAA ATTTGTGGCC TGTCCAAGT 1140
GTTTGGCAAA	CCAATATGTA	TATTATCCAC CCGATTATCT AATGCAATA CAGTGCCTAA 1200
AATTCCTGCT	TCCGGAGTCT	TAAACTTTAC CCGAATCCAA TCTGGAAACC GAAAAGACAG 1260
CTGCTTAGCT	GATGGCAAGT	CACTGGGTAC ATTGATTTGT GTTAATTTTC AGTCCAATAA 1320
AACAGCGCAA	AAATTGTAAG	GGTGATCCCT CTTTAGTAAA GCCATGCATT CTGCAAATC 1380
TGTTGCAATG	CAAGCTGTAT	CCTATATCCA GTGCCGATGA ACCAATTCTG TTTGCAGACT 1440
GTACCCTATC	TCTACTCTAC	AAGCCAACCA AAGGAAAGTG TTTGATCTGC AGTGAATAC 1500
TAGCAGGTAT	TCCACCATTT	CAGGGTTGGG AGTGTGATTG ATATGCAGGA GATTGACATT 1560
GTGCAGAAAC	TTGGCCGTCA	GCTGCCGCTG CCGTCGCCGG TGGTGTCCGT GAGAAAAGCC 1620
GGTGGTGGTG	GTTGTGCCGG	CGGCGAGGAG TGGCTGCAAC AGGATGGGCT GTTGTGCATG 1680
GGCGGATCAG	CGGGTGGCTT	ATGGCGGTGG CCACGCTGTT AGCCGGCGAC GGACCCGGCG 1740
GCGGCTCCT	TCACGAGGGA	CGGCGCATGA TGATCCTGGA TAATTTGAG ACTTCGGGCC 1800
GGCGTTCGTG	CAAAGCCCAT	ACATATTCTA CGCGCAACTG TCACGCACAA AAACGAAGTT 1860
TTTAGTACCA	CATGGAAAAT	CTATGACGAC TAACACCGGC ATAAAAGACG ACGCGCTCGC 1920
ATAGCGGGAG	TTGGCAGTTT	TCGGCTGCTG GAGAAAACGA GGTTTCTCCC TCGATCGAAT 1980
GGATGCAAAC	ATCCTCCCGA	CTTTGGCCCA CTAGGGAGGG AAGGTGTGAG TCACCCTGGG 2040
CTCCAGACGG	CTGCGTCATG	GAGCGAAGAG GACCAACCGA CACCCTTCTC CCCACCCATT 2100
GGCGAATGCC	CTAGAGGTTT	GGGCAACCGA CACCCTTCTC CCCACCTATT GACGAATGCC 2160
CTTGGGTTGA	GATAGGAGTA	GAGGGGAGTG AGGTCTTCTC CCCACCCATT GGCGAATGCC 2220
TTTGGGTTGA	GATAGGAGTA	GAGGGGAGTG AGGTCTTCTC CCCACCCATT GGCGAATGCC 2280
CTAGAGGTTT	GGGCAACCGA	CACCCTTCTC CCCACCCATT GGCGAATGCC CTAGAGGTTT 2340
GGGTTGAGAT	AGGAGTAGAG	GGGAGTGAGG TGAAGAAGA TTGCTAGTTG GCTTGTGGGG 2400
TTCCACGTGG	GCCCTGCACT	GACTCAGCCA CCACGTAAAC AAAACCGGAA AGCAATACTA 2460
CCTTGGGATT	AAAAGTGGTC	CGTTTGAAG ATTAGGGGTT CAGGGCCGTG TAAAACCTAA 2520
CGACAAGATA	AGGGACCTTA	GATGAACTTT TTTGGGAGAT GAGGCGCCTG TGCATATGAC 2580
CCATAGGCAG	GCGACACCGC	GGCAGAGCGG CGCTGCACGA CCTCCGCCTC CCCAATCCGT 2640
CCCGTCTCCT	CGCCCGCCGC	CCTCGACTCC CGTCTCCTCG CTGCGCGCTG GCGCCGATCT 2700
CCATCCTGCT	AGCAGAGGTG	GCGCCGGCGT CCTCCTGCTC CCGCCGCATT CGCATCCTAA 2760
TCCATCCCAT	CCGGCCTCGG	CCTCGAATTT CGTCTCCTCG CCGCCGCTT GCGCCGATCC 2820
CATCCTGCGA	GCAGAGGTGG	CGCCCGCGT CCTCCTTCCA CCGTATCGTA GCTCGCCGGT 2880
GAGCATCCCT	CCCTACCCAC	ACCTCATCAG GTATTCTGCG TTATCCCTCA AAAAGTTTGG 2940
GGGTTCAACC	GAAACAGGGT	TAGATCTGCC TCTGCCAGC TCCACCTACT TTCAAGTTGT 3000
TAATTTTGTG	TTCCGTTTTT	AGCAGATGTA ATTTGGTTAT TGAATCTCAT CCAAACACCC 3060
TCAGAACGAA	AAATGTAAGC	TTACATAATT TGTAATCATC CAAACTTACA TAAATTTCTT 3120
AAGGAGAATC	TAGACCACAA	ACTACCCATA GTCACACAAA ATATCTTTTT ATCAAGGTAT 3180
TCTTATAAGT	AATTTTAATT	CCACAAAATT TTCTAAAGGA CATACTGTGA CACTTGGCAT 3240
GAATCTAATT	TAACATTCTT	TCTTTATCAG GTTATAAATT GAAACCATTG AACGTATTTT 3300
GTCTTCCCGT	CCCTACAACA	TTGTGATATA TCTGTAATAT TTTAATATTT TTAATTTTAA 3360
AAATATTTAG	ACTAATAATA	TAGATATTTA ATTAGGTAAT TAATAAATTC AAATCAAAATG 3420
TAGTTTGGAA	TAAATAAACA	AAATGATATA TGCCAAGTAC AATCTAATAT CGGGCATGAT 3480

21	22	
TTTAGATGTA	GTAGGTATTA	TTCTGGAATA CTCCTCGTTG AAACATATGG AACGCATTTT 3540
CCTGAAAAAG	GAAAAATTTT	TGCCCCGACC CCTCGACACC AACCCCGTCG GATGTGAAGC 3600
CGACGCGCCA	GATGGAGGCC	AGCGGTGCCA ATGCGTAGGC CAATCGTGCC TCTGGGGAAA 3660
TCTTATCTCC	CGGGGCCGGA	CGGCTCCGCT CCACTTCCCT CCCCAGTCA CTCAAACCAT 3720
CCAATCCCCC	ACACTCCCTT	CCCTTGCCCC CATTCCCAC CGCCGCAAGG AAAAAATATTG 3780
TTAATAAACA	ATGATGTTGA	TGTATTATTA ATAAACAATG ATATTGATGT ATTTCTAAAT 3840
ATTTTCACGT	ATTATTTATT	AAGTGTCACT GATTGAAATG GATCCTGGTC GAAATGAAT 3900
CCTGGTCGGA	AAATGGTTAC	TAATGTTTTT CCTTCATATA ATATTTCTGG ATATGTATAA 3960
CAATGTGGGT	CAGCAATATT	GAACATGCA AACCATTAAT CTGTACAATC TTTTCTTTTC 4020
AAATGCTGGC	CACATTTTCG	TCGAGCTTAC TGCTCATGTA TGCAGCTCAT GGATCCTGAG 4080
ATCTAGACGT	CAACGTGCTT	CCTGGAAAGA GAGAGGCTCA GGCATGAGAG CATACCTCTA 4140
AAATAATGTC	CGTGCTTACC	TGAGTGCTTG ATAACATGGG CTCATCCTGT AGCAGATCTC 4200
ATTCCTTAAG	TGAGGCTGAA	ACAACAAAAA ATGCAAAAGT AAGTTAGCAC TCGGACTTAC 4260
TGAACAAGTA	AATGCTAACT	CAATTCTTGA TTTGAGAGTT GCCACATTTG GTTTCTTCTA 4320
ATTCAGCTGG	TAACAGTCTG	CAGACATTGA CAGGCGAATT TTGCAAGAGA CAAAAGCAGA 4380
GCAACACATC	CACAAGCTCT	TACTTCTTGG TATTGCTAAC TTTCCCAAAT TTAAGTGGTC 4440
ATTTTCCTTG	TCACAATTAT	CTGCGCTACC TTTAGTATCT ATTGGTGGAG AAAATTAATT 4500
GTTTCTGTTG	TTCCTATTTA	CCTCTATAAA AAAACCTTTC TCATGTTATT TCCAAAAAAA 4560
AAGAAGATAA	ATAAATGTAT	CCTAGAAAAT TTTAGTTTGA ACTTGTTTCT AATGTGGATC 4620
CATCCTTCTT	TCTCTCTCTC	AATTGCTTCT GTTTTAAAGT GCGGCAGAAT CAGGGAAGTC 4680
TACGATATTT	AAACAGGTGA	TGAATGTTAT ATTCCATGGA GAATCATAAC CCGTACGCCG 4740
CTAGTTAGTC	TGATGTATTC	TACTGTTCCTA CCTGCAGATT AAGTCCTTTT TCCAAACTGG 4800
CTTTGATGAG	GCAGAACTTA	GGAGCTACAC ATCAGTTATC CATGCAAACG TCTATCAGAC 4860
AATTAAGTA	TGCAATACTG	GAAAGGGTGT GTCTTTTTTT TCTTATTGCA AAGTGGGGAT 4920
TATGTAGGAG	AGTCGACTAG	GGATTGTGAT TCTGTTCATA AGGAAATGCG TTCATACTTT 4980
TCCTTTTTGT	CGAGTAATGT	GTTAAATGTT AACAGATACT ATATGAAGGA GCAAAAAGAAC 5040
TCTCACAAGT	GGAATCAGAT	TCCTCAAAGT ATGTTATATC CCCAGATAAC CAGGTTTGTG 5100
CTTACTCTTT	ACTCAACAGT	TAAAGCTAAA TCTGTGCATA TGAACATGTC TTGTTAAATC 5160
TGGGAATACA	AACATTTTGA	TTTGCAACAT TTCTGTTGTA GTCAAGCTGC TCGGCTCTAT 5220
GTTTTAACCT	GTTAAGACCT	TGTAGACTGT GCTCGGCTCT ATTGTAGTCT TATATTTTAC 5280
ACGGTCATTC	TATAATGAAA	ACTTGAAAAA GATATCTATT GAACCGTTCA ATGTACTGAA 5340
CAAAGTAGAA	AAGAACAATG	AGATTTTGTG ACATTTATTC TTCTTGTTT ATTTGATTGC 5400
TTCAGACAAT	TGTTGATATG	CTAAAAATAA CTTGGTATCA AATGTGGGTG TTATAAGATT 5460
CAATTTTTTC	CTCAACCAGG	TTAAAAAAG TATACCTTTG TGCATTTCCC TGGTTCCGTT 5520
GCTTTGGAAC	TTTAAAGGAA	AACTGACTTT CTTAGGCAT TGAAAGACAA ATATCACCAG 5580
TTTCACACTG	TACACCTTAC	CAACCAATTT GGTTCCTTAG ATGTCATTTA CTTTGTCTATA 5640
TCATCAGGAA	ATTGGAGAAA	AACTATCAGA TATTGATGGC AGGTTGGATT ATCCACTGCT 5700
GAACAAAGAA	CTTGACTCG	ATGTA AAAAG GTTATGGCAA GACCCAGTCA TTCAGGTGAA 5760
AACAAATAGC	CATTCAAATC	TTTTGAAGTT ATATAGTTTT CCTGGCCAGG TGTGCTGAAG 5820
CAATGCTCTA	TACTGTAGGA	AACTTACTTA CGTGAAGTA TTCTGCAACT TCCTGATTGT 5880
GCACAATACT	TCATGGAAAA	TTTGGTTCTGA TTAGCCGAAG CAGGTTATGT GCCAACAAAG 5940
GTGTGCTGTC	CATGTTCTATA	GACAATTATT TACATATTCT CAGATATTTG TCCTGACACC 6000
ATTTTCATGTT	GATTTTAAAGT	CTACTTAGTC AGAGGTTGTC AAATGGTTAA CTATGTGTAC 6060
TGAGTCAGAG	GTTGCCAAAT	AGTTTTAAAA GATGGGCATA TGTTTATCCT TATCTTTTAA 6120
ATAATATTGG	AGGCTATCCT	TTAAAATTCA ATATTAGGGA GGAGAAACTA TTATTCTACC 6180
GTTATTACGC	AGTCTACATA	ACGAAGGTAA AAAATGTCCC TGTGAAACAT AGGGTGCAAA 6240
ACTACTGTGA	ATAAACTCT	ACTTATCTAA GCACCTTGAG CTTTTGAGTT CCCACATATT 6300
AATCTTATGA	CACTAGCATA	TATTTTTTTT GTTCAGTTCC TTCAATAAGT TGCAAACCAC 6360
AAATATGATC	ACTGTACCAT	CCACTTTTGC AACCATTTCC CGTCATTTCT TAAGCATAGA 6420
AAATTGTTTG	TCACTTGTTT	AAGTCCACAC TGCATGAAAA TTCCAATTAA CTTTGTGTGC 6480

23

24

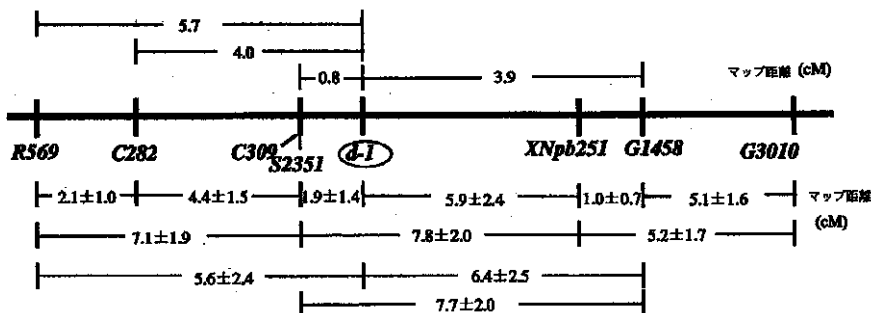
TAAGTGAAGA TATGACTCCA TATTTCTGCA TTTAGCAGTC TGGATGGGAT AATTTGTGAT 6540  
 TGTACCTTGT CTAATGGTTC GTTTGAAAGG CTGGTAGTTG ATCTTCCATA CTTAAGAATG 6600  
 CTTGCAGTAT TATAGTTGTC AATATTATGA GTCATTTTCC AGGAGGATGT GCTTTATGCA 6660  
 AGAGTACGGA CAAATGGTGT TGTACAAATA CAATTTAGGT AATCTGCTGA CACTATTTTT 6720  
 TGCACATTTT TTTGCTGGTT GCTCTACTAT GTACAGAACG ACAAGTTGAA GTCCTTTTTT 6780  
 CCTCCCTTTT CACTTCTAAG ATATGACCTG AGAGTTCTG AATGTAGCTG TTATAAGATG 6840  
 AGTTGAATCA TCTAGTTAAC TGGGTTTCTT TCTGCAGTCC TGTTGGAGAA AACAAAAGAG 6900  
 GTGGAGAGGT ATATAGGTTG TATGATGTAG GAGGCCAGAG GAATGAGAGG AGAAAGTGGA 6960  
 TTCATCTTTT TGAAGGTGTT AATGCGGTAA TCTTTTGTGC TGCCATTAGC GAGTAAGTAC 7020  
 AATTTTTTTG ATTGTTGAAC TTATCCTAAT CTGCTAAGTT CTTCTCATAG GCTTCTTGTT 7080  
 CATTTCAGAT ATGATCAGAT GCTATTTGAA GATGAGACAA AAAACAGAAT GATGGAGACC 7140  
 AAGGAACTCT TTGACTGGGT TTTAAAGCAA AGATGTTTTG AGGTCTGCAT GCATCCATTT 7200  
 CTGCAACCTT TGTGCTCATG CTTTTTTTTC TCATTTTGAA ACTAATTACG GTGCTATATT 7260  
 GACCATCAGA AAACATCATT CATTCTGTTT CTCAACAAAT TTGATATATG CGAGAAGAAA 7320  
 ATACAAAAGG TAAGGCCTGC TCTTTGTACC AATGCATAGT TTAGTACTAA ATGTTACCAA 7380  
 CATTATGTTT TTCGCTGGTT ACGTAGGTTT CTTTAAGTGT GTGCGAGTGG TTTAAAGACT 7440  
 ACCAGCCTAT TGCACCTGGG AAACAGGAGG TTGAACATGC ATATGAGTGA GTCCACTACT 7500  
 CGCCCTCTCA GATGAACATG GGCATTTGGC CATTGTAAAT GTTGCTGCAT GGTGCACTTA 7560  
 TATGCCTTGA TAAGTTTTTC CATTCTAATG TTATATAGTA TCAAACGTTT ATCATTACTG 7620  
 TGGCTTATGG TCTGGAGTGA CGTTTACAG GTTTGTCAAG AAGAAGTTT AAGAGCTCTA 7680  
 CTTCCAGAGC AGCAAGCCTG ACCGTGTGGA CCGCGTCTTC AAAATCTACA GAACTACGGC 7740  
 CCTAGACCAG AAACCTGTAA AGAAGACATT CAAGTTGATT GATGAGAGCA TGAGACGCTC 7800  
 CAGGGAAGGA ACTTGATTCA GAGCTAAGAC TAGGTTGTAA GTCACACAGG GAAGGTAATT 7860  
 AGGACGGCGA GAGGAACAAA GTTTCACACT GTCACAGCTT TATCTGTTGT AATTCTTTTA 7920  
 CAGGTGGACC ATTGATTGAC CTTTTGGTTC TTAGTGTGGG CTGTTTCAGG CTGTACCCTA 7980  
 TTTTTTGTTC TCTAGTTAGC CATTGTGCAA ATTTTCCTTG AATCAGATTC TCTACCTGTT 8040  
 GTCTATGTGT GTTATCTTGG TCTGTTAATT TGCATAGCCC ACTTGTTACA AAAGGAGAGC 8100  
 CGAATTC 8107

【図面の簡単な説明】

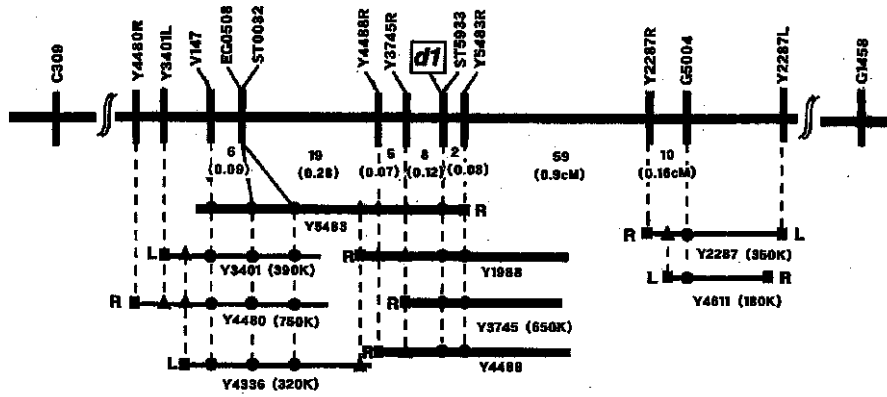
- 【図 1】低精度の連鎖解析によるd1座の推定領域を示す。
- 【図 2】高精度の連鎖解析によるd1座の推定領域を示す。
- 【図 3】ST5933をプローブにした2種のd1野生型品種(日本晴、カサラーサ)ならびに9種のd1変異体品種(FL2、H0532、H0533、H0537、H0538、H0541、H0552、CM38

- 2、CM1792)のゲノミックサザンハイブリダイゼーションの結果を示す電気泳動像である。0.8%アガロースゲルによる電気泳動後ニトロセルロース膜へプロットした。シグナルの検出にはECL系を用いた。
- 【図 4】ST5933をプローブにした2種のd1野生型品種(日本晴、カサラーサ)ならびに4種のd1変異体品種(FL2、H0532、H0541、H0552)のノザンハイブリダイゼーションの結果を示す電気泳動像である。

【図 1】



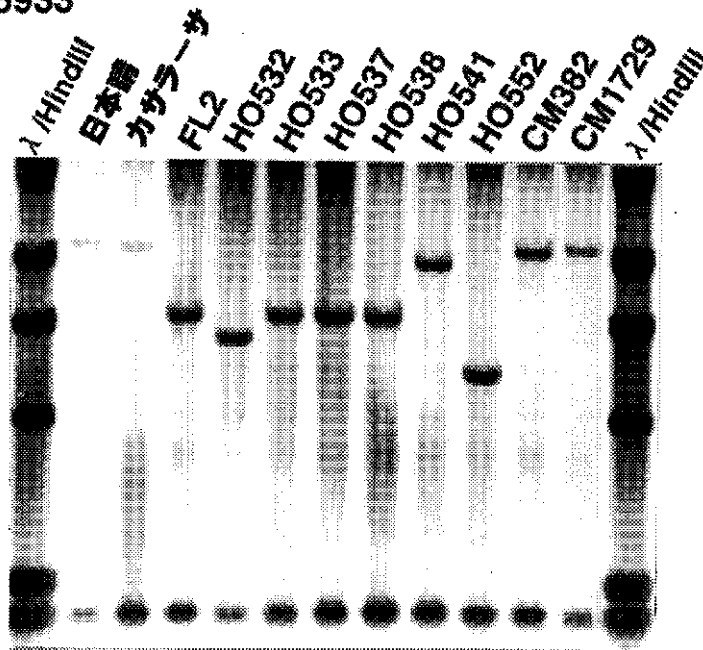
【 図 2 】



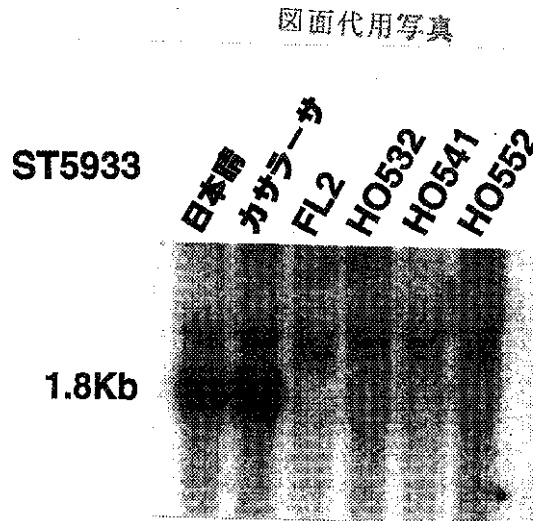
【 図 3 】

図面代用写真

ST5933



【図 4】



## 【手続補正書】

【提出日】平成 11 年 8 月 2 日 ( 1999 . 8 . 2 )

## 【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 植物を矮性化するために用いる、下記 ( a ) から ( c ) のいずれかに記載の DNA の転写産物と相補的なアンチセンス RNA をコードする DNA。

( a ) 配列番号 : 1 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする DNA。

( b ) 配列番号 : 2 に記載の塩基配列からなる DNA。

( c ) 配列番号 : 2 に記載の塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件下でハイブリダイズする DNA であって、その発現が抑制されることによって植物の矮性化が誘導される DNA。

【請求項 2】 植物を矮性化するために用いる、請求項 1 の ( a ) から ( c ) のいずれかに記載の DNA の転写産物を特異的に開裂するリボザイム活性を有する RNA をコードする DNA。

【請求項 3】 植物を矮性化するために用いる DNA であって、植物細胞における発現時に、共抑制効果により、下記 ( a ) から ( c ) のいずれかに記載の DNA の発現を抑制させる RNA をコードし、下記 ( a ) から ( c ) のいずれかに記載の DNA と 90% 以上の相同性を有する DNA。

( a ) 配列番号 : 1 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする DNA。

( b ) 配列番号 : 2 に記載の塩基配列からなる DNA。

( c ) 配列番号 : 2 に記載の塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件下でハイブリダイズする DNA であって、その発現が抑制されることによって植物の矮性化が誘導される DNA。

【請求項 4】 請求項 1 から 3 のいずれかに記載の DNA を発現可能に保持するトランスジェニック植物細胞。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0010

【補正方法】変更

【補正内容】

【0010】即ち、本発明は、植物の矮性に関与する d1 遺伝子若しくはその相同遺伝子の発現を抑制することによる植物を矮性化する方法、およびこれら遺伝子の発現を抑制するために用いられる分子に関し、より具体的には、

( 1 ) 植物を矮性化するために用いる、下記 ( a ) から ( c ) のいずれかに記載の DNA の転写産物と相補的なアンチセンス RNA をコードする DNA。

( a ) 配列番号 : 1 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする DNA、

( b ) 配列番号 : 2 に記載の塩基配列からなる DNA。

( c ) 配列番号 : 2 に記載の塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件下でハイブリダイズする DNA であって、その発現が抑制されることによって植物の矮性化が誘導される DNA。

( 2 ) 植物を矮性化するために用いる、請求項 1 の ( a ) から ( c ) のいずれかに記載の DNA の転写産物を特異的に開裂するリボザイム活性を有する RNA をコード

するDNA、

( 3 ) 植物を矮性化するために用いるDNAであって、植物細胞における発現時に、共抑制効果により、下記 ( a ) から ( c ) のいずれかに記載のDNAの発現を抑制させるRNAをコードし、下記 ( a ) から ( c ) のいずれかに記載のDNAと90%以上の相同性を有するDNA、  
 ( a ) 配列番号： 1 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA。  
 ( b ) 配列番号： 2 に記載の塩基配列からなるDNA。  
 ( c ) 配列番号： 2 に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNAであって、その発現が抑制されることによって植物の矮性化が誘導されるDNA。

( 4 ) ( 1 ) から ( 3 ) のいずれかに記載のDNAを発現可能に保持するトランスジェニック植物細胞、に関する。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 1 4

【補正方法】変更

【補正内容】

【 0 0 1 4 】イネd1遺伝子がコードするタンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードする遺伝子を単離するための当業者によく知られた方法としては、ストリンジントな条件下におけるハイブリダイゼーション技術 (Southern, E.M.: Journal of Molecular Biology, Vol. 98, 503, 1975) やポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 技術 (Saiki, R. K. et al. Science, vol.230, 1350-1354, 1985; Saiki, R. K. et al. Science, vol.239, 487-491, 1988) が挙げられる。即ち、当業者にとっては、イネd1遺伝子の塩基配列 (配列番号： 2) もしくはその一部をプローブとして、またd1遺伝子 (配列番号： 2) に特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドをプライマーとして、イネ以外の植物からd1遺伝子の相同遺伝子を単離することは通常行いうることである。

フロントページの続き

(72)発明者 吉村 淳  
 福岡県福岡市中央区港 1 - 10 - 3 - 32  
 (72)発明者 矢野 昌裕  
 茨城県つくば市観音台 2 丁目 1 - 2 農林  
 水産省農業生物資源研究所内  
 (72)発明者 松本 隆  
 茨城県つくば市観音台 2 丁目 1 - 2 農林  
 水産省農業生物資源研究所内  
 (72)発明者 佐々木 卓治  
 茨城県つくば市観音台 2 丁目 1 - 2 農林  
 水産省農業生物資源研究所内

(72)発明者 吳 健忠  
 茨城県つくば市上横場一杯塚446 - 1 社  
 団法人農林水産先端技術産業振興センター  
 農林水産先端技術研究所内  
 (72)発明者 山本 公子  
 茨城県つくば市上横場一杯塚446 - 1 社  
 団法人農林水産先端技術産業振興センター  
 農林水産先端技術研究所内  
 Fターム(参考) 2B030 AA02 AB03 AD20 CA01 CA17  
 CA19 CB03  
 4B024 AA05 AA08 BA63 CA03 DA01  
 GA06  
 4B065 AA89X AA89Y AB03 AC20  
 CA24 CA53