(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2015-504301
(P2015-504301A)
(43)公表日　平成27年2月12日(2015.2.12)

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード（参考）
A01H	***5/10***	***(2006.01)***	A01H	5/10	ZNA	2B030
A01H	***5/00***	***(2006.01)***	A01H	5/00	A	4B017
A01H	***1/00***	***(2006.01)***	A01H	1/00	A	4B018
A23L	***1/10***	***(2006.01)***	A23L	1/10	H	4B023
A23L	***1/30***	***(2006.01)***	A23L	1/30	B	4B024

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 141 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2014-539188 (P2014-539188)
(86)(22)出願日　平成24年11月2日 (2012.11.2)
(85)翻訳文提出日　平成26年6月30日 (2014.6.30)
(86)国際出願番号　PCT/AU2012/001349
(87)国際公開番号　WO2013/063653
(87)国際公開日　平成25年5月10日 (2013.5.10)
(31)優先権主張番号　61/556,051
(32)優先日　平成23年11月4日 (2011.11.4)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　61/645,530
(32)優先日　平成24年5月10日 (2012.5.10)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　513111709
アリスタ　シリアル　テクノロジーズ　プロプライエタリー　リミテッド
ＡＲＩＳＴＡ　ＣＥＲＥＡＬ　ＴＥＣＨＮＯＬＯＧＩＥＳ　ＰＴＹ　ＬＴＤ
オーストラリア連邦　オーストラリアンキャピタルテリトリー　２６０１，ブラックマウンテン，クリュニーズロスストリート，ブラックマウンテンラボラトリーズ
(74)代理人　110001302
特許業務法人北青山インターナショナル
(72)発明者　レジナ，アーメド
オーストラリア連邦　オーストラリアンキャピタルテリトリー　２９１３，パーマストン，コジオスコアヴェニュー　２１
最終頁に続く

(54)【発明の名称】高アミロースコムギ

(57)【要約】
胚およびデンプンを含むコムギ穀粒（Ｔｒｉｔｉｃｕｍ　ａｅｓｔｉｖｕｍ）であって、胚がＳＢＥＩＩａ－Ａ遺伝子の２つの同一対立遺伝子、ＳＢＥＩＩａ－Ｂ遺伝子の２つの同一対立遺伝子およびＳＢＥＩＩａ－Ｄ遺伝子の２つの同一対立遺伝子を含み、ＳＢＥＩＩａ遺伝子の各々のタンパク質の量（ｗ／ｗ）またはＳＢＥＩＩａ活性が対応する野生型遺伝子よりも低いタンパク質、およびこれら遺伝子の少なくとも１つが点変異を含み、デンプンが穀粒の抽出可能デンプンの比率として穀粒が少なくとも５０％（ｗ／ｗ）アミロース含有量を含むようなアミロースを含むコムギ穀粒。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
胚およびデンプンを含むコムギ穀粒において、当該胚がＳＢＥＩＩａ－Ａ遺伝子の２つの同一対立遺伝子、ＳＢＥＩＩａ－Ｂ遺伝子の２つの同一対立遺伝子およびＳＢＥＩＩａ－Ｄ遺伝子の２つの同一対立遺伝子を含み、当該ＳＢＥＩＩａ遺伝子の各々が、ある量のタンパク質（ｗ／ｗ）または対応する野生型遺伝子よりも低いＳＢＥＩＩａ活性を有するタンパク質を生み出し、当該遺伝子の少なくとも１つが点変異を含み、前記デンプンがアミロースを含み、穀粒の抽出可能デンプンの比率として穀粒が少なくとも５０％（ｗ／ｗ）のアミロース含有量を含むことを特徴とするコムギ穀粒。
【請求項２】
請求項１に記載の穀粒が、発生中の内胚乳に発現した場合にデンプン分岐活性を有する少なくとも１つのＳＢＥＩＩａタンパク質を含み、当該タンパク質がある量存在するか、または野生型コムギ穀粒中の対応するタンパク質の量または活性の２％から６０％、または１０％から５０％、または２％から３０％、または２％から１５％、または３％から１０％、または２％から２０％、または２％から２５％のデンプン分岐酵素活性を有することを特徴とする穀粒。
【請求項３】
請求項１に記載の穀粒において、前記穀粒中の前記ＳＢＥＩＩａタンパク質の量または活性が、野生型コムギ穀粒中のＳＢＥＩＩａの量または活性の２％よりも低いことを特徴とする穀粒。
【請求項４】
請求項１乃至３の何れか１項に記載の穀粒において、前記胚がヌルＳＢＥＩＩａ遺伝子を１個のみ有することを特徴とする穀粒。
【請求項５】
請求項１乃至３の何れか１項に記載の穀粒において、前記胚がヌルＳＢＥＩＩａ遺伝子を２個のみ有することを特徴とする穀粒。
【請求項６】
請求項５に記載の穀粒において、ウエスタンブロット分析で測定したＳＢＥＩＩａタンパク質を１個のみ有し、当該タンパク質がＳＢＥＩＩａ－Ａ，ＳＢＥＩＩａ－ＢおよびＳＢＥＩＩａ－Ｄ遺伝子の１つによりコードされ、前記対応する野生型遺伝子がコードするＳＢＥＩＩａタンパク質と比較して低減した発生中の内胚乳中で生産されたデンプン分岐酵素活性を有することを特徴とする穀粒。
【請求項７】
請求項１乃至６の何れか１項に記載の穀粒において、デンプン入りゲルの親和性ゲル電気泳動から分かるように、前記ＳＢＥＩＩａタンパク質が対応する野生型ＳＢＥＩＩａタンパク質に対して変化した移動性を有することを特徴とする穀粒。
【請求項８】
請求項１乃至５の何れか１項に記載の穀粒が、ウエスタンブロット分析から分かるように検出可能なＳＢＥＩＩａタンパク質を欠くことを特徴とする穀粒。
【請求項９】
請求項１乃至８の何れか１項に記載の穀粒において、点変異が１個存在し、これがアミノ酸置換変異であることを特徴とする穀粒。
【請求項１０】
請求項１または３乃至９の何れか１項に記載の穀粒において、前記ＳＢＥＩＩａ－Ａ，ＳＢＥＩＩａ－ＢまたはＳＢＥＩＩａ－Ｄ遺伝子の１つが点変異を含み、当該遺伝子がコードする前記タンパク質がデンプン分岐酵素活性を欠くことを特徴とする穀粒。
【請求項１１】
請求項１乃至１０の何れか１項に記載の穀粒が、前記ＳＢＥＩＩａ－ＢおよびＳＢＥＩＩａ－Ｄ遺伝子の少なくとも一部をそれぞれ欠失したＢおよびＤゲノム中の欠失変異であるヌル対立遺伝子を有し、前記ＳＢＥＩＩａ－Ａ遺伝子が点変異を含む；または前記ＳＢ

ＥＩＩａ－ＡおよびＳＢＥＩＩａ－Ｄ遺伝子の少なくとも一部をそれぞれ欠失したＡおよびＤゲノム中の欠失変異であるヌル対立遺伝子を有し、前記ＳＢＥＩＩａ－Ｂ遺伝子が点変異を含む；または前記ＳＢＥＩＩａ－ＡおよびＳＢＥＩＩａ－Ｂ遺伝子の少なくとも一部をそれぞれ欠失したＡおよびＢゲノム中の欠失変異であるヌル対立遺伝子を有し、前記ＳＢＥＩＩａ－Ｄ遺伝子が変異を含むことを特徴とする穀粒。

【請求項１２】

請求項１乃至１１の何れか１項に記載の穀粒において、前記胚がさらに、少なくとも１個が機能喪失変異である６個のＳＢＥＩＩｂ対立遺伝子を含むことを特徴とする穀粒。

【請求項１３】

請求項１乃至１２の何れか１項に記載の穀粒において、前記胚がＳＢＥＩＩｂ遺伝子のヌル対立遺伝子を有していない、またはＳＢＥＩＩｂ遺伝子のヌル対立遺伝子を２個のみ、または４個のみ、または６個有することを特徴とする穀粒。

【請求項１４】

請求項１乃至１２の何れか１項に記載の穀粒において、前記胚が、発生中の内胚乳中で生産された場合にデンプン分岐酵素活性を有するＳＢＥＩＩｂタンパク質を１個のみまたは２個のみ含む、または、ウエスタンブロット分析で検出できるＳＢＥＩＩｂを１個のみまたは２個のみ含むことを特徴とする穀粒。

【請求項１５】

請求項１乃至１２の何れか１項に記載の穀粒において、ＳＢＥＩＩａ－Ｂ遺伝子の少なくとも一部およびＳＢＥＩＩｂ－Ｂ遺伝子の少なくとも一部を欠く、好ましくはＳＢＥＩＩａ－Ｂ遺伝子および／またはＳＢＥＩＩｂ－Ｂ遺伝子の全体を欠く、Ｂゲノム中に欠失変異であるヌル変異を含む；または、ＳＢＥＩＩａ－Ｄ遺伝子の少なくとも一部およびＳＢＥＩＩｂ－Ｄ遺伝子の少なくとも一部を欠く、好ましくはＳＢＥＩＩａ－Ｄ遺伝子および／またはＳＢＥＩＩｂ－Ｄ遺伝子の全体を欠く、Ｄゲノム中に欠失変異であるヌル変異を含む；または、ＳＢＥＩＩａ－Ａ遺伝子の少なくとも一部およびＳＢＥＩＩｂ－Ａ遺伝子の少なくとも一部を欠く、好ましくはＳＢＥＩＩａ－Ａ遺伝子および／またはＳＢＥＩＩｂ－Ａ遺伝子の全体を欠く、Ａゲノム中に欠失変異であるヌル変異を含む；ことを特徴とする穀粒。

【請求項１６】

請求項１乃至１５の何れか１項に記載の穀粒において、当該穀粒中の全ＳＢＥＩＩタンパク質の量または活性が、野生型コムギ穀粒中の全ＳＢＥＩＩタンパク質の量または活性の６０％よりも低く、好ましくは２％よりも低いことを特徴とする穀粒。

【請求項１７】

請求項１乃至１６の何れか１項に記載の穀粒であって、当該穀粒が生存可能であることを特徴とする穀粒。

【請求項１８】

請求項１７に記載の穀粒において、当該穀粒の発芽率が野生型穀粒の発芽率の約７０％から約９０％、または約９０％から約１００％であることを特徴とする穀粒。

【請求項１９】

請求項１乃至１８の何れか１項に記載の穀粒において、前記変異の少なくとも１つ、２つ以上、または全てが、（ｉ）導入された変異、（ｉｉ）化学的薬剤、生物学的薬剤または放射線照射のような変異誘発薬剤を用いた変異誘発により親世代コムギ植物または種子中に導入された、または（ｉｉｉ）前記植物ゲノムを改変するために導入されたことを特徴とする穀粒。

【請求項２０】

請求項１乃至１９の何れか１項に記載の穀粒が、当該穀粒の抽出可能なデンプンの比率としてアミロース含有量が少なくとも６０％（ｗ／ｗ）または少なくとも６７％（ｗ／ｗ）であることを特徴とする穀粒。

【請求項２１】

請求項１乃至２０の何れか１項に記載の穀粒が、非遺伝子組み換え穀粒である、または

ＳＢＥＩＩａ遺伝子の発現を低下させるＲＮＡをコードするいかなる外来性核酸も有さないことを特徴とする穀粒。
【請求項２２】
請求項１乃至２１の何れか１項に記載の穀粒において、前記ＳＢＥＩＩａ活性および／またはＳＢＥＩＩｂ活性を、発生中の内胚乳中の酵素活性のアッセイにより、または収穫した穀粒中のＳＢＥＩＩａおよび／またはＳＢＥＩＩｂタンパク質の量の免疫学的または他の手法のアッセイにより、決定することを特徴とする穀粒。
【請求項２３】
請求項１乃至２２の何れか１項に記載の穀粒において、当該穀粒のデンプンが、
（ｉ）少なくとも２％の難消化性デンプンを含む；
（ｉｉ）低い相対血糖指数（ＧＩ）を含む；
（ｉｉｉ）低い相対アミロペクチンレベルを含む；
（ｉｖ）デンプン顆粒の歪み；
（ｖ）顆粒複屈折の低下；
（ｖｉ）膨潤体積の低下；
（ｖｉｉ）鎖長分布および／または分岐発生頻度の変化；
（ｖｉｉｉ）糊化温度およびより高いピーク温度の終了遅延；
（ｉｘ）粘度低下（ピーク粘度、糊化開始温度など）；
（ｘ）アミロペクチンの分子量増大；および
（ｘｉ）野生型コムギデンプン顆粒またはデンプンに対する、％結晶化度、％Ａ型またはＢ型デンプンの変化
からなる群から選択される、１つまたは２つ以上によって特徴付けられることを特徴とする穀粒。
【請求項２４】
請求項１乃至２３の何れか１項に記載の穀粒がコムギ植物中に含まれることを特徴とする穀粒。
【請求項２５】
請求項１乃至２４の何れか１項に記載の穀粒が発生中であることを特徴とする穀粒。
【請求項２６】
請求項１乃至２３の何れか１項に記載の穀粒が成熟して収穫された穀粒であることを特徴とする穀粒。
【請求項２７】
請求項１乃至２３の何れか１項に記載の穀粒が、粗挽き、挽き割り、湯通し、圧延、パール加工、製粉または粉砕穀粒などで、それがもはや発芽できないように処理されていることを特徴とする穀粒。
【請求項２８】
請求項１乃至２３の何れか１項に記載の穀粒を生産することを特徴とするコムギ植物。
【請求項２９】
請求項２８に記載のコムギ植物が繁殖可能な雌雄であることを特徴とするコムギ植物。
【請求項３０】
請求項１乃至２３の何れか１項に記載の穀粒から生産することを特徴とする全麦または小麦粉。
【請求項３１】
請求項１乃至２３の何れか１項に記載の穀粒から生産したことを特徴とするコムギデンプン顆粒またはコムギデンプン。
【請求項３２】
請求項３１に記載のデンプン顆粒またはデンプンにおいて、前記デンプンの比率として、少なくとも５０％（ｗ／ｗ）、または少なくとも６０％（ｗ／ｗ）、または少なくとも６７％（ｗ／ｗ）のアミロースを含んでおり：
（ｉ）野生型コムギデンプン顆粒またはデンプンに対して２％－３０％の量の全ＳＢＥ

ＩＩまたはＳＢＥＩＩａを含む；
（ｉｉ）少なくとも２％の難消化性デンプンを含む；
（ｉｉｉ）低い相対血糖指数（ＧＩ）を含む；
（ｉｖ）低い相対アミロペクチンレベルを含む；
（ｖ）デンプン顆粒の歪み；
（ｖｉ）顆粒複屈折の低下；
（ｖｉｉ）膨潤体積の低下；
（ｖｉｉｉ）鎖長分布および／または分岐発生頻度の変化；
（ｉｘ）糊化温度およびより高いピーク温度の終了遅延；
（ｘ）粘度低下（ピーク粘度、糊化開始温度など）；
（ｘｉ）アミロペクチンの分子量増大；および／または
（ｘｉｉ）野生型コムギデンプン顆粒またはデンプンに対する、％結晶化度、％Ａ型またはＢ型デンプンの変化
の１つまたは２つ以上によって特徴付けられることを特徴とするデンプン顆粒またはデンプン。

【請求項３３】
請求項１乃至２３、または２６、または２７の何れか１項に記載の穀粒、請求項３０に記載の全麦または小麦粉、請求項３１または３２に記載のデンプン顆粒またはデンプンを含むことを特徴とする食品原材料。

【請求項３４】
請求項３３に記載の食品原材料において、前記穀粒が粗挽き、挽き割り、湯通し、圧延、パール加工、製粉または粉砕穀粒またはこれらの組み合わせによる穀粒であることを特徴とする食品原材料。

【請求項３５】
食品または飲料製品が、乾燥重量で少なくとも１０％レベルの食品または飲料原材料を含み、当該原材料が請求項１乃至２３、または２６、または２７の何れか１項に記載のコムギ穀粒、請求項３０に記載の全麦または小麦粉、請求項３１または３２に記載のデンプン顆粒またはデンプンであることを特徴とする食品または飲料製品。

【請求項３６】
請求項１乃至２３、または２６、または２７の何れか１項に記載の穀粒、または請求項３０に記載の全麦または小麦粉、または請求項３１または３２に記載のコムギデンプン顆粒またはコムギデンプンを少なくとも１０重量％レベルで、およびアミロースレベルが約５０％（ｗ／ｗ）よりも低いコムギ穀粒、またはこれらより得られた小麦粉、全麦、デンプン顆粒またはデンプンを含むことを特徴とする組成または配合。

【請求項３７】
穀粒中の全デンプン量の比率としてアミロース含有量が少なくとも５０％（ｗ／ｗ）、または少なくとも６０％（ｗ／ｗ）、または少なくとも６７％（ｗ／ｗ）である穀粒を生産するコムギ植物を生産する工程において、当該工程が（ｉ）ＳＢＥＩＩａ－Ａ，ＳＢＥＩＩａ－Ｂ，ＳＢＥＩＩａ－Ｄ，ＳＢＥＩＩｂ－Ａ，ＳＢＥＩＩｂ－Ｂ，ＳＢＥＩＩｂ－Ｄからなる群から選択した１つ、または２つ、または３つのＳＢＥＩＩａまたはＳＢＥＩＩｂ遺伝子の各々の点変異をそれぞれが含む２つの親世代コムギ植物を交雑するステップ、または当該点変異を含む親世代植物を変異導入するステップと；（ｉｉ）前記交雑または変異導入により得た植物または穀粒、またはこれより得た子孫植物または穀粒を、当該植物または穀粒からのＤＮＡ、ＲＮＡ、タンパク質、デンプン顆粒またはデンプンを分析することでスクリーニングするステップと；および（ｉｉｉ）ＳＢＥＩＩａまたはＳＢＥＩＩａデンプン分岐活性を欠く繁殖可能植物を選択するステップと；を具えることを特徴とする工程。

【請求項３８】
請求項２１に記載の工程において、前記選択した繁殖可能コムギ植物の穀粒が請求項１乃至２３の何れか１項に記載の特性により特徴付けられていることを特徴とする工程。

【請求項３９】
コムギ植物または穀粒をスクリーニングする方法において、当該方法が（ｉ）野生型またはコントロール植物または穀粒中の量または活性に対するＳＢＥＩＩａおよび／またはＳＢＥＩＩｂの量または活性を、測定するステップと；および（ｉｉ）請求項１乃至２３の何れか１項に係わる穀粒を生産する植物を選択する、またはこの穀粒を選択するステップと；を具えることを特徴とする方法。
【請求項４０】
食料または飲料を生産する工程において、（ｉ）請求項１乃至２３の何れか１項に記載の穀粒を得るステップと；（ｉｉ）当該穀粒を加工して食料または飲料原材料を生産するステップと；（ｉｉｉ）ステップｉｉからの食品または飲料原材料を別の食料または飲料原材料に加えて当該食料または飲料を生産するステップと；を具えることを特徴とする工程。
【請求項４１】
患者が必要とする代謝健康状態、腸健康状態または心臓血管健康状態の１つまたは２つ以上のパラメータを改善する、または糖尿病、腸疾患または心臓血管疾患のような代謝疾患の重篤性または発症率を予防または低下させる方法であって、前記方法が当該患者に請求項１乃至２３の何れか１項に記載の穀粒、または請求項３５に記載の食料または飲料製品を提供するステップを具えることを特徴とする方法。
【請求項４２】
患者の代謝健康状態、腸健康状態または心臓血管健康状態の１つまたは２つ以上のパラメータの改善、または患者の代謝、腸または心臓血管疾患の重篤性または発症率の予防または低下に使用する請求項３５に記載の食料または飲料製品。
【請求項４３】
穀粒を生産する工程において、（ｉ）請求項２８または２９に係わるコムギ植物を得るステップと；（ｉｉ）当該植物からコムギ穀粒を収穫するステップ、および（ｉｉｉ）選択的に当該穀粒を加工するステップと；を具えることを特徴とする工程。
【請求項４４】
デンプンを生産する工程において、（ｉ）請求項１乃至２３の何れか１項に記載のコムギ穀粒を得るステップと；および（ｉｉ）当該穀粒よりデンプンを抽出してデンプンを生産するステップと；を具えることを特徴とする工程。
【請求項４５】
コムギ穀粒を取引する方法において、請求項１乃至２６の何れか１項に記載のコムギ穀粒を得るステップと；および当該得た穀粒を金銭的利益のために取引するステップと；を具えることを特徴とする方法。
【請求項４６】
請求項４５に記載の方法において、前記コムギ穀粒を得るステップがコムギ穀粒を栽培または収穫するステップを具えることを特徴とする方法。
【請求項４７】
請求項４６に記載の方法において、前記コムギ穀粒を得るステップがさらにコムギ穀粒を保存するステップを具えることを特徴とする方法。
【請求項４８】
請求項４６または４７に記載の方法において、前記コムギ穀粒を得るステップがさらにコムギ穀粒を異なった場所へ輸送するステップを具えることを特徴とする方法。
【請求項４９】
コムギ穀粒入りの容器を生産する工程が：
（ａ）請求項１乃至２３の何れか１項で定義したコムギ穀粒を含むコムギ茎を刈り取るステップと；
（ｂ）当該茎を脱穀および／または吹き分けて当該穀粒をもみ殻から分離するステップと；および
（ｃ）ステップｂで分離した穀粒をふるい分けおよび／または分類し、ふるい分けおよ

び／または分類した穀粒を容器に入れ、穀粒入りの容器を生産するステップと；を具えることを特徴とする工程。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本出願では全体を通して、かっこ内で引用したものを含めて様々な文献を参照している。かっこ内で引用した文献の完全な書誌事項は、明細書の終わりの特許請求の範囲の前に、アルファベット順でリストした。全ての参照文献の開示事項は、本発明に関連する最新技術を完全に網羅するために、本出願に引用により組み込まれてる。

【０００２】

本明細書は、高アミロースデンプンを有する六倍体コムギ植物を得る方法、このような植物の使用、特にそれから得られる穀粒またはデンプンの様々な範囲の食品および非食品製品における使用について記載する。

【背景技術】

【０００３】

本明細書中のあらゆる先行技術への言及は、この先行技術があらゆる任意の国における一般常識の一部を形成することの認知またはいかなる形の示唆でもなく、そのように理解されるべきではない。

【０００４】

過去１０年間に、植物生活環および植物生産を支える、分子、遺伝子、および細胞事象について、多くの知見が得られている。１つの特に重要な植物性産物は、コムギ穀粒である。コムギ穀粒は、多数の国々における主食であり、全世界人口の食物キロジュールの少なくとも２０％を提供する。デンプンはコムギ穀物の主要構成要素であり、広範囲の食品および非食品中で使用される。デンプン特性は多様であり、それらは特定の最終用途に対するコムギデンプンの適合性を定める上で、重要な役割を果たす。多大な全体的消費量にもかかわらず、そして最終製品の品質に対するデンプンの機能性の重要性に対する意識の高まりにもかかわらず、コムギ中の遺伝子バリエーションと、デンプン特性に対するその正確な影響の調査は、その他の商業的に重要な作物に遅れを取っている。

【０００５】

パンコムギ（Ｔｒｉｔｉｃｕｍ　ａｅｓｔｉｖｕｍ）は、３対の同祖染色体画定ゲノムＡ、Ｂ、およびＤを有する六倍体である。穀粒の内胚乳は、母親細胞からの２個の半数体補体と、父親細胞からの１個の半数体補体を含んでなる。コムギ穀粒の胚は、母親および父親の各細胞からの１個の半数体補体を含んでなる。六倍数性は、有用なコムギ変種を研究し開発する上で、著しい障害と見なされてきた。事実上、コムギの同祖遺伝子がどのように相互作用するか、それらの発現がどのように調節されるのか、そして同祖遺伝子によって生成される異なるタンパク質がどのように別々にまたは協力して機能するのかについては、非常にわずかしか知られていない。

【０００６】

穀類デンプンは、アミロースとアミロペクチンの２種類のグルコースポリマーから構成される。アミロースとアミロペクチンの比率は、（ｉ）コムギ穀粒およびコムギデンプンの健康上の利点、および（ｉｉ）コムギデンプンを含んでなる製品の最終品質における主要決定要因であると思われる。

【０００７】

アミロースが、本質的にα－１，４結合したグルコース単位の直鎖ポリマーであるのに対し、アミロペクチンは高度に分枝して、α－１，６グルコシド単位結合が直鎖を連結する。

【０００８】

高アミロースデンプンは、それらの健康上の利点のために特に興味深い。高アミロースを含んでなる食品は、とりわけ食物繊維の一形態である難消化性デンプンを天然により多く含むことが分かっている。ＲＳは、小腸内で消化または吸収されない、デンプンまたは

デンプン消化産物である。難消化性デンプンは、腸管健康を促進して、結腸直腸がん、ＩＩ型糖尿病、肥満症、心疾患、および骨粗鬆症などの疾患から保護する上で重要な役割を果たしていると、以前にも増して見なされるようになってきた。高アミロースデンプンは、腸の健康を促進する手段として食物中で使用するために、トウモロコシおよびオオムギなどの特定の穀粒中で開発されてきた。難消化性デンプンの有益な効果は、大腸への栄養素の提供から得られ、その中で腸管細菌叢にエネルギー源が供給されて、発酵されて、とりわけ短鎖脂肪酸が形成される。これらの短鎖脂肪酸は、結腸細胞のための栄養素を提供し、大腸全域で特定の栄養素の取り込みを高めて、大腸の生理学的活性を促進する。概して、難消化性デンプンまたはその他の食物繊維が大腸に提供されなければ、大腸は代謝的に比較的非活動状態になる。したがって高アミロース製品は、繊維摂取の増大を容易にする可能性を有する。高アミロースコムギ穀粒、またはデンプンなどのそれらの製品を摂取することの可能な健康上の利点のいくつかとしては、糖およびインシュリンおよび脂質レベルの調節、腸管健康の促進、満腹感を促進する低カロリー価の食品の製造、便通改善、糞便水分量、プロバイオティクス細菌増殖の促進、および糞便中胆汁酸排泄量増大におけるその役割が挙げられる。

【０００９】

ほとんどの加工デンプン質食品は、非常にわずかなＲＳを含有する。野生型小麦粉および従来の配合と、ベーキング工程を使用して作られたパンは、＜１％のＲＳを含有する。比較すると、同一工程と貯蔵条件を使用して焼かれているが、改質高アミロースコムギを含有するパンは、１０倍程度により高いレベルのＲＳを有した（国際公開第２００６／０６９４２２号パンフレットを参照されたい）。ヒト食餌中の数少ないＲＳの豊富な供給源の１つである豆類は、常態では＜５％のＲＳレベルを含有する。したがって成人において常態で摂取される量（例えば２００ｇ／日）の高アミロースコムギパンの摂取は、少なくとも５～１２ｇのＲＳを容易に供給する。したがって食品中への高アミロースコムギの組み込みは、ＲＳの平均１日摂取量が、約５ｇのみであると推定される、先進国のＲＳの日常摂取にかなり貢献する可能性がある。

【００１０】

デンプンは、食品、製紙、および化学産業で広く使用されている。デンプンの物理的構造は、食品または非食品または工業製品のためのデンプンの栄養と取り扱い特性に、重要な影響を及ぼし得る。特定の特徴は、アミロペクチン鎖長分布、結晶性の程度とタイプをはじめとするデンプン構造、および糊化温度、粘度、および膨潤体積などの特性の指標と見なし得る。アミロペクチン鎖長の変化は、アミロペクチンの結晶化度の変化、糊化または老化の指標であり得る。

【００１１】

未改質原料によって常態では提供されない機能性を提供する、化学的にまたは別の方法で改質されたデンプンを食品中で使用し得る一方で、このような加工は価値あるその他の構成要素を変質させがちであり、または改質に伴う工程のために望ましくないという認識が持たれがちである。したがって食品中で未改質形態で使用し得る、構成要素源を提供することが好ましい。

【００１２】

デンプンは、最初に、植物において葉などの光合成組織の葉緑体中で、移動デンプンの形態で合成される。これは引き続く暗期中に動員されて、シンク器官への輸送およびエネルギー代謝のための、種子または塊茎などの器官中への貯蔵のための炭素を供給する。デンプンの合成と長期貯蔵は、内胚乳などの貯蔵器官のアミロプラスト内で起きて、デンプンは、最大直径１００μｍの半晶質顆粒として蓄積される。顆粒は、アミロースとアミロペクチンの双方を含有し、前者が典型的に天然デンプン顆粒中の非晶質物質であるのに対し、後者は直鎖グルコシド鎖のスタッキングによる半晶質である。顆粒はまた、デンプン生合成に関与するタンパク質のいくつかも含有する。

【００１３】

デンプンシンターゼは、内胚乳中で４つの必須ステップを遂行する。ＡＤＰ－グルコー

スピロホスホリラーゼ（ＡＤＧＰ）は、グルコース－１－リン酸とＡＴＰからのＡＤＰ－グルコースの合成を触媒する。次にデンプンシンターゼが、α－１，４結合グルコース単位末端へのＡＤＰ－グルコースの移動を促進する。３番目に、デンプン分枝酵素（ＳＢＥ）が、α－ポリグルカン中に新しいα－１，６結合を形成する。次にデンプン脱分枝酵素（ＳＤＢＥ）が、完全に解明されていない機序を通じて、分枝結合のいくつかを除去する。

【００１４】

高等植物中の標準的デンプン顆粒合成には、少なくともこれらの４つの機能が必要であることは明らかであるが、４つの機能の１つに関与する酵素の複数のイソ型が、高等植物内胚乳に見られる。いくつかのイソ酵素の特異的役割が、変異解析に基づいて、または遺伝子組換えアプローチを使用した遺伝子発現レベルの修正を通じて、提案されている（Ａｂｅｌ ｅｔ ａｌ．，１９９６；Ｊｏｂｌｉｎｇ ｅｔ ａｌ．，１９９９；Ｓｃｈｗａｌｌ ｅｔ ａｌ．，２０００）。しかし、デンプン生合成に対する各活性の各イソ型の正確な貢献度は依然として分かっておらず、これらの貢献度は種間で顕著に異なるようである。

【００１５】

穀物の内胚乳中にはＡＤＰ－グルコースピロホスホリラーゼ（ＡＤＧＰ）の２つのイソ型が存在し、１つはアミロプラスト内、１つは細胞質内にある。各形態は、２つのサブユニット型から構成される。トウモロコシ中のｓｈｒｕｎｋｅｎ（ｓｈ２）およびｂｒｉｔｔｌｅ（ｂｔ２）変異体は、それぞれ大型および小型サブユニットの損傷に相当する。

【００１６】

コムギ中のアミロース／アミロペクチン比を調節するストラテジーのために、いくつかの研究がデンプンシンターゼ酵素に注目している（Ｓｅｓｔｉｌｉ ｅｔ ａｌ．２０１０を参照されたい）。

【００１７】

デンプン顆粒内の局在化に限定されるイソ型（顆粒結合デンプンシンターゼ（ＧＢＳＳ））、顆粒と可溶性画分の間で分割される２つの型（ＳＳＩおよびＳＳＩＩ）、そして全て可溶性画分中に位置する第４の型（ＳＳＩＩＩ）の、４つのデンプンシンターゼ（ＳＳ）クラスが穀物の内胚乳に見られる。ＧＢＳＳはアミロース合成に必須であることが示されており、ＳＳＩＩおよびＳＳＩＩＩ中の変異は、アミロペクチン構造を変化させることが示されている。

【００１８】

ＳＧＰ－１（ＳＳＩＩａ）タンパク質を完全に欠く変異コムギ植物は、Ａ、Ｂ、およびＤゲノム特異的形態のＳＧＰ－１（ＳＳＩＩ）タンパク質を欠く系統の交雑によって生じる（Ｙａｍａｍｏｒｉ ｅｔ ａｌ．，２０００）。ＳＳＩＩヌル種子の試験は、変異が、アミロペクチン構造の変化、デンプン顆粒の変形、および野生型レベルからの約８％の増大に相当するデンプンの３０～３７％への相対的アミロース含有量の上昇をもたらしたことを示した（Ｙａｍａｍｏｒｉ ｅｔ ａｌ．，２０００）。（どちらもヨウ素結合のための）比色分析と測定電流滴定、およびコンカナバリンＡ法によってアミロースを測定した。ＳＳＩＩ ヌル変異体からのデンプンは、同等の非変異植物からのデンプンと比較して、糊化温度の低下を示した。デンプン含有量は、野生型の６０％から、ＳＳＩＩ－ヌル穀粒中の５０％未満まで低下した。

【００１９】

トウモロコシでは、ｄｕｌｌ１変異は、内胚乳中のデンプン含有量低下とアミロースレベル増大を引き起こし、変化の程度は、遺伝的背景、および残っているアミロペクチン中の分枝程度の増大に左右された。変異に対応する遺伝子は、トランスポゾンミューテーター（Ｍｕ）を使用した、トランスポゾン標識ストラテジーによって同定、単離され、デンプンシンターゼＩＩ（ＳＳＩＩ）と称される酵素をコードすることが示された。酵素は、今や穀物のＳＳＩＩＩファミリーの構成員として認識されている。変異内胚乳は、ｄｕｌｌ１変異に関連してＳＢＥＩＩａの活性レベルが低下した。これらの知見が、その他の穀

類にもあてはまるかどうかは分かっていない。

【００２０】

穀粒デンプン中のアミロース比が増大しているオオムギ系統が、同定されている。これらとしては、相対的アミロース含有量が約４５％であり、穀粒デンプン中のアミロースレベルを約６５～７０％上昇させるオオムギのＳＳＩＩａ遺伝子の化学的突然変異を有するＨｉｇｈ Ａｍｙｌｏｓｅ Ｇｌａｃｉｅｒ（ＡＣ３８）が挙げられる（国際公開第０２／３７９５５Ａ１号パンフレット；Ｍｏｒｅｌｌ ｅｔ ａｌ．，２００３）。デンプンは、糊化温度の低下を示した。

【００２１】

植物では、ＳＢＥＩおよびＳＢＥＩＩのＳＢＥの２つの主要クラスが知られている。ＳＢＥＩＩは、穀類で、ＳＢＥＩＩａおよびＳＢＥＩＩｂの２つにさらに分類し得る。ＳＢＥの追加的な形態である、コムギからの推定上の１４９ｋＤａのＳＢＥＩと、オオムギからの５０／５１ｋＤａのＳＢＥもまた、いくつかの穀類で報告される。

【００２２】

配列アラインメントは、ヌクレオチドおよびアミノ酸レベルの双方で高度な配列類似性を明らかにして、ＳＢＥＩ、ＳＢＥＩＩａ、およびＳＢＥＩＩｂクラスに分類できるようにする。概してＳＢＥＩＩａおよびＳＢＥＩＩｂは、特に遺伝子の中央領域で互いに約８０％のヌクレオチド配列同一性を示す。

【００２３】

トウモロコシおよびイネでは、高アミロース表現型は、ａｍｙｌｏｓｅ ｅｘｔｅｎｄｅｒ（ａｅ）遺伝子としてもまた知られている、ＳＢＥＩＩｂ遺伝子の損傷から得られることが示されている（Ｂｏｙｅｒ ａｎｄ Ｐｒｅｉｓｓ，１９８１，Ｍｉｚｕｎｏ ｅｔ ａｌ．，１９９３；Ｎｉｓｈｉ ｅｔ ａｌ．，２００１）。これらのＳＢＥＩＩｂ変異体では、内胚乳デンプン穀粒が異常な形態を示し、アミロース含有量が顕著に上昇して、残留アミロペクチンの分枝発生頻度が低下し、短鎖（＜ＤＰ１７、特にＤＰ８－１２）の比率がより低かった。さらにデンプンの糊化温度が上昇した。これに加えて、アミロースとアミロペクチンの「中間体」と定義される物質のかなり大きいプールがあった。（Ｂｏｙｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９８０，Ｔａｋｅｄａ ｅｔ ａｌ１９９３ｂ）。対照的に、ＳＢＥＩＩａ遺伝子が変異しているトウモロコシ植物では、葉のデンプンは変化したが、ｍｕｔａｔｏｒ（Ｍｕ）挿入因子と、その結果ＳＢＥＩＩａタンパク質発現を欠くために、内胚乳デンプンの分枝については野生型植物と識別不能であった（Ｂｌａｕｔｈ ｅｔ ａｌ．，２００１）。トウモロコシとイネの双方で、ＳＢＥＩＩａおよびＳＢＥＩＩｂ遺伝子は、ゲノム中で連鎖しない。

【００２４】

ＳＢＥＩＩａ、ＳＢＥＩＩｂ、およびＳＢＥＩはまた、内胚乳およびその他の組織中の時間的および空間的発現パターンによって区別されてもよい。ＳＢＥＩは、コムギおよびトウモロコシ中で、内胚乳発生中期以降に発現される（Ｍｏｒｅｌｌ ｅｔ ａｌ．，１９９７）。対照的に、ＳＢＥＩＩａおよびＳＢＥＩＩｂは、内胚乳発生の初期段階から発現される。トウモロコシでは、ＳＢＥＩＩｂが内胚乳中の優勢な形態であるのに対し、ＳＢＥＩＩａは葉の中に高発現レベルで存在する（Ｇａｏ ｅｔ ａｌ．，１９９７）。イネでは、ＳＢＥＩＩａおよびＳＢＥＩＩｂが、内胚乳におよそ等量で見られる。しかし発現のタイミングと組織に、相違がある。ＳＢＥＩＩａが、種子発生の初期段階に発現されて開花の３日後に検出され、葉の中で発現された一方で、ＳＢＥＩＩｂは、開花の３日後に検出可能でなく、開花７～１０日後の発生中の種子中で最も豊富であり、葉の中では発現されなかった。コムギ内胚乳中では、ＳＢＥＩ（Ｍｏｒｅｌｌ ｅｔ ａｌ，１９９７）が可溶性画分のみに見られる一方、ＳＢＥＩＩａおよびＳＢＥＩＩｂは、可溶性およびデンプン顆粒関連画分の双方に見られる（Ｒａｈｍａｎ ｅｔ ａｌ．，１９９５）。

【００２５】

トウモロコシの超高アミロース変種が、しばらく前から知られている。非常に高いアミロース含有量（＞９０％）を含有する低アミロペクチンデンプントウモロコシは、ＳＢＥ

ＩＩ活性のほぼ完全な不活性化と合わせた、ＳＢＥＩ活性のかなりの低下によって獲得された（Ｓｉｄｅｂｏｔｔｏｍ　ｅｔ　ａｌ．，１９９８）。

【００２６】

ジャガイモでは、アンチセンス法による塊茎中の主要ＳＢＥ（ＳＢＥ　Ｂ、ＳＢＥＩに相当する）の下方制御が、いくつかの新規デンプン特性をもたらしたが、アミロース含有量は変化させなかった（Ｓａｆｆｏｒｄ　ｅｔ　ａｌ．，１９９８）。あまり豊富でないＳＢＥ形態（ＳＢＥＡ、穀類のＳＢＥＩＩに類似する）のアンチセンス阻害は、アミロース含有量に中程度の３８％の増大をもたらした（Ｊｏｂｌｉｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，１９９９）。しかしＳＢＥＩＩおよびＳＢＥＩの双方の下方制御は、ＳＢＥＩＩのみの下方制御よりもはるかに大きい６０～８９％の増大を相対的アミロース含有量にもたらした（Ｓｃｈｗａｌｌ　ｅｔ　ａｌ．，２０００）。

【００２７】

国際公開第２００５／００１０９８号パンフレットおよび国際公開第号２００６／０６９４２２パンフレットは、内胚乳中のＳＢＥＩＩａおよび／またはＳＢＥＩＩｂ発現を低下させる外来性二本鎖ＲＮＡコンストラクトを含んでなる、遺伝子組換え六倍体コムギについて特に記載する。遺伝子組換え系統からの穀粒は、ＳＢＥＩＩａおよび／またはＳＢＥＩＩｂタンパク質が皆無であり、またはタンパク質レベルが低下していた。内胚乳からのＳＢＥＩＩａタンパク質の喪失には、相対的アミロースレベルの５０％を上回る増大が伴った。ＳＢＥＩＩｂタンパク質レベルの損失は、穀粒デンプン中のアミロース比を実質的に変化させないようであった。実質的にＳＢＥＩＩａおよびＳＢＥＩＩｂタンパク質発現を欠くＳＢＥＩＩａおよび／またはＳＢＥＩＩｂ三重ヌル変異体が、アミロースレベルのさらなる上昇をもたらすことが提案されたが、確立されてはいなかった。しかし先行技術から、全デンプンの少なくとも５０％の比率の高アミロースレベルを提供するのに、いくつのＳＢＥＩＩａおよび／またはＳＢＥＩＩｂ変異対立遺伝子が必要であるかは、知られておらず、または予測可能でなかった。三重ヌル遺伝子型の穀粒が、生存できるかどうか、またはコムギ植物が稔性かどうかもまた知られていなかった。

【００２８】

当該技術分野において、改善された高アミロースコムギ植物と同植物を産生する方法に対する必要がある。

【発明の概要】

【００２９】

本明細書全体を通じて、文脈上他の意味に解すべき場合を除き、「含んでなる（ｃｏｍｐｒｉｓｅ）」と言う語、または「含んでなる（ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ）」または「含んでなる（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」などのバリエーションは、述べられた要素または整数または要素群または整数群の包含を暗示するが、いなかるその他の要素または整数または要素群または整数群の排除も暗示しないものと理解される。「からなる（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ　ｏｆ）」が意味するのは、「からなる（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ　ｏｆ）」という表現に続く如何なるものを含みかつ限定されるということである。したがって、「からなる（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ　ｏｆ）」という表現が示すのは、列挙した要素が必要または義務であり、他の要素が存在しないということである。「本質的に・・・からなる（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ　ｅｓｓｅｎｔｉａｌｌｙ　ｏｆ）」が意味するのは、「本質的に・・・からなる（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ　ｅｓｓｅｎｔｉａｌｌｙ　ｏｆ）」という表現の後に列挙する如何なる要素も含み、列挙する要素に関する開示で特定された活動または作用に、干渉したり関与したりしないような他の要素に限定されるということである。したがって、「本質的に・・・からなる（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ　ｅｓｓｅｎｔｉａｌｌｙ　ｏｆ）」という表現が示すのは、列挙した要素が必要または義務であるが、他の要素に関しては、任意ということではなく、列挙した要素の活動または作用へ影響を与えるか否かによって存在したりしなかったりするものではない。

【００３０】

本明細書の用法では、文脈上例外が明記されていない限り、単数形「ａ」、「ａｎ」、

および「ｔｈｅ」は、複数の態様を含む。したがって例えば「１個の変異（ａ　ｍｕｔａｔｉｏｎ）」への言及は、１個の変異ならびに２個以上の変異を含み；「植物（ａ　ｐｌａｎｔ）」への言及は、１つの植物ならびに２つ以上の植物を含む。

【００３１】

特に断りのない限り、本明細書中の各実施形態は、変更すべきところは変更して、他の全ての実施形態に適用される。

【００３２】

遺伝子およびその他の遺伝物質（例えばｍＲＮＡ、コンストラクトなど）は、斜体で表され、それらのタンパク様発現産物は、非斜体で表される。したがって例えばＳＢＥＩＩａは、ＳＢＥＩＩａの発現産物である。

【００３３】

ヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、配列識別子番号（配列番号）によって言及される。配列番号は、配列識別子＜４００＞１（配列番号１）、＜４００＞２（配列番号２）などの番号に対応する。配列表は、特許請求の範囲の後に提供される。配列表中の配列を説明した表は、実施例の後に提供される。

【００３４】

特に断りのない限り、本明細書で使用される全ての技術的および科学的用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。本発明の実施または試験では、本明細書に記載のものと類似したまたは同等の方法および材料を使用し得るが、適切な方法および材料について記載する。

【００３５】

本発明は、改質デンプン特性を有する一連のコムギ植物を提供する。

【００３６】

本明細書は、態様の１つとして、胚芽およびデンプンを含むコムギ穀粒（Ｔｒｉｔｉｃｕｍ　ａｅｓｔｉｖｕｍ）を記載している。。いくつかの実施例では、この胚芽は、ここで、ＳＢＥＩＩａ遺伝子の各々がある量のタンパク質（ｗ／ｗ）または対応する野生型遺伝子よりもＳＢＥＩＩａ活性が低いタンパク質を生み出し、好ましくは１つまたは２つまたは３つのＳＢＥＩＩａ遺伝子がＳＢＥＩＩａ活性のあるタンパク質を生み出さず、遺伝子の少なくとも１つが点変異を有し、２つの同一ＳＢＥＩＩａ－Ａ対立遺伝子、２つの同一ＳＢＥＩＩａ－Ｂ対立遺伝子および２つの同一ＳＢＥＩＩａ－Ｄ対立遺伝子を含み、このデンプンは、穀粒の抽出可能デンプンの比率として穀粒が少なくとも５０％（ｗ／ｗ）のアミロース含有量を有するアミロースを含む。言い換えると、このコムギ穀粒は、３つのＳＢＥＩＩａ遺伝子の各々につき、変異対立遺伝子に関して同型接合である。

【００３７】

いくつかの実施例では、穀粒は、生長内胚乳中で発現したときにデンプン分岐活性を有する少なくとも１つのＳＢＥＩＩａタンパク質を含み、このタンパク質は、野生型コムギ穀粒中の対応するタンパク質の量または活性の２％から６０％の間、または１０％から５０％の間、または２％から３０％の間、または２％から１５％の間、または３％から１０％の間、または２％から２０％の間、または２％から２５％の間の量が存在し、またはこれらのパーセンテージのデンプン分岐酵素活性を有する。好ましくは、このＳＢＥＩＩａタンパク質、すなわちＳＢＥＩＩａ－Ａタンパク質、ＳＢＥＩＩａ－Ｂタンパク質またはＳＢＥＩＩａ－Ｄタンパク質は、対応する野生型ＳＢＥＩＩａタンパク質に対して１箇所のアミノ酸置換を有する。これはさらに、デンプンへの結合に関して変化した親和性を示すものでもよい。変化した親和性はデンプンへの親和性の増加であってもよく、またはデンプンへの親和性の減少であることが好ましい。

【００３８】

一実施例では、穀粒中のＳＢＥＩＩａタンパク質の量または活性は、野生型コムギ穀粒中のＳＢＥＩＩａタンパク質の量または活性の２％よりも低く、実質的には存在せず、例えばウエスタンブロットアッセイで検出できないことが好ましい。このようなコムギ穀粒を、ここでは三重ヌルＳＢＥＩＩａ変異株と称する。

【００３９】
実施例の１つでは、穀粒は、対応する野生型タンパク質に対してこのタンパク質中に１箇所のアミノ酸置換があることにより非活性であるが、野生型に対して穀粒中で少なくとも５０％のレベルで存在するような、ＳＢＥＩＩａタンパク質を含む。代替的に、そのようなタンパク質は野生型に対して５０％よりも低いレベルで存在してもよい。一実施例では、このタンパク質は、野生型に対して切断されたポリペプチドである。このようなポリペプチドは、未成熟翻訳終始（ナンセンス）コドンを含む変異ＳＢＥＩＩａ遺伝子から生産される。この穀粒はこのようなタンパク質を２つまたは３つも有する。この穀粒はさらに、１つのみか２つのみのＳＢＥＩＩｂタンパク質を含み、または１つのみか２つのみの活性型ＳＢＥＩＩｂタンパク質を含む。

【００４０】
いくつかの実施例では、胚芽は１つのみのヌル　ＳＢＥＩＩａ遺伝子を含む。

【００４１】
他の実施例では、胚芽は２つのみのヌル　ＳＢＥＩＩａ遺伝子を含む。

【００４２】
他の実施例では、胚芽は３つのヌル　ＳＢＥＩＩａ遺伝子を含む。好ましい実施例では、穀粒はＳＢＥＩＩａタンパク質を実質的に欠いている。これらの実施例では、ヌルＳＢＥＩＩａ遺伝子の各々が、独立して、ＳＢＥＩＩａ遺伝子の部分的または全体的な欠損、またはＳＢＥＩＩａ遺伝子の少なくとも１つが点変異を有する限り、未成熟翻訳終始変異のような点変異、またはスプライス部位変異、または挿入、またはコード化ＳＢＥＩＩａポリペプチドを不活性化するアミノ酸置換変異を含む対立遺伝子からなるのが好ましい。好ましい実施例では、胚芽中の、１つ、２つ、または１つよりも多くない、または２つよりも多くないＳＢＥＩＩａ遺伝子が全体的に欠損している。この欠損は、同じゲノム上でリンクしたＳＢＥＩＩｂ遺伝子も部分的または全体的に欠いている。さらに好ましい実施例では、胚芽は、３つのヌル　ＳＢＥＩＩａ遺伝子だけでなく、１つの（しかし１つよりも多くない）または２つの（しかし２つよりも多くない）ＳＢＥＩＩｂ遺伝子のヌル対立遺伝子に関して同型接合であり、各々が独立してＳＢＥＩＩｂ遺伝子の部分的または全体的な欠損、または未成熟翻訳終始変異のような点変異、スプライス部位変異、挿入、またはコード化ＳＢＥＩＩｂポリペプチドを不活性化するアミノ酸置換変異であり得る。言い換えると、胚芽は、以下に説明する１つの（しかし１つよりも多くない）、または２つの（しかし２つよりも多くない）タイプＩ変異を含む。そのような穀粒は少なくとも１つのＳＢＥＩＩｂタンパク質を含む。

【００４３】
いくつかの実施例では、穀粒はウエスタンブロット解析で決定されるただ１つのＳＢＥＩＩａタンパク質を有しており、このタンパク質はＳＢＥＩＩａ－Ａ、ＳＢＥＩＩａ－ＢおよびＳＢＥＩＩａ－Ｄ遺伝子の１つでコード化され、減少したデンプン分岐酵素活性を有し、生長内胚乳中で産出した場合、対応する野生型遺伝子でコード化されるＳＢＥＩＩａタンパク質と比較して好ましくはＳＢＥ活性を持たない。これらの実施例では、少なくとも１つの、好ましくは他の２つのＳＢＥＩＩａ遺伝子の両方が、部分的または全体的に欠損している。２番目のＳＢＥＩＩａ遺伝子が部分的に欠損し、３番目のＳＢＥＩＩａ遺伝子が全体的に欠損してもよい。２番目または３番目のＳＢＥＩＩａ遺伝子のうち１つのみが部分的または全体的に欠損している場合、２番目または３番目のＳＢＥＩＩａ遺伝子のうちの１つが点変異を有し、これはコード化ＳＢＥＩＩａポリペプチドを不活性化する未成熟翻訳終始変異、スプライス部位変異、挿入、またはアミノ酸置換変異のようなヌル変異であるのが好ましい。好ましい実施例では、１つ、２つ、または１つよりも多くない、または２つよりも多くないＳＢＥＩＩａ遺伝子が胚芽中で全体的に欠損している。この欠損は、同じゲノム上でリンクしたＳＢＥＩＩｂ遺伝子も部分的または全体的に欠損させる。より好ましい実施例では、胚芽は、うち１つがウエスタンブロット解析から１つのＳＢＥＩＩａタンパク質をコードすることが判明している３つのＳＢＥＩＩａ遺伝子の対立遺伝子について同型接合であるばかりでなく、各々が独立して、コード化したＳＢＥＩＩ

ｂポリペプチドを不活性化する未成熟翻訳終始変異、スプライス部位変異、挿入またはアミノ酸置換変異のような、部分的または全体的なＳＢＥＩＩｂ遺伝子の欠損または点変異であるような、１つの（しかし１つよりも多くない）または２つの（しかし２つよりも多くない）ＳＢＥＩＩｂ遺伝子のヌル対立遺伝子についても同型接合である。言い換えると、胚芽は、以下に説明する１つの（しかし１つよりも多くない）または２つの（しかし２つよりも多くない）タイプＩ変異を含む。そのような穀粒は少なくとも１つのＳＢＥＩＩｂタンパク質を含む。

【００４４】

いくつかの実施例では、ＳＢＥＩＩａ－Ａタンパク質の量または活性は、野生型コムギ穀粒中の対応するタンパク質の量または活性の６０％よりも低く、５０％よりも低く、４０％よりも低く、３５％よりも低く、３０％よりも低く、２０％よりも低く、１０％よりも低く、５％よりも低く、２％よりも低い。いくつかの実施例では、穀粒中にＳＢＥＩＩａ－Ａタンパク質は検出できない。

【００４５】

いくつかの実施例では、ＳＢＥＩＩａ－Ｂタンパク質の量または活性は、野生型コムギ穀粒中の対応するタンパク質の量または活性の６０％よりも低く、５０％よりも低く、４０％よりも低く、３５％よりも低く、３０％よりも低く、２０％よりも低く、１０％よりも低く、５％よりも低く、２％よりも低い。いくつかの実施例では、穀粒中にＳＢＥＩＩａ－Ｂタンパク質は検出できない。

【００４６】

いくつかの実施例では、ＳＢＥＩＩａ－Ｄタンパク質の量または活性は、野生型コムギ穀粒中の対応するタンパク質の量または活性の６０％よりも低く、５０％よりも低く、４０％よりも低く、３５％よりも低く、３０％よりも低く、２０％よりも低く、１０％よりも低く、５％よりも低く、２％よりも低い。いくつかの実施例では、穀粒中にＳＢＥＩＩａ－Ｄタンパク質は検出できない。

【００４７】

実施例の１つでは、ＳＢＥＩＩａ－Ａタンパク質、ＳＢＥＩＩａ－Ｂタンパク質、ＳＢＥＩＩａ－ＤタンパクＳＢＥＩＩａタンパク質は、デンプンを含むゲルについての親和性ゲル電気泳動から分かる通り、対応する野生型ＳＢＥＩＩａタンパク質と比較すると移動度が変化している。この変化した移動度は、デンプンへの結合親和性が変化したことを示すものであり、デンプンへの親和性の増加または好ましくは結合親和性の減少である。一実施例では、結合親和性は、少なくとも３０％または少なくとも５０％減少している。変化した親和性は１つまたは２つ以上のアミノ酸置換の存在によるもので、対応する野生型タンパク質と比較してポリペプチド中に置換がただ１つあるのが好ましい。移動度が変化したＳＢＥＩＩａタンパク質はＳＢＥＩＩａ活性をいくらか有しており、好ましくは対応する野生型のＳＢＥＩＩａタンパク質と比較して活性が減少しているか、ＳＢＥＩＩａ活性を失っていてもよい。

【００４８】

他の実施例では、穀粒は、ウエスタンブロット分析等から検出可能なＳＢＥＩＩａタンパク質を欠いている。

【００４９】

他の実施例では、穀粒のＳＢＥＩＩａ遺伝子すなわちＳＢＥＩＩａ－Ａ遺伝子、ＳＢＥＩＩａ－Ｂ遺伝子および／またはＳＢＥＩＩａ－Ｄ遺伝子の少なくとも１つが点変異を有している。いくつかの実施例では、点変異を有する遺伝子は、対応する野生型ポリペプチドと比較して１つのアミノ酸置換を有するポリペプチドをコード化する。すなわち、コード化されたタンパク質は野生型ポリペプチドと同じ数のアミノ酸（残基）を持つ。好ましくは、アミノ酸置換は非保存的なアミノ酸置換である。この文脈では、野生型アミノ酸配列は本明細書中では配列番号１，２および３というように記載されている。いくつかの実施例では、点変異が、遺伝子のタンパク質コード領域中で未成熟翻訳終始コドン（ナンセンスコドン）を生じる単一ヌクレオチド変化である。ナンセンスコドンを生じさせるヌク

レオチド変化は、遺伝子のエクソン１，エクソン２，エクソン３，エクソン４，エクソン５，エクソン６，エクソン７，エクソン８，エクソン９，エクソン１０，エクソン１１，エクソン１２，エクソン１３，エクソン１４，エクソン１５，エクソン１６，エクソン１７，エクソン１８，エクソン１９，エクソン２０またはエクソン２１にある。いくつかの実施例では、点変異が、ＳＢＥＩＩａ遺伝子の翻訳産物の正常なスプライシングを抑えるまたは阻止するスプライス部位変異である。この点変異は、ＳＢＥＩＩａ遺伝子のイントロン１，イントロン２，イントロン３，イントロン４，イントロン５，イントロン６，イントロン７，イントロン８，イントロン９，イントロン１０，イントロン１１，イントロン１２，イントロン１３，イントロン１４，イントロン１５，イントロン１６，イントロン１７，イントロン１８，イントロン１９またはイントロン２０の５’－または３’－スプライス部位にある。

【００５０】

別の実施例では、胚芽中のＳＢＥＩＩａ－Ａ、ＳＢＥＩＩａ－ＢまたはＳＢＥＩＩａ－Ｄ遺伝子の１つが、この遺伝子によりコード化されるタンパク質がデンプン分岐酵素活性を欠くような点変異を有する。

【００５１】

他の実施例では、穀粒胚芽が、ＳＢＥＩＩａ－ＢおよびＳＢＥＩＩａ－Ｄ遺伝子をそれぞれ少なくとも部分的に欠損するＢおよびＤゲノム中の欠損変異であるようなヌル対立遺伝子からなり、ここでＳＢＥＩＩａ－Ａ遺伝子が点変異を有するものであり；またはＳＢＥＩＩａ－ＡおよびＳＢＥＩＩａ－Ｄ遺伝子をそれぞれ少なくとも部分的に欠損するＡおよびＤゲノム中の欠損変異であるようなヌル対立遺伝子を有し、ＳＢＥＩＩａ－Ｂ遺伝子が点変異を有するものであり；またはＳＢＥＩＩａ－ＡおよびＳＢＥＩＩａ－Ｂ遺伝子をそれぞれ少なくとも部分的に欠損するＡおよびＢゲノム中の欠損変異であるようなヌル対立遺伝子を有し、ＳＢＥＩＩａ－Ｄ遺伝子が点変異を有するものである。

【００５２】

他の実施例では、胚芽は６個のＳＢＥＩＩｂ対立遺伝子からなり、このうち少なくとも１つが機能喪失変異である。

【００５３】

さらなる実施例では、穀粒の胚芽はＳＢＥＩＩｂ遺伝子のヌル対立遺伝子を持たないか、または２個のみ、４個のみ、または６個のＳＢＥＩＩｂ遺伝子のヌル対立遺伝子を持つ。好ましくは、胚芽は、３個のＳＢＥＩＩａ遺伝子のそれぞれに、および３個のＳＢＥＩＩｂ遺伝子のそれぞれについて同型接合である。

【００５４】

いくつかの実施例では、胚芽は、生育内胚乳中で産出した場合にデンプン分岐酵素活性を有する１つのみまたは２つのみのＳＢＥＩＩｂタンパク質、またはウエスタンブロット解析で検出できる１つまたは２つのみのＳＢＥＩＩｂタンパク質を含む。一実施例では、穀粒は、対応する野生型タンパク質と比較してタンパク質中にアミノ酸置換があるために不活性であるＳＢＥＩＩｂタンパク質を含むが、このタンパク質は穀粒中に野生型と比較して少なくとも５０％のレベルで存在する。代替的に、そのようなタンパク質は野生型と比較して５０％よりも低いレベルで存在するものでもよい。実施例の１つでは、このタンパク質は野生型と比較すると切断されたポリペプチドである。そのようなポリペプチドは、未成熟翻訳終始（ナンセンス）コドンからなる変異ＳＢＥＩＩｂ遺伝子から産出される。この穀粒は２個または３個のそのようなタンパク質を含む。

【００５５】

他の実施例では、穀粒胚芽は、ＳＢＥＩＩａ－Ｂ遺伝子の少なくとも一部を、およびＳＢＥＩＩｂ－Ｂ遺伝子の少なくとも一部を欠損する、好ましくはＳＢＥＩＩａ－Ｂ遺伝子および／またはＳＢＥＩＩｂ－Ｂ遺伝子の全体を欠損するＢゲノム中の欠損変異であるヌル変異を含む；または、ＳＢＥＩＩａ－Ｄ遺伝子の少なくとも一部を、およびＳＢＥＩＩｂ－Ｄ遺伝子の少なくとも一部を欠損する、好ましくはＳＢＥＩＩａ－Ｄ遺伝子および／またはＳＢＥＩＩｂ－Ｄ遺伝子の全体を欠損するＤゲノム中の欠損変異であるヌル変異を

含む；または、ＳＢＥＩＩａ－Ａ遺伝子の少なくとも一部を、およびＳＢＥＩＩｂ－Ａ遺伝子の少なくとも一部を欠損する、好ましくはＳＢＥＩＩａ－Ａ遺伝子および／またはＳＢＥＩＩｂ－Ａ遺伝子の全体を欠損するＡゲノム中の欠損変異であるヌル変異を含む。一実施例では、穀粒胚芽は、ＳＢＥＩＩａ－ＢおよびＳＢＥＩＩｂ－Ｂ遺伝子の両方において、ＳＢＥＩＩａ－ＤおよびＳＢＥＩＩｂ－Ｄ遺伝子の両方において、またはＳＢＥＩＩａ－ＡおよびＳＢＥＩＩｂ－Ａ遺伝子の両方において、点変異を有する。

【００５６】

一実施例では、コムギ穀粒は（Ｔｒｉｔｉｃｕｍ　ａｅｓｔｉｖｕｍ）、（１）穀粒デンプンのヨード定量法によって測定したアミロース含有量が約６０％（ｗ／ｗ）から約９０％（ｗ／ｗ）であり、または好ましくは約６７％（ｗ／ｗ）から約９０％（ｗ／ｗ）アミロース、または好ましくは約７０％（ｗ／ｗ）から約９０％（ｗ／ｗ）アミロースであるデンプン、（２）胚芽が、１つまたは２つの異なるＳＢＥＩＩａ対立遺伝子について同型接合であって、対立遺伝子の各々が、対応する野生型ＳＢＥＩＩａ遺伝子に対してＳＢＥＩＩａ遺伝子の一部または全ての欠損を含み；各々が点変異を含む１つまたは２つの異なるＳＢＥＩＩａ遺伝子について同型接合であって、この点変異が好ましくは、ナンセンスコドンまたは非保存的アミノ酸置換を生じるスプライス部位変異または単一ヌクレオチド多型であり；１つまたは２つの異なるＳＢＥＩＩｂ対立遺伝子について同型接合であって、対立遺伝子の各々が、対応する野生型ＳＢＥＩＩｂ遺伝子に対してＳＢＥＩＩｂ遺伝子の一部または全ての欠損を含む；（３）ＳＢＥＩＩａタンパク質が無いか、１つのＳＢＥＩＩａタンパク質のみか、２つの異なるＳＢＥＩＩａタンパク質のみである、および（４）ＳＢＥＩＩｂタンパク質が無いか、１つのＳＢＥＩＩｂタンパク質のみか、２つの異なるＳＢＥＩＩｂタンパク質のみ、である。１つまたは２つのＳＢＥＩＩａタンパク質および１つまたは２つのＳＢＥＩＩｂタンパク質は各々が独立して、活性を有しなくてもよく、対応する野生型タンパク質に対して切断されたタンパク質であってもよく、または対応する野生型タンパク質に対して変化したデンプン結合親和性を有するものでよい。この胚芽は、ＳＢＥＩＩａ－AおよびＳＢＥＩＩａ－Ｂ遺伝子の欠損とＳＢＥＩＩａ－Ｄ遺伝子中の点変異とを含み、または、ＳＢＥＩＩａ－AおよびＳＢＥＩＩａ－Ｄ遺伝子の欠損とＳＢＥＩＩａ－Ｂ遺伝子中の点変異とを含み、または、ＳＢＥＩＩａ－ＤおよびＳＢＥＩＩａ－Ｂ遺伝子の欠損とＳＢＥＩＩａ－Ａ遺伝子中の点変異と、ＳＢＥＩＩｂ－Ａ遺伝子、ＳＢＥＩＩｂ－Ｂ遺伝子またはＳＢＥＩＩｂ－Ｄ遺伝子またはこれらのうち２つにおける欠損との組み合わせを含んでいてもよい。

【００５７】

本発明はまた、上述した実施例の穀粒を生産できるコムギ植物、およびこの穀粒の生産および使用方法、およびこの穀粒より生産した産物をも提供する。本発明のコムギ植物およびこれより生産したコムギ穀粒胚芽、したがって、本発明のコムギ穀粒は同一の遺伝子型を有すると解される。

【００５８】

便利なことに、いくつかの実施例では、穀粒中の全ＳＢＥＩＩタンパク質の量または活性は、野生型コムギ穀粒中の全ＳＢＥＩＩタンパク質の量または活性より６０％より低く、または２％よりも低い。

【００５９】

重要なことは、本明細書は生育可能で、野生型穀粒と実質的に同じ率で発芽し、吸水後７－１４日の時期で測った場合に野生型穀粒に対して少なくとも８０％に等しい率で発芽し、および／または雌雄ともに繁殖可能で、および／または対応する野生型植物と実質的に同じ速さで生長する表現型的に正常な植物を生産し、および／または対応する野生型植物と実質的に同じ穀粒収量を生産する穀粒を提供するものである。

【００６０】

さらにいくつかの実施例では、この穀粒は野生型の発芽率に対し、好ましくは吸水後７－１４日の時期で測定して、約７０％から約９０％、または約９０％から約１００％の発芽率を有している。

【００６１】
実施例では、変異の少なくとも１つ、２つ以上または全てが、１）導入した変異であり、２）化学薬剤、生物学的薬剤または放射線照射のような変異薬剤を用いた変異生成により親コムギ植物または種子中で引き起こした変異であり、または３）植物ゲノムを修飾するために導入された。放射線照射は好ましくは重イオン衝撃（ＨＩＢ）であり、化学薬剤は好ましくはアジ化化合物である。一実施例では、化学薬剤はＥＭＳではなく、および／または、変異させたコムギの種類はＣａｄｅｎｚａではない。
【００６２】
ここに説明しているように、いくつかの実施例では、穀粒デンプンのアミロース含量は、穀粒の抽出可能デンプンの比率として、少なくとも約６０％（ｗ／ｗ）、少なくとも約６７％（ｗ／ｗ）、少なくとも約７０％（ｗ／ｗ）、少なくとも約７５％（ｗ／ｗ）、少なくとも約７９％（ｗ／ｗ）、少なくとも約８２％（ｗ／ｗ）、少なくとも約８５％である。穀粒デンプンのアミロース含量は、最大約９０％（ｗ／ｗ）になる。好ましくは、穀粒デンプンのアミロース含量は約８０％（ｗ／ｗ）または約８５％（ｗ／ｗ）または約９０％（ｗ／ｗ）である。この文脈では、アミロース含量は穀粒デンプンの重量に基づいたパーセント比率として定義される。
【００６３】
一実施例では、本明細書に提供されている穀粒は非遺伝子組み換えであり、またはＳＢＥＩＩａ遺伝子の発現を低減するＲＮＡをコード化する外来の核酸を含んでいない。
【００６４】
ここで説明しているように、ＳＢＥＩＩａ活性および／またはＳＢＥＩＩｂ活性は、生長内胚乳中での酵素活性を測ることで、または、免疫学的または当業者に知られた他の手法により、収穫した穀粒中のＳＢＥＩＩａタンパク質および／またはＳＢＥＩＩｂタンパク質の量を量ることで決定する。
【００６５】
別の実施例では、穀粒のデンプンは、
（ｉ）少なくとも２％、好ましくは少なくとも約３％ＲＳ、より好ましくは少なくとも約６％または約８％ＲＳ、または約６％または約８％または１０％ＲＳの難消化性デンプンを含んでおり、；
（ｉｉ）相対血糖指数（ＧＩ）が低く；
（ｉｉｉ）相対アミロペクチンレベルが低く；
（ｉｖ）歪んだデンプン顆粒であって、好ましくは少なくとも５０％が形状および／またはサイズの歪んだデンプン顆粒；
（ｖ）好ましくは顆粒の５０％より少ないものが複屈折性を示す低い顆粒複屈折性；
（ｖｉ）少なくとも１０％低下した膨潤体積；
（ｖｉｉ）変化した鎖長分布および／または分枝発生頻度；
（ｖｉｉｉ）糊化温度およびより高いピーク温度の終了遅延；
（ｉｘ）粘度低下（ピーク粘度、糊化開始温度など）；
（ｘ）アミロペクチンの分子量増大；および
（ｘｉ）野生型コムギデンプン顆粒またはデンプンと比較して修正された、％結晶化度または％Ａ型またはＢ型デンプン
からなる群より選択される性質の１つまたは２つ以上によって特徴付けられる。
【００６６】
いくつかの実施例では、ここで説明する穀粒はコムギ植物に含まれる。いくつかの実施形態では、穀粒は生育中の穀粒である。別の実施例では、穀粒は成熟した収穫穀粒であり、好ましくは畑栽培植物から収穫した穀粒である。いくつかの実施例では、穀粒の量は少なくとも１ｋｇ重量、または少なくとも１トン重量である。
【００６７】
いくつかの実施例において、穀粒は、粗挽き、挽き割り、湯通し、圧延、パール加工、製粉または粉砕穀粒など、もはや発芽できないように加工される。本発明は、本発明の穀

粒を得るステップと、穀粒から製粉するステップとからなる、製粉産物を製造する工程も提供する。

【００６８】

本発明は、ここに説明している穀粒を産出することができるコムギ植物（Ｔｒｉｔｉｃｕｍ　ａｅｓｔｉｖｕｍ）を含む。一実施例では、この穀粒は胚芽およびデンプンを含み、この胚芽は、ＳＢＥＩＩａ－Ａ遺伝子の２つの同一対立遺伝子、ＳＢＥＩＩａ－Ｂ遺伝子の２つの同一対立遺伝子、ＳＢＥＩＩａ－Ｄ遺伝子の２つの同一対立遺伝子を含み、ＳＢＥＩＩａ遺伝子の各々がある量のタンパク質（ｗ／ｗ）または対応する野生遺伝子よりも低いＳＢＥＩＩａ活性を有するタンパク質を生み出し、およびこれら遺伝子の少なくとも１つが点変異を有し、このデンプンは、アミロース含量が穀粒の抽出可能デンプンの比率として少なくとも５０％（ｗ／ｗ）である。好ましくは、穀粒のデンプンのアミロース含量は、穀粒の抽出可能デンプンの比率として、少なくとも約６７％（ｗ／ｗ）、または少なくとも約７５％（ｗ／ｗ）、または少なくとも約７９％（ｗ／ｗ）、または少なくとも約８２％（ｗ／ｗ）、または少なくとも約８５％（ｗ／ｗ）である。穀粒デンプンのアミロース含量は最大約９０％（ｗ／ｗ）になる。好ましくは、穀粒デンプンのアミロース含量は約８０％（ｗ／ｗ）または約８５％（ｗ／ｗ）または９０％（ｗ／ｗ）である。

【００６９】

いくつかの実施例では、コムギ植物の穀粒は、生育内胚乳中で発現した場合にデンプン分岐活性を有する少なくとも１つのＳＢＥＩＩａタンパク質を含み、このタンパク質は、野生型コムギ穀粒中の対応するタンパク質の量または活性の２％から６０％の間、または１０％から５０％の間、または２％から３０％の間、または２％から１５％の間、または３％から１０％の間、または２％から２０％の間、または２％から２５％の間の量またはデンプン分岐酵素活性を有する。

【００７０】

いくつかの実施例では、少なくとも１つのＳＢＥＩＩａタンパク質の量または活性が、野生型コムギ穀粒中の対応するタンパク質の量または活性の６０％よりも低く、５０％よりも低く、４０％よりも低く、３５％よりも低く、３０％よりも低く、２０％よりも低く、１０％よりも低く、５％よりも低く、２％よりも低い。いくつかの実施例では、穀粒中でＳＢＥＩＩａタンパク質活性が検出できない。

【００７１】

いくつかの実施例では、ＳＢＥＩＩａ－Ａタンパク質の量または活性が、野生型コムギ穀粒中の対応するタンパク質の量または活性の６０％よりも低く、５０％よりも低く、４０％よりも低く、３５％よりも低く、３０％よりも低く、２０％よりも低く、１０％よりも低く、５％よりも低く、２％よりも低い。いくつかの実施例では、穀粒中でＳＢＥＩＩａ－Ａタンパク質活性が検出できない。

【００７２】

いくつかの実施例では、ＳＢＥＩＩａ－Ｂタンパク質の量または活性が、野生型コムギ穀粒中の対応するタンパク質の量または活性の６０％よりも低く、５０％よりも低く、４０％よりも低く、３５％よりも低く、３０％よりも低く、２０％よりも低く、１０％よりも低く、５％よりも低く、２％よりも低い。いくつかの実施例では、穀粒中でＳＢＥＩＩａ－Ｂタンパク質活性が検出できない。

【００７３】

いくつかの実施例では、ＳＢＥＩＩａ－Ｄタンパク質の量または活性が、野生型コムギ穀粒中の対応するタンパク質の量または活性の６０％よりも低く、５０％よりも低く、４０％よりも低く、３５％よりも低く、３０％よりも低く、２０％よりも低く、１０％よりも低く、５％よりも低く、２％よりも低い。いくつかの実施例では、穀粒中でＳＢＥＩＩａ－Ｄタンパク質活性が検出できない。

【００７４】

好ましい実施例では、コムギ植物は繁殖できる雌雄であり、または好ましくは、雌雄の繁殖性両方のレベルが、対応する野生型植物と実質的に同じである。

【００７５】
本明細書は、ここに説明した穀粒より生産する全麦または小麦粉を説明し、そのような全麦または小麦粉を生産するための穀粒の使用について説明する。一実施例では、この穀粒は胚芽およびデンプンを含み、この胚芽は、ＳＢＥＩＩａ－Ａ遺伝子の２つの同一対立遺伝子、ＳＢＥＩＩａ－Ｂ遺伝子の２つの同一対立遺伝子、ＳＢＥＩＩａ－Ｄ遺伝子の２つの同一対立遺伝子を含み、ＳＢＥＩＩａ遺伝子の各々がある量のタンパク質（ｗ／ｗ）または対応する野生遺伝子よりも低いＳＢＥＩＩａ活性を有するタンパク質を生み出し、およびこれら遺伝子の少なくとも１つが点変異を有し、このデンプンは、穀粒の抽出可能デンプンの比率として穀粒のデンプンが少なくとも５０％（ｗ／ｗ）であるようなアミロース含量を有する。好ましくは、穀粒のデンプンは、穀粒の抽出可能デンプンの比率として、少なくとも約６０％（ｗ／ｗ）、または少なくとも約６７％（ｗ／ｗ）、または少なくとも約７５％（ｗ／ｗ）、または少なくとも約７９％（ｗ／ｗ）、または少なくとも約８２％（ｗ／ｗ）、または少なくとも約８５％（ｗ／ｗ）のアミロース含量を有する。穀粒デンプンのアミロース含量は最大約９０％（ｗ／ｗ）になる。好ましくは、穀粒デンプンのアミロース含量は約８０％（ｗ／ｗ）または約８５％（ｗ／ｗ）または９０％（ｗ／ｗ）である。小麦粉または全麦のデンプンのアミロース含量は、穀粒デンプンのアミロース含量と同じである。一実施例では、全麦または小麦粉は全麦または小麦粉１００ｇにつき、少なくとも約３ｇ、好ましくは少なくとも約６ｇ、さらに好ましくは少なくとも約８ｇの難消化性デンプンを含む。小麦粉または全麦のデンプンは、好ましくは野生型小麦粉または全麦のデンプンと比較して、糊化温度が高い。全麦、小麦粉またはこれらより生産した食品原材料は、分画化、ブリーチング、材料を安定化するための熱処理、酵素による処理または野生型コムギ由来の全麦または小麦粉のような食品原材料によるブレンドにより品質向上できる。小麦粉は、好ましくは白色小麦粉で、パン製造技術で知られた特性を有する。好ましい実施例では、全麦、小麦粉または他の食品は食品原材料として販売できるよう包装し、包装は使用に際してのレシピ説明書を含む。

【００７６】
別の態様では、本明細書は、ここに説明した穀粒より生産するコムギデンプン顆粒またはコムギデンプンについて記載している。一実施例では、この穀粒は胚芽およびデンプンを含み、この胚芽は、ＳＢＥＩＩａ－Ａ遺伝子の２つの同一対立遺伝子、ＳＢＥＩＩａ－Ｂ遺伝子の２つの同一対立遺伝子、ＳＢＥＩＩａ－Ｄ遺伝子の２つの同一対立遺伝子を含み、ＳＢＥＩＩａ遺伝子の各々がある量のタンパク質（ｗ／ｗ）または対応する野生遺伝子よりも低いＳＢＥＩＩａ活性を有するタンパク質を生み出し、およびこれら遺伝子の少なくとも１つが点変異を有し、このデンプンは、穀粒の抽出可能デンプンの比率として穀粒のデンプンが少なくとも５０％（ｗ／ｗ）であるようなアミロース含量を有する。

【００７７】
いくつかの実施例では、デンプン顆粒またはデンプンはデンプン比率として、少なくとも約５０％（ｗ／ｗ）、または少なくとも約６０％（ｗ／ｗ）、または少なくとも約６７％（ｗ／ｗ）、または少なくとも約７０％（ｗ／ｗ）、または少なくとも約７５％（ｗ／ｗ）、または少なくとも約７９％（ｗ／ｗ）、または少なくとも約８２％（ｗ／ｗ）、または少なくとも約８５％（ｗ／ｗ）のアミロースを有する。穀粒デンプンのアミロース含量は最大約９０％（ｗ／ｗ）になる。好ましくは、アミロース含量は約８０％（ｗ／ｗ）または約８５％（ｗ／ｗ）または９０％（ｗ／ｗ）である。デンプンのアミロース含量は、元となった穀粒デンプンのアミロース含量と同じであり、好ましくはヨード定量法で測られる。一実施例では、デンプン顆粒またはデンプンは、
（ｉ）デンプン顆粒の場合、野生型コムギデンプン顆粒と比較して、全ＳＢＥＩＩまたはＳＢＥＩＩａが２％よりも低い量、または２％から３０％の量を含み、好ましくは、デンプンに対する親和性が変化したＳＢＥＩＩａタンパク質を含み；または
（ｉｉ）少なくとも２％の難消化性デンプン、好ましくは少なくとも約３％の難消化性デンプン、少なくとも約６％の難消化性デンプン、または少なくとも約８％の難消化性デンプン；

（ｉｉｉ）低い相対血糖指数（ＧＩ）；
（ｉｖ）低い相対アミロペクチンレベル；
（ｖ）歪んだデンプン顆粒であって、好ましくは少なくとも５０％が形状および／またはサイズの歪んだデンプン顆粒；
（ｖｉ）好ましくは顆粒の５０％より少ないものが複屈折性を示す低い顆粒複屈折性；
（ｖｉｉ）膨潤体積の低下；
（ｖｉｉｉ）変化した鎖長分布および／または分枝発生頻度；
（ｉｘ）糊化温度およびより高いピーク温度の終了遅延；
（ｘ）粘度低下（ピーク粘度、糊化開始温度など）；
（ｘｉ）アミロペクチンの分子量増大；および／または
（ｘｉｉ）野生型コムギデンプン顆粒またはデンプンと比較して修正された、％結晶化度または％Ａ型またはＢ型デンプン
からなる群より選択される性質の１つまたは２つ以上によって特徴付けられる。

【００７８】
本明細書は、ここに説明する穀粒、全麦、または小麦粉、またはデンプン顆粒、またはデンプンを含む食品原材料を提供する。一実施例では、この穀粒は胚芽およびデンプンを含み、この胚芽は、ＳＢＥＩＩａ－Ａ遺伝子の２つの同一対立遺伝子、ＳＢＥＩＩａ－Ｂ遺伝子の２つの同一対立遺伝子、ＳＢＥＩＩａ－Ｄ遺伝子の２つの同一対立遺伝子を含み、ＳＢＥＩＩａ遺伝子の各々がある量のタンパク質（ｗ／ｗ）または対応する野生遺伝子よりも低いＳＢＥＩＩａ活性を有するタンパク質を生み出し、およびこれら遺伝子の少なくとも１つが点変異を有し、このデンプンのアミロース含量は、穀粒の抽出可能デンプンの比率として穀粒のデンプンが少なくとも５０％（ｗ／ｗ）である。好ましくは、穀粒、全麦または小麦粉のデンプンのアミロース含量は、穀粒の抽出可能デンプンの比率として、少なくとも約６０％（ｗ／ｗ）、または少なくとも約６７％（ｗ／ｗ）、または少なくとも約７５％（ｗ／ｗ）、または少なくとも約７９％（ｗ／ｗ）、または少なくとも約８２％（ｗ／ｗ）、または少なくとも約８５％（ｗ／ｗ）である。穀粒デンプンのアミロース含量は最大約９０％（ｗ／ｗ）になる。好ましくは、穀粒のアミロース含量は約８０％（ｗ／ｗ）または約８５％（ｗ／ｗ）または９０％（ｗ／ｗ）である。

【００７９】
いくつかの実施例では、穀粒は、粗挽き、挽き割り、湯通し、圧延、パール加工、製粉または粉砕穀粒またはこれらの如何なる組み合わせなどにより加工される。

【００８０】
別の実施例では、食料または飲料製品は、乾燥重量で少なくとも１０％のレベルの食料または飲料原材料を含み、その原材料とはここで説明しているようなコムギ穀粒、全麦、または小麦粉、またはデンプン顆粒またはデンプンである。一実施例では、この穀粒は胚芽およびデンプンを含み、この胚芽は、ＳＢＥＩＩａ－Ａ遺伝子の２つの同一対立遺伝子、ＳＢＥＩＩａ－Ｂ遺伝子の２つの同一対立遺伝子、ＳＢＥＩＩａ－Ｄ遺伝子の２つの同一対立遺伝子を含み、ＳＢＥＩＩａ遺伝子の各々がある量のタンパク質（ｗ／ｗ）または対応する野生遺伝子よりも低いＳＢＥＩＩａ活性を有するタンパク質を生み出し、およびこれら遺伝子の少なくとも１つが点変異を有し、このデンプンのアミロース含量は、穀粒の抽出可能デンプンの比率として穀粒のデンプンが少なくとも５０％（ｗ／ｗ）である。好ましくは、原材料のデンプンのアミロース含量は、穀粒の抽出可能デンプンの比率として、少なくとも約６０％（ｗ／ｗ）、または少なくとも約６７％（ｗ／ｗ）、または少なくとも約７５％（ｗ／ｗ）、または少なくとも約７９％（ｗ／ｗ）、または少なくとも約８２％（ｗ／ｗ）、または少なくとも約８５％（ｗ／ｗ）である。穀粒デンプンのアミロース含量は最大約９０％（ｗ／ｗ）になる。好ましくは、穀粒のアミロース含量は約８０％（ｗ／ｗ）または約８５％（ｗ／ｗ）または９０％（ｗ／ｗ）である。

【００８１】
本明細書はさらに穀粒、または全麦、または小麦粉、またはコムギデンプン顆粒、またはコムギデンプンを重量で少なくとも１０％のレベルで含む組成物または配合物、および

アミロースのレベルが５０％（ｗ／ｗ）よりも低いコムギ穀粒、またはこれより得られる小麦粉、全麦、デンプン顆粒またはデンプンについて説明した。

【００８２】

別の態様では、本明細書は、穀粒中の全デンプンの比率として少なくとも５０％（ｗ／ｗ）、または少なくとも６０％（ｗ／ｗ）、または少なくとも６７％（ｗ／ｗ）のアミロースを含む、穀粒中の抽出可能デンプンとして少なくとも約７５％（ｗ／ｗ）、または少なくとも約７９％（ｗ／ｗ）、または少なくとも約８２％（ｗ／ｗ）、または少なくとも約８５％（ｗ／ｗ）のアミロースを含む穀粒を産出するコムギ植物を生み出す工程について説明した。穀粒デンプンのアミロース含量は最大約９０％（ｗ／ｗ）になる。好ましくは、穀粒のアミロース含量は約８０％（ｗ／ｗ）または約８５％（ｗ／ｗ）または９０％（ｗ／ｗ）である。この工程は、（ｉ）ＳＢＥＩＩａ－Ａ，ＳＢＥＩＩａ－Ｂ，ＳＢＥＩＩａ－Ｄ，ＳＢＥＩＩｂ－Ａ，ＳＢＥＩＩｂ－Ｂ，ＳＢＥＩＩｂ－Ｄからなる群から選択されたＳＢＥＩＩａまたはＳＢＥＩＩｂ遺伝子の１つ、２つまたは３つの各々の中に点変異を有する２つの親コムギ植物を交配するステップ、またはこの点変異を有する親植物へ変異導入するステップ、および（ｉｉ）植物または穀粒由来のＤＮＡ，ＲＮＡ，タンパク質，デンプン顆粒またはデンプンの分析により、交差または変異導入により得られた植物または穀粒、またはこれらより得られた子孫植物または穀粒のスクリーニングを行うステップ、および（３）ＳＢＥＩＩａまたはＳＢＥＩＩａデンプン分岐活性を欠いた繁殖可能植物を選択するステップ、を具える。変異導入のための好ましい方法は、重イオン衝撃法または別の照射方法であり、またはジンクフィンガーヌクレアーゼまたはＴＡＬエフェクタの使用など知られている技術である。

【００８３】

この工程のいくつかの実施例では、選択した繁殖可能コムギ植物の穀粒は、上記に説明した特性の１つにより特徴付けられている。

【００８４】

いくつかの実施例では、本明細書はコムギ植物または穀粒のスクリーニング方法を提供するものであり、この方法は（１）ＳＢＥＩＩａおよび／またはＳＢＥＩＩｂの量または活性を野生型またはコントロール植物または穀粒中の量または活性と比較して測定するステップ、および（２）穀粒を生産する植物を選択するステップ、または（３）ここに説明する穀粒を選択するステップを具え、この穀粒は胚芽およびデンプンを含み、この胚芽はＳＢＥＩＩａ－Ａ遺伝子の２つの同一対立遺伝子、ＳＢＥＩＩａ－Ｂ遺伝子の２つの同一対立遺伝子、ＳＢＥＩＩａ－Ｄ遺伝子の２つの同一対立遺伝子を含み、ＳＢＥＩＩａ遺伝子の各々がある量のタンパク質（ｗ／ｗ）または対応する野生遺伝子よりも低いＳＢＥＩＩａ活性を有するタンパク質を生み出し、およびこれら遺伝子の少なくとも１つが点変異を有し、このデンプンのアミロース含量は、穀粒が穀粒の抽出可能デンプンの比率として少なくとも５０％（ｗ／ｗ）、または少なくとも６０％（ｗ／ｗ）、または少なくとも６７％（ｗ／ｗ）、または約６０％（ｗ／ｗ）から約９０％（ｗ／ｗ）間である。好ましくは、穀粒のデンプンのアミロース含量は、穀粒の抽出可能デンプンの比率として、少なくとも約７５％（ｗ／ｗ）、または少なくとも約７９％（ｗ／ｗ）、または少なくとも約８２％（ｗ／ｗ）、または少なくとも約８５％（ｗ／ｗ）である。穀粒デンプンのアミロース含量は最大約９０％（ｗ／ｗ）になる。好ましくは、穀粒のアミロース含量は約８０％（ｗ／ｗ）または約８５％（ｗ／ｗ）または９０％（ｗ／ｗ）である。

【００８５】

いくつかの実施例では、本発明は、食料または飲料を製造する工程を具え、以下のステップを具える：（１）ここに説明した穀粒を得るステップ、またはその穀粒から得た小麦粉、全麦、デンプン顆粒、またはデンプンを含む原材料を得るステップ、（２）穀粒を必要に応じて加工し、食料または飲料の原材料を生産するステップ、（３）ステップ（１）または（２）からの食料または飲料原材料を別の食料または飲料原材料に加えることで、食料または飲料を生産するステップ。

【００８６】

別の態様では、本発明は、患者が必要とする代謝健康、腸健康、または心臓血管健康の１またはそれ以上のパラメータを改善する方法、または糖尿病、腸疾患または心臓血管疾患のような代謝疾患の重大性または発症を予防または軽減する方法を意図しており、この方法は患者にここに説明した穀粒、または食料または飲料製品を提供するステップを具える。

【００８７】

別の態様では、本明細書は、代謝健康状態、腸健康状態または心臓血管健康状態の１またはそれ以上のパラメータを改善、または患者の代謝、腸または心臓血管疾患の重大性または発症を予防または軽減に使用する、ここに説明した穀粒、または食料または飲料製品を意図している。

【００８８】

本発明はさらに、（１）ここに説明したコムギ植物を得るステップ、（２）植物からコムギ穀粒を収穫するステップ、（３）必要に応じて、穀粒をひくなど穀粒を加工し、好ましくは穀粒を改変して繁殖できないようにするステップを具えた穀粒を生産する工程を意図する。

【００８９】

本発明は、（１）本記述によりコムギ穀粒を得るステップ、（２）穀粒からデンプンを抽出し、デンプンを生産するステップを具えるデンプン生産の工程を含む。

【００９０】

いくつかの実施例では、本発明は、ここに説明した通りコムギ穀粒を得るステップ、および得られたコムギ穀粒を金銭的利益のために取引するステップを具えた、コムギ穀粒を取引する方法を含む。いくつかの実施例では、コムギ穀粒を得る方法はコムギ穀粒を耕作するまたは収穫するステップを具える。いくつかの実施例では、コムギ穀粒を得るステップは、コムギ穀粒を分類するステップをさらに具える。さらなるいくつかの実施例では、コムギ穀粒を得るステップは、コムギ穀粒を異なる場所へ輸送するステップをさらに具える。

【００９１】

別の態様では、本明細書は、

ａ）ここに定義した穀粒を含む麦穂を収穫するステップ；

ｂ）穀粒を殻から分離するために麦穂を打つおよび／または吹き分けるステップ；

ｃ）ステップｂで分離した穀粒をふるい分けおよび／または分類し、ふるい分けおよび／または分類した穀粒を容器に移し、コムギ穀粒入りの容器生産するステップ

を具えるコムギ穀粒入りの容器を生産する工程を提供する。

【００９２】

コムギ中の全デンプンの比率として少なくとも５０％（ｗ／ｗ）、または少なくとも６０％（ｗ／ｗ）、または少なくとも６７％（ｗ／ｗ）、または約８０％（ｗ／ｗ）、または約６０％（ｗ／ｗ）から約９０％（ｗ／ｗ）の間のアミロース含量を有する穀粒を生産するコムギ植物を得る、または識別する、または選択する、または生産するための方法が提供されている。コムギ植物は、変異導入した群または交雑過程または戻し交雑／繁殖過程由来の植物の群のような、複数候補植物の群から識別または選択される。

【００９３】

いくつかの実施例では、この方法は、（ｉ）ＳＢＥＩＩａ－Ａ，ＳＢＥＩＩａ－Ｂ，ＳＢＥＩＩａ－Ｄ，ＳＢＥＩＩｂ－Ａ，ＳＢＥＩＩｂ－Ｂ，ＳＢＥＩＩｂ－Ｄからなる群から選択されたＳＢＥＩＩａまたはＳＢＥＩＩｂ遺伝子の１つ、２つまたは３つの各々の中に点変異を有する２つの親コムギ植物を交配するステップ、またはこの機能喪失変異を有する親植物へ変異導入するステップ、および（ｉｉ）交雑または変異導入により得られた植物または穀粒、またはこれらより得られた子孫植物または穀粒のスクリーニングを、植物または穀粒由来のＤＮＡ，ＲＮＡ，タンパク質，デンプン顆粒またはデンプンの分析により行うステップ、および（ｉｉｉ）穀粒中のＳＢＥＩＩａのレベルまたは活性が、野生型穀粒中の当該タンパク質のレベルまたは活性に対して２％よりも低い繁殖可能植物を選

択するステップを具える。代替的に、複数候補植物の群から選択または識別する場合、本方法は上記ステップ（ｉｉ）、（ｉｉｉ）を具え、ステップ（ｉ）はオプションであってもよい。

【００９４】

いくつかの実施例では、選択した繁殖可能なコムギ植物の穀粒は、ここに定義した１またはそれ以上の特性により特徴付けられる。

【００９５】

別の実施例では、本発明はコムギ植物または穀粒をスクリーニングする方法を提供するものであり、この方法は（ｉ）ＳＢＥＩＩａのレベルまたは活性を、野生型またはコントロール植物または穀粒中のレベルまたは活性と比較して測定するステップ、（ｉｉ）野生型植物中の全ＳＢＥＩＩａタンパク質のレベルまたは活性の２％よりも低い植物または穀粒を選択するステップを具える。穀粒は、本発明の穀粒の別の特性によってさらに特徴付けられる。

【００９６】

上の概要は、本発明の全実施形態の網羅的列挙ではなく、そのように見なされるべきではない。

【図面の簡単な説明】

【００９７】

【図１】図１は、ＳＢＥＩＩａタンパク質の配列比較を図示する（ＡＡＫ２６８２１．１はＤゲノム、ＣＡＲ９５９００．１はＢゲノム、ＣＡＡ７２１５４はＡゲノムに由来する）。配列比較中の点は、最上部の配列に存在するのと同じアミノ酸を示す。

【００９８】

【図２】図２は、コムギのＡ、Ｂ、およびＤゲノムからのエクソン１～３によってコードされる、ＳＢＥＩＩｂアミノ酸の配列比較を図示する。破線は、タンパク質中に存在するが配列が分かっていないアミノ酸を示し、配列比較中の点は、最上部の配列に存在するのと同じアミノ酸を示す。

【００９９】

【図３】図３は、ＳＢＥ１１ｂアミノ酸の配列比較の描写である。

【０１００】

【図４】図４は、遺伝子組換え変異系統のアミロース含有量の散布図を示す、グラフ表示である。（実施例５を参照されたい）。

【０１０１】

【図５】図５は、ＳＢＥＩＩ遺伝子組換え系の挙動から計算されたアミロースモデルを示す、データのグラフ表示である。

【０１０２】

【図６】図６は、ＳＢＥＩＩ遺伝子組換え系の挙動から計算されたアミロースモデルを示すデータのグラフ表示である。

【０１０３】

【図７－１】図７－１は、コムギ変種Ｃｈａｒａから得られた、同祖ＳＢＥＩＩａ遺伝子のエクソン１２～１４領域のＤＮＡの配列比較を図示する。Ｃｈａｒａ　Ｂゲノム断片のヌクレオチド配列全体が示されるのに対し、同祖ＡおよびＤゲノム断片の対応するヌクレオチドは、多形性のある部分のみが示される。点は、対応するヌクレオチドが、Ｃｈａｒａ　Ｂゲノム断片と同一であることを示す。破線は、配列内に対応するヌクレオチドが不在であることを示す。

【図７－２】図７－２は、コムギ変種Ｃｈａｒａから得られた、同祖ＳＢＥＩＩａ遺伝子のエクソン１２～１４領域のＤＮＡの配列比較を図示する。Ｃｈａｒａ　Ｂゲノム断片のヌクレオチド配列全体が示されるのに対し、同祖ＡおよびＤゲノム断片の対応するヌクレオチドは、多形性のある部分のみが示される。点は、対応するヌクレオチドが、Ｃｈａｒａ　Ｂゲノム断片と同一であることを示す。破線は、配列内に対応するヌクレオチドが不在であることを示す。

【０１０４】
【図８－１】図８－１は、コムギ変種ＳｕｎｃｏおよびＴａｓｍａｎから得られるＳＢＥＩＩａ遺伝子のイントロン３領域のＤＮＡの配列比較を図示する。Ｔａｓｍａｎ　Ｄゲノム断片のヌクレオチド配列全体が示されるのに対し、同祖断片の対応するヌクレオチドは、多形性のある部分のみが示される。点は、対応するヌクレオチドが、Ｔａｓｍａｎ　Ｄゲノム断片と同一であることを示す。破線は、配列内に対応するヌクレオチドが不在であることを示す。
【図８－２】図８－２は、コムギ変種ＳｕｎｃｏおよびＴａｓｍａｎから得られるＳＢＥＩＩａ遺伝子のイントロン３領域のＤＮＡの配列比較を図示する。Ｔａｓｍａｎ　Ｄゲノム断片のヌクレオチド配列全体が示されるのに対し、同祖断片の対応するヌクレオチドは、多形性のある部分のみが示される。点は、対応するヌクレオチドが、Ｔａｓｍａｎ　Ｄゲノム断片と同一であることを示す。破線は、配列内に対応するヌクレオチドが不在であることを示す。
【０１０５】
【図９】図９は、コムギ変種Ｃｈｉｎｅｓｅ　Ｓｐｒｉｎｇから得られた、同祖ＳＢＥＩＩａ遺伝子のエクソン３領域のＤＮＡの配列比較を図示する。Ｃｈｉｎｅｓｅ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｄゲノム断片のヌクレオチド配列全体が示されるのに対し、同祖ＡおよびＢゲノム断片の対応するヌクレオチドは、多形性のある部分のみが示される。点は、対応するヌクレオチドが、Ｃｈｉｎｅｓｅ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｄゲノム断片と同一であることを示す。
【０１０６】
【図１０】図１０は、コムギ変種Ｃｈｉｎｅｓｅ　ＳｐｒｉｎｇのＳＢＥＩＩａ遺伝子由来のｃＤＮＡからのエクソン１ヌクレオチド配列のアラインメントである。Ｃｈｉｎｅｓｅ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｂゲノム断片は全体を示してあり、相同のＡおよびＤゲノム断片の対応するヌクレオチドは多型のある所だけを示してある。ドットは、対応するヌクレオチドがＣｈｉｎｅｓｅ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｂゲノム断片と同一であることを表す。
【０１０７】
【図１１】図１１は、ＣＳ　ヌルｉｓｏｍｉｃ－ｔｅｔｒａｓｏｍｉｃ系統からのＳＢＥＩＩａ遺伝子のエクソン１２～１４に及ぶ領域のＰＣＲ増幅を図示する。ＢＤＤと称される系統はＡゲノムについてヌルであり、ＡＤＤはＢゲノムについてヌルであり、ＡＡＢはＤゲノムについてヌルである。
【０１０８】
【図１２】図１２は、Ｓ２８系統からの発生中の内胚乳中におけるＳＢＥＩＩａタンパク質発現を示す、ウエスタンブロットを表す写真である。内胚乳からのタンパク質抽出物は、実施例１に記載されるように、ＳＢＥＩＩａ特異的抗体を使用したウエスタンブロット分析によってアッセイされた。右側の最後のレーンは、野生型内胚乳（変種ＮＢ１）から出現したバンドを示す。Ａ、Ｂ、およびＤゲノムによってコードされるＳＢＥＩＩａタンパク質の位置が、示される。
【０１０９】
【図１３】図１３は、１－Ｄ　Ｎａｔｉｖｅ　ＰＡＧＥにおける、β－限界デキストリン不在（ｍ０）および存在（ｍ）下における、限界デキストリン（Ｓ）濃度に対する、相互作用ＳＢＥＩＩａの移動度比プロットである。解離定数（Ｋｄ）は、方程式、ｍ０／ｍ＝１＋［Ｓ］／Ｋｄから計算される。
【０１１０】
【図１４】図１４は、実施例２に記載される遺伝子組換えコムギ系に由来する、プールされたコムギデンプンサンプル中のアミロース含有量と酵素耐性デンプンの相関を示す。
【０１１１】
【図１５】図１５は、コムギ単一種子中の見かけ上のアミロース含有量に関する、ＮＩＲＳ予測値と生化学的参照値を表す散布図を提供する。
【０１１２】
【図１６】図１６は、ＮＩＲＳによって測定された、ＷＭおよびＷＭＣ集団のアミロース

含有量の分散をグラフ表示する。
【０１１３】
【図１７】図１７ａおよびｂは、（ａ）吸水および（ｂ）ミキソグラフ混合時間に対する、コムギ系統の添加量増大の効果を示すデータの図式化である。
【０１１４】
【図１８】図１８ａおよびｂは、（ａ）難消化性デンプン（ｂ）小型食パンの予測ＧＩ（ＨＩ％）に対する、高アミロースコムギ小麦粉の添加量増大の効果を示すデータの図式化である。
【０１１５】
【図１９】図１９は、表記の系統からの野生型コムギ内胚乳（変種Ｓｕｎｓｔａｔｅ、レーンはＳｕｎｓと表記）および変異株内胚乳より単離したＳＢＥＩＩａタンパク質のウエスタンブロット解析の画像である。ＳｕｎｓｔａｔｅのＳＢＥＩＩａ－Ａ，－Ｂ，－Ｄタンパク質に対応するバンドを矢印で示す。
【０１１６】
【図２０】図２０は、コムギの野生型ＳＢＥＩＩａ遺伝子からのｃＤＮＡヌクレオチド配列のアラインメントである。Ａ．ｔａｕｓｃｈｉｉからのＳＢＥＩＩａ－Ｄ（Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏ．ＡＦ３３８４３１．１）に対応するｃＤＮＡのヌクレオチド配列は各パネルの最上位行に全体を示してあり、ＳＢＥＩＩａ－Ａ（Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏ．Ｙ１１２８２，Ｎａｉｒ　ｅｔ　ａｌ．，１９９７）およびＳＢＥＩＩａ－Ｂ（Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏ．ＦＭ８６５４３５中のゲノム配列由来，Ｂｏｔｔｉｃｅｌｌａ　ｅｔ　ａｌ．，２０１１）の相同ｃＤＮＡに対応するヌクレオチド配列は多型のある所だけを示してある。ドットは、対応するヌクレオチドがＡＦ３３８４３１配列と同一であることを表す。ＡＫ３３５７０７．１およびＡＦ２８６３１９．１ｃＤＮＡ配列は、ＢまたはＤゲノムよりもＡゲノムに近いのでおそらくＳＢＥＩＩａ－Ａ由来で、栽培品種Ｃｈｉｎｅｓｅ　Ｓｐｒｉｎｇおよびｃｈｅｙｅｎｎｅ中の自然発生変種からそれぞれ由来していると考えられる。
【０１１７】
表の簡単な説明
　表Ａは、配列表中の配列についての解説を提供する。
【０１１８】
　表１は、穀類から特性解析されたデンプン分枝酵素遺伝子を提供する。
【０１１９】
　表２は、アミノ酸下位分類を提供する。
【０１２０】
　表３は、例示的なアミノ酸置換を提供する。
【０１２１】
　表４は、コムギＳＢＥＩＩａ遺伝子のゲノム特異的プライマーを提供する。
【０１２２】
　表５は、ＳＢＥＩＩａのゲノム特異的プライマーのヌクレオチド配列を提供する。
【０１２３】
　表６は、ＳＢＥＩＩａ遺伝子のコムギの特にＡゲノムからの部分を増幅するようにデザインされた、プライマーを提供する。
【０１２４】
　表７は、ＳＢＥＩＩａ遺伝子の特にコムギのＢゲノムからの部分を増幅するようにデザインされた、プライマーを提供する。
【０１２５】
　表８は、ＳＢＥＩＩａ遺伝子の特にコムギのＤゲノムからの部分を増幅するようにデザインされた、プライマーを提供する。
【０１２６】
　表９は、コムギＳＢＥＩＩｂ遺伝子のゲノム特異的プライマーを提供する。

【０１２７】
表１０は、ＳＢＥＩＩｂのゲノム特異的プライマーのヌクレオチド配列を提供する。
【０１２８】
表１１は、実施例４に記載される、コムギのＲＮＡｉ系統の全ＳＢＥＩＩおよびＳＢＥＩＩａおよびＳＢＥＩＩｂ発現、およびアミロース含有量を提供する。
【０１２９】
表１２は、実施例５に記載される変異株中で試験された、マイクロサテライトマーカーの一覧を提供する。
【０１３０】
表１３は、実施例５に記載される、ＨＩＢ個体数およびマイクロサテライトマッピングデータから同定された変異株を提供する。
【０１３１】
表１４は、実施例５に記載される、同定されたＳＢＥＩＩ二重ヌル変異株の説明を提供する。
【０１３２】
表１５は、実施例５に記載される、二重および単一ヌル変異株間で実施した交雑の説明を提供する。
【０１３３】
表１６は、実施例５に記載される、ヌル変異株の三重穀粒デンプン中のアミロース含有量の集計を提供する。
【０１３４】
表１７は、Ｆ２子孫植物の稔性観察を提供する。
【０１３５】
表１８は、同定された二重ヌルに関する、ＳＢＥＩＩ対立遺伝子の組成およびアミロース比データを提供する。
【０１３６】
表１９は、コムギのアジ化物変異した群（ｃｖ．Ｓｕｎｓｔａｔｅ）から同定した、ＳＮＰ変異株の要約を提供する。
【０１３７】
表２０は、ヨード定量法で測定したＳＢＩＩａ三重ヌル変異株のアミロース含有量を提供する。
【０１３８】
表２１は、ＳＢＩＩａ三重ヌル変異株のアミロース含有量を提供する。
【０１３９】
表２２は、ＳＢＩＩａ三重ヌル変異株のアミロース含有量を提供する。
【０１４０】
表２３は、三重ヌル植物に関する予備的な農学的データを提供する。
【０１４１】
表２４は、遺伝子組換えコムギ系統からの穀粒デンプンのデンプン特性評価を提供する。
【０１４２】
表２５は、コムギ遺伝子組換え系からのデンプン画分の分子量分布を提供する。
【０１４３】
表２６は、ｈｐ５’－ＳＢＥＩＩａ遺伝子組換えコムギデンプンのＲＶＡパラメータを提供する。
【０１４４】
表２７は、対照ＮＢ１と比較した、ｈｐ５’－ＳＢＥＩＩａ遺伝子組換えコムギデンプンの糊化ピークのＤＳＣパラメータを提供する。
【０１４５】
表２８は、圧延および圧扁穀粒製品中のＲＳ含有量を提供する。

【０１４６】
表２９は、様々なレベルで高アミロースコムギ（ＨＡＷ）を組み込んだ、食品製品中の難消化性デンプン含有量を提供する。
【０１４７】
表３０は、実施例１８で言及されるゲノム特異的プライマーを提供する。
【０１４８】
表３１は、ＡｒｃｈｅおよびＡｐａｃｈｅ群から選択した点変異株の詳細を提供する。
【０１４９】
表３２は、二重ヌル（ＨＩＢ欠損）変異株との交雑のために選択した点変異株の詳細を提供する。
【０１５０】
表３３は、単一ＳＢＥＩＩａ点変異株および二重ヌル（欠損）変異株間交雑からの交雑結果（Ｆ１種群）の詳細を提供する。
【０１５１】
表３４は、単一ＳＢＥＩＩａ点変異株および二重ヌル（ＨＩＢ欠損）変異株間交雑からのＦ２種のＮＩＲＳスクリーニング結果の詳細を提供する。
【０１５２】
表３５は、コントロール穀粒およびＲＮＡｉ対照系統８５．２ｃと比較した、ＨＡＷＳＢＥＩＩａ三重ヌル穀粒のアミロース量および千粒重（ＴＫＷ）を提供する。
【発明を実施するための形態】
【０１５３】
本発明は、ＳＢＥＩＩａ遺伝子中に少なくとも１つの点変異を含む変異株植物および穀粒が、変異ＳＢＥＩＩａ遺伝子を組み合わせるために、特に野生型穀粒と似た率で発芽した表現型的に正常な雌雄の繁殖可能植物を得るために、各々のＳＢＥＩＩａ遺伝子中で欠損させた植物および穀粒よりも好ましいという、ここに説明した実験において行った観察に一部基づいている。この観察のあり得る説明の１つは、欠失が、ＳＢＥＩＩａ遺伝子に隣接する重要な遺伝要素を除去する傾向にあることである。
【０１５４】
難消化性デンプン量および関連した健康上の利点が実質的に増大するレベルである、少なくとも５０％（ｗ／ｗ）のアミロース含有量を穀粒デンプン中で得るためには、穀粒中の全ＳＢＥＩＩ活性、具体的にはＳＢＥＩＩａ活性を野生型レベルの３０％未満に低下させることが必要であることもまた観察された。
【０１５５】
ここに説明したように、六倍体コムギ中では、３個の各同祖ＳＢＥＩＩａ遺伝子からの、または少なくとも２個の同祖ＳＢＥＩＩａ遺伝子からの、および２または３個の同祖ＳＢＥＩＩｂ遺伝子からの、デンプン分岐酵素（ＳＢＥＩＩ）タンパク質のレベルおよび／または活性の低下が、２個の同祖ＳＢＥＩＩａ遺伝子中にヌル変異を有する植物と比較して、コムギ内胚乳のデンプン中のアミロース比の実質的非線形増大をもたらすと判定された。六倍体コムギの穀粒中のアミロース含有量とＳＢＥＩＩレベル間のこの非直線関係は、図５および６に図示される。
【０１５６】
Ａ、Ｂ、およびＤゲノムからのＳＢＥＩＩａおよび／またはＳＢＥＩＩｂ対立遺伝子の組み合わせ中の部分的および完全機能喪失変異を研究することで、デンプン特性の調節における複数ＳＢＥＩＩ遺伝子の役割が確立された。具体的には、非常に高レベルのアミロースを有する稔性コムギ植物を得るのに必要な、変異対立遺伝子数および変異対立遺伝子の組み合わせが調査され、判定された。
【０１５７】
本明細書で示されるように、発生中の六倍体コムギ内胚乳は、Ａ、Ｂ、およびＤゲノムのそれぞれから、ＳＢＥＩＩａおよびＳＢＥＩＩｂを発現する。四倍体コムギは、ＡおよびＢゲノムのそれぞれから、ＳＢＥＩＩａおよびＳＢＥＩＩｂを発現する。本明細書の用

法では、「Ａゲノムから発現されるＳＢＥＩＩａ」または「ＳＢＥＩＩａ－Ａ」とは、そのアミノ酸配列が配列番号１で記載される、または配列番号１で記載されるアミノ酸配列と少なくとも９９％同一である、またはこのような配列を含んでなる、デンプン分枝酵素を意味する。配列番号１のアミノ酸配列（ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＣＡＡ７２１５４）は、野生型ＳＢＥＩＩａ－Ａの参照配列として、本明細書で使用されるコムギのＡゲノムから発現されるＳＢＥＩＩａに対応する。配列番号１のタンパク質は、８２３アミノ酸長である。この酵素の活性変種は、例えば栽培品種Ｃｈｅｙｅｎｎｅであるコムギ中に存在する、配列番号１と９９．８８％（８２２／８２３）同一である受入番号ＡＦ２８６３１９、または受入番号ＡＫ３３５７０７（Ｃｈｉｎｅｓｅ　Ｓｐｒｉｎｇ）を参照されたい。このような変種は、配列番号１に関して本質的に野生型デンプン分枝酵素活性を有するという条件で、「ＳＢＥＩＩａ－Ａ」に含まれる。

【０１５８】

本明細書の用法では、「Ｂゲノムから発現されるＳＢＥＩＩａ」または「ＳＢＥＩＩａ－Ｂ」とは、そのアミノ酸配列が配列番号２で記載される、または配列番号２で記載されるアミノ酸配列と少なくとも９９％同一である、またはこのような配列を含んでなる、デンプン分枝酵素を意味する。配列番号２のアミノ酸配列（ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＣＡＲ９５９００）は、野生型ＳＢＥＩＩａ－Ｂの参照配列として、本明細書で使用される変種Ｃｈｉｎｅｓｅ　ＳｐｒｉｎｇのＢゲノムから発現されるＳＢＥＩＩａに対応する。配列番号２のタンパク質は、８２３アミノ酸長である。この酵素の活性変種はコムギ中に存在してもよく、配列番号２に関して本質的に野生型デンプン分枝酵素活性を有するという条件、でＳＢＥＩＩａ－Ｂに含まれる。配列番号２は、配列番号１と９８．４２％（８１１／８２４）同一である。図１のアミノ酸配列の配列比較は、タンパク質を区別するのに、またはＳＢＥＩＩａ－ＡまたはＳＢＥＩＩａ－Ｂとして変種を分類するのに使用されてもよい、アミノ酸の差異を示す。

【０１５９】

本明細書の用法では、「Ｄゲノムから発現されるＳＢＥＩＩａ」または「ＳＢＥＩＩａ－Ｄ」とは、そのアミノ酸配列が配列番号３で記載される、または配列番号３で記載されるアミノ酸配列と少なくとも９８％同一である、またはこのような配列を含んでなる、デンプン分枝酵素を意味する。配列番号３のアミノ酸配列（ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＡＡＫ２６８２１）は、野生型ＳＢＥＩＩａ－Ｄの参照配列として本明細書で使用される、六倍体コムギのＤゲノムの祖先であると思われるタルホコムギ（Ａ．ｔａｕｓｃｈｉｉ）のＤゲノムから発現されるＳＢＥＩＩａに対応する。配列番号３のタンパク質は、８１９アミノ酸長である。この酵素の活性変種はコムギ中に存在してもよく、それらが配列番号３に関して本質的に野生型のデンプン分枝酵素活性を有するという条件で、ＳＢＥＩＩａ－Ｄに含まれる。配列番号３は配列番号１と９７．５７％（８０３／８２３）同一であり、配列番号２と９７．８１％（８０５／８２３）同一である。図１のアミノ酸配列の配列比較は、タンパク質を区別するのに、またはＳＢＥＩＩａ－Ａ、ＳＢＥＩＩａ－ＢまたはＳＢＥＩＩａ－Ｄとして変種を分類するのに使用されてもよい、アミノ酸の差異を示す。

【０１６０】

この文脈で、例えばＢｌａｓｔｐによって、同一性百分率を判定するためにアミノ酸配列を比較する場合は、完全長配列を比較すべきであり、配列中のギャップは、アミノ酸の相違として数えられる。

【０１６１】

本明細書の用法では、「ＳＢＥＩＩａタンパク質」は、デンプン分枝酵素活性が低下しまたは皆無であるタンパク質変種、ならびに本質的に野生型の酵素活性を有するタンパク質を含む。ＳＢＥＩＩａタンパク質が、穀粒中に、具体的には一般に商業的に収穫されているが、穀粒の生理学的条件のために非活性状態にある休眠穀粒中に、存在してもよいこともまた理解される。このようなタンパク質は、本明細書の用法では「ＳＢＥＩＩａタンパク質」に含まれる。ＳＢＥＩＩａタンパク質は、穀粒発生中の一時期のみにおいて、特に貯蔵デンプンが典型的に蓄積されるが、その他の点では非活性状態にある発生中の内胚

乳において、酵素的に活性であってもよい。このようなＳＢＥＩＩａタンパク質は、ウエスタンブロット分析などの免疫学的方法を使用して、容易に検出され定量化されてもよい。「ＳＢＥＩＩｂタンパク質」は、本明細書の用法では類似した意味を有する。

【０１６２】

本明細書の用法では、「Ａゲノムから発現されるＳＢＥＩＩｂ」または「ＳＢＥＩＩｂ－Ａ」とは、配列番号４で記載される、または配列番号４で記載されるアミノ酸配列と少なくとも９８％同一であるアミノ酸配列を含んでなる、またはこのような配列を含んでなる、デンプン分枝酵素を意味する。配列番号４のアミノ酸配列は、野生型ＳＢＥＩＩｂ－Ａの参照配列として本明細書で使用される、コムギゲノムから発現されるＳＢＥＩＩｂのアミノ末端配列に対応する。

【０１６３】

本明細書の用法では、「Ｂゲノムから発現されるＳＢＥＩＩｂ」または「ＳＢＥＩＩｂ－Ｂ」とは、配列番号５で記載される、または配列番号５で記載されるアミノ酸配列と少なくとも９８％同一であるアミノ酸配列を含んでなる、またはこのような配列を含んでなる、デンプン分枝酵素を意味する。野生型ＳＢＥＩＩｂ－Ｂの参照配列として本明細書で使用されるアミノ酸配列番号５は、コムギのＳＢＥＩＩｂ－Ｂ遺伝子のエクソン２～３によってコードされる、部分的アミノ酸配列である。変種ＳＢＥＩＩｂ－Ｂ配列は、栽培変種Ｃｈｉｎｅｓｅ　Ｓｐｒｉｎｇから単離された、受入番号ＡＫ３３５３７８のヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列である。

【０１６４】

本明細書の用法では、「Ｄゲノムから発現されるＳＢＥＩＩｂ」または「ＳＢＥＩＩｂ－Ｄ」とは、そのアミノ酸配列が配列番号６で記載される、または配列番号６で記載されるアミノ酸配列と少なくとも９８％同一である、またはこのような配列を含んでなる、デンプン分枝酵素を意味する。配列番号６のアミノ酸配列（ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＡＡＷ８０６３１）は、六倍体コムギのＤゲノムの祖先であると思われ、野生型ＳＢＥＩＩｂ－Ｄの参照配列として本明細書で使用されるタルホコムギ（Ａ．ｔａｕｓｃｈｉｉ）のＤゲノムから発現されるＳＢＥＩＩｂに対応する。この酵素の活性変種はコムギ中に存在してもよく、それらが配列番号６に関して本質的に野生型のデンプン分枝酵素活性を有するという条件で、ＳＢＥＩＩｂ－Ｄに含まれる。例えば米国特許出願公開第２００５００７４８９１号明細書の配列番号４は、第１のメチオニンに始まって、本出願の配列番号６と９９．５％同一である、ＳＢＥＩＩｂ－Ｄタンパク質のアミノ酸配列を示す。図２のアミノ酸配列の配列比較は、ＳＢＥＩＩｂタンパク質を区別するのに、またはＳＢＥＩＩｂ－Ａ、ＳＢＥＩＩｂ－ＢまたはＳＢＥＩＩｂ－Ｄとして変種を分類するのに使用されてもよい、アミノ酸の差異を示す。

【０１６５】

したがってＳＢＥＩＩａ－Ａに言及する場合の「野生型」とは、本明細書の用法では、そのアミノ酸配列が配列番号１で記載されるデンプン分枝酵素を意味し；ＳＢＥＩＩａ－Ｂに言及する場合の「野生型」とは、本明細書の用法では、そのアミノ酸配列が配列番号２で記載されるデンプン分枝酵素を意味し；ＳＢＥＩＩａ－Ｄに言及する場合の「野生型」とは、本明細書の用法では、そのアミノ酸配列が配列番号３で記載されるデンプン分枝酵素を意味し；ＳＢＥＩＩｂ－Ａに言及する場合の「野生型」とは、本明細書の用法では、そのアミノ酸配列が配列番号４で記載されるデンプン分枝酵素を意味し；ＳＢＥＩＩｂ－Ｂに言及する場合の「野生型」とは、本明細書の用法では、そのアミノ酸配列が配列番号５で記載されるデンプン分枝酵素を意味し；およびＳＢＥＩＩｂ－Ｄに言及する場合の「野生型」とは、本明細書の用法では、そのアミノ酸配列が配列番号６で記載されるデンプン分枝酵素を意味する。

【０１６６】

本明細書の用法では、「ＳＢＥＩＩａ遺伝子」、「ＳＢＥＩＩａ－Ｂ遺伝子」，「コムギＳＢＥＩＩａ遺伝子」、「コムギＳＢＥＩＩｂ遺伝子」および類似表現という用語は、その他のコムギ変種中に存在する相同遺伝子をはじめとする、コムギ中でそれぞれ機能的

ＳＢＥＩＩａまたはＳＢＥＩＩｂ酵素をコードする遺伝子を指し、低下した活性または検出不能な活性がある酵素をコードする遺伝子の変異型もまた指す。これらとしては、表１に列挙または図で説明されるゲノム配列とｃＤＮＡ配列をはじめとする、クローンされたコムギＳＢＥＩＩ遺伝子が挙げられるが、これに限定されるものではない。本明細書の用法では、遺伝子は、いかなるタンパク質も全くコードしない変異型を包含し、その場合変異型は遺伝子のヌル対立遺伝子に相当する。遺伝子の対立遺伝子は、少なくとも遺伝子の一部が欠損した、遺伝子の全体が欠損して対立遺伝子が遺伝子のヌル対立遺伝子でもある場合も含めた変異対立遺伝子を含む。

【０１６７】

「内在性ＳＢＥＩＩ遺伝子」は、野生型および変異型をはじめとする、コムギゲノム中の天然の位置にあるＳＢＥＩＩ遺伝子を指す。対照的に、「単離ＳＢＥＩＩ遺伝子」および「外来性ＳＢＥＩＩ遺伝子」という用語は、例えばクローンされ、合成され、ベクターに含まれ、または好ましくは遺伝子組換えコムギ植物中の導入遺伝子として、細胞中の導入遺伝子の形態である、天然の位置にないＳＢＥＩＩ遺伝子を指す。この文脈でＳＢＥＩＩ遺伝子は、以下のように記述される特定形態のいずれかであってもよい。

【０１６８】

本明細書の用法では、「コムギのＡゲノム上のＳＢＥＩＩａ遺伝子」または「ＳＢＥＩＩａ－Ａ遺伝子」とは、本明細書で定義されるＳＢＥＩＩａ－Ａをコードするあらゆるポリヌクレオチド、または天然ポリヌクレオチド、配列変種または合成ポリヌクレオチドをはじめとする、ＳＢＥＩＩａ－Ａをコードするポリヌクレオチドに由来するあらゆるポリヌクレオチドを意味し、本質的に野生型活性があるＳＢＥＩＩａ－Ａをコードする「野生型ＳＢＥＩＩａ－Ａ遺伝子」、および本質的に野生型活性があるＳＢＥＩＩａ－Ａをコードしないが、すぐ分かるほどに野生型ＳＢＥＩＩａ－Ａ遺伝子に由来する「変異ＳＢＥＩＩａ－Ａ遺伝子」を含む。ＳＢＥＩＩ遺伝子の突然変異型と、一連の野生型ＳＢＥＩＩ遺伝子とのヌクレオチド配列の比較を使用して、それがいずれのＳＢＥＩＩ遺伝子に由来するかを判定し、分類する。例えばそのヌクレオチド配列がより近い関係にあれば、すなわちあらゆるその他のＳＢＥＩＩ遺伝子よりも野生型ＳＢＥＩＩａ－Ａ遺伝子に対してより高い配列同一性を有すれば、変異ＳＢＥＩＩ遺伝子は、変異ＳＢＥＩＩａ－Ａ遺伝子であると見なされる。変異ＳＢＥＩＩａ－Ａ遺伝子は、デンプン分枝酵素活性が低下したＳＢＥ（部分的変異体）をコードし、またはＳＢＥ活性を欠くタンパク質をコードし、またはタンパク質を全くコードしない（ヌル変異遺伝子）。ＳＢＥＩＩａ－Ａ遺伝子に対応するｃＤＮＡの例示的なヌクレオチド配列は、ＧｅｎＢａｎｋ受入番号Ｙ１１２８２に記載される。他の例示的ヌクレオチド配列は、受入番号ＡＦ２８６３１９（ＳＢＥＩＩａ－Ａ）、受入番号ＡＫ３３５７０７（ＳＢＥＩＩａ－Ａ）、受入番号ＥＵ６７０７２４中の部分的ｃＤＮＡ、受入番号ＦＭ８６５４３５中のゲノムＳＢＥＩＩａ－Ｂ配列、受入番号ＡＦ３３８４３２中のＳＢＥＩＩａ－Ａタンパク質のスプライシング変種に対応するｃＤＮＡで提供されている。ＳＢＥＩＩａ－Ａ遺伝子の一部の配列はまた、図７、８、９、および１０と、配列番号１３、１４、および１５とを参照して、本明細書でも提示される。

【０１６９】

本明細書の用法では、「Ｂゲノムから発現されるＳＢＥＩＩａ」または「ＳＢＥＩＩａ－Ｂ」、「Ｄゲノムから発現されるＳＢＥＩＩａ」または「ＳＢＥＩＩａ－Ｄ」、「Ａゲノムから発現されるＳＢＥＩＩｂ」または「ＳＢＥＩＩｂ－Ａ」、「Ｂゲノムから発現されるＳＢＥＩＩｂ」または「ＳＢＥＩＩｂ－Ｂ」、および「Ｄゲノムから発現されるＳＢＥＩＩｂ」または「ＳＢＥＩＩｂ－Ｄ」という用語は、前段落のＳＢＥＩＩａ－Ａに対応する意味を有する。

【０１７０】

例示的な部分的ＳＢＥＩＩｂ－Ａ、ＳＢＥＩＩｂ－Ｂ、およびＳＢＥＩＩｂ－Ｄタンパク質の配列が、図２に提供される。例示的ＳＢＥＩＩｂ－Ａアミノ酸配列は、配列番号４に記載される（エクソン１～３によってコードされるアミノ末端配列）。例示的ＳＢＥＩＩｂ－Ｂアミノ酸配列は、配列番号５に記載される。例示的ＳＢＥＩＩｂ－Ｄアミノ酸配

列は、配列番号６，配列番号７および配列番号９に記載される。
【０１７１】
上で定義されるＳＢＥＩＩ遺伝子としては、転写領域内の関連転写領域およびイントロンの発現を調節するプロモーター領域をはじめとする、転写領域の５’または３’であるあらゆる制御配列が挙げられる。
【０１７２】
異なるコムギ変種からのＳＢＥＩＩａおよびＳＢＥＩＩｂ遺伝子の配列には、自然変動があるものと理解される。図２０は、コムギの野生型ＳＢＥＩＩａ遺伝子のｃＤＮＡ配列のアラインメントを与える。相同的な遺伝子は、配列同一性に基づいて当業者によって容易に認識される。相同ＳＢＥＩＩａ遺伝子またはタンパク質間の配列同一性の程度は、少なくとも９０％と考えられ、ＳＢＥＩＩｂ遺伝子またはタンパク質についても同様である。コムギＳＢＥＩＩａ遺伝子は、コムギＳＢＥＩＩｂ遺伝子と配列が約８０％同一である。コードされたタンパク質もまた、配列が約８０％同一である。
【０１７３】
対立遺伝子は、単一遺伝子座における遺伝子の変種である。二倍体生物は、２組の染色体を有する。各染色体は、各遺伝子（１個の対立遺伝子）の１コピーを有する。双方の対立遺伝子が同一であれば、生物はその遺伝子に関して同型接合しており、対立遺伝子が異なれば、生物はその遺伝子に関して異型接合している。遺伝子座における対立遺伝子間の相互作用は、一般的に優勢または劣性と記述される。
【０１７４】
内胚乳中の異なる対立遺伝子は、同じまたは異なった変異を有してもよく、異なった対立遺伝子は当業者に知られた方法により結合することができる。
【０１７５】
いかなる活性酵素の生成もコードしない、またはもたらすことができない対立遺伝子が、ヌル対立遺伝子である。
【０１７６】
ヌル変異への参照は、欠失変異、挿入変異、スプライス部位変異、未成熟翻訳終始変異、およびフレームシフト変異からなる群より独立して選択されるヌル変異を含む。一実施例では、１またはそれ以上のヌル変異が非保存的アミノ酸置換変異であり、またはヌル変異が２またはそれ以上の非保存的アミノ酸置換の組み合わせを有する。この文脈で、非保存的アミノ酸置換は本明細書に定義されている通りである。
【０１７７】
対立遺伝子中の部分的機能喪失変異に加えて完全機能喪失変異を含む機能喪失変異は、穀粒中のＳＢＥＩＩ、ＳＢＥＩＩａまたはＳＢＥＩＩｂ酵素のレベルまたは活性の低下に至る対立遺伝子中の変異を意味する。対立遺伝子中の変異は、例えば、野生型のまたは活性が低下したより少ないタンパク質が翻訳される、または野生型のまたはレベルが低下した転写に、酵素活性が低下した酵素の翻訳が続くことを意味してもよい。この変異は、例えば、変異を含む遺伝子から転写されるＲＮＡが無いまたは少ない、または生産されたタンパク質の活性が無いまたは少ないということを意味してもよい。
【０１７８】
「点変異」とは、欠失、置換または挿入を含む単一のヌクレオチド塩基変化のことをいう。この変異はさらに、変異によりタンパク質が生産されない、またはタンパク質の生産量が少ない、または生産されたタンパク質のＳＢＥ活性が低い、スプライス部位変異、未成熟翻訳終始変異、フレームシフト変異または他の機能喪失変異であってもよい。いくつかの実施例では、この点変異が本明細書に記載されている保存的または好ましくは非保存的アミノ酸置換となる。
【０１７９】
タンパク質の量またはレベルが「低下した」または「低い」とは、対応する野生型対立遺伝子により生産される量またはレベルと比較しての「低下した」または「低い」を意味する。典型的には、この低下量は、野生型に対して少なくとも４０％、好ましくは少なく

とも５０％または少なくとも６０％、より好ましくは少なくとも８０％または９０％である。最も好ましい実施例では、本明細書に記載したウエスタンブロット検査などにより、タンパク質は検出されない。

【０１８０】

活性が「低下した」とは、対応する野生型ＳＢＥＩＩ、ＳＢＥＩＩａまたはＳＢＥＩＩｂ酵素と比較して低下したという意味である。

【０１８１】

タンパク質「活性」とは、当業者に知られたさまざまな手段および本明細書に記載した手段により直接的または間接的に測定できるＳＢＥ活性のことをいう。例えば、ＳＢＥ活性は、リン酸化刺激アッセイまたはヨウ素染色アッセイにより直接的に測定できる。デンプンへの結合は、例えば本明細書に記載した親和性ゲル電気泳動により、デンプンへのＳＢＥ親和性を測定することで、判別できる。デンプンへの結合親和性は、ＳＢＥ活性の間接的な測定となる。本明細書に記載したように、部分的機能喪失変異は、デンプンへの親和性が減少または増加を含んで変化したＳＢＥＩＩａタンパク質を発現する変異株を含む。デンプンへの親和性が近似的に（約）３０％減少した（低くなった）ＳＢＥＩＩａタンパク質を少なくとも１つ発現するそのような変異株は、直接的に測定した場合、ＳＢＥタンパク質活性の減少または低減がより大きくなると期待される。

【０１８２】

内胚乳中の様々な対立遺伝子は、同じまたは異なった変異を有してもよく、異なった対立遺伝子は当業者に知られた方法により結合することができる。

【０１８３】

いくつかの実施形態では、ＳＢＥＩＩａ遺伝子またはＳＢＥＩＩｂ遺伝子それぞれの転写または翻訳が低下するために、ＳＢＥＩＩａタンパク質またはＳＢＥＩＩｂタンパク質の量が低下する。

【０１８４】

いくつかの実施形態では、穀粒中に野生型の数のＳＢＥＩＩａタンパク質分子またはＳＢＥＩＩｂタンパク質分子があるにもかかわらず、ＳＢＥＩＩａタンパク質またはＳＢＥＩＩｂタンパク質の重量は低下するが、これは例えば変異ＳＢＥＩＩａタンパク質またはＳＢＥＩＩｂタンパク質が、翻訳早期終止シグナルのためにトランケートされるなど、生成するタンパク質のいくつかが、野生型ＳＢＥＩＩａタンパク質またはＳＢＥＩＩｂタンパク質よりも短いためである。

【０１８５】

本明細書の用法では、「ＳＢＥＩＩａ－Ａ遺伝子の２個の同一対立遺伝子」は、ＳＢＥＩＩａ－Ａ遺伝子の２個の対立遺伝子が互いに同一であることを意味し；「ＳＢＥＩＩａ－Ｂ遺伝子の２個の同一対立遺伝子」は、ＳＢＥＩＩａ－Ｂ遺伝子の２個の対立遺伝子が互いに同一であることを意味し；「ＳＢＥＩＩａ－Ｄ遺伝子の２個の同一対立遺伝子」は、ＳＢＥＩＩａ－Ｄ遺伝子の２個の対立遺伝子が互いに同一であることを意味し；「ＳＢＥＩＩｂ－Ａ遺伝子の２個の同一対立遺伝子」は、ＳＢＥＩＩｂ－Ａ遺伝子の２個の対立遺伝子が互いに同一であることを意味し；「ＳＢＥＩＩｂ－Ｂ遺伝子の２個の同一対立遺伝子」は、ＳＢＥＩＩｂ－Ｂ遺伝子の２個の対立遺伝子が互いに同一であることを意味し；「ＳＢＥＩＩｂ－Ｄ遺伝子の２個の同一対立遺伝子」は、ＳＢＥＩＩｂ－Ｄ遺伝子の２個の対立遺伝子が互いに同一であることを意味する。

【０１８６】

本発明のコムギ植物は、変異誘発後に生産して識別することができる。いくつかの実施例では、コムギ植物は一部の市場では望まれている非遺伝子組み換えであり、またはＳＢＥＩＩａ遺伝子の発現を減少させるいかなる外来性核酸分子も含まない。別の実施例では、コムギ植物は遺伝子組み換えであり、例えばＳＢＥＩＩａ遺伝子の発現を減少させるもの以外の外来性核酸分子を含み、これは例えば植物に除草剤耐性を与えるポリペプチドをコード化する外来性核酸分子である。

【０１８７】

単一ＳＢＥＩＩ遺伝子中に変異を有し、その他のＳＢＥＩＩ変異との交雑および選択によって組み合わせて本発明のコムギ植物を産生し得る変異コムギ植物は、例えば核酸に部位特異的変異誘発を実施することで、または変異原性処理によって誘発される合成であり得て、または天然でありすなわち天然原料から単離されてもよい。いくつかの実施例では、先祖植物細胞、組織、種子または植物を変異誘発して、ヌクレオチド置換、欠失、付加および／またはコドン修飾などの単一または複数変異を生成してもよい。

【０１８８】

本発明の好ましいコムギ植物および穀粒は、少なくとも１個の導入ＳＢＥＩＩ変異、より好ましくは２個以上の導入ＳＢＥＩＩ変異を含んでなり、天然原料からの変異を含まなくてもよく、すなわち植物中の全ての変異ＳＢＥＩＩａおよびＳＢＥＩＩｂ対立遺伝子は、合成手段によって、または変異原性処理によって得られる。

【０１８９】

変異誘発は、例えば種子のＥＭＳまたはアジ化ナトリウム（Ｚｗａｒ　ａｎｄ　Ｃｈａｎｄｌｅｒ，１９９５）処理などの化学的または照射手段によって、または当該技術分野で周知のγ線照射によって、獲得され得る。化学変異誘発は、ヌクレオチドの置換でなく欠失を誘発する傾向がある。重イオンビーム（ＨＩＢ）照射は、新しい植物栽培品種を産生する突然変異育種のための効果的技術として知られており、例えばＨａｙａｓｈｉ　ｅｔ　ａｌ．，２００７およびＫａｚａｍａ　ｅｔ　ａｌ，２００８を参照されたい。イオンビーム照射は、ＤＮＡ損傷量およびＤＮＡ欠失サイズを決定する生物学的効果に対して、投与（ｇｙ）およびＬＥＴ（線エネルギー付与、ｋｅＶ／ｕｍ）の２つの物理的要因を有し、これらは所望の変異誘発の程度次第で調節し得る。実施例で示されるように、ＨＩＢは変異株のコレクションを生成し、その多くは欠失を含んでなり、特定のＳＢＥＩＩ遺伝子の変異についてスクリーニングされてもよい。同定される変異株は、変異誘発ゲノム中の非連鎖変異の影響を除去し、したがってそれを低下させるために、反復親としての非変異コムギ植物と戻し交配してもよく、実施例９を参照されたい。

【０１９０】

部位特異的変異体の生成において有用な生物学的作用物質としては、ＤＮＡ中に二本鎖切断を含み、内在性修復機構を刺激する、酵素が挙げられる。これらとしては、エンドヌクレアーゼ、亜鉛フィンガーヌクレアーゼ、ＴＡＬエフェクタータンパク質、トランスポサーゼ、および部位特異的リコンビナーゼが挙げられる。亜鉛フィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）は、例えばゲノム中の部位特異的切断を促進し、内在性またはその他の末端連結修復機構が、欠失または挿入を導入してギャップを修復できるようにする。亜鉛フィンガーヌクレアーゼ技術については、ＬｅＰｒｏｖｏｓｔ　ｅｔ　ａｌ．，２００９でレビューされる。Ｄｕｒａｉ　ｅｔ　ａｌ．，２００５およびＬｉｕ　ｅｔ　ａｌ．，２０１０もまた参照されたい。

【０１９１】

変異株の単離は、変異誘発植物または種子をスクリーニングすることで達成されてもよい。例えばＳＢＥＩＩａおよび／またはＳＢＥＩＩｂ遺伝子型について、変異誘発コムギ集団を直接スクリーニングしてもよく、またはＳＢＥＩＩ遺伝子中の変異に起因する表現型について、間接的にスクリーニングしてもよい。遺伝子型について直接スクリーニングすることは、好ましくはＳＢＥＩＩ遺伝子中の変異の存在についてアッセイすることを含み、それは遺伝子のいくつかを欠失させた場合に予期されるように、特定のＳＢＥＩＩａまたはＳＢＥＩＩｂマーカーの不在によってＰＣＲアッセイ中で、またはＴｉｌｌｉｎｇのようなヘテロ二本鎖ベースのアッセイ中で観察されてもよい。表現型のスクリーニングは、１つまたは複数のＳＢＥＩＩａまたはＳＢＥＩＩｂタンパク質量の損失または低下について、ＥＬＩＳＡまたは親和性クロマトグラフィーによって、または穀粒デンプ中の増大するアミロース含有量について、スクリーニングすることを含んでなってもよい。六倍体コムギ中では、スクリーニングは、好ましくは機能活性をさらに欠く変異株を探し求めるように、例えば３個のゲノムの内２個の上でＳＢＥＩＩａまたはＳＢＥＩＩｂ遺伝子が既に変異体であるコムギ植物中などの、ＳＢＥＩＩ活性の１つまたは２つを既に欠く遺伝

子型中で行われる。四倍体コムギ中では、スクリーニングは好ましくは、ＡまたはＢゲノムのいずれかの上で１つのＳＢＥＩＩ活性を既に欠く遺伝子型中で行われ、第２のゲノムからのＳＢＥＩＩが低下した変異株が同定される。親和性クロマトグラフィーは、実施例１１で実証されるように実施してもよい。変異誘発種子の大集団（数千または数万の種子）は、実施例１０で実証されるように、近赤外線分光法（ＮＩＲ）を使用して、高アミロース表現型についてスクリーニングしてもよい。ＮＩＲを使用して、高アミロース候補について濃縮された亜集団が得られた。これらの手段によって、ハイスループットスクリーニングが容易に達成でき、数百個の種子あたりおよそ１個の頻度で変異株を単離できる。

【０１９２】

本発明の植物および種子は、ＴＩＬＬＩＮＧ（ゲノム中の標的部位に局所的損傷を誘発する手法）として知られる工程を使用して生じさせ得て、コムギ植物または穀粒中の変異の１つまたは複数が、この方法によって生じてもよい。第１のステップでは、化学または照射変異原で種子または花粉を処理することによって、新規単一塩基対の修正などの導入変異を植物集団内で誘導し、次に典型的に、同型接合体が同定されることもあるＭ２世代である、変異が安定して遺伝する世代に進む。集団の全構成員からＤＮＡが抽出され、種子が保存されて、経時的に繰り返しアクセスし得る資源が作成される。ＴＩＬＬＩＮＧアッセイでは、関心の対象である単一遺伝子を特異的に増幅するＰＣＲプライマーがデザインされる。次に染料標識プライマーを使用して、複数個体のプールされたＤＮＡからＰＣＲ産物を増幅し得る。これらのＰＣＲ産物を変性させ、再アニーリングして、ミスマッチ塩基対を形成させる。ミスマッチ、またはヘテロ二本鎖は、天然単一ヌクレオチド多形性（ＳＮＰ）（すなわち集団からのいくつかの植物は、同一多形性を有することが期待できる）と、誘導ＳＮＰ（すなわち稀な個々の植物のみが変異を呈示することが期待できる）の双方に相当する。ヘテロ二本鎖形成後、ミスマッチＤＮＡを認識して切断するＣｅｌＩなどのエンドヌクレアーゼの使用が、または、高分解融解の使用が、ＴＩＬＬＩＮＧ集団内で新規ＳＮＰを発見する上で用いられる。例えば、Ｂｏｔｔｉｃｅｌｌａ ｅｔ ａｌ．，２０１１を参照されたい。

【０１９３】

このアプローチを使用して、数千の植物をスクリーニングして、あらゆる遺伝子またはゲノムの特定領域中で、単一塩基置換ならびに小さな挿入または欠失（１～３０ｂｐ）がある、あらゆる個体を同定し得る。アッセイされるゲノムの断片は、０．３～１．６ｋｂ程度のサイズに及び得る。８倍のプールで、１．４ｋｂ断片をアッセイあたり９６レーンで増幅し、この組み合わせは、単一アッセイあたり、最高の１００万個のゲノムＤＮＡの塩基対がスクリーニングできるようにして、ＴＩＬＬＩＮＧをハイスループット技術にする。ＴＩＬＬＩＮＧについては、Ｓｌａｄｅ ａｎｄ Ｋｎａｕｆ，２００５、およびＨｅｎｉｋｏｆｆ ｅｔ ａｌ．，２００４でさらに記載される。

【０１９４】

変異の効率的な検出を可能にするのに加えて、ハイスループットＴＩＬＬＩＮＧ技術は、天然多形性の検出に理想的である。したがって既知の配列とのヘテロ二本鎖形成によって未知の相同ＤＮＡを照合することで、多型性部位の数および位置が明らかになる。少なくともいくつかの反復数多形性をはじめとするヌクレオチド変化と、小さな挿入および欠失の双方が同定される。これは、Ｅｃｏｔｉｌｌｉｎｇと称されている（Ｃｏｍａｉ ｅｔ ａｌ．，２００４）。変異誘発植物からのＤＮＡプールでなく、配列生態型ＤＮＡ（ａｒｒａｙｅｄ ｅｃｏｔｙｐｉｃ ＤＮＡ）を含有するプレートがスクリーニングされ得る。検出は、ほぼ塩基対の分解能のゲル上であり、背景パターンはレーンの全域で一様であるため、同一サイズのバンドを整合させ得て、したがって変異が単一ステップで発見されて遺伝子型が同定される。このようにして、変異遺伝子の配列決定は単純で効率的である。

【０１９５】

次に所望の遺伝的背景がある植物と変異株とを交雑して、同定された変異を望ましい遺伝的背景に導入し、適切な回数の戻し交雑を実施して、本来望まれない親背景を交雑除去

（ｃｒｏｓｓ　ｏｕｔ）してもよい。

【０１９６】

本出願の文脈で、「誘導変異」または「導入変異」は、例えばトランスポゾンまたはＴ－ＤＮＡ挿入などの化学、照射または生物学ベースの変異誘発の結果であってもよい、人工的に誘導された遺伝的変動である。

【０１９７】

いくつかの実施例では、変異とは、遺伝子を完全に不活性化するナンセンス変異、フレームシフト変異、欠失、挿入変異、またはスプライス部位変種のようなヌル変異である。別の実施例では、いくらかのＳＢＥＩＩ活性を保つが、野生型酵素のレベルを下回る部分的変異である。ヌクレオチド挿入誘導体としては、５’および３’末端融合ならびに単一または複数ヌクレオチドの配列内挿入が挙げられる。

【０１９８】

挿入ヌクレオチド配列変種は、亜鉛フィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）またはその他の相同的組換え法により可能であるような所定部位に、またはランダム挿入と得られた生成物の適切なスクリーニングによって、ヌクレオチド配列部位に１つまたは複数のヌクレオチドが導入されたものである。

【０１９９】

欠失変種は、配列からの１つまたは複数のヌクレオチドの除去によって特徴付けられる。好ましくは、変異遺伝子は、野生型遺伝子と比較して、ヌクレオチド配列の単一挿入または欠失のみを有する。欠失は、十分大規模であって、１つまたは複数のエクソンまたはイントロン、エクソンおよびイントロンの双方、イントロン－エクソン境界、プロモーターの一部、翻訳開始部位を含み、または遺伝子全体さえも含んでもよい。欠失は十分広がり、２個の遺伝子の密接な遺伝的連鎖に基づいて、Ａ、ＢまたはＤゲノム上のＳＢＥＩＩａおよびＳＢＥＩＩｂ遺伝子の双方の少なくとも一部、または全体を含んでもよい。３の正確な倍数でないいくつかのヌクレオチドを挿入または欠失させる、遺伝子のタンパク質コード領域のエクソン内の挿入または欠失は、翻訳中に読み枠の変化を引き起こし、このような挿入または欠失を含んでなる変異遺伝子の活性をほぼ必ず消滅させる。

【０２００】

置換ヌクレオチド変種は、配列中の少なくとも１個のヌクレオチドが除去され、異なるヌクレオチドがその場所に挿入されたものである。いくつかの実施例では、野生型遺伝子と比較した変異遺伝子中の置換によって影響される、ヌクレオチド数は、最大１０ヌクレオチド、より好ましくは最大９、８、７、６、５、４、３、または２、または最も好ましくは１ヌクレオチドのみである。置換は、置換が、コドンによって規定されるアミノ酸を変化させない「サイレント」であってもよい。ヌクレオチド置換は翻訳効率を低下させ、それによって例えばｍＲＮＡ安定性を低下させることで、またはエクソン－イントロンスプライス境界近くの場合はスプライシング効率を変化させることで、ＳＢＥＩＩ発現レベルを低下させてもよい。ＳＢＥＩＩａまたはＳＢＥＩＩｂ遺伝子の翻訳効率を変化させないサイレント置換は、遺伝子活性を変化させることが予測されず、そのため本明細書では非変異体と見なされ、すなわちこのような遺伝子は活性変種であり、「変異対立遺伝子」に包含されない。代案としては、特に保存アミノ酸がかなり異なる別のアミノ酸によって置換され、すなわち非保存的置換であれば、ヌクレオチド置換はコードされたアミノ酸配列を変化させ、それによってコードされた酵素の活性が変化してもよい。典型的な保存的置換は、表３に従って作成されたものである。

【０２０１】

「変異」という用語は、本明細書の用法では、遺伝子の活性に影響を及ぼさないサイレントヌクレオチド置換を含まず、したがって遺伝子活性に影響を及ぼす遺伝子配列の変化のみを含む。「多形性」という用語は、このようなサイレントヌクレオチド置換をはじめとする、ヌクレオチド配列中のあらゆる変化を指す。スクリーニング法は、１番目に多形性のスクリーニング、２番目に多形変種群内の変異のスクリーニングを伴ってもよい。

【０２０２】

当該技術分野で理解されるように、パンコムギなどの六倍体コムギは、一般にＡ、Ｂ、およびＤゲノムと称される３個のゲノムを含んでなる一方、デュラムコムギなどの四倍体コムギは、一般にＡおよびＢゲノムと称される２個のゲノムを含んでなる。各ゲノムは７対の染色体を含んでなり、それは当該技術分野で周知のように、減数分裂間に細胞学的方法によって観察され、したがって同定されてもよい。

【０２０３】

「植物」および「コムギ植物」という用語は、名詞としての本明細書の用法では、概して植物全体を指すが、「植物」または「コムギ」が形容詞として使用される場合、用語は、例えば植物器官（例えば葉、茎、根、花卉）、単一細胞（例えば花粉）、種子、例えば組織培養細胞をはじめとする植物細胞、「小麦粉」、「コムギ穀粒」、「コムギデンプン」、「コムギデンプン顆粒」などの植物から製造される製品など、植物またはコムギ植物中に存在し、それから得られ、それに由来し、またはそれに関連するあらゆる物質を指す。それから根および苗条が出現した小植物および発芽種子もまた、「植物」の意味に含まれる。「植物部位」という用語は、本明細書の用法では、好ましくはコムギ植物である植物全体から得られる、１つまたは複数の植物組織または器官を指す。植物部位としては、栄養構造体（例えば葉、茎）、根、花器官／構造体、種子（胚、内胚乳、および種皮をはじめとする）、植物組織（例えば維管束組織、粉砕組織など）、細胞およびその子孫が挙げられる。「植物細胞」という用語は、本明細書の用法では、好ましくはコムギ植物である、植物から得られる、または植物中の細胞を指し、プロトプラストまたは植物に由来するその他の細胞、配偶子生成細胞、および植物全体に再生する細胞が挙げられる。植物細胞は、培養中の細胞であってもよい。「植物組織」とは、植物中のまたは植物（「外植片」）から得られる分化組織、または未熟または成熟胚、種子、根、苗条、果実、花粉、およびカルスなどの培養中の植物細胞の様々な集合形態に由来する、未分化組織を意味する。コムギ種子などの種子中のまたは種子からの植物組織は、種皮、内胚乳、胚盤、アリューロン層、および胚である。

【０２０４】

本明細書の用法では穀類は、それらの種子の可食成分のために栽培される、単子葉植物科の禾本科（ＰｏａｃｅａｅまたはＧｒａｍｉｎａｅ）の植物または穀粒を意味し、コムギ、オオムギ、トウモロコシ、オートムギ、ライムギ、イネ、ソルガム、ライコムギ、キビ、ソバが挙げられる。好ましくは、穀物植物または穀類は、コムギまたはオオムギ植物または穀類、より好ましくはコムギ植物または穀類である。さらに好ましい実施形態では、穀物植物は、イネまたはトウモロコシでなく、またはこれらのいずれでもない。

【０２０５】

本明細書の用法では、「コムギ」という用語は、その祖先、ならびにその他の種との交雑によって生じるその子孫をはじめとする、コムギ属（Ｔｒｉｔｉｃｕｍ）のあらゆる種を指す。コムギには、４２本の染色体からなるＡＡＢＢＤＤのゲノム構成を有する「六倍体コムギ」、および２８本の染色体からなるＡＡＢＢのゲノム構成を有する「四倍体コムギ」が含まれる。六倍体コムギとしては、コムギ（Ｔ．ａｅｓｔｉｖｕｍ）、スペルトコムギ（Ｔ．ｓｐｅｌｔａ）、マカコムギ（Ｔ．ｍａｃｈａ）、密穂コムギ（Ｔ．ｃｏｍｐａｃｔｕｍ）、インド矮性コムギ（Ｔ．ｓｐｈａｅｒｏｃｏｃｃｕｍ）、バビロビコムギ（Ｔ．ｖａｖｉｌｏｖｉｉ）、およびそれらの種間交雑が挙げられる。四倍体コムギとしては、デュラムコムギ（Ｔ．ｄｕｒｕｍ）（デュラムコムギ（ｄｕｒｕｍ ｗｈｅａｔ）またはリベットコムギ・デュラム亜種（Ｔｒｉｔｉｃｕｍ ｔｕｒｇｉｄｕｍ ｓｓｐ．ｄｕｒｕｍ）とも称される）、Ｔ．ジコッコイデス（Ｔ．ｄｉｃｏｃｃｏｉｄｅｓ）、エンマーコムギ（Ｔ．ｄｉｃｏｃｃｕｍ）、ポーランドコムギ（Ｔ．ｐｏｌｏｎｉｃｕｍ）、およびそれらの種間交雑が挙げられる。これに加えて、「コムギ」という用語は、Ａゲノムではウラルツコムギ（Ｔ．ｕｒａｒｔｕ）（Ｔ．ｕａｒｔｕ）、ヒトツブコムギ（Ｔ．ｍｏｎｏｃｏｃｃｕｍ）または野生型ヒトツブコムギ（Ｔ．ｂｏｅｏｔｉｃｕｍ）、Ｂゲノムではクサビコムギ（Ａｅｇｉｌｏｐｓ ｓｐｅｌｔｏｉｄｅｓ）、Ｄゲノムではタルホコムギ（Ｔ．ｔａｕｓｃｈｉｉ）（Ａｅｇｉｌｏｐｓ ｓｑｕａｒｒｏｓａまたはＡ

ｅｇｉｌｏｐｓ　ｔａｕｓｃｈｉｉとしてもまた知られている）などの六倍体または四倍体コムギ（Ｔｒｉｔｉｃｕｍ）種の予測される祖先を含む。本発明で使用するためのコムギ栽培品種は、上に列挙した種のいずれかに属してもよいが、これに限定されるものではない。ライムギ（Ｓｅｃａｌｅ　ｃｅｒｅａｌｅ）などのライコムギ（Ｔｒｉｔｉｃａｌｅ）をはじめとするが、これに限定されるものではない非コムギ（Ｔｒｉｔｉｃｕｍ）種との有性交雑中で、親としてコムギ（Ｔｒｉｔｉｃｕｍ）種を使用して、従来技術によって生成される植物もまた包含される。好ましくはコムギ植物は、六倍体コムギまたはデュラムコムギの商業的変種などのように、当業者に知られている適切な農業特性を有して、穀物の商業生産に適する。より好ましくは、コムギは、コムギ・エスチバム亜種（Ｔｒｉｔｉｃｕｍ　ａｅｓｔｉｖｕｍ　ｓｓｐ．ａｅｓｔｉｖｕｍ）またはリベットコムギ・デュラム亜種（Ｔｒｉｔｉｃｕｍ　ｔｕｒｇｉｄｕｍ　ｓｓｐ．ｄｕｒｕｍ）であり、最も好ましくは、コムギは、本明細書で「パンコムギ」とも称されるコムギ・エスチバム亜種（Ｔｒｉｔｉｃｕｍ　ａｅｓｔｉｖｕｍ　ｓｓｐ．ａｅｓｔｉｖｕｍ）である。

【０２０６】

本明細書の用法では、「オオムギ」という用語は、その祖先、ならびにその他の種との交雑によって生じるその子孫をはじめとする、オオムギ属（Ｈｏｒｄｅｕｍ）のあらゆる種を指す。植物は、例えばオオムギ（Ｈｏｒｄｅｕｍ　ｖｕｌｇａｒｅ）の株または栽培品種または変種などの商業的に栽培されるオオムギ（Ｈｏｒｄｅｕｍ）種であり、または穀物の商業生産に適することが好ましい。

【０２０７】

本発明の態様は、本発明のコムギ穀粒の植え付けおよび収穫の方法、および本発明のコムギ穀粒入り容器を生産する方法を提供する。例えば、土地を耕起および／または特定の他の方法で準備した後、種子（ｋｅｒｎｅｌ、核）を、まいて播種（すなわち、土地の表面に分布させる）することで植え付けるか、または溝を掘って種子を列に植え付ける。核の散逸を防ぐために、コムギは完全に熟する前に収穫する。収穫にはいくつかのステップがある：茎の切断または刈り取り；核を穂、包えい、および他のもみ殻から分けるための脱穀および吹き分け；穀粒のふるい分けおよび分類；穀粒をトラックに積む；および、わらを束ねる。いくつかの実施例では、収穫後のコムギ穀粒は、害虫が入らないようにした、乾燥して良く換気した建物中で保管するようにしている。いくつかの実施例では、収穫したコムギ穀粒を短期間、容器または穀物倉庫に保管するようにしている。いくつかの実施例では、収穫後のコムギ穀粒は短期のあいだ容器または穀物貯蔵所に保管する。穀粒はその後、産地穀物倉庫に運搬し、高い建物中で穀粒を、乾燥させて売れるまで保管するか、またはターミナルエレベータへ出荷する。したがって、本発明の実施例は：（ａ）本明細書で定義したコムギ穀粒を含むコムギ茎を刈り取るステップ；（ｂ）茎を脱穀および／または吹き分けして穀粒をもみ殻から分けるステップ；（ｃ）ステップｂで分けた穀粒をふるい分けおよび／または分類し、ふるい分けたおよび／または分類した穀粒を容器に入れ、コムギ穀粒入り容器を生産するステップ；を具えるコムギ穀粒入りの容器を生産する工程を提供する。

【０２０８】

本発明のコムギ植物は、例えば調査または育種における用途など、食品または動物飼料用途以外の多くの用途を有してもよい。コムギなどの種子繁殖作物中では、植物が自己交雑して所望の遺伝子について同型接合である植物を生じ得て、または例えば発生中の胚芽細胞などの半数組織が染色体組を倍加するように誘導して、同型接合植物を産生し得る。本発明の同系交配コムギ植物は、それによって、同型接合であってもよい、変異ＳＢＥＩＩ対立遺伝子の組み合わせを含有する種子を産生する。これらの種子を栽培して、例えばそのデンプン中の高アミロース含有量などの選択された表現型を有する植物を産生し得る。

【０２０９】

本発明のコムギ植物は、より望ましい遺伝的背景を含有する植物と交雑してもよく、したがって本発明は、その他の遺伝的背景への低ＳＢＥＩＩ形質の移入を含む。最初の交雑

後、適切な回数の戻し交雑を実施して、望ましさに劣る背景を除去してもよい。本明細書に記載されるものなどのＳＢＥＩＩ対立遺伝子特異的ＰＣＲベースのマーカーを使用して、対立遺伝子の所望の組み合わせがある子孫植物または穀粒をスクリーニングまたは同定し、それによって育種プログラムにおける対立遺伝子の存在を追跡してもよい。所望の遺伝的背景は、遺伝子の適切な組み合わせを含んで、商業的産生量、および農業生産力または非生物的ストレス耐性などのその他の特性を提供してもよい。遺伝的背景はまた、例えばその他のコムギ系統からの遺伝子など、その他の改変デンプン生合成または修飾遺伝子を含み得る。遺伝的背景は、例えばグリホサートなどの除草剤耐性をもたらす遺伝子などの１つまたは複数の導入遺伝子を含んでなってもよい。

【０２１０】

コムギ植物の所望の遺伝的背景は、農業収量およびその他の特性の考察を含む。このような特性は、冬型または春型、農業生産力、疾病耐性および非生物的ストレス耐性を有することが所望されるかどうかを含み得る。オーストラリアにおける使用では、本発明のコムギ植物の改変デンプン形質をＢａｘｔｅｒ、Ｋｅｎｎｅｄｙ、Ｊａｎｚ、Ｆｒａｍｅ、Ｒｏｓｅｌｌａ、Ｃａｄｏｕｘ、Ｄｉａｍｏｎｄｂｉｒｄまたはその他の一般的栽培変種などのコムギ栽培品種に交雑することが所望されるかもしれない。その他の栽培地域では、その他の変種が適切であろう。本発明のコムギ植物は、少なくともいくつかの栽培地域における対応する野生型変種の収量と比較して、少なくとも８０％、より好ましくは少なくとも８５％、または少なくとも９０％の穀粒収量を提供することが好ましく、なおもより好ましくは同じ条件下で栽培されたほぼ同じ遺伝的背景を有する野生型変種と比較して、少なくとも９５％の穀粒収量を提供する。最も好ましくは、本発明のコムギ植物の穀粒収量は、少なくとも、ほぼ同じ遺伝的背景を有して同じ条件下で栽培された野生型コムギ植物の収量と同程度に大きい。収量は、対照野外実験で、または温室内の疑似野外実験で、好ましくは野外で容易に測定し得る。

【０２１１】

マーカー利用選択は、古典的育種プログラムにおいて、反復親と戻し交雑する際に、得られた異型接合体植物を選択するための周知の方法である。各戻し交雑世代中の植物集団は、対象遺伝子について異型接合体であり、常態では戻し交雑集団中に１：１の比率で存在し、分子マーカーを使用して、遺伝子の２個の対立遺伝子を区別し得る。例えば若芽からＤＮＡを抽出し、遺伝子移入された望ましい形質のための特異的マーカーで試験することで、さらなる戻し交雑のための植物の初期選択が行われ、同時により少数の植物にエネルギーと資源が集中される。

【０２１２】

コムギ植物交雑、自家受粉コムギ植物またはマーカー利用選択などの手順は標準手順であり、当該技術分野で周知である。デュラムコムギなどの四倍体コムギの対立遺伝子の六倍体への移入、またはその他の形態のハイブリダイゼーションはより困難であるが、これもまた当該技術分野で公知である。

【０２１３】

所望の表現型特性を同定するためには、変異ＳＢＥＩＩａおよびＳＢＥＩＩｂ対立遺伝子またはその他の所望の遺伝子の組み合わせを含有するコムギ植物を、典型的に対照植物と比較する。穀粒デンプン中のアミロース含有量などの酵素活性に付随する表現型特性を評価する場合、試験される植物および対照植物は、グロースチャンバー、温室、無蓋チャンバーおよび／または野外条件下で栽培される。特定の表現型形質の同定および対照との比較は、日常統計学的分析とスコア付けに基づく。植物系統間の統計学的差異は、酵素を発現する各組織型内において、植物系統間で酵素活性を比較することで評価し得る。発現および活性は、植物部位形態学、色、数、サイズ、寸法、乾燥および湿重量、熟成、地上－地下バイオマス比；および栄養成長、結実、開花をはじめとする老化を通じた成長の様々な段階のタイミング、速度および持続期間；およびスクロース、グルコース、果糖、およびデンプンレベルならびに内在性デンプンレベルをはじめとする可溶性炭水化物含有量をはじめとする、成長、発生および収量パラメータと比較される。いくつかの実施例では

、本発明のコムギ植物は、同じ条件下で栽培した場合、これらのパラメータの１つまたは複数において、野生型植物と、５０％未満、より好ましくは４０％未満、３０％未満、２０％未満、１５％未満、１０％未満、５％未満、２％未満のまたは１％未満異なる。

【０２１４】

本明細書の用法では、「連鎖する」という用語は、染色体上で、マーカー遺伝子座および第２の遺伝子座が十分近いため、例えば無作為でなく、５０％を超える減数分裂で、一緒に遺伝することを指す。この定義は、マーカー遺伝子座と第２の遺伝子座が、同一遺伝子の一部を形成する状況を含む。さらにこの定義は、マーカー遺伝子座が、対象形質に関与する多形性を含んでなる状況を含む（換言すればマーカー遺伝子座が表現型と直接「連鎖する」）。「遺伝的に連鎖する」という用語は、本明細書の用法では、より狭く、マーカー遺伝子座と第２の遺伝子座が、染色体上で十分に近いため、５０％を超える減数分裂で、一緒に遺伝する場合についてのみ使用される。したがって世代あたりの遺伝子座間で観察された組換え百分率（センチモルガン（ｃＭ））は、５０未満であろう。本発明の特定の実施形態では、遺伝的に連鎖した遺伝子座は、染色体上で、４５、３５、２５、１５、１０、５、４、３、２、または１ｃＭ以下離れていてもよい。好ましくは、マーカーは、５ｃＭまたは２ｃＭ未満離れており、最も好ましくは約０ｃＭは離れている。本明細書の実施例５に記載されるように、ＳＢＥＩＩａおよびＳＢＥＩＩｂ遺伝子は、各コムギゲノムの染色体２の長腕上で遺伝的に連鎖して約０．５ｃＭ離れており、それは約１００～２００ｋｂの物理的距離に相当する。

【０２１５】

本明細書の用法では、「その他の遺伝子マーカー」は、本発明のコムギ植物中の所望の形質と結びついた、あらゆる分子であってもよい。このようなマーカーは当業者に良く知られており、疾病耐性、歩留まり、植物形態学、穀粒品質、穀粒色などのその他の休眠形質、種子中のジベレリン酸含有量、草高、小麦粉色などの形質を定める遺伝子と結びついた、分子マーカーが挙げられる。このような遺伝子の例は、黒さび病耐性遺伝子Ｓｒ２またはＳｒ３８、黄さび病耐性遺伝子Ｙｒ１０またはＹｒ１７、Ｃｒｅ１およびＣｒｅ３などの線虫耐性遺伝子、Ａｘ、Ｂｘ、Ｄｘ、Ａｙ、Ｂｙ、およびＤｙ対立遺伝子などの生地強度を決定するグルテニン遺伝子座の対立遺伝子、半矮性の成長傾向ひいては耐倒伏性を決定するＲｈｔ遺伝子である（Ｅａｇｌｅｓ ｅｔ ａｌ．，２００１；Ｌａｎｇｒｉｄｇｅ ｅｔ ａｌ．，２００１；Ｓｈａｒｐ ｅｔ ａｌ．，２００１）。

【０２１６】

本発明のコムギ植物、コムギ植物部位、およびそれからの製品は、好ましくは、ＳＢＥＩＩａ発現を阻害する遺伝子について非遺伝子組換えであり、すなわちそれらは、内在性ＳＢＥＩＩａ遺伝子の発現を低下させるＲＮＡ分子をコードする導入遺伝子を含まないが、この実施形態では、それらは例えば除草剤耐性遺伝子などのその他の導入遺伝子を含んでなってもよい。より好ましくは、コムギ植物、穀粒、およびそれからの製品は、非遺伝子組換えであり、すなわちそれらはいかなる導入遺伝子も含有せず、それはいくつかの市場で好ましい。このような製品はまた、本明細書で「非形質転換」製品として記載される。このような非遺伝子組換え植物および穀粒は、変異誘発後に生じるものなどの本明細書に記載される複数の変異ＳＢＥＩＩ対立遺伝子を含んでなる。

【０２１７】

「遺伝子組換え植物」および「遺伝子組換えコムギ植物」という用語は、本明細書の用法では、同一の種、変種または栽培品種の野生型植物中には見られない遺伝子コンストラクト（「導入遺伝子」）を含有する植物を指す。すなわち、遺伝子組換え植物（形質転換植物）は、形質転換前には含有しなかった遺伝物質を含有する。本明細書で言及される「導入遺伝子」は、生物工学技術分野における標準的意味を有し、組換えＤＮＡまたはＲＮＡ技術によって生成または改変され、植物細胞に導入された遺伝子配列を指す。導入遺伝子は、植物細胞、または別の植物細胞、または非植物原料、または合成配列から得られ、またはそれに由来する、遺伝子配列を含んでもよい。典型的に、導入遺伝子は、例えば形質転換などによって、人為的操作によって植物に導入されるが、当業者は認識するように

あらゆる方法を使用し得る。遺伝物質は、典型的に安定して植物のゲノムに組み込まれる。導入遺伝物質は、同種の天然配列を含んでなってもよいが、それは例えばアンチセンス配列などの再配置された順序、または異なる配置である。このような配列を含有する植物は、本明細書において「遺伝子組換え植物」に含まれる。本明細書で定義される遺伝子組換え植物は、組換え技術を使用して遺伝子操作された最初の形質転換および再生植物（Ｔ０植物）の全ての子孫を含み、子孫は導入遺伝子を含んでなる。このような子孫は、初代遺伝子組換え植物の自家受粉によって、またはこのような植物と同一種の別の植物との交雑によって得られてもよい。一実施形態では、遺伝子組換え植物は、それらの子孫が所望の表現型から分離しないよう、導入されるありとあらゆる遺伝子（導入遺伝子）について同型接合である。遺伝子組換え植物部位としては、例えば種子、培養組織、カルス、およびプロトプラストなど、導入遺伝子を含んでなる前記植物の全ての部分および細胞が挙げられる。「非遺伝子組換え植物」、好ましくは非遺伝子組換えコムギ植物とは、組換えＤＮＡ技術による遺伝物質導入によって遺伝子操作されていないものである。

【０２１８】

本明細書の用法では、「対応する非遺伝子組換え植物」という用語は、ほとんどの特性において同一または同様であって、好ましくは遺伝子組換え植物に対して同質遺伝子型または準同質遺伝子型であるが、対象導入遺伝子がない植物を指す。好ましくは、対応する非遺伝子組換え植物は、対象遺伝子組換え植物の祖先と同一栽培品種または変種であり、またはコンストラクトを欠いて「分離個体」と称されることが多い同胞植物系統であり、または「空ベクター」コンストラクトで形質転換された非遺伝子組換え植物であってもよい、同一栽培品種または変種の植物である。「野生型」は、本明細書の用法では、本発明に従って改質されていない細胞、組織または植物を指す。当該技術分野で公知の野生型細胞、組織または植物を対照として使用して、本明細書に記載されるように改質された細胞、組織または植物について、外来性核酸の発現レベルまたは形質修飾の程度と性質を比較してもよい。本明細書の用法では、「野生型コムギ穀粒」は、対応する非変異誘発非遺伝子組換えコムギ穀粒を意味する。本明細書の用法では、特定の野生型コムギ穀粒としてはＳｕｎｓｔａｔｅおよびＣａｄｏｕｘが挙げられるが、これに限定されるものではない。Ｓｕｎｓｔａｔｅ栽培品種は、Ｅｌｌｉｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，（１９９４）Ｔｒｉｔｉｃｕｍ ａｅｓｔｉｖｕｍ ｓｐｐ．ｖｕｌｇａｒｅ（パンコムギ）ｃｖ．Ｓｕｎｓｔａｔｅ，Ａｕｓｔｒａｌｉａｎ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ Ａｇｒｉｃｕｌｔｕｒｅ，３４（６）：８６９－８６９に記載されており、その全ての内容がここに参考文献として入れられている。

【０２１９】

いくつかの方法のいずれかを用いて、形質転換植物中の導入遺伝子の存在を判定してもよい。例えばポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）を使用して、形質転換植物に特有の配列を増幅し、ゲル電気泳動またはその他の方法によって、増幅産物を検出してもよい。従来法を使用して植物からＤＮＡを抽出し、形質転換および非形質転換植物を区別するプライマーを使用して、ＰＣＲ反応を実施してもよい。陽性形質転換体を同定する代替え方法は、当該技術分野で周知のサザンブロット法ハイブリダイゼーションによる。形質転換されたコムギ植物は、例えば選択可能なマーカー遺伝子の存在によってもたらされるそれらの表現型によって、または導入遺伝子によってコードされる酵素の発現、または導入遺伝子によってもたらされるあらゆるその他の表現型を検出または定量化する免疫測定法によって、同定されてもよく、すなわち非形質転換または野生型コムギ植物と区別されてもよい。

【０２２０】

本発明のコムギ植物は、主に食用に供するため、または動物飼料としての穀粒、または特にエタノール製造などの発酵または工業原料生産用の穀粒のために、栽培または収穫されてもよい。代案としては、コムギ植物は飼料として直接使用されてもよい。本発明の植物は、好ましくは食品製造、特に商業的食品生産のために有用である。食品製造としては、商業的食品製造の成分であり得る、穀粒からの小麦粉、生地、セモリナまたはその他の製品の製造が挙げられる。

【０２２１】
本明細書の用法では、「穀粒」という用語は、概して植物の成熟し収穫された種子を指すが、文脈次第で吸水または発芽後の穀粒もまた指し得る。成熟穀類などのコムギは、一般に約１８～２０％未満の水分含有量を有する。本明細書の用法では、「種子」という用語は、収穫種子を含むが、開花後に植物中で発生中の種子および収穫前に植物に含まれる成熟種子もまた含む。
【０２２２】
本明細書の用法では、「発芽」は、吸水後の種皮からの根端の出現を指す。「発芽率」は、吸水後、例えば７または１０日の期間内に発芽した集団中の種子の百分率を指す。発芽率は、当該技術分野で公知の技術を使用して計算し得る。例えば種子集団を数日間にわたって毎日評価して、経時的に発芽百分率を判定し得る。本発明の穀粒に関して、本明細書の用法では「実質的に同一の発芽率」という用語は、穀粒の発芽率が、対応する野生型穀粒の少なくとも９０％であることを意味する。
【０２２３】
デンプンは、例えばＳｃｈｕｌｍａｎ ａｎｄ Ｋａｍｍｉｏｖｉｒｔａ，１９９１の方法などの標準法を使用して、容易にコムギ穀粒から単離される。工業規模では、湿式粉砕または乾式製粉を使用し得る。デンプン顆粒サイズは、より小さなＢ顆粒からより大きなＡ顆粒が分離されるデンプン加工産業で重要である。
【０２２４】
栽培される栽培品種に多少依存して、商業的に栽培される野生型コムギは、穀粒中に通常５５～６５％の範囲のデンプン含有量を有する。相対的に、植物が同じ条件下で栽培された場合、本発明の種子または穀粒は、野生型穀粒のデンプン含有量と比較して少なくとも９０％、好ましくは少なくとも９３％、少なくとも９５％、または少なくとも９８％のデンプン含有量を有する。さらなる実施形態では、穀粒のデンプン含有量は、穀粒重量の百分率（ｗ／ｗ）として、少なくとも約２５％、少なくとも約３５％、少なくとも約４５％、または少なくとも約５５％～約６５％である。その他の望ましい特性としては、穀粒の製粉能力、特に穀粒硬度が挙げられる。コムギ植物の価値をより高める別の側面は、穀粒からのデンプン抽出の程度であり、より高い抽出率がより有用である。粒形もまた、植物の商業的有用性に影響を及ぼし得る別の特徴であり、したがって粒形は、穀粒を製粉し得る容易さまたはその他の点に影響を及ぼし得る。
【０２２５】
別の態様では、本発明は、アミロース比が増大してアミロペクチン比が低下した、上述のデンプン顆粒、または植物穀粒から得られるデンプンを提供する。精製デンプンは、例えばタンパク質、油、および繊維からのデンプンの分離を伴う、湿式磨砕工程などの製粉工程によって穀粒から得られてもよい。製粉工程の初期生成物は、デンプン顆粒の混合物または組成物であり、したがって本発明は、このような顆粒を包含する。コムギからのデンプン顆粒は、数あるタンパク質中で特にＧＢＳＳ、ＳＢＥＩＩａ、およびＳＢＥＩＩｂをはじめとするデンプン顆粒結合タンパク質を含んでなり、したがってこれらのタンパク質の存在は、その他の穀類のデンプン顆粒からコムギデンプン顆粒を区別する。デンプン顆粒からのデンプンは、加熱および／または化学的処理によるデンプン顆粒の破壊と分散後に、タンパク質を除去することで精製してもよい。本発明のコムギ穀粒からのデンプン顆粒では、特に穀粒の全デンプンの百分率として少なくとも５０％のアミロース含有量を有するコムギ穀粒では、本明細書で例示されるように、光学顕微鏡下で観察すると、典型的に形状および表面形態が歪んでいる。一実施形態では、穀粒から得られるデンプン顆粒の少なくとも５０％、好ましくは少なくとも６０％または少なくとも７０％は、歪んだ形状または表面形態を示す。デンプン顆粒はまた、偏光下で観察した際に複屈折喪失も示す。
【０２２６】
本発明の穀粒デンプン、デンプン顆粒デンプン、および精製デンプンは、以下の特性の１つまたは複数によってさらに特徴付けられてもよい。

（ｉ）全デンプンの比率として、少なくとも５０％（ｗ／ｗ）、または少なくとも６０％（ｗ／ｗ）、または少なくとも６７％（ｗ／ｗ）のアミロース；
（ｉｉ）膨潤体積の修正；
（ｉｉｉ）鎖長分布および／または分枝発生頻度の修正；
（ｉｖ）糊化温度の修正；
（ｖ）粘度（ピーク粘度、糊化開始温度など）の修正；
（ｖｉ）アミロペクチンおよび／またはアミロースの分子量の修正；
（ｖｉｉ）％結晶化度の修正
（ｖｉｉｉ）少なくとも２％の難消化性デンプンを含んでなる；および／または
（ｉｘ）低い相対血糖指数（ＧＩ）を含んでなる。

【０２２７】
デンプンはまた、野生型デンプンと比較した、過剰な加熱水中の膨潤体積によって特徴付けられてもよい。膨潤体積は、典型的に、デンプンまたは小麦粉のいずれかと過剰な水を混合して加熱し、典型的に９０℃を上回る高温にして測定される。次にサンプルを遠心分離によって収集し、サンプル乾燥重量で除した沈降物質の質量として膨潤体積が表される。低膨潤特性は、特に水和食品の調製において、食品調製品のデンプン含有量を増大することが所望される場合に有用である。

【０２２８】
改変アミロペクチン構造の１つの尺度は、デンプンの鎖長分布または重合度である。鎖長分布は、イソアミラーゼ（ｉｓｏａｍｙｌｏｓｅ）脱分枝に続いて、フルオロフォア支援炭水化物電気泳動（ＦＡＣＥ）を使用して判定しもよい。本発明のデンプンのアミロペクチンは、脱分枝に際して、野生型植物からのデンプンの分布を上回る、５～６０の範囲の鎖長分布を有してもよい。鎖長のより長いデンプンは、分枝頻度もまた比例して低下する。したがってデンプンはまた、なおも存在するアミロペクチン中に、より長いアミロペクチン鎖長の分布を有してもよい。穀粒のアミロペクチンは、アミロペクチンのイソアミラーゼ脱分枝後の測定で、野生型穀粒のアミロペクチンと比較して、４～１２ｄｐ鎖長画分の比率低下を含んでなることで特徴付けられてもよい。

【０２２９】
本発明の別の態様では、コムギデンプンは、示差走査熱量測定（ＤＳＣ）によって容易に測定されてもよい、糊化温度の変化を有してもよい。糊化は、顆粒膨潤、微結晶融解、複屈折喪失、粘度発生、およびデンプン可溶化などの特性の同時不可逆的変化を伴う、過剰な水中におけるデンプン顆粒内の分子秩序の熱駆動崩壊（破壊）である。糊化温度は、残留アミロペクチンの鎖長次第で、野生型植物からのデンプンと比較して、上昇または低下してもよい。アミロース増量（ａｅ）トウモロコシ変異株からの高アミロースデンプンは、標準的トウモロコシよりも高い糊化温度を示した（Ｆｕｗａ　ｅｔ　ａｌ．，１９９９；Ｋｒｕｅｇｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，１９８７）。他方、デンプンシンターゼＩＩａ活性を欠くオオムギｓｅｘ６変異株からのデンプンは、対照植物と比べて糊化温度が低下し、糊化ピークのエンタルピーが低下した（Ｍｏｒｅｌｌ　ｅｔ　ａｌ．，２００３）。

【０２３０】
糊化温度、特に最初のピークの開始温度および最初のピークの頂点温度は、ＤＳＣによる測定で、類似しているが非改変の穀粒から抽出されるデンプンと比較して、少なくとも３℃、好ましくは少なくとも５℃以上、好ましくは少なくとも７℃上昇してもよい。デンプンは、デンプン顆粒形態の変化が理由であり得る消化酵素の物理的到達し難さ、顕著なデンプン結合脂質の存在、結晶化度の変化、およびアミロペクチン鎖長分布の変化からなる群の１つまたは複数をはじめとする、特定の物理的特性によって示される構造変化と共に、難消化性デンプンレベルの上昇を含んでなってもよい。アミロースの高比率もまた、難消化性デンプンレベルに寄与する。

【０２３１】
本発明のコムギデンプンの構造は、小麦から単離された標準的デンプンに比べて、結晶化度が低下しているという点で異なっていてもよい。デンプンの結晶化度の低下はまた、

官能特性の向上と関係して、より滑らかな口当たりに寄与すると考えられる。したがってデンプンは、１つまたは複数のアミロペクチン合成酵素の活性レベル低下に起因する、結晶化度の低下をさらに示してもよい。結晶化度は、Ｘ線結晶構造解析によって典型的に調査される。

【０２３２】

いくつかの実施形態では、検討中のデンプンは、１％～２０％、２％～１８％、３％～１８％または５％～１５％の難消化性デンプンをはじめとする、難消化性デンプンの増大、および血糖指数（ＧＩ）低下などの消化特性の修正を提供する。

【０２３３】

本発明はまた、穀粒から製造される、小麦粉、全粒小麦粉、またはその他の製品も提供する。これらは未加工であっても、または例えば分画または漂白によって加工されていてもよい。

【０２３４】

本発明はまた、好ましくは難消化性デンプンレベルの上昇と組み合わさった、増大した食物繊維量を含んでなる、例示されるコムギ植物の穀粒からのデンプンも提供する。この増大はまた、少なくとも部分的に、高い相対的アミロースレベルの結果である。

【０２３５】

「食物繊維」という用語は、本明細書の用法では、健康なヒトの小腸で吸収されずに、大腸に入る炭水化物と炭水化物消化産物を含む。これは難消化性デンプンと、その他の可溶性および不溶性炭水化物ポリマーとを含む。これは、大腸内で常在性細菌叢によって発酵される炭水化物部分の少なくとも一部を構成することが、意図される。本発明のデンプンは、比較的高レベルの食物繊維、より具体的にはアミロースを含有する。本発明の穀粒の食物繊維含有量は、少なくとも部分的に、穀粒のデンプン中のアミロース含有量増大に起因し、また全デンプンの百分率としての難消化性デンプン含有量の増大にも起因し、またはそれらの組み合わせに起因する。「難消化性デンプン」は、本明細書において、健康なヒトの小腸で吸収されないが大腸に入る、デンプンおよびデンプン消化産物の合計と定義される。これは文脈次第で、穀粒の全デンプンの百分率、または食物の全デンプン含有量の百分率の観点から定義される。したがって難消化性デンプンからは、消化され小腸で吸収される産物は除外される。難消化性デンプンとしては、物理的にアクセス不能なデンプン（ＲＳ１形態）、難消化性天然デンプン顆粒（ＲＳ２）、老化デンプン（ＲＳ３）、および化学修飾デンプン（ＲＳ４）が挙げられる。デンプン構造の変化、特に本発明のデンプンの高アミロースレベルは、食物中で摂取された際に、難消化性デンプンの増大を引き起こす。デンプンは、消化にとっていくぶんアクセス不能なＲＳ１形態であってもよい。Ｖ－複合結晶化度によって測定されるデンプン－脂質結合もまた、恐らく難消化性デンプンのレベルに寄与する。

【０２３６】

本発明は、ヒトの治療または予防法において特に有用であってもよい一方で、本発明はまた、ウシ、ヒツジ、ブタなどの農業動物、イヌまたはネコなどの飼育動物、ウサギや、マウス、ラット、ハムスターなどの齧歯類などの実験動物、またはウマなどのスポーツで使用されることもあり得る動物などをはじめとするが、これに限定されるものではない、非ヒト対象にも適用できるものと理解される。方法は、特に、非反芻動物哺乳類に、または単胃哺乳類などの動物に適用可能であってもよい。本発明はまた、例えばニワトリ、ガチョウ、カモ、シチメンチョウ、またはウズラをはじめとする家禽などのその他の農業動物、または魚に適用可能であってもよい。

【０２３７】

特にヒトである対象の処置方法は、本明細書で定義される改変コムギ穀粒、小麦粉、デンプンまたは食品または飲料製品を、それによって腸健康または代謝指標の１つまたは複数のレベルが改善される量と期間で、対象に１回または複数回投与することを含んでなってもよい。指標は、ｐＨ、ＳＣＦＡレベル上昇、食後グルコース変動などのいくつかの指標については、非改変コムギデンプンまたはコムギまたはその製品の摂取と比較して、数

時間以内に変化してもよく、または糞量増大または便通改善については数日間を要してもよく、または酪酸により改善される正常結腸細胞の増殖の測定については、恐らくは数週間または数ヶ月程度の長さを要してもよい。改変デンプンまたはコムギまたはコムギ製品の投与が、生涯にわたることが望ましいこともある。しかし改変デンプンを投与し得る相対的な容易さを考慮すれば、治療される個人による服薬遵守の良好な見通しがある。

【０２３８】

投与量は、治療されるまたは予防される病状次第で変動してもよいが、ヒトでは、１日あたり少なくとも１ｇの本発明のコムギ穀粒またはデンプン、より好ましくは１日あたり少なくとも２ｇ、好ましくは１日あたり少なくとも１０ｇまたは少なくとも２０ｇが想定される。１日あたり約１００グラムを超える投与は、かなりの送達体積を要して、服薬遵守を低下をさせることもある。最も好ましくは、ヒトへの投与量は１日あたり５～６０ｇのコムギ穀粒またはデンプンであり、または成人では１日あたり５～１００ｇである。

【０２３９】

血糖指数（ＧＩ）は、デンプンを含んでなる食品の消化速度に関係があり、血糖濃度変動幅に対する試験食品の影響と、精白パンまたはグルコースの影響との比較である。血糖指数は、食後血清グルコース濃度と、血糖恒常性のためのインシュリン要求に対する、食品の影響可能性の尺度である。本発明の食品によって提供される１つの重要な特性は、血糖指数の低下である。血清グルコースレベルは、ヒトボランティアによる高アミロースコムギ製品摂取の３０分後に、低アミロースコムギと比較して低下する（Ｇｏｄｄａｒｄ　ｅｔ　ａｌ．，１９８４）。さらに食品は最終消化レベルが低く、その結果比較的低カロリーであってもよい。低カロリー製品は、製粉されたコムギ穀粒から製造された小麦粉の包含に基づき得る。このような食品は、満腹させ、腸健康を高め、食後血清グルコースおよび脂質濃度を低下させる効果を有し、ならびに低カロリー食品を提供してもよい。

【０２４０】

腸健康改善の指標は、

ｉ）腸内容物のｐＨ低下、

ｉｉ）腸内容物の全ＳＣＦＡ濃度または全ＳＣＦＡ量の増大、

ｉｉｉ）腸内容物の１つまたは複数のＳＣＦＡの濃度または量の増大、

ｉｖ）糞量増大、

ｖ）下痢なしでの腸または糞便の全水分量の増大、

ｖｉ）便通改善、

ｖｉｉ）１種または複数種のプロバイオティクス細菌の数または活性の増大、

ｖｉｉｉ）糞便中胆汁酸排泄量の増大、

ｉｘ）腐敗産物の尿中レベル低下、

ｘ）腐敗産物の糞便中レベル低下、

ｘｉ）正常結腸細胞の増殖増大、

ｘｉｉ）腸が炎症性である個体における腸内の炎症低下、

ｘｉｉｉ）尿毒症患者における、尿素、クレアチニン、およびリン酸塩のいずれか１つの糞便または大腸レベルの低下、および

ｘｉｖ）上記の任意の組み合わせ

を含んでなってもよいが、必ずしもこれに限定されるものではない。

【０２４１】

代謝健康改善の指標は、

ｉ）食後グルコース変動の安定化、

ｉｉ）血糖応答の改善（低下）、

ｉｉｉ）食前（ｐｒｏ－ｐｒａｎｄｉａｌ）血漿インシュリン濃度の低下、

ｉｖ）血液脂質プロフィールの改善、

ｖ）血漿ＬＤＬコレステロールの低下、

ｖｉ）尿毒症患者における、尿素、クレアチニン、およびリン酸塩の１つまたは複数の血漿レベルの低下、

ｖｉｉ）血糖調節異常（ｄｙｓｇｌｕｃａｅｍｉｃ）応答の改善、または
ｖｉｉｉ）上記の任意の組み合わせ
を含んでなってもよいが、必ずしもこれに限定されるものではない。

【０２４２】

本発明の１つの利点は、特定の栄養面での恩恵があるパンなどの製品を提供することであり、さらにそうするために、コムギ穀粒のデンプンまたはその他の構成物を収穫後に改質する必要がないものと理解される。しかし穀粒のデンプンまたはその他の構成物の改質が所望されることもあり、本発明はこのような改質構成物を包含する。改質方法は、周知であり、従来法によるデンプンまたはその他の構成物の抽出、および難消化性形態を増大させるデンプンの改質が挙げられる。デンプンは、熱および／または水分による処理、物理的処理（例えばボールミル粉砕）、（例えばα－またはβ－アミラーゼ、プルラナーゼ（ｐｕｌｌａｌａｎａｓｅ）などを使用した）酵素的処理、（液体または気体の試薬を使用した湿式または乾式）化学的加水分解、酸化、二官能性試薬（例えばナトリウムトリメタリン酸、オキシ塩化リン）との交差結合、またはカルボキシメチル化によって改質されてもよい。

【０２４３】

本発明のコムギデンプンは、エタノール（生物燃料）またはエタノール含有飲料のための発酵に適した基質であり、コムギ穀粒またはコムギデンプンは、食品、栄養補助食品（不溶性または可溶性繊維）、酵素および工業原料などのその他の発酵製品のための発酵に適した基質であろう。植物由来デンプンを使用した発酵法は、当業者に良く知られており、様々な発酵産物のための確立されたプロセスがある（例えばＶｏｇｅｌｅｔａｌ．，１９９６およびその中の参考文献を参照されたい）。一実施形態では、デンプン炭水化物は、穀粒などの本発明のコムギ植物の部分の破砕によって、または植物組織から水または別の適切な溶媒中への拡散によって抽出されてもよい。本発明のコムギ組織またはデンプンは、バッチ式、連続式、または固定化細胞工程において、発酵または生物変換のための基質として直接使用されてもよい。

【０２４４】

「ポリペプチド」および「タンパク質」という用語は、本明細書において概して同義的に使用される。「タンパク質」および「ポリペプチド」という用語は、本明細書の用法では、本明細書に記載される本発明のポリペプチドの変種、変異体、改質および／または誘導体もまた含む。本明細書の用法では、「実質的に精製されたポリペプチド」とは、それが天然状態で結合する、脂質、核酸、その他のペプチドおよびその他の分子から分離されたポリペプチドを指す。好ましくは、実質的に精製されたポリペプチドは、それが天然に結合するその他の成分を少なくとも６０％、より好ましくは少なくとも７５％、より好ましくは少なくとも９０％含まない。「組換えポリペプチド」とは、組換え技術を使用して、すなわち細胞、好ましくは植物細胞、より好ましくはコムギ細胞中の組換えポリヌクレオチド発現を通じて、作成されたポリペプチドを意味する。一実施形態では、ポリペプチドは、デンプン分枝酵素活性、具体的にはＳＢＥＩＩ活性を有し、本明細書に記載されるＳＢＥＩＩと少なくとも９０％同一である。

【０２４５】

本明細書の用法では、「生物学的活性」断片は、完全長ポリペプチドの規定の活性を保つ、本発明のポリペプチドの一部である。特に好ましい実施形態では、生物学的活性断片は、デンプン分枝酵素活性を有する。生物学的活性断片は、規定の活性を保ちさえすればあらゆるサイズであり得るが、好ましくは少なくとも７００または８００アミノ酸残基の長さである。

【０２４６】

別のポリペプチドと比較したポリペプチドの％同一性は、ＧＡＰ（Ｎｅｅｄｌｅｍａｎ ａｎｄ Ｗｕｎｓｃｈ，１９７０）分析（ＧＣＧプログラム）によって、ｇａｐ ｃｒｅａｔｉｏｎ ｐｅｎａｌｔｙ＝５、およびｇａｐ ｅｘｔｅｎｓｉｏｎ ｐｅｎａｌｔｙ＝０．３で判定し得る。クエリー配列は少なくとも５０アミノ酸長であり、ＧＡＰ分析

は、２つの配列を少なくとも５０個のアミノ酸の領域にわたって整合させる。より好ましくは、クエリー配列は少なくとも１００アミノ酸長であり、ＧＡＰ分析は、２つの配列を少なくとも１００個のアミノ酸の領域にわたって整合させる。なおもより好ましくは、クエリー配列は少なくとも２５０アミノ酸長であり、ＧＡＰ分析は、２つの配列を少なくとも２５０個のアミノ酸の領域にわたって配列比較する。最も好ましくは、２つのＳＢＥＩＩポリペプチドは、それらの完全長アミノ酸配列にわたって配列比較される。

【０２４７】

定義されたポリペプチドに関しては、上で提供されるものよりも高い％同一性値が、好ましい実施形態を包含することが理解されるであろう。したがって当てはまる場合、最小％同一性の観点から、ポリペプチドが、該当する指定配列番号と、少なくとも７５％、より好ましくは少なくとも８０％、より好ましくは少なくとも８５％、より好ましくは少なくとも９０％、より好ましくは少なくとも９１％、より好ましくは少なくとも９２％、より好ましくは少なくとも９３％、より好ましくは少なくとも９４％、より好ましくは少なくとも９５％、より好ましくは少なくとも９６％、より好ましくは少なくとも９７％、より好ましくは少なくとも９８％、より好ましくは少なくとも９９％、より好ましくは少なくとも９９．１％、より好ましくは少なくとも９９．２％、より好ましくは少なくとも９９．３％、より好ましくは少なくとも９９．４％、より好ましくは少なくとも９９．５％、より好ましくは少なくとも９９．６％、より好ましくは少なくとも９９．７％、より好ましくは少なくとも９９．８％、さらにより好ましくは少なくとも９９．９％同一のアミノ酸配列を含んでなることが好ましい。

【０２４８】

アミノ酸配列欠失または挿入は、概して約１～１５残基、より好ましくは約１～１０残基、典型的には約１～５連続残基の範囲である。

【０２４９】

置換変異体は、ポリペプチド分子中の少なくとも１個のアミノ酸残基が除去されて、異なる残基がその場所に挿入される。ポリペプチド活性を低下する置換変異誘発の最大関心部位としては、活性部位として同定された部位が挙げられる。その他の関心部位は、その中で様々な株または種から得られた特定の残基が同一である、すなわち保存的アミノ酸である部位である。これらの位置は、生物学的活性にとって重要であってもよい。これらのアミノ酸、特に少なくとも３個のその他の同様に保存されたアミノ酸の連続配列内に入るものは、好ましくは、ＳＢＥＩＩ活性などの機能を保持するために比較的保存的様式で、または活性を低下するために非保存的様式で置換される。このような保存的置換は、表１の「例示的な置換」の見出しの下に示される。「非保存的アミノ酸置換」は、本明細書では、表３に列挙されるもの（例示的な保存的置換）以外の置換として定義される。ＳＢＥＩＩ中の非保存的置換は酵素活性を低下させることが予測され、多くは、「部分的機能喪失変異ＳＢＥＩＩ遺伝子」によってコードされるＳＢＥＩＩに対応する。

【０２５０】

コムギのアミロプラスト中でＳＢＥＩ、ＳＢＥＩＩａ、およびＳＢＥＩＩｂについて示されたように、本発明の範囲内には、例えばリン酸化によって、合成の最中または後に、差次的に修飾された本発明のポリペプチドもまた含まれる（Ｔｅｔｌｏｗ　ｅｔ　ａｌ．，２００４）。これらの修飾は、例えばデンプン合成中のアミロプラスト内のタンパク質複合体形成の調節によって、酵素活性を調節する役割を果たしてもよく（Ｔｅｔｌｏｗ　ｅｔ　ａｌ．，２００８）、または本発明のポリペプチドの安定性および／または生物活性を増大させ、または別の分子を結合させるリガンドとしての役割を果たす。

【０２５１】

いくつかの実施形態では、本発明は、遺伝子活性、具体的にはＳＢＥＩＩ遺伝子活性の修飾、変異遺伝子の組み合わせ、およびキメラ遺伝子の構築および使用を伴う。本明細書の用法では、「遺伝子」という用語は、タンパク質コード領域を含む、または結合非コードおよび調節領域と共に細胞中で転写されるが翻訳されない、あらゆるデオキシリボヌクレオチド配列を含む。このような結合領域は、典型的に、どちらの側も約２ｋｂの距離で

、５’および３’末端の双方で、コード領域に隣接して位置する。この点において、遺伝子は、所与の遺伝子に天然に結合するプロモーター、エンハンサーなどの調節シグナル、転写終結および／またはポリアデニル化シグナル、または異種調節シグナルを含み、その場合、遺伝子は「キメラ遺伝子」と称される。タンパク質コード領域の５’に位置して、ｍＲＮＡ上に存在する配列は、５’非翻訳配列と称される。タンパク質コード領域の３’または下流に位置して、ｍＲＮＡ上に存在する配列は、３’非翻訳配列と称される。「遺伝子」という用語は、遺伝子のｃＤＮＡおよびゲノム形態の双方を包含する。「遺伝子」という用語は、本明細書に記載される本発明のタンパク質をコードする合成または融合分子を含む。遺伝子は、通常、二本鎖ＤＮＡとしてコムギゲノム中に存在する。キメラ遺伝子は、細胞中の染色体外維持のために、または宿主ゲノムへの組み込みのために、適切なベクターに導入されてもよい。遺伝子または遺伝子型は、本明細書において斜体で言及される（例えばＳＢＥＩＩａ）一方、タンパク質、酵素または表現型は非斜体（ＳＢＥＩＩａ）で言及される。

【０２５２】

コード領域を含有するゲノム形態または遺伝子クローンは、「イントロン」または「介在領域」または「介在配列」と称される非コード配列によって、中断されてもよい。「イントロン」とは、本明細書の用法では、一次ＲＮＡ転写物の一部として転写されるが、成熟ｍＲＮＡ分子中に存在しない遺伝子断片である。イントロンは、核または一次転写産物から除去され、または「切り出され」；したがってメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）中にイントロンは不在である。イントロンは、エンハンサーなどの調節要素を含有してもよい。「エクソン」とは、本明細書の用法では、成熟ｍＲＮＡ中に、またはＲＮＡ分子が翻訳されない場合は成熟ＲＮＡ分子中に存在するＲＮＡ配列に対応する、ＤＮＡ領域を指す。翻訳におけるｍＲＮＡの機能は、新生ポリペプチド中のアミノ酸の配列または順序を指定することである。

【０２５３】

本発明は、様々なポリヌクレオチドに言及する。本明細書の用法では、「ポリヌクレオチド」または「核酸」または「核酸分子」は、例えばｍＲＮＡ、ｃＲＮＡ、ｃＤＮＡ、ｔＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、ｈｐＲＮＡ、および単鎖または二本鎖ＤＮＡをはじめとする、例えばＤＮＡおよびＲＮＡのヘテロ二本鎖などのＤＮＡまたはＲＮＡまたはその組み合わせであってもよい、ヌクレオチドのポリマーを意味する。それは、細胞起源、ゲノム起源、合成起源のＤＮＡまたはＲＮＡであってもよい。好ましくは、ポリヌクレオチドは、細胞中で生じる場合、ＤＮＡのみまたはＲＮＡのみであり、コムギ細胞中で生じる場合、いくつかの塩基はメチル化されまたは別の方法で修飾されてもよい。ポリマーは、単鎖、本質的二本鎖または部分的二本鎖であってもよい。部分的二本鎖ＲＮＡ分子の一例は、ヌクレオチド配列とその補体間の塩基対形成によって形成される二本鎖ステムと、ヌクレオチド配列とその補体を共有結合的に連結するループ配列とを含む、ヘアピン型ＲＮＡ（ｈｐＲＮＡ）、低分子ヘアピン型ＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）または自己相補的ＲＮＡである。塩基対形成とは、本明細書の用法では、ＲＮＡ分子中のＧ：Ｕ塩基対をはじめとする、ヌクレオチド間の標準塩基対形成を指す。「相補的」とは、２つのポリヌクレオチドが、それらの長さの一部に沿って、または片方または双方の完全長に沿って、塩基対形成できることを意味する。

【０２５４】

「単離」という用語は、常態ではその天然状態に付随する構成要素を実質的にまたは本質的に含まない、材料を意味する。本明細書の用法では、「単離ポリヌクレオチド」または「単離核酸分子」は、それがその天然状態では付随または連結する、同一タイプのポリヌクレオチド配列から少なくとも部分的に分離され、好ましくはそれを実質的にまたは本質的に含まない、ポリヌクレオチドを意味する。例えば「単離ポリヌクレオチド」としては、例えば常態では断片に隣接する配列から取り出されたＤＮＡ断片などのように、天然状態では側面に位置する配列から精製または分離されたポリヌクレオチドが挙げられる。好ましくは、単離ポリヌクレオチドはまた、タンパク質、炭水化物、脂質などのその他の

成分を少なくとも９０％含まない。「組換えポリヌクレオチド」という用語は、本明細書の用法では常態では天然に見られない形態に核酸を操作することで、生体外で形成されるポリヌクレオチドを指す。例えば組換えポリヌクレオチドは、発現ベクターの形態であってもよい。概してこのような発現ベクターとしては、細胞中で転写されるヌクレオチド配列と作動可能に結合する、転写および翻訳調節核酸が挙げられる。

【０２５５】

本発明は、「プローブ」または「プライマー」として使用されてもよい、オリゴヌクレオチドの使用に言及する。本明細書の用法では、「オリゴヌクレオチド」は、最高５０ヌクレオチド長のポリヌクレオチドである。それらは、ＲＮＡ、ＤＮＡ、またはいずれかの組み合わせ、または誘導体であってもよい。オリゴヌクレオチドは、ＳＢＥＩＩａまたはＳＢＥＩＩｂ遺伝子の一部と、またはＳＢＥＩＩａまたはＳＢＥＩＩｂ遺伝子に対応するｃＤＮＡと同一である、またはそれに相補的な、１０～３０ヌクレオチド、一般に１５～２５ヌクレオチド長の、典型的に１０～３０または１５～２５ヌクレオチドを含んでなる、典型的に比較的短い単鎖分子である。増幅反応中でプローブまたはプライマーとして使用される場合、このようなオリゴヌクレオチドの最小サイズは、標的核酸分子上でオリゴヌクレオチドと相補配列間に安定ハイブリッドを形成するのに必要なサイズである。好ましくは、オリゴヌクレオチドは少なくとも１５ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも１８ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも１９ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも２０ヌクレオチド、なおもより好ましくは少なくとも２５ヌクレオチド長である。プローブとして使用されるポリヌクレオチドは、典型的に、放射性同位体、酵素、ビオチン、蛍光分子または化学発光分子などの検出可能な標識にコンジュゲートされる。本発明のオリゴヌクレオチドおよびプローブは、ＳＢＥＩＩａ、ＳＢＥＩＩｂの対立遺伝子、または例えば改質デンプンなどの対象形質と関連付けられている、その他の遺伝子を検出する方法において有用である。このような方法は核酸ハイブリダイゼーションを用いて、多くの場合、例えば野生型または変異対立遺伝子の検出または同定のためにＰＣＲで使用されるような適切なポリメラーゼによる、オリゴヌクレオチドプライマー延長を含む。好ましいオリゴヌクレオチドおよびプローブは、例えば配列番号３６～１４９などの本明細書で開示される配列のいずれかをはじめとする、コムギからのＳＢＥＩＩａまたはＳＢＥＩＩｂ遺伝子配列とハイブリダイズする。好ましいオリゴヌクレオチド対は、１つまたは複数のイントロン、またはイントロンの一部にまたがるものであり、したがってイントロン配列を増幅するためにＰＣＲ反応中で使用してもよい。本明細書の実施例において、多数の例が提供される。

【０２５６】

「ポリヌクレオチド変種」および「変種」などの用語は、参照ポリヌクレオチド配列と実質的に配列同一性を呈し、参照配列と類似様式で、または同一活性で機能できるポリヌクレオチドを指す。これらの用語はまた、少なくとも１個のヌクレオチドの付加、欠失または置換によって参照ポリヌクレオチドと区別され、または天然分子と比べて、１つまたは複数の変異を有するポリヌクレオチドも包含する。したがって「ポリヌクレオチド変種」および「変種」という用語は、その中で１つまたは複数のヌクレオチドが付加されまたは欠失し、または異なるヌクレオチドで置換されているポリヌクレオチドを含む。この点においては、改変ポリヌクレオチドが、参照ポリヌクレオチドの生物学的機能または活性を保つように、参照ポリヌクレオチドに、変異、付加、欠失、および置換を包含する特定の改変を加え得ることが、当該技術分野で良く知られている。したがってこれらの用語は、酵素的またはその他の調節活性を呈示するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを包含し、またはポリヌクレオチドは、選択的プローブまたはその他のハイブリッド形成剤としての役割を果たすことができる。「ポリヌクレオチド変種」および「変種」という用語はまた、天然対立遺伝子の変種も含む。変異体は、天然（すなわち天然原料から単離される）または合成（例えば核酸上での部位特異的変異誘発の実施による）のいずれかであり得る。好ましくは、酵素活性があるポリペプチドをコードする本発明のポリヌクレオチド変種は、長さが４００を超え、より好ましくは５００を超え、より好ましくは６００

を超え、より好ましくは７００を超え、より好ましくは８００を超え、より好ましくは９００を超え、なおもより好ましくは１，０００ヌクレオチドを超えて、最大で遺伝子の完全長である。

【０２５７】

本発明のオリゴヌクレオチドの変種は、例えば本明細書で定義される特定のオリゴヌクレオチド分子に近い位置で、コムギゲノムとハイブリダイズできる様々なサイズの分子を含む。例えば変種は、標的領域となおもハイブリダイズさえすれば、追加的なヌクレオチド（１、２、３、４個以上など）、またはより少ないヌクレオチドを含んでなってもよい。さらにいくつかのヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドが標的領域とハイブリダイズする能力に影響することなしに、置換されてもよい。これに加えて、本明細書で定義される特定のオリゴヌクレオチドがハイブリダイズする、植物ゲノムの領域近く（例えば５０ヌクレオチド以内であるが、これに限定されるものではない）でハイブリダイズする変種を容易にデザインしてもよい。

【０２５８】

ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの文脈における「対応する」または「に対応する」は、（ａ）参照ポリヌクレオチド配列の全部または一部と実質的に同一でありまたはそれに相補的なヌクレオチド配列を有する、または（ｂ）ペプチドまたはタンパク質中のアミノ酸配列と同一であるアミノ酸配列をコードする、ポリヌクレオチドを意味する。この語句は、その範囲内に、参照ペプチドまたはタンパク質中のアミノ酸配列と実質的に同一であるポリペプチドを有する、ペプチドまたはアミノ酸配列もまた含む。２つ以上のポリヌクレオチドまたはポリペプチド間の配列関係性を記述するのに使用される用語としては、「参照配列」、「比較ウィンドウ」、「配列同一性」、「配列同一性百分率」、「実質的同一性」および「同一」が挙げられ、ヌクレオチドまたはアミノ酸残基の規定最小数について、または好ましくは完全長にわたり定義される。「配列同一性」および「同一性」という用語は、本明細書において同義的に使用され、比較ウインドウ全体にわたって、ヌクレオチド単位で、またはアミノ酸単位で、配列が同一である程度を指す。したがって「配列同一性百分率」は、比較ウインドウ全体にわたって最適に整列させた２つの配列を比較して、同一核酸塩基（例えばＡ、Ｔ、Ｃ、Ｇ、Ｉ）または同一アミノ酸残基（例えばＡｌａ、Ｐｒｏ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ｇｌｙ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ、Ｐｈｅ、Ｔｙｒ、Ｔｒｐ、Ｌｙｓ、Ａｒｇ、Ｈｉｓ、Ａｓｐ、Ｇｌｕ、Ａｓｎ、Ｇｌｎ、Ｃｙｓ、およびＭｅｔ）が、双方の配列内に存在する位置の数を求めて一致位置数とし、一致位置数を比較ウインドウ内の総位置数（すなわちウインドウサイズ）で除して、結果に１００を乗じて配列同一性百分率を得ることで計算される。

【０２５９】

ポリヌクレオチドの％同一性は、ＧＡＰ（Ｎｅｅｄｌｅｍａｎ ａｎｄ Ｗｕｎｓｃｈ，１９７０）分析（ＧＣＧプログラム）によって、ｇａｐ ｃｒｅａｔｉｏｎ ｐｅｎａｌｔｙ＝５、およびｇａｐ ｅｘｔｅｎｓｉｏｎ ｐｅｎａｌｔｙ＝０．３で判定し得る。特に断りのない限り、クエリー配列は少なくとも４５ヌクレオチド長であり、ＧＡＰ分析は少なくとも４５ヌクレオチドの領域にわたり、２つの配列を配列比較する。好ましくは、クエリー配列は少なくとも１５０ヌクレオチド長であり、ＧＡＰ分析は少なくとも１５０ヌクレオチドの領域にわたり、２つの配列を配列比較する。より好ましくは、クエリー配列は少なくとも３００ヌクレオチド長であり、ＧＡＰ分析はいずれの場合にも少なくとも３００ヌクレオチド、または少なくとも４００、５００または６００ヌクレオチドの領域にわたり、２つの配列を配列比較する。例えばＡｌｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ．，１９９７によって開示されたＢＬＡＳＴファミリーのプログラムもまた、参照し得る。配列分析の詳細な論考は、Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．，１９９４－１９９８，Ｃｈａｐｔｅｒ １５のＵｎｉｔ １９．３にある。

【０２６０】

ヌクレオチドまたはアミノ酸配列は、少なくとも約９５％の、特に少なくとも約９８％の、より特には少なくとも約９８．５％の、かなり特には約９９％の、特に約９９．５％

の、より特には約１００％の、ななり特には同一である、配列同一性を有する場合、「本質的に同様」と示される。ＲＮＡ配列が、ＤＮＡ配列と本質的に同様であり、またはある程度の配列同一性を有すると記述される場合、ＤＮＡ配列中のチミン（Ｔ）は、ＲＮＡ配列中のウラシル（Ｕ）に等しいと見なされることが明らかである。

【０２６１】

定義されたポリヌクレオチドに関しては、上で提供されるものよりも高い％同一性値が、好ましい実施形態を包含することが理解されるであろう。したがって当てはまる場合、最小％同一性値の観点から、ポリヌクレオチドは、該当する指定配列番号と、少なくとも７５％、より好ましくは少なくとも８０％、より好ましくは少なくとも８５％、より好ましくは少なくとも９０％、より好ましくは少なくとも９１％、より好ましくは少なくとも９２％、より好ましくは少なくとも９３％、より好ましくは少なくとも９４％、より好ましくは少なくとも９５％、より好ましくは少なくとも９６％、より好ましくは少なくとも９７％、より好ましくは少なくとも９８％、より好ましくは少なくとも９９％、より好ましくは少なくとも９９．１％、より好ましくは少なくとも９９．２％、より好ましくは少なくとも９９．３％、より好ましくは少なくとも９９．４％、より好ましくは少なくとも９９．５％、より好ましくは少なくとも９９．６％、より好ましくは少なくとも９９．７％、より好ましくは少なくとも９９．８％、なおもより好ましくは少なくとも９９．９％同一のポリヌクレオチド配列を含んでなることが好ましい。

【０２６２】

いくつかの実施形態では、本発明は、２つのポリヌクレオチドの相補性の程度を定義するハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーに言及する。「ストリンジェンシー」は、本明細書の用法では、ハイブリダイゼーション中の温度およびイオン強度条件、および特定の有機溶媒の存在または不在を指す。ストリンジェンシーが高いほど、標的ヌクレオチド配列と標識ポリヌクレオチド配列間の相補性の程度が高くなる。「ストリンジェントな条件」とは、相補的塩基を高頻度に有するヌクレオチド配列のみがその下でハイブリダイズする、温度およびイオン条件を指す。本明細書の用法では、「低ストリンジェンシー、中程度のストリンジェンシー、高ストリンジェンシー、または非常に高いストリンジェンシー条件下でハイブリダイズする」という用語は、ハイブリダイゼーションおよび洗浄条件を記述する。ハイブリダイゼーション反応を実施するためのガイダンスは、参照によって本明細書に援用する、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｎ．Ｙ．（１９８９），６．３．１～６．３．６．にある。本明細書で参照される特定のハイブリダイゼーション条件は、次のようである。１）約４５℃の６×塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム（ＳＳＣ）と、それに続く５０～５５℃の０．２×ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳでの２回の洗浄の低ストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件；２）約４５℃の６×ＳＳＣと、それに続く６０℃で０．２×ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳでの１回または複数回の洗浄の中程度のストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件；３）約４５℃の６×ＳＳＣと、それに続く６５℃で０．２×ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳでの１回または複数回の洗浄の高度のストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件；および４）非常に高いストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件は、０．５Ｍのリン酸ナトリウム、６５℃で７％のＳＤＳと、それに続く６５℃で０．２×ＳＳＣ、１％ＳＤＳでの１回または複数回の洗浄である。

【０２６３】

本明細書の用法では、「キメラ遺伝子」または「遺伝子コンストラクト」は、その天然位置の天然遺伝子でないあらゆる遺伝子を指し、すなわちそれは人為的に操作されて、コムギゲノムに組み込まれた、キメラ遺伝子または遺伝子コンストラクトを含む。典型的にキメラ遺伝子または遺伝子コンストラクトは、自然界では一緒に見られない、調節および転写またはタンパク質コード配列を含んでなる。したがってキメラ遺伝子または遺伝子コンストラクトは、異なる起源に由来する調節配列およびコード配列、または同じ起源に由来するが、天然に見られるのとは異なる様式で配列された調節配列およびコード配列を含

んでなってもよい。「内在性」という用語は、常態では、好ましくはコムギ植物である研究中の植物と同一発達段階において、未改質植物中で産生される、デンプンまたはＳＢＥＩＩａまたはＳＢＥＩＩｂなどの物質に言及するために、本明細書で使用される。「内在性遺伝子」とは、好ましくはコムギ植物中のＳＢＥＩＩａまたはＳＢＥＩＩｂ遺伝子である、生物のゲノム中のその自然な位置にある天然遺伝子を指す。本明細書の用法では、「組換え核酸分子」とは、組換えＤＮＡ技術によって構築され、または修飾された核酸分子を指す。「異質ポリヌクレオチド」または「外来性ポリヌクレオチド」または「異種ポリヌクレオチド」などという用語は、実験的操作によって、好ましくはコムギゲノムである細胞のゲノムに導入されるが、細胞中で天然に発生しないあらゆる核酸を指す。導入遺伝子が、例えば天然遺伝子との比較で、導入変異または選択可能なマーカー遺伝子の存在などのいくらかの改変を含有する限り、これらには、その細胞中に見られる改質形態の遺伝子配列が含まれる。異質性または外来性遺伝子は、非天然生物中に挿入された天然に見られる遺伝子、天然宿主内の新しい位置に導入された天然遺伝子、またはキメラ遺伝子または遺伝子コンストラクトであってもよい。「導入遺伝子」は、形質転換手順によってゲノムに導入された遺伝子である。「遺伝子操作された」という用語は、細胞中に遺伝子を導入し、細胞中の遺伝子を変異させ、これらが実行される細胞または生物またはそれらの子孫中の遺伝子の調節を改変または修飾することを含む。

【０２６４】

本発明は、作動可能に結合または連結した要素に言及する。「作動可能に結合する」または「作動可能に連結する」などは、機能的関係にあるポリヌクレオチド要素の連結を指す。典型的に、作動可能に結合する核酸配列は隣接して連結し、必要な場合、２つのタンパク質コード領域を、隣接して読み枠内につなぎ合わせる。ＲＮＡポリメラーゼが２つのコード配列を単一ＲＮＡに転写して、それが翻訳されると、双方のコード配列から抽出されるアミノ酸を有する単一ポリペプチドに翻訳される場合に、コード配列は別のコード配列と「作動可能に結合する」。発現される配列が、究極的にプロセシングされて所望のタンパク質が生成しさえすれば、コード配列は互いに隣接しなくてもよい。

【０２６５】

本明細書の用法では、「シス作用配列」、「シス作用エレメント」または「シス調節領域」または「調節領域」という用語または類似用語は、遺伝子配列の発現を調節する、あらゆる任意のヌクレオチド配列を意味するものとする。これは、例えばコムギＳＢＥＩＩａまたはＳＢＥＩＩｂ遺伝子を調節するなどのその天然状況における天然シス作用配列であってもよく、または遺伝子配列に対して適切に配置されるとその発現を調節する遺伝子コンストラクト中の配列であってもよい。このようなシス調節領域は、転写レベルまたは転写後レベルにおいて、遺伝子配列の発現レベルおよび／または細胞型特異性および／または成長特異性を活性化、サイレンシング、促進、抑制し、または別の方法で修正できてもよい。本発明の好ましい実施形態では、シス作用配列は、プロモーターなどの発現可能な遺伝子配列の発現を高め、または刺激する、活性化配列である。遺伝子の５’－ｌｅａｄｅｒ（ＵＴＲ）中のイントロンの存在は、コムギなどの単子葉植物中の遺伝子発現を高めることが示されている（Ｔａｎａｋａｅｔａｌ．，１９９０）。別のタイプのシス作用配列は、活性クロマチンドメインを核マトリックスに固着させることで、遺伝子発現に影響を及ぼしてもよい、マトリックス付着領域（ＭＡＲ）である。

【０２６６】

「ベクター」とは、好ましくは、その中に核酸配列が挿入されてもよい、例えばプラスミド、バクテリオファージまたは植物ウイルスに由来するＤＮＡ分子である、核酸分子を意味する。ベクターはまた、適切な形質転換体の選択のために使用し得る抗生物質耐性遺伝子などの選択マーカー、またはＴ－ＤＮＡまたはＰ－ＤＮＡ配列などの原核生物または真核生物（特にコムギ）細胞の形質転換を高める配列を含んでもよい。このような耐性遺伝子と配列の例は、当業者に周知である。

【０２６７】

「マーカー遺伝子」とは、マーカー遺伝子を発現する細胞に特徴的な表現型を与え、し

たがってこのような形質転換細胞が、マーカーを持たない細胞と区別されるようにする遺伝子を意味し、当業者には良く知られている。「選択可能なマーカー遺伝子」は、選択作用物質（例えば除草剤、抗生物質、照射、熱、または非形質転換細胞を損傷するその他の処理）に対する耐性に基づいて、または代謝可能基質存在下における成長上の利点に基づいて、「選択」し得る形質を与える。植物形質転換体を選択するための例示的な選択可能なマーカーとしては、以下が挙げられるが、これに限定されるものではない。ハイグロマイシンＢ耐性を与えるｈｙｇ遺伝子；例えばＰｏｔｒｙｋｕｓ ｅｔ ａｌ．，１９８５によって記載される、カナマイシン、パロモマイシン、Ｇ４１８などに対する耐性を与える、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ（ｎｐｔ）遺伝子；例えば欧州特許第Ａ－２５６２２３号明細書に記載される、グルタチオン由来除草剤に対する耐性を与える、ラット肝臓からのグルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ遺伝子；例えば国際公開第８７／０５３２７号パンフレットに記載される、過剰発現時に、ホスフィノトリシンなどのグルタミンシンセターゼ阻害剤に対する耐性を与える、グルタミンシンセターゼ遺伝子；例えば欧州特許第号明細書－Ａ－２７５９５７に記載される、選択作用物質ホスフィノトリシンに対する耐性を与える、ストレプトマイセス・ビリドクロモゲネス（Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｖｉｒｉｄｏｃｈｒｏｍｏｇｅｎｅｓ）からのアセチルトランスフェラーゼ遺伝子；例えばＨｉｎｃｈｅｅ ｅｔ ａｌ．，１９８８によって記載される、Ｎ－ホスホノメチルグリシンに対する耐性を与える５－エノールシキミ酸－３－リン酸シンターゼ（ＥＰＳＰＳ）をコードする遺伝子；例えば国際公開第９１／０２０７１号パンフレットに記載される、ビアラホスに対する耐性を与えるｂａｒ遺伝子；ブロモキシニルに対する耐性を与える、クレブシエラ・ニューモニアエ亜種オザエナエ（Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ ｏｚａｅｎａｅ）からのｂｘｎなどのニトリラーゼ遺伝子（Ｓｔａｌｋｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９８８）；メトトレキサートに対する耐性を与える、ジヒドロ葉酸レダクターゼ（ＤＨＦＲ）遺伝子（Ｔｈｉｌｌｅｔ ｅｔ ａｌ，１９８８）；イミダゾリノン、スルホニル尿素またはその他のＡＬＳ－阻害化学薬品に対する耐性を与える、変異アセト乳酸シンターゼ遺伝子（ＡＬＳ）（欧州特許第Ａ－１５４２０４号明細書）；５－メチルトリプトファンに対する耐性を与える、変異アントラニル酸シンターゼ遺伝子；または除草剤に対する耐性を与えるダラポン脱ハロゲン酵素遺伝子。

【０２６８】

好ましいスクリーニング可能なマーカーとしては、以下が挙げられるが、これに限定されるものではない。そのための様々な色素産生基質が知られている、β－グルクロニダーゼ（ＧＵＳ）酵素をコードするｕｉｄＡ遺伝子；そのための色素産生基質が知られている酵素をコードする、β－ガラクトシダーゼ遺伝子；カルシウム感受性生物発光検出中で用いられてもよいエクオリン遺伝子（Ｐｒａｓｈｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９８５）；緑色蛍光タンパク質遺伝子（ＧＦＰ、Ｎｉｅｄｚ ｅｔ ａｌ．，１９９５）またはその変種の１つ；生物発光を検出できるようにするルシフェラーゼ（ｌｕｃ）遺伝子（Ｏｗ ｅｔ ａｌ．，１９８６）、および当該技術分野で公知のその他のもの。

【０２６９】

いくつかの実施形態では、内在性デンプン分枝活性またはその他の酵素活性のレベルは、コムギ植物中のこれらの機能に関与するタンパク質をコードする遺伝子の発現レベルを低下させることによって、またはコムギ植物中の酵素をコードするヌクレオチド配列の発現レベルを増大させることによって、調節される。発現増大は、コード配列から発現される転写物レベルを制御できる、異なる強度のプロモーター、または誘導性プロモーターを使用して、転写レベルで獲得され得る。その生成物が、デンプン分枝を下方制御する遺伝子の発現を調節しまたは高める、転写因子をコードする異種配列が導入されてもよい。遺伝子の発現レベルは、コード配列とそれに作動可能に結合して細胞中で機能性である転写制御要素を含んでなる、コンストラクトの細胞あたりのコピー数を修正することで、調節してもよい。代案としては、複数の形質転換体を選択し、導入遺伝子組み込み部位近傍の内在性配列の影響に起因する、好ましいレベルおよび／または特異性の導入遺伝子発現があるものについて、スクリーニングしてもよい。導入遺伝子発現の好ましいレベルおよび

パターンは、コムギ植物のデンプン合成またはアミロース含有量の実質的増大をもたらすレベルである。これは単純な形質転換体試験によって検出されてもよい。

【０２７０】

遺伝子発現の低下は、コムギ植物に導入された「遺伝子サイレンシングキメラ遺伝子」の導入と転写を通じて得られてもよい。遺伝子サイレンシングキメラ遺伝子は、好ましくはコムギゲノムに、好ましくはコムギ核ゲノムに、安定して導入される。本明細書の用法では「遺伝子サイレンシング効果」とは、サイレンシングＲＮＡの導入によって獲得され得る、コムギ細胞、好ましくは内胚乳細胞中の標的核酸の発現低下を指す。好ましい実施形態では、１つまたは複数の内在性遺伝子、好ましくはＳＢＥＩＩａおよび／またはＳＢＥＩＩｂ遺伝子の発現を低下させるＲＮＡ分子をコードする、遺伝子サイレンシングキメラ遺伝子が導入される。コムギ中の標的遺伝子はまた、表１に列挙される遺伝子を含む。このような低下は、メチル化によるクロマチン再構築を介した転写低下、またはＲＮＡ分解をはじめとするＲＮＡ分子の転写後修飾、またはその双方の結果であってもよい。遺伝子サイレンシングは、必ずしも標的核酸または遺伝子発現の消滅とは解釈されない。サイレンシングＲＮＡの存在下での標的核酸レベルでの発現が、その非存在下よりも低ければ、それで十分である。標的遺伝子の発現レベルは、少なくとも約４０％、または少なくとも約４５％、または少なくとも約５０％、または少なくとも約５５％、または少なくとも約６０％、または少なくとも約６５％、または少なくとも約７０％、または少なくとも約７５％、または少なくとも約８０％、または少なくとも約８５％、または少なくとも約９０％、または少なくとも約９５％低下してもよく、または事実上検出不能なレベルに消滅してもよい。

【０２７１】

アンチセンス技術を使用して、コムギ細胞中の遺伝子発現を低下させてもよい。「アンチセンスＲＮＡ」という用語は、特異的ｍＲＮＡ分子の少なくとも一部に相補的であり、好ましくはＳＢＥＩＩａおよび／またはＳＢＥＩＩｂ遺伝子である、ｍＲＮＡをコードする遺伝子の発現を低下させられるＲＮＡ分子を意味するものとする。このような低下は、典型的に配列依存様式に起きて、核から細胞質へのｍＲＮＡ輸送、ｍＲＮＡ安定性、または翻訳阻害などの転写後事象に干渉することで生じると考えられる。アンチセンス法の使用については、当該技術分野で周知である（例えばＨａｒｔｍａｎｎ ａｎｄ Ｅｎｄｒｅｓ，１９９９を参照されたい）。アンチセンス法は、今や植物中の遺伝子発現を操作するための確立された技術である。

【０２７２】

本明細書の用法では、「人工的に導入されたｄｓＲＮＡ分子」とは、好ましくは、このようなｄｓＲＮＡ分子をコードするキメラ遺伝子からの転写によって、コムギ細胞中で合成された、二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）分子の導入を指す。ＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）は、遺伝子発現を特異的に低下させ、または特定タンパク質の生成を阻害する上で、コムギ中でもまた特に有用である（Ｒｅｇｉｎａ ｅｔ ａｌ．，２００６）。この技術は、対象遺伝子のｍＲＮＡまたはその一部、およびその補体と本質的に同一である配列を含有し、それによってｄｓＲＮＡが形成する、ｄｓＲＮＡ分子の存在に依存する。好都合には、ｄｓＲＮＡは、宿主細胞中の単一プロモーターから生成され得て、センスおよびアンチセンス配列が転写されてヘアピン型ＲＮＡを生じ、その中ではセンスおよびアンチセンス配列がハイブリダイズして、（ＳＢＥＩＩ遺伝子）関連配列または無関連配列があるｄｓＲＮＡ領域を形成し、ヘアピン型ＲＮＡがステムループ構造を含んでなるようにループ構造を形成する。本発明の適切なｄｓＲＮＡ分子のデザインおよび生成は、特に、Ｗａｔｅｒｈｏｕｓｅ ｅｔ ａｌ．，１９９８；Ｓｍｉｔｈ ｅｔ ａｌ．，２０００；国際公開第９９／３２６１９号パンフレット；国際公開第９９／５３０５０号パンフレット；国際公開第９９／４９０２９号パンフレット；および国際公開第０１／３４８１５号パンフレットを考慮すれば、十分に当業者の能力の範囲内である。

【０２７３】

ｄｓＲＮＡをコードするＤＮＡは、典型的に、逆方向反復として配置された、センスお

よびアンチセンス配列の双方を含んでなる。好ましい実施形態では、センスおよびアンチセンス配列は、ＲＮＡへの転写時に切り出されるイントロンを含んでなりうる、スペーサー領域によって区切られる。この配置は、より高い効率の遺伝子サイレンシングをもたらすことが示されている（Ｓｍｉｔｈ　ｅｔ　ａｌ．，２０００）。二本鎖領域は、１つまたは２つのＤＮＡ領域のいずれかから転写された、１または２個のＲＮＡ分子を含んでなってもよい。ｄｓＲＮＡは大部分が相補的であり得るが、完全に相補的でなくてもよい、長いセンスおよびアンチセンス領域（典型的に約２００ｂｐよりも大きく、２００～１０００ｂｐの範囲に及ぶ）を有する、長鎖ｈｐＲＮＡに分類されてもよい。ｈｐＲＮＡはまた、かなり小型であり得て、二本鎖部分は、約３０～約４２ｂｐのサイズ範囲に及ぶが、９４ｂｐよりも長くない（国際公開第０４／０７３３９０号パンフレットを参照されたい）。二本鎖ＲＮＡ領域の存在は、内在性植物系からの応答を引き起こし、それは二本鎖ＲＮＡと、標的植物遺伝子からの相同的なＲＮＡ転写物の双方を破壊して、標的遺伝子の活性を効率的に低下させまたは排除すると考えられる。

【０２７４】

ハイブリダイズするセンスおよびアンチセンス配列の長さは、それぞれ少なくとも１９個の隣接ヌクレオチド、好ましくは少なくとも３０または５０ヌクレオチド、およびより好ましくは少なくとも１００、２００、５００または１０００ヌクレオチドであるべきである。遺伝子転写物全体に対応する、完全長配列を使用してもよい。長さは最も好ましくは、１００～２０００ヌクレオチドである。センスおよびアンチセンス配列と標的転写物との同一性の程度は、少なくとも８５％、好ましくは少なくとも９０％、より好ましくは９５～１００％であるべきである。配列が長いほど、全体的な配列同一性に対する要求は、厳しさが低下する。ＲＮＡ分子は、もちろん、分子を安定化するよう機能してもよい無関係の配列を含んでなってもよい。ｄｓＲＮＡ形成コンストラクトを発現するように使用されるプロモーターは、標的遺伝子を発現する細胞中で発現される、あらゆるタイプのプロモーターであってもよい。標的遺伝子が、ＳＢＥＩＩａまたはＳＢＥＩＩｂまたは内胚乳で選択的に発現されるその他の遺伝子である場合、その他の組織中の標的遺伝子発現に影響を及ぼさないように、内胚乳プロモーターが好ましい。

【０２７５】

下方制御ＳＢＥＩＩ遺伝子で使用されてもよいｄｓＲＮＡ分子の例は、実施例４に提供される。

【０２７６】

本明細書の用法では、「サイレンシングＲＮＡ」は、好ましくはＳＢＥＩＩａまたはＳＢＥＩＩｂである標的遺伝子から転写されたｍＲＮＡ領域に相補的な、２１～２４個の隣接ヌクレオチドを有するＲＮＡ分子である。２１～２４個のヌクレオチドの配列は、好ましくは、ｍＲＮＡの２１～２４個の隣接ヌクレオチド配列と完全に相補的であり、すなわち２１～２４個のヌクレオチドのｍＲＮＡ領域の補体と同一である。しかしｍＲＮＡ領域内に最高５個のミスマッチを有するｍｉＲＮＡ配列もまた使用してもよく（Ｐａｌａｔｎｉｋ　ｅｔ　ａｌ．，２００３）、塩基対形成は１または２個のＧ－Ｕ塩基対を含んでもよい。サイレンシングＲＮＡの２１～２４ヌクレオチドの全てが、ｍＲＮＡと塩基対形成できない場合、サイレンシングＲＮＡの２１～２４ヌクレオチドとｍＲＮＡ領域との間のミスマッチは、１または２個のみであることが好ましい。ｍｉＲＮＡに関しては、最大５個までであるあらゆるミスマッチは、ｍｉＲＮＡの３’末端近くにあることが好ましい。好ましい実施形態では、サイレンシングＲＮＡおよびその標的ｍＲＮＡの配列間に、１または２個以下のミスマッチがある。

【０２７７】

サイレンシングＲＮＡは、本発明のキメラＤＮＡによってコードされるより長いＲＮＡ分子に由来する。よ本明細書で「ＲＮＡ前駆体」とも称される、より長いＲＮＡ分子は、コムギ細胞中におけるキメラＤＮＡからの転写によって生じる最初の生成物であり、相補領域間の分子内塩基対形成によって形成される、部分的二本鎖の特徴を有する。ＲＮＡ前駆体は、一般に「ダイサー」と称される専門クラスのＲＮＡｓｅｓによって、典型的に２

１～２４ヌクレオチド長である、サイレンシングＲＮＡにプロセッシングされる。サイレンシングＲＮＡは、本明細書の用法では、短い干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）およびマイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）を含み、それらは生合成の点で異なる。ＳｉＲＮＡは、可能なＧ－Ｕ塩基対を含み、二本鎖領域から突出するミスマッチまたは非塩基対形成ヌクレオチドのない、少なくとも２１個の隣接塩基対を有する、完全または部分的二本鎖ＲＮＡに由来する。これらの二本鎖ＲＮＡは、それ自身への折り返しによって形成されて本明細書で「ヘアピン型ＲＮＡ」と称されるステムループ構造を形成する単一自己相補的転写物から、または少なくとも部分的に相補的でハイブリダイズして二本鎖ＲＮＡ領域を形成する２つの別個のＲＮＡから形成される。ｍｉＲＮＡは、不完全塩基対構造を形成する、完全に相補的でない相補領域を含む、より長い単鎖転写物のプロセッシングによって生成され、したがって部分的二本鎖構造内に、ミスマッチまたは非塩基対形成ヌクレオチドを有する。塩基対形成構造はまた、Ｇ－Ｕ塩基対を含んでもよい。ｍｉＲＮＡを形成するＲＮＡ前駆体のプロセッシングは、特定配列を有する１つの特徴的な小型ＲＮＡであるｍｉＲＮＡの優先的な蓄積をもたらす。これは、典型的にＲＮＡ前駆体の「アンチセンス」鎖であるＲＮＡ前駆体の単鎖から誘導される一方で、ｓｉＲＮＡを形成する長い相補的ＲＮＡ前駆体のプロセッシングは、配列は一様でないが、前駆体の双方の鎖からの多数の部分に対応するｓｉＲＮＡ集団を生成する。

【０２７８】

本明細書で「人工ｍｉＲＮＡ前駆体」とも称される本発明のＲＮＡのｍｉＲＮＡ前駆体は、それが標的ｍＲＮＡの２１～２４個のヌクレオチド領域と相補的であり、好ましくは完全に相補的であるように、天然前駆体のｍｉＲＮＡ部分のヌクレオチド配列を修正することにより、そしてｍｉＲＮＡ配列と塩基対形成して塩基対を維持する、ｍｉＲＮＡ前駆体の相補領域のヌクレオチド配列を修正することにより、典型的に天然ｍｉＲＮＡ前駆体から誘導される。ＲＮＡのｍｉＲＮＡ前駆体の残部は未改変であり、したがって天然ｍｉＲＮＡ前駆体と同一配列を有してもよく、またはヌクレオチド置換、ヌクレオチド挿入、または好ましくはヌクレオチド欠失、またはあらゆるその組み合わせによって、配列が改変されてもよい。ＲＮＡのｍｉＲＮＡ前駆体の残部は、ダイサー様１（ＤＣＬ１）と称されるダイサー酵素による構造の認識に関与すると考えられ、そのため構造の残部に対する修正は、あったとしてもわずかであることが好ましい。例えば塩基対形成ヌクレオチドは、全体的構造に対する主要な修正なしに、その他の塩基対形成ヌクレオチドによって置換されてもよい。それから本発明の人工ｍｉＲＮＡ前駆体が誘導される天然ｍｉＲＮＡ前駆体は、コムギ、別の穀物植物などの別の植物、または非植物源に由来してもよい。このようなＲＮＡ前駆体の例は、イネｍｉ３９５前駆体、アラビドプシス属（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）ｍｉ１５９ｂ前駆体、またはｍｉ１７２前駆体である。

【０２７９】

人工ｍｉＲＮＡは、例えばＡｌｖａｒｅｚ ｅｔ ａｌ．，２００６；Ｐａｒｉｚｏｔｔｏ ｅｔ ａｌ．，２００４；Ｓｃｈｗａｂ ｅｔ ａｌ．，２００６などのように、植物中で実証されている。

【０２８０】

使用してもよい別の分子生物学的アプローチは、コサプレッションである。コサプレッションの機序は良く分かっていないが、転写後遺伝子サイレンシング（ＰＴＧＳ）を伴うと考えられ、その点でアンチセンス抑制の多数の例と非常に良く相似してもよい。それはその発現のためのプロモーターに対して「センス方向」で、遺伝子またはその断片の追加コピーを植物に導入することを伴い、それは本明細書の用法では、標的遺伝子中の配列に対して、配列の転写および（それが起きる場合は）翻訳と同一方向を指す。センス断片のサイズ、その標的遺伝子領域との対応関係、および標的遺伝子に対するその相同性の程度は、アンチセンス配列について上述したとおりである。場合によっては、遺伝子配列の追加的なコピーは、標的植物遺伝子の発現に干渉する。コサプレッションアプローチを具現する方法については、国際公開第９７／２０９３６号パンフレットおよび欧州特許第０４６５５７２号明細書を参照されたい。アンチセンス、コサプレッションまたは二本鎖ＲＮ

Ａ分子はまた、大部分二本鎖のＲＮＡ領域を含んでなってもよく、好ましくは国際公開第０３／０７６６１９号パンフレットに記載されるように、核局在化シグナルを含んでなる。

【０２８１】

遺伝子発現を低下させるこれらの技術のいずれかを使用して、複数遺伝子の活性を協調的に低下させ得る。例えば共通する遺伝子領域を標的化することで、関連遺伝子ファミリーに対して、１個のＲＮＡ分子を標的化し得る。代案としては、各領域が異なる遺伝子を標的化する複数領域を１個のＲＮＡ分子中に含めることで、無関係の遺伝子を標的化してもよい。これは単一プロモーターの制御下にある複数領域を融合させることで、容易に実行し得る。

【０２８２】

核酸分子のコムギ細胞への導入には、いくつかの技術が利用でき、当該技術分野の当業者には周知である。「形質転換」という用語は、本明細書の用法では、異質または外来性核酸導入による、例えば細菌または植物などの細胞、特にコムギ植物である細胞の遺伝子型の修正を意味する。「形質転換体」とは、このように改変された生物を意味する。親植物の交雑による、または変異誘発それ自体による、コムギ植物へのＤＮＡの導入は、形質転換に含まれない。「導入遺伝子」は、植物に導入された、異質または外来性遺伝子または配列を意味する。核酸分子は、染色体外要素として複製されてもよく、または好ましくは安定して植物ゲノムに組み込まれる。「ゲノム」とは、細胞、植物または植物部位の全ての遺伝する遺伝的補体を意味し、染色体ＤＮＡ、色素体ＤＮＡ、ミトコンドリアＤＮＡ、および染色体外ＤＮＡ分子が含まれる。一実施形態では、導入遺伝子は、コムギ核ゲノムに組み込まれるが、これは六倍体コムギの場合、本明細書でＡ、Ｂ、およびＤ「ゲノム」と称される、Ａ、Ｂ、およびＤサブゲノムを含む。

【０２８３】

稔性の遺伝子組換えコムギ植物を生成する最も一般的に使用される方法は、再生可能なコムギ細胞へのＤＮＡ送達と、生体外組織培養を通じた植物再生との二段階を含んでなる。ＤＮＡ送達には、通常、アグロバクテリウム・ツメファシェンス（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｔｕｍｅｆａｃｉｅｎｓ）または関連細菌を使用したＴ－ＤＮＡ転移と、粒子衝突によるＤＮＡの直接導入の２つの方法が使用されるが、その他の方法も使用されてコムギまたはその他の穀類にＤＮＡ配列が組み込まれている。それが許容可能レベルの核酸移入を達成するという条件で、植物細胞に核酸コンストラクトを導入する形質転換システムの特定の選択が本発明に必須でなく、またはそれを制限しないことは、当業者には明らかである。コムギのためのこのような技術については、当該技術分野で周知である。

【０２８４】

形質転換コムギ植物は、本発明に従った核酸コンストラクトを受容体細胞に導入し、本発明に従ったポリヌクレオチドを含んでそれを発現する新しい植物を栽培することで、産生し得る。細胞培養中における、形質転換細胞からの新しい植物の栽培過程は、本明細書で「再生」と称される。再生可能なコムギ細胞としては、成熟胚細胞、葉脚の葉肉細胞などの成長点組織、または好ましくは、開花後１２～２０日に得られる未熟胚の胚盤、またはこれらのいずれかに由来するカルスが挙げられる。再生されたコムギ植物を回収する最も一般的に使用される手段は、２，４－Ｄなどのオーキシンおよび低レベルサイトカイニン添加ＭＳ寒天などの培地を使用した体細胞胚形成であり、Ｓｐａｒｋｓ　ａｎｄ　Ｊｏｎｅｓ，２００４を参照されたい）。

【０２８５】

コムギのアグロバクテリウム（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）媒介形質転換は、Ｃｈｅｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，１９９７；Ｗｅｉｒ　ｅｔ　ａｌ．，２００１；Ｋａｎｎａ　ａｎｄ　Ｄａｇｇａｒｄ，２００３またはＷｕ　ｅｔ　ａｌ．，２００３の方法によって実施してもよい。好ましくはＬＢＡ４４０４、ＡＧＬ０またはＡＧＬ１（Ｌａｚｏ　ｅｔ　ａｌ．，１９９１）またはＣ５８変種などの追加的な感染性遺伝子機能を有する株である、十分な感染性を持つあらゆるアグロバクテリウム（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）株を使

用してもよい。アグロバクテリウム（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）に関連した細菌もまた、使用してもよい。アグロバクテリウム（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）から受容体コムギ細胞に移入されるＤＮＡ（Ｔ－ＤＮＡ）は、遺伝子コンストラクト（キメラプラスミド）に含まれ、それは、移入される核酸の側面に位置する、野生型Ｔｉプラスミドの Ｔ－ＤＮＡ領域の１つまたは２つの境界領域を含有する。遺伝子コンストラクトは、例えば対象遺伝子を含有する１個のＴ－ＤＮＡと、選択可能なマーカー遺伝子を含有する第２のＴ－ＤＮＡとの２個以上のＴ－ＤＮＡを含有して、２個のＴ－ＤＮＡの非依存性挿入と、対象導入遺伝子から離れた選択可能なマーカー遺伝子の可能な隔離とを提供してもよい。

【０２８６】

再生可能なあらゆるコムギタイプを使用してもよく、Ｂｏｂ Ｗｈｉｔｅ、Ｆｉｅｌｄｅｒ、Ｖｅｅｒｙ－５、Ｃａｄｅｎｚａ、およびＦｌｏｒｉｄａ変種について成功が報告されている。これらのより容易に再生可能な変種の１つの形質転換事象は、標準戻し交雑によるエリート変種をはじめとする、あらゆるその他のコムギ栽培品種に移転されてもよい。生体内接種法と、それに続く組織培養を使用した形質転換植物の再生および選択を利用する、アグロバクテリウム（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）を使用した代替え法が効率的であることが判明しており、国際公開第００／６３３９８号パンフレットを参照されたい。アグロバクテリウム（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）の使用を伴うその他の方法としては、アグロバクテリウム（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）と培養単離プロトプラストとの共培養；アグロバクテリウム（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）による種子、頂点または分裂組織の形質転換；またはＢｅｃｈｔｏｌｄ ｅｔ ａｌ．，１９９３によって記載される、アラビドプシス属（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）のための花浸漬法などの植物体中接種が挙げられる。この後者のアプローチは、アグロバクテリウム（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）細胞懸濁液の真空浸潤に基づいている。代案としては、ベクターとしてアグロバクテリウム（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）の発根（Ｒｉ）プラスミドを使用して、キメラコンストラクトを導入してもよい。

【０２８７】

核酸コンストラクトを植物細胞に導入するために通常使用される別の方法は、例えばＫｌｅｉｎ ｅｔ ａｌ．，１９８７によって記載される、小型ビーズまたは粒子マトリックス内、またはその表面のいずれかに含有される導入される核酸を用いた、小型粒子による高速弾道貫通（粒子衝突または微粒子銃としてもまた知られている）である。

【０２８８】

コムギの形質転換で使用される好ましい選択可能なマーカー遺伝子としては、除草剤グルホシネートアンモニウムを使用した選択と併せた、ストレプトマイセス・ハイグロスコピカス（Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｈｙｇｒｏｓｃｏｐｉｃｕｓ）ｂａｒ遺伝子またはｐａｔ遺伝子、抗生物質ハイグロマイシンと併せたｈｐｔ遺伝子、またはカナマイシンまたはＧ４１８と併せたｎｐｔＩＩ遺伝子が挙げられる。代案としては、唯一のＣ源としての糖マンノース－６－リン酸と併せて、ホスホマンノースイソメラーゼ（ＰＭＩ）をコードするｍａｎＡ遺伝子などの陽性選択可能なマーカーを使用してもよい。

【０２８９】

コムギを含む高等植物の内胚乳中でのデンプン合成は、鍵となる４つのステップを触媒する一組の酵素でなされる。最初に、ＡＤＰ－グルコース ピロホスホリラーゼ（ＥＣ２．７．７．２７）が、Ｇ－１－ＰおよびＡＴＰからのＡＤＰ－グルコース合成を通して、デンプンの単量体前駆体を活性化する。２番目に、活性化したグリコシル供与体である、ＡＤＰ－グルコースが、デンプンシンターゼ（ＥＣ２．４．１．２４）により、予め存在するα（１－４）結合の非還元末端に転移する。３番目に、デンプン分岐酵素が、α（１－４）結合グルカン領域の開裂を通して分岐点を導入し、開裂鎖を受容体鎖に転移して新しいα（１－６）結合を形成する。デンプン分岐酵素はα（１－６）結合をαポリグルカンに導入できる唯一の酵素であり、したがってアミロペクチン形成において重要な役割を果たす。４番目に、デンプン分岐除去酵素（ＥＣ２．４．４．１８）がいくつかの分岐結合を取り除く。

【０２９０】
デンプンは、コムギを含む穀物のような植物における主要な貯蔵炭水化物である。デンプンはデンプン体において合成され、穀粒のような生育中の貯蔵器官中の顆粒体において形成および貯蔵される；ここでは、このデンプンを「貯蔵デンプン」または「穀粒デンプン」と言う。穀物穀粒においては、貯蔵デンプンの大部分が内胚乳中に集まる。デンプンを本明細書ではα（１－４）およびα（１－６）結合の両方の組み合わせを通して重合したグルコピラノース単位からなる多糖類と定義する。デンプンの多分散系分子は、重合度およびα（１－６）結合のα（１－４）結合への比率に基づいて、アミロースおよびアミロペクチンとして知られる２つの構成要素に属すると分類される。コムギを含む野生型穀物植物の穀粒デンプンは、約２０％－３０％のアミロースおよび約７０％－８０％のアミロペクチンを含む。

【０２９１】
本明細書では、アミロースは、「真性アミロース」と呼ばれる、α（１，４）結合したグルコシド（グルコピラノース）単位のほぼ直線分子、および「中間物質」または「アミロース様アミロペクチン」と呼ばれ、ヨード定量検査において真性アミロースと並びヨード化物結合物質として発現するアミロース様長鎖デンプンを含むものと定義する（Ｔａｋｅｄａ　ｅｔ　ａｌ．，１９９３ｂ；Ｆｅｒｇａｓｏｎ，１９９４）。典型的には、真性アミロース中の直線分子は、重合度が５００と５０００の間であり、１％よりも低いα（１－６）結合を含む。最近の研究では、アミロース中でα（１－６）グリコシド分岐部位が約０．１％で生じるとされ、したがって「ほぼ直線」と記載した。対照的に、アミロペクチンはより大きい分子であり、ＤＰが５０００から５００００にわたり、４－５％のα（１－６）結合を含む。アミロペクチン分子は、したがって、より高度に分岐している。アミロースは分子量が約10^4から約10^6ダルトンのヘリックス構造を有するのに対し、アミロペクチンの分子量は約10^7から約10^8ダルトンである。これら２種類のデンプンは、公知の手法で簡単に識別または分離することができる。

【０２９２】
本明細書で定義するデンプン中のアミロースの割合は、重量／重量（ｗ／ｗ）に基づいており、すなわち、アミロース重量の、穀粒から抽出可能な全デンプンの重量へのパーセント表示であり、アミロース分およびアミロペクチン分に分割する前のデンプンに対するものである。「デンプン中のアミロースの割合」および「アミロース含有量」という用語は、穀粒、小麦粉または本発明の他の製品についての文脈で用いる場合は、本質的に交換可能である。アミロース含有量は、サイズ排除高性能液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）、例えば９０％（ｗ／ｖ）ＤＭＳＯ、コンカナバリンＡ法（Ｍｅｇａｚｙｍｅ　Ｉｎｔ，アイルランド）、または好ましくは例えば実施例１で述べたヨウ素定量法を含むいかなる公知の手法でも測定できる。ＨＰＬＣ法は、デンプンを分岐しても（Ｂａｔｅｙ　ａｎｄ　Ｃｕｒｔｉｎ，１９９６）、しなくともよい。「真性アミロース」のみを測るＢａｔｅｙおよびＣｕｒｔｉｎのＨＰＬＣ法のような手法は、ここで定義するアミロース含有量を過小評価することがあるのに注意すべきである。ＨＰＬＣまたはゲル透過クロマトグラフィーのような手法がデンプンのアミロース分およびアミロペクチン分への分割に依存するのに対し、ヨウ素定量法はヨード化物の結合の違いを利用するので分割する必要がない。

【０２９３】
穀粒重量およびアミロース含有量から、穀粒あたりの沈着アミロース量を計算して、これを試験および対照系統と比較することができる。

【０２９４】
コムギを含む穀物由来のデンプン分岐酵素（ＳＢＥ）をコードする遺伝子例を表１に示す。本明細書で用いるように、「デンプン分岐酵素」とは、グルコース残基鎖の間にα１，６グリコシド結合を導入する酵素（ＥＣ２．４．１．１８）を意味する。デンプン分岐酵素の３つの型が、すなわちコメ、トウモロコシ、オオムギ、コムギのような穀物中に発現しており、これらは生育中穀物内胚乳にデンプン分岐酵素Ｉ（ＳＢＥＩ）、デンプン分

岐酵素ＩＩａ（ＳＢＥＩＩａ）、およびデンプン分岐酵素ＩＩｂ（ＳＢＥＩＩｂ）を含む（Ｈｅｄｍａｎ ａｎｄ Ｂｏｙｅｒ，１９８２；Ｂｏｙｅｒ ａｎｄ Ｐｒｅｉｓｓ，１９７８；Ｍｉｚｕｎｏ ｅｔ ａｌ．，１９９２；Ｓｕｎ ｅｔ ａｌ．，１９９７）。これらの酵素をコードする遺伝子のゲノムおよびｃＤＮＡ配列が、コメ、オオムギおよびコムギについて解析されている（表１）。配列アラインメントからヌクレオチドおよびアミノ酸レベルの両方で配列相同性が高いのが分かるが、配列の差異もあることからＳＢＥＩ，ＳＢＥＩＩａ，ＳＢＥＩＩｂクラスに分けることができる。どのような種のＳＢＥＩＩａおよびＳＢＥＩＩｂも、一般的に、特に遺伝子の中央領域において、互いに約８０％のアミノ酸相同性を示す。ＳＢＥＩＩａおよびＳＢＥＩＩｂはまた、発現のパターンからも識別でき、これは種によって異なる。トウモロコシにおいては、ＳＢＥＩＩｂは内胚乳中で最も高く発現するが、ＳＢＥＩＩａは植物のどの組織にも存在する。オオムギにおいては、ＳＢＥＩＩａおよびＳＢＥＩＩｂの両方とも内胚乳中で概ね同量存在するが、コムギ内胚乳においては、ＳＢＥＩＩａはＳＢＥＩＩｂよりも３－４倍多く存在する。したがって、穀物は種によってＳＢＥＩＩａおよびＳＢＥＩＩｂの発現に顕著な差があり、１つの種で得られた結論がそのまま他の種に通用するわけではない。コムギにおいては、ＳＢＥＩＩａおよびＳＢＥＩＩｂタンパク質はサイズが異なり（下記参照）、これは２つを識別するのに便理である。２つを識別するために特異的抗体を用いてもよい。

【０２９５】

生育中コムギ内胚乳においては、ＳＢＥＩＩａおよびＳＢＥＩＩｂが内胚乳中の可溶性およびデンプン顆粒関連画分の両方で見られる（Ｒａｈｍａｎ ｅｔ ａｌ．，１９９９）のに対し、ＳＢＥＩは可溶性画分（アミロプラスト ストローマ）でのみ見られる（Ｍｏｒｅｌｌ ｅｔ ａｌ．，１９９７）。コムギにおいては、明確な遺伝子重複現象により各ゲノム中のＳＢＥＩ遺伝子の数が増加した（Ｒａｈｍａｎ ｅｔ ａｌ．，１９９９）。Ａ，ＢおよびＤゲノム由来のＳＢＥＩ遺伝子のうち最も多く発現する型の中の変異を合わせた結果、ＳＢＥＩ活性を９７％よりも多く取り除いても、デンプンの構造または機能に測定しうる影響は現れなかった（Ｒｅｇｉｎａ ｅｔ ａｌ．，２００４）。対照的に、ＳＢＥＩＩｂ発現を低下させるがＳＢＥＩＩａ発現は低下しない遺伝子抑制コンストラクトが最小限の影響を与えたのに対して、対応するコンストラクトによるコムギ中のＳＢＥＩＩａ発現の低下は高アミロースレベル（＞７０％）をもたらした（Ｒｅｇｉｎａ ｅｔ ａｌ．，２００６）。オオムギにおいては、ＳＢＥＩＩａおよびＳＢＥＩＩｂ発現の両方を低下させた遺伝子抑制コンストラクトが高アミロースオオムギ穀粒を作出するのに用いられた（Ｒｅｇｉｎａ ｅｔ ａｌ．，２０１０）。

【０２９６】

デンプン分岐酵素（ＳＢＥ）活性は、酵素アッセイ、例えばホスホリラーゼ刺激アッセイにより測定できる（Ｂｏｙｅｒ ａｎｄ Ｐｒｅｉｓｓ．，１９７８）。このアッセイは、グルコース１－リン酸のメタノール非溶性ポリマー（α－Ｄ－グルカン）への取り込みのＳＢＥによる刺激をホスホリラーゼＡで測定する。ＳＢＥ活性は、グルカンポリマーの分岐にともなうグルカン－多ヨウ素複合体の吸収の減少を測定する、ヨウ素染色法により測定できる。ＳＢＥ活性は、イソアミロース消化後に、還元アミロースからの還元末端の生成を基質として測定する分岐結合アッセイによってもアッセイすることができる（Ｔａｋｅｄａ ｅｔ ａｌ．，１９９３ａ）。好ましくは、この活性はＳＢＥＩ活性がない状態で測定する。ＳＢＥのアイソフォームは異なった基質特異性を示し、例えばＳＢＥＩＩａおよびＳＢＥＩＩｂがアミロペクチン基質に関して高い分岐速度を示すのに対して、ＳＢＥＩはアミロースの分岐について高い活性を呈する。アイソフォームは、転移するグルカン鎖の長さに基づいても識別できる。ＳＢＥタンパク質は、本明細書で説明した特異的抗体を用いても測定することができる。ＳＢＥＩＩ活性は、生育中内胚乳の中で穀粒が生育する間に測定できる。代替的に、ＳＢＥＩＩレベルは、タンパク質がまだ存在して免疫学的手法によりアッセイできる成熟穀粒中でも測定することができる。

【０２９７】

いくつかの実施例では、ＳＢＥＩＩまたはＳＢＥＩＩａのレベルまたは活性は、ノーザ

ンまたはＲＴ－ＰＣＲ解析などの転写生成物レベルによって測定できる。好ましい手法では、穀粒または生育中内胚乳の中のＳＢＥＩＩａタンパク質の量は、電気泳動によりゲル上で穀粒／内胚乳抽出物中のタンパク質を分離し、次いでウエスタンブロットによりタンパク質をメンブレンに移し、メンブレン上のタンパク質を特異的抗体を用いて定量的に検出することで測定する。これは、実施例１１で例示している。

【０２９８】

以下の非限定的例によって、本発明をさらに説明する。

【実施例】

【０２９９】

実施例１：方法と材料

炭水化物の測定と分析

Ｒｅｇｉｎａ ｅｔ ａｌ．，（２００６）の方法を使用して、発生中および成熟コムギ穀粒の双方からデンプンを小規模に単離した。大規模デンプン抽出は、Ｒｅｇｉｎａ ｅｔ ａｌ．，（２００４）の方法に従って実施した。Ｍｅｇａｚｙｍｅ（Ｂｒａｙ，Ｃｏ Ｗｉｃｋｌｏｗ，Ｒｅｐｕｂｌｉｃ ｏｆ Ｉｒｅｌａｎｄ）によって提供される全デンプン分析キットを使用して、デンプン含有量を測定し、成熟、未製粉穀粒重量の百分率として、重量を基準にして計算した。次にデンプン含有量を対照植物と比較した。全穀粒重量からデンプン重量を差し引いて穀粒の全非デンプン含有量を得て、総重量の低下がデンプン含有量の低下に起因するかどうかを判定した。

【０３００】

デンプンサンプルのアミロース含有量は、軽微な修正を加えたＭｏｒｒｉｓｏｎ ａｎｄ Ｌａｉｇｎｅｌｅｔ（１９８３）の比色分析（ヨウ素滴定）法によって、次のように測定した。およそ２ｍｇのデンプンを正確に秤量して（精度０．１ｍｇ）、蓋にゴム座金を装着した２ｍｌのネジ蓋管に入れた。脂質を除去するために、デンプンに１ｍｌの８５％（ｖ／ｖ）メタノールを混合し、時々ボルテックスしながら、管を６５℃水浴中で１時間加熱した。１３，０００ｇで５分間の遠心分離後、上清を注意深く除去して、抽出ステップを繰り返した。次にデンプンを６５℃で１時間乾燥し、２ｍｇのデンプン（上記のように秤量）あたり１ｍｌのＵＤＭＳＯを使用して、尿素ジメチルスルホキシド溶液（ＵＤＭＳＯ；１体積の６Ｍ尿素に対して９体積のジメチルスルホキシド）に溶解した。混合物を即座に激しくボルテックスして、９５℃の水浴内で１時間、断続的にボルテックスしてインキュベートし、デンプンを完全に溶解させた。デンプン－ＵＤＭＳＯ溶液（５０μｌ）のアリコートを、１ｍｌの水あたり２ｍｇのヨウ素および２０ｍｇのヨウ化カリウムを含有する、２０μｌのI_2－ＫＩ試薬で処理した。混合物を水で１ｍｌにした。２００μｌをマイクロプレートに移し、Ｅｍａｘ Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ Ｍｉｃｒｏｐｌａｔｅ Ｒｅａｄｅｒ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｄｅｖｉｃｅｓ，ＵＳＡ）を使用して吸光度を読み取り、６２０ｎｍにおける混合物の吸光度を測定した。０～１００％のアミロースと１００％～０％のアミロペクチンとを含有する標準サンプルをジャガイモアミロースおよびトウモロコシ（またはジャガイモ）アミロペクチン（Ｓｉｇｍａ）から作成し、試験サンプルと同様に処理した。標準サンプルの吸光度から得られた回帰方程式を使用して、吸光度値からアミロース含有量（アミロース百分率）を判定した。非脱分枝デンプンのアミロース／アミロペクチン比の解析はまた、Ｃａｓｅ ｅｔ ａｌ．，（１９９８）に従って実施してもよく、またはＢａｔｅｙ ａｎｄ Ｃｕｒｔｉｎ，（１９９６）によって記載される脱分枝デンプン分離のための９０％ＤＭＳＯを使用したＨＰＬＣ法によって実施してもよい。

【０３０１】

アミロースデータの統計学的分析は、8^{th}ｅｄｉｔｉｏｎ ｏｆ Ｇｅｎｓｔａｔ ｆｏｒ Ｗｉｎｄｏｗｓ（登録商標）（ＶＳＮ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｌｔｄ，Ｈｅｒｔｓ，ＵＫ）を使用して実施した。

【０３０２】

デンプン中の鎖長分布は、デンプンサンプルの脱分枝後に、Ｍｏｒｅｌｌ ｅｔ ａｌ

．，（１９９８）に従って、キャピラリー電気泳動ユニットを使用して、フルオロフォア支援炭水化物電気泳動（ＦＡＣＥ）によって分析した。デンプンサンプルの糊化温度プロファイルは、Ｐｙｒｉｓ　１示差走査熱量計（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ，Ｎｏｒｗａｌｋ，ＣＴ，ＵＳＡ）内で測定した。デンプン溶液の粘度は、例えばＢａｔｅｙ　ｅｔ　ａｌ．，（１９９７）で報告される条件を使用して、Ｒａｐｉｄ－Ｖｉｓｃｏ－Ａｎａｌｙｓｅｒ（ＲＶＡ，Ｎｅｗｐｏｒｔ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　Ｐｔｙ　Ｌｔｄ，Ｗａｒｒｉｅｗｏｏｄ，Ｓｙｄｎｅｙ）上で測定した。パラメータ測定には、ピーク粘度（最大加熱糊化粘度）、保持強度、最終粘度、および糊化開始温度が含まれた。小麦粉またはデンプンの膨潤体積は、Ｋｏｎｉｋ－Ｒｏｓｅ　ｅｔ　ａｌ．，（２００１）の方法に従って測定した。水の取り込みは、規定温度の水に小麦粉またはデンプンサンプルを混合し、続く糊化物質の回収の前後にサンプルを秤量して判定した。

【０３０３】

デンプン顆粒形態は、顕微鏡検査で分析した。Ｌｅｉｃａ－ＤＭＲ複合顕微鏡を使用して、普通光および偏光の双方の下で水中の精製デンプン顆粒懸濁液を検査して、デンプン顆粒の形態を判定した。Ｊｏｅｌ　ＪＳＭ　３５Ｃ装置を使用して、走査型電子顕微鏡を実施した。精製デンプンを金でスパッタ被覆して、１５ｋＶおよび室温で走査した。

【０３０４】

Ｍｅｇａｚｙｍｅ（Ｂｒａｙ，Ｃｏ．Ｗｉｃｋｌｏｗ，Ｒｅｐｕｂｌｉｃ　ｏｆ　Ｉｒｅｌａｎｄ）から提供されるキットを使用して、β－グルカンレベルを判定した。

【０３０５】

内胚乳中のタンパク質発現の解析

内胚乳中のＳＢＥＩ、ＳＢＥＩＩａ、およびＳＢＥＩＩｂタンパク質の特異的発現、特にこれらのタンパク質の発現レベルまたは蓄積レベルをウエスタンブロット法によって分析した。内胚乳を全ての母体組織から切り離し、５ｍＭのＥＤＴＡ、２０％グリセロール、５ｍＭのＤＴＴおよび１ｍＭのＰｅｆａｂｌｏｃを含有する、６００μｌの５０ｍＭリン酸カリウム緩衝液（４２ｍＭK_2HPO_4および８ｍＭKH_2PO_4）、ｐＨ７．５中で、およそ０．２ｍｇのサンプルを均質化した。粉砕サンプルを１３，０００ｇで１０分間遠心分離し、上清をアリコートにして使用時まで－８０℃で凍結した。総タンパク質量推定のために、０．２５ｍｇ／ｍｌのＢＳＡ標準の０、２０、４０、６０、８０、および１００μｌのアリコートを使用して、ＢＳＡ標準曲線を作成した。サンプル（３μｌ）を蒸留水で１００μｌにして、１ｍｌのＣｏｏｍａｓｓｉｅ　Ｐｌｕｓ　Ｐｒｏｔｅｉｎ試薬を各サンプルに添加した。標準曲線からの０　ＢＳＡサンプルを空試験として使用して、５分後に５９５ｎｍで吸光度を読み取り、サンプル中のタンパク質レベルを判定した。０．３４ＭトリスＨＣｌ（ｐＨ８．８）、アクリルアミド（８．０％）、過硫酸アンモニウム（０．０６％）、およびＴＥＭＥＤ（０．１％）を含有する８％非変性ポリアクリルアミドゲル上で、各内胚乳からの２０μｇの総タンパク質量を含有するサンプルを分離した。電気泳動に続いて、Ｍｏｒｅｌｌ　ｅｔ　ａｌ．，１９９７に従って、タンパク質をニトロセルロース膜に移し、ＳＢＥＩＩａ、ＳＢＥＩＩｂまたはＳＢＥＩ特異的抗体と免疫反応させた。成熟コムギＳＢＥＩＩａのＮ末端のアミノ酸配列ＡＡＳＰＧＫＶＬＶＰＤＧＥＳＤＤＬ（配列番号１６）を有する合成ペプチドを使用して、コムギＳＢＥＩＩａタンパク質（抗ｗＢＥＩＩａ）に対する抗血清を作成した（Ｒａｈｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．，２００１）。ＡＧＧＰＳＧＥＶＭＩ（配列番号１７）を使用して、Ｎ末端合成ペプチドと類似様式で、コムギＳＢＥＩＩｂ（抗ｗＢＥＩＩｂ）に対する抗血清を作成した（Ｒｅｇｉｎａ　ｅｔ　ａｌ．，（２００５）。このペプチドは成熟ＳＢＥＩＩｂペプチドのＮ末端配列に相当し、さらにオオムギＳＢＥＩＩｂタンパク質のＮ末端と同一であると考えられる（Ｓｕｎ　ｅｔ　ａｌ．，１９９８）。Ｎ末端合成ペプチドＶＳＡＰＲＤＹＴＭＡＴＡＥＤＧＶ（配列番号１８）を使用して、類似様式でコムギＳＢＥＩに対するポリクローナル抗体を合成した（Ｍｏｒｅｌｌ　ｅｔ　ａｌ．，１９９７）。このような抗血清は、合成ペプチドで免疫化したウサギから標準法に従って得られた。

【０３０６】

ＳＢＥのための酵素アッセイ。全ての３つのイソ型、ＳＢＥＩ、ＳＢＥＩＩａ、およびＳＢＥＩＩｂの活性を検出する分枝酵素の酵素活性アッセイは、軽微な修正を加えたＮｉｓｈｉ　ｅｔ　ａｌ．，２００１の方法に基づいた。電気泳動後、１０％グリセロールを含有する５０ｍＭのＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．０でゲルを２回洗浄し、５０ｍＭのＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．４、５０ｍＭのグルコース－１－リン酸、２．５ｍＭのＡＭＰ、１０％グリセロール、５０Ｕのホスホリラーゼ、１ｍＭのＤＴＴ、および０．０８％マルトトリオースからなる反応混合物中で室温で１６時間インキュベートした。０．２％（Ｗ／Ｖ）I_2および２％ＫＩ溶液で、バンドを視覚化した。ＳＢＥＩ、ＳＢＥＩＩａ、およびＳＢＥＩＩｂイソ型の比活性は、これらの電気泳動条件下で分離された。これは、抗ＳＢＥＩ、抗ＳＢＥＩＩａ、および抗ＳＢＥＩＩｂ抗体を使用した、免疫ブロット法で確認された。各バンドの強度を測定するＴｏｔａｌＬａｂソフトウェアパッケージ（Ｎｏｎｌｉｎｅａｒ　Ｄｙｎａｍｉｃｓ　Ｌｔｄ，Ｎｅｗｃａｓｔｌｅ，ＵＫ）を使用した免疫ブロットの濃度測定分析を実施して、各イソ型の酵素活性レベルを判定した。

【０３０７】

デンプン分枝酵素（ＳＢＥ）活性は、例えばホスホリラーゼ刺激アッセイなどの酵素アッセイによって測定されてもよい（Ｂｏｙｅｒ　ａｎｄ　Ｐｒｅｉｓｓ，１９７８）。このアッセイは、ホスホリラーゼＡによるメタノール不溶性ポリマー（α－Ｄ－グルカン）へのグルコース－１－リン酸組み込みの、ＳＢＥによる刺激を測定する。ＳＢＥの特定イソ型の活性は、Ｒｅｇｉｎａ　ｅｔ　ａｌ．，２００４に記載されるようにして、個々のイソ型の精製に続いてこのアッセイで測定し得る。全可溶性タンパク質抽出物は、上述の抽出緩衝液で予備平衡化された３ｍｌのβ－シクロデキストリン（β－ＣＤ）アフィニティカラムに適用された。カラムは、製造会社の使用説明に従ってβ－ＣＤをエポキシ活性化セファロース６Ｂ（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｕｐｐｓａｌａ，Ｓｗｅｄｅｎ）にカップリングして調製された。リン酸緩衝液中の１％β－ＣＤを使用して結合タンパク質（ＳＢＥ含有）を溶出し、次に緩衝液Ａ（２０ｍＭのリン酸緩衝液、ｐＨ８．０、１ｍＭのＥＤＴＡ、および１ｍＭのＤＴＴ）に対して透析した。緩衝液Ａで予備平衡化された１ｍｌのＭｏｎｏＱカラム（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｐｈａｒｍａｃｉａ）を使用して、透析サンプルをアニオン交換クロマトグラフィーで分離した。非結合タンパク質の溶出後、緩衝液Ａに緩衝液Ｂ（５００ｍＭのリン酸緩衝液、ｐＨ８．０、１ｍＭのＥＤＴＡ、１ｍＭのＤＴＴ）を添加して、３０分間の直線濃度勾配を適用して、結合タンパク質を溶出した。

【０３０８】

ＳＢＥ活性は、グルカンポリマー分枝から生じるグルカン－ポリヨード複合体の吸光度の低下を測定する、ヨウ素染色アッセイによっても測定し得る。ＳＢＥ活性はまた、イソアミラーゼ消化に続いて、基質としての還元アミロースからの還元末端の生成を測定する、アッセイ分枝結合によってアッセイし得た（Ｔａｋｅｄａ　ｅｔ　ａｌ．，１９９３ａ）。好ましくは、活性はＳＢＥＩ活性の不在下で測定される。ＳＢＥのイソ型は異なる基質特異性を示し、例えばＳＢＥＩがアミロースの分枝においてより高い活性を示すのに対し、ＳＢＥＩＩａおよびＳＢＥＩＩｂはアミロペクチン基質に対してより高い分枝率を示す。イソ型はまた、それが移入されるグルカン鎖の長さに基づいて区別されてもよい。ＳＢＥタンパク質はまた、本明細書に記載されるものなどの特異的抗体を使用して測定されてもよい。好ましくは、ＳＢＥＩＩ活性は、穀粒の成長中に発生中の内胚乳で測定される。ＳＢＥＩＩタンパク質レベルは、好ましくは、ウエスタンブロット分析などの免疫学的方法で、タンパク質がなおも存在する成熟穀粒中で測定される。

【０３０９】

コムギ植物のＤＮＡ分析

形質転換コムギ植物または導入遺伝子の存在について試験される植物のＰＣＲ分析は、Ｓｔａｃｅｙ　ａｎｄ　Ｉｓａａｃ，（１９９４）によって記載されるミニプレップ法を使用して、１～２cm^2の新鮮な葉材料から抽出されたゲノムＤＮＡ上で実施した。ヘアピン型ＲＮＡコンストラクトの存在を判定するＰＣＲアッセイでは、ＳＢＥＩＩａ遺伝子

からの断片（４６２ｂｐ）を増幅するようにデザインされた、プライマーＳＢＥＩＩａ－Ｆｏｒ：５’－ＣＣＣＧＣＴＧＣＴＴＴＣＧＣＴＣＡＴＴＴＴＧ－３’（配列番号１９）およびＳＢＥＩＩａ－Ｒｅｖ：５’－ＧＡＣＴＡＣＣＧＧＡＧＣＴＣＣＣＡＣＣＴＴＣ－３’（配列番号２０）を使用した。反応条件は、次のとおりであった：「ホットスタート」（９４℃、３分間）と、それに続く３０サイクルの変性（９５℃、３０秒間）、アニーリング（５５℃、３０秒間）、延長（７３℃、２分間）と、それに続く１サイクルの７３℃（５分間）。反応生成物は、アガロースまたはポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分析した。

【０３１０】

凍結乾燥粉砕組織からの大規模（９ｍｌ）抽出からのＤＮＡ上で、サザンブロット法ハイブリダイゼーション分析を実施した（Ｓｔａｃｅｙ ａｎｄ Ｉｓａａｃ，１９９４）。ＤＮＡサンプルを０．２ｍｇ／ｍｌに調節し、ＨｉｎｄＩＩＩ、ＥｃｏＲＩ、およびＫｐｎＩなどの制限酵素で消化した。Ｓｔａｃｅｙ ａｎｄ Ｉｓａａｃ（１９９４）により記載されるようにして、制限酵素消化、ゲル電気泳動、および真空ブロッティングを実施した。ｄｓ－ＳＢＥＩＩコンストラクトのイントロン３領域を含むジゴキシゲニン（Ｄｉｇｏｘｙｇｅｎｉｎ）標識プローブは、ＭｃＣｒｅｅｒｙ ａｎｄ Ｈｅｌｅｎｔｊａｒｉｓ，（１９９４）の方法に従って、ＰＣＲにより作成された。プローブのサザンブロットへのハイブリダイゼーションおよび化学発光による検出は、ＭｃＣｒｅｅｒｙ ａｎｄ Ｈｅｌｅｎｔｊａｒｉｓ，（１９９４）の方法に従って実施した。

【０３１１】

アグロバクテリウム（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）（Ａｇｒｏｂａｃｔａｅｒｉｕｍ）によるコムギの形質転換

ｖｉｒプラスミドｐＡＬ４４０４およびｐＳＢ１を保有する、武装解除（ｄｉｓａｒｍｅｄ）アグロバクテリウム・ツメファシェンス（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｍｅｆａｃｉｅｎｓ）ＬＢＡ４４０４株に、コムギの形質転換のための遺伝子コンストラクトを電気穿孔によって導入し、スペクチノマイシン添加培地上での選択がそれに続いた。形質転換アグロバクテリウム（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）株を固化ＹＥＰ培地上で２７℃で２日間インキュベートした。次に細菌を収集し、コムギ接種のために、４００ｍＭのアセトシリンゴンを含有するＴＳＩＭ１（１００ｍｇ／ｌのミオイノシトール、１０ｇ／ｌのグルコース、５０ｍｇ／ｌのＭＥＳ緩衝液を添加したＭＳ培地、ｐＨ５．５）中に６５０ｎｍで２．４の光学濃度で再懸濁した。

【０３１２】

コムギ植物（変種ＮＢ１、Ｎｉｃｋｅｒｓｏｎ Ｓｅｅｄｓ Ｌｔｄ，Ｒｏｔｈｗｅｌｌ，Ｌｉｎｃｓ．から得られる春コムギ変種）を２２／１５℃の日中／夜間温度で、１日に１６時間の光を与えるよう補い、温室内で栽培した。開花後およそ１４日間（およそ１ｍｍの胚長）で、５０ｃｍの分蘖柄を含めて分蘖を収穫した。次に分蘖から止め葉以外の全ての葉を除去し、止め葉を清浄にして汚染真菌胞子を除去した。次に各小穂の苞穎、および最初の２個の小花からの外穎を注意深く除去して、未熟種子を露出した。通常、各小穂中のこれらの２個の種子のみを露出した。花序の全長に沿ってこの手順を実施した。次に簡潔な表面滅菌として、穂に７０％ＩＭＳを噴霧した。

【０３１３】

１０μｌのＨａｍｉｌｔｏｎシリンジを使用して、全ての露出種子が接種されるように、ほぼ胚盤と内胚乳の境界面の位置で、未熟種子にアグロバクテリウム（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）懸濁液（１μｌ）を接種した。次に分蘖を水に入れ、半透明なポリ袋で覆って種子の脱水を防ぎ、１日に１６時間の光を与えて、２３℃、４５μＥm^{-2} s^{-1}ＰＡＲの照明インキュベーターに３日間入れた。３日間の共培養後、接種未熟種子を取り出して、７０％エタノール（３０秒間）、次に２０％漂白剤（Ｄｏｍｅｓｔｏｓ、２０分間）で表面滅菌し、無菌蒸留水中での徹底的洗浄がそれに続いた。未熟胚を無菌的に単離し、追加の１５０ｍｇ／ｌのＴｉｍｅｎｔｉｎ（Ｗ３Ｔ培地）および胚盤最上部と共に、Ｗ３培地（２０ｇ／ｌのスクロースおよび２ｍｇ／ｌの２，４－Ｄを添加したＭＳ；Ｓｉｇ

ｍａからの６ｇ／ｌのタイプＩアガロースで固化）にのせた（プレートあたり２０個の胚）。培養物を２５℃で明るい場所に置いた（１日に１６時間の光、８０μＥｍ$^{-2}$ｓ$^{-1}$ＰＡＲ）。単離の約５日後に、胚上の胚軸の成長を評価して、カルス生成の改善のために必要な場合は軸を除去した。単離後２週間で新鮮な培地に移して、胚をＷ３Ｔ中に４週間保ち、胚形成能力を評価した。

【０３１４】

４週間の成長後、接種胚から誘導されたカルスは、Ｗ３Ｔ培地に播種された未接種胚から得られた対照カルスと、非常に良く似ていた。細菌の存在は、接種胚から誘導されたカルスの胚形成能力を実質的に低下させなかったようであった。胚形成カルスを２ｍｇ／ｌのＡｓｕｌａｍまたは２５ｍｇ／ｌのｇｅｎｅｔｉｃｉｎおよび１５０ｍｇ／ｌのＴｉｍｅｎｔｉｎ添加Ｗ３培地（Ｗ３２ＡＴ培地）に移した。カルスをこの培地上でさらに２週間維持し、次に各カルスを２ｍｍサイズの断片に分割し、Ｗ３２ＡＴ上に再播種した。バイナリーベクターコンストラクトなしのＬＢＡ４４０４の接種から誘導された対照胚は、選択培地上で形質転換カルスを生じなかった。

【０３１５】

さらに２週間の培養後、胚形成カルスの成長について全ての組織を評価した。選択上で４週間後、継続成長の徴候を示すあらゆるカルスを再生培地（ＲＭＴ；４０ｇ／ｌのマルトースおよび１５０ｍｇ／ｌのＴｉｍｅｎｔｉｎ添加ＭＳ、ｐＨ５．８；Ｓｉｇｍａ ｔｙｐｅ１の６ｇ／ｌのアガロースで固化）に移した。苗条はこの培地上で４週間以内に再生されて、次に苗条伸長および発根のために、１５０ｍｇ／ｌのＴｉｍｅｎｔｉｎ添加ＭＳ３０に移された。次に幼若植物を土壌混合物に移し、ミスティングベンチ上に２週間保ち、最後に温室に移した。

【０３１６】

ＡＧＬ１株などの代案のアグロバクテリウム（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）株またはハイグロマイシン耐性をコードする遺伝子などの選択可能なマーカーもまた、方法で使用し得る。

【０３１７】

実施例２：ヘアピン型ＲＮＡコンストラクトを使用したコムギ中のＳＢＥＩＩａ遺伝子の阻害

４つのヘアピン型ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）コンストラクトを作成して、コムギのｉ）ＳＢＥＩＩａ、またはｉｉ）ＳＢＥＩＩａ、ＳＢＥＩＩｂ、およびＳＢＥＩ遺伝子の発現を低下させた。各コンストラクト中で、ヘアピン型ＲＮＡをコードするＤＮＡを、ヘアピン型ＲＮＡの内胚乳特異的発現を提供するコムギＤｘ５遺伝子から得られる高分子量グルテニン（ＨＭＷＧ）プロモーター配列、およびアグロバクテリウム（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）からのノパリンシンターゼ遺伝子からの転写ターミネーター配列（ｎｏｓ３’）と連結させた。このプロモーターは、ヘアピン型ＲＮＡをコードする合成遺伝子の内胚乳特異的発現を提供する。

【０３１８】

ｈｐ５’－ＳＢＥＩＩａ

ｈｐ５’－ＳＢＥＩＩａと称される第１のコンストラクトの構築および使用については、Ｒｅｇｉｎａ ｅｔ ａｌ．，（２００６）に記載される。ｈｐ５’－ＳＢＥＩＩａコンストラクトは、コムギＳＢＥＩＩａ遺伝子からのＰＣＲによって増幅された１５３６ｂｐのヌクレオチド配列を含有する（ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＡＦ３３８４３１）。これは、以下を含んだ。エクソン１および２の全てとエクソン３の一部（ヌクレオチド配列部位１０５８～１３３６、１６６４～１７６１、および２０３８～２２１９（ＳＢＥＩＩａをコードするタルホコムギ（Ａｅｇｉｌｏｐｓ ｔａｕｓｃｈｉｉ）ｃＤＮＡのヌクレオチド配列部位１～５７８、ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＡＦ３３８４３１．１を含む）を含んでなり、各側にＥｃｏＲＩおよびＫｐｎＩ制限酵素認識部位を有する、４６８ｂｐの配列（断片１）、ＳＢＥＩＩａ（ヌクレオチド配列部位２２２０～２７３１）のエクソン３および４の一部およびイントロン３の全てからなり、各側にＫｐｎＩおよびＳａｃＩ部位を有

する、５１２ｂｐの配列（断片２）、およびＳＢＥＩＩａ（タルホコムギ（Ａｅｇｉｌｏｐｓ　ｔａｕｓｃｈｉｉ）ＳＢＥＩＩａ　ｃＤＮＡヌクレオチド配列部位１～６３８、ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＡＦ３３８４３１．１を含む、ＡＦ３３８４３１中のヌクレオチド配列部位１０５８～１３３６、１６６４～１７６１、および２０３８～２２７９）の完全エクソン１、２、および３からなり、各側にＢａｍＨＩおよびＳａｃＩ部位を有する、５２８ｂｐの断片（断片３）。次に断片３の配列が、断片１に対してアンチセンス方向で断片２とライゲートするように、断片１、２、および３をライゲートした。ヘアピン型ＲＮＡコンストラクトは、最初に、ＨＭＷＧプロモーター配列とｎｏｓ３’ターミネーターを含有するベクターｐＤＶＯ３０００中で生成された。

【０３１９】

ｈｐｃ－ＳＢＥＩＩａ

ｈｐｃ－ＳＢＥＩＩａと称されるＳＢＥＩＩａコンストラクトは、ＳＢＥＩＩａｃＤＮＡ（ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＡＦ３３８４３２．１）のヌクレオチド１２５５～１５４７に対応する２９３塩基対のＤＮＡ断片を含んでなり、それはＳＢＥＩＩａ遺伝子のエクソン１２の一部、エクソン１３および１４、およびエクソン１５の一部に対応する。ＳＢＥＩＩａのこの領域は、ＳＢＥＩＩｂ　ｃＤＮＡの対応する領域のヌクレオチド配列と約８１％のみの同一性を有し、したがってＳＢＥＩＩｂでなく、ＳＢＥＩＩａのサイレンシングの特異性の可能性を増大させることから選択された。

【０３２０】

ｈｐ３’－ＳＢＥＩＩａ

ｈｐ３’－ＳＢＥＩＩａと称されるＳＢＥＩＩａコンストラクトは、ＳＢＥＩＩａｃＤＮＡのヌクレオチド２３０５～２４３４に対応する１３０塩基対のＤＮＡ断片を含んでなり、ＳＢＥＩＩａ遺伝子のエクソン２１の一部、エクソン２２、および３’非翻訳領域（３’ＵＴＲ）の一部に対応した。

【０３２１】

ｈｐ－ｃｏｍｂｏ

ｈｐ－ｃｏｍｂｏと称されるヘアピン型ＲＮＡコンストラクトは、ＳＢＥＩＩａ遺伝子の一部に加えて、コムギＳＢＥＩ遺伝子の領域を含んでなり、ｉ）ＳＢＥＩＩａｃＤＮＡからのヌクレオチド１７５６～２１７２に対応し、エクソン１６の一部、エクソン１７～１９、およびエクソン２０の一部に対応する４１７塩基対の配列、およびｉｉ）ＳＢＥＩｃＤＮＡ（ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＡＦ０７６６７９）のヌクレオチド２６７～６２３に対応し、ＳＢＥＩ遺伝子のエクソン３の一部、エクソン４、およびエクソン５の一部に対応する３５７塩基対の配列を含有した。ＳＢＥＩＩａ遺伝子断片は、ＳＢＥＩＩｂ遺伝子の対応する領域と約８６％の同一性を有し、ＳＢＥＩＩｂのそれらの対応する領域と１００％同一性がある２３個の連続したヌクレオチドのいくつかの領域を含み、そのためコムギ中のＳＢＥＩＩｂをコードする遺伝子ならびにＳＢＥＩＩａおよびＳＢＥＩをコードする遺伝子の発現を低下させるという期待を持って、組み合わせコンストラクトがデザインされた。

【０３２２】

上述の各断片の２つのコピーは、イネチューブリン遺伝子イントロンが２つのコピーの間に存在するように、片方はセンス方向、他方はアンチセンス方向で適切なベクターに挿入された。合成遺伝子は、バイナリーベクター中に挿入され、コムギを形質転換するのに使用された。

【０３２３】

これらのコンストラクトは、実施例１に記載されるコムギを形質転換するのに使用された。それぞれのコンストラクトについてＰＣＲ陽性の独立コムギ遺伝子組換え系の数は、次のとおりであった。ｈｐ５’－ＳＢＥＩＩａ、２７；ｈｐｃ－ＳＢＥＩＩａ、１０；ｈｐ３’－ＳＢＥＩＩａ、１０；およびｈｐ－ｃｏｍｂｏ、６３。

【０３２４】

遺伝子組換え植物の分析：ＤＮＡ分析

ＰＣＲ分析を実施して、Ｓｔａｃｅｙ ａｎｄ Ｉｓａａｃ（１９９４）によって記載されるミニプレップ法を使用して、１－２ｃｍ^{2}の新鮮葉料から抽出されたゲノムＤＮＡを使用して、再生植物中の導入遺伝子の１つまたは複数を検出した。例えばプライマーＳＢＥＩＩａ－Ｆｏｒ：５’－ＣＣＣＧＣＴＧＣＴＴＴＣＧＣＴＣＡＴＴＴＴＧ－３’（配列番号１９）およびＳＢＥＩＩａ－Ｒｅｖ：５’－ＧＡＣＴＡＣＣＧＧＡＧＣＴＣＣＣＡＣＣＴＴＣ－３’（配列番号２０）を使用して、ｈｐ５’－ＳＢＥＩＩａ導入遺伝子で形質転換された植物に対して、ＰＣＲ反応を実施した。これらのＰＣＲ反応は、ＳＢＥＩＩａ遺伝子からの約４６２ｂｐの断片を増幅するようにデザインされた。反応条件は、次のとおりであった：「ホットスタート」（９４℃、３分間）と、それに続く３０サイクルの変性（９５℃、３０秒間）、アニーリング（５５℃、３０秒間）、および延長（７３℃、２分間）と、それに続く１サイクルの７３℃（５分間）。

【０３２５】

デンプン顆粒形態

Ｔ０形質転換コムギ植物から得られる、成熟Ｔ１種子からのデンプン顆粒の形態を光学顕微鏡によって観察した。２５のＴ０ｈｐ５’－ＳＢＥＩＩａ植物のそれぞれからの１０個の個々の穀粒を分析した。各内胚乳を穏やかに粉砕してデンプン顆粒を放出し、それを水中に分散して光学顕微鏡下で視覚化した。分析した２５系統の内、１２系統が歪んだ顆粒がある穀粒を有したが、目視観測からは、異なる種子中の様々なレベルの歪みが明らかになった。デンプン顆粒の形態学的変化について、ｈｐｃ－ＳＢＥＩＩａ、ｈｐ３’－ＳＢＥＩＩａ、およびｈｐ－ｃｏｍｂｏ導入遺伝子で形質転換された各植物からの９個の種子を同様に分析した。この場合、残りの各半切種子をＴ１植物に栽培することで各系統を保存できるように、半切種子を分析した。６３のｈｐ－ｃｏｍｂｏ系統の内５５系統は、様々なレベルの歪みがある、顆粒形態が変化した種子を有した。１０のｈｐ５’－ＳＢＥＩＩａ系統は全て、様々なレベルの歪みがある、デンプン顆粒形態が変化した種子を有した。ＳＢＥＩＩａ３’系統のいずれにおいても、有意なデンプン顆粒形態の変化は観察されなかった。歪んだデンプン顆粒は、内胚乳中のデンプン中のアミロースレベル上昇の指標であり、典型的に約５０％のアミロースであり、または高度に歪んだデンプン顆粒では約７０％のアミロースである。これは、表現型の程度の範囲が、有効なサイレンシングコンストラクトのそれぞれについて観察されたことを示した。

【０３２６】

発生中内胚乳中における、ウエスタンブロット法によるタンパク質発現

抗ＳＢＥＩＩａおよび抗ＳＢＥＩＩｂ抗体をそれぞれ使用して、ウエスタンブロット法により、ＳＢＥＩＩａおよびＳＢＥＩＩｂタンパク質のレベルについて、Ｔ１遺伝子組換え系からの４～７個のＴ２発生中内胚乳を分析した。ｈｐ－ｃｏｍｂｏ系統の場合、抗ＳＢＥＩ抗体を使用して、ＳＢＥＩ発現もまた分析した。選択された遺伝子組換え系からの全ＳＢＥＩＩタンパク質レベル（ＳＢＥＩＩａおよびＳＢＥＩＩｂ）は、野生型（変種ＮＢ１）中のレベルの百分率として計算され、表１１に示される。実施例１に記載されるヨウ素滴定法を使用して、穀粒中の全デンプンの百分率として計算された、遺伝子組換え系からの成熟穀粒中のアミロースレベルもまた判定された（表１１）。これは図５に図示される。

【０３２７】

ＳＢＥＩＩａおよびＳＢＥＩＩｂの発現レベル範囲が、独立系統の統遺伝子組換え植物の穀粒中で得られた。このような範囲は、異なる遺伝子組換え事象における導入遺伝子組み込み部位の多様性のために、常態では、あらゆる１個のコンストラクトによって得られた遺伝子組換え系内で予測されて、一般に「位置効果」と称される４個のコンストラクトは、ＳＢＥＩＩａおよびＳＢＥＩＩｂ遺伝子の発現低下において等しく効率的でないことが観察されたため、これらの実験で見られた発現レベル範囲は広がった。特に、いくつかの形質転換された系統でｈｐ－ｃｏｍｂｏコンストラクトによって引き起こされるＳＢＥＩＩｂの発現低下の程度は、例えば系統６７９．５．３および６７２．２．３．などのＳＢＥＩＩａの発現低下の程度と相関しなかった。しかし全てのコンストラクトは、大部分

の形質転換系統中で対応する遺伝子の発現を低下させた。

【０３２８】

全ＳＢＥＩＩタンパク質レベルに対してアミロースの百分率をプロットし、データ点から最良適合曲線を作成すると（図５を参照されたい）、野生型と比較して少なくとも７５％の全ＳＢＥＩＩの低下は、内胚乳デンプン中で５０％（ｗ／ｗ）以上のアミロース含有量をもたらすことが観察された。野生型と比較して少なくとも４０％の全ＳＢＥＩＩ活性の低下は、少なくとも４０％（ｗ／ｗ）のアミロース含有量をもたらした。

【０３２９】

残留ＳＢＥＩＩａタンパク質レベルに対してアミロース百分率をプロットすると、非常に良く似た曲線が得られ（図６を参照されたい）、コムギ内胚乳中のＳＢＥＩＩａのレベルが、デンプン中のアミロースレベルの一次決定要因であり、ＳＢＥＩＩｂおよびＳＢＥＩのレベルが二次決定要因であるという結論がもたらされた。

【０３３０】

アミロースモデルは、３組の入力（図６）に基づいてさらに発展させた。

【０３３１】

（１）ＳＢＥＩＩａおよびＳＢＥＩＩｂの相対的発現レベルに基づく理論的データ、および遺伝子導入からのアミロースデータ

【０３３２】

（２）単一および二重ヌルのアミロースデータ、およびＳＢＥＩＩａおよびＳＢＥＩＩｂの相対的発現レベルに基づく理論的データ

【０３３３】

（３）測定されたアミロースデータ、および「追加的なコンストラクト」遺伝子導入から測定されたＳＢＥＩＩａおよびＳＢＥＩＩｂレベル

【０３３４】

図６では、検出力曲線がこのデータに適合されている。まとめるとこれらの３つのデータセットは、入力タイプ間で高度に一貫したモデルを生じ、予測ルーツとしてのモデルを強化する。モデルは、パンコムギまたは四倍体コムギ中で高アミロース生成するために、ＳＢＥＩＩ遺伝子中に複数の変異を作り出すことの重要性を予測した。

【０３３５】

実施例３：コムギからのＳＢＥＩＩ遺伝子配列のクローニングおよび比較

タルホコムギ（Ａｅｇｉｌｏｐｓ　ｔａｕｓｃｈｉｉ）ゲノムライブラリからのＳＢＥＩＩ遺伝子の単離およびＰＣＲによる、それらの特性評価については、国際公開第９９／１４３１４号パンフレットおよび国際公開第２００１６２９３４－Ａ号パンフレットに記載される。Ａ、Ｂ、およびＤゲノムのＳＢＥＩＩａ遺伝子のイントロン５領域からのＤＮＡ配列は、国際公開第２００１６２９３４－Ａ号パンフレットに記載される。さらなる研究からは、異なるコムギ遺伝子型からのコムギＳＢＥＩＩａ遺伝子のその他の領域から配列を得て、例えば次のようにして同祖遺伝子をさらに特性評価することが導かれた。プライマーＡＲ２ａＥ１２Ｆ０７（５’－ＣＡＴＴＣＧＴＣＡＡＡＴＡＡＴＡＣＣＣＴＴＧＡＣＧＧ－３’（配列番号２１））およびＡＲ２ａＥ１４Ｒ０７（５’－ＣＴＴＣＡＣＣＡＡＴＧＧＡＴＡＣＡＧＣＡＴＣＡＧ－３’（配列番号２２））を使用して、六倍体コムギ変種ＣｈａｒａからＳＢＥＩＩａのエクソン１２～１４領域を増幅した。これから約６５６ｂｐのＰＣＲ産物が生じ、それは３つの同祖遺伝子のそれぞれからの増幅断片の混合物であると推定された。ＴＯＰＯベクターへのクローニングに続いて、この産物を配列決定した。エクソン１２～１４間の領域をカバーする、３つの多型配列が得られた（図７）。実施例４で詳述されるように、切断後増幅多型（ＣＡＰ）マーカーを使用した、Ｃｈｉｎｅｓｅ　Ｓｐｒｉｎｇ染色体操作系のＰＣＲ分析に基づいて、配列Ｆ１－１はＤゲノムに割り当てられ、配列Ｆ１－１３はＢゲノムにゲノム割り当てられ、配列Ｆ１－１５はＡゲノムに割り当てられた。

【０３３６】

プライマー対ＡＲ２ａｋｐｎＩＦ（５’－ＧＧＴＡＣＣＧＧＣＡＡＡＴＡＴＡＣＧＡＧ

ＡＴＴＧＡＣＣＣＧ－３’（配列番号２３））およびＡＲ２ａＳａｃＩＲ（５’－ＧＡＧＣＴＣＣＣＡＣＣＴＴＣＡＴＧＴＴＧＧＴＣＡＡＴＡＧＣ－３’（配列番号２４））を使用して、２個の六倍体コムギ変種、ＳｕｎｃｏおよびＴａｓｍａｎから、ＳＢＥＩＩａのイントロン３領域を増幅した。３つの多型配列が、ＳｕｎｃｏおよびＴａｓｍａｎのそれぞれから得られた（図８）。コムギＳＢＥＩＩａＤゲノム配列（ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＡＦ３３８４３１．１）と比較して、配列Ｔａｓｍａｎ０２５７およびＳｕｎｃｏ０２４２はＤゲノムに割り当てられた。Ｔａｓｍａｎ　０２７２およびＳｕｎｃｏ　０２４１配列は、分離集団における一塩基多型に基づく多型マーカーのマッピングに基づいて、Ｂゲノムに割り当てられた。Ｔａｓｍａｎ　０２６４およびＳｕｎｃｏ　０２４３の配列は、ＢおよびＤゲノム配列と異なるようであり、それらはＡゲノムに由来するはずであると結論付けられた。遺伝子型特異的多形性はまた、３個の各ゲノムにおいて、ＳｕｎｃｏおよびＴａｓｍａｎ間でＳＢＥＩＩａのこの領域についても観察された。

【０３３７】

プライマーＡＲ２ａｅｘｏｎ３Ｆ（５’－ＧＡＴＡＣＣＴＧＡＡＧＡＴＡＴＣＧＡＧＧＡＧＣ－３’（配列番号２５））およびＡＲ２ａｅｘｏｎ３Ｒ（５’－ＣＧＧＴＡＧＴＣＡＡＧＡＴＧＧＣＴＣＣＧ－３’（配列番号２６））を使用して、Ｃｈｉｎｅｓｅ　Ｓｐｒｉｎｇ（ＣＳ）からのＳＢＥＩＩａのエクソン３領域を増幅した。３つの多型配列が得られた（図９）。コムギＳＢＥＩＩａ遺伝子（ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＡＦ３３８４３１．１）の比較からは、配列ＣＳエクソン３ａがＤゲノムに由来することが明らかにされた。配列ＣＳエクソン３ｂは、パンコムギ２Ｂ染色体に由来すると報告されているＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＦＭ８６５４３５との１００％同一性に基づいて、Ｂゲノムに由来することが分かった。第３の配列ＣＳエクソン３ｄは、ＧｅｎＢａｎｋ受入番号Ｙ１１２８２．１と９９％同一性を示し、それは次にＣｈｉｎｅｓｅ　ＳｐｒｉｎｇのＡゲノム（ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＥＵ６７０７２４）に由来すると報告されている、部分的コード配列との高度な同一性（９９％）を有した。これは配列ＣＳエクソン３ｄが、Ａゲノムに由来するという予測を導いた。

【０３３８】

プライマーＡＲ２ａｅｘｏｎ１Ｆ（５’－ＣＡＣＡＣＧＴＴＧＣＴＣＣＣＣＣＴＴＣＴＣ－３’（配列番号２９））およびＡＲ２ａｅｘｏｎ１Ｒ（５’－ＧＡＧＡＧＧＡＧＴＣＣＴＴＣＴＴＣＣＴＧＡＧＧ－３’（配列番号２８））を使用して、ＣＳからのＳＢＥＩＩａのエクソン１領域を増幅した。配列が得られた（図１０）。ＳＢＥＩＩＧｅｎＢａｎｋ受入番号との配列比較からは、配列ＣＳエクソン１ａのＢゲノム（ＦＭ８６５４３５と１００％相同性）への、ＣＳエクソン１ｂのＡゲノム（Ｙ１１２８２．１と９９％相同性）への、ＣＳエクソン１ｃのＤゲノム（ＡＦ３３８４３１．１と１００％相同性）への割り当てが導かれた。

【０３３９】

ＳＢＥＩＩａ遺伝子配列はまた、パンコムギの二倍体祖先または類縁、パンコムギのＡゲノム祖先と考えられるウラルツコムギ（Ｔｒｉｔｉｃｕｍ　ｕｒａｒｔｕ）、Ｂゲノム祖先と考えられるクサビコムギ（Ａｅｇｉｌｏｐｓ　ｓｐｅｌｔｏｉｄｅｓ）（Ｔｒｉｔｉｃｕｍｓｐｅｌｔｏｉｄｅｓとしてもまた知られている）、およびＤゲノム祖先と密接な関係があると考えられるタルホコムギ（Ａｅｇｉｌｏｐｓ　ｔａｕｓｃｈｉｉ）からも得られる。遺伝子断片は、次のようにしてこれらの種から得られる。Ｄゲノム（受入番号ＡＦ３３８４３２）のＳＢＥＩＩａ遺伝子のヌクレオチド配列またはその補体に基づいて、１０個のプライマーをデザインし、その配列全体をカバーしたＰＣＲによって、これらのプライマーセットを使用して、二倍体種ＳＢＥＩＩａ遺伝子の断片を増幅した。１０個のプライマーを使用して、二倍体種ウラルツコムギ（Ｔ．ｕｒａｒｔｕ）（ＡＡゲノム）、クサビコムギ（Ａ．ｓｐｅｌｔｏｉｄｅｓ）、（ＢＢ）、タルホコムギ（Ａ．ｔａｕｓｃｈｉｉ）（ＤＤ）、および四倍体種デュラムコムギ（Ｔ．ｄｕｒｕｍ）（ＡＡＢＢゲノム）からのＤＮＡと共に、１６の組み合わせがＰＣＲで使用された。これらの増幅から、それらのヌクレオチド配列決定をする配列決定のために十分な品質であった、全部で３５

の断片が選択された。Ｃｏｎｔｉｇ　Ｅｘｐｒｅｓｓを使用して、配列を比較し編集し、二倍体からの祖先ＳＢＥＩＩａ遺伝子について決定された配列を組み合わせる。Ａ、Ｂ、およびＤゲノム上の遺伝子を区別するのに使用し得るＳＮＰまたは挿入／欠失などの多形性が同定され、Ａｍｐｌｉｆｉｅｒを使用して変異体同定のための特異的プライマーがデザインされる。

【０３４０】

ウラルツコムギ（Ｔ．ｕｒａｒｔｕ）からのＳＢＥＩＩａ遺伝子のエクソン１１～２２領域のヌクレオチド配列は、配列番号１３で示され、エクソン３～８は配列番号１５、およびエクソン１～３は配列番号１４で示される。タルホコムギ（Ａ．ｔａｕｓｃｈｉｉ）のＳＢＥＩＩａ遺伝子全体のヌクレオチド配列は、（参照によって本明細書に援用する）国際公開第２００５００１０９８号パンフレットで提供される。

【０３４１】

ＳＢＥＩＩａおよびＳＢＥＩＩｂのマッピング－コムギ中のＳＢＥＩＩａおよびＳＢＥＩＩｂの遺伝的連鎖

ＳＢＥＩＩａおよびＳＢＥＩＩｂ遺伝子は、どちらもコムギ２番染色体の長腕上に位置し（Ｒｅｇｉｎａ　ｅｔ　ａｌ．，２００５；Ｒａｈｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．，２００１）、これらの報告に基づいて連結すると考えられたが、連鎖がどの程度近いのか正確に分かっていなかった。親栽培品種Ｂａｘｔｅｒ、Ｙｉｔｐｉ、Ｃｈａｒａ、およびＷｅｓｔｏｎｉａが関与する、四元交雑から得られる分離集団を使用して、ＳＢＥＩＩａおよびＳＢＥＩＩｂ遺伝子の遺伝子マッピングを実施した。遺伝子間の組換えに関する集団分析は、およそ９００の子孫から１個の組換えのみを明らかにした。このデータから、ＳＢＥＩＩａとＳＢＥＩＩｂ間の遺伝距離はわずか０．５ｃＭと計算された、これは２個の遺伝子間の非常に密な連鎖であった。

【０３４２】

２個の遺伝子間の物理的距離を判定するために、Ｍｏｕｌｌｅｔ　ｅｔ　ａｌ．，（１９９９）によって構築されたタルホコムギ（Ａｅｇｉｌｏｐｓ　ｔａｕｓｃｈｉｉ）のＢＡＣライブラリーをスクリーニングして、ＳＢＥＩＩ含有クローンを同定した。ＳＢＥＩＩａおよびＳＢＥＩＩｂ遺伝子のそれぞれの５’および３’領域から、^{32}Ｐで標識されたハイブリダイゼーションプローブを作成して使用し、ＢＡＣライブラリーをスクリーニングした。４つのプローブの混合物でスクリーニングすると、陽性ハイブリダイゼーションシグナルのある９個のクローンが同定された。次に各プローブで９個のクローンを別々にスクリーニングして、３個のクローンを選択した。それらの１つ（ＢＡＣ２）は完全に配列決定され、完全長ＳＢＥＩＩｂ遺伝子を含有することが示された。その他のクローンでは、ＢＡＣ１は部分的直接配列決定によってＳＢＥＩＩａ遺伝子を含有することが示され、ＢＡＣ３はＰＣＲによって示されるように、ＳＢＥＩＩａおよびＳＢＥＩＩｂ遺伝子の双方の部分を含有するようであった。これは２個の遺伝子が、どの程度密に物理的に連結するのかを示唆した。ＢＡＣ１およびＢＡＣ３は、完全に配列決定されるであろう。この物理的データから、密接した遺伝的連鎖が確認された。

【０３４３】

したがって遺伝子の１つに影響を与える放射線などの作用物質によって生じる欠失変異は、恐らく遺伝子の双方に及びまたは全体にわたり、すなわち双方の遺伝子にとってヌルであることが予測された。さらにこれは、このような欠失変異株に生存能力があり、野生型の適応度を有し得る可能性を示唆した。少なくとも、観察された密な連鎖は、生存度または適応度に必要とされるその他の連鎖遺伝子に及ばない、比較的小さな欠失がある変異株を得る可能性を高めた。したがってこのような変異株を実施例５～７で下述するようにして探し求めた。

【０３４４】

実施例４：コムギ中のＳＢＥＩＩａおよびＳＢＥＩＩｂ同祖遺伝子の識別

実施例２で得られた配列多形性に基づいて、ＰＣＲアッセイをデザインし作成して、パンコムギ中の同祖ＳＢＥＩＩａ遺伝子を区別した。コムギＳＢＥＩＩａのエクソン１２～

１４領域からの２０７ｂｐ産物を増幅するように、ネステッドプライマー対、ＡＲ２ａＩ１３ゲノムＦ２（５’－ＧＴＡＣＡＡＴＴＴＡＣＣＴＧＡＴＧＡＧＡＴＣＡＴＧＧ－３’（配列番号２９））およびＡＲ２ａＩ１３ゲノムＲ２（５’－ＣＴＴＣＡＧＧＡＡＴＧＧＡＴＡＣＡＧＣＡＴＣＡＧ－３’（配列番号３０））をデザインした。２種の制限酵素Ｓｓｐ１およびＭｓｅ１で消化すると、Ｃｈｉｎｅｓｅ　Ｓｐｒｉｎｇ（ＣＳ）からのプライマーを使用して増幅された生成物は、サイズ２０７ｂｐ、１４７ｂｐ、９９ｂｐ、および１０８ｂｐの４本の明確なバンドを生じた。ＣＳ染色体操作系におけるこのＰＣＲマーカーアッセイの使用からは、２０７ｂｐの生成物がＡゲノムに由来し、１４７ｂｐの生成物がＢゲノムに由来し、９９ｂｐおよび１０８ｂｐの生成物がＤゲノムに由来することが明らかになった（図１１）。

【０３４５】

コムギの二倍体祖先、すなわちゲノムＡではウラルツコムギ（Ｔｒｉｔｉｃｕｍ　ｕｒａｒｔｕ）、ゲノムＢではクサビコムギ（Ａｅｇｉｌｏｐｓ　ｓｐｅｌｔｏｉｄｅｓ）、ゲノムＤではタルホコムギ（Ａｅｇｉｌｏｐｓ　ｔａｕｓｃｈｉｉ）からのＳＢＥＩＩａ配列に基づいて、異なるゲノムからのＳＢＥＩＩａ遺伝子の異なる領域からの断片を特異的に増幅してそれらを区別し得るプライマー対をデザインした（表４～８）。表６～８は、ヌクレオチド多形性のいくつか（ＳＮＰと標識された列）と、指定されたプライマー対を使用した際に得られる増幅断片のサイズとを列挙する。これらの同一プライマーの組み合わせを使用して、デュラムコムギからのＡおよびＢゲノム同祖ＳＢＥＩＩａ遺伝子を区別し得る。

【０３４６】

パンコムギのＡ、Ｂ、およびＤゲノムからの同祖ＳＢＥＩＩｂ遺伝子を識別するいくつかのＰＣＲプライマーセットの開発、および六倍体コムギ中のこれらの各ゲノム中のＳＢＥＩＩｂの同定については、国際公開第２００１６２９３４－Ａ号パンフレットに記載される。コムギの二倍体祖先、すなわちゲノムＡではウラルツコムギ（Ｔｒｉｔｉｃｕｍ　ｕｒａｒｔｕ）、ゲノムＢではクサビコムギ（Ａｅｇｉｌｏｐｓ　ｓｐｅｌｔｏｉｄｅｓ）、ゲノムＤではタルホコムギ（Ａｅｇｉｌｏｐｓ　ｔａｕｓｃｈｉｉ）からのＳＢＥＩＩｂ配列に基づいて、ＳＢＥＩＩｂの異なる領域からの３個のゲノムのそれぞれを特異的に増幅し得るプライマー対をデザインした（表９～１０）。これらの同一プライマーの組み合わせを使用して、デュラムコムギからのＡおよびＢゲノム同祖ＳＢＥＩＩｂ遺伝子を区別し得る。

【０３４７】

実施例５：ＳＢＥＩＩ欠失変異株の作成および同定

重イオン衝撃によるコムギの変異誘発コムギ種子の重イオン衝撃（ＨＩＢ）

一般に使用される市販品種であるコムギ品種Ｃｈａｒａにおいて、変異誘発コムギ集団を作成した。日本国埼玉県和光市の理化学研究所で行われた変異誘発では、２種類の重イオン、すなわち炭素およびネオンの供給源が使用された。変異誘発された種子を温室内に播種して、Ｍ１植物を得た。これらを自家受粉させて、Ｍ２世代を作成した。ＳＢＥＩＩａ（ＡＲＩＩａＦ２／ＡＲＩＩａＲ２）およびＳＢＥＩＩｂのゲノム特異的ＰＣＲプライマー（ＡＲＡ１９Ｆ／ＡＲＡ２３Ｒ）（診断ＰＣＲ）を使用して、およそ１５，０００のＭ２植物のそれぞれから単離されたＤＮＡサンプルをＳＢＥＩＩａおよびＳＢＥＩＩｂ遺伝子のそれぞれの変異について個々にスクリーニングした。野生型ＤＮＡサンプルに対する各ＰＣＲ反応が、Ａ、Ｂ、およびＤゲノム上のＳＢＥＩＩａまたはＳＢＥＩＩｂ遺伝子の増幅領域に対応する、３個の異なる増幅産物を生じた一方で、変異誘発Ｍ２サンプルからのＰＣＲ中の１個の断片の不在は、１個のゲノム中の対応領域の不在を示唆し、すなわちその中で遺伝子の少なくとも一部が欠失した変異対立遺伝子の存在を示唆した。このような変異対立遺伝子は、ほぼ確実にヌル対立遺伝子である。

【０３４８】

ゲノム特異的プライマー対を使用したＭ２系統のスクリーニングによって、ＳＢＥＩＩａおよび／またはＳＢＥＩＩｂ遺伝子の変異体である合計３４の変異株が同定された。Ｓ

ＢＥＩＩａの変異株をＳＢＥＩＩｂ遺伝子の存在および不在についてスクリーニングした。その結果、同定された変異株は３群に分類された。ＳＢＥＩＩａおよびＳＢＥＩＩｂ遺伝子の双方が変異体である、すなわち１個のゲノム中で双方の野生型遺伝子を欠く「タイプ１」、ＳＢＥＩＩａ遺伝子のみが変異体である一方、ＳＢＥＩＩｂ遺伝子は野生型である「タイプ２」、および特定ゲノム中でＳＢＥＩＩｂ遺伝子のみが変異体でありＳＢＥＩＩａ遺伝子が野生型である「タイプ３」。Ａ、Ｂ、およびＤゲノム上のＳＢＥＩＩａ遺伝子は、診断ＰＣＲ反応によって区別されたので、同様に、いずれの増幅産物が不在であるのかによって、ＳＢＥＩＩｂ遺伝子、変異対立遺伝子が、ゲノムの１つに割り当てられ得た。本明細書の用法では、名称「Ａ１」は、ゲノム上のＳＢＥＩＩａおよびＳＢＥＩＩｂ遺伝子の双方が変異体である遺伝子型を指し、「Ａ２」は、Ａゲノム上のＳＢＥＩＩａ遺伝子が変異体でありＳＢＥＩＩｂ遺伝子が野生型である遺伝子型を指し、「Ａ３」は、Ａゲノム上のＳＢＥＩＩａ遺伝子が野生型であり、ＳＢＥＩＩｂ遺伝子が変異体である遺伝子型を指す。名称「Ｂ１」、「Ｂ２」、「Ｂ３」、「Ｄ１」、「Ｄ２」、および「Ｄ３」は、ＢおよびＤゲノムと類似した意味を有する。これらの可能な９タイプの各変異株は、収集された３４の変異株内で同定された。

【０３４９】

３４の各変異株の中の染色体欠失の程度は、マイクロサテライトマッピングによって判定された。以前、染色体２Ａ、２Ｂ、および２Ｄの長腕に位置づけられたマイクロサテライトマーカー（表１２）をこれらの変異株上で試験して、各変異体中の各マーカーの存在または不在を判定した。反応における適切な増幅産物の生成に基づいて、その中で特定染色体マイクロサテライトマーカーの全てまたは大部分のいずれかが保持されている変異植物は、比較的小さな欠失変異株であると推測された。変異がその他の重要な遺伝子に影響する可能性があまりないことを考慮すると、このような変異株が好ましい。同定された変異株、およびマイクロサテライトマッピングからの結果を表１３に要約する。

【０３５０】

変異株の交雑

複数ゲノム上に変異ＳＢＥＩＩ対立遺伝子を有する子孫植物および穀粒を作成する交雑のために、マイクロサテライトマーカー分析による判定で、より小さな欠失について同型接合である変異植物を選択した。交雑種からのＦ１子孫植物を自家受粉させ、得られたＦ２種子をそれらのＳＢＥＩＩ遺伝子型について分析した。このような１２のＦ２集団のスクリーニングは、１１種類の異なる変異対立遺伝子組み合わせ（「二重ヌル」）の同定をもたらした（表１４）。その特定の交雑の１２００を超えるＦ２子孫をスクリーニングしたにもかかわらず、１２回目の交雑において、Ｂ１Ｄ１遺伝子型の二重ヌル組み合わせは得られなかった。この１つの可能な説明は、ＳＢＥＩＩ遺伝子座近傍の重要遺伝子がＢおよびＤゲノムには存在するがＡゲノムにはないことであり、したがってＢ１およびＤ１二重ヌル変異の組み合わせが、種子を生育不能にしたかもしれない。２７種類の二重ヌル変異株の組み合わせが理論的には可能であり、より多くのＦ２集団をスクリーニングして、その他の組み合わせが同定されるであろう。

【０３５１】

実施例６：コムギの単一および二重ヌルＳＢＥＩＩ変異株のアミロース含有量

実施例１に記載されるヨウ素滴定法を使用して、実施例５に記載される単一および二重ヌル植物の穀粒デンプンのアミロース百分率を測定した。変異系統数（Ｘ軸）に対してアミロース含有量（Ｙ軸）をプロットする散布図を図４に示す。変異株穀粒中のアミロース含有量は、２７．３～３８．７％の範囲であった。野生型（未変異）Ｃｈａｒａサンプルのアミロース含有量は、２７．４％～２９．５％の範囲であった。２６系統が、３４％を上回るアミロース含有量を記録した。これらの２６系統の内、２０系統は二重ヌルであり、そのいくつかは、タイプ１またはタイプ２の組み合わせのいずれかの同一交雑からの複製であることが観察された。換言すれば、単一ヌル穀粒のアミロース含有量と比較して、タイプ１およびタイプ２二重ヌル組み合わせにおいて、アミロース含有量が顕著に増大する傾向があった。

【０３５２】
重要なことには、そして意外にもこの研究以前には、アミロースが４０％を超えるデンプンを有する二重ヌル変異株穀粒はなかった。これには、それぞれ４個のＳＢＥＩＩａおよび４個のＳＢＥＩＩｂヌル対立遺伝子を含有し、２個の野生型ＳＢＥＩＩａおよび２個の野生型ＳＢＥＩＩｂ対立遺伝子を保持する、Ａ１Ｂ１、Ａ１Ｄ１、およびＢ１Ｄ１遺伝子型が含まれた。しかしこの観察は、実施例２のデータから立てられた予測と一貫していた。そのため変異を組み合わせることで、アミロースが４０％を超えるコムギ穀粒を獲得するには、穀粒が、４個を超えるＳＢＥＩＩａの変異対立遺伝子を有する必要があり、または代案としては、４個のＳＢＥＩＩａの変異対立遺伝子のみが存在する場合は、４個のＳＢＥＩＩａ対立遺伝子と組み合わせて４個を超える変異ＳＢＥＩＩｂ対立遺伝子が必要であり、好ましくは６個のＳＢＥＩＩｂ遺伝子が全て変異体であると結論付けられた。データから、Ａ、ＢおよびＤゲノムのそれぞれの上のＳＢＥＩＩａ遺伝子は、相互比較で同様のレベルで発現され、すなわちパンコムギ中では、いずれの１個のゲノムもＳＢＥＩＩａを優勢に発現しないこともまた示唆された。

【０３５３】
「Ａ３」および「Ａ３Ｄ３」遺伝子型が、実施例２のデータと一致する低アミロース含有量を有したことは興味深く、コムギ中のアミロース含有量を定める上で、ＳＢＥＩＩｂの役割がＳＢＥＩＩａと比較してより小さいことが確認された。

【０３５４】
実施例７：三重ヌル欠失変異株を作り出す試みにおける交雑種
４個を超えるＳＢＥＩＩａ変異対立遺伝子がある変異株系統を前の実施例で単離した欠失変異株を用いて作成するために、単一ヌルおよび二重ヌル系統のいくつかを交雑し、診断ＰＣＲアッセイを使用して、これらの交雑種のＦ２子孫を分析した。アッセイは、３個のＳＢＥＩＩａおよび３個のＳＢＥＩＩｂ遺伝子の存在を試験し、したがってＡ、Ｂ、およびＤゲノムのそれぞれの中のＳＢＥＩＩａおよび／またはＳＢＥＩＩｂ遺伝子にヌル（欠失）変異を有した植物（ＳＢＥＩＩａおよび／またはＳＢＥＩＩｂに関して三重ヌル系統）を同定する試みにおいて使用された。第１の実験で実施された交雑、および親系統と可能な三重ヌル　Ｆ２子孫の遺伝子型を表１５に列挙する。

【０３５５】
これらの交雑から選択された見かけが正常なＦ２種子および皺が寄った／萎縮Ｆ２種子を顕微鏡検査して、デンプン顆粒形態を分析した。Ｄ２単一ヌル親植物とＡ１Ｂ２二重ヌル親植物の間の交雑からそれぞれ得られた、０８／ｄｄ交雑から５個の、および０８／ｂｂ交雑から１個の、６個の皺が寄った／萎縮種子を選択した。６個の各種子は、デンプン顆粒の重度の歪みを示し、種子中の顆粒の大部分で異常な歪んだ形状を示し、それはアミロースレベルが増大した遺伝子組換え種子で観察された顆粒と類似していた（実施例２）。その他の交雑種からの皺が寄った／萎縮種子および選択された外見が奇妙ないくつかの種子の検査は、デンプ顆粒形態が無変化であったことを明らかにし、０８／ｄｄおよび０８／ｂｂ種子中で観察された表現型が、遺伝子型に特異的であって、種子発生中の発育障害のためではないことが示唆された。

【０３５６】
歪んだデンプン顆粒を有する６個の種子から単離されたデンプンをプールして、実施例１に記載されるヨウ素滴定法を使用して、アミロース含有量を試験した。プールされたサンプルのアミロース含有量は、６７％と測定された（表１６）。栽培品種ＣａｄｏｕｘおよびＣｈａｒａの野生型種子（対照）中のアミロースレベルは、およそ３５％であった。

【０３５７】
デンプン顆粒形態が変化した種子の遺伝子型分析。
０８／ｄｄおよび０８／ｂｂ交雑からのデンプン顆粒形態が変化した種子を播種して、結果として生じた植物を温室栽培した。実施例３に記載されるＳＢＥＩＩａおよびＳＢＥＩＩｂのゲノム特異的プライマーを使用して、植物から抽出されたＤＮＡを分析した。ＰＣＲアッセイからの結果は、これらの各種子が、遺伝子型Ａ１Ｂ２、Ｂ２Ｄ２またはＡ１

Ｄ２のホモ接合二重ヌル変異株である一方、第３の（野生型）遺伝子は、同型接合または異型接合状態のいずれかで存在することを示唆した。植物中の３個のＳＢＥＩＩａ遺伝子の存在または不在、および同型接合性または異型接合性をアッセイする、ゲノム特異的個別プライマー対を使用した、定量的ＰＣＲ（リアルタイムＰＣＲ、Ｒｏｔｏｒｇｅｎｅ６０００）を使用して、これらの植物からのＤＮＡをさらに試験した。ＳＢＥＩＩａのために使用されたプライマー対は、Ｓｎｐ６ｆｏｒ／Ａｒｅｖ５（配列番号５１／配列番号６１）（Ａゲノム、２０５ｂｐの増幅産物）、Ｂｓｎｐ４／Ａｒｅｖ５（配列番号５５／配列番号６１）（Ｂゲノム、４９４ｂｐの増幅産物）、およびＤＳｎｐ７ｆｏｒ／Ｄｒｅｖ１（配列番号５８／配列番号６２）（Ｄゲノム、２７８ｂｐの増幅産物）であった。ＳＢＥＩＩａ増幅反応を正規化するために、全ての植物で等しく発現されると予測される細胞壁生合成遺伝子でありコムギの７番染色体に位置するＣｓｌＦ６遺伝子から、１９０ｂｐの産物を増幅するプライマー対（ＳＪ１５６／ＳＪ２４２）を使用して、増幅を制御した。野生型植物からのＤＮＡ、２Ｂ２と称される変異誘発集団からのＤＮＡ、および野生型栽培変種Ｃｈｉｎｅｓｅ Ｓｐｒｉｎｇ（ＣＳ）からのＤＮＡを対照テンプレートとして使用した。ＳＢＥＩＩａプライマーとの反応で生成された相対濃度の値は、各テンプレートＤＮＡ調製品のためのＣｓｌｆ６プライマーの値で正規化した。可能な三重ヌル植物およびＣＳの値を２Ｂ２系統と比較して計算した。

【０３５８】

これらの３個のプライマー対の内、Ｄゲノムプライマーが、Ｓ１４と称される１つの植物について明白な単一バンドを生じ、定量化を可能にした。Ｓ１４のＡおよびＢゲノム上のＳＢＥＩＩａ遺伝子ではバンドが得られず、これらのゲノム上の変異対立遺伝子について、それが同型接合であったこと（欠失）が示唆された。定量化は、Ｓ１４が、２Ｂ２と比較しておよそ３０～５０％のＤ対立遺伝子補体を有した一方、ＣＳはＤゲノムＳＢＥＩＩａ遺伝子について、２Ｂ２のおよそ９５％の値を与えたことを示唆した。これは、約６７％のアミロースレベルの種子を与えたＳ１４が、Ａゲノム中のＳＢＥＩＩｂヌル変異について同型接合であったことに加えて、２個のゲノム（ＡおよびＢ）のＳＢＥＩＩａヌル変異について同型接合であり、第３のゲノム（Ｄ）について異型接合体であったことを示した。すなわち、Ｓ１４は、Ａ１（同型接合）、Ｂ２（同型接合）、Ｄ２／＋（異型接合体）遺伝子型を有した。同様に、定量的ＰＣＲは、Ｓ２４と称される植物がＢ２（同型接合）、Ｄ２（同型接合）およびＡ１（異型接合体）遺伝子型を有したことを示した。ＰＣＲ分析は、残りの５植物が以下の遺伝子型を有したことを示した。０８ｄｄ９－Ｂ４はＡ１Ｂ２遺伝子型について同型接合であり、すなわちＡゲノム上のＳＢＥＩＩａおよびＳＢＥＩＩｂについて同型接合変異体であり、Ｂゲノム上のＳＢＥＩＩａおよび野生型ＳＢＥＩＩｂについて同型接合変異体であり、Ｄゲノム上の双方の遺伝子について同型接合野生型である一方、０８ｂｂ１１－Ｄ９はＢ２Ｄ２遺伝子型について同型接合であり、Ｓ２８およびＳ２２はＡ１Ｄ２遺伝子型について同型接合であった。

【０３５９】

Ｆ３種子の分析

Ｓ２８、Ｓ２２、Ｓ１４、およびＳ２４系統の種子を温室内に播種して、結果として生じた植物を自家受粉させ、各植物から種子（Ｆ３世代）を得た。植物の稔性が影響を被り、ヘッドあたりの種子数および稔性の花穂の百分率は、同時に同一条件下で栽培された、野性型、単一ヌル、およびその他の二重ヌル変異株と比較して顕著に低下したが、消滅しなかったことが観察された（表１７）。

【０３６０】

デンプン顆粒形態は、Ｓ２８、Ｓ１４、およびＳ２２の各系統からの１００～２００個の種子上で、光学顕微鏡によって判定された。Ｓ２２系統からの試験された２００個の種子の内、１０２個のＦ３種子に歪んだデンプン顆粒があると同定された。データは、予想よりも正常な表現型の数が多い、予想される１：２：１（同型接合変異体：異型接合体：野生型）からの分離比の歪みを明らかにした。高アミロース表現型を持つ同型接合植物が同定されるかどうかを見るために、歪んだ顆粒がある１０２個の種子を発芽に適する条件

においた。１０２個の種子の内、６１個が発芽した。これらの６１個の植物からのＤＮＡはＳＢＥＩＩａゲノム特異的ＰＣＲによって分析され、全ての６１個の植物はＡ１Ｄ２遺伝子型の二重ヌルのようであり、同型接合三重ヌルは同定されなかった。Ｂゲノム上の野生型ＳＢＥＩＩａ遺伝子は異型接合体であることが示され、すなわちＢゲノムに対して野生型および変異対立遺伝子の双方が存在した。

【０３６１】

歪んだデンプン顆粒を有したが発芽しなかった４１個の種子は、それらのＳＢＥＩＩａ遺伝子型について分析された。これらの多くは三重ヌル（ＳＢＥＩＩａ遺伝子の欠失）であることが観察され、すなわちＳＢＥＩＩａ遺伝子のあらゆる増幅産物の不在を示し、したがってＳＢＥＩＩａに対して６個のヌル対立遺伝子を有した。これから、三重ヌル種子が生じ得るが、これらの種子は発芽に影響を及ぼす欠陥を有したことが確認された。これらの種子いくつかから胚を摘出し、胚の発芽を促進する条件下で、組織培養液を使用して培養した。いくつかの胚は成功裏に発芽して、緑色小植物がもたらされた。しかしこれらの小植物を土壌に移すと、それらは発育不良であり、稔性コムギ植物を生じなかった。

【０３６２】

これらのデータから、ＨＩＢ生成欠失変異に基づく同型接合三重ヌル変異体種子、およびこれらの種子から誘導され、６個のヌルＳＢＥＩＩａ対立遺伝子を有して完全にＳＢＥＩＩａを欠く小植物は、これらの交雑種から回収可能であったが、発芽および成長が影響を被ったと結論付けられ、これらの過程におけるいくつかのＳＢＥＩＩａの重要な役割、または種子の発芽、正常な生育および植物の繁殖能力に必要な密接にリンクした遺伝子が存在し、交雑に用いられたＨＩＢ変異株の各々で遺伝子が欠失したことが示唆された。対照的に、第３のヌル対立遺伝子について異型接合体であり、したがって５個のヌルＳＢＥＩＩａ対立遺伝子を有するＳＢＥＩＩａの二重ヌル変異株は、回収されて正常に成長し、稔性は低下したものの稔性であった。

【０３６３】

Ｓ２８系統のタンパク質発現解析

ＳＢＥＩＩａ特異的抗体を使用して、ウエスタンブロット法により、Ｓ２８植物からの１本の花穂全体から得られる発生中の内胚乳中のＢＥＩＩａタンパク質表現を分析した。花穂中の１５個の内胚乳の全ては、ＳＢＥＩＩａのＡおよびＤゲノムイソ型の双方を欠くパターン（ＡＤ二重ヌル）を示し、Ｂゲノムから発現される１つのＳＢＥＩＩａバンドのみが存在した。１５個の内胚乳の内７個は、他よりも、そして対照系統ＮＢ１よりも大幅に低い、ＢゲノムＳＢＥＩＩａ発現レベルを有した。バンド強度に基づいて、各内胚乳中のＳＢＥＩＩａ発現を定量化した。

【０３６４】

内胚乳からの残りのデンプン顆粒を、９０％Ｐｅｒｃｏｌｌを使用して精製した。２００μｌの水中の再懸濁に続いて、顆粒を顕微鏡的に検査した。野生型の約３６％未満のＳＢＥＩＩａ発現レベルを有する全ての内胚乳は、高アミロース表現型に典型的な、歪んだ形態のデンプン顆粒を有したことが観察された。Ｓ２４植物からの１本の花穂からの発生中の穀粒中で観察された一連のＳＢＥＩＩａタンパク質発現レベルは、野生型の５％未満に低下した。ＳＢＥＩＩａのレベルがより低い内胚乳はまた、デンプン顆粒形態の変化も示し；したがってこの実験において表現型は、完全に相関性がある。これらの全ての内胚乳中のＳＢＥＩＩｂ発現レベルはまた、ＳＢＥＩＩｂ特異的抗体を使用して分析された。結果は、ＳＢＥＩＩａ発現の低下に対応して、ＳＢＥＩＩｂの発現に同時の低下があったことを明らかに示した。

【０３６５】

考察

４個の変異ＳＢＥＩＩａ対立遺伝子を有するＡ１Ｂ２変異遺伝子型がある植物（表１８に要約される）からの種子の分析は、その遺伝子型について、アミロース含有量がわずかにのみ上昇し、４０％未満のアミロースレベルがもたらされたことを示した。比較すると、Ｓ１４、Ｓ２２、Ｓ２４、およびＳ２８種子からのデータは、第５のＳＢＥＩＩａ変異

（欠失）対立遺伝子の追加が、アミロースレベルを約６７％に上昇させることを実証した。したがって４個のＳＢＥＩＩａヌル対立遺伝子から最低限の５個の変異ＳＢＥＩＩａ対立遺伝子への増加は、アミロースレベルを５０％（ｗ／ｗ）を超えて、実際に６０％（ｗ／ｗ）を超えて増大させる上で重要であった。この結論は、実施例２のデータから立てられた予測と一致した。対立遺伝子組成とアミロース含有量との観察された関係性は、植物中のＳＢＥＩＩａ変異対立遺伝子の総数が、アミロース含有量を定める上で重要であったことを示唆した（表１８）。ＳＢＥＩＩｂ変異対立遺伝子の数が役割を果たすこともまた結論付けられたが、ＳＢＥＩＩａ変異対立遺伝子の数よりも重要性に劣った。

【０３６６】

第３のヌル対立遺伝子について異型接合体であり、したがって５個のヌルＳＢＥＩＩａ対立遺伝子を有するＳＢＥＩＩａの二重ヌル変異株は、回収されて正常に成長し、稔性であった。対照的に、６個のヌルＳＢＥＩＩａ対立遺伝子を有し、完全にＳＢＥＩＩａを欠く同型接合三重ヌル変異株種子および小植物は、交雑に用いたＨＩＢ誘発欠失を含む一重ヌル変異株から作成することができたが、これらは発芽および生長が影響を受け、これらの過程におけるいくつかのＳＢＥＩＩａの本質的役割、またはＨＩＢ誘発変異株でＳＢＥＩＩａとともに欠失し、種子の発芽、正常な生育および植物の繁殖能力に必要な、ＳＢＥＩＩａと密接にリンクした遺伝子の存在を示唆する。実施例１１に示すデータから、これらの説明のうち２番目が正しい説明であると考えられる。

【０３６７】

実施例８：完全にＳＢＥＩＩａまたはＳＢＥＩＩｂを欠く三重ヌル欠失変異株を生成するさらなる試み

ＨＩＢ誘発欠失変異株から完全にＳＢＥＩＩａを欠く三重ヌル変異株が作成できないという、上の実施例の観察は、交雑の親として使用される特定の変異体植物に依存したかもしれない。これを試験するために、これもまたＨＩＢ変異誘発から得られた追加的な親欠失変異株を使用して交雑の第２の組を実施した。３８の交雑種からのＦ２種子を収穫してＤＮＡ抽出した。その内の１２はＡ１Ｂ２Ｄ２遺伝子型（三重ヌル変異体）の生成を目的する交雑種からであるが、実施例７に記載されるのとは異なる親系統を使用している、２５の交雑種それぞれからの少なくとも９６個のＤＮＡサンプルをＰＣＲによってスクリーニングし、分離傾向を判定した。これらの交雑種のいずれからも、生存能力がある三重ヌルは同定されなかった。二重ヌルの回収もまた交雑に応じて変動したが、ほとんどの場合、予測された遺伝子型が得られた。６個のＡ１Ｂ２Ｄ２交雑種からのＦ２種子もまた顕微鏡的にスクリーニングして、高アミロース表現型有する種子を同定した。このような種子は、中程度の頻度で同定された。

【０３６８】

Ａ２Ｂ２Ｄ２交雑からの種子のスクリーニング、０８／ｍｍ－１。１２の交雑種はＡ２遺伝子型親とＢ２Ｄ２遺伝子型親の間の交雑種であり、すなわちＡ２Ｂ２Ｄ２遺伝子型を有する三重ヌルＳＢＥＩＩａ変異株を作り出す目的で、双方の親は３つ全てのＳＢＥＩＩｂ遺伝子について野生型であった。０８／ｍｍ－１交雑から得られるおよそ６７２個のＦ２種子からのＤＮＡ調製品をＰＣＲによってスクリーニングした。分離比は、予測されるメンデル比から歪んで、予測されたよりも顕著により少ない二重ヌルが同定された。それでもなお、生育し得る種子中で、二重ヌル変異の全ての可能な組み合わせが同定された。メンデル型分離では、約１０個が予測されたにもかかわらず、６７２個の種子中にＡ２Ｂ２Ｄ２遺伝子型の三重ヌルは同定されなかった。

【０３６９】

並行して、０８／ｍｍ－１交雑のＦ２種子を顕微鏡検査でスクリーニングして、高アミロース／歪んだデンプン顆粒（ＨＡ）表現型を持つあらゆる種子を同定した。スクリーニングされた５７６個のＦ２種子の内、ＨＡ表現型を持つと同定された種子はなかった。この種子集団は、２個のゲノムにおいて同型接合変異体であり、第３のゲノムにおいてＳＢＥＩＩａの異型接合変異体／野生型を有する、５個の変異ＳＢＥＩＩａ対立遺伝子を有する、低頻度の種子を含むべきであった。Ａ２Ｂ２Ｄ２交雑における、ＨＡ表現型がある種

子の観察された欠如は、あらゆるＳＢＥＩＩｂ変異対立遺伝子の不在下では、５個の変異ＳＢＥＩＩａ対立遺伝子が、高アミロース（＞５０％アミロース）表現型を提供するには不十分なようであったことを示唆した。すなわち、５個の変異ＳＢＥＩＩａ対立遺伝子と１個の野生型ＳＢＥＩＩａ対立遺伝子の文脈で、ＳＢＥＩＩａレベルの大幅低下に加えて、野生型と比較したＢＥＩＩｂレベルの低下により、または１つまたは複数のＳＢＥＩＩａ遺伝子に部分的機能喪失変異を有する内胚乳での同等のＳＢＥＩＩａ活性レベルにより、５０％を超えるアミロースが提供できる。

【０３７０】

その他の２個のゲノム上の単一ＳＢＥＩＩａ変異体親（野生型ＳＢＥＩＩｂ）と二重ＳＢＥＩＩａ変異体親の間の１１の追加的な交雑種からのＦ２種子のスクリーニングもまた、いかなる生存能力のあるＡ２Ｂ２Ｄ２遺伝子型の三重ヌル変異体種子も同定しなかった。

【０３７１】

タイプ３変異を伴う交雑

４個の変異ＳＢＥＩＩａ対立遺伝子と組み合わされた、２、４または６個の変異ＳＢＥＩＩｂ対立遺伝子の同型接合を有する変異株を発見する目的でタイプ３変異を伴う交雑を実施し、結果として生じる植物およびその穀粒の表現型を測定した。全てが野性型デンプン顆粒形態を示し、ＳＢＥＩＩｂの６個のヌル対立遺伝子とともにＳＢＥＩＩａのゼロまたは４個のヌル対立遺伝子を有する、Ａ３Ｂ３Ｄ３およびＡ３Ｂ２Ｄ２交雑種からの三重ヌルＳＢＥＩＩｂが同定された。

【０３７２】

実施例９：高アミロース変異株のさらなるスクリーニング

同定された単一欠失変異株からの三重ヌルＳＢＥＩＩａ変異株を生成するさらなる試みにおいて、改変ストラテジーを採用した。このストラテジーでは、単一変異株の同定後に、単一ＳＢＥＩＩａ変異を有するＭ２植物から未連鎖で無関係の変異を除去するために、単一変異株のいくつかの初期戻し交雑ステップを追加した。これは、変異が組み合わさると有害効果を及ぼし得る、所望のＳＢＥＩＩａ変異と無関係の追加的な変異を植物中に生じ得る、使用された高レベル変異誘発処理に起因する変異背景の影響を低下させるために含めた。これらの初期戻し交雑は、Ｍ２変異株と、冬コムギ栽培品種Ａｐａｃｈｅまたは春コムギ栽培品種Ｃｈａｒａコムギのいずれかの植物との交雑によって実施された。

【０３７３】

最初に、１３回の交雑を実施して、全ての３ゲノム上の変異を組み合わせ、２１，４００Ｆ２の半切種子からのＤＮＡについて分子解析を実施して、各半切種子の残りは系統維持のために保持した。変異を検出する予備スクリーニングでは、ＳＢＥＩＩａまたはＳＢＥＩＩｂに対する特異的ゲノムである、優勢ＳＳＲマーカーを使用した。これから、ゲノム特異的増幅産物の不在によって、２１個の種子が推定上の三重ヌル変異株として、７９３個の種子が推定上の二重変異株として同定された。

【０３７４】

コムギ種子遺伝子型のＱ－ＰＣＲ　ＴａｑＭａｎベースのアッセイ

上述の優勢マーカーを使用した１回目のスクリーニングは、あらゆる１個のＳＢＥＩＩａ遺伝子について、異型接合または同型接合野生型の種子を区別できなかった。そのためＴａｑＭａｎベースのＰＣＲアッセイを開発して、第３のゲノム上のＳＢＥＩＩａ遺伝子について、異型接合体および同型接合体を区別して、最初のスクリーニングからの遺伝子型を同定した。ＴａｑＭａｎ分析は、半切種子に対して実施され、コムギ内胚乳は各ゲノムについて三倍体（３ｎ）であるので、第３のゲノム上の野生型ＳＢＥＩＩａ対立遺伝子に関する異型接合体内胚乳について、以下の２種類のプロファイルのいずれかが可能であった。野生型対立遺伝子が母親によって提供される２ｎ、または野生型対立遺伝子が花粉を通じて父親によって提供される１ｎ。Ｑ－ＰＣＲ　ＴａｑＭａｎベースのアッセイは、Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ　７９００ＨＴ　Ｆａｓｔ　Ｒｅａｌ　Ｔｉｍｅ　ＰＣＲ　Ｓｙｓｔｅｍ（ＡＢＩ，Ｆｏｓｔｅｒ　Ｃｉｔｙ，ＣＡ）を使用して、推定上

の二重変異体コムギ種子の第３のゲノム上のＳＢＥＩＩａ遺伝子のコピー数を検出した。アッセイは、磁気ビーズ法（Ｎｕｃｌｅｏｍａｇ、カタログ番号７４４　４００．２４）によって、半切種子から抽出されるゲノムＤＮＡを使用した。ＤＮＡを３８４ウェルプレートに装入し、二本鎖Ｑ－ＰＣＲ反応を各プレートについて二連で実施した。ＰＣＲ反応は、プライマーＳＢＥ２ａＱＰＣＲＡＢＤＦ４（順方向プライマー）：５’－ＡＣＧＡＴＧＣＡＣＴＣＴＴＧＧＴＧＧＡＴ－３’（配列番号３１）およびＳＢＥ２ａＱＰＣＲＡＢＤＲ４（逆方向プライマー）：５’－ＡＣＴＴＡＣＧＧＴＴＧＴＧＡＡＧＴＡＧＴＣＧＡＣＡＴ（配列番号３２）を使用して、ＳＢＥＩＩａ遺伝子のエクソン２１からの６５ｂｐ断片を増幅するようにデザインされた。Ｑ－ＰＣＲ反応中に蛍光シグナルを送達するのに使用されたプローブは、ＳＢＥ２ａＱＰＣＲＡＢＤＳ４（ＴａｑＭａｎ（登録商標）プローブＭＧＢ、ＦＡ）Ｍ５’－ＣＡＧＣＡＧＧＣＴＴＧＡＴＣＡＴ－３’（配列番号３３）であった。プライマーＧａｍｙＢ１Ｆ（順方向プライマー）：５’－ＧＡＴＣＣＧＡＡＴＡＧＣＴＧＧＣＴＣＡＡＧＴＡＴ－３’（配列番号３４）およびＧａｍｙＢ２Ｒ（逆方向プライマー）：５’－ＧＧＡＧＡＣＴＧＣＡＧＧＴＡＧＧＧＡＴＣＡＡＣ－３’（配列番号３５）を使用して、内在性遺伝子からの配列ＧａｍｙＢを内部対照として使用して各サンプルのシグナル値を正規化した。反応条件は、次のとおりであった：「ホットスタート」（９５℃、１０分間）とそれに続く４０サイクルの変性（９５℃、１５秒間）、アニーリング（５８℃、６０秒間）。７９００ＨＴ　Ｆａｓｔ　Ｒｅａｌ　Ｔｉｍｅ　ＰＣＲ　Ｓｙｓｔｅｍに組み込まれたＲｅｌａｔｉｖｅ　Ｑｕａｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎマネジャーソフトウェアを使用して、反応生成物を分析した。

【０３７５】

このＴａｑＭａｎアッセイを使用して、全ての２１の推定上の三重ヌル変異株は二重ヌルであって、三重ヌルではないことが確認された。最初のスクリーニングにおける不正確な同定は、恐らくテンプレートＤＮＡの低品質によって引き起こされた偽陰性に起因すると考えられた。光学顕微鏡によってデンプン顆粒形態について１４個の種子を検査すると、観察された１４個は全て野生型顆粒表現型を有し、これは二重ヌル変異株であって三重ヌル変異株でない種子と一致した。アッセイはまた、交雑種Ｍ７６、Ｍ７７、Ｍ８２、Ｍ８３、およびＭ８６から、第３のゲノム上の２ｎ異型接合体である、数個の推定上の二重変異体種子を同定した。

【０３７６】

実施例１０：ＮＩＲによる変異株コムギ種子のスクリーニング

迅速非破壊的ハイスループット方法を開発して、高アミロース含有量と関連付けられている表現型について、単一種子をスクリーニングした。実施例４～６に記載されるＰＣＲベースのスクリーニング法は、１５，０００個の種子集団中の変異株を検出するのに成功したが、手動で各種子を切断した後に、各半切種子からのＤＮＡ調製が必要であるため時間と手間がかかった。近赤外線分光法（ＮＩＲＳ）を使用して、高アミロースと標準的アミロース表現型を区別し得ると判断した。近赤外線分光法（ＮＩＲＳ）は、コムギ種子の特性を判定するのに使用されている非破壊技術である（ＭｃＣｌｕｒｅ，２００３）。ワキシーデンプン表現型（低アミロース）コムギ単一種子ＮＩＲＳ分析は、Ｄｅｌｗｉｃｈｅ　ｅｔ　ａｌ．（２００６）によってデュラムコムギ上で開発された。Ｄｏｗｅｌｌ　ｅｔ　ａｌ（２００９）は、ワキシー、部分的ワキシー、および標準的デュラムおよび六倍体コムギを分離する自動単一種子ＮＩＲ仕分け装置を開発した。我々の知る限りでは、この方法は、これまで六倍体コムギ中の高アミロース種子を区別するために、使用されていない。

【０３７７】

粉砕種子材料中の見かけのアミロース含有量を測定する小規模生化学的参照法の開発および検証

個々の種子中の見かけのアミロース含有量に従ってＮＩＲＳ測定を較正するために、この場合は単一種子である同一サンプル上で、ＮＩＲＳスペクトルデータと見かけのアミロース含有量を測定する生化学的方法とを相関させるための、数理モデルを確立してなくて

はならなかった。例えば実施例１に記載される方法などの標準ヨウ素滴定法では、一定量の種子が慣例的に使用され、それはデンプン可溶化前に合わせられて、バルク（合わせた）デンプンを提供し、それは常態では、ヨウ素結合に基づいたアミロース含有量の比色分析測定に先だって脱脂される。ＮＩＲＳ較正目的での使用に適切にするために、この方法を修正、簡易化、縮小して、単一種子中の見かけのアミロース含有量を測定できるようにし、それによって種子間のアミロース含有量の変動を考慮に入れた。修正法は、粉砕穀粒からのデンプンを精製せず、デンプン中のアミロースと相互作用する脂質を除去せず、結果は種子からの単離デンプンの百分率でなく新鮮種子重量の百分率として表されるので、「見かけのアミロース含有量」という用語がこの文脈で使用される。これらの理由から、「見かけのアミロース含有量」について得られる値は、実施例１に記載される標準法を使用して得られる値よりもはるかに低い。

【０３７８】

第１段階として、この方法はデンプン精製なしに粉砕コムギ穀粒を使用して、比色分析応答とアミロース含有量の間の直線性を評価することで開発された。このために使用した高アミロース材料は、ｈｐ５’－ＳＢＥＩＩａコンストラクトで形質転換されてＳＢＥＩＩａが低下しているコムギ穀粒（ＷＭ、系統８５．２ｃ、実施例２を参照されたい）、および同時に同一条件下で栽培された野生型コムギ（ＷＭＣ）である標準的アミロースレベルのコムギであった。粉砕ＷＭ穀粒が、実施例１の標準法による測定で約８０％のアミロースを含有したのに対し、粉砕ＷＭＣ穀粒は約２５％のアミロース含有量を有した。異なる比率のＷＭとＷＭＣのサンプルを粉砕種子材料から調製したが、さらなる精製はしなかった。およそ１７ｍｇのサンプルをアッセイで使用した。ＷＭおよびＷＭＣ混合物を正確に秤量して、１．５ｍｌ微量遠心管に入れた。サンプル中のデンプンを可溶化するために、１７ｍｇのサンプルあたり１ｍｌのＤＭＳＯを添加して、次に時々ボルテックスして、混合物を９５℃の水浴内で９０分間加熱した。各混合物からの１０μｌのアリコートを１．９８ｍｌの水に添加して、１０μｌの０．０１Ｎ　ＮａＯＨ溶液中の０．３％I_2＋３％ＫＩで処理した。各混合物の吸光度を６０５ｎｍで測定し、標準曲線を使用して吸光度値をアミロース百分率に変換した。アミロース比０％～１００％のトウモロコシアミロペクチン（Ｓｉｇｍａ、カタログ番号Ａ７７８０）およびジャガイモアミロース（Ｓｉｇｍａ、Ａ０５１２）を使用し、粉砕コムギサンプルと同様に処理して標準曲線を作成した。

【０３７９】

結果は、ＷＭ組み込みレベルと見かけのアミロース含有量の間の直線関係を示し、ＮＩＲＳ較正のために簡易化ヨウ素滴定法を使用し得て、この目的でデンプン精製が必要でなかったことが示された。

【０３８０】

半切種子中の見かけのアミロース含有量を測定するための生化学的参照法の試験

この試験では、ＡｒｉｚｏｎａおよびＷａｓｈｉｎｇｔｏｎで行われた野外実験から得られたＷＭおよびＷＭＣ（対照）系統からの種子を使用した。全部で４７個の胚除去半切種子を１．５ｍｌ微量遠心管に個々に入れて、それぞれに０．６ｍｌのＤＭＳＯを添加する前に正確に秤量した。管を９５℃の水浴内で２０分間インキュベートし、その後、ガラス棒を使用して、サンプルを管の中で粉砕した。各混合物の体積を１７ｍｇのサンプルあたり１ｍｌにＤＭＳＯで正確に調節し、その後、時々ボルテックスして、管を水浴内で９５℃でさらに７０分間インキュベートした。前述同様に、各混合物の１０μｌのアリコートを取り出して、それらを１０μｌの０．０１Ｎ　ＮａＯＨ溶液中の０．３％I_2＋３％ＫＩで処理し、H_2Oで２ｍｌに希釈して、見かけのアミロースを測定した。上述したように、各サンプルの吸光度を６０５ｎｍで測定し、標準曲線を使用して、吸光度値を「見かけのアミロース」百分率に変換した。

【０３８１】

この方法を使用して、ＷＭ種子の見かけのアミロース含有量が２０％～４１％（平均２７％）の範囲であったのに対し、ＷＭＣ種子の見かけのアミロース含有量は、７．５％～１７％（平均１１．４％）の範囲であった。これらの値が、実施例１の方法によって測定

されたアミロース含有量よりもはるかに低い理由については上述した。したがってこの簡易法は、高アミロースがある種子を野生型アミロース含有量の種子から区別できるようにした。

【０３８２】

ＮＩＲＳ較正

ＷＭおよびＷＭＣ種子上の単一種子ＮＩＲＳスキャンは、Ｍｕｌｔｉ Ｐｕｒｐｏｓｅ Ａｎａｌｙｓｅｒ（ＭＰＡ）ＮＩＲＳ分光計（Ｂｒｕｋｅｒ Ｏｐｔｉｃｓ，Ｆ－７７４２０Ｃｈａｍｐｓ Ｓｕｒ Ｍａｒｎｅｓ，Ｆｒａｎｃｅ）を使用して得られた。各種子をアルミニウムホイルで覆ったガラス管の底に入れ、２回スキャンした。ファイバープローブを装着したＢｒｕｋｅｒ ＭＰＡ Ｍｕｌｔｉ－Ｐｕｒｐｏｓｅ－Ａｎａｌｙｓｅｒ ｓｐｅｃｔｒｏｍｅｔｅｒ（Ｂｒｕｋｅｒ Ｏｐｔｉｃｓ）を使用して、スペクトルを記録した。１６ｃｍ$^{-1}$の分解能で４０００～１２，５００ｃｍ$^{-1}$の範囲にわたる、３２個の参照スキャンおよび１６個のサンプルスキャンを使用してスペクトルを記録し、１１００個のデータ点がもたらされた。使用された光ファイバープローブは、固体用ＩＮ２６１プローブであった。

【０３８３】

見かけのアミロースレベルとＮＩＲ読み取り間の相関を判定するために、６～４４％の範囲にわたる見かけのアミロース含有量がある、２２６の個々のＷＭまたはＷＭＣ種子を分析した。最初に、各種子について二連でＮＩＲＳスペクトルを得て、その後上述の方法に従って、各種子について、見かけのアミロース含有量を生物化学的に測定した。全データセットのスペクトルと比較して、スペクトル外れ値（６サンプル）を異常なスペクトルとして同定し、除外した残りのスペクトルをＮｏｒｍａｌｉｓａｔｉｏｎ Ｍｉｎ－ｍａｘ ｐｒｅ－ｔｒｅａｔｍｅｎｔで分析した。完全（ワンアウト）交雑検証があるＰａｒｔｉａｌ Ｌｅａｓｔ Ｓｑｕａｒｅソフトウェアを使用して、モデルを作成した。モデル開発のために使用されたスペクトルウインドウは、９８２７～７１５０ｃｍ$^{-1}$および６２７１～４４８１ｃｍ$^{-1}$であった。較正を開発するのに使用されたＰＬＳ要素数は、１４であった。較正モデルの正確度は、交雑検証（ＳＥＣＶ）の標準誤差および決定係数（Ｒ^{2}）で表された。キャリブレーションの効率は、セットの参照データの標準偏差に対する予測の標準誤差の比率（ｒａｔｉｏｎ）（ＲＭＳＥＣＶ）であるＲＰＤによって示された。

【０３８４】

生化学的データとＮＩＲスペクトルデータの間に正相関（Ｒ^{2}＝０．７０２）が得られた（図１５）。モデルは、高アミロースコムギ種子を標準的アミロースコムギ種子から区別するのに十分頑強でありながら、なおもあらゆる１個の種子中でアミロース含有量を正確に測定するのに十分正確であると結論付けられた。したがって方法は、高アミロース表現型がある穀粒を濃縮するために、非常に多数の種子集団をスクリーニングできる。これは次のように検証された。

【０３８５】

ＮＩＲＳ検証

高アミロース穀粒と対照穀粒の識別におけるＮＩＲ法を検証するために、さらに６０個のＷＭ種子と３４個のＷＭＣ種子をＮＩＲで２回スキャンして、計算される見かけのアミロース含有量を予測した。このように測定された見かけのアミロース値がＷＭおよびＷＭＣ集団の分布形状を獲得するようにプロットされると、２つの群がわずかな重なりを持ってほとんどは分離されることが分かる（図１６）。これらの結果によれば、ＮＩＲＳによる判定で３０％以上の予測された見かけのアミロース表現型を有する種子は、高アミロース種子の良好な候補と見なし得た。

【０３８６】

コムギ交雑からのＦ２種子のＮＩＲＳスクリーニング

ＮＩＲＳスクリーニングを実施して、高アミロース含有量を有する変異体種子を検出した。スクリーニングでは、２１．１４２（Ｂ２）／Ｔｙｐｅ Ｉ－２０２５７（Ａ１）［

０８／ｈ－１１１］／／Ｔｙｐｅ　Ｉ－１９．８３２（Ｄ１）／ＣＨＡＲＡおよび５．７０６（Ｄ２）／２１．６６８（Ｂ２）／／２０．２５７（Ａ１）／ＣＨＡＲＡである、Ｍ８０およびＭ８５の２つの異なる交雑種からの２，７００個のＦ２種子を使用した。したがってスクリーニングは、それぞれＡ１Ｂ２Ｄ１またはＡ１Ｂ２Ｄ２遺伝子型がある種子を同定することを目的とした。上述したように、種子あたり２回のＮＩＲＳスペクトルを記録した。

【０３８７】

二連のスクリーニングの少なくとも１つにおいて、３４％を超える予測された見かけのアミロース値を与えた種子をさらなる分析のために最初に選択した。２，７００個の種子から２７個の種子が選択され、次に光学顕微鏡によって評価されて、デンプン顆粒形態が判定された。各種子を注意深く掻き取って胚を保存しながら、なおも十分な内胚乳検査材料を獲得した。２７個の内４個の種子が、歪んだデンプン顆粒形態を有することが観察された。これらの４個の種子は、ＮＩＲスクリーニングから、期せずして最大の予測された見かけのアミロース含有量を有し、これらの種子だけにおいて、予測されたアミロース値と見かけのアミロース値の双方が３０％を超えた。他の２３個の種子は、標準的（野生型）顆粒形態を示した。

【０３８８】

ＮＩＲＳスクリーニングによって選択された種子上の分子データ

４個の種子上でＰＣＲ分析を実施して、それぞれのＳＢＥＩＩａ遺伝子型を判定した。最初のアッセイは、３個のゲノム上で各ＳＢＥＩＩａ遺伝子の存在または不在を示す、優勢ＰＣＲマーカーを使用した。種子の３個は二重ヌル変異株であることが示された一方で、４個目の種子は推定上の三重ヌル変異株であった。しかし共優勢ＰＣＲマーカー（下記参照）でさらに試験すると、４個の種子は全て、ＳＢＥＩＩａの二重ヌル変異株（すなわち２個のゲノム中にＳＢＥＩＩａを欠く）であり、第３のゲノム上の変異ＳＢＥＩＩａ遺伝子について異型接合体であることが示された。したがってこれらの種子は、５個の変異ＳＢＥＩＩａ対立遺伝子、および少なくとも２個の変異ＳＢＥＩＩｂ対立遺伝子を含有した。

【０３８９】

各種子からの胚を発芽条件下に置くと、恐らくそれらは非常に損傷を受けており、または変異の組み合わせが非常に有害であったために、それらの中で成功裏に発芽したものはなかった。

【０３９０】

より多くの候補の同定を試みるために、あまり厳しくない候補種子選択により、Ｍ８０およびＭ８５交雑種からのさらに多数のＦ２子孫種子上で、さらなるＮＩＲＳスクリーニングを実施した。第２のスクリーニングのための選択基準は、予測された見かけのアミロース値の１つが３０％を超えて、第２の値が少なくとも２３％でなくてはならないことであった。光学顕微鏡によるデンプン顆粒評価のために、２２個の種子の新しいセットを選択した。これらの２２の候補の内、１個の種子ＢＤ８５；９Ｆ０８（Ｐ２７９－Ｆ０８－８３４）は、歪んだデンプン顆粒表現型を示した。この変異株はＰＣＲによってさらに分析され、ＡおよびＢゲノム上の二重ヌルＳＢＥＩＩａ変異体であり、Ｄゲノム上の変異ＳＢＥＩＩａ遺伝子について異型接合であることが示された。これは増殖のために成功裏に発芽した。

【０３９１】

実施例１１：点変異を有するデンプン分枝酵素の対立遺伝子の検出

化学的変異原アジ化ナトリウムまたはＥＭＳを用いた処理によって生成された、変異誘発コムギ穀粒の集団をスクリーニングして、ＳＢＥＩＩａ遺伝子に点変異を有する変異株を同定した。このスクリーニングは、野生型コムギと比較してＳＢＥＩＩａ－Ａ、－Ｂまたは－Ｄ活性、またはＳＢＥＩＩｂ－Ａ、－Ｂまたは－Ｄ活性が減少したが消失していない変異株（部分的変異株）と並び、対応する遺伝子中の変異によりＳＢＥＩＩａ－Ａ、－Ｂまたは－Ｄ活性、またはＳＢＥＩＩｂ－Ａ、－Ｂまたは－Ｄ活性の１つを完全に欠く変

異株を検出すると期待された。変株異のスクリーニング法は、ＳＢＥＩＩａまたはＳＢＥＩＩｂに対して特異的な抗体と共にウエスタンブロット法を使用して（実施例２を参照されたい）、または次のような親和性ベースの技術によって、ＳＢＥＩＩａまたはＳＢＥＩＩｂタンパク質量を測定することに基づいた。

【０３９２】

グリコーゲン、アミロペクチン、アミロースまたはβ－限界デキストリンを含有するポリアクリルアミドマトリックスを通過する、デンプン分枝酵素を含む穀粒からのタンパク質抽出物の親和性（非変性）ゲル電気泳動は、デンプン結合能力が変化したＳＢＥＩＩａまたはＳＢＥＩＩｂをコードするＳＢＥＩＩａまたはＳＢＥＩＩｂの対立遺伝子、またはＳＢＥＩＩａまたはＳＢＥＩＩｂアイソフォームの１つを失ったものを同定する方法を提供した。デンプン分枝酵素の活性部位がデンプン結合部位を含有したことを考えると、結合効率が変化したＳＢＥＩＩポリペプチドは、触媒の速度および／または親和性が恐らく変化した。特に、結合効率が低下したポリペプチドは、ＳＢＥＩＩ活性が低下するまたはＳＢＥＩＩ活性を失うと予測される。

【０３９３】

いくらかの修正を加えて、Ｍｏｒｅｌｌ　ｅｔ　ａｌ．，（１９９７）；およびＫｏｓａｒ－Ｈａｓｈｅｍｉ　ｅｔ　ａｌ．，（２００６）に基づいて、以下の方法を使用した。

【０３９４】

タンパク質の調製

５ｍＭのＥＤＴＡ、５ｍＭのＤＴＴ、０．４％プロテアーゼ阻害剤カクテル、および２０％グリセロールを含有する、５０ｍＭのリン酸緩衝液、ｐＨ７．５中で、発生中の種子（開花後約１５日）からの単離内胚乳を均質化し、可溶性タンパク質を抽出した。１４，０００ｇで１０分間の遠心分離後、上清をゲル電気泳動のために使用した。抽出物中のタンパク質濃度をＣｏｏｍａｓｓｉｅ　Ｐｌｕｓ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ａｓｓａｙ　Ｒｅａｇｅｎｔを使用して推定した。

【０３９５】

親和性電気泳動

ＳＢＥＩＩａタンパク質イソ型分離のための二次元（２Ｄ）親和性電気泳動技術において、Ｈｏｅｆｅｒ　ＳＥ６００垂直１６ｃｍスラブゲルユニット中に流し込まれた非変性ポリアクリルアミドゲルである第１次元のゲルに、タンパク質抽出物のアリコート（４０または１００μｇ）を装入した。第２次元ゲルの分離用成分は、ゲル構造内に固定化された、適量の多糖類標的（アミロペクチン、β－限界デキストリンまたはグリコーゲン）が添加された１０％グリセロールを含有する、６％非変性ゲル（１４×１６ｃｍまたは１６×１６ｃｍ、１．５ｍｍ厚さ）であった。濃縮用ゲル（多糖類を含まない）をガラスプレートフォーミングの上部から１ｃｍに注ぎ込んで、コームを使用してウェルを形成した。ゲルを一晩４℃、定常電圧（グリコーゲンおよびβ－限界デキストリンでは１００Ｖ、アミロペクチン含有ゲルでは１３５Ｖ）で泳動した。

【０３９６】

代案としては、一次元形を使用して、タンパク質抽出物（２０μｇ）を非変性ポリアクリルアミドゲルに装入して、ＳＢＥＩＩａタンパク質を分離した。ゲルの分離用成分が、ゲル構造内に固定化された、０．１５％のβ限界デキストリンを添加した１０％グリセロールを含有する、６％非変性ゲルであった一方、濃縮用ゲルは多糖類を含まなかった。ゲルを４℃で、ゲルあたり２０ｍＡの定電流、および最大電圧２００Ｖで泳動した。

【０３９７】

ＳＢＥＩＩｂタンパク質は、ビス－トリス４～１２％勾配ゲル（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）上で分離できる。ゲルを４℃で、ゲルあたり２０ｍＡの定電流、および最大電圧２００Ｖで泳動する。

【０３９８】

免疫学的検出

電気泳動に続くＳＢＥＩＩタンパク質の免疫化学的検出のために、ＴＥ　７０　ＰＷＲ半乾燥移動ユニット（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用して、タンパク質をゲルからニトロセルロース膜に移した。転写バッファーは、３９ｍＭグリシン、４８ｍＭトリス、０．０３７５％ＳＤＳ、および２０％メタノールを含有した。移動は、０．８ｍＡ／ｃｍ^{2}の定電流で１～１．５時間実施した。コムギＳＢＥＩＩａに対して特異的な一次ウサギポリクローナル抗体を使用するウエスタンブロット法に先だって、膜を５％脱脂乳でブロックした。

【０３９９】

一次元親和性ゲル電気泳動方法によって分析すると、コムギＡ、Ｂ、およびＤゲノムからの同祖対立遺伝子によってコードされるＳＢＥＩＩイソ型の移動パターンは、異なるコムギ変種間で相違を示した。いくつかの変種では、Ａ、Ｂ、およびＤ同祖形態の明確な分離が可能であり、これらの変種からの変異誘発集団における多形性の単純なスコア付けを可能にした。例えば野生型コムギ変種ＳｕｎｓｔａｔｅおよびＮＢ１の内胚乳からのタンパク質抽出物の親和性ゲル電気泳動は、ＳＢＥＩＩａ－Ａ、－Ｂおよび－Ｄイソ型の明確な分離を示した。デンプン親和性が低下している分枝酵素ポリペプチドは、それぞれの固有の同祖対立遺伝子によりコードされたポリペプチドよりも、多糖類含有ポリアクリルアミドゲル内でより長距離移動した。同型接合状態にあるバンドの存在／不在によって、および異型接合体系統中のバンド強度を測定する濃度測定を通じて、特定の同祖対立遺伝子の発現が低下し、または発現が不在の対立遺伝子を含有する系統を同定した。この方法を検証するために、親和性ゲル電気泳動によって、遺伝子型分析によって同定されたＳＢＥＩＩａ－およびＳＢＥＩＩｂ－変異体植物（実施例６）が、それらの遺伝子型に一致して、特異的ＳＢＥＩＩａまたはＳＢＥＩＩｂタンパク質を欠くことを確認した。これらの実験は、ＳＢＥＩＩイソ型の量または活性が低下した変異株の検出について、このタンパク質分析法を検証した。

【０４００】

Ｚｗａｒ　ａｎｄ　Ｃｈａｎｄｌｅｒ（１９９５）に記載されるようにアジ化ナトリウムで処理された、コムギＳｕｎｓｔａｔｅ変種の２１００の変異誘発系統の集団が、β－限界デキストリン親和性ゲル電気泳動を使用してスクリーニングされ、親和性ゲル上におけるＳＢＥＩＩａタンパク質の１つの変化した運動性（親和性変異株）、または、遺伝子によってコードされる検出可能なタンパク質が無いことを踏まえると、ＳＢＥＩＩａタンパク質の１つが失われていて、したがって遺伝子の１つに関してヌル変異株であるもののいずれかを有する、１８の変異株が同定された。親和性変異株の１つにおける各ＳＢＥＩＩａイソ型のデンプン－酵素相互作用の解離定数（Ｋｄ）は、Ｋｏｓａｒ－Ｈａｓｈｅｍｉ　ｅｔ　ａｌ．，２００６で記載されるように、１－Ｄ親和性ゲル内のβ－限界デキストリン濃度の関数として、酵素運動性の変化を測定して計算された。７－２５と名付けられた親和性変異株は、ＳＢＥＩＩａ－Ａ、ＳＢＥＩＩａ－Ｂ、およびＳＢＥＩＩａ－Ｄイソ型のそれぞれに対して、Ｋｄ値が０．５３ｇ／ｌ、０．５２ｇ／ｌ、および１．６９ｇ／ｌであるＳＢＥＩＩａタンパク質を有した（図１３）。Ｄイソ型で観察された、ＡおよびＢイソ型と比較してより高いＫｄ値は、デンプン結合に対するこのイソ型のより低い親和性を示し、この系統がＳＢＥＩＩａ－Ｄ遺伝子の親和性変異体であることを示唆した。この系統のＤゲノムイソ型（ＳＢＥＩＩａ－Ｄ）は、その他の２つのイソ型と比較して酵素活性がより低いが、活性は完全には喪失しないことが予測される。この予測は、ＳＢＥＩＩａ－ＡおよびＳＢＥＩＩａ－Ｂのヌル対立遺伝子存在下のＳＢＥＩＩ活性アッセイによって確認される。

【０４０１】

変異株植物はさらに、植物の生育中種子からのいくつかの内胚乳を分析することで確認した。これらＭ３内胚乳はＭ２植物から単離し、ＳＢＥＩＩａタンパク質をゲル電気泳動およびウエスタンブロット法で調べた（図１９）。植物中の変異株ＳＢＥＩＩａ遺伝子のヌクレオチド配列および推定したアミノ酸配列を、ゲノム特異的プライマーを用いてｃＤＮＡ配列を増幅し、コード領域をシーケンスすることで決定した。現在までに、１８変異

株のうち９個に特異的点変異を見出し、表１９に要約した通り、このうち２個がＡゲノム変異株、３個がＢゲノム変異株、４個がＤゲノム変異株である。残りの植物の各々の変異遺伝子は、免疫ブロット中の特定のポリペプチドバンドが無いことで判断した。いくつかの系統において、ポリペプチドの帰属を、さらに非変性親和性ゲルを第２の次元ゲルとして２次元ゲルを流すことで確認した。これら変異株を、２つの群、すなわち、（ａ）内胚乳が免疫ブロット中でＳＢＥＩＩａバンドを２個のみ示し、消失したバンドが変異したゲノムＡ，ＢまたはＤを表すヌル変異株（表１９でヌルを意味する「ｎ」と表記）および（ｂ）免疫ブロット中で３個のバンドを示し、デンプンへの親和性が変化したことによりポリペプチドの１つが異なって野生型へ移動する親和性変異株（ｐａｒｔｉａｌを意味するｐと表記）に分類した。

【０４０２】

共優性ＰＣＲに基づく遺伝子マーカーを、変異株系統のうち６－６０，７－２５，１５－３Ｄおよび１６－９Ｃと名付けた４個について開発した。系統６－６０中のエクソン６／７スプライスジャンクションでのＧからＡ点変異により、Ｆｏｋ１制限部位が消失した。この違いを利用して、プライマーペアＡＲ２ａＢＩ６Ｆ２（５’－ＣＡＴＴＴＴＴＴＧＧＴＡＧＡＡＣＣＴＴＴＧ－３’；配列番号１５２）およびＡＲ２ａＢＩ７Ｒ（５’－ＡＴＣＣＡＴＣＣＧＴＡＴＣＴＡＧＡＡＡＡＴ－３’；配列番号１５３）を用いたエクソン６－７領域のＰＣＲ増幅をともなう、共優性切断可能多型配列（ＣＡＰｓ）マーカーを作製し、産物を制限酵素Ｆｏｋ１により消化した。これにより、ゲル電気泳動で見られた通り、系統６－６０から約２４５ｂｐ、野生型（Ｓｕｎｓｔａｔｅ）から約１３８ｂｐのＤＮＡ断片を得た。野生型および系統７－２５からのＳＢＥＩＩａ－Ｄのエクソン２１／２２領域のヌクレオチド配列から、制限酵素地図を作成した。この違いを利用して、７－２５についてＣＡＰＳマーカーを作製した。エクソン２１／２２領域のＰＣＲ増幅を、プライマーペアＡＲ２ａＤｅｘ２１＿２２Ｆ（５’－ＣＴＧＴＴＧＴＡＧＣＣＡＴＡＧＧＡＡＧＧ－３’；配列番号１５４）およびＡＲ２ａｅｘ２１＿２２Ｒ（５’－ＧＡＧＣＧＣＴＣＡＣＣＡＡＣＡＡＧＣＴＡＣＣ－３’；配列番号１５５）を用いて行った。ＰＣＲ産物を制限酵素Ｍｌｙ１で消化した結果、変異株系統７－２５からおよそ２２９ｂｐの断片、および野生型から１４１ｂｐ断片となった。野生型および系統１５－３Ｄからの ＳＢＥＩＩａ－Ｄ遺伝子のエクソン１５領域のヌクレオチド配列から制限酵素地図を作成したところ、１５－３Ｄ中のＧからＡ多型によるＨｐｙｌ８８ＩＩＩの制限部位の欠失が明らかになった。エクソン１５領域のＰＣＲ増幅を、プライマーＡＲ２ａＥ１５Ｆ０７（５’－ＧＴＣＡＧＴＧＧＡＡＴＧＣＣＴＡＣＡＴＴＴＴＧＣ－３’；配列番号１５６）およびＡＲ２ａＥ１５Ｒ０７（５’－ＧＴＣＡＧＴＧＧＡＡＴＧＣＣＴＡＣＡＴＴＴＴＧＣ－３’；配列番号１５７）を用いて行った。ＰＣＲ産物を制限酵素Ｈｐｙｌ８８ＩＩＩで消化した結果、変異株１５－３Ｄからおよそ１０５ｂｐの断片、および野生型から６３ｂｐ断片となった。野生型および系統１６－９ＣからのＳＢＥＩＩａ－Ｄのエクソン１７から２０領域のヌクレオチド配列から制限酵素地図を作成したところ、１６－９Ｃ中のＣからＴ多型によるＢｓｅＲ１の制限部位の欠失が明らかになった。エクソン１７から２０領域のＰＣＲ増幅を，プライマーＡＲ２ａＤｅｘ１７＿２０Ｆ（５’－ＧＧＡＧＡＴＡＴＧＣＴＴＡＧＴＡＡＣＡＧ－３’；配列番号１５８）およびＡＲ２ａＤｅｘ１７＿２０Ｒ（５’ ＧＣＴＧＴＴＡＡＧＡＡＣＡＡＣＣＴＴＣＣ－３’；配列番号１５９）を用いて行った。ＰＣＲ産物を制限酵素ＢｓｅＲ１で消化した結果、変異株系統１６－９Ｃからおよそ１５２９ｂｐの断片、および野生型からサイズが約１１５９ｂｐおよび３７０ｂｐの２つのバンドとなった。

【０４０３】

次に、アジ化ナトリウムで変異導入したＳｕｎｓｔａｔｅ群から同定したＳＢＥＩＩａ一重変異株を、２つのゲノムからのＳＢＥＩＩａ活性および３番目のゲノムからの活性を全体的にまたは部分的に欠く三重変異株を単離するために、以前に同定したＨＩＢ二重ヌル変異株と交雑した。３つの群の交雑を行った。１番目の群では、Ａ１Ｂ２Ｄ２遺伝子型の変異株を単離するために４回の交雑、Ａ２Ｂ２Ｄ２およびＡ２Ｂ２Ｄ１遺伝子型を単離

するためにそれぞれ２回の交雑、Ａ１Ｂ２Ｄ１遺伝子型を単離するために１回の交雑を行った。２番目の群では、Ａ２Ｂ２Ｄ２遺伝子型の三重ヌル変異株作製のために２回の交雑、Ａ１Ｂ２Ｄ２，Ａ１Ｂ１Ｄ２およびＡ２Ｂ１Ｄ２遺伝子型の作製のためにそれぞれ１回の交雑を行った。３番目の群では、Ａ２Ｂ１Ｄ２，Ａ２Ｂ２Ｄ１およびＡ１Ｂ１Ｄ２遺伝子型の生産のためにそれぞれ４回の交雑、Ａ２Ｂ２Ｄ２遺伝子型のために１０回の交雑、Ａ１Ｂ２Ｄ２遺伝子型のために６回の交雑、Ａ１Ｂ２Ｄ１遺伝子型のために２回の交雑を行った。得られたＦ１植物を自家交雑してＦ２内胚乳を生産した。

【０４０４】

Ｆ２内胚乳からのデンプン顆粒を、顆粒形態の変化を見るために光学顕微鏡で調べた。高アミロース（少なくとも７０％アミロースのレベル）を有する穀粒で見られる種子と同様に、ひどく歪んだデンプン顆粒を呈するＦ２種子を同定した。第１群における個々の交雑の結果は、以下に示す通りである。

【０４０５】

交雑７－２５（Ｄ２）Ｘ　０８／ｈ－９２（Ａ１Ｂ２）、ＣＳ３と命名。Ｆ２種子１９２個のスクリーニングから、デンプン顆粒の形態がさまざまな程度に変化した種子１９個を同定した。これらの種子は発芽し、できた植物の葉サンプルからＤＮＡを抽出した。選択した植物１９個からのＤＮＡについてＰＣＲを行って、（１）親７－２５（上記）由来のＤゲノム中の点変異を検出するために、Ｍｌｙ１により消化した、ＣＡＰＳ共優性マーカーＡＲ２ａＤｅｘ２１＿２２ＦおよびＡＲ２ａｅｘ２１＿２２Ｒを検出し、および（２）０８／－Ｈ－９２親系統由来のＡおよびＢゲノム中のＳＢＥＩＩａ欠失を検出するために、ＡＲ２ａＩ１３ゲノムＦ２およびＡＲ２ａＩ１３ゲノムＲ２プライマーを検出した。試した１９系統のうち、Ｃ３，Ｃ１０，Ａ２およびＦ９と名付けた４つの植物が、７－２５親由来のＳＢＥＩＩａ－Ｄ中の点変異について同型接合であり、ＳＢＥＩＩａ－ＡおよびＳＢＥＩＩａ－Ｂ由来の断片を明らかに失っているので欠失同型遺伝子について同型接合である。このことは、これらの植物が三重ヌル遺伝子型であることを示す。Ｃ３，Ｃ１０，Ａ２およびＦ９植物の各々からの４個の生育中種子のＳＢＥＩＩａタンパク質の発現をゲル電気泳動およびウエスタンブロット法により分析した。結果から、これらの植物全てがＳＢＥＩＩａ遺伝子について同型接合三重ヌル変異株であると確認した。

【０４０６】

交雑６－６０（Ｂ２）Ｘ　０８／ｉ－Ｇ３（Ａ１Ｄ２）、ＣＳ２と命名。全部で２８８個のＦ２種子をスクリーニングして、この交雑から、Ｆ１１，Ｄ８，Ｅ６およびＥ１１と名付けられた４個の三重ヌル種子を同定した。これらの種子から生産した植物のうち、Ｆ１１およびＤ８が三重ヌル遺伝子型であることを確認した。Ｆ１１およびＥ６種子から生産した植物は正常な生長および生育を示し、植物Ｅ１１は幼植物の段階で死滅し、植物Ｄ８には開花時期が遅れる表現型があった。植物Ｆ１１およびＥ６は、４個の内胚乳のそれぞれがＳＢＥＩＩａ発現を欠くことから、ＳＢＥＩＩａの同型接合三重ヌル変異株であると確認した。この交雑ＣＳ２－Ｃ６からの異型接合系統からのＦ３種子１０個を分析した結果、ＳＢＥＩＩａ発現の欠損について同型接合であると確認した，１個の三重ヌル種子ＣＳ２－Ｃ６．４を同定した。

【０４０７】

交雑０８／ｂ－１８（Ａ１Ｄ１）Ｘ　６－６０（Ｂ２）、ＣＳ１と命名。Ｆ２種子１９２個を顕微鏡で、２８８個をＰＣＲでスクリーニングした結果、同型接合の三重ヌルは同定できなかった。しかし、異型接合系統と確認できた１個であるＡ１Ｂ２ｈｅｔＤ１－Ｇ１２は、ＳＢＥＩＩａ－Ａおよび－Ｂ遺伝子について同型接合二重ヌルであり、ＳＢＥＩＩａ－Ｄ変異対立遺伝子について異型接合であり、生長することができた。Ｆ３生長中種子から胚を単離し、栽培して植物およびＳＢＥＩＩａポリペプチドの型が既知の対応する内胚乳を生産した。分析した種子２９個のうち、ゲル電気泳動およびウエスタンブロット法により、５個が三重ヌル遺伝子型を有することを見出した。これら５個のＣＳ１三重ヌル系統のうち、４個だけが結実まで生き延びた。これら４個のうち、１個の系統ＣＳ１－Ｇ１２／１５のみが他のＣＳ１系統と比較して結実が良好であると見受けられた。これら

親世代変異株系統から作られたＡ１Ｄ１Ｂ２三重ヌル同型接合植物は、繁殖性が低下したと見受けられ、これはおそらく２番目の変異にともなうリンケージドラッグによると考えられる。非遺伝子組み換え系統と戻し交雑。

【０４０８】

第２群のなかで、ＣＳ１０と名付けた０８／ｍｍ－Ｍ７－Ｅ１１（Ａ２Ｄ２）　Ｘ　６－６０（Ｂ２）交雑からのＦ２種子２８８個のスクリーニングから、ＣＳ１０－Ｃ１２と名付けたＡ２Ｂ２Ｄ２遺伝子型の三重同型接合ヌル種子を１個を同定した。すなわち、この遺伝子型は３個のＳＢＥＩＩａ遺伝子についてヌルであり、３個のＳＢＥＩＩｂ遺伝子について野生型である。光学顕微鏡による分析から、ＣＳ１０－Ｃ１２種子中に歪んだデンプン顆粒が存在し、これはアミロースレベルが相当高くなっていることを示す。この種子を播き、ガラスハウス内で植物を生産した。植物ＤＮＡから、この植物が三重ヌルＳＢＥＩＩａおよび野生型ＳＢＥＩＩｂ遺伝子型であることを確認した。Ｆ３種子のデンプン中のアミロース含有量を測定した。

【０４０９】

他の交雑からのＦ２種子も同じ要領で調べられた。

【０４１０】

２つの三重ヌル系統、ＣＳ３－Ａ２（０８／ｈ－９２（Ａ１Ｂ２）Ｘ７－２５（Ｄ２））およびＣＳ２－Ｆ１１（０８／ｉ－Ｇ３（Ａ１Ｄ２）Ｘ６－６０（Ｂ２））の穀粒デンプン中のアミロース含有量を最初はヨウ素定量法で分析した。結果を表２０に掲げ、陽性コントロールとしてのＳＢＥＩＩａ抑制ＲＮＡｉ系統、野生型としてのＳｕｎｓｔａｔｅおよびＮＢ１と比較した。ＣＳ３－Ａ２系統の穀粒デンプンのアミロース含有量は６９．５％であり、ＣＳ２－Ｆ１１は８５．３％であった。比較すると、野生型穀粒のアミロースレベルが約３２．９％で、ＲＮＡｉ　ＳＢＥＩＩａ系統８５．２ｃは７２．２％から７５．１％の範囲となった。ＣＳ１，ＣＳ２およびＣＳ３の特性を比較するために、アミロース含有量をさらにヨウ素定量法で分析し、データを表２１に掲げた。ＣＳ１およびＣＳ２系統の両方が８０％よりも高いアミロース含有量を示して８０－８６％の範囲にあるのに対し、ＣＳ３系統はアミロース含有量が約６７％から７０％となった。Ａ２Ｂ２Ｄ２三重ヌル系統ＣＳ１０－Ｃ１２を含む３回目のアミロース分析を行い、その結果を表２２に示す。ＣＳ１およびＣＳ２三重ヌル系統が７４％から８４％の範囲にあったのに対し、ＣＳ１０－Ｃ１２はアミロース含有量６７．４％を示し、ＣＳ３系統で見られた範囲に及ばなかった。Ａ１単一ヌル系統の値が３９．５％であったのに対し、Ａ１Ｂ２二重系統はこのアッセイで５０．４％から５３．６％の範囲にあった。

【０４１１】

これらの種子から生産した植物の生長および発生を観察した。三重ヌルＳＢＥＩＩａ植物の予備的農学的特性を表２３に要約した。三重ヌル系統から得た個々の種子の平均重量は３４．２から４６．５ｇの範囲にあった。植物あたりの種子の全個数は１５から２５４の範囲にあった。ＣＳ２およびＣ３の三重ヌル系統は、コントロール植物と比較して繁殖性の有意な損失を呈しなかった。４つのＣＳ１三重ヌル系統のうち３つで相当の不稔性が見られた。これらの植物の種子形態の検査により、種子は明確には縮んでいないことが明らかになった。ＣＳ３－Ａ２系統からの三重ヌル植物の種子は、ＣＳ３，ＣＳ２およびＣＳ１系統からの他の三重ヌル系統の種子と比較して、白っぽい外見を有していた。

【０４１２】

ＣＳ２＿Ｆ９およびＣＳ３－Ａ２三重ヌル系統の穀粒から単離したデンプンについて、イソアミラーゼ分岐除去デンプンの鎖長分布をキャピラリー電気泳動により調べた。野生型（Ｓｕｎｓｔａｔｅ）について得た値から変異株のものを差し引いてある差プロットから、三重ヌル系統のプロフィールがＲＮＡｉ　ＳＢＥＩＩａ系統８５．２ｃのものと非常に似ており、ＤＰ９から１５の長さを有する鎖の比率が有意に減少し、ＤＰ１７－１９およびＤＰ＞２６である長鎖の比率が増大した。ＣＳ２－Ｆ１１系統では、ＤＰ９－１５である短鎖の比率の差がＣＳ３－Ａ２および８５．２ｃよりも目立っていた。ＣＳ２－Ｆ１１でも、ＤＰ６－７である超短鎖で有意な増加があった。

【０４１３】
また親和性単一変異株間で８回の交雑を実施して、ＳＢＥＩＩａの親和性二重変異株を生成した。これはＡ２Ｂ２、Ａ２Ｄ２、およびＢ２Ｄ２二重親和性変異株を単離する目的で生成された交雑種を含んだ。Ｆ２子孫を上述の方法によって分析し、二重同型接合親和性変異株を同定した。
【０４１４】
実施例１２：高アミロースコムギ穀粒からのデンプン顆粒およびデンプンの特性
デンプン顆粒の形態および複屈折の変化
実施例２に記載される遺伝子組換え高アミロースコムギ中で、デンプンおよびデンプン顆粒の特性を調べた。走査型電子顕微鏡を使用して、デンプン顆粒サイズおよび構造の全体的変化を同定した。ＳＢＥＩＩａ発現が低下している内胚乳からのデンプン顆粒は、非形質転対照と比較して著しい形態学的変化を示した。それらは形が高度に不規則であり、Ａ顆粒（＞１０μｍ径）の多くは鎌形のようであった。対照的に、ＳＢＥＩＩｂ発現が低下しＳＢＥＩＩａ発現が無変化の内胚乳からのＡおよびＢ（＜１０μｍ径）デンプン顆粒は、どちらも表面が滑らかで形状が球状または楕円体であり、野生型コムギデンプン顆粒と識別不能であった。
【０４１５】
偏光下で顕微鏡的に観察すると、野生型デンプン顆粒は、典型的に強力な複屈折パターンを示す。しかし、高アミロースデンプン含有顆粒では、複屈折は大幅に低下した。ＳＢＥＩＩａ発現が低下してアミロース含有量が７０％～８０％の系統からのデンプン顆粒を偏光下で視覚化すると、１０％未満が複屈折性であった。ＳＢＥＩＩｂ発現が本質的にないが野生型ＳＢＥＩＩａ発現のある系統では、非形質転換対照と比較して、複屈折の変化は観察されなかった。野生型およびＳＢＥＩＩｂ抑制系統のどちらも、デンプン顆粒のおよそ９４％が完全な複屈折を示した。データを表２４に記載する。したがって複屈折喪失は、高アミロース含有量と密な相関性がある。
【０４１６】
遺伝子組換えコムギ穀粒のアミロース含有量
２つの独立した方法、すなわちヨウ素滴定法およびサイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）法によって、遺伝子組換えコムギ穀粒のアミロース含有量をアッセイした。アミロース含有量のヨウ素滴定測定は、実施例１記載されるように、既知の濃度精製ジャガイモアミロースおよびアミロペクチンを使用して作成される標準曲線に関連して、ヨウ素がα－１，４グルカンの直鎖領域に結合する際に誘発される色変化の測定に基づいていた。サイズ排除クロマトグラフィー法は、脱分枝されていないアミロースおよびアミロペクチンのカラムクロマトグラフィーによる分離と、それに続くカラムから溶出した画分中のデンプン濃度の測定に基づいていた。穀粒の３つの遺伝子型を分析した。１つ目は、ｈｐ－ＳＢＥＩＩａコンストラクトで形質転換されて、ＳＢＥＩＩａ発現レベルが非常に低い植物；２つ目は、ｈｐ－ＳＢＥＩＩｂコンストラクトを含有して、検出可能なＳＢＥＩＩｂ発現がないがＳＢＥＩＩａについて野生型である植物；３つ目は、非形質転換野生型対照（ＮＢ１）。ＳＢＥＩＩｂ発現を欠く植物（００８）からの穀粒は、アミロース含有量が、ヨウ素滴定法による測定で２７．３％であり、ＳＥＣ法では３２％であった。これは非形質転換対照系統ＮＢ１穀粒のアミロース含有量（ヨウ素滴定で３１．８％、ＳＥＣで２５．５％）と顕著に異ならない。しかしＳＢＥＩＩａ発現が低下している穀粒（０８７系統）では、アミロース含有量は顕著に上昇した（ヨウ素滴定で８８．５％、ＳＥＣで７４．４％）。０８７系統に関するこれらの２つの数値の差は、アミロースと良く似てヨウ素に結合し、ヨウ素滴定アッセイ中でアミロースとして測定されるが、カラムクロマトグラフィーではより大きいアミロペクチンと共に分離される、いくつかの「中間体物質」の存在であると考えられた。
【０４１７】
ＦＡＣＥによるデンプンの鎖長分布
イソアミラーゼ脱分枝デンプンの鎖長分布は、フルオロフォア支援炭水化物電気泳動（

ＦＡＣＥ）によって判定した。この技術は、ＤＰ１～５０の範囲内で、鎖長分布の高分解能分析を提供する。非形質転換対照の正規化鎖長分布が遺伝子組換え系の正規化分布から差し引かれるモル差プロット（ｍｏｌａｒ　ｄｉｆｆｅｒｅｎｃｅ　ｐｌｏｔ）から、ＳＢＥＩＩａ発現が低下した穀粒からのデンプンにおいて、ＤＰ６－１２の鎖長の比率の著しい低下と、ＤＰ１２を上回る対応する鎖長増大があったことが観察された。野生型と比較して、ｈｐ－ＳＢＥＩＩｂ系統からのデンプンの鎖長分布に、統計的に有意な変化は観察されなかった。

【０４１８】

アミロペクチンおよびアミロースの分子量

デンプンの分子量分布をサイズ排除－ＨＰＬＣ（ＳＥ－ＨＰＬＣ）によって測定した。ＨＰＬＣシステムは、Ａｕｔｏ　Ｓａｍｐｌｅｒ（ＧＢＣ、ＬＣ１６１０）および蒸発光散乱検出器（ＥＬＳＤ）（ＡＬＬＴｅｃｈ、Ｄｅｅｒｆｉｅｌｄ，ＵＳＡ）を装着した、ＧＢＣポンプ（ＬＣ　１１５０、ＧＢＣ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ，Ｖｉｃ，Ａｕｓｔｒａｌｉａ）から構成された。Ｕｌｔｒａｈｙｄｒｏｇｅｌ１０００カラム、Ｕｌｔｒａｈｙｄｒｏｇｅｌ２５０カラム、およびガードカラム（７．８ｍｍ×３００ｍｍ、Ｗａｔｅｒｓ，Ｊａｐａｎ）を使用して、ＨＰＬＣ操作中３５℃を保った。´酢酸アンモニウム緩衝液（０．０５Ｍ；ｐＨ５．２）を流速０．８ｍＬｍｉｎ$^{-1}$で移動相として使用した。

【０４１９】

ＳＢＥＩＩａ低減穀粒デンプン中のアミロペクチンの分子量は、ＮＢ１（野生型、非遺伝子組換え）およびＳＢＥＩＩｂ低下穀粒デンプン中のアミロペクチンよりも、はるかにより低いようであった（ピーク位置が４５５２３、４３６４６ｋＤａと対比して７１６６ｋＤａ）。対照的に、ＳＢＥＩＩｂ低下穀粒からのアミロースの分子量は、非形質転換変種ＮＢ１からの野生型穀粒と比較して、顕著に異ならなかった。データは表２５にある。

【０４２０】

ＳＢＥＩＩａ発現が低下したコムギ内胚乳中の全デンプン含有量

穀粒重量の百分率としての穀粒中の全デンプン含有量の解析は、対照の５２％およびｈｐ－ＳＢＥＩＩｂ系統の５０．３％と比較して、ｈｐ－ＳＢＥＩＩａ系統（４３．４％）中の内胚乳デンプン含有量のわずかな低下を明らかにした（表２４）。これは阻害性コンストラクトによってＳＢＥＩＩａ発現が低下すると、全デンプン合成にいくらかの低下があったことを示唆した。

【０４２１】

デンプン膨潤力（ＳＳＰ）

デンプンの糊化中の水取り込みを測定するＫｏｎｉｋ－Ｒｏｓｅ　ｅｔ　ａｌ．，（２００１）の小規模検査に従って、糊化デンプンのデンプン膨潤力を測定した。ＳＳＰ推定値は、対照（９．３１）およびＳＢＥＩＩｂ低下穀粒（１０．７４）からのデンプンと比較して、ＳＢＥＩＩａ低下系統からのデンプンで数値３．５１と顕著により低かった（表２４）。

【０４２２】

デンプン糊化特性

本質的にＲｅｇｉｎａ　ｅｔ　ａｌ．，（２００４）に記載されるＲａｐｉｄ　Ｖｉｓｃｏ　Ａｎａｌｙｚｅｒ（ＲＶＡ）を使用して、デンプン糊化粘度パラメータを測定した。ＲＶＡの温度プロファイルは、以下の段階を含んでなる。６０℃で２分間保持、６分間で９５℃に加熱、９５℃で４分間保持、４分間で５０℃に冷却、および５０℃で４分間保持。結果（表２６）は、対照コムギデンプンと比較して、ＳＢＥＩＩａ低下穀粒からのデンプン中で、ピークおよび最終粘度が顕著により低かったことを示した。

【０４２３】

デンプンゼラチン化特性

Ｒｅｇｉｎａ　ｅｔ　ａｌ．，（２００４）に記載される示差走査熱量測定（ＤＳＣ）を使用して、デンプンゼラチン化特性を研究した。Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ　Ｐｙｒｉｓ　１示差走査熱量計上でＤＳＣを実施した。１：２の比率でデンプンおよび水を予備混

合し、およそ５０ｍｇをＤＳＣパン内に量り入れて密封し、一晩平衡化させた。１分あたり１０℃の加熱速度を使用して、試験および参照サンプルを３０～１３０℃に加熱した。装置付属のソフトウェアを使用して、データを分析した。結果（表２７）は、対照（６６．６℃）と比較して、ＳＢＥＩＩａ低下穀粒からのデンプンのゼラチン化温度終了遅延（７２．６℃）を明らかに示した。対照デンプン（６１．１６℃）と比較して、ＳＢＥＩＩａ低下デンプン（６３．５１℃）は、ピークゼラチン化温度もまたより高かった。

【０４２４】

実施例１３：加工中の高アミロースコムギ小麦粉の分析

加圧加工に関するＣＳＩＲＯＦｏｏｄ ａｎｄ Ｎｕｔｒｉｔｉｏｎａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｗｅｒｒｉｂｅｅとの共同研究

小角Ｘ線散乱（ＳＡＸＳ）を使用して、天然デンプンと比較した高アミロースコムギデンプンの構造特性評価を実施した。研究は、ａ）生小麦粉の特性評価、およびｂ）１００℃を超える温度における小麦粉またはデンプンサンプルの加圧料理中の糊化処理のリアルタイム分析、およびｃ）０～１０日間にわたる冷却時の構造変化と老化を含めるようにデザインされた。研究では、約２５％（野生型）～約７５％の範囲にわたる、約１０％刻みで増大する様々なアミロース含有量の小麦粉サンプルを使用した。

【０４２５】

３組の小麦粉サンプルを実験に含めた。１つ目は、ＳＢＥＩＩａ低下系統からの高アミロースコムギのプールなしの純粋系統であり、ｈｐ－ｃｏｍｂｏコンストラクトで形質転換された約５０％のアミロースを有する中程度のレベルのアミロースコムギ系統ＡＣ４５．１（実施例２）および対照コムギ（ＮＢ１）。２つ目は、実施例２に記載される形質転換系統からのプールされたコムギ材料、プールサンプルは、アミロース含有量が約１０％刻みで増大される。３つ目は、コムギ（高アミロース、野生型、およびＳＳＩＩａを欠くコムギ）、オオムギ（野生型、ＳＢＥＩＩａおよびＳＢＥＩＩｂ低下による高アミロース、およびＳＳＩＩ低下による高アミロース）、およびアミローストウモロコシをはじめとする、異なる種からの比較穀粉。一連のアミロース含有量のプールされたコムギ物質に対する難消化性デンプン分析の結果は、難消化性デンプンのアミロース含有量?４０％からの直線的増大を明らかにした。

【０４２６】

実施例１４：パンおよびその他食品生産

高アミロースコムギなどの穀粒を食餌中に送達する最も効果的な様式の１つは、パンを経由する。高アミロースコムギが、パンに容易に組み込み得ることを示し、製パン品質の維持を可能にする要素を調べるために、小麦粉サンプルを製造し、分析して、ベーキングで使用した。以下の方法を用いた。

【０４２７】

方法

コムギ穀粒を１６．５％の水分含量に一晩調湿して、ＢＲＩ Ｌｔｄ，ＡｕｓｔｒａｌｉａのＢｕｈｌｅｒ実験室規模製粉機で、またはＱｕａｄｒｏｍａｔ Ｊｕｎｉｏｒ製粉機を使用して製粉し、それに続いて篩掛けして、最終粒度１５０μｍを得た。ＡＡＣＣ法３９－１１（１９９９）に従った赤外線反射率（ＮＩＲ）によって、またはＤｕｍａｓ法およびＡＡＣＣ法４４－１５Ａ（ＡＡＣＣ$_5$１９９９）に従った空気乾燥器によって、サンプルのタンパク質および水分含有量を測定した。

【０４２８】

マイクロＺ－ａｒｍ混合

マイクロＺ－ａｒｍミキサーによって、混合あたり４ｇの試験小麦粉を使用して小麦粉の最適吸水値を判定した（Ｇｒａｓ ｅｔ ａｌ．，（２００１）；Ｂｅｋｅｓ ｅｔ ａｌ．，（２００２）。全ての混合において、それぞれ９６および６４ｒｐｍの迅速および緩慢ブレードの軸速度で、一定の角速度を使用した。混合は、三連で各２０分間実施した。水を小麦粉に添加する前に、固形成分の混合のみによって、ベースラインを自動的に記録した（３０秒間）。自動送水ポンプを使用して、水を一度に添加した。以下のパラメ

ータは、個々の混合実験から平均を取って判定された。ＷＡ％：吸水量は５００ブラベンダー単位（ＢＵ）生地粘稠度で判定された；生地形成時間（ＤＤＴ）：ピーク抵抗までの期間（秒）。

【０４２９】

ミキソグラム

改変小麦粉に関する最適生地混合パラメータを判定するために、全生地質量を一定に保ちながら、１０ｇのＣＳＩＲＯプロトタイプミキソグラフ中で、マイクロＺ－ａｒｍミキサーで測定される吸水量に相当する変動する吸水量のサンプルを混合した。各小麦粉サンプルで、以下のパラメータを記録した。ＭＴ－混合時間（秒）；ＰＲ－ミキソグラフピーク抵抗（任意の単位、ＡＵ）；ＢＷＰＲ－ピーク抵抗での帯域幅（任意の単位、ＡＵ）；ＲＢＤ－抵抗崩壊（％）；ＢＷＢＤ－帯域幅崩壊（％）；ＴＭＢＷ－最大帯域幅までの期間（秒）；およびＭＢＷ－最大帯域幅（任意の単位、Ａ．Ｕ．）。

【０４３０】

マイクロ伸張試験

生地伸展性パラメータは、次のように測定した：生地を１０ｇのプロトタイプミキソグラフ中のピーク生地形成まで混合した。修正ジオメトリＫｉｅｆｆｅｒ生地およびグルテン伸展性装置を用いて、ＴＡ．ＸＴ２ｉテクスチャー分析器上で、１ｃｍ／ｓでの伸張試験を実施した（Ｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，２００３）。伸張試験のための生地サンプル（約１．０ｇ／試験）をＫｉｅｆｆｅｒ成型機で成型して、伸張試験前に３０℃および９０％ＲＨで４５分間休ませた。Ｅｘｃｅｅｄ Ｅｘｐｅｒｔソフトウェアを用いて、データからＲ＿ＭａｘおよびＥｘｔ＿Ｒｍａｘを判定した（Ｓｍｅｗｉｎｇ，Ｔｈｅｍｅａｓｕｒｅｍｅｎｔ ｏｆ ｄｏｕｇｈ ａｎｄ ｇｌｕｔｅｎ ｅｘｔｅｎｓｉｂｉｌｉｔｙ ｕｓｉｎｇｔｈｅＳＭＳ／Ｋｉｅｆｆｅｒ ｒｉｇ ａｎｄ ｔｈｅＴＡ．ＴＸ２ ｔｅｘｔｕｒｅ ａｎａｌｙｚｅｒ ｈａｎｄｂｏｏｋ，ＳＭＳ Ｌｔｄ：Ｓｕｒｒｅｙ，ＵＫ，１９９５；Ｍａｎｎ，（２００２）。

【０４３１】

１４ｇの小麦粉を１００％とした例証的レシピは、次のとおりであった。小麦粉１００％、塩２％、乾燥酵母１．５％、植物油２％、および改良剤（アスコルビン酸１００ｐｐｍ、真菌アミロース１５ｐｐｍ、キシラナーゼ４０ｐｐｍ、大豆粉０．３％；Ｇｏｏｄｍａｎ Ｆｉｅｌｄｅｒ Ｐｔｙ Ｌｔｄ，Ａｕｓｔｒａｌｉａから得られる）１．５％。加水レベルは、完全配合のために調節されたマイクロＺ－ａｒｍ吸水値に基づいた。小麦粉（１４ｇ）およびその他の成分を３５ｇのミキソグラフ中のピーク生地形成時間まで混合した。成型および型詰めを４０℃で８５％ＲＨの二段階プルーフィングで実施した。ベーキングはＲｏｔｅｌオーブン内で、１９０℃で１５分間実施した。ローフ体積（カノーラ種子置換法によって測定される）および重量は、ラック上で２時間の冷却後に測定した。ローフを経時的に秤量して、正味水損失を測定した。

【０４３２】

小麦粉または全粒小麦は、非改変コムギからの小麦粉または全粒小麦、またはオオムギなどのその他の穀類と混合して、所望の生地および製パンまたは栄養価を提供してもよい。例えば栽培品種ＣｈａｒａまたはＧｌｅｎｌｅａからの小麦粉は、生地強度が高いのに対し、栽培品種Ｊａｎｚの生地強度は中程度である。特に小麦粉中の高および低分子量グルテニンサブユニットのレベルは、生地強度と正の相関があり、さらに存在する対立遺伝子の性質によって影響を受ける。

【０４３３】

ＳＢＥＩＩａが低下した遺伝子組換えコムギ系統からの小麦粉が、１００％、６０％、および３０％の添加レベルで使用された。例えば全ての小麦粉が様々なコムギ系統に由来するか、またはベーキング対照（Ｂ．追加）小麦粉に６０％または３０％が添加された。百分率は、パン配合中の全小麦粉である。４つの遺伝子組換えコムギ系統が、次のように使用された：０７２（ＳＢＥＩＩａ低下）、２１２（ＳＢＥＩＩａ低下×ＳＢＥＩ三重ヌルコムギの交雑に由来するコムギ系統）、Ｈ７（ＳＢＥＩＩａ低下×ＳＳＩＩａ三重ヌル

コムギの交雑に由来するコムギ系統）、および００８（ＳＢＥＩＩｂ低下）が、非形質転換対照コムギ（ＮＢ１）と共に試験された。全てのコムギは、Ｂｒａｂｅｎｄｅｒ　Ｑｕａｄｒａｍａｔ　Ｊｕｎｉｏｒミル内で製粉した。全ての混合物は、上述したように、４ｇのＺ－ａｒｍミキサーで測定された吸水量と、１０ｇのミキソグラフで測定された最適混合時間を有した。これらの条件を使用して、１０ｇの試験ベーキングローフを調製した。

【０４３４】

混合特性

対照系統（ベーキング対照、ＮＢ１および００８）を除いて、全てのその他のコムギ系統は大幅に上昇した吸水値を与えた（図１７（ａ））。系統２１２および０７２は、添加レベルの増大と共に、１００％の２１２小麦粉の添加で最高９５％の吸水値をはじめとする、吸水値の増大を与えた。これらの系統からの小麦粉の組み込みレベルの増大はまた、最適ミキソグラフ混合時間の短縮をもたらした（図１７（ｂ））。吸水データと同様に、非対照系統は、添加レベルの増大と共に、比膨化体積（ローフ体積／ローフ重量）に大幅な低下を示した。影響は２１２系統で特に強力であった。

【０４３５】

これらの研究は、許容されるクラム構造、歯触り、および外観をはじめとする、商業的可能性のあるパンが、対照小麦粉サンプルと会合された高アミロースコムギ小麦粉を使用して得られ得ることを示す。さらに、高アミロースコムギは、好ましい遺伝的背景特性（例えば好ましい高および低分子量グルテニン）、グルテン、アスコルビン酸塩または乳化剤などの改良剤の添加、または異なる製パン様式の使用（例えば中種製パン、サワードウ、マルチグレイン、または全粒小麦）と組み合わせて使用されて、腸および代謝健康の改善に対して特定の効用および栄養効能がある一連の製品を提供する。

【０４３６】

その他の食品：

標準ＢＲＩ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｎｏｏｄｌｅ　Ｍａｎｕｆａｃｔｕｒｉｎｇ　Ｍｅｔｈｏｄ（ＡＦＬ０２９）を使用して、Ｈｏｂａｒｔミキサー内で、黄色アルカリ麺（ＹＡＮ）（１００％小麦粉、３２％水、１％Na_2CO_3）を調製した。Ｏｔａｋｅ製麺機のステンレス鋼ローラー内で麺シートを形成した。休止（３０分間）後、麺シートを切り分けて細断した。麺の寸法は１．５×１．５ｍｍであった。

【０４３７】

標準ＢＲＩ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｎｏｏｄｌｅ　Ｍａｎｕｆａｃｔｕｒｉｎｇ　ｍｅｔｈｏｄ（ＡＦＬ０２８）に従って、Ｈｏｂａｒｔミキサー内で、即席麺（１００％小麦粉、３２％水、１％ＮａＣｌ、および０．２％Ｎａ２ＣＯ３）を調製した。Ｏｔａｋｅ製麺機のステンレス鋼ローラー内で麺シートを形成した。休止（５分間）後、麺シートを切り分けて細断した。麺の寸法は１．０×１．５×２５ｍｍであった。麺を３．５分間蒸煮して、次に１５０℃、４５秒間で油で揚げた。

【０４３８】

中種（Ｓ＆Ｄ）パン

ＢＲＩ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ中種ベーキングは、二段法を伴った。最初の段階では、全小麦粉の一部を水、酵母、およびイーストフードと混合してスポンジを作成した。スポンジを４時間発酵させた。第２の段階では、スポンジに残りの小麦粉、水、およびその他の成分を合わせて、生地を作成した。工程のスポンジ段階は２００ｇの小麦粉で作成し、４時間発酵させた。発酵したスポンジに残りの１００ｇの小麦粉およびその他の成分を混合して、生地を調製した。

【０４３９】

パスタースパゲティ

パスタ製造に使用した方法は、Ｓｉｓｓｏｎｓ　ｅｔ　ａｌ．，（２００７）に記載される。高アミロースコムギ（ＳＢＥＩＩａ低下）および対照コムギ（ＮＢ１）からの試験サンプル小麦粉をＭａｎｉｌｄｒａセモリナと様々な百分率で混合し（試験サンプル：０

、２０、４０、６０、８０、１００％）、小規模パスタ調製用の小麦粉ミックスを得た。サンプルを３０％水分に調節した。所望量の水をサンプルに添加して短時間混合し、５０ｇファリノグラフボールに移し入れてさらに２分間混合した。コーヒー豆サイズの小片に似た得られた生地をステンレス鋼チャンバーに移し入れて、７０００ｋＰａの圧力下で９分間、５０℃で休ませた。次にパスタを定速で押出し、およそ４８ｃｍの長さに切断した。各サンプルで２バッチのパスタを製造した。Ｔｈｅｒｍｏｌｉｎｅ Ｔｅｍｐｅｒａｔｕｒｅ ａｎｄ Ｈｕｍｉｄｉｔｙ Ｃａｂｉｎｅｔ（ＴＥＣ ２６０４）（Ｔｈｅｒｍｏｌｉｎｅ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｅｑｕｉｐｍｅｎｔ，Ｓｍｉｔｈｆｉｅｌｄ，Ａｕｓｔｒａｌｉａ）を使用してパスタを乾燥した。乾燥サイクルは、２５℃の保持温度とそれに続く６５℃への増大を４５分間、次に５０℃で約１３時間とそれに続く２５℃への冷却からなった。サイクル中、湿度を制御した。引き続く試験のために乾燥パスタを７ｃｍの長さに切断した。

【０４４０】

実施例１５：食物サンプルの血糖指数（ＧＩ）および難消化性デンプン（ＲＳ）の生体外測定

本明細書に記載されるように製造されたパンをはじめとする食物サンプルの血糖指数（ＧＩ）を生体外で次のように測定した：食物サンプルを家庭用フードプロセッサ内で均質化した。およそ５０ｍｇの炭水化物に相当するサンプル量を１２０ｍｌのプラスチックサンプル容器内に量り入れ、α－アミラーゼなしで１００μｌの炭酸塩緩衝液を添加した。炭酸塩緩衝液添加のおよそ１５～２０秒後に、５ｍｌのペプシン溶液（６５ｍｌのＨＣｌ０．０２Ｍに溶解した６５ｍｇのペプシン（Ｓｉｇｍａ）、ｐＨ２．０、使用日に作成）を添加し、混合物を７０ｒｐｍの往復流水浴内で３７℃で３０分間インキュベートした。培養に続いてサンプルを５ｍｌのＮａＯＨ（０．０２Ｍ）で中和して、２５ｍｌの酢酸緩衝液０．２Ｍ、ｐＨ６を添加した。次にＮａ酢酸緩衝液（酢酸ナトリウム緩衝液、０．２Ｍ、ｐＨ６．０、０．２０Ｍ塩化カルシウムおよび０．４９ｍＭ塩化マグネシウム含有）に溶解した、２ｍｇ／ｍＬパンクレアチン（α－アミラーゼ、Ｓｉｇｍａ）とアスペルギルス・ニガー（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｎｉｇｅｒ）からの２８Ｕ／ｍＬアミログルコシダーゼ（ＡＭＧ、Ｓｉｇｍａ）を含有する５ｍｌ酵素混合物を添加して、混合物を２～５分間インキュベートした。１ｍｌの溶液を各フラスコから１．５ｍｌ管に移し入れ、３０００ｒｐｍで１０分間遠心分離した。上清を新しい管に移し、冷凍庫内で保存した。残りの各サンプルをアルミニウムホイルで覆い、容器を水浴内で３７℃で５時間インキュベートした。次にさらに１ｍｌの溶液を各フラスコから収集し、先に実施したように、遠心分離して上清を移した。これもまた、吸光度の読み取りまで、冷凍庫内に保存した。

【０４４１】

全てのサンプルは室温で解凍し、３０００ｒｐｍで１０分間遠心分離した。サンプルを必要に応じて希釈し（通常１：１０希釈で十分である）、各サンプルから１０μｌの上清を９６ウェルマイクロタイタープレートに二連または三連で移し入れた。グルコース（０ｍｇ、０．０６２５ｍｇ、０．１２５ｍｇ、０．２５ｍｇ、０．５ｍｇ、および１．０ｍｇ）を使用して、各マイクロタイタープレートの標準曲線を作成した。各ウェルに２００μｌのＧｌｕｃｏｓｅ Ｔｒｉｎｄｅｒ試薬（Ｍｉｃｒｏｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ Ｐｔｙ Ｌｔｄ，Ｌｉｄｃｏｍｂｅ，ＮＳＷ）を添加して、プレートを室温でおよそ２０分間インキュベートした。プレートリーダーを使用して、各サンプルの吸光度を５０５ｎｍで測定し、標準曲線を参照してグルコースの量を計算した。

【０４４２】

本明細書に記載されるように製造されたパンをはじめとする食物サンプル中の難消化性デンプン（ＲＳ）のレベルは、生体外で次のように測定した。この方法は、試料調製と、普通に摂食されたものとしての食物中のデンプンの生体外消化について記述する。方法は２つの部分を含む：第１に、食物中のデンプンを疑似生理学的条件下で加水分解した；第２に、洗浄を通じて副産物を除去し、サンプルの均質化および乾燥後に残留デンプンを測定した。消化処理の終わりに定量化されたデンプンは、食物の難消化性デンプン含有量に

相当する。

【０４４３】

１日目に、例えば家庭用フードプロセッサで噛みくだきによって達成される粘稠度に均質化することで、摂取を模倣する様式で食物サンプルを処理した。均質化後、最高５００ｍｇの炭水化物に相当する量の食物を１２５ｍＬエルレンマイアーフラスコ内に量り入れた。１２１ｍｇのＮａＨＣＯ$_3$および１５７ｍｇのＫＣｌをおよそ９０ｍＬの精製水に溶解し、１５９μＬの１Ｍ　ＣａＣｌ$_2$・６Ｈ$_2$Ｏ溶液および４１μＬの０．４９Ｍ　ＭｇＣｌ$_2$・６Ｈ$_2$Ｏを添加して、０．３２ＭのＨＣｌでｐＨ７～７．１に調節し、体積を１００ｍＬに調節して炭酸塩緩衝液を調製した。この緩衝液を４℃で最高５日間まで保存した。１ｍＬの炭酸塩緩衝液あたり２５０単位ｏｆα－アミラーゼ（Ｓｉｇｍａ　Ａ－３１７６；ブタ膵臓からのタイプＶＩ－Ｂ）を含有する人工唾液溶液を調製した。およそ食物重量に等しい人工唾液溶液の量をフラスコに添加した。唾液添加の約１５～２０秒後、５ｍＬのＨＣｌ中のペプシン溶液（０．０２ＭのＨＣｌ、ｐＨ２．０中の１ｍｇ／ｍＬペプシン（Ｓｉｇｍａ）、使用日に作成）を各フラスコに添加した。アミラーゼ、次にペプシンの混合は、ヒトが食物を飲む混む前の噛みくだきを模倣した。混合物を８５ｒｐｍで振盪しながら、３７℃で３０分間インキュベートした。次に混合物を５ｍＬの０．０２ＭＮａＯＨで中和した。フラスコあたり、２５ｍＬの酢酸緩衝液（０．２Ｍ、ｐＨ６）と、酢酸緩衝液、ｐＨ６中に２ｍｇ／ｍＬのパンクレアチン（Ｓｉｇｍａ、ブタ膵臓４×ＵＳＰ活性）およびアスペルギルス・ニガー（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｎｉｇｅｒ）からの２８Ｕのアミログルコシダーゼ（ＡＭＧ、Ｓｉｇｍａ）を含有する５ｍＬのパンクレアチン酵素混合物とを添加した。各フラスコにアルミニウムホイルで蓋をして、８５ｒｐｍに設定した往復流水浴内で、３７℃で１６時間インキュベートした。

【０４４４】

２日目に、各フラスコの内容物を５０ｍＬポリプロピレン管に定量的に移し、室温で２０００×ｇで１０分間遠心分離した。上清を廃棄して、各ペレットを２０ｍＬの水で３回洗浄し、各洗浄毎に管を穏やかにボルテックスしてペレットを砕き、続いて遠心分離した。最後の５０μｌの洗浄水をＧｌｕｃｏｓｅ　Ｔｒｉｎｄｅｒ試薬で、遊離グルコースの不在について試験した。次に各ペレットをおよそ６ｍＬの精製水に再懸濁し、Ｓ２５Ｎ－８Ｇ分散ツール付きＵｌｔｒａ　Ｔｕｒｒａｘ　ＴＰ１８／１０を使用して、１０秒間にわたり３回均質した。内容物を２５ｍＬメスフラスコに定量的に移して、一定体積にした。内容物を完全に混合して、ポリプロピレン管に戻した。各懸濁液の５ｍＬのサンプルを２５ｍＬの培養管に移して、即座に液体窒素内でシェル凍結して凍結乾燥した。

【０４４５】

３日目に、Ｍｅｇａｚｙｍｅ　Ｔｏｔａｌ　Ｓｔａｒｃｈ　Ｐｒｏｃｅｄｕｒｅキットで提供される試薬を使用して、各サンプル中の全デンプンを測定した。デンプン標準物質（Ｒｅｇｕｌａｒ　Ｍａｉｚｅ　Ｓｔａｒｃｈ、ＳｉｇｍａＳ－５２９６）およびアッセイ試薬空試験を調製した。サンプル、対照、および試薬空試験を０．４ｍＬの８０％エタノールで湿らせて分散を助け、ボルテックスがそれに続いた。即座に２ｍＬのＤＭＳＯを添加して、ボルテックスにより溶液を混合した。管を沸騰する水浴５分間に入れて、ＭＯＰＳ緩衝液（ｐＨ７、５ｍＭのＣａＣｌ$_2$および０．０２％アジ化ナトリウム含有）中の３ｍＬの熱安定性アミラーゼ（１００Ｕ／ｍｌ）を即座に添加した。a溶液を３分間隔でボルテックス混合しながら、沸騰水浴内でさらに１２分間インキュベートした。次に管を５０℃水浴に入れて、４ｍＬの酢酸ナトリウム緩衝液（２００ｍＭ、ｐＨ４．５、０．０２％アジ化ナトリウム含有）と０．１ｍＬの３００Ｕ／ｍｌアミログルコシダーゼを添加した。混合物を１０分間隔で穏やかに混合しながら、５０℃で３０分間インキュベートした。体積をメスフラスコ内で２５ｍＬにして良く混合した。アリコートを２０００×ｇで１０分間遠心分離した。５０μＬの上清中のグルコースの量を１．０ｍＬのＧｌｕｃｏｓｅ　Ｔｒｉｎｄｅｒ試薬によって測定し、管を最低１８分間最大４５分間暗所で室温インキュベーションした後に、吸光度を５０５ｎｍで測定した。

【０４４６】

４種の遺伝子組換えコムギ系統、すなわち０７２（低下ＳＢＥＩＩａ）、２１２（ＳＢＥＩＩａ低下×ＳＢＥＩ三重ヌルコムギの交雑に由来するコムギ系統）、Ｈ７（ＳＢＥＩＩａ低下×ＳＳＩＩａ三重ヌルコムギの交雑に由来するコムギ系統）、および００８（ＳＢＥＩＩｂ低下）からの小麦粉から焼かれた食パンを非形質転換対照コムギ（ＮＢ１）と共に、１００％、６０％および３０％の小麦粉、残りの４０％または７０％の小麦粉が野生型穀粒由来である組み込みレベルで、ＲＳおよびＧＩについて試験した。２１２、０７２、およびＨ７小麦粉の組み込みの増大は、ＲＳの有意な増大（図１８（ａ））と、予測ＧＩの低下（図１８（ｂ））をもたらした。変化の規模は、系統２１２からの小麦粉を使用した場合に最大であった。例えばこの高アミロース小麦粉の１００％添加から作られたパンはＲＳ含有量が約１０％であり、これは３０％レベルの含有の１５０％増大に相当し、ＮＢ１対照と比較して９倍の増大に相当した。００８系統からの小麦粉の組み込み程度の増大は、結果として生じるローフのＲＳおよびＧＩに影響を及ぼし、結果はベーキング対照小麦粉と同等であった。

【０４４７】

系統Ｆ９およびＦ１１穀粒から生産した小麦粉を、難消化性デンプン含有量につきインビトロ法で試験した。ｔｈｗ野生型栽培品種ＳｕｎｓｔａｔｅおよびＮＢ１由来のコントロール小麦粉の０．２－０．４ｇ／小麦粉１００ｇと比較して、Ｆ１１小麦粉のＲＳ含有量が約６．５ｇ／小麦粉１００ｇであるのに対し、Ｆ９小麦粉はＲＳ含有量が約３ｇ／小麦粉１００ｇ（範囲２．３－３．４ｇ／小麦粉１００ｇ）であった。これは、野生型小麦粉のＲＳレベルに対し、約８倍または少なくとも１０倍の増加である。

【０４４８】

実施例１６：高アミロースコムギの加工および結果として生じるＲＳレベル

小規模研究を行って、圧延または圧扁された高アミロースコムギからの加工穀粒の難消化性デンプン（ＲＳ）含有量を判定した。技術は、水分レベル２５％への１時間の穀粒の馴化を伴い、穀粒の蒸煮がそれに続いた。蒸煮に続いて、小規模ローラーを使用して、穀粒を圧扁した。次にフレークをオーブン内で１２０℃で３５分間ローストした。ＳＢＥＩＩａ低下高アミロースコムギ（ＨＡＷ、系統８５．２ｃ）および野生型対照コムギ（栽培変種Ｈａｒｔｏｇ）からのおよそ２００ｇのサンプル上で、２種類のローラー幅と３種類の蒸煮時間を使用した。試験されたローラー幅は、０．０５ｍｍおよび０．１５ｍｍであった。試験された蒸煮時間は６０’、４５’、および３５’であった。

【０４４９】

この研究は、対照と比較して、加工高アミロースコムギ中のＲＳ量の明白なかなりの増大を示した（表２８、図１８）。またＲＳレベルに対して、加工条件のいくらかの効果もあった。例えば高アミロース穀粒では、より長い蒸煮時間は、ＲＳレベルにわずかな低下をもたらしたが、これは蒸煮中のデンプン糊化の増大に起因する見込みが高い（表２８）。より幅広いローラー間隙は、最長蒸煮時間以外では、より高いＲＳレベルを生じた。これは、より狭い間隙で穀粒を圧延した際に、デンプン顆粒の剪断損傷が増大して、ＲＳレベルをわずかに低下させたことに起因し得た。より狭いローラー間隙はまた、Ｈａｒｔｏｇ対照でより高いＲＳレベルをもたらしたが、全体的ＲＳレベルははるかにより低かった。高アミロースの結果とは対照的に、蒸煮時間の増大はより高いＲＳレベルをもたらしたが、これは恐らくより長い蒸煮時間でのデンプン糊化の増大が、引き続く加工および冷却中のデンプン老化増大に寄与したためである。

【０４５０】

様々な製品からのＲＳに関する統合データ。実施例１０に記載されるようにして調製された麺、中種パンおよびスパゲティなどの様々な製品から得られたＲＳデータを表２９に提示する。全ての製品について全ての組み込みレベルが試験されたわけではないが、分析した製品の大部分で、２０％、４０％、および６０％の組み込みレベルを使用した。結果は、ＲＳ含有量と高アミロース小麦粉組み込みレベルとの間の直線関係を示した。

【０４５１】

実施例１７：ＳＢＥＩＩＡに点変異を有するさらなる植物の単離

標準ＥＭＳ処理条件を使用して、コムギ栽培品種ＡｒｃｈｅまたはＡｐａｃｈｅ種子をＥＭＳ変異誘発した後に、変異植物系統集団を開発した。変異誘発種子から、約５０００のＡｐａｃｈｅおよび９００のＡｒｃｈｅの個々のＭ１植物を栽培して自家受粉させ、各植物からの種子と引き続く子孫をそれぞれ個々のＭ１植物に由来する潜在的変異系統として維持した。次世代Ｓｏｌｅｘａ配列決定（Ｉｌｌｕｍｉｎａ）により、系統を３つの同祖ＳＢＥＩＩａ遺伝子中の変異についてスクリーニングした。これを行うためには、Ａｒｃｈｅ集団からの約１３０のＭ１ファミリーおよびＡｐａｃｈｅ集団からの９６のＭ１ファミリーからＤＮＡをそれぞれプールして、７個のＤＮＡプールを調製した。プールされたＤＮＡ上で、遺伝子のスプライス部位をはじめとするエクソン領域を標的にして、同祖遺伝子あたり３または４領域についてＰＣＲを実施した。ゲノム特異的プライマーを表３０に記載する。

【０４５２】

ＰＣＲ産物の正規化後に、同一ＤＮＡプールからの１０個の単位複製配列（増幅産物）をマージさせ、１個のＤＮＡプールあたり１個のフローセルで配列決定を行った。配列データを分析し、全ての多形性から、観察された多形性頻度に基づいて、配列決定の誤りでなく変異に起因する見込みが高いものを選択した。Ａｒｃｈｅ集団からの６４の推定上の変異体およびＡｐａｃｈｅ集団からの４８の推定上の変異体が、エクソン領域およびスプライス部位をカバーする第１の配列分析から観察された。ｋａｓｐａｒ技術に基づいて、各多形性毎にＳＮＰアッセイをデザインし、特定の多形性について陽性の各プール中の１３０ファミリー上で遺伝子型同定を実施した。したがって各変異遺伝子を含有する個々の変異体系統が同定されて、変異ＳＢＥＩＩａ配列が確認された。

【０４５３】

この方法により、それぞれＳＢＥＩＩａ変異を有し、それぞれＭ２　ｋｅｒｎｅｌを保持する、Ａｐａｃｈｅ集団からの３１の変異体系統と、Ａｒｃｈｅ集団からの９の変異体系統が同定された。入手可能性に応じて、各変異体系統からの約１０個のＭ２種子を半切し、胚がない半分をＤＮＡ抽出と分析で使用して、胚がある残りの半分を播種のために保存した。Ａｒｃｈｅ集団からの半切種子上で合計５の変異株が確認され、Ａｐａｃｈｅ集団からは２８が確認された。対応する種子を播種して子孫植物を産生し、Ｍ２植物葉材料上で分析を繰り返し、変異がメンデル様式で遺伝することを確認し、より良いＤＮＡ品質を提供した。これらの分析は、Ａｒｃｈｅ集団からの４株とＡｐａｃｈｅ集団からの１５株である１９の同型接合変異株を確認し（表３１）、それらのＤＮＡと変異株によってコードされる推定タンパク質の配列に応じて、それらの格付けを可能にした。

【０４５４】

得られた変異株を３つの群に分類した。第１群は、ＢまたはＤゲノム上のＳＢＥＩＩａ遺伝子のタンパク質コード領域中にストップコドンのある変異ＳＢＥＩＩａ遺伝子を有する変異株からなり、ＳＢＥＩＩａタンパク質翻訳の未成熟停止を引き起こす。第２群は、ＳＢＥＩＩａ－ＢまたはＳＢＥＩＩａ－Ｄ遺伝子中にスプライス部位変異を含む系統からなる。このような変異はヌル変異であると期待できる。第３群は、ＳＢＥＩＩａ－Ａ，ＳＢＥＩＩａ－ＢおよびＳＢＥＩＩａ－Ｄ遺伝子中に点変異を含む変異株からなり、コードするポリペプチド中にアミノ酸置換をもたらす。コードしたタンパク質構造への置換変異の効果はＢｌｏｓｕｍ６２およびＰａｍ２５０マトリックスを用いて予測し；各々の事例で効果が強いと予測した。これらの同型接合植物を親として用い、これらの間の、または二重ヌル（欠失）ＳＢＥＩＩａ変異株との間の交雑を行った。変異株植物はまた、デュラムコムギ（栽培品種Ｓｏｌｄｕｒ）とも交雑して四倍体コムギに変異を導入した。

【０４５５】

実施例１８：高アミロースコムギを生産するための、二重ヌル欠失変異および点変異を組み合わせたＳＢＥＩＩａ三重ヌルコムギの生産と同定

三重ヌルの生産のための交雑に用いるため、ＡｐａｃｈｅおよびＡｒｃｈｅ変異群において同定した８個の変異株系統と、Ｓｕｎｓｔａｔｅ群からの２個の変異株系統を選択した。親の１つとして点変異について同型接合である植物（表３２）および２番目の親とし

て二重ヌルＳＢＥＩＩａ変異株（ＨＩＢ欠失変異株）を用い、全部で６６回の交雑を行った。２番目の親植物は、三重ヌルを生産するため、Ａ１Ｄ２，Ａ２Ｄ２，Ａ１Ｂ２およびＢ２Ｄ２遺伝子型の変異株を含んだ。交雑３４回分のＦ１種子（表３３）を維持し、単一種子系統によってＦ２種子５００００個を生産するために用いた。これらを、ＨＡＷ表現型について、単一種子ＮＩＲＳ技術を用いてスクリーニングした。全部でＨＡＷ種子２３００個を同定した。全ての交雑のうち１つがＨＡＷ種子を生産した。選択した種子をグリーンハウスで播き、得られたＦ３植物４１５個のうち、分子マーカーで９１個をＳＢＥＩＩａ遺伝子について三重ヌルであると同定した。植物８５個から種子が得られ、うち６７個の三重ヌル植物を、ＮＩＲＳ測定により高アミロースコムギ植物であると同定した。２４個の植物が、ＧＭ８５．２ｃ参照穀粒よりもアミロースレベルが高い種子を生産した。アミロース含有量をヨウ素定量法により測定したところ、ＳＢＥＩＩａ三重ヌル穀粒のいくつかがコントロール穀粒よりもアミロースレベルが高く、１５８％までであった。この同じ実験では、ＨＡＷ　ＧＭ参照穀粒は、コントロール系統よりもアミロースレベルが５８％高かった（表３５）。千粒重測定により、高アミロースコムギ穀粒は穀粒重量が有意に減少していないことが分かった。

【０４５６】

種子は、穀粒中デンプンの特性をさらに試験するため、播いて増やした。

【０４５７】

表A 配列リスト

配列番号	説明
1	SBEIIa-A アミノ酸配列 (Genbank 受入番号 CAA72154)
2	SBEIIa-B アミノ酸配列 (受入番号 CAR95900)
3	SBEIIa-D アミノ酸配列 (受入番号 AAK26821)
4	SBEIIb-A の部分的アミノ酸配列、N末端から、 *SBEIIb-A* エクソン 1-3 でコード
5	SBEIIb-B の部分的アミノ酸配列、 *SBEIIb-B* エクソン 2-3 でコード
6	SBEIIb-D アミノ酸配列 (受入番号 AAW80631) (塩基配列 AY740401)、836 アミノ酸
7	米国特許第 20050164178 号明細書 (CSIRO) からの配列番号6、生物種 *Triticum sp.* 、 AAW80631と同一の SBEIIb-D をコード
8	米国特許第 20050074891 号明細書 からの 配列番号2、生物種 *Triticum aestivum* 、 695アミノ酸− SBEIIb の部分的配列
9	米国特許第 20050074891 号明細書 からの 配列番号4、N末端延長なし、 生物種 *Triticum aestivum* 、836 アミノ酸、 これはSBEIIb-D、832/836 が AAW80631と同一
10	米国特許第 20050074891 号からの配列番号5、 生物種 *Hordeum vulgare* 、オオムギ由来 SBEIIb
11	米国特許第 20050177901 号明細書 からの 配列番号 1026 、生物種 *Triticum aestivum* 、 おそらく SBEIIb
12	米国特許第 20040016025 号明細書 からの 配列番号 3480 、生物種 *Triticum aestivum* 、 おそらく SBEIIb
13	塩基配列 *SBE IIa* Urartu エクソン 11-22
14	塩基配列 *SbeIIa_A* Urartu エクソン 1-3

15	塩基配列 *SbeIIa_A* Urartu エクソン 3-8
16	合成ペプチド配列（実施例1）
17	合成ペプチド配列（実施例1）
18	合成ペプチド配列（実施例1）
19	SBEIIa のプライマー（実施例1）
20	SBEIIa のプライマー（実施例1）
21	*SBEIIa* エクソン12-14のプライマー（実施例3）
22	*SBEIIa* エクソン12-14のプライマー（実施例3）
23	*SBEIIa* イントロン3領域のプライマー（実施例3）
24	*SBEIIa* イントロン3領域のプライマー（実施例3）
25	*SBEIIa* エクソン3領域のプライマー（実施例3）
26	*SBEIIa* エクソン3領域のプライマー（実施例3）
27	*SBEIIa* エクソン1領域のプライマー（実施例3）
28	*SBEIIa* エクソン1領域のプライマー（実施例3）
29	パンコムギ中の相同性 *SBEIIa* 遺伝子を識別するプライマー（実施例4）
30	パンコムギ中の相同性 *SBEIIa* 遺伝子を識別するプライマー（実施例4）
31	SBEIIa遺伝子PCRプライマー（実施例9）
32	SBEIIa遺伝子PCRプライマー（実施例9）
33	SBEIIa遺伝子PCRプライマー（実施例9）
34	SBEIIa遺伝子PCRプライマー（実施例9）
35	SBEIIa遺伝子PCRプライマー（実施例9）
36-62	SBEIIaのゲノム特異的プライマー（表5）
63-88	SBEIIa のAゲノム特異的プライマー（表6）

89-118	SBEIIaのBゲノム特異的プライマー（表7）
119-134	SBEIIaのDゲノム特異的プライマー（表8）
135-149	SBEIIbのゲノム特異的プライマー（表10）
150	受入番号Y11282、2970塩基 (SBEIIa-A cDNA配列、Nair et al, 1997)、タンパク質コード領域は151-153のATGから2620-2620のTAA
151	受入番号 AF338432（A. tauschii由来SBEIIa-D遺伝子）のゲノム配列から予測したcDNA塩基配列、2760の翻訳開始ATGから開始、タンパク質コード領域は塩基配列1-2457
152	変異株6-60のプライマー（実施例11）
153	変異株6-60のプライマー（実施例11）
154	変異株7-25のプライマー（実施例11）
155	変異株7-25のプライマー（実施例11）
156	変異株15-3Dのプライマー（実施例11）
157	変異株15-3Dのプライマー（実施例11）
158	変異株16-9Cのプライマー（実施例11）
159	変異株16-9Cのプライマー（実施例11）

表 1. 穀類から特性解析されたデンプン分枝酵素遺伝子

種	SBE イソ型	クローンのタイプ	受入番号	参考文献
トウモロコシ	SBEI	cDNA	U17897	Fisher et al., 1995
		ゲノム	AF072724	Kim et al., 1998
	SBEIIb	cDNA	L08065	Fisher et al., 1993
		ゲノム	AF072725	Kim et al., 1999
	SBEIIa	cDNA	U65948	Gao et al., 1997
コムギ	SBEII	cDNA	Y11282	Nair et al., 1997
	SBEI	cDNA およびゲノム	AJ237897 (SBEI 遺伝子) AF002821 (SBEI 偽遺伝子) AF076680 (SBEI 遺伝子) AF076679 (SBEI cDNA)	Baga et al., 1999、 Rahman et al., 1997、 Rahman et al., 1999
	SBEI	cDNA	Y12320	Repellin et al., 1997
	SBEIIa	cDNA およびゲノム	AF338432 (cDNA) AF338431 (遺伝子)	Rahman et al., 2001
	SBEIIa	cDNA	AK335707、 AF286319	
	SBEIIb	cDNA およびゲノム		国際公開第 01/62934 号パンフレット
	SBEIIb	cDNA		国際公開第 00/15810 号パンフレット
	SBEIIb-D	cDNA		米国特許第 2005074891 号明細書
イネ	SBEI	cDNA	D10752	Nakamura, 2002 - and Nakamura and Yamanouchi, 1992
	SBEI	ゲノム	D10838	Kawasaki et al., 1993
	RBE3	cDNA	D16201	Mizuno et al., 1993
オオムギ	SBEIIa および SBEIIb	cDNA およびゲノム	AF064563 (SBEIIb 遺伝子) AF064561 (SBEIIb cDNA) AF064562 (SBEIIa 遺伝子) AF064560 (SBEIIa cDNA)	Sun et al., 1998

表 2. アミノ酸下位分類

サブクラス	アミノ酸
酸性	アスパラギン酸、グルタミン酸
塩基性	非環式:アルギニン、リジン;環式:ヒスチジン
荷電	アスパラギン酸、グルタミン酸、アルギニン、リジン、ヒスチジン
小型	グリシン、セリン、アラニン、スレオニン、プロリン
極性/中性	アスパラギン、ヒスチジン、グルタミン、システイン、セリン、スレオニン
極性/大型	アスパラギン、グルタミン
疎水性	チロシン、バリン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファン
芳香族	トリプトファン、チロシン、フェニルアラニン
鎖配向に影響する残基	グリシンおよびプロリン

表 3. 例示的な好ましい保存的アミノ酸置換

元の残基	例示的な保存的置換	好ましい保存的置換
Ala	Val、Leu、Ile	Val
Arg	Lys、Gln、Asn	Lys
Asn	Gln、His、Lys、Arg	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser	Ser
Gln	Asn、His、Lys、	Asn
Glu	Asp、Lys	Asp
Gly	Pro	Pro
His	Asn、Gln、Lys、Arg	Arg
Ile	Leu、Val、Met、Ala、Phe	Leu
Leu	Ile、Val、Met、Ala、Phe	Ile
Lys	Arg、Gln、Asn	Arg
Met	Leu、Ile、Phe	Leu
Phe	Leu、Val、Ile、Ala	Leu
Pro	Gly	Gly
Ser	Thr	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr	Tyr
Tyr	Trp、Phe、Thr、Ser	Phe
Val	Ile、Leu、Met、Phe、Ala	Leu

表 4. コムギ SBEIIa 遺伝子のゲノム特異的プライマー

ゲノム	プライマー	領域	予想サイズ(bp)
A	SbeIIa_A_deb1F / SbeIIa_A_deb1R	エクソン 1～8	615
A	SbeIIa_A_deb2F / SbeIIa_A_deb1R	エクソン 1～8	604
A	SbeIIa_A_deb2F / SbeIIa_A_deb5R	エクソン 1～8	約 1039
A	SbeIIa_A_deb3F / SbeIIa_A_deb1R	エクソン 1～8	565
A	SbeIIa_A_deb4F / AR2aE8R07	エクソン 1～8	735
A	SbeIIa_A_deb5F / AR2aE8R07	エクソン 1～8	696
B	SbeIIa_B_R4 / BeIIaE1f	エクソン 1～8	B では約 600、A では約 800
D	SbeIIa_D_deb1F / SbeIIa_D_deb1R	エクソン 1～8	573
D	SbeIIa_D_deb1F / SbeIIa_D_deb2R	エクソン 1～8	539
D	SbeIIa_D_deb1F / SbeIIa_D_deb4R	エクソン 1～8	約 900
D	SbeIIa_D_deb2F / SbeIIa_D_deb4R	エクソン 1～8	約 900
D	SbeIIa_D_deb3F / SbeIIa_D_deb4R	エクソン 1～8	約 900
D	SbeIIa_D_deb4F / AR2aE8R07	エクソン 1～8	736
A	Snp1for/Arev5	エクソン 13～14	508
A	Afor4/del4rev	エクソン 12～14	863
A	Snp6for/Arev5	エクソン 14	205
A	Afor4/Snp6rev	エクソン 12～13	637
A	Afor4/del5rev	エクソン 12～14	872
B	Bsnp4/Arev5	エクソン 13-14	494
B	Afor4/Bsnp17rev	エクソン 12～14	905
B	Afor4/Bsnp18rev	エクソン 12～14	952
D	Afor4/Dsnp7rev	エクソン 12～14	901
D	Dsnp7for/Drev1	-	278
D	Afor4/Arev5	エクソン 12～14	802

表 5. SBEIIa のゲノム特異的プライマーのヌクレオチド配列

プライマー名	ヌクレオチド配列(5'から 3'方向)	配列番号
SbeIIa_A_deb1F	GTTCGATGCTGTTCCCCAG	36
SbeIIa_A_deb1R	AGCCGTTTGCTCCTCGATG	37
SbeIIa_A_deb2F	TTCCCCAGTTGATCTCCATC	38
SbeIIa_A_deb4F	CTTACTGAATACTGACCAGTTG	39
SbeIIa_A_deb5F	TTTATGATCTGGCTTTTGCATCCTA	40
SbeIIa_A_deb5R	GATGTTCCCCAAATTTGCATGAC	41
SbeIIa_B_deb4R	AATGCACAAGGCAGTGAAGTAG	42
SbeIIa_D_deb1F	CCCAATTGATCTCCATGAGT	43
SbeIIa_D_deb1R	AACCCCAAACGGTGCATTATG	44
SbeIIa_D_deb2F	CGGCTTTGATCATTCCTCG	45
SbeIIa_D_deb2R	GCTAGAATGCACATCCATCTGAT	46
SbeIIa_D_deb3F	GTAACTGCAAGTTGTGGCG	47
SbeIIa_D_deb4F	GCTTACTGAATACTGACCAGTTACTA	48
SbeIIa_D_deb4R	CCTTAATTCAAAATGAGCGAAAGC	49
snp1for	GGCTAACTGTTCCTGTTAAA	50
snp6for	GATGAGATCATGGACGATTC	51
snp6rev	AATAAATAATAATCACTTCG	52
Del4rev	GAGTAACAGCCTGATCCCAA	53
Del5rev	TAACAAAAAGAGTAACAGCC	54
Bsnp4	GTCAATCTGTTCTTACACG	55
Bsnp17 rev	CAAAAAGAGTAGTAACAGCT	56
Bsnp18 rev	CAAGGTATAAATTAGCATTC	57
D snp7 for	GTTTTATTTTGGGGATCAGT	58
D snp7 rev	CCCTAACAAAAAGTGTAACAGA	59
Afor4	ATCAGACCTTGTCACCAAAT	60
Arev5	GCACTTACATCTTCACCAATG	61
Drev 1	GCCTTCTGAAGCAATTGACAAG	62

表 6. 特にコムギ A ゲノムから SBEIIa 遺伝子の一部を増幅するようにデザインされたプライマー-検出された多形性および断片サイズ

プライマーコード	プライマー配列	SNP 詳細	Afor4	Arev5	rev6	配列番号
snp1for	GGCTAACTGTTCCTGTTAAA	追加の A/B および D	−	508		63
SNP1REV	CGACATGTGTAAGAACAGAT	追加の A/B および D	33	−		64
snp2for2a	GTCGATATTCTATTCTTATGT	t/D;a/B;a/B;c/BD	−	474		65
snp3for	CTTTTTTAGGGCACTGAAAT	c/B;c/B;c/BD	−	315		66
snp3reva	GTTATGATGCATAGCAATTA	c/BD	528	−		67
snp4for	TCTTAGATAGTTCCCTAGTAC	t/BD	−	245		68
snp4rev	CAGGTAAAATTGTACAAGCG	t/BD	599	−		69
snp5for	ACCTGATGAGATCATGGAC	a/BD	−	210		70
snp5for2	TACCTGATGAGATCATGGAC	a/BD	−	211		71
snp6for	GATGAGATCATGGACGATTC	a/BD;g/BD	−	205		72
snp6rev	AATAAATAATAATCACTTCG	t/B;a/B;g/B;g/BD	637	−		73
snp7for	TCTTTTTGTTAGGGGTAAG	追加の 3 つの最初の bp/D;BD 中の追加の act;a/BD	−	−	390	74
A for3	AGTTTGACCAAGTCTACTG		−	1050		75
Afor4	ATCAGACCTTGTCACCAAAT	t/D	−	802		76
Arev5	GCACTTACATCTTCACCAATG		802	−		77
Arev7	GTAGTTATAAGCAATATG		−	−		78
del1for	CATCAAGTGGTTTCAGTAAC	7bp の相違/BD	−	334		79
del1rev	GTTACTGAAACCACTTGATG		490	−		80
Del4for	TTGGGATCAGGCTGTTACTC	BD 中の追加の g;t=ABD;BD 中の追加の act	−	−		81
Del4rev	GAGTAACAGCCTGATCCCAA		863	−		82
Del5for	GGCTGTTACTCTTTTTGTTA	t/BD;追加の t;BD 中の追加の act;追加の ct	−	−		83
Del5rev	TAACAAAAAGAGTAACAGCC		872	−		84
Del3for	TTAACCAGTTAAGTAGTT	追加の cagt;追加の a;追加の D 中の ttaag および B 中の ttaatag	−	−	432	85
Del3rev1	AACTACTTAACTGGTTAA	追加の D 中の ttaag および B 中の ttaatag;追加の a;追加の actg	836	−		86
Del3rev2	GATCCCAAAATAAAACTACTT	追加の D 中の ttaag および B 中の ttaatag;追加の a	851	−		87
Del3rev3	CCCAAAATAAAACTACTT	追加の D 中の ttaag および B 中の ttaatag;追加の a	848	−		88

JP 2015-504301 A 2015.2.12

表 7. 特にコムギ B ゲノムから SBEIIa 遺伝子の一部を増幅するようにデザインされたプライマー-検出された多形性および断片サイズ

プライマーコード	プライマー配列	SNP 詳細	Arev5	Afor4	エクソン	配列番号
Bsnp1for	GTGGGATTCTCGTCTG	a/AD				89
Bsnp2	TTGGGAAGTATGTAGCTGC	ct/AD	546		13_14	90
Bsnp3	TTGGCTAACTGTTCCTGTC	t/AD	509		13_14	91
Bsnp4	GTCAATCTGTTCTTACACG	t/AD;A 中の追加の a;a/AD	494			92
Bsnp5	ATCTGTTCTTACACGTGTCA	a/AD;t/D;g/AD	494			93
Bsnp6	GTCAATATTCTATTCTTATA	t/D;g/AD;g/AD	474			94
Bsnp7	CTATTCTTATACAGGTATTA	g/AD;g/AD	465			95
Bsnp8	AACGCGAGATGGTGGCTTGAT	a/AD	430		half 13_14	96
Bsnp9	CAAGTGGTTTCAGTAACTTC	t/AD	331		14	97
Bsnp10	TGGTTTCAGTAACTTCTTC	t/AD;t/AD	327			98
Bsnp11	GGAAGATTGGAAGTGATTG	c/A;c/A;a/AD	195		14	99
Bsnp13	TGGAAGTGATTGTTATTAT	a/AD;ta/AD	188			100
Bsnp14	TTGCTTCTTGTTCTAGATGG	t/D;a/AD	155			101
Bsnp1rev	TTCCCAACTCCCATAGTGAAC	a/AD		290	half 12	102
Bsnp2rev	CAAATATGGTGACAGAAGTCG	tc/AD		322		103
Bsnp3rev	CACGTGTAAGAACAGATTG	a/AD;A 中の追加の a;t/AD		356		104
Bsnp4rev	AGAATAGAATATTGACAC	g/AD;t/D;g/AD		371		105
Bsnp6rev	GTAAGAATCTTAATACCTGT	g/AD;g/AD		396		106
B snprev7	CGCGTTTGACAGTAAGAATCTT	g/AD		405	13	107
Bsnp8rev	CCATCAAACTTATATTCA	a/AD		437		108
Bsnp9rev	CAATTGTTTCAGTGCCCTGAAG	t/A;t/AD;t/AD		539	12_13	109
Bsnp10rev	GCAATTGTTTCAGTGCCCTG	t/A;t/AD		540		110
Bsnp11rev	CTTAGAAGAAAAAATAATAAC	c/D;ta/AD;a/AD		673	12_13	111
Bsnp13rev	GCAAACTTAGAAGAAAAAA	t/D;c/D;a/AD		678		112
Bsnp14rev	CCATAGTTCCCAGTAAATGC	a/AD		713	12_13	113
Bextra1rev	CTACTATTAAATTAACTG	ct 追加/A、at 追加/AD、taa 追加/A、g/AD、actg 追加/D		868	12_14	114
Bsnp16 rev	ATCCCCAAAATAAAACTACTAT	c 追加/A,tat 追加/AB		880	12_14	115
Bsnp17 rev	CAAAAAGAGTAGTAACAGCT	ag 追加/D、agt 追加/A、a 追加/D、t/D、g/AD		905	12_14	116
Bsnp18 rev	CAAGGTATAAATTAGCATTC	c/AD		952	12_14	117
Bsnp19 rev	GCATTCTTATGAAAAGAC	c/ADc/AD		938	12_14	118

表 8. 特にコムギ D ゲノムから SBEIIa 遺伝子の一部を増幅するようにデザインされたプライマー - 検出された多形性および断片サイズ

プライマーコード	プライマー配列	SNP 詳細	Arev5	Drev 1	Afor4	配列番号
D snp1for	TCTGTTCTTACACATGTT	c/AB	489	798	–	119
D snp1for/A	CTTTTTTAGGGCACTGAAAC	c/B;c/B;t/A	315	624	–	120
Dsnp2 for	GATTATTATTTATTTTCCTTCTAAGTTTGT	g/B;at/B;t/AB;cAB	184	490	–	121
Dsnp2bfor	ACCTGATGAGATCATGGAAGATTG	c/A;c/A	210	519	–	122
D snp 3 for	GTGATTATTATTTATTTTC	g/B;at/B;t/AB;cAB	183	492	–	123
D snp 4 for	TTATTTTCCTTCTAAGTTTGT	at/B;t/AB;c/AB	172	481	–	124
D snp5for	GTGATTATTATTTATTTTC	g/B;at/B;t/AB	137	446	–	125
D snp6for	TGATGCGGTAGTTTACTTGATGT	g/B;a/B;c/AB	89	398	–	126
D del1for	GATTTTTAACTAGTTAAGTAGTT	t/B;cagt/AB;a/AB;t/B;at/B;A 中の del	–	298	–	127
D snp7 for	GTTTTATTTTGGGGATCAGT	A 中の del g;a/B;g/AB	–	278	–	128
D snp1 rev	CCTGCATAAGAATAGAATATCA	t/A;a/B;c/AB	–	–	379	129
D snp1a rev	CATGTTATGATGCATAGCAATTG	t/A	–	–	556	130
D snp2 rev	GTAAATGTCATCTAGAACAAGAAA	g/B;c/AB	–	–	701	131
D snp3 rev	CAAGAAACAAACTTAGAAGG	c/AB;t/AB	–	–	684	132
D snp4 rev	ACAAACTTAGAAGGAAAATAA	c/AB;t/AB;at/B	–	–	678	133
D snp5 rev	CATCAGTAGCAAATCCAAAATAT	g/AB	–	–	739	134

JP 2015-504301 A 2015.2.12

表 9. コムギ SBEIIb 遺伝子のゲノム特異的プライマー

ゲノム	プライマー	予想サイズ(bp)
A	SbeIIb_A_deb1F / 2R	741
A	SbeIIb_A_deb1F / 4R	1007
A	SbeIIb_A_deb4F / 4R	772
B	SbeIIb_B_deb3F / 2R	615
B	SbeIIb_B_deb2F / 3R	929
B	SbeIIb_B_deb3F / 4R	772
D	SbeIIb_D_deb1F / 1R	1126
D	SbeIIb_D_deb3F / 3R	827
D	SbeIIb_D_deb4F / 4R	669

表 10. SBEIIb のゲノム特異的プライマーのヌクレオチド配列

プライマー名	ヌクレオチド配列 (5'から 3'方向)	配列番号
SbeIIb_A_deb1F	ACCCCGTAATTATTGGCGCT	135
SbeIIb_A_deb4F	ACTCTGATGATCTGAAGGTAG	136
SbeIIb_A_deb2R	TCATGCAGGCAGGTACTAG	137
SbeIIb_A_deb4R	GTGGCAGAATGCGTAATTTCTCT	138
SbeIIb_B_deb2F	CAGCGATCTTACGTTCCCTA	139
SbeIIb_B_deb3F	ATGTCTGTAGGTGCCGTCA	140
SbeIIb_B_deb2R	CAACAAATTAGAAAGAGGATATTCC	141
SbeIIb_B_deb3R	CCGTAGATGATTCTTTGTCCATTA	142
SbeIIb_B_deb4R	ATGGAACCTAACACAATGTGC	143
SbeIIb_D_deb1F	GCGCCACCTTTCTCACTCA	144
SbeIIb_D_deb3F	CGGTCCCGTTCAGTTCGAT	145
SbeIIb_D_deb4F	CCTGAGTAAATACTGCCACCA	146
SbeIIb_D_deb1R	AGAATGCGTAATTTCTCCCTCG	147
SbeIIb_D_deb3R	TGTCTTCAGCATCAATTTCTTCAC	148
SbeIIb_D_deb4R	CTGTAGGCTTGTTTCATCATCA	149

表 11. コムギの RNAi 系の SBEII 発現 - 対 - アミロース含有量

選択系	コンストラクト	アミロース%	WT(%)に対する SBEIIa 発現	WT(%)に対する SBEIIb 発現	全 SBEII 発現(WT%)
673.2.1	**hp-combo**	**35**	**108**	**91**	**100**
679.5.3	**hp-combo**	**40**	**81**	**1**	**41**
670.1.4	**hp-combo**	**45**	**35**	**10**	**23**
672.2.3	**hp-combo**	**50**	**16**	**1**	**9**
671.2.2	**hp-combo**	**55**	**8**	**5**	**7**
666.2.2	**hp-combo**	**60**	**10**	**6**	**8**
669.1.2	**hp-combo**	**65**	**9**	**7**	**8**
684.2.3	**hpc-SBEIIa**	**70**	**6**	**10**	**8**
677.1.2	**hp-combo**	**75**	**4**	**1**	**3**
684.2.1	**hpc-SBEIIa**	**80**	**3**	**5**	**4**
694.3.3	**hpc-SBEIIa**	**85**	**2**	**3**	**3**

表 12. 変異株中で試験されたマイクロサテライトマーカーの一覧

染色体 2A	染色体 2B	染色体 2D
gwm 304	**barc 128**	**gwm 539**
gwm 328	**gwm 129**	**cfd 270**
barc 309	**wmc 265**	**cfd 168**
cfa 2043	**wmc 272**	**cfd 233**
cfa 2058	**gwm 388**	**wmc 175**
wmc 170	**wmc 441**	**wmc 181**
gwm 312	**barc 101**	**wmc 041**
gwm 294	**gwm 120**	**cfd 239**
wmc 181	**gwm 130**	**gwm 349**
gwm 356	**gwm 526**	**barc 219**
gwm 265	**gwm 501**	**gwm 382**
wmc 181	**wmc 332**	**wmc 167**
gwm 311	**wmc 434**	**gwm 320**
gwm 382	**wmc 361**	**gwm 301**
cfa 2086	**gwm 382**	**cfd 50**
	wmc 317	**barc 159**
	wmc 445	

表 13. HIB 個体数およびマイクロサテライトマッピングデータから同定された変異株

変異型	ゲノム	変異株番号	マイクロサテライトマッピング (保持マーカー/試験マーカー)
タイプ 1	A	20-257 (H7)	15/15
		19-119 (G3)	5/11
		12-178	10/10
		5-563	10/10
		21C-880D	4/10
	B	12-679	7/15
		5-173	15/15
		13-963 (F10)	4/11
		18c-109	8/8
		3-159	3/8
	D	19-832 (A6)	13/13
		22-578 (B5)	13/13
		3-909 (D1)	7/13
		19b-918 (C11)	未試験
タイプ 2	A	20b-5B2-608 (H2)	10/10
		19c-342	9/10
		19-744	12/12
	B	21-142 (F6)、	15/15
		21-668 (D2-2)	15/15
		20-365	15/15
		19-220	14/15
		21b-4B2-345 (A8)	11/11
		20-141	9/11
	D	12-801	13/13
		5-706	13/13
		19c-905	未試験
		18b-505	未試験
タイプ 3	A	18-111/3 (D2-1)	8/11
		19-861 (F9)	8/11
		20-791 (G10)	12/12
	B	19b-55 (G7)	11/11
	D	18-96 (E12)	18/18
		18b-120 (E3)	未試験
		18b-190 (C12)	未試験

表 14. 同定された SBEII の二重 null 変異株

交雑名	親系統(親の遺伝子型)	二重 null の遺伝子型	同定された二重 null の数
08/a	**20-257 (A1) X 5-173 (B1)**	**A1B1**	**6**
08/b	**20-257(A1) X 19-832 (D1)**	**A1D1**	**2**
08/c	**19-832 (D1) X 5-173 (B1)**	**B1D1**	**0**
08/d	**21-142 (B2) X 12-801 (D2)**	**B2D2**	**4**
08/e	**21-142 (B2) X 5-706 (D2)**	**B2D2**	**8**
08/f	**20-365 (B2) X 12-801(D2)**	**B2D2**	**4**
08/g	**21-668 (B2) X 5-706 (D2)**	**B2D2**	**6**
08/h	**20-257 (A1) X 21-142 (B2)**	**A1B2**	**2**
08/i	**20-257 (A1) X 12-801 (D2)**	**A1D2**	**5**
08/j	**18-111/3 (A3) X 18-96 (D3)**	**A3D3**	**2**
08/k	**18-111/3 (A3) X 5-173 (B1)**	**A3B1**	**3**
08/l	**18-96 (D3) X 5-173 (B1)**	**B1D3**	**1**

表 15. 二重および単一 null 変異株間で実施された交雑

交雑名	**親 1 コード**	**P1 遺伝子型**	**親 2 コード**	**P2 遺伝子型**	**可能な F2 遺伝子型**
08/aa	5-173	B1	08/b-18	A1D1	A1B1D1
08/aa-2	5-173	B1	08/b-33	A1D1	A1B1D1
08/bb	5-706	D2	08/h-92	A1B2	A1B2 D2
08/dd	5-706	D2	08/h-111	A1B2	A1B2 D2
08/ee	5-173	B1	08/b-12	A1D1	A1B1D1
08/ff	21-142	B2	08/b-12	A1D1	A1B2D1
08/gg	20-365	B2	08/b-12	A1D1	A1B2D1

表 16. 二重および単一 null 変異株間の交雑からの子孫の穀粒デンプン中のアミロース含有量

系統	**遺伝子型**	**アミロース%**
HIB 変異株	三重 null 交雑の F2	67.38
Cadoux	WT	35.4
85.2c	hp-SBEIIa	74.99
008(IIb ノックアウト)	hp-SBEIIb	36.1
Chara	WT	36.09

表 17. F2 子孫植物の稔性観察

系統 ID	遺伝子型	％稔性穂	穂あたり種子数
08/dd S28	A1D2(hetB2)	41.9	17.0
08/dd S14	A1B2(hetD2)	75.3	26.3
08/dd S22	A1D2(hetB2)	56.5	19.0
08/dd S24	B2D2(hetA2)	61.1	16.0
08/dd-2 D7	A1B2	84.2	37.3
08/dd-2 F1	B2	93.2	50.7
08/dd-2 G7	A1D2	92.6	49.7
08/dd-2 A1	B2D2	91.5	44.3
08/dd-2 F4	D2	84.4	45.7
08/dd-2 D5	wt	95.3	49.0

表 18.複数の SBEIIa および SBEIIbnull 対立遺伝子がある変異株の SBEII 対立遺伝子の組成

植物遺伝子型	A、B、および D ゲノムに存在する野生型 SBEIIa 対立遺伝子数						存在する野生型 SBEIIa 対立遺伝子の総数	A、B、および D ゲノムに存在する野生型 SBEIIb 対立遺伝子数						存在する野生型 SBEIIb 対立遺伝子の総数	存在する野生型 SBEIIa および SBEIIb 対立遺伝子の総数	アミロース含有量%
	A	A	B	B	D	D		A	A	B	B	D	D			
A1(+/-)B2D2	1	-	-	-	-	-	1/6	1	-	1	1	1	1	5/6	6/12	67% (プールされた)
A1B2D2(+/-)	-	-	-	-	1	-	1/6	-	-	1	1	1	1	4/6	5/12	67% (プールされた)
A1B2(+/-)D2	-	-	1	-	-	-	1/6	-	-	1	1	1	1	4/6	5/12	67% (プールされた)
B2D2	1	1	-	-	-	-	2/6	1	1	1	1	1	1	6/6	8/12	33.0～36.8
A1B2	-	-	-	-	1	1	2/6	-	-	1	1	1	1	4/6	6/12	33.9～34.9
A1D2	-	-	1	1	-	-	2/6	-	-	1	1	1	1	4/6	6/12	32.2～37.0
A1B1	-	-	-	-	1	1	2/6	-	-	-	-	1	1	2/6	4/12	34.1～34.7
A1D1	-	-	1	1	-	-	2/6	-	-	1	1	-	-	2/6	4/12	32.8～38.7
A3D3	1	1	1	1	1	1	6/6	-	-	1	1	-	-	2/6	8/12	30.8～31.6
A3B1	1	1	-	-	1	1	4/6	-	-	-	-	1	1	2/6	6/12	31.4
B1D3	1	1	-	-	1	1	4/6	1	1	-	-	-	-	2/6	6/12	30.3

表19. コムギ*(cv. Sunstate)*のアジ化物-変異誘発群から同定した*SNP*変異株の要約

変異株名称	ウエスタンバンドパターン				評価した変異		
	バンド1 (D)	バンド2 (B)	バンド3 (A)	新バンド	塩基多型(エクソン影響; アミノ酸置換)	ゲノム	変異指定
4-85	1	1	0	なし	評価予定	A	A2n
7-25	0	1	1	なし	エクソン21;配列番号3中のS772F	D	D2p
6-60	1	0	1	なし	GからA、*SBEIIa-B* イントロン6の最初の塩基(スプライス部位変異)	B	B2n
3-3	1	1	0/弱い	なし	評価予定	A?	A2p
1-55	1	1	0	高親和性A	エクソン20;配列番号1中のE734K	A	A2p
2-120	1	0	1	低親和性B	エクソン18;配列番号2中のG674D	B	B2p
9-94	1	0	1	低親和性B	評価予定	B?	B2p
4-29	1	1	0	1(低親和性)	エクソン11;配列番号1中のS374N	A	A2p
9-36	1/0	1	1/0	なし	評価予定	A/D?	?
3-70	0	1	1	変化した親和性	評価予定	D?	Dp?
16-11A	1	0	1		評価予定	B	B2n
15-3D	0	1	1	高親和性D	エクソン15;配列番号3中のD536N	D	D2p
16-3C	1	1	0		評価予定	A	A2n
16-9C	0	1	1	低親和性D	エクソン17;配列番号3中のT619I	D	D2n
13-9D	0	1	1	低親和性D	エクソン17;配列番号3中のG641D	D	D2p
20-5A	1	1	0		評価予定	A?	A2n
22-9G	1	0	1	低親和性B	エクソン10;配列番号2中のD335N	B	B2p
21-1C	0	1	1	なし	評価予定	D?	D2n

tbd: to be determined

表20. *SBEIIa* 三重ヌル変異株のアミロース含有量

系統	交雑/遺伝子型	アミロース% （3回の平均±標準偏差）
CS3-A2	08/h-92 (A1B2) X 7_25 (D2)	69.5 ± 3.1
CS2_F11	08/i-G3 (A1D2) X 6_60 (B2)	85.3 ± 1.7
Sunstate	WT	32.9 ± 0.3
85.2c (2102)	RNAi SBEIIa	75.1 ± 1.8
NB1	コントロール(野生型)	32.8 ± 0.8
85.2c (2007)	RNAi SBEIIa	72.9 ± 0.2
85.2c (2006)	RNAi SBEIIa	72.2 ± 2.9
008	RNAi SBEIIb	33.4 ± 0.8

表21. *SBEIIa* 三重ヌル変異株のアミロース含有量

ID番号	系統	アミロース% （3回の平均±標準偏差）
Sunstate	WT 1	32.92±1.1
CS2-E6	6-60 X 08/i-G3-E6	84.37± 3.8
CS2-C6/4	6-60 X 08/i-G3-C6-4	83.89± 3.7
CS1-G12/15	6-60 X 08b-18- G12-15	81.78± 2.6
CS3-F9 (New)	7-25 x 08/h-92-F9	70.25± 1.3
CS3-F9 (old)	7-25 x 08/h-92-F9	67.68± 3.1
CS3-C3	7-25 x 08/h-92-C3	66.87± 1.4
CS3-C10	7-25 x 08/h-92-C10	68.62± 0.7
85.2c	RNAi SBEIIa	76.78± 3.1
CS2-F11	6-60 X 08/i-G3-E6-F11	86.05± 3.2
NB1	WT-2	32.98± 1.0

表22. *SBEIIa* 三重ヌル変異株のアミロース含有量

系統 ID	遺伝子型	平均アミロース含有量（±標準偏差）
CS1-G12/3	A1B2 二重ヌル	53.6± 2.2
CS10-C12	A2B2D2	67.4± 1.9
CS1-G12/21	A1B2D1	74.0± 2.8
CS1-G12/6	A1 単一ヌル	39.5 ±3.4
CS1-G12/10	A1B2D1	82.9 ±2.4
CS2-F11	A1B2nD2	84.2± 3.5
CS1-G12/19	A1B2D1	80.1± 1.4
CS1-G12/4	A1B2 二重ヌル	50.4± 1.9
Sunstate	WT	27.2± 1.0
CS3-A2	A1B2D2p	65.8± 2.4
CS3-C10	A1B2D2p	66.4± 0.9
85.2c	RNAi SBEIIa	72.4± 3.5

表23. 三重ヌル *SBEIIa* 植物に関する予備的な農学的データ

系統ID（F2植物/F3種子）	交雑	植物の高さ (cm)	スパイクの数	結実/スパイクレット数	平均種子重量（種子5個） (mg)	植物あたりの全種子数	植物あたりの全種子重量 (g)
CS3- C3	MC7-25 (D2) x 08/h-92 (A1B2)	93	3	32/34, 29/32, 24/26	42.8	101	3.86
CS3- C10	MC7-25 (D2) x 08/h-92 (A1B2)	75	3	33/33	41.7	72	2.84
CS3-F8-コントロール	MC7-25 (D2) x 08/h-92 (A1B2)	89	3	17/19, 20/22, 12/14	42.1	61	2.65
CS3-F9	MC7-25 (D2) x 08/h-92 (A1B2)	78	5	26/28,20/26,16/18	40.5	105	3.43
CS3-A2	MC7-25 (D2) x 08/h-92 (A1B2)	79	3	26/28,24/26,29/30	40.7	116	4.69
CS2-F11	MC6-60 x 08/i-G3	85	4	26/28,19/21,20/22	39.4	85	2.56
CS2-B12 コントロール	MC6-60 x 08/i-G3	82	4	32/34, 34/36, 32/32	44.6	139	6.20
CS1-G12/15	08/b-18 (A1D1) x MC6-60 (B2)	81	6	18/30, 20/28, 10/22	43.7	81	3.54
CS1-G12/21	08/b-18 (A1D1) x MC6-60 (B2)	71	3	5/18, 6/20, 3/16	40.2	16	0.64
CS1-G12/10	08/b-18 (A1D1) x MC6-60 (B2)	81	10	4/16, 2/18, 7/18	45.1	22	9.92
CS1-G12/19	08/b-18 (A1D1) x MC6-60 (B2)	60	4	高い繁殖不能性	-	15	-
CS2-E6	MC6-60(B2) x 08/i-G3 (A1D2)	63	9	18/24, 15/24, 7/24	46.5	117	5.44
CS2-C6/4	MC6-60(B2) x 08/i-G3 (A1D2)	83	9	35/38, 32/34, 21/24	34.2	254	8.64

表24. 遺伝子組み換えコムギ系統由来の穀粒デンプンのデンプン評価

系統ID	標的酵素	複屈折性			ヨウ素定量法で見積もったアミロース含有量	SECで測定したアミロース含有量	デンプン含有量	デンプン膨潤力
		なし (%)	部分 (%)	完全 (%)	(%)	%	(% w/w)	
NB1	形質転換なし	1.6	3.5	94.9	31.8	25.5	52.0	9.31
SBEIIa-	SBEIIa	94.5	4.0	1.5	88.5	74.4	43.4	3.51
SBEIIb-	SBEIIb	0.6	5.21	94.1	27.3	32.8	50.3	10.74
LSD (5%)		9.02	3.3	9.9	7.7	nd	4.9	

表 25. コムギ遺伝子組換え系からのデンプン画分の分子量分布

系統	推定分子量(kDa)		
	アミロペクチン	高 MW アミロース	低 MW アミロース
野生型(対照)	45523.3 ± 2605.3	420.4 ± 23.2	8.56 ± 0.2
SBEIIb の低下	43646.4 ± 5259.6	409.6 ± 7.8	8.76 ± 0.1
SBEIIa および SBEIIb の低下	7166.1 ± 166.5	422.7 ± 26.8	9.70 ± 0.1

表 26. hp5'-SBEIIa 遺伝子組換えコムギデンプンの RVA パラメータ

系統 ID	コンストラクト	ピーク 1	最初のトラフ値	崩壊	最終粘度	セットバック	ピーク時間	糊化温度(℃)
対照	なし	225.08	180.83	44.25	318	137.17	10	85.3
SBEIIa	hp5'-BEIIa	27.08	17.5	9.58	22.92	5.42	12.73	*

*SBEIIa 低下穀粒(85.2c 系)からのデンプンは、RVA 操作で使用される温度プロファイルで糊化しなかった

表 27. 対照 NB1 と比較した hp5'-SBEIIa 遺伝子組換えコムギデンプンの糊化ピークの DSC パラメータ

系統 ID	コンストラクト	開始℃	ピーク℃	終了℃	ΔH
NB1	対照	57.93	61.16	66.61	5.036
85.2c	hp5'-SBEIIa	57.38	63.51	72.61	2.385

表 28. 圧延および圧扁穀粒製品中の RS 含有量

処理番号	系統	ローラー幅	蒸煮時間(分間)	%RS (g/100g 製品)
HWFP03	HAW	広幅	60	13.3
HWFP05	HAW	広幅	45	14.1
HWFP08	HAW	狭幅	35	13.7
HWFP09	HAW	広幅	35	16.1
HWFP11	HAW	狭幅	60	13.1
HWFP12	HAW	狭幅	45	11.4
HWFP01	Hartog	狭幅	60	0.6
HWFP02	Hartog	広幅	60	0.6
HWFP04	Hartog	広幅	45	0.5
HWFP06	Hartog	狭幅	45	0.4
HWFP07	Hartog	狭幅	35	0.1
HWFP10	Hartog	広幅	35	0.2

表 29. 様々なレベルで高アミロースコムギ(HAW)を組み込んだ食品製品中の難消化性デンプン含有量

製品タイプ	難消化性デンプン(g/100g 製品)											
	組み込みレベル											
	0%		20%		40%		60%		80%		100%	
	対照	HAW	対照	HAW	対照	HAW	対照	HAW	対照	HAW	対照	HAW
S & D パン	NT	NT	0.45	1.33	0.40	2.1	0.30	2.9	NT	NT	NT	NT
YAN	0.4	0	0.2	0.7	0	1.1	0.2	1.2				
スパゲティ			0.3	1.3	0.1	2	0	2.9	0.1	4	0	6
即席麺	0.4	0.4	0.3	0.8	0.2	1.4	0.2	1.6	NT	NT	NT	NT
食パン	NT	NT	0.6	1.7	NT	NT	0.6	3.7	NT	NT	1	5.2
フレーク	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	0.2	16.1

NT:試験されず

表 30. ゲノム特異的プライマー

SbeIIa SeqId	プライマー対	カバーされるエクソン
IIaA2_3	SbeIIa_A_deb2F / SbeIIa_A_deb5R	2、3
IIaA6_7_8	SbeIIa_A_deb4F / AR2aE8R07	6、7、8
IIaA12_14	Del5rev/Afor4	12,14
IIaB2_3	SbeIIa_Bdeb7F / BeIIaE3r	2、3
IIaB12_14	BSNP17rev/Afor4	12、14
IIaB21_22	Sbe2a_Bfin-F2 / BeIIaE22r	21、22
IIaD2_3	SbeIIa_D_deb1F / SbeIIa_D_deb4R	2、3
IIaD6_7_8	SbeIIa_D_deb4F / AR2aE8R07	6、7、8
IIaD12_14	DSNP7rev/Afor4	12、14
IIaD18_20	Sbe2a_Dfin-F1 / Sbe2a_Dfin-R3	18、20

表31. *Arche* および *Apache* 群より選択した点変異株

コムギ栽培品種	変異株コード	同型接合植物の数	植物の総数	ゲノム	Blosum 62	Pam 250	エクソン
Arche	Arb_177-M2	1	2	A	-3	-3	E12-14
Apache	ApA_2442	2	5	B	0	1	E12-14
Apache	ApA_1092	1	10	B	SM	SM	E12-14
Apache	ApA_2071	1	5	B	-2	-3	E2-3
Apache	ApA_0613	1	5	B	-2	-3	E2-3
Apache	ApA_1512	3	10	B	SM	SM	E21-22
Apache	ApC_4527	1	5	B	-1	1	E21-22
Apache	ApA-1000	3	12	B	STOP	STOP	E12-14
Arche	Arb_344-M2	1	3	B	1	1	E21-22
Apache	ApC_5372	2	5	D	-1	1	E12-14
Apache	ApA_1205	2	5	D	-2	-3	E12-14
Apache	ApA_1482	3	10	D	SM	SM	E12-14
Apache	ApC_4483	1	4	D	-2	0	E18-20
Apache	ApB_2719	2	10	D	SM	SM	E2-3
Apache	ApC_4058	2	9	D	SM	SM	E2-3
Apache	ApA_0958	2	3	D	-2	0	E2-3
Apache	ApA-1878	16	44	D	STOP	STOP	E12-14
Arche	Ara-0255-M2	2	3	D	1	2	E2-3
Arche	Arb_147-M2	3	3	D	-1	1	E6-7-8

表32. 二重ヌル *(HIB* 欠失*)* 変異株との交雑のために選択した点変異株

元の点変異株	ゲノム	点変異株の型	エクソン	二重HIB変異株との交雑のために選択した同型接合変異植物
Arb_177	A	タンパク質配列の変化	E12-14	点変異 224
ApA_1092	B	スプライス変異	E12-14	点変異 78
ApA_1512	B	スプライス変異	E21-22	点変異 123, 125, 125
ApA-1000	B	ストップコドン	E12-14	点変異 5, 7, 10
ApA-1878	D	ストップコドン	E12-14	点変異15, 17, 18, 19, 21, 22, 24, 33, 36, 37, 41, 42, 46, 50, 52, 65
ApA_1482	D	スプライス変異	E12-14	点変異 112
				点変異 115
				点変異 117
ApB_2719	D	スプライス変異	E2-3	点変異 173
				点変異 174
ApC_4058	D	スプライス変異	E2-3	点変異 177
				点変異 178

表33. 単一SBEIIa点変異株および二重ヌル(欠失)変異株間の交雑からのF1種子生産

HIB変異株IDコード	HIB SBEIIa二重変異株の状態		点変異株IDコード	点変異株の型	栽培品種	F1種子
430	A1	D2	点変異5	ストップコドン-Bゲノム	Apache	25
431	A1	D2	点変異5			22
445	A1	D2	点変異5			24
422	A1	D2	点変異7			29
73	A1	D2	点変異10			23
420	A1	D2	点変異10			26
443	A1	D2	点変異10			28
420	A1	D2	点変異123	スプライス部位変異-Bゲノム	Apache	33
435	A1	D2	点変異123			11
438	A1	D2	点変異123			29
73	A1	D2	点変異123			18
38	A2	D2	点変異5	ストップコドン-Bゲノム	Apache	13
448	A2	D2	点変異5			11
39	A2	D2	点変異7			29
413	A1	B2	点変異15	ストップコドン-Dゲノム	Apache	30
412	A1	B2	点変異19			22
380	A1	B2	点変異21			24
368	A1	B2	点変異22			28
405	A1	B2	点変異22			18
412	A1	B2	点変異22			13
374	A1	B2	点変異33			30
368	A1	B2	点変異36			18
410	A1	B2	点変異36			12
409	A1	B2	点変異37			7
380	A1	B2	点変異37			13
154	A1	B1	点変異41			24
367	A1	B2	点変異41			19

367	A1	B2	点変異42			33
397	A1	B2	点変異42			19
405	A1	B2	点変異56			21
396	A1	B2	点変異112	スプライス部位変異-Dゲノム	Apache	24
405	A1	B2	点変異112			24
412	A1	B2	点変異115			25
459	B2	D2	点変異224	変化したタンパク質配列-Aゲノム	Arche	2
790	A1	D2	797	変化したタンパク質-Bゲノム	Sunstate	39
38	A2	D2	797			25
422	A1	D2	797			4
412	A1	B2	798	変化したタンパク質-Dゲノム		15
791	A1	B2	798			26
792	A1	B2	798			11
793	A1	B2	798			64

表34. 単一*SBEIIa*点変異株および二重ヌル*(HIB*欠失*)*変異株間の交雑からの*F2*種子の*NIRS*スクリーニング

交雑コード	元の点変異株コード	点変異株の型	点変異株コード	HIB変異株コード	HIB変異株の状態			重量(g)	種子の数	HAW種子の数
BD70	MC6-60	変化したタンパク質Bゲノム	797	38	A1		D2	31	712	28
BD71				422	A1		D2	17	337	14
BD73				790	A1		D2	42	1104	83
BD72	MC7-25	変化したタンパク質Dゲノム	798	412	A1	B2		45	1016	44
BD74				791	A1	B2		39	2204	34
BD75				792	A1	B2		41	1023	13
BD76				793	A1	B2		35	859	36
BD77	APA-1000	ストップコドンBゲノム	TIL 5	38	A2		D2	47	1348	89
BD78				430	A1		D2	51	1543	79
BD80				445	A1		D2	38	1052	54
BD81				448	A2		D2	40	1194	67
BD82			TIL 7	39	A2		D2	53	1684	105
BD83				422	A1		D2	52	1689	69
BD84			TIL 10	73	A1		D2	56	1681	60
BD85				420	A1		D2	58	1947	140
BD86				443	A1		D2	59	1936	161
BD87	APA_1512	スプライス部位変異-Bゲノム	TIL 123	420	A1		D2	62	1993	136
BD88				435	A1		D2	37	1142	62
BD89				438	A1		D2	67	2125	114
BD90				73	A1		D2	52	1727	97
BD91	APA-1878	ストップコドン-Dゲノム	TIL 15	413	A1	B2		61	2092	128
BD92			TIL 19	412	A1	B2		30	1064	47
BD93			TIL 21	380	A1	B2		34	1129	44
BD94			TIL 22	368	A1	B2		36	1241	35
BD95				405	A1	B2		40	1259	50
BD96				412	A1	B2		36	1017	43
BD97			TIL 33	374	A1	B2		35	493	31
BD98			TIL 36	368	A1	B2		42	1406	16
BD99				410	A1	B2		54	1662	102

BD100			TIL 37	409	A1	B2		16	493	13
BD101				380	A1	B2		44	1434	52
BD102			TIL 41	154	A1	B1		33	967	46
BD104			TIL 42	367	A1	B2		50	1577	57
BD105				397	A1	B2		29	921	37
BD106			TIL 56	405	A1	B2		35	1120	41
BD107	APA_1482	スプライス部位変異-Dゲノム	TIL 112	396	A1	B2		30	946	17
BD108				405	A1	B2		39	1242	29
BD109			TIL 115	412	A1	B2		37	865	20
BD111	Arb_177	変化したタンパク質配列-Aゲノム	TIL 224	459		B2	D2	1	30	0
TOTAL									**49856**	**2296**

表35. HAW *SBEIIa* 三重ヌル穀粒の、コントロール穀粒および RNAi 参照系統85.2cと比較したアミロース含有量および千粒重 (TKW)

系統	千粒重	コントロール系統と比較したアミロース%増加
Ctrl1	55	
Ctrl2	52	
GM 85.2c	-	58
HAW12-090	49	158
HAW12-057	50	155
HAW12-081	50	110
HAW12-034	41	147
HAW12-050	42	150
HAW12-044	47	151
HAW12-046	46	138
HAW12-014	53	48
HAW12-003	52	31

【０４５８】

引用文献

Abel et al., The Plant Journal 10: 981-991, 1996
Altschul et al., Nucl. Acids Res. 25:3389, 1997

Alvarez et al., Plant Cell 18: 1134-1151, 2006
Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons Inc, Chapter 15, 1994-1998
Baga et al., Plant Mol Biol. 40(6): 1019-1030, 1999
Batey and Curtin, Starch 48: 338-344, 1996
Batey et al., Cereal Chemistry 74: 497-501, 1997
Bechtold et al., C.R. Acad. Sci. Paris, 316:1194, 1993
Bekes et al., Crit Care Med. 30(8): 1906-1907, 2002
Blauth et al., Plant Physiology 125: 1396-1405, 2001
Botticella et al., BMC Plant Biology 11: 156, 2011
Boyer and Preiss, Carbohydrate Research, 61: 321-334, 1978
Boyer and Preiss, Plant Physiology 67: 1141-1145, 1981
Boyer et al., Starch 32: 217-222, 1980
Cao et al., Archives of Biochemistry and Biophysics, 373: 135-146, 2000
Case et al., Journal of Cereal Science 27: 301-314, 1998
Cheng et al., Plant Physiol 115: 971-980, 1997
Comai et al., Plant J. 37: 778-786, 2004
Craig et al., Plant Cell 10: 413-426, 1998
Delwiche et al. Cereal Chem. 83(3):287-292, 2006
Dowell et al Cereal Chem. 86(3):251-255, 2009
Durai et al., Nuclieic Acids Research 33(18): 5978-5990, 2005
Eagles et al., Aust. J. Agric. Res. 52: 1 349-1356, 2001
Fergason, Speciality Corns eds, CRC Press Inc. pp 55-77, 1994
Fisher et al., Plant Physiol 102: 1045-1046, 1993
Fisher et al., Journal Plant Physiol. 108(3): 1313-1314, 1995
Fuwa et al., Starch-Staerke 51: 147-151, 1999
Gao et al., Plant Cell, 10: 399-412, 1998
Gao et al., Plant Physiol 114: 69-78, 1997
Goddard et al., Am J Clin Nutr 39: 388-392, 1984
Gras et al., In: Proc. ICC 11th Int. Cereal and Bread Congress. RACI: Melbourne, 2001b
Green et al., Plant Physiol 114: 203-212, 1997
Harayama, Trends Biotechnol. 16: 76-82, 1998
Hartmann and Endres, Manual of Antisense Methodology, Kluwer, 1999
Hayashi et al., Effects of ion beam irradiation on mutation induction in rice. Cyclotrons and Their Applications 2007, Eighteenth International Conference 237-239, 2007
Hedman and Boyer, Biochemical Genetics 20: 483-492, 1982
Henikoff et al., Plant Physiol. 135: 630-636, 2004
Hinchee et al., Biotech., 6: 915, 1988
James et al., Plant Cell, 7: 417-429, 1995
Jobling et al., Plant Journal 18: 163-171, 1999
Kanna and Daggard, Plant Cell Rep 21: 429-436, 2003
Kawasaki et al., Mol Gen Genet. 237(1-2): 10-6, 1993
Kazama et al., Plant Biotechnology 25: 113-117, 2008
Kim et al., Plant Physiol. 121(1): 225-236, 1999
Kim et al., Gene. 216(2): 233-43, 1998a
Klein et al., Nature 327: 70, 1987
Konik-Rose et al., Starch-Staerke, 53: 14-20, 2001
Krueger et al., Cereal Chemistry 64: 187-190, 1987

Kubo et al., Plant Physiology, 121: 399-409, 1999
Langridge et al., Aust. J. Agric. Res. 52: 1043-1077, 2001
Lazo et al., Biotechnology (N Y). 9(10): 963-967, 1991
Le Provost et al., Trends in Biotechnology 28(3): 134-141, 2009
Li et al., Plant Physiology, 120: 1147-1155, 1999a
Li et al., Theoretical and Applied Genetics, 98: 1208-1216, 1999b
Li et al., Plant Physiology, 123: 613-624, 2000
Liu et al., Biotechnology and Bioengineering, 106: 97-105, 2010
Mann et al., In 'Workshop on gluten proteins' Eds. Lafiandra et al., The Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK, pp. 215-218, 2003
Mann, New crop phenomenon in wheat and the mechanisms involved, PhD thesis, University of Reading, UK, 2002
McCallum et al., Nat Biotechnol 18:455-457, 2000
McClure, J. Near Infrared Spectrosc. 11, 487-518, 2003
McCreery and Helentjaris, Methods in Molecular Biology, Vol. 28: Protocols for nucleic acid analysis by non-radioactive probes, Humana Press Inc., Totawa, NJ., pp 67-71, 1994
Mizuno et al., Journal of Biological Chemistry 268: 19084-19091, 1993
Morell et al., Electrophoresis 19: 2603-2611, 1998
Morell et al., Plant J. 34: 173-185, 2003
Morell et al., Plant Physiol 113: 201-208, 1997
Morrison and Laignelet, J Cereal Sci, 1: 9-20, 1983
Moullet et al., Theor Appl Genet 99: 305-313, 1999
Myers et al., Plant Physiology, 122: 989-997, 2000
Nair et al., Plant Sci 122: 153-163, 1997
Nakamura, Plant Cell Physiology 43: 718-725, 2002
Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443-453, 1970
Niedz et al., Plant Cell Reports, 14: 403, 1995
Nishi et al., Plant Physiology 127: 459-472, 2001
Ow et al., Science, 234: 856, 1986
Palatnik et al., Nature 425: 257-263, 2003
Parizotto et al., Genes Dev 18: 2237-2242, 2004
Potrykus et al., Mol. Gen. Genet., 199: 183, 1985
Prasher et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 126: 1259-68, 1985
Rahman et al., Genome 40: 465-474, 1997
Rahman et al., Theor. Appl. Genet. 98: 156-163, 1999
Rahman et al., Aust. J. Plant Physiol. 22: 793-803, 1995
Rahman et al., Plant Physiol 125: 1314-1324, 2001
Regina et al., J Exp Bot. 61(5): 1469-1482, 2010
Regina et al., Funct Plant Biol, 31: 591-601, 2004
Regina et al., Planta 222: 899-909, 2005
Regina et al., Proc Natl Acad Sci USA, 103: 3546-3551, 2006
Repellin et al., Plant Gene Reg pp. 97-094, 1997
Safford et al., Carbohydrate Polymers 35: 155-168, 1998
Schulman and Kammiovirta, Starch 43: 387-389, 1991
Schwab et al., Plant Cell 18: 1121-1133, 2006
Schwall et al., Nature Biotachnology 18: 551-554, 2000
Sestili et al., Mol Breeding 25:145-154, 2010
Sharp et al., Aust J Agric Res 52: 1357-1366, 2001
Shure et al., Cell 35: 225-233, 1983

Sidebottom et al., Journal of Cereal Science 27: 279-287, 1998
Sissons et al., Journal of the Science of Food and Agriculture 87: 1874-1885, 2007
Slade and Knauf, Transgenic Res. 14: 109-115, 2005
Smewing, The measurement of dough and gluten extensibility using the SMS/Kieffer rig and the TA.TX2 texture analyzer handbook, SMS Ltd: Surrey, UK,1995
Smith et al., Nature, 407: 319-320, 2000
Sparks and Jones in Transgenic Crops of the World- Essential protocols, Ed. IP Curtis, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, pp 19-34, 2004
Stacey and Isaac, Methods in Molecular Biology, Vol. 28: Protocols for nucleic acid analysis by non-radioactive probes, Humana Press Inc., Totawa, NJ., pp 9-15, 1994
Stalker et al., Science, 242: 419, 1988
Sun et al., Plant Physiol 118: 37-49, 1998
Takeda et al., Carbohydrate Research 240: 253-262, 1993a
Takeda et al., Carbohydrate Research 246: 273-281, 1993b
Tanaka et al., Nucl. Acids Res. 18: 6767-6770, 1990
Tetlow et al., Plant Cell 16: 694-708, 2004
Tetlow et al., Plant Physiol 146: 1878-1891, 2008
Thillet et al., J. Biol. Chem., 263: 12500, 1988
Vogel et al., Fermentation and Biochemical Engineering Handbook: Principles, Process Design, and Equipment, Noyes Publications, Park Ridge, N.J., USA, 1996
Waterhouse et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.95: 13959-13964, 1998
Weir et al., Aust J Plant Physiol 28: 807-818, 2001
Wu et al., Plant Cell Rep 21: 659-668, 2003
Yamamori et al., Theor Appl Genet, 101: 21-29, 2000
Nakamura and Yamanouchi, Plant Physiol. 99(3): 1265-1266, 1992
Yu et al., Science 307: 932-935, 2005
Zwar and Chandler, Planta 197: 39-48, 1995

【図１－１】

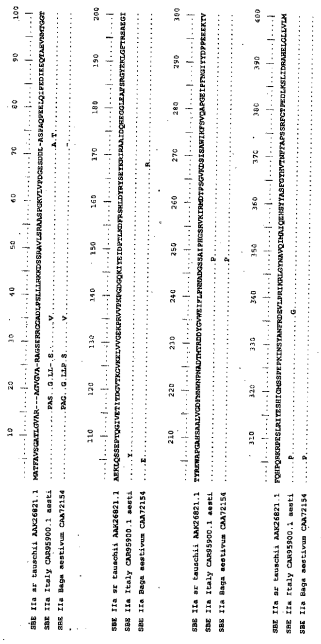


FIGURE 1

【図１－２】

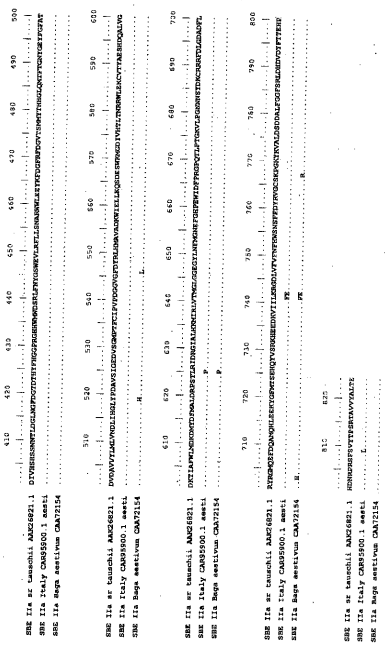


FIGURE 1 (CONTINUED)

【図２】

図２

【図３】

図３

【図４】

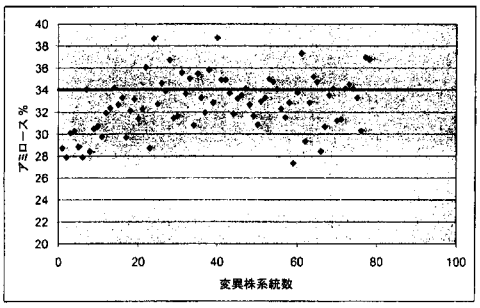


図4

【図５】

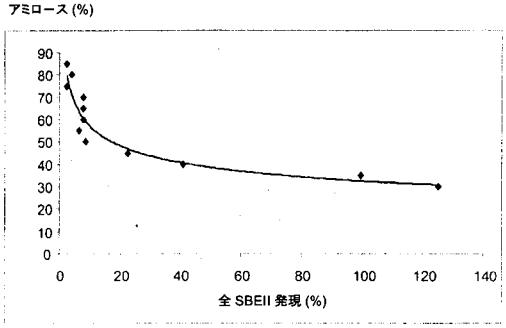


図5

【図６】

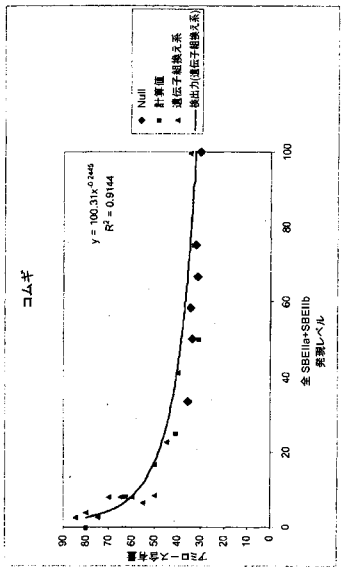


図6

【図７－１】

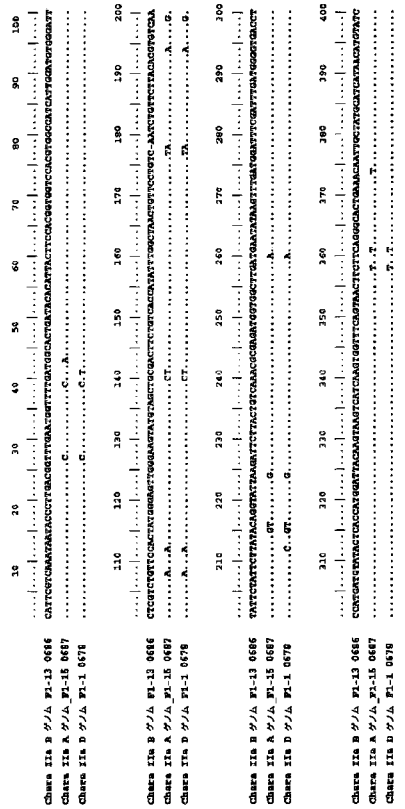


図7

【図７－２】

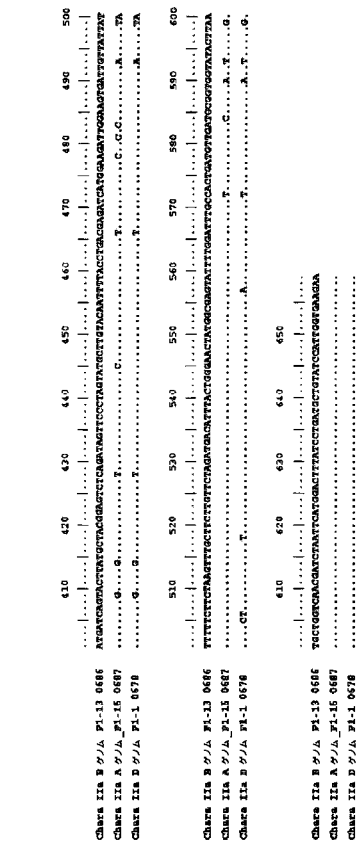


図７(続き)

【図８－１】

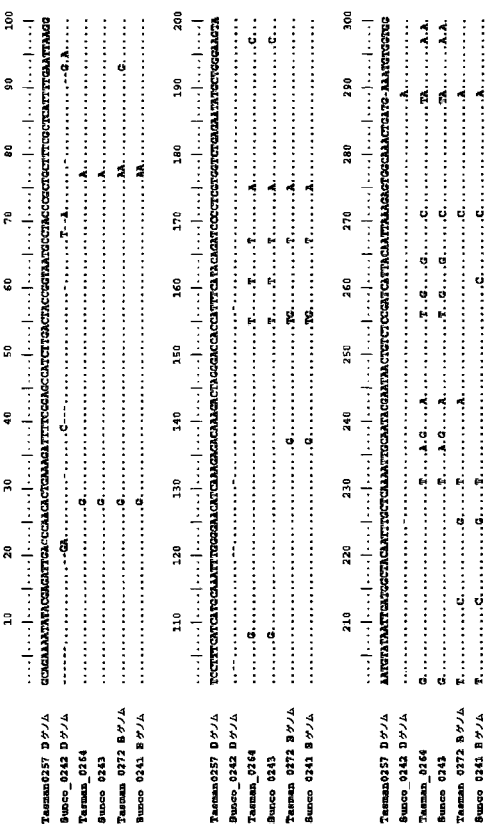


図８

【図８－２】

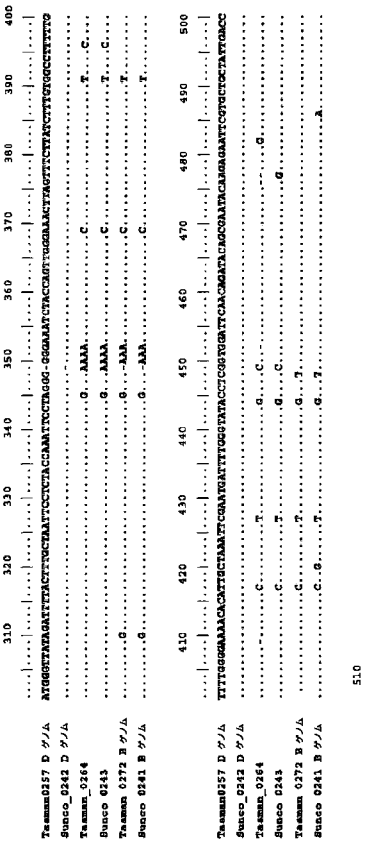


図８(続き)

【図９】

図９

【図１０】

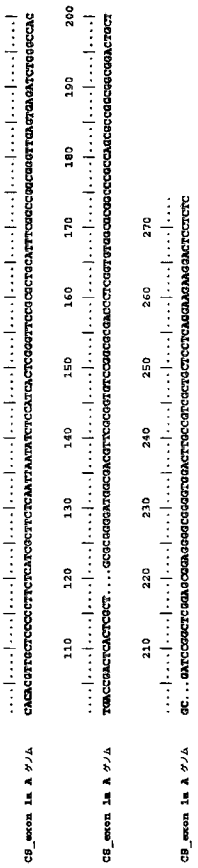


図 10

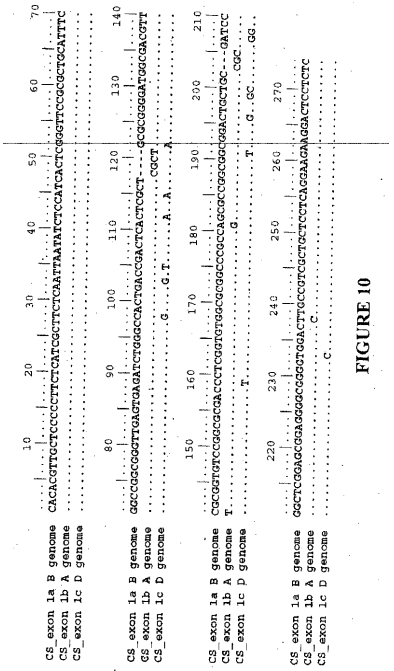


FIGURE 10

【図１１】

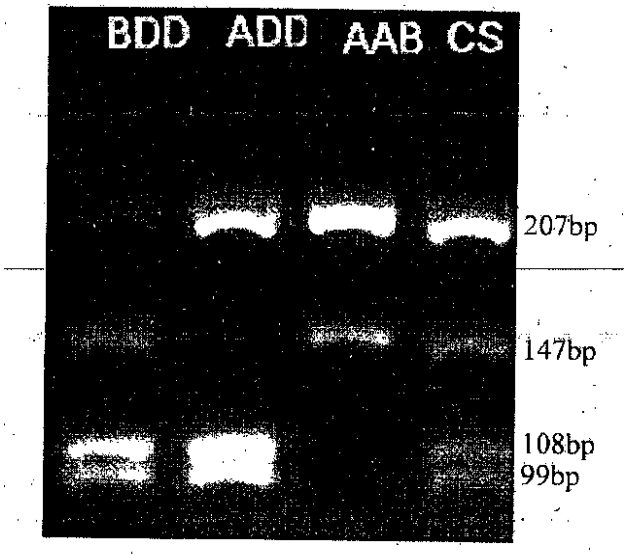


FIGURE 11

【図１２】

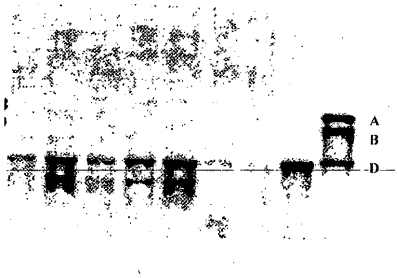
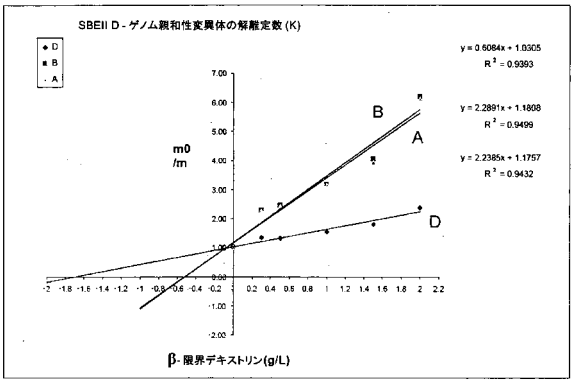


FIGURE 12

【図１３】



Kd D = 1.69 g/L
B = 0.52 g/L
A = 0.53 g/L

図 13

【図１４】

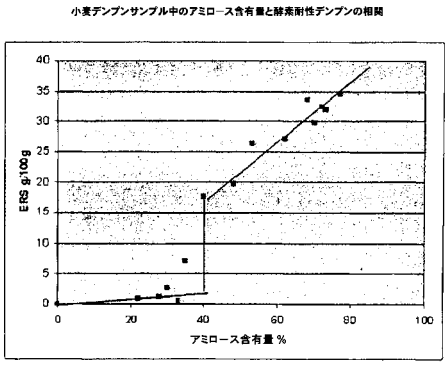


図 14

【図１５】

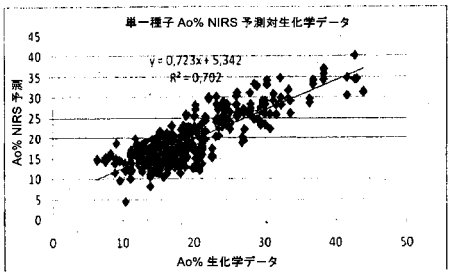


図 15

【図１６】

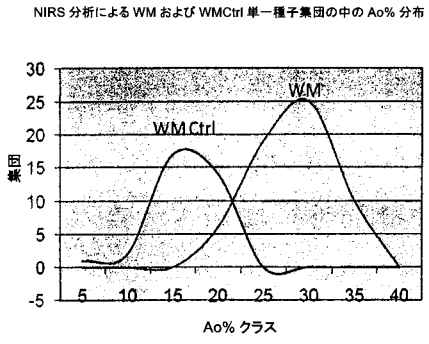


図 16

【図１７】

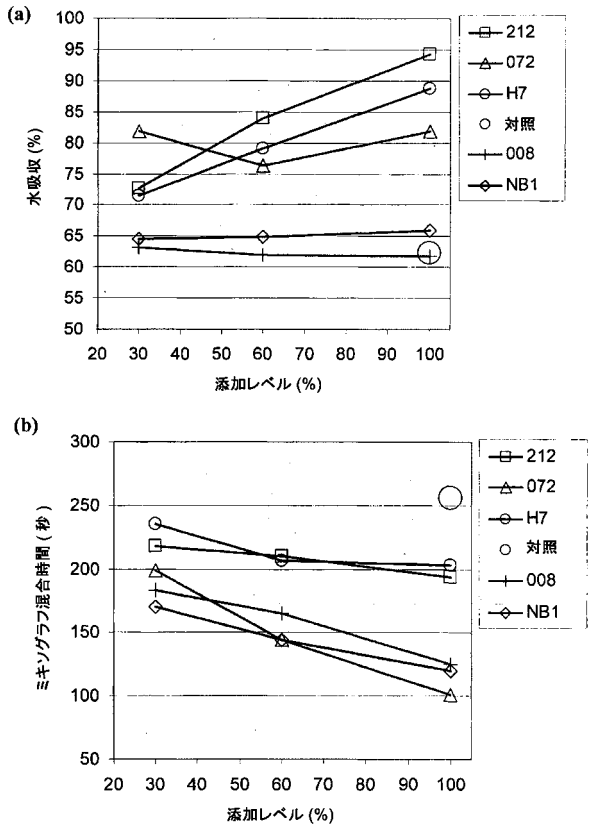


図 17

【図１８】

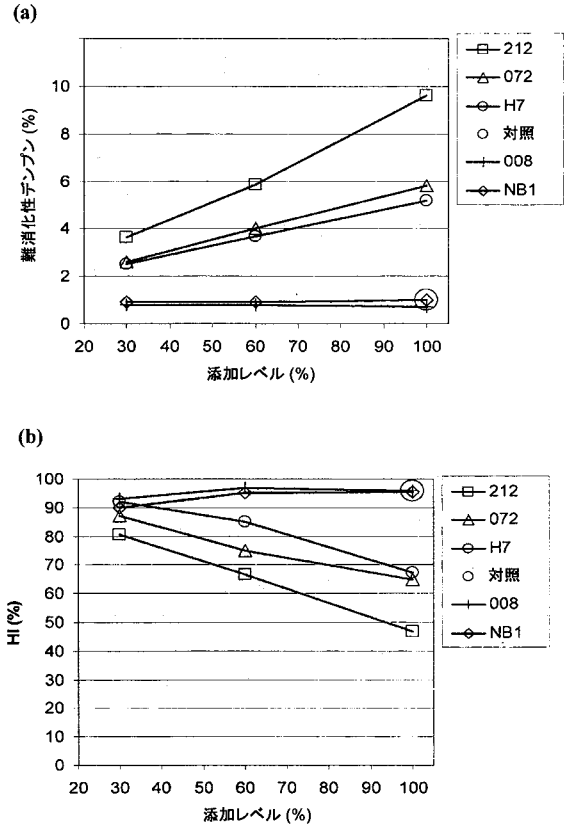


図 18

【図１９】

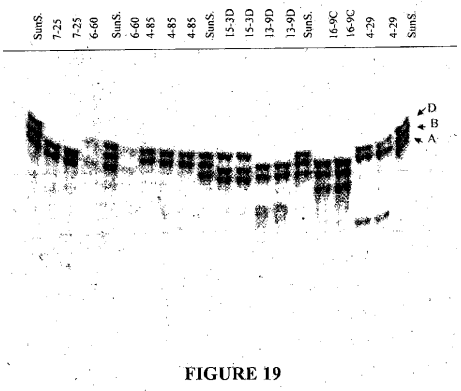


FIGURE 19

【図２０－１】

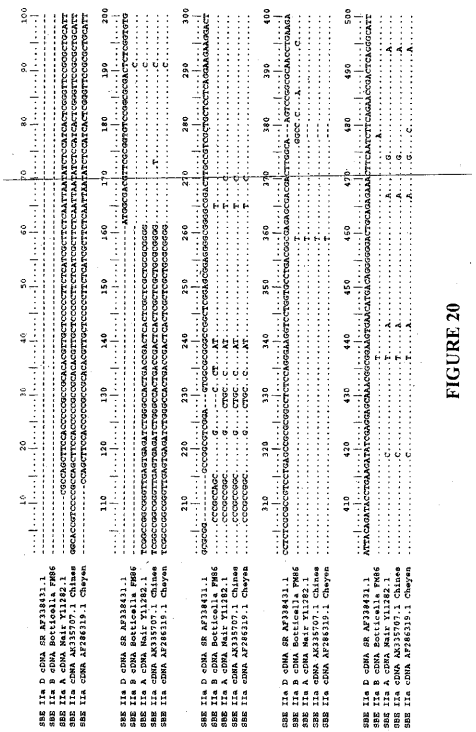


FIGURE 20

【図２０－２】

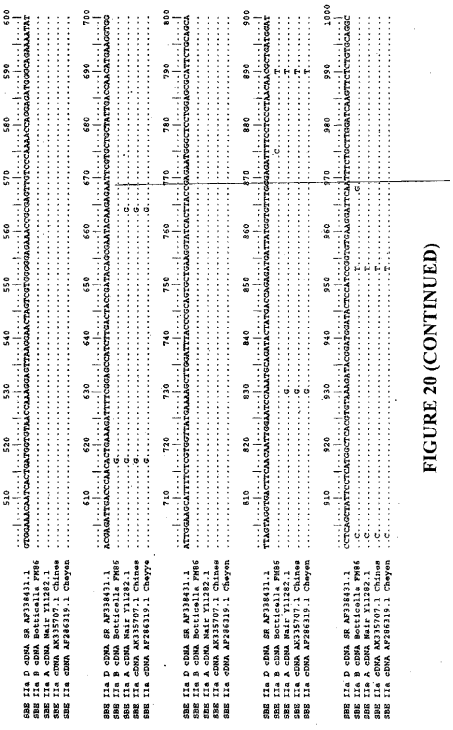


FIGURE 20 (CONTINUED)

【図２０－３】

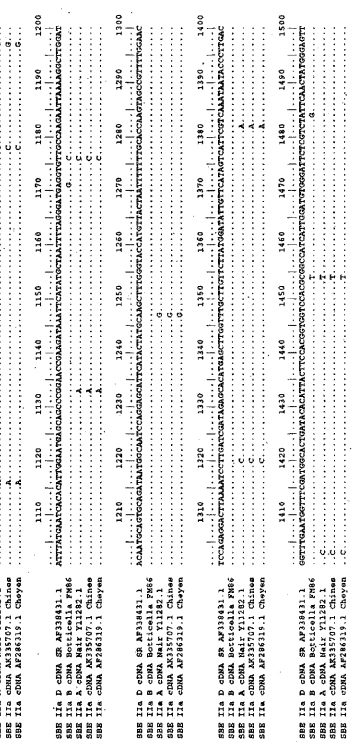


FIGURE 20 (CONTINUED)

【図２０－４】

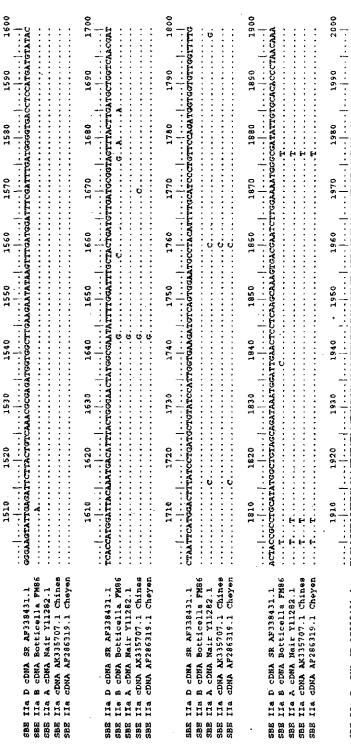


FIGURE 20 (CONTINUED)

【図２０－５】

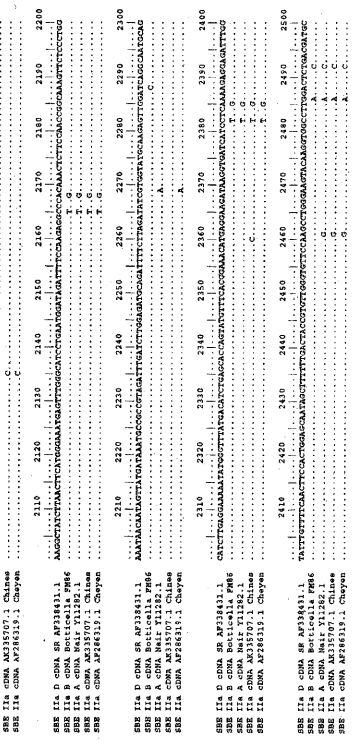


FIGURE 20 (CONTINUED)

【図２０－６】

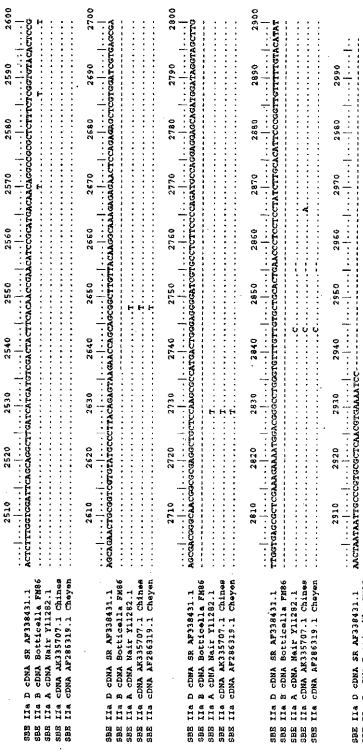


FIGURE 20 (CONTINUED)

【配列表】
2015504301000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/AU2012/001349

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A01H 5/00 (2006.01) A01H 1/04 (2006.01) A01H 1/06 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE, BIOSIS, AGRICOLA, HCAPLUS, WPI, EPODOC: wheat, aestivum, triticale, triticum, starch branching enzyme, amylose, mutant, variant, SNP, polymorphism, allele and other like terms and synonyms

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	Documents are listed in the continuation of Box C	

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C [X] 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	Date of mailing of the international search report
21 January 2013	21 January 2013
Name and mailing address of the ISA/AU	**Authorised officer**
AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA Email address: pct@ipaustralia.gov.au Facsimile No.: +61 2 6283 7999	Susan MacKenzie AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. 0262832690

Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		International application No. PCT/AU2012/001349
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2006/069422 A1 (COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH ORGANISATION et al.) 06 July 2006 Example 5	39
P,A	BOTTICELLA E. et al., 'High resolution melting analysis for the detection of EMS induced mutations in wheat SBEIIa genes', BMC Plant Biology, 2011. November 10, Vol. 11:156 Whole document	1-49
P,A	SLADE A.J., et al., 'Development of high amylose wheat through TILLING', BMC Plant Biology, 2012. May 14, Vol. 12:69 Whole document	1-49

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/AU2012/001349

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a)

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See Supplemental Box for Details

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/AU2012/001349

Supplemental Box

Continuation of: Box III

This International Application does not comply with the requirements of unity of invention because it does not relate to one invention or to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

This Authority has found that there are different inventions based on the following features that separate the claims into distinct groups:

- Claims 1-38, 40-49 (all in full), 39 (partially) are directed to the wheat defined in claims 1-23 and claims appended thereto. The feature of the wheat grains as defined in these claims is specific to this group of claims.

- Claim 39 (partially) is directed towards a method of screening a wheat plant or grain. The feature of determining the amount of activity of SBEIIa and/or SBEIIb relative to the amount or activity in a wild type or control plant or grain and selecting a plant which produces grain is specific to this group of claims.

PCT Rule 13.2, first sentence, states that unity of invention is only fulfilled when there is a technical relationship among the claimed inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features. PCT Rule 13.2, second sentence, defines a special technical feature as a feature which makes a contribution over the prior art.

When there is no special technical feature common to all the claimed inventions there is no unity of invention.

In the above groups of claims, the identified features may have the potential to make a contribution over the prior art but are not common to all the claimed inventions and therefore cannot provide the required technical relationship. The only feature common to all of the claimed inventions and which provides a technical relationship among them is the concept of wheat plants or grain with altered SBEIIa or SBEIIb.

However this feature does not make a contribution over the prior art because it is disclosed in:

WO 2006/069422 A1 (COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH ORGANISATION) 6 July 2006

Therefore in the light of this document this common feature cannot be a special technical feature. Therefore there is no special technical feature common to all the claimed inventions and the requirements for unity of invention are consequently not satisfied *a posteriori*.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members	International application No. **PCT/AU2012/001349**

This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	**Publication Date**	**Publication Number**	**Publication Date**
WO 2006/069422 A1	06 Jul 2006	AU 2005321754 A1	06 Jul 2006
		AU 2005321754 B2	02 Feb 2012
		CA 2594155 A1	06 Jul 2006
		EP 1833291 A1	19 Sep 2007
		JP 2008526690 A	24 Jul 2008
		US 2006204597 A1	14 Sep 2006
		US 7700139 B2	20 Apr 2010
		US 2006286186 A1	21 Dec 2006
		US 7993686 B2	09 Aug 2011
		US 2011212916 A1	01 Sep 2011
		WO 2006069422 A1	06 Jul 2006

End of Annex

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
C12N	*15/09*	*(2006.01)*	C12N	15/00	A	4B063
C12Q	*1/68*	*(2006.01)*	C12Q	1/68	A	4C088
A23L	*2/52*	*(2006.01)*	A23L	2/00	F	
A61K	*36/899*	*(2006.01)*	A61K	35/78	U	
A61P	*3/00*	*(2006.01)*	A61P	3/00		
A61P	*1/00*	*(2006.01)*	A61P	1/00		
A61P	*9/00*	*(2006.01)*	A61P	9/00		
A61P	*3/10*	*(2006.01)*	A61P	3/10		
G01N	*33/53*	*(2006.01)*	G01N	33/53	D	
			A01H	5/00	Z	
			A01H	1/00	Z	

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

(72)発明者 モレル，マシュー ケネディー
オーストラリア連邦 オーストラリアンキャピタルテリトリー ２６１４，アランダ，ウルガルプレイス １３
(72)発明者 ベルベツィー，ピエール ジョルジュ ルイ
フランス共和国 エフ－６３５３０ シャナ ラ ムトゥイル，レタン，シュマン デ ラ ルショディー，２０
(72)発明者 シャンリオード，エリザベト マリー－アンヌ イダ
フランス共和国 エフ－６３１１９ シャトーゲ，リュ デュ バ シャラール ４
(72)発明者 デュペリエ，ベルナール
フランス共和国 エフ－６３２７０ ヴィック ル コント，ブロラック

Ｆターム(参考) 2B030 AA02 AB02 AD09 AD20 CA17 CB02 CD17
4B017 LC03 LG10 LK13 LP18
4B018 LB08 LE02 MD49 ME02 ME04 MF07 MF09 MF14
4B023 LC09 LE26 LG06 LG07 LP17 LT61
4B024 AA08 CA04 DA01 EA01 GA14
4B063 QA18 QQ04 QQ09 QQ43 QQ53 QQ79 QR32 QR36 QR48 QR62
QR73 QR78 QS02 QS33 QS34 QX01
4C088 AB73 AC04 BA12 BA16 NA14 ZA36 ZA66 ZC21 ZC35

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2015504301A5	公开(公告)日	2015-12-24
申请号	JP2014539188	申请日	2012-11-02
[标]申请(专利权)人(译)	阿里斯塔串行技术有限公司有限公司		
申请(专利权)人(译)	阿里斯塔串行技术有限公司有限公司		
[标]发明人	レジナアーメド モレルマシューケネディー ベルベツィーピエールジョルジュルイ シャンリオードエリザベトマリーアンヌイダ デュペリエベルナール		
发明人	レジナ,アーメド モレル,マシュー ケネディー ベルベツィー,ピエール ジョルジュ ルイ シャンリオード,エリザベト マリー-アンヌ イダ デュペリエ,ベルナール		
IPC分类号	A01H5/10 A01H5/00 A01H1/00 A23L1/10 A23L1/30 C12N15/09 C12Q1/68 A23L2/52 A61K36/899 A61P3/00 A61P1/00 A61P9/00 A61P3/10 G01N33/53		
CPC分类号	A01H5/10 A61P1/00 A61P3/00 A61P3/10 A61P9/00 A23L7/197 C12N15/8218 C12N15/8245 A23V2002/00 B02C9/00 C08B30/046		
FI分类号	A01H5/10.ZNA A01H5/00.A A01H1/00.A A23L1/10.H A23L1/30.B C12N15/00.A C12Q1/68.A A23L2/00.F A61K35/78.U A61P3/00 A61P1/00 A61P9/00 A61P3/10 G01N33/53.D A01H5/00.Z A01H1/00.Z		
F-TERM分类号	2B030/AA02 2B030/AB02 2B030/AD09 2B030/AD20 2B030/CA17 2B030/CB02 2B030/CD17 4B017/LC03 4B017/LG10 4B017/LK13 4B017/LP18 4B018/LB08 4B018/LE02 4B018/MD49 4B018/ME02 4B018/ME04 4B018/MF07 4B018/MF09 4B018/MF14 4B023/LC09 4B023/LE26 4B023/LG06 4B023/LG07 4B023/LP17 4B023/LT61 4B024/AA08 4B024/CA04 4B024/DA01 4B024/EA01 4B024/GA14 4B063/QA18 4B063/QQ04 4B063/QQ09 4B063/QQ43 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR36 4B063/QR48 4B063/QR62 4B063/QR73 4B063/QR78 4B063/QS02 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX01 4C088/AB73 4C088/AC04 4C088/BA12 4C088/BA16 4C088/NA14 4C088/ZA36 4C088/ZA66 4C088/ZC21 4C088/ZC35		
优先权	61/556051 2011-11-04 US 61/645530 2012-05-10 US		
其他公开文献	JP6346093B2 JP2015504301A		

摘要(译)

包含胚和淀粉的小麦籽粒（Triticum aestivum），其中所述胚包含SBEIIa-A基因的两个相同等位基因，SBEIIa-B基因的两个相同等位基因和SBEIIa-D基因的两个相同等位基因，其中每个SBEIIa基因产生一定量的蛋白质（w / w）或具有低于相应野生型基因的SBEIIa活性的蛋白质，并且至少一个所述基因包含点突变，其中所述淀粉包含直链淀粉，使得谷粒具有至少50％（w / w）的直链淀粉含量作为谷物可提取淀粉的比例。