

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7288915号
(P7288915)

(45)発行日 令和5年6月8日(2023.6.8)

(24)登録日 令和5年5月31日(2023.5.31)

(51)国際特許分類	F I			
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09	1 0 0		
C 1 2 N 15/29 (2006.01)	C 1 2 N 15/29		Z N A	
C 1 2 N 15/54 (2006.01)	C 1 2 N 15/54			
C 1 2 N 15/74 (2006.01)	C 1 2 N 15/74	1 0 0 Z		
A 0 1 H 1/00 (2006.01)	A 0 1 H 1/00		A	

請求項の数 8 (全32頁)

(21)出願番号	特願2020-551106(P2020-551106)	(73)特許権者	000000941 株式会社カネカ 大阪府大阪市北区中之島二丁目3番18号
(86)(22)出願日	令和1年10月4日(2019.10.4)	(74)代理人	110001047 弁理士法人セントクレスト国際特許事務所
(86)国際出願番号	PCT/JP2019/039265	(72)発明者	柳楽 洋三 兵庫県高砂市高砂町宮前町1-8 株式会社カネカ内
(87)国際公開番号	WO2020/071528	(72)発明者	三木 隆二 兵庫県高砂市高砂町宮前町1-8 株式会社カネカ内
(87)国際公開日	令和2年4月9日(2020.4.9)	(72)発明者	濱田 晴康 兵庫県高砂市高砂町宮前町1-8 株式会社カネカ内
審査請求日	令和4年4月15日(2022.4.15)		
(31)優先権主張番号	特願2018-188798(P2018-188798)		
(32)優先日	平成30年10月4日(2018.10.4)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)		
(出願人による申告)平成30年度、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構、S I P(戦略的イノベーション創造プログラム)「次世代農林水産業創造技術」委託研究、産業技術力強化法第17条の適用を受ける特許出願			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 植物のゲノム編集に用いられるDNA構築物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

植物細胞においてゲノム編集系を発現させるためのDNA構築物であって、
 5'側に位置する第1のリコンビナーゼ認識部位と3'側に位置する第2のリコンビナーゼ認識部位とに挟まれた被切除領域を含み、
 第1のリコンビナーゼ認識部位と第2のリコンビナーゼ認識部位は同じ向きであり、
 第1及び第2のリコンビナーゼ認識部位を特異的に認識する部位特異的リコンビナーゼをコードする遺伝子が、前記被切除領域の少なくとも一方の外側に配置されており、
 前記被切除領域は、前記ゲノム編集系をコードする遺伝子と、5'領域と3'領域とに分割されているマーカー遺伝子とを含み、前記マーカー遺伝子の3'領域は第1のリコンビナーゼ認識部位の3'末端に隣接し、前記マーカー遺伝子の5'領域は第2のリコンビナーゼ認識部位の5'末端に隣接し、ゲノム編集系をコードする遺伝子は、前記マーカー遺伝子の3'領域と5'領域との間に配置されており、かつ
 植物細胞に導入された場合に、前記部位特異的リコンビナーゼが発現し、前記被切除領域が切り出されて環状化することによって、前記5'領域と3'領域とがリコンビナーゼ認識部位を介して結合し、これにより前記マーカー遺伝子の発現が可能となる、DNA構築物。

【請求項2】

アグロバクテリウムT-DNA配列由来の右境界配列(RB)及び左境界配列(LB)を更に含み、前記RBとLBとに挟まれた伝達領域に、前記被切除領域及び前記部位特異

的リコンビナーゼをコードする遺伝子が配置されている、請求項 1 に記載の DNA 構築物。

【請求項 3】

前記マーカー遺伝子が、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子又は薬剤耐性遺伝子である、請求項 1 又は 2 に記載の DNA 構築物。

【請求項 4】

前記マーカー遺伝子が、イントロンにて 5' 領域と 3' 領域とに分割されている、請求項 1 ~ 3 のうちのいずれか一項に記載の DNA 構築物。

【請求項 5】

前記被切除領域において、前記マーカー遺伝子の 3' 領域と 5' 領域との間に、更に外来遺伝子を含む、請求項 1 ~ 4 のうちのいずれか一項に記載の DNA 構築物。

10

【請求項 6】

前記外来遺伝子が植物ホルモン生合成遺伝子である、請求項 5 に記載の DNA 構築物。

【請求項 7】

ゲノム編集された植物細胞の生産方法であって、下記 (1) ~ (2) の工程を含む方法 (1) 請求項 1 ~ 6 のうちのいずれか一項に記載の DNA 構築物を、植物細胞に導入する工程、

(2) 前記工程にて得られた細胞から、前記マーカー遺伝子の発現を指標として、前記 DNA 構築物が導入され、前記被切除領域の環状化が生じている細胞を選抜する工程。

【請求項 8】

ゲノム編集された植物の生産方法であって、下記 (1) ~ (3) の工程を含む方法

20

(1) 請求項 6 に記載の DNA 構築物を、植物細胞に導入する工程、

(2) 前記工程にて得られた細胞から、前記マーカー遺伝子の発現を指標として、前記 DNA 構築物が導入され、前記被切除領域の環状化が生じている細胞を選抜する工程、

(3) 前記工程にて得られた細胞を培養して植物組織を生成させ、前記 DNA 構築物上の植物ホルモン生合成遺伝子の発現に起因する植物組織における形態変化を指標として、当該形態変化が生じた植物組織を選抜する工程。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、植物細胞においてゲノム編集系を発現させるための DNA 構築物、及び当該 DNA 構築物を用いた、ゲノム編集された植物細胞の生産方法に関する。

30

【背景技術】

【0002】

農作物の遺伝子改変のツールとして、ゲノム編集技術への関心が世界的に高まっている。ゲノム編集技術は、ゲノム上の特定の塩基配列に特異的に結合する領域と DNA を切断等する酵素領域とで構成されるゲノム編集系 (CRISPR/Cas システム、TALEN システム、ZFN システム、PPR システム等) を用い、狙った遺伝子 (標的遺伝子) をピンポイントで書き換える (編集する) 技術である。標的遺伝子の改変が簡便かつ高確率で行えるため、農作物育種、有用物資生産、品種改良、目的遺伝子の機能解析等、植物に関する様々な分野において、ゲノム編集技術の利用が進みつつある (非特許文献 1)。

40

【0003】

しかしながら、ゲノム編集技術においても、得られたゲノム編集植物のゲノムにおいて、ゲノム編集系や選抜マーカー等をコードする外来遺伝子が残存してしまうという問題がある。そのため、植物ゲノムに必要な変異のみを導入したい場合は、これら遺伝子のゲノムへの挿入を抑制するか、挿入後にゲノムから除去する必要がある。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【文献】Osakabe Y. ら、Plant Cell Physiol. 2015 年 3 月、56 巻、3 号、389 ~ 400 ページ

50

Nanto, K.ら、Plant Biotechnol. J. 2005年、3巻、203～214ページ

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、前記従来技術の有する課題に鑑みてなされたものであり、その目的は、ゲノム編集系等をコードする外来遺伝子が植物ゲノムに組み込まれることなく、標的遺伝子に改変を施すことができる植物のゲノム編集方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは、前記目的を達成すべく、従前開発したMAT (Multi-Auto-Transformation) ベクターに着目した。MATベクターは、部位特異的組換えシステムであるCre/LoxPシステムの利用により、選別に用いたマーカー遺伝子(選抜用遺伝子)を、ゲノム編集植物のゲノム中に残存させないという利点を有する。具体的には、図1に示すとおり、MATベクターにおいては、ゲノムに組み込まれた選抜用遺伝子が2つのリコンビナーゼ認識部位(LoxP配列)で挟まれており、部位特異的リコンビナーゼ(Creリコンビナーゼ)の作用により、当該選抜用遺伝子が環状に切り出されることが明らかになっている(非特許文献2)。

【0007】

そこで、選抜用遺伝子の代わりに、ゲノム編集に用いる人工制限酵素遺伝子等(ゲノム編集系をコードする遺伝子)を、リコンビナーゼ認識部位間に組み込み、部位特異的リコンビナーゼを一過的に発現させることによって、前記遺伝子等を含む領域が切除され、ゲノムへの組み込み前に環状DNAが生成しうる系を構想した。さらに、分割したマーカー遺伝子を前記被切除領域の両端部に配置することによって、該領域が環状化した場合、該マーカー遺伝子が再構成され、発現可能となることにより、前記環状DNAの挙動をモニタリングすることも構想した。

【0008】

そして実際に、図3に示すDNA構築物を作製し、植物に導入した結果、ゲノム編集系(SgRNA及びCas9)をコードする遺伝子を含む環状DNAが生成されることにより、当該遺伝子が植物ゲノム中に組み込まれることなく、ゲノム編集系が一過的に発現することによって、標的遺伝子の配列を改変できることを明らかにした。さらに、本発明者は、前記環状DNAが、植物細胞内において安定して一定期間(約35日間)保持されうることを見出し、本発明を完成するに至った。したがって、本発明は以下を提供するものである。

[1] 植物細胞においてゲノム編集系を発現させるためのDNA構築物であって、

5'側に位置する第1のリコンビナーゼ認識部位と3'側に位置する第2のリコンビナーゼ認識部位とに挟まれた被切除領域を含み、

第1のリコンビナーゼ認識部位と第2のリコンビナーゼ認識部位は同じ向きであり、

第1及び第2のリコンビナーゼ認識部位を特異的に認識する部位特異的リコンビナーゼをコードする遺伝子が、前記被切除領域の少なくとも一方の外側に配置されており、

前記被切除領域は、前記ゲノム編集系をコードする遺伝子と、5'領域と3'領域とに分割されているマーカー遺伝子とを含み、前記マーカー遺伝子の3'領域は第1のリコンビナーゼ認識部位の3'末端に隣接し、前記マーカー遺伝子の5'領域は第2のリコンビナーゼ認識部位の5'末端に隣接し、ゲノム編集系をコードする遺伝子は、前記マーカー遺伝子の3'領域と5'領域との間に配置されており、かつ

植物細胞に導入された場合に、前記部位特異的リコンビナーゼが発現し、前記被切除領域が切り出されて環状化することによって、前記5'領域と3'領域とがリコンビナーゼ認識部位を介して結合し、これにより前記マーカー遺伝子の発現が可能となる、DNA構築物。

[2] アグロバクテリウムT-DNA配列由来の右境界配列(RB)及び左境界配列(

10

20

30

40

50

L B) を更に含み、前記 R B と L B とに挟まれた伝達領域に、前記被切除領域及び前記部位特異的リコンビナーゼをコードする遺伝子が配置されている、[1] に記載の DNA 構築物。

[3] 前記マーカー遺伝子が、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子又は薬剤耐性遺伝子である、[1] 又は [2] に記載の DNA 構築物。

[4] 前記マーカー遺伝子が、イントロンにて 5 ' 領域と 3 ' 領域とに分割されている、[1] ~ [3] のうちのいずれか一項に記載の DNA 構築物。

[5] 前記被切除領域において、前記マーカー遺伝子の 3 ' 領域と 5 ' 領域との間に、更に外来遺伝子を含む、[1] ~ [4] のうちのいずれか一項に記載の DNA 構築物。

[6] 前記外来遺伝子が植物ホルモン生成遺伝子である、[5] に記載の DNA 構築物。

10

[7] ゲノム編集された植物細胞の生産方法であって、下記 (1) ~ (2) の工程を含む方法

(1) [1] ~ [6] のうちのいずれか一項に記載の DNA 構築物を、植物細胞に導入する工程、

(2) 前記工程にて得られた細胞から、前記マーカー遺伝子の発現を指標として、前記 DNA 構築物が導入され、前記被切除領域の環状化が生じている細胞を選抜する工程。

[8] ゲノム編集された植物の生産方法であって、下記 (1) ~ (3) の工程を含む方法

(1) [6] に記載の DNA 構築物を、植物細胞に導入する工程、

(2) 前記工程にて得られた細胞から、前記マーカー遺伝子の発現を指標として、前記 DNA 構築物が導入され、前記被切除領域の環状化が生じている細胞を選抜する工程、

20

(3) 前記工程にて得られた細胞を培養して植物組織を生成させ、前記 DNA 構築物上の植物ホルモン生成遺伝子の発現に起因する植物組織における形態変化を指標として、当該形態変化が生じた植物組織を選抜する工程。

【発明の効果】

【 0 0 0 9 】

本発明によれば、植物細胞において、ゲノム編集系等をコードする外来遺伝子がゲノムに組み込まれることなく、標的遺伝子の配列を改変することが可能となる。また、本発明によれば、ゲノム編集系を環状 DNA から安定して発現させることができる。したがって、安全性の高いゲノム編集植物を高効率で生産することができる。

30

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 0 】

【図 1】本発明の DNA 構築物の基となる、M A T (M u l t i - A u t o - T r a n s f o r m a t i o n) ベクターシステムの概要を示す図である。M A T ベクターにおいて、1 o x P 配列が順方向に位置しており、その間に選抜用遺伝子と部位特異的酵素 C r e リコンビナーゼが位置している。そのため、C r e / 1 o x P システムによって当該選抜用遺伝子が環状に切り出され、マーカーフリーの植物体を得ることができる。

【図 2】本発明の DNA 構築物を用いたゲノム編集の一例を示す図である。本発明の DNA 構築物において、T - D N A 内に部位特異的酵素 C r e 遺伝子を配置し、またその認識部位 1 o x P 2 つを順方向に配置させることによって、該 DNA 構築物が植物細胞に導入された際に、C r e / 1 o x P システムによる環状 DNA の切り出しが生じることになる。さらに、環状に切り出される領域に人工制限酵素である C a s 9 と標的配列の S g R N A (図中、ハサミにて表す) をあらかじめ組み込むことで、ゲノムに組み込まれない環状 DNA (図中「環状化 DNA」) によるゲノム編集が可能となる。そして最終的には、細胞分裂の際、環状 DNA が消失し、外来遺伝子がゲノムに組み込まれていない変異個体を得ることができる。

40

【図 3】本発明の DNA 構築物 (図中 A)、及びそれから切り出され環状 DNA (図中 B) の一態様を示す、概略図である。アグロバクテリウム法により導入された T - D N A 領域 (図中、「O D / R B」(オーバードライブ配列及び右境界配列) と、L B / L B (左境界配列 2 つ) にて挟まれた領域) から、C r e / 1 o x P システムにより環状 DNA の

50

切り出しが生じる。環状DNAの中には、ゲノム編集系をコードする遺伝子（図中「Cas9」及び「SgRNA」）、並びに植物ホルモン生合成遺伝子（図中「iaaM」、「iaaH」及び「ipt」）が配置されている。環状DNA中の遺伝子が、植物細胞内で一過的に発現することによって、非組込み型変異導入を行うことができる。また、本発明のDNA構築物ではgfp遺伝子が分割されて組込まれている（図中の「P^{35S}」、「G」及び「in」と、「tron」、「FP」及び「T」）が、環状化した際には、gfp遺伝子間のイントロン（図中の「in」と「tron」）が再結合することにより、さらに植物細胞内でスプライシングが生じることによって、当該イントロンが抜け、コードするGFPタンパク質が発現する仕組みとなっている。なお、図中の「SgRNA」は、ゲノム編集における標的配列のガイドRNAをコードする遺伝子を示す。「P^{35S}」は、35Sカリフラワーモザイクウイルスプロモーターを示す。「T」は、熱ショックタンパク質ターミネーターを示す。「intCre」は、5'にイントロンを付加したCreリコンビナーゼ遺伝子を示す。「lox」はCreリコンビナーゼが認識するloxP配列を示す。「Ri-ori」及び「NPTII」は、カナマイシン耐性遺伝子を示す。「G」及び「FP」も併記された矢印は、gfp遺伝子検出用プライマーセットを示す。なお、本図における表記は、以下の図面でも同様である。

10

【図4】本発明のDNA構築物の作動を検証するために、作製したベクターの概略図である。

【図5】本発明のDNA構築物を作製するためのベクター骨格を示す概略図である。当該骨格に位置するMCS内の各制限酵素サイトに、PCRにより増幅した遺伝子カセットをインフュージョン反応により挿入し、本発明のDNA構築物を作製した。

20

【図6】図5に示した骨格に挿入した遺伝子カセット、及びそれらを増幅するために用いたプライマー（図中の各矢印）を示す概略図である。

【図7】ベンサミアナタバコへのアグロインフィルトレーションに用いた、本発明のDNA構築物を示す概略図である。当該アグロインフィルトレーションには、イントロン内のloxP配列（図中「lox」の位置が異なる2種類のlox-int-GFPベクターと、イントロンなしのGFPベクターをコントロールとして用いた。T-DNA領域には35Sカリフラワーモザイクウイルスプロモーター（図中、「35SP」）、ヒートショックプロテインターミネーター（図中、「T」）、gfp（図中、「G」及び「FP」、又は「GFP」）が位置している。

30

【図8】lox-int-GFPベクターを導入したベンサミアナタバコ葉片を、蛍光顕微鏡にて観察した結果を示す写真である。より具体的には、ベンサミアナタバコへのアグロインフィルトレーションから6日目の葉片各2箇所にてGFPの蛍光観察した結果を示す。上段において、lox-int-GFP01ベクター由来のGFP蛍光を示し、中段において、lox-int-GFP02ベクター由来のGFP蛍光を示す、下段において、ポジティブコントロールとして用いたGFPベクター由来のGFP蛍光を示す。

【図9】lox-int-GFPベクターを導入したベンサミアナタバコ葉片における蛍光強度を検出した結果を示すグラフである。より具体的には、図8に示した6日目の葉片についてアグロインフィルトレーションの菌液接種点を中心に直径1.5cm円内を画像解析により、GFP蛍光強度の定量化した結果を示す。

40

【図10】本発明のDNA構築物の作動を検証するために作製したベクターの概略図である。

【図11】図10に示したベクターをアグロインフィルトレーションにより導入したベンサミアナタバコ葉片を、蛍光顕微鏡にて観察した結果を示す写真である。より具体的には、ベンサミアナタバコへのアグロインフィルトレーションから7日目の葉片のGFP蛍光を観察した結果を示す。上段において、図中Aは、コントロールとして用いたGFPベクター由来のGFP蛍光を示し、図中Bは、Switch on GFP 01ベクター由来のGFP蛍光を示し、図中Cは、Switch on GFP 02ベクター由来のGFP蛍光を示す。

【図12】図10に示したベクターをアグロインフィルトレーションにより導入したベン

50

サミアナタバコ葉片における蛍光強度を検出した結果を示すグラフである。より具体的には、図8に示した6日目の葉片についてアグロインフィルトレーションの菌液接種点を中心に直径1.5cm円内を画像解析により、GFP蛍光強度の定量化した結果を示す。

【図13】本発明のDNA構築物の作動を検証するために、作製した改良型ベクターの概略図である。図中「Ipt」はサイトカニン合成遺伝子を示し、「iaaH」はオーキシン前駆体合成遺伝子を示す。

【図14】図13に示したベクターをアグロインフィルトレーションにより導入したベンサミアナタバコ葉片を、蛍光顕微鏡にて観察した結果を示す写真である。より具体的には、ベンサミアナタバコへのアグロインフィルトレーションから7日目の葉片のGFP蛍光を観察した結果を示す。上段において、図中「GFP-npt(control)」は、
10
コントロールとして用いたGFPベクター由来のGFP蛍光を示し、図中「S01 iGFP(1) intCre ipt iaaH」及び「S01 iGFP(2) intCre ipt iaaH」は各々、改良型ベクター由来のGFP蛍光を示す。

【図15】図13に示したベクターをアグロインフィルトレーションにより導入したベンサミアナタバコ葉片における蛍光強度を、検出した結果を示す、グラフである。より具体的には、図8に示した6日目の葉片についてアグロインフィルトレーションの菌液接種点を中心に直径1.5cm円内を画像解析により、GFP蛍光強度の定量化した結果を示す。

【図16】図13に示したベクターをアグロインフィルトレーションにより導入したベンサミアナタバコ葉片を、蛍光顕微鏡にて観察した結果を示す写真である。図中A及びBは、
20
ipt、iaaH組込み改良型ベクター(S01 iGFP(1) intCre ipt iaaH)に由来する、感染後7日目及び35日のGFP蛍光を各々示す。図中C及びDは、ipt、iaaH組込み改良型ベクター(S01 iGFP(2) intCre ipt iaaH)に由来する、感染後7日目及び35日のGFP蛍光を各々示す。

【図17】図13に示したベクターをアグロインフィルトレーションにより導入したベンサミアナタバコ葉片を、ゲノムPCRにて解析した結果を示す泳動写真である。上段は、
ipt、iaaH組込み改良型ベクター感染後7日目に解析した結果を示し、下段は、ipt、iaaH組込み改良型ベクター感染後35日目に解析した結果を示す。

【図18】実施例にてゲノム編集の標的とした遺伝子 NtPDS 遺伝子の構成を示す概略図である。ゲノム編集の標的配列として、Arabidopsis thaliana
30
とSR1タバコの共通配列であるPDSの第三エクソン配列(PDS3)を選択した。具体的に、PDSの第三エクソンの部分にあたる。PDS3のSgRNAターゲット配列は、GAGGCAAGAGATGTCCTAGGTGG(配列番号:21)である。なお、当該配列中3'末のTGGは、PAM配列である。また、pUC118への平滑末端クローニングに用いるインサートは、プライマーセット(1)及び(2)を用いて増幅した。コロニーPCRを行う際にはプライマーセット(3)及び(4)を用いた。

【図19】SR1 WTのPDS3遺伝子をコロニーPCRにて解析した結果を示す、泳動写真である。実施例に記載のpUC118への平滑末端クローニングで得られたコロニーに対し、Emerald Ampを用いてコロニーPCRを行った結果を示す。図中「M」は、500bp DNAラダーを泳動したマーカーレーンを示す。

【図20】ゲノム編集系(Cas9タンパク質及びSgRNA)の作動検証に用いた、本発明のDNA構築物の構成を示す概略図である。図中、「a-ipt」は、アグロバクテリウムpO22系統由来のプロモーターを有するipt遺伝子を示す。
40

【図21】図20に示したDNA構築物を、アグロバクテリウム法によりタバコ(SR1)の葉片に導入して培養した結果を示す写真である。感染後、2日間アグロバクテリウムを殺す選抜培地に置いた後、1週間ごとにホルモンフリー培地で継代培養を行った。図中Aは、アグロバクテリウム感染後9日目のSR1の葉片を観察した結果を示し、Bは感染後16日目のSR1の葉片を観察した結果を示し、Cは感染後40日目のSR1を観察した結果を示し、葉片からのカルスの形成が見られる。Dは葉片から分離されたカルスを示す。

【図22】図20に示したDNA構築物を、アグロバクテリウム法によりタバコ(SR1)

10

20

30

40

50

)の葉片に導入して培養して得られたカルスについて、C A P S解析した結果を示す泳動写真である。カルスから抽出したゲノムDNAを鋳型として、図18に示すプライマーセットを用いてP C R反応を行い、得られた増幅産物を制限酵素B l n Iにて37 で4時間処理した。左側の電気泳動写真は、感染後39日目のカルスをC A P S解析した結果を示す。当該解析においては、図18に示すプライマー(1)及び(2)を用いた。図中の「W T」は、S R 1のP D S 3を増幅した断片であり、未切断の目安となる。右側の電気泳動写真は、感染後45日目のカルスをC A P S解析した結果を示す。当該解析においては、図18に示すプライマー(3)及び(4)を用いた。図中の「M」は、100bp DNAラダーを泳動した結果を示すマーカーレーンである。黒矢印は、B l n Iでの未切断断片の位置を示す。なお、図中の丸1及び丸3は、C A P S解析により変異導入が検出されたサンプルである。図中の丸2は、C A P S解析で変異を検出できなかったサンプルである。

10

【図23】図20に示したDNA構築物を、アグロバクテリウム法によりタバコ(S R 1)の葉片に導入して培養して得られたカルス(感染後39日目)について、C A P S解析した結果を示す泳動写真である。当該カルスについて、平滑末端クローニングを行い、得られたコロニーに対してコロニーP C Rを行い、P D S 3を増幅した。その後、B l n Iで4時間37 処理したサンプルを、電気泳動した結果を示す。図中「M」は、100bp マーカーを泳動レーンであり、黒矢印は、未切断断片の位置を示す。

【図24】図20に示したDNA構築物を、アグロバクテリウム法によりタバコ(S R 1)の葉片に導入して培養して得られたカルス(感染後45日目)について、C A P S解析した結果を示す泳動写真である。当該カルスについて、平滑末端クローニングを行い、得られたコロニーに対してコロニーP C Rを行い、P D S 3を増幅した。その後、B l n Iで4時間37 処理したサンプルを、電気泳動した結果を示す。図中「M」は、100bp マーカーを泳動レーンであり、黒矢印は、未切断断片の位置を示す。

20

【図25】形態選抜及び変異導入に用いた、本発明のDNA構築物の構成を示す概略図である。図中、「35S - i p t」は、プロモーターをアグロバクテリウムp O 2 2系統由来のプロモーターから35Sプロモーターに変更したi p t遺伝子を示す。

【図26】図25に示したDNA構築物を導入することにより得られた、カルスを観察した結果を示す写真である。当該DNA構築物をアグロバクテリウム法によるS R 1に導入した。感染から30日後に周辺部のカルス化が認められた(図中、A、C、E、G及びI参照)。カルス化した葉片のG F P蛍光を観察した結果、18葉片中5葉片でG F P蛍光カルスが観察された(図中、B、D、F、H及びJ参照)。図25に示した構築物Aを導入し、M S培地で生育して得られたカルスを、図のA~Dに示す。図25に示した構築物Bを導入し、N A M含有M S培地で生育して得られたカルスは、図のE~Hに示す。図25に示した構築物Cを導入し、M S培地で生育して得られたカルスを、図のI及びJに示す。

30

【図27】本発明のDNA構築物、及びそれから生成される環状DNAと、該環状DNAの挙動を検証するために用いたプライマーとの位置関係を示す概略図である。プライマー(1)及び(2)は、g f pのコーディング領域断片を増幅するためのプライマーセットである。環状DNAへの切り出しが起こることでP C R反応が進むように設計されており、環状DNAの検出のため用いた。プライマー(3)及び(4)は、C a s 9のコーディング領域断片を増幅するためのプライマーセットである。C a s 9の存在を確認するために用いた。増幅されるバンドの長さにより、環状DNAへの切り出しを確認するために用いた。

40

【図28】図25に示したDNA構築物を導入して得られたカルスについて、ゲノムP C R分析及びC A P S解析した結果を示す泳動写真である。感染後30日目のカルスからゲノムDNAを抽出し、図27に示すプライマーセットを用い、ゲノムP C Rを行い、g f p遺伝子(環状DNA)及びC a s 9遺伝子を検出した。また図22において説明した方法にてC A P S解析を行い、標的遺伝子における変異導入を検出した。図25に示した構築物Aを導入し、M S培地で生育して得られたカルスは、レーン1~6に示す。図25に

50

示した構築物 B を導入し、M S 培地で生育して得られたカルスは、レーン 7 及び 8 に示す。図 2 5 に示した構築物 B を導入し、N A M 含有 M S 培地で生育して得られたカルスは、レーン 9 ~ 1 3 に示す。図 2 5 に示した構築物 C を導入し、M S 培地で生育して得られたカルスは、レーン 1 4 ~ 1 8 に示す。また図中の「M」は D N A ラダー 5 0 0 b p を泳動したマーカーレーンを示す。黒矢印は、C A P S 解析における未切断断片の位置を示す。

【発明を実施するための形態】

【0011】

(DNA 構築物)

本発明の、植物細胞においてゲノム編集系を発現させるための DNA 構築物は、5' 側に位置する第 1 のリコンビナーゼ認識部位と 3' 側に位置する第 2 のリコンビナーゼ認識部位とに挟まれた被切除領域を含み、

第 1 のリコンビナーゼ認識部位と第 2 のリコンビナーゼ認識部位は同じ向きであり、第 1 及び第 2 のリコンビナーゼ認識部位を特異的に認識する部位特異的リコンビナーゼをコードする遺伝子が、前記被切除領域の少なくとも 1 方の外側に配置されており、前記被切除領域は、前記ゲノム編集系をコードする遺伝子と、5' 領域と 3' 領域とに分割されているマーカー遺伝子とを含み、前記マーカー遺伝子の 3' 領域は第 1 のリコンビナーゼ認識部位の 3' 末端に隣接し、前記マーカー遺伝子の 5' 領域は第 2 のリコンビナーゼ認識部位の 5' 末端に隣接し、ゲノム編集系をコードする遺伝子は、前記マーカー遺伝子の 3' 領域と 5' 領域との間に配置されていることを、特徴とする。

【0012】

そして、この構成をとることによって、本発明の DNA 構築物は、植物細胞に導入された場合に、前記部位特異的リコンビナーゼが発現し、前記被切除領域が切り出されて環状化することによって、前記 5' 領域と 3' 領域とがリコンビナーゼ認識部位を介して結合し、これにより前記マーカー遺伝子の発現が可能となる。また、当該環状化された領域は、該植物細胞のゲノムに組み込まれることなく該細胞内に、一定期間安定して存在し、コードするゲノム編集系を発現させることができる。そのため、効率的にゲノム編集された植物細胞を得ることができる。

【0013】

本発明に係る「被切除領域」は、部位特異的リコンビナーゼによって切除され環状化するために、その末端に該部位特異的リコンビナーゼが特異的に認識する 2 つのリコンビナーゼ認識部位 (5' 側に位置する第 1 のリコンビナーゼ認識部位と、3' 側に位置する第 2 のリコンビナーゼ認識部位) が、同じ向きにて配置される。

【0014】

本発明において「部位特異的リコンビナーゼ」とは特定の配列 (リコンビナーゼ認識部位) を認識し、該配列間で組換えを生じさせる酵素であればよく、特に制限はないが、例えば、Cre リコンビナーゼ、醤油酵母 (*Zygosaccharomyces rouxii*) 由来のリコンビナーゼ R、FLP リコンビナーゼ、リゾルバーゼ、Tn3 リゾルバーゼ、C31 インテグラーゼ、Bxb1 - インテグラーゼ、R4 インテグラーゼ、インテグラーゼが挙げられる。また「リコンビナーゼ認識部位」としては、前記各酵素が特異的に認識し得る配列であればよく、例えば、Cre リコンビナーゼであれば、loxP 配列が挙げられ、リコンビナーゼ R であれば Rs 配列が挙げられ、FLP リコンビナーゼであれば、FRT 配列が挙げられる。

【0015】

被切除領域に含まれる「マーカー遺伝子」としては、該遺伝子がコードするマーカータンパク質が植物細胞において発現し、検出可能であればよく、例えば、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子、薬剤耐性遺伝子が挙げられる。

【0016】

蛍光タンパク質遺伝子としては、具体的には、例えば、GFP (緑色蛍光タンパク質) 遺伝子、YFP (黄色蛍光タンパク質) 遺伝子、RFP (赤色蛍光タンパク質) 遺伝子、エクオリン遺伝子が挙げられる。発光酵素遺伝子としては、具体的には、例えば、ルシフ

エラーゼ遺伝子が挙げられる。発色酵素遺伝子としては、具体的には、例えば、グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子、ガラクトシダーゼ遺伝子、アルカリフォスファターゼ遺伝子、SEAP 遺伝子が挙げられる。薬剤耐性遺伝子としては、具体的には、例えば、カナマイシン耐性 (NPTII) 遺伝子、ハイグロマイシン耐性 (HPT) 遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、スペクチノマイシン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、除草剤耐性遺伝子 (ピアラホス耐性遺伝子、グリフォセート耐性遺伝子 (EPSPS)、スルホニル尿素系耐性遺伝子 (ALS)) が挙げられる。

【0017】

「マーカー遺伝子」は、後述の実施例において示すとおり、被切除領域の環状化及びその環状化DNAをモニタリングするために、被切除領域において、5'領域と3'領域とに分割されて含まれる。さらに、当該3'領域は第1のリコンビナーゼ認識部位の3'末端に隣接し、前記5'領域は第2のリコンビナーゼ認識部位の5'末端に隣接するよう、被切除領域において配置される。そして、この構成をとることによって、前述の部位特異的リコンビナーゼの作用により、第1のリコンビナーゼ認識部位及び第2のリコンビナーゼ認識部位間で組換えが生じた際に、マーカー遺伝子の5'領域と3'領域とが結合され、再構成されることになる。

10

【0018】

マーカー遺伝子の分割は、当該再構成により、機能的なタンパク質を発現しうるものであれば特に制限はなく、例えば、マーカー遺伝子のエキソン中であってもよく、マーカー遺伝子のイントロン中であってもよいが、再構成において配列に改変が生じても影響が少なく、また分割の設計がし易いという観点から、前記マーカー遺伝子は、イントロンにて5'領域と3'領域とに分割されていることが好ましい。

20

【0019】

また、マーカー遺伝子の3'領域と5'領域との間には、少なくともゲノム編集系をコードする遺伝子が配置されていればよいが、マーカー遺伝子の3'領域に含まれるターミネーター領域と、5'領域に含まれるプロモーター領域とが接近し過ぎると、マーカータンパク質の発現に負の影響を与える傾向があることから、前記3'領域及び5'領域間は、2000塩基以上であることが好ましく、4000塩基以上であることがより好ましい。

【0020】

本発明に係る被切除領域において、前記マーカー遺伝子の3'領域と5'領域との間に、ゲノム編集系をコードする遺伝子が配置される。本発明において「ゲノム編集系」とは、ゲノムDNA上の任意の部位に改変を生じさせ得る人工制限酵素システムである限り特に制限されない。人工制限酵素システムとしては、例えば、CRISPR/Casシステム、TALENシステム、ZFNシステム、PPRシステムが挙げられる。

30

【0021】

CRISPR/Casシステムは、ヌクレアーゼ (RGN; RNA-guided nuclease) であるCasタンパク質とガイドRNA (gRNA、Single-guide RNA (SgRNA)) を使用する。該システムを細胞内に導入することにより、ガイドRNAが標的部位に結合し、該結合部位に誘導されたCasタンパク質によってDNAを切断することができる (例えば、CRISPR-Cas9 (米国特許8697359号、国際公開2013/176772号)、CRISPR-Cpf1 (Zetsche B. et al., Cell, 163(3): 759-71, (2015))。

40

【0022】

また、CRISPR/Casシステムから、ヌクレアーゼ活性を除去したものに、脱アミノ化酵素であるデアミナーゼを付加した人工酵素複合体も、本発明に係るゲノム編集系として用いることができる (Target-AID (K. Nishida et al., Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems, Science, DOI: 10.1126/science.aa

50

f 8 7 2 9 , (2 0 1 6))) 。

【 0 0 2 3 】

T A L E N システムは、DNA 切断ドメイン（例えば、F o k I ドメイン）に加えて転写活性化因子様（T A L）エフェクターのDNA 結合ドメインを含む人工ヌクレアーゼ（T A L E N）を使用する（例えば、米国特許 8 4 7 0 9 7 3 号、米国特許 8 5 8 6 3 6 3 号）。該システムを細胞内に導入することにより、T A L E N が DNA 結合ドメインを介して標的部位に結合し、そこで DNA を切断する。標的部位に結合する DNA 結合ドメインは、公知のスキーム（例えば、Z h a n g , F e n g e t . a l . (2 0 1 1) N a t u r e B i o t e c h n o l o g y 2 9 (2) に従って設計することができる。

【 0 0 2 4 】

Z F N システムは、ジンクフィンガーアレイを含む DNA 結合ドメインにコンジュゲートした核酸切断ドメインを含む人工ヌクレアーゼ（Z F N）を使用する（例えば、米国特許 6 2 6 5 1 9 6 号、8 5 2 4 5 0 0 号、7 8 8 8 1 2 1 号、欧州特許 1 7 2 0 9 9 5 号）。該システムを細胞内に導入することにより、Z F N が DNA 結合ドメインを介して標的部位に結合し、そこで DNA を切断する。標的部位に結合する DNA 結合ドメインは、公知のスキームに従って設計することができる。

【 0 0 2 5 】

P P R システムとしては、例えば、ヌクレアーゼドメインが融合された P P R (p e n t a t r i c o p e p t i d e r e p e a t) を使用することができる (N a k a m u r a e t a l . , P l a n t C e l l P h y s i o l 5 3 : 1 1 7 1 - 1 1 7 9 (2 0 1 2)) 。

【 0 0 2 6 】

これらゲノム編集系の中でも、標的部位の認識に核酸（ガイド RNA）を用いるため、標的部位をより自由に選択でき、その調製も簡便であるという観点から、C R I S P R / C a s システムが好ましい。なお、C R I S P R / C a s システムにおいて用いられるガイド RNA の長さは、少なくとも 1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0 塩基である。好ましい塩基長の上限としては、3 0 以下、より好ましくは 2 5 以下、さらに好ましくは 2 2 以下、最も好ましくは 2 0 以下である。C a s タンパク質は、1 つ以上の核局在化シグナル（N L S）を含んでいてもよい。また、C a s タンパク質は、II 型 C R I S P R 系酵素が好ましく、例えば、C a s 9 タンパク質である。C a s 9 タンパク質は、肺炎連鎖球菌（S . p n e u m o n i a e）、化膿性連鎖球菌（S . p y o g e n e s）C a s 9、S . サーマフィラス（S . t h e r m o p h i l u s）C a s 9 であり、それらの生物に由来する突然変異 C a s 9 を含み得、また、C a s 9 ホモログ又はオルソログであり得る。

【 0 0 2 7 】

本発明に係る被切除領域において、前記マーカー遺伝子の 3 ' 領域と 5 ' 領域との間に、ゲノム編集系をコードする遺伝子の他、更に他の外来遺伝子が含まれていてもよい。「外来遺伝子」としては特に制限はなく、例えば、植物ホルモン生合成遺伝子、複製促進因子遺伝子、細胞死抑制因子遺伝子が挙げられる。

【 0 0 2 8 】

植物ホルモン生合成遺伝子としては、具体的に、i p t 遺伝子、i a a M 遺伝子、i a a H 遺伝子、r o l (r o l A、r o l B、r o l C) 遺伝子等が挙げられる。不定胚の形成を促進する遺伝子として、W S U 遺伝子、B B M 遺伝子、A G L 1 5 遺伝子、L e c 1 遺伝子等が、挙げられる。複製促進因子遺伝子としては、具体的に、A P S 遺伝子、c t - a r s 1 遺伝子等が挙げられる。細胞死抑制遺伝子としては、具体的に、A C C d 遺伝子、B a x - I 遺伝子、N a G H 遺伝子等が挙げられる。

【 0 0 2 9 】

本発明の「DNA 構築物」においては、前述の被切除領域の他、当該領域の少なくとも一方の外側に、前記部位特異的リコンビナーゼをコードする遺伝子が配置されていればよいが、さらに他の遺伝子を含んでいてもよい。「他の遺伝子」としては特に制限はなく、例えば、本発明の DNA 構築物を、植物細胞以外の宿主（例えば、大腸菌）にて、複製で

10

20

30

40

50

きるようにするための複製起点 (Ri プラスミド由来の変異型複製起点 (Ri - ori) 等) や、前記宿主において機能するマーカー遺伝子 (NPT III 遺伝子等) が挙げられる。

【0030】

なお、本発明においてDNA構築物に含まれる各遺伝子には、タンパク質又はRNAのコード領域のみならず、その発現を制御する領域 (プロモーター、エンハンサー、インシュレーター、ターミネーター、ポリA付加シグナル等) が適宜付加されていてもよい。「プロモーター」としては、植物細胞内において機能し、構成的に発現するか、植物の特定の組織内あるいは特定の発育段階において発現を導くことのできるDNAであればよい。例えば、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35Sプロモーター、E12 35Sオメガプロモーター、ノパリン合成酵素遺伝子のプロモーター (Pnos)、トウモロコシ由来コピキチンプロモーター、イネ由来のアクチンプロモーター、タバコ由来PRタンパク質プロモーター、ADHプロモーター、RuBisCoプロモーターが挙げられる。「ターミネーター」としては、前記プロモーターによる転写転写を終結でき、ポリA付加シグナルを有する配列であればよく、例えば、熱ショックタンパク質 (HSP) 遺伝子のターミネーター、ノパリン合成酵素 (NOS) 遺伝子のターミネーター、オクトピン合成酵素 (OCS) 遺伝子のターミネーター、CaMV 35Sターミネーターが挙げられる。

10

【0031】

また、本発明の「DNA構築物」において、前記部位特異的リコンビナーゼによる組換えが生じた際に、その範囲はリコンビナーゼ認識部位間のみならず、その周辺領域にも及び得るから、第1のリコンビナーゼ認識部位の5'末端には、更に前記マーカー遺伝子の5'領域の3'末部位が配置され、第2のリコンビナーゼ認識部位の3'末端には、更に前記マーカー遺伝子の3'領域の5'末部位が配置されていることが好ましい。この場合における、前記5'領域の3'末部位と、前記3'領域の5'末部位の長さには、特に制限はないが、10塩基以上であることが好ましく、50塩基以上であることがより好ましく、80塩基以上であることがさらに好ましく、100塩基以上であることがより好ましい。

20

【0032】

本発明の「DNA構築物」の形態としては、配置された遺伝子を導入された植物細胞内で発現できるものであれば特に制限はなく、例えば、pUC系 (pUC57、pUC18、pUC19、pUC9等)、pAL系 (pAL51、pAL156等)、pBI系 (pBI121、pBI101、pBI221、pBI2113、pBI101.2等)、pPZP系、pSMA系、中間ベクター系 (pLGV23Neo、pNCAT等)、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV)、インゲンマメモザイクウイルス (BGMV)、タバコモザイクウイルス (TMV) が挙げられる。

30

【0033】

本発明のDNA構築物を、後述の実施例に示すように、アグロバクテリウム法により植物細胞に導入する場合には、当該構築物は、アグロバクテリウムT-DNA配列由来の右境界配列 (RB) 及び左境界配列 (LB) を更に含んでいることが望ましい。なお、この場合、前記被切除領域及び前記部位特異的リコンビナーゼをコードする遺伝子は、前記RBとLBとに挟まれた伝達領域に配置されることとなる。

40

【0034】

さらに、アグロバクテリウムにおける前記伝達領域の形成を高め、植物細胞への当該領域の移行を促進するという観点から、RBの5'末端にはオーバードライブ (OD) 配列が隣接していることが好ましい。また、LBは複数 (例えば、2個) 配置されていてもよい。さらに、RBの3'末端及びLBの5'末端には各々、テロメア配列が隣接していてもよい (Chiurazzi M.ら、Plant Molecular Biology、1994年、26巻、923~934ページ、Teo CH.ら、The Plant Journal、2011年、68巻、28~39ページ 参照)。

【0035】

また、本発明のDNA構築物は、当業者であれば適宜公知の手法を用いて作製すること

50

ができる。例えば、後述の実施例に示すように、精製された遺伝子カセットを適当な制限酵素で切断し、骨格となる適当なベクターの制限酵素部位又はマルチクローニングサイト等に連結することにより作製することができる。また、In-Fusionクローニング、TAクローニング、二重交叉組換え(double cross-over)等の手法を用いても、本発明のDNA構築物は作製できる。さらに、本発明のDNA構築物においてコードされる遺伝子の塩基配列は、導入される植物細胞においてそれらの翻訳産物を効率良く発現させるため、当該細胞に合わせたコドンに最適化されていてもよい。

【0036】

(ゲノム編集された植物細胞の生産方法)

本発明のゲノム編集された植物細胞の生産方法は、

(1) 上述の本発明のDNA構築物を、植物細胞に導入する工程、

(2) 前記工程にて得られた細胞から、前記マーカー遺伝子の発現を指標として、前記DNA構築物が導入され、前記被切除領域の環状化が生じている細胞を選抜する工程。

を含む、方法である。

【0037】

後述の実施例において示すとおり、この方法によれば、前記被切除領域の環状化が生じている細胞、すなわち当該領域に含まれるゲノム編集系をコードする遺伝子等が、植物ゲノムに組み込まれていない細胞を選抜することができ、ひいては標的遺伝子のみが改変された植物細胞を得ることができる。

【0038】

本発明の方法においてゲノム編集の対象となる「植物」は、被子植物及び裸子植物を含む種子植物であり、被子植物には、単子葉植物及び双子葉植物が含まれる。単子葉植物としては、例えば、イネ科植物、ユリ科植物、バショウ科植物、パイナップル科植物、ラン科植物が挙げられる。双子葉植物としては、例えば、アブラナ科植物、マメ科植物、ナス科植物、ウリ科植物、ヒルガオ科植物、バラ科植物、クワ科植物、アオイ科植物、キク科植物、ヒユ科植物、タデ科植物が挙げられる。また、裸子植物としては、例えば、マツ、スギ、イチヨウ、ソテツが挙げられる。

【0039】

本発明のDNA構築物が導入される「植物細胞」には、前述の植物体中の細胞の他、当該植物由来の培養細胞も含まれる。さらに、種々の形態の植物細胞、例えば、葉の切片、種子、種子の胚の茎頂、塊茎の幼芽の茎頂、懸濁培養細胞、プロトプラスト、カルス、未熟胚、花粉等が含まれる。

【0040】

本発明のDNA構築物の植物細胞への「導入」は、当業者であれば適宜公知の手法を用いて行なうことができ、例えば、アグロインフィルトレーション等のアグロバクテリウム法、iPB(in planta Particle Bombardment)法等のパーティクルボンバードメント法、エレクトロポレーション法、PEG-リン酸カルシウム法、リポソーム法、マイクロインジェクション法、ウィスカー法、プラズマ法、レーザーインジェクション法が挙げられる。なお、iPB法については、例えば、特開2017-205104号公報及び特開2017-205103号公報に開示されている。

【0041】

本発明のDNA構築物が挿入された植物細胞は、前記マーカー遺伝子の発現を指標とすることにより、当該DNA構築物が導入され、前記被切除領域の環状化が生じている細胞を選抜することができる。「選抜」は、当業者であれば、マーカー遺伝子の種類に合わせて適宜行なうことができる。例えば、マーカー遺伝子が蛍光タンパク質遺伝子である場合には、蛍光顕微鏡でその発現を検出して細胞を選抜することができる。また蛍光強度の違いを利用することにより、セルソーター等で選抜することも可能である。発光酵素遺伝子を用いた場合には、細胞に発光基質を加え、発光光度計で発光量を測定することにより、その発現を検出して細胞を選抜することができる。発色酵素遺伝子を用いた場合には、細胞に発色基質を加え、発色の有無を観察することにより、その発現を検出して細胞を選抜

10

20

30

40

50

することができる。薬剤耐性遺伝子を用いた場合には、各薬剤を含有する培地（選択培地）で細胞を培養することにより、細胞を選抜することができる。

【0042】

また、本発明において、前記外来遺伝子として植物ホルモン生合成遺伝子も含むDNA構築物を用いる場合には、以下のゲノム編集された植物の生産方法の態様もとり得る。

【0043】

ゲノム編集された植物の生産方法であって、下記(1)～(3)の工程を含む方法
(1)植物ホルモン生合成遺伝子も含む本発明のDNA構築物を、植物細胞に導入する工程、

(2)前記工程にて得られた細胞から、前記マーカー遺伝子の発現を指標として、前記DNA構築物が導入され、前記被切除領域の環状化が生じている細胞を選抜する工程、

(3)前記工程にて得られた細胞を培養して植物組織を生成させ、前記DNA構築物上の植物ホルモン生合成遺伝子の発現に起因する植物組織における形態変化を指標として、当該形態変化が生じた植物組織を選抜する工程。

【0044】

当該方法における工程(1)及び(2)については上述のとおりである。工程(3)においては、植物ホルモン生合成遺伝子の発現に起因する植物組織における形態変化を指標とすることにより、本発明のDNA構築物が導入され、前記被切除領域の環状化が生じている植物組織を選抜することができる。なお、植物組織生成に至る植物細胞の培養法としては、特に制限はなく、当業者であれば、後述の実施例に示すような公知の培地等を用いて適宜行なうことができる。

【0045】

また、工程(3)における「選抜」も、当業者であれば、植物ホルモン生合成遺伝子の種類に合わせて適宜行なうことができる。例えば、植物ホルモン生合成遺伝子がipt遺伝子である場合には、不定芽形成又はカルス形成を指標として、植物組織を選抜することができる。iaaM遺伝子及びiaaH遺伝子である場合には、不定根形成又はカルス形成を指標として、植物組織を選抜することができる。ipt遺伝子、iaaM遺伝子及びiaaH遺伝子である場合には、不定根形成又はカルス形成を指標として、植物組織を選抜することができる。rol遺伝子である場合には、毛状根形成又はカルス形成を指標として、植物組織を選抜することができる。AGL15遺伝子である場合には、不定胚形成を指標として、植物組織を選抜することができる。また、BBM遺伝子、WSU遺伝子又はLec1遺伝子である場合には、カルス形成を指標として、植物組織を選抜することができる。

【0046】

また、このようにして選抜して得られた植物細胞等において、標的遺伝子の配列が改変されたことの確認は、当業者であれば、公知の手法を適宜用いて行なうことができる。例えば、シーケンス(配列決定)法、PCR法、CAPS法、RFLP法、サザンブロッティング法等を用いて確認することもできる。また、標的遺伝子におけるゲノム編集の有無等は、該遺伝子から発現されるRNAの有無、量、分子量等を解析することにより確認することもできる。例えば、RT-PCR法、ノーザンブロッティング法を用いて確認することもできる。さらに、標的遺伝子から発現されるタンパク質の有無、量、分子量等を解析することにより確認することもできる。例えば、ウエスタンブロッティング法、免疫染色、ELISA法、RIA、ドットイミュノバイディングアッセイを用いて行なうことができる。

【0047】

また、植物においては、古くから、その体細胞が分化全能性を有していることが知られており、様々な植物において、植物細胞、植物組織(カルス等)から植物体を再生する方法が確立されている(例えば、田部井豊 編、「形質転換プロトコール[植物編]」、株式会社化学同人、2012年9月20日出版) 参照のほど)。したがって、例えば、本発明の方法により得られた植物細胞又は植物組織から植物体を再生することにより、標的

10

20

30

40

50

遺伝子の配列が改変された植物体を得ることができる。

【実施例】

【0048】

以下、実施例に基づいて本発明をより具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。また、本実施例は、以下に示す実験材料及び方法を用いて行なった。なお、以下にて、メーカー名の記載のない試薬は、和光純薬社製のものである。

【0049】

(植物体の準備と栽培)

トランジェントアッセイには、ベンサミアナタバコ (*Nicotiana benthamiana*) を用いた。ベンサミアナタバコは、ウイルスに対する免疫システムがないため、アグロインフィルトレーション等の感染実験においてよく使用されている。

10

【0050】

浸漬法による感染実験の際には、タバコ (*N. tabacum*) の SR1 を用いた。SR1 のゲノムは異質複二倍体 ($2n = 24$) であり *N. sylvestris* ($2n = 12 : SS$) と *N. tomentosiformis* ($2n = 12 : TT$) を祖先としている。本実施例にて用いた SR1 種子は JT (日本たばこ産業) より譲渡された。

【0051】

SR1 の種子に 70% エタノール 1 ml 加え、6000 rpm で遠心し、上清を捨てた。滅菌溶液 (10 倍希釈ハイタ) 1 ml を加え 10 分間攪拌し、その後上清を捨てた。クリーンベンチ内で、滅菌水 1 ml を加え攪拌し、その後上清を捨てた。この操作を 3 回繰り返した。浮いている種は捨て、寒天培地に播種し、全明で 2 ~ 3 週間高温室に置いた。芽が出てきた種から 200 ml コニカルピーカーに移し替え、大きくなったものを、さらにジャムビンに移し替えた。約 2 ヶ月後の植物体の葉を感染実験に使用した。

20

【0052】

(使用培地と抗生物質)

LB 培地は、Bacto Tryptone 10 g、Bacto Yeast Extract 5 g 及び NaCl 10 g を、DW で 1000 ml にメスアップし、pH 7.2 に調整した後、オートクレーブ (121、20 分) にて滅菌したものをを用いた。寒天培地の場合は、全量を 200 ml で調製し、pH 調整後に、Bacto Ager 3 g を加えてオートクレーブ (121、20 分) にて滅菌した。寒天培地に抗生物質を加える場合は、シャーレに広げる直前に加えた。

30

【0053】

MS 培地は、ムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類 (日本製薬社製) 1 袋、MURASHIGE & SKOOG MODIFIED VITAMIN SOLUTION (1000x)、MP Biomedicals 1 ml 及びスクロース 30 g を、DW で 1000 ml にメスアップし、1 M 水酸化カリウムで pH 5.8 に調整した後、200 ml に小分けしてゲランガム 0.6 g を加え、オートクレーブ (121、20 分) にて滅菌した。

【0054】

抗生物質又はアセトシリンゴンを加える場合は、シャーレに広げる直前に加えた。抗生物質は各々、アンピシリン 100 mg / l、カナマイシン 50 mg / l、ストレプトマイシン 20 mg / l、カルベニシリン 100 mg / l、セフトキシム 200 mg / l になるよう調整して用いた。アセトシリンゴンの使用濃度は、50 mg / l になるように調整した。

40

【0055】

植物ホルモンを添加する場合は、以下の濃度になるように pH 調製前に加えた。

再分化培地：ナフタレン酢酸 (NAA) 0.1 mg、1、6 - ベンジルアデニン (BA) 1.0 mg / l

NAM 培地：1 - ナフチルアセトアミド (NAM) 1.0 mg / l。

【0056】

(アグロインフィルトレーション)

50

LB培地（リファンピシン 25 mg/L、カナマイシン 50 mg/L）でシングルコロニーを取り、2~3 mlの液体LB培地で、28、150~200 rpmで18時間培養した。培養したアグロ菌液に、200 μMのアセトシリンゴンを添加したLB培地を加え、28、150~200 rpmで24時間培養した。培養液を3000 gで10分間遠心し、集菌した後、培養液と等量のインフィルトレーションバッファーに再懸濁した。再び3000 gで10分間遠心し、集菌した後培養液の半分量のインフィルトレーションバッファーに再懸濁した。ODを0.3にあわせ、アセトシリンゴンを200 μMになるように添加した。インフィルトレーション溶液をシリンジにいれ、ベンサミアナの葉の裏側から注入した。

【0057】

（形質転換）

大腸菌（JM101）、アグロバクテリウム（LBA4504）への形質転換は、ヒートショック法を用いて行った。コンピテントセルに1 ngのDNAを加え、20分間氷上に置いた。ヒートブロックを用い、42で30秒ヒートショックし、直ちに氷にさした。その後、コンピテントセルの5倍量の液体LB培地を加えた後、大腸菌では37、1時間、アグロバクテリウムでは28、2時間でインキュベートした。インキュベート後、適当な抗生物質を含むLB培地に菌液をまき、コンラージ棒で伸ばし大腸菌は37で約12時間、アグロバクテリウムは28で48時間インキュベートし、コロニーを得た。

【0058】

（SR1タバコへの浸漬法による感染実験）

ベクターを形質転換したアグロバクテリウムを、カナマイシンを加えたLB培地で、28で48時間振蕩培養して感染菌液とした。無菌苗から十分に育った葉を切り取り、滅菌水を入れたシャーレで、太い葉脈を避け1 cm角程度の葉片にした。27 mlの滅菌水を入れた50 mlファルコンチューブに葉片を入れ、感染菌液を3 ml加えよく攪拌した。葉片全体が感染液に浸かるようにし、10分間浸漬した。葉片を滅菌キムタオルに取り出し、余分な菌液を吸い取った。アセトシリンゴンを加えたMS再分化培地に置床し、28全暗で48時間共存培養を行った。共存培養した葉片を、カルベニシリンとセファタキシンを加えたMS培地上にシャーレ1枚当り16~25枚程度置床し、1週間全暗条件にて培養を行った。1週間後以降は25 16 h明/8 h暗条件で培養した。その後は、1週間ごとに培地を交換し継代を行った。

【0059】

（アガロース電気泳動）

DNAのアガロース電気泳動においては、トリス-酢酸-EDTA（TAE）泳動バッファー（50×）（コスモ・バイオ社製）をDWで50倍希釈し、泳動バッファーとした。アガロースゲルとして、このバッファーにAgarose L03（タカラ社製）を1%添加して加熱溶解させ、ゲルトレイで固めて調製した、1%アガロースゲルを使用した。

【0060】

（ゲル抽出）

アガロース電気泳動をした後に、FastGene Gel/PCR Extraction Kit（日本ジェネティクス社製）を用いて、付属の説明書に従って行い、ゲルからDNAを抽出した。

【0061】

（制限酵素処理）

制限酵素処理は全てタカラ社製の酵素を用いて、付属の説明書に従って行った。

【0062】

（インフュージョン反応）

インフュージョン（In Fusion）反応は、2つのDNA末端が15 bpの相同配列を持つ場合に、それらDNAを結合することができる反応である。インフュージョン反応によるクローニングは、PrimeSTAR Max（タカラ社製）を用いて付属の説明書に従ってPCRを行い、そのPCR産物と、制限酵素処理で線上化したベクターを

10

20

30

40

50

、In Fusion HD Cloning Kit (タカラ社製) を用い、付属の説明書に従って反応を行った。インフュージョン反応により環状化したベクターを大腸菌に形質転換し、コロニーPCRでベクターを確認した。

Prime STAR MAXを用いたPCRの基本的なプログラムは、以下のとおりである。

【0063】

【表1】

温度	時間	サイクル数
94°C	2min	×1
98°C	10sec	×30
Tm値	15sec	
72°C	30sec/1kb	
72°C	1min	×1
4°C	∞	

10

20

【0064】

(コロニーPCR)

Emerald Amp (タカラ社製) を用い、付属の説明書に従って、形質転換した大腸菌コロニーを2µlチップの先で取り、PCRを行った。

Emerald Ampを用いたPCRの基本的なプログラムを以下に示す。

【0065】

【表2】

温度	時間	サイクル数
94°C	2min	×1
98°C	10sec	×30
60°C	30sec	
72°C	1min/1kb	
72°C	1min	×1
4°C	∞	

30

40

【0066】

(ゲノム抽出)

Plant DNA Isolation Reagent (タカラ社製) を用い、付属の説明書に従って反応を行った。

【0067】

(ゲノムPCR)

全てのゲノムは、50ng/µlになるよう調整してテンプレートとした。Ex - Ta

50

q (タカラ社製) を用い、付属の説明書に従って P C R を行った。
基本的なプログラムを以下に示す。

【 0 0 6 8 】

【表 3】

温度	時間	サイクル数
98°C	2min	× 1
98°C	10sec	× 30
T _m 値	30sec	
72°C	1 min/1kb	
72°C	2min	× 1
4°C	∞	

10

【 0 0 6 9 】

(平滑末端クローニング)

Mighty Cloning Reagent Set (タカラ社製) を用い、付属の説明書に従ってクローニングを行った。クローニングベクターは、付属の B A P 処理された p U C 1 1 8 を用いた。

20

【 0 0 7 0 】

(CAPS 解析)

CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) 解析は、標的配列である P D S 3 を Prime STAR MAX を用いて増幅して行った。P D S 3 には、制限酵素 B l n I で切断される配列が P A M 配列の直前に位置している。したがって、制限酵素の認識配列に変異が入ると、B l n I による P D S 3 の切断ができなくなるため、制限酵素の未切断の有無により変異体を検出することができる。

30

【 0 0 7 1 】

(シークエンス解析)

Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (アプライドバイオシステム社製) を用い、付属の説明書に従って、DNA シークエンス反応を行った。その後、エタノール沈殿を行い、ホルムアミドで溶解した後、A B I 3 1 3 0 シークエンサーの説明書に従い、シークエンスを行った。解析は Finch TV を用いて行った。

【 0 0 7 2 】

(実施例 1) Switch on GFP ベクター

本発明者らは、ゲノム編集植物を作製する上で、変異を引き起こす人工制限酵素遺伝子等の外来遺伝子を、植物ゲノムに組み込むことなく、一過的に発現させるために、図 2 及び 3 に示すような、植物細胞における人工制限酵素等 (ゲノム編集系) の発現方法、及び該方法に用いられる DNA 構築物を構想した。

40

【 0 0 7 3 】

そして、この DNA 構築物が、植物ゲノムに組込まれる前に環状 DNA を切り出し、環状 DNA の遺伝子を一過的に発現できることを検証すべく、先ず、図 4 にて示す、Switch on GFP ベクターを設計した。

【 0 0 7 4 】

Switch on GFP ベクターの大きな特徴は、レポーター遺伝子として用いる g f p が分割されて組み込まれている点である。すなわち、このベクターを用いたアグロバ

50

クテリウム法によって、当該ベクター中のLBとRBの間のT-DNAが植物に導入され、T-DNA中の*int cre*が一過的に発現をする。次いで、該酵素による*lox P*間の組換えによって切り出され、環状化が生じた結果、分割されていた*gfp*遺伝子が再構成され、該遺伝子がコードするGFPが発現することになる。そのため、このGFPの発現を検出することにより、環状DNAの生成及びその安定性を確認することが可能となる。なお、「*int cre*」及び「*intron cre*」とは、コーディング部分の前半部にイントロンが挿入されている*Cre*リコンビナーゼ遺伝子を意味する。

【0075】

そして、このように設計した*Switch on GFP*ベクターを以下のようにして作製した。まず、MCS(マルチクローニングサイト)、RB、OD及びLBx2を有するT-DNA領域を合成し、pUC57へクローニングした。その後、pRI201ベクターの*npt III*及び*Ri-Ori*を、下記プライマー(1)及び(2)を用い、PCRにより増幅し、*EcoRV*サイトへ挿入した。

10

【0076】

*gfp*のコーディング領域の内側に34bpの*lox P*配列を含むシロイヌナズナ由来のKOR1イントロンを組み込んだ*lox intron GFP*を合成した。KOR1イントロンの組み込み位置は、植物イントロンのコンセンサス領域(*ag//gtaagt t gcaag//g*)に配慮して決定した。34bpの*lox P*配列を含むシロイヌナズナ由来のKOR1イントロンは、下記のとおり2種類用いた。

【0077】

lox-intron(KOR1)01 (配列番号:1)

G T A A G T C T T C T T T T C C T T T A C T C T T T A C A G A A A T G G T A A T
 C T C A G A T A T A G T A A a t a a c t t c g t a t a a t g t a t g c t a t a c
 g a a g t t a t T G G A T A A G A T C C A A A A A T G A C A C T T T T A A C C A
 A G A T T G T A C G A A G A T C T T T T T A A A C T C C A T T T T T T A T T T T
 G A C A T C T A A A T T G G A T T T A A C T C G G C C T T G C T G T A T T T T G
 G C A G

20

lox-intron(KOR1)02 (配列番号:2)

G T A A G T C T T C T T T T C C T T T A C T C T T T A C A G A A A T G G T A A T
 C T C A G A T A T A G T A A T G G A T A A G A T C C A A A A A T G A C A C T T T T
 T A A C C A A a t a a c t t c g t a t a a t g t a t g c t a t a c g a a g t t a
 t G A T T G T A C G A A G A T C T T T T T A A A C T C C A T T T T T T A T T T T
 G A C A T C T A A A T T G G A T T T A A C T C G G C C T T G C T G T A T T T T G
 G C A G

30

前記2種の配列において、大文字はシロイヌナズナ由来のKOR1イントロンの配列(171bp)を示し、小文字は*lox P*配列(34bp)を示す。

【0078】

図4に示す*Switch on*ベクター骨格のMCSにおける各制限酵素サイトへの導入は、制限酵素による切断とPCR増幅断片のインフュージョン反応により行った。概要としては以下のとおりである。

40

【0079】

lox intron gfp

*lox intron gfp*は2箇所の制限酵素サイトへ分割して導入した。35Sプロモーターからイントロンの終わりまでは、下記プライマー(3)及び(4)を用いたPCRにより増幅し、*SmaI*サイトに導入した。またイントロンの始めからHST(熱ショックタンパク質ターミネーター)までは、下記プライマー(7)及び(8)を用いたPCRにより増幅し、*KpnI*サイトに導入した。

【0080】

intron cre

遺伝子合成された35SプロモーターとHSTを有する*intron cre*は、下記

50

プライマー（５）及び（６）を用いて増幅し、Sma I サイトへ lox intron gfp の上流部と共に導入した。

【 0 0 8 1 】

また、後述のとおり Switch on GFP ベクターに下記遺伝子を挿入する場合には、以下のようにして行なった。

【 0 0 8 2 】

a - i p t、3 5 S - i p t

秋田県立大学の我彦廣悦氏より譲受したアグロバクテリウム pO22 系統由来のプロモーターを有する a - i p t は、下記プライマー（１３）及び（１４）を用いて増幅し、EcoRI サイトへ導入した。また 35S プロモーターを有する 35S - i p t は下記プライマー（９）及び（１０）を用いて同サイトへ導入した。

10

【 0 0 8 3 】

i a a H、i a a M

35S プロモーターと HSP を有する i a a H は、a - i p t と導入する際は下記プライマー（１５）及び（１６）を用いて増幅し、また 35S - i p t と導入する際は下記プライマー（１１）及び（１２）を用いて増幅し、各々 EcoRI サイトに導入した。同プロモーターとターミネーターを有する i a a M は下記プライマー（１７）及び（１８）を用いて増幅し、HindIII サイトに導入した。

【 0 0 8 4 】

C a s 9、P D S 3 の S g R N A (S i n g l e - g u i d e R N A)

20

国立研究開発法人農業生物資源研究所（現：国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構）の土岐精一氏より譲渡された、パセリ由来 PCubi ユビキチンプロモーターと大豆由来 Pea3A ターミネーターとを有する Cas9、及びシロイヌナズナ由来の AtU-6 プロモーターを有する PDS3 の SgRNA は、下記プライマー（１９）及び（２０）を用いて増幅し、NotI サイトに導入した。

【 0 0 8 5 】

なお、このように挿入した遺伝子は全て、合成時にタバコにおけるコドン使用頻度に最適化した。また、前記プライマーの配列を以下に示し、これら配列の位置関係は図 6 に示す。

R i - O r i n p t I I I の E c o R V サイトへの挿入

30

プライマー（１） Ri - NPT - F

5' AGCTCGGCACAAGATGATCCTACAAGGTAG 3'

（配列番号：３、Tm：59.2）。

プライマー（２） Ri - NPT - R

5' AAAGAGCGTTTTAGATGTTGCCATGTTTTAC 3'

（配列番号：４、Tm：53.7）。

l o x i n t r o n g f p の S m a I サイトへの挿入

プライマー（３） lox - GUS - F

5' GGATCCGAATTCCCGTCCCCAGATTAGCC 3'

（配列番号：５、Tm：63.3）。

40

プライマー（４） Out - Sma I (GF - I) - R

5' ACTTCCTGCAGGCCCTGCCAAAATACAGC 3'

（配列番号：６、Tm：61.9）。

I n t r o n c r e の S m a I サイトへの挿入

プライマー（１１） lox - i a a H - F

5' GTCCCCAGATTAGCCTTTTCA 3'

（配列番号：７、Tm：48.6）。

プライマー（６） Out - Sma I (HSP - T) - R

5' ACTTCCTGCAGGCTTATCTTTAATCAT 3'

（配列番号：８、Tm：56.5）。

50

lox intron gfpのKpnIサイトへの挿入

プライマー(7) Out-KpnI(I-P)-F(end)

5' GATAGTTTAAACTGGGTAAGTCTTCTTTTC 3'
(配列番号:9、Tm:52.4)。

プライマー(8) Out-KpnI(HSP-T)-R

5' AAGCTTGCGGCCGCGCTTATCTTTAATCAT 3'
(配列番号:10、Tm:57.8)。a-Ipt及びiaaHのEcoRIサイトへの挿入

プライマー(9) lox-ipt-F

5' GCTTGGATCCGAATTGTCCCCAGATTAGCC 3' 10
(配列番号:11、Tm:60.6)。

プライマー(10) lox-ipt-R

5' GGCTAATCTGGGGACCTTATCTTTAATCAT 3'
(配列番号:12、Tm:55.1)。

プライマー(11) lox-iaaH-F

5' GTCCCCAGATTAGCCTTTTCA 3'
(配列番号:7、Tm:48.6)。

プライマー(12) lox-iaaH-R

5' TGGGGACGGGGAATTCTTATCTTTAATCAT 3' 20
(配列番号:13、Tm:55.0)。35S-ipt及びiaaHのEcoRIサイトへの挿入

プライマー(13) lox-ipt-F

5' GCTTGGATCCGAATTGTCCCCAGATTAGCC 3'
(配列番号:11、Tm:60.6)。

プライマー(14) lox-SmaI(HSP-T)-R

5' CTTATCTTTAATCATATTCCA 3'
(配列番号:14、Tm:38.8)。

プライマー(15) lox-SmaI(HSP T/ipt)-F

5' ATGATTAAGATAAGCAACGAAGGTAATGG 3' 30
(配列番号:15、Tm:52.4)。

プライマー(16) lox-EcoRI(a-ipt-T)-R

5' TTATCCTGCAGGCCACGAATATCCGTGAC 3'
(配列番号:16、Tm:60.6)。iaaMのHindIIIサイトへの挿入

プライマー(17) Out-HindIII(35S-P)-F

5' GCGCGGCCGCAAGCTGTCCCCAGATTAGCC 3'
(配列番号:17、Tm:67.4)。

プライマー(18) lox-HindIII(HSP-T)-R

5' ATTCGGATCCAAGCTCTTATCTTTAATCAT 3' 40
(配列番号:18、Tm:52.4)。Cas9及びPDS3のSgRNAのNotIサイトへの挿入

プライマー(19) lox-NotI(cas9-P)-F

5' GATGGTACCGCGGCCCTAGCAACGATTGTA 3'
(配列番号:19、Tm:61.9)。

プライマー(20) lox-NotI(SgRNA-T)-R

5' GGACAGCTTGCGGCCCAACTTTGTACAAGA 3'
(配列番号:20、Tm:60.6)。

【0086】

(実施例2) トランジェントアッセイによるSwitch on GFPベクターの作動についての検証

10

20

30

40

50

Switch on GFPベクターを用いたアグロバクテリウム法により、環状DNAが生成されるかどうかを検証するに際して、先ず、植物細胞において、1oxPを組み込んだイントロンを有するgfp遺伝子におけるスプライシングが正常に起き、GFPが発現するかを、確認した。具体的には、図7に示す1oxP配列の位置が異なる2種類の1ox intron GFPベクターと、それらのコントロールとしてGFPベクターを用い、ベンサミアナタバコへのアグロインフィルトレーションを行った。

【0087】

その結果、図8及び図9に示すとおり、GFP蛍光を観察することができ、挿入したイントロンのスプライシングは正常に生じ、1ox intron GFP遺伝子は作動することが確認された。

【0088】

次に、Switch on GFPベクターを用いたアグロバクテリウム法により、環状DNAが生成されるかどうかを検証すべく、図10に示す2種類のSwitch on GFPベクターとコントロールGFPベクターを用いて、再度ベンサミアナタバコへのアグロインフィルトレーションを行い、GFP蛍光の観察を行った。

【0089】

その結果、図11及び12に示すとおり、GFP蛍光を検出することができ、Switch on GFPベクターを用いたアグロバクテリウム法により、環状DNAが生成されていることは確認された。しかしながら、Switch on GFPベクターを導入した場合の蛍光強度は、コントロールのその十分の一程度であった。

【0090】

次に、図13に示すとおり、iptとiaaHを組み込んだSwitch on GFPベクターを用い、アグロインフィルトレーションを行い、GFP蛍光の観察を行った。その結果、図14及び15に示すとおり、ipt及びiaaHを挿入することによって、Switch on GFPベクターの蛍光強度はコントロールの45%まで向上することが明らかになった。

【0091】

さらに、Switch on GFPベクターを用い、アグロインフィルトレーションを行い、感染後7日目と35日目に、GFP蛍光の観察及びゲノムPCRによる環状DNAの検出を行った。その結果、図16に示すとおり、感染後35日目でも、GFP蛍光を観察することができ、また図17に示すとおり、ゲノムPCRの結果から、環状DNAが維持されていることも明らかになった。

【0092】

以上の結果から、Switch on GFPベクターを用いたアグロインフィルトレーションにより環状DNAの切り出しが生じることが確認された。さらに切り出された環状DNAは35日目になっても維持され得ることが明らかになった。

【0093】

また、Switch on GFPベクターに、ipt及びiaaHを挿入することにより、GFPの発現が向上することも明らかになった、このように向上する理由については定かではないが、本発明者らは以下のように推察する。すなわち、ターミネーター(Ter)とプロモーター(35SP)とが隣接した状態になっていたため、GFPの発現の発現不良が生じたものの、ipt及びiaaHの挿入によって、その状態が解消され、GFPの発現が向上したことが考えられる。また、挿入したipt遺伝子が発現することにより、生合成が促進されたホルモンの効果によって、GFPの発現が向上した可能性もある。

【0094】

(実施例3) Switch on GFPベクターを用いたゲノム編集

Switch on GFPベクターを用いることにより、上記構想どおり、植物ゲノムに組み込まれることなく、標的遺伝子を改変(ゲノム編集)できるかどうかを検証した。

【0095】

今回、ゲノム編集の対象として、PDS(phytoene desaturase)

10

20

30

40

50

遺伝子を選択した。また、ゲノム編集における標的配列は、この遺伝子の第3エクソン部分(PDS3)とした(図18参照)。

【0096】

そして、この遺伝子のゲノム編集を試みるに際して先ず、SR1タバコ(*N. tabacum*)のPDS3遺伝子配列を決定するためにシーケンス解析を行った。具体的には、図18に示すプライマーセット(1)及び(2)を用いてPDS3を増幅した。その後、pUC118へ平滑末端クローニングし、コロニーPCRを行った。その結果、図19に示すとおり、1本又は2本のバンドが得られた。

【0097】

次に、1本又は2本のバンドを得られたコロニー各4個から、プラスミド抽出を行い、シーケンス解析を行なった。その結果、相同性の異なる2種類の配列を得ることができた。これはSR1のゲノムが異質複二倍体($2n=24$)であり、*N. sylvestris*($2n=12:SS$)と*N. tomentosiformis*($2n=12:TT$)を持つためであると予想する。実際、1本のバンドをシーケンスした結果、得られた配列は、*N. sylvestris*のそれとの相同性が高かった。また、2本のバンドをシーケンスした結果、*N. tomentosiformis*のそれとの相同性を高く示した。

【0098】

以上の結果より、pUC118にクローニングし、PDS3遺伝子についてコロニーPCRにより解析した結果、1本のバンドが検出された場合には、*N. sylvestris*のゲノムに由来し、2本のバンドが検出された場合には、*N. tomentosiformis*に由来することが示唆された。

【0099】

次に、Switch on GFPベクターを用いた変異導入を試みた。なお、Switch on GFPベクターには、変異導入のため、CRISPR/Cas9システムを導入した。すなわち、Cas9及びPDS3のsgRNAをコードするDNAを前記ベクターに組込んだ。さらに、ホルモンフリー培地でのカルス形成能を高めるため、iaaMも組み込み、図20に示す変異導入用Switch on GFPベクターを構築した。そして、浸漬法を用いたタバコ(SR1)への感染実験を行い、Cas9による変異導入を試みた。

【0100】

その結果、図21に示すとおり、Switch on GFPベクターを導入したSR1の葉片から、カルスを誘導することができた。また、感染後39日目と45日目、2つの実験区から各々無作為にカルス2つをサンプリングし、図18に示すプライマー(1)及び(2)を用い、PCRによりPDS3を増幅した。次いで、増幅した断片に対しCAPS解析を行い、変異導入の検出を行った。その結果、図22に示すとおり、各実験区1つのカルスにおいて、標的配列PDS3に変異が導入されたことが認められた。

【0101】

さらに、図18に示すプライマー(1)及び(2)を用いて増幅した断片を、Mighty Cloning Regent Setを用い、pUC118へ平滑末端クローニングした。当該クローニングによって得られたコロニーは、青白選抜及び図18に示すプライマー(3)及び(4)を用いたコロニーPCRにて、前記増幅断片の挿入を確認した。そして、コロニーPCRの反応液を、BlnI処理に供することで、標的配列に変異が導入されたことを確認した(図23及び24参照)。また、未切断のあるクローンに対してシーケンス解析を行ったところ、下記表4に示すとおり、DNA配列の置換又は短い欠失が認められた。

【0102】

10

20

30

40

50

【表 4】

	配列	配列番号:	変異	クローン数
PDS3 (WT/標的配列)	GAGGCAAGAGATGTCCTAGGTGG	21	—	—
	GAGGCAAGAGAG-----AGGTGG	22	7ヌクレオチド欠失	1
PDS3 (39日目)	GAGGCAAGAAgGTggaAGGTGa	23	6ヌクレオチド置換	1
	GAGGCAAGAGATGTCCTggaTGa	24	4ヌクレオチド置換	2
PDS3 (45日目)	GAGGCAAGAGATG-----	25	10ヌクレオチド欠失	4
	GAGGCAAGAGATGTC-----Ttt	26	4ヌクレオチド欠失、 2ヌクレオチド置換	2

【0103】

なお、表 4 中の配列にて「」は、野生型 (WT) と比して欠失している部位を示し、小文字にて表記した塩基は、野生型 (WT) より置換された部位を示す。

【0104】

以上のとおり、CAPS 解析及びシーケンス解析の結果、Switch on GFP ベクターによって、ゲノム編集系を植物細胞において発現させ、標的遺伝子に変異を導入できることが明らかとなった。

【0105】

なお、図 18 に示すプライマー (1) ~ (4)、及び未切断のあるクローンに対する前

10

20

30

40

50

記シーケンス解析に用いたプライマーの配列は、以下のとおりである。

PDS3の平滑末端クローニング

プライマー(1) NtPDS(1866-1892SG)F

5' ACATATAGGGGTTGCACTCTTCTAAGG 3'

(配列番号: 27、Tm: 54.4)。

プライマー(2) NtPDS(2993-3017c)R

5' CCCAGTCTCATACCAATCTCCATCA 3'

(配列番号: 28、Tm: 53.9)。

PDS3のコロニーPCR

プライマー(3) PDS3-F2(Affrc)

5' GTATTGTCATCAACTGGTTGATTATCTGAGTACC 3'

(配列番号: 29、Tm: 57.0)。

プライマー(4) PDS3-R2(Affrc)

5' CTTTCCATATCTTTTACCTAATATGCTG 3'

(配列番号: 30、Tm: 50.3)。

PDS3のシーケンス解析

PUC M4

5' GTTTTCCCAGTCACGAC 3'

(配列番号: 31、Tm: 43.2)。

PUC RV

5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'

(配列番号: 32、Tm: 40.8)。

【0106】

(実施例4) Switch on GFPベクター導入によるゲノム編集個体の作製

Switch on GFPベクターを用い、浸漬によるアグロバクテリウム法でSR1タバコへの感染実験を行い、環状DNAを有する組換え個体の選抜を行った。また選抜効果を向上させるため、感染時に細胞増殖の促進を目指し、T-DNAに組み込む植物ホルモン遺伝子と培養条件を検討した。

【0107】

具体的には、図25に示すように、植物ホルモン遺伝子の組み合わせを変えた3種類のCas9を有する変異導入Switch on GFPベクターを作製して用いた。なお、iaaHを有するベクターに、オーキシン前駆体合成遺伝子iaaMを組み込むことで、ホルモンフリー培地におけるオーキシン合成を促した。またiaaMを組込まず、オーキシン前駆体の類縁物質NAM(ナフタレンアセトアミド)を添加したMS培地を用いて、オーキシン合成を促す条件も検討した。より具体的には、図25に示すコンストラクトAを導入したタバコ葉片は、MS培地において培養し、コンストラクトBを導入したタバコ葉片は、MS培地又はMS NAM培地において培養し、コンストラクトCを導入したタバコ葉片は、MS培地又はMS NAM培地において培養した。

【0108】

前記5つの培養条件で各20枚の葉片に感染実験を行った結果、18葉片分のカルスを獲得することができた(コンストラクトAのMS培地で6葉片、コンストラクトBのMS培地で2葉片、コンストラクトBのMS NAM培地で5葉片、コンストラクトCのMS培地で5葉片)。なお、ベクターにおける植物ホルモン遺伝子の組み合わせや、MS培地のNAMの有無によるカルス形成能の差を確認することはできなかった。

【0109】

また、図26に示すとおり、カルス化した18葉片のうち5葉片(コンストラクトAのMS培地で2葉片、コンストラクトBのMS NAM培地で2葉片、コンストラクトCのMS培地で1葉片)で、GFP蛍光を観察することができた。

【0110】

さらに、これら葉片においてカルス化した部位をまとめてサンプリングし、ゲノム抽出

10

20

30

40

50

を行い、図27に示すプライマーセットを用い、PCR分析を行なった。その結果、図28に示すとおり、gfp(環状DNA)及びCas9が検出された。さらに、実施例3に示した結果同様に、CAPS解析によって変異導入も検出された。

【0111】

なお、図28に示すプライマー(1)~(4)の配列は、以下のとおりである。

gfp(環状DNA)の検出

プライマー(1) pRI-GFP F

5' CACTGTTGATACATATGGTGAGCAAGGGCG 3'

(配列番号:33、Tm:59.2)。

プライマー(2) pRI-GFP R

5' CTTTCATCTTCATAAGTTACTTGTACAGCTC 3'

(配列番号:34、Tm:53.7)。

Cas9の検出

プライマー(3) FFCas9-113F

5' CCGATAGGCACTCTATCAAG 3'

(配列番号:35、Tm:48.0)。

プライマー(4) FFCas9-640R

5' CAGAGAGGATAGCCTTAGCA 3'

(配列番号:36、Tm:48.0)。

【0112】

(実施例5) Switch on GFPベクター導入による、ゲノム編集個体の作製
実施例4同様に、図25のBに示したコンストラクトを有する変異導入Switch on GFPベクターを用い、感染を実施した。各16枚の葉片に感染実験を行った結果、MS培地で29カルスを獲得することができた。また、29カルスのうち12カルスでGFP蛍光を検出でき、GFP蛍光が検出されたカルスを選抜した。さらに、GFP蛍光により選抜した12カルスのうち、3カルスにおいてCAPS解析によって変異導入が検出された。ゲノムへのランダム挿入が起こっていないと考えられる変異導入カルスが得られた。

【0113】

(比較例1) Switch on GFPベクター(Creカセット無し)導入による、ゲノム編集個体の作製

図25のBに示したコンストラクトを有するが、その外側にCreリコンビナーゼ発現用カセット(intcre)を備えていない変異導入Switch on GFPベクターを用い、実施例4と同様の方法で感染を実施した。各20枚の葉片に感染実験を行った結果、MS培地で40カルスを獲得することができた。しかしながら、40カルスのうちGFP蛍光を有するカルスは1つも得られなかった。さらに、40カルスのうちCAPS解析によって変異導入が検出されたカルスは1つも得られなかった。

【0114】

以上の実施例及び比較例に示した結果より、本発明においては、Creリコンビナーゼによって切り出されたDNAが環状化することによって、GFP蛍光の発現が可能となる。そして、当該蛍光を指標としてカルスを選抜することが、変異導入カルスを獲得するために有効であることが分かった。

【産業上の利用可能性】

【0115】

以上説明したように、本発明によれば、植物細胞において、ゲノム編集系等をコードする外来遺伝子がゲノムに組み込まれることなく、標的遺伝子の配列を改変することが可能となり、安全性の上で有利である。また、本発明によれば、ゲノム編集系を一定期間安定して発現させることができるため、高効率でゲノム編集を行うことができる。したがって、本発明は、農作物育種、有用物資生産、品種改良、目的遺伝子の機能解析等において有用である。

10

20

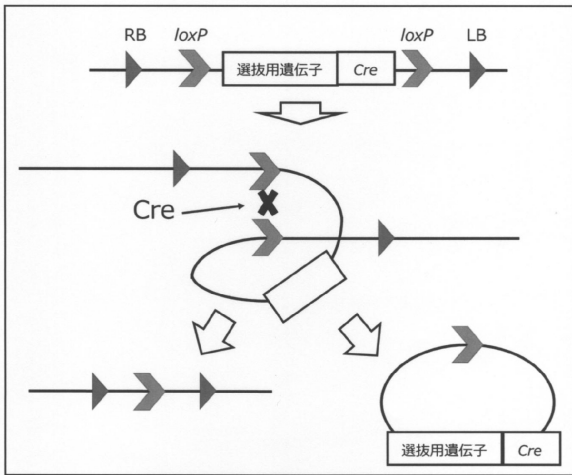
30

40

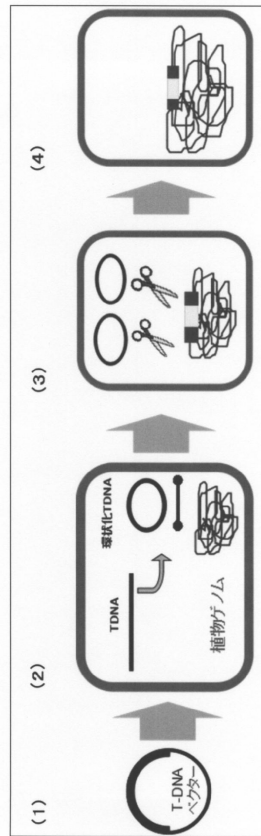
50

【図面】

【図 1】



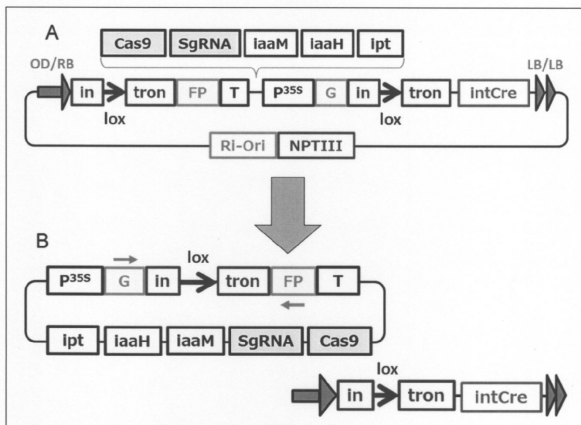
【図 2】



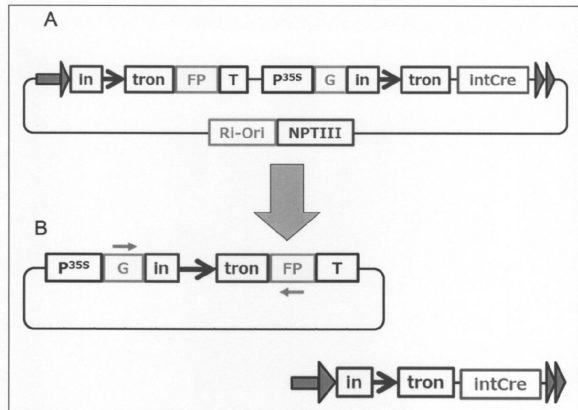
10

20

【図 3】



【図 4】

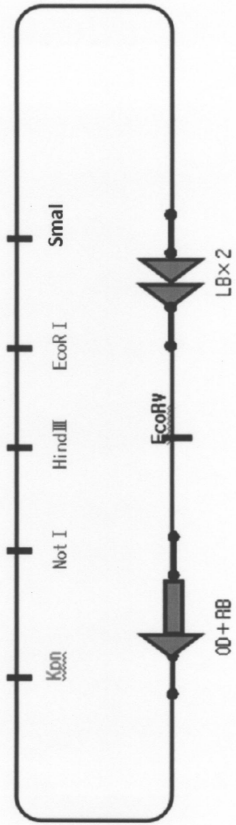


30

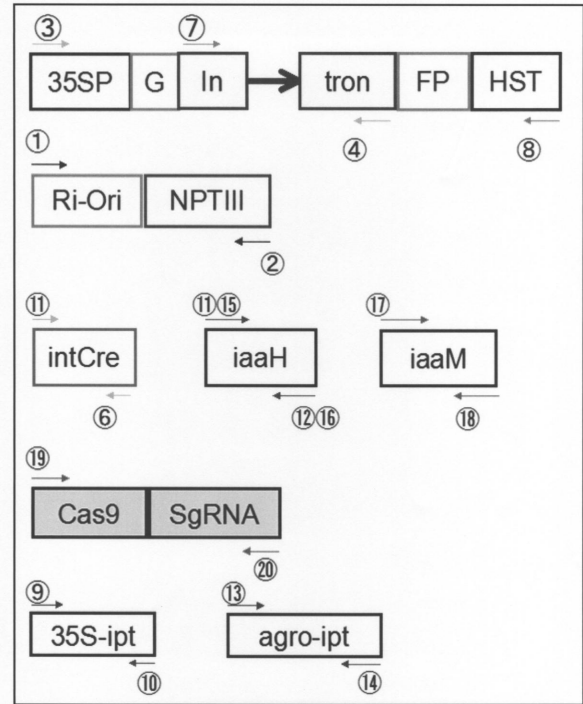
40

50

【 図 5 】



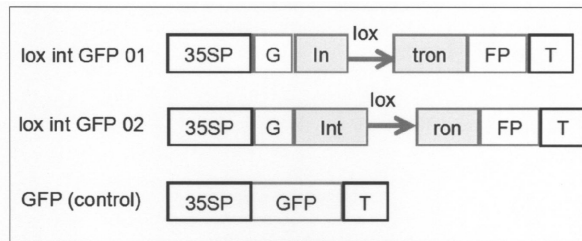
【 図 6 】



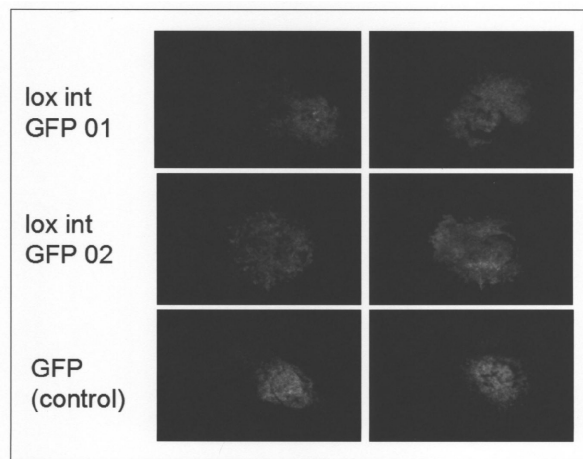
10

20

【 図 7 】



【 図 8 】

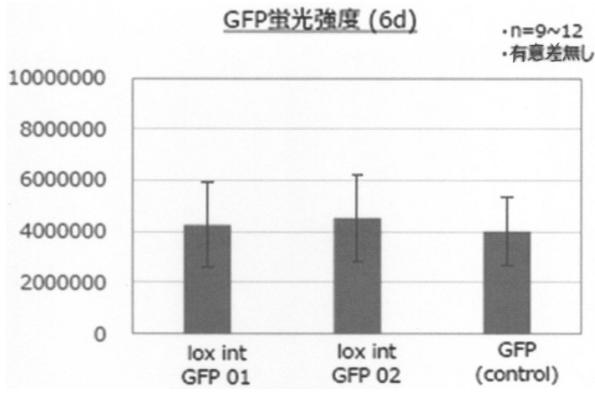


30

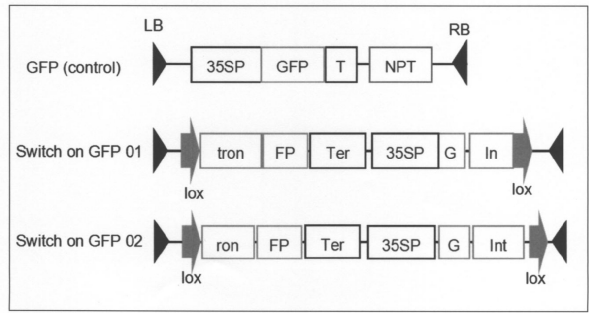
40

50

【 図 9 】

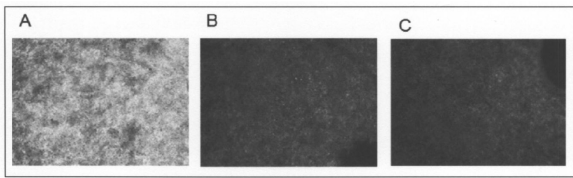


【 図 1 0 】

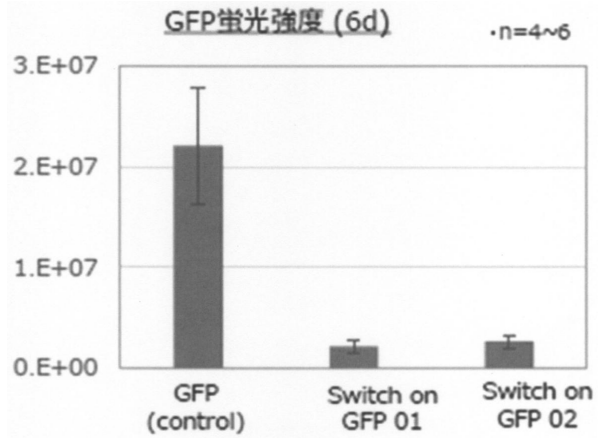


10

【 図 1 1 】

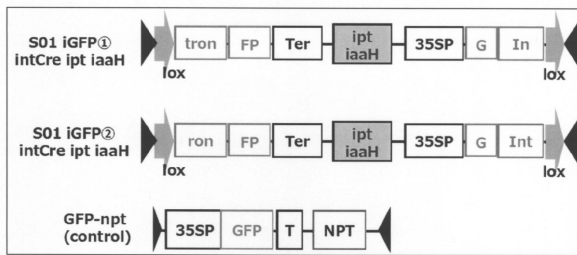


【 図 1 2 】

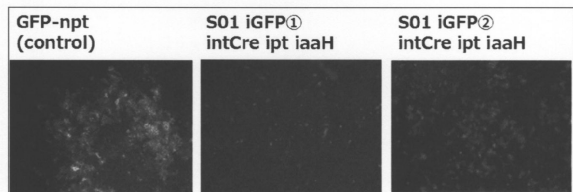


20

【 図 1 3 】



【 図 1 4 】

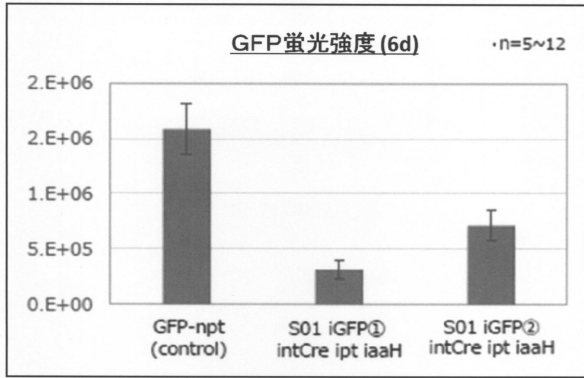


30

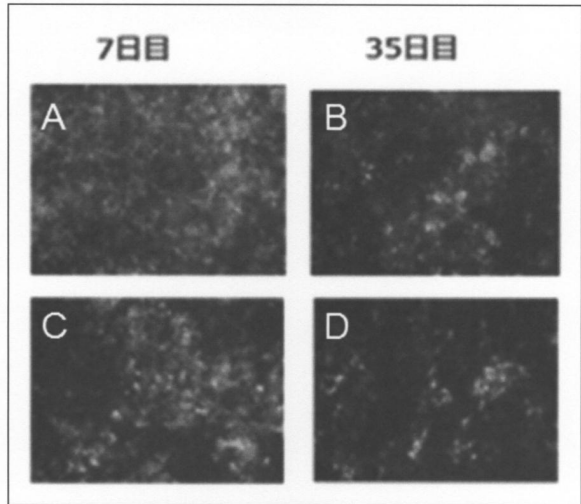
40

50

【 図 1 5 】



【 図 1 6 】

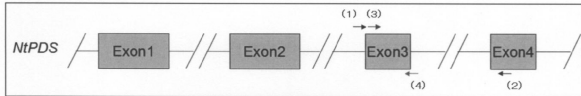


10

【 図 1 7 】



【 図 1 8 】



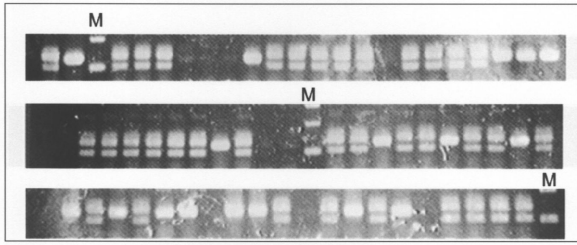
20

30

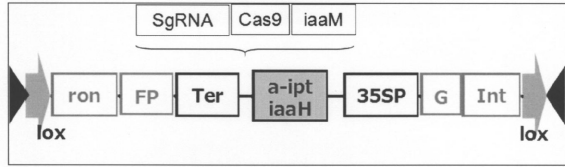
40

50

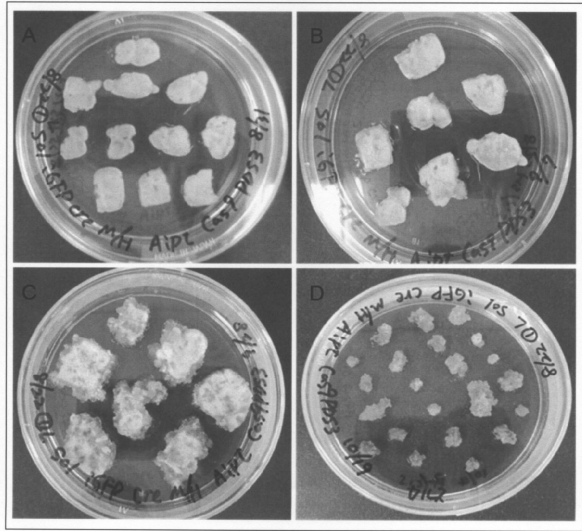
【 19 】



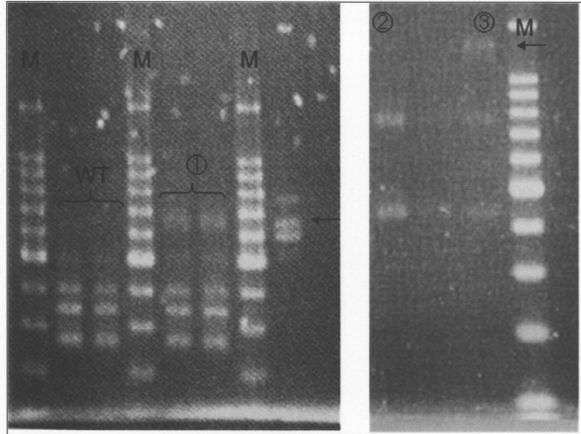
【 20 】



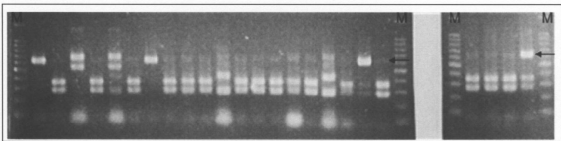
【 21 】



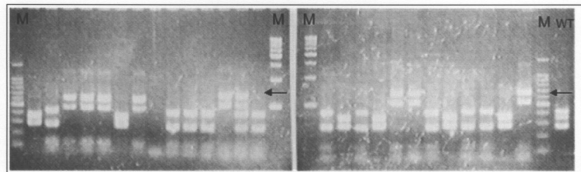
【 22 】



【 23 】



【 24 】



10

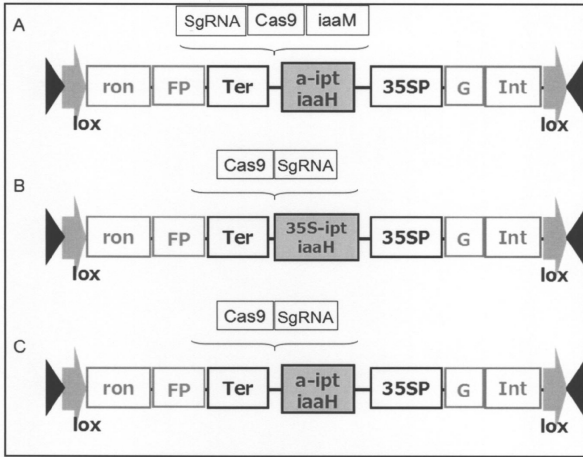
20

30

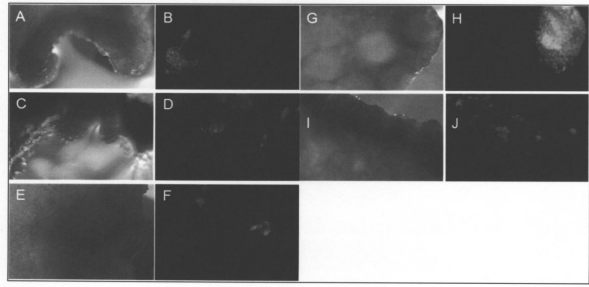
40

50

【 図 2 5 】

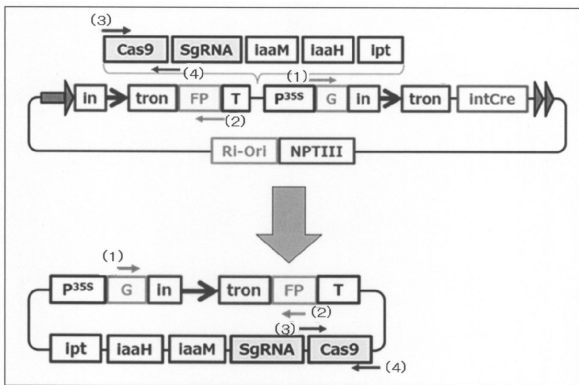


【 図 2 6 】

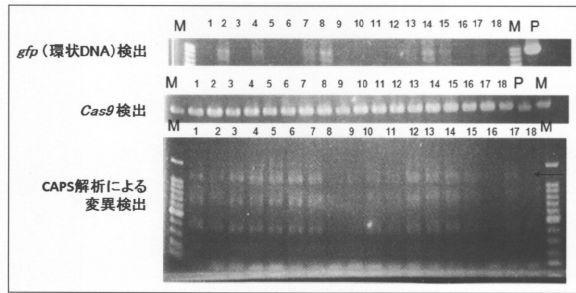


10

【 図 2 7 】



【 図 2 8 】



20

【 配列表 】

0007288915000001.app

30

40

50

フロントページの続き

- 会社カネカ内
(72)発明者 田岡 直明
兵庫県高砂市高砂町宮前町 1 - 8 株式会社カネカ内
- (72)発明者 海老沼 宏安
長野県上田市常田 3 - 1 5 - 1 国立大学法人信州大学内
- 審査官 千葉 直紀
- (56)参考文献 特表 2 0 1 7 - 5 0 0 0 3 8 (J P , A)
国際公開第 2 0 1 7 / 1 5 1 6 6 8 (W O , A 1)
特表 2 0 1 8 - 5 0 0 0 3 7 (J P , A)
特表 2 0 0 3 - 5 2 1 9 4 0 (J P , A)
第37回日本植物細胞分子生物学(京都)大会講演要旨集, 2019年08月25日, p. 99, 2Cp-06
Plant Biotechnology Journal, 2005年, Vol. 3, pp. 203-214
Journal of Virology, 2000年, Vol. 74, No. 22, pp. 10631-10638
Plant Cell Rep., 2007年, Vol. 26, No. 1, pp. 39-45
- (58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)
C 1 2 N、A 0 1 H
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S (S T N)