

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2020年5月14日(14.05.2020)



(10) 国際公開番号

WO 2020/095973 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 5/04 (2006.01) *A01H 4/00* (2006.01)
A01H 1/00 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
A01H 1/02 (2006.01) *C12N 5/14* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2019/043576
- (22) 国際出願日: 2019年11月7日(07.11.2019)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 添付公開書類:
特願 2018-209785 2018年11月7日(07.11.2018) JP 一 国際調査報告(条約第21条(3))
- (71) 出願人: 日本たばこ産業株式会社 (**JAPAN TOBACCO INC.**) [JP/JP]; 〒1058422 東京都港区虎ノ門2丁目2番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 市川 雅子 (**ICHIKAWA, Masako**); 〒4380802 静岡県磐田市東原700番地 日本たばこ産業株式会社 植物イノベーションセンター内 Shizuoka (JP).
- (74) 代理人: 小野 新次郎, 外(**ONO, Shinjiro et al.**); 〒1000004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).



WO 2020/095973 A1

(54) **Title:** METHOD FOR CULTURING PLANT FERTILIZED EGG CELL AND REGENERATED PLANT BODY PRODUCED THEREBY

(54) 発明の名称: 植物受精卵細胞の培養方法、および当該方法で作成された再生植物体

(57) **Abstract:** The present invention pertains to a method for culturing a plant fertilized egg cell. The present invention also pertains to a method for regenerating a plant from a plant fertilized egg cell. The culture method and the plant regeneration method according to the present invention comprise culturing a plant fertilized egg cell in a solid medium.

(57) 要約: 本発明は、植物受精卵細胞の培養方法に関する。本発明はまた、植物受精卵細胞からの植物再生方法に関する。本発明の培養方法及び植物再生方法は、植物受精卵細胞を固形培地で培養することを含む。

明 細 書

発明の名称：

植物受精卵細胞の培養方法、および当該方法で作成された再生植物体

技術分野

[0001] 本発明は、植物受精卵細胞を培養する方法に関する。本発明は、さらに植物受精卵細胞から再生植物体を作成する方法に関する。

背景技術

[0002] トウモロコシ (Leduc, 1996)、イネ (Zhang, 1999)、コムギ (Kumlehn, 1998)、オオムギ (Holm, 1994, 2000)、タバコ (Yuchi, 2004) などの種においては、受精後の胚嚢から受精卵を単離・培養し、植物体を再生した例が報告されている。受精卵は本来、植物体へと成長する能力を保有した細胞であり、それゆえ、種、品種間差によって生じる培養効率の影響を受けないことが期待される。

[0003] 植物の受精卵細胞を再生させる方法に関連する技術としては、以下のよう
なもの知られている。

[0004] 1) 植物受精卵細胞の獲得

植物から受精卵を獲得する方法には、自然に、または人工的に交配を行った植物体から受精卵を単離する方法や、卵細胞と精細胞を融合させて受精卵を得る方法などが行われている。前者の方法においては、コムギの子房から受精卵を単離する際、穂を2, 4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2, 4-D) を含む溶液で処理することによって子房の肥大を促進し、受精卵の単離を容易にする工夫が試みられている (Kovacs et al., (1994))。また、後者の方法においては、電気的融合 (Kranz et al., (1993)、Uchiyumi et al., (2007))、カルシウムイオンによる融合 (Faure et al., (1994))、ポリエチレングリコール融合 (Sun et al., (1995)、Tian et al., (1997)) の3種の方法が報告されている。

[0005] 2) 細胞塊形成工程

獲得した植物受精卵細胞を生存、分裂させ、細胞塊に増殖させる工程である。

この工程では、溶液や培地、ナースセルなどの選択が、植物受精卵細胞の生存、分裂、細胞塊形成に重要な影響を与える。

[0006] 植物の受精卵細胞を培養する溶液や培地を選択するにあたり最も重要なことは、使用する溶液や培地の浸透圧を適切にすることであると言われている。適した浸透圧は植物種によって異なるため、種々の糖類を用いて浸透圧が調整されている。また、培地の植物ホルモンについても検討されている。例えば、オオムギ受精卵の植物体再生効率を、2, 4-Dを含む液体培地と含まない培地で比較したところ、2, 4-Dを含む液体培地で培養する方が、再生効率が高いことが示されている (Holm et al., (1994))。さらに、トウモロコシでは、2, 4-Dに加えてBAPを液体培地に添加することも行われている (Leduc et al., (1996))。

[0007] 植物の受精卵細胞の培養には、受精卵の生存や分裂に必要な栄養の供給源が必要である。例えば、単離した受精卵を胚珠に戻す方法や、ナースセルを使用する方法が挙げられる。Kumlehn et al., (1997) は、単離したコムギ受精卵細胞を胚珠に戻す方法を使って、植物体の再生を行っている。ナースセルを使用する方法では、小孢子培養物を用いた方法 (Kumlehn et al., (1998), Holm et al., (1994), Leduc et al., (1996), Kranz et al. (1999))、懸濁培養細胞を使った方法 (Kranz et al., (1993))、葯培養物を使った方法 (Leduc et al., (1996)) が報告されている。

[0008] 3) 再生工程

細胞塊から植物体を再生させる工程である。この工程で使用されている培地は、無機塩や糖類などは植物種によって異なるが、トウモロコシ (Led

uc, 1996)、イネ (Zhang, 1999)、コムギ (Kumlehn, 1998)、オオムギ (Holm, 1994, 2000) に共通している点は、いずれも植物成長調節物質を含まないということである。

[0009] 以上のように、植物受精卵細胞の培養方法、および再生植物体の作成方法は、さまざまな改良が行われてきた。しかしながら、受精卵細胞は、葉、培養細胞、カルスなどとは異なり、作出や単離に手間がかかる、受精直前の卵細胞や精細胞は電気処理やカルシウム溶液添加など融合処理をしなければ分化を開始しない、などの問題がある。これまでに植物体の再生に成功している品種は限定的であり、安定して再生植物体を得るには材料植物の状態から培地やナースセルの条件なども最適化し、それを厳格に再現できなければ、再生植物体を得ることは困難である。また、ゲノム編集や遺伝子組換えなどのための植物材料として植物受精卵細胞を扱う場合には、DNA、RNA、タンパク質を受精卵に導入する必要があり、単に植物受精卵細胞を培養するよりも、植物受精卵細胞の生存、分裂、再生の難易度が高くなる。そのため、より強固な培養方法、再生植物体作出方法が求められており、より多角的な改良を行う必要がある。

先行技術文献

特許文献

- [0010] 特許文献1：特開2016-63785
特許文献2：国際公開WO2017/171092
特許文献3：国際公開WO2018/143480

非特許文献

- [0011] 非特許文献1：Leduc et al., (1996), *Developmental Biology* 177:190-203
非特許文献2：Zhang et al., (1999), *Plant Cell Reports* 19:128-132
非特許文献3：Kumlehn et al., (1998), *Planta*

205:327-333

非特許文献4: Holm et al., (1994), The Plant Cell 6:531-543

非特許文献5: Holm et al., (2000), Transgenic Research 9:21-32

非特許文献6: Yuchi et al., (2004), Chinese Science Bulletin 49:810-814.

非特許文献7: Kovacs et al., (1994), Sex Plant Reprod 7:311-312

非特許文献8: Kranz et al., (1993), Plant Cell 5:739-746

非特許文献9: Uchiumi et al., (2007), Planta 226:581-589

非特許文献10: Faure et al., (1994), Science 263:1598-1600

非特許文献11: Sun et al., (1995), Acta Bot Sin 36:489-493

非特許文献12: Tian et al., (1997), Plant Cell Rep 16:657-661

非特許文献13: Kumlehn et al., (1997), Plant Journal 12(6) 1473-1479

非特許文献14: Kranz et al., (1999), Methods in Molecular Biol 111, 259-267

非特許文献15: Ishida et al., (2015), Methods Mol Biol. 1223, 189-98

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0012] 本発明は、植物受精卵細胞を培養する方法、本発明の方法によって再生し

た植物体を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0013] 限定されるわけではないが、本発明は以下の態様を含む。

[態様 1]

植物受精卵細胞を固形培地で培養することを含む、植物受精卵細胞の培養方法。

[態様 2]

植物受精卵細胞からの植物再生方法であって、
植物受精卵細胞を培養する工程の一部において、植物受精卵細胞を固形培地において培養することを含む、前記方法。

[態様 3]

植物受精卵細胞が細胞塊になった後に固形培地において培養することを含む、態様 2 に記載の植物再生方法。

[態様 4]

植物受精卵細胞からの植物再生方法であって、
(1) 植物受精卵細胞を培養して培養細胞塊を取得し、ここにおいて、当該工程の一部において、植物受精卵細胞を固形培地において培養する；
(2) 前記培養細胞塊を再生する、
ことを含む、前記方法。

[態様 5]

植物受精卵細胞からの植物再生方法であって、
(1) (i) 植物受精卵細胞を培養して培養細胞塊を取得し；
(1) (ii) 該培養細胞塊を、固体培地において培養し；
(2) 前記培養細胞塊を再生する、
ことを含む、前記方法。

[態様 6]

さらに、(0) 植物受精卵細胞を取得する、ことを含む、態様 4 または 5 に記載の方法。

〔態様 7〕

直径が 0.3 mm 以上の細胞塊の状態の植物受精卵細胞を固体培地において培養する、ことを含む、態様 1 - 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

〔態様 8〕

直径が 1 mm 以上の細胞塊の状態の植物受精卵細胞を固体培地において培養する、ことを含む、態様 1 - 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

〔態様 9〕

植物が、単子葉植物である、態様 1 - 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

〔態様 10〕

植物が、トウモロコシ、コムギ、オオムギ、イネ、ソルガム及びライムギからなる群から選択される、態様 1 - 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

〔態様 11〕

固形培地が、植物成長調整物質を含む、態様 1 - 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

〔態様 12〕

植物成長調整物質が、オーキシン類である、態様 11 に記載の方法。

〔態様 13〕

オーキシン類が、2, 4-D、ピクロラム、ダイカンバからなる群より選択される植物ホルモンである、態様 12 に記載の方法。

〔態様 14〕

植物成長調整物質の固体培地中の濃度が、0.05 mg/L 以上 10 mg/L 以下である、態様 12 または 13 に記載の方法。

〔態様 15〕

植物成長調整物質の固体培地中の濃度が、0.01 mg/L 以上 10 mg/L 以下である、態様 12 または 13 に記載の方法。

〔態様 16〕

植物受精卵細胞が、卵細胞を、植物の卵細胞を含む組織から単離した後に、精細胞を融合させることによって得られるものである、態様 1 - 15 のい

ずれか 1 項に記載の方法。

[態様 17]

植物受精卵細胞が、物質が導入された植物受精卵細胞である、態様 1 - 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

発明の効果

- [0014] 本発明により、植物受精卵細胞を培養することによって得た細胞塊から、安定して効率よく再生植物体を得ることが可能になった。
- [0015] 植物受精卵細胞は、植物体内で胚へ発生する。通常、受精卵細胞や胚は、その外部を胚乳や母体組織などの固形状の環境で覆われている。一方、植物体から単離された受精卵細胞やそこから肥大した細胞塊は、多くの場合、液体状の培地で培養されており、植物体内での環境下とは大きく異なるため、受精卵細胞が植物体再生に至らないことが問題であった。本発明者らは鋭意検討の結果、従来の植物受精卵を培養・植物体再生方法に加えて、植物体再生前に植物体内に近い環境に細胞塊を置くことによって、細胞塊から安定して効率よく再生植物体を得る方法を見出した。

図面の簡単な説明

- [0016] [図1]図 1 は、再分化用培地改変 L S D 培地で植物体を再生させる前に改変 N 6 Z 固形培地に置床した場合（試験区、左）と、改変 N 6 Z 固形培地に置床する代わりに改変 N 6 Z 液体培地で同日数培養した場合（対照区、右）の、細胞塊が植物体に再生するのに要した日数（日）を示した図である。

発明を実施するための形態

- [0017] 1. 植物受精卵細胞の培養方法
- 本発明は、植物受精卵細胞の培養方法に関する。
- 本発明の培養方法は、植物受精卵細胞を固形培地で培養することを含む。
- [0018] 植物
- 植物の種類は特に限定されるものではない。双子葉植物および単子葉植物のいずれでもよく、好ましくは単子葉植物である。さらに好ましくは、コムギ、トウモロコシ、オオムギ、イネ、ソルガム、ライムギ、サトウキビ等で

あり、最も好ましくは、トウモロコシ、コムギ、イネである。双子葉植物にはタバコ、大豆、ジャガイモ、ヒマワリ、その他が含まれるがこれらに限定されるものではない。好ましくは、大豆、タバコである。植物受精卵細胞の培養方法は、限定されるわけではないが、特に、「難培養」とされる植物あるいは品種に用いることが可能である。「難培養」とは、培養が困難、具体的には、例えば、植物体から単離された細胞や組織等の培養が困難、脱分化等の処理によるカルスの形成や、カルスからの植物体への再分化が困難である、ことを意味する。

[0019] 一般的に双子葉植物よりも単子葉植物の方が培養困難だが、「難培養」の植物は、例えば、大豆、インゲンマメ、トウガラシ等を含む。「難培養品種」とは、同じ種の一般的な研究用品種（コムギならF i e l d e rなど、トウモロコシならA 1 8 8など）と比べ、培養が困難である品種を意味する、例えば、コムギのエリート品種（例えばA C B a r r i eやT A Mなど）、トウモロコシのB 7 3およびB 7 3を由来に持つトウモロコシエリート品種、オオムギのG o l d e n P r o m i s eとI g r i以外の品種、ソルガムの2 9 6 B、C 4 0 1、S A 2 8 1、P 8 9 8 0 1 2、P i o n e e r 8 5 0 5、T x 4 3 0以外の品種などが挙げられる。

[0020] 受精卵細胞

本明細書において、「受精卵細胞」とは、精細胞と卵細胞とが融合した細胞を意味する。

「植物受精卵細胞」とは、植物の胚嚢を含む組織から単離される受精した卵細胞である、即ち、植物体の段階で受粉・受精させ、該植物体から単離した受精卵細胞、であってもよい。あるいは、受粉・受精前の植物体から卵細胞および精細胞を単離したのち、それらを融合させて受精卵細胞を作出および取得してもよい。なお、電気的な融合により受精卵を作成および取得してもよい。また、異種の植物同士の卵細胞と精細胞の融合により得られた受精卵細胞、であってもよい。

[0021] 本明細書において「卵細胞」とは、雌ずいの中において、胚嚢母細胞の減

数分裂により形成される雌性配偶子を意味する。卵細胞の単離方法は限定されないが、例えば、適切な浸透圧の溶液中において子房を切断し、その切断面から出てきた卵細胞を顕微鏡下においてガラスキャピラリーを用いて単離することができる。

[0022] 本明細書において「精細胞」とは、雄ずいの葯の中において、花粉母細胞の減数分裂により形成される雄性配偶子を意味する。精細胞の単離方法は限定されないが、例えば、適切な浸透圧の溶液に葯から採取した花粉を浸すと、数分後には、花粉から精細胞を含む花粉内容物が溶液中に放出されるので、顕微鏡下においてガラスキャピラリーを用いて精細胞を単離することができる。

[0023] 受精卵細胞の取得方法

植物受精卵細胞の培養方法において、植物受精卵細胞は、自然受精法により植物体内で作出し、作成された受精卵細胞を植物体から取得してもよい。自然受精法を用いた受精卵細胞の取得方法は、例えば、柱頭を露出させ、花粉を付着させ受粉させたのち、胚嚢を含む組織から受精卵を単離する方法である。植物体からの受精卵細胞の単離は、受粉後の植物体から受精直後の子房を取り出し、適切な浸透圧の溶液中においてその子房を切断し、その切断面から出て来た受精卵を顕微鏡下においてガラスキャピラリー等を用いて単離することができる。あるいは、酵素溶液で子房又は胚珠を一定時間処理した後に、例えば、ガラス針等を用いて顕微鏡下において珠心等の組織を解剖し摘出、単離することもできる。

[0024] 植物の卵細胞と精細胞を *in vitro* で融合して受精卵を作出してもよい。即ち、植物体より先ず卵細胞と精細胞を単離し、電気融合法等の公知の方法により、*in vitro* で受精卵細胞を作出することが可能である（配偶子融合ともいう）。電気融合法は、電気刺激により2種又は2種以上の細胞を *in vitro* で融合する方法である。具体的には、適切な浸透圧の溶液中において単離した卵細胞及び精細胞に、電気パルスを加えることで細胞融合を引き起こす。

[0025] 電気融合により細胞融合を行う場合、電圧、電極間距離等の条件は、植物の種類又は細胞の大きさ等に応じて当業者が適宜決めることができる。例えば、特開2016-63785（特許文献1）や国際公開WO2017/171092（特許文献2）に記載の条件を適用することができる。

[0026] あるいは、卵細胞と精細胞の細胞融合には、カルシウム融合法、PEG融合法等の他の公知の細胞融合方法を用いてもよい。「カルシウム融合法」は、カルシウム濃度依存的に細胞膜の融合が生じやすくなる、という細胞膜の性質を利用するものである。「PEG融合法」は、細胞をポリエチレングリコール（polyethyleneglycol、PEG）で処理することによって細胞膜が結合し、PEGを取り除くと細胞が融合することを利用するものである。

[0027] 一態様において、植物受精卵細胞は、卵細胞を、植物の卵細胞を含む組織から単離した後に、精細胞を融合させることによって得られるものである。

[0028] 一態様において、植物受精卵細胞は、物質が導入された植物受精卵細胞である。

[0029] 固体培地

本発明の培養方法は、植物受精卵細胞を固形培地で培養することを含む。

非限定的に、植物受精卵細胞を固形培地で培養は、植物受精卵細胞から植物を再分化する工程において行う。一態様において、植物受精卵細胞を固形培地で培養することは、再分化培地における培養工程の前に行う。一態様において、植物受精卵細胞を固形培地で培養は、植物受精卵細胞から形成された細胞塊を、再分化培地における培養工程の前に培養すること、を含む。本明細書において、「植物受精卵細胞」は、受精卵が細胞塊まで培養された状態を含む意味で使用する場合がある。

[0030] 以下、非限定的に、本発明の培養方法を説明する。

培地：植物細胞を通常培養するために通常使用されるものでもよく、例えばMS培地、LS培地、N6培地、B5培地、R2培地、CC培地を基本とする培地等が挙げられる。これらの培地は、基本の濃度から高濃度にされた

ものでも、希釈されたものであってもよい。好ましくは、1/10倍から2倍量、より好ましくは、1/5倍から1倍量である。なお、本工程における培地は、細胞塊の取得工程に使用した培地と同組成であってもよい。

[0031] 固体培地は、液体培地を例えば、寒天等の固化剤により固めたものである。培地固化は、当該技術分野において公知の固化剤を添加することにより行うことができ、そのような固化剤としては、例えばアガロース、寒天やゲランガム、ゲルライト、ファイタゲル等である。固化剤の濃度は固化剤の種類によって異なるが、例えば、ゲルライトの場合、0.3-4.0 g/Lが好ましく、0.5-3.0 g/Lがより好ましい。

[0032] 本工程における固形培地は、半固形培地であってもよい。「半固体」とは、液体と固体の両方の属性を持つ物質で、液体より固体に近い半流動体として定義され、粘性があり自由に変形することを特徴とする、いわゆるゲル状のものをいう。「半固体培地」は、例えば、液体培地に添加する固化剤の濃度を、完全な固体培地が生成される濃度より低い濃度で加えることにより作成できる。固化剤の濃度を、固体培地が生成される濃度より低い濃度、例えば、90%以下、80%以下、70%以下、60%以下、50%以下、40%以下%の濃度で加えることにより作成できる。一態様において、固化剤の濃度を、固体培地が生成される濃度、10%以上、20%以上、30%以上、40%以上濃度で加えることにより作成してもよい。当業者は、「固体培地（含む、半固体培地）」と「液体培地」を明確に判別可能である。

[0033] 一態様において、固体培地は、植物成長調整物質を含んでもよい。一態様において、植物成長調整物質は、オーキシン類である。具体的には、例えば、オーキシン類として特にインドール-3-酢酸、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)、ピクローラム、ダイカンバ、ナフタレン酢酸、ナフトキシ酢酸、フェニル酢酸、2,4,5-トリクロロフェノキシ酢酸または他のオーキシン類を添加することができる。一態様において、オーキシン類は、2,4-D、ピクローラム、ダイカンバからなる群より選択される植物ホルモンである。あるいは、カイネチンや4PUのようなサイトカイニン

など、他の植物成長調節物質を添加することもできる。これらの植物成長調節物質は、単独でも複数を異なる濃度で混合させてもよい。

[0034] 固体培地に添加する植物成長調整物質の濃度は、その植物に合わせて当業者が適宜設定することができる。非限定的に、例えば、0.05 mg/L以上10.0 mg/L以下、あるいは、0.01 mg/L以上10.0 mg/L以下、が挙げられる。非限定的に、0.1 mg/L以上5.0 mg/L以下が好ましく、0.15 mg/L以上2.0 mg/L以下がより好ましい。非限定的に、0.015 mg/L以上5.0 mg/L以下が好ましく、0.02 mg/L以上2.0 mg/L以下がより好ましい。

[0035] 培養：固化した培地に、植物受精卵細胞、より好ましくは、植物受精卵細胞から得られた細胞塊を置床し、適切な温度、明暗条件および期間で生育させる。培養温度は、適宜選択可能であり、好ましくは18℃-35℃、さらに好ましくは20-28℃、最も好ましくは23-26℃で行われる。また、この工程の培養は好ましくは暗所、もしくは薄暗い所で行われるが、これに限定されない。培養期間もまた適宜選択可能であり、好ましくは1日から35日、1日から30日、より好ましくは、2日から28日、2日から14日である。一態様において、植物受精卵細胞が再分化工程に供するのに適した状態になるまで固体培地で培養する。

[0036] 一態様において、植物受精卵細胞を固形培地で培養は、先ず、植物受精卵細胞を液体培地で培養してから行うことが望ましい。一態様において、先ず、植物受精卵細胞を液体培地で培養し培養細胞塊を取得してから、培養細胞塊を固体培地で培養する。「細胞塊」、「培養細胞塊」については、「2. 植物再生方法」の項目において詳述する。

[0037] 2. 植物再生方法

本発明は、植物受精卵細胞からの植物再生方法に関する。

[0038] 一態様において、植物受精卵細胞からの植物再生方法は、植物受精卵細胞を培養する工程の一部において、植物受精卵細胞を固形培地において培養することを含む。

- [0039] 一態様において、植物受精卵細胞からの植物再生方法は、植物受精卵細胞が細胞塊になった後に固形培地において培養することを含む。
- [0040] 一態様において、植物受精卵細胞からの植物再生方法は、
- (1) 植物受精卵細胞を培養して培養細胞塊を取得し、ここにおいて、当該工程の一部において、植物受精卵細胞を固形培地において培養する；
 - (2) 前記培養細胞塊を再生する、
- ことを含む。
- [0041] 一態様において、植物受精卵細胞からの植物再生方法は、
- (1) (i) 植物受精卵細胞を培養して培養細胞塊を取得し；
 - (1) (ii) 該培養細胞塊を、固体培地において培養し；
 - (2) 前記培養細胞塊を再生する、
- ことを含む。
- [0042] 植物受精卵細胞からの植物再生方法は、植物受精卵細胞を培養する工程の前に、さらに、(0) 植物受精卵細胞を取得する、工程を含んでもよい。
- [0043] 「植物」、「植物受精卵細胞」、「固形培地」の意義は、「1. 植物受精卵細胞の培養方法」に記載した通りである。
- [0044] 「植物受精卵細胞を培養する工程の一部」とは、植物再生方法における、植物体再生工程の前の、植物受精卵細胞を培養する工程における、一部分を意味する。一態様において、「植物受精卵細胞を培養する工程の一部」は、植物受精卵細胞を培養して、培養細胞塊を取得した後を意味する。
- [0045] 培養細胞塊の取得
- 植物受精卵細胞からの植物再生方法は、一態様において、植物受精卵細胞から、培養細胞塊を取得する工程を含む。植物受精卵細胞から培養細胞塊を形成する工程は、公知の方法を利用することが可能である。
- [0046] 細胞塊とは、無数に分裂を繰り返した植物受精卵の塊を示す。本明細書において、「植物受精卵細胞」は、受精卵が細胞塊まで培養された培養細胞塊を含む意味で使用する場合がある。本発明において「細胞塊」は、胚様体、球状様胚、カルスなどであってもよい。受精卵細胞を分裂誘導し細胞増殖さ

せ、胚様体、球状様胚、カルスなどを形成させる工程は、植物によって最適条件が異なるため特に限定されないが、フィーダー細胞や植物外植片を加えた、ナースカルチャー法が好ましい。例えば、次のように行うことができる。

[0047] 培養：植物受精卵細胞から細胞塊を取得するまでの「培養」とは、液体培地に受精卵細胞を移し、培養することをいう。非限定的に、培養の温度は、好ましくは、 $23\sim 28^{\circ}\text{C}$ 、 $24\sim 28^{\circ}\text{C}$ 、 $24\sim 27^{\circ}\text{C}$ 、又は $25^{\circ}\text{C}\sim 27^{\circ}\text{C}$ である。

[0048] 培養は暗下で行うことが好ましい。この時、培地にはフィーダー細胞を加え共培養（ナースカルチャー法）を行うことが好ましい。共培養期間は、液体培地での培養終了まででもよく、途中でフィーダー細胞を取り除いてもよい。また、培養中は、穏やかに振とうさせてもよい。振とう速度は、 $30\sim 50\text{rpm}$ が好ましく、 $35\sim 45\text{rpm}$ がより好ましい。

[0049] 培地：植物の受精卵細胞を培養するために通常使用される公知の培地であればよく、例えば液体のMS培地、B5培地、N6培地およびそれらの改変培地等を使用することができる。

[0050] 培地には植物ホルモン、特にインドール-3-酢酸、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸（2,4-D）、ピクローラム、ダイカンバ、ナフタレン酢酸、ナフトキシ酢酸、フェニル酢酸、2,4,5-トリクロロフェノキシ酢酸等のオーキシン類が添加されることが好ましい。添加濃度は、その植物に合わせて当業者が適宜設定することができる。非限定的に、例えば、 $0.1\sim 10.0\text{mg/L}$ が挙げられるが、 $0.1\sim 5.0\text{mg/L}$ が好ましく、 $0.15\sim 2.00\text{mg/L}$ がより好ましい。非限定的に、例えば、 $0.01\sim 10.0\text{mg/L}$ が挙げられるが、 $0.15\sim 5.0\text{mg/L}$ が好ましく、 $0.02\sim 2.00\text{mg/L}$ がより好ましい。

[0051] フィーダー細胞：公知のフィーダー細胞や植物外植片を用いることが可能である。例えば、フィーダー細胞としては、イネ浮遊細胞培養物（Line Oc、理研バイオリソースセンター製）や、トウモロコシのナース細胞（

Kranz et al., 1993)、小孢子培養物 (Bakos et al., 2003) などが挙げられる。植物外植片としては、子房 (Kumlehn et al., (1998)) などが挙げられる。

[0052] 植物受精卵細胞から細胞塊を取得するまでの「培養」工程の途中で、液体培地を新しく交換する工程を含めてもよい。

[0053] 固形培地における培養を始める細胞塊としては、再分化能を有する状態にまで培養させたものが好ましい。当該状態の細胞塊にまで培養するために必要な培養条件、時間等は植物の種類や品種によって異なるため、当業者が適宜設定することができる。例えば、培養開始からおおよそ21-48日後、直径1.0~3.0mm程度の細胞塊が形成される。

[0054] 例えば、コムギを用いた場合において、受精卵の取得から7日、好ましくは14日、さらに好ましくは20日間、液体培養を行い得られた細胞塊を用いることが好ましい。また、例えば、該細胞塊が直径0.3mm以上、好ましくは0.5mm以上、さらに好ましくは1mm以上、最も好ましくは2mm以上の大きさになったときに、固形培地に移し、培養を開始することができる。本発明の一態様において、直径が0.3mm以上の細胞塊の状態の植物受精卵細胞を固体培地において培養する、ことを含む。本発明の一態様において、直径が1mm以上の細胞塊の状態の植物受精卵細胞を固体培地において培養する、ことを含む。本明細書において、「細胞塊の直径」は、細胞塊の最も長い箇所の長さを意味する。例えば、回転楕円形のような形状を有する細胞塊において、「細胞塊の直径」とは、回転楕円形の最も長い軸方向の長さを意味する。

[0055] 固形培地での細胞塊の培養

植物受精卵細胞からの植物再生方法の一態様において、植物受精卵細胞を培養する工程の一部において、植物受精卵細胞を固形培地において培養する。植物受精卵細胞を培養する工程の一部」とは、植物再生方法における、植物体再生工程の前の、植物受精卵細胞を培養する工程における、一部分を意味する。一態様において、「植物受精卵細胞を培養する工程の一部」は、植

物受精卵細胞を培養して、培養細胞塊を取得した後を意味する。

[0056] 植物受精卵細胞からの植物再生方法の一態様において、植物受精卵細胞を培養して培養細胞塊を取得し、ここにおいて、当該工程の一部において、植物受精卵細胞を固形培地において培養する。「植物受精卵細胞を培養して培養細胞塊を取得する工程の一部」とは、植物再生方法における、植物体再生工程の前の、植物受精卵細胞を培養する工程における、一部分を意味する。一態様において、植物受精卵細胞を培養して培養細胞塊を取得する工程の一部」とは、植物受精卵細胞を培養して、培養細胞塊を取得した後を意味する。

[0057] 植物受精卵細胞からの植物再生方法の一態様において、(i) 植物受精卵細胞を培養して培養細胞塊を取得し、(ii) 該培養細胞塊を、固体培地において培養する、ことを含む。

[0058] 「固体培地」、「固体培地における培養」の意義は、「1. 植物受精卵細胞の培養方法」に記載した通りである。

[0059] 再分化と再生植物体の取得

植物受精卵細胞からの植物再生方法は、一態様において、培養細胞塊を再生する、ことを含む。再分化工程は、公知の再分化工程に従い実施することができる。例えば、一例として、以下のように行うことが可能である。

[0060] 培養：培養細胞塊を、任意の培地、例えばMS培地からなる固形または液体再分化培地に移し、培養する。この際、培養は光を照射して行うことが好ましく、非限定的に、光は、例えば、 $50 \sim 180 \mu\text{mol} / \text{m}^2 \cdot \text{秒}$ が好ましく、 $70 \sim 150 \mu\text{mol} / \text{m}^2 \cdot \text{秒}$ がより好ましい。非限定的に、光は、例えば、 $20 \sim 180 \mu\text{mol} / \text{m}^2 \cdot \text{秒}$ が好ましく、 $50 \sim 150 \mu\text{mol} / \text{m}^2 \cdot \text{秒}$ がより好ましい。

[0061] 再分化培地：例えばMS培地、B5培地、N6培地であり、アガロース、寒天やゲランガム、ゲルライト等固化材を使用した固体培地を含まない液体培地であってもよい。該再分化培地には、オーキシン、サイトカイニンを含む植物成長調節物質を添加してもよい。

[0062] この工程によって根、シュートなどが再分化した個体を、土が入ったポットなどに移植して生育させることで、再生した植物個体を得ることができる。

[0063] 3. 再生植物

本発明は、さらに、本発明の植物受精卵細胞からの植物再生方法によって再生された植物（再生植物体）に関する。

[0064] 再生された植物とは、受精卵細胞の培養、再分化により再生された植物、該植物から得られた細胞、組織等や、本発明の方法により得られた再分化当代である「T0世代」やT0世代の植物の自殖種子である「T1世代」などの後代植物、それらを片親にして交配した雑種植物やその後代植物を含む。

[0065] 本発明以前は、特に「難培養」とされる植物や品種について、効率よく培養することができず、再生された植物を得ることは困難或いは不可能であった。本発明により、このような植物、品種についても簡便な方法で効率よく培養、再生植物体を得ることが可能になった。

[0066] 4. 植物への物質の導入

植物、特に単子葉植物の遺伝子組換え技術は、1990年代にアグロバクテリウムを利用した方法がイネ、トウモロコシで開発されたことを契機に急速に利用が普及した。現在までに様々な形質転換方法が開発されてきている。しかしながら、それらの多くは、植物組織の脱分化と再分化を経由することが必要であるが故に、種や品種間で形質転換の効率が大きく異なることが知られている。種や品種によっては形質転換の効率が低く、再現性をもって形質転換植物を得ることができない。例えば、トウモロコシにおいて育種上非常に重要な系統であるB73では、再現性を持った形質転換法はいまだ開発されていない。

[0067] また、近年効率的にゲノム編集を行うことが可能になりつつあるが、これも作物種、品種ごとに組織培養の容易性が異なる点が、ゲノム編集効率に大きな影響を与えるため、実用化の妨げとなっている。

[0068] 本発明の、植物受精卵細胞の培養方法、植物再生方法により、植物受精卵

細胞を培養することによって得た細胞塊から、安定して効率よく再生植物体を得ることが可能になった。本発明の培養方法、再生方法の工程における、受精卵細胞、卵細胞、精細胞、分裂を開始した受精卵細胞、細胞塊のいずれかに物質を導入することにより、物質が導入された再生植物を安定して効率よく取得することができる。一態様において、受精卵細胞に形質転換物質を導入する。

[0069] 一態様において、本発明の培養方法、植物再生方法における、植物受精卵細胞は、物質が導入された植物受精卵細胞である。

[0070] 導入する物質は、非限定的に、核酸、タンパク質及びペプチドからなる群から選択される。核酸は特に限定されず、RNA、DNA、両者の結合体、混合物であってもよい。好ましくはベクターのような環状DNA、直鎖DNA、環状RNA又は直鎖RNAである。使用される形質転換方法に応じた任意の長さのものを使用可能である。例えば、PEG法を用いる場合、核酸の長さは、好ましくは100kb以下、より好ましくは、50kb以下である。さらに好ましくは30kb以下、特に好ましくは20kb以下、もっとも好ましくは10kb以下である。

[0071] ゲノム編集のためのCas9ヌクレアーゼ等ヌクレアーゼや、修飾酵素、抗体等のタンパク質も導入しうる。タンパク質の大きさは、非限定的に、好ましくは分子量300kDa以下、より好ましくは200kDa以下、さらに好ましくは150kDa以下である。

[0072] ペプチドは、決まった順番で様々なアミノ酸が、アミド結合（「ペプチド結合」ともいう）つながった分子の総称で、一般にタンパク質よりも長さが短い。好ましくは、100a.a.以下、より好ましくは、50a.a.以下である。

[0073] 2種類以上の核酸、タンパク質及びペプチドを導入してもよい。核酸は、2種類以上のDNA又はRNAでも、DNAとRNAの組み合わせでもよい。核酸とタンパク質など異なる種の物質を導入してもよい。

[0074] 物質を植物に導入する方法は、植物に所望の物質を導入することのできる

公知の方法ならば特に限定されず、植物の種類に応じて適宜選択することができる。例えば、ポリエチレングリコール法（PEG法）、エレクトロポレーション法、パーティクルガン法、マイクロインジェクション法、ウィスカー法などの物理化学的方法（DNAの直接導入法）あるいはアグロバクテリウム法などの生物学的方法（DNAの間接導入法）を好ましく用いることができる。

[0075] 植物への物質の導入は、例えば、国際公開WO2017/171092、国際公開WO2018/143480に記載の方法によって行うことができる。

実施例

[0076] 以下、実施例に基づいて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。当業者は本明細書の記載に基づいて容易に本発明に修飾・変更を加えることができ、それらは本発明の技術的範囲に含まれる。

[0077] 実施例1：コムギ受精卵の単離

受精卵の単離および培養は、Kumlehn et al. (1997) に従って行った。開花1-3日前に、コムギ品種Fielderを除雄した。4-6日後、除雄した小花の柱頭に、同品種の葯を接触させることによって人工的に交配をした。交配3-4時間後に、穂を1-2%次亜塩素酸ナトリウムで6分間に浸し、さらに滅菌蒸留水で3回洗浄することによって殺菌した。無菌的に小花を解体し、4 mLの0.55 M マンニトール溶液が入った3.5 cmプラスチックシャーレの上に子房を採取した。子房を沈めながら、プラスチックシャーレの底でメスを使って、子房の下部を切断した。子房から胚珠切片を取り出し、2本のガラス針のうち一方で胚珠切片を固定し、もう一方で受精卵が存在すると推測される領域の組織を軽く押すことにより受精卵を取り出した。領域の推定は、受精が行われると、2個存在する助細胞のうち花粉管が侵入した方が変性し、暗褐変化するのでそれを目印とした。

[0078] 実施例2：コムギ受精卵の植物体再生効率における固形培地の効果

受精卵の培養は、Kumlehn et al. (2016) を参照して行った。3.5 mL プラスチックシャーレの中に直径12 mmのMilliCell-CMインサート（ミリポア社製）を入れ、MilliCell-CMインサートの内側に2,4-D濃度を0.02 mg/Lに変更した改変N6Z液体培地（Kumlehn et al., 2016）を0.2 mL、外側に上述の改変N6Z培地を2 mLとFieder細胞を添加した。実施例1の通り単離した受精卵を、マイクロキャピラリーを用いてMilliCell-CMインサートのメンブレン上に移した。受精卵は、25°Cの暗所で2週間培養し、上述の改変N6Z液体培地を交換後、さらに2週間培養した。

[0079] 直径2 mm以上になった細胞塊を、上述の改変N6Z固形培地（2倍濃度の上述の改変N6Z液体培地と1.6%ゲルライト溶液を等量混合して固めた培地）に置床し、25°Cの暗所で2-4日間培養した。次に、細胞塊を、Ishida et al. (2015) の再生用培地LSD培地の組成を変更した改変LSD培地（カルベニシリンとセフォタキシムを除き、8 g/L アガーを3 g/L ゲルライトに変更）に置床し、25°Cの明所で培養した。シュートが分化した細胞塊をIshida (2015) の苗化用培地LSF培地の組成を変更した改変LSF培地（IBAを0.5 mg/Lに変更）し置床し、25°Cの明所で培養した。

[0080] 改変LSD培地で植物体を再生させる前に細胞塊を改変N6Z固形培地に置床した場合（試験区）と、改変N6Z固形培地に置床する代わりに細胞塊を改変N6Z液体培地で同日数培養した場合（対照区）で比較した。その結果、対照区の植物体再生効率は72%であったのに対し、試験区は100%であった。これによって、受精卵から得られた細胞塊は、植物体再生させる前に固形培地で培養することによって、再生効率が高まることが示された。結果を表1に示す。

[0081]

[表1]

	N6Z固形培地への 置床	受精卵由来 細胞塊数	再生植物体 数	再生率
対照区	無	11	8	72%
試験区	有	11	11	100%

[0082] 実施例3：コムギ受精卵の植物体再生速度における固形培地の効果

実施例2と同様にコムギ品種 F i e l d e r から受精卵細胞を単離し、植物体の再生を行った。

[0083] 細胞塊が植物体に再生する期間を、再分化用培地改変 L S D 培地で植物体を再生させる前に改変 N 6 Z 固形培地に置床した場合（試験区）と、改変 N 6 Z 固形培地に置床する代わりに改変 N 6 Z 液体培地で同日数培養した場合（対照区）で比較した。試験区、対照区それぞれにつき、植物体が再生した細胞塊 7 個の植物体再生に要した日数（具体的には再生用改変 L S D 培地に置床してから土に移植ができるまでの日数）を比較したところ、試験区の方が対照区より平均 4.7 日早く植物体が再生した。これにより、再生工程前に細胞塊を固形培地に置床する工程を経た細胞塊の方が、この工程を含めない細胞塊よりも、早く植物体の再生が促されることがわかった。結果を表 2 及び図 1 に示す。

[0084]

[表2]

N6Z固形培地への置床	植物体再生日数(日)	
	無(対照区)	有(試験区)
細胞塊No. 1	20	7
細胞塊No. 2	17	10
細胞塊No. 3	17	14
細胞塊No. 4	20	7
細胞塊No. 5	14	15
細胞塊No. 6	14	13
細胞塊No. 7	11	14
平均日数(日)	16.1	11.4

[0085] 参考例1：コムギ品種農林61号の未熟胚培養および植物体の再生

植物受精卵細胞の培養に供試したコムギ品種 *Fielder* と農林61号の培養特性を確認するため、Ishida et al. (2015) の方法を参考にして、それぞれの品種の未熟胚を培養し、再生植物体を得た。

[0086] 開花14日後の穂から無菌的に未熟胚を単離し、WLS-1iq培地に採取した。未熟胚を15,000rpm(20,000×g)で10分間遠心した後、改変WLS培地-1(2.2mg/Lピクローラムを2.5mg/Lダイカンバに置換、カルベニシリンを除去)に置床し、25℃、暗黒下で2日間培養した。次に、胚軸を除去後、改変WLS培地-1に置床し、さらに5日間培養した。肥大した未熟胚を、改変培地WLS培地-2(カルベニシリンを除去)に置床し、25℃、暗黒下で2週間培養した。各未熟胚を2分割後、改変培地WLS培地-2に再度置床し、さらに2週間培養した。増殖したカルスを、カルベニシリンとセフォタキシムを除いた改変LSZ培地で、25℃、明所にて2週間培養した。最後に、再生した植物体を、カ

ルベニシリンを除いた改変LSF培地で、25℃、明所にて2週間培養した。結果を表3に示す。

[0087] [表3]

品種	供試未熟胚数(個)	再生植物体数(個)	植物体再生効率
Fielder	30	29	96.7 %
農林61号	48	2	4.2 %

[0088] 表3に示された通り、再生した植物体を得られた未熟胚は、Fielderは30個中29個であったのに対し、農林61号は48個中2個からのみであった。このことから、Fielderは比較的培養しやすい性質があり、一方農林61号は培養が困難な品種であると言える。

[0089] 実施例4：コムギ難培養品種受精卵の植物体再生効率における固形培地の効果

実施例2と同様にコムギ品種農林61号から受精卵細胞を単離し、植物体の再生を行い、植物体再生前に細胞塊を固形培地上で培養した場合（試験区）と、固形培地に置床する代わりに液体培地で同日数培養した場合（対照区）で、植物体再生効率を比較した。

[0090] その結果、対照区の植物体再生効率は71%であったのに対し、試験区は100%であった。これによって、培養が困難なコムギ品種の受精卵細胞の培養においても、受精卵から得られた細胞塊は、植物体再生させる前に固形培地で培養することによって、再生効率が高まることが示された。結果を表4に示す。

[0091] [表4]

	N6Z固形培地への置床	受精卵由来細胞塊数	再生植物体数	再生率
対照区	無	7	5	71%
試験区	有	7	7	100%

[0092] 実施例5：トウモロコシ受精卵の植物体再生率における固形培地の効果

トウモロコシ（品種：A188）の交配適期の雌穂のシルクを長さ10cmのところで切断し、その先端に、同品種の雄穂から採取した花粉を受粉させ、25℃、日長12時間の培養室にて培養した。交配後16時間経過した雌穂の胚珠から、胚嚢を含む珠心切片を摘出し、3.5cmプラスチックシャーレ中の1mLの650mOsmol/kg マンニトール溶液に入れた。さらに、酵素混合液（1% セルラーゼ（Worthington）、0.3% マセロザイム（ヤクルト本社製）、0.05% ペクトリアーゼ（盛進製薬製を0.7%マンニトール溶液中に溶解））0.5mLを添加し、室温にて10分消化した。その後、このうち0.75μLを除去し、650mOsmol/kg マンニトール溶液 0.75μLを添加し、良く混和後、さらに室温にて20分消化した。2本のガラス針のうち一方で胚珠切片を固定し、もう一方で受精卵が存在すると推測される領域の組織を軽く押すことにより受精卵を取り出した。領域の推定は、受精が行われると、2個存在する助細胞のうち花粉管が侵入した方が変性し、暗褐変化するのをそれを目印とした。

[0093] 3.5mLプラスチックシャーレの中に直径12mmのMilliCell-1-CMインサート（ミリポア社製）を入れ、MilliCell-1-CMインサートの内側に、2,4-D濃度を0.2mg/L、浸透圧を650mOsmol/kg H₂O、pHを5.7に変更した改変MSO培地（Kranz E. et al., (1993)）を0.2mL、外側に上述の改変MSO培地を2mLとOc培養細胞（理研バイオリソースセンター）を添加した。単離した受精卵の培養を、マイクロキャピラリーを用いてMilliCell-1-CMインサートのメンブレン上に移した。受精卵は、25℃の暗所で2日培養し、上述の改変MSO液体培地とOc培養細胞を交換後、さらに1週間培養した。浸透圧を450mOsmol/kg H₂Oに変更した改変MSO培地とOc培養細胞を交換後、さらに5週間培養した。

[0094] 直径2mm以上になった細胞塊1つを、改変MSO固形培地（上述の45

0 mOsmol/kg H₂Oに変更した改変MSO培地のグルコースを20g/L シュークローズに置換し、2倍の濃度で調製した液体培地と1.6%ゲルライト溶液を等量混合して固めた培地)に置床し、25℃の暗所で1週間培養した。次に、細胞塊を、再分化用培地RMS1培地(Kranz et al. (1999))に置床し、25℃の明所で2週間培養したところ、細胞塊から複数のシュートが再分化した。次に、発根用培地RMS2培地(Kranz et al. (1999))で1週間、さらにRMS3培地(Kranz et al. (1999))で2週間培養したところ、1つの細胞塊から形態が正常なシュートと根が再分化した個体が4個体獲得できた。

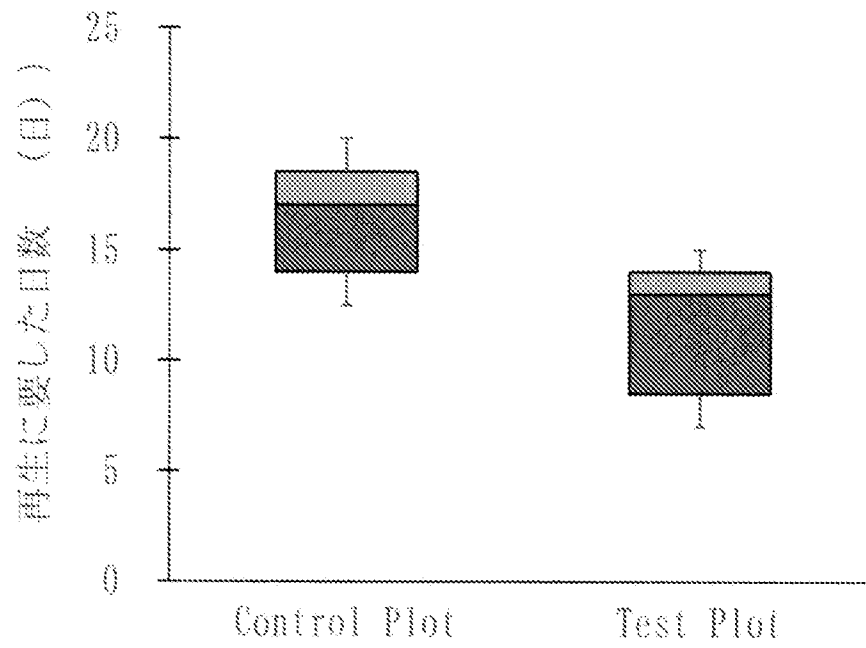
請求の範囲

- [請求項1] 植物受精卵細胞を固形培地で培養することを含む、植物受精卵細胞の培養方法。
- [請求項2] 植物受精卵細胞からの植物再生方法であって、植物受精卵細胞を培養する工程の一部において、植物受精卵細胞を固形培地において培養することを含む、前記方法。
- [請求項3] 植物受精卵細胞が細胞塊になった後に固形培地において培養することを含む、請求項2に記載の植物再生方法。
- [請求項4] 植物受精卵細胞からの植物再生方法であって、
(1) 植物受精卵細胞を培養して培養細胞塊を取得し、ここにおいて、当該工程の一部において、植物受精卵細胞を固形培地において培養する；
(2) 前記培養細胞塊を再生する、
ことを含む、前記方法。
- [請求項5] 植物受精卵細胞からの植物再生方法であって、
(1) (i) 植物受精卵細胞を培養して培養細胞塊を取得し；
(1) (ii) 該培養細胞塊を、固体培地において培養し；
(2) 前記培養細胞塊を再生する、
ことを含む、前記方法。
- [請求項6] さらに、(0) 植物受精卵細胞を取得する、ことを含む、請求項4または5に記載の方法。
- [請求項7] 直径が0.3 mm以上の細胞塊の状態の植物受精卵細胞を固体培地において培養する、ことを含む、請求項1-6のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項8] 直径が1 mm以上の細胞塊の状態の植物受精卵細胞を固体培地において培養する、ことを含む、請求項1-6のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項9] 植物が、単子葉植物である、請求項1-8のいずれか1項に記載の

方法。

- [請求項10] 植物が、トウモロコシ、コムギ、オオムギ、イネ、ソルガム及びライムギからなる群から選択される、請求項1－9のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項11] 固形培地が、植物成長調整物質を含む、請求項1－10のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項12] 植物成長調整物質が、オーキシン類である、請求項11に記載の方法。
- [請求項13] オーキシン類が、2, 4-D、ピクローラム、ダイカンバからなる群より選択される植物ホルモンである、請求項12に記載の方法。
- [請求項14] 植物成長調整物質の固体培地中の濃度が、0.05 mg/L以上10 mg/L以下である、請求項12または13に記載の方法。
- [請求項15] 植物成長調整物質の固体培地中の濃度が、0.01 mg/L以上10 mg/L以下である、請求項12または13に記載の方法。
- [請求項16] 植物受精卵細胞が、卵細胞を、植物の卵細胞を含む組織から単離した後に、精細胞を融合させることによって得られるものである、請求項1－15のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項17] 植物受精卵細胞が、物質が導入された植物受精卵細胞である、請求項1－15のいずれか1項に記載の方法。

[図1]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/043576

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl. C12N5/04 (2006.01) i, A01H1/00 (2006.01) i, A01H1/02 (2006.01) i, A01H4/00 (2006.01) i, C12N5/10 (2006.01) i, C12N5/14 (2006.01) n

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)

Int. Cl. C12N5/04, A01H1/00, A01H1/02, A01H4/00, C12N5/10, C12N5/14

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2019
 Registered utility model specifications of Japan 1996-2019
 Published registered utility model applications of Japan 1994-2019

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

JSTplus/JMEDplus/JST7580 (JDreamIII), CAPplus/WPIDS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2000-350526 A (AJINOMOTO CO., INC.) 19 December 2000, paragraphs [0002]-[0008], [0012], [0027],	1-3, 7-9, 11-17
Y	[0030] & US 5367111 A, page 1, page 6, examples	10
A		4-6
X	JP 4-23928 A (ORION MACHINERY CO., LTD.) 28 January 1992, page 160, upper left column, page	1-3, 7-8, 16-17
Y	161, example 1 (Family: none)	10
A		4-6, 9, 11-15

Further documents are listed in the continuation of Box C. 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 26.11.2019
 Date of mailing of the international search report 10.12.2019

Name and mailing address of the ISA/
 Japan Patent Office
 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
 Tokyo 100-8915, Japan
 Authorized officer
 Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/043576

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>科学技術振興機構 (JST), 名古屋大学, 植物の受精卵が分裂する様子を生きたまま観察することに成功 ～植物の驚くべき再生能力が明らかに～, 共同発表 [online], 10 July 2015 [retrieved: 25 November 2019], Internet: <URL:https://www.jst.go.jp/pr/announce/20150710/index.html>, pp. 1-8, in particular, p. 2, p. 5, fig. 4 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY (JST), NAGOYA UNIVERSITY. Real time observation of zygote division in a flowering plant. Joint Announcement.)</p>	1-17
A	<p>WO 2018/143480 A1 (JAPAN TOBACCO INC.) 09 August 2018 & CN 110234223 A</p>	1-17

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））
 Int.Cl. C12N5/04(2006.01)i, A01H1/00(2006.01)i, A01H1/02(2006.01)i, A01H4/00(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N5/14(2006.01)n

B. 調査を行った分野
 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））
 Int.Cl. C12N5/04, A01H1/00, A01H1/02, A01H4/00, C12N5/10, C12N5/14

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの
 日本国実用新案公報 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2019年
 日本国実用新案登録公報 1996-2019年
 日本国登録実用新案公報 1994-2019年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
 CAplus/WPIDS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y A	JP 2000-350526 A (味の素株式会社) 2000.12.19, [0002] - [0008], [0012], [0027], [0030] & US 5367111 A p.1, p.6, Example1	1-3, 7-9, 11-17 10 4-6

C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）	「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	

国際調査を完了した日 26.11.2019	国際調査報告の発送日 10.12.2019
--------------------------	--------------------------

国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ISA/J P） 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 清野 千秋 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4 B	1150
--	---	-----	------

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y A	JP 4-23928 A (オリオン機械株式会社) 1992.01.28, p.160 左上欄、 p.161 実施例1 (ファミリーなし)	1-3, 7-8, 16-17 10 4-6, 9, 11-15
A	科学技術振興機構 (JST)、名古屋大学, 植物の受精卵が分裂する様子を生きたまま観察することに成功 ~植物の驚くべき再生能力が明らかに~, 共同発表 [オンライン], 2015.07.10, [検索日 2019.11.25], インターネット: <URL:https://www.jst.go.jp/pr/announce/20150710/index.html >, p.1-8, 特に、p.2, p.5 図4	1-17
A	WO 2018/143480 A1 (日本たばこ産業株式会社) 2018.08.09, & CN 110234223 A	1-17