

(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
2018年3月1日(01.03.2018)



(10) 国際公開番号

WO 2018/038092 A1

(51) 国際特許分類:

A24B 15/00 (2006.01) A01H 5/02 (2006.01)
A24B 3/04 (2006.01) A01H 5/04 (2006.01)
A01H 1/00 (2006.01) A01H 5/06 (2006.01)
A01H 1/06 (2006.01) A01H 5/10 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01) A01H 5/12 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2017/029901

(22) 国際出願日: 2017年8月22日(22.08.2017)

(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:

特願 2016-162276 2016年8月22日(22.08.2016) JP

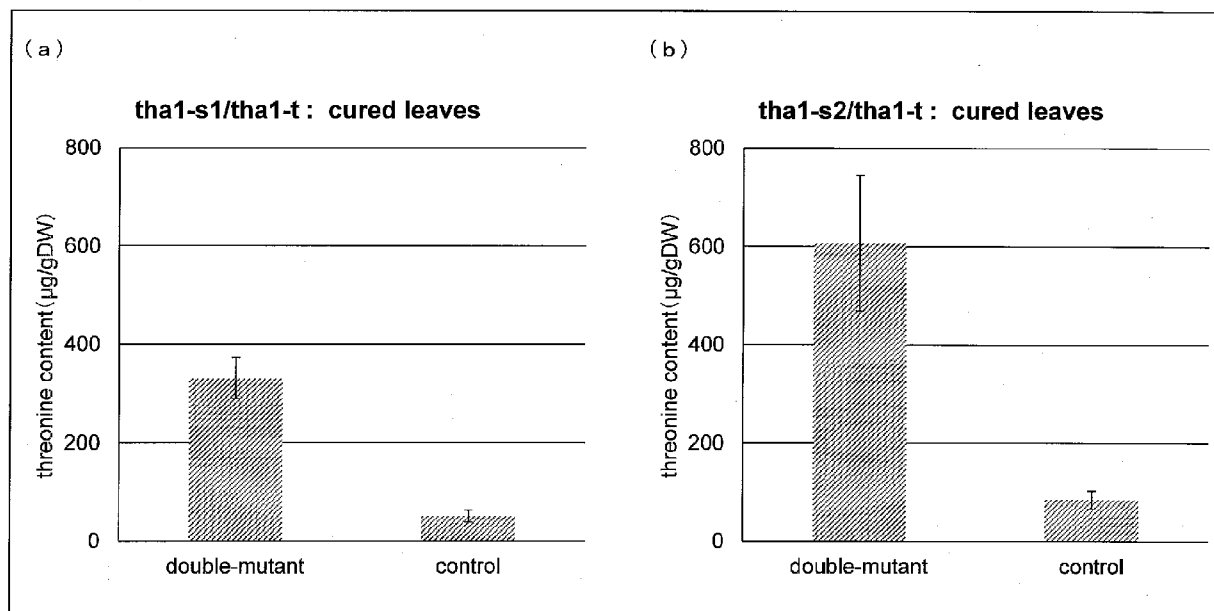
(71) 出願人: 日本たばこ産業株式会社 (JAPAN TOBACCO INC.) [JP/JP]; 〒1058422 東京都港区虎ノ門二丁目2番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 津久井 里望 (TSUKUI, Satomi); 〒1308603 東京都墨田区横川一丁目17番7号 日本たばこ産業株式会社内 Tokyo (JP). 三田 智子 (SANDA, Satoko); 〒1308603 東京都墨田区横川一丁目17番7号 日本たばこ産業株式会社内 Tokyo (JP). 宇田川 久史 (UDAGAWA, Hisashi); 〒1308603 東京都墨田区横川一丁目17番7号 日本たばこ産業株式会社内 Tokyo (JP). 藤村 朋也 (FUJIMURA, Tomoya); 〒1308603 東京都墨田区横川一丁目17番7号 日本たばこ産業株式会社内 Tokyo (JP). 新井 雅雄 (ARAI, Masao); 〒1308603 東京都墨田区横川一丁目17番7号 日本たばこ産業株式会社内 Tokyo (JP). 小池 明子 (KOIKE, Akiko); 〒1308603 東京都墨田区横川一丁目17番7号 日本たばこ産業株式会社内 Tokyo (JP).

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING CURED TOBACCO MATERIAL

(54) 発明の名称: 乾燥たばこ材料の生産方法

図 9



(57) Abstract: Provided is a method for producing a cured tobacco material having an enhanced threonine content. The present invention is a method for producing a cured tobacco material having an enhanced threonine content, wherein the cured tobacco material is produced from a tobacco plant modified such that the expression or activity of the endogenous threonine aldolase is reduced, or is produced from a part thereof.



(74) 代理人: 特許業務法人 H A R A K E N Z
O W O R L D P A T E N T & T
R A D E M A R K (HARAKENZO WORLD
PATENT & TRADEMARK); 〒5300041 大阪府
大阪市北区天神橋 2 丁目北 2 番 6 号 大
和南森町ビル Osaka (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).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則5.2(a))

(57) 要約: トレオニン含量の増強された乾燥たばこ材料の生産方法を提供する。本発明は、
トレオニン含量の増強された乾燥たばこ材料の生産方法であって、該乾燥たばこ材料は、
内在性のトレオニナルドラーゼの発現または活性が低下するよう改変されたタバコ植物
またはその一部から生産されるものである、生産方法である。

明 細 書

発明の名称：乾燥たばこ材料の生産方法

技術分野

[0001] 本発明は、トレオニン含量の増強された乾燥たばこ材料の生産方法、乾燥たばこ材料およびその抽出物、およびたばこ製品に関する。

背景技術

[0002] トレオニンは、植物において、種々の有用な効果をもたらすアミノ酸であり、例えば、タバコ植物では、当該植物をたばこ原料として喫煙に供した場合にそのフレーバー（香嗅味）に大きく貢献する成分の1つである。トレオニン含量の増強されたたばこ原料を生産するための品種の開発はタバコ育種における重要な目標となっている。

[0003] 植物のトレオニン含量を増大させるための公知のアプローチの1つはトレオニン生合成の鍵となる酵素（key酵素）であるアスパラギン酸キナーゼ（Asparatate Kinase、AK）の改変である。AKはアスパラギン酸に由来するトレオニン等の各種アミノ酸の生合成経路における最初の酵素であるが、通常AKの活性は最終生成産物であるトレオニン、リジンおよびS-アデノシルメチオニン（S-adenosylmethionine）からのフィードバック阻害によって厳密に制御されている（非特許文献1および非特許文献2）。

[0004] こうした最終生成産物であるアミノ酸からのフィードバック阻害を受けないよう改変されたAKを発現する植物の葉は、高いレベルのトレオニン濃度を示すことが知られている（非特許文献3および特許文献1）。

[0005] また、アスパラギン酸からリジンまたはメチオニンの生成に至る生合成経路に障害がある場合も、植物のトレオニン含量が高くなることが知られている。例えば、リジン生合成経路における最初の反応を担う酵素であるジヒドロピコリン酸合成酵素（dihydrodipicolinate synthase（DHDP S））の機能を喪失したシロイヌナズナのT-DNA挿入変異体は全身で高いレベルのトレオニン濃度を示す（非特許文献4）。また、メチオニン生合成経路に

におけるKey酵素であるシスタチオニン γ 合成酵素 (cystathionine gamma-synthase (C G S)) の発現をアンチセンス抑制したシロイヌナズナのシュートもトレオニン含量が高い (非特許文献5)。

[0006] しかし、上記の例に限らず、トレオニン含量を高めるよう改変された植物は深刻な生育不全を伴うことが知られている (非特許文献6、非特許文献7および非特許文献8)。

[0007] このように、トレオニン含量を高めた植物は、収量の大幅な減少に繋がる受け入れがたい形質を伴う。このことがトレオニン含量の高いたばこ原料等を生産するための品種を開発する上での大きな問題となっている。

[0008] 以上の問題を解決するための1つの方法として、特許文献2には、老化誘導プロモータの下でフィードバック阻害を受けないAKを発現させる方法が開示されている。この方法によると老化するまではトレオニン含量が高くないので、植物の生育不全が改善されることが期待できる。

[0009] また、以上に示した例とは異なり、トレオニン分解を抑制する改変が植物の葉のトレオニン含量の増大に繋がった例はこれまでに知られていない。例えば、シロイヌナズナはトレオニンからグリシンへの異化反応を担う2種類のトレオニンアルドラーゼ (Threonine Aldolases (T H A)) を有しているが、主に種子および実生で発現するT H A 1の機能喪失は、種子のトレオニン含量を高めるものの、シュートのトレオニン含量に影響しない。一方、全身の維管束組織で発現するT H A 2の機能喪失変異は致死性のアルビノを引き起こす (特許文献3、非特許文献9および非特許文献10)。さらに、もう1つのトレオニン分解経路のKey酵素であるトレオニンデアミナーゼ (Threonine Deaminase (T D)) の発現抑制は植物の生育を強く阻害する (非特許文献11)。

[0010] このようにトレオニン分解を抑制することによりトレオニンレベルの増大を狙ったアプローチは実用的な品種の開発には繋がりにくいことが知られていた。

先行技術文献

特許文献

[0011] 特許文献1：米国特許出願公開 6 7 3 0 8 3 2 号明細書（2 0 0 4 年 5 月 4 日 公開）

特許文献2：国際公開公報 2 0 1 0 / 0 1 8 2 3 4 号明細書（2 0 1 0 年 2 月 1 8 日 公開）

特許文献3：国際公開公報 2 0 0 5 / 0 4 7 4 7 2 号明細書（2 0 0 6 年 5 月 2 6 日 公開）

非特許文献1：Heldt and Piechulla, Plant biochemistry. Fourth Edition, Academic Press, 291-293 (2010).

非特許文献2：Jander and Joshi, The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists, 7 (2009).

非特許文献3：Frankard et al., Theoretical and Applied Genetics, 82, 2 73-282 (1991).

非特許文献4：Craciun et al., FEBS letters, 487, 234-238 (2000).

非特許文献5：Kim et al. Plant Science, 151(1), 9-18 (2000).

非特許文献6：Shaul and Galili, Plant Physiol 100: 1157-1163 (1992).

非特許文献7：Karchi et al., The Plant Journal, 3, 721-727 (1993).

非特許文献8：Sarrobort et al., The Plant Journal, 24, 357-368 (2000).

非特許文献9：Jander et al., The Plant Journal, 39, 465-475 (2004).

非特許文献10：Joshi et al., Plant Cell. 18, 3564-3575 (2006)

非特許文献11：Kang et al., The Plant Cell, 18(11), 3303-3320 (2006).

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0012] 依然として、トレオニン含量の高いタバコ原料の生産に適し、かつ、生育不全を伴わない品種の探索または開発が求められている。さらに、このような特性を有する品種を遺伝子組み換え体ではない品種の中から選択可能となることも求められている。

[0013] 本発明は、上記の問題点に鑑みてなされたものであり、その目的は、タバ

コ植物の栽培から収穫、乾燥に至る葉たばこ生産上の不利益を伴わずに、トレオニン含量の増強された乾燥たばこ材料を生産するための方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0014] 上記の課題を解決するために、本発明は以下の何れかの一態様を包含する。

< 1 > トレオニン含量の増強された乾燥たばこ材料の生産方法であって、
内在性のトレオニンアルドラーゼの発現または活性が低下するよう改変されたタバコ植物またはその一部から、該乾燥たばこ材料を生産することを含み、

該トレオニンアルドラーゼは、以下の（a）および（b）の少なくとも何れかである、生産方法：

（a）配列番号 1 に記載の塩基配列を有するポリヌクレオチドに対して 90%以上の配列同一性を有するポリヌクレオチドを含む遺伝子によってコードされるポリペプチドからなるトレオニンアルドラーゼ

（b）配列番号 3 に記載の塩基配列を有するポリヌクレオチドに対して 90%以上の配列同一性を有するポリヌクレオチドを含む遺伝子によってコードされるポリペプチドからなるトレオニンアルドラーゼ。

< 2 > トレオニン含量の増強された乾燥たばこ材料の生産方法であって、
内在性のトレオニンアルドラーゼの発現または活性が低下するよう改変されたタバコ植物またはその一部から、該乾燥たばこ材料を生産することを含み、

該トレオニンアルドラーゼは、以下の（a）および（b）の少なくとも何れかである、生産方法：

（a）配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドに対して 90%以上の配列同一性を有するポリペプチドからなるトレオニンアルドラーゼ、

（b）配列番号 4 に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドに対して 9

0%以上の配列同一性を有するポリペプチドからなるトレオニンアルドラーゼ。

発明の効果

[0015] 本発明によれば、トレオニン含量の増強された乾燥たばこ材料を生産することができ、当該乾燥たばこ材料、当該乾燥たばこ材料から調製した抽出物ならびに当該乾燥たばこ材料およびその抽出物を使用して生産されたたばこ製品を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0016] [図1]アスパラギン酸に由来するアミノ酸の代謝経路を示す図である。

[図2]ニコチアナ タバカムの各種組織におけるN t T H A 1 遺伝子およびN t T H A 2 遺伝子の発現を示す。

[図3]N t T H A 1 遺伝子の野生型対立遺伝子および変異対立遺伝子の塩基配列のアライメントを示す。

[図4]N t T H A 1 遺伝子の野生型対立遺伝子および変異対立遺伝子の翻訳産物のアミノ酸配列のアライメントを示す。

[図5]N t T H A 1 遺伝子の二重変異体におけるN t T H A 1 遺伝子の発現を示す。

[図6]圃場で生育させたN t T H A 1 遺伝子の二重変異体および対照のタバコ植物を示す。

[図7]熱風乾燥における標準的な乾燥スケジュールを示す。

[図8]N t T H A 1 遺伝子の二重変異体および対照のタバコ植物から採取した新鮮な葉のトレオニン含量を示す。

[図9]N t T H A 1 遺伝子の二重変異体および対照のタバコ植物から採取した葉を熱風乾燥した場合のトレオニン含量を示す。

[図10]N t T H A 1 遺伝子の二重変異体および対照のタバコ植物から採取した葉を各温度条件で熱風乾燥した場合のトレオニン含量を示す。

[図11]各種遺伝子型の個体におけるN t T H A 1 遺伝子の発現を示す。

[図12]各種遺伝子型の個体に由来する乾葉の遊離トレオニン含量を示す。

[図13]空気乾燥中のタバコ葉を示す。

[図14]空気乾燥中のタバコ葉の周辺温度、周辺湿度の推移を示す。

[図15]空気乾燥中の二重変異体および対照のタバコ葉の遊離トレオニン含量の推移を示す。

[図16]二重変異体および対照の各種乾葉の遊離トレオニン含量を示す。

[図17]ゲノム編集したタバコ植物における N t T H A 1 遺伝子の発現レベルを示す。

[図18]ゲノム編集したタバコ植物の乾葉の遊離トレオニン含量を示す。

発明を実施するための形態

[0017] 本発明の実施の形態について説明すれば、以下の通りである。なお、本発明は、これに限定されるものではない。

[0018] [用語等の定義]

本明細書において、「ポリヌクレオチド」は、「核酸」または「核酸分子」とも換言でき、ヌクレオチドの重合体を意図している。また、「塩基配列」は、「核酸配列」または「ヌクレオチド配列」とも換言でき、特に言及のない限り、デオキシリボヌクレオチドの配列またはリボヌクレオチドの配列を意図している。

[0019] 本明細書において、「ポリペプチド」は、「タンパク質」とも換言できる。

[0020] 本明細書において、「ホモ接合体 (homozygote)」とはトレオニンアルドラーゼをコードするある遺伝子座が一对の同一の対立遺伝子からなるホモ接合体 (homozygous) であるタバコ植物を意図する。「ヘテロ接合体 (heterozygote)」とはトレオニンアルドラーゼをコードするある遺伝子座が一对の異なる対立遺伝子からなるヘテロ接合体 (heterozygous) であるタバコ植物を意図する。

[0021] 本明細書において、「Aおよび／またはB」は、AおよびBとAまたはBとの双方を含む概念であり、「AおよびBの少なくとも一方」とも換言できる。

[0022] 本明細書において、「ポリヌクレオチド同士が相補的な関係にある」とは、「ポリヌクレオチドが有する塩基配列同士を比較したときに相補的な関係にある」ことと同義である。

[0023] 本明細書において、タバコ植物に対して用いる場合、「対照（コントロール）」とは、本発明に係る内在性のトレオニンアルドラーゼの発現または活性が、正常な状態から変更されていない、例えば低下するよう改変されていない、タバコ植物を意味している。したがって、対照のタバコ植物は、内在性のトレオニンアルドラーゼの発現または活性が低下したタバコ植物との比較のための基準を提供することができる。対照は、野生型の同種のタバコ植物とすることができる。または、対照は、後述する組換え発現ベクターの空ベクターを含むタバコ植物であってもよい。

[0024] また、本明細書において、トレオニンアルドラーゼのタンパク質に対して用いる場合、「対照」とは、本発明に係るトレオニンアルドラーゼの活性が、正常な状態から変更されていない、例えば低下するよう改変されていない、トレオニンアルドラーゼのタンパク質を意味している。したがって、対照のトレオニンアルドラーゼのタンパク質は、トレオニンアルドラーゼの活性が低下したトレオニンアルドラーゼのタンパク質との比較のための基準を提供することができる。

[0025] さらに、本明細書において乾燥たばこ材料に対して用いる場合、「対照」とは、本発明に係る内在性のトレオニンアルドラーゼの発現または活性が、正常な状態から変更されていない、例えば低下するよう改変されていない、タバコ植物またはその一部を乾燥させた乾燥たばこ材料を意図する。したがって、対照の乾燥たばこ材料は、内在性のトレオニンアルドラーゼの発現または活性が低下したタバコ植物またはその一部を乾燥させて作製した乾燥たばこ材料との比較のための基準を提供することができる。

[0026] [1. トレオニン含量の増強された乾燥たばこ材料の生産方法]

本発明に係る生産方法について説明すれば以下の通りである。

[0027] 本発明に係る生産方法は、トレオニン含量の増強された乾燥たばこ材料の

生産方法であって、内在性のトレオニンアルドラーゼの発現または活性が低下するよう改変されたタバコ植物またはその一部から、該乾燥たばこ材料を生産することを含み、該トレオニンアルドラーゼは、以下の（a）および（b）の少なくとも何れかである、生産方法である。

[0028] （a）配列番号 1 に記載の塩基配列を有するポリヌクレオチドに対して 90%以上の配列同一性を有するポリヌクレオチドを含む遺伝子によってコードされるポリペプチドからなるトレオニンアルドラーゼ

（b）配列番号 3 に記載の塩基配列を有するポリヌクレオチドに対して 90%以上の配列同一性を有するポリヌクレオチドを含む遺伝子によってコードされるポリペプチドからなるトレオニンアルドラーゼ。

[0029] また、本発明に係る生産方法は、トレオニン含量の増強された乾燥たばこ材料の生産方法であって、内在性のトレオニンアルドラーゼの発現または活性が低下するよう改変されたタバコ植物またはその一部から、該乾燥たばこ材料を生産することを含み、該トレオニンアルドラーゼは、以下の（a）および（b）の少なくとも何れかである、生産方法である。

[0030] （a）配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドに対して 90%以上の配列同一性を有するポリペプチドからなるトレオニンアルドラーゼ、

（b）配列番号 4 に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドに対して 90%以上の配列同一性を有するポリペプチドからなるトレオニンアルドラーゼ。

[0031] ここで、上記トレオニンアルドラーゼは、以下に詳述する（遺伝子）の項目に記載のポリヌクレオチドを含む遺伝子がコードするタンパク質である。また、トレオニンアルドラーゼについては以下の（トレオニンアルドラーゼとしてのポリペプチド）の項目に詳細を記載する。

[0032] 本明細書において、「乾燥たばこ材料」とは、採取されたタバコ植物またはその一部を乾燥させたものをいう。

[0033] 一実施形態において、本発明の生産方法は、内在性のトレオニンアルドラー

一ゼの発現または活性が低下するよう改変されたタバコ植物またはその一部を乾燥させる乾燥工程を包含している。乾燥工程については、以下の（乾燥工程）の項目で詳細に記載する。

[0034] また、本明細書において「トレオニン含量の増強された乾燥たばこ材料」とは、乾燥工程を経て乾燥させたタバコ植物またはその一部のトレオニン含量が、対照と比べて有意に増強されたことを意図している。

[0035] 例えば、乾燥させたタバコ植物またはその一部のトレオニン含量が、対照と比較して、乾燥重量あたり20%以上、より好ましくは30%以上、さらに好ましくは40%以上、さらにより好ましくは50%以上、さらにより好ましくは60%以上、特に好ましくは80%以上、最も好ましくは、100%増大している。具体的には、乾燥工程を経て乾燥させた植物またはその一部の乾燥重量あたり、好ましくはトレオニン含量が $100\mu\text{g/g}$ （DW）以上、より好ましくはトレオニン含量が $120\mu\text{g/g}$ （DW）以上、さらにより好ましくはトレオニン含量が $140\mu\text{g/g}$ （DW）以上、さらにより好ましくはトレオニン含量が $160\mu\text{g/g}$ （DW）以上、さらにより好ましくはトレオニン含量が $180\mu\text{g/g}$ （DW）以上、さらにより好ましくはトレオニン含量が $200\mu\text{g/g}$ （DW）以上、特に好ましくはトレオニン含量が $220\mu\text{g/g}$ （DW）以上、最も好ましくは、 $240\mu\text{g/g}$ （DW）以上である。一例では、乾燥たばこ材料は、葉材料であって、当該乾燥たばこ材料におけるトレオニン含量は、トレオニンアルドラーゼが改変されていない対照のタバコ植物またはその一部から作製した乾燥たばこ材料のトレオニン含量と比べて20%以上増大している。

[0036] ここで乾燥たばこ材料のトレオニン含量とは、乾燥たばこ材料に含まれる遊離トレオニンの含量を意図している。

[0037] （タバコ植物またはその一部）

まず、本発明の生産方法に用いられるタバコ植物またはその一部について説明する。本明細書において、「タバコ植物またはその一部」とは、タバコ植物の、植物体全体、植物器官（葉、根、茎、わき芽、花、および種子など

）、植物組織片（表皮、師部、柔組織、木部および維管束等）ならびに植物細胞（培養細胞、カルス、およびプロトプラスト等）を包含するものを意味する。好ましくは植物体全体、植物器官（葉、根、茎、わき芽、花、および種子など）ならびに植物組織片（表皮、師部、柔組織、木部および維管束等）から選択されるものであり、より好ましくは、植物体全体、および植物器官（葉、根、茎、わき芽、花、および種子など）等から選択されるものであり、さらに好ましくは、植物体全体および葉から選択されるものであり、最も好ましくは、葉である。なお、本発明の生産方法に用いられる葉は、植物体の茎の上部に位置する葉（上葉）であってもよく、茎の真ん中より上に位置する葉（本葉）であってもよい。または、茎に着いたままの葉であってもよい。

[0038] 本発明の生産方法に用いられるタバコ植物は、トレオニンアルドラーゼの発現または活性が低下するよう改変されたタバコ植物である。ここで、「発現または活性が低下した」とは、「発現が低下した」または「活性が低下した」ことを指し、遺伝的な要因によって、該トレオニンアルドラーゼの「発現」、または、トレオニンアルドラーゼの「活性」が対照の植物（例えば野生型の同種の植物）と比べて低下していることを意味する。また、「発現または活性が低下した」には「発現または活性が欠損した」ことも包含する。

[0039] また、トレオニンアルドラーゼの「発現」とはタバコ植物の細胞において該トレオニンアルドラーゼが翻訳され、タンパク質（トレオニンアルドラーゼタンパク質）として存在することを意味している。

[0040] ここで、トレオニンアルドラーゼの「発現が低下した」とは、タバコ植物における、該トレオニンアルドラーゼのタンパク質の存在量が、対照のタバコ植物（例えば野生型の同種の植物）と比べて低下した状態を指す。

[0041] ある実施形態において、該トレオニンアルドラーゼの発現の低下は、該トレオニンアルドラーゼタンパク質の存在量が、対照のタバコ植物（例えば野生型の同種の植物）におけるものに対して、80%以下、70%以下、60%以下、50%以下、40%以下、30%以下、20%以下、10%以下、

５％以下または１％以下であり得る。

[0042] また、トレオニンアルドラーゼの「活性が低下した」とは、該トレオニンアルドラーゼタンパク質そのものの活性レベルが、対照のタバコ植物（例えば野生型の同種の植物）におけるものと比較して、有意に低下した状態を意味している。ある実施形態において、該トレオニンアルドラーゼタンパク質の活性の低下は、該トレオニンアルドラーゼタンパク質の活性レベルが、野生型の同種の植物における対照に対して、８０％以下、７０％以下、６０％以下、５０％以下、４０％以下、３０％以下、２０％以下、１０％以下、５％以下または１％以下であり得る。

[0043] （遺伝子（トレオニンアルドラーゼ遺伝子））

本発明の生産方法に係る遺伝子は、トレオニンからグリシンへの異化反応を触媒するトレオニンアルドラーゼをコードするものである。また、該遺伝子の一例は、トレオニンからグリシンへの異化反応を触媒するトレオニンアルドラーゼをコードしており、当該トレオニンアルドラーゼが活性を有していると、アスパラギン酸由来のアミノ酸生合成経路において、トレオニンからグリシンへの異化反応を触媒するものである。以下、本発明の生産方法に係る遺伝子は、「トレオニンアルドラーゼ遺伝子」としても記載する。

[0044] 本発明の生産方法に係る遺伝子は、以下の何れかに記載のポリヌクレオチドを含むものである。

[0045] （a）配列番号１に記載の塩基配列を有するポリヌクレオチドに対して９０％以上の配列同一性を有するポリヌクレオチド

（b）配列番号２に記載のアミノ酸配列に対して９０％以上の配列同一性を有し、トレオニンからグリシンへの異化反応を触媒する酵素活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

（c）配列番号２に記載のアミノ酸配列において１～３５個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加されたアミノ酸配列を有し、トレオニンからグリシンへの異化反応を触媒する酵素活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

(d) 上記 (a) に記載のポリヌクレオチドと相補的な配列からなるポリヌクレオチドと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、トレオニンからグリシンへの異化反応を触媒する酵素活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

(e) 配列番号 3 に記載の塩基配列を有するポリヌクレオチドに対して 90%以上の配列同一性を有するポリヌクレオチド

(f) 配列番号 4 に記載のアミノ酸配列に対して 90%以上の配列同一性を有し、トレオニンからグリシンへの異化反応を触媒する酵素活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

[0046] (g) 配列番号 4 に記載のアミノ酸配列において 1～35 個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加されたアミノ酸配列を有し、トレオニンからグリシンへの異化反応を触媒する酵素活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

[0047] (h) 上記 (e) に記載のポリヌクレオチドと相補的な配列からなるポリヌクレオチドと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、トレオニンからグリシンへの異化反応を触媒する酵素活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

[0048] なお、塩基配列の上記配列同一性は、それぞれ、91%以上であることが好ましく、92%以上であることがより好ましく、93%以上であることがさらに好ましく、94%以上であることがさらに好ましく、95%以上であることがさらに好ましく、96%以上であることがさらに好ましく、97%以上であることが特に好ましく、98%以上または99%以上であることが最も好ましい。また、置換、欠失、挿入、および／または付加されたアミノ酸の個数は、それぞれ 1～32 個であることが好ましく、1～28 個であることがより好ましく、1～25 個であることがさらに好ましく、1～21 個であることが特に好ましく、1～17 個であることが最も好ましい。

[0049] なお、ストリンジェントな条件下とは、例えば、参考文献：Molecular clo

ning-a Laboratory manual 2nd edition (Sambrookら、1989) に記載の条件等が挙げられる。ストリンジェントな条件下とは、より具体的には例えば、 $6\times\text{SSC}$ ($1\times\text{SSC}$ の組成: 0.15M 塩化ナトリウム、 0.015M クエン酸ナトリウム、 $\text{pH}7.0$)、 0.5% SDS、 $5\times$ デンハートおよび 100mg/mL ニシン精子DNAを含む溶液にプローブとともに 65°C で $8\sim16$ 時間恒温し、ハイブリダイズさせる条件が挙げられる。なお、このポリヌクレオチドは、上記 (a) または (e) に記載のポリヌクレオチドの塩基配列に対して 91% 以上であることが好ましく、 92% 以上であることがより好ましく、 93% 以上であることがさらにより好ましく、 94% 以上であることがさらにより好ましく、 95% 以上であることがさらにより好ましく、 96% 以上であることがさらにより好ましく、 97% 以上であることが特に好ましく、 98% 以上または 99% 以上であることが最も好ましい。

[0050] 本発明に係るトレオニナルドラーゼ遺伝子は、RNA (例えば、mRNA) の形態、またはDNAの形態 (例えば、cDNAまたはゲノムDNA) で存在し得る。DNAは、二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。本発明に係るポリヌクレオチドの一例である、配列番号1に示す塩基配列は、配列番号2に示すポリペプチドをコードするコーディング領域 (CDS) である。本発明に係るポリヌクレオチドの一例である、配列番号3に示す塩基配列は、配列番号4に示すポリペプチドをコードするコーディング領域 (CDS) である。本発明に係るトレオニナルドラーゼ遺伝子は、非翻訳領域 (UTR) の配列等の付加的な配列を含むものであってもよい。

[0051] トレオニナルドラーゼ遺伝子の例としては、タバコ植物であるニコチアナ タバカムのSゲノムに含まれるNtTHA1s遺伝子 (配列番号1)、Tゲノムに含まれるNtTHA1t遺伝子 (配列番号3) 等を挙げることができる。ニコチアナ タバカムは異質4倍体であり、これらの遺伝子は互いに祖先種ゲノムに由来するオルソログ遺伝子である。

[0052] 一例において、本発明の生産方法に係る遺伝子は、上記の (a) ~ (d)

の何れかに記載のポリヌクレオチド、および（e）～（h）の何れかに記載のポリヌクレオチドの両方であるか、少なくとも何れか一方を含むものである。

[0053] 本発明に係るトレオニナルドラーゼ遺伝子の発現部位および発現する生育段階は特に限定されない。一例として、対照植物において本発明に係るトレオニナルドラーゼ遺伝子は、植物体の全体において発現しており、少なくとも葉において発現するものであること、および乾燥工程において発現するものであることが好ましい。

[0054] （トレオニナルドラーゼとしてのポリペプチド）

本発明の生産方法に係るポリペプチドは、上記（遺伝子）の欄に記載した遺伝子の翻訳産物であり、少なくともトレオニンからグリシンへの異化反応を触媒する活性を有する植物のトレオニナルドラーゼである。また、「トレオニンからグリシンへの異化反応を触媒するトレオニナルドラーゼ」は、一例としては、L-トレオニナルドラーゼ（EC 4.1.2.5）である。L-トレオニナルドラーゼは、L-トレオニンからグリシンとアセトアルデヒドとを生成する反応を触媒するものである。

[0055] 本発明の生産方法に係るトレオニナルドラーゼとしてのポリペプチドは、より具体的には、以下の（a）～（d）の少なくとも何れかである。なお、このポリペプチドは遺伝子の翻訳産物であって、用語「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」等の意味については上記（遺伝子）の欄の記載をそのまま参照してよい。

[0056] （a）配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドに対して90%以上の配列同一性を有するポリペプチドからなるトレオニナルドラーゼとしてのポリペプチド

（b）配列番号2に記載のアミノ酸配列において1～35個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドからなるトレオニナルドラーゼとしてのポリペプチド

（c）上記（a）に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと

相補的な配列からなるポリヌクレオチドと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされる、トレオニンアルドラーゼとしてのポリペプチド

(d) 配列番号4に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドに対して90%以上の配列同一性を有するポリチペプチドからなるトレオニンアルドラーゼとしてのポリペプチド

(e) 配列番号4に記載のアミノ酸配列において1～35個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドからなるトレオニンアルドラーゼとしてのポリペプチド

(f) 上記(d)に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと相補的な配列からなるポリヌクレオチドと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされる、トレオニンアルドラーゼとしてのポリペプチド。

[0057] なお、アミノ酸配列の配列同一性は、それぞれ91%以上であることが好ましく、92%以上であることがより好ましく、93%以上であることがさらに好ましく、94%以上であることがさらに好ましく、95%以上であることがさらに好ましく、96%以上であることがさらに好ましく、97%以上であることが特に好ましく、98%以上または99%以上であることが最も好ましい。なお、置換、欠失、挿入、および／または付加されたアミノ酸の個数は、1～32個であることが好ましく、1～28個であることがより好ましく、1～25個であることがさらに好ましく、1～21個であることがさらに好ましく、1～17個であることが特に好ましい。

[0058] 一例において、本発明の生産方法に係るポリペプチドは、上記(a)～(c)の何れかに記載のポリペプチドと(d)～(f)の何れかに記載のポリペプチドとの両方であるか、(a)～(f)の何れかのポリペプチドである。

[0059] (本発明の生産方法において用いられるタバコ植物の態様)

本発明の生産方法において用いられるタバコ植物は、内在性のトレオニナルドラーゼの発現または活性が低下するよう改変されたタバコ植物である。

[0060] なお、「内在性のトレオニナルドラーゼの発現または活性の低下」は、上記のタバコ植物が該トレオニナルドラーゼをコードする内在性遺伝子として変異対立遺伝子 (mutant allele) を有することによって生じているものであるか、または該トレオニナルドラーゼをコードする内在性の遺伝子の発現を抑制するために上記タバコ植物に導入された外因性のポリヌクレオチドによって生じているものである。

[0061] すなわち、一実施形態において、本発明の生産方法に用いられるタバコ植物は、該トレオニナルドラーゼをコードする内在性の遺伝子として変異対立遺伝子を有するか、または該遺伝子の発現を抑制するために導入された外因性のポリヌクレオチドを有するものである。

[0062] ここで、本発明の生産方法において用いられるタバコ植物が有する、上記トレオニナルドラーゼに係る変異対立遺伝子は、挿入、欠失、フレームシフト変異、ナンセンス変異、ノンストップ変異およびスプライス部位変異からなる群より選択される突然変異を含むものであり得る。上記突然変異の種類は対照の植物が有する野生型対立遺伝子との比較により明らかにすることができる。また、当該変異対立遺伝子は、突然変異誘発、ゲノム編集およびノックアウト法からなる群より選択されるいずれかの方法によって導入された人工突然変異を含むものであるか、天然に存在する自然突然変異を含むものである。

[0063] 該突然変異誘発、ゲノム編集またはノックアウト法の方法としては、化学物質または放射線への暴露、CRISPR system、Transcription Activator-Like Effector Nucleases、Zinc Finger Nucleases、Oligonucleotide-directed mutagenesis、T-DNA挿入、およびトランスポゾン挿入などが挙げられる。突然変異誘発またはゲノム編集またはノックアウト法の詳細については、以降の（トレオニナルドラーゼの発現または活性の低下したタバコ植物の

作出)において詳細に記載する。

[0064] また、「自然突然変異」とは、人為的な操作によらず、自然界の放射線および遺伝子複製等の自然要因が原因で生じる突然変異を指す。

[0065] なお、上記変異対立遺伝子は、一実施形態において、機能欠失型対立遺伝子(loss of function allele)と同義である。

[0066] 本発明の生産方法に用いられるタバコ植物は、トレオニンアルドラーゼをコードする遺伝子を含む染色体領域の大規模な欠失を含むものであってもよい。

また、改変されたタバコ植物におけるトレオニンアルドラーゼの発現または活性の低下は、恒常的に生じるものであっても、断続的に生じるものであってもよく、一過性のものであってもよい。例えば、タバコ植物が所定の温度以上の温度に曝露されたときにのみ、当該トレオニンアルドラーゼの発現または活性の低下が生じるものであってもよい。そのようなトレオニンアルドラーゼとして加熱条件下で失活する温度感受性変異を含むケースが挙げられる。

[0067] さらに、本発明のタバコ植物には、内在性のトレオニンアルドラーゼの発現を抑制するために導入された外因性ポリヌクレオチドを含む植物細胞、該植物細胞を含む植物体、該植物体の形質を有するタバコ品種、およびそれらのクローン等も含まれる。つまり、本発明の植物には、形質転換処理を施した再分化当代である「T0世代」、T0世代の植物の自殖種子である「T1世代」などの後代植物、およびそれらを片親にして交配した雑種植物またはその後代植物、内在性のトレオニンアルドラーゼの発現を抑制するために導入された、外因性ポリヌクレオチドを含むベクター等のコンストラクトを含有する植物またはその後代植物を含む。

[0068] 本明細書におけるタバコの「品種 (v a r i e t y)」とは、同じ種の他の植物から区別できる少なくとも1つの特色に関して、個体間での遺伝的変動をほとんど呈さないタバコ植物のある群を指す。該品種は通常の繁殖法によって維持可能である。さらに、本発明の生産方法において使用されるタバ

コの品種は内在性のトレオニナルドラーゼの発現または活性が低下していることを特色として有する。本明細書においては品種 (variety)」はcultivarまたはlineとも換言することができる。

[0069] なお、タバコ植物における、トレオニナルドラーゼの発現または活性の低下という形質（以下、単に「形質」とも記載する）がトレオニナルドラーゼの変異対立遺伝子によって付与された形質である場合、本明細書における「タバコ品種」とは、通常はインブレッド品種またはF1ハイブリッド品種であり得る。しかし、上記の形質を有する限りにおいては、必ずしも一般的なインブレッド品種またはF1ハイブリッド品種のようにその他の形質においても均質性を示す必要はない。上記タバコ品種は上記形質を有するタバコ植物の自殖によって、または上記形質を有する2つの異なるタバコ植物の交配によって作出することができる。本発明の生産方法に用いられるタバコ植物は、商業的に利用される場合、トレオニナルドラーゼの発現または活性の低下を特色として有するタバコ品種の植物であることが特に好ましい。

[0070] トレオニナルドラーゼの発現または活性の低下したタバコ植物は該特色を有するタバコ植物の自殖によって、または該特色を有する2つの異なるタバコ植物の交配によって、種子として繁殖させることができる。該種子から生育したタバコ植物は通常、上記の特色を具備する。上記タバコ植物は、組織または細胞からカルス誘導等の組織培養法により器官または個体を再生させることによって繁殖させることもできる。

[0071] （トレオニナルドラーゼ遺伝子の遺伝子型）

タバコ植物における内在性のトレオニナルドラーゼの発現または活性の低下が、該変異対立遺伝子によるものである場合、該タバコ植物は、トレオニナルドラーゼをコードする遺伝子座についてみれば、対立遺伝子同士で同一種類の変異を有するホモ接合体であるか、または対立遺伝子同士で異なる変異を有するヘテロ接合体であり得る。

[0072] また、遺伝子の変異は、例えば、1つの遺伝子座における1つの領域において生じているものであってもよく、1つの遺伝子座における複数の異なる

領域において生じているものであってもよい。また、1つの遺伝子座における複数の領域において変異が生じている場合、異なる種類の変異がそれぞれの変異領域において生じていてもよい。なお、係る変異は、相同染色体における一对のトレオニナルドラゼ対立遺伝子の少なくとも一方に生じていればよい（すなわちヘテロ接合型）が、双方に生じていることが好ましい。

[0073] なお、タバコ植物がニコチアナ タバカムのような異質4倍体である場合は、2種のオルソログ遺伝子について少なくとも一方の遺伝子座が、一对の対立遺伝子同士で同一種類の変異を有するホモ接合型であるか、一对の対立遺伝子同士で異なる変異を有するヘテロ接合型であることが好ましい。

[0074] さらに、これら異質4倍体においてはトレオニナルドラゼの2つの遺伝子座における4つの遺伝子のコピーのすべてが変異対立遺伝子であることが特に好ましい。

[0075] 本発明の製造方法に係るタバコ植物の一例は、配列番号1に記載されるN t T H A 1 s 遺伝子および配列番号3に記載されるN t T H A 1 t 遺伝子の両方がナンセンス変異を有しており、これらの変異N t T H A 1 s 遺伝子（例えば、配列番号33または配列番号34）と変異N t T H A 1 t 遺伝子（例えば、配列番号35）との両方の変異N t T H A 1 遺伝子がそれぞれホモ接合型であるニコチアナ タバカムの二重変異体が挙げられる。本発明の製造方法に係るタバコ植物の別の一例は、配列番号1に記載されるN t T H A 1 s 遺伝子および配列番号3に記載されるN t T H A 1 t 遺伝子の両方に1塩基挿入を有しており、これらの変異N t T H A 1 s 遺伝子（例えば、配列番号49）と変異N t T H A 1 t 遺伝子（例えば、配列番号50または配列番号51）との両方の変異N t T H A 1 遺伝子がそれぞれホモ接合型であるニコチアナ タバカムの二重変異体が挙げられる。このようなタバコ植物は一般に交配または選抜などの人為的な操作を経て漸く得ることが可能である。

[0076] また、本発明に係る内在性のトレオニナルドラゼの発現または活性が低下するよう改変されたタバコ植物は、フィードバック阻害への感受性の低下したアスパラギン酸キナーゼ（AK）を発現するものであってもよい。本

発明の生産方法では、このようなタバコ植物またはその一部を用いることによってトレオニン含量がさらに増強された乾燥たばこ材料を生産し得る。

[0077] 一実施形態において、本発明に係るタバコ植物は、内在性のAK遺伝子に変異が導入され、フィードバック感受性の低下したAKタンパク質を発現している。あるいは、タバコ植物は、適切な組換え発現ベクターによって植物に導入された変異型AK遺伝子をコードするポリヌクレオチドによって発現したフィードバック感受性の低下したAKタンパク質を有するものであってもよい。よって、本発明に係るタバコ植物の別の一例は、内在性のトレオニナルドラゼの発現または活性が低下するよう改変されており、且つ、フィードバック感受性の低下したAKを発現するように改変されているタバコ植物であり得る。

[0078] なお、AKの発現に用いる組換え発現ベクターは、以下の＜組換え発現ベクターおよび形質転換体＞に記載のうちの好適なものを用いることができる。

[0079] 一実施形態において、タバコ植物において発現されるフィードバック感受性の低下したAKタンパク質は、配列番号36に記載のアミノ酸配列を有している。当該アミノ酸配列は、野生型タバコ植物のAKタンパク質における405番目のロイシンがフェニルアラニンに置換されている。また、タバコ植物において発現されるフィードバック感受性の低下したAKタンパク質は、野生型タバコ植物のAKタンパク質の有するアミノ酸配列における複数のアミノ酸において置換等の変異を有していてもよい。

[0080] （判定方法または選抜方法を用いて得られたタバコ植物）

一実施形態において、本発明の生産方法に用いるのに好適なタバコ植物であるか否かは、以下の（a）または（b）に示される内在性のトレオニナルドラゼの発現または活性の低下を指標として判定することができる。また、別の実施形態において、本発明の生産方法に用いるのに好適なタバコ植物はトレオニナルドラゼの発現または活性の低下と関連した（a）～（e）のいずれかに示される指標に基づく選抜を経て育成することができる。

- [0081] (a) トレオニンアルドラーゼの発現の低下
 (b) トレオニンアルドラーゼの活性の低下
 (c) 加熱処理した葉におけるトレオニン含量の増強
 (d) トレオニンアルドラーゼの変異対立遺伝子の有無
 (e) 上記 (d) の変異対立遺伝子に連鎖する DNA マーカー（連鎖 DNA マーカー）
 (f) 上記トレオニンアルドラーゼ遺伝子の発現を抑制するために導入された外因性のポリヌクレオチドの有無。

- [0082] <本発明の生産方法に用いるのに好適なタバコ植物であることを判定するための方法>

一実施形態において、本発明の生産方法に、あるタバコ植物またはその一部を原料として適用するに当たり、候補のタバコ植物のトレオニンアルドラーゼの発現または活性の低下を確認することによって、当該タバコ植物またはその一部が本発明の生産方法に用いるのに好適なタバコ植物であるか否かを判定することができる。

- [0083] 以下に該判定方法について説明する。

- [0084] 該判定方法は、内在性のトレオニンアルドラーゼの発現が低下しているか、該トレオニンアルドラーゼタンパク質そのものの活性が低下しているかを確認することを包含する。一実施形態において、判定は、(a) 内在性トレオニンアルドラーゼの発現の低下または (b) 内在性トレオニンアルドラーゼの活性の低下を指標として行われる。上記判定を行うための具体的手段は特に限定されないが、分子遺伝学的な手法を用いた方法および生化学的な手法を用いた方法等が挙げられる。さらに、該判定方法の一実施形態として、上記 (a) または (b) の確認に加えて、(c) 加熱処理した葉におけるトレオニン含量の増強の有無の確認をさらに含んでもよい。

- [0085] 1. トレオニンアルドラーゼの発現が低下していることの確認

トレオニンアルドラーゼの発現の低下は、タバコ植物またはその一部におけるトレオニンアルドラーゼタンパク質の存在量を検査することによって確

認することができる。該タンパクの存在量の検査は、例えば、抗体を用いたウェスタン分析またはELISA分析等によって実施することができる。必要に応じて基準となる該タンパクの存在量と比較して、該タンパク質の存在量が低減されているか否か検査する。また、基準となるタンパク質の存在量とは、例えば、対照となる同種のタバコ植物（例えば、トレオニンアルドラーゼの発現または活性が、正常な状態から変更されていない、例えば低下するよう改変されていないタバコ植物）におけるトレオニンアルドラーゼタンパク質の存在量を指す。

[0086] 一般的に、タンパク質の存在量の低下は、遺伝子発現の低下と関連づけることが可能である。遺伝子の変異による発現量の低下は、多くの場合、mRNAの品質監視を担うnonsense-mediated mRNA decay (NMD)、nonstop decay (NSD)、およびno go decay (NGD)などの機構による変異mRNAの分解に基づく。よって、トレオニンアルドラーゼタンパク質の存在量の低下の確認は、トレオニンアルドラーゼ遺伝子の発現の低下を確認することによって行うことも可能である。タンパク質の量の低下に繋がる遺伝子発現の低下の確認はノーザン分析、RT-PCR分析等による特異的なプローブまたはプライマーを用いた転写産物解析により該遺伝子発現を検査することによって実施できる。

[0087] また、上述のトレオニンアルドラーゼの発現の低下の確認については、必要に応じて、特定の生育段階において、且つ部位特異的に実施してもよい。

[0088] 2. トレオニンアルドラーゼの活性が低下していることの確認

トレオニンアルドラーゼの活性の低下は、例えば、以下の2-1~2-2の方法によって確認することができる。

[0089] 2-1. グリシン要求性の酵母を用いた相補試験

あるタバコ植物が有するトレオニンアルドラーゼタンパク質そのものの酵素活性の低下は該植物から単離したトレオニンアルドラーゼ遺伝子のcDNAを用いた相補性試験により明らかにすることができる。相補試験において、グリシン要求性酵母株であるYM13 (gly1 shm1 shm2) がホストとして好

適に利用することができる (Monschauet al. 1997, FEMS microbiology letters 150: 55-60., Joshi et al. 2006, The Plant Cell 18: 3564-3575.)。単離したトレオニンアルドラーゼ遺伝子の翻訳産物が酵素活性を有する場合は機能相補するため、この遺伝子を導入された宿主はグリシンを含まない培地で生育することができる。試験の容易さの観点からは、下記のポリペプチドの活性の測定よりも、酵母を用いた相補試験を行うことが一般的である。

[0090] 2-2. ポリペプチドの活性測定

対象となるタバコ植物またはその一部から、トレオニンアルドラーゼ遺伝子がコードするポリペプチドを単離する。または対象となる植物におけるトレオニンアルドラーゼ遺伝子のクローンを発現ベクターに導入して、宿主細胞に導入することにより、一過的にポリペプチドを発現させる。これを培養、抽出および精製したものを用いて、トレオニンを基質としたグリシンへの異化反応を触媒する酵素活性の有無を検査し、当該酵素活性が無いか、当該酵素活性が、対照となる同種の植物（例えば、野生型のトレオニンアルドラーゼ遺伝子のホモ接合体）と比較して低下している場合に、トレオニンアルドラーゼの活性が低下しているとみなす。

[0091] 上述のポリペプチドの発現に用いる組換え発現ベクターおよび宿主細胞としては、（組換え発現ベクターおよび形質転換体）の項目において記載のものおよび当技術分野で公知のものが好適に用いられる。

[0092] また、ポリペプチドの合成、抽出および精製方法は、特に限定されず、公知の方法が好適に用いられる。ポリペプチドの合成方法の一例として、アグロバクテリウムを介して、タバコ植物の葉などに一過的発現させる方法、および大腸菌にポリペプチドの発現ベクターを形質転換し、当該大腸菌を培養することによってポリペプチドを発現させる方法等が挙げられる。

[0093] また、トレオニンを基質としたグリシン合成を触媒する酵素活性の測定方法として、例えば、上述の方法によって得られたポリペプチドに対し、トレオニンを添加して、インキュベーションした反応液における、アセトアルデヒドを定量する方法が挙げられる（参考文献：Liu et al. 1998, European J

ournal of Biochemistry, 255, 220-226.)。

[0094] また、別の一態様では、上述の方法によって得られたポリペプチドに対し、トレオニン（例えば、L-Thr）を加えて、インキュベーションした反応液を、精製しLC/MS/MS分析に供する方法が挙げられる。

[0095] 上述の物質の量の測定方法としては、質量分析装置を用いた測定、HPLCを用いた測定等の方法が挙げられる。なかでも、感度および精度に優れているという点において、質量分析装置を用いた測定方法がましい。測定に用いる質量分析装置としては、LC/MS/MSおよびGC/MS等が挙げられる。

[0096] 2-3. トレオニン含量の測定

また、上記の<2-1>および<2-2>に加え、本発明の生産方法に用いるのに好適なタバコ植物であるか否かの判定は、そのタバコ植物またはその一部を加熱処理し、加熱処理後のタバコ植物またはその一部が含有する遊離トレオニンの量を測定し、測定結果を確認することによって簡単に行うことができる。例えば、加熱処理した後のタバコ植物またはその一部が含有する遊離トレオニンの量が、対照の植物またはその一部を加熱処理した場合と比べて、有意に多いか否かを確認することによって好適なタバコ植物であるか否かが判定できる。

[0097] 有意に多いとは、好ましくは25%以上、より好ましくは50%以上、75%以上、100%以上多いことを意図とする。

[0098] 上述のトレオニン含量の測定のために行われる上記タバコ植物またはその一部の加熱処理は、例えば、タバコ植物から切り取った葉を所定の温度および湿度の条件下に、一定時間以上暴露することによって行うことができる。一例として、温度36～40および湿度80～90%の条件下に、24～48時間曝露する方法が挙げられる。

[0099] <本発明の生産方法に好適なタバコ植物を育成するための選抜方法>

一実施形態において、本発明の生産方法に用いられるのに好適なタバコ植物は、上述した(a)～(e)からなる群より選択される指標に基づいて選

抜を行うことを包含する選抜方法を経て育成されたタバコ植物であり得る。

[0100] 上述の通り、本発明の生産方法に用いるのに好適なタバコ植物であるか否かは、(a)トレオニンアルドラーゼの発現の低下または(b)トレオニンアルドラーゼの活性の低下を指標として判定することが可能である。

[0101] ここで、上記(a)トレオニンアルドラーゼの発現の低下または(b)トレオニンアルドラーゼの活性の低下は、本発明の生産方法に用いるのに好適なタバコ植物を育成する過程において行われる選抜の指標として用いてもよい。例えば、検定交雑(test cross)から得られた植物における(a)トレオニンアルドラーゼの発現の低下または(b)トレオニンアルドラーゼの活性の低下を指標とすることで、選抜を効果的に実施することも可能である。

(a)トレオニンアルドラーゼの発現の低下または(b)トレオニンアルドラーゼの低下を確認するための具体的な検査の手法は、上記の判定方法において記載した通りである。

[0102] さらに実施形態において、本発明の生産方法に用いるのに好適なタバコ植物は、(d)トレオニンアルドラーゼの変異対立遺伝子の有無、(e)上記(d)の変異対立遺伝子に連鎖するDNAマーカー、または(f)トレオニンアルドラーゼ遺伝子の発現を抑制するために導入された外因性のポリヌクレオチドの有無を指標とした選抜を経て育成されたものであり得る。つまり、本発明の生産方法に用いられるタバコ植物は、例えば、以下の1~3の何れかの手法によって実施される選抜を通して育成されたタバコ植物であり得る。

[0103] 1. トレオニンアルドラーゼの変異対立遺伝子の有無を指標とした選抜

トレオニンアルドラーゼ遺伝子における、該トレオニンアルドラーゼの発現の低下または活性の低下を生じさせる変異を検出する。該変異の一例は挿入、欠失、フレームシフト変異、ナンセンス変異、ノンストップ変異、およびスプライス部位変異からなる群より選択される突然変異である。該変異の検出には様々な方法が利用可能であるが、例えば、PCR-RFLP法またはリアルタイムPCRを利用した方法(Cycling Probe Method, TaqMan(登

録商標) SNP Genotyping Assays) などが好適に利用される。トレオニンアルドラーゼの遺伝子座の遺伝子型は、交配または選抜などによる一般的な育種プログラムにおける育種過程を通して、常にモニターすることが可能である。したがって、トレオニンアルドラーゼの発現または活性の低下したタバコの品種は、トレオニンアルドラーゼの変異対立遺伝子を利用した育種プログラムにおいて、変異対立遺伝子の変異そのものを指標とすることによって、容易に選抜し、育成することが可能である。

[0104] 2. トレオニンアルドラーゼの変異対立遺伝子の発現を抑制するために導入された外因性のポリヌクレオチドの有無を指標とした選抜

ある局面においては、トレオニンアルドラーゼの発現の低下は、トレオニンアルドラーゼ遺伝子の発現を抑制するために導入された外因性のポリヌクレオチドによるものが含まれる。そのような場合はトレオニンアルドラーゼ遺伝子の発現を抑制するために導入された外因性のポリヌクレオチドの有無を指標として利用することによって、該形質を有するタバコ植物を選抜および育成することができる。あるいは、該外因性ポリヌクレオチドと共に植物に導入されたコンストラクトの構成要素（プロモータ配列など）も選抜の指標として利用してもよい。

[0105] 3. 連鎖DNAマーカーを指標とした選抜

トレオニンアルドラーゼの発現または活性の低下と関連するトレオニンアルドラーゼの変異対立遺伝子の有無を、当該変異対立遺伝子に連鎖するDNAマーカーを利用して、検査することも可能である。上記の連鎖DNAマーカーは、一例において、トレオニンアルドラーゼ遺伝子が座乗する位置から約10cM以内に位置しており、好ましくは約5cM以内に位置しており、より好ましくは約2cM以内に位置しており、さらに好ましくは約1cM以内に位置している。

[0106] タバコ植物の選抜するにあたり、marker assisted selection (MAS) に利用可能な多型性の連鎖DNAマーカーとしては、SNP、RFLP、RAPD、AFLPおよびmicrosatellite等が挙げられる。

[0107] 以上のことから、本発明に係る生産方法に用いられるトレオニナルドラーゼの発現または活性が低下しているタバコ植物は、上記の判定方法を行って、本発明の生産方法に適用できるか否かあらかじめ判定されたものであってもよく、且つ／または上述のタバコ植物の選抜を経て育成されたタバコ品種の植物であってもよい。

[0108] (トレオニナルドラーゼの発現または活性の低下したタバコ植物の作出)

本発明に係るトレオニナルドラーゼの発現または活性が低下するよう改変されたタバコ植物は、以下に記載する方法で作出されたタバコ植物を含む。

[0109] ここで、トレオニナルドラーゼの発現または活性が低下しているタバコ植物の作出方法としては、トレオニナルドラーゼをコードする遺伝子の変異対立遺伝子を利用する方法および外因性のポリヌクレオチドを導入することによって遺伝子の発現を抑制する方法が挙げられる。

[0110] なお、上述のように、トレオニナルドラーゼの発現または活性の低下は、遺伝的な要因によって生じる遺伝形質であるので、本形質を有するタバコ植物は交配または選抜などによる一般的な育種プログラムの中で作出することが可能である。

[0111] 1. 変異対立遺伝子を利用する方法

トレオニナルドラーゼの発現または活性の低下に繋がるトレオニナルドラーゼをコードする遺伝子の変異対立遺伝子は、挿入、欠失、フレームシフト変異、ナンセンス変異、ノンストップ変異、およびスプライス部位変異からなる群より選択される突然変異を含むものである。

[0112] 上記突然変異は、通常、トレオニナルドラーゼタンパク質をコードするアミノ酸配列を変化させる変異を意図するが、トレオニナルドラーゼ遺伝子の転写活性を抑制させる変異であってもよい。そのような変異としては、例えば、転写調節配列（プロモータ配列またはエンハンサ配列など）における変異が挙げられる。

上記変異対立遺伝子は、変異原処理、ゲノム編集およびノックアウト法から選択されるいずれかの方法によって生じる人工突然変異を含むものであるか、天然に存在する自然突然変異を含むものである。変異原処理の具体例としては、EMS (ethyl methane sulfonate: エチルメタンスルホン酸) 処理、電磁波、紫外線、X線、 γ 線、粒子線、中性子線、 α 線および β 線などの各種放射線の照射、または重イオンビーム等の照射等の方法が挙げられる。

[0113] 変異原処理によってトレオニンアルドラーゼ遺伝子に変異が導入された植物は、例えば、TILLING (Till et al., 2003) またはAmplicon Sequence解析などの方法によって変異体集団の中から探索することができる。また、トレオニンアルドラーゼ遺伝子に自然突然変異を含むタバコ植物も同様の方法によってタバコの遺伝資源のコレクションの中から探索することができる。そのようなタバコ植物が保持するトレオニンアルドラーゼ遺伝子（ゲノムDNA、mRNAおよびcDNA等）の塩基配列を解析することによって、導入された変異の内容を明らかにすることができる。さらに、該変異対立遺伝子がトレオニンアルドラーゼの発現または活性の低下に有用であるか否かの推定に役立つ。

[0114] 例えば、EMS処理で得られたナンセンス変異遺伝子のポリヌクレオチドとして、本明細書の実施例において得られたタバコ由来の配列番号33、配列番号34および配列番号35で示される塩基配列を有するポリヌクレオチドが挙げられる。

[0115] ゲノム編集の具体例としては、TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nuclease) 法、ZFN (Zinc Finger Nuclease) 法およびCRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat) system (CRISPR/Cas9およびCRISPR/Cpf1など) 等のゲノム編集技術が挙げられる。例えば、CRISPR/Cas9を用いたゲノム編集で得られた1塩基挿入変異遺伝子のポリヌクレオチドとして、本明細書の実施例で得られたタバコ由来の配列番号49、配列番号50および配列番号51で示される塩基配列を有するポリヌクレオチドが挙げられる。

[0116] CRISPR/Cas9 systemでは、ゲノム上のXGGのすぐ上流にある塩基配列およびその相補的な配列が、ガイドRNAによって認識され、当該塩基配列内においてCas9によって切断を受ける。ガイドRNAによって認識される当該塩基配列は、例えば、配列番号1もしくは3に記載の塩基配列を有しているポリヌクレオチドに対して90%以上の配列同一性を有するポリヌクレオチド、または配列番号2もしくは4に示されるアミノ酸配列を有しているポリペプチドに対して90%以上の配列同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの一部のうち、XGGのすぐ上流にある連続する10塩基以上、好ましくは17塩基以上、より好ましくは20塩基以上である。

[0117] TALENでは、二量体を形成する人工ヌクレアーゼの一对のDNA結合ドメインのそれぞれは、FokI切断ドメインの両端に、5～7塩基のスペーサを介して存在する塩基配列と結合する。当該DNA結合ドメインは、33～34アミノ酸残基を繰り返し単位（モジュール）として、結合する塩基数とモジュールから構成されている。DNA結合ドメインによって結合される塩基配列は、配列番号1もしくは3に記載の塩基配列を有しているポリヌクレオチドに対して90%以上の配列同一性を有するポリヌクレオチド、または配列番号2もしくは4に示されるアミノ酸配列を有しているポリペプチドに対して90%以上の配列同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの一部のうち、FokI切断ドメインの両端に、5～7塩基のスペーサを介して存在する、それぞれ連続する6塩基以上、好ましくは10塩基以上、より好ましくは21塩基以上である。

[0118] ZFNでは、TALENと同様に、二量体を形成する人工ヌクレアーゼの一对のDNA結合ドメインのそれぞれは、FokI切断ドメインの両端に、5～7塩基のスペーサを介して存在する塩基配列と結合する。当該DNA結合ドメインは、複数のジンクフィンガーモジュールから構成されている。当該塩基配列は、配列番号1もしくは3に記載の塩基配列を有しているポリヌクレオチドに対して90%以上の配列同一性を有するポリヌクレオチド、ま

たは配列番号 2 もしくは 4 に示されるアミノ酸配列を有しているポリペプチドに対して 90%以上の配列同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの一部のうち、F o k I 切断ドメインの両端に、5～7 塩基のスペーサを介して存在する、それぞれ連続する 9 塩基以上、好ましくは 12 塩基以上、より好ましくは 18 塩基以上である。

[0119] また、ノックアウト法の具体例としては、レトロトランスポゾン等の各種トランスポゾン、もしくは T-DNA などを用いた遺伝子破壊法が挙げられる。当該手法の具体例は、タバコのレトロトランスポゾン t n t 1 もしくは他の植物におけるトランスポゾン、またはアグロバクテリウムの T1 プラスミドにおける T-DNA をタバコ植物体に導入する方法である。

[0120] 2. 外因性のポリヌクレオチドを導入することによって遺伝子の発現を抑制する方法

次に、外因性のポリヌクレオチドを導入することによってトレオニンアルドラーゼ遺伝子の発現を抑制したタバコ植物の作出方法について説明する。

[0121] 外因性ポリヌクレオチドは、トレオニンアルドラーゼ遺伝子の発現を抑制するポリヌクレオチドであり得る。例えば、当該ポリヌクレオチドを含むコンストラクトを植物に導入することによって作出する。かかるコンストラクトは、例えば、遺伝子の発現を抑制するポリヌクレオチドを含む発現カセットを備えたベクター等である。

[0122] 外因性のポリヌクレオチドを植物に導入することによって内在性のトレオニンアルドラーゼ遺伝子の発現を抑制する手法としては、例えば、RNA 干渉法、またはアンチセンス RNA 法、共抑制法、キャリア（抗体またはペプチド等）と核酸との複合体を利用する方法、核酸キャリア（生体内シグナルペプチド等の機能性ペプチド等）を用いた細胞への核酸の導入方法およびデコイ核酸による転写制御因子の阻害等の手法が挙げられる。つまり、上記遺伝子の発現を抑制するポリヌクレオチドは、これらの手法において用いられるヌクレオチド分子であってアンチセンス RNA 分子、RNA i 分子および共抑制因子分子からなる群より選択される分子であることが好ましい。

- [0123] ここで、アンチセンス法とは、目的遺伝子から転写された mRNA と相補的なアンチセンス RNA を発現させて、該アンチセンス RNA を目的遺伝子と相補的に結合させ、目的タンパク質の翻訳を妨げ、その結果として該遺伝子の発現を抑制する方法をいう。具体的には、植物で機能するプロモータの下流に、トレオニンアルドラーゼ遺伝子に係るポリヌクレオチド、またはそれらの断片をアンチセンス方向につないで植物細胞または組織に導入すると、上記 mRNA と相補的なアンチセンス RNA を産生することができる。
- [0124] RNA 干渉法とは、以下の機序で標的 RNA を分解させる現象を利用して目的の遺伝子の発現を抑制する方法をいう。まず、dsRNA（2本鎖 RNA、double-strand RNA）の鋳型となる DNA を含むベクターを用いることによって細胞内で dsRNA を形成させる。次に、当該 dsRNA を 2 本鎖 RNA 特異的な RNase（Dicer）により切断して siRNA（small interfering RNA）を生成させる。その後、siRNA を、RISC（RNA-induced silencing complex）の一部として複合体を形成させ、最終的に RISC によって相同性により標的 mRNA を認識させ、分解させる。
- [0125] RNA 干渉に用いるベクターとしては、RNAi を引き起こす dsRNA をヘアピン型 dsRNA として発現するベクターが好ましい。dsRNA を発現する RNAi ベクターは、イントロンなどの数塩基以上のスペーサ配列の両端に IR（inverted repeat：逆位反復）となるように、dsRNA 形成部分に対応した DNA を配置することによって構築されるヘアピン型の RNAi ベクターを用いることができる。なお、ベクターの構成の詳細については後述する。
- [0126] また、RNAi ベクターは別々のプロモータによってセンス RNA およびアンチセンス RNA それぞれが転写され、これらが細胞内でハイブリダイズして dsRNA を産生する、タンデム型であってもよい。あるいは、センス RNA とアンチセンス RNA がそれぞれ転写されるような複数の発現ベクターを構築して、RNAi を引き起こしてもよい。

[0127] 共抑制法とは、植物に標的となる内在性遺伝子と同一もしくは類似した配列を有する遺伝子を形質転換により導入すると、導入した外来遺伝子および標的となる内在性遺伝子の発現がいずれも抑制される現象のことを指す。例えば、トレオニンアルドラーゼ遺伝子が共抑制された植物体を得るためには、当該遺伝子、または、これらと類似した配列を有するDNAを発現できるように作製したベクターを使用して目的の植物を形質転換すればよい。

[0128] これらの遺伝子の発現を抑制するポリヌクレオチドは、当該ポリヌクレオチドを含む組換え発現ベクターによって植物へ導入される。これらの遺伝子の発現を抑制するためのポリヌクレオチドを含む組換え発現ベクターを植物へ導入する方法は特に限定されず、ポリエチレングリコール法、電気穿孔法（エレクトロポレーション法）、アグロバクテリウムを介する方法、またはパーティクルガン法等を適宜用いればよい。なお、このポリヌクレオチドを含む組換え発現ベクターは、植物細胞、カルス、植物組織、または植物個体に対して導入すればよい。

[0129] また、トレオニンアルドラーゼ遺伝子の発現の抑制のために導入する外因性ポリヌクレオチドは、内在性のトレオニンアルドラーゼ遺伝子のプロモータ配列またはエンハンサ配列領域の配列を含むものであってもよい。

[0130] <組換え発現ベクターおよび形質転換体>

本発明に係るタバコ植物に適用される組換え発現ベクターおよび本発明に係る外因性のポリヌクレオチドが発現可能に導入された形質転換体について以下に説明する。

[0131] 組換え発現ベクターを構成するためのベクターの種類は特に限定されるものではなく、宿主細胞中で発現可能なものを適宜選択すればよい。すなわち、宿主細胞の種類に応じて、適宜プロモータ配列を選択し、当該プロモータ配列と本発明に係るトレオニンアルドラーゼ遺伝子に係るポリヌクレオチドとを、例えば、プラスミド、ファージミド、またはコスミド等に組み込んだものを組換え発現ベクターとして用いればよい。

[0132] 上記組換え発現ベクターは、好ましくは発現抑制ベクターである。組換え

発現ベクターにおいて本発明に係るポリヌクレオチドは、転写に必要な要素（例えば、プロモータなど）が機能的に連結されている。また、必要に応じて、エンハンサ、選択マーカー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナルおよび5' - UTR配列などを連結されていてもよい。プロモータは宿主細胞において転写活性を示すDNA配列であり、宿主の種類に応じて適宜選択することができる。

[0133] 宿主細胞内で作動可能なプロモータ配列としては、カリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモータ、アグロバクテリウムのノパリン合成遺伝子プロモータおよびトウモロコシ由来のユビキチン遺伝子プロモータ、イネ由来のアクチン遺伝子プロモータなどが挙げられる。宿主細胞内で作動可能なプロモータ配列として、さらには、老化誘導されるシロイヌナズナのSAG12遺伝子のプロモータ (Ori et al., The Plant Cell 11.6 : 1073-1080 (1999)、国際特許公開公報第W0 2010/018234 A1号)、熱誘導性のシロイヌナズナのHSP18.2遺伝子のプロモータ (Yoshida, K., et al., Applied microbiology and biotechnology 44.3-4 466-472 (1995))が挙げられる。

[0134] また、上記の本発明に係るプロモータとしては、本発明に係る内在性のトレオニナルドラゼ遺伝子におけるプロモータ領域の配列を用いてもよい。

[0135] 組換え発現ベクターおよび形質転換体の作製は、例えば単離されたトレオニナルドラゼ遺伝子のポリヌクレオチドを用いて行われる。トレオニナルドラゼ遺伝子に係るポリヌクレオチドを取得する（単離する）方法は、特に限定されるものではないが、例えば、上記トレオニナルドラゼ遺伝子の塩基配列の一部と特異的にハイブリダイズするプローブを調製し、ゲノムDNAライブラリーまたはcDNAライブラリーをスクリーニングすればよい。

[0136] また、トレオニナルドラゼ遺伝子に係るポリヌクレオチドを取得する方法として、PCR等の増幅手段を用いる方法を挙げることができる。例えば、当該トレオニナルドラゼ遺伝子のcDNAのうち、5'側および3

’側の配列（またはその相補配列）の中からそれぞれプライマーを調製し、これらプライマーを用いてゲノムDNA（またはcDNA）等を鋳型にしてPCR等を行い、両プライマー間に挟まれるDNA領域を増幅することで、トレオニンアルドラーゼ遺伝子に係るポリヌクレオチドを含むDNA断片を大量に取得できる。

[0137] 組換え発現ベクターにおいて、本発明に係るポリヌクレオチドは、必要に応じて、適切なターミネータに結合させてもよい。例えば、ノパリン合成酵素（NOS）遺伝子のターミネータおよびCaMV35S RNA遺伝子のターミネータに機能的に結合されていてもよい。ターミネータの種類は、宿主細胞の種類に応じて適宜選択すればよい。

[0138] また、エンハンサは、目的遺伝子の発現効率を高めるために用いられ、例えばCaMV35Sプロモータ内の上流側の配列を含むエンハンサ領域およびタバコモザイクウイルスのオメガ配列が挙げられる。

[0139] 本発明に係る組換え発現ベクターはさらに選択マーカ含有してもよい。選択マーカとしては、例えば、アンピシリン、カナマイシン、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、ネオマイシン、ハイグロマイシンまたはスペクチノマイシンのような薬剤耐性遺伝子を挙げることができる。

[0140] レポーター遺伝子としては、遺伝子の発現によって植物細胞が形質転換されたか否かを確認することができるものであればよく、例えば、 β -グルクロニダーゼ（GUS）、ルシフェラーゼ（LUC）、緑色蛍光タンパク質（GFP）およびシアン蛍光タンパク質（CFP）などの蛍光タンパク質、ならびにベータガラクトシダーゼ（LacZ）などが挙げられる。

[0141] なお、レポーター遺伝子を含む発現カセットと目的遺伝子とをそれぞれ別々の組換え発現ベクター上に配置してもよい。別々に配置した場合は、各ベクターを宿主に共導入（コトランスフェクト）すればよい。

[0142] また、組換え発現ベクターにおいて本発明に係るポリヌクレオチドは、必要に応じて、好適なスペーサー配列に結合されていてもよい。また、組換え発現ベクターの一例として、温度感受性のプロモータ下に本発明に係る遺伝

子を結合させた構造を有するもの等が挙げられる。

[0143] 本発明に係るタバコ植物に適用されるベクターは、遺伝子発現抑制用ベクターであり得る。遺伝子発現抑制用ベクターは、(遺伝子)の項目に記載した遺伝子の発現を抑制するためのポリヌクレオチドを好適なベクターに挿入したものである。

[0144] タバコ植物の形質転換に用いられる組換えベクターのうち、発現抑制ベクターは、植物細胞内における内在性の遺伝子の発現を抑制するためのベクターであり、形質転換植物体を作成するために使用され得るベクターである。係るベクターは、例えば、配列番号1に記載の塩基配列を有するポリヌクレオチドおよび配列番号3に記載の塩基配列を有するポリヌクレオチドの少なくとも何れかの配列に対して、好ましくは90%以上、より好ましくは91%以上、さらに好ましくは92%以上、さらにより好ましくは93%以上、さらにより好ましくは94%以上、さらにより好ましくは95%以上、さらにより好ましくは96%以上、さらにより好ましくは97%以上、特に好ましくは98%以上、最も好ましくは99%以上の配列同一性を有する塩基配列からなる群より選択される塩基配列を有するポリヌクレオチドを含む。このようなベクターとして、RNA干渉誘導ベクター、アンチセンスベクターまたは共抑制用ベクターなどが挙げられる。

[0145] RNA干渉誘導ベクターは、RNA干渉のトリガーとなるdsRNA(2本鎖RNA、double-strand RNA)の鋳型となるDNAを含むベクターである。RNA干渉のトリガーとなる2本鎖RNAを形成する部分に対応するポリヌクレオチドは、内在性のトレオニンアルドラーゼ遺伝子の発現を抑制するためのポリヌクレオチドであり、配列番号1に記載の塩基配列を有するポリヌクレオチドもしくは配列番号3に記載の塩基配列を有するポリヌクレオチド、または配列番号1に記載の塩基配列を有するポリヌクレオチドもしくは配列番号3に記載の塩基配列を有するポリヌクレオチドに対して、好ましくは90%以上、より好ましくは91%以上、さらに好ましくは92%以上、さらにより好ましくは93%以上、さらにより好ましく

は 94%以上、さらにより好ましくは 95%以上、さらにより好ましくは 96%以上、さらにより好ましくは 97%以上、特に好ましくは 98%以上、最も好ましくは 99%以上の配列同一性を有する塩基配列を有するポリヌクレオチドにおける、連続する少なくとも 21～30 塩基（例えば、21 塩基以上、22 塩基以上、23 塩基以上、24 塩基以上、25 塩基以上、26 塩基以上、27 塩基以上、28 塩基以上、29 塩基以上、および 30 塩基以上）の塩基配列に示されるポリヌクレオチド（センス RNA 部分）、ならびに当該ポリヌクレオチドと相補的な塩基配列に示されるポリヌクレオチド（アンチセンス RNA 部分）である。上述の「連続する少なくとも 21～30 塩基」の塩基配列は、より詳細には、連続する 21 塩基以上、23 塩基以上、25 塩基以上、30 塩基以上、35 塩基以上、40 塩基以上、45 塩基以上、50 塩基以上、60 塩基以上、70 塩基以上、80 塩基以上、90 塩基以上、または 100 塩基以上の塩基配列を意味する。

[0146] RNA 干渉誘導ベクターの例として、老化誘導プロモータまたは温度感受性プロモータ下に上述の RNA 干渉のトリガーの鋳型となる DNA の配列を結合させた構造を有するもの等が挙げられる。

[0147] アンチセンスベクターは、アンチセンス法によって、トレオニンアルドラーゼ遺伝子の発現を抑制するポリヌクレオチドを含むベクターである。アンチセンスベクターに導入する内在性のトレオニンアルドラーゼ遺伝子の発現を抑制するためのポリヌクレオチド分子は、配列番号 1 に記載の塩基配列を有するポリヌクレオチドもしくは配列番号 3 に記載の塩基配列を有するポリヌクレオチド、または配列番号 1 に記載の塩基配列を有するポリヌクレオチドおよび配列番号 3 に記載の塩基配列を有するポリヌクレオチドの少なくとも何れかに対して、好ましくは 90%以上、より好ましくは 91%以上、さらに好ましくは 92%以上、さらにより好ましくは 93%以上、さらにより好ましくは 94%以上、さらにより好ましくは 95%以上、さらにより好ましくは 96%以上、さらにより好ましくは 97%以上、特に好ましくは 98%以上、最も好ましくは 99%以上の配列同一性を有する塩基配列の一部の

塩基配列を有するアンチセンスヌクレオチド分子であってもよく、例えば、連続した15塩基以上から全長未満、20塩基以上から全長未満、好ましくは100塩基以上から全長未満、より好ましくは500塩基以上から全長未満からなる塩基配列を有するアンチセンスヌクレオチド分子であってもよい。

[0148] また、共抑制ベクターは、共抑制法によって、トレオニンアルドラーゼ遺伝子の発現を抑制する共抑制因子分子を含むベクターである。共抑制に用いるヌクレオチド分子は内在性のトレオニンアルドラーゼ遺伝子の発現を抑制するためのポリヌクレオチドであり、配列番号1に記載の塩基配列を有するポリヌクレオチドもしくは配列番号3に記載の塩基配列を有するポリヌクレオチド、または配列番号1に記載の塩基配列を有するポリヌクレオチドもしくは配列番号3に記載の塩基配列を有するポリヌクレオチドに対して、好ましくは90%以上、より好ましくは91%以上、さらに好ましくは92%以上、さらにより好ましくは93%以上、さらにより好ましくは94%以上、さらにより好ましくは95%以上、さらにより好ましくは96%以上、さらにより好ましくは97%以上、特に好ましくは98%以上、最も好ましくは99%以上の配列同一性を有する塩基配列を有するポリヌクレオチドにおける、例えば連続した50塩基であり、好ましくは100塩基であり、さらに好ましくは500塩基である。または、共抑制に用いるヌクレオチド分子は、例えば上記塩基配列中の連続した50塩基以上から全長未満、好ましくは100塩基以上から全長未満、より好ましくは500塩基以上から全長未満からなる塩基配列を有するヌクレオチドであってもよい。

[0149] また、形質転換体は、上記の組換え発現ベクターまたはトレオニンアルドラーゼ遺伝子に係るポリヌクレオチドが発現可能に導入された植物体、植物細胞、植物組織片および植物器官等であり得る。

[0150] トレオニンアルドラーゼの発現の低下が当該遺伝子の発現を抑制するために導入された外因性のポリヌクレオチドによるものである場合、該タバコ植物は導入されたポリヌクレオチド配列についてホモ接合体であることが望ま

しいが、ヘミ接合体であってもよい。

[0151] (乾燥 (c u r i n g) 工程)

本発明の一実施形態に係る乾燥たばこ材料の生産方法は、タバコ植物またはその一部の乾燥工程を包含している。

[0152] 本明細書におけるタバコ植物またはその一部の乾燥 (c u r i n g) は、植物中の水分を脱水するのみならず、植物の内容成分の変化を促進することを意図する。

[0153] 本明細書におけるトレオニン含量の増強された乾燥たばこ材料を生産するための乾燥法としては、特に限定されず、一般に実施されるタバコ葉の乾燥 (c u r i n g) 方法、またはその範疇である方法でよい。当該タバコ葉の乾燥 (c u r i n g) 方法としては熱風乾燥、空気乾燥、火力乾燥および日干し乾燥ならびにこれらの乾燥法の組み合わせが含まれるがこれらに限定されない。一実施形態では、乾燥は、熱風乾燥、空気乾燥、火力乾燥および日干し乾燥からなる群より選択される乾燥方法によって行われる。一般的に、タバコ葉の乾燥法は通常はタバコのタイプによって決まっており、例えばバージニアタバコは熱風乾燥され (flue-cured)、バーレータバコは空気乾燥され、オリエントタバコは日干し乾燥される。

[0154] タバコ植物またはその一部の乾燥 (c u r i n g) を実施するための設備または装置としては、特に限定されず、例えば、乾燥が熱風乾燥によって行われる場合、温度と湿度とを制御できる空間または設備が一般に利用される。また、乾燥が空気乾燥によって行われる場合、採取したタバコ植物またはその一部の乾燥を雨および直射日光等を避けて進行させることができる、小屋などの施設が一般に利用される。

[0155] また、タバコ植物またはその一部の乾燥のための乾燥プログラムは、ステージ、成熟度、器官など、乾燥させるタバコ植物またはその一部の状態に応じて適宜設定を変更することできる。また、タバコ植物の葉を乾燥する場合は、例えば一般に実施される熱風乾燥において用いられる乾燥プログラムを用いてもよい。当該乾燥プログラムとしては、実施例の図7に示されている

ものが例示される。

[0156] さらに、ある種の加熱処理は採取したタバコ植物またはその一部のトレオニン含量を増強することができる。葉中のタンパク質は熱ストレスを加えられた条件下においてHeat-induced leaf senescenceと呼ばれる機構によって分解が促進される。このような熱ストレスによって生じたタンパク質分解産物は直接的、または間接的にタバコ植物またはその一部のトレオニン含量の増強に貢献する。特にタバコ植物が内在性のトレオニンアルドラーゼの発現または活性が低下するよう改変されたタバコ植物である場合、上記加熱処理によるトレオニン含量の増強は対照植物を加熱処理した場合と比較して顕著である。また、一般的に実施される方法で乾燥（c u r i n g）処理されるタバコ葉は通常は上記熱ストレスに晒される。上記トレオニン含量を増強するための加熱処理の条件（温度、時間など）は、例えば、タンパク質の分解を指標に決定してもよい。タンパク質はB r a d f o r d法またはB C A法（ビシンコニン酸法）などの方法を用いて定量することができる。総タンパク質量の10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、または60%以上が分解されたことを指標に温度および時間を決定してもよい。また、Heat-induced leaf senescenceはクロロフィルの分解も促進するため、上記加熱処理の条件は葉のクロロフィル分解を指標に決定することもできる。クロロフィルはクロロフィルメーター等を用いて容易に測定することができる。一例として、総クロロフィル量の5%以上、10%以上、15%以上または20%以上が分解されたことを指標に温度および時間を決定する方法が挙げられる。

[0157] 上記加熱処理の具体的な条件は、例えば、摂氏38℃程度の湿潤な雰囲気の中に12時間以上晒すことである。タンパク質の分解は処理の温度および時間の影響を受けるため、これらは適宜調整する必要がある。上記加熱処理において、当該タバコ植物またはその一部をさらすための温度は、好ましくは25℃以上60℃以下の範囲であり、より好ましくは、以下の各範囲から選択される温度である。

[0158] 28℃~60℃、30℃~60℃、32℃~60℃、34℃~60℃、36℃~60℃、38℃~60℃、40℃~60℃、42℃~60℃、44℃~60℃、46℃~60℃、48℃~60℃、50℃~60℃、52℃~60℃、54℃~60℃、56℃~60℃、

28℃~58℃、30℃~58℃、32℃~58℃、34℃~58℃、36℃~58℃、38℃~58℃、40℃~58℃、42℃~58℃、44℃~58℃、46℃~58℃、48℃~58℃、50℃~58℃、52℃~58℃、54℃~58℃、

28℃~56℃、30℃~56℃、32℃~56℃、34℃~56℃、36℃~56℃、38℃~56℃、40℃~56℃、42℃~56℃、44℃~56℃、46℃~56℃、48℃~56℃、50℃~56℃、52℃~56℃、

28℃~54℃、30℃~54℃、32℃~54℃、34℃~54℃、36℃~54℃、38℃~54℃、40℃~54℃、42℃~54℃、44℃~54℃、46℃~54℃、48℃~54℃、50℃~54℃、

28℃~52℃、30℃~52℃、32℃~52℃、34℃~52℃、36℃~52℃、38℃~52℃、40℃~52℃、42℃~52℃、44℃~52℃、46℃~52℃、48℃~52℃、

28℃~50℃、30℃~50℃、32℃~50℃、34℃~50℃、36℃~50℃、38℃~50℃、40℃~50℃、42℃~50℃、44℃~50℃、46℃~50℃、

28℃~48℃、30℃~48℃、32℃~48℃、34℃~48℃、36℃~48℃、38℃~48℃、40℃~48℃、42℃~48℃、44℃~48℃、

28℃~46℃、30℃~46℃、32℃~46℃、34℃~46℃、36℃~46℃、38℃~46℃、40℃~46℃、42℃~46℃、28℃~44℃、30℃~44℃、32℃~44℃、34℃~44℃、36℃~44℃、38℃~44℃、40℃~44℃、

28℃～42℃、30℃～42℃、32℃～42℃、34℃～42℃、36℃～42℃、38℃～42℃、

28℃～40℃、30℃～40℃、32℃～40℃、34℃～40℃、36℃～40℃、

28℃～38℃、30℃～38℃、32℃～38℃、34℃～38℃、

28℃～36℃、30℃～36℃、32℃～36℃、

28℃～34℃、30℃～34℃または28℃～32℃。

[0159] また、上記加熱処理において当該植物またはその一部を曝露するための期間は、好ましくは2時間～96時間の範囲であり、より好ましくは、以下の範囲から選択される時間である。

[0160] 2時間～96時間、4時間～96時間、8時間～96時間、12時間～96時間、16時間～96時間、24時間～96時間、36時間～96時間、48時間～96時間、72時間～96時間、

2時間～72時間、4時間～72時間、8時間～72時間、12時間～72時間、16時間～72時間、24時間～72時間、36時間～72時間、48時間～72時間、

2時間～48時間、4時間～48時間、8時間～48時間、12時間～48時間、16時間～48時間、24時間～48時間、36時間～48時間、

2時間～36時間、4時間～36時間、8時間～36時間、12時間～36時間、16時間～36時間、24時間～36時間、

2時間～24時間、4時間～24時間、8時間～24時間、12時間～24時間、16時間～24時間、

2時間～16時間、4時間～16時間、8時間～16時間、12時間～16時間、

2時間～12時間、4時間～12時間、8時間～12時間、

2時間～8時間、4時間～8時間または

2時間～4時間。

[0161] 上記加熱処理における湿度は、特に限定されないが、例えば乾燥装置を用

いる場合は、乾燥装置内部の湿度は好ましくは60～95%であり、より好ましくは70～90%である。

[0162] タバコ植物またはその一部のトレオニン含量は上記加熱処理によって増強されるが、通常は、この処理だけでは乾燥（c u r i n g）は完了しない。一般には、残っている水分の大半を除去し、内容成分の変化を停止させて、乾燥（c u r i n g）を完了させる必要がある。したがって、上記加熱処理は一実施形態として水分除去を主眼に置いた別の乾燥法（ドライイング）と組み合わせて実施されてもよい。あるいは、上記加熱処理は一般的に実施されるタバコ葉の乾燥方法と組み合わせてもよい。たとえば既存の乾燥プログラムの初期過程に挿入されて、実施されてもよい。

[0163] 本明細書において記載する乾燥処理のための温度は、乾燥工程中の乾燥環境内（例えば乾燥小屋または乾燥装置内）の平均気温を示す。平均気温は、乾燥小屋または乾燥装置内の1点以上または1箇所以上において測定されるものであり得る。

[0164] また、上記加熱処理において、加熱の温度を時間経過とともに段階的に昇温してもよい。また、一つの加熱処理のためのプログラムにおいて、一定期間の昇温と一定期間の降温とを任意の回数で含んでもよい。また、上記加熱は連続して行っても断続的に行ってもよい。すなわち、加熱期間と加熱期間との間に一定の加熱休止期間を設けてもよい。

[0165] 上記加熱処理は、燃料等を燃焼させることによって実施されてもよく、太陽光等の熱または電気を利用しで実施されてもよい。また、簡易なビニールハウス等の閉鎖系施設を用いてもよい。また、熱風を用いてもよい。

[0166] 上記加熱処理は、タバコ植物またはその一部を、ある温度の環境にある期間曝露する段階、を包含しているものであり得る。

[0167] 一例において、本発明に係る生産方法に用いられるタバコ植物またはその一部は、上述の乾燥工程を経ることによって初めてスレオニン含量が増大するものである。

[0168] （生産方法に適用可能なタバコ植物の種類）

本発明に係る生産方法はタバコ (*Nicotiana*) 属の植物であるタバコ植物に適用することができる。タバコ植物としては、タバコ (*Nicotiana*) 属に属する植物であれば特に限定されないが、例えば、ニコチアナ トメントシフォルミス (*Nicotiana tomentosiformis*)、ニコチアナ シルベストリス (*Nicotiana sylvestris*)、ニコチアナ ルスティカ (*Nicotiana rustica*) (マルバタバコ)、ニコチアナ タバカム (*Nicotiana tabacum*)、ニコチアナ プルムバギニフォリア (*Nicotiana plumbaginifolia*)、ニコチアナ アラタ (*Nicotiana alata*) (ハナタバコ) (*Nicotiana alata*)、ニコチアナ アカウリス (*Nicotiana acaulis*)、ニコチアナ アカミナタ (*Nicotiana acuminata*)、ニコチアナ アカミナタ ヴァリエーション ムルツユロラ (*Nicotiana acuminata* var. *multijlora*)、ニコチアナ アフリカナ (*Nicotiana africana*)、ニコチアナ アンプレクシカウリス (*Nicotiana amplexicaulis*)、ニコチアナ アレンツィイ (*Nicotiana arentsii*)、ニコチアナ アテヌアタ (*Nicotiana attenuata*)、ニコチアナ ベナビデシイ (*Nicotiana benavidesii*)、ニコチアナ ベンサミアナ (*Nicotiana benthamiana*)、ニコチアナ ビゲロビイ (*Nicotiana bigelovii*)、ニコチアナ ボナリエンシス (*Nicotiana bonariensis*)、ニコチアナ カビコラ (*Nicotiana cavicola*)、ニコチアナ クレベランディイ (*Nicotiana clevelandii*)、ニコチアナ コルディフォリア (*Nicotiana cordifolia*)、ニコチアナ コリンボサ (*Nicotiana corymbosa*)、ニコチアナ デブネイ (*Nicotiana debneyi*)、ニコチアナ エクセルシオール (*Nicotiana excelsior*)、ニコチアナ フォゲッチアナ (*Nicotiana forgetiana*)、ニコチアナ フラグランサ (*Nicotiana fragrans*)、ニコチアナ グラウカ (*Nicotiana glauca*)、ニコチアナ グルチノサ (*Nicotiana glutinosa*)、ニコチアナ グッドスピーディイ (*Nicotiana goodspeedii*)、ニコチアナ ゴセイ (*Nicotiana gossei*)、ニコチアナ ハイブリッド (*Nicotiana hybrid*)、ニコチアナ イングルバ (*Nicotiana ingulba*)、ニコチアナ カワカミイ (*Nicotiana kawakamii*)、ニコチアナ ナイチアナ (*Nicotiana knightiana*)、ニコチアナ ラングスドルフィ (*Nicotiana langsdorfi*)、ニコチアナ リニア

リス (*Nicotiana linearis*)、ニコチアナ ロンギフロラ (*Nicotiana longiflora*)、ニコチアナ マリチマ (*Nicotiana maritima*)、ニコチアナ メガロシフォン (*Nicotiana megalosiphon*)、ニコチアナ ミエルシイ (*Nicotiana miersii*)、ニコチアナ ノクチフロラ (*Nicotiana noctiflora*)、ニコチアナ ヌディカウリス (*Nicotiana nudicaulis*)、ニコチアナ オブツシフォリア (*Nicotiana obtusifolia*)、ニコチアナ オクシデンタリス (*Nicotiana occidentalis*)、ニコチアナ オクシデンタリス サブスピーシーズ ヘスペリス (*Nicotiana occidentalis* subsp. *Hesperis*)、ニコチアナ オトフォラ (*Nicotiana otophora*)、ニコチアナ パニクラタ (*Nicotiana paniculata*)、ニコチアナ パウクツユロラ (*Nicotiana pauciflora*)、ニコチアナ ペチュニオイデス (*Nicotiana petunioides*)、ニコチアナ プランバギニフォリア (*Nicotiana plumbaginifolia*)、ニコチアナ クアドリヴァルヴィス (*Nicotiana quadrivalvis*)、ニコチアナ レイモンディイ (*Nicotiana raimondii*)、ニコチアナ レパンダ (*Nicotiana repanda*)、ニコチアナ ロズラタ (*Nicotiana rosulata*)、ニコチアナ ロズラタ サブスピーシーズ イングルバ (*Nicotiana rosulata* subsp. *Ingulba*)、ニコチアナ ロツンディフォリア (*Nicotiana rotundifolia*)、ニコチアナ セツチェルリイ (*Nicotiana setchellii*)、ニコチアナ シムランス (*Nicotiana simulans*)、ニコチアナ ソラニフォリア (*Nicotiana solanifolia*)、ニコチアナ スペガウイニイ (*Nicotiana spegauinii*)、ニコチアナ ストックトニイ (*Nicotiana stocktonii*)、ニコチアナ スアヴェオレンス (*Nicotiana suaveolens*)、ニコチアナ チルシフロラ (*Nicotiana thyrsoflora*)、ニコチアナ トメントサ (*Nicotiana tomentosa*)、ニコチアナ トリゴノフィラ (*Nicotiana trigonophylla*)、ニコチアナ アンブラティカ (*Nicotiana umbratica*)、ニコチアナ アンドゥラタ (*Nicotiana undulata*)、ニコチアナ ベルンチナ (*Nicotiana velutina*)、およびニコチアナウィガンディオイデス (*Nicotiana wigandioides*) などが挙げられる。また品種については、黄色種（バージニア種）、バーレー種、葉巻種、オリエント種、および各地の気候風土に適応し分化した在来種の各

品種を含む。一実施形態では、本発明に係る生産方法には、ニコチアナ タバカムおよびニコチアナ ルスティカからなる群より選択されるタバコ属植物が用いられる。

[0169] 〔２．乾燥たばこ材料〕

また、本発明は、上記の生産方法により生産された、乾燥たばこ材料も提供する。上記のように、本明細書において、「乾燥たばこ材料」とは、採取されたタバコ植物またはその一部を乾燥させたものを包含するものである。

[0170] 本発明の生産方法により生産された乾燥たばこ材料は、任意のたばこ製品の製造用途、たとえば、電子たばこ（e-cigarettes）、非燃焼型加熱式たばこ（heat-not-burn tobacco）、紙巻きたばこ、葉巻およびパイプたばこなどの喫煙製品、ならびに嗅ぎたばこ、噛みたばこなどのスモークレスたばこ製品の製造用途に用いることができる。

[0171] 本発明の生産方法により生産された乾燥たばこ材料は、特に限定されるものではないが、スチーム、ロースト、膨化など、含有する成分や物理的性質の変化を伴う更なる加工処理が加えられた上で、上記製品の製造に使用され得る。さらに、別の実施形態として、本発明の生産方法により生産された乾燥たばこ材料は、特に限定されるものではないが、刻みたばこ、顆粒状形態、微粉末形態または液体（抽出物含有物）などの形態に加工された上で上記製品の製造に使用され得る。

[0172] 〔３．抽出物〕

本発明に係る乾燥たばこ材料から調製された抽出物は本発明の範疇である。当該抽出物は、乾燥たばこ材料から１つ以上の成分を抽出する抽出工程を含む調製方法によって調製されたものであり得る。

[0173] 抽出物の調製は、例えば、本発明の生産方法により生産された乾燥たばこ材料に、水性溶媒などの好適な溶媒を添加して、溶媒可溶化成分と乾燥たばこ材料残渣とに分離することによって行われる。特に限定されるものではないが、抽出物の調整に供せられる乾燥たばこ材料はスチーム、ローストまたは膨化など、含有する成分や物理的性質の変化を伴う更なる加工処理が加え

られていてもよい。また、得られた抽出物に対し、目的に応じて、不要な成分の除去、または目的の成分を濃縮するために、カラム精製またはフィルター過等を行ってもよい。また、凍結乾燥または減圧蒸留法等による濃縮を行ってもよい。また、必要に応じて抽出物は乾燥させてもよい。係る工程を経て調製された抽出物は、乾燥たばこ材料から不要の成分を除去したものである、または所望の成分のみを含むものであり得る。そのため、種々の製品の生産に用いることができる。一例として、抽出物の調製方法は、上述の生産方法によって得た乾燥たばこ材料に、水等の水性溶媒を添加し、水溶性たばこ抽出物と、乾燥たばこ材料残渣とに分離する工程を含む。たばこ抽出物からたばこ製品を生産する場合、不要成分除去等を行った抽出物と残渣とを、再度混合および乾燥したものを、たばこ製品の製造に用いることができる。

[0174] 〔４．たばこ製品〕

本発明は、本発明の生産方法により生産された乾燥たばこ材料および／または当該乾燥たばこ材料から調製した抽出物を原料として用いて製造されたたばこ製品も提供する。たばこ製品は、上述の乾燥たばこ材料、更に加工処理の加えられた乾燥たばこ材料、または抽出物を用いて製造されるものである。上述の乾燥たばこ材料、さらに加工された乾燥たばこ材料または抽出物は、たばこ製品中のたばこ材料の全体として使用されてもよいし、たばこ製品中のたばこ材料の一部として使用されてもよい。あるいは、本発明の方法により生産された乾燥たばこ材料から粉末、液体などの形態にさらに加工された材料はたばこ製品中の他のたばこ材料に添加されて使用されてもよい。本発明により得られる乾燥たばこ材料は、たばこ製品中のたばこ材料の一部として使用される場合、任意の割合で使用することができる。

[0175] たばこ製品には、乾燥たばこ材料の他に、風味料、フィラー、バインダー、pH調整剤、緩衝剤、着色剤、崩壊補助剤、抗酸化剤、保湿剤および保存料等の他の成分を含み得る。

[0176] 以上のように本発明によれば、広範なたばこ製品を製造するための原料と

して使用され得る、トレオニン含量の増強された乾燥たばこ材料を生産することができる。

[0177] 〔 5. 本発明に係る具体的な態様の例示〕

本発明は以下の< 1 >～< 18 >の何れかを包含する。

< 1 > トレオニン含量の増強された乾燥たばこ材料の生産方法であって、
 内在性のトレオニンアルドラーゼの発現または活性が低下するよう改変されたタバコ植物またはその一部から、該乾燥たばこ材料を生産することを含み、

 該トレオニンアルドラーゼは、以下の（a）および（b）の少なくとも何れかである、生産方法：

 （a）配列番号 1 に記載の塩基配列を有するポリヌクレオチドに対して 90%以上の配列同一性を有するポリヌクレオチドを含む遺伝子によってコードされるポリペプチドからなるトレオニンアルドラーゼ

 （b）配列番号 3 に記載の塩基配列を有するポリヌクレオチドに対して 90%以上の配列同一性を有するポリヌクレオチドを含む遺伝子によってコードされるポリペプチドからなるトレオニンアルドラーゼ。

< 2 > トレオニン含量の増強された乾燥たばこ材料の生産方法であって、
 内在性のトレオニンアルドラーゼの発現または活性が低下するよう改変されたタバコ植物またはその一部から、該乾燥たばこ材料を生産することを含み、

 該トレオニンアルドラーゼは、以下の（a）および（b）の少なくとも何れかである、生産方法：

 （a）配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドに対して 90%以上の配列同一性を有するポリペプチドからなるトレオニンアルドラーゼ、

 （b）配列番号 4 に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドに対して 90%以上の配列同一性を有するポリペプチドからなるトレオニンアルドラーゼ。

＜3＞ 上記改変されたタバコ植物における内在性のトレオニンアルドラーゼの発現または活性の低下は、該トレオニンアルドラーゼをコードする遺伝子の変異対立遺伝子によるものであるか、または該トレオニンアルドラーゼの発現を抑制するために導入された外因性のポリヌクレオチドによるものである、＜1＞または＜2＞に記載の生産方法。

＜4＞ 上記変異対立遺伝子は、挿入、欠失、フレームシフト変異、ナンセンス変異、ノンストップ変異、およびスプライス部位変異からなる群より選択される突然変異を含むものである、＜3＞に記載の生産方法。

＜5＞ 上記突然変異は、突然変異誘発、ゲノム編集およびノックアウト法からなる群から選択される方法によって導入された人工突然変異を含むものであるか、天然に存在する自然突然変異を含むものである、＜4＞に記載の生産方法。

＜6＞ 上記人工突然変異は、突然変異誘発またはゲノム編集によって導入されたものであり、該突然変異誘発またはゲノム編集は、化学物質または放射線への暴露、CRISPR system、Transcription Activator-Like Effector Nucleases、Zinc Finger Nucleases、Oligonucleotide-directed mutagenesis、T-DNA挿入、およびトランスポゾン挿入からなる群より選択される方法によって行われるものである＜5＞に記載の生産方法。

＜7＞ 上記改変されたタバコ植物は、上記トレオニンアルドラーゼをコードする遺伝子として、対立遺伝子同士で同一種類の変異を有するホモ接合体であるか、または対立遺伝子同士で異なる変異を有するヘテロ接合体である、＜3＞～＜6＞の何れか一項に記載の生産方法。

＜8＞ 上記外因性のポリヌクレオチドは、アンチセンスRNA分子、RNAi分子および共抑制因子分子からなる群より選択される分子を含む、＜3＞に記載の生産方法。

＜9＞ 上記改変されたタバコ植物は、内在性のトレオニンアルドラーゼの発現または活性が低下するよう改変されたタバコ植物の自殖によって育成された、または該改変されたタバコ植物同士の交配によって育成された、タバ

コ品種の植物である、＜1＞～＜8＞の何れか一項に記載の生産方法。

＜10＞ 上記改変されたタバコ植物は、以下の（a）～（e）からなる群より選択される指標に基づき選抜および育成されたタバコ植物である、＜9＞に記載の生産方法：

- （a）上記トレオニンアルドラーゼの発現の低下
- （b）上記トレオニンアルドラーゼの活性の低下
- （c）加熱処理した葉におけるトレオニン含量の増強
- （d）上記トレオニンアルドラーゼの変異対立遺伝子の有無
- （e）上記（d）の変異対立遺伝子に連鎖するDNAマーカー

（f）上記遺伝子の発現を抑制するために導入された外因性のポリヌクレオチドの有無。＜11＞ 上記タバコ植物の一部は、葉、根、茎、わき芽、花、種子、植物培養細胞、カルスおよびプロトプラストからなる群より選択される、＜1＞～＜10＞の何れか一項に記載の生産方法。

＜12＞ 上記乾燥たばこ材料におけるトレオニン含量の増強は、上記改変されたタバコ植物またはその一部の乾燥によって生じたものである、＜1＞～＜11＞の何れか一項に記載の生産方法。

＜13＞ 上記乾燥が、熱風乾燥、空気乾燥、火力乾燥および日干し乾燥からなる群より選択される乾燥によって行われる、＜12＞に記載の生産方法。

＜14＞ 上記改変されたタバコ植物は、ニコチアナ タバカムおよびニコチアナ ルスティカからなる群より選択されるタバコ植物である、＜1＞～＜13＞の何れか一項に記載の生産方法。

＜15＞ 上記乾燥たばこ材料は、葉材料であって、当該乾燥たばこ材料におけるトレオニン含量は、トレオニンアルドラーゼの発現または活性が低下するよう改変されていない対照のタバコ植物またはその一部から作製した乾燥たばこ材料のトレオニン含量と比べて20%以上高い、＜1＞～＜14＞の何れか一項に記載の生産方法。

＜16＞ ＜1＞～＜15＞の何れか一項に記載の生産方法によって生産さ

れる、乾燥たばこ材料。

< 1 7 > < 1 6 > に記載の乾燥たばこ材料から調製した、抽出物。

< 1 8 > < 1 6 > に記載の乾燥たばこ材料および／または< 1 7 > に記載の抽出物を使用して製造された、たばこ製品。

[0178] 本発明は上述した各実施形態に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能であり、異なる実施形態にそれぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせて得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。

実施例

[0179] 〔実施例 1 : ニコチアナ タバカムにおけるターゲット遺伝子の選定および単離〕

トレオニナルドラーゼ (Threonine aldolase (THA)) は、生物におけるトレオニンの代謝に関わる酵素であり、*Arabidopsis thaliana* では THA1 (At1g08630)、THA2 (At3g04520) という 2 つの遺伝子によってコードされている (非特許文献 10) ことが知られている。アスパラギン酸に由来するアミノ酸の代謝経路を図 1 に示す。

[0180] BLAST 検索によって *A. thaliana* の THA 遺伝子と相同性を有する 3 種のタバコ遺伝子を公共核酸データベースから同定した。このうち 2 種はタバコの S ゲノムに座乗し、1 種は T ゲノムに座乗していた。S ゲノムの 1 種と T ゲノムの 1 種の遺伝子はアミノ酸レベルで 99% という高い配列同一性を示すため、同じ機能を有することが推定された。これらの遺伝子について、S ゲノムにおけるものを NtTHA1s とし、T ゲノムにおけるものを NtTHA1t とした。残り 1 つの遺伝子は他の 2 つの遺伝子とアミノ酸レベルで 87% の同一性を示し NtTHA2 とした。NtTHA1s、NtTHA1t および NtTHA2 のコーディング領域 (CDS) をそれぞれ配列番号 1、3 および 5 に、翻訳産物のアミノ酸配列を配列番号 2、4 および 6 に示す。

[0181] 〔実施例 2 : タバコにおける THA 遺伝子の発現の確認〕

タバコにおけるT H A 遺伝子の発現を確認するために、品種つくば1号の播種後10日の芽生え、播種後4週の苗の葉身（ラミナ）、播種後5週の苗の根、加熱処理を施したラミナおよび種子からRNAを抽出してRT-PCRに供試した。葉身の加熱処理は、播種後8週の個体から切り取った葉を温度37℃および湿度85%の条件下に、0、8、24または48時間暴露して行った。種子のRNAは10、25、50または100粒から調製した。全RNAはRNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて抽出した。cDNA合成はHigh Capacity RNA-to-cDNA Master Mix (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて行った。手法は抽出Kitに添付のマニュアルに従った。

[0182] N t T H A 1 およびN t T H A 2 遺伝子のRT-PCRは表1に示す特異的なプライマーのセットおよびPrimeSTAR（登録商標）Max DNA Polymerase (TAKARA BIO INC.) を用いて実施した。なお、N t T H A 1 の検出には2種のオルソログ遺伝子（N t T H A 1 _sとN t T H A 1 _t）の両方を同時に増幅するプライマー組を用いた。品種つくば1号のゲノムDNAを、PCR増幅のポジティブコントロールの鋳型として使用した。得られたPCR産物を電気泳動して確認した。図2は、ニコチアナ タバカムの各種組織におけるN t T H A 1 およびN t T H A 2 遺伝子の発現を示す。図2の（a）は、N t T H A 1 遺伝子の発現を示し、図2の（b）は、N t T H A 2 遺伝子の発現を示している。N t T H A 1 遺伝子は調査した全てのサンプルにおいて発現していた。特に、N t T H A 1 遺伝子は根、芽生え、および加熱処理したラミナにおいて強く発現していた。一方、N t T H A 2 遺伝子は根でのみ発現していた。

[0183] [表1]

遺伝子	Forward または Reverse	配列（配列番号）
NtTHA1	F	GGGGTCAAAGATCAGCGAAACAGAGA（配列番号7）
	R	TCTTCGGCCACTCCTGCTAAAGCTC（配列番号8）
NtTHA2	F	TACTGAAAGGGTCAAAGGTCAGTAG（配列番号9）
	R	TTCTTCTGCCTCTCCCGCCAAAGTTT（配列番号10）

〔実施例3：遺伝子変異体の選抜〕

(N t T H A 1 _ s 遺伝子およびN t T H A 1 _ t 遺伝子の変異体の選抜)

N t T H A 1 _ s 遺伝子およびN t T H A 1 _ t 遺伝子に変異を有する系統はニコチアナタバカム (つくば1号) のEMS変異体集団 (M2) の中から選抜した。選抜は SingleStrand Conformation Polymorphism (SSCP) 解析によって行った。SSCP解析に供試するPCR断片は、以下の表2に示すN t T H A 1 遺伝子に特異的なプライマーセットおよびMultiplex PCR Kit (QIGEN) を用いて増幅した。その後、増幅産物の分析はPOP (商標) Conformational Analysis Polymer (Thermo Fisher Scientific Inc.) を充填したキャピラリー電気泳動装置 (3130xl PRISM (登録商標) DNA analyzer, Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて実施した。得られたデータをGeneMapper (登録商標) Version4.0 (Thermo Fisher Scientific Inc.) で解析し、多型性のPCR産物が増幅された系統を目的変異体の候補として選抜した。

[0184] [表2]

遺伝子	Forward または Reverse	配列 (配列番号)
NtTHA1s	F	CAGGGAAAATGGTGATGAGAACC (配列番号 11)
	R	ATGCACCAATATGAGGATCGCTG (配列番号 12)
NtTHA1t	F	CAGGGAAAATGGTGATGAGAACC (配列番号 13)
	R	ACCAGATAATGTACCAAATAGAGAG (配列番号 14)

選抜した候補系統から増幅したPCR産物を、TOP0 (登録商標) TA Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いてクローニングした。生じたコロニーをLB/Km

液体培地で一晚培養した後、QiaPrep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) を用いてプラスミドを抽出した。その後、得られたプラスミドおよびBigDye (登録商標) Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いてPCR産物の塩基配列を解読した。得られたデータをATGC (Ver.7) Sequence Assembly Software (GENETYX CORPORATION) で解析し、N t T H A 1 遺伝子に導入された変異を特定した。各手順における全ての手法はKitに添付のマニュアルに従った。

[0185] 最終的に、N t T H A 1 _ s 遺伝子にナンセンス突然変異が導入された2種

類の変異対立遺伝子 (tha1-s1, tha1-s2) を同定した。さらに、N t T H A 1 _ t 遺伝子にナンセンス突然変異が導入された 1 種の変異対立遺伝子 (tha1-t) を同定した。いずれの変異もエキソン 1 (450bp) の内部に見いだされた。2 種類の変異対立遺伝子のうち、t h a 1 - s 1 は、野生型である N t T H A 1 s の配列番号 1 に記載の塩基配列における 223 番目の塩基が C から T に置換しており (配列番号 33)、野生型である N t T H A 1 s の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列における 75 番目のアミノ酸がストップコドンとなっていた。また、t h a 1 - s 2 は、野生型である N t T H A 1 s の配列番号 1 に記載の塩基配列における 376 番目の塩基が C から T に置換しており (配列番号 34)、野生型である N t T H A 1 s の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列における 126 番目のアミノ酸がストップコドンとなっていた。また、tha1-t は、野生型である N t T H A 1 t の配列番号 3 に記載の塩基配列における 121 番目の塩基が C から T に置換しており (配列番号 35)、野生型である N t T H A 1 t の配列番号 4 に記載のアミノ酸配列における 41 番目のアミノ酸がストップコドンとなっていた。

[0186] 図 3 に、N t T H A 1 遺伝子の野生型対立遺伝子および変異対立遺伝子の塩基配列のアライメントを示す。図 4 に、N t T H A 1 遺伝子の野生型対立遺伝子および変異対立遺伝子の翻訳産物のアミノ酸配列のアライメントを示す。

[0187] (二重変異体の育成)

N t T H A 1 遺伝子の機能欠失の影響を明らかにするために、tha1-s1 または tha1-s2 のホモ接合体であり、且つ、tha1-t のホモ接合体である二重変異体植物を育成した。

[0188] まず、上述の通り、tha1-s1、tha1-s2 または tha1-t についてホモ接合体である M2 植物を選抜した。次に、これら M2 植物の交配に由来する 2 種の F2 分離集団 (F2 population) を作製した。それぞれの集団から、両方の N t T H A 1 遺伝子座が変異対立遺伝子のホモ接合体である個体を選抜して 2 つのタイプの二重変異体系統 (tha1-s1/tha1-t, tha1-s2/tha1-t) を得た。

さらに、前記集団のそれぞれから両方の N t T H A 1 遺伝子座が野生型のホモ接合体である植物 (THA1-s/THA1-t) を対照として選抜した。

[0189] なお、2つの N t T H A 1 遺伝子座の遺伝子型はいずれも T a q M a n (登録商標) M G B プローブを用いた SNP Genotyping Assay によって明らかにした。解析は TaqMan (登録商標) Genotyping Master Mix (Thermo Fisher Scientific Inc.) と StepOnePlus Real-Time PCR System (商標) (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて実施した。解析に使用したプライマーおよびプローブのセットを表3に示す。

[0190] [表3]

target SNP	primer/probe name	5' label	配列 (配列番号)
tha1-s1	tha1_s1_F primer		GCACTATGGGCAACCTTATCAGT (配列番号 15)
	tha1_s1_R primer		AACACCTCCGAGAGTGGAAT (配列番号 16)
	tha1_s1_W probe	VIC	TCATTGCCAAATTAGA (配列番号 17)
	tha1_s1_M probe	FAM	TGCTGACTCATTGCTAA (配列番号 18)
tha1-s2	tha1_s2_F primer		CGAGGACAGTGAAGAACAATGAAG (配列番号 19)
	tha1_s2_R primer		TCAGCCTAGTGGTTGGGTAACA (配列番号 20)
	tha1_s2_W probe	VIC	AAGCTGCAATTCGAGA (配列番号 21)
	tha1_s2_M probe	FAM	AAGCTGCAATTTGA (配列番号 22)
tha1-t	tha1_t_F primer		CAATGGCCAACGCTGAAGT (配列番号 23)
	tha1_t_R primer		GGTTGCCCATAGTGCCTGAAG (配列番号 24)
	tha1_t_W probe	VIC	CCAAGTGCCTAACGCCTTG (配列番号 25)
	tha1_t_M probe	FAM	CCAAGTGCCTAACGCCTTG (配列番号 26)

[実施例4：遺伝子発現の解析]

二重変異体における N t T H A 1 遺伝子の発現は以下のように調査した。まず播種後6週の苗から R N A を抽出し、PrimeScript (商標) RT reagent kit with gDNA Eraser (TAKARA BIO INC.) を用いて c D N A を合成した。得られた c D N A を鋳型とし、以下の表4に示すプライマーおよびプローブセットと TaqMan (登録商標) Fast Advanced Master Mix (Thermo Fisher Scientific Inc.) とを用いて、R e a l - T i m e P C R を実施した。解析には StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いた。P C R の手順についてはキットおよび装置のマニュアルに従った。

[0191] N t T H A 1 遺伝子の発現量は elongation factor 1-alpha (E F - 1 alpha) 遺伝子 (アクセッション No. A F 1 2 0 0 9 3) を内部標準とした com

parative CT methodで解析した。プライマーおよびプローブセットは、Primer Express (登録商標) 3.0 (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて NtTHA1s および NtTHA1t の塩基配列の間で完全一致する部分で設計した (表4)。二重変異体および対照 (control) の植物における NtTHA1 遺伝子の発現量を図5に示す。図5の (a) はtha1-s1/tha1-t二重変異体の発現レベルを示し、図5の (b) はtha1-s2/tha1-t二重変異体の発現レベルを示す。図5の縦軸は、対照植物 (THA1-s/THA1-t) における NtTHA1 遺伝子の発現量に対する相対的な発現量 (Relative expression level) を示している。いずれの二重変異体も、対照植物と比べ、発現が有意に低下していた。

[0192] [表4]

target	primer/probe name	5' label	配列 (配列番号)
NtTHA1	THA1_F primer		TAGGTCAGGGAAAATGGTGATGA (配列番号 27)
	THA1_R primer		CGTTCCGCATGGCTTCAG (配列番号 28)
	THA1 probe	FAM	ACCGTGGATCTTCGCTCGGACACA (配列番号 29)
EF-1 alpha	EF-1_F primer		CTAAGGGTGCTGCCAGCTTT (配列番号 30)
	EF-1_R primer		GTCAAGCACTGGAGCATATCCA (配列番号 31)
	EF-1 probe	VIC	ATCATGAACCATCCAGGACAGATTGG (配列番号 32)

〔実施例5：植物体の栽培および遊離トレオニン含量の解析〕

(生育状態および形態の観察)

上記のように選抜した二重変異体 (tha1-s2/tha1-t) および対照 (control) となる植物を、一般的なたばこ耕作法に従い、圃場にて栽培した。図6の (b) は二重変異体であり、図6の (a) は対照植物である。

[0193] 図6に示す通り、二重変異体と対照植物との間に、生育および形態における差は認められなかった。

[0194] (植物体中の遊離トレオニン含量の解析)

次に、二重変異体および対照植物のそれぞれから葉を採取し、新鮮な葉および熱風乾燥した葉における遊離トレオニン含量を分析した。熱風乾燥における標準的な乾燥スケジュール (Tobacco Curing schedule) を図7に示す。図7の横軸は、経過時間 (Time) (hr) を示し、左側の縦軸は温度 (Temperature) (°C) を示し、右側の縦軸は相対湿度 (Relative humidity, RH) (%) を示

している。また、図8に、二重変異体および対照植物の新鮮な葉 (flesh leaves) の遊離トレオニン含量を示す。図9に、二重変異体および対照植物の熱風乾燥した葉 (cured leaves) の遊離トレオニン含量を示す。

[0195] なお、図8の(a)および図9の(a)は、tha1-s1/tha1-t二重変異体および対照植物の遊離トレオニン含量 (threonine content) を示す。図8の(b)および図9の(b)は、tha1-s2/tha1-t二重変異体と対照植物の遊離トレオニン含量 (threonine content) を示す。図8および9の縦軸は、乾燥タバコ葉の乾燥重量当たりの遊離トレオニン含量 ($\mu\text{g} / \text{g DW}$) を示している。

[0196] 図8に示すとおり、二重変異体から採取した直後の新鮮な葉のトレオニン含量は対照植物のものと有意な差を示さなかった。一方で、図9に示すとおり、熱風乾燥を施した二重変異体の葉の遊離トレオニン含量は対照と比べて大幅に増大していた。

[0197] [実施例6：熱風乾燥の温度が遊離トレオニン含量に及ぼす影響の解析]
熱風乾燥の温度が二重変異体 (tha1-s2/tha1-t) および対照植物 (THA1-s/THA1-t) の葉の遊離トレオニン含量に及ぼす影響を調査した。乾燥開始から0 h、8 h、16 h、24 h、30 h、36 h、48 h、60 hおよび72 h後に乾燥中のタバコ葉3枚をランダムに選び、それらから凡そ10 cm四方の葉片を採取した。3つの葉片を1つのサンプルとしてまとめて遊離トレオニン含量を測定した。なお、熱風乾燥チャンバーは一定温度 (25℃、34℃、38℃または42℃) を維持し、湿度85%で運転した。図10に、NtTHA1遺伝子の二重変異体および対照のタバコ植物から採取した葉を各温度条件で熱風乾燥した場合のトレオニン含量を示す。乾燥開始から24時間以降の二重変異体の葉ではどの温度条件でも野生型と比べて遊離トレオニン含量が高かった。

[0198] [実施例7：各種遺伝子型の個体の解析]

各種遺伝子型の個体におけるNtTHA1遺伝子の発現をさらに詳しく調べるために、NtTHA1s遺伝子またはNtTHA1t遺伝子の特異的に

検出するプライマーおよびプローブを作成した（表5）。表中の‘position’カラムは配列番号1または3における位置を示す。

[0199] [表5]

[primer]				
target gene	primer	sequence	position	配列番号
NtTHA1s	forward primer	ACTACCAGAAGGGCCACA	951-968	SeqID 37
	reverse primer	CCAAAGCTCGCTGAACG	1032-1048	SeqID 38
NtTHA1t	forward primer	CTACCAGAAGGCCTAATGAGA	952-972	SeqID 39
	reverse primer	CTGCTAAAGCTCGCTGAACA	1032-1051	SeqID 40
[probe]				
target gene	TaqMan® probe	sequence	position	配列番号
NtTHA1s & NtTHA1t	FAM/TAMRA	TCACCAGATTTTCAGAAAATGATGTGCAC	990-1017	SeqID 41

N t T H A 1 遺伝子座が野生型または変異型のホモ接合体である4つの遺伝子型（tha1-s2/tha1-t、tha1-s2/THA1-t、THA1-s/tha1-t、THA1-s/THA1-t）の植物についてN t T H A 1 遺伝子の発現を調査した。図11に、各種遺伝子型の個体におけるN t T H A 1 遺伝子の発現を示す。図11に示すように、tha1-s2のホモ接合体ではN t T H A 1 s 遺伝子の発現レベルが低下していた。同様に、tha1-tのホモ接合体ではN t T H A 1 t 遺伝子の発現レベルが低下していた。これら植物から採取した葉を熱風乾燥し、乾葉（乾燥された葉）の遊離トレオニン含量を分析した。図12に、各種遺伝子型の個体由来する乾葉の遊離トレオニン含量を示す。二重変異体の乾葉の遊離トレオニン含量は他の遺伝子型のものと比べて有意に高かった。

[0200] [実施例7：空気乾燥]

二重変異体（tha1-s1/tha1-t）と空気乾燥タイプのタバコ品種（TN90）を交配し、BC1F2の種子を得た。BC1F2植物の幼苗からDNAを抽出しN t T H A 1 遺伝子の遺伝子型を調査した。二重変異体（tha1-s1/tha1-t）と対照植物（THA1-s/THA1-t）とを選抜し、それぞれ200個体以上を一般的なたばこ耕作法に従って圃場にて栽培した。

[0201] タバコ葉の空気乾燥は一般的な方法に則って実施した。まず、収穫したタバコ葉は11日間Sun Shade Netで覆われたGreenhouseの中に吊り下げて乾燥を促進させた。タバコ葉はさらに37日間乾燥小屋の中で乾燥させた。図13に、空気乾燥中のタバコ葉を示す。図13(a)は吊り下げの開始直後の葉を示し、図13(b)は吊り下げ開始から10日目の葉を示す。空気乾燥中のタバコ葉の周辺温度および周辺湿度の推移は図14に示す。吊り下げの開始から0h、18h、24h、42h、48h、90h、96h、7d、8d、9d、10dおよび11d後に、タバコ葉3枚をランダムに選び、それらから凡そ10cm四方の葉片を採取した。3つの葉片を1サンプルとしてまとめて遊離トレオニン含量を測定した。図15に、空気乾燥中のタバコ葉の遊離トレオニン含量の推移を示す。図15に示す通り、二重変異体の遊離トレオニン含量は、空気乾燥の過程を通して対照と比べて高いレベルで推移した。

[0202] 茎の上部に位置する葉（上葉：Tips）、真ん中より上に位置する葉（本葉：Leaf）、および茎に着いたままの葉も同様の方法で乾燥させた。図16に、二重変異体および対照の各種乾葉の遊離トレオニン含量を示す。二重変異体の乾葉の遊離トレオニン含量は、異なる着位のいずれの葉においても対照と比べて高かった（図16）。さらに、茎に着いた状態のまま乾燥させた（stalk cut curing）、二重変異体の乾葉の遊離トレオニン含量も対照と比べて高かった。

[0203] [実施例8：ゲノム編集]

CRISPR-Cas9 を用いたゲノム編集はLiら（Li et al., Nat Biotechnol. 2013 Aug;31(8):688-912013）の方法を参照して実施した。ターゲット配列（5'-GGAGGCATTGCCACTCTCGGAGG-3'：配列番号42）はNtTHA1s遺伝子（配列番号1）およびNtTHA1t遺伝子（配列番号3）の共通部分から選択された。この配列は配列番号1または配列番号3の283番目から305番目の塩基配列であり、3'末端のAGG（下線部）はPAM配列である。plant codon-optimized SpCas9 (pcoCas9)とsynthetic-guide RNA (sgRNA)をタ

バコで発現させるための一体型の植物発現ベクターは、pRI201-AN（タカラバイオ社）のC a M V 3 5 S プロモータの下流のNdeI-SalI間にpcoCas9遺伝子を挿入し、KpnI-BamHI間にArabidopsis U6 polymerase III promoterと連結したs g R N A 発現カセットを挿入して作成した。

[0204] 上記ベクターを含むアグロバクテリウム（LBA4404）を播種10日目のタバコ子葉片（*Nicotiana tabacum*, S R - 1）に感染させ、形質転換体を作製した。N t T H A 1 s 遺伝子およびN t T H A 1 t 遺伝子の両方に1塩基挿入を含む3つのT O（M 1）個体を選抜し、自殖した。それぞれの系統からpcoCas9／sgRNAコンストラクトを含まず、N t T H A 1 s 遺伝子およびN t T H A 1 t 遺伝子の両方が変異型のホモ接合体であるT 1（M 2）植物を選抜した。上記M 2植物を自殖してM 3種子を得た。これら系統のN t T H A 1 遺伝子は、いずれも、280番目と281番目塩基の間にTまたはGの1塩基挿入を有していた（表6）。野生型であるN t T H A 1 s の配列番号1に記載の塩基配列における280番目と281番目塩基の間に、Tの1塩基挿入を有する配列を配列番号49に示す。また、野生型であるN t T H A 1 t の配列番号3に記載の塩基配列における280番目と281番目塩基の間に、Tの1塩基挿入を有する配列を配列番号50に、Gの1塩基挿入を有する配列を配列番号51にそれぞれ示す。

[0205] [表6]

allele	line	mutation	position
NtTHA1_s	3_10	T-insertion	280/281
	18_16	T-insertion	280/281
	48_78	T-insertion	280/281
NtTHA1_t	3_10	T-insertion	280/281
	18_16	G-insertion	280/281
	48_78	T-insertion	280/281

ゲノム編集したタバコ植物におけるN t T H A 1 遺伝子の発現を調査するために、新しいプライマーおよびプローブセット（セットAおよびB）を変

異箇所の上流と下流に一つずつ設計した（表 7）。設計にはNCBI Reference Sequence (RefSeq) accession number XM_016599601.1とXM_016606047.1を参照した。いずれのセットを用いても、N t T H A 1 __ s 遺伝子およびN t T H A 1 __ t 遺伝子の両方を同時に検出可能である。セット A のプローブは配列番号 1 または配列番号 3 の 1 3 ～ 3 6 番目の塩基配列と一致する。セット B のプローブは配列番号 1 または配列番号 3 の 6 9 4 ～ 7 1 1 番目の塩基配列と一致する。

[0206] [表7]

[primer]				
primer & probe set	forward / reverse primer	sequence	配列番号	
A (upstream)	forward primer	TAGGTCAGGGAAAATGGTGATGA	SeqID 43	
A (upstream)	reverse primer	CGTTCGCGATGGCTTCAG	SeqID 44	
B (downstream)	forward primer	TTGGTTCAAAGAGCTTCATTGC	SeqID 45	
B (downstream)	reverse primer	CCGATAAAAAGCAGCAGCACAA	SeqID 46	

[probe]				
primer & probe set	TaqMan® probe	sequence	position	配列番号
A (upstream)	FAM/TAMRA	ACCGTGGATCTTCGCTCGGACACA	13-36	SeqID 47
B (downstream)	FAM/NFQ (MGB)	AAGACTCTAGGCGGTGGA	694-711	SeqID 48

M3 幼苗の葉を採取して N t T H A 1 遺伝子の発現レベルを調査した（3 個体／line）。図 17 に、ゲノム編集したタバコ植物における N t T H A 1 遺伝子の発現レベルを示す。図 17 に示すとおり、ゲノム編集した個体の N t T H A 1 遺伝子の発現レベルは野生型 S R - 1 と比べて大幅に低かった。さらに、これら幼苗を 12 cm テラコッタに移植して、温室内で育成した。花芽形成のステージの 3 個体のそれぞれから 3 枚の葉を採取して熱風乾燥に供し、遊離トレオニン含量を分析した。熱風乾燥における温度および湿度の設定は 38℃／100%RH／18h、38℃／88%RH／30h、45℃／85%RH／48h、50℃／20%RH／72h であった。図 18 に、ゲノム編集したタバコ植物の乾葉の遊離トレオニン含量を示す。熱風乾燥した葉の遊離トレオニン含量は、野生型 S R - 1 と比べてゲノム編集した個体の方が高かった（図 18）。

産業上の利用可能性

[0207] 本発明は、トレオニン含量の増強された乾燥たばこ材料の生産ならびに当該乾燥たばこ材料および／またはその抽出物を含むたばこ製品の製造に利用することができる。

請求の範囲

- [請求項1] トレオニン含量の増強された乾燥たばこ材料の生産方法であって、
 内在性のトレオニンアルドラーゼの発現または活性が低下するよう
 改変されたタバコ植物またはその一部から、該乾燥たばこ材料を生産
 することを含み、
 該トレオニンアルドラーゼは、以下の（a）および（b）の少なく
 とも何れかである、生産方法：
- （a）配列番号1に記載の塩基配列を有するポリヌクレオチドに対
 して90%以上の配列同一性を有するポリヌクレオチドを含む遺伝子
 によってコードされるポリペプチドからなるトレオニンアルドラーゼ
 （b）配列番号3に記載の塩基配列を有するポリヌクレオチドに対
 して90%以上の配列同一性を有するポリヌクレオチドを含む遺伝子
 によってコードされるポリペプチドからなるトレオニンアルドラーゼ
 。
- [請求項2] トレオニン含量の増強された乾燥たばこ材料の生産方法であって、
 内在性のトレオニンアルドラーゼの発現または活性が低下するよう
 改変されたタバコ植物またはその一部から、該乾燥たばこ材料を生産
 することを含み、
 該トレオニンアルドラーゼは、以下の（a）および（b）の少なく
 とも何れかである、生産方法：
- （a）配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドに対
 して90%以上の配列同一性を有するポリペプチドからなるトレオニ
 ンアルドラーゼ、
 （b）配列番号4に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドに対
 して90%以上の配列同一性を有するポリペプチドからなるトレオニ
 ンアルドラーゼ。
- [請求項3] 上記改変されたタバコ植物における内在性のトレオニンアルドラー
 ゼの発現または活性の低下は、該トレオニンアルドラーゼをコードす

る遺伝子の変異対立遺伝子によるものであるか、または該トレオニナルドラーゼの発現を抑制するために導入された外因性のポリヌクレオチドによるものである、請求項1または2に記載の生産方法。

[請求項4] 上記変異対立遺伝子は、挿入、欠失、フレームシフト変異、ナンセンス変異、ノンストップ変異、およびスプライス部位変異からなる群より選択される突然変異を含むものである、請求項3に記載の生産方法。

[請求項5] 上記突然変異は、突然変異誘発、ゲノム編集およびノックアウト法からなる群から選択される方法によって導入された人工突然変異を含むものであるか、天然に存在する自然突然変異を含むものである、請求項4に記載の生産方法。

[請求項6] 上記人工突然変異は、突然変異誘発またはゲノム編集によって導入されたものであり、該突然変異誘発またはゲノム編集は、化学物質または放射線への暴露、CRISPR system、Transcription Activator-Like Effector Nucleases、Zinc Finger Nucleases、Oligonucleotide-directed mutagenesis、T-DNA挿入、およびトランスポゾン挿入からなる群より選択される方法によって行われるものである請求項5に記載の生産方法。

[請求項7] 上記改変されたタバコ植物は、上記トレオニナルドラーゼをコードする遺伝子として、対立遺伝子同士で同一種類の変異を有するホモ接合体であるか、または対立遺伝子同士で異なる変異を有するヘテロ接合体である、請求項3～6の何れか一項に記載の生産方法。

[請求項8] 上記外因性のポリヌクレオチドは、アンチセンスRNA分子、RNAi分子および共抑制因子分子からなる群より選択される分子を含む、請求項3に記載の生産方法。

[請求項9] 上記改変されたタバコ植物は、内在性のトレオニナルドラーゼの発現または活性が低下するよう改変されたタバコ植物の自殖によって育成された、または該改変されたタバコ植物同士の交配によって育成

された、タバコ品種の植物である、請求項 1 ～ 8 の何れか一項に記載の生産方法。

[請求項10] 上記改変されたタバコ植物は、以下の（a）～（e）からなる群より選択される指標に基づき選抜および育成されたタバコ植物である、請求項 9 に記載の生産方法：

- （a）上記トレオニンアルドラーゼの発現の低下
- （b）上記トレオニンアルドラーゼの活性の低下
- （c）加熱処理した葉におけるトレオニン含量の増強
- （d）上記トレオニンアルドラーゼの変異対立遺伝子の有無
- （e）上記（d）の変異対立遺伝子に連鎖する DNA マーカー
- （f）上記トレオニンアルドラーゼの発現を抑制するために導入された外因性のポリヌクレオチドの有無。

[請求項11] 上記タバコ植物の一部は、葉、根、茎、わき芽、花、種子、植物培養細胞、カルスおよびプロトプラストからなる群より選択される、請求項 1 ～ 10 の何れか一項に記載の生産方法。

[請求項12] 上記乾燥たばこ材料におけるトレオニン含量の増強は、上記改変されたタバコ植物またはその一部の乾燥によって生じたものである、請求項 1 ～ 11 の何れか一項に記載の生産方法。

[請求項13] 上記乾燥が、熱風乾燥、空気乾燥、火力乾燥および日干し乾燥からなる群より選択される乾燥によって行われる、請求項 12 に記載の生産方法。

[請求項14] 上記改変されたタバコ植物は、ニコチアナ タバカムおよびニコチアナ ルスティカからなる群より選択されるタバコ植物である、請求項 1 ～ 13 の何れか一項に記載の生産方法。

[請求項15] 上記乾燥たばこ材料は、葉材料であって、当該乾燥たばこ材料におけるトレオニン含量は、トレオニンアルドラーゼの発現または活性が低下するよう改変されていない対照のタバコ植物またはその一部から作製した乾燥たばこ材料のトレオニン含量と比べて 20% 以上高い、

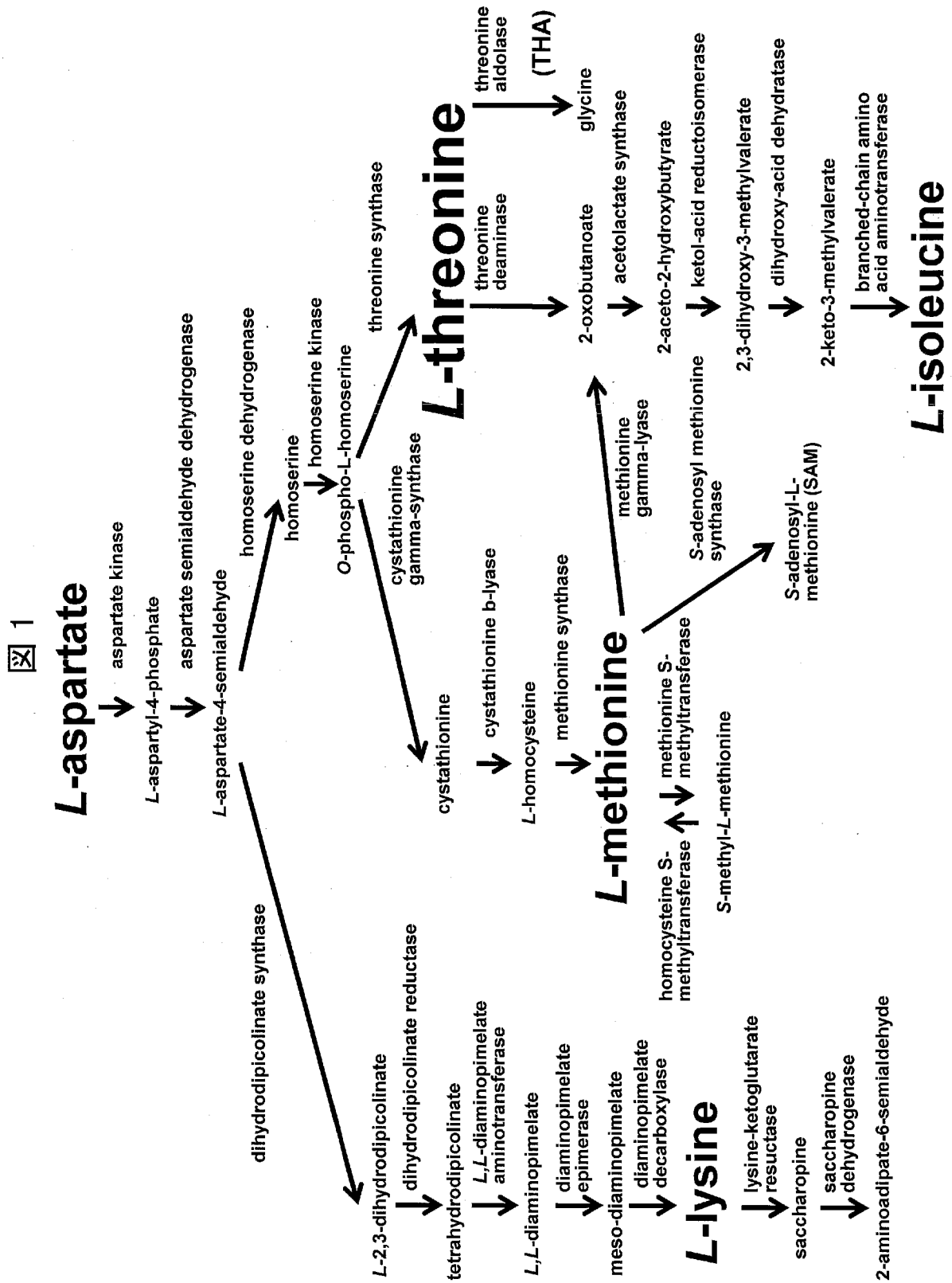
請求項 1 ～ 1 4 の何れか一項に記載の生産方法。

[請求項16] 請求項 1 ～ 1 5 の何れか一項に記載の生産方法によって生産される、乾燥たばこ材料。

[請求項17] 請求項 1 6 に記載の乾燥たばこ材料から調製した、抽出物。

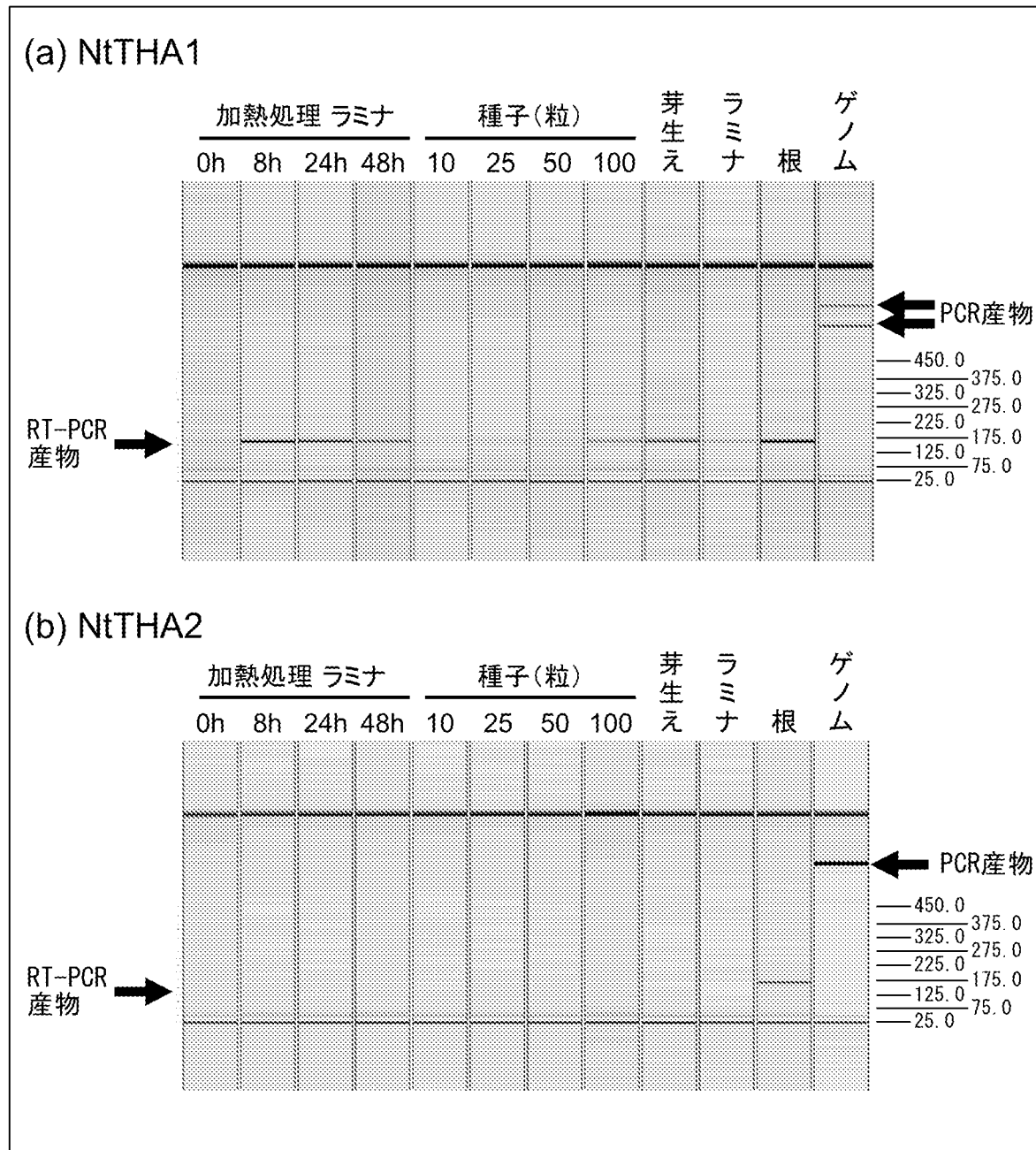
[請求項18] 請求項 1 6 に記載の乾燥たばこ材料および／または請求項 1 7 に記載の抽出物を使用して製造された、たばこ製品。

[1]



[図2]

図 2



[3]

3

NtTHA1_s

THA1_s	1	ATGGTGATGAGAACCGTGGATCTTGGCTGGACACAGTCACCTAACCACCTGAGCCCATGCGGACGGGATGGCCCAATGCTGAAGTGGATGACGATGATGGGTATGATCCAACTGCC	120
tha1_s1	1		120
tha1_s2	1		120
THA1_s	121	CAAGCCCTTGAGCCCGAGATCGCAGGATATAGGCAAGAGACAGGGCTATTGTTCCTTCAGGCCACTATGGCCAACTTATCAGTGTGCTGACTCATTCATTCGCCAAATTAGAGGCAGTGAA	240
tha1_s1	121		240
tha1_s2	121		240
THA1_s	241	ATTATCTTGGTGAATTATTCGCAATACCATATTATGAAATGAGAGCATTCGCCAGGAGTTCATCCGAGGCACAGTGAACAAATGAGATCTGATCTA	360
tha1_s1	241		360
tha1_s2	241		360
THA1_s	361	ATTGAAGTGCATTCGAGATCCTAGCTTTGAGATATGTTACCCACCACTAGGCTGATCTGCTTGAGAAATTCACATGCACACTCAGGAGGCCCAATGSCCTTTCTGCAGAGTATACAGAC	480
tha1_s1	361		480
tha1_s2	361		480

NtTHA1_t

THA1_t	1	ATGGTGATGAGAACCGTGGATCTTGGCTGGACACAGTCACCTAACCACCTGAGCCCATGCGGACGGGATGGCCCAATGCTGAAGTGGATGACGATGATGGGTATGATCCAACTGCC	120
tha1_t	1		120
THA1_t	121	CAAGCCCTTGAGCCCGAGATCGCAGGATATAGGCAAGAGACAGGGCTATTGTTCCTTCAGGCCACTATGGCCAACTTATCAGTGTGCTGACTCATTCGCCAAATTAGAGGCAGTGAA	240
tha1_t	121		240

[図4]

4

NtTHA1_s

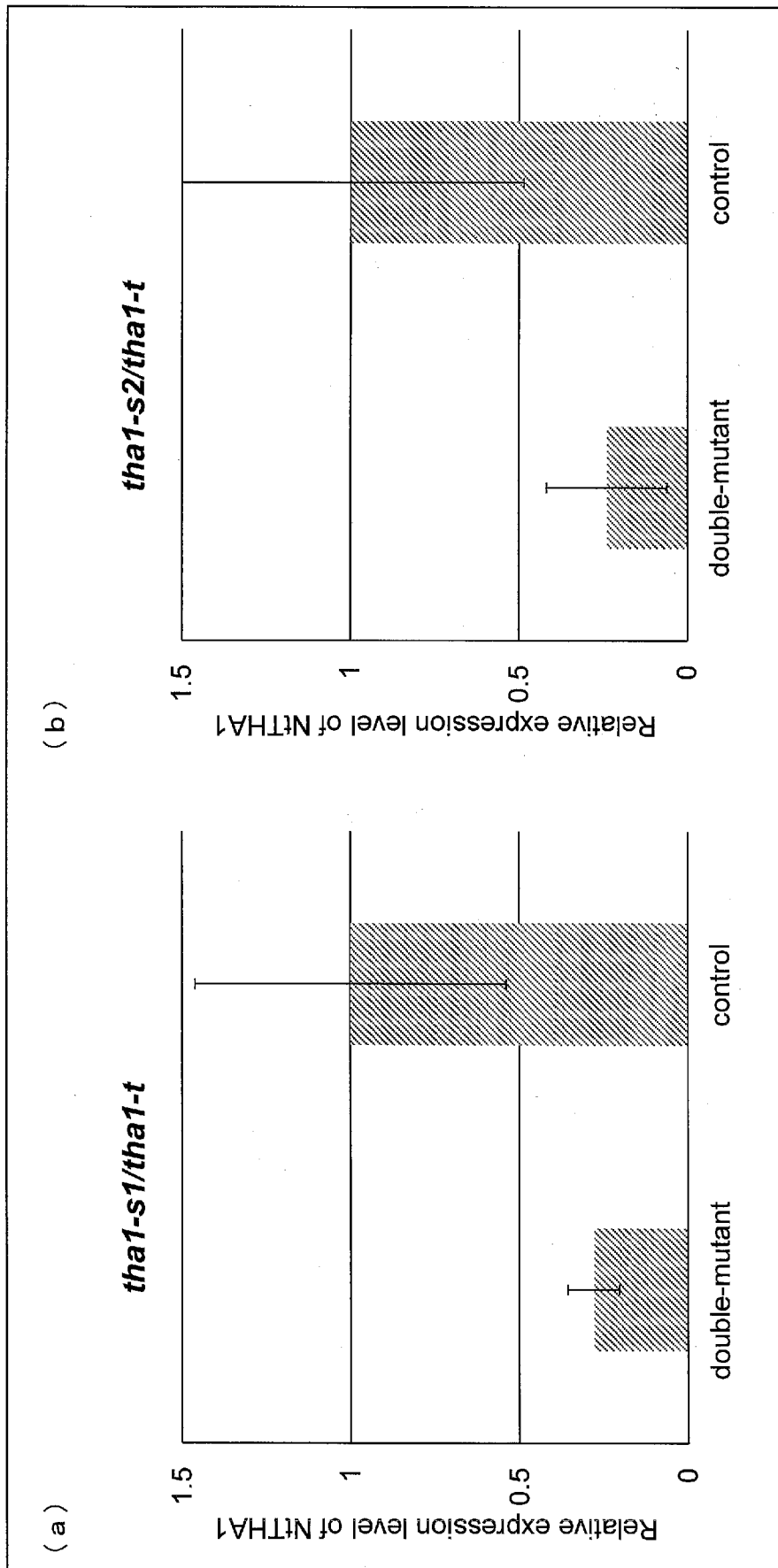
THA1_s_aa	1	MVMRTVDLRSDTVTKPTEAMRNMANAEVDDVLDGYDPTAQRLEAEIARIMGKEAGLFVP	60
tha1_s1_aa	1	MVMRTVDLRSDTVTKPTEAMRNMANAEVDDVLDGYDPTAQRLEAEIARIMGKEAGLFVP	60
tha1_s2_aa	1	MVMRTVDLRSDTVTKPTEAMRNMANAEVDDVLDGYDPTAQRLEAEIARIMGKEAGLFVP	60
THA1_s_aa	61	SGTMGNLISVLTHCQIRGSEIILGDYSHIHIEYENGGAITLGGVHPRTVKNNEDGTMDDL	120
tha1_s1_aa	61	SGTMGNLISVLTHC-----	74
tha1_s2_aa	61	SGTMGNLISVLTHCQIRGSEIILGDYSHIHIEYENGGAITLGGVHPRTVKNNEDGTMDDL	120
THA1_s_aa	121	IEAAIRDPSEFEICYPITRLICLEN SHAHSGGRCLSAEYTDKVGELAKKYGLKLHIDGARI	180
tha1_s1_aa	74	-----	74
tha1_s2_aa	121	IEAAI-----	125

NtTHA1_t

THA1_t_aa	1	MVMRTVDLRSDTVTKPTEAMRNMANAEVDDVLDGYDPTAQRLEAEIARIMGKEAGLFVP	60
tha1_t_aa	1	MVMRTVDLRSDTVTKPTEAMRNMANAEVDDVLDGYDPTA-----	40
THA1_t_aa	61	SGTMGNLISVLTHCQIRGSEIILGDYSHIHIEYENGGAITLGGVHPRTVKNNEDGTMDDL	120
tha1_t_aa	40	-----	40
THA1_t_aa	121	IEAAIRDPSEFEICYPITRLICLEN SHAHSGGRCLSAEYTDKVGELAKKYGLKLHIDGARI	180
tha1_t_aa	40	-----	40

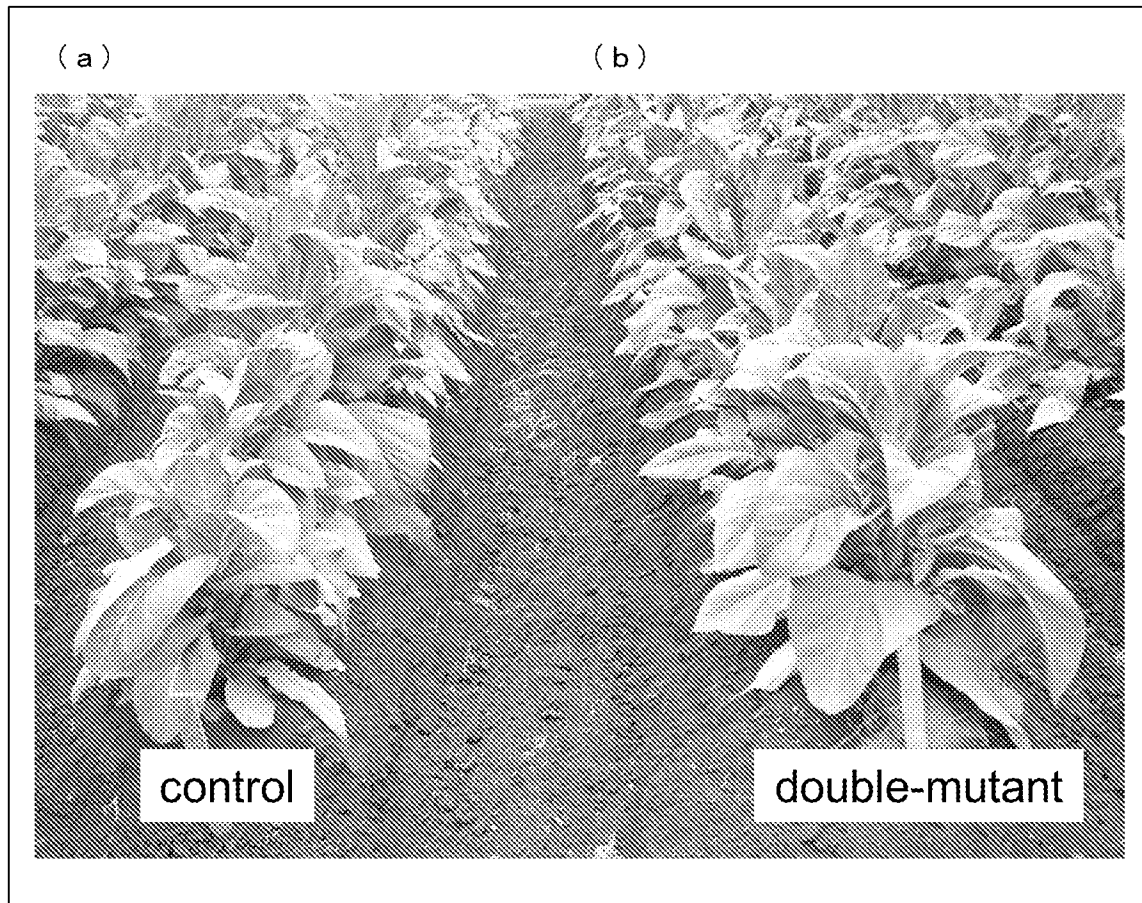
[図5]

[図5]



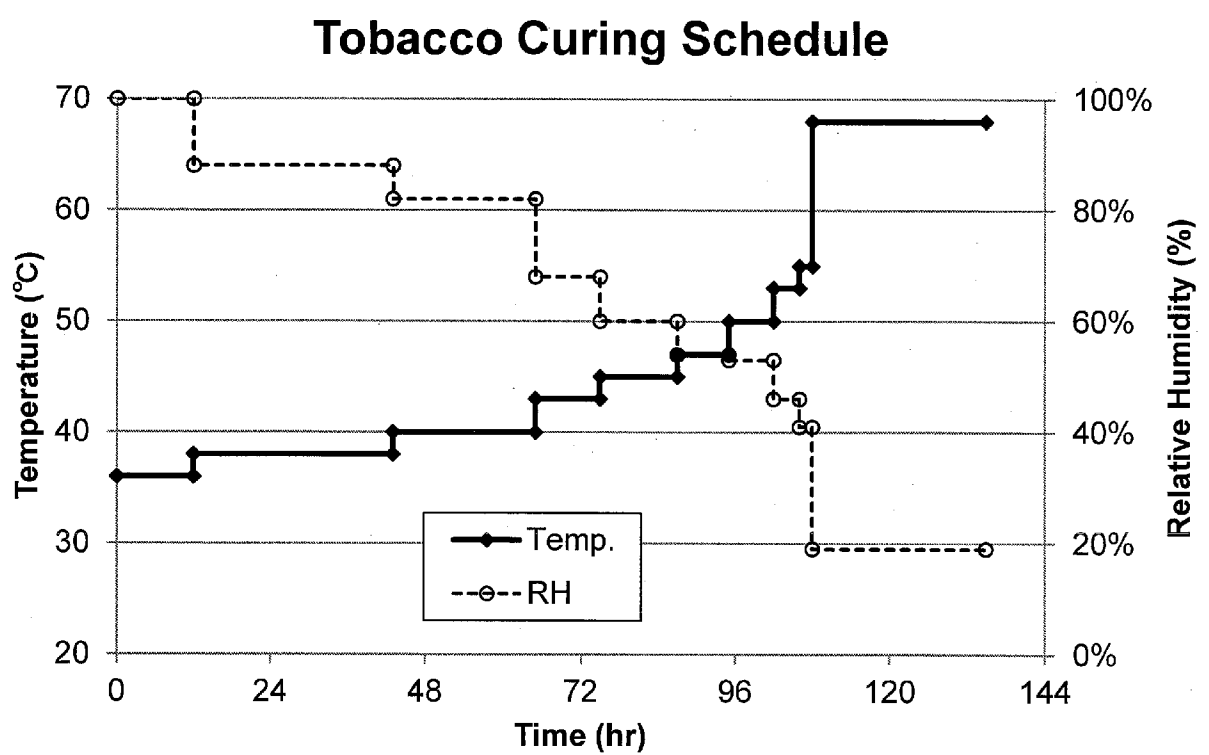
[図6]

図 6



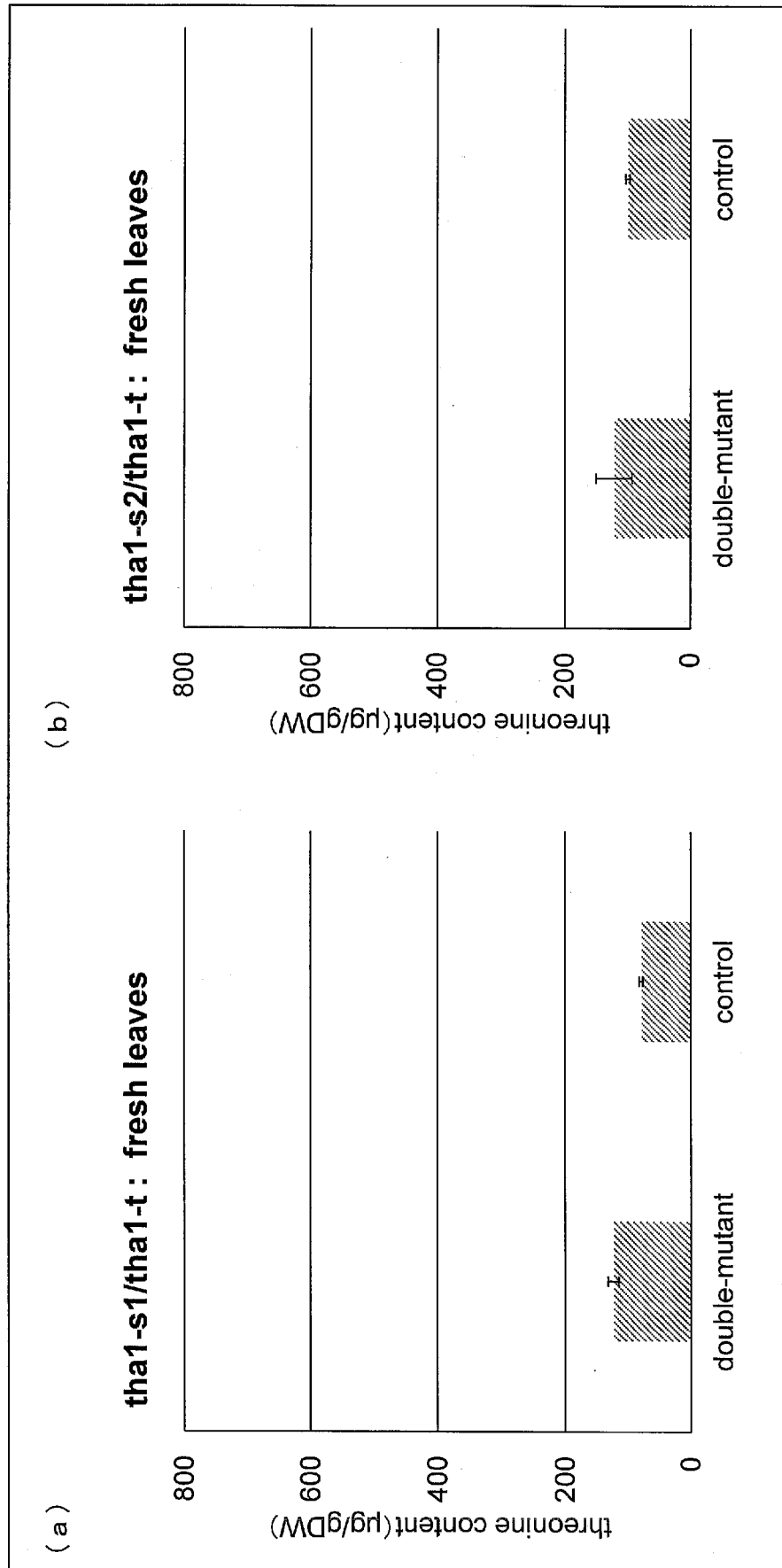
[図7]

図 7



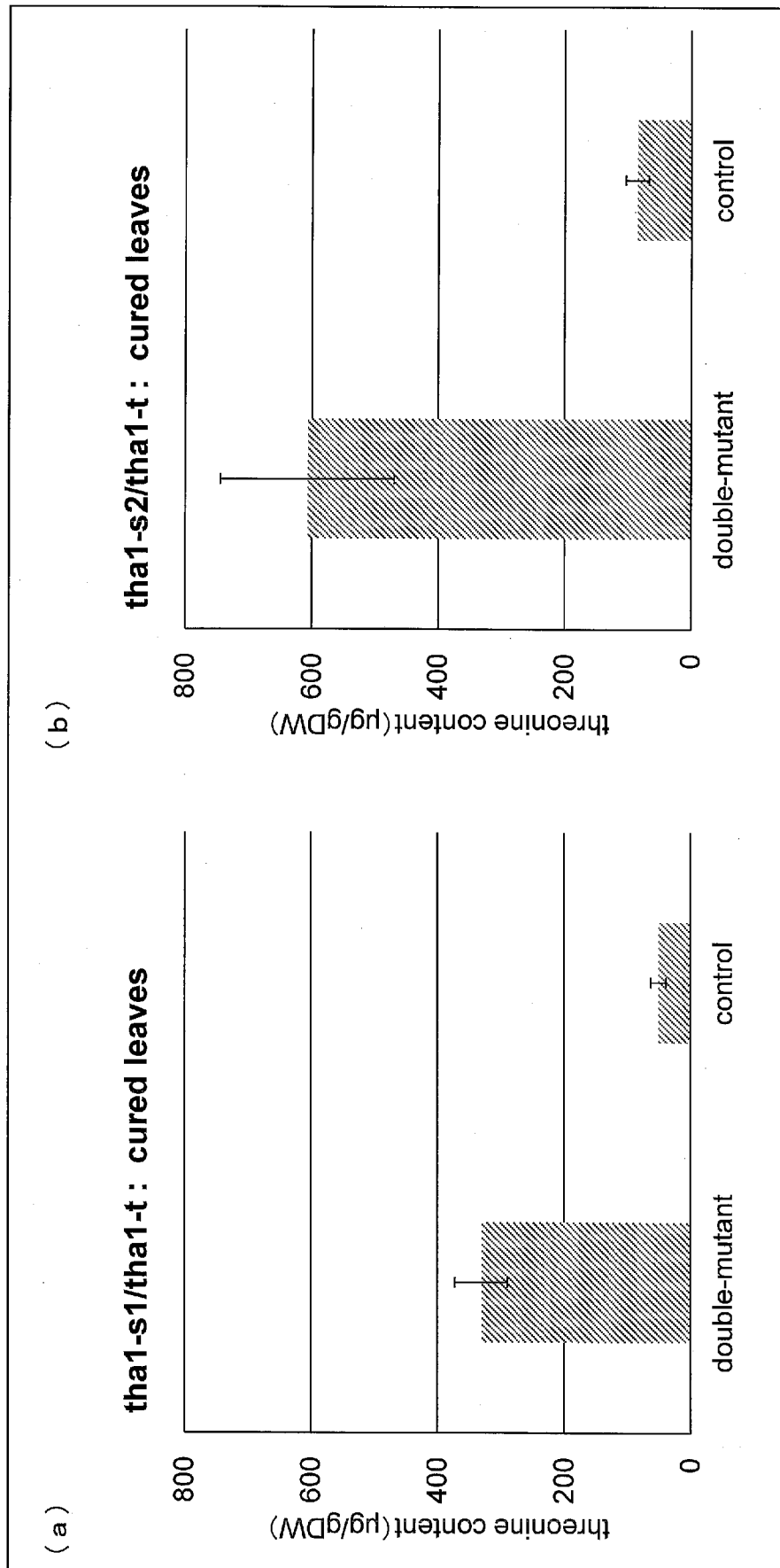
[図8]

[図] 8

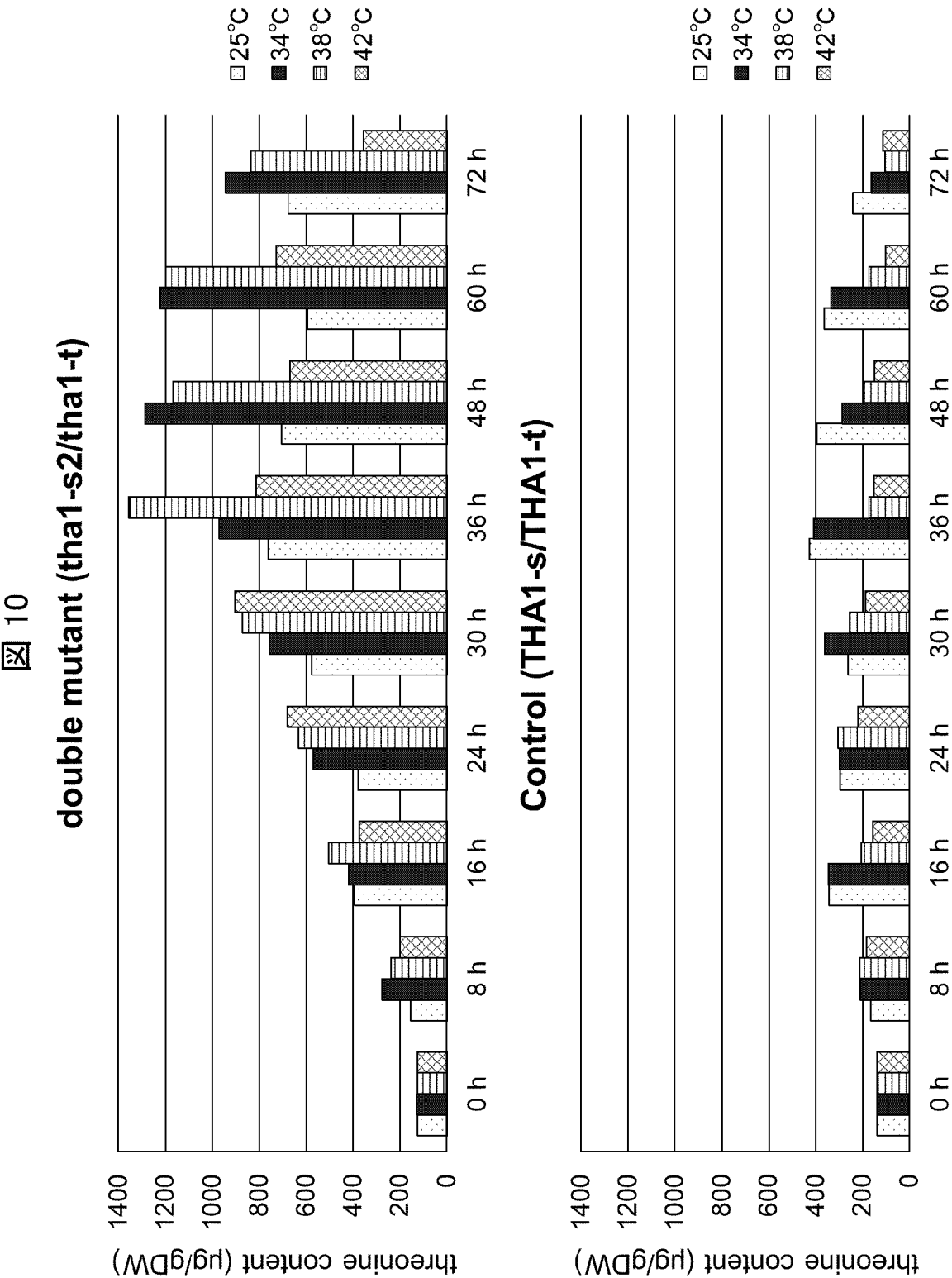


[9]

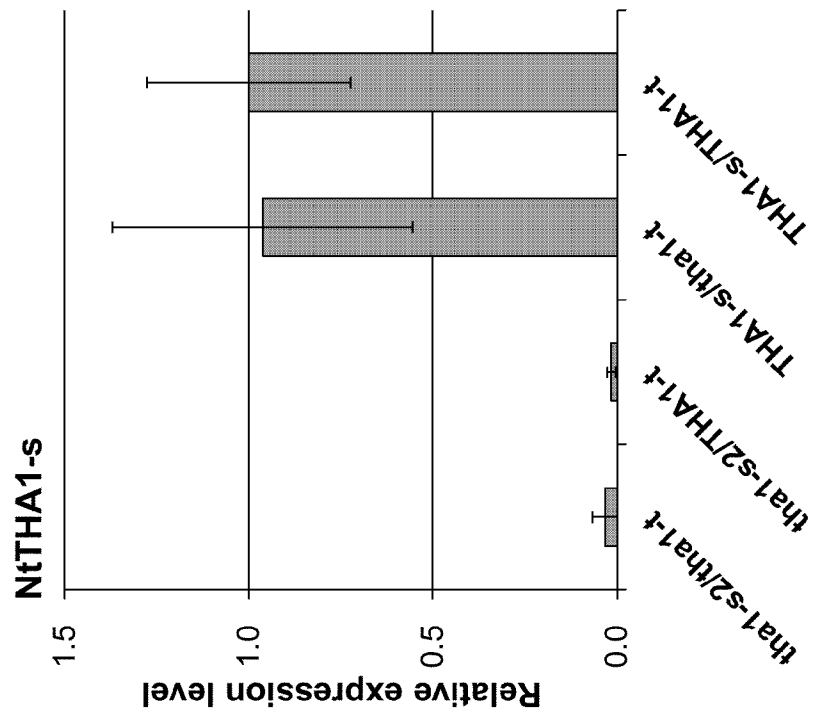
[9]



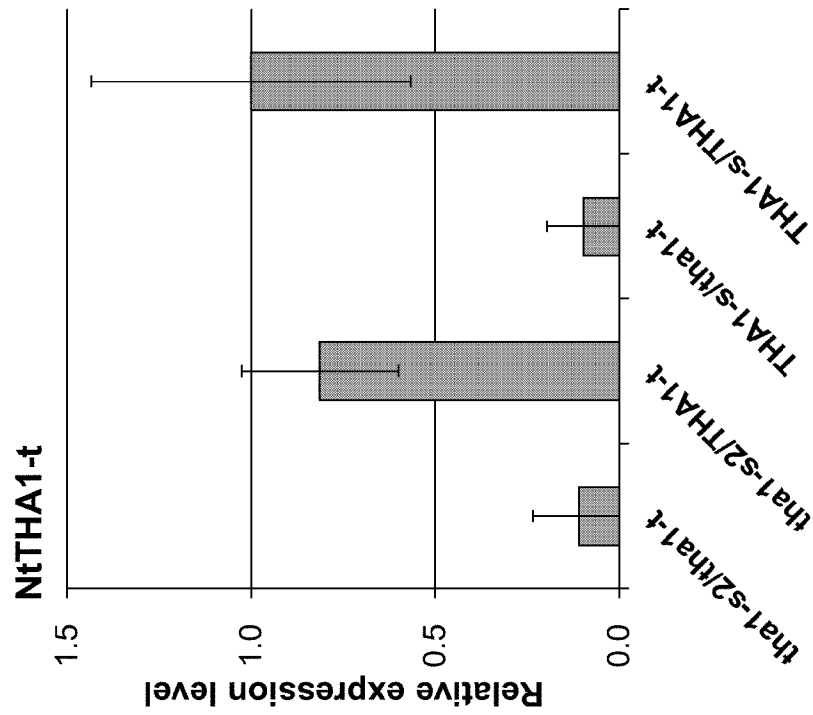
[図10]



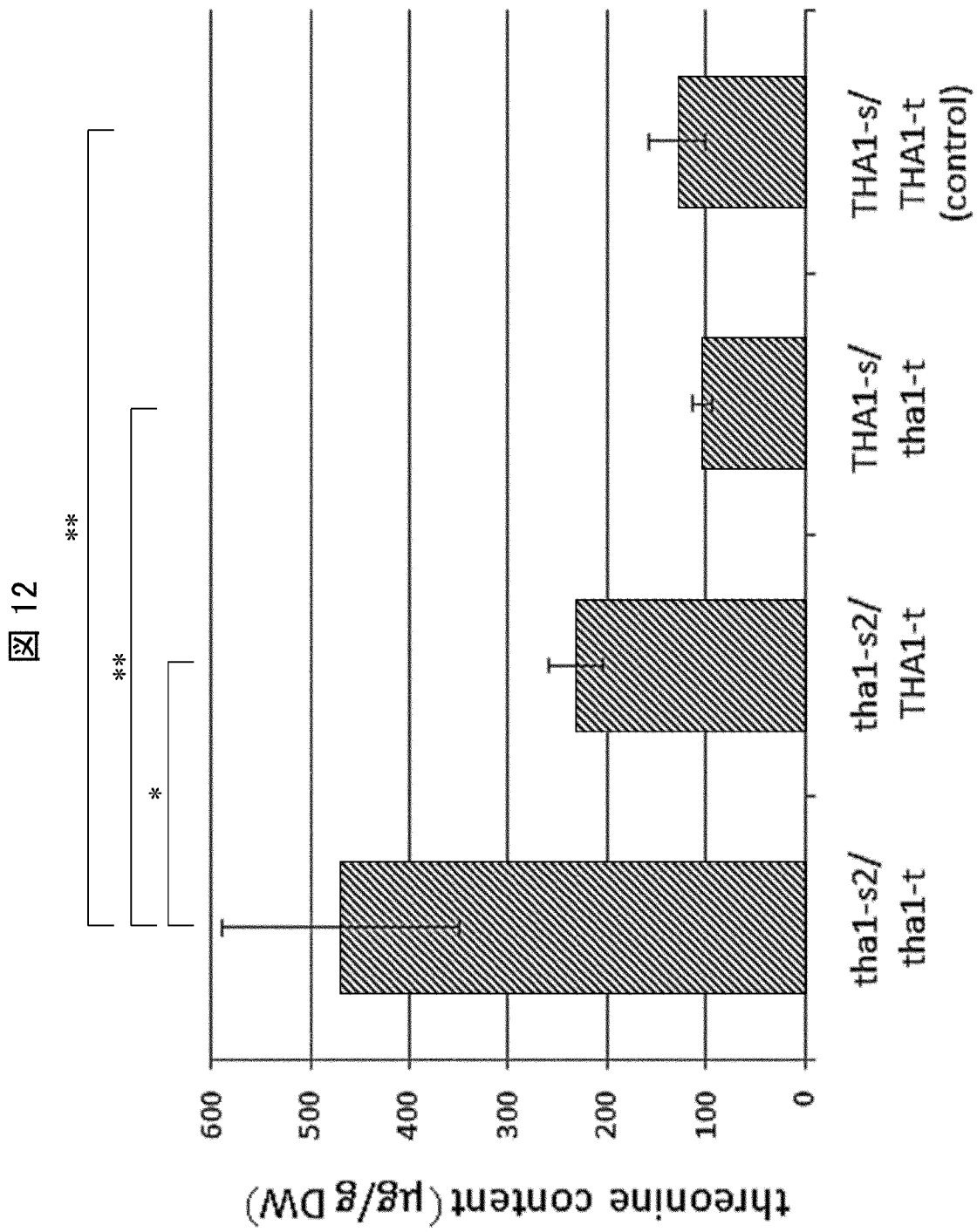
[図11]



[図11]



[図12]



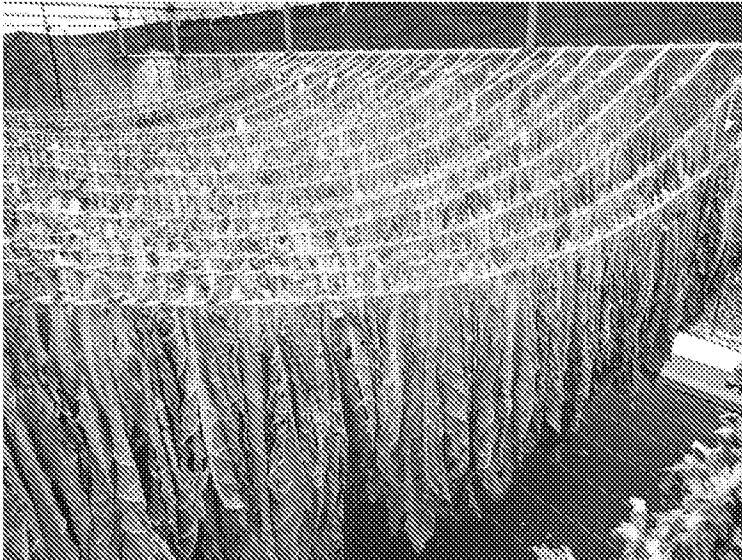
[図13]

図 13

(a)



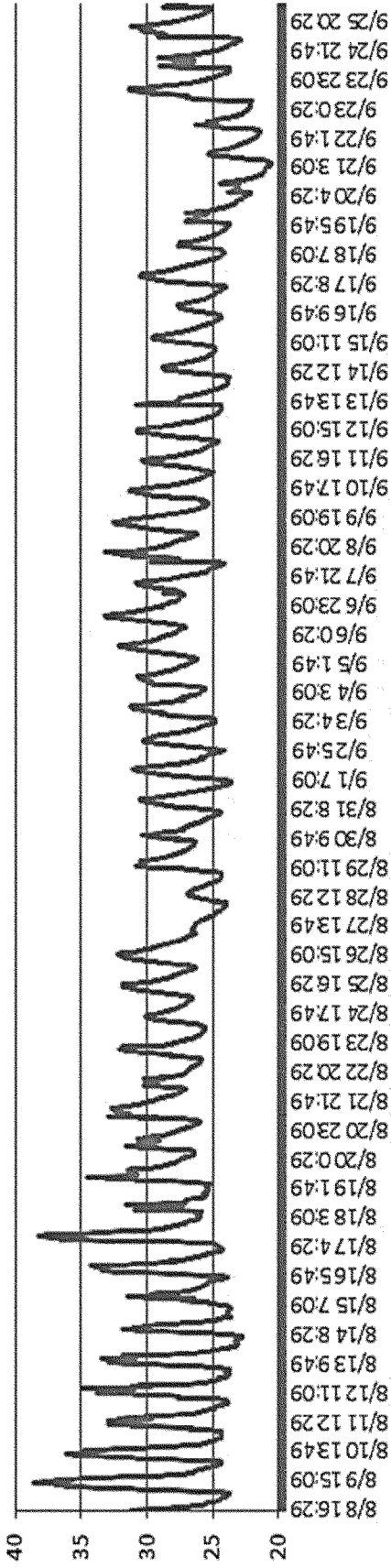
(b)



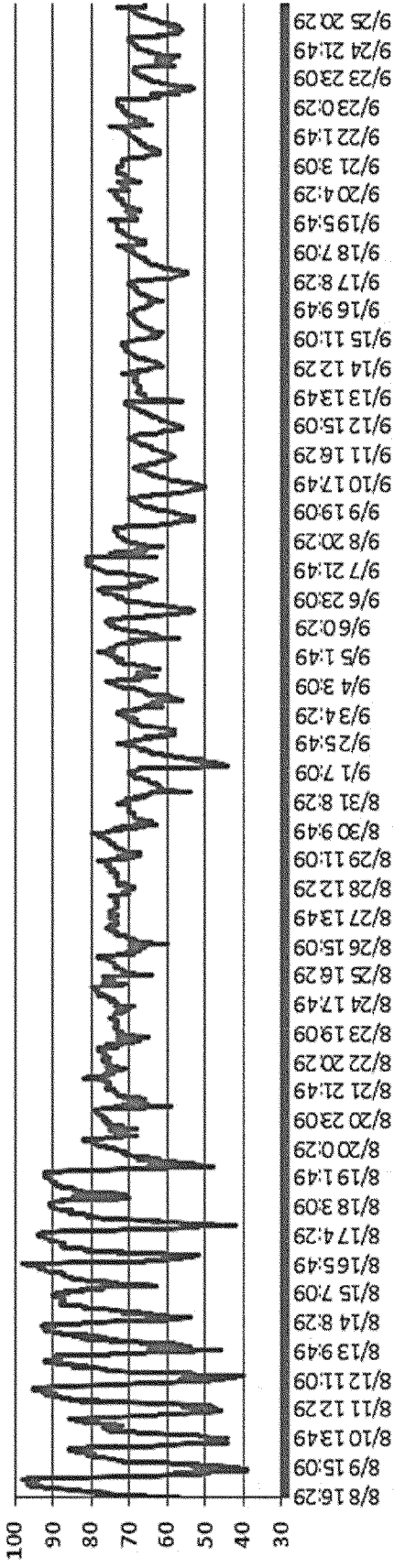
[図14]

図 14

temperature(°C)

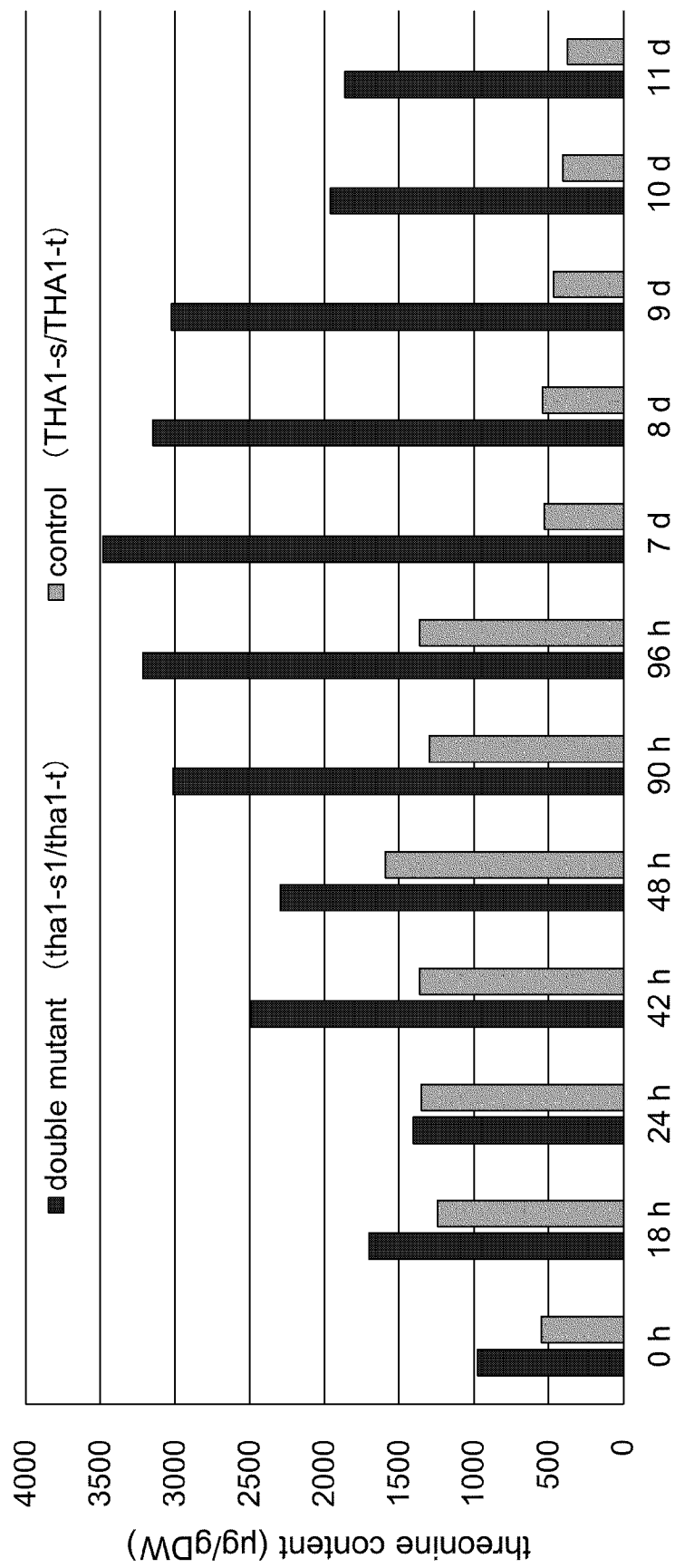


humidity(%)



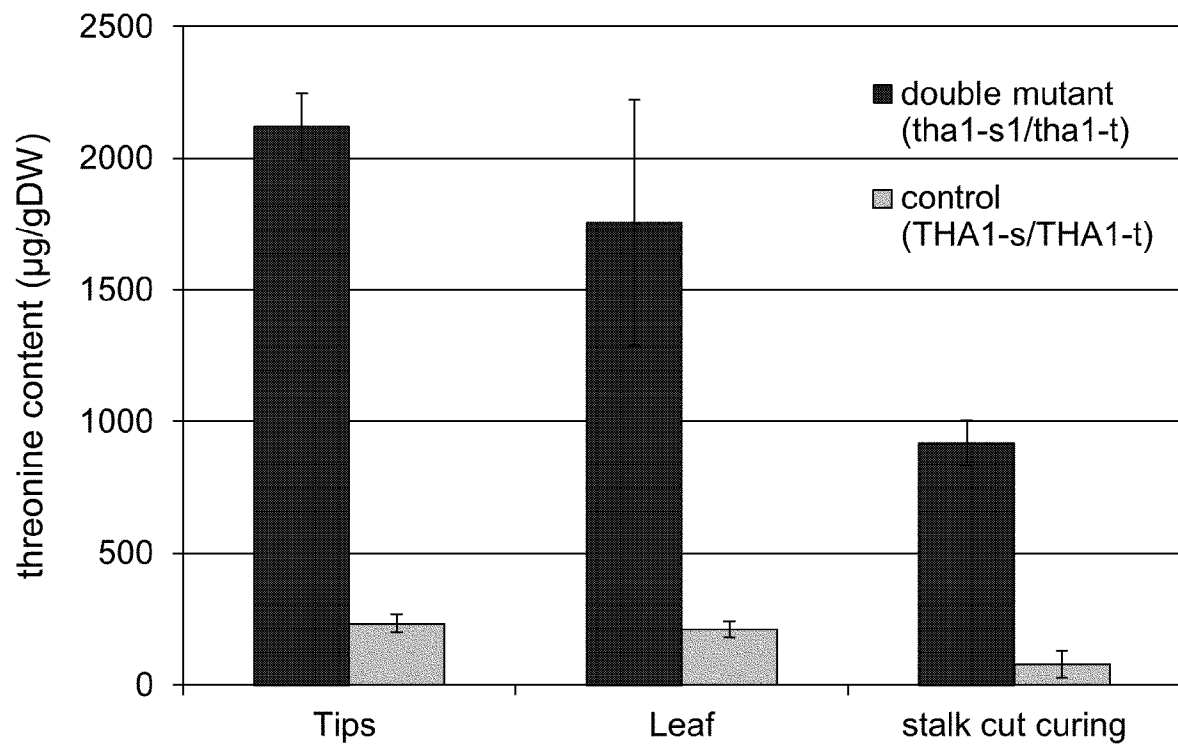
[図15]

[図15]



[図16]

図 16



[図17]

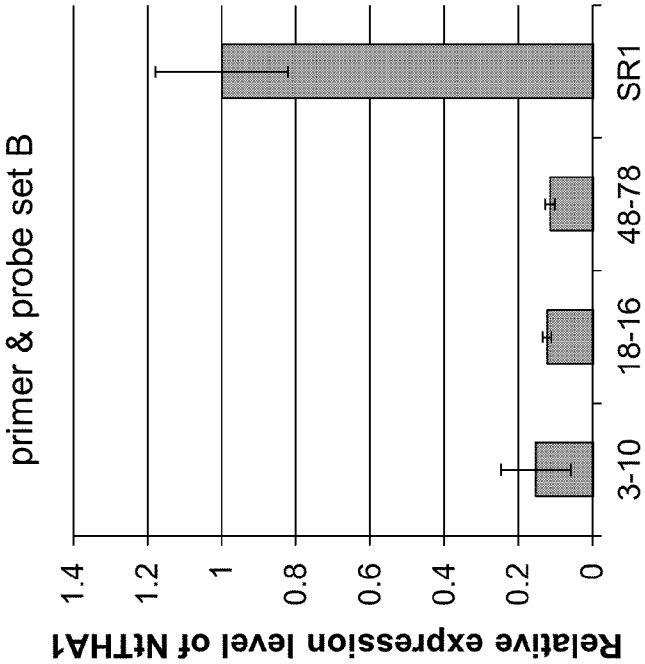
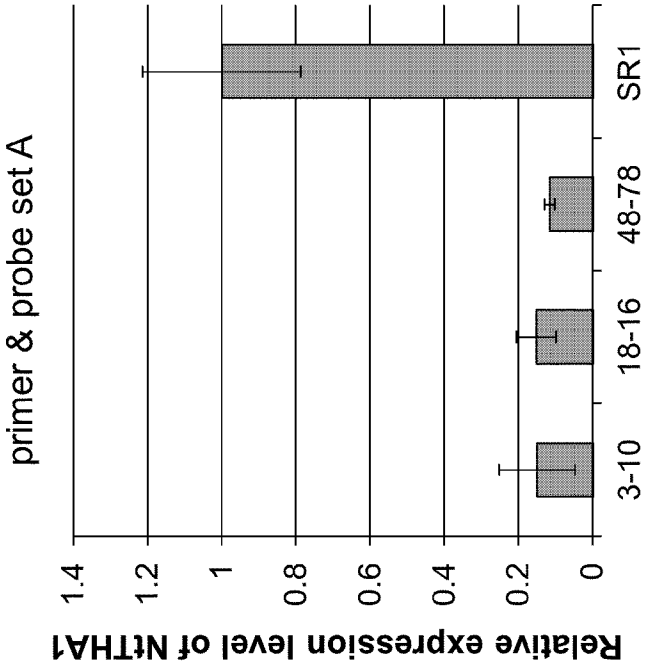
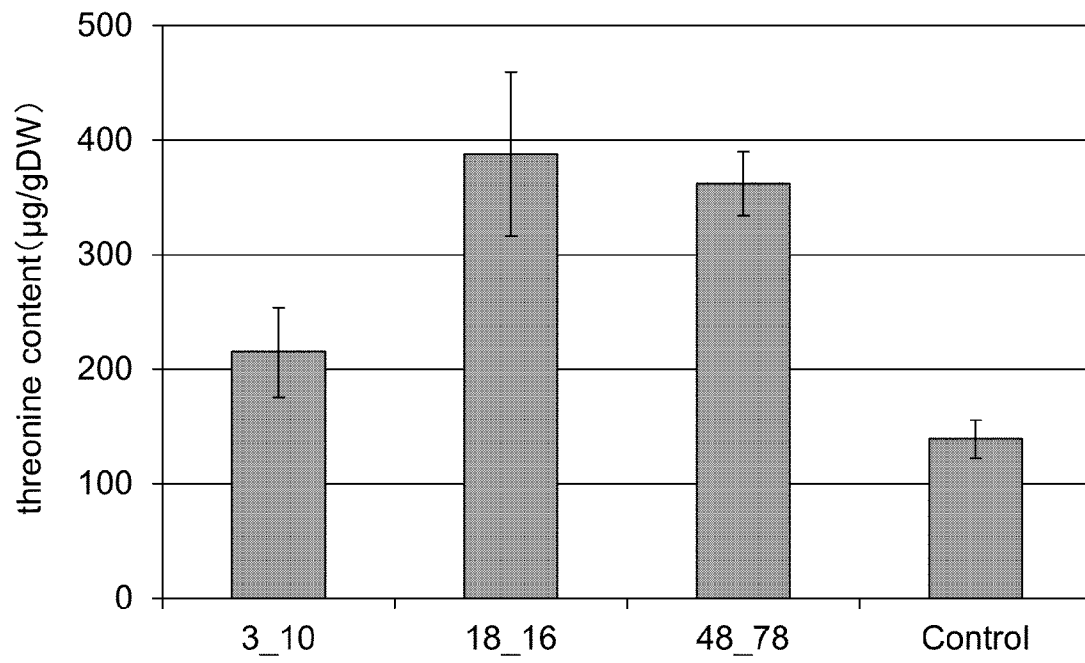


図 17



[図18]

図 18



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/029901

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A24B15/00(2006.01)i, A24B3/04(2006.01)i, A01H1/00(2006.01)n, A01H1/06(2006.01)n, A01H5/00(2006.01)n, A01H5/02(2006.01)n, A01H5/04(2006.01)n, A01H5/06(2006.01)n, A01H5/10(2006.01)n, A01H5/12(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)

A24B1/00-15/42, A01H1/00-17/00, C12N1/00-7/08, C12N15/00

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2017

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2005/047472 A2 (BOYCE THOMPSON INSTITUTE FOR PLANT RESEARCH), 26 May 2005 (26.05.2005), paragraphs [0002], [0011] to [0087] & AR 46836 A1	1-18

☒ 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
08 November 2017 (08.11.17)

Date of mailing of the international search report
21 November 2017 (21.11.17)

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/JP2017/029901

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2015-128439 A (British American Tobacco (Investments) Ltd.), 16 July 2015 (16.07.2015), paragraphs [0002], [0091] to [0095] & US 2011/0226267 A1 paragraphs [0117] to [0121] & GB 2462645 A & WO 2010/018234 A1 & EP 2310496 A1 & AU 2009281139 A1 & CA 2732800 A1 & KR 10-2011-0041575 A & CN 102203243 A & MX 2011001649 A & NZ 590889 A & RU 2011109341 A & JP 2012-500003 A	1-18
Y	US 6730832 B1 (DOMINGUEZ, Luis Mayan), 04 May 2004 (04.05.2004), column 4, lines 34 to 53; column 18, line 66 to column 19, line 14; table 2 & US 2005/0005335 A1 & US 2007/0039068 A1 & US 2011/0023178 A1	1-18
Y	WO 2015/199242 A1 (Japan Tobacco Inc.), 30 December 2015 (30.12.2015), paragraphs [0036], [0189] & US 2017/0107533 A1 paragraphs [0090], [0259] & EP 3162195 A1 & CN 106793760 A	10-18
A	JP 2013-212063 A (Ajinomoto Co., Inc.), 17 October 2013 (17.10.2013), entire text (Family: none)	1-18
A	JP 2014-533926 A (Philip Morris Products S.A.), 18 December 2014 (18.12.2014), entire text & US 2015/0106971 A1 entire text & WO 2013/029800 A1 & EP 2565271 A1 & EP 2751273 A1 & AU 2012301350 A1 & KR 10-2014-0057642 A & CN 103946384 A & MX 2014002498 A & RU 2014112759 A	1-18

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A24B15/00(2006.01)i, A24B3/04(2006.01)i, A01H1/00(2006.01)n, A01H1/06(2006.01)n,
A01H5/00(2006.01)n, A01H5/02(2006.01)n, A01H5/04(2006.01)n, A01H5/06(2006.01)n, A01H5/10(2006.01)n,
A01H5/12(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. A24B1/00-15/42, A01H1/00-17/00, C12N1/00-7/08, C12N15/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2017年
日本国実用新案登録公報	1996-2017年
日本国登録実用新案公報	1994-2017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)

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
Y	WO 2005/047472 A2 (BOYCE THOMPSON INSTITUTE FOR PLANT RESEARCH) 2005.05.26, 段落[0002],[0011]-[0087] & AR 46836 A1	1-18

☒ 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

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08.11.2017

国際調査報告の発送日

21.11.2017

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)

磯部 賢

3 L

9332

電話番号 03-3581-1101 内線 3337

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
Y	JP 2015-128439 A (ブリティッシュ アメリカン タバコ (イン ヴェストメンツ) リミテッド) 2015.07.16, 段落[0002], [0091]-[0095] & US 2011/0226267 A1, 段落[0117]-[0121] & GB 2462645 A & WO 2010/018234 A1 & EP 2310496 A1 & AU 2009281139 A1 & CA 2732800 A1 & KR 10-2011-0041575 A & CN 102203243 A & MX 2011001649 A & NZ 590889 A & RU 2011109341 A & JP 2012-500003 A	1-18
Y	US 6730832 B1 (DOMINGUEZ, Luis Mayan) 2004.05.04, 第4欄第34-53行, 第18欄第66行-第19欄第14行, 表2 & US 2005/0005335 A1 & US 2007/0039068 A1 & US 2011/0023178 A1	1-18
Y	WO 2015/199242 A1 (日本たばこ産業株式会社) 2015.12.30, 段落[0036], [0189] & US 2017/0107533 A1, 段落[0090], [0259] & EP 3162195 A1 & CN 106793760 A	10-18
A	JP 2013-212063 A (味の素株式会社) 2013.10.17, 全文 (ファミリーなし)	1-18
A	JP 2014-533926 A (フィリップ・モーリス・プロダクツ・ソシエテ・ アノニム) 2014.12.18, 全文 & US 2015/0106971 A1, 全文 & WO 2013/029800 A1 & EP 2565271 A1 & EP 2751273 A1 & AU 2012301350 A1 & KR 10-2014-0057642 A & CN 103946384 A & MX 2014002498 A & RU 2014112759 A	1-18