

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6916188号

(P6916188)

(45) 発行日 令和3年8月11日 (2021.8.11)

(24) 登録日 令和3年7月19日 (2021.7.19)

(51) Int. Cl.	F I
AO 1 H 5/00 (2018.01)	AO 1 H 5/00 Z N A A
AO 1 H 6/14 (2018.01)	AO 1 H 6/14
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09 1 1 O

請求項の数 13 (全 32 頁)

(21) 出願番号	特願2018-538510 (P2018-538510)	(73) 特許権者	515312760
(86) (22) 出願日	平成28年10月6日 (2016.10.6)		インスティテュート フォー ベーシック
(65) 公表番号	特表2018-530350 (P2018-530350A)		サイエンス
(43) 公表日	平成30年10月18日 (2018.10.18)		I N S T I T U T E F O R B A S I C
(86) 国際出願番号	PCT/KR2016/011217		S C I E N C E
(87) 国際公開番号	W02017/061806		大韓民国 テジョン 34047 ユソン
(87) 国際公開日	平成29年4月13日 (2017.4.13)		-グ ユソン-デロ 1689ボン-ギル
審査請求日	平成30年6月5日 (2018.6.5)		70
(31) 優先権主張番号	10-2015-0140314	(73) 特許権者	513246872
(32) 優先日	平成27年10月6日 (2015.10.6)		ソウル大学校産学協力団
(33) 優先権主張国・地域又は機関	韓国 (KR)		S E O U L N A T I O N A L U N I V
前置審査			E R S I T Y R & D B F O U N D A T
			I O N
			大韓民国、08826 ソウル、クアナク
			-グ (シリムドン)、クアナク-ロ、1
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プロトプラストからの全植物体の製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

予め組み立てられた Cas 9 タンパク質 - ガイド RNA RNP (r i b o n u c l e o p r o t e i n) を導入することにより、植物プロトプラスト (p r o t o p l a s t) の一つ以上の内在的遺伝子をノックアウトする段階を含む、植物プロトプラストから植物体を製造する方法であって、前記ガイド RNA は PHYB、BR1 または BIN2 に特異的に結合し、前記ガイド RNA は、配列番号 85、89、90、または 91 の配列を含む、前記方法。

【請求項 2】

前記ガイド RNA はベクターにコードされており、前記ベクターは、ウイルスベクター、プラスミドベクター、またはアグロバクテリウムベクターである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記 Cas 9 タンパク質は、NGG トリヌクレオチド (t r i n u c l e o t i d e) を認識する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記 Cas 9 タンパク質は、タンパク質伝達ドメイン (p r o t e i n t r a n s d u c t i o n d o m a i n) に接続されている、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記 Cas 9 タンパク質は、ストレプトコッカス属 (g e n u s S t r e p t o c o

10

20

c c u s) の微生物由来のものである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記ストレプトコッカス属の微生物はストレプトコッカスピヨジェンス (S t r e p t o c o c c u s p y o g e n e s) である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記植物プロトプラストはレタス (L a c t u c a s a t i v a) 由来のものである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記導入は、微細注入法、電気穿孔法、D E A E - デキストラン処理、リポフェクション、ナノパーティクル - 媒介性形質導入、タンパク質形質導入ドメイン媒介性形質導入、および P E G - 媒介形質導入からなる群から選択される方法で実行される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

遺伝子がノックアウトされた植物プロトプラストを再生させる段階をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記再生させる段階は、1 つ以上の遺伝子がノックアウトされた植物プロトプラストを、アガロースを含む培地中で培養してカルス (c a l l u s) を形成させる段階、及び前記カルスを再生培地で培養する段階を含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法によって調製されたゲノム編集された植物プロトプラストから再生された植物。

【請求項 12】

植物プロトプラストの P H Y B、B R I 1 または B I N 2 遺伝子をノックアウトする段階を含む、植物プロトプラストから植物体を製造する方法に用いるための組成物であって、予め組み立てられた C a s 9 タンパク質 - ガイド RNA RNP (r i b o n u c l e o p r o t e i n) を含有し、前記ガイド RNA は、P H Y B、B R I 1 または B I N 2 遺伝子に特異的に結合し、前記ガイド RNA は、配列番号 8 5、8 9、9 0、または 9 1 の配列を含む、前記組成物。

【請求項 13】

植物細胞で標的変異 (t a r g e t e d m u t a g e n e s i s) を誘導する、請求項 12 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、植物プロトプラスト (p r o t o p l a s t) から 1 つ以上の植物の内在的遺伝子をノックアウトまたはノックインさせる段階を含む、植物プロトプラストから植物体を製造する方法、及び前記方法で製造された遺伝体が編集された植物プロトプラストから再生された植物体に関するものである。

【背景技術】

【0002】

Z F N (z i n c f i n g e r n u c l e a s e)、T A L L E N (t r a n s c r i p t i o n a c t i v a t o r - l i k e e f f e c t o r D N A b i n d i n g p r o t e i n) と R G E N s (R N A - g u i d e d e n d o n u c l e a s e s) などの人工ヌクレアーゼ (p r o g r a m m a b l e n u c l e a s e s) は細菌、藻類などの C R I S P R C a s (t y p e I I c l u s t e r e d , r e g u l a r l y - i n t e r s p a c e d p a l i n d r o m i c r e p e a t - C R I S P R - a s s o c i a t e d) 獲得免疫システムから目的に合わせて作られた、様々な植物種から由来した細胞および有機体の誘電体校正に使用されており、生物医薬研究、医薬品、バイオテクノロジーの分野で新規な活用方法として認識されている (K i m , H .

10

20

30

40

50

etc., Nat Rev Genet, 2014, 15: 321-334)。

【0003】

上述した人工ヌクレアーゼの中でも、CRISPR RGENsは最近開発されたものであり、プログラミングの容易さのためにZFNs、TALENsを急速に置き換えられている。ストレプトコッカスピヨジェンス(*Streptococcus pyogenes*)から由来したCas9タンパク質とガイド-RNAs(gRNAs)で構成されたRGENsは、RNAの構成要素だけ交換するように設計されて、新しいTALENsとZFNsの製造に必要な労働集約的で、多くの時間かかるタンパク質工学を必要しなくなった。アグロバクテリウム(*Agrobacterium*)またはニュークラアゼをコードするプラスミドの形質導入を介して植物細胞に伝達される人工ヌクレアーゼは、序列依存的な方法で染色体標的の位置を切断して、位置-特異的DNAの二重-らせん切断(DNA double-strand breaks; DSBs)を生成する。これらの内在システムを通じたDSBsの修理は標的化遺伝体校正に使用することができる。

10

【0004】

遺伝体編集植物がヨーロッパとその他の国でGMO(genetically-modified organism)に規定されて規制されるかどうかは、現在までに不明確な状態である(Jones, H.D., Nature Plants, 2015, 1: 14011)。人工ヌクレアーゼ(programmable nuclease)は、遺伝体の標的位

20

【0005】

わりに、人工ヌクレアーゼをコーディングする非-挿入性プラスミドは、プロトプラストのような植物細胞に形質導入させることができる。しかし、本発明者らは、ヒト細胞で見られたように、形質導入されたプラスミドが細胞内で内因性ヌクレアーゼによって分解され、そこから生成された小さなDNA断片がCas9の標的(on-target)および非標的(off-target)の位置に挿入されることができるという事実に注目した(Kim, S, etc., Genome research, 2014, 24: 1012-1019)。

30

【0006】

Cas9タンパク質とgRNAをコーディングするプラスミドを植物細胞に導入する方法に比べて、予め組み立てられたCas9タンパク質-gRNA RNP(ribonucleoprotein)を利用する場合、宿主細胞の遺伝体に組換えDNAを挿入する可能性を減らすことができる。さらに、ヒト細胞で確認されたように、RGEN(RNA-guided engineered nuclease) RNPは形質導入後すぐに染色体標的の位置を切断し、細胞内で内因的タンパク質分解酵素によって急速に分解されるので、再生された植物体でモザイク現象(mosaicism)および非標的効果(off-target effect)の可能性を減少させることができる。予め組み立てられたRGEN RNPは、事前コドン最適化プロセスと各植物種からCas9とgRNAを発現させるためのプロモーターがなくても広範囲の植物種に使用することができる。さらに、RGEN RNPは高度の活性を有するgRNAを試験管内で事前にスクリーニングすることができ、RFLP(restriction fragment length polymorphism)分析を介して変異クローンの遺伝形質を確認することができる。私たちが知っている限りでは、RGEN RNP sはどのような植物種でも使用

40

50

されたことがない。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の一つの目的は、植物プロトプラストから1つ以上の植物の内在的遺伝子をノックアウトまたはノックインさせる段階を含む、植物プロトプラストから植物体を製造する方法を提供することである。

【0008】

本発明の他の一つの目的は、植物プロトプラストから植物体を製造する上記の方法で製造された、遺伝体が編集された植物プロトプラストから再生された植物体を提供することである。

10

【0009】

本発明の他の一つの目的は、BIN2 (brassinosteroid insensitive 2) 遺伝子、BKI1 遺伝子またはこれらのホモログをコードするDNAに特異的なガイドRNAまたは上記ガイドRNAをコードするDNA；とCasタンパク質をコードする核酸またはCasタンパク質を含む、植物細胞でBIN2 遺伝子をコードするDNAを切断するための組成物を提供することである。

【0010】

本発明の他の一つの目的は、BIN2 (brassinosteroid insensitive 2) 遺伝子、BKI1 遺伝子またはこれらのホモログをコードするDNAに特異的なガイドRNAまたは上記ガイドRNAをコードするDNA；とCasタンパク質をコードする核酸またはCasタンパク質を含む、植物プロトプラストから植物体を製造するための組成物を提供することである。

20

【0011】

本発明の他の一つの目的は、植物プロトプラストから植物体を製造する組成物を含んでいる、植物プロトプラストから植物体を製造するキットを提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明者らは精製されたCas9タンパク質とガイドRNAsを、様々な植物プロトプラストに形質導入し、上記プロトプラストから再生された植物体で標的化された変異の発生頻度は、最大46%であることを確認した。また、プロトプラストにCas9リボヌクレオシドタンパク質を伝達することは宿主ゲノムに外来DNAが挿入される可能性を避けることができた。前記再生された植物体は、自然に生じた変異とは区別されない、生殖細胞系列に伝達可能な小さな導入または削除を標的化された場所から持っていた。これは、本発明の方法は、アグロバクテリウムまたはプラスミドを使用する方法に関する調節要件を必要としないことを示唆しているものである。

30

【発明の効果】

【0013】

本発明では、RGEN RNPsは、様々な植物種に由来した植物プロトプラストに伝達されることができ、また、上記プロトプラストから再生された植物体で標的化されたゲノム変異を誘導することができる。

40

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】様々な植物のプロトプラストでRGEN RNP-媒介遺伝子ノックアウトを確認したものである。(a) T7E1アッセイおよび標的化ディープシーケンシング (targeted deep sequencing) で測定された変異の頻度、(b) 植物細胞でRGEN RNPによって誘導された変異DNA配列。PAM (protospacer-adjacent motif) 配列は、赤で表示し、挿入されたヌクレオチドは、青色で表示した。WT、野生型。(c) シロイヌナズナプロトプラストで誘電体校正の時間経過に伴う分析。(上部) T7E1分析。(下段) 野生型(WT)と変異配列のD

50

N A 配列。

【図2】大規模な集団でR G E N R N P - 媒介遺伝子ロックアウトを確認したものである。(a) B I N 2 遺伝子の標的配列。P A M 配列は赤で表示した。(b) 大規模な集団でT 7 E 1 分析と標的化ディープシーケンシングを介して測定した変異の頻度。(c) 植物細胞でC a s 9 タンパク質 - ガイドRNA R N P に誘導された変異DNA配列。P A M 配列は赤で表示し、挿入されたヌクレオチドは、青色で表示した。W T、野生型。

【図3】RNA R N P で処理した単一のプロトプラスト由来のマイクロカリ (m i c r o c a l l i) の遺伝型を分析した結果である。(a) マイクロカリの遺伝子型。(上部) R G E N R F L P 分析、(下段) マイクロカリで変異DNA配列。(b) T 0 世代でB I N 2 遺伝子の遺伝子型変異をまとめた表。

10

【図4】レタスで、RNA R N P を利用した標的遺伝子の削除を示す。(a) B I N 2 遺伝子の標的配列。P A M 配列は赤で表示した。(b) マイクロカリの遺伝子型。(上部) R G E N R F L P 分析、(下段) マイクロカリで変異DNA配列。(c) RNA R N P - 形質導入されたプロトプラストから再生された植物体。

【図5】非標的 (o f f - t a r g e t) 効果进行分析したものである。P H Y B と B R I 1 遺伝子 - 特異的 s g R N A s のターゲットと潜在比較的位置で変異の頻度を標的化ディープシーケンシングで測定した。インデル頻度 (i n d e l r a t e) を計算するために位置当たり弱 ~ 8 0 , 0 0 0 組の末端の断片 (r e a d s) を獲得した。

【図6】L s B I N 2 の部分ヌクレオチドおよびアミノ酸配列に対するものである。下線とボックスに表示された文字は、それぞれプライマーと s g R N A に対応する配列を示す。

20

【図7】RNA R N P - 媒介形質導入されたレタスのプロトプラストから植物体の再生過程を示すものである。RNA R N P - 媒介形質導入されたレタスのプロトプラストからプロトプラスト分裂、カルス形成およびシュート (s h o o t) の再生過程を示す。(a) プロトプラスト培養5日後、細胞分裂 (スケールバー = 1 0 0 μ m) 。(b) プロトプラストの多細胞コロニー (スケールバー = 1 0 0 μ m) 。(c) プロトプラスト培養4週間後アガロースにちりばめられたコロニー。(d) プロトプラスト - 由来コロニーからカルス形成。(e、f) プロトプラスト - 由来カルスからの器官形成、再生された芽 (スケールバー = 5 μ m) 。

【図8】変異カルスの標的化ディープシーケンシング結果に関するものである。変異カルスの遺伝型は、I l l u m i n a M i s e q で確認した。各アレルの配列及びシーケンスの断片の数を分析した。(A 1)、アレル1、(A 2)、アレル2。

30

【図9】RNA R N P - 媒介形質導入されたレタスのプロトプラストから植物体の再生を示す。(a - c) プロトプラスト - 由来カルスからの器官および芽の形成を示す。; 野生型 (W T) (# 2 8) は、両アレル (b i - a l l e l i c) / 異形接合 (h e t e r o z y g o t e) (# 2 4) は、両アレル / 同型接合体 (h o m o z y g o t e) (# 3 0) 。(d) インビトロ芽分裂と開発。(e) P G R - フリーMS培地でシュートの伸長と成長。(f) 身長されたシュートから根の誘導。(g) 苗 (p l a n t l e t s) の適応。(h、i) 再生された植物体。

【図10】B I N 2 変異アレル (a l l e l e s) の生殖細胞伝達に関するものである。(a) 再生された植物体の抽臺と開花。(b) T 0 - 1 2 と名付けた同型接合体両アレル変異から来した種子のR G E N - R F L P 分析のための遺伝型。(c) 野生型、T 0 - 1 変異、およびT 0 - 1 2 ラインから由来したT 1 の変異のDNA配列。赤い三角形は、挿入されたヌクレオチドを指す。

40

【発明を実施するための形態】

【0015】

本発明の一つの様態として、植物プロトプラスト (p r o t o p l a s t) から1つ以上の植物の内在的遺伝子をロックアウトまたはロックインさせる段階を含む、植物プロトプラストから植物体を製造する方法を提供する。

【0016】

50

一つの実施例において、上記植物の内在的遺伝子は、遺伝子のノックアウトまたはノックインによりストレス抵抗性を増加させる遺伝子であり得る。

【0017】

もう一つの実施例において、上記植物の内在的遺伝子は、植物のブラシノステロイド (brassinosteroid) シグナル伝達に關与する遺伝子であり得る。

【0018】

もう一つの実施例において、(i) 上記ノックアウトの段階において、内在的遺伝子はBIN2 遺伝子、BKI1 遺伝子、及びこれらのホモログ遺伝子からなる群から選択される1つ以上のものであり、(iI) 上記ノックインの段階において、内在的遺伝子は、BRI1 遺伝子、BSU 遺伝子、BZR1 遺伝子、DWF4 遺伝子、CYP85A1、およびこれらのホモログ遺伝子からなる群から選択される1つ以上であり得る。

10

【0019】

もう一つの実施例において、上記の遺伝子のノックアウトはBIN2 遺伝子、BKI1 遺伝子、及びこれらのホモログ遺伝子からなる群から選択される1つ以上の遺伝子のアレルのいずれか一つまたは二つをノックアウトすることができる。

【0020】

もう一つの実施例において、上記の遺伝子のノックアウトは、遺伝子ノックアウト (gene knock-out) を介して実行されるものであり、上記の遺伝子のノックインは、遺伝子ノックイン (gene knock-in) を介して実行されることができ

20

【0021】

もう一つの実施例において、上記の遺伝子ノックアウトはBIN2 遺伝子、BKI1 遺伝子、及びこれらのホモログ遺伝子からなる群から選択される1つ以上の遺伝子に特異的な人工ヌクレアーゼ (engineered nuclease) を利用して実行することができ

【0022】

もう一つの実施例において、上記の人工ヌクレアーゼはジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN)、転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN)、およびRNAガイド人工ヌクレアーゼ (RGEN) からなる群から選択することができ

30

【0023】

もう一つの実施例において、上記のRGENはBIN2 遺伝子、BKI1 遺伝子、及びこれらのホモログ遺伝子からなる群から選択される1つ以上の遺伝子の特定配列に特異的に結合するガイドRNAまたは上記ガイドRNAをコードするDNA、並びにCasタンパク質をコードする核酸またはCasタンパク質を含んでいるものであり得る。

【0024】

もう一つの実施例において、上記の遺伝子のノックアウトはBIN2 遺伝子、BKI1 遺伝子、及びこれらのホモログ遺伝子からなる群から選択される1つ以上の遺伝子の特定配列に特異的に結合するガイドRNAまたは上記ガイドRNAをコードするDNA；並びにCasタンパク質をコードする核酸またはCasタンパク質を植物プロトプラストに導入して実行することができ

40

【0025】

もう一つの実施例において、上記ガイドRNAはcrRNAとtracrRNAを含む二重RNA (dual RNA) または単一鎖ガイドRNA (sgRNA) の形態であり得る。

【0026】

もう一つの実施例において、上記単一鎖ガイドRNAはcrRNAとtracrRNAの部分を含むことができる。

【0027】

もう一つの実施例において、上記単一鎖ガイドRNAは、単離されたRNAの形態であり得る。

50

【0028】

もう一つの実施例において、上記ガイドRNAをコードするDNAは、ベクターにコードされており、上記ベクターは、ウイルスベクター、プラスミドベクター、またはアグロバクテリウムベクターであることができる。

【0029】

もう一つの実施例において、上記のCasタンパク質はCas9タンパク質またはそれらの変異体であることができる。

【0030】

もう一つの実施例において、上記のCasタンパク質は、NGGトリヌクレオチド (trinucleotide) を認識することができる。

10

【0031】

もう一つの実施例において、上記のCasタンパク質は、タンパク質伝達ドメイン (protein transduction domain) に接続されていることができる。

【0032】

もう一つの実施例において、上記Cas9タンパク質の変異体は、触媒アスパラギン酸 (aspartate) 残基が他のアミノ酸に置換されたCas9の変異形であることができる。

【0033】

もう一つの実施例において、上記のアミノ酸は、アラニン (alanine) であることができる。

20

【0034】

もう一つの実施例において、上記Casタンパク質をコードする核酸またはCasタンパク質は、ストレプトコッカス属 (genus Streptococcus) 由来であることができる。

【0035】

もう一つの実施例において、上記ストレプトコッカス属はストレプトコッカスピヨジェンス (Streptococcus pyogenes) であることができる。

【0036】

もう一つの実施例において、上記植物プロトプラストはレタス (Lactuca sativa) 由来であることができる。

30

【0037】

もう一つの実施例において、上記の導入はCasタンパク質をコードする核酸またはCasタンパク質、及び前記ガイドRNAまたはガイドRNAをコードするDNAを植物プロトプラストに同時形質導入 (co-transfecting) または連続形質導入 (serial-transfecting) することができる。

【0038】

もう一つの実施例において、上記連続形質導入はCasタンパク質またはCasタンパク質をコードする核酸を、まず形質導入し、ネイキッドガイドRNA (naked guide RNA) を二番目に形質導入して行うことができる。

40

【0039】

もう一つの実施例において、上記の導入は、微細注入法、電気穿孔法、DEAE-デキストラン処理、リポフェクション、ナノパーティクル媒介形質導入、タンパク質伝達ドメイン媒介形質導入、ウイルス-媒介遺伝子伝達、およびPEG-媒介形質導入で構成された群から選択された方法で行うことができる。

【0040】

もう一つの実施例において、上記方法は、遺伝子がロックアウトされた植物プロトプラストを再生させる段階をさらに含むことができる。

【0041】

もう一つの実施例において、前記再生させる段階は、BIN2遺伝子、BKI1遺伝子

50

、及びこれらのホモログ遺伝子からなる群から選択される1つ以上の遺伝子がロックアウトされた植物プロトプラストを、アガロースを含む培地で培養させてカルス(calls)を形成させる段階、及び前記カルスを再生培地で培養する段階を含むことができる。

【0042】

本発明の他の一つの様態として、上記の方法によって製造された誘電体が編集された植物プロトプラストから再生された植物体を提供する。

【0043】

本発明のもう一つの様態として、BIN2(brassinosteroid insensitive 2)遺伝子、BKI1遺伝子またはこれらのホモログをコードするDNAに特異的なガイドRNAまたは上記ガイドRNAをコードするDNA；並びにCasタンパク質をコードする核酸またはCasタンパク質を含む、植物細胞でBIN2遺伝子をコードするDNAを切断するための組成物を提供する。

10

【0044】

別の実施例において、前記組成物は、植物細胞で標的変異(targeted mutagenesis)を誘導することができる。

【0045】

本発明のもう一つの様態として、BIN2(brassinosteroid insensitive 2)遺伝子、BKI1遺伝子またはこれらのホモログをコードするDNAに特異的なガイドRNAまたは上記ガイドRNAをコードするDNA；並びにCasタンパク質をコードする核酸またはCasタンパク質を含む、植物プロトプラストから植物体を製造するための組成物を提供する。

20

【0046】

本発明のもう一つの様態として、前記組成物を含む、植物プロトプラストから植物体を製造するためのキットを提供する。

[発明を実施するための形態]

【0047】

以下、本発明を実施例を通じてより詳細に説明する。しかし、これらの実施例は、本発明を例示的に説明するためのもので、本発明の範囲がこれらの実施例に限定されるものではない。

【0048】

30

方法

【0049】

Cas9タンパク質とガイドRNAs。

核位置信号が接続されてCas9タンパク質はToolGen、Inc. (South Korea) から購入した。Phusionポリメラーゼ(表1-4)を使用したオリゴ-延長(oligo-extension)を介してガイドRNA転写の鋳型を製造した。T7 RNAポリメラーゼ(New England Biolabs)を使用したラン-オフ(run-off)反応でガイドRNAsを試験管内で転写した。反応混合物は、1X DNase I反応バッファーに含まれているDNase I(New England Biolabs)で処理した。転写されたsgRNAsの品質を評価するためにSYBR gold染色(Invitrogen)された8%変性尿素-ポリアクリルアミドゲル(urea-polyacrylamide gel)でsgRNAsを確認した。転写されたsgRNAsをMGTM PCR Product Purification SV(Macrogen)で精製し、分光光度計でsgRNAsの量を測定した。

40

【0050】

【表 1】

T 7 E 1 アッセイに使用されたプライマーのリスト

Target	1 st PCR		2 nd PCR	
	Forward (5' to 3')	Reverse (5' to 3')	Forward (5' to 3')	Reverse (5' to 3')
AOC	CGAGCTCAATG AACGTGACC (配列番号: 1)	GATCAGAATG CAGAGTCC AGC (配列番号: 2)		ATGCAGAGTC CAGCCGT TAT (配列番号: 3)
PHYB	TGGTTGTTTGC CATCACACT (配列番号: 4)	GAAAAGCCTG AAAGGACGAA (配列番号: 5)		GCCTCCCCATT TGATTTCCT (配列番号: 6)
P450	GGAGCTGAAC CACTTCATCC(S (配列番号: 7)	CCCAGCACCTG CTTCACTAT (配列番号: 8)	ACCCAGGCC AATTCATG (配列番号: 9)	GGGACAAAGA TTCATGCAGCA (配列番号: 10)
DWD1	CCTTTTCTTTG TGGGGTGTG (配列番号: 11)	TCCTTCTCCCT CTCCTCCTG (配列番号: 12)	ATCTCGTGCCA TCTCCATCC(SE (配列番号: 13)	
BR11	ATTTGGGCTGA TCCTTGTTG (配列番号: 14)	TGTTGAACACC TGAAACTTTGG (配列番号: 15)	ACCAATTGGA AGCTGACTGG (配列番号: 16)	CCATGCCAAA ATCTGAAACC((配列番号: 17)

10

20

【 0 0 5 1 】

30

【表 2】

標的化ディープシーケンスに使用されたプライマーのリスト（第1プライマー）

標的	フォワード (5' to 3')	リバース (5' to 3')
PHYB-OTI	CCGCATTCAACAGCTCTCT C (配列番号: 18)	GCTCAAATCAGGTGGCTAC G (配列番号: 19)
PHYB-OT2	AGGCTGTTCAAAGTCCAGG T (配列番号: 20)	ATCGCTGGGAGTTCAACAG A (配列番号: 21)
PHYB-OT3	CCAATGGGCCTGAAAGCTT T (配列番号: 22)	ACAACCAAAATCCGCAACG A (配列番号: 23)
BRII-TSI-OTI	CGCAAGTTGGTCAGAGTGA A (配列番号: 24)	ACAAGGAGGCTGACGGAA A (配列番号: 25)
BRII-TS 1- OT2	ACTCGTTACAGGACTCGGT G (配列番号: 26)	TACAGAGCTGCTTCTGGAC C (配列番号: 27)
BRII-TSI- OT3	TTACCGTAGCTGGGATCGT C (配列番号: 28)	GACTTGTCTCCCTCGCCAT A (配列番号: 29)
BRII-TSI-OT4	GCAAGGACGGATGAGAAA C C (配列番号: 30)	TGGCATAGTCGCTATTTG C (配列番号: 31)
BRII-TSI- OT5	GTCTCCAAAATCCTCGTCG C (配列番号: 32)	GGAAAATTTCTCCCCGCCT C (配列番号: 33)
BRII-TSI- OT6	TATGGCGGAAGGTGTAGGT C (配列番号: 34)	TTGCTTGGCTGAAACTCAC C (配列番号: 35)
BRII-TS2- OT1	CGAGTGCTGATGTGTGTGT T (配列番号: 36)	TCTCTTGGTGCAGGGTGAA T (配列番号: 37)
BRII-TS2-OT2	CCCTCTCAATTGCAGCCATT (配列番号: 38)	CGTGTCTTCCTCTGCCATT G (配列番号: 39)
BRII-TS2-OT3	ACATTTGCTGCATTGGGAT C T (配列番号: 40)	CCAACCCGGCTCAAACCTA C (配列番号: 41)
BRII-TS2- OT4	CTCGTCTCAGCCAGGTTAG T (配列番号: 42)	ATCAAGAATCCAATGGCGG C (配列番号: 43)

10

20

30

40

【表 3】

標的化ディープシーケンスに使用されたプライマーのリスト（第2プライマー）

	Sequence (5' to 3')
AOC-deepF	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCGAGC TCAATGAACGTGACC(配列番号: 44)
AOC-deepR	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGATC AGAATGCAGAGTCCAGC(配列番号: 45)
PHYB-deepF	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGCAAA TGTCAGAGAAACGCG(配列番号: 46)
PHYB-deepR	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTATCA GTGCTTAATCCGGTTGA(配列番号: 47)
P450-deepF	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTACCCC AGGCCAATTCATG(配列番号: 48)
P450-deepR	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGCT CTGGTTTCAAGTTAGTACA(配列番号: 49)
DWD1-deepF	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCTGCC ACAACCAACGGA TC(配列番号: 50)
DWD1-deepR	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGGA TTCAGACCCACCCG(配列番号: 51)
BRI1-TS1-deepF	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTTGCG GATCTTCTTCAGGCT(配列番号: 52)
BRI1-TS1-deepR	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCTC GTCTCCAACCTTTGCAA(配列番号: 53)
BRI1-TS2-deepF	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTTGCA AAGTTGGAGACGAGC(配列番号: 54)
BRI1-TS2-deepR	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTATCT GAAACCCGAGCTTCCA(配列番号: 55)
BIN2-deepF	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTGTTG TTTCTTTGAAGCATTGT(配列番号: 56)
BIN2-deepR	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGCC ACTCACA TCACATGT(配列番号: 57)
PHYB-OT1-deepF	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTTCAT GAAGGTGGCTCAGGT(配列番号: 58)
PHYB-OT1-deepR	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTC ATTCTCTTGCCGTGGG(SEQ ID NO: 59)

10

20

30

40

	ATTCTCTTGCCGTGGG(配列番号: 59)	
PHYB-OT2-deepF	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGGTGA CAATGTGGCTAATGGT(配列番号: 60)	
PHYB-OT2-deepR	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACTC GGCCAATGTTACTCCA(配列番号: 61)	
PHYB-OT3-deepF	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGGCTT GTTGGGTGATCTTGA(配列番号: 62)	
PHYB-OT3-deepR	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGACC CACTTCACAGAAAGCA(配列番号: 63)	10
BRI1-TS 1-0T1-dee pF	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTCTGC ACGATTCTACCTGACA(配列番号: 64)	
BRI1-TS 1-0T1-dee pR	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCTC CTGTCATGTGTTCTAAC(配列番号: 65)	
BRI1-TS 1-0T2-dee pF	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTAGCT ATGCCGGTGGAAGTT(配列番号: 66)	
BRI1-TS 1-0T2-dee pR	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACAG AAGTAGCCATTCCGAGA(配列番号: 67)	
BRI1-TS 1-0T3-dee pF	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCGGAG ACCTTTAAGCTTCGC(配列番号: 68)	20
BRI1-TS 1-0T3-dee pR	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGCA AAACCATCAGCAGTGG(配列番号: 69)	
BRI1-TS 1-0T4-dee pF	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGTTTG AAGAAGGTGGCCCAG(配列番号: 70)	
BRI1-TS 1-0T4-dee pR	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGTG GGACGATCGAGCTTAT(配列番号: 71)	
BRI1-TS 1-0T5-dee pF	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTGACT AACCGCTTGTCCTCA(配列番号: 72)	
BRI1-TS 1-0T5-dee pR	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACGT TGCCAGTAAAGTTCGC(配列番号: 73)	30
BRI1-TS 1-0T6-dee pF	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCGTCT CTTACTCGCCTCCTT(配列番号: 74)	
BRI1-TS 1-0T6-dee pR	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCAT CTGAGGTTGGTTCGACA(配列番号: 75)	
BRI1-TS2-0T1-dee	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTCATT	

pF	CAGCTTTGCCAAACCA(配列番号: 76)
BRI1-TS2-0T1-dee pR	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCCG GTGGAATTACTGCTCA(配列番号: 77)
BRI1-TS2-0T2-dee pF	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTGTTC ACAATTACTGCCACCA(配列番号: 78)
BRI1-TS2-0T2-dee pR	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACTC TCTACGATCGCAACTCT(配列番号: 79)
BRI1-TS2-0T3-dee pF	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGGAGA TGGAGGGGATGGAAC(配列番号: 80)
BRI1-TS2-0T3-dee pR	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCGGC TCTGAACAGGTCTACA(配列番号: 81)
BRI1-TS2-0T4-dee pF	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTGCAA TCAGATGTCCGGTCA(配列番号: 82)
BRI1-TS2-0T4-dee pR	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGTAC CTCTTCAGCAACCAAGT(配列番号: 83)

10

【 0 0 5 3 】

【 表 4 】

インビトロ転写鋳型

20

	配列 (5' to 3')
AOC-sgF	GAAATTAATACGACTCACTATAGCAAAAGACTGTCAATTCCC TGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG(配列番号: 84)
PHYB- sgF	GAAATTAATACGACTCACTATAGGCACTAGGAGCAACACCCA ACGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG(配列番号: 85)
P450-sgF	GAAATTAATACGACTCACTATAGGCATATAGTTGGGTCATGG CAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG(配列番号: 86)
DWD1- TS 1-sgF	GAAATTAATACGACTCACTATAGGTGCATCGTCCAAGCGCAC AGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG(配列番号: 87)
DWD1- TS 2-sgF	GAAATTAATACGACTCACTATAGGCTACGACGTCAGGTTCTA CCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG(配列番号: 88)
BRI1- TS1- sgF	GAAATTAATACGACTCACTATAGGTTTGAAAGATGGAAGCGC GGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG(配列番号: 89)
BRI1- TS2- sgF	GAAATTAATACGACTCACTATAGGTGAAACTAACTGGTCCA CAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG(配列番号: 90)
BIN2-sgF	GAAATTAATACGACTCACTATAGATCACAGTGATGCTCGTCA AGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG(配列番号: 91)
Universal sgR	AAAAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGG ACTAGCCTTATTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAC(配列番号 : 92)

30

40

【 0 0 5 4 】

プロトプラスト培養。既存の公知の方法に基づいてシロイヌナズナ、イネ、およびレタスからプロトプラストを分離した。まず、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 生態型 Columbia-0、稲 (*Oryza sativa* L.) cv. ドンジン、およびレタス (*Lactuca sativa* L.) cv. チョンチ

50

マの種子を70%エタノール、0.4%次亜塩素酸(hypochlorite)溶液で15分間滅菌した後、蒸留水で3回洗浄し、2%スクロースを含有する1/2X MS固形培地で培養した。培養は、成長室で16時間明条件($150\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$)、8時間暗条件で25で行った。プロトプラストを分離するために、14日目になるシロイヌナズナの苗(plantlets)、14日目になる稲の苗由来幹と葉、7日目になるレタス苗の子葉を暗条件で25で12時間酵素溶液(1.0%セルラーゼR10、0.5%マセロザイム(macerozyme)R10、0.45Mマンニトール、20mM MES[pH 5.7]、CPW溶液)と一緒に40rpmで攪拌しながらインキュベーションして分解し、同量のW5溶液で希釈した。上記混合物を濾過し、丸底チューブで100gで5分間遠心分離してプロトプラストを回収した。再懸濁されたプロトプラストをCPW 21S溶液(21%[w/v]スクロース含有CPW液、pH5.8)に浮かべ精製し、80gで7分間遠心分離した。精製されたプロトプラストをW5溶液で洗浄した後、70gで5分間遠心分離してペレットを形成した。最後に、プロトプラストをW5溶液に再懸濁して、ヘマサイトメーター(hemocytometer)を利用して顕微鏡で数を数えた。プロトプラストを 1×10^6 プロトプラスト/1ml MMG溶液(0.4Mマンニトールおよび15mM MgCl_2 、4mM MES[pH 5.7])の密度に希釈した。

10

【0055】

プロトプラスト形質導入。従来の方に基づいてPEG-媒介RNP形質導入を行った。RNP複合体を利用したDSB(double strand break)を誘導するために、 1×10^5 個のプロトプラスト細胞をインビトロ転写されたsgRNA(20-120 μg)と事前に混合されたCas9タンパク質(10-60 μg)で形質導入した。形質導入を行う前に、保存溶液(20mM HEPES pH7.5、150mM KCl、1mM DTTおよび10%グリセロール)に含まれているCas9を1X NEBバッファ-3に含まれているsgRNAと混合し、室温で10分間インキュベーションした。上記 1×10^5 個(またはレタスの場合は、 5×10^5 個)のプロトプラスト混合物を200 μl MMG溶液に再懸濁させ、5-20 μl RNP複合体と210 μl の新たな製造したPEG溶液(40%[w/v]PEG4000; Sigma No. 95904、0.2Mマンニトールと0.1M CaCl_2)を慎重に混合した後、暗条件の25で10分間インキュベーションした。次に、950 μl のW5溶液(2mM MES[pH 5.7]、154mM NaCl、125mM CaCl_2 および5mM KCl)をゆっくりと添加して、慎重に混合した。100gで3分間遠心分離してプロトプラストペレットを得ており、これをW1溶液(0.5Mマンニトール、20mM KCl、および4mM MES、pH5.7)1mlに再懸濁させた。以後、プロトプラストをマルチ-ウェルに移し、暗条件の25で24-48時間インキュベーションした。上記細胞は、形質導入の一日後に分析した。

20

30

【0056】

プロトプラスト再生。RNPで形質浸透させたプロトプラストを375mg/L $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、18.35mg/L NaFe-EDTA、270mg/L ナトリウムソクシネイト(sodium succinate)、103g/L スクロース、0.2mg/L 2,4-D、0.3mg/L 6-BAP(benzylaminopurine)、および0.1g/LのMESを含有する1/2X B5培地に再懸濁させた。その次のプロトプラストを1/2X B5培地と2.4%アガロースの1:1溶液と一緒に混合して、 2.5×10^5 プロトプラスト/mlの密度で培養した。アガロースに囲まれたプロトプラストを6ウェルプレートに移し、2mlの1/2X B5培地で25の暗条件で培養した。7日後、上記培地を新しい培地に交換し、25の明条件($16\text{時間明}[30\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}]$ と8時間暗条件)で培養した。培養3週間後、マイクロカリを直径数mmまで育て、30g/L スクロース、0.6% プラントアガ、0.1mg/L α -NAA(naphthaleneacetic acid)、0.5mg/L BAPを含有するMS再生培地に移し培養した。再生培地で約4週間経過後、多数

40

50

のレタス芽 (shoot) が誘導されたことを確認した。

【0057】

レタスの根誘導と土壌からの成長。植物体を再生するために、分裂と伸長された芽を新鮮な再生培地に移した後、25 の明条件 (16 時間人 [30 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$] と 8 時間暗条件) で培養した。根誘導のために、約 3 - 5 cm の長さの苗 (plantlets) を摘出してマゼンタ (Magenta) 容器に入れられた固体ホルモン - フリー 1 / 2 X 培地に移した。芽から由来した苗を土壌に移植し、25 の成長チャンバー (100 - 150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ - 1 の白色蛍光灯の下で 6 時間の光周期条件) に維持して、新しい環境に順応させた。

【0058】

T7E1 分析。DNeasy Plant Miniキット (Qiagen) を用いてプロトプラストまたはカルスから誘電体 DNA を分離した。標的 DNA 領域を増幅させて T7E1 分析を行った。具体的には、PCR 産物を 95 で変性させ、サーマルサイクラー (thermal cycler) を用いて常温まで温度をゆっくりと下げた。アニールされた PCR 産物を 37 で 20 分間 T7 エンドヌクレアーゼ I (Tool Gen, Inc.) とインキュベーションし、アガロースゲル電気泳動を使用して分析した。

【0059】

RGEN - RFLP 分析。従来方法に基づいて RGEN - RFLP 分析を行った。1 X NEB 緩衝液 3 で PCR 産物 (300 - 400 ng) と Cas9 タンパク質 (1 μg) と sgRNA (750 ng) を反応体積 10 μl で、37 で 60 分間インキュベーションした。その後、前記反応混合物に RNase A (4 μg) を添加し、37 で 30 分間インキュベーションして sgRNA を除去した。その次の 6 X 停止溶液 (30 % グリセロール、1.2 % SDS、および 250 mM EDTA) を添加して反応を停止させた。2.5 % アガロースゲルを用いて DNA 産物を電気泳動した。

【0060】

標的化ディープシーケンシング。遺伝体 DNA から標的位置 (on-target site) を増幅させた。インデックスとシーケンスアダプターを追加の PCR を介して付加した。Illumina Miseq (v2, 300-cycle) を利用して、高スループットシーケンシング (high-throughput sequencing) を行った。

【0061】

結果

【0062】

前に組み立てられた RNP を形成するために、三つの植物種から 4 つの遺伝子を標的する sgRNA の 10 倍モル過剰の精製された Cas9 タンパク質とインビトロで混合した。ポリエチレングリコール (PEG) が存在する条件では、RGEN RNPs を、シロイヌナズナ (*A. thaliana*)、野生型タバコ (*N. attenuata*) と稲 (*O. sativa*) に由来したプロトプラストとインキュベーションした。形質導入細胞の変異頻度を測定するために T7E1 分析と標的化ディープシーケンシングを使用した (図 1a、b)。インデル (indels) は予想された位置、すなわち、PAM (NGG protospacer-adjacent motif) の 3 ヌクレオチド (nt) 上流から 8.4 ~ 44 % の範囲の頻度で検出された。

【0063】

ヒト細胞から確認したように、同時に生じた二つの DSBs を編集することが挿入された配列の標的化結実を生じさせることができるかどうかを調査しようと、シロイヌナズナなどの遺伝子から 201 bps で分離されたところを目標とする二つの sgRNA を同時形質導入した。サンガーシーケンシング (Sanger sequencing) の結果を使用して、プロトプラストで 223 bp の DNA 配列が結実されることを確認した (図 1c)。RGEN - 媒介変化は、形質導入 24 時間後に観察された。これにより、RGENs は形質導入後すぐに標的位置を切断し、細胞分裂の全体サイクルの前に変異を誘導するこ

10

20

30

40

50

とが確認された。

【0064】

次に、本発明者らはRGEN RNPsが標的位置(on-target)と高い相同性を有する位置での非標的(off-target)の変異を誘導するかどうか分析した。シロイヌナズナの遺伝体でピトクロムB(PHYTOCHROME B; PHYB)とブラシノステロイド感受性1(BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1; BRI1)遺伝子特異的なsgRNAsの潜在的な非標的位置を調査し、変異の頻度を測定するためにCas-Offinderプログラムと標的化ディープシーケンシングを使用した(図5)。2~5ヌクレオチドによる標的位置とは異なってインデルはどの位置でも発見されなかったが、これはヒトの細胞に対する本発明者の既存の研究内容と一致することを確認した。

10

【0065】

本発明者らは、ブラシノステロイド(brassinosteroid; BR)シグナル伝達経路の負のレギュレータをコードするBIN2(BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 2)遺伝子をノックアウトするために、RGEN標的位置(配列番号93)を設計した(図2a)。PEGが存在する条件でRGEN RNPを形質導入し、RGENによって誘導された標的遺伝子の変異の効率を測定するために、T7E1分析および標的化ディープシーケンシングを用いた。インデルは予想された位置、すなわち、PAM(NGG protospacer adjacent motif)の3'nt上流で検出され、T7E1分析時8.3~11%(平均9.0%)の範囲の変化率とNGS解析時3.2~5.7%(平均4.3%)の範囲の変化率を示した(図2b、c)。

20

【0066】

本発明者らは、上記RGEN-RNPを処理したレタスのプロトプラストからBIN2変異アレルを持つ植物体を製造した。その結果、上記プロトプラストのごく一部(<0.5%)だけがカルスを経て完全な植物体に培養されることを確認した。これらのなか、35個のプロトプラストのラインに対して追加的な分析を行った(図3)。具体的には、本発明者らは、レタス、マイクロカリの遺伝子型についてRGEN-RFLP分析と標的化ディープシーケンシングを行った。RGEN-RFLP分析は、ヘテロ接合両アレル(bi-allelic)変異クローン(非切断)と単一アレル変異クローン(50%カット)を区別することができたし、野生型クローン(100%切断)と同型接合両アレル(bi-allelic)変異クローン(非切断)を区別することができた。分析の結果、上記の35個の中2個のカルス(5.7%)の標的位置が、単一アレル変異であり、14個のカルス40%の標的位置が両アレル変異であることを確認した。これにより、再生されたカルスの変化頻度は42.9%(=30変異アレル/70アレル)であり、プロトプラストでの変異頻度よりも10倍高いことを確認した。上記の結果は、どのような選別過程なしに43%の頻度で遺伝体編集レタスを得たことで、大規模な集団でのRGEN-RNPを利用した変異頻度を考慮したとき、極めて高い頻度である。上記の結果を通じて、再生過程でRGENで誘導される変異が安定的に維持されて蓄積されうことがわかった。

30

【0067】

BIN2遺伝子ノックアウトは、他の形態的な変化を示さなかったが、いくつかの稲からストレス耐性を示した。本発明者らは、BIN2遺伝子ノックアウトによるBRシグナル伝達の上方調節は、全体的な細胞分裂と成長率を促進し、これはカルスが再生される過程で受けるストレスに対して肯定的な反応を示すことができるような利点を提供することを提案する。

40

【0068】

最後に、本発明者らはブラシノステロイド(brassinosteroid; BR)シグナル伝達経路の負のレギュレータをコードするシロイヌナズナBIN2遺伝子のレタス(Lactuca sativa)同形体をノックアウトするために、レタスのプロトプラストにRGEN RNPを形質導入し、RNP-形質導入された細胞から再生され

50

たマイクロカリを得た（図6）。本発明者らは、レタス、マイクロカリの遺伝型を分析するためにRFLP分析で同じRGEN RNPを使用した（図2～4、および図7）。T7E1分析とは異なり、RGEN-RFLP分析は、ヘテロ接合両アレル（bi-allelic）変異クローン（非切断）と単一アレル変異クローン（50%切断）を区別することができたし、野生型クローン（100%切断）と同形接合両アレル（bi-allelic）変異クローン（非切断）を区別することができた。また、RGEN-RFLP分析は、レタス、遺伝体に存在するヌクレオチド標的位置の近くで配列ポリモρφイズムによる制限がないことを確認した。分析の結果、上記の35個のうち2個のカルス（5.7%）の標的位置が、単一アレル変異であり、14個のカルス（40%）の標的位置が両アレル変異であることを確認した（図3、図4b）。上記の結果を通じ、RGEN-誘導変異は、再生後も安定的に維持されることがわかった。このとき、再生されたカルの変異頻度は46%であった。16個の変異カルスから遺伝型を確認したい標的位置化ディープシーケンシングを行った結果、標的位置で欠失または挿入された塩基対の数は-9～+1の範囲に存在しており、これはヒト細胞で観察された変異パターンと一致することを確認した。上記クローンにおいてモザイク現象（mosaicism）は観察されなかったし（図8）、RGEN RNPは形質導入後すぐに標的位置を切断し、細胞分裂の前にインデルを誘導することを確認した。

【0069】

以後、本発明者らはBIN2-特異的RGENがレタス遺伝体で付随的な損傷を誘導かを高スループットシーケンシング（high throughput sequencing）を利用して分析した。その結果、91個の相同の位置での非標的変異は誘導されず、BIN2-変異された3つの苗の標的位置から1～5個のヌクレオチドが相違することを確認し（表5～8）、CRISPR RGENsによって誘導された非標的変異は、単一細胞クローンではほとんど検出されないという、ヒト細胞で確認した本発明者らの従来の研究内容と一致することを知ることができた。

【0070】

【表5】

レタス遺伝体で存在する潜在的な非標的位置の数。レタス遺伝体からの潜在的RGEN非標的位置は、Cas-Offinder（www.regenome.net）で確認した。本発明者らは、標準遺伝体としてLegassy_V2 database（Genebank：AFSA000000000.1）を使用し、標的位置配列と最大5nt相違な相同配列を確認した。合計92個の位置を選択し、これに対して標的位置化ディープシーケンシングを行った。標準遺伝体のデータの品質が低いに基づいてPCRプライマーが結合していないし、PCRを使用した増幅物を得ていなかったため、本分析では、いくつかの位置を除外した。

	標的位置の不一致の数						合計
	0	1	2	3	4	5	
潜在的な非標的位置の数	1 (on-target)	0	1	4	27	349	382
適切なPCRプライマーが結合した位置の数	1	0	1	3	24	72	101
成功的に増幅された位置の数	1	0	1	3	22	65	92

【0071】

10

20

30

40

50

【表 6】

三種類の再生された苗では、標的位置と 9 1 個の潜在的な非標的位置でのインデル頻度。シーケンシングエラーによる偽陽性のインデルは 0 ～ 3. 0 % の範囲で観察された。

位置名	配列	WT インデル (%)	TO-20 インデル (%)	TO-25 インデル (%)
On-target	ATCACAGTGATGCTCGTCA AAGG(配列番号: 94)	0.021	99.912	45.042
OT1	ATCACAGTGcgGCTCGTCAA gGG(配列番号: 95)	0.022	0.039	0
OT2	caCACAGTGATGtTCGTCAA gG(配列番号: 96)	0	0.014	0.013
OT3	ATacCAGgGATGCTCGTCAAt GG(配列番号: 97)	0	0	0
OT4	ATCAAtAGTGATGCTCaTgAA gG(配列番号: 98)	0.013	0.03	0
OT5	ATCACAtTGATGCTCtaCAAt AG(配列番号: 99)	0.023	0.033	0.012
OT6	ATaACAGaGAcGaTCGTCAAA GG(配列番号: 100)	0.029	0.03	0.027
OT7	ATCACAcTGATGCcCtaCAAA GG(配列番号: 101)	0.093	0.06	0.109
OT8	ATCACAtTGAgGCcCGaCAAA l-GG(配列番号: 102)	—	—	—
OT9	ATCACAcTGATGCaCtaCAAA GG(配列番号: 103)	0.057	0.037	0.077
OT10	caCACAGTGATGtTCaTCAAA GG(配列番号: 104)	0.635	0.715	0.145
OT11	ATgACAAtTtATGCTCtTCAAA GG(配列番号: 105)	0.250	0	0
OT12	ATCAaAGTGcTcCTCGTgAAA GG(配列番号: 106)	0	0	0
OT13	taCACAaTGtTGCTCGTCAAc G(配列番号: 107)	0.013	0	0.012

10

20

30

OT14	gcCACAGTGATGaTCGTCgAcGG(配列番号: 108)	0	0	0.013
OT15	ATatCAGgGATGCTCGcCAAtGG(配列番号: 109)	0	0	0
OT16	AaatCAGTGATcCTCGTCAAcGG(配列番号: 110)	0	0	0.012
OT17	ATggCAGTGATGgTCGTgAAgGG(配列番号: 111)	0	0.045	0.1
OT18	cTCAGAGTGtTGCTCtTCAAtGG(配列番号: 112)	0	0.01	0
OT19	ATCACAGaGATGCTCcaaAAtGG(配列番号: 113)	0.074	0.033	0.068
OT20	ATCAagGTtATtCTCGTCAAgGG(配列番号: 114)	0	0.009	0
OT21	AgCACAGTGAgGCTtGTCgAgGG(配列番号: 115)	0	0	0
OT22	ATatCAagGATGCTCGTCAAtGG(配列番号: 116)	0	0	0
OT23	tTCcCAGaGATGCTCtTCAAgGG(配列番号: 117)	0.024	0.05	0.035
OT24	gTCACAtTGATGCTCaTCAtgGG(配列番号: 118)	0	0	0
OT25	ATCACAGaGATGtTCaTCAtcGG(配列番号: 119)	0.022	0	0
OT26	ATCAaAaTGAgGCTCGaCAAc1-GG(配列番号: 120)			
OT27	ATaACAaTGAaGCTCGTtAAtGG(配列番号: 121)	0	0	0
OT28	ATatCAGgGATGCTCaTCAAtGG(配列番号: 122)	0	0.011	0.017
OT29	ATCAAtAtTGAaGCaCtTCAAAGG(配列番号: 123)	0.029	0.019	0.036
OT30	cTCACAtTGATGCaCtaCAAAGG(配列番号: 124)	0.069	0.055	0.097

OT31	tcCACAAaTGATGCaCtTCAAAGG (配列番号:125)	0.023	0	0.012
OT32	cTCACAaTGtTGCTCtaCAAAG-G (配列番号:126)	—	—	—
OT33	ATgACAaTGAaGCTCGTaAtA GG(配列番号: 127)	0	0	0

【表 7】

		WT	T0-20	T0-24	T0-25
位置名	配列	インデル (%)	インデル (%)	インデル (%)	インデル (%)
On-target	ATCACAGTGATGCTCGTCAAAGG(配列番号: 94)	0.021	99.912	99.867	45.042
OT34	cTCiCAGTGgTGCTgGTCgAAGG(配列番号: 128)	0	0	0	0.029
OT35	ATCACAcTtATaCTCGaCAgAGG(配列番号: 129)	0	0	0.054	0.018
OT36	cTCACAGTGAgGCTtTaAAAGG(配列番号: 130)	0.16	0.154	0.153	0.082
OT37	ATCACiGTGATGtTCGggAgAGG(配列番号: 131)	0	0	0	0.042
OT38	cTCiCgGTGgTGCTgGTCAAAGG(配列番号: 132)	0.045	0.061	0.069	0.082
OT39	gTgACAGTcATGCaCGTCcAAGG(配列番号: 133)	0.017	0.023	0.013	0.017
OT40	ATCACAcTGATtCcCtaCAAAGG(配列番号: 134)	0.051	0.097	0.024	0.077
OT41	ATgAgAGTGATtTCGTtAAAGG(配列番号: 135)	0.03	0.017	0	0.05
OT42	ATCACiGTGATGtTtacCAAAGG(配列番号: 136)	0.038	0.035	0.042	0.012
OT43	ATCACAGTGATGCTtccacAAGG(配列番号: 137)	0	0.02	0.034	0.012
OT44	gTaACAGTGgTGtTCGaCAAAGG(配列番号: 138)	0.113	0.209	0.142	0.192
OT45	ATCcCAaTcAgGCTCtTCAAAGG(配列番号: 139)	0.022	0.014	0.028	0.023
OT46	cTCACAcTGATGCaCtTCAAGG(配列番号: 140)	0	0	0	0.01
OT47	AaCACAcTGAgGCTCtgCAAAGG(配列番号: 141)	-	-	-	-

10

20

30

40

OT48	ATggCAcTGATGCaCGaCA AAGG(配列番号: 142)	0.022	0.014	0.04	0.011
OT49	caCACtGTcATGtTCGTCA AAGG(配列番号: 143)	0.34	0.114	0.27	0.054
OT50	tTgACAGTGtTcCTaGTCA AAGG(配列番号: 144)	0.017	0.014	0.013	0
OT51	ATCAAtAGgtATGtTgGTCA AAGG(配列番号: 145)	0	0.016	0.038	0.026
OT52	ATCACAcTGATGCcTaCA tAGG(配列番号: 146)	0.011	0	0	0.021
OT53	ATCACAcTGATtCcCtgCA AAGG(配列番号: 147)	0.047	0.036	0.043	0.025
OT54	AaCAAtAGcGtTGCTaGTCA AAGG(配列番号: 148)	0.049	0.043	0.087	0.119
OT55	ATCACAtgGATeCTCcTgA AAGG(配列番号: 149)	0.025	0	0	0
OT56	tTtCAaTGATGCTCaTCAA AGG(配列番号: 150)	0.023	0.015	0.018	0
OT57	tTCtCtGTcATGtTCGTCAA AGG(配列番号: 151)	0.027	0.052	0.02	0.019
OT58	ATCACAGTatTGgTCcaCA AAGG(配列番号: 152)	0.052	0.02	0.044	0.041
OT59	ATgctAGaGATGCTtGTCA AAGG(配列番号: 153)	0.029	0.01	0.017	0.078
OT60	ATCACAcTGATGCaCtaCA gAGG(配列番号: 154)	0	0	0	0.023
OT61	cTCACAcTGATGCaCtaCA AAGG(配列番号: 155)	0.051	0.052	0.061	0.018
OT62	tTgAtAGTGtTcCTCGTCAA AGG(配列番号: 156)	-	-	-	-
OT63	ATCACAGatATcaTgGTCA AAGG(配列番号: 157)	0.013	0	0.032	0.026
OT64	ATCttAGTcAaGCTaGTCA AAGG(配列番号: 158)	-	-	-	-

10

20

30

40

OT65	ATCAgAtTtATGCTCaTtAA AGG(配列番号: 159)	-	-	-	-
OT66	ATCtgAGTGATctTCGTCg AAGG(配列番号: 160)	0.033	0.02	0	0.027

【 0 0 7 3 】

【表 8】

位置名	配列	WT	TO-20	TO-24	TO-25
		インデル (%)	インデル (%)	インデル (%)	インデル (%)
On-target	ATCACAGTGATGCTCG TCAAAGG(配列番号: 94)	0.021	99.912	99.867	45.042
OT67	ATggCAGTGtTcCTaGTC A1-AAGG(配列番号: 161)				
OT68	ATCACAtTtATGCTtaTCt AAGG(配列番号: 162)	0.019	0.011	0.019	0.023
OT69	tcCACAGTGtTcCTaGTC AAGG(配列番号: 163)	0.014	0.024	0.028	0.013
OT70	tTCttAGgGATGgTCGTC AAGG(配列番号: 164)	0.042	0.02	0.024	0.013
OT71	AaCACAGTcATGCTCac CAgAGG(配列番号: 165)	3.006	2.67	2.831	0.935
OT72	AaaAgAGTGATGCTtaTC AAGG(配列番号: 166)	0.018	0.012	0.018	0.029
OT73	cTtcCAGTGATGaTaGTC AAGG(配列番号: 167)	0.051	0.021	0.02	0.043
OT74	ATCAaAGTGAgataCGTC AAGG(配列番号: 168)	0.012	0.022	0	0.021
OT75	ATgAtAtTGAcGCTtGTC AAGG(配列番号: 169)	0	0.055	0.02	0.053
OT76	ATCACgcTGATGggCcTC AAGG(配列番号: 170)	0.012	0.016	0	0
OT77	ATagatGTGATGCTtGTC AAGG(配列番号: 171)	0.012	0.02	0	0.022
OT78	gTCcCAtTGATGCaCGaC AAGG(配列番号: 172)	0.017	0.046	0.051	0
OT79	tTgACAAtTtATGCTCtTCA AAGG(配列番号: 173)	0.175	0.178	0.18	0.332
OT80	ATtAaAaTcATGtTCGTC AAGG(配列番号: 174)	0.082	0.037	0.051	0.025

10

20

30

40

OT81	caCACAGTcATGtTCcTCA AAGG(配列番号: 175)	0	0.022	0.036	0.03
OT82	tTgACAAcTcATGCTCtTCA AAGG(配列番号: 176)	-	-	-	-
OT83	tTCAAtAGTGATGtTtTCA AAGG(配列番号: 177)	0.043	0.059	0.033	0.058
OT84	ATCACgcTcATGaTCcTCA AAGG(配列番号: 178)	0	0.03	0	0
OT85	ATCACAcTcATGgaCcTCA AAGG(配列番号: 179)	0	0.034	0.039	0.01
OT86	ATCAAtAtGAaGCcCtTCA AAGG(配列番号: 180)	0.027	0.053	0.079	0.053
OT87	ATCACAAaTGATGgTCGgg gAAGG(配列番号: 181)	0.268	0.358	0.301	0.273
OT88	ATCAAtAaTGAAaGCcCtTCA AAGG(配列番号: 182)	0.029	0.057	0.085	0.057
OT89	ATgAatGTtATGCTCtTCA AAGG(配列番号: 183)	0	0.038	0	0.052
OT90	ATCACAcTGATaCcCtaCA AAGG(配列番号: 184)	0.027	0.026	0.053	0.051
OT91	AatAtAaTGATtCTCGTCA AAGG(配列番号: 185)	0.022	0.02	0.013	0.036
OT92	ATgACtGTGtTcCTtGTCA AAGG(配列番号: 186)	0	0	0.122	0.074
OT93	cTCAaAGTcATGaTCtTCA AAGG(配列番号: 187)	0	0.026	0	0.022
OT94	cTCAatGaGATGCTCGaCA AAGG(配列番号: 188)	0.053	0.052	0.056	0.057
OT95	ATCACAcTtAaGCTCtTgA AAGG(配列番号: 189)	0.201	0.216	0.15	0.161
OT96	gTgACAGTGtTGCTtGTCg AAGG(配列番号: 190)	0.012	0.012	0.015	0
OT97	ATaACAacaATGaTCGTCA AAGG(配列番号: 191)	0.036	0.016	0.048	0.057

10

20

30

OT98	AaCACtGTGATGtTtGTCA gAGG(配列番号: 192)	0	0	0	0
OT99	ATCACgcTGATagTCcTCA AAGG(配列番号: 193)	0	0	0	0
OT100	gTgACAAaTtATGCTCtTCA AAGG(配列番号: 194)	1.201	0.847	1.346	0.61

40

【 0 0 7 4 】

続いて、遺伝体編集カルスから植物体が再生され、これは土壌でもよく成長していることを確認した(図4c及び図9)。十分に成長した同型接合両アレル変異体から種子を得た(図10)。本発明を通じ、BIN2-ノックアウトレタスは、向上されたBR信号を示すことを確認した。

【 0 0 7 5 】

50

要約すると、R G E N R N P s は、植物プロトプラストに正常に配信され、4つの異なる植物種の6つの遺伝子の標的化誘電体の変化を誘導する。また、R G E N - 誘導変化はプロトプラストから再生された植物体で安定的に維持され、生殖細胞に伝達される。このコースでは、組換えDNAが使用されていないので、本発明の遺伝体校正植物体は、現在のG M O 規定に該当しないことがあります。これは、R N A - ガイド遺伝体校正は、植物バイオテクノロジーと農業分野で広く活用されることができるところを示唆するものである。

本発明は一態様において、以下を提供する。

[項目 1]

植物プロトプラスト (p r o t o p l a s t) の一つ以上の内在的遺伝子をノックアウトまたはノックインする段階を含む、植物プロトプラストから植物体を製造する方法。

10

[項目 2]

前記植物の内在的遺伝子は、前記ノックアウトまたはノックインによりストレス抵抗性を増加させる遺伝子である、項目 1 に記載の方法。

[項目 3]

前記植物の内在的遺伝子は、植物のブラシノステロイド (b r a s s i n o s t e r o i d) シグナル伝達に関与する遺伝子である、項目 1 に記載の方法。

[項目 4]

(i) 前記ノックアウトの段階において、内在的遺伝子は B I N 2 遺伝子、B K I 1 遺伝子、及びこれらのホモログ遺伝子からなる群から選択される 1 つ以上であり、

20

(i i) 前記ノックインの段階において、内在的遺伝子は B R I 1 遺伝子、B S U 遺伝子、B Z R 1 遺伝子、D W F 4 遺伝子、C Y P 8 5 A 1、およびこれらのホモログ遺伝子からなる群から選択される 1 つ以上である、項目 1 に記載の方法。

[項目 5]

前記遺伝子のノックアウトは、B I N 2 遺伝子、B K I 1 遺伝子、及びこれらのホモログ遺伝子からなる群から選択される 1 つ以上の遺伝子のアレルの中いずれか一つまたは二つをノックアウトすることである、項目 1 に記載の方法。

[項目 6]

前記遺伝子のノックアウトは、遺伝子ノックアウトにより実行され、前記遺伝子のノックインは、遺伝子ノックインにより実行される、項目 1 に記載の方法。

30

[項目 7]

前記遺伝子のノックアウトは、B I N 2 遺伝子、B K I 1 遺伝子、及びこれらのホモログ遺伝子からなる群から選択される 1 つ以上の遺伝子に特異的な人工ヌクレアーゼ (e n g i n e e r e d n u c l e a s e) を利用して実行される、項目 1 に記載の方法。

[項目 8]

前記人工ヌクレアーゼは、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (Z F N)、転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ (T A L E N)、および R N A ガイド人工ヌクレアーゼ (R G E N) からなる群から選択される、項目 7 に記載の方法。

[項目 9]

前記 R G E N は、B I N 2 遺伝子、B K I 1 遺伝子、及びこれらのホモログ遺伝子からなる群から選択される 1 つ以上の遺伝子の特定配列に特異的に結合するガイド R N A、または前記ガイド R N A をコードする D N A、並びに C a s タンパク質をコードする核酸または C a s タンパク質を含む、項目 8 に記載の方法。

40

[項目 10]

前記遺伝子のノックアウトは、B I N 2 遺伝子、B K I 1 遺伝子、及びこれらの同族体ホモログ遺伝子からなる群から選択される 1 つ以上の遺伝子の特定配列に特異的に結合するガイド R N A または前記ガイド R N A をコードする D N A；並びに C a s タンパク質をコードする核酸または C a s タンパク質を、植物プロトプラストに導入することで実行される、項目 1 に記載の方法。

[項目 11]

50

前記ガイドRNAはcrRNAとtracrRNAを含む二重RNA(dual RNA)または単一鎖ガイドRNA(sgRNA)の形態である、項目10に記載の方法。

[項目12]

前記単一鎖ガイドRNAはcrRNA及びtracrRNAの一部を含む、項目11に記載の方法。

[項目13]

前記単一鎖ガイドRNAは、単離されたRNAの形態である、項目10に記載の方法。

[項目14]

前記ガイドRNAをコードするDNAはベクターにコードされており、前記ベクターは、ウイルスベクター、プラスミドベクター、またはアグロバクテリウムベクターである、項目10に記載の方法。

10

[項目15]

前記Casタンパク質はCas9タンパク質またはその変異体である、項目10に記載の方法。

[項目16]

前記Casタンパク質は、NGGトリヌクレオチド(trinucleotide)を認識する、項目10に記載の方法。

[項目17]

前記Casタンパク質は、タンパク質伝達ドメイン(protein transduction domain)に接続されている、項目10に記載の方法。

20

[項目18]

前記Cas9タンパク質の変異体は、触媒アスパラギン酸(aspartate)残基が他のアミノ酸に置換されたCas9の変異体である、項目15に記載の方法。

[項目19]

前記アミノ酸は、アラニン(alanine)である、項目18に記載の方法。

[項目20]

前記Casタンパク質をコードする核酸またはCasタンパク質は、ストレプトコッカス属(genus Streptococcus)由来のものである、項目10に記載の方法。

[項目21]

前記ストレプトコッカス属はストレプトコッカスピヨジェンス(Streptococcus pyogenes)である、項目20に記載の方法。

30

[項目22]

前記植物プロトプラストはレタス(Lactuca sativa)由来のものである、項目1に記載の方法。

[項目23]

前記導入はCasタンパク質をコードする核酸またはCasタンパク質、及び前記ガイドRNAまたはガイドRNAをコードするDNAを、植物プロトプラストに同時形質導入する(co-transfecting)または連続形質導入(serial-transfecting)するものである、項目10に記載の方法。

40

[項目24]

前記連続形質導入は、Casタンパク質またはCasタンパク質をコードする核酸を最初に形質導入した後、ネイキッドガイドRNA(naked guide RNA)を二番目に形質導入することで実行される、項目23に記載の方法。

[項目25]

前記導入は、微細注入法、電気穿孔法、DEAE-デキストラン処理、リポフェクション、ナノパーティクル-媒介性形質導入、タンパク質形質導入ドメイン媒介性形質導入、およびPEG-媒介形質導入からなる群から選択される方法で実行される、項目10に記載の方法。

[項目26]

50

遺伝子がノックアウトされた植物プロトプラストを再生させる段階をさらに含む、項目 1 に記載の方法。

[項目 27]

前記再生させる段階は、BIN2 遺伝子、BKI1 遺伝子、及びこれらのホモログ遺伝子からなる群から選択される 1 つ以上の遺伝子がノックアウトされた植物プロトプラストを、アガロースを含む培地中で培養してカルス (callus) を形成させる段階、及び前記カルスを再生培地で培養する段階を含む、項目 26 に記載の方法。

[項目 28]

項目 1 ~ 27 のいずれか一項に記載の方法によって調製されたゲノム編集された植物プロトプラストから再生された植物。

10

[項目 29]

BIN2 (brassinosteroid insensitive 2) 遺伝子、BKI1 遺伝子またはこれらのホモログをコードする DNA に特異的なガイド RNA、または前記ガイド RNA をコードする DNA ; 並びに Cas タンパク質をコードする核酸または Cas タンパク質を含む、植物細胞において BIN2 遺伝子をコードする DNA を切断するための組成物。

[項目 30]

植物細胞で標的変異 (targeted mutagenesis) を誘導する、項目 29 に記載の組成物。

[項目 31]

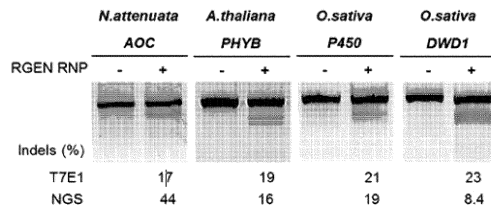
20

BIN2 (brassinosteroid insensitive 2) 遺伝子、BKI1 遺伝子またはこれらのホモログをコードする DNA に特異的なガイド RNA または前記ガイド RNA をコードする DNA ; 並びに Cas タンパク質をコードする核酸または Cas タンパク質を含む、植物プロトプラストから植物体を製造するための組成物。

[項目 32]

項目 29 ~ 30 のいずれか一項に記載の組成物を含む、植物プロトプラストから植物体を製造するためのキット。

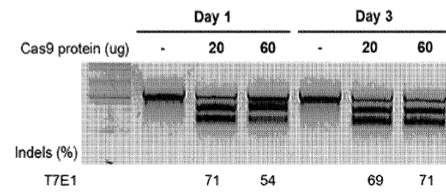
【図 1 a】



【図 1 b】

AOC		PHYB	
CAAAAGACTGTCAATTC--CCTTGG	WT	CAC TAGGAGCAACACCC--AACGGG	WT
CAAAAGACTGTCAATTCACCTTGG	+1	CAC TAGGAGCAACACCCAAACGGG	+1
CAAAAGACTGTCAATTCCTCTTGG	+1	CAC TAGGAGCAACACC--AACGGG	-1
CAAAAGACTGTCAATTCCTTGG	+1	CAC TAGGAGCAACACCCAAACGGG	+1
CAAAAGACTGTCAATTCCTTGG	-1	CAC TAGGAGCAAC--AACGGG	-2
		CAC TAGGAGCAAC--AACGGG	-4
P450		DWD1-TS1+TS2	
CATATAGTTGGGTCATG-SCATGG	WT	TGCATGCTCCAAAGGCCACAGTGGCCGGCCTACGAGCTCAGGTCTTCTT-----ACCCGG	WT
CATATAGTTGGGTCATG-SCATGG	-1	TGCATGCTCCAAAGGCCACAGTGGCCGGCCTACGAGCTCAGGTCTTCTT-----T-----ACCCGG	-29
CATATAGTTGGGTCATG-SCATGG	-3	TGCATGCTCCAAAGGCCACAGTGGCCGGCCTACGAGCTCAGGTCTTCTT(T1N5)ACCCGG	+33
CATATAGTTGGGTCATG-SCATGG	-4		
CATATAGTTGGGTCATG-SCATGG	-5		

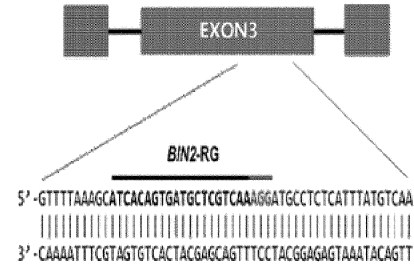
【図 1 c】



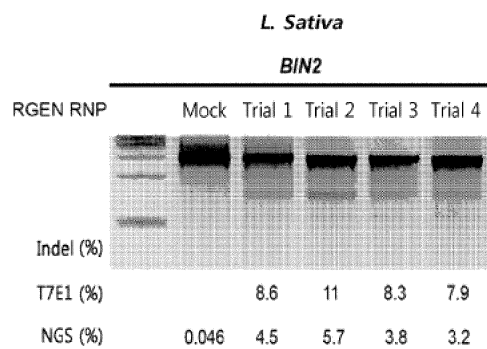
BRI1-TS1+TS2

TTTGAAAGATGGAAGCG-CGGTGG.(201bp).TGAAACTAAACTGGTCC-ACACGG WT
 TTTGAAAGATGGAAGCG-----C-ACACGG -223

【図 2 a】



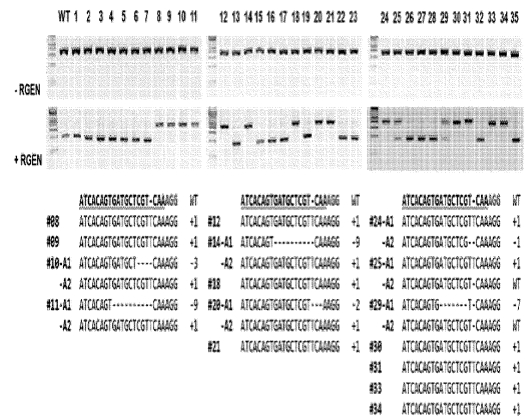
【図 2 b】



【図 2 c】

Trial 1		Trial 2	
Mutated locus	ATCACAGTGTCTCTCTCAAGG WT	Mutated locus	ATCACAGTGTCTCTCTCAAGG WT
	ATCACAGTGTCTCTCTCAAGG + 1bp (3.1 %)		ATCACAGTGTCTCTCTCAAGG + 1bp (3.3 %)
	ATCACAGTGTCTCTCTCAAGG - 1bp (0.25 %)		ATCACAGTGTCTCTCTCAAGG - 1bp (0.68 %)
	ATCACAGTGTCTCTCTCAAGG + 1bp (0.25 %)		ATCACAGTGTCTCTCTCAAGG + 1bp (0.37 %)
Trial 3		Trial 4	
Mutated locus	ATCACAGTGTCTCTCTCAAGG WT	Mutated locus	ATCACAGTGTCTCTCTCAAGG WT
	ATCACAGTGTCTCTCTCAAGG + 1bp (2.4 %)		ATCACAGTGTCTCTCTCAAGG + 1bp (2.2 %)
	ATCACAGTGTCTCTCTCAAGG + 1bp (0.43 %)		ATCACAGTGTCTCTCTCAAGG + 1bp (0.27 %)
	ATCACAGTGTCTCTCTCAAGG + 1bp (0.27 %)		ATCACAGTGTCTCTCTCAAGG - 3bp (0.28 %)
Trial 4		Trial 5	
Mutated locus	ATCACAGTGTCTCTCTCAAGG + 1bp (0.15 %)	Mutated locus	ATCACAGTGTCTCTCTCAAGG + 1bp (0.11 %)

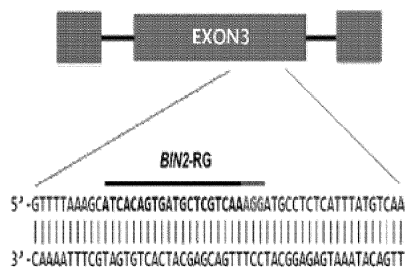
【図 3 a】



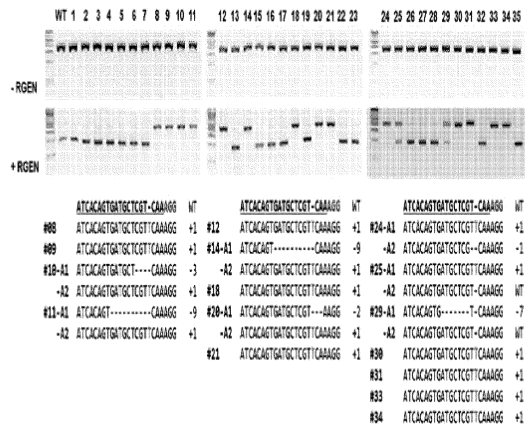
【図 3 b】

遺伝子型	数	頻度 (%)
野生型	19	54
単一アレル変異	2	5.7
両アレル変異(ヘテロ)	5	14
両アレル変異(ホモ)	9	26
変異ト小植物の総数	16	46

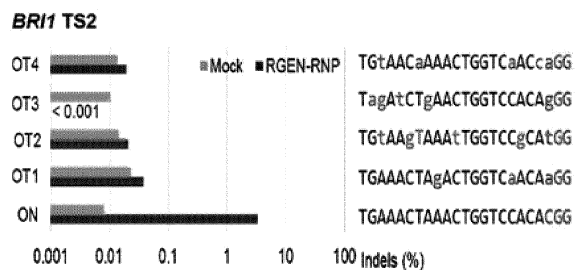
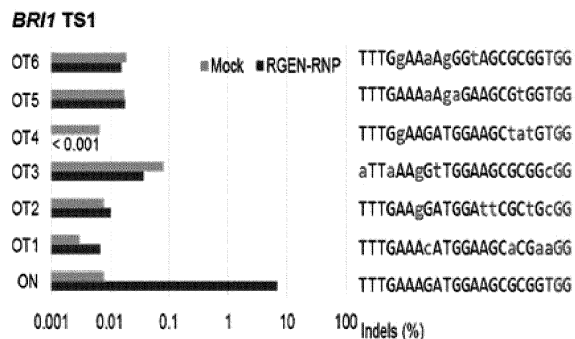
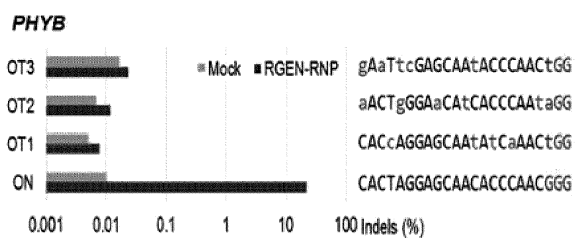
【 図 4 a 】



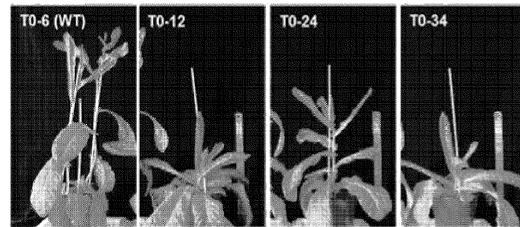
【 図 4 b 】



【 図 5 】



【 図 4 c 】

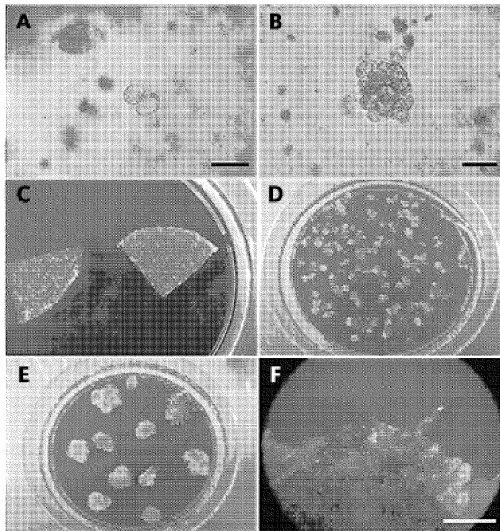


【 図 6 】

gtc act ggc cac atc tcc acc aca att gga ggc aag aat gga gaa cca aaa cag act
gtg agt tac atg gca gag cgt gtg gta ggg gct gga tct ttt gga att gtt ttc cag gca
aaa tgt cta gaa acg ggg gaa act gtg gct ata aaa aag gtt tta caa gac aaa aga tac
aag aat cgt gag ttg cag ttg at gaga aca atg gat cat cca aat gtg gtt tct ttg aag
cat tgt ttc tat tca act aca agc aaa gat gag ctt ttt ctc aat ctg gtt atg gaa tat
gtc cca gag aca att ttt cgg gtt tta aag cat cac agt gat gct cgt caa agg atg cct
ctc att tat gtc aaa cta ta caca tat caa ata ttt agg ggg cta gca tac atg cat atg
gtt gct gga gca tgc cac agg gac ttg aag cct cag aat gtc ctg gtt gat cct ctt act
cac caa gtc aag atc tgc gac ttt gga agc gca aaa atg cta gtg agg gga gaa gca aat
ata tca tat att tgt tct cgt ttt tat cgg gcc cca gaa ctt atc ttt ggt gct act gag
tat aca act tgc att gat ata tgg tgc gct ggt tgc att ctt gat gac ctt ctt ttg ggg
cag cca cta ttt ccc gga gaa aat gca gtg gat cag ctt gtg gag att att aag gtt ctg
ggc acg cca acg cga gaa gaa ctt cga tgt atg aat ccc aac tac act gat ttt agg ttt
cct caa gta aag gca cac cct tgg cac aag gta ttt cat aag cgg atg ccc cgg gaa gca
att gac tta

VTGHIISTITIGGKNGEPKQTVSYMAERVVGAGSFGIVFQA
KCLETGETVAIKKVLQDKRYKNRELQLMRTMDHPNVVSLK
HCFYSTTSKDELFLNLVMEYVPETIFRVLKHHSDARQRM
LIYVKLYTYQIFRGLAYMHMVAGACHRDLPQNVVLVDPLT
HQVKICDFGSAKMLVRGEANISYICSRFYRAPELIFGATE
YTTSIDIWSAGCILAELLGQPLFPGENAVDQLVEIIKVL
GTPTREELRCMNPNTDFRFPQVKAHPWHKVFHKRMPPFA
IDL

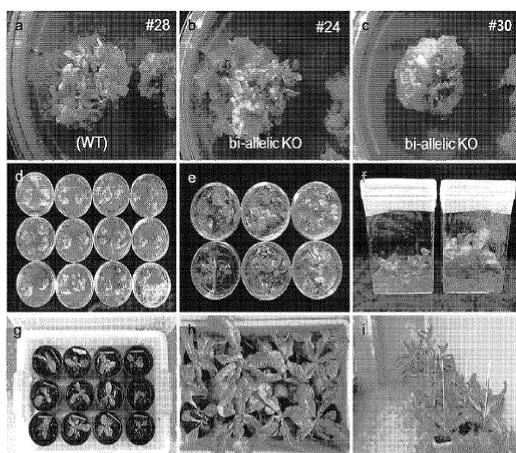
【図 7】



【図 8】

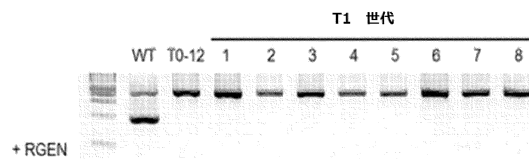
08	ATCACAGTATGCTCTGTTCAAAGG ATCACAGTATGCTCTGTTCAAAGG +1 (33443/33863, 99.5%)	21	ATCACAGTATGCTCTGTTCAAAGG ATCACAGTATGCTCTGTTCAAAGG +1 (45389/45727, 99.3%)
09	ATCACAGTATGCTCTGTTCAAAGG ATCACAGTATGCTCTGTTCAAAGG +1 (28733/28948, 99.8%)	24	ATCACAGTATGCTCTGTTCAAAGG A1 ATCACAGTATGCTCTGTTCAAAGG +1 (23888/42414, 58.5%) A2 ATCACAGTATGCTCTGTTCAAAGG -1 (28585/42414, 48.1%)
10	ATCACAGTATGCTCTGTTCAAAGG A1 ATCACAGTATGCTCTGTTCAAAGG +1 (17473/33732, 51.8%) A2 ATCACAGTATGCTCTGTTCAAAGG -3 (16813/33732, 47.5%)	25	ATCACAGTATGCTCTGTTCAAAGG A1 ATCACAGTATGCTCTGTTCAAAGG +1 (28469/54676, 52.1%) A2 ATCACAGTATGCTCTGTTCAAAGG NT (26183/54676, 47.5%)
11	ATCACAGTATGCTCTGTTCAAAGG A1 ATCACAGT-----CAAAGG -9 (12793/23779, 53.8%) A2 ATCACAGTATGCTCTGTTCAAAGG +1 (18434/23779, 43.5%)	28	ATCACAGTATGCTCTGTTCAAAGG A1 ATCACAGT-----TCAAAGG -7 (26892/47398, 56.7%) A2 ATCACAGTATGCTCTGTTCAAAGG NT (28216/47398, 43.5%)
12	ATCACAGTATGCTCTGTTCAAAGG ATCACAGTATGCTCTGTTCAAAGG +1 (28954/29871, 99.6%)	30	ATCACAGTATGCTCTGTTCAAAGG ATCACAGTATGCTCTGTTCAAAGG +1 (35153/35348, 99.7%)
14	ATCACAGTATGCTCTGTTCAAAGG A1 ATCACAGT-----CAAAGG -9 (24828/44434, 55.9%) A2 ATCACAGTATGCTCTGTTCAAAGG +1 (19456/44434, 43.8%)	31	ATCACAGTATGCTCTGTTCAAAGG ATCACAGTATGCTCTGTTCAAAGG +1 (66874/67268, 99.6%)
18	ATCACAGTATGCTCTGTTCAAAGG ATCACAGTATGCTCTGTTCAAAGG +1 (41332/41738, 99.5%)	33	ATCACAGTATGCTCTGTTCAAAGG ATCACAGTATGCTCTGTTCAAAGG +1 (34331/34438, 99.7%)
20	ATCACAGTATGCTCTGTTCAAAGG A1 ATCACAGTATGCTCTGTTCAAAGG -2 (22232/44178, 50.1%) A1 ATCACAGTATGCTCTGTTCAAAGG +1 (21899/44178, 49.4%)	34	ATCACAGTATGCTCTGTTCAAAGG ATCACAGTATGCTCTGTTCAAAGG +1 (36793/37130, 99.1%)

【図 9】

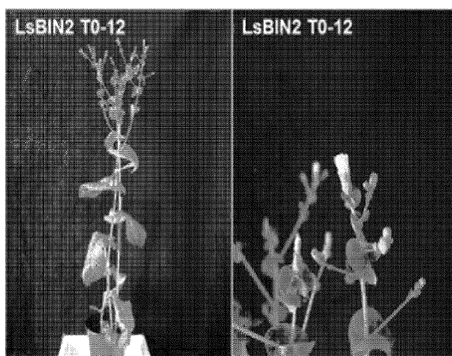


【図 10 b】

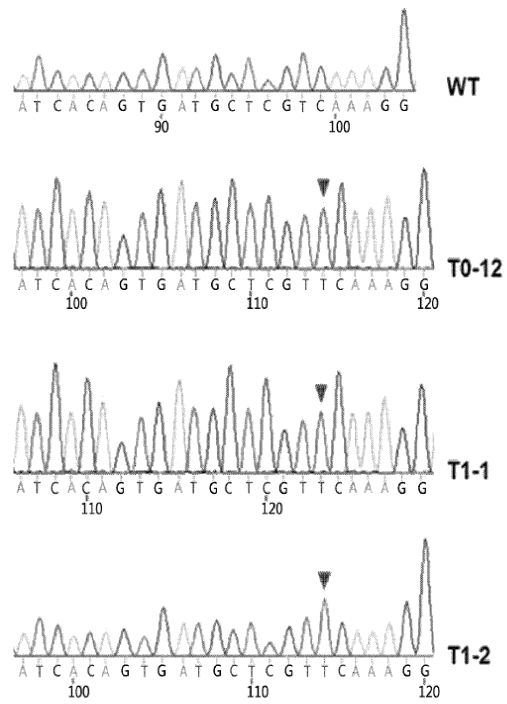
T0-12 (1 bp 挿入、ホモ接合両アレル変異体)



【図 10 a】



【図 10 c】



【配列表】

0006916188000001.app

フロントページの続き

(73)特許権者 518120005

エーアイシーティー

大韓民国, キョンギ - ド・ 1 6 2 2 9 , スウォン - シ, ヨントン - ク, クァンギョ - ロ, 1 4 5

(74)代理人 100114188

弁理士 小野 誠

(74)代理人 100119253

弁理士 金山 賢教

(74)代理人 100124855

弁理士 坪倉 道明

(74)代理人 100129713

弁理士 重森 一輝

(74)代理人 100137213

弁理士 安藤 健司

(74)代理人 100143823

弁理士 市川 英彦

(74)代理人 100183519

弁理士 櫻田 芳恵

(74)代理人 100196483

弁理士 川崎 洋祐

(74)代理人 100203035

弁理士 五味渕 琢也

(74)代理人 100160749

弁理士 飯野 陽一

(74)代理人 100160255

弁理士 市川 祐輔

(74)代理人 100202267

弁理士 森山 正浩

(74)代理人 100182132

弁理士 河野 隆

(74)代理人 100146318

弁理士 岩瀬 吉和

(74)代理人 100127812

弁理士 城山 康文

(72)発明者 キム ジンス

大韓民国、ソウル・ 0 8 8 2 6、クァナク - ク、クァナク - ロ、 1、カレッジ・オブ・ナチュラル
・サイエンス、デパートメント・オブ・ケミストリー

(72)発明者 キム ジョンウン

大韓民国、ソウル・ 0 2 7 2 1、ソンプク - ク、キルウム - ロ・ 9 - ギル、 5 0、 9 1 2 - 2 8 0
1

(72)発明者 チェ ソンファ

大韓民国、キョンギ - ド・ 1 0 0 8 2、キンポ - シ、チョンソン - ロ、 1 9、 3 0 9 - 2 0 4

(72)発明者 ウ ジェウク

大韓民国、テジョン・ 3 4 0 1 6、ユソン - ク、テクノ・ 3 - ロ、 6 6

(72)発明者 クォン スニイル

大韓民国、キョンギ - ド・ 1 5 8 2 5、クンポ - シ、クァンジョン - ロ、 1 1 9、 7 2 9 - 2 0 3

審査官 松田 芳子

- (56)参考文献 国際公開第2014/199358(WO, A1)
米国特許出願公開第2009/0013433(US, A1)
Annu. Rev. Plant Biol., 2013年, vol.64, p.327-350
Plant Methods, 2013年, vol.9, no.1, article:39
J. Integr. Plant Biol., 2011年, vol.53, no.6, p.455-468
佐賀大学農学部彙報, 1989年, 67号, p.109-118
育種学雑誌, 1988年, vol.38(別冊2), p.52-53
Genetics, 2013年, vol.195, p.1177-1180
Genome Res., 2014年, vol.24, p.1012-1019
Phytochemistry, 2004年, vol.65, p.801-811
光合成研究, 2008年, vol.18, p.16-23
化学と生物, 1999年, vol.37, p.128-134
Mol. Cells, 2014年, vol.37, p.833-840
Nature Biotechnology, 2015年10月, vol.33, p.1162-1165

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/09
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
Caplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
GenBank/EMBL/DDBJ/GenSeq