

(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
2024年12月19日(19.12.2024)



(10) 国際公開番号

WO 2024/257777 A1

(51) 国際特許分類:

A01N 37/46 (2006.01) C07K 14/415 (2006.01)
A01H 1/00 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)
A01H 5/00 (2018.01) C12N 15/29 (2006.01)
A01H 6/46 (2018.01) C12N 15/63 (2006.01)
A01P 5/00 (2006.01)

(71) 出願人: 国立大学法人 熊本大学 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION KUMAMOTO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒8608555 熊本県熊本市中央区黒髪二丁目39番1号 Kumamoto (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2024/021268

(22) 国際出願日: 2024年6月12日(12.06.2024)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

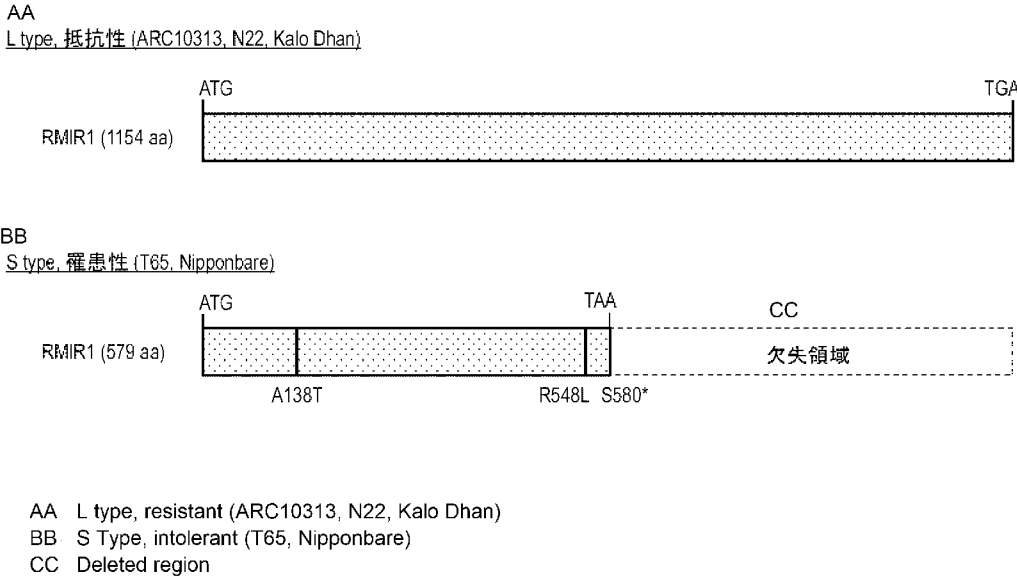
(30) 優先権データ:
特願 2023-097058 2023年6月13日(13.06.2023) JP

(72) 発明者: 澤進一郎(SAWA Shinichiro); 〒8608555 熊本県熊本市中央区黒髪二丁目39番1号 国立大学法人熊本大学内 Kumamoto (JP). 春原英彦(SUNOHARA Hidehiko); 〒8608555 熊本県熊本市中央区黒髪二丁目39番1号 国立大学法人熊本大学内 Kumamoto (JP). 佐藤豊(SATO Yutaka); 〒4118540 静岡県三島市谷田1111 大学共同利用機関法人情報・システム研究機構 国立遺伝学研究所内 Shizuoka (JP). 土井一行(DOI Kazuyuki); 〒4648601 愛

(54) Title: PLANT PARASITIC NEMATODE CONTROLLING AGENT

(54) 発明の名称: 植物寄生性センチュウ防除剤

[図3]



(57) Abstract: A new gene that provides a difference in resistance between a plant parasitic nematode resistant rice variety ARC10313 and a plant parasitic nematode intolerance variety T65 is found and a plant parasitic nematode controlling agent based on the new gene is provided. Provided is a plant parasitic nematode controlling agent comprising a polypeptide having any of amino acid sequences represented by: (a) the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 13; (b) an amino acid sequence resulting from deletion, substitution, or addition of one or more amino acids in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 13; or (c) an amino acid sequence having an identity of 90% or more with the amino

[続葉有]



WO 2024/257777 A1

知県名古屋市千種区不老町 1 番 国立大学法人東海国立大学機構内 Aichi (JP).

- (74) 代理人: 弁理士法人平木国際特許事務所 (HIRAKI & ASSOCIATES); 〒1056232 東京都港区愛宕二丁目 5 - 1 愛宕グリーンヒルズ MOR I タワー 3 2 階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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))

acid sequence represented by SEQ ID NO: 13, or a fragment of said polypeptide.

(57) 要約: 植物寄生性センチュウ抵抗性のイネ品種ARC10313と植物寄生性センチュウ罹患性品種T65との間で抵抗性の違いをもたらす新規遺伝子を見出し、当該新規遺伝子に基づく植物寄生性センチュウ防除剤を提供することである。(a) 配列番号13で示すアミノ酸配列、(b) 配列番号13で示すアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列、又は(c) 配列番号13で示すアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列で示すいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチド又はその断片からなる植物寄生性センチュウ防除剤を提供する。

明 細 書

発明の名称：植物寄生性センチュウ防除剤

技術分野

[0001] 本発明は、植物寄生性センチュウ防除剤、植物形質転換体、及び植物形質転換体を製造する方法に関する。

背景技術

[0002] 植物寄生性センチュウは2,000種を超える植物に寄生すると言われ、宿主範囲が極めて広いことが知られている。宿主となり得る植物には農業上重要な作物が数多く含まれており、その被害額は全世界で1500億ドルに上ることが報告されている。

[0003] 植物寄生性センチュウの中で特に農業被害が大きいセンチュウ種としては、ネコブセンチュウ、ネグサレセンチュウ、及びシストセンチュウの3種類が知られている。例えば、ネコブセンチュウの一種であるサツマイモネコブセンチュウ (*Meloidogyne incognita*) は宿主範囲が広く、農作物を含む世界中の様々な植物へ寄生し、収量低下、品質低下、生育阻害、枯死等の影響が報告されている。食糧生産安定化の観点からも世界中で問題となっており、その対策は急務となっている。

[0004] 植物寄生性センチュウによる農業被害は、一般的に土壤中に隠れた状態で進行するため、制御が困難である。そのため、植物寄生性センチュウに対する有効な防除技術としては、毒性の強い化学物質（殺センチュウ剤）の散布が行われてきた。しかし、殺センチュウ剤のように強い毒性を有する化学物質は土壤汚染を引き起こすことが問題となっている。主要な殺センチュウ剤である臭化メチルは、オゾン層破壊を引き起こすとして2005年以降に使用が禁止されている。したがって、殺センチュウ剤によらない有効なセンチュウ防除技術が求められている。

[0005] 殺センチュウ剤に代わる有力な防除技術として、植物寄生性センチュウに対する抵抗性遺伝子の利用が進められている。トマトでは、サツマイモネコ

ブセンチュウに対する抵抗性遺伝子としてMi-1遺伝子が見出されている（非特許文献1）。Mi-1遺伝子が導入されたトマトは、サツマイモネコブセンチュウに対する強い抵抗性を発揮することから、この遺伝子が導入されたトマトが農業現場に広く普及している。また、トマト由来のMi-1遺伝子を導入したレタスはセンチュウ抵抗性を獲得することも報告されている（非特許文献2）。

[0006] しかしながら、Mi-1遺伝子の適用可能な植物種の範囲は限定的であり、特に単子葉植物では有効なセンチュウ抵抗性遺伝子は知られていない。単子葉植物では、主要な穀物に加えてバナナ、パイナップル、及びサトウキビでも、センチュウによる農業被害が相次いで報告されている。イネでは、ネコブセンチュウの一種であるイネネコブセンチュウ (*Meloidogyne graminicola*) が、アジアにおいて甚大な被害を与えており、イネネコブセンチュウが感染した地域では収穫量が70%程度低下することが報告されている（非特許文献3、4）。

[0007] したがって、植物寄生性センチュウに対する新たな抵抗性遺伝子、及びそれに基づく新たな植物寄生性センチュウ防除剤が必要とされている。

先行技術文献

非特許文献

- [0008] 非特許文献1: Milligan, S. B., et al., 1998, *Plant Cell*, 10:1307-1319.
非特許文献2: Zhang, L.-Y., et al., 2010, *Plant Mol Biol Report*, 28:204-211.
非特許文献3: De Waele, D. and Elsen, A., 2007, *Annu. Rev. Phytopathol.* 45:457-485.
非特許文献4: Bridge, J., Plowright, R. A., and Peng, D., 2005, *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*, pp.87-130.

特許文献

- [0009] 特許文献1: W02022/176971

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] 本発明の目的は、植物寄生性センチュウ抵抗性のイネ品種ARC10313と植物寄生性センチュウ罹患性品種T65との間で抵抗性の違いをもたらす新規遺伝子を見出し、当該新規遺伝子に基づく植物寄生性センチュウ防除剤を提供することである。

課題を解決するための手段

[0011] 本発明者らは、過去の研究においてサツマイモネコブセンチュウに対して抵抗性を示すインディカ品種Kalo Dhanに着目し、罹患性を示すジャポニカ品種台中65号（T65）との間で組換え自殖系統（Recombinant inbred line；RIL）を128系統作製し、RILに基づくQTL解析及び遺伝子マッピングを実施した（特許文献1）。その結果、Os04g0112100遺伝子（本明細書において、ROOT KN OT NEMATODE RESISTANCE 1又はRKNR1と表記する）がKalo Dhan/T65の2品種間でセンチュウ抵抗性の違いをもたらす遺伝子の1つであることを明らかにした。

[0012] しかし、特許文献1に記載のKalo Dhan/T65の2品種比較研究では、2品種間で作製したRILにおいてセンチュウ抵抗性に対するRKNR1遺伝子の寄与率は29.84%に過ぎず、またKalo Dhan由来のRKNR1遺伝子をセンチュウ罹患性品種に導入した形質転換株のセンチュウ抵抗性は増強されるものの、Kalo Dhan自身のセンチュウ抵抗性には及ばなかったことから、RKNR1だけではKalo Dhan/T65の2品種間のセンチュウ抵抗性の違いを説明することができなかった。

[0013] 本発明者らは、上記RIL系統を用いて、Kalo Dhan/T65の2品種間でさらなる抵抗性遺伝子の同定を試みたものの、当該RIL系統ではRKNR1遺伝子以外の抵抗性遺伝子をマッピングすることができなかった。したがって、Kalo Dhan/T65の2品種間でセンチュウ抵抗性の違いをもたらすRKNR1遺伝子以外の遺伝子は、同定に至っておらず、現在でも不明のままである。

[0014] そこで、本発明者らは、上記課題を解決するため、上記研究とは異なる抵抗性品種のARC10313に着目し、上記研究とは異なる新たなセンチュウ抵抗性

遺伝子を探索することを着想した。具体的には、抵抗性品種ARC10313と罹患性品種T65との間で抵抗性の違いをもたらす遺伝子を求めて、ARC10313/T65の2品種間で新たなRIL系統を作製した。この新たなRILについてQTL解析を実施し、さらに染色体断片置換系統（chromosome segment substitution line; CSSL系統）を用いて遺伝子マッピングを実施した結果、ARC10313/T65の2品種間でセンチュウ抵抗性の差異に関連する新たな遺伝子としてOs06g0621600遺伝子（本明細書において、ROOT MELOIDOGYNE INCOGNITA RESISTANCE 1又はRMIR1と表記する）を見出した。さらにセンチュウ抵抗性品種のRMIR1遺伝子をセンチュウ罹患性品種に導入して形質転換株を作製した結果、センチュウ抵抗性が得られることを見出し、本発明を完成させるに至った。本発明は、上記知見に基づくものであって以下を提供する。

[0015] (1) 以下の (a) ~ (c) で示すいずれかのアミノ酸配列を含むRMIR1ポリペプチド又はその断片を含む植物寄生性センチュウ防除剤。

(a) 配列番号13で示すアミノ酸配列、

(b) 配列番号13で示すアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列、又は

(c) 配列番号13で示すアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列

(2) 以下の (d) ~ (f) で示すいずれかのアミノ酸配列を含むRKNR1ポリペプチド又はその断片をさらに含む、(1)に記載の植物寄生性センチュウ防除剤。

(d) 配列番号1で示すアミノ酸配列、

(e) 配列番号1で示すアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列、又は

(f) 配列番号1で示すアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列

(3) (1)に記載のRMIR1ポリペプチド又はその断片をコードするRMIR1ポリヌクレオチドを含む、植物寄生性センチュウ防除剤。

(4) 前記RMIR1ポリヌクレオチドが以下の (g) ~ (j) で示すいずれかの塩基配列を含む、(3) に記載の植物寄生性センチュウ防除剤。

(g) 配列番号 14 で示す塩基配列、

(h) 配列番号 14 で示す塩基配列において 1 若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列、

(i) 配列番号 14 で示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列、又は

(j) 配列番号 14 で示す塩基配列に相補的な塩基配列と高ストリンジェントな条件でハイブリダイズする塩基配列

(5) (2) に記載のRKNR1ポリペプチド又はその断片をコードするRKNR1ポリヌクレオチドをさらに含む、(3) 又は (4) に記載の植物寄生性センチュウ防除剤。

(6) 前記RKNR1ポリヌクレオチドが以下の (k) ~ (n) で示すいずれかの塩基配列を含む、(5) に記載の植物寄生性センチュウ防除剤。

(k) 配列番号 2 で示す塩基配列、

(l) 配列番号 2 で示す塩基配列において 1 若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列、

(m) 配列番号 2 で示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列、又は

(n) 配列番号 2 で示す塩基配列に相補的な塩基配列と高ストリンジェントな条件でハイブリダイズする塩基配列

(7) (3) 又は (4) に記載のRMIR1ポリヌクレオチドを含む発現ベクターを含む、植物寄生性センチュウ防除剤。

(8) 前記植物寄生性センチュウがネコブセンチュウである、(1) ~ (7) のいずれかに記載の植物寄生性センチュウ防除剤。

(9) 前記ネコブセンチュウが、イネネコブセンチュウ、サツマイモネコブセンチュウ、キタネコブセンチュウ、及びジャワネコブセンチュウからなる群から選択される、(8) に記載の植物寄生性センチュウ防除剤。

(10) (1) 若しくは(2)又は(3)～(9)のいずれかに記載の植物寄生性センチュウ防除剤を含む、植物寄生性センチュウに対して抵抗性を有する植物形質転換体、又は前記ポリヌクレオチド若しくは前記発現ベクターを保持したその後代。

(11) 単子葉植物である、(10)に記載の植物形質転換体又はその後代。

(12) 前記単子葉植物がイネ科植物である(11)に記載の植物形質転換体又はその後代。

(13) 前記イネ科植物が、イネ、コムギ、オオムギ、ライムギ、トウモロコシ、サトウキビ、アワ、キビ、ヒエ、及びソルガムからなる群から選択される、(12)に記載の植物形質転換体又はその後代。

(14) 遺伝子組換え体である、(10)～(13)のいずれかに記載の植物形質転換体又はその後代。

(15) 植物寄生性センチュウに対して抵抗性を有する植物形質転換体を製造する方法であって、

(7)に記載の発現ベクターを植物に導入する工程、及び前記発現ベクターが導入された植物を選択する工程を含む、方法。

本明細書は本願の優先権の基礎となる日本国特許出願番号2023-097058号の開示内容を包含する。

発明の効果

[0016] 本発明によれば、植物寄生性センチュウ抵抗性を示すRMIR1遺伝子に基づく植物寄生性センチュウ防除剤を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0017] [図1]77種類のイネ品種のサツマイモネコブセンチュウ抵抗性を評価した結果を示す。評価値 (Evaluation value ; EV) が低いほど、センチュウに対して抵抗性が高いことを示す。エラーバーは標準誤差を示す。

[図2]サツマイモネコブセンチュウ抵抗性に関する遺伝子マッピングの結果を

示す。(A) 各染色体断片置換系統 (chromosome segment substitution line; CSSL系統) について第6染色体上の9つのSNPマーカーと評価値 (EV) を示す。図中のSNPマーカーは、T65型を「A」で示し、ARC10313型を「B」で示す。**は $P < 0.01$ (ステューデントt検定) を示す。エラーバーは標準誤差を示す。(B) 第6染色体上の各SNPマーカーの位置を示す。RMIR1遺伝子がマッピングされたゲノム領域を両矢印で示す。

[図3]ARC10313、N22、Kalo Dhan、T65、及び日本晴 (Nipponbare) におけるRMIR1遺伝子によってコードされるポリペプチドの構造を示す。

[図4]RMIR1形質転換株のサツマイモネコブセンチュウ抵抗性を評価した結果を示す。**は $P < 0.01$ (ステューデントt検定) を示す。エラーバーは標準誤差を示す。

[図5]77種類のイネ品種、RKNR1形質転換株、及びRMIR1形質転換株のサツマイモネコブセンチュウ抵抗性を評価した結果を示す。エラーバーは標準誤差を示す。

発明を実施するための形態

[0018] 1. 植物寄生性センチュウ防除剤

1-1. 概要

本発明の第1の態様は、植物寄生性センチュウ防除剤である。本発明の植物寄生性センチュウ防除剤は、センチュウ抵抗性のRMIR1ポリペプチド若しくはその断片からなる若しくはそれを含むか、又はそのいずれかをコードするポリヌクレオチド若しくはそれを含む発現ベクターを含む。本発明の植物寄生性センチュウ防除剤は、植物寄生性センチュウに対して防除効果を有する。

[0019] 1-2. 用語の定義

本明細書において「植物寄生性センチュウ」は、植物に寄生し得るセンチュウであれば特に限定しない。植物寄生性センチュウとして、ネコブセンチュウ (Root-knot nematode; Meloidogyne)、ネグサレセンチュウ (Pratylenchus)、シストセンチュウ (シストセンチュウには、Afenestrata、Cactoder

a、Dolichodera、Globodera、Heterodera、及びPunctoderaの6つの属が知られている)、ハセンチュウ (Aphelenchoides)、クキセンチュウ (Ditylenchus) 等が知られている。本発明の防除対象となる植物寄生性センチュウは、好ましくはネコブセンチュウである。

[0020] ネコブセンチュウは、植物の根に寄生して植物細胞の原形質から栄養をとり、植物の根に瘤を形成する。ネコブセンチュウの幼虫は、卵の中で1回脱皮し、第2期 (J2) 幼虫となってから孵化する。第2期幼虫は土壤中を移動し、植物の根の根尖部付近から組織内に侵入し、維管束付近に定着して養分を摂取した後、2回目の脱皮を行って成虫となる。成虫の体長はおよそ0.5~1mmであり、雌成虫は卵嚢を排出し、その中に約400~1500個の卵を産卵する。ネコブセンチュウに属する種としては、例えばイネネコブセンチュウ、ジャワネコブセンチュウ (*Meloidogyne javanica*)、サツマイモネコブセンチュウ (*Meloidogyne incognita*; 本明細書ではしばしば「Mi」と表記する)、キタネコブセンチュウ (*Meloidogyne hapla*)、リンゴネコブセンチュウ (*Meloidogyne mali*)、及びアレナリアネコブセンチュウ (*Meloidogyne arenaria*) が挙げられる。

[0021] ネグサレセンチュウに属する種としては、例えばキタネグサレセンチュウ (*Pratylenchus penetrans*)、ミナミネグサレセンチュウ (*Pratylenchus coffeae*)、ムギネグサレセンチュウ (*Pratylenchus neglectus*)、ノコギリネグサレセンチュウ (*Pratylenchus crenatus*)、クルミネグサレセンチュウ (*Pratylenchus vulnus*)、及びチャネグサレセンチュウ (*Pratylenchus loosi*) が挙げられる。

[0022] シストセンチュウに属する種としては、例えばジャガイモシストセンチュウ (*Globodera rostochiensis*)、ダイズシストセンチュウ (*Heterodera glycines*)、及びクローバーシストセンチュウ (*Heterodera trifolii*) が挙げられる。

[0023] ハセンチュウに属する種としては、例えばハガレセンチュウ (*Aphelenchoides ritzemabosi*)、イチゴセンチュウ (*Aphelenchoides fragariae*)、及び

イネシンガレセンチュウ (*Aphelenchoides besseyi*) が挙げられる。

[0024] クキセンチュウに属する種としては、例えばイモグサレセンチュウ (*Ditylenchus destructor*)、及びナミクキセンチュウ (*Ditylenchus dipsaci*) が挙げられる。

[0025] 本明細書において植物は、植物寄生性センチュウが寄生し得る植物種であれば特に制限はされず、被子植物又は裸子植物のいずれであってもよい。また、被子植物には、双子葉又は単子葉植物のいずれも包含される。代表的なものとしては、農業上、特に種苗産業及び花卉園芸産業上、重要な植物、例えば、穀類、花、野菜、果物等の作物植物が挙げられる。具体的には、単子葉植物であれば、イネ科に属する種（例えば、イネ、コムギ、オオムギ、ライムギ、トウモロコシ、サトウキビ、アワ、キビ、ヒエ、ソルガム、コウリヤン）、バショウ科に属する種（例えば、バナナ、バショウ）、又はパイナップル科（例えば、パイナップル）が該当する。双子葉植物であれば、アブラナ科に属する種（例えば、キャベツ、ダイコン、ハクサイ、アブラナ）、マメ科に属する種（例えば、ダイズ、ピーナッツ、エンドウ、インゲンマメ、アズキ、ソラマメ、スイートピー）、ナス科に属する種（例えば、トマト、ナス、ジャガイモ、タバコ、ピーマン、トウガラシ、ペチュニア）、ヒルガオ科に属する種（例えば、サツマイモ、ヨウサイ）、バラ科に属する種（例えば、イチゴ、バラ、リンゴ、ナシ、モモ、ビワ、アーモンド、スモモ、ウメ、サクラ）、ラン科に属する種（例えば、シンビジウム、ファレノプシス、カトレア、デンドロビウム）、ユリ科に属する種（例えば、ユリ、チューリップ）、キジカクシ科（例えば、ヒアシンズ、ムスカリ）、ヒガンバナ科（例えば、ネギ、タマネギ、ニンニク）、ミカン科（例えば、ミカン、オレンジ、グレープフルーツ、レモン、ユズ）、ブドウ科に属する種（例えば、ブドウ）、キク科に属する種（例えば、レタス、キク、ダリア、マーガレット、ヒマワリ）、ナデシコ科に属する種（例えば、カーネーション、カスミソウ）、ツバキ科に属する種（例えば、サザンカ、チャノキ）が該当する。ネコブセンチュウは2,000種を超える植物に寄生（感染）することが報告さ

れており、センチュウ種により寄生する宿主に違いはあるものの、ナス科、イネ科、アブラナ科、マメ科、ウリ科、ヒルガオ科、ユリ科、キク科、アカザ科、セリ科、サトイモ科、ショウガ科、アオイ科等の幅広い宿主範囲を有し、様々な農作物に寄生して植物病害をもたらす。ネコブセンチュウの宿主植物種の一例としては、トマト、ピーマン、ウリ、バレイショ、サツマイモ、ナス、ニンジン、ゴボウ、ハウレンソウ、フダンソウ、シュンギク、ネギ類、ショウガ、エンドウ、インゲンマメ、ササゲ、イネ等が挙げられる。

[0026] イネの栽培品種は、アジアイネ (*Oryza sativa*) とアフリカイネ (*Oryza glaberrima*) に分類される。アジアイネはインディカ (*Indica*) 及びジャポニカ (*Japonica*) の2種類の亜種に分類され、ジャポニカは温帯ジャポニカ (表1において「Temperate japonica」として示す) と熱帯ジャポニカ (表1において「Tropical japonica」として示す) に分類される。温帯ジャポニカに属する品種としては、例えば、台中65号 (Taichung65 ; T65)、銀坊主 (Ginbouzu)、日本晴 (Nipponbare)、金南風 (Kinmaze)、ヒノヒカリ (Hinohikari)、ゆきひかり (Yukihikari)、愛国 (Aikoku)、亀治 (Kameji)、京都旭 (Kyoutoasahi)、赤毛 (Akage)、Dianyu1等が挙げられる。熱帯ジャポニカに属する品種としては、例えば、Ma Sho、Khao Nok、Jaguary、Khau Mac Kho、Padi Perak、Rexmont、Senshou、Kahei等が挙げられる。インディカはインディカ (表1において「Indica」として示す) とアウス (表1において「Aus」として示す) に分類できる。インディカに属する品種としては、例えば、Bei Khe、Naba、Puluik Arang、Ryou Suisan Koumai、Jinguoyin、Keiboba、Qingyu、Deng Pao Zhai、Milyang23、Karahoushi等が挙げられる。アウスに属する品種としては、Kasalath、Jena035、Muha、Jhona2、Nepal8、Jarjan、Kalo Dhan、Anjana Dhan、Shoni、Surjamukhi、ARC7291、ARC5955、ARC7047、ARC11094、Badari Dhan、Nepal555、Kaluheenati、DV85、ARC10313、N22等が挙げられる。また、ネリカ (*Nerica*) はアジアイネとアフリカイネの間の交雑種である。ネリカに属する品種としては、NERICA 1、NERICA 2、NERICA 4、NERICA 6、NERICA L20、NERICA L41等が挙げられる (表1では、ネリカ

品種を含むネリカ関連品種を「NERICA related」として示す)。上記のいずれのグループにも分類されない交雑種(表1において「Admixture」として示す)としては、Davao1、Asu、IR58、Co13、Vary Futsi、Shwe Nang Gyi、Pinulupot1、Local Basmati、Basilanon、Khau Tan Chiem、Tima1、Tupa729等が挙げられる。また、分類不明の品種(表1において「Unknown」として示す)として、Basmati370、IRAT109、LTH、IR24、Kinandang Patong、Silewah等が挙げられる。イネの栽培品種の分類方法については、Kojima et al., 2005, *Breeding Science*, 55, 431-440及びYonemaru et al., 2014, *Plant Cell Physiol.*, 55 (1), e9を参照することができる。

[0027] イネ品種は、植物寄生性センチュウ罹患性の品種及び植物寄生性センチュウ抵抗性の品種に分類することができる。例えば、本明細書の実施例に記載の評価方法を用いて評価値(Evaluation value; EV)を算出し、評価値が特定の値以上のイネ品種をセンチュウ罹患性の品種、評価値が特定の値未満のイネ品種をセンチュウ抵抗性の品種に分類することができる。

[0028] 本明細書において「植物寄生性センチュウ抵抗性」とは、植物寄生性センチュウによる宿主植物への加害及び/又は寄生(感染)を防止又は抑制する作用をいう。ネコブセンチュウ等の植物寄生性センチュウに対する植物の抵抗性は、当業者に公知の方法を用いて検査することができる。例えば、被験植物に一定数(例えば、200匹)のネコブセンチュウJ2幼虫をその培養土に接種し、一定期間後(例えば2か月後)に感染状態の評価を行う。評価は、植物体の根における瘤の数、及び/又はネコブセンチュウの卵塊数を計数することが好ましい。瘤の数は、目視により計数することができる。

[0029] 本明細書において「植物寄生性センチュウ防除」とは、植物寄生性センチュウの宿主植物への加害及び/又は寄生(感染)を防止又は抑制する作用をいう。

[0030] 本明細書において「RMIR1 (ROOT MELOIDOGYNE INCOGNITA RESISTANCE 1) 遺伝子」とは、イネにおいて植物寄生性センチュウに対する抵抗性に関連する日本晴ゲノム上の0s06g0621600遺伝子、任意のイネ品種において0s06g0621

600遺伝子に対応するオルソログ遺伝子、任意の植物種においてOs06g0621600遺伝子に対応するオルソログ遺伝子、又はそのいずれかに由来する変異型遺伝子をいう。RMIR1遺伝子はRAP-db上でOs06g0621600遺伝子と表記されるが、Rice Genome Annotation Project (RGAP)ではLOC_Os06g41670.1遺伝子と表記されている。本明細書において単に「RMIR1遺伝子」というとき、任意の生物種に由来する野生型及び変異型のRMIR1遺伝子（それぞれ「野生型RMIR1遺伝子」及び「変異型RMIR1遺伝子」と表記する）が含まれ、また後述のL型RMIR1遺伝子及びS型RMIR1遺伝子が含まれるものとする。

[0031] イネ品種間ではRMIR1遺伝子配列に差異がある場合がある。例えば、ARC10313のRMIR1遺伝子は1154アミノ酸残基からなるタンパク質をコードするが、T65のRMIR1遺伝子は、C末端側の領域が欠失した579アミノ酸残基からなる欠失型タンパク質をコードする。本明細書では、上記C末端側の領域の有無によって、イネRMIR1遺伝子をL型RMIR1遺伝子及びS型RMIR1遺伝子に分類する。すなわち、S型RMIR1遺伝子は、L型RMIR1遺伝子と比較してC末端側の領域が欠失している欠失型タンパク質をコードする。

[0032] L型RMIR1遺伝子の例としては、ARC10313、N22、及びKalo DhanのRMIR1遺伝子が挙げられる。ARC10313、N22、及びKalo DhanのRMIR1遺伝子の塩基配列はいずれも配列番号14で示され、100%同一である。

[0033] S型RMIR1遺伝子の例としては、T65及び日本晴のRMIR1遺伝子等が挙げられる。T65及び日本晴のRMIR1遺伝子の塩基配列はいずれも配列番号16で示され、100%同一である。

[0034] 本明細書において「RMIR1ポリペプチド」とは、イネにおいて植物寄生性センチュウに対する抵抗性に関連する日本晴ゲノム上のOs06g0621600遺伝子にコードされるポリペプチド（すなわちRMIR1遺伝子にコードされるポリペプチド）、任意のイネ品種においてそれに対応するオルソログ、任意の植物種においてそれに対応するオルソログ、又はそのいずれかに由来する変異型ポリペプチドをいう。本明細書において単に「RMIR1ポリペプチド」というとき、任意の生物種に由来する野生型及び変異型のRMIR1ポリペプチド（それぞれ「

野生型RMIR1ポリペプチド」及び「変異型RMIR1ポリペプチド」と表記する)が含まれ、また後述のL型RMIR1ポリペプチド及びS型RMIR1ポリペプチドが含まれるものとする。

[0035] イネの野生型RMIR1ポリペプチドは、L型RMIR1遺伝子にコードされるL型RMIR1ポリペプチド、及びS型RMIR1遺伝子にコードされるS型RMIR1ポリペプチドに分類される。L型RMIR1ポリペプチドは、ヌクレオチド結合ドメイン (NB-ARCドメイン) 及び13個のロイシンリッチリピート (LRR) ドメインを含むNB-LRRタンパク質である。これに対して、S型RMIR1ポリペプチドは、L型RMIR1ポリペプチドにおける580位のセリン残基に対応する位置が終止コドンであるため、L型RMIR1ポリペプチドにおいてC末端側の11個のLRRドメインが欠失している。L型RMIR1ポリペプチドのアミノ酸配列の例として、配列番号13が挙げられる。ARC10313、N22、及びKalo DhanではRMIR1ポリペプチドのアミノ酸配列は、いずれも配列番号13で示され、100%同一である。S型RMIR1ポリペプチドのアミノ酸配列の例としては、配列番号15が挙げられる。T65及び日本晴のRMIR1ポリペプチドのアミノ酸配列は、いずれも配列番号15で示され、100%同一である。T65及び日本晴のRMIR1ポリペプチドでは、ARC10313、N22、及びKalo DhanのRMIR1ポリペプチドと比較して、C末端側の575アミノ酸残基が欠失している他、138位のアラニン残基がスレオニン残基に置換されており、548位のアルギニン残基がロイシン残基に置換されている (図3)。

[0036] 本明細書において「RKNR1 (ROOT KNOT NEMATODE RESISTANCE 1) 遺伝子」とは、イネにおいて植物寄生性センチュウに対する抵抗性に関連する日本晴ゲノム上の0s04g0112100遺伝子、任意のイネ品種において0s04g0112100遺伝子に対応するオルソログ遺伝子、任意の植物種において0s04g0112100遺伝子に対応するオルソログ遺伝子、又はそのいずれかに由来する変異型遺伝子をいう。本明細書において単に「RKNR1遺伝子」というとき、任意の生物種に由来する野生型及び変異型のRKNR1遺伝子 (それぞれ「野生型RKNR1遺伝子」及び「変異型RKNR1遺伝子」と表記する) が含まれ、また後述のL型RKNR1遺伝子及びS型RKNR1遺伝子が含まれるものとする。

- [0037] イネ品種間ではRKNR1遺伝子配列に差異がある場合がある。例えば、RKNR1遺伝子のORFでは、RKNR1アミノ酸配列中のNB-ARCドメインの中央部分からLRRドメインのC末端側付近に至る配列領域の有無が、イネ品種間で異なることが知られている。本明細書では、この配列領域の有無によって、イネRKNR1遺伝子をL型RKNR1遺伝子及びS型RKNR1遺伝子に分類する。
- [0038] L型RKNR1遺伝子の例としては、温帯ジャポニカに属する一部の品種（例えば、赤毛及び銀坊主）、並びにインディカ、熱帯ジャポニカ、アウス、及びネリカに属する品種のRKNR1遺伝子が挙げられる。L型RKNR1遺伝子の塩基配列の例として、配列番号2（N22及びKalo Dhan）、配列番号5（Naba）、配列番号6（Bei Khe）、及び配列番号7（赤毛）が挙げられる。なお、RKNR1遺伝子の塩基配列はN22とKalo Dhanとの間で100%同一であり、いずれも配列番号2で示される。
- [0039] S型RKNR1遺伝子の例としては、温帯ジャポニカの一部の品種（例えば、T65、日本晴、金南風、ヒノヒカリ、ゆきひかり、愛国、亀治、京都旭、及びDianyu1）のRKNR1遺伝子等が挙げられる。S型RKNR1遺伝子の塩基配列の例として、配列番号3（T65）及び配列番号4（日本晴）が挙げられる。
- [0040] 本明細書において「RKNR1ポリペプチド」とは、イネにおいて植物寄生性センチュウに対する抵抗性に関連する日本晴ゲノム上のOs04g0112100遺伝子にコードされるポリペプチド（すなわちRKNR1遺伝子にコードされるポリペプチド）、任意のイネ品種においてそれに対応するオルソログ、任意の植物種においてそれに対応するオルソログ、又はそのいずれかに由来する変異型ポリペプチドをいう。本明細書において単に「RKNR1ポリペプチド」というとき、任意の生物種に由来する野生型及び変異型のRKNR1ポリペプチド（それぞれ「野生型RKNR1ポリペプチド」及び「変異型RKNR1ポリペプチド」と表記する）が含まれ、また後述のL型RKNR1ポリペプチド及びS型RKNR1ポリペプチドが含まれるものとする。
- [0041] イネの野生型RKNR1ポリペプチドは、L型RKNR1遺伝子にコードされるL型RKNR1ポリペプチド、及びS型RKNR1遺伝子にコードされるS型RKNR1ポリペプチド

に分類される。Bei Khe及びNaba以外のイネ品種では、L型RKNR1ポリペプチドは、ヌクレオチド結合ドメイン（NB-ARCドメイン）及び7つのロイシンリッチリピート（LRR）ドメインを有するNB-LRRタンパク質である。これに対して、S型RKNR1ポリペプチドは、L型RKNR1ポリペプチドにおいてヌクレオチド結合ドメインの一部とLRRドメインの大部分を欠失するポリペプチドである。なお、Bei Khe及びNabaのRKNR1ポリペプチドは、その遺伝子配列において1754bp領域が欠失していないため、L型RKNR1ポリペプチドに分類されるが、フレームシフトによって生じる終止コドンによってアミノ酸長の短いタンパク質となる。S型RKNR1ポリペプチドのアミノ酸配列の例としては、配列番号8（T65）及び配列番号9（日本晴）が挙げられる。L型RKNR1ポリペプチドのアミノ酸配列の例として、配列番号1（N22及びKalo Dhan）、配列番号10（Naba）、配列番号11（Bei Khe）、及び配列番号12（赤毛）が挙げられる。なお、RKNR1ポリペプチドのアミノ酸配列はKalo DhanとN22との間で100%同一であり、いずれも配列番号1で示される。

[0042] 本明細書において植物体の「全部」とは、生きている植物体を構成する全領域をいう。また、植物体の「一部」とは、生きている植物体を構成する一部領域、具体的には、器官（例えば、根部、莖部、葉部、花部、表皮、若しくはそれらの組み合わせ、又は花粉、卵細胞若しくは種子等を含む）、形態的及び／又は機能的に分化した細胞群からなる組織若しくはその一部、又は細胞をいう。

[0043] 本明細書において「複数個」とは、例えば、2～100個、2～90個、2～80個、2～70個、2～60個、2～50個、2～40個、2～30個、2～20個、2～15個、2～10個、2～7個、2～5個、2～4個又は2～3個をいう。また、「アミノ酸同一性」とは、比較する2つのポリペプチドのアミノ酸配列において、アミノ酸残基の一致数が最大となるように、必要に応じて一方又は双方に適宜ギャップを挿入して整列化（アラインメント）したときに、全アミノ酸残基数における一致アミノ酸残基数の割合（％）をいう。アミノ酸同一性を算出するための2つのアミノ酸配列の整列化は、Blast、FASTA、ClustalW等の既知プログラムを

用いて行うことができる。「塩基同一性」も同様に計算される。

[0044] 本明細書において「(アミノ酸の)置換」とは、天然のタンパク質を構成する20種類のアミノ酸間において、電荷、側鎖、極性、芳香族性等の性質の類似する保存的アミノ酸群内での置換をいう。例えば、低極性側鎖を有する無電荷極性アミノ酸群 (Gly, Asn, Gln, Ser, Thr, Cys, Tyr)、分枝鎖アミノ酸群 (Leu, Val, Ile)、中性アミノ酸群 (Gly, Ile, Val, Leu, Ala, Met, Pro)、親水性側鎖を有する中性アミノ酸群 (Asn, Gln, Thr, Ser, Tyr, Cys)、酸性アミノ酸群 (Asp, Glu)、塩基性アミノ酸群 (Arg, Lys, His)、芳香族アミノ酸群 (Phe, Tyr, Trp) 内での置換が挙げられる。これらの群内でのアミノ酸置換であれば、ポリペプチドの性質に変化を生じにくいことが知られているため好ましい。

[0045] 本明細書において「ストリンジентな条件」とは、非特異的なハイブリッドが形成されにくい条件を意味する。「高ストリンジентな条件」とは、非特異的なハイブリッドがより形成されにくい、又は形成されない条件をいう。一般に、反応条件が低塩濃度で、かつ高温になるほど高ストリンジентな条件となる。ハイブリダイゼーション後の洗浄において、例えば50℃～70℃、55℃～68℃、又は65℃～68℃で、0.1×SSC及び0.1%SDSで洗浄する条件である。この他、プローブ濃度、プローブ塩基長、ハイブリダイゼーション時間等のその他の条件を適宜組み合わせることでハイブリダイゼーションのストリンジエンシーを高くすることもできる。

[0046] 1-3. 構成

本発明の植物寄生性センチュウ防除剤は、有効成分として、(1)植物寄生性センチュウ抵抗性のRMIR1ポリペプチド若しくはその断片を含むか、(2)植物寄生性センチュウ抵抗性のRMIR1ポリペプチド又はその断片をコードするポリヌクレオチドを含むか、又は(3)植物寄生性センチュウ抵抗性のRMIR1ポリペプチド又はその断片をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを含む。

[0047] 1-3-1. 有効成分

(1) 植物寄生性センチュウ抵抗性のRMIR1ポリペプチド若しくはその断片一実施形態において、本発明の植物寄生性センチュウ防除剤は、植物寄生性センチュウ抵抗性のRMIR1ポリペプチド若しくはその断片からなる、又はそれを含む。

[0048] 本明細書において「植物寄生性センチュウ抵抗性のRMIR1ポリペプチド」とは、宿主植物に植物寄生性センチュウに対する抵抗性を付与する、及び／又は宿主植物の植物寄生性センチュウに対する抵抗性を増強するRMIR1ポリペプチドであって、植物寄生性センチュウ抵抗性の植物に由来する野生型又は変異型のRMIR1ポリペプチドをいう。

[0049] 植物寄生性センチュウ抵抗性の野生型RMIR1ポリペプチドとしては、野生型のL型RMIR1ポリペプチドが挙げられる。野生型のL型RMIR1ポリペプチドの例としては、配列番号13で示すARC10313、N22、及びKa lo Dhanの野生型RMIR1ポリペプチド、及びそれらの他のイネ品種又は他植物種の野生型のL型RMIR1オルソログが挙げられる。

[0050] 植物寄生性センチュウ抵抗性の変異型RMIR1ポリペプチドとしては、上記いずれかの植物寄生性センチュウ抵抗性の野生型RMIR1ポリペプチドのアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列、又は、上記いずれかの植物寄生性センチュウ抵抗性の野生型RMIR1ポリペプチドのアミノ酸配列と60%以上、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、82%以上、85%以上、87%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、又は99%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドが挙げられる。例えば、配列番号13で示すアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列、又は、配列番号13で示すアミノ酸配列と60%以上、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、82%以上、85%以上、87%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、又は99%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドが挙げられる。植物寄生性

センチュウ抵抗性の変異型RMIR1ポリペプチドは、植物寄生性センチュウ抵抗性の野生型RMIR1ポリペプチドの50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、若しくは90%以上の活性、又はそれと同等以上の活性を有するものが好ましい。

[0051] 一実施形態において、植物寄生性センチュウ抵抗性のRMIR1ポリペプチドは、(a) 配列番号13で示すアミノ酸配列、(b) 配列番号13で示すアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列、又は(c) 配列番号13で示すアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列のいずれかを含むポリペプチド又はその断片からなる。

[0052] 本明細書において植物寄生性センチュウ抵抗性のRMIR1ポリペプチドの「断片」とは、上記の植物寄生性センチュウ抵抗性のRMIR1ポリペプチドにおいて、植物寄生性センチュウに対する抵抗性を宿主植物に付与する、及び／又は宿主植物の植物寄生性センチュウに対する抵抗性を増強する活性を有する断片、例えば植物寄生性センチュウ抵抗性のRMIR1ポリペプチドの活性の50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、若しくは90%以上の活性、又はそれと同等以上の活性を有する断片をいう。例えば、植物寄生性センチュウ抵抗性のRMIR1ポリペプチドにおいて1つ、2つ、又は3つ以上のLRRドメインを含むポリペプチド断片が挙げられる。本断片を構成するポリペプチドのアミノ酸長は、特に限定しないが、例えば、植物寄生性センチュウ抵抗性のRMIR1ポリペプチドにおいて、少なくとも50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、又は1000アミノ酸の連続する領域であればよい。

[0053] さらに実施形態において、植物寄生性センチュウ防除剤は、植物寄生性センチュウ抵抗性のRMIR1ポリペプチド若しくはその断片に加えて、植物寄生性センチュウ抵抗性のRKNR1ポリペプチド若しくはその断片をさらに含む。

[0054] 本明細書において「植物寄生性センチュウ抵抗性のRKNR1ポリペプチド」とは、宿主植物に植物寄生性センチュウに対する抵抗性を付与する、及び／又

は宿主植物の植物寄生性センチュウに対する抵抗性を増強するRKNR1ポリペプチドであって、植物寄生性センチュウ抵抗性の植物に由来する野生型又は変異型のRKNR1ポリペプチドをいう。RKNR1遺伝子は、特許文献1（W02022/176971）において、植物の植物寄生性センチュウに対する抵抗性を増強することができる遺伝子であることが開示されており、当該植物のセンチュウ誘引活性、根部内へのセンチュウの移行、瘤形成、瘤成熟、根部内におけるセンチュウの成長、及び／又は宿主植物における巨大細胞の誘導を抑制することができることも開示されている。

[0055] 植物寄生性センチュウ抵抗性の野生型RKNR1ポリペプチドとしては、Bei Khe、Naba、及び赤毛（Akage）のRKNR1ポリペプチド以外のL型RKNR1ポリペプチドが挙げられる。Bei Khe、Naba、及び赤毛（Akage）のRKNR1ポリペプチド以外のL型RKNR1ポリペプチドの例としては、配列番号1で示すN22の野生型RKNR1ポリペプチド、配列番号1で示すKalo Dhanの野生型RKNR1ポリペプチド、及びそれらの他のイネ品種又は他植物種の野生型RKNR1オルソログが挙げられる。例えば、Ma Shoの野生型RKNR1ポリペプチド、Khao Nokの野生型RKNR1ポリペプチド、Jaguaryの野生型RKNR1ポリペプチド、Khau Mac Khoの野生型RKNR1ポリペプチド、Padi Perakの野生型RKNR1ポリペプチド、Rexmontの野生型RKNR1ポリペプチド、Senshouの野生型RKNR1ポリペプチド、Kaheiの野生型RKNR1ポリペプチド、Puluik Arangの野生型RKNR1ポリペプチド、Ryou Suisan Koumaiの野生型RKNR1ポリペプチド、Jinguoyinの野生型RKNR1ポリペプチド、Keibobaの野生型RKNR1ポリペプチド、Qingyuの野生型RKNR1ポリペプチド、Deng Pao Zhaiの野生型RKNR1ポリペプチド、Milyang23の野生型RKNR1ポリペプチド、Karahoushiの野生型RKNR1ポリペプチド、Kasalathの野生型RKNR1ポリペプチド、Jena035の野生型RKNR1ポリペプチド、Muhaの野生型RKNR1ポリペプチド、Jhona2の野生型RKNR1ポリペプチド、Nepal8の野生型RKNR1ポリペプチド、Jarjanの野生型RKNR1ポリペプチド、Anjana Dhanの野生型RKNR1ポリペプチド、Shoniの野生型RKNR1ポリペプチド、Surjamukhiの野生型RKNR1ポリペプチド、ARC7291の野生型RKNR1ポリペプチド、ARC5955の野生型RKNR1ポリペプチド

、ARC7047の野生型RKNR1ポリペプチド、ARC11094の野生型RKNR1ポリペプチド、Badari Dhanの野生型RKNR1ポリペプチド、Nepal555の野生型RKNR1ポリペプチド、Kaluheenatiの野生型RKNR1ポリペプチド、DV85の野生型RKNR1ポリペプチド、ARC10313の野生型RKNR1ポリペプチド、WAB56-50の野生型RKNR1ポリペプチド、WAB56-104の野生型RKNR1ポリペプチド、NERICA 1の野生型RKNR1ポリペプチド、NERICA 2の野生型RKNR1ポリペプチド、NERICA 4の野生型RKNR1ポリペプチド、NERICA 6の野生型RKNR1ポリペプチド、NERICA L20の野生型RKNR1ポリペプチド、NERICA L41の野生型RKNR1ポリペプチド、CG14の野生型RKNR1ポリペプチド、WK18の野生型RKNR1ポリペプチド、Davao1の野生型RKNR1ポリペプチド、Asuの野生型RKNR1ポリペプチド、IR58の野生型RKNR1ポリペプチド、Co13の野生型RKNR1ポリペプチド、Vary Futsiの野生型RKNR1ポリペプチド、Shwe Nang Gyiの野生型RKNR1ポリペプチド、Pinulupot1の野生型RKNR1ポリペプチド、Local Basmatiの野生型RKNR1ポリペプチド、Basilanonの野生型RKNR1ポリペプチド、Khau Tan Chiemの野生型RKNR1ポリペプチド、Tima1の野生型RKNR1ポリペプチド、Tupa729の野生型RKNR1ポリペプチド、Basmati370の野生型RKNR1ポリペプチド、IRAT109の野生型RKNR1ポリペプチド、LTHの野生型RKNR1ポリペプチド、IR24の野生型RKNR1ポリペプチド、Kinandang Patongの野生型RKNR1ポリペプチド、及びSilawahの野生型RKNR1ポリペプチドが該当する。

[0056] 植物寄生性センチュウ抵抗性の変異型RKNR1ポリペプチドとしては、上記いずれかの植物寄生性センチュウ抵抗性の野生型RKNR1ポリペプチドのアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列、又は、上記いずれかの植物寄生性センチュウ抵抗性の野生型RKNR1ポリペプチドのアミノ酸配列と60%以上、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、82%以上、85%以上、87%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、又は99%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドが挙げられる。例えば、配列番号1で示すアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミ

ノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列、又は、配列番号1で示すアミノ酸配列と60%以上、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、82%以上、85%以上、87%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、又は99%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドが挙げられる。植物寄生性センチュウ抵抗性の変異型RKNR1ポリペプチドは、植物寄生性センチュウ抵抗性の野生型RKNR1ポリペプチドの50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、若しくは90%以上の活性、又はそれと同等以上の活性を有するものが好ましい。

[0057] さらに実施形態において、植物寄生性センチュウ抵抗性の変異型RKNR1ポリペプチドは、配列番号12で示すアミノ酸配列における315位がGly以外のアミノ酸残基（例えばAsp）であり、配列番号12で示すアミノ酸配列における505位がAsp以外のアミノ酸残基（例えばGlu）であり、配列番号12で示すアミノ酸配列における745位がVal以外のアミノ酸残基（例えばAla）であり、及び／又は配列番号12で示すアミノ酸配列における1040位がGln以外のアミノ酸残基（例えばLeu）である。植物寄生性センチュウ抵抗性の変異型RKNR1ポリペプチドは、好ましくは配列番号12で示すアミノ酸配列における1040位がGln以外のアミノ酸残基（例えばLeu）である。

[0058] さらに実施形態において、植物寄生性センチュウ抵抗性のRKNR1ポリペプチドは、（a）配列番号1で示すアミノ酸配列、（b）配列番号1で示すアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列、又は（c）配列番号1で示すアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列のいずれかを含むポリペプチド又はその断片からなる。

[0059] 本明細書において植物寄生性センチュウ抵抗性のRKNR1ポリペプチドの「断片」とは、上記の植物寄生性センチュウ抵抗性のRKNR1ポリペプチドにおいて、植物寄生性センチュウに対する抵抗性を宿主植物に付与する、及び／又は宿主植物の植物寄生性センチュウに対する抵抗性を増強する活性を有する断片、例えば植物寄生性センチュウ抵抗性のRKNR1ポリペプチドの活性の50%以

上、60%以上、70%以上、80%以上、若しくは90%以上の活性、又はそれと同等以上の活性を有する断片をいう。例えば、植物寄生性センチュウ抵抗性のRKNR1ポリペプチドにおいてLRRドメインを含むポリペプチド断片が挙げられる。本断片を構成するポリペプチドのアミノ酸長は、特に限定しないが、例えば、植物寄生性センチュウ抵抗性のRKNR1ポリペプチドにおいて、少なくとも50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、又は1000アミノ酸の連続する領域であればよい。

[0060] (2) 植物寄生性センチュウ抵抗性のRMIR1ポリペプチド又はその断片をコードするRMIR1ポリヌクレオチド

一実施形態において、本発明の植物寄生性センチュウ防除剤は、植物寄生性センチュウ抵抗性のRMIR1ポリペプチド又はその断片をコードするポリヌクレオチド（本明細書において「RMIR1ポリヌクレオチド」という）を含む、又はそれからなる。

[0061] RMIR1ポリヌクレオチドは、上記の植物寄生性センチュウ抵抗性のRMIR1ポリペプチド若しくはその断片をコードする。RMIR1ポリヌクレオチドは、植物寄生性センチュウ抵抗性のRMIR1ポリペプチド又はその断片をコードするポリヌクレオチドであれば、その塩基配列は特に限定しない。例えば、配列番号13で示すアミノ酸配列からなるARC10313の野生型RMIR1ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、ARC10313の野生型RMIR1遺伝子であって、配列番号14で示す塩基配列からなるポリヌクレオチド）である。

[0062] 一実施形態において、RMIR1ポリヌクレオチドは、(g) 配列番号14で示す塩基配列、(h) 配列番号14で示す塩基配列において1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列、(i) 配列番号14で示す塩基配列と60%以上、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、82%以上、85%以上、87%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、又は99%以上の同一性を有する塩基配列、又は(j) 配列番号14で示す塩基配列に相補的な塩基配

列と高ストリンジेंटな条件でハイブリダイズする塩基配列のいずれかを
含む。

[0063] さらに実施形態において、本発明の植物寄生性センチュウ防除剤は、植物寄生性センチュウ抵抗性のRMIR1ポリペプチド又はその断片をコードするポリヌクレオチドに加えて、植物寄生性センチュウ抵抗性のRKNR1ポリペプチド又はその断片をコードするポリヌクレオチド（本明細書において「RKNR1ポリヌクレオチド」という）をさらに含む。

[0064] RKNR1ポリヌクレオチドは、上記の植物寄生性センチュウ抵抗性のRKNR1ポリペプチド若しくはその断片をコードする。RKNR1ポリヌクレオチドは、植物寄生性センチュウ抵抗性のRKNR1ポリペプチド又はその断片をコードするポリヌクレオチドであれば、その塩基配列は特に限定しない。例えば、配列番号1で示すアミノ酸配列からなるN22の野生型RKNR1ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、N22の野生型RKNR1遺伝子であって、配列番号2で示す塩基配列からなるポリヌクレオチド）、又は配列番号1で示すアミノ酸配列からなるKalo DhanのRKNR1ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、Kalo Dhanの野生型RKNR1遺伝子であって、配列番号2で示す塩基配列からなるポリヌクレオチド）である。

[0065] さらに実施形態において、RKNR1ポリヌクレオチドは、（k）配列番号2で示す塩基配列、（l）配列番号2で示す塩基配列において1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列、（m）配列番号2で示す塩基配列と60%以上、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、82%以上、85%以上、87%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、又は99%以上の同一性を有する塩基配列、又は（n）配列番号2で示す塩基配列に相補的な塩基配列と高ストリンジेंटな条件でハイブリダイズする塩基配列のいずれかを
含む。

[0066] 一実施形態において、RMIR1ポリヌクレオチド及び／又はRKNR1ポリヌクレオチドの塩基配列は、当該ポリヌクレオチドが導入される細胞におけるコード

ン使用頻度に合わせてコドン最適化した塩基配列であってもよい。

[0067] RMIR1ポリヌクレオチド及び／又はRKNR1ポリヌクレオチドは、DNA、又はmRNA等のRNAであってもよい。

RMIR1ポリヌクレオチド及び／又はRKNR1ポリヌクレオチドがmRNAである場合、その塩基配列は、上で例示したいずれかの塩基配列においてチミン (T) をウラシル (U) に置換した塩基配列をコーディング領域として含むmRNAとすることができる。本発明のポリヌクレオチドに該当するmRNAは、前記コーディング領域に加えて、5'末端のキャップ構造、3'末端のポリA鎖、開始コドン上流の5'非翻訳領域 (5' UTR)、及び／又は終止コドン下流の3'非翻訳領域 (3' UTR) 等を含んでもよい。5' UTR及び／又は3' UTR等には、mRNAからの翻訳量を調節するための配列が含まれていてもよい。

[0068] (3) 植物寄生性センチュウ抵抗性のRMIR1ポリペプチド又はその断片をコードするRMIR1ポリヌクレオチドを含む発現ベクター

一実施形態において、本発明の植物寄生性センチュウ防除剤は、植物寄生性センチュウ抵抗性のRMIR1ポリペプチド又はその断片をコードするRMIR1ポリヌクレオチドを含む発現ベクターを含む、又はそれからなる。

[0069] 本発明の発現ベクターは、本発明の植物寄生性センチュウ抵抗性のRMIR1ポリペプチド又はその断片をコードするRMIR1ポリヌクレオチドを発現可能な状態で含む。本明細書において「発現可能な状態」とは、プロモーターの制御下にあるプロモーター下流域に、発現すべき遺伝子を配置していることをいう。

[0070] 本発明の発現ベクターは、必須構成要素として、プロモーター、及び「(2) 植物寄生性センチュウ抵抗性のRMIR1ポリペプチド又はその断片をコードするRMIR1ポリヌクレオチド」に記載のポリヌクレオチドを含む。

[0071] さらなる実施形態において、本発明の発現ベクターは、植物寄生性センチュウ抵抗性のRMIR1ポリペプチド又はその断片をコードするRMIR1ポリヌクレオチドに加えて、植物寄生性センチュウ抵抗性のRKNR1ポリペプチド又はその断片をコードするRKNR1ポリヌクレオチドを発現可能な状態でさらに含む。

- [0072] 本発明の発現ベクターとして使用可能なベクターは、例えば、プラスミド又はウイルスを利用した発現ベクターである。本明細書において、「発現ベクター」は、組換えベクターを包含するものとする。
- [0073] プラスミドを利用した発現ベクター（以下、しばしば「プラスミド発現ベクター」と表記する）の場合、プラスミドには、限定はしないが、例えば、pPZP系、pSMA系、pUC系、pBR系、pBluescript系（Agilent Technologies社）、pTriEXTM系（TaKaRa社）、又はpBI系、pRI系若しくはpGW系のバイナリーベクター等を利用することができる。
- [0074] ウイルスを利用した発現ベクター（以下、しばしば「ウイルス発現ベクター」と表記する）の場合、ウイルスには、カリフラワーモザイクウイルス（CaMV）、インゲンマメゴールデンモザイクウイルス（BGMV）、タバコモザイクウイルス（TMV）等を利用することができる。
- [0075] また、アグロバクテリウム法を用いる場合には、バイナリーベクター等のアグロバクテリウム法に適した発現ベクター又はその改変ベクターを用いることもできる。そのような発現ベクターとしては、例えば、pBI121、pBIN19、pSMAB704、pCAMBIA、pGreen等が挙げられる。
- [0076] プロモーターは、各種プロモーター、例えば、過剰発現型プロモーター、構成的プロモーター、部位特異的プロモーター、時期特異的プロモーター、及び／又は誘導性プロモーターを用いることができる。植物細胞で作動可能な過剰発現型で構成的プロモーターの具体例としては、カリフラワーモザイクウイルス（CaMV）由来の35Sプロモーター、Tiプラスミド由来のノパリン合成酵素遺伝子のプロモーターPnos、トウモロコシ由来のユビキチンプロモーター、イネ由来のアクチンプロモーター、タバコ由来PRタンパク質プロモーター等が挙げられる。様々な植物種のリブローズニリン酸カルボキシラーゼの小サブユニット（Rubisco ssu）プロモーター、又はヒストンプロモーターも使用することができる。誘導性プロモーターの例としては、温度によって制御可能なヒートショックプロモーターや、テトラサイクリンの有無によって制御可能なテトラサイクリン応答性プロモーター等の誘導性プロモーター

が挙げられる。

- [0077] 発現ベクターは、ターミネーター、エンハンサー、ポリA付加シグナル、5'-UTR（非翻訳領域）配列、イントロン配列、リボソーム結合配列、標識若しくは選択マーカー遺伝子、マルチクローニング部位、ヌクレアーゼ認識配列、及び／又は複製開始点等を含むこともできる。それぞれの種類は、宿主細胞内でその機能を発揮し得るものであれば、特に限定されない。導入する植物細胞又は植物宿主に応じて当該分野で公知のものを適宜選択すればよい。
- [0078] ターミネーターは、例えば、ノパリン合成酵素（NOS）遺伝子のターミネーター、オクトピン合成酵素（OCS）遺伝子のターミネーター、CaMV 35Sターミネーター、大腸菌リポポリプロテインlppの3'ターミネーター、trpオペロンターミネーター、amyBターミネーター、ADH1遺伝子のターミネーター等が挙げられる。前記プロモーターにより転写された遺伝子の転写を終結できる配列であれば特に限定はしない。
- [0079] エンハンサーとしては、例えば、CaMV 35Sプロモーター内の上流側の配列を含むエンハンサー領域が挙げられる。活性ペプチドをコードする核酸等の発現効率を増強できるものであれば特に限定はされない。
- [0080] ヌクレアーゼ認識配列としては、制限酵素認識配列、Cre組換え酵素によって認識されるloxP配列、ZFNやTALEN等の人工ヌクレアーゼの標的となる配列、又はCRISPR/Cas9システムの標的となる配列が例示される。
- 複製起点配列としては、SV40複製起点配列が例示される。
- [0081] 選択マーカー遺伝子としては、薬剤耐性遺伝子（例えば、テトラサイクリン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、スペクチノマイシン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子、又はネオマイシン耐性遺伝子）、蛍光又は発光レポーター遺伝子（例えば、ルシフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルクロニターゼ（GUS）、又はグリーンフルオレッセンスプロテイン（GFP））、ネオマイシンホストランスフェラーゼII（NPT II）、ジヒドロ葉酸還元酵素等の酵素遺伝子が挙げられる。

[0082] 本発明の発現ベクターが包含し得る選択マーカ－遺伝子は、本発明の発現ベクターが導入された細胞を選択することができる選択マーカ－遺伝子である。選択マーカ－遺伝子の具体例としては、例えばアンピシリン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子、又はハイグロマイシン耐性遺伝子等の薬剤耐性遺伝子が挙げられる。

[0083] 本発明の発現ベクターが包含し得るレポ－ター遺伝子は、本発明の発現ベクターが導入された細胞を識別可能なレポ－ターをコードする遺伝子である。レポ－ター遺伝子としては、例えば、GFPやRFP等の蛍光タンパク質をコードする遺伝子や、ルシフェラーゼ遺伝子等が例示される。

[0084] 1－3－2. その他の成分

本発明の植物寄生性センチュウ防除剤は、「1－3－1. 有効成分」に記載した有効成分のみから構成されていてもよいが、必要に応じてその他の成分を含むことができる。

[0085] 本発明の植物寄生性センチュウ防除剤は、農業製剤上許容可能な担体を含んでもよい。本明細書において「農業製剤上許容可能な担体」とは、本発明の植物寄生性センチュウ防除剤の活性に実質的に影響しない物質であって、植物の栽培に施用しても土壌及び水質等の環境に対する有害な影響がないか又は小さい、又は動物、特にヒトに対する有害性がないか又は低い物質をいう。例えば、溶媒、補助剤、賦形剤、乳化剤、分散剤、界面活性剤等が挙げられる。

[0086] 本発明の植物寄生性センチュウ防除剤は、有効成分の活性に影響しない範囲において、他の薬理作用を有する成分、すなわち、殺センチュウ剤、除草剤、肥料（例えば、尿素、硝酸アンモニウム、過リン酸塩）を包含することもできる。

[0087] 1－3－3. 剤形

本発明の植物寄生性センチュウ防除剤の剤形は、本発明の植物寄生性センチュウ防除剤が施用される植物体内に侵入し得る状態であれば、いかなる状

態であってもよく、例えば、液体状態の液剤、固体状態の固形剤とすることができる。液剤の場合、有効成分を適当な溶液に懸濁した溶液剤、油性分散液剤、エマルジョン剤、懸濁剤が挙げられる。固形剤の場合、有効成分が施用植物に作用し得る状態であれば、特に制限しない。例えば、粉剤、散剤、ペースト剤、ゲル剤が挙げられる。

[0088] 1-4. 効果

本発明の植物寄生性センチュウ防除剤によれば、植物寄生性センチュウに罹患性の植物に、植物寄生性センチュウに対する抵抗性を付与することができる。また、本発明の植物寄生性センチュウ防除剤によれば、植物寄生性センチュウに抵抗性の植物において、植物寄生性センチュウに対する抵抗性を増強することができる。

[0089] 本発明の植物寄生性センチュウ防除剤によれば、本剤が適用される植物においてセンチュウ誘引活性、根部内へのセンチュウの移行、瘤形成、瘤成熟、根部内におけるセンチュウの成長、及び／又は宿主植物における巨大細胞の誘導を抑制することができる。

[0090] 2. 植物寄生性センチュウに対して抵抗性を有する植物形質転換体又はその後代

2-1. 概要

本発明の第2の態様は、植物寄生性センチュウに対して抵抗性を有する植物形質転換体又はその後代である。本発明の植物形質転換体又はその後代は、第1態様に記載の植物寄生性センチュウ防除剤、例えば第1態様に記載のポリヌクレオチド又は発現ベクターを含み、ネコブセンチュウ等の植物寄生性センチュウに対して抵抗性を有する。本発明の植物形質転換体又はその後代は、センチュウ誘引活性、根部内へのセンチュウの移行、瘤形成、瘤成熟、根部内におけるセンチュウの成長、及び／又は宿主植物における巨大細胞の誘導が抑制されており、植物寄生性センチュウに対して抵抗性を有する。

[0091] 2-2. 構成

本明細書における「植物形質転換体」は、植物寄生性センチュウに対して

抵抗性を獲得するように遺伝子改変された植物宿主をいう。

[0092] 一実施形態において、本発明の植物形質転換体は、第1態様に記載の植物寄生性センチュウ抵抗性のRMIR1ポリペプチド若しくはその断片をコードするRMIR1ポリヌクレオチド、又は前記ポリヌクレオチドを含む発現ベクターを含む。より具体的には、本発明の植物形質転換体は、第1態様に記載の植物寄生性センチュウ抵抗性のRMIR1ポリペプチド若しくはその断片をコードするRMIR1ポリヌクレオチド、又は前記ポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換されている。

[0093] さらなる実施形態において本発明の植物形質転換体は、
第1態様に記載の植物寄生性センチュウ抵抗性のRMIR1ポリペプチド若しくはその断片をコードするRMIR1ポリヌクレオチド、又は前記ポリヌクレオチドを含む発現ベクター、及び
第1態様に記載の植物寄生性センチュウ抵抗性のRKNR1ポリペプチド若しくはその断片をコードするRKNR1ポリヌクレオチド、又は前記ポリヌクレオチドを含む発現ベクター
を含み、例えば上記2種のポリヌクレオチド又は発現ベクターで形質転換されている。

[0094] 本発明において形質転換される宿主植物種は、限定しない。宿主植物は、単子葉植物又は双子葉植物であってもよいが、単子葉植物が特に好ましい。単子葉植物であれば、イネ科に属する種（例えば、イネ、コムギ、オオムギ、ライムギ、トウモロコシ、サトウキビ、アワ、キビ、ヒエ、ソルガム、コウリヤン）、バショウ科に属する種（例えば、バナナ、バショウ）、ヒガンバナ科に属する種（例えば、ネギ、タマネギ、ニンニク、ニラ）、又はパイナップル科に属する種（例えば、パイナップル）であってもよい。宿主植物は、植物寄生性センチュウに対して罹患性の植物種や植物寄生性センチュウに対する抵抗性が弱い植物種が好ましく、例えば、S型RMIR1遺伝子及び／又はS型RKNR1遺伝子を有するイネ品種、又はL型RMIR1遺伝子及び／又はL型RKNR1遺伝子を有しない植物種が好ましい。植物寄生性センチュウに対して罹患性

のイネ品種としては、図1において1.0以上の評価値を示すイネ品種又は0.8以上の評価値を示すイネ品種が例示される。

[0095] 本発明の植物形質転換体は、同一の遺伝情報を有するクローン体を包含する。植物形質転換体第1世代から採取した植物体の一部、例えば、表皮、師部、柔組織、木部若しくは維管束のような植物組織、葉、花弁、茎、根若しくは種子のような植物器官、又は植物細胞から植物組織培養法や挿し木、接木若しくは取り木によって得られるクローン体、あるいは根茎、塊根、球茎、ランナー等のような植物形質転換体第1世代から無性生殖で得られる栄養繁殖器官より新たに生じた新たなクローン体、植物形質転換体第1世代若しくはそれに由来するクローン体から脱分化処理によって誘導される不定胚等も本発明の植物形質転換体に含まれる。

一実施形態において、本発明の植物形質転換体は遺伝子組換え体であってもよい。

[0096] 本明細書において「その後代」とは、前記植物形質転換体第1世代の有性生殖を介した子孫であって、植物寄生性センチュウ抵抗性のRMIR1ポリペプチド若しくはその断片をコードするRMIR1ポリヌクレオチド、又は前記ポリヌクレオチドを含む発現ベクターを保持し、かつ植物寄生性センチュウに対して抵抗性を有する宿主植物を意味する。後代の世代は問わない。

[0097] 2-3. 効果

本発明の植物寄生性センチュウ抵抗性のRMIR1ポリペプチド若しくはその断片をコードするRMIR1ポリヌクレオチド、又は前記ポリヌクレオチドを含む発現ベクター（以下、「RMIR1ポリペプチド等」と表記する）を含む植物形質転換体は、植物寄生性センチュウに対して抵抗性を示す。また、本発明の植物寄生性センチュウ抵抗性のRMIR1ポリペプチド等、及び植物寄生性センチュウ抵抗性のRKNR1ポリペプチド若しくはその断片をコードするRKNR1ポリヌクレオチド、又は前記ポリヌクレオチドを含む発現ベクター（以下、「RKNR1ポリペプチド等」と表記する）を含む植物形質転換体は、RMIR1ポリペプチド等又はRKNR1ポリペプチド等のいずれか一方のみを含む形質転換体と比較してセン

チュウ抵抗性がさらに増強されている。

[0098] 3. 植物寄生性センチュウに対して抵抗性を有する植物形質転換体を製造する方法

3-1. 概要

本発明の第3の態様は、植物寄生性センチュウに対して抵抗性を有する植物形質転換体を製造する方法に関する。本発明の製造方法によれば、植物寄生性センチュウ罹患性の植物から、抵抗性の植物形質転換体を製造することができる。

[0099] 3-2. 方法

本発明の植物寄生性センチュウに対して抵抗性を有する植物形質転換体を製造する方法は、必須の工程として導入工程、及び選択工程を含む。以下、各工程について具体的に説明をする。

[0100] 3-2-1. 導入工程

本態様において「導入工程」は、植物寄生性センチュウ抵抗性のRMIR1ポリペプチド又はその断片をコードするRMIR1ポリヌクレオチドを含む発現ベクターを宿主植物に導入する工程である。

[0101] さらに実施形態において、導入工程は、植物寄生性センチュウ抵抗性のRMIR1ポリペプチド又はその断片をコードするRMIR1ポリヌクレオチドを含む発現ベクターに加えて、植物寄生性センチュウ抵抗性のRKNR1ポリペプチド又はその断片をコードするRKNR1ポリヌクレオチドを含む発現ベクターを宿主植物に導入する工程である。

[0102] 本工程で導入される発現ベクターの構成は、前記第1態様の「(3) 植物寄生性センチュウ抵抗性のRMIR1ポリペプチド又はその断片をコードするRMIR1ポリヌクレオチドを含む発現ベクター」の記載に準じる。

[0103] 発現ベクターの導入方法は、当該分野で公知の方法、例えば、アグロバクテリウム法、PEG-リン酸カルシウム法、電圧ポレーション法、リポソーム法、パーティクルガン法、マイクロインジェクション法を用いることができる。導入されたポリヌクレオチドは、宿主のゲノムDNA中に組み込まれて

もよいし、導入されたポリヌクレオチドの状態（例えば、外来ベクターに含有されたまま）で存在していてもよい。さらに、導入されたポリヌクレオチドは、宿主のゲノムDNA中に組み込まれた場合のように宿主細胞内で維持され続けてもよいし、一過的に保持されてもよい。

[0104] アグロバクテリウム法を用いる場合は、アグロバクテリウム法に適した発現ベクターに植物寄生性センチュウ抵抗性のRMIR1ポリペプチド又はその断片をコードするポリヌクレオチドを挿入した後、適当なアグロバクテリウム、例えばアグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) にエレクトロポレーション法等により導入し、この菌株を植物細胞、カルス、又は子葉切片等に接種して感染させればよい。好適なアグロバクテリウムとしては、限定するものではないが、GV3101、C58、C58C1Rif(R)、EHA101、EHA105、AGL1、LBA4404等の株を利用することができる。

[0105] 導入対象の宿主試料としては、植物の葉等の切片を使用してもよく、プロトプラストを調製して使用してもよい (Christou P, et al., *Bio/Technology* (1991) 9: 957-962)。例えばパーティクルガン法では、遺伝子導入装置（例えばPDS-1000 (BIO-RAD社) 等）を製造業者の説明書に従って使用して、本発明に係る発現ベクター又はDNA構築物をまぶした金属粒子をこのような試料に打ち込むことにより、植物細胞内に導入させ、形質転換植物細胞を得ることができる。操作条件は、通常は450~2000psi程度の圧力、4~12cm程度の距離で行う。

[0106] 3-2-2. 選択工程

本態様において「選択工程」は、前記発現ベクターが導入された植物を選択する工程である。

[0107] 本工程は、上述の方法で発現ベクターを宿主に導入した後、当該分野で公知の方法によって行えばよい。例えば、発現ベクター中の選択マーカー遺伝子やレポーター遺伝子にコードされるタンパク質の活性を利用して、形質転換体を選択することができる。

[0108] 一実施形態において、本発明の発現ベクター又はポリヌクレオチドを導入

した植物細胞や子葉切片等を、植物組織培養法に従って選択培地で培養し、生存したカルスを再分化培地（適当な濃度の植物ホルモン（オーキシン、サイトカイニン、ジベレリン、アブシジン酸、エチレン、ブラシノライド等）を含む）で培養することにより、形質転換された植物体を再生することができる。このようにして形質転換体を選択することができる。

実施例

[0109] <実施例 1：様々なイネ品種のサツマイモネコブセンチュウに対する抵抗性の検討>

（目的）

様々なイネ品種について、サツマイモネコブセンチュウ（Mi）に対する抵抗性を検討する。

[0110] （方法）

（1）イネ品種

本実施例において評価の対象としたイネ品種は、温帯ジャポニカに属する11品種、熱帯ジャポニカに属する8品種、アウスに属する20品種、インディカに属する10品種、12種類の交雑品種、ネリカ関連系統に属する8品種、及び分類不明の8品種であった。上記の品種は農業・食品産業技術総合研究機構（NARO）Genbank、及び名古屋大学から得た。

[0111] （2）Mi抵抗性の評価方法

Mi抵抗性の評価は、本発明者の報告（Sunohara, H., Kaida, S., and Sawa, S., 2020, Plant Biotechnol., 37, 343-347）に記載の方法に従って行った。

[0112] 具体的には、イネの種子を殺菌液（花王株式会社製キッチン用漂白剤の100倍希釈液）に26℃で3日間浸し（吸水期）、カビや菌を死滅させると同時に発芽を誘導した。発芽後の種子をペーパーパウチ（CYG Seed Germination Pouch, Mega International, USA）にパウチ当たり2粒ずつ播種した。発芽した種子の入ったパウチを26℃の暗所に3日間置いた。次に、10パウチを木板で挟み、バネクランプで固定した後、12時間明所（26℃）／12時間暗所（24℃）

で8日間育成した。なお、木板で挟む目的は、水分が多い状態ではセンチュウの感染効率が低下することから、ペーパーパウチから余分な水分を除去するためである。吸水14日後、1mLあたり400個体のJ2期サツマイモネコブセンチュウを含む溶液2mL（計800個体）を根に沿って添加した（センチュウ接種）。接種後、木板に挟んだ状態のパウチを暗所にて水平な状態で3日間置き、28℃で12時間、26℃で12時間暗所に直立させた。また、生育期間中は節水状態を維持し、各植物に対して、週1回（接種後7、14、21、28日）、文献（Nishiyama H. et al., 2015, Nematol. Res. 45:45-49.）に記載の液体肥料2mLを添加した。

[0113] 卵塊数は吸水後48日（接種後34日）に計測した。根系全体を50ng/ μ Lのエリオグロウシンに少なくとも15分間浸漬することにより染色し、青く染色された卵塊の数を測定した。卵塊数の計測後、根系を50℃のインキュベーターに最低5日間入れ、根内の水分を完全に除去した後に重量を測定した。得られた乾燥根重量と卵塊数から単位乾燥根重量当たりの卵塊数を計算した。T65の数値を基準値とした標準化した値を各品種の評価値（Evaluation value; EV）とした。

[0114] 得られた評価値が0.6以上のイネ品種をMi罹患性の品種、評価値が0.6未満のイネ品種をMi抵抗性の品種に分類した。

[0115] （結果）

各品種について得られた評価値を図1及び以下の表1に示す。

[0116]

[表1]

表1. 様々なイネ品種の評価値(EV)

アクセッション 番号	品種	原産地	分類	評価値(EV) (平均±標準誤差)
-	Taichung65 (T65)	Taiwan	<i>Temperate japonica</i>	1 (reference)
WRC 01	Nipponbare	Japan	<i>Temperate japonica</i>	1.090±0.068
-	Kinmaze	Japan	<i>Temperate japonica</i>	1.278±0.205
-	Hinohikari	Japan	<i>Temperate japonica</i>	1.087±0.065
-	Yukihikari	Japan	<i>Temperate japonica</i>	1.236±0.170
WRC 43	Dianyu1	China	<i>Temperate japonica</i>	1.128±0.073
JRC 17	Akage	Japan	<i>Temperate japonica</i>	1.180±0.371
JRC 26	Aikoku	Japan	<i>Temperate japonica</i>	0.983±0.045
JRC 27	Ginbouzu	Japan	<i>Temperate japonica</i>	0.362±0.043
JRC 31	Kameji	Japan	<i>Temperate japonica</i>	0.869±0.004
JRC 34	Kyoutoasahi	Japan	<i>Temperate japonica</i>	0.972±0.108
WRC 45	Ma Sho	Myanmar	<i>Tropical japonica</i>	0.282±0.031
WRC 46	Khao Nok	Laos	<i>Tropical japonica</i>	0.139±0.002
WRC 47	Jaguary	Brazil	<i>Tropical japonica</i>	0.275±0.060
WRC 48	Khau Mac Kho	Vietnam	<i>Tropical japonica</i>	0.204±0.086
WRC 49	Padi Perak	Indonesia	<i>Tropical japonica</i>	0.154±0.038
WRC 50	Rexmont	USA	<i>Tropical japonica</i>	0.085±0.029
JRC 04	Senshou	Japan	<i>Tropical japonica</i>	0.157±0.018
JRC 11	Kahei	Japan	<i>Tropical japonica</i>	0.348±0.048
WRC 02	Kasalath	India	<i>Aus</i>	0.133±0.016
WRC 04	Jena035	Nepal	<i>Aus</i>	0.006±0.006
WRC 25	Muha	India	<i>Aus</i>	0.400±0.052
WRC 26	Jhona2	India	<i>Aus</i>	0.376±0.015
WRC 27	Nepal8	Nepal	<i>Aus</i>	0.018±0.002
WRC 28	Jarjan	Bhutan	<i>Aus</i>	0.002±0.002
WRC 29	Kalo Dhan	Nepal	<i>Aus</i>	0.011±0.003
WRC 30	Anjana Dhan	Nepal	<i>Aus</i>	0.020±0.008
WRC 31	Shoni	Bangladesh	<i>Aus</i>	0.143±0.014
WRC 33	Surjamukhi	India	<i>Aus</i>	0.033±0.012
WRC 34	ARC7291	India	<i>Aus</i>	0.242±0.054
WRC 35	ARC5955	India	<i>Aus</i>	0.073±0.017
WRC 37	ARC7047	India	<i>Aus</i>	0.060±0.008
WRC 38	ARC11094	India	<i>Aus</i>	0.071±0.015
WRC 39	Badari Dhan	Nepal	<i>Aus</i>	0.045±0.006
WRC 40	Nepal555	India	<i>Aus</i>	0.006±0.006
WRC 41	Kaluheenati	Sri Lanka	<i>Aus</i>	0.266±0.013
-	DV85	-	<i>Aus</i>	0.333±0.021
-	ARC10313	-	<i>Aus</i>	0.117±0.023
-	N22	-	<i>Aus</i>	0.039±0.016

WRC 03	Bei Khe	Cambodia	<i>Indica</i>	1.035±0.560
WRC 05	Naba	India	<i>Indica</i>	1.126±0.289
WRC 06	Puluik Arang	Indonesia	<i>Indica</i>	0.022±0.015
WRC 09	Ryou Suisan Koumai	China	<i>Indica</i>	0.326±0.078
WRC 11	Jinguoyin	China	<i>Indica</i>	0.308±0.092
WRC 17	Keiboba	China	<i>Indica</i>	0.072±0.038
WRC 18	Qingyu	Taiwan	<i>Indica</i>	0.083±0.058
WRC 19	Deng Pao Zhai	China	<i>Indica</i>	0.344±0.085
WRC 57	Milyang23	Korea	<i>Indica</i>	0.432±0.185
JRC 44	Karahoushi	Japan	<i>Indica</i>	0.286±0.024
WRC 07	Davao1	Philippines	<i>Admixture</i>	0.213±0.026
WRC 13	Asu	Bhutan	<i>Admixture</i>	0.158±0.071
WRC 14	IR58	Philippines	<i>Admixture</i>	0.416±0.171
WRC 15	Co13	India	<i>Admixture</i>	0.199±0.022
WRC 16	Vary Futsi	Madagascar	<i>Admixture</i>	0.085±0.065
WRC 21	Shwe Nang Gyi	Myanmar	<i>Admixture</i>	0.151±0.038
WRC 24	Pinulupot1	Philippines	<i>Admixture</i>	0.545±0.099
WRC 42	Local Basmati	India	<i>Admixture</i>	0.032±0.018
WRC 44	Basilanon	Philippines	<i>Admixture</i>	0.378±0.055
WRC 52	Khau Tan Chiem	Vietnam	<i>Admixture</i>	0.461±0.025
WRC 53	Tima	Bhutan	<i>Admixture</i>	0.157±0.099
WRC 55	Tupa729	Bangladesh	<i>Admixture</i>	0.479±0.034
-	Basmati370	India	Unknown	0.217±0.068
-	IRAT109	-	Unknown	0.060±0.042
-	LTH	China	Unknown	0.576±0.116
-	IR24	Philippines	Unknown	0.393±0.015
-	Kinandang Patong	-	Unknown	0.486±0.034
-	Silewah	-	Unknown	0.042±0.009
-	WAB56-50	-	Unknown	0.100±0.023
-	WAB56-104	-	Unknown	0.232±0.029
-	NERICA 1	-	NERICA related	0.320±0.041
-	NERICA 2	-	NERICA related	0.189±0.076
-	NERICA 4	-	NERICA related	0.274±0.020
-	NERICA 6	-	NERICA related	0.014±0.003
-	NERICA L20	-	NERICA related	0.350±0.043
-	NERICA L41	-	NERICA related	0.053±0.012
-	CG14	-	NERICA related	0.009±0.009
-	WK18	-	NERICA related	0.025±0.012

[0117] 温帯ジャポニカでは、銀坊主（Ginbouzu）以外の品種（T65、日本晴、金南風、ヒノヒカリ（Hinohikari）、ゆきひかり等）がMi罹患性を示した。一方、熱帯ジャポニカ、アウス、インディカ、及びネリカに属する品種では、Bei Khe及びNaba以外の品種がMi抵抗性を示した。

[0118] Aus品種のARC10313はT65と比較して約11.7%の評価値を示し (EV=0.117)、Miに対して抵抗性の強い品種の一つであることが判明した。この結果に基づき、以降の実施例ではARC10313をMi抵抗性品種として用いた。

[0119] <実施例2：Mi抵抗性遺伝子のマッピングと同定>

(目的)

RIL系統を用いるQTL解析とCSSL系統を用いる遺伝子マッピングによってMi抵抗性遺伝子を同定する。

[0120] (方法と結果)

(1) RILを用いたQTL解析

T65とARC10313を交配親とした組換え自殖系統 (Recombinant inbred line; RIL) を113系統作製し、2,144個のSNPを用いてQTL (量的形質遺伝子座) 解析を行った。その結果、主要なQTLの1つが第6染色体上で見出され、qRMIR1 (qROOT MELOIDOGYNE INCOGNITA RESISTANCE 1) と命名した。

[0121] (2) CSSLを用いた遺伝子マッピング/RMIR1遺伝子の同定

qRMIR1の遺伝子マッピングでは、上記RILにおいてqRMIR1遺伝子を含むゲノム領域をヘテロ接合で有する系統が存在しなかった。そのため、さらなる組換え体の取得に基づいて遺伝子座を絞り込むことができなかった。しかしながら、T65及びARC10313の2品種間では染色体断片置換系統 (chromosome segment substitution line; CSSL) がOryzabaseから配布されているため、Oryzabaseから入手した染色体断片置換系統を使用して遺伝子座の絞り込みを行った。ここで使用したCSSLの3系統 (TACSSL-42、TACSSL-45、及びTACSSL-47) は、第6染色体上の0.596~29.229Mbの領域において系統ごとに異なる領域に抵抗性品種ARC10313由来の配列を有するが、この領域以外は罹患性品種T65由来の配列を有する。

[0122] CSSLの3系統 (TACSSL-42、TACSSL-45、及びTACSSL-47) 並びに親株のT65及びARC10313について、実施例1に記載の方法によってMi接種試験を実施し、抵抗性を評価した。その結果、TACSSL-42、TACSSL-45、及びTACSSL-47の評価値は、それぞれ 1.517 ± 0.035 、 0.505 ± 0.015 、及び 1.236 ± 0.372 であった (

図2A)。この結果から、第6染色体においてMi抵抗性遺伝子は、TACSSL-45においてARC10313に由来する20,258~27,829Mbの範囲(約7.6Mbの領域)に特定された。

[0123] 次いでイネのデータベースRAP-db (<https://rapdb.dna.affrc.go.jp/>)を用いて、マッピングされた範囲に含まれる遺伝子を検索した。なお、上記データベースは、日本晴に由来するゲノム情報に基づいて作成されたデータベースであり、上述の約7.6Mbの領域には449個の遺伝子がアノテートされていた。この449遺伝子配列の中から、NB-ARCドメインを含み、かつ抵抗性品種間と罹患性品種との間でアミノ酸配列が大きく異なる遺伝子として、Os06g0621600遺伝子(以下、ROOT MELOIDOGYNE INCOGNITA RESISTANCE 1遺伝子又はRMIR1遺伝子と称する)を見出した。RAP-db上のOs06g0621600遺伝子は、Rice Genome Annotation Project (RGAP)のLOC_Os06g41670.1遺伝子に対応する。以降の実施例では、RGAPのLOC_Os06g41670.1遺伝子の塩基配列に基づくアミノ酸配列をRMIR1遺伝子によってコードされるポリペプチド(以下、「RMIR1ポリペプチド」という)の配列とした。

[0124] 抵抗性品種ARC10313及び罹患性品種T65においてRMIR1遺伝子によってコードされるポリペプチドの構造を図3に示す。

[0125] ARC10313のRMIR1遺伝子は、ヌクレオチド結合ドメイン(NB-ARCドメイン)及び13個のロイシンリッチリピート(LRR)ドメインを含む1154アミノ酸長のL型RMIR1ポリペプチドをコードする。ARC10313、N22、及びKalo DhanのRMIR1遺伝子の塩基配列は、いずれも配列番号14で示され、100%同一である。

[0126] これに対して、T65のRMIR1遺伝子は、580位のセリンが終止コドンに置換されているためにC末端側の575アミノ酸残基が欠失しており、さらに138位のアラニンがスレオニンに置換され、548位のアルギニンがロイシンに置換された579アミノ酸長のS型RMIR1ポリペプチドをコードする。そのため、T65のRMIR1遺伝子は、13個のLRRドメインのうち11個のLRRドメインが欠失していることが推定された。また、T65のRMIR1遺伝子は、終止コドンの下流域において、ARC10313には存在しない141塩基長の挿入配列を有する。T65及び日本晴のRMIR

1遺伝子の塩基配列は、いずれも配列番号16で示され、100%同一である。

[0127] なお、ARC10313のRMIR1ポリペプチド（配列番号13）と、Kalo DhanのRKN R1ポリペプチド（配列番号1）との間のアミノ酸同一性は、62.64%である。

[0128] <実施例3：RMIR1遺伝子の導入によるMi抵抗性形質への影響>

（目的）

センチュウ抵抗性品種であるKalo Dhan由来のRMIR1遺伝子を含むゲノム領域を日本晴に導入した形質転換株を作製し、Mi抵抗性が得られるか否かを検証する。

[0129] （方法）

野生型Kalo Dhanの0s06g0621600遺伝子（RMIR1遺伝子）を含む12 kbのゲノム領域をPCR増幅して、ベクターにクローニングすることによって、RMIR1形質転換ベクターを作製した。RMIR1形質転換ベクター又はRMIR1ゲノム領域を含まない対照ベクターを、エレクトロポレーションによりAgrobacterium tumefaciens株EHA105に導入した。イネの形質転換は、文献（Toki S., et al, Plant J. 47:969-976）に記載の方法に従って行った。具体的には、日本晴の種子を2N6上に28℃にて7日間置き、アグロバクテリウム懸濁液に数分間浸漬した後、2N6-AS培地上に移した。2℃にて暗所で3日間共培養した後、種子を25mg/Lのメロペネム（Wako）を含む滅菌水で洗浄してアグロバクテリウムを除去した。その後、50mg/Lのハイグロマイシンを含むN6D培地で、32℃にて連続光下で2週間培養し、続いて小植物体の再生と回収を行った。RMIR1形質転換ベクターが形質転換されたRMIR1形質転換株、及び対照ベクターが形質転換されたベクターコントロール株に対して実施例1と同様の方法によりMi抵抗性の試験を行った。

[0130] （結果）

結果を図4及び図5に示す。RMIR1形質転換体の評価値は、ベクターコントロールの評価値の平均に対する相対値として算出した。ベクターコントロール株の評価値は 1.003 ± 0.150 、RMIR1形質転換体の評価値は 0.510 ± 0.056 で、t検定の結果1%水準で有意差が検出された。この結果から、RMIR1遺伝子がMi

抵抗性形質の原因遺伝子であり、Mi抵抗性品種のRMIR1遺伝子をMi罹患性品種に導入することによって、Mi抵抗性が付与されることが実証された。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願はそのまま引用により本明細書に組み入れられるものとする。

請求の範囲

- [請求項1] 以下の（a）～（c）で示すいずれかのアミノ酸配列を含むRMIR1ポリペプチド又はその断片を含む植物寄生性センチュウ防除剤。
- （a）配列番号13で示すアミノ酸配列、
 - （b）配列番号13で示すアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列、又は
 - （c）配列番号13で示すアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列
- [請求項2] 以下の（d）～（f）で示すいずれかのアミノ酸配列を含むRKNR1ポリペプチド又はその断片をさらに含む、請求項1に記載の植物寄生性センチュウ防除剤。
- （d）配列番号1で示すアミノ酸配列、
 - （e）配列番号1で示すアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列、又は
 - （f）配列番号1で示すアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列
- [請求項3] 請求項1に記載のRMIR1ポリペプチド又はその断片をコードするRMIR1ポリヌクレオチドを含む、植物寄生性センチュウ防除剤。
- [請求項4] 前記RMIR1ポリヌクレオチドが以下の（g）～（j）で示すいずれかの塩基配列を含む、請求項3に記載の植物寄生性センチュウ防除剤。
- （g）配列番号14で示す塩基配列、
 - （h）配列番号14で示す塩基配列において1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列、
 - （i）配列番号14で示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列、又は
 - （j）配列番号14で示す塩基配列に相補的な塩基配列と高ストリンジেন্টな条件でハイブリダイズする塩基配列

- [請求項5] 請求項2に記載のRKNR1ポリペプチド又はその断片をコードするRKNR1ポリヌクレオチドをさらに含む、請求項3に記載の植物寄生性センチュウ防除剤。
- [請求項6] 前記RKNR1ポリヌクレオチドが以下の(k)～(n)で示すいずれかの塩基配列を含む、請求項5に記載の植物寄生性センチュウ防除剤。
- (k) 配列番号2で示す塩基配列、
 - (l) 配列番号2で示す塩基配列において1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列、
 - (m) 配列番号2で示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列、又は
 - (n) 配列番号2で示す塩基配列に相補的な塩基配列と高ストリンジェントな条件でハイブリダイズする塩基配列
- [請求項7] 請求項3に記載のRMIR1ポリヌクレオチドを含む発現ベクターを含む、植物寄生性センチュウ防除剤。
- [請求項8] 前記植物寄生性センチュウがネコブセンチュウである、請求項1に記載の植物寄生性センチュウ防除剤。
- [請求項9] 前記ネコブセンチュウが、イネネコブセンチュウ、サツマイモネコブセンチュウ、キタネコブセンチュウ、及びジャワネコブセンチュウからなる群から選択される、請求項8に記載の植物寄生性センチュウ防除剤。
- [請求項10] 請求項3～9のいずれか一項に記載の植物寄生性センチュウ防除剤を含む、植物寄生性センチュウに対して抵抗性を有する植物形質転換体、又は前記ポリヌクレオチド若しくは前記発現ベクターを保持したその後代。
- [請求項11] 単子葉植物である、請求項10に記載の植物形質転換体又はその後代。
- [請求項12] 前記単子葉植物がイネ科植物である、請求項11に記載の植物形質

転換体又はその後代。

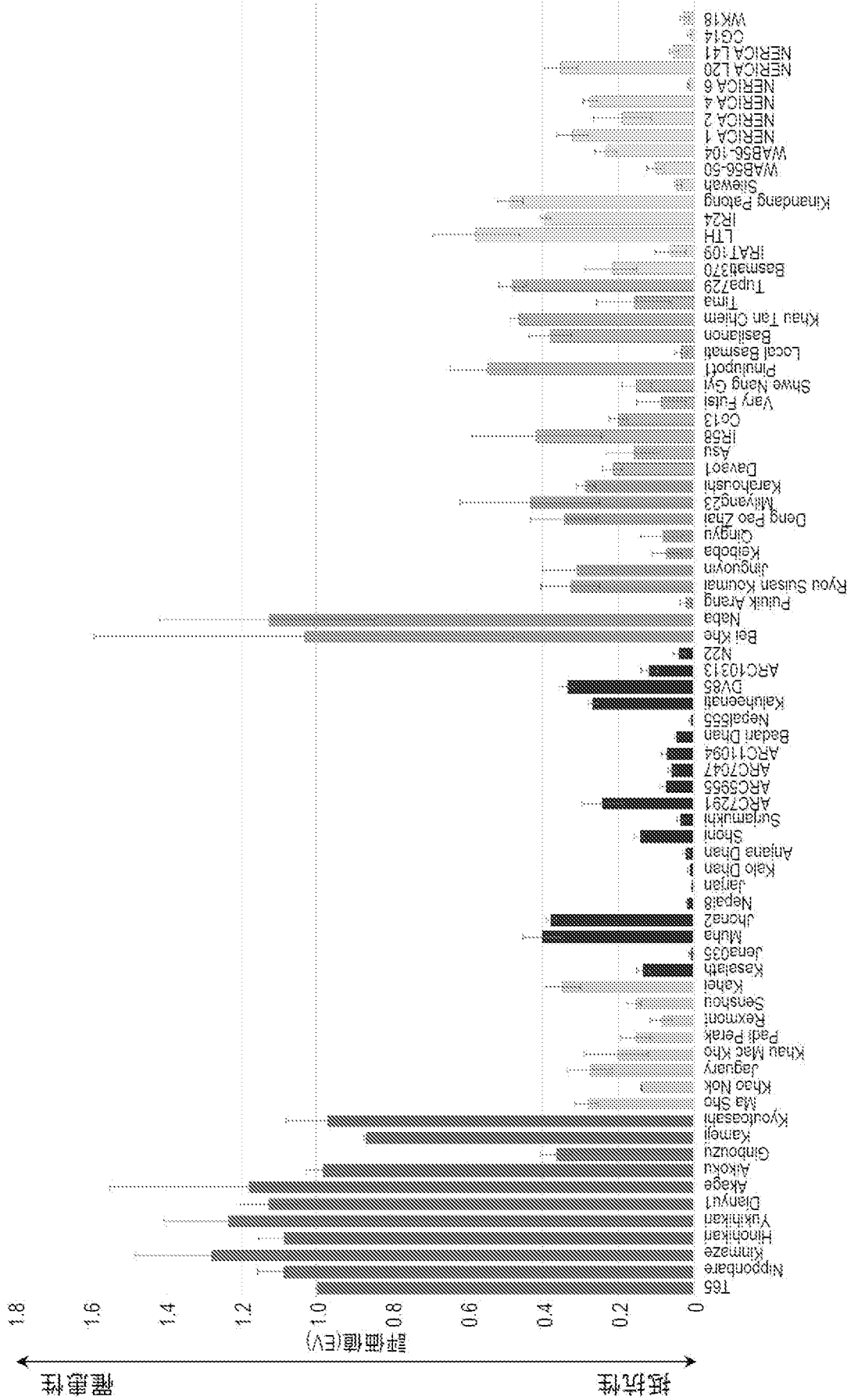
[請求項13] 前記イネ科植物が、イネ、コムギ、オオムギ、ライムギ、トウモロコシ、サトウキビ、アワ、キビ、ヒエ、及びソルガムからなる群から選択される、請求項12に記載の植物形質転換体又はその後代。

[請求項14] 遺伝子組換え体である、請求項10に記載の植物形質転換体又はその後代。

[請求項15] 植物寄生性センチュウに対して抵抗性を有する植物形質転換体を製造する方法であって、

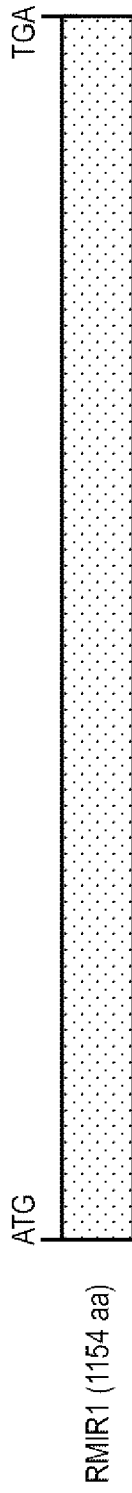
請求項7に記載の発現ベクターを植物に導入する工程、及び
前記発現ベクターが導入された植物を選択する工程
を含む、方法。

[図1]

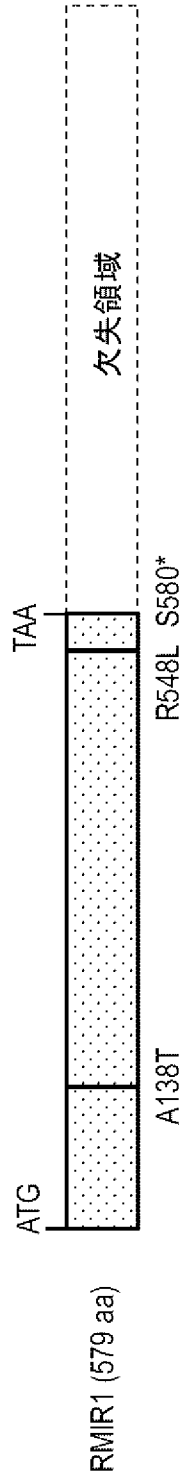


[図3]

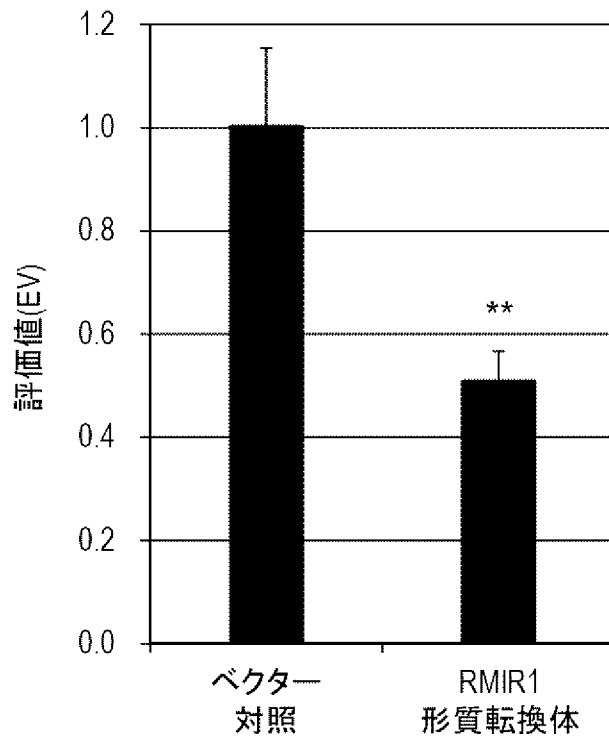
L type, 抵抗性 (ARC10313, N22, Kalo Dhan)



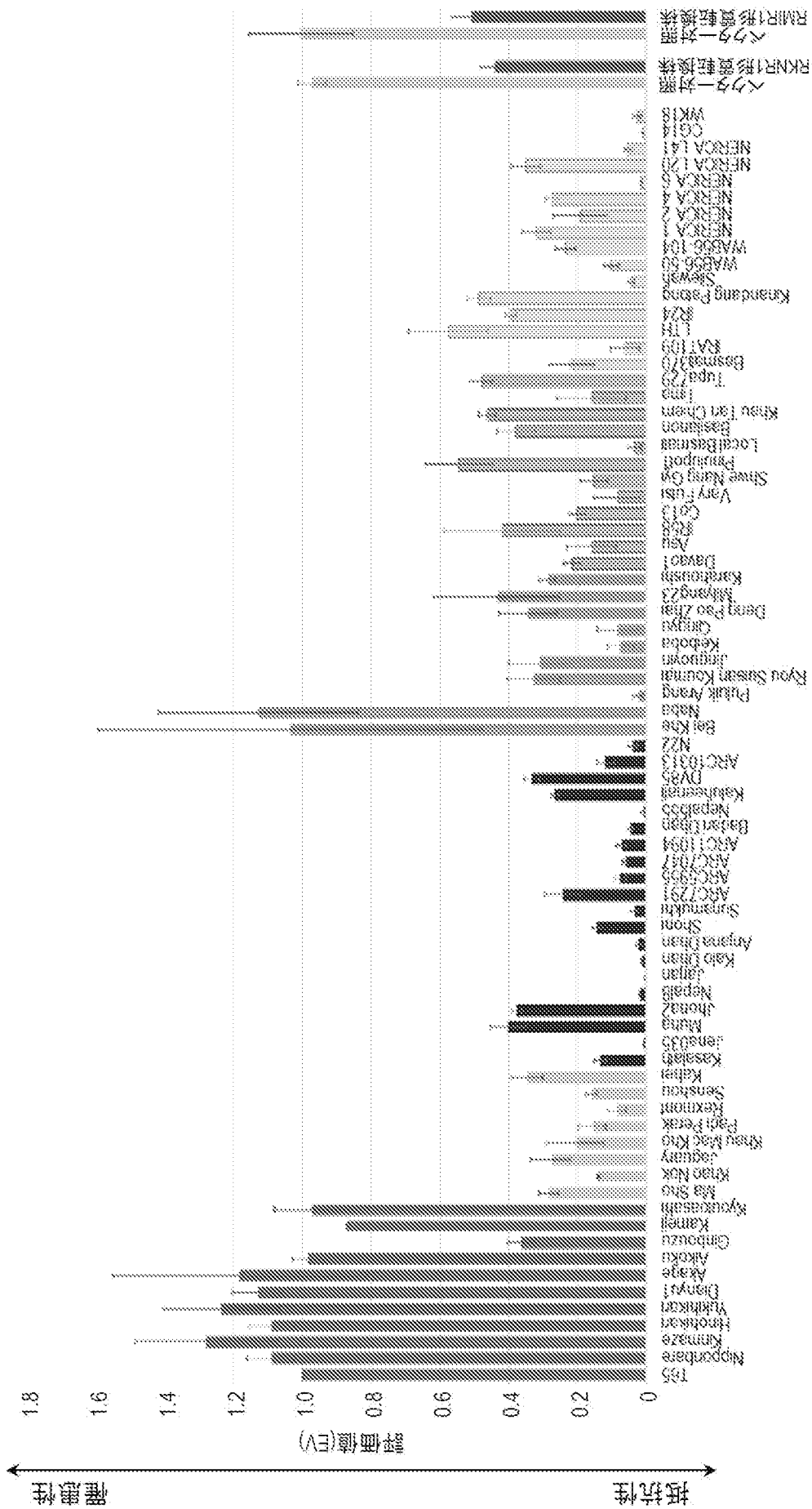
S type, 罹患病性 (T65, Nipponbare)



[図4]



[図5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/021268

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<p><i>A01N 37/46</i>(2006.01)i; <i>A01H 1/00</i>(2006.01)i; <i>A01H 5/00</i>(2018.01)i; <i>A01H 6/46</i>(2018.01)i; <i>A01P 5/00</i>(2006.01)i; <i>C07K 14/415</i>(2006.01)i; <i>C12N 5/10</i>(2006.01)i; <i>C12N 15/29</i>(2006.01)i; <i>C12N 15/63</i>(2006.01)i FI: A01N37/46; C12N5/10; C07K14/415; A01H1/00 A; A01H5/00 A; A01H6/46; C12N15/63 Z; A01P5/00; C12N15/29 ZNA</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A01N37/46; A01H1/00; A01H5/00; A01H6/46; A01P5/00; C07K14/415; C12N5/10; C12N15/29; C12N15/63		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024 Registered utility model specifications of Japan 1996-2024 Published registered utility model applications of Japan 1994-2024		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2004/0123343 A1 (LA ROSA, Thomas J.) 24 June 2004 (2004-06-24) paragraphs [0003], [0015], SEQ ID No. 131841, SEQ ID No. 29358	1-15
A	JP 2005-185101 A (NATIONAL INSTITUTE OF AGROBIOLOGICAL SCIENCES) 14 July 2005 (2005-07-14) paragraph [0006], SEQ ID No. 54940, SEQ ID No. 26607	1-15
A	WO 03/008540 A2 (SYNGENTA PARTICIPATIONS AG) 30 January 2003 (2003-01-30) SEQ ID No. 6701, SEQ ID No. 2570	1-15
A	US 2015/0082481 A1 (MONSANTO TECHNOLOGY LLC) 19 March 2015 (2015-03-19) SEQ ID No. 20680	1-15
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 “D” document cited by the applicant in the international application “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 19 August 2024		Date of mailing of the international search report 03 September 2024
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/021268

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed.
 - b. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
 accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No. PCT/JP2024/021268

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
US 2004/0123343 A1	24 June 2004	(Family: none)	
JP 2005-185101 A	14 July 2005	US 2006/0123505 A1	
WO 03/008540 A2	30 January 2003	US 2006/0075523 A1	
		EP 1402042 A2	
US 2015/0082481 A1	19 March 2015	(Family: none)	

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））</p> <p>A01N 37/46(2006.01)i; A01H 1/00(2006.01)i; A01H 5/00(2018.01)i; A01H 6/46(2018.01)i; A01P 5/00(2006.01)i; C07K 14/415(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 15/29(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i FI: A01N37/46; C12N5/10; C07K14/415; A01H1/00 A; A01H5/00 A; A01H6/46; C12N15/63 Z; A01P5/00; C12N15/29 ZNA</p>																															
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））</p> <p>A01N37/46; A01H1/00; A01H5/00; A01H6/46; A01P5/00; C07K14/415; C12N5/10; C12N15/29; C12N15/63</p> <p>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</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2024年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2024年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2024年</td> </tr> </table> <p>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）</p> <p>GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq</p>			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2024年	日本国実用新案登録公報	1996-2024年	日本国登録実用新案公報	1994-2024年																					
日本国実用新案公報	1922-1996年																														
日本国公開実用新案公報	1971-2024年																														
日本国実用新案登録公報	1996-2024年																														
日本国登録実用新案公報	1994-2024年																														
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>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</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>US 2004/0123343 A1 (THOMAS J. LA ROSA) 24.06.2004 (2004 - 06 - 24) [0003], [0015], SEQ ID No.131841, SEQ ID No.29358</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>JP 2005-185101 A (独立行政法人農業生物資源研究所) 14.07.2005 (2005 - 07 - 14) [0006], SEQ ID No.54940, SEQ ID No.26607</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 03/008540 A2 (SYNGENTA PARTICIPATIONS AG) 30.01.2003 (2003 - 01 - 30) SEQ ID No.6701, SEQ ID No.2570</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2015/0082481 A1 (MONSANTO TECHNOLOGY LLC) 19.03.2015 (2015 - 03 - 19) SEQ ID No.20680</td> <td>1-15</td> </tr> </tbody> </table> <p><input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p> <table border="0"> <tr> <td>* 引用文献のカテゴリー</td> <td>“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抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</td> </tr> <tr> <td>“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの</td> <td>“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</td> </tr> <tr> <td>“D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献</td> <td>“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</td> </tr> <tr> <td>“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</td> <td>“&” 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>“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）</td> <td></td> </tr> <tr> <td>“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td></td> </tr> <tr> <td>“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</td> <td></td> </tr> </table>			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	A	US 2004/0123343 A1 (THOMAS J. LA ROSA) 24.06.2004 (2004 - 06 - 24) [0003], [0015], SEQ ID No.131841, SEQ ID No.29358	1-15	A	JP 2005-185101 A (独立行政法人農業生物資源研究所) 14.07.2005 (2005 - 07 - 14) [0006], SEQ ID No.54940, SEQ ID No.26607	1-15	A	WO 03/008540 A2 (SYNGENTA PARTICIPATIONS AG) 30.01.2003 (2003 - 01 - 30) SEQ ID No.6701, SEQ ID No.2570	1-15	A	US 2015/0082481 A1 (MONSANTO TECHNOLOGY LLC) 19.03.2015 (2015 - 03 - 19) SEQ ID No.20680	1-15	* 引用文献のカテゴリー	“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抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの	“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	“D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献	“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	“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	“&” 同一パテントファミリー文献	“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	
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																													
A	US 2004/0123343 A1 (THOMAS J. LA ROSA) 24.06.2004 (2004 - 06 - 24) [0003], [0015], SEQ ID No.131841, SEQ ID No.29358	1-15																													
A	JP 2005-185101 A (独立行政法人農業生物資源研究所) 14.07.2005 (2005 - 07 - 14) [0006], SEQ ID No.54940, SEQ ID No.26607	1-15																													
A	WO 03/008540 A2 (SYNGENTA PARTICIPATIONS AG) 30.01.2003 (2003 - 01 - 30) SEQ ID No.6701, SEQ ID No.2570	1-15																													
A	US 2015/0082481 A1 (MONSANTO TECHNOLOGY LLC) 19.03.2015 (2015 - 03 - 19) SEQ ID No.20680	1-15																													
* 引用文献のカテゴリー	“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抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの																														
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの	“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																														
“D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献	“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																														
“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	“&” 同一パテントファミリー文献																														
“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																															
<p>国際調査を完了した日</p> <p>19.08.2024</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>03.09.2024</p>																														
<p>名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>権限のある職員（特許庁審査官）</p> <p>小森 潔 4H 3762</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3443</p>																														

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。
 - a. 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
 - b. 国際出願日後に、国際調査のために提出された配列表（PCT規則13の3.1(a）
 配列表が出願時の国際出願の開示の範囲を超えるものではない旨の陳述書が添付されていた。
2. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、この国際調査報告は、WIPO標準ST.26に準拠する配列表なしで有意義な国際調査をすることができる限度において作成された。
3. 補足意見：

国際調査報告
特許ファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2024/021268

引用文献	公表日	特許ファミリー文献	公表日
US 2004/0123343 A1	24.06.2004	(ファミリーなし)	
JP 2005-185101 A	14.07.2005	US 2006/0123505 A1	
WO 03/008540 A2	30.01.2003	US 2006/0075523 A1	
		EP 1402042 A2	
US 2015/0082481 A1	19.03.2015	(ファミリーなし)	