

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6591898号
(P6591898)

(45) 発行日 令和1年10月16日(2019.10.16)

(24) 登録日 令和1年9月27日(2019.9.27)

(51) Int.Cl.	F 1
AO 1 H 1/00	(2006.01)
AO 1 H 5/00	(2018.01)
AO 1 H 5/10	(2018.01)
C 12 N 15/09	(2006.01)
C 12 N 5/10	(2006.01)
AO 1 H	1/00
AO 1 H	5/00
AO 1 H	5/10
C 12 N	15/09
C 12 N	5/10

請求項の数 13 (全 26 頁)

(21) 出願番号	特願2015-562512 (P2015-562512)	(73) 特許権者	511005413
(86) (22) 出願日	平成26年3月13日 (2014.3.13)	セレクティス	
(65) 公表番号	特表2016-509865 (P2016-509865A)	フランス国, エフ-75013 パリ,	
(43) 公表日	平成28年4月4日 (2016.4.4)	リュードゥ ラ クロワ ジャリ, 8	
(86) 國際出願番号	PCT/IB2014/059752	(74) 代理人	100113376
(87) 國際公開番号	W02014/141147	弁理士	南条 雅裕
(87) 國際公開日	平成26年9月18日 (2014.9.18)	(74) 代理人	100179394
審査請求日	平成29年3月8日 (2017.3.8)	弁理士	瀬田 あや子
(31) 優先権主張番号	61/790,655	(74) 代理人	100185384
(32) 優先日	平成25年3月15日 (2013.3.15)	弁理士	伊波 興一朗
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74) 代理人	100137811
(31) 優先権主張番号	61/885,213	弁理士	原 秀貢人
(32) 優先日	平成25年10月1日 (2013.10.1)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 F A D 2 - 1 A / 1 B 遺伝子の標的化ノックアウトを介した、大豆油組成物の改変

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

1つまたは複数の F A D 2 - 1 A 対立遺伝子内の欠失、および1つまたは複数の F A D 2 - 1 B 対立遺伝子内の欠失を含む、大豆植物、大豆植物部分、または大豆植物細胞であつて、

前記1つまたは複数の F A D 2 - 1 A 対立遺伝子内の欠失および前記1つまたは複数の F A D 2 - 1 B 対立遺伝子内の欠失は、転写アクチベーター様 (T A L) エフェクターエンドスクレアーゼによって誘導されたものであり、前記 T A L エフェクターエンドスクレアーゼは、配列番号 2 0 および 2 1 、配列番号 2 4 および 2 5 、配列番号 2 8 および 2 9 、または配列番号 3 2 および 3 3 に記載の配列に結合するものであり、かつ、

前記の植物、植物部分、植物細胞、または前記の植物由来の種子は、対応する野生型の大豆植物、植物部分、または植物細胞により生産される油と比較して、オレイン酸含有量が増加してリノール酸含有量が減少した油を生産する、

大豆植物、大豆植物部分、または大豆植物細胞。

【請求項 2】

請求項1の大豆植物、大豆植物部分、または大豆植物細胞であつて、

前記欠失は、配列番号 3 2 および 3 3 を標的化する T A L エフェクターエンドスクレアーゼによって誘導されたものである、

大豆植物、大豆植物部分、または大豆植物細胞。

【請求項 3】

10

20

請求項 1 の大豆植物、大豆植物部分、または大豆植物細胞であって、
前記 1 つまたは複数の F A D 2 - 1 B 対立遺伝子は、配列番号 1 6 に記載の配列を生じる欠失を含む、
大豆植物、大豆植物部分、または大豆植物細胞。

【請求項 4】

請求項 3 の大豆植物、大豆植物部分、または大豆植物細胞であって、
前記の植物、植物部分、または植物細胞は、導入遺伝子を含まない、
大豆植物、大豆植物部分、または大豆植物細胞。

【請求項 5】

オレイン酸含有量が増加してリノール酸含有量が減少した大豆油を生産する方法であつて：

(a) 1 つまたは複数の F A D 2 - 1 A 対立遺伝子内の欠失および 1 つまたは複数の F A D 2 - 1 B 対立遺伝子内の欠失を含む、大豆植物または大豆植物部分を提供するステップ、ここで、前記 1 つまたは複数の F A D 2 - 1 A 対立遺伝子内の欠失および前記 1 つまたは複数の F A D 2 - 1 B 対立遺伝子内の欠失は、T A L エフェクターエンドヌクレアーゼによって誘導されたものであり、前記 T A L エフェクターエンドヌクレアーゼは、配列番号 2 0 および 2 1、配列番号 2 4 および 2 5、配列番号 2 8 および 2 9、または配列番号 3 2 および 3 3に記載の配列に結合するものである；および

(b) 前記の植物または植物部分から油を生産するステップ、
を含む、

方法。

【請求項 6】

請求項 5 の方法であって、
前記欠失は、配列番号 3 2 および 3 3 を標的化する T A L エフェクターエンドヌクレアーゼによって誘導されたものである、
方法。

【請求項 7】

請求項 5 に記載の方法であって、
前記 1 つまたは複数の F A D 2 - 1 B 対立遺伝子は、配列番号 1 6 に記載の配列を生じる欠失を含む、
方法。

【請求項 8】

請求項 5 の方法であって、
前記の大豆植物または大豆植物部分は、導入遺伝子を含まない、
方法。

【請求項 9】

1 つまたは複数の F A D 2 - 1 A 対立遺伝子内の欠失および 1 つまたは複数の F A D 2 - 1 B 対立遺伝子内の欠失を含む大豆植物を作る方法であって、
前記方法は：

(a) 機能性 F A D 2 - 1 A および F A D 2 - 1 B 対立遺伝子を含む大豆植物細胞の個体群を、内因性 F A D 2 - 1 A 配列を標的化する 1 つまたは複数の T A L エフェクターエンドヌクレアーゼおよび内因性 F A D 2 - 1 B 配列を標的化する 1 つまたは複数の T A L エフェクターエンドヌクレアーゼと接触させるステップ、ここで、前記 T A L エフェクターエンドヌクレアーゼは、配列番号 2 0 および 2 1、配列番号 2 4 および 2 5、配列番号 2 8 および 2 9、または配列番号 3 2 および 3 3に記載の配列に結合するものである、

(b) 前記大豆植物細胞の個体群から大豆植物の個体群を再生させるステップ、ここで、前記大豆植物の個体群は、1 つまたは複数の T A L エフェクターエンドヌクレアーゼをコードする導入遺伝子を含む、および、

(c) 前記大豆植物の個体群から、1 つまたは複数の F A D 2 - 1 A 対立遺伝子および 1 つまたは複数の F A D 2 - 1 B 対立遺伝子が欠失を含む大豆植物を選択するステップ、

10

20

30

40

50

を含む、
方法。

【請求項 10】

請求項 9 の方法であって、
前記 T A L エフェクターエンドヌクレアーゼは、配列番号 3 2 および 3 3 を標的化する
、
方法。

【請求項 11】

請求項 9 の方法であって、
前記大豆植物から、前記 F A D 2 - 1 B 遺伝子座の少なくとも一部分を含むゲノム D N 10
A を分離するステップをさらに含み、ここで、前記 F A D 2 - 1 B 遺伝子座の前記部分が
、配列番号 1 6 に示される配列を含む、
方法。

【請求項 12】

請求項 9 の方法であって、
前記方法は、
(d) 前記の選択された大豆植物を成熟まで生育させるステップ、
(e) 前記の成熟した選択された大豆植物を自家受精させるステップ、
(f) 前記の自家受精させた植物から、種子を回収するステップ、および、
(g) 前記の回収された種子から生産された植物から、導入遺伝子を含まない分離個体 20
をスクリーニングするステップ、ここで、前記の導入遺伝子を含まない分離個体は、1 つ
または複数の F A D 2 - 1 A 対立遺伝子内の欠失および 1 つまたは複数の F A D 2 - 1 B
対立遺伝子内の欠失を含む、
をさらに含む、
方法。

【請求項 13】

少なくとも 1 つの F A D 2 - 1 A 対立遺伝子内の欠失および少なくとも 1 つの F A D 2
- 1 B 対立遺伝子内の欠失を含む、大豆植物を生産する方法であって：
(a) 子孫を得るために、少なくとも 1 つの F A D 2 - 1 A 対立遺伝子内の欠失および
少なくとも 1 つの F A D 2 - 1 B 対立遺伝子内の欠失を含む第一の大豆植物を、第二の 30
大豆植物と、交配するステップ、ここで前記少なくとも 1 つの F A D 2 - 1 B 対立遺伝子は
、配列番号 1 6 に記載の配列を生じる欠失を含む；および
(b) 前記子孫から、少なくとも 1 つの F A D 2 - 1 A 対立遺伝子内の欠失および少な
くとも 1 つの F A D 2 - 1 B 対立遺伝子内の欠失を含む大豆植物を選択するステップ、
を含む、
方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

[関連出願の相互参照]

本出願は、2013年10月1日に出願された米国仮出願第 61/885,213 号、
および、2013年3月15日に出願された米国仮出願第 61/790,655 号からの
優先権の利益を主張する。

【0002】

[技術分野]

本願は、野生型植物と比較して組成物が改変された油を生産するために用いることができる、大豆植物を作るための材料および方法に関する。また、本願は、F A D 2 - 1 A /
1 B 活性を欠損した大豆品種にも関する。

【背景技術】

【0003】

10

20

30

40

50

大豆 (Glycine max) は、大気中窒素を固定するその能力に起因して、世界中で重要なマメ科作物である。大豆はまた、主な動物飼料タンパク質源としての役割も果たし、その油は、クッキング / フライから産業用途およびバイオディーゼルまでわたる用途を有する。典型的に、水素化工程を用いて熱安定性を高め、大豆油の保存期間および味を改善する。しかしながら、水素化は、生産コストを増大し、また、トランス脂肪の形成をもたらし、それはヒトでの心血管系疾患に関連している。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本明細書では、遺伝子組換えを用いずに、デルタ - 12 脂肪酸デサチュラーゼ 2 (FAD2) 1A および 1B 遺伝子の発現を減らす、または無くすことにより、大豆油組成物を改变するための材料および方法が提供される。そのような改变された油組成物を有する大豆品種もまた提供される。

10

【0005】

本明細書に記載の方法は、配列特異的なレアカットエンドスクレアーゼを利用して、FAD2 - 1A および / または FAD2 - 1B コード配列に変異を導入し、それにより、遺伝子機能をノックアウトする。これらの方法は、導入遺伝子の挿入を伴わずに FAD2 - 1A / 1B サイレンシングを仲介する。導入遺伝子を含む植物は、ヨーロッパなどの特定の管轄では高度に規制され、他の管轄では、規制当局の承認を得るための費用は非常に高い。本明細書に記載の方法は、新品種の生産を促進することもでき、および、トランスジエニックまたは伝統的な育種アプローチよりも費用効果的であり得る。

20

【課題を解決するための手段】

【0006】

一態様では、本願は、1つまたは複数の FAD2 - 1A 対立遺伝子内の変異、1つまたは複数の FAD2 - 1B 対立遺伝子内の変異、または、1つまたは複数の FAD2 - 1A 対立遺伝子内の変異および1つまたは複数の FAD2 - 1B 対立遺伝子内の変異を有する、大豆植物、植物部分、または植物細胞を特徴とし、ここで、前記の植物、植物部位、または植物細胞は、対応する野生型の大豆植物、植物部分、または植物細胞により生産される油と比較して、オレイン酸含有量が増加してリノール酸含有量が減少した油を生産する。各変異は、配列番号 1 または配列番号 2 の配列にあってよい。各変異は、レアカットエンドスクレアーゼ (例えれば、転写アクチベーター様 (TAL) エフェクターエンドスクレアーゼ) により誘導することができる。TAL エフェクターエンドスクレアーゼは、配列番号 18 ~ 33 のいずれかに記載の配列に結合することができる。各変異は、1ヌクレオチドを超える挿入、欠失、または置換であってよい。変異型 FAD2 - 1A および / または FAD2 - 1B 対立遺伝子は、それぞれ、いかなる外因性の核酸も含まずに、内因性の核酸配列の変更を有してよい。一部の実施態様では、植物、植物部分、または植物細胞は、導入遺伝子を含まない。植物部分は種子であってよい。

30

【0007】

別の態様では、本願は、1つまたは複数の FAD2 - 1A 対立遺伝子内の変異、1つまたは複数の FAD2 - 1B 対立遺伝子内の変異、または、1つまたは複数の FAD2 - 1A 対立遺伝子内の変異および1つまたは複数の FAD2 - 1B 対立遺伝子内の変異を有する、大豆植物、植物部分、または植物細胞を特徴とし、前記の植物、植物部分、または植物細胞は、オレイン酸含有量が 30 % よりも高い (例えれば、40 % よりも高い、50 % よりも高い、または 55 % よりも高い) 油を生産する。一部の実施態様では、植物、植物部分、または植物細胞は、導入遺伝子を含まない。

40

【0008】

別の態様では、本願は、1つまたは複数の FAD2 - 1A 対立遺伝子内の変異、1つまたは複数の FAD2 - 1B 対立遺伝子内の変異、または、1つまたは複数の FAD2 - 1A 対立遺伝子内の変異および1つまたは複数の FAD2 - 1B 対立遺伝子内の変異を有する、大豆植物、植物部分、または植物細胞を特徴とし、前記の植物、植物部分、または植

50

物細胞は、リノール酸含有量が10%未満（例えば、5%未満、3%未満、または1%未満）である油を生産する。一部の実施態様では、植物、植物部分、または植物細胞は、導入遺伝子を含まない。

【0009】

別の態様では、本願は、オレイン酸含有量が増大してリノール酸含有量が減少した大豆油を生産するための方法を特徴とする。その方法は、(a) 1つまたは複数のFAD2-1A対立遺伝子内の変異、1つまたは複数のFAD2-1B対立遺伝子内の変異、または、1つまたは複数のFAD2-1A対立遺伝子内の変異および1つまたは複数のFAD2-1B対立遺伝子内の変異を有する、大豆植物または植物部分を提供するステップ；および(b)前記の植物または植物部分から油を生産するステップ、を含むことができる。各変異は、レアカットエンドヌクレアーゼ（例えば、TALエフェクターエンドヌクレアーゼ）により誘導することができる。TALエフェクターエンドヌクレアーゼは、配列番号18～33のいずれかに記載の配列に結合することができる。一部の実施態様では、植物または植物部分は、導入遺伝子を含まない。

【0010】

さらに別の態様では、本願は、各FAD2-1A対立遺伝子内の変異および各FAD2-1B対立遺伝子内の変異を有する、大豆植物を作るための方法を特徴とする。その方法は、(a)機能性FAD2-1AおよびFAD2-1B対立遺伝子を有する大豆植物細胞の個体群を、内因性FAD2-1A配列を標的化する1つまたは複数のレアカットエンドヌクレアーゼおよび内因性FAD2-1B配列を標的化する1つまたは複数のレアカットエンドヌクレアーゼと、接触させるステップ、(b)前記個体群から、各FAD2-1A対立遺伝子および各FAD2-1B対立遺伝子が不活性化されている細胞を選択するステップ、および(c)選択された植物細胞を、大豆植物内へ再生させるステップ、を含むことができる。大豆植物細胞は、子葉細胞を含むことができる。その方法は、子葉細胞を、前記の1つまたは複数のレアカットエンドヌクレアーゼをコードする1つまたは複数のベクターで形質転換するステップを含むことができる。前記の1つまたは複数のレアカットエンドヌクレアーゼは、TALエフェクターエンドヌクレアーゼであってよい。各TALエフェクターエンドヌクレアーゼは、配列番号18～33のいずれかに記載の配列を標的化することができる。その方法は、植物細胞内に、1つまたは複数のTALエフェクターエンドヌクレアーゼタンパク質を導入するステップを含むことができる。その方法は、植物系統を生産するために、植物細胞を培養するステップをさらに含むことができる。その方法は、植物細胞から、FAD2-1A遺伝子座の少なくとも一部分またはFAD2-1B遺伝子座の少なくとも一部分を含むゲノムDNAを分離するステップをさらに含むことができる。一部の実施態様では、植物細胞は、導入遺伝子を含まない。

【0011】

また、本願は、各FAD2-1A対立遺伝子内の変異および各FAD2-1B対立遺伝子内の変異を有する、大豆植物を生産するための方法を特徴とする。その方法は、(a)子孫を得るために、少なくとも1つのFAD2-1A対立遺伝子内の変異および少なくとも1つのFAD2-1B対立遺伝子内の変異を有する第一の大豆植物を、少なくとも1つのFAD2-1A対立遺伝子内の変異および少なくとも1つのFAD2-1B対立遺伝子内の変異を有する第二の大豆植物と、交配させるステップ；および(b)前記子孫から、各FAD2-1AおよびFAD2-1B対立遺伝子内に変異を有する大豆植物を選択するステップ、を含むことができる。各変異は、レアカットエンドヌクレアーゼ（例えば、TALエフェクターエンドヌクレアーゼ）により誘導することができる。TALエフェクターエンドヌクレアーゼは、配列番号18～33のいずれかに記載の配列に結合することができる。各変異は、1ヌクレオチドを超える欠失であってよい。一部の実施態様では、前記の第一および第二の大豆植物は、導入遺伝子を含まない。

【0012】

別段の定義が無い限り、本明細書で用いられる全ての技術的および科学的用語は、本発明が関連する当業者の一人により一般に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に

10

20

30

40

50

記載のものと同様または同等の方法および材料を用いて本発明を実施することができるが、適切な方法および材料を以下に記載する。本明細書で言及される全ての刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献は、それらの全体で参照により援用される。矛盾する場合は、本明細書（定義を含む）が支配する。加えて、材料、方法、および実施例は、単なる説明であり、制限を意図しない。

【0013】

本発明の1つまたは複数の実施態様の詳細を、添付の図面および以下の説明に示す。本発明の他の特徴、目的、および利点は、説明および図面から、および特許請求の範囲から、明らかである。

【図面の簡単な説明】

10

【0014】

【図1A】FAD2-1AおよびFAD2-1Bにおける、様々なTALエフェクターエンドヌクレアーゼ標的部位に関するDNA配列を示す。FAD2-1A遺伝子由来のDNA配列（配列番号1）を図1Aに示し、FAD2-1B遺伝子由来のDNA配列（配列番号2）を図1Bに示す。下線を引いた配列は、T1～T4と指定されるTALエフェクターエンドヌクレアーゼに関する標的部位を示す。小文字は、TALエフェクターエンドヌクレアーゼにより誘導される変異をスクリーニングするために用いられる制限エンドヌクレアーゼ部位を示す。

【図1B】FAD2-1AおよびFAD2-1Bにおける、様々なTALエフェクターエンドヌクレアーゼ標的部位に関するDNA配列を示す。FAD2-1A遺伝子由来のDNA配列（配列番号1）を図1Aに示し、FAD2-1B遺伝子由来のDNA配列（配列番号2）を図1Bに示す。下線を引いた配列は、T1～T4と指定される、TALエフェクターエンドヌクレアーゼに関する標的部位を示す。小文字は、TALエフェクターエンドヌクレアーゼにより誘導される変異をスクリーニングするために用いられる制限エンドヌクレアーゼ部位を示す。

20

【図2】FAD2-1AおよびFAD2-1BにおけるTALエフェクターエンドヌクレアーゼにより誘導される変異に関して大豆毛根をスクリーニングするために用いられる、PCRエンリッチメントアッセイによる産物を示す、ゲルの写真である。

【図3】大豆毛根におけるFAD2-1AおよびFAD2-1B遺伝子内の、TALエフェクターエンドヌクレアーゼにより誘導される変異の例示的なDNA配列を示す。各パネルの一番上の列は、FAD2-1A（上の2つのパネル）およびFAD2-1B（下の2つのパネル）における、TALエフェクターエンドヌクレアーゼ（下線）に関する認識部位のDNA配列を示す。他の配列は、不正確な非相同末端結合（NHEJ）により誘導された代表的な変異を示し、欠失サイズを右に示す。

30

【図4】FAD2-1AおよびFAD2-1BにおいてTALエフェクターエンドヌクレアーゼにより誘導される変異を同定するために、再生された大豆植物において行なわれたT7E1アッセイの結果を示す、ゲルの写真である。アスタリスクは、明らかな変異を有するサンプルを示す。本明細書の表4Aは、どの再生植物およびどの特定のFAD2-1遺伝子が、ゲルの各レーンにおいて分析されたのかについての情報を提供する。最初および最後のレーンは、分子長マーカーを含み、番号は付けていない。表4Aに「切断されず」として挙げられるDNAサンプルは、T7E1で処理されなかった。

40

【図5】FAD2-1AおよびFAD2-1Bにおける、TALエフェクターエンドヌクレアーゼにより誘導される変異のDNA配列を示す。これらの変異は、遺伝学的に伝染性であった。

【図6】GM02 6-18由来の異なる子孫に関する脂肪酸組成物分析の結果を示す。aaBB遺伝子型を有する植物は、FAD2-1Aの両方の対立遺伝子に変異を有する。AAbb遺伝子型を有する植物は、FAD2-1Bの両方の対立遺伝子に変異を有する。aabb植物は、FAD2-1AおよびFAD2-1Bの両方の対立遺伝子に変異を有する。

【図7】FAD2-1突然変異体における、TALエフェクターエンドヌクレアーゼ導入

50

遺伝子の分離を示す。ゲル画像は、それぞれ、T A L エフェクターエンドヌクレアーゼのコード配列および大豆アルコールデヒドロゲナーゼ (A D H) 遺伝子に関するプライマーセットを用いて得られた P C R 産物を示す。ゲル画像の下のラベルは以下を表わす： 1 - 1 5 , 個々の T 2 突然変異体の系統 ; W T , 非トランスジェニック野生型大豆植物由来の D N A ; ベクター , 形質転換で用いたベクター D N A ; トランスジェニック , T - D N A ベクターを含むトランスジェニック植物由来のポジティブコントロール D N A ; H ₂ O , いかなる D N A も有さないネガティブコントロール。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 5 】

商品大豆油は、5つの脂肪酸：パルミチン酸 (1 0 %) 、ステアリン酸 (4 %) 、オレイン酸 (1 8 %) 、リノール酸 (5 5 %) およびリノレン酸 (1 3 %) で構成される。オレイン酸の含有量が高い植物油は、安定性および / または味を改善するために、より少ない加工を必要とし得る。また、そのような油類は、より健康もあり得て、および、バイオディーゼルの生産にも、より適し得る。オレイン酸含有量が 5 5 % よりも高くリノール酸含有量が 1 0 % 未満である大豆油は、特に有用であり得る。伝統的な育種および突然変異誘発のストラテジーは、高レベルのオレイン酸を含む大豆品種を生産するために用いられているが、これらの品種は収率が低く、したがって、農場主に許容されていない。

【 0 0 1 6 】

パルミチン酸からリノレン酸への生合成の進行に関与している酵素が同定されている。例えば、F A D 2 遺伝子は、大豆種子の発達における油蓄積中に、オレイン酸前駆体をリノール酸前駆体に変換することに関与している。大豆の古来の倍数化に起因して、2コピーのF A D 2 (F A D 2 - 1 A および F A D 2 - 1 B) が、大豆ゲノム中に存在する。これらの遺伝子は、D N A レベルで約 9 5 % の配列同一性を有し、コードされるタンパク質は、アミノ酸レベルで約 9 9 % の配列同一性を有する。天然起源の F A D 2 - 1 B 突然変異体の対立遺伝子に関してホモ接合型の植物は、他に記載されるように (Pham et al . , BMC Plant Biol . 1 0 : 1 9 5 , 2 0 1 0) 、オレイン酸組成物が軽度に増加 (2 0 . 5 % ~ 2 9 . 4 %) し得る。F A D 2 - 1 A における変異は、X線突然変異誘発および耕耘 (T I L L i n g) を介して発達されていて、5 0 % までのオレイン酸を含む種子を生産し (Sandhu et al . , J A O C S 8 4 : 2 2 9 - 2 3 5 , 2 0 0 7) 、 F A D 2 - 1 A および F A D 2 - 1 B 対立遺伝子の両方の変異は、オレイン酸含有量が 8 2 . 2 % である油をもたらす (Phamら、上記) 。

【 0 0 1 7 】

本願は、F A D 2 - 1 A および / または F A D 2 - 1 B 活性が低減した (例えば、欠損した) 大豆植物、ならびに、そのような植物、および、そのような植物由来の油を生産する方法を提供する。本明細書に記載の方法を用いて、オレイン酸成分が少なくとも 3 0 % (例えば、少なくとも 3 5 % 、少なくとも 4 0 % 、少なくとも 4 5 % 、少なくとも 5 0 % 、少なくとも 5 5 % 、少なくとも 6 0 % 、少なくとも 6 5 % 、少なくとも 7 0 % 、少なくとも 7 5 % 、または少なくとも 8 0 %) 増加し、リノール酸成分が 1 0 % 以下 (例えば、8 % 以下、5 % 以下、4 % 以下、3 % 以下、2 % 以下、1 % 以下、または 0 . 5 % 以下) に減少した、油を有する大豆品種を生産することができる。一部の実施態様では、大豆油組成物のこの改変は、F A D 2 - 1 A および / または F A D 2 - 1 B 遺伝子の発現を完全にノックアウトすることにより達成することができる。本明細書で提供される方法の一部によれば、F A D 2 - 1 A および / または F A D 2 - 1 B 遺伝子の対立遺伝子の両方とも、非トランスジェニック技術を用いて不活性化されている。F A D 2 - 1 A / 1 B の遺伝子産物の除去は、大豆種子における、オレイン酸前駆体のリノール酸前駆体への変換を、大いに低減させることができる。

【 0 0 1 8 】

F A D 2 - 1 A / 1 B 発現の完全な排除を達成するために、例えば、操作されたレアカットヌクレアーゼを、F A D 2 - 1 遺伝子の両方の保存領域を認識して二本鎖切断を生じさせるように設計した。D N A 切断部位での非相同末端結合 (N H E J) に起因する不適

10

20

30

40

50

切な修復は、F A D 2 - 1 A / 1 B コード領域内に、ミスセンスおよび / またはナンセンスの変異を生じ、F A D 2 - 1 A / 1 B のRNA転写を不安定にさせて、翻訳前に分解へ向かわせる。

【 0 0 1 9 】

天然起源の大豆のF A D 2 - 1 A およびF A D 2 - 1 B ヌクレオチド配列の代表例を表5に示す。本明細書で提供される、大豆植物、細胞、植物部分、種子、およびその子孫は、内因性F A D 2 - 1 A およびF A D 2 - 1 B 対立遺伝子のそれぞれにおいて、各遺伝子の発現が低減または完全に阻害されるように変異を有することができる。あるいは、本明細書で提供される、大豆植物、細胞、植物部分、種子、およびその子孫は、少なくとも1つのF A D 2 - 1 A 対立遺伝子および / または少なくとも1つのF A D 2 - 1 B 対立遺伝子において、各遺伝子の発現が低減または完全に阻害されるように変異を有し得る。大豆植物、細胞、部分、種子、および子孫は、野生型の大豆植物、細胞、部分、種子、および子孫と比較して、増加したレベルのオレイン酸および低減したレベルのリノール酸を有することができる。

10

【 0 0 2 0 】

一部の実施態様では、本明細書で提供される、植物、植物細胞、植物部分、種子、および植物子孫は、F A D 2 - 1 A および / またはF A D 2 - 1 B 遺伝子内に標的化ノックアウトを作成するために、T A L エフェクターエンドヌクレアーゼシステムを用いて生産することができる。したがって、本開示は、オレイン酸含有量が増加してリノール酸含有量が低下した大豆油の生産に特に適切な、植物および関連産物（例えば、種子および植物部分）を生産するために、T A L エフェクターエンドヌクレアーゼを用いるための、材料および方法を提供する。他のレアカットの配列特異的なヌクレアーゼ（操作されたホーミングエンドヌクレアーゼまたはジンクフィンガーヌクレアーゼを含む）を用いて、所望の植物材料を生産することができる。

20

【 0 0 2 1 】

「植物」および「植物部分」は、親植物の際立った特徴を保持する、細胞、組織、器官、種子、および切断部分（例えば、根、葉、および花）を指す。「種子」は、受精の存在下または不存在下で形成されるかに関係なく、および、種子構造が稔性または不稔性であるか否かに関係なく、開花におけるその正常な成熟ポイントに続く、植物の胚珠の継続的な分化により形成される任意の植物構造を指す。

30

【 0 0 2 2 】

用語「対立遺伝子（単数または複数）」は、特定の遺伝子座における、任意の1つまたは複数の遺伝子の代替型を意味する。生物の二倍体（または複二倍体）細胞では、所定の遺伝子の対立遺伝子は、染色体上の特定の位置または遺伝子座に存在する。1つの対立遺伝子は、相同染色体ペアの各染色体上に存在する。「ヘテロ接合」対立遺伝子は、対応する相同染色体ペア上に個々に配置された特定の遺伝子座に存在する、2つの異なる対立遺伝子である。「ホモ接合型」対立遺伝子は、細胞内の対応する相同染色体ペア上に個々に配置された特定の遺伝子座に存在する、2つの同一の対立遺伝子である。

【 0 0 2 3 】

本明細書において用いられる「野生型」は、天然に最も一般的に生じるような、植物または遺伝子の典型的な型を指す。「野生型F A D 2 - 1 A 対立遺伝子」は、機能性F A D 2 - 1 A タンパク質をコードする、天然起源のF A D 2 - 1 A 対立遺伝子（例えば、天然起源の大豆植物内に見られる）であり、一方で、「突然変異体F A D 2 - 1 A 対立遺伝子」は、機能性F A D 2 - 1 A タンパク質をコードしないF A D 2 - 1 A 対立遺伝子である。そのような「突然変異体F A D 2 - 1 A 対立遺伝子」は、その核酸配列内に1つまたは複数の変異を含むことができ、その変異（単数または複数）は、植物または植物細胞においてインピボで検出可能な量の機能性F A D 2 - 1 A タンパク質をもたらさない。

40

【 0 0 2 4 】

本明細書における用語「レアカットエンドヌクレアーゼ」は、約12～40 bpの長さ（例えば、14～40 bpの長さ）の認識配列（標的配列）を有する核酸配列を標的とす

50

るエンドヌクレアーゼ活性を有する、天然または改変されたタンパク質を指す。典型的なレアカットエンドヌクレアーゼは、それらの認識部位の内部で切断を生じさせ、3' OHまたは5' OH突出を有する4 nt スタガードカットを生じる。これらのレアカットエンドヌクレアーゼは、メガヌクレアーゼ、例えば、ホーミングエンドヌクレアーゼの野生型または変異タンパク質であってよく、より具体的には、ドデカペップチドファミリー (L A G L I D A D G (配列番号37) ; WO 2004 / 067736 を参照) に属し、または、DNA結合ドメインと切断活性を有する触媒ドメインとを結合する融合タンパク質に由来してよい。T A L - エフェクターエンドヌクレアーゼおよびジンクフィンガーヌクレアーゼ (Z F N) は、エンドヌクレアーゼ F o k I の触媒ドメインとDNA結合ドメインとの融合の例である。カスタマイズされたT A L エフェクターエンドヌクレアーゼは、商品名T A L E N (商標) (C e l l e c t i s , P a r i s , F r a n c e) の下で市販されている。レアカットエンドヌクレアーゼの総説に関しては、B a k e r , N a t u r e M e t h o d s 9 : 23 - 26 , 2012 を参照。

【0025】

本明細書において用いられる「突然変異誘発」は、変異が、選択されたDNA配列内に導入されるプロセスを指す。一般にエンドヌクレアーゼにより誘導される変異は、二本鎖切断により得られ、ディープ - シーケンシング分析により検出することができる挿入または欠失 (「インデル」) をもたらす。そのような変異は典型的に、数個の塩基対の欠失であり、変異型対立遺伝子を不活性化する作用を有する。本明細書に記載の方法では、例えば、突然変異誘発は、植物細胞中の選択されたDNA配列を標的とするT A L エフェクターエンドヌクレアーゼによりなされる二本鎖DNA切断を介して生じる。そのような突然変異誘発は、「T A L エフェクターエンドヌクレアーゼにより誘導される変異」(例えば、T A L エフェクターエンドヌクレアーゼにより誘導されるノックアウト) および標的遺伝子の発現低下をもたらす。突然変異誘発の後に、植物は、公知技術を用いて、処理された細胞から再生することができる (例えば、従来の培養手順に従って種子を植えて、その後に自家受粉させる)。

【0026】

ある場合には、核酸は、代表的なF A D 2 - 1 A またはF A D 2 - 1 B ヌクレオチド配列と、少なくとも約75%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を有することができる。例えば、ヌクレオチド配列は、表5に記載される代表的な天然起源のF A D 2 - 1 A またはF A D 2 - 1 B ヌクレオチド配列と、少なくとも75、少なくとも80、少なくとも85、少なくとも90、少なくとも91、少なくとも92、少なくとも93、少なくとも94、少なくとも95、少なくとも96、少なくとも97、少なくとも98、または少なくとも99%の配列同一性を有することができる。

【0027】

特定の核酸またはアミノ酸配列と、特定の配列識別番号により参照される配列との間の配列同一性のパーセントは、以下のように決定される。まず、核酸またはアミノ酸配列を、B L A S T Nバージョン2.0.14およびB L A S T Pバージョン2.0.14を含むB L A S T Zの独立型バージョンによるB L A S T 2 S e q u e n c e s (B12s e q) プログラムを用いて、特定の配列識別番号で示された配列と比較する。このB L A S T Zの独立型バージョンは、f r . c o m / b l a s t またはn c b i . n l m . n i h . g o v で、オンラインで得ることができる。B12s e q プログラムの使い方を説明する取扱説明書は、B L A S T Zに添付のリードミーファイルで確認することができる。B12s e q は、B L A S T NまたはB L A S T Pアルゴリズムのいずれかを用いて、2つの配列間の比較を行なう。B L A S T Nは核酸配列を比較するために用いられ、一方で、B L A S T Pはアミノ酸配列を比較するために用いられる。2つの核酸配列を比較するために、オプションを以下のように設定する：- i は、比較される第一の核酸配列を含むファイルに設定し (例えば、C : \ s e q 1 . t x t) ； - j は、比較される第二の核酸配列を含むファイルに設定し (例えば、C : \ s e q 2 . t x t) ； - p は、b l a s t n に設定し； - o は、任意の所望のファイル名に設定し (例えば、C : \ o u t p u t

10

20

30

40

50

. t x t) ; - q は、 - 1 に設定し ; - r は、 2 に設定し ; および、他のオプションは全て、それらの初期設定のままにする。例えば、以下のコマンドを用いて、2つの配列間の比較を含む出力ファイルを産出することができる : C : \ B 1 2 s e q - i c : \ s e q 1 . t x t - j c : \ s e q 2 . t x t - p b l a s t n - o c : \ o u t p u t . t x t - q - 1 - r 2 。2つのアミノ酸配列を比較するために、B 1 2 s e q のオプションを以下のように設定する : - i は、比較される第一のアミノ酸配列を含むファイルに設定し (例えば、C : \ s e q 1 . t x t) ; - j は、比較される第二のアミノ酸配列を含むファイルに設定し (例えば、C : \ s e q 2 . t x t) ; - p は、 b l a s t p に設定し ; - o は、任意の所望のファイル名に設定し (例えば、C : \ o u t p u t . t x t) ; および、他のオプションは全て、それらの初期設定のままにする。10 例えば、以下のコマンドを用いて、2つのアミノ酸配列間の比較を含む出力ファイルを産出することができる : C : \ B 1 2 s e q - i c : \ s e q 1 . t x t - j c : \ s e q 2 . t x t - p b l a s t p - o c : \ o u t p u t . t x t 。2つの比較される配列がホモロジーを共有する場合は、指定の出力ファイルは、ホモロジーのこれらの領域をアライン配列として示す。2つの比較される配列がホモロジーを共有しない場合は、指定の出力ファイルは、アライン配列を示さない。

【 0 0 2 8 】

アラインした時点で、同一のヌクレオチドまたはアミノ酸残基が両方の配列に存在する位置の数を数えることにより、マッチ数を決定する。配列同一性のパーセントは、マッチ数を、同定された配列 (例えば、配列番号 1) に示される配列の長さで、または、連結された (a r t i c u l a t e d) 長さ (例えば、同定された配列に示される配列由来の 1 0 0 の連続ヌクレオチドまたはアミノ酸残基) のいずれかで割って、その後、生じた値に 1 0 0 を掛けることにより決定される。例えば、配列番号 1 に示される配列とアラインした場合に 2 5 0 マッチを有する核酸配列は、配列番号 1 に示される配列と 8 6 . 5 % 同一である (すなわち、 $250 \div 289 \times 100 = 86.5$) 。なお、配列同一性のパーセント値は、小数第一位に四捨五入する。例えば、7 5 . 1 1 、7 5 . 1 2 、7 5 . 1 3 、および 7 5 . 1 4 は、7 5 . 1 に切り捨てて、一方で、7 5 . 1 5 、7 5 . 1 6 、7 5 . 1 7 、7 5 . 1 8 、および 7 5 . 1 9 は、7 5 . 2 に切り上げる。長さの値は常に整数であることにも注意すべきである。20

【 0 0 2 9 】

内因性の標的配列を選択する方法、および、そのような配列を標的とする T A L エフェクターエンドヌクレアーゼを生産する方法は、他に記載のとおりに行なうことができる。例えば、P C T 公報番号 W O 2 0 1 1 / 0 7 2 2 4 6 (その全体で参照により本明細書中に援用される) を参照。T A L エフェクターは、X a n t h o m o n a s 属の植物病原細菌に見られる。これらのタンパク質は、疾患における重要な役割を果たし、または、宿主 D N A に結合してエフェクター特異的な宿主遺伝子を活性化することにより、防御を引き起こす (例えば、Gu et al . , N a t u r e 4 3 5 : 1 1 2 2 - 1 1 2 5 , 2 0 0 5 ; Yang et al . , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 1 0 3 : 1 0 5 0 3 - 1 0 5 0 8 , 2 0 0 6 ; Kay et al . , S c i e n c e 3 1 8 : 6 4 8 - 6 5 1 , 2 0 0 7 ; Sugio et al . , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 1 0 4 : 1 0 7 2 0 - 1 0 7 2 5 , 2 0 0 7 ; および、R o m e r et al . S c i e n c e 3 1 8 : 6 4 5 - 6 4 8 , 2 0 0 7 を参照) 。特異性は、エフェクター可変性の不完全な数 (e f f e c t o r - v a r i a b l e n u m b e r o f i m p e r f e c t) 、典型的には 3 4 アミノ酸リピートに依存する (S c h o r n a c k et al . , J . P l a n t P h y s i o l . 1 6 3 : 2 5 6 - 2 7 2 , 2 0 0 6 ; および、W O 2 0 1 1 / 0 7 2 2 4 6) 。多型は、主に、繰り返しの 1 2 位および 1 3 位に存在し、本明細書において、 r e p e a t v a r i a b l e - d i r e s i d u e (R V D) と呼ぶ。40

【 0 0 3 0 】

T A L エフェクターの R V D は、一部の縮重を有しかつ明らかなコンテキスト依存なく

10

20

30

40

50

、それらの標的部位内のヌクレオチドに、直接的な直線状で、1つのRVDが1つのヌクレオチドに対応する。タンパク質-DNA認識に関するこのメカニズムは、新規の標的特異的なTALエフェクターに関する標的部位の予測、ならびに、標的部位の選択、および選択部位に関して結合特異性を有する新規のTALエフェクターの設計を可能にする。

【0031】

TALエフェクターのDNA結合ドメインは、エンドヌクレアーゼ配列などの他の配列に融合することができ、特異的な選択DNA配列を標的とするキメラエンドヌクレアーゼをもたらし、そして、標的配列において、またはその付近で、その後のDNA切断をもたらす。DNAでのそのような切断（すなわち、二本鎖切断）は、NHEJまたは相同組換えなどを介して、野生型DNA配列内に変異を誘導することができる。ある場合には、TALエフェクターエンドヌクレアーゼを用いて、複合体ゲノムにおいて部位特異的な突然変異誘発を促進することができ、ノックアウトし、またはそれ以外の方法で遺伝子機能をかなりの精度および高効率で変化させる。以下の実施例で説明するように、大豆FAD2-1AおよびFAD2-1B対立遺伝子を標的とするTALエフェクターエンドヌクレアーゼを用いて、内因性遺伝子を突然変異誘発することができ、これらの遺伝子の発現が低減された（例えば、発現が検出可能でない）植物をもたらす。一部のエンドヌクレアーゼ（例えば、Fok I）が二量体として機能するという事実を利用して、TALエフェクターエンドヌクレアーゼの標的特異性を高めることができる。例えば、ある場合には、異なるDNA配列（例えば、図1Aおよび図1Bに示される下線を引いた標的配列）を標的としたTALエフェクターエンドヌクレアーゼ単量体のペアを用いることができる。図1Aおよび図1Bに示されるように、2つのTALエフェクターエンドヌクレアーゼ認識部位が極めて接近している場合は、不活性の単量体が一体となって、DNAを切断する機能性酵素を生じることができる。DNA結合がヌクレアーゼを活性化するように要求することにより、高い部位特異的な制限酵素を生じることができる。

【0032】

本明細書において用いられる用語「発現」は、センスまたはアンチセンスmRNAを生産する特定の核酸配列の転写、および/または、ポリペプチド（例えば治療用タンパク質）を生産するセンスmRNA分子の翻訳（その後に翻訳後イベントを伴う、または伴わない）を指す。

【0033】

植物または植物細胞における遺伝子またはポリペプチドの「発現が低下する」ことは、遺伝子の転写および/またはコードされるポリペプチドの翻訳が、対応する野生型の植物または植物細胞と比較して低下するように、遺伝子またはポリペプチドを、阻害、妨害、ノックアウト、またはノックダウンすることを含む。発現レベルは、例えば、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）、ノーザンプロット法、ドットプロットハイブリダイゼーション、in situハイブリダイゼーション、nuclear run-onおよび/またはnuclear run-off、RNaseプロテクション、または免疫学的および酵素学的方法、例えば、ELISA、ラジオイムノアッセイ、およびウェスタンブロッティングなどの方法を用いて評価することができる。

【0034】

内因性遺伝子内に変異を有する植物、植物細胞、または植物部分を生産するためにTALエフェクターエンドヌクレアーゼを用いる方法は、例えば、本明細書中の実施例に記載の方法を含む。例えば、選択されたFAD2-1AまたはFAD2-1B配列（例えば、図1Aに示すFAD2-1A配列または図1Bに示すFAD2-1B配列）を標的とするTALエフェクターエンドヌクレアーゼをコードする核酸を、それらを発現することができる植物細胞（例えば、子葉内の細胞）中に形質転換することができる。例えば上述の発現レベルを検出するための核酸に基づく分析またはタンパク質に基づく分析を介して、または、ゲノムの遺伝子座での変異を検出するための核酸に基づく分析（例えば、PCRおよびDNAシーケンシング、またはPCR後のT7E1アッセイ；Mussolini et al., Nucleic Acids Res. 39: 9283-9293, 2011）

10

20

30

40

50

を用いて、細胞を続けて分析して、標的部位（単数または複数）に変異が導入されているかどうか決定することができる。

【0035】

突然変異誘発された個体群、またはその個体群の次の世代を、その変異により生じる所望の形質（単数または複数）（例えば、油の組成物が改変された植物）に関してスクリーニングすることができる。あるいは、突然変異誘発された個体群、またはその個体群の次の世代を、FAD2-1AまたはFAD2-1B遺伝子における変異に関してスクリーニングすることができる。例えば、M₁植物の子孫M₂世代を、FAD2-1AまたはFAD2-1B遺伝子における変異の存在に関して評価してよい。「個体群」は、一般的な遺伝子プールを共有する個体の任意のグループである。本明細書において用いられる「M₀」は、TALエフェクタースクレアーゼに曝された植物細胞（およびそれから生育した植物）を指し、一方で、「M₁」は、自家受粉したM₀植物により生産された種子、およびそのような種子から生育した植物を指す。「M₂」は、自家受粉したM₁植物の子孫（種子および植物）であり、「M₃」は、自家受粉したM₂植物の子孫であり、および、「M₄」は、自家受粉したM₃植物の子孫である。「M₅」は、自家受粉したM₄植物の子孫である。「M₆」、「M₇」などは、それぞれ、前の世代の自家受粉した植物の子孫である。本明細書において用いられる用語「自家（selfed）」は、自家受粉を意味する。

10

【0036】

1つまたは複数のM₁大豆植物は、個々の、突然変異誘発したM₀植物細胞（およびそれから生育した植物）から得ることができ、少なくとも1つの植物は、FAD2-1AまたはFAD2-1B遺伝子内に変異を含むものとして同定することができる。M₁大豆植物は、FAD2-1Aおよび/またはFAD2-1Bの遺伝子座において、突然変異体の対立遺伝子に関してヘテロ接合型であってよく、そして、野生型の対立遺伝子の存在に起因して、デルタ-12脂肪酸デサチュラーゼ活性を示す。あるいは、M₁大豆植物は、FAD2-1AまたはFAD2-1Bの遺伝子座において、突然変異体の対立遺伝子を有してよく、そして、デルタ-12脂肪酸デサチュラーゼ活性が欠失した表現型を示す。そのような植物は、ヘテロ接合型であってよく、そのようなドミナントネガティブの抑制の現象に起因して、野生型の対立遺伝子の存在にもかかわらず、デルタ-12脂肪酸デサチュラーゼ活性を欠失していてよく、または、FAD2-1AまたはFAD2-1Bの遺伝子座での両方の対立遺伝子において独立に誘導された変異に起因して、ホモ接合型であってよい。

20

30

【0037】

FAD2-1AおよびFAD2-1B対立遺伝子の突然変異を有する大豆植物を植物育種プログラムにおいて用いて、新規かつ有用な系統および品種を作ることができる。したがって、一部の実施態様では、FAD2-1A内の少なくとも1つの変異およびFAD2-1B遺伝子内の少なくとも1つの変異を含む、M₁、M₂、M₃、またはその後の世代の大豆植物を、第二の大豆植物と交配し、そして、FAD2-1AおよびFAD2-1B遺伝子の変異が存在する交配の子孫を同定する。第二の大豆植物は、それを交配した植物と同一のFAD2-1AおよびFAD2-1B変異を含むことができ、異なるFAD2-1AおよびFAD2-1B変異を含むことができ、または、FAD2-1Aおよび/またはFAD2-1Bの遺伝子座において野生型であることができることが、理解されよう。

40

【0038】

育種は、公知の手順を介して行なうことができる。DNAフィンガープリンティング、SNPまたは同様の技術をマーカー利用選抜（marker-assisted selection）（MAS）の育種プログラムで用いて、突然変異体FAD2-1AおよびFAD2-1B対立遺伝子を、他の大豆植物内へ移行または育種し得る。例えば、育種者は、農学的に望ましい遺伝子型を有する突然変異体の対立遺伝子を含む遺伝子型の交雑から、分離個体群を作ることができる。F₂または戻し交配の世代における植物は、FAD2-1AおよびFAD2-1B配列またはそれらのフラグメントから開発されたマーカー

50

を用いてスクリーニングすることができる。突然変異体の対立遺伝子を保有するものとして同定された植物を戻し交配または自家受粉して、スクリーニングすべき第二の個体群を作ることができる。期待する遺伝様式または用いるM A S技術に応じて、所望の個々の植物の同定を助けるために、戻し交配の各サイクルの前に選択植物を自家受粉することが必要であり得る。循環性の親の所望の表現型が回復するまで、戻し交配または他の育種手順を繰り返すことができる。

【0039】

成功的な交配は、稔性でありかつ必要に応じて親の1つと戻し交配することができるF₁植物を生じる。一部の実施態様では、F₂世代における植物個体群が、F A D 2 - 1 AおよびF A D 2 - 1 B遺伝子発現に関してスクリーニングされ、標準的な方法に従って、
10 例えば、本明細書に記載のF A D 2 - 1 AおよびF A D 2 - 1 Bに関するヌクレオチド配列情報に基づくプライマーを用いたP C R法を用いて、例えば、植物は、F A D 2 - 1 AおよびF A D 2 - 1 B遺伝子が存在しないせいで、F A D 2 - 1 AおよびF A D 2 - 1 Bを発現することができないことが同定される。それから、選択植物を親の1つと交配し、第一の戻し交配(B C₁)世代植物を自家受粉してB C₁ F₂個体群を生産し、それを再び、変異型のF A D 2 - 1 AおよびF A D 2 - 1 B遺伝子発現(例えば、F A D 2 - 1 AおよびF A D 2 - 1 B遺伝子のヌルバージョン)に関してスクリーニングする。戻し交配、自家受粉、および、スクリーニングの工程は、例えば、少なくとも4回、稔性でありかつ循環性の親と合理的に類似する植物を最終スクリーニングが生産するまで繰り返される。この植物は、必要に応じて自家受粉することができ、その後、その子孫を再びスクリーニングして、植物がF A D 2 - 1 AおよびF A D 2 - 1 B遺伝子の発現を欠損していることを確認することができる。場合により、選択植物の細胞遺伝学的分析を行なって、染色体組および染色体対合の関係を確認することができる。育種者の選択植物の種子は、例えば、フィールドテスト、F A D 2 - 1 AおよびF A D 2 - 1 Bに関するヌル状態の確認、および/または、オレイン酸およびリノール酸のレベルを決定するための油の分析を含む、標準的な方法を用いて生産することができる。

【0040】

第一の突然変異体の大豆親と、第二の野生型の大豆親との間の交配から生じる、元のF₁ハイブリッドが、突然変異体の大豆親と交雑または戻し交配される状況では、戻し交配の子孫を自家受粉して、B C₁ F₂世代を作ることができ、それを、突然変異体のF A D 2 - 1 AおよびF A D 2 - 1 B対立遺伝子に関してスクリーニングする。

【0041】

本明細書に記載の突然変異体の大豆植物を用いた植物育種プログラムの結果は、新規かつ有用な系統および品種であることができる。本明細書において用いられる用語「品種」は、同種の他の植物からそれらを区別する不变の特徴を共有する植物の個体群を指す。品種は、常にではないが市販されることが多い。1つまたは複数の際立った形質を保有しながら、品種は、その品種内の個体間の非常に小さな全般的多様性により、さらに特徴付けることができる。「純系」品種は、数世代の自家受粉および選択、または組織または細胞の培養技術を用いた単一親からの栄養増殖により作られ得る。品種は、別の系統または品種から、本質的に得ることができる。植物の新品種の保護に関する国際条約(1961年40
12月2日。1972年11月10日、1978年10月23日、および1991年3月19日に、ジュネーブにて改正)により定義されるとおり、品種は：a)原品種の遺伝子型または遺伝子型の組み合わせに起因する本質的な特徴の発現を保持しながら、原品種から、または原品種から主に得られる品種から、主に得られる場合；b)原品種から明確に区別可能である場合；および、c)派生行為(act of derivation)に起因する違いを除き、原品種の遺伝子型または遺伝子型の組み合わせに起因する本質的な特徴の発現において原品種に準ずる場合に、原品種から「本質的に得られる」。本質的に得られる品種は、例えば、天然または誘導の突然変異体、体細胞繁殖系の変異、原品種の植物由来の個々の変異、戻し交配、または形質転換の選択により、得ることができる。品種から区別される「系列」は、非商業的に、例えば植物研究において用いられる植物群を

10

20

30

40

50

表わすことが最も多い。系列は、典型的に、1つまたは複数の対象となる形質について個体間で全般的な多様性をほとんど示さないが、他の形質については個体間で多少の多様性があつてよい。

【0042】

本明細書で提供される方法を用いて、野生型植物由来の対応する植物部分または産物と比較して、オレイン酸含有量が増加してリノール酸含有量が減少した、植物部分（例えば種子）または植物産物（例えば油）を生産することができる。植物部分または植物産物の脂肪酸含有量は、標準的な方法、例えば本明細書の実施例5などに記載の方法などを用いて、評価することができる。

【0043】

本発明を以下の実施例でさらに説明し、それは、特許請求の範囲に記載される本発明の範囲を限定しない。

【実施例】

【0044】

実施例1 - FAD2 - 1AおよびFAD2 - 1B遺伝子を突然変異誘発するための、配列特異的なヌクレアーゼの操作

G. maxにおけるFAD2 - 1AおよびFAD2 - 1B遺伝子の対立遺伝子を完全に不活性化またはノックアウトするために、スタートコドンに近接したタンパク質コード領域を標的化する配列特異的なヌクレアーゼを設計した。TALエフェクターエンドヌクレアーゼ認識部位を特異的に同定するソフトウェア、例えばTALE-NT 2.0 (Doy 2012)を用いて、コード配列の最初の500bp内のFAD2 - 1遺伝子ファミリーを標的化するように8つのTALエフェクターエンドヌクレアーゼペアを設計した。FAD2 - 1遺伝子に関するTALエフェクターエンドヌクレアーゼ認識部位を、図1において下線を引き、表1にリスト化する。TALエフェクターエンドヌクレアーゼは、他に記載の方法 (Cermak et al., Nucl. Acids Res. 39: e82, 2011; Reyon et al., Nat. Biotechnol. 30: 460 - 465, 2012; および、Zhang et al., Nat. Biotechnol. 29: 149 - 153, 2011)と同様の方法を用いて合成した。

【0045】

実施例2 - 酵母でのFAD2 - 1 TALエフェクターエンドヌクレアーゼ活性

FAD2 - 1遺伝子を標的化するTALエフェクターエンドヌクレアーゼの活性を評価するために、他に記載の方法 (Christian et al., Genetics 186: 757 - 761, 2010)と同様の方法により、酵母において活性分析を行なった。これらの分析のために、非機能性 - ガラクトシダーゼレポーター遺伝子内にクローン化されたTALエフェクターエンドヌクレアーゼ認識部位（表2）を有する標的のプラスミドを構築した。レポーター遺伝子がTALエフェクターエンドヌクレアーゼにより切断されたら、ダイレクトリピート間で組換えが生じて、機能が - ガラクトシダーゼ遺伝子に復元されるように、標的部位の横に - ガラクトシダーゼコード配列のダイレクトリピートを配置した。したがって、 - ガラクトシダーゼ活性は、TALエフェクターエンドヌクレアーゼ切断活性の尺度としての役割を果たした。結果を図3に要約する。全てのFAD2 - 1 TALエフェクターエンドヌクレアーゼペアが、切断活性を示した。切断活性を、ベンチマークのヌクレアーゼ、I - Sce Iに標準化した。

【0046】

10

20

30

40

【表1】

表1
T A L エフェクター-エンコードスクリアーゼ標的配列

遺伝子	標的配列 左	配列番号	標的配列 右	配列番号
FAD2_T01_C11	GCCACCACTACTCCACCTCCT	18	ATTGATGCCAATCT	19
FAD2_T01_C40	GCCACCACTACTCCACCTCCT	20	ATTGATGCCAATCT	21
FAD2_T02_C11	ACATTGCCACCACTACTTCCACCT	22	ATTGATGCCAATCT	23
FAD2_T02_C40	ACATTGCCACCACTACTTCCACCT	24	ATTGATGCCAATCT	25
FAD2_T03_C11	CTCATGGAAAAATAAGCCAT	26	ACCGTGATGAAGTGTCCC	27
FAD2_T03_C40	CTCATGGAAAAATAAGCCAT	28	ACCGTGATGAAGTGTCCC	29
FAD2_T04_C11	ATTCTCATGGAAAATAAGCCAT	30	ACCGTGATGAAGTGTCCC	31
FAD2_T04_C40	ATTCTCATGGAAAATAAGCCAT	32	ACCGTGATGAAGTGTCCC	33

【0047】

【表2】

表2 酵母アッセイのための、FAD2 TALEフェクターとクレアーゼ標的配列

TALEフェクター-エンドヌクレアーゼ標的配列	TALEフェクター-エンドヌクレアーゼ標的配列	配列番号
TALEフェクター-エンドヌクレアーゼ標的		
FAD2標的 1	GCCACCCACCTACTTCCACCTTCCCTCAACCCTTTCCCTCATTGCATGGCCAATCT	34
FAD2標的 2	ACATGCCACCCATTAACCTTCCACCTCCCTCAACCCTTTCCCTCATTGCATGGCCAATCT	35
FAD2標的 3	CTCATGGAAAAATAAGCCATTCGCCCATCACTCCAAACACAGGTTCCCTTGACCCGTGATGAAGTGTGTGTC	36
FAD2標的 4	ATTTCTCATGGAAAAATAAGCCATCACTCACTCCGGCATGACCTTGACCGTGAACAGGTGATGAAGTGTGTGTC	7

【0048】

10

20

30

40

【表3】

表3
酵母でのFAD2 TALエフェクターエンドヌクレアーゼ活性

TALエフェクターエンドヌクレアーゼサブユニット	酵母での活性*			
	FAD2_T1	FAD2_T2	FAD2_T3	FAD2_T4
FAD2_T01 左 C11	0.73	0.87	0.00	0.00
FAD2_T01 右 C11				
FAD2_T01 左 C40	0.79	0.73	0.00	0.00
FAD2_T01 右 C40				
FAD2_T02 左 C11	0.00	0.97	0.00	0.00
FAD2_T01 右 C11				
FAD2_T02 左 C40	0.00	0.96	0.00	0.00
FAD2_T01 右 C40				
FAD2_T03 左 C11	0.00	0.00	0.65	0.53
FAD2_T03 右 C11				
FAD2_T03 左 C40	0.00	0.00	0.63	0.51
FAD2_T03 右 C40				
FAD2_T04 左 C11	0.00	0.00	0.00	0.54
FAD2_T03 右 C11				
FAD2_T04 左 C40	0.00	0.00	0.00	0.52
FAD2_T03 右 C40				

* I - Scale に標準化 (最大 = 1.0)

【0049】

実施例3 - 大豆毛根での、TALエフェクターエンドヌクレアーゼ発現および活性

酵母での様々なFAD2 TALエフェクターエンドヌクレアーゼの活性に基づき、2つの異なる足場内の4つのTALエフェクターエンドヌクレアーゼを、大豆細胞での発現に選択した：C40構造におけるFAD2_T01、C40構造におけるFAD2_T02、C40構造におけるFAD2_T03、および、C11構造におけるFAD2_T04。これらのTALエフェクターエンドヌクレアーゼの活性を、他に記載 (Curtin et al. Plant Physiology 156(2): 466-473, 2011) の毛根アッセイを用いて、大豆でのそれらの内因性標的部位において評価した。始めに、各TALエフェクターエンドヌクレアーゼを、T-DNAベクター中に、エストラジオール誘導性プロモーター (Zuo et al., Plant J. 24: 265-273, 2000) の下流にクローン化し、それから、Agrobacterium rhizogenesのK599株に形質転換した (Govindarajulu et al., Mol. Plant Microbe Interact. 21: 1027-1035, 2008)。それから、様々なTALエフェクターエンドヌクレアーゼを有するA. rhizogenes株を用いて、大豆の半子葉 (half-cotyledon) を感染させて、トランスジェニック毛根を生産した。感染の3週間後に、毛根を集めて、液体窒素中で凍らせ、標準的な方法 (Murray et al., Nucleic Acids Res. 8(19): 4321-4325, 1980) を用いてゲノムDNAを調製した。

【0050】

NHEJにより仲介される変異が、TALエフェクターエンドヌクレアーゼによって大豆ゲノム内の標的部位で生じたかどうか判定するために、9つの毛根由来のDNAを、P

10

20

40

50

C R エンリッヂメントアッセイ (Zhang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107 (26) : 12028 - 12033, 2010) に供した。このアッセイは、NHEJ により誘導される変異に起因する、TAL エフェクターエンドヌクレアーゼのスペーサー配列内の制限酵素部位の欠失をモニターする。このアッセイで用いた制限酵素部位を図 1 に示す (小文字で表す)。FAD2-T01 を発現する 3 つの毛根サンプル由来のゲノム DNA を Mn1I で消化して、FAD2-1A 遺伝子座での変異をモニターした。HphI を用いて、FAD2-T01 に起因する FAD2-1B での変異をモニターした。AccI を用いて、FAD2-T04 を発現する 6 つの毛根サンプル由来の消化したゲノム DNA 内の FAD2-1A および FAD2-1B の両方の遺伝子座での変異をモニターした。消化に続いて、各反応液のアリコートを、FAD2-T01 または FAD2-T04 標的部位のいずれかの脇のプライマーを用いた PCR のためのテンプレートとして用いた。FAD2-T01 の活性を評価するために、FAD2-1A および FAD2-1B に特異的なプライマーを用いて、別個の PCR 反応を行なった。PCR 産物を、最初に 1% アガロースゲル上で分析し、増幅が生じていることを確認し、それから、分析される特定の TAL エフェクターエンドヌクレアーゼのスペーサー配列内に位置する制限酵素を用いて消化した。それから、この第二の制限消化反応を、野生型サンプル由来のコントロール DNA の消化および未消化と並べて、2% アガロースゲル上で分析した。TAL エフェクターエンドヌクレアーゼにより誘導される NHEJ 変異を有するサンプルは、スペーサー配列内の制限酵素部位を欠失し得て、未消化の PCR 産物をもたらし、それは、ゲル上に全長のバンドとして現れる。図 2 に示すように、未消化の PCR 産物は、同一のサンプル内で、FAD2-1A、FAD2-1B、または両方の遺伝子について観察された。例えば、図 2C 中のサンプル「b」は、FAD2-1B に変異が存在したことを示し、図 2B 中のサンプル「d」は、FAD2-1A に変異が存在したことを示し、図 2B および図 2D 中のサンプル「f」は、FAD2-1A および FAD2-1B の両方に変異が存在したことを示す。
10
20

【0051】

未消化の PCR 産物をクローン化およびシーケンスして、それらが、TAL エフェクターエンドヌクレアーゼにより誘導される変異をスペーサー配列内に含むことを確認した。PCR 産物は、Qiagen TOPO クローニングキットを用いて、メーカーの取り扱い説明書に従ってクローン化した。所定の未消化フラグメント由来の個々のクローンをシーケンスして、DNA 配列を、野生型 FAD2-1A または FAD2-1B 配列とともにアラインした。図 3 に示すように、多数の非依存性の欠失が、FAD2-1A および FAD2-1B の両方において、6 ~ 92 塩基対のサイズにわたって復元された。
30

【0052】

実施例 4 - FAD2 遺伝子において TAL エフェクターエンドヌクレアーゼにより誘導される変異を用いた、大豆植物の再生

FAD2-TAL01 および FAD2-TAL04 が、内因性標的部位において標的化した変化を生じたという検証に続き、FAD2-1A および FAD2-1B 内に変異を有する大豆植物を作るために実験を行なった。これを達成するために、4 つの FAD2-1 TAL エフェクターエンドヌクレアーゼのそれぞれを、T-DNA ベクター内にクローン化して、TAL エフェクターエンドヌクレアーゼ発現を、カリフラワー モザイクウイルス 35S プロモーター、または、エストラジオールにより誘導される XVE プロモーター系 (Zuolala、上記) のいずれかにより作動した。また、T-DNA ベクターは、グルホシネートに対する耐性を与えるバー選択マーカー (bar selectable marker) も含んだ。
40

【0053】

TAL エフェクターエンドヌクレアーゼを発現するトランスジェニック大豆植物を、標準的な Agrobacterium tumefaciens の形質転換プロトコル (Curtinら、上記) を用いて生産した。T-DNA を含む A. tumefaciens 株の、大豆半子葉 (品種 Bert (variety Bert)) との培養に続いて、推
50

定的にトランスジェニック植物を再生した。植物を土壤に移して、およそ4週間の生育後、DNA抽出および遺伝子型決定のために、各植物から小さい葉を回収した。各DNAサンプルを、初めに、PCRを用いてT-DNAの存在についてスクリーニングした。それから、全てのT-DNA-陽性植物をT7E1アッセイに供して、FAD2-1AおよびFAD2-1B TALエフェクターエンドヌクレアーゼ認識部位に変異を有する植物を同定した(Kim et al., Genome Res. 19: 1279-1288, 2009)。手短には、TALエフェクターエンドヌクレアーゼ認識部位にまたがるPCR産物を生産し、変性させ、そして再アニールさせた。野生型DNAフラグメントが、TALエフェクターエンドヌクレアーゼにより誘導される変異を有するフラグメントとアニールした場合に生産される、ヘテロ二本鎖を切断するために、アニールした産物にT7E1エンドヌクレアーゼを加え、アガロースゲル電気泳動により切断産物を可視化した。図4に示すように、4つの植物は、TALエフェクターエンドヌクレアーゼにより誘導される変異(GM026-18、GM026-23、GM027-06およびGM027-07)の証拠を示した。加えて、4つの植物は全て、FAD2-1AおよびFAD2-1Bの両方に変異を有し、両方の遺伝子が同時に突然変異誘発されることを示した。再生された全ての植物に関する遺伝子型決定データを表4Bに示す。

【0054】

葉組織においてTALエフェクターエンドヌクレアーゼによって導入された変異が次の世代に伝達されるかどうか判定するために、M0植物GM026-18、GM026-23およびGM027-06から種子を回収した。各M1個体群において、20~60の個々の植物を遺伝子型決定し、変異の伝達を確認した。FAD2-1AおよびFAD2-1B変異の両方とも、GM026-18のM1子孫において分離された。対照的に、FAD2-1AまたはFAD2-1B変異のみが、それぞれ、GM-026-23およびGM027-6のM1子孫に伝達された。遺伝性変異のDNA配列を図5に示す。

【0055】

実施例5 - 大豆FAD2遺伝子においてTALエフェクターエンドヌクレアーゼにより誘導される変異によって生産された種子における、脂肪酸プロファイル分析

大豆系列GM026-18を成熟まで生育させて、そして自家受精させて、FAD2-1A (aabbと表される)またはFAD2-1B (AAbbと表される)のいずれかでのホモ接合型の突然変異体、または、FAD2-1AおよびFAD2-1Bの両方に関するホモ接合型 (aabbと表される)である種子を生じさせた。これらの種子を、脂肪酸組成物について分析した。手短には、個々の大豆種子を粉碎して、基本組織部分からDNAを調製し、分析して各種子の遺伝子型を確立した。FAD2-1Aホモ接合型 (AAbb)、FAD2-1Bホモ接合型 (aabb)、またはFAD2-1A / FAD2-1Bのダブルのホモ接合型 (aabb)のノックアウト種子由来の残っている粉碎組織を用いて、脂肪酸メチルエステル (FAME) ガスクロマトグラフィー (Beuselink et al., Crop Sci. 47: 747-750, 2006) を用いて脂肪酸組成物を決定した。分析結果を図6に示す。図に見ることができるように、野生型植物、および、aabbおよびAAbb系列は、同様の脂肪酸プロファイル - よりも20%オレイン酸および50%リノール酸を示した。しかしながら、aabb系列 (FAD2-1AおよびFAD2-1Bに関するホモ接合型の突然変異体) は、高度に増加したレベルのオレイン酸を示し、それは80%と見積もられた。aabb系列におけるリノール酸レベルは大いに減少し、3%未満であった。

【0056】

【表4】

表4 A

図4において分析した、再生植物およびFAD2-1遺伝子のリスト

レーン	DNA	遺伝子
1	GM026-7a	FADII 1A
2	GM026-17	FADII 1A
3	GM026-18	
4	GM026-20	
5	GM026-23	
6	GM027-3	
7	GM027-6	
8	GM027-7	
9	GM027-10	
10	GM027-11	
11	GM008-6	FADII 1A
12	Bert WT	
13	GM026-7a	
14	GM026-17	
15	GM026-18	
16	GM026-7a	FADII 1B
17	GM026-17	FADII 1B
18	GM026-18	FADII 1B
19	GM026-20	FADII 1B
20	GM026-23	FADII 1B
21	GM027-3	FADII 1B
22	GM027-6	
23	GM027-7	
24	GM027-10	
25	GM027-11	
26	GM008-6	
27	Bert WT	
28	GM026-7a	FADII 1B 切断されず
29	GM026-17	
30	GM026-18	

【0057】

【表5】

表4B
トランスジェニック大豆植物での、突然変異体スクリーニング

	GM026-7a	GM026-17	GM026-18	GM026-20	GM026-23	GM026-3	GM027-6	GM027-7	GM027-10	GM027-11
FAD2-1A	Wt	Wt	変異株	Wt	変異株	Wt	変異株	変異株	Wt	Wt
FAD2-1B	Wt	Wt	変異株	Wt	変異株	Wt	変異株	変異株	Wt	Wt

* Wt T 7 E 1 A 7 E 1 に基づく野生型遺伝子型を表わす

【0058】

10

20

30

40

【表6】

表5 代表的なFAD²-1AおよびFAD²-1Bヨード配列

10

20

30

* インタロシ配列は小文字である

【 0 0 5 9 】

実施例 6 - 導入遺伝子フリーの突然変異体の大豆系列の作成

FAD2-1変異を有するがFAD2-T04 TALエフェクターエンドヌクレアーゼ構築物およびその関連する選択マーカーが欠失した大豆系列を得るために、GM026-18の子孫を、aabb遺伝子型に関してスクリーニングした。それから、突然変異体、導入遺伝子フリーの分離個体を、2セットのプライマーペア：1つはTALエフェクターエンドヌクレアーゼコード配列にまたがり、もう片方は大豆の内因性アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子（PCR反応のコントロール；図7）を使用したPCRストラテジーを用いて探索した。15個のaabb子孫を分析し、6つはそれらのゲノム中にTALEN配列の証拠を示さず、TALエフェクターエンドヌクレアーゼ構築物が、これらの植物において分離されていることを示唆した。これらの結果は、FAD2-1AおよびFAD2-1B遺伝子の両方における変異を用いて、導入遺伝子フリーの系列を作成する実施可能性を示す。

【 0 0 6 0 】

[他の実施態様]

本発明はその詳細な説明とともに記載されているが、前述の記載は説明目的であり、添

40

50

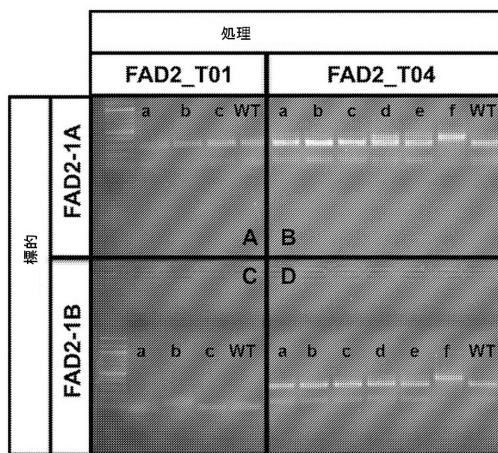
付の特許請求の範囲により定義される本発明の範囲を制限しないことが理解されるべきである。他の態様、利点、および改変は、以下の特許請求の範囲の範囲内である。

【図 1 A】

【 図 1 B 】

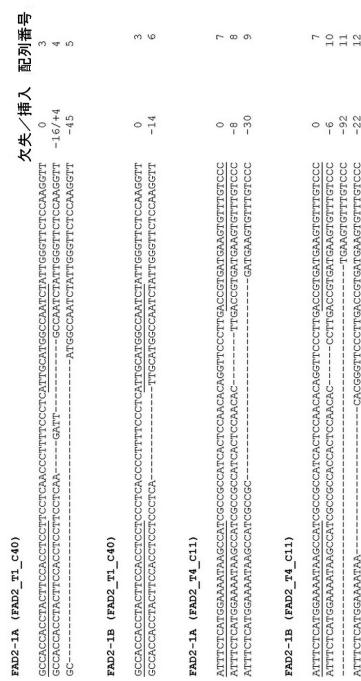
【図2】

Figure 2



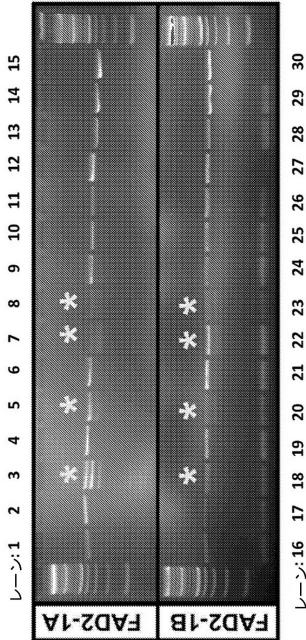
【図3】

Figure 3



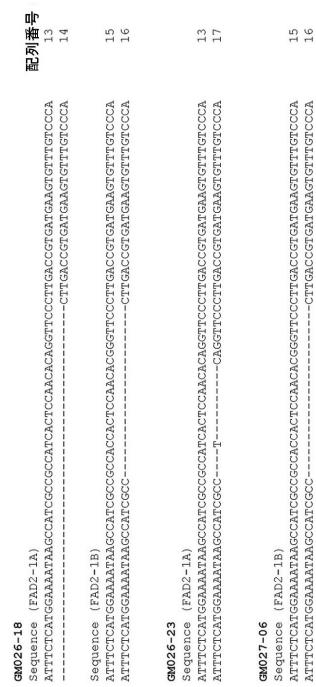
【図4】

Figure 4



【図5】

Figure 5



【図2】

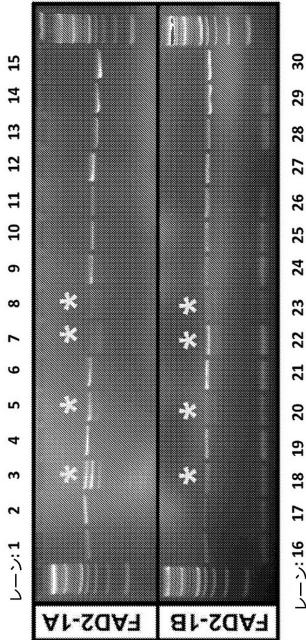
【図3】

Figure 3



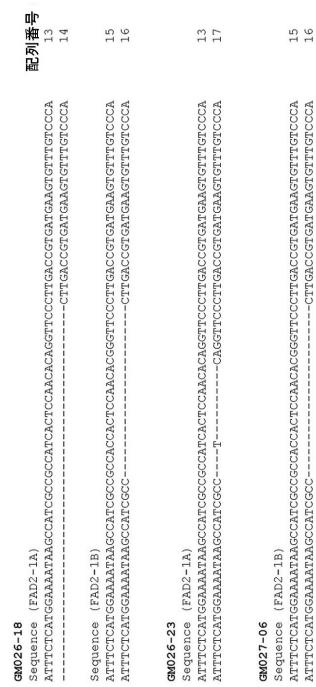
【図4】

Figure 4



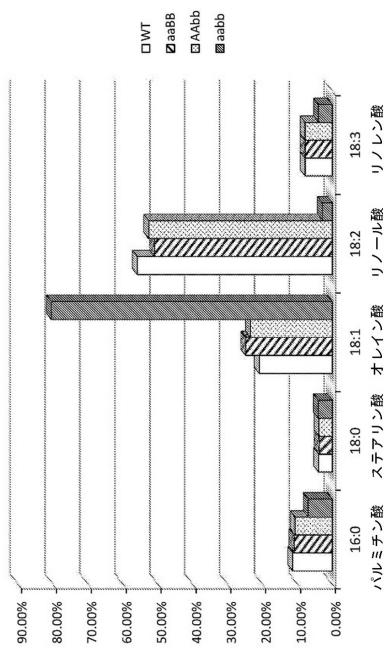
【図5】

Figure 5



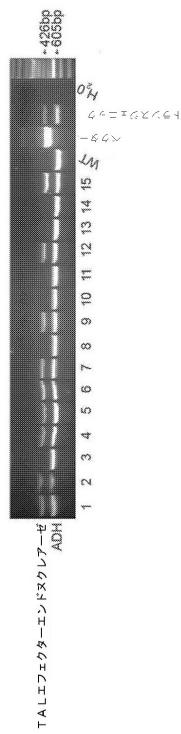
【図6】

Figure 6



【図7】

Figure 7



【配列表】

0006591898000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 マチス ルク

フランス国 エフ-94270 ル クレムラン ピセートル リュ ガンベッタ 30

(72)発明者 ポイタス ダニエル エフ.

アメリカ合衆国 55108 ミネソタ州 ファルコン ハイツ, フォルウェル アベニュー
2197

(72)発明者 チヤン フェン

アメリカ合衆国 55311 ミネソタ州 メープル グローブ, シックスティーセカンド コー
ト 17780

(72)発明者 ハーン ウィリアム

アメリカ合衆国 55117 ミネソタ州 セント ポール カンバーランド ストリート 14
78

審査官 鈴木 崇之

(56)参考文献 国際公開第2010/150901 (WO, A1)

特表2013-507960 (JP, A)

国際公開第2014/039702 (WO, A2)

特表2002-528050 (JP, A)

国際公開第2011/072246 (WO, A2)

特表2006-516403 (JP, A)

米国特許出願公開第2011/0010791 (US, A1)

特開2002-191371 (JP, A)

Breeding Science, 2010年, Vol. 60, pp. 419-425

THEORETICAL AND APPLIED GENETICS, 2011年 6月17日, Vol. 123, No. 5, pp. 793-802

BMC PLANT BIOLOGY, 2010年 9月 9日, Vol. 10, No. 1, pp. 195/1 - 195/13

Nucleic Acids Research, 2011年 4月14日, Vol. 39, No. 12, e82 (pp. 1-11)

GM Crops, 2011年, Vol. 2, Issue 2, pp. 99-103

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A01H 1/00-1/08

A01H 5/00-5/12

A01H 6/54

C12N 5/10

C12N 15/09

C12N 15/82

C12P 7/64

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S (S T N)

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q

P u b M e d