

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】平成30年6月14日 (2018.6.14)

【公表番号】特表2017-519519(P2017-519519A)

【公表日】平成29年7月20日 (2017.7.20)

【年通号数】公開・登録公報2017-027

【出願番号】特願2017-510762(P2017-510762)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 15/01 (2006.01)

A 0 1 H 5/00 (2018.01)

A 0 1 H 5/10 (2018.01)

A 0 1 H 5/12 (2018.01)

A 0 1 H 5/02 (2018.01)

A 0 1 H 5/04 (2018.01)

C 1 2 N 5/04 (2006.01)

A 0 1 H 1/00 (2006.01)

C 1 2 N 9/00 (2006.01)

A 2 4 B 15/10 (2006.01)

【 F I 】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 5/10

C 1 2 N 15/00 X

A 0 1 H 5/00 A

A 0 1 H 5/00 Z

A 0 1 H 5/10

A 0 1 H 5/12

A 0 1 H 5/02

A 0 1 H 5/04

C 1 2 N 5/04

A 0 1 H 1/00 A

C 1 2 N 9/00

A 2 4 B 15/10

【手続補正書】

【提出日】平成30年5月2日 (2018.5.2)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

突然変異の、非天然の、または遺伝子組み換えのたばこ植物細胞であって、

( i ) 機能的ニコチン N - デメチラーゼをコードし、かつ配列番号 2 との少なくとも 95 % の配列同一性を有する配列を含む、それから構成される、またはそれから実質的に構成されるポリヌクレオチド、

( i i ) ( i ) に記載した前記ポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、

( i i i ) ニコチン N - デメチラーゼをコードし、かつ配列番号 3 との少なくとも 96 % の配列同一性を有する配列を含む、それから構成される、またはそれから実質的に構成されるポリペプチド、または

( i v ) ( i ) に記載した前記単離ポリヌクレオチドを含む構築物、ベクターまたは発現ベクターを含み、

かつ前記ニコチンデメチラーゼの前記発現または活性が、前記ニコチンデメチラーゼの前記発現または活性が低減されなかった対照のタバコ植物細胞と比較して低減される、タバコ植物細胞。

【請求項 2】

前記タバコ植物細胞が前記ニコチン N - デメチラーゼの前記発現または活性を減少させる 1 つ以上の突然変異を含む、請求項 1 に記載の突然変異の、非天然の、または遺伝子組み換えのタバコ植物細胞。

【請求項 3】

請求項 1 または請求項 2 に記載の突然変異の、非天然の、または遺伝子組み換えのタバコ植物細胞であって、C Y P 8 2 E 4 ニコチンデメチラーゼをコードする遺伝子における 1 つ以上の突然変異を含み、ここで前記突然変異は結果的に前記 C Y P 8 2 E 4 ニコチンデメチラーゼの発現または機能の低減をもたらすが、好ましくは、前記 C Y P 8 2 E 4 ニコチンデメチラーゼが、配列番号 1 2 ~ 1 6 またはそれらのうちの二つ以上の組み合わせから成る群から選択され、好ましくは、前記突然変異が結果的に前記 C Y P 8 2 E 4 ニコチンデメチラーゼの変性をもたらし、かつ配列番号 5 のアミノ酸残基 3 2 9、3 6 4、3 7 6、3 8 2、および 4 5 8 またはそれらのうちの二つ以上の組み合わせから成る群から選択される位置で発生し、好ましくは、前記突然変異が、a) 配列番号 5 の位置 3 2 9 にあるトリプトファン残基のための終止コドン置換、b) 配列番号 5 の位置 3 6 4 にあるリジン残基のためのアスパラギン置換、c) 配列番号 5 の位置 3 7 6 にあるバリン残基のためのメチオニン置換、d) 配列番号 5 の位置 3 8 2 にあるプロリン残基のためのセリン置換、および e) それらのうちの二つ以上の任意の組み合わせから成る群から選択される、タバコ植物細胞。

【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の突然変異の、非天然の、または遺伝子組み換えのタバコ植物細胞であって、C Y P 8 2 E 5 ニコチンデメチラーゼをコードする遺伝子における 1 つ以上の突然変異を含むが、ここで前記突然変異は結果的に前記 C Y P 8 2 E 5 ニコチンデメチラーゼの発現または機能の低減をもたらし、好ましくは、前記 C Y P 8 2 E 5 ニコチンデメチラーゼが配列番号 2 4 または 2 5 またはその組み合わせから選択され、好ましくは、前記突然変異が結果的に前記 C Y P 8 2 E 5 ニコチンデメチラーゼの変性をもたらし、かつ配列番号 1 7 のアミノ酸残基 4 2 2 または 4 4 9 またはその組み合わせで発生し、好ましくは前記突然変異は、a) 配列番号 1 7 の位置 4 2 2 にあるトリプトファン残基のための終止コドン置換、b) 配列番号 1 7 の位置 4 4 9 にあるプロリン残基のためのロイシン置換、および c) その組み合わせから成る群から選択される、タバコ植物細胞。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の突然変異の、非天然の、または遺伝子組み換えのタバコ植物細胞であって、C Y P 8 2 E 1 0 ニコチンデメチラーゼをコードする遺伝子における 1 つ以上の突然変異を含むが、ここで前記突然変異は結果的に前記 C Y P 8 2 E 1 0 ニコチンデメチラーゼの発現または機能の低減をもたらし、好ましくは前記 C Y P 8 2 E 1 0 ニコチンデメチラーゼが、配列番号 3 2 ~ 3 5 またはそれらのうちの二つ以上の組み合わせから成る群から選択され、好ましくは、前記突然変異が結果的に前記 C Y P 8 2 E 1 0 ニコチンデメチラーゼの変性をもたらし、かつ配列番号 2 6 のアミノ酸残基 7 9、1 0 7、3 8 2、4 1 9 またはそれらのうちの二つ以上の組み合わせから成る群から選択される位置で発生し、好ましくは、前記突然変異は、a) 配列番号 2 6 の位置 7 9 にあるグリシン残基のためのセリン置換、b) 配列番号 2 6 の位置 1 0 7 にあるプロリン残基の

ためのセリン置換、c) 配列番号 26 の位置 382 にあるプロリン残基のためのセリン置換、d) 配列番号 26 の位置 419 にあるプロリン残基のためのセリン置換、および e) その任意の組み合わせから成る群から選択される、たばこ植物細胞。

【請求項 6】

請求項 1 または請求項 2 に記載の突然変異の、非天然の、または遺伝子組み換えのたばこ植物細胞であって、

(i) CYP82E4 ニコチンデメチラーゼをコードする遺伝子における 1 つ以上の突然変異(ここで、前記突然変異は結果的に前記 CYP82E4 ニコチンデメチラーゼの発現または機能の低減をもたらすが、好ましくは、前記 CYP82E4 ニコチンデメチラーゼが、配列番号 12 ~ 16 またはそれらのうちの二つ以上の組み合わせから成る群から選択され、好ましくは、前記突然変異が結果的に前記 CYP82E4 ニコチンデメチラーゼの変性をもたらす、かつ配列番号 5 のアミノ酸残基 329、364、376、382、および 458 またはそれらのうちの二つ以上の組み合わせから成る群から選択される位置で発生し、好ましくは、前記突然変異が、a) 配列番号 5 の位置 329 にあるトリプトファン残基のための終止コドン置換、b) 配列番号 5 の位置 364 にあるリジン残基のためのアスパラギン置換、c) 配列番号 5 の位置 376 にあるバリン残基のためのメチオニン置換、d) 配列番号 5 の位置 382 にあるプロリン残基のためのセリン置換、d) 配列番号 5 の位置 458 にあるプロリン残基のためのセリン置換、および e) それらのうちの二つ以上の任意の組み合わせから成る群から選択される)；及び

(ii) CYP82E5 ニコチンデメチラーゼをコードする遺伝子における 1 つ以上の突然変異(ここで、前記突然変異は結果的に前記 CYP82E5 ニコチンデメチラーゼの発現または機能の低減をもたらす、好ましくは、前記 CYP82E5 ニコチンデメチラーゼが配列番号 24 または 25 またはその組み合わせから選択され、好ましくは、前記突然変異が結果的に前記 CYP82E5 ニコチンデメチラーゼの変性をもたらす、かつ配列番号 17 のアミノ酸残基 422 または 449 またはその組み合わせで発生し、好ましくは前記突然変異は、a) 配列番号 17 の位置 422 にあるトリプトファン残基のための終止コドン置換、b) 配列番号 17 の位置 449 にあるプロリン残基のためのロイシン置換、および c) その組み合わせから成る群から選択される)；及び

(iii) CYP82E10 ニコチンデメチラーゼをコードする遺伝子における 1 つ以上の突然変異(ここで、前記突然変異は結果的に前記 CYP82E10 ニコチンデメチラーゼの発現または機能の低減をもたらす、好ましくは前記 CYP82E10 ニコチンデメチラーゼが、配列番号 32 ~ 35 またはそれらのうちの二つ以上の組み合わせから成る群から選択され、好ましくは、前記突然変異が結果的に前記 CYP82E10 ニコチンデメチラーゼの変性をもたらす、かつ配列番号 26 のアミノ酸残基 79、107、382、419 またはそれらのうちの二つ以上の組み合わせから成る群から選択される位置で発生し、好ましくは、前記突然変異は、a) 配列番号 26 の位置 79 にあるグリシン残基のためのセリン置換、b) 配列番号 26 の位置 107 にあるプロリン残基のためのセリン置換、c) 配列番号 26 の位置 382 にあるプロリン残基のためのセリン置換、d) 配列番号 26 の位置 419 にあるプロリン残基のためのセリン置換、および e) その任意の組み合わせから成る群から選択される)

をさらに含む、たばこ植物細胞。

【請求項 7】

請求項 1 または請求項 2 に記載の突然変異の、非天然の、または遺伝子組み換えのたばこ植物細胞であって、

(i) CYP82E4 ニコチンデメチラーゼをコードする遺伝子における 1 つ以上の突然変異、CYP82E5 ニコチンデメチラーゼをコードする遺伝子における 1 つ以上の突然変異および CYP82E10 ニコチンデメチラーゼをコードする遺伝子における 1 つ以上の突然変異(ここで、前記 CYP82E4 ニコチンデメチラーゼが配列番号 13 (W329Stop) に規定された配列を含み、前記 CYP82E5 ニコチンデメチラーゼが配列番号 24 (W422Stop) に規定された配列を含み、前記 CYP82E10 ニコ

チンデメチラーゼが配列番号 33 (G79S) に規定された配列を含む ) ; または

( i i ) C Y P 8 2 E 4 ニコチンデメチラーゼをコードする遺伝子における 1 つ以上の突然変異、C Y P 8 2 E 5 ニコチンデメチラーゼをコードする遺伝子における 1 つ以上の突然変異および C Y P 8 2 E 1 0 ニコチンデメチラーゼをコードする遺伝子における 1 つ以上の突然変異 ( ここで、前記 C Y P 8 2 E 4 ニコチンデメチラーゼが配列番号 13 ( W 3 2 9 S t o p ) に規定された配列を含み、前記 C Y P 8 2 E 5 ニコチンデメチラーゼが配列番号 24 ( W 4 2 2 S t o p ) に規定された配列を含み、前記 C Y P 8 2 E 1 0 ニコチンデメチラーゼが配列番号 34 ( P 1 0 7 S ) に規定された配列を含む ) ; または

( i i i ) C Y P 8 2 E 4 ニコチンデメチラーゼをコードする遺伝子における 1 つ以上の突然変異、C Y P 8 2 E 5 ニコチンデメチラーゼをコードする遺伝子における 1 つ以上の突然変異および C Y P 8 2 E 1 0 ニコチンデメチラーゼをコードする遺伝子における 1 つ以上の突然変異 ( ここで、前記 C Y P 8 2 E 4 ニコチンデメチラーゼが配列番号 13 ( W 3 2 9 S t o p ) に規定された配列を含み、前記 C Y P 8 2 E 5 ニコチンデメチラーゼが配列番号 24 ( W 4 2 2 S t o p ) に規定された配列を含み、前記 C Y P 8 2 E 1 0 ニコチンデメチラーゼが配列番号 35 ( P 3 8 2 S ) に規定された配列を含む ) ; または

( i v ) C Y P 8 2 E 4 ニコチンデメチラーゼをコードする遺伝子における 1 つ以上の突然変異、C Y P 8 2 E 5 ニコチンデメチラーゼをコードする遺伝子における 1 つ以上の突然変異および C Y P 8 2 E 1 0 ニコチンデメチラーゼをコードする遺伝子における 1 つ以上の突然変異 ( ここで、前記 C Y P 8 2 E 4 ニコチンデメチラーゼが配列番号 13 ( W 3 2 9 S t o p ) に規定された配列を含み、前記 C Y P 8 2 E 5 ニコチンデメチラーゼが配列番号 24 ( W 4 2 2 S t o p ) に規定された配列を含み、前記 C Y P 8 2 E 1 0 ニコチンデメチラーゼが配列番号 32 ( P 4 1 9 S ) に規定された配列を含む ) をさらに含む、たばこ植物細胞。

#### 【請求項 8】

前記突然変異がヘテロ接合性またはホモ接合性の突然変異である、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の、突然変異の、非天然の、または遺伝子組み換えのたばこ植物細胞。

#### 【請求項 9】

前記植物細胞が 1 % 未満のニコチンからノルニコチンへの変換を持つ、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の突然変異の、非天然の、または遺伝子組み換えのたばこ植物細胞。

#### 【請求項 10】

請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の植物細胞を含む、突然変異の、非天然の、または遺伝子組み換えの植物またはその構成要素またはその部分。

#### 【請求項 11】

請求項 10 に記載の植物に由来するバイオマス、種子、幹、花または葉を含む、植物材料。

#### 【請求項 12】

請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の植物細胞、請求項 10 の植物の少なくとも一部、または請求項 11 に記載の植物材料を含む、たばこ製品。

#### 【請求項 13】

ノルニコチンおよび / または N N N のレベルが低減されたたばこ植物を調製するための方法であって、前記方法が、

( a ) ( i ) 機能的ニコチン N - デメチラーゼをコードし、かつ配列番号 2 との少なくとも 95 % の配列同一性を有する配列を含む、それから構成される、またはそれから実質的に構成されるポリヌクレオチドを含む植物を用意する工程と、

( b ) 1 つ以上の突然変異を前記たばこ植物の前記ポリヌクレオチドに挿入して突然変異のたばこ植物を生成する工程と、

( c ) 随意に前記たばこ植物材料を乾燥処理する工程と、

( d ) 前記突然変異のたばこ植物中のノルニコチンおよび / または N N N の前記レベルを測定する工程とを含み、対照たばこ植物と比較した前記突然変異のたばこ植物中のノルニコチンおよび / または N N N の前記レベルの低下が、前記突然変異のたばこ植物にお

ける前記ノルニコチンおよび／またはNNNのレベルが低減されたことを示すものである、方法。

【請求項14】

工程(b)における前記たばこ植物が、突然変異のたばこ植物であり、好ましくは、前記突然変異のたばこ植物が1つ以上のさらなるニコチンN-デメチラーゼ遺伝子における1つ以上の突然変異を含む、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

前記突然変異のたばこ植物が、CYP82E4、CYP82E5またはCYP82E10またはそれらのうちの二つ以上の組み合わせの群から構成される前記遺伝子における1つ以上のさらなる突然変異を持つ、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

たばこ植物における、たばこ植物材料における、又は、前記たばこ植物若しくはたばこ植物材料に由来するたばこの煙における低いレベルのノルニコチンおよび／またはNNNと関連する、たばこ植物の1つ以上の突然変異を同定するための方法であって、前記方法が、

(a) 対照たばこ植物と比較して低いレベルのノルニコチンおよび／またはNNNを有するたばこ植物を同定する工程と、

(b) 工程(a)で同定された前記たばこ植物に由来する核酸試料を用意する工程と、

(c) 前記対照植物中には存在しない配列番号1の配列における1つ以上の突然変異の存在について、工程(b)での前記核酸試料をスクリーニングする工程と、

(d) 工程(c)で同定された前記1つ以上の突然変異を、たばこ植物中のノルニコチンおよび／またはNNNの前記レベルを低減させる既知の突然変異と随意に比較する工程と、

(e) 低いレベルのノルニコチンおよび／またはNNNと関連した1つ以上の突然変異を同定する工程とを含む、方法。

【請求項17】

対照植物材料と比較して低いレベルのノルニコチンを持つか、または対照植物材料と比較して低いレベルの少なくともNNNを持つか、またはその組み合わせを持つ乾燥処理済み植物材料、好ましくは、乾燥処理済みの葉、または花を製作する方法であって、

(a) 請求項10に記載の植物または請求項11に記載の前記植物材料を用意する工程と、

(b) 随意に、前記植物材料をそこから収穫する工程と、

(c) 少なくともノルニコチンまたはNNNの前記レベルが対照の乾燥処理済み植物材料よりも低くなるような期間だけ前記植物材料を乾燥処理する工程とを含む、方法。