

(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  
2022年6月16日(16.06.2022)



(10) 国際公開番号

WO 2022/124361 A1

(51) 国際特許分類:  
A01H 6/82 (2018.01) A24B 15/10 (2006.01)  
A01H 5/00 (2018.01) C12N 15/29 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2021/045295

(22) 国際出願日: 2021年12月9日(09.12.2021)

(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 2020-203916 2020年12月9日(09.12.2020) JP

(71) 出願人: 日本たばこ産業株式会社 (JAPAN TOBACCO INC.) [JP/JP]; 〒1056927 東京都港区虎ノ門四丁目1番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 鈴木 庄一 (SUZUKI, Shoichi); 〒1308603 東京都墨田区横川一丁目17番7号 日本たばこ産業株式会社内 Tokyo (JP). 岡田 龍 (OKADA, Ryo); 〒1308603 東京都墨田区横川一丁目17番7号 日本たばこ産業株式会社内 Tokyo (JP). 野口 総一郎 (NOGUCHI, Soichiro); 〒1308603 東京都墨田区横川一丁目17番7号 日本たばこ産業株式会社内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 山本 修, 外 (YAMAMOTO, Osamu et al.); 〒1000004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所 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, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, 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, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 一 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))

(54) Title: TOBACCO PLANT AND TOBACCO PRODUCT

(54) 発明の名称: タバコ植物及びたばこ製品

(57) Abstract: The present invention relates to a tobacco plant. This tobacco plant contains a nitrate reductase in which the amino acid residue that corresponds to position 525 in the amino acid sequence corresponding to sequence number 2 or 4 is mutated from proline to an amino acid residue other than proline. This tobacco plant has one or more of properties (a)-(c) below: (a) the activity of the nitrate reductase in dark conditions is at least 80% of the activity of the nitrate reductase in bright conditions; (b) individual growth is substantially equivalent to controls; (c) nitrates are reduced relative to controls. Said controls include nitrate reductase comprising the amino acid sequence of sequence number 2 or 4.

(57) 要約: 本発明は、タバコ植物等に関する。本発明のタバコ植物は、配列番号2又は4に相当するアミノ酸配列中の525位に相当するアミノ酸残基がプロリンからプロリン以外のアミノ酸残基に変異している硝酸還元酵素を含む。一態様において、タバコ植物は、以下の(a)-(c)のうち、1以上の性質を有する、(a) 暗条件での硝酸還元酵素の活性が、明条件での硝酸還元酵素の活性の80%以上である; (b) 対照と個体の生長が本質的に同等である; 及び/又は、(c) 対照と比較して、硝酸が低減している、ここにおいて、対照は、配列番号2又は4のアミノ酸配列からなる硝酸還元酵素を含む、タバコ植物である。

WO 2022/124361 A1

## 明 細 書

発明の名称： タバコ植物及びたばこ製品

### 技術分野

[0001] 本発明は、タバコ植物及びその作成方法、並びに、たばこ製品等に関する。

### 背景技術

[0002] タバコ特異的ニトロソアミン (TSNA) は、主にたばこ葉の乾燥時に生成されるタバコアルカロイドのニトロソ化産物である。タバコ植物は葉に高レベルの遊離硝酸塩を蓄積するが、これはTSNAの生成に関係している。たばこ葉の乾燥時におけるTSNA生成に直接的に関与する物質は亜硝酸塩であるとされている。タバコ植物の葉に蓄積された遊離硝酸塩は、タバコが有する硝酸還元酵素 (NR) によって亜硝酸塩に変換されるが、亜硝酸塩は細胞毒性を有しており速やかに代謝されるため、一般に植物組織に含まれる内因性の亜硝酸塩の量は非常に少ない。たばこ葉の乾燥時におけるTSNA生成に関与する亜硝酸塩の大部分は、葉面に生息する微生物により硝酸塩から産生されると考えられている。すなわち、たばこ葉の乾燥工程において、葉の組織が分解されるにつれて、葉に蓄積された硝酸塩が溶出し、葉面に生息する微生物がもつ硝酸還元酵素 (NR) によって亜硝酸塩に変換される。

[0003] 硝酸還元酵素は、植物内の硝酸態窒素を有機形態に還元する最初のステップを触媒する酵素であり、転写、翻訳、翻訳後のレベルで調節されている。暗所環境はリン酸化とそれに続く14-3-3タンパク質の結合によって硝酸還元酵素を不活性化する (Lillo et al., 2004)。

[0004] The Plant Cell, 8 (1996), 505-517 (非特許文献1) は、合成ペプチドを用いて、ホウレンソウの硝酸還元酵素のSer543が翻訳後調節に係るリン酸化部位であることを開示しており、その周辺のアミノ酸残基の置換が、NRキナーゼとの親和性に及ぼす影響を調査している。その中で、Ser543からマイナス3位のアルギニン残基 (R

540) またはマイナス5位のロイシン (L538) のアラニンへの変更はNRキナーゼとの親和性を著しく損なうことが示されている。一方、マイナス4位のリジン (K539)、プラス2位のプロリン (P545) およびプラス4位のメチオニン (M547) のアラニンへの変更はNRキナーゼとの親和性に大きな影響を及ぼさないことが示されている。また、非特許文献1の図8は、硝酸還元酵素において、植物種を問わず高度に保存されている制御性リン酸化部位が示されており、タバコNIA2では523位のセリンがこれに相当する。

[0005] Plant physiology, 140 (2006), 1085-1094 (非特許文献2) は、タバコ植物 *Nicotiana glauca* E23 変異体に、NIA2の521位のセリンをアスパラギン酸に変換した硝酸還元酵素 (S521D-NR) 遺伝子を導入して、CaMV 35Sプロモーター下で過剰発現させた結果、S521D-NR遺伝子が導入された植物 (S521D系統) は、昼夜を問わず高い硝酸還元酵素活性が恒常的に維持され、個体の硝酸含量が昼夜を問わずほぼ一定で低い水準で推移したことを記載している。Plant J., 35 (2003), 566-573 (非特許文献3) は、非特許文献2と著者が一部共通し、タバコのS521D-NR構築物の作出とS521D-NR導入タバコを記載している。

[0006] なお、非特許文献1の記載を勘案すれば、非特許文献2及び3の「S521D」は「S523D」の誤記であることが明らかである。

[0007] WO2016/046288 (特許文献1) (特表2017-529850に相当) は、タバコ植物から生成される低減されたタバコ特異的ニトロソアミン (TSNA) を持つタバコ製品について記載している。前記タバコ植物は、

(i) 緩和した硝酸レダクターゼ酵素をコードする配列を含む、緩和した硝酸レダクターゼ酵素をコードする配列から成るもしくは緩和した硝酸レダクターゼ酵素をコードする配列から本質的に成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 ) 緩和した硝酸レダクターゼ酵素を含む、緩和した硝酸レダクターゼ酵素から成るもしくは緩和した硝酸レダクターゼ酵素から本質的に成るポリペプチド、又は

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

前記硝酸レダクターゼの発現又は活性が対照非修飾タバコ植物と比較して緩和され、かつ、緩和した硝酸レダクターゼ酵素が、

( a ) 配列番号 4 の位置 5 2 3 に相当する位置にアミノ酸置換を含む硝酸レダクターゼポリペプチド、又は

( b ) 配列番号 4 の位置 5 2 3 に相当する位置にアミノ酸置換を含む硝酸レダクターゼポリペプチドであって、配列番号 4 の位置 5 2 3 のアミノ酸がアスパラギン酸に置換されているように修飾されている、と特定されている。

[0008] 特許文献 1 の実施例には、タバコの硝酸還元酵素遺伝子 ( N i a 2 ) の S 5 2 3 D 変異体について、S 5 2 3 D 変異体の葉中硝酸量が低下したデータ及び乾葉及び煙中の T S N A が低下したデータが開示されている。当該文献の実施例の S 5 2 3 D 変異体は、3 5 S プロモーターで S 5 2 3 D 変異型 N i a 2 を恒常発現させたものである。

[0009] WO 2 0 2 0 / 1 4 1 0 6 2 ( 特許文献 2 ) は、タバコの硝酸還元酵素タンパク質の 5 2 7 位のメチオニン残基が他のアミノ酸残基に置換された変異体について記載している。特許文献 2 の実施例は、タバコの硝酸還元酵素遺伝子 ( N i a 2 ) の M 5 2 7 I 変異体 ( ホモ接合型のみ ) について、葉中硝酸量が低下したことを記載している。

## 先行技術文献

## 特許文献

[0010] 特許文献 1 : WO 2 0 1 6 / 0 4 6 2 8 8

特許文献2：WO2020/141062

### 非特許文献

[0011] 非特許文献1：The Plant Cell, 8 (1996), 505-517

非特許文献2：Plant physiology, 140 (2006), 1085-1094

非特許文献3：Plant J., 35 (2003), 566-573

非特許文献4：Planta 219 (2004), 59-65

非特許文献5：平成23年日本植物病理学会大会 P258、(226)タバコ変異体パネルの作出

### 発明の概要

#### 発明が解決しようとする課題

[0012] 非特許文献2、3及び特許文献1のS523D組換え体は、アミノ酸置換変異を有するNia2遺伝子を35Sプロモーターで恒常発現させたものである。本出願人が確認したところ、この遺伝子組換え体は、甚だしい生育不良を伴うことが明らかになった。また、特許文献2では、M527がIに変異することによりリン酸化されやすくなるためNR活性は低下していると考えられること、が記載されている。なお、それにも関わらず含有硝酸量が低下する理由は述べられていない。また、変異をヘテロに有するヘテロ接合体については開示されていない。また、Nia1遺伝子については、いずれの先行技術文献でも突然変異体 (mutant)、遺伝子改変体 (gene-modified variant)、遺伝子組換え体 (gene recombinant) は得られていない。

[0013] タバコ植物の硝酸還元酵素タンパク質のプロリン525 (P525) は、リン酸化部位のセリン523 (S523) からプラス2位に位置する。このプロリンは植物において広く保存されていることが知られているが (非特許文献1の図8)、このプロリンのアラニンへの変更はNRキナーゼによる認識に大きく影響しないことが示されていた (非特許文献1の表3)。

[0014] しかしながら、本発明者らは、タバコ植物において、2種の硝酸還元酵素 N I A 1、N I A 2 が変異した突然変異体を多数作出し、そのうち、当該硝酸還元酵素タンパク質のアミノ酸配列の525位に相当するアミノ酸残基がプロリンからプロリン以外のアミノ酸残基に変異している硝酸還元酵素を含むタバコ植物は、(a) 暗条件でも、硝酸還元酵素の活性が低下しにくい、(b) 対照と個体の生長が本質的に同等である、及び、(c) 対照と比較して、硝酸が低減している、という優れた性質を有することを見出し、本発明を想到した。

### 課題を解決するための手段

[0015] 限定されるわけではないが、本発明は以下の態様を含む。

#### [態様1]

配列番号2又は4に相当するアミノ酸配列中の525位に相当するアミノ酸残基がプロリンからプロリン以外のアミノ酸残基に変異している硝酸還元酵素を含む、タバコ植物。

#### [態様2]

以下の(a) - (c)のうち、1以上の性質を有する、

(a) 暗条件での硝酸還元酵素の活性が、明条件での硝酸還元酵素の活性の80%以上である；

(b) 対照と個体の生長が本質的に同等である；及び／又は

(c) 対照と比較して、硝酸が低減している、

ここにおいて、対照は、配列番号2又は4のアミノ酸配列からなる硝酸還元酵素を含む、タバコ植物である、態様1に記載のタバコ植物。

#### [態様3]

配列番号2又は4に相当するアミノ酸配列中の525位に相当するアミノ酸残基がプロリンからロイシン又はセリンに変異している硝酸還元酵素を含む、態様1又は2に記載のタバコ植物。

#### [態様4]

前記変異している硝酸還元酵素のアミノ酸配列において、配列番号2又は4に相当するアミノ酸配列中の523位に相当するアミノ酸残基がセリンである、態様1-3のいずれか1項に記載のタバコ植物。

[態様5]

前記変異している硝酸還元酵素が、配列番号2又は4のアミノ酸配列と80%以上同一のアミノ酸配列を有する、態様1-4のいずれか1項に記載のタバコ植物。

[態様6]

前記変異している硝酸還元酵素が、配列番号5-8のいずれか1つに相当するアミノ酸配列を有する、態様1-5のいずれか1項に記載のタバコ植物。

[態様7]

対照と比較して、硝酸が少なくとも10%低減している、態様2-6のいずれか1項に記載のタバコ植物。

[態様8]

突然変異体である、又は、遺伝子改変体である、態様1-7のいずれか1項に記載のタバコ植物。

[態様9]

前記タバコ植物が、ニコチアナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*) である、態様1-8のいずれか1項に記載のタバコ植物。

[態様10]

(i) タバコ植物の硝酸還元酵素の、配列番号2又は4に相当するアミノ酸配列中の525位に相当するアミノ酸残基をプロリンからプロリン以外のアミノ酸残基に改変する、あるいは、

(ii) 突然変異により、硝酸還元酵素の、配列番号2又は4に相当するアミノ酸配列中の525位に相当するアミノ酸残基がプロリンからプロリン以外のアミノ酸残基に変異したタバコ植物を選択する、  
ことを含む、態様1-9のいずれか1項に記載のタバコ植物の作成方法。

## [態様 1 1]

態様 1 - 9 のいずれか 1 項に記載のタバコ植物から収穫された葉たばこ。

## [態様 1 2]

態様 1 1 に記載の葉たばこから生成された、乾燥葉。

## [態様 1 3]

態様 1 2 に記載の乾燥葉から製造された、カットフィルター、粉末、シート、中骨、顆粒、又は抽出物。

## [態様 1 4]

態様 1 2 に記載の乾燥葉、及び／又は、態様 1 3 に記載のカットフィルター、粉末、シート、中骨、顆粒、若しくは抽出物を含む、たばこ製品。

## 発明の効果

[0016] 本発明の改変タバコ植物は、葉中の硝酸塩蓄積量が低減している。本発明の改変タバコ植物を利用することにより、たばこ原料やたばこ製品の T S N A を低減させることができる。本発明の改変タバコ植物は、葉中硝酸量が低下するだけでなく、好ましくは、植物体の生育も良好であった。これはたばこ製品を製造するための葉たばこの材料として利用するためにも、優れた顕著な効果である。

## 図面の簡単な説明

[0017] [図1]図 1 は、S 5 2 3 D 変異を有する N I A 2 ( N I A 2 \_ S 5 2 3 D ) 、野生型の N I A 2 ( N I A 2 \_ W T ) を恒常発現させた葉 (ラミナ) 中の硝酸量を示した図である。S 5 2 3 D - 1 6 と S 5 2 3 - 2 0 は、異なる T 0 個体に由来する T 1 世代の 2 系統である。W T - 4 、 W T - 1 3 、 W T - 2 2 は、異なる T 0 個体に由来する T 1 世代の 3 系統である。S 5 2 3 D - N u l l 、 W T - N u l l は、各々 N I A 2 \_ S 5 2 3 D 、 N I A 2 \_ W T を形質転換した組換え体で、N I A 2 \_ S 5 2 3 D 、 N I A 2 \_ W T を発現していない T 1 世代の系統の葉の結果である。反復数は 3 、エラーバーは標準偏差。

[図2]図 2 は、移植から約 3 週間のちの植物体の写真である。S 5 2 3 D - 1

6 : S 5 2 3 D 変異を有する N I A 2 ( N I A 2 \_ S 5 2 3 D ) を恒常発現させた植物体、 T 1 世代 ; S 5 2 3 D - 2 0 : S 5 2 3 D 変異を有する N I A 2 ( N I A 2 \_ S 5 2 3 D ) を恒常発現させた植物体、 T 1 世代 ; W T - 1 3 : 野生型の N I A 2 ( N I A 2 \_ W T ) の恒常発現させた植物体、 T 1 世代 ; W T - 2 2 : 野生型の N I A 2 ( N I A 2 \_ W T ) の恒常発現させた植物体、 T 1 世代 ; S 5 2 3 D - N u l l 、 W T - N u l l : N I A 2 \_ S 5 2 3 D も N I A 2 \_ W T も発現していない植物体、 T 1 世代

[図3]図3は、S 5 2 3 D - 1 6 組換え体 ( S 5 2 3 D 変異を有する N I A 2 ( N I A 2 \_ S 5 2 3 D ) を恒常発現させた植物体 ) 、 及び N u l l ( N I A 2 \_ S 5 2 3 D を発現していない分離系統、 T 2 世代 ) の初期成育 ( 仮植 1 1 日目 ) の写真図である。

[図4]図4は、N I A 2 \_ S 5 2 3 D 恒常発現組換え体、野生型の S R - 1 、 及び N I A 2 \_ W T 恒常発現組換え体 ( W T - 1 3 ) の、暗所亜硝酸溶出試験の結果である。S 5 2 3 D - 1 6 と S 5 2 3 D - 2 0 は、異なる T 0 個体に由来する T 1 世代の異なる 2 系統である。反復数は 4 、 エラーバーは標準偏差。

[図5]図5は、N I A 2 \_ S 5 2 3 D 恒常発現組換え体、野生型の S R - 1 、 W T - 1 3 及び N I A 2 \_ W T 恒常発現組換え体 ( W T - 1 3 ) の、明条件 ( L ) ( 左 ) 、暗条件 ( D ) ( 右 ) における硝酸還元酵素の活性 ( N R 活性 ) 試験の活性化率を解析した結果である。S 5 2 3 D - 1 6 と S 5 2 3 D - 2 0 は、異なる T 0 個体に由来する T 1 世代の異なる 2 系統である。反復数は 4 、 エラーバーは標準誤差

[図6]図6は、実施例 1 で作成した、N I A 1 もしくは N I A 2 のヒンジ 1 領域にミスセンス置換変異を有する E M S 突然変異体について、M 2 もしくは M 3 世代の各系統を液肥栽培し、たばこ葉 ( ラミナ ) 中の硝酸量を調べた結果である。各世代において野生型タバコのつくば 1 号を対照として、変異がホモ接合型である個体を解析した。反復数は 3 もしくは 4 、 エラーバーは標準偏差。

[図7A]図7は、実施例1で作成した、NIA1もしくはNIA2のヒンジ1領域にミスセンス置換変異を有するEMS突然変異体について、M2もしくはM3世代の各系統を液肥栽培し、たばこ葉（ラミナ）中の硝酸量を調べた結果である。各世代において変異が分離した変異を持たないWT個体を対照として、変異がホモ接合型、或いはヘテロ接合型である個体を解析した。反復数は3もしくは4、エラーバーは標準偏差、\*は対照に対して有意差あり。

[図7B]図7は、実施例1で作成した、NIA1もしくはNIA2のヒンジ1領域にミスセンス置換変異を有するEMS突然変異体について、M2もしくはM3世代の各系統を液肥栽培し、たばこ葉（ラミナ）中の硝酸量を調べた結果である。各世代において変異が分離した変異を持たないWT個体を対照として、変異がホモ接合型、或いはヘテロ接合型である個体を解析した。反復数は3もしくは4、エラーバーは標準偏差、\*は対照に対して有意差あり。

[図8]図8は、実施例1で作成した、NIA2のヒンジ1領域にミスセンス置換変異を有するEMS突然変異体について、M3世代の各系統を液肥栽培し、たばこ葉（ラミナ）中の硝酸量を調べた結果である。M3世代において野生型タバコのつくば1号を対照として、変異がホモ接合型である個体を解析した。反復数は4、エラーバーは標準偏差。

[図9]図9は、NIA1\_P525L、NIA1\_P525S（M2世代）の硝酸還元酵素の活性（NR活性）の明条件（light）（左）、暗条件（dark）（右）における活性化率を解析した試験の結果である。M2世代で変異が分離した変異を持たないWT個体を対照として、変異がホモ接合型、ヘテロ接合型である個体を解析した。反復数は3もしくは2、エラーバーは標準誤差。

[図10]図10は、NIA1\_P525L、NIA1\_P525S（M3世代）の暗所亜硝酸溶出試験の結果である。M3世代で変異が分離した変異を持たないWT個体を対照として、変異がホモ接合型である個体を解析した。反

復数は4、エラーバーは標準偏差、\*\*は対照に対して有意差あり。

[図11]図11は、NIA1\_P525L、NIA1\_P525Sについて、M3世代の各系統を液肥栽培し、たばこ葉（ラミナ）中の硝酸量を調べた結果である。M3世代で変異が分離した変異を持たないWT個体を対照として、変異がホモ接合型、ヘテロ接合型である個体を解析した。反復数は4、エラーバーは標準偏差、\*は対照に対して有意差あり。

[図12]図12は、NIA1\_P525L、NIA1\_P525Sの、M3世代各系統について、移植から16日後の植物体の写真である。M3世代で変異が分離した変異を持たないWT個体を対照として、変異がホモ接合型、ヘテロ接合型である個体を示す。

[図13]図13は、P525L変異、P525S変異のホモ接合型個体もしくはヘテロ接合型個体、対照の変異を有しないWT個体、の乾葉中の硝酸態窒素濃度を調べた結果である。反復数はP525LのWTが6、ヘテロが7、ホモが5、P525SのWTが4、ヘテロが6、ホモが2である。エラーバーは標準誤差（SE）。

[図14]図14は、TN90のS523D-OE、S523D-null、WT-OE、WT-nullのT1世代の系統についての、移植8日後の植物体の写真である。

[図15]図15は、TN90のS523D-OE、S523D-null、WT-OE、WT-nullのT1世代の系統について、地上葉数を調べた結果である。反復数は4、t検定による有意差：\*\* $P < 0.01$ 、エラーバーは標準偏差（SD）。

[図16]図16は、TN90のS523D-OE、S523D-null、WT-OE、WT-nullのT1世代の系統について、茎丈を調べた結果である。反復数は4、t検定による有意差：\*\* $P < 0.01$ 、エラーバーは標準偏差（SD）。

[図17]図17は、TN90のS523D-OE、S523D-null、WT-OE、WT-nullのT1世代の系統について、地上葉乾物重（バイ

オマス)を調べた結果である。反復数は4、t検定による有意差： $**P < 0.01$ 、エラーバーは標準偏差(SD)。

[図18]図18は、つくば1号のS523D-OE、S523D-null、P525L-Homo、P525S-HomoのT1世代の系統について、地上葉数を調べた結果である。反復数は9(S523D-OE、Null)、もしくは6(P525S、P525L)、t検定による有意差： $**P < 0.01$ 、エラーバーは標準偏差(SD)。

[図19]図19は、つくば1号のS523D-OE、S523D-null、P525L-Homo、P525S-HomoのT1世代の系統について、茎丈を調べた結果である。反復数は9(S523D-OE、Null)、もしくは6(P525S、P525L)、t検定による有意差： $**P < 0.01$ 、エラーバーは標準偏差(SD)。

[図20]図20は、つくば1号のS523D-OE、S523D-null、P525L-Homo、P525S-HomoのT1世代の系統について、地上葉乾物重(バイオマス)を調べた結果である。反復数は9(S523D-OE、Null)、もしくは6(P525S、P525L)、t検定による有意差： $**P < 0.01$ 、エラーバーは標準偏差(SD)。

[図21]図21は、つくば1号のS523D-OE、S523D-nullのT1世代の系統について、播種92日後の開花期を示す写真である。いずれも同時に播種した。左が、S523D-OEで開花13日前の状態、右がS523D-nullで、開花6日後の状態である。

[図22A]図22Aは、圃場で栽培したP525L変異体、P525S変異体(BC2F3世代)の乾葉中ニコチン量の相対値(%)を示す。それぞれ、WTの乾葉中ニコチン濃度の平均値を100%とした時の相対値である。反復数は20(P525LのHomoのみ19)、t検定による有意差： $**P < 0.01$ 、エラーバーは標準偏差。

[図22B]図22Bは、圃場で栽培したP525L変異体、P525S変異体(BC2F3世代)の乾葉中TSNAsの相対値(%)を示す。それぞれ、W

Tの乾葉中TSNAs濃度の平均値を100%とした時の相対値である。反復数は20（P525LのHomoのみ19）、t検定による有意差：\*\*  
P<0.01、エラーバーは標準偏差。TSNAsは4種のTSNA（NNN, NAT, NAB, NNK）の合計値である。

### 発明を実施するための形態

[0018] 非限定的に本発明は、以下の態様を含む。本明細書において他に断りがない限り、本明細書で使用される技術及び科学用語は、当業者が通常理解している意味と同じ意味を有する。本明細書に開示された物質、材料及び例は単なる例示であり、制限することを意図していない。本明細書において「一態様において」と言及する場合は、その態様に限定されない、即ち、非限定的であることを意味する。

#### [0019] 1. タバコ植物

一態様において、本発明は、タバコ植物に関する。本発明のタバコ植物は、配列番号2又は4に相当するアミノ酸配列中の525位に相当するアミノ酸残基がプロリンからプロリン以外のアミノ酸残基に変異している硝酸還元酵素（以下、「変異している硝酸還元酵素」と呼称する場合がある）を含む。

[0020] 「タバコ植物」とは、ナス科タバコ属（*Nicotina*）の植物であり、例えば、ニコチアナ・アカウリス（*Nicotiana acaulis*）、ニコチアナ・アカミナタ（*Nicotiana acuminata*）、ニコチアナ・アカミナタ・ヴァリエーション・ムルツユロラ（*Nicotiana acuminata* var. *multzjlora*）、ニコチアナ・アフリカナ（*Nicotiana africana*）、ニコチアナ・アラタ（*Nicotiana alata*）、ニコチアナ・アンプレクシカウリス（*Nicotiana amplexicaulis*）、ニコチアナ・アレンツィイ（*Nicotiana arentsii*）、ニコチアナ・アテヌアタ（*Nicotiana attenuata*）、ニコチアナ・ベナビデシイ（*Nicotiana benavidesii*）、ニコチ

アナ・ベンサミアナ (*Nicotiana benthamiana*)、ニコチアナ・ビゲロビイ (*Nicotiana bigelovii*)、ニコチアナ・ボナリエンシス (*Nicotiana bonariensis*)、ニコチアナ・カビコラ (*Nicotiana cavicola*)、ニコチアナ・クレベランディイ (*Nicotiana clelandii*)、ニコチアナ・コルディフォリア (*Nicotiana cordifolia*)、ニコチアナ・コリンボサ (*Nicotiana corymbosa*)、ニコチアナ・デブネイ (*Nicotiana debneyi*)、ニコチアナ・エクセルシオール (*Nicotiana excelsior*)、ニコチアナ・フォゲッチアナ (*Nicotiana forgetiana*)、ニコチアナ・フラグランス (*Nicotiana fragrans*)、ニコチアナ・グラウカ (*Nicotiana glauca*)、ニコチアナ・グルチノサ (*Nicotiana glutinosa*)、ニコチアナ・グッドスピーディイ (*Nicotiana goodspeedii*)、ニコチアナ・ゴセイ (*Nicotiana gossei*)、ニコチアナ・イングルバ (*Nicotiana ingulba*)、ニコチアナ・カワカミイ (*Nicotiana kawakamii*)、ニコチアナ・ナイトチアナ (*Nicotiana knightiana*)、ニコチアナ・ラングドルフィ (*Nicotiana langsdorfi*)、ニコチアナ・リニアリス (*Nicotiana linearis*)、ニコチアナ・ロングフロラ (*Nicotiana longiflora*)、ニコチアナ・マリチマ (*Nicotiana maritima*)、ニコチアナ・メガロシフォン (*Nicotiana megalosiphon*)、ニコチアナ・ミエルシイ (*Nicotiana miersii*)、ニコチアナ・ノクチフロラ (*Nicotiana noctiflora*)、ニコチアナ・ヌディカウリス (*Nicotiana nudicaulis*)、ニコチアナ・オブツシフォリア (*Nicotiana obtusifolia*)、ニコチアナ・オクシデンタリス (*Nicotiana occidentalis*)

is)、ニコチアナ・オクシデンタリス・サブスピーシーズ・ヘスペリス (*Nicotiana occidentalis subsp. Hesperis*)、ニコチアナ・オトフォラ (*Nicotiana otophora*)、ニコチアナ・パニクラタ (*Nicotiana paniculata*)、ニコチアナ・パウクツユロラ (*Nicotiana pauczjloria*)、ニコチアナ・ペチュニオイデス (*Nicotiana petunioides*)、ニコチアナ・プランバギニフォリア (*Nicotiana plumbaginifolia*)、ニコチアナ・クアドリヴァルヴィス (*Nicotiana quadrivalvis*)、ニコチアナ・レイモンディイ (*Nicotiana raimondii*)、ニコチアナ・レパンダ (*Nicotiana repanda*)、ニコチアナ・ロズラタ (*Nicotiana rosulata*)、ニコチアナ・ロズラタ・サブスピーシーズ・イングルバ (*Nicotiana rosulata subsp. Ingulba*)、ニコチアナ・ロツンディフォリア (*Nicotiana rotundifolia*)、ニコチアナ・ルスチカ (*Nicotiana rustica*) (マルバタバコ)、ニコチアナ・セツェルリイ (*Nicotiana setchellii*)、ニコチアナ・シムランス (*Nicotiana simulans*)、ニコチアナ・ソラニフォリア (*Nicotiana solanifolia*)、ニコチアナ・スペガウイニイ (*Nicotiana spegauinii*)、ニコチアナ・ストックトニイ (*Nicotiana stocktonii*)、ニコチアナ・スアヴェオレンス (*Nicotiana suaveolens*)、ニコチアナ・シルベストリス (*Nicotiana sylvestris*)、ニコチアナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*)、ニコチアナ・チルシフロラ (*Nicotiana thyrsoiflora*)、ニコチアナ・トメントサ (*Nicotiana tomentosa*)、ニコチアナ・トメントシフォミス (*Nicotiana tomentosiformis*)、ニコチアナ・トリゴノフィラ (*Nicotiana tri*

gonophylla)、ニコチアナ・アンブラティカ (*Nicotiana umbratica*)、ニコチアナ・アンドウラタ (*Nicotiana undulata*)、ニコチアナ・ベルチナ (*Nicotiana velutina*)、ニコチアナ・ウィガンディオイデス (*Nicotiana wigandioides*)、およびタバコ属植物のハイブリッドなどが挙げられる。限定されるものではないが、ニコチアナ・ベンサミアナ、ニコチアナ・ルスチカおよびニコチアナ・タバカムがより好ましく、葉たばこ生産の原料として用いられるニコチアナ・ルスチカおよびニコチアナ・タバカムが特に好ましい。

[0021] タバコ植物は、タバコ植物の成体、全体のみならず、その部分も含むうる。非限定的に、前記部分は、葉（葉身と葉柄を含む）、莖、根、種子、花、花粉、葯、胚珠、小花柄、分裂組織、子葉、胚軸、内鞘、胚、胚乳、外植片、カルス、組織培養物、芽、細胞、及びプロトプラストからなる群から選択される。

[0022] 「硝酸還元酵素」 (*nitrate reductase*) (「NR」と呼称される場合もある) は、窒素代謝酵素の一種で硝酸 ( $\text{NO}_3^-$ ) を亜硝酸 ( $\text{NO}_2^-$ ) に還元する酵素を意味する。硝酸還元酵素は植物、酵母、真菌、藻類などに広く分布している。植物では、タバコ、シロイヌナズナ、セイヨウアブラナ、インゲン豆、オオムギ、カボチャ、カバノキ、大豆、トウモロコシ、イネ、ハウレンソウ等において硝酸還元酵素が知られている（非特許文献1の表8）。

[0023] 一態様において、硝酸還元酵素は植物由来、好ましくはタバコ属の植物由来である。一態様において、前記硝酸還元酵素は、ニコチアナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*) の硝酸還元酵素である。ニコチアナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*) は、*Nia1*と*Nia2*と称される2つの高度な相同性を有する窒素代謝酵素遺伝子を有する。本明細書における硝酸還元酵素は、一態様において、*NIA1*タンパク質 (*Nia1* 遺伝子はTゲノム由来) 及びその変異体、あるいは／並びに、*NIA*

2タンパク質（N i a 2 遺伝子はSゲノム由来）及びその変異体を含む。一態様において、本明細書における硝酸還元酵素は、N I A 1タンパク質（N i a 1 遺伝子はTゲノム由来）及びその変異体を含む。

[0024] N i a 1 遺伝子及びN i a 2 遺伝子は各々、配列番号1、3の塩基配列を有する。N I A 1タンパク質、N I A 2タンパク質は各々、配列番号1、3の塩基配列によってコードされる配列番号2及び4のアミノ酸配列を有する。

[0025] 本発明のタバコ植物は、配列番号2又は4に相当するアミノ酸配列中の525位に相当するアミノ酸残基がプロリンからプロリン以外のアミノ酸残基に変異している硝酸還元酵素を含む。本明細書において、「硝酸還元酵素を含む」とは、特に明記しない限り、硝酸還元酵素タンパク質を含む、または、硝酸還元酵素タンパク質をコードする核酸を含む、ことを意味する。配列番号2又は4に相当するアミノ酸配列の518-528のアミノ酸配列は、「L K K S I S T P F M N」である。ニコチアナ・タバカム以外の植物の硝酸還元酵素タンパク質も、配列番号2又は4に相当するアミノ酸配列の518-528のアミノ酸配列「L K K S I S T P F M N」と同様のアミノ酸配列を有する部位を含む。当該部位は多少の変異を含んでもよく、例えば非特許文献1の表8には、配列番号2又は4に相当するアミノ酸配列の518-528において、各植物の硝酸還元酵素タンパク質「L K (K/R) (S/T) (I/V/T/A) S (T/S) P F M N」のアミノ酸配列を有することが記載されている。「配列番号2又は4に相当するアミノ酸配列中の525位に相当するアミノ酸残基」とは、例えば、硝酸還元酵素タンパク質の野生型のS-(T/S)に続くアミノ酸残基であって、そして、F-Mへと続くアミノ酸残基で、野生型の硝酸還元酵素タンパク質ではプロリンである。

[0026] 本発明のタバコ植物は、野生型の硝酸還元酵素のタンパク質における525位のプロリンが、プロリン以外のアミノ酸残基に変異している。硝酸還元酵素遺伝子の変異は、ヘテロ接合型であってもホモ接合型であってもよい。また、硝酸還元酵素タンパク質がN I A 1タンパク質、N I A 2タンパク質

の2種類存在する場合、変異はN1A1タンパク質、N1A2タンパク質のいずれか一方であってもよい。

[0027] 一態様において、タバコ植物は、配列番号2又は4に相当するアミノ酸配列中の525位に相当するアミノ酸残基がプロリンからロイシン又はセリンに変異している硝酸還元酵素を含む。

[0028] 一態様において、変異している硝酸還元酵素のアミノ酸配列において、配列番号2又は4に相当するアミノ酸配列中の523位に相当するアミノ酸残基がセリンである。これは、この位置のアミノ酸残基が野生型の硝酸還元酵素から変異していない（修飾されていないことを含む）、ことを意味する。

[0029] 一態様において、変異している硝酸還元酵素のアミノ酸配列において、配列番号2又は4に相当するアミノ酸配列中の527位に相当するアミノ酸残基がメチオニンである。これは、この位置のアミノ酸残基が野生型の硝酸還元酵素から変異していない（修飾されていないことを含む）、ことを意味する。

[0030] 本発明の変異している硝酸還元酵素のアミノ酸配列は、配列番号2又は4に相当するアミノ酸配列中の525位に相当するアミノ酸残基がプロリンからプロリン以外のアミノ酸残基に変異している硝酸還元酵素であり、そして、好ましくは、硝酸還元酵素のアミノ酸配列において、配列番号2又は4に相当するアミノ酸配列中の523位に相当するアミノ酸残基がセリンである、という条件を満たす限り、配列番号2又は4から多少の多様性（変異）を有する変異体であってもよい。

[0031] 一態様において、前記変異している硝酸還元酵素は、配列番号2又は4のアミノ酸配列と80%以上同一のアミノ酸配列を有する。好ましくは、配列番号2又は4のアミノ酸配列と82%以上同一、85%以上同一、88%以上同一、90%以上同一、92%以上同一、95%以上同一、97%以上同一、98%以上同一、99%以上同一である。いずれの場合も、配列番号2又は4に相当するアミノ酸配列中の525位に相当するアミノ酸残基がプロリンからプロリン以外のアミノ酸残基に変異しているという条件を具備する

。

[0032] 一態様において、前記変異している硝酸還元酵素は、配列番号1又は3に相当する塩基配列と80%以上同一の塩基配列を有する核酸によってコードされる。好ましくは、配列番号1又は3の塩基配列と82%以上同一、85%以上同一、88%以上同一、90%以上同一、92%以上同一、95%以上同一、97%以上同一、98%以上同一、99%以上同一の塩基配列を有する核酸によってコードされる。いずれの場合も、配列番号2又は4に相当するアミノ酸配列中の525位に相当するアミノ酸残基がプロリンからプロリン以外のアミノ酸残基に変異しているという条件を具備する。

[0033] 本明細書において、2つのアミノ酸配列の同一性は、視覚的検査及び数学的計算によって決定することができる。また、コンピュータープログラムを用いて同一性を決定することもできる。そのようなコンピュータープログラムとしては、例えば、BLAST及びClustalW等があげられる。特に、BLASTプログラムによる同一性検索の各種条件（パラメーター）は、Altschulら（Nucl. Acids. Res., 25, p. 3389-3402, 1997）に記載されたもので、NCBIやDNA Data Bank of Japan (DDBJ)のウェブサイトから公的に入手することができる（BLASTマニュアル、Altschulら NCB/NLM/NIH Bethesda, MD 20894; Altschulら）。また、遺伝情報処理ソフトウェアGENETYX Ver. 7（ゼネティックス）、DNASIS Pro（日立ソフト）、Vector NTI (Infomax)等のプログラムを用いて決定することもできる。

。

[0034] 本明細書において、2つの塩基配列の同一性は、視覚的検査及び数学的計算によって決定することができる。また、コンピュータープログラムを用いて同一性を決定することもできる。そのような配列比較コンピュータープログラムとしては、例えば、米国国立医学ライブラリーのウェブサイト：<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Bla>

s t . c g i から利用できるBLASTNプログラム (A l t s c h u l e t a l . ( 1 9 9 0 ) J . M o l . B i o l . 2 1 5 : p . 4 0 3 - 1 0 ) : バージョン2. 2. 7、又はWU-BLAST2. 0アルゴリズム等があげられる。WU-BLAST2. 0についての標準的なデフォルトパラメーターの設定は、以下のインターネットサイト：<http://blast.wustl.edu>に記載されているものを用いることができる。

[0035] 一態様において、前記変異している硝酸還元酵素は、配列番号2又は4のアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列を有していてもよい。ただし、硝酸還元酵素は、配列番号2又は4に相当するアミノ酸配列中の525位に相当するアミノ酸残基がプロリンからプロリン以外のアミノ酸残基に変異しているという条件を具備する。

[0036] 「1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入もしくは付加された」という場合は、対象となるアミノ酸配列において、1個もしくは数個のアミノ酸が欠失しているか、他のアミノ酸に置換されているか、他のアミノ酸が挿入されているか、及び／又は他のアミノ酸が付加されているアミノ酸配列をいう。「数個のアミノ酸」とは、非限定的に、200個以内、100個以内、50個以内、30個以内、20個以内、15個以内、12個以内、10個以内、8個以内、6個以内、4個以内、3個以内、2個以内のアミノ酸を意味する。あるいは、数個のアミノ酸とは、アミノ酸配列の全長に対して30%、好ましくは25%、20%、15%、10%、5%、3%、2%又は1%のアミノ酸を意味する。

[0037] 上記のうち、置換は、好ましくは保存的置換である。保存的置換とは、特定のアミノ酸残基を類似の物理化学的特徴を有する残基で置き換えることであるが、もとの配列の構造に関する特徴を実質的に変化させなければいかなる置換であってもよく、例えば、置換アミノ酸が、もとの配列に存在するらせんを破壊したり、もとの配列を特徴付ける他の種類の二次構造を破壊したりしなければいかなる置換であってもよい。以下に、アミノ酸残基の保存的

置換について置換可能な残基ごとに分類して例示するが、置換可能なアミノ酸残基は以下に記載されているものに限定されるものではない。

[0038] A群：ロイシン、イソロイシン、バリン、アラニン、メチオニン、グリシン、システイン、プロリン

B群：アスパラギン酸、グルタミン酸

C群：アスパラギン、グルタミン

D群：リジン、アルギニン

E群：セリン、スレオニン

F群：フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、ヒスチジン

非保存的置換の場合は、上記種類のうち、ある1つのメンバーと他の種類のメンバーとを交換することができる。例えば、不用意な糖鎖修飾を排除するために上記のB、D、E群のアミノ酸をそれ以外の群のアミノ酸に置換してもよい。あるいは、3次構造でタンパク質中に折りたたまれることを防ぐためにシステインを欠失させるか、他のアミノ酸に置換してもよい。あるいは、親水性／疎水性のバランスが保たれるように、あるいは、合成を容易にするために親水度を上げるように、アミノ酸に関する疎水性／親水性の指標であるアミノ酸のハイドロパシー指数 (J. Kyte 及び R. Doolittle, *J. Mol. Biol.*, Vol.157, p.105-132, 1982) を考慮して、アミノ酸を置換してもよい。

[0039] 別の態様として、元のアミノ酸よりも立体障害の少ないアミノ酸への置換、例えばF群からA、B、C、D、E群への置換；電荷を持つアミノ酸から電荷を持たないアミノ酸への置換、例えばB群からC群への置換、をしてもよい。

[0040] 一態様において、前記変異している硝酸還元酵素は、配列番号5-8のいずれか1つに相当するアミノ酸配列を有する。配列番号5及び6は、各々、配列番号2又は4に相当するアミノ酸配列中の525位に相当するアミノ酸残基がプロリンからロイシンに変異しているアミノ酸配列である。配列番号7及び8は、各々、配列番号2又は4に相当するアミノ酸配列中の525位

に相当するアミノ酸残基がプロリンからセリンに変異しているアミノ酸配列である。

[0041] 一態様において、前記タバコ植物は、突然変異体である、又は、遺伝子改変体であってもよい。

[0042] 本明細書において、「突然変異体」は、天然により又は人為的に生じた無作為の変異によるタバコ植物の改変体である。突然変異体を作成する手法は、以下の「3. タバコ植物の作成方法」に詳述した。また、突然変異体は、限定されるものではないが、突然変異体を一方の親としてタバコ植物と交配した後代から、配列番号2又は4に相当するアミノ酸配列中の525位に相当するアミノ酸残基がプロリンからプロリン以外のアミノ酸残基に変異している硝酸還元酵素タンパク質をコードする核酸を有するものを選択したタバコ植物、あるいはその後代であってもよい。

[0043] 「遺伝子改変体」は、タバコ植物が配列番号2又は4に相当するアミノ酸配列中の525位に相当するアミノ酸残基がプロリンからプロリン以外のアミノ酸残基に変異している硝酸還元酵素タンパク質を発現するように、当該タンパク質をコードする内因性遺伝子を改変したタバコ植物であり、その後代を含む。

[0044] 「突然変異体」及び「遺伝子改変体」は、タバコ植物の成体、全体のみならず、その部分も含みうる。非限定的に、前記部分は、葉（葉身と葉柄を含む）、莖、根、種子、花、花粉、葯、胚珠、小花柄、分裂組織、子葉、胚軸、内鞘、胚、胚乳、外植片、カルス、組織培養物、芽、細胞、及びプロトプラストからなる群から選択される。

[0045] また、一態様において、前記タバコ植物は、配列番号2又は4に相当するアミノ酸配列中の525位に相当するアミノ酸残基がプロリンからプロリン以外のアミノ酸残基に変異している硝酸還元酵素タンパク質を発現するように、当該タンパク質をコードする核酸を人為的操作によって外部から導入した、遺伝子組換え体及びその後代であってもよい。限定されるものではないが、当該タンパク質をコードする核酸が、後代に伝わるように安定的にゲノ

ム内に統合されていることが好ましい。

[0046] 2. タバコ植物の性質

非限定的に、本発明のタバコ植物は、以下の (a) - (c) のうち、1以上の性質を有する、

(a) 暗条件での硝酸還元酵素の活性が、明条件での硝酸還元酵素の活性の80%以上である；

(b) 対照と個体の生長が本質的に同等である；及び／又は

(c) 対照と比較して、硝酸が低減している。

[0047] ここにおいて、対照は、配列番号2又は4のアミノ酸配列からなる硝酸還元酵素を含む、タバコ植物である。配列番号2又は4のアミノ酸配列からなる硝酸還元酵素は、野生型タバコ植物が有する硝酸還元酵素であり、何ら改変されていない。一態様において、対照は、配列番号2又は4のアミノ酸配列からなる硝酸還元酵素を含む、ニコチアナ・タバカム、好ましくは野生型のニコチアナ・タバカムであってよい。野生型のニコチアナ・タバカムは、配列番号2又は4のアミノ酸配列からなる硝酸還元酵素を含み、その発現も活性も何ら改変されていない。

[0048] 一態様において、本発明のタバコ植物は、(a) - (c) のうち、2以上の性質、あるいは3つの性質全てを有する。

[0049] 「硝酸還元酵素の活性」は、非限定的に、例えば、本明細書の比較例2の(5)「NR酵素活性」に記載した手法により測定することができる。例えば、採取したタバコ植物の葉(ラミナ)の組織を凍結乾燥し、粗抽出液を調製する。この粗抽出液にNR活性測定バッファーを加えて反応させ、反応液中に生成された亜硝酸量の測定を行う。

[0050] 「硝酸還元酵素の活性」はその他、亜硝酸を定量する代わりに0.5 mM フェリシアン化カリウムと0.1 mM NADHを用いて340 nmの吸光度を測定する方法、還元型メチルピオロゲンやブロモフェノールブルーを用いて、その酸化を測定する方法等によって測定することができる。

[0051] すなわち、限定されるものではないが、本明細書において「硝酸還元酵素

の活性」は、対象となるタバコ植物の組織について、上述の手法や方法により測定される活性であってよい。

[0052] 暗条件とは、非限定的に、光が届かない条件（例えば、1ルクス以下、好ましくは0.1ルクス以下の照度）に、30分以上60分以上、90分以上、120分以上おくことを意味する。これに対し、明条件は、光が届く条件（例えば、5000ルクス以上、好ましくは、10000ルクス以上）に、30分以上、60分以上、90分以上、120分以上おくことを意味する。

[0053] 「暗条件での硝酸還元酵素の活性が、明条件での硝酸還元酵素の活性の80%以上である」とは、暗条件での硝酸還元酵素の活性が、光の条件以外は同じ条件で同じ方法により測定した、明条件での硝酸還元酵素の活性の80%以上である、ことを意味する。非限定的に、好ましくは、暗条件での硝酸還元酵素の活性が、明条件での硝酸還元酵素の活性の85%以上、88%以上、90%以上、92%以上、95%以上、97%以上、98%以上、99%以上である。一態様において、暗条件での硝酸還元酵素の活性が、明条件での硝酸還元酵素の活性と比較して実質的に低下しない、即ち、実質的に同じである。一態様において、暗条件での硝酸還元酵素の活性が、明条件での硝酸還元酵素の活性と同じである。配列番号2又は4のアミノ酸配列からなる硝酸還元酵素を含む、タバコ植物（対照）は、暗条件では明条件と比較して、硝酸還元酵素の活性が抑制される。これに対し、配列番号2又は4に相当するアミノ酸配列中の525位に相当するアミノ酸残基がプロリンからプロリン以外のアミノ酸残基に変異している硝酸還元酵素を含むタバコ植物は、暗条件でも硝酸還元酵素の活性が明条件と同様に硝酸還元酵素の活性が抑制されない、又は抑制されにくい。一態様において、硝酸還元酵素遺伝子の変異に関し、変異型ホモ接合体のみでなく、変異型ヘテロ接合体でも暗条件での硝酸還元酵素の活性が低下しにくい。

[0054] 一態様において、前記タバコ植物は、配列番号2又は4のアミノ酸配列からなる硝酸還元酵素を含み、タバコ植物である対照と個体の生長が本質的に同等である。

- [0055] 本明細書の比較例2に示したように、野生型のN I A 2\_\_W Tでは恒常発現の有無によらず、生育に大きな差はみられなかった。特許文献1に記載のN I A 2\_\_S 5 2 3 Dが恒常発現する遺伝子組換えタバコは、個体のサイズが小さくなる矮性を示した(図3)。実施例6において、N I A 2\_\_S 5 2 3 Dを恒常発現する系統は、発現させていない系統と比較して、顕著な生育不良が観察され、さらに、開花期も遅かった。
- [0056] これに対し、配列番号2又は4に相当するアミノ酸配列中の5 2 5位に相当するアミノ酸残基がプロリンからプロリン以外のアミノ酸残基に変異している硝酸還元酵素を含む、タバコ植物は、配列番号2又は4のアミノ酸配列からなる硝酸還元酵素を含む、タバコ植物である対照と個体の生長が本質的に同等であった。実施例6において、N I A 1のP 5 2 5 L、P 5 2 5 Sのアミノ酸置換変異がホモ接合型である系統は、生育の異常も観察されなかった。
- [0057] 「個体の生長が本質的に同等である」とは、植物体の高さ、葉の数、葉の大きさなど、個体のサイズ(成長)、マス(m a s s)(例えば、地上葉乾物重(バイオマス))、及び開花の時期等が実質的に同程度であることを意味する。非限定的に、例えば高さを比較した場合に、その差が20%以内、15%以内、10%以内、5%以内であることを意味する。
- [0058] 一態様において、前記タバコ植物は、対照と比較して、含有する硝酸の量が低減している。硝酸は、非限定的に、例えば、本明細書の比較例2の(2)硝酸定量に記載した手法により測定することができる。例えば、タバコ植物より採取した葉を乾燥させ、水で抽出したのち、ろ過したろ液を測定試料としてもよい。
- [0059] 一態様において、前記タバコ植物は、対照と比較して、硝酸が好ましくは、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%低減している。
- [0060] 上記(a) - (c)の1以上の性質は、突然変異体又は遺伝子改変体であ

るM1世代のみでなく、それ以降の継代（M2世代、M3世代、それ以降）においても受け継がれることが好ましい。

[0061] 3. タバコ植物の作成方法

一態様において、本発明は、タバコ植物の作成方法に関する。タバコ植物の作成方法は、

(i) タバコ植物の硝酸還元酵素の、配列番号2又は4に相当するアミノ酸配列中の525位に相当するアミノ酸残基をプロリンからプロリン以外のアミノ酸残基に改変する、あるいは、

(ii) 突然変異により、硝酸還元酵素の、配列番号2又は4に相当するアミノ酸配列中の525位に相当するアミノ酸残基がプロリンからプロリン以外のアミノ酸残基に変異したタバコ植物を選択する、ことを含む。

[0062] 「硝酸還元酵素」、「配列番号2又は4に相当するアミノ酸配列中の525位に相当するアミノ酸残基がプロリンからプロリン以外のアミノ酸残基に変異」等の意義は、「2. タバコ植物の性質」までにおいて説明した通りである。

[0063] タバコ植物における硝酸還元酵素タンパク質における、配列番号2又は4に相当するアミノ酸配列中の525位に相当するアミノ酸残基のプロリンからプロリン以外のアミノ酸残基への改変は、タバコ植物が配列番号2又は4に相当するアミノ酸配列中の525位に相当するアミノ酸残基がプロリンからプロリン以外のアミノ酸残基に変異している硝酸還元酵素タンパク質を発現するように、当該タンパク質をコードする内因性遺伝子を改変することによって行うことができる。

[0064] 内因性遺伝子の改変は例えば、ゲノム編集システムを用いて行ってもよい。ゲノム編集システムは、配列番号2又は4に相当するアミノ酸配列中の525位に変異を有する硝酸還元酵素タンパク質を作るために、特定の位置で内因性硝酸還元酵素遺伝子を結合又は切断できる。内因性硝酸還元酵素遺伝子は、内因性硝酸還元酵素遺伝子を結合及び切断する部位特異的ヌクレアー

ぜを含むゲノム編集システムによって改変されうる。ゲノム編集システムは、ヌクレアーゼ介在型非相同末端結合又は相同組換え修復を利用することもできる。部位特異的ヌクレアーゼを改変することができる。例えば、改変部位特異的ヌクレアーゼは、CRISPR/Cas9系システム、ZFN又はTALENであってもよい。部位特異的ヌクレアーゼは内因性硝酸還元酵素遺伝子を結合及び切断することができる。ゲノム編集システムとして、改変CRISPR/Cas9システム、改変転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ、改変ジンクフィンガーヌクレアーゼ又は改変メガヌクレアーゼなどの改変CRISPR/Casシステムを利用してもよい。

[0065] 前記タバコ植物の作成方法は、突然変異により、硝酸還元酵素タンパク質の、配列番号2又は4に相当するアミノ酸配列中の525位に相当するアミノ酸残基がプロリンからプロリン以外のアミノ酸残基に変異したタバコ植物を選択する、工程を含んでもよい。

[0066] 植物に突然変異を生じさせる手法は、当業界で周知であり、化学的突然変異原又は放射線を含め、主に点突然変異及び短い欠失、挿入、塩基転換、及び／又は転移を作り出す突然変異原を使って、植物が有する硝酸還元酵素遺伝子に突然変異を作り出すことができる。化学的突然変異原は、エチルメタンスルホン酸塩、メチルメタンスルホン酸塩、N-エチル-N-ニトロソウレア、トリエチルメラミン、N-メチル-N-ニトロソウレア、プロカルバジン、クロランブシル、シクロホスファミド、ジエチル硫酸塩、アクリルアミドモノマー、メルファラン、ナイトロジェン・マスタードカラシナ、ビンクリスチン、ジメチルニトロソアミン、N-メチル-N'-ニトロニトロソグアニジン、ニトロソグアニジン、2-アミノプリン、7,12ジメチルベンズ(a)アントラセン、酸化エチレン酸化物、ヘキサメチルホスホルアミド、ビスルファン、ジエポキシアルカン(ジエポキシオクタン、ジエポキシブタン、及びこれに類するもの)、2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(エチル-2-クロロ-エチル)アミノプロピルアミノ]アクリジン二塩酸塩及びホルムアルデヒドを含むが、これに限定されない。また、放射線は

、 $\gamma$ 線、重イオンビーム、X線、中性子線、又はUVを含むが、これに限定されない。

[0067] 突然変異により、硝酸還元酵素タンパク質の、配列番号2又は4に相当するアミノ酸配列中の525位に相当するアミノ酸残基がプロリンからプロリン以外のアミノ酸残基に変異したタバコ植物を選択する工程は、一回以上の交雑工程を含んでもよい。一態様において、植物体からの種子を突然変異誘発した後、播種、栽培して第一世代の植物体を得て、これを自家受粉して得られる第二世代の植物体について、突然変異体のスクリーニングを行ってもよい。第二世代の植物体をスクリーニングすることの利点は、その突然変異が生殖細胞由来の変異となることである。突然変異誘発の対象は、限定されるものではないが、種子、花粉であってよい。花粉を対象に突然変異誘発を行う場合、当該花粉を、突然変異誘発を行っていない植物体に交配して得られた種子から育成される植物体について、突然変異体のスクリーニングを行ってもよい。

[0068] また、前記タバコ植物の作成方法として、配列番号2又は4に相当するアミノ酸配列中の525位に相当するアミノ酸残基がプロリンからプロリン以外のアミノ酸残基に変異している硝酸還元酵素タンパク質をタバコ植物が発現するように、当該タンパク質をコードする核酸を、人為的操作によってタバコ植物に導入することによっても行うことができる。

[0069] 核酸の導入のための方法は特に限定されず、核酸導入のための公知の方法を用いて行うことができる。例えば、ポリエチレングリコール法（PEG法）、エレクトロポレーション法、パーティクルガン法、マイクロインジェクション法、ウィスカー法などの物理化学的方法（DNAの直接導入法）あるいはアグロバクテリウム法などの生物学的方法（DNAの間接導入法）を好ましく用いることができる。

[0070] 配列番号2又は4に相当するアミノ酸配列中の525位に相当するアミノ酸残基の目的の遺伝子改変体、突然変異体、又は遺伝子組換え体の選択は、非限定的に、例えば、タバコ植物よりゲノムDNAを抽出し、PCR等によ

り増幅し、そして、配列番号2又は4に相当するアミノ酸配列中の525位に相当するアミノ酸残基を含む部分をコードするDNAの塩基配列を解析することによって行うことができる。その他に、SSCP (Single strand conformation Polymorphism) 法を用いて配列の違いを電気泳動の距離の違いで検出する方法、T7 Endonuclease Iなどを用いてミスマッチ部位を切断することにより変異の有無を検出する方法、などから選択が可能である。

[0071] 一態様において、本発明は、配列番号2又は4に相当するアミノ酸配列中の525位に相当するアミノ酸残基がプロリンからプロリン以外のアミノ酸残基に変異している硝酸還元酵素を含むタバコ植物、を選抜するために使用するための選抜用核酸マーカーであってもよい。あるいは、硝酸還元酵素の配列番号2又は4に相当するアミノ酸配列中の525位に相当するアミノ酸残基のプロリンからプロリン以外のアミノ酸残基への変異を検出に使用するための検出用ポリヌクレオチドであってもよい。非限定的に、選抜用核酸マーカー又は検出用ポリヌクレオチドは、配列番号2又は4に相当するアミノ酸配列中の525位に相当するアミノ酸残基を含む部分をコードするDNAの塩基配列を増幅するための核酸増幅用プライマー、配列番号2又は4に相当するアミノ酸配列中の525位に相当するアミノ酸残基を含む部分をコードするDNAの塩基配列の配列決定用プライマー、あるいは、配列番号2又は4に相当するアミノ酸配列中の525位に相当するアミノ酸残基を含む部分をコードするDNAに結合するプローブであってもよい。当業者は、これらの選抜用核酸マーカー又は検出用ポリヌクレオチドを公知技術に基づき適宜選択可能である。

[0072] 一態様において、本発明は、配列番号2又は4に相当するアミノ酸配列中の525位に相当するアミノ酸残基がプロリンからプロリン以外のアミノ酸残基に変異している硝酸還元酵素を含むタバコ植物、を選抜するために使用する選抜用核酸マーカー、あるいは、硝酸還元酵素タンパク質の配列番号2又は4に相当するアミノ酸配列中の525位に相当するアミノ酸残基のプロ

リンからプロリン以外のアミノ酸残基への変異を検出するために使用する検出用ポリヌクレオチドを含む、キットであってもよい。

[0073] 一態様において、本発明は、配列番号2又は4に相当するアミノ酸配列中の525位に相当するアミノ酸残基がプロリンからプロリン以外のアミノ酸残基に変異しているタバコ植物と、本発明のタバコ植物とは異なる機序で含有硝酸量及び／又はTSNAを低減させたタバコ植物とを交配させたタバコ植物及びその後代であってよい。このような交配親の例として、主要なニコチンデメチラーゼであるCYP82E4が機能しないように改変された変異体や硝酸トランスポーターの変異体を挙げることができる。

[0074] 本明細書の実施例では、配列番号2又は4に相当するアミノ酸配列中の525位に相当するアミノ酸残基がプロリンからロイシン又はセリンに変異している硝酸還元酵素を含むタバコ植物が得られた。プロリンからロイシンへのアミノ酸変化を生じるための塩基配列の変異はCCA→CTA、プロリンからセリンへのアミノ酸変化を生じるための塩基配列の変異はCCA→TCAで、いずれも1塩基のみの変異であった。

[0075] 非特許文献2、3に記載の硝酸還元酵素S523Dを得るためには、523位においてセリンからアスパラギン酸へのアミノ酸変化を生じるために、TCA→GATと3つの塩基置換が必要である。3つの塩基を置換することが必要という事実は、内因性の硝酸還元酵素遺伝子を、薬剤等の突然変異によって改変してS523D突然変異体を取得することが、極めて困難であることを意味する。これに対し、配列番号2又は4に相当するアミノ酸配列中の525位に相当するアミノ酸残基がプロリンからロイシン又はセリンに変異している硝酸還元酵素を含むタバコ植物は、突然変異によっても取得しやすい。欧州を含む諸国では遺伝子組換え作物の栽培が制度上困難であることなどを考慮すると、突然変異体は事業上有効である。

[0076] 硝酸還元酵素において、保存ドメイン間を繋いでいる保存性の低い領域（ヒンジ1領域）が知られている。非特許文献2、3に記載のS523Dは、このヒンジ1領域に存在する。本発明においてヒンジ1領域においてアミノ

酸が変異した硝酸還元酵素を有するタバコ植物を26種類取得して、その葉中硝酸量を調べたところ、低減が見られたのは本発明の2種類のP525変異体のみであった。

[0077] 4. 葉たばこ及び乾燥葉

本発明は、一態様において、本発明のタバコ植物から収穫された葉たばこに関する。本発明はまた、本発明の葉たばこから生成された、乾燥葉に関する。

[0078] 「本発明のたばこ葉」の意義は、「3. タバコ植物の作成方法」までにおいて説明した通りである。

[0079] 葉たばこから乾燥葉を作成する工程は特に限定されず、公知の方法を用いることができる。タバコ植物は、その葉を収穫し、たばこ製品等の製造のための材料とすることができる。たばこ葉は、空気乾燥、火力乾燥、黄色乾燥又は日光乾燥してもよい。非限定的に、空気乾燥は、換気の良い納屋に吊り下げ、空気にさらして4～8週間乾燥する。火力乾燥たばこは、大きな納屋で吊り下げ、工程及びたばこに応じて3日間～10週間、火力で連続的又は断続的に加熱乾燥する。黄色乾燥たばこは、たばこを一行に並べ、乾燥小屋で吊り下げて、通常1週間程度かけて温度をゆっくり上昇させて乾燥させる。日光乾燥処理たばこは日向で乾燥される。この方法は、トルコ、ギリシャ、及びその他の地中海諸国でオリエンタ葉たばこを製造するために使用される。

[0080] 一態様において、本発明は、本発明の葉たばこに由来する乾燥葉、葉たばこの乾燥葉に関する。

[0081] 一態様において、前記葉たばこ及び乾燥葉は、配列番号2又は4に相当するアミノ酸配列中の525位に相当するアミノ酸残基がプロリンからプロリン以外のアミノ酸残基に変異している硝酸還元酵素タンパク質、あるいは当該タンパク質をコードする核酸を含む。

[0082] 一態様において、前記乾燥葉は、「2. タバコ植物の性質」に記載された対照であるタバコ植物の葉たばこから生成された乾燥葉と比較して、タバコ

特異的ニトロソアミン（TSNA）が減少している。

[0083] TSNAの4成分

N-ニトロソノルニコチン（NNN）

N-ニトロソアナタピン（NAT）

N-ニトロソアナバシン（NAB）

ニコチン由来ニトロソケトン（NNK）

実施例7において、P525L、P525Sのホモ接合体は、対照であるタバコ植物の葉たばこから生成された乾燥葉と比較して、TSNAの4成分（NNN、NAT、NAB及びNNK）の総計が、34-36%低減していた。一態様において、前記タバコ植物は、対照と比較して、TSNAの少なくとも1成分、あるいは、TSNAの成分の総計が、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%低減している。

[0084] 5. カットフィルター、粉末、シート、中骨、顆粒、抽出物、組成物

一態様において、本発明は、本発明の乾燥葉から製造された、カットフィルター、粉末、シート、中骨、顆粒、又は抽出物に関する。

[0085] 「本発明の乾燥葉」の意義は「4. 葉たばこ及び乾燥葉」までにおいて説明した通りである。

[0086] 「カットフィルター」とは、乾燥したたばこ葉を細長い短冊状に細断したもので、巻きたばこに使用する。

[0087] 「中骨」とは、葉の中央を走る最も太い葉脈部分である。

[0088] 「粉末」とは、乾燥したたばこ葉を粉砕して粉状にしたものである。

[0089] 「顆粒」とは、粉末を粒状に成形したものである。

[0090] 「抽出物」は、たばこ製品の香味を改善する目的やたばこ製品中の特定成分の含有量を低下させる目的で、タバコ植物由来の葉、莖などの材料（「部分」、好ましくは「非増殖性部分」を含む）を抽出して得られたものである。抽出方法は植物から精油や特定の成分等を抽出するための公知の方法を用いることができる。

[0091] 非限定的に、本発明は、本発明のタバコ植物（部分を含む）又は乾燥葉、

あるいはこれらに由来するタバコ材料（カットフィラー等）を含む組成物に関する。組成物は、タバコ植物又はその部分をそのまま用いても、あるいは裁断、粉碎又は磨砕して細片状、スラリー状、又は微粉状としたものを用いてもよい。組成物として、タバコ植物又はその部分は、畑地などから収穫したものをそのまま用いても、所定期間屋内又は屋外において水分を一部放散させたものを用いても、あるいは乾燥機などで水分をほとんど放散させたものを用いてもよい。

[0092] 非限定的に、組成物は、本発明の乾燥葉から製造された、カットフィラー、粉末、シート、中骨、顆粒、又は抽出物を含んでもよい。

[0093] 一態様において、本発明のカットフィラー、粉末、シート、中骨、顆粒、又は抽出物、並びに組成物は、タバコ植物の非増殖性部分を含む。

[0094] 一態様において、本発明のカットフィラー、粉末、シート、中骨、顆粒、又は抽出物、並びに組成物は、配列番号2又は4に相当するアミノ酸配列中の525位に相当するアミノ酸残基がプロリンからプロリン以外のアミノ酸残基に変異している硝酸還元酵素をコードする核酸を含む。

[0095] 6. 製品

一態様において、本発明は、本発明の乾燥葉、及び／又は、本発明のカットフィラー、粉末、シート、中骨、顆粒、若しくは抽出物を含む、たばこ製品に関する。

[0096] 「本発明の乾燥葉、及び／又は、本発明のカットフィラー、粉末、シート、中骨、顆粒、若しくは抽出物」の意義は、「5. カットフィラー、粉末、シート、中骨、顆粒、抽出物、組成物」までにおいて説明した通りである。

[0097] 「たばこ製品」の種類は特に限定されない。紙巻きたばこ（シガレット）の他、葉巻、パイプたばこ、嗅ぎたばこ（スヌース、スナッフを含む）、噛みたばこ、刻み（細刻みを含む）、水たばこ等を含む。さらに、たばこを加熱し発生するエアロゾルをエアロゾル源として用いた非燃焼加熱型たばこ製品、たばこを加熱せずにその香味を吸引する非加熱型たばこ製品なども含まれる。

- [0098] 非限定的に、「たばこ製品」は、タバコ植物の非増殖性部分を含む。
- [0099] 本発明は一態様において、本発明のタバコ植物、葉たばこ、乾燥葉の、たばこ製品を製造するための使用を提供する。
- [0100] 本発明は一態様において、本発明のタバコ植物、葉たばこ、乾燥葉の、たばこ製品としての使用、に関する。
- [0101] 本発明は一態様において、たばこ製品としての使用されるための、発明のタバコ植物、葉たばこ、乾燥葉の、たばこ製品に関する。
- [0102] 本発明は一態様において、たばこ製品の製造方法を含む。非限定的に、たばこ製品の製造方法は、配列番号2又は4に相当するアミノ酸配列中の525位に相当するアミノ酸残基がプロリンからプロリン以外のアミノ酸残基に変異している硝酸還元酵素を含む、改変タバコ植物から、タバコ植物由来の材料を調製する、ことを含む。前記製造方法は、前記タバコ植物から葉を採取し、乾燥葉を調製する工程を含んでもよい。たばこ製品の製造方法は、公知の方法を用いることができる。例えば、改変タバコ植物から、採取した葉（葉たばこ）を、原料工程（格付、除骨、調整・乾燥、貯蔵・熟成）、原料加工工程（シート、抽出、顆粒、加熱、付香）並びに、製品工程（ブレンド、裁刻、巻上、包装）を経てたばこ製品を製造することができる。
- [0103] 「たばこ製品」の定義は上述した通りである。

## 実施例

- [0104] 以下、実施例に基づいて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。当業者は本明細書の記載に基づいて容易に本発明に修飾・変更を加えることができ、それらは本発明の技術的範囲に含まれる。
- [0105] 比較例1 S523D、WT恒常発現組換え体の作製  
本比較例では、S523D、WT恒常発現組換え体の作製を行った。
- [0106] (1) ベクター構築  
NIA2ポリペプチド（配列番号4）の523番目のセリン（S）がアスパラギン酸（D）になるように変異を導入したORF（S523D）と、野

生型のNIA2のORF (WT) について、人工合成したDNAを、GeneWizから購入した。5'末端にCATを、3'末端にGTCGACを付加することにより、各々NdeI、SalIで切断されるようにした。また、アミノ酸置換変異を起こすことなく内生のNIA2と区別できるように、野生型NIA2のORF (配列番号3) の1869~71番目のTTCをAAGに置換して (配列番号25の塩基1872~74に相当)、HindIIIサイトを導入した。NIA2のS523Dをコードする合成DNAの塩基配列を配列番号24、野生型NIA2をコードする合成DNAの塩基配列を配列番号25で示す。

[0107] 35Sプロモーターを有するpRI201-AN (タカラバイオ) に上記DNAのNdeI/SalI消化断片を導入した。ベクターとの結合部位を含む挿入全体の配列を、配列決定用プライマー (表1) を用いて確認した。

[0108] [表1]

プライマー名	配列
Nia2_ex1_2F	ACCGAAGCATGGGTACAA (配列番号9)
Nia2_ex2_3F	GGCTATTCTTATTCTGGCGGAG (配列番号10)
Nia2_ex3_4R	CATCATTCCCATGACGTCC (配列番号11)
Nia2_ex4_HindIII_R	GCTGCTGAAGCTTGAAGATCC (配列番号12)

配列を確認したプラスミドをアグロバクテリア (*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404) にエレクトロポレーション法で形質転換し、タバコ形質転換に用いた。

[0109] (2) タバコ形質転換

タバコ (栽培品種: Petit Havana SR-1) に (1) で作製した2種のコンストラクトを有するアグロバクテリアを個別に形質転換した。発根が確認された個体は、シュートの葉における導入遺伝子の発現を解析した。以下の「(3) 導入遺伝子の発現確認」に記載の方法により導入遺伝子の発現を確認した個体を、肥土を詰めた3号鉢に移植した。これらT0世代の個体を遺伝子組換え温室で栽培し、自殖T1種子を採種した。

[0110] (3) 導入遺伝子の発現確認

RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて葉からRNAを抽出し、PrimeScript (商標) RT reagent Kit with gDNA Eraser (タカラバイオ) を用いてcDNAを合成し、TaqMan Fast Advanced Master Mix (サーモフィッシャー) とStep OnePlus Real-Time PCR Systems (サーモフィッシャー) を用いて、導入した変異型NIA2 cDNA由来の発現レベルを解析した。

[0111] プライマー、プローブ配列は表2の通りである。対照として伸長因子-1  $\alpha$  遺伝子 (アクセッションNo. AF120093、elf) を用い、対照に対する相対的な発現レベル (dCt) で比較した。

[0112] [表2]

プライマー・プローブ名		配列
NRs_TMF	プライマー	CAGGATTGGTGAACCTATAACTAC (配列番号13)
NRs_TMR	プライマー	CTCTGGGCTGGAACAAGT (配列番号14)
NRs_wt_WGB	プローブ	GATCTTCTTCCTTCAGCAGC (配列番号15)
NRs_tg_MGB	プローブ	GGATCTTCAAGCTTCAGCAG (配列番号16)
elfa_v2_TMF	プライマー	CTAAGGGTGCTGCCAGCTTT (配列番号17)
elfa_v2_TMR	プライマー	GTCAAGCACTGGAGCATATCCA (配列番号18)
elfa_v2_TMP	プローブ	ATCATGAACCATCCAGGACAGATTGG (配列番号19)

### 比較例2 S523D、WT恒常発現組換え体の解析

本比較例では、比較例1で取得したS523D、WT恒常発現組換え体の解析を行った。T1世代においても、比較例1(3)に記載の方法で、導入遺伝子の発現を確認し、以下の試験を実施した。

[0113] (1) 液肥栽培

比較例1(2)のT1種子を播種して約2週間後に仮植し、仮植後約2週間の苗を4号鉢に移植した。肥土ごと仮植苗を移し、バーミキュライトを400ml程度詰めた。硝酸液肥 (NO<sub>3</sub>として20mM: 4mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、4mM Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、4mM KNO<sub>3</sub>) を与え、明期25℃/暗期18℃、12時間日長、湿度60%条件のコイトロンで栽培した。明期は10000ルクス~15000ルクスの明るさで、暗期はコイトロン内のランプを全てOFFにした遮光条件で栽培を行った。

[0114] (2) 硝酸定量

葉（3－8枚）採取し、中骨を除去したラミナを80℃で一晩以上乾燥させた。これらの乾燥粉末は、乾燥粉末100mg当たりMQ水1mlを添加し、1時間以上振とう抽出した。ろ液を測定試料として、Ntrachek 404 Meter (KPG Products Ltd) を用いて、添付されているマニュアルに従って硝酸を測定した。

[0115] 以前の報告（例えば、特許文献1、非特許文献2）の通り、S523D変異を有するNIA2（NIA2\_\_S523D）の恒常発現により、葉（ラミナ）中の硝酸量は劇的に低減することが確認された（図1）。一方、野生型のNIA2（NIA2\_\_WT）の恒常発現でも、NIA2を恒常発現させていない対照に比べて1/2～1/4程度の硝酸量の低減がみられた（図1）。

[0116] 生育については、NIA2\_\_WTでは恒常発現の有無によらず大きな差はみられなかったが、NIA2\_\_S523Dは恒常発現により個体のサイズが小さくなる矮性を示した（図2）。この矮性の形質は生育初期から観察された（図3）。

[0117] （3）亜硝酸定量

サンプル100μlに50μlの発色試薬1（3N HCl中、2%スルファニルアミド）を混合し、室温で5分間反応させた。50μlの発色試薬2（水中、0.1%N-ナフチルエチレンジアミン）を添加／混合し、室温で10分間反応させた。マイクロプレートリーダーInfinite 200 PRO (TECAN) でA540と対照としてA700を測定し、A540－A700（差分）を測定値とした。検量線用にNaNO<sub>2</sub>（和光純薬・特級）も100μl同様に測定し、検量線を引いて亜硝酸量を算出した。

[0118] （4）暗所亜硝酸溶出試験

Leaらの方法（非特許文献4）を参考に、暗所亜硝酸溶出試験を行った。溶出バッファー（50mM HEPES-NaOH pH7、50mM KNO<sub>3</sub>）にNIA2\_\_S523Dのリーフディスクを浸漬させ、アルミホイルで遮光、28℃、100rpmの条件で5時間振とう反応させた。溶出バ

ッファーを回収し、「(3) 亜硝酸定量」に記載の方法で亜硝酸を定量した。直径4 mmのリーフディスク当たり200  $\mu$  lの溶出バッファーを用いた。

[0119] 対照のSR-1、NIA2\_\_S523D恒常発現組換え体、及びNIA2\_\_WT恒常発現組換え体を4号鉢に移植し、液肥栽培10日のタバコから5枚のリーフディスク（直径4 mm）を採取し、重量を測定後、1 mlの溶出バッファーに浸漬した。溶出バッファー中に溶出した亜硝酸を生葉重量当たりで示した。

[0120] 野生型のSR-1及びNIA2\_\_WT恒常発現組換え体では暗所における亜硝酸の溶出はほとんどみられないのに対し、NIA2\_\_S523D恒常発現組換え体では顕著な溶出がみられた（図4）。

[0121] (5) NR酵素活性

(1)において仮植した植物を、明条件(L)あるいは暗条件(D)に置いた。明条件、暗条件とも室温は25°C、湿度60%とした。なお、明条件は10000ルクス~15000ルクスの明るさとし、暗条件はコイトロン内のランプを全てOFFにして遮光した。2時間の後、0.1 g程度の葉(ラミナ)を2 mlチューブに採取し、直ちに液体窒素で凍結した。採取した葉組織をシェイクマスターネオ(バイオメディカルサイエンス)で凍結破碎(1000 rpm、30秒、2回)した。8倍容の抽出バッファー(終濃度; 0.1 M HEPES pH7.5、10 mM MgCl<sub>2</sub>、3% PVPP、1X cOmplete™, EDTA-free (Roche)、2 mM DTT)を凍結破碎した組織に加え、よく混和し、氷上に置いた。遠心(6000 rpm、4°C、15分間)し、上清を1.5 mlチューブに回収(粗抽出液)した。その後、別の1.5 mlチューブに一部を移して超純水で5倍希釈した。場合に応じて、終濃度10 mM MgCl<sub>2</sub>あるいは終濃度10 mM EDTAを抽出バッファーに加えて粗抽出液を調製した。

[0122] 活性測定は以下の通り実施した。5倍希釈した20  $\mu$  lの粗抽出液を80  $\mu$  lの活性測定バッファー(終濃度; 50 mM HEPES pH7.5、

10 mM  $\text{KNO}_3$ , 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5  $\mu\text{M}$  FAD, 0.15 mM NADH)に加えて、反応(30°C、60分間)させた。なお、反応は、一つの粗抽出液につき、活性測定バッファーに終濃度10 mM  $\text{MgCl}_2$ 、あるいは終濃度10 mM EDTAを加えた二通りの方法で行った。「(3) 亜硝酸定量」に記載の亜硝酸定量法に従い、反応液中に生成された亜硝酸量の測定を行った。上記二通りの方法により測定された値の比をとり、硝酸還元酵素の活性(NR活性化率)を得た。

[0123] 野生型のSR-1及びNIA2\_\_WT恒常発現組換え体では、明条件(L)に比べて暗条件(D)のNR活性化率が明らかに低いのに対し、NIA2\_\_S523D恒常発現組換え体では暗条件でのNR活性化率の低減がみられなかった(図5)。

[0124] 実施例1 メタンスルホン酸エチル(EMS)突然変異体の作成及び選抜  
本実施例において、タバコ植物のメタンスルホン酸エチル(EMS)突然変異体を作成した。

[0125] (1) EMS処理による突然変異導入

タバコ(品種:つくば1号)の種子をメタンスルホン酸エチル(EMS)処理することによって、変異体パネル(TUM)を作成した(平成23年日本植物病理学会大会 P234、タバコ変異体パネルの作出:非特許文献5)。具体的には、2 ml スクリューキャップチューブに種子200 mg、水1 mlと6~8  $\mu\text{l}$ のEMS(シグマアルドリッチ)を加え、上下反転等で良く攪拌、混合後、室温で60 rpm、18時間振とうした。チューブを遠心して上清を除去し、1 mlの水を加え、30分間振とう洗浄した。遠心した上清を除去して1 mlの水を加えてチューブを上下反転等して種子をすすいだ。このすすぎの操作は3回繰り返した。この洗浄、すすぎの操作をさらに2回繰り返した後に、種子をろ紙上で乾燥した。乾燥した種子を肥土栽培し、自殖したM2種子を採種した。各M2種子の一部を播種し、幼苗8個体からGentra Puregene Tissue Kit(キアゲン)を用いてゲノムDNAを抽出した。抽出したゲノムDNAは濃度を10 ng

／ $\mu$ lに調整した。変異体パネルは、このM2種子と抽出したバルクゲノムDNAのセットからなる。

[0126] (2) PCR

「(1) EMS処理による突然変異導入」で作成した変異体パネルのゲノムDNAを鋳型に、PCR反応でヒンジ1領域を増幅した。

[0127] 具体的には、TKS Gflex DNA Polymerase (タカラバイオ) を用いて、キット添付のマニュアルに従って、(95℃; 1分, [98℃; 10秒、55℃; 15秒、68℃; 1分] × 35-40サイクル、68℃; 1分) で行った。68℃の反応時間は、増幅断片の推定サイズに応じて、1kb当たり1分となるように増減した。

[0128] ヒンジ1領域の増幅プライマーとして、以下のものを使用した。

[0129] NIA1

NIA1\_hinge1\_F2 (TTAGGTGAAATAACGCTCTTACAC) (配列番号20)

NIA1\_hinge1\_R2 (CCTAATTGGAGAGAATCAAGGTAT) (配列番号21)

NIA2

NIA2\_hinge1\_F2 (ATTGTGCTATGTTGCAATGTTTCAG) (配列番号22)

NIA2\_hinge1\_R1 (GGAAGAAGATCCGTGCA CG) を用いた。 (配列番号23)

(3) 配列解析

鋳型となるDNAを、Big Dye Terminator v. 3.1 cycle sequencing kit (サーモフィッシャー) を用いて、キット添付の方法で反応(94℃30秒、96℃10秒/50℃5秒/60℃2分×25サイクル)させた。次に、BigDye X Terminator (商標) Purification Kit (サーモフィッシャー) を用いて、キット添付の方法で精製した。Applied Bio

systems (登録商標) 3730 DNA Analyzer (サーモフィッシャー) で配列情報を入手し、シーケンスアセンブリソフトウェア ATGC (GENETYX) で解析した。

[0130] 配列決定用プライマーとして、配列番号20及び22に記載のものを使用した。

[0131] (4) EMS突然変異体

「(3) 配列解析」の配列解析の結果、変異体パネルから得られたM2系統において、NIA1及びNIA2のヒンジ1領域にアミノ酸置換を有する26系統のミスセンス変異体が選抜された(表3、4)

[0132] [表3]

	NIA1変異体系統	変異
1	NIA1_C477Y	TGC⇒TAC
2	NIA1_E483K	GAG⇒AAG
3	NIA1_G485E	GGA⇒GAA
4	NIA1_P491S	CCG⇒TCG
5	NIA1_G495E	GGA⇒GAA
6	NIA1_G499S	GGT⇒AGT
7	NIA1_G499D	GGT⇒GAT
8	NIA1_E505K	GAG⇒AAG
9	NIA1_E509K	GAG⇒AAG
10	NIA1_A514T	GCA⇒ACA
11	NIA1_P515S	CCT⇒TCT
12	NIA1_P515L	CCT⇒CTT
13	NIA1_P525L	CCA⇒CTA
14	NIA1_P525S	CCA⇒TCA
15	NIA1_M527I	ATG⇒ATA
16	NIA1_S537L	TCG⇒TTG

[0133]

[表4]

	NIA2変異体系統	変異
1	NIA2_M474I	ATG⇒ATA
2	NIA2_A503T	GCG⇒ACG
3	NIA2_H507Y	CAT⇒TAT
4	NIA2_E509K	GAG⇒AAG
5	NIA2_A512V	GCA⇒GTA
6	NIA2_E513K	GAG⇒AAG
7	NIA2_T524I	ACT⇒ATT
8	NIA2_N528K	AAC⇒AAA
9	NIA2_A530V	GCT⇒GTT
10	NIA2_A530T	GCT⇒ACT

#### 実施例2 硝酸低減系統の選抜

本実施例では、実施例1で選抜したEMS突然変異体系統について、M2世代もしくはM3世代で液肥栽培し、たばこ葉（ラミナ）中の硝酸が対照に比べて低減するかどうかを解析した。M2、M3個体の葉からゲノムDNAを抽出し、それを鋳型に、実施例1の（2）PCR及び（3）配列解析を実施し、変異のホモ接合体、ヘテロ接合体、及び変異を含まない分離WT個体を選別した。

[0134] タバコ植物の栽培、硝酸定量の方法は、比較例2の「（1）液肥栽培」、  
「（2）硝酸定量」と同様に行った。実施例1で検出した、ヒンジ1領域にミスセンス置換変異を有する、NIA1変異体16系統とNIA2変異体10系統（表3）を対象とした。26種の突然変異体のうち、NIA1遺伝子中の525番目のアミノ酸に置換変異が導入された、NIA1\_P525LとNIA1\_P525Sの2系統のみ、有意に硝酸の低減がみられた（図6→図8）。

[0135] 実施例3 NIA1\_P525L、NIA1\_P525SのNR活性解析  
本実施例では、NIA1\_P525L、NIA1\_P525SのNR活

性解析を行った。

[0136] 実施例2において、ラミナ中の硝酸低減が確認されたP525LとP525Sについて、明条件、暗条件でNR酵素活性の活性化率を解析した。方法は、比較例2の「(5) NR酵素活性」と同様に行った。

[0137] (1) 酵素活性

活性測定時にEDTAを添加した場合のNR活性値(NR最大活性)に対する、Mgを添加した場合のNR活性値を、百分率(%)で示したNR酵素活性化率を解析した。その結果、NIA1\_P525L、NIA1\_P525Sの両変異系統とも、ホモ接合体、ヘテロ接合体のいずれも、明条件でも暗条件と同程度にNR活性化率が高かった(図9)。一方、変異を持たない分離WT(野生型)は、明条件に比べて暗条件でのNR活性化率は顕著に低かった。これらの結果から、両変異体は暗所において活性が抑制されなくなったために、硝酸の蓄積量が低減したと考えられた。また、変異型ホモ接合体のみでなく、変異型ヘテロ接合体でも暗条件での活性化率の低下はわずかであったが、この結果は、変異型ヘテロ接合体でも硝酸の低減がみられた実施例2の結果と一致する(図7-6、図7-7)。

[0138] 実施例4 NIA1\_P525L、NIA1\_P525SのM3世代における再確認

本実施例では、NIA1\_P525L、NIA1\_P525SのM3世代の硝酸レベルと暗所におけるNR活性について解析を行った。

[0139] M2世代で暗所における高いNR活性化率と硝酸低減が確認されたNIA1\_P525L、NIA1\_P525Sの両変異系統について、M3世代で再確認試験を行った。方法は、比較例2の「(1) 液肥栽培」、「(2) 硝酸定量」、「(4) 暗所亜硝酸溶出試験」と同様に行った。ただし、暗所亜硝酸溶出試験は、リーフディスク枚数当たりの亜硝酸溶出量から算出した。

[0140] (1) 暗所亜硝酸溶出

NIA1\_P525L、NIA1\_P525Sの両変異系統とも、ホモ接合体では、顕著な亜硝酸の溶出がみられた(図10)。一方、分離WT(P

525変異を持たない)では野生型のつくば1号と同様に亜硝酸の溶出はほとんどみられなかった。このことから、NIA1\_\_P525L、NIA1\_\_P525Sの変異型ホモ接合体では、いずれも暗所において高いNR活性を有することが再確認された。

[0141] (2) 硝酸定量

NIA1\_\_P525L、NIA1\_\_P525Sの両変異系統とも、ホモ接合体、ヘテロ接合体のいずれも、分離WT個体に比べて有為に硝酸が低減した(図11)。硝酸レベルは対照比で、NIA1\_\_P525Lでは68%、NIA1\_\_P525Sでは34%であった。

[0142] また、NIA1\_\_P525L、NIA1\_\_P525Sの両変異系統は、NIA2\_\_S523D恒常発現組換え体とは異なり、変異の有無によって生育に異常はみられなかった(図12)。

[0143] 実施例5 NIA1-P525L、NIA1 P525Sの圃場栽培個体の硝酸量

本実施例では、NIA1\_\_P525L、NIA1\_\_P525Sについて、圃場栽培した個体の硝酸量を調べた。

[0144] NIA1遺伝子上にP525L、P525Sのアミノ酸置換変異を有する変異体に、TN90(バーレー種)を交配したBC1F1系統を得た。これを自殖したBC1F2世代において、NIA1のアミノ酸置換変異のホモ接合体、ヘテロ接合体、及び変異を含まない分離WT個体を、圃場で栽培した。バーレー種の標準耕作法で栽培したが、心止め時に、基肥量の6割を畦間に追肥した。

[0145] 心止めから36日後の上位葉3枚を硝酸の分析サンプルとした。恒温恒湿器(ESPEC)を用いてプログラム乾燥した。黄変条件(温度38℃、相対湿度80%RH)で5日間、褐変条件(温度32℃、相対湿度:上位2枚は85%RH、下位1枚は90%RH)で14日間、中骨乾燥条件(温度50℃、相対湿度40%RH)で3日間乾燥を行った。乾葉のラミナを粉碎し、オートアナライザーQuattro 2HR(ピーエルテック株式会社)

を用いて、取り扱い説明書に従って硝酸態窒素を分析した。

[0146] P 5 2 5 L 変異のホモ接合体、もしくはヘテロ接合体の乾葉中の硝酸態窒素濃度は、対照（変異を持たないWT）に比べて1/2程度であった（図13）。同様に、P 5 2 5 S 変異をホモ（ホモ接合体）もしくはヘテロ（ヘテロ接合体）に有する個体の乾葉中の硝酸態窒素濃度も、対照（変異を持たないWT）に比べて1/2程度であった。

[0147] 実施例6 S 5 2 3 D 恒常発現組換え体とP 5 2 5 変異体の生育、バイオマス、開花

本実施例では、S 5 2 3 D 恒常発現組換え体とP 5 2 5 変異体の生育、バイオマス、及び開花を調べた。

[0148] (1) S 5 2 3 D 恒常発現組換え体の生育不良

「比較例1 S 5 2 3 D、WT 恒常発現組換え体の作製(1)、(2)」に記載の方法で、TN 90（バーレー種）に形質転換し、T 1 種子を採取した。T 1 世代で導入遺伝子が高発現する個体（S 5 2 3 D-OE、WT-OE）と発現がみられない個体（ヌルセグリガント。S 5 2 3 D-null、WT-null）を選抜し、試験に用いた。具体的には、NIA 2\_\_S 5 2 3 Dを導入したT 0 世代を自殖したT 1 世代の各3系統（S 5 2 3 D-OE\_\_1、2、3およびS 5 2 3 D-null\_\_1、2、3）、NIA 2\_\_WTを導入したT 0 世代を自殖したT 1 世代の各2系統（WT-OE\_\_1、2およびWT-null\_\_1、2）、形質転換の宿主であるTN 90を野生型として試験に用いた。

[0149] 25℃の閉鎖系温室で栽培した幼植物の葉を用いて、「比較例1 S 5 2 3 D、WT 恒常発現組換え体の作製(3)」に記載の方法で、導入遺伝子が高発現している個体（S 5 2 3 D-OE、WT-OE）と発現していない個体（S 5 2 3 D-null、WT-null）を選抜した。選抜された各個体を鉢に移植して栽培を続けた。移植8日後に、各系統の個体の写真を記録した。NIA 2\_\_S 5 2 3 Dを高発現するT 1 世代の3系統とも、S 5 2 3 D-OEはS 5 2 3 D-nullに比べて、明らかに生育が劣っていた（図

14)。一方、N I A 2 \_\_ W Tを高発現するT 1世代の2系統のW T - O EとW T - n u l lでは、顕著な生育の違いはみられなかった(図14)。

[0150] S 5 2 3 D - O E特異的な生育不良は、幼苗の段階ですでにみられていた。移植23日後に各系統4個体について、地上葉数、茎丈、地上葉の乾物重量を測定した。地上葉数はS 5 2 3 D - O EはS 5 2 3 D - n u l lに比べて2-3枚少なかったが、W T - O EとW T - n u l lでは有意な差はみられなかった(図15)。茎丈と地上葉の乾物重量(バイオマス)についても、S 5 2 3 D - O EはS 5 2 3 D - n u l lと比べて顕著に低く、W T - O EとW T - n u l lでは有意な差はみられなかった(図16、図17)。

[0151] 以上より、N I A 2 \_\_ S 5 2 3 Dの高発現は、T N 9 0(バーレー種)において、顕著な生育不良を引き起こすことが示された。W T - O Eでは生育不良はみられなかったことから、N Rタンパク質の高発現自体の影響ではなく、暗所で活性抑制されない変異型(N I A 2 \_\_ S 5 2 3 D)のN Rタンパク質の高発現の影響と考えられた。

[0152] (2) S 5 2 3 D恒常発現組換え体とP 5 2 5変異体の生育比較

T N 9 0の代わりにつくば1号(黄色種)を宿主とし、(1)に記載の要領で形質転換体を作製し、同様に解析を行った。N I A 2 \_\_ S 5 2 3 Dを高発現するT 0世代を自殖したT 1世代の3系統を試験に用いた。

[0153] 25℃一定の閉鎖系温室で栽培した幼植物の葉を用いて、導入遺伝子が高発現している個体(S 5 2 3 D - O E)と発現していない個体(S 5 2 3 D - n u l l)を選抜し、鉢に移植して栽培を続けた。同時に、N I A 1にP 5 2 5 L、P 5 2 5 Sのアミノ酸置換変異をホモに有する(ホモ接合体)のM 3世代の各2系統を同様に栽培した。移植34日後に各系統3個体について、地上葉数、茎丈、地上葉の乾物重量を測定した。S 5 2 3 D - O Eを高発現する3系統、N I A 1にP 5 2 5 L、P 5 2 5 Sのアミノ酸置換変異のホモ接合体の各2系統は、それぞれ複数系統の結果をまとめて集計し、比較を行った。

[0154] N I A 2 \_\_ S 5 2 3 Dを高発現する系統(S 5 2 3 D - O E)は、対照(

S523D-null) に比べて、地上葉数が1枚少なかった(図18)。一方、NIA1のP525L、P525Sのアミノ酸置換変異のホモ接合体は、対照(S523D-null)と同等であった。茎丈も地上葉数同様、NIA2\_\_S523Dを高発現する系統(S523D-OE)についてのみ、有意に差がみられ、対照に比べて低かった(図19)。

[0155] 地上葉の乾物重(バイオマス)も、NIA2\_\_S523Dを高発現する系統(S523D-OE)のみ、対照(S523D-null)に比べて約半分と、顕著に差がみられた(図20)。

[0156] これらの結果から、つくば1号(黄色種)の遺伝的背景においても、NIA2\_\_S523Dを高発現することにより顕著な生育不良が示された。一方、NIA1のP525L、P525Sのアミノ酸置換変異のホモ接合体は、NIA2\_\_S523Dを高発現する系統(S523D-OE)とは異なり、生育の異常はみられなかった。

[0157] 25℃一定条件で開花するまで栽培を続け、開花期についても調査した。NIA2\_\_S523Dを高発現する系統(S523D-OE)は、対照(S523D-null)に比べて開花も遅い傾向がみられた(図21)。

[0158] 実施例7 圃場栽培したP525L、P525S変異体の葉中成分(ニコチン、TSNAs)

実施例5記載の戻し交雑系統BC1F1について、さらにTN90を戻し交雑したBC2F1系統を単離した。この系統から2世代自殖を行ったBC2F3世代を単離し、圃場で栽培した。P525L\_\_HomoとP525S\_\_HomoはNIA1遺伝子にそれぞれP525LもしくはP525Sの変異をホモに有するホモ接合体である。P525L\_\_WTとP525S\_\_WTはそれぞれBC2F2世代でNIA1遺伝子に変異を有さない個体として分離した系統である。各分離系統の遺伝子型は、実施例1のEMS変異体の選抜に記載の方法に従って、NIA1遺伝子のNIA1\_\_hinge1領域をPCRで増幅し、その塩基配列を配列解析することにより行った。

[0159] バーレー種の標準耕作法(栽植密度: 2, 380株/10a、化成肥料バ

ーレーS625 : 216 kg / 10 a) で栽培し、心止め8日後に基肥の50%の化成肥料を追肥した。移植から約2か月後の開花期に心止めを行い、その後約3回に分けて下位葉を除去した。心止め56日後に、最上位2枚をサンプリングし、恒温恒湿器 (E S P E C) を用いて、表5記載の条件で乾燥させた。

[0160] [表5]

	Yellowing	Browning		Stem drying	Conditioning
		Program 1	Program 2		
Temperature (°C)	38.0	32.0	32.0	50.0	22.0
Relative humidity (%)	85.0	93.0	89.0	40.0	50.0
Curing period (hours)	40.0	96.0	200.0	72.0	92.0

乾燥した葉を粉碎後、乾燥粉末を試料としてニコチン、タバコ特異的ニトロソアミン (T S N A) を分析した。ニコチンは0.25 gの試料に対して4 mlの2 Nの水酸化ナトリウムを加えて室温で30分間静置させた後に、40 mlのメタノールを加えて振とう抽出し、0.45 μmフィルターで濾過した濾液をガスクロマトグラフィー-マススペクトロメトリー (G C - M S) 分析により測定した。

[0161] T S N Aの4成分 (N N N、N A T、N A B及びN N K) は、0.5 gの試料に対して20 mlの0.1 M酢酸アンモニウムを加えて振とう抽出し、0.1 M酢酸アンモニウムで10倍希釈後に液体クロマトグラフィー-マススペクトロメトリー/マススペクトロメトリー (L C - M S / M S) 分析により測定した。

[0162] ニコチンは、P 5 2 5 L \_\_ H o m oとP 5 2 5 S \_\_ H o m oとWT間で大きな差はみられなかった (図22A)。P 5 2 5 L、P 5 2 5 SのWTのニコチンはそれぞれ6.3%、5.8%であった。一方、T S N A sはN N N、N A T、N A B、N N Kの分析値を合計した値をT S N A sとして比較したが、P 5 2 5 L、P 5 2 5 Sともホモ接合体ではWTと比べて有意に34

−36%低減していた(図22B)。P525L、P525SのWTのTSNAsはそれぞれ3.8ppm、1.0ppmであった。これらの結果から、N1A1遺伝子にP525L及びP525Sの変異を有する変異体では、硝酸レベルが低減することにより、乾葉中のTSNAsレベルが低減することが確認された。

### 産業上の利用可能性

[0163] 硝酸塩蓄積量が低減した本発明の改変タバコ植物を利用することにより、たばこ原料やたばこ製品のTSNAを低減させることができる。本発明の改変タバコ植物は、葉中硝酸量が低下するだけでなく、好ましくは、植物体の生育も良好であった。これはたばこ製品を製造するための葉たばこの材料として利用することが可能である。

## 請求の範囲

- [請求項1] 配列番号2又は4に相当するアミノ酸配列中の525位に相当するアミノ酸残基がプロリンからプロリン以外のアミノ酸残基に変異している硝酸還元酵素を含む、タバコ植物。
- [請求項2] 以下の(a) - (c)のうち、1以上の性質を有する、  
(a) 暗条件での硝酸還元酵素の活性が、明条件での硝酸還元酵素の活性の80%以上である；  
(b) 対照と個体の生長が本質的に同等である；及び／又は  
(c) 対照と比較して、硝酸が低減している、  
ここにおいて、対照は、配列番号2又は4のアミノ酸配列からなる硝酸還元酵素を含む、タバコ植物である、  
請求項1に記載のタバコ植物。
- [請求項3] 配列番号2又は4に相当するアミノ酸配列中の525位に相当するアミノ酸残基がプロリンからロイシン又はセリンに変異している硝酸還元酵素を含む、請求項1又は2に記載のタバコ植物。
- [請求項4] 前記変異している硝酸還元酵素のアミノ酸配列において、配列番号2又は4に相当するアミノ酸配列中の523位に相当するアミノ酸残基がセリンである、請求項1 - 3のいずれか1項に記載のタバコ植物。
- [請求項5] 前記変異している硝酸還元酵素が、配列番号2又は4のアミノ酸配列と80%以上同一のアミノ酸配列を有する、請求項1 - 4のいずれか1項に記載のタバコ植物。
- [請求項6] 前記変異している硝酸還元酵素が、配列番号5 - 8のいずれか1つに相当するアミノ酸配列を有する、請求項1 - 5のいずれか1項に記載のタバコ植物。
- [請求項7] 対照と比較して、硝酸が少なくとも10%低減している、請求項2 - 6のいずれか1項に記載のタバコ植物。
- [請求項8] 突然変異体である、又は、遺伝子改変体である、請求項1 - 7のい

ずれか1項に記載のタバコ植物。

[請求項9] 前記タバコ植物が、ニコチアナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*) である、請求項1-8のいずれか1項に記載のタバコ植物。

[請求項10] (i) タバコ植物の硝酸還元酵素の、配列番号2又は4に相当するアミノ酸配列中の525位に相当するアミノ酸残基をプロリンからプロリン以外のアミノ酸残基に改変する、あるいは、

(ii) 突然変異により、硝酸還元酵素の、配列番号2又は4に相当するアミノ酸配列中の525位に相当するアミノ酸残基がプロリンからプロリン以外のアミノ酸残基に変異したタバコ植物を選択する、ことを含む、請求項1-9のいずれか1項に記載のタバコ植物の作成方法。

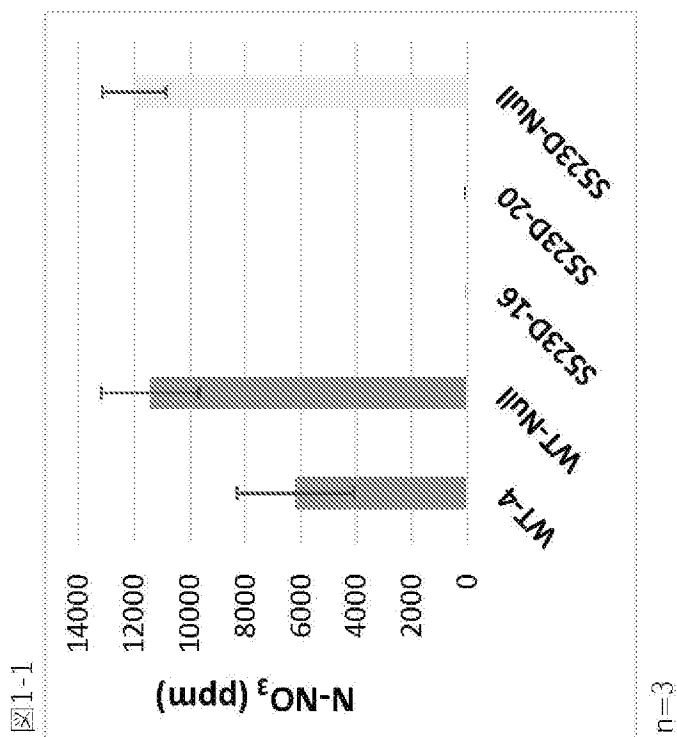
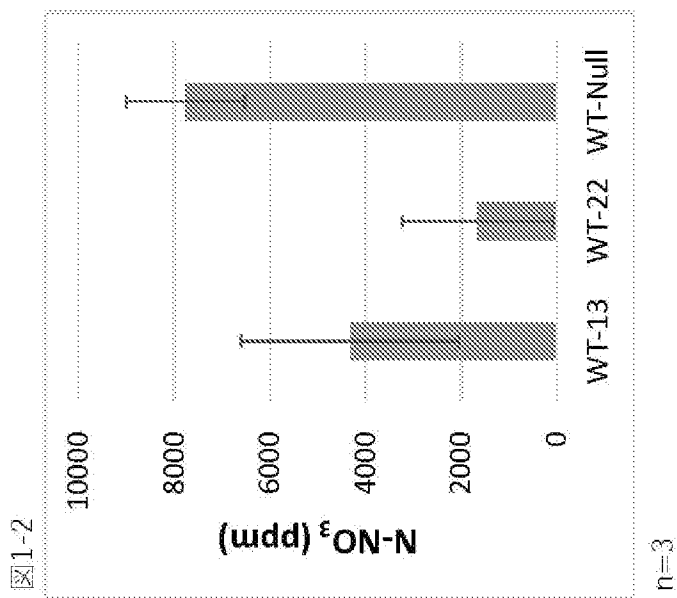
[請求項11] 請求項1-9のいずれか1項に記載のタバコ植物から収穫された葉たばこ。

[請求項12] 請求項11に記載の葉たばこから生成された、乾燥葉。

[請求項13] 請求項12に記載の乾燥葉から製造された、カットフィルター、粉末、シート、中骨、顆粒、又は抽出物。

[請求項14] 請求項12に記載の乾燥葉、及び／又は、請求項13に記載のカットフィルター、粉末、シート、中骨、顆粒、若しくは抽出物を含む、たばこ製品。

[1]

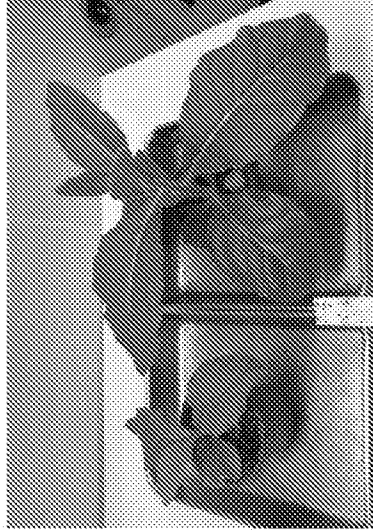
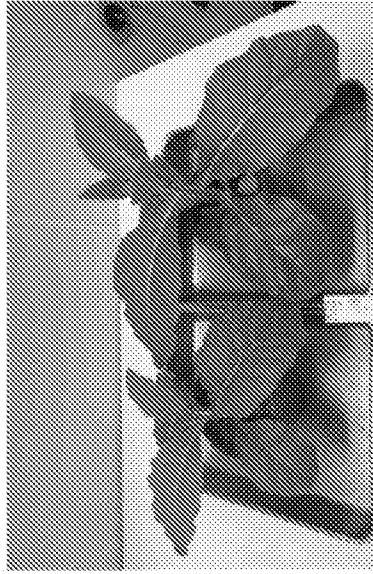


[図2]

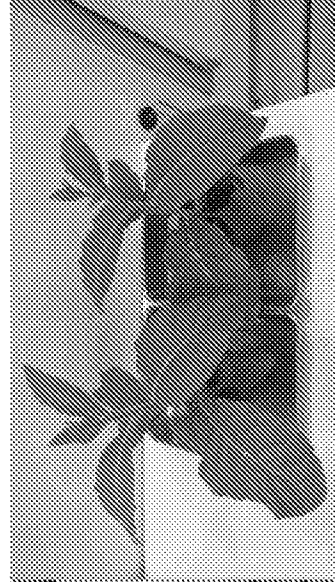
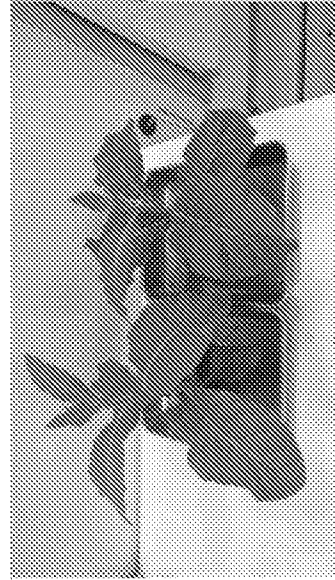
T1世代の2系統のS523D-16、20と非発現Null系統  
 T1世代の2系統のWT-13、22と非発現Null系統

### 移植3W前後の植物体

S523D-16    S523D-Null    S523D-20    S523D-Null



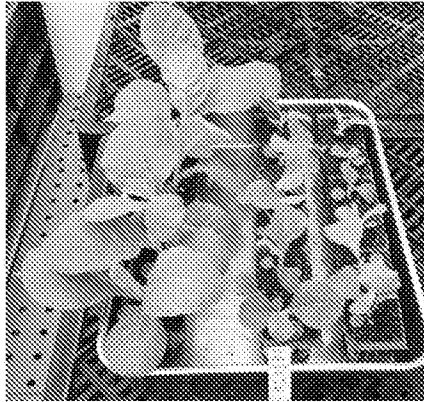
WT-Null    WT-13    WT-Null    WT-22



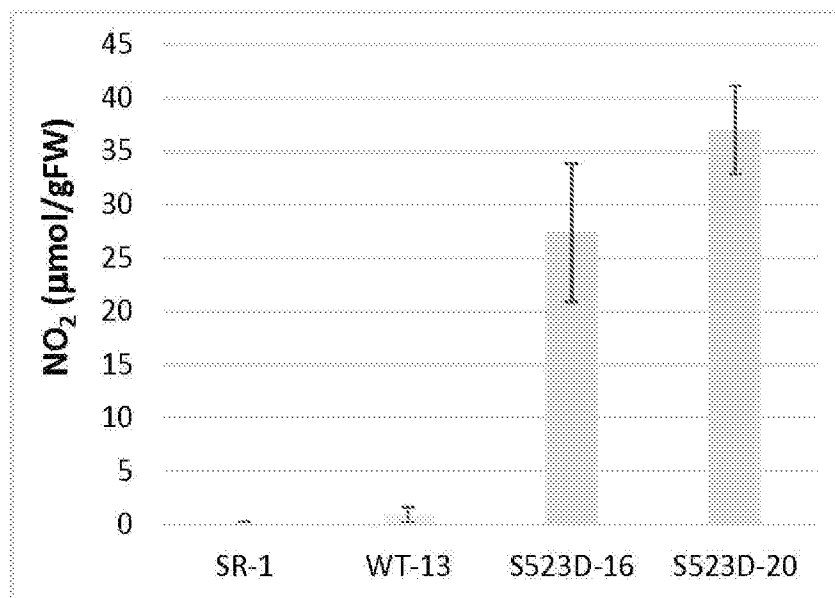
[図3]

S523D組換え体 (T2世代) の初期生育 (仮植11日)

S523D-Null    S523D-16

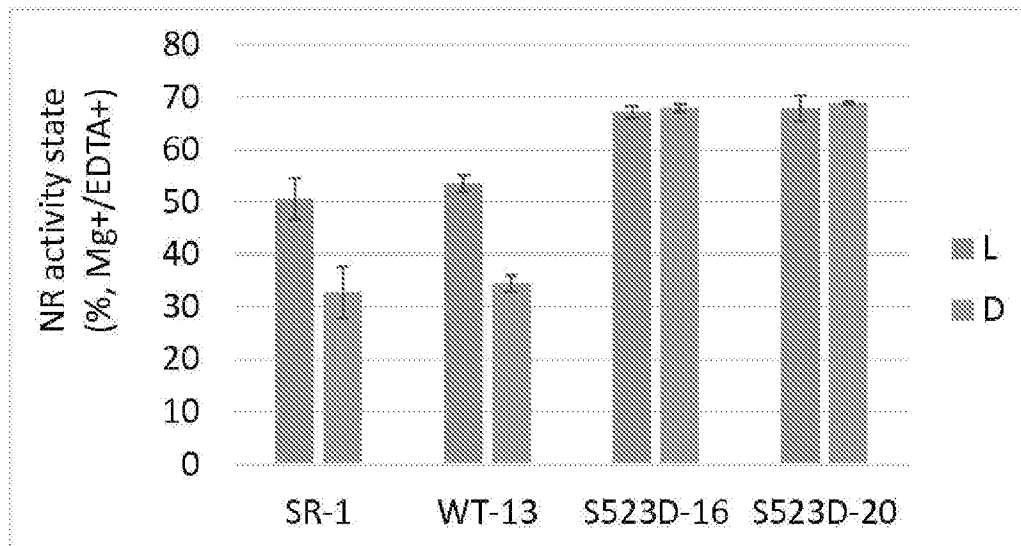


[図4]



n=4

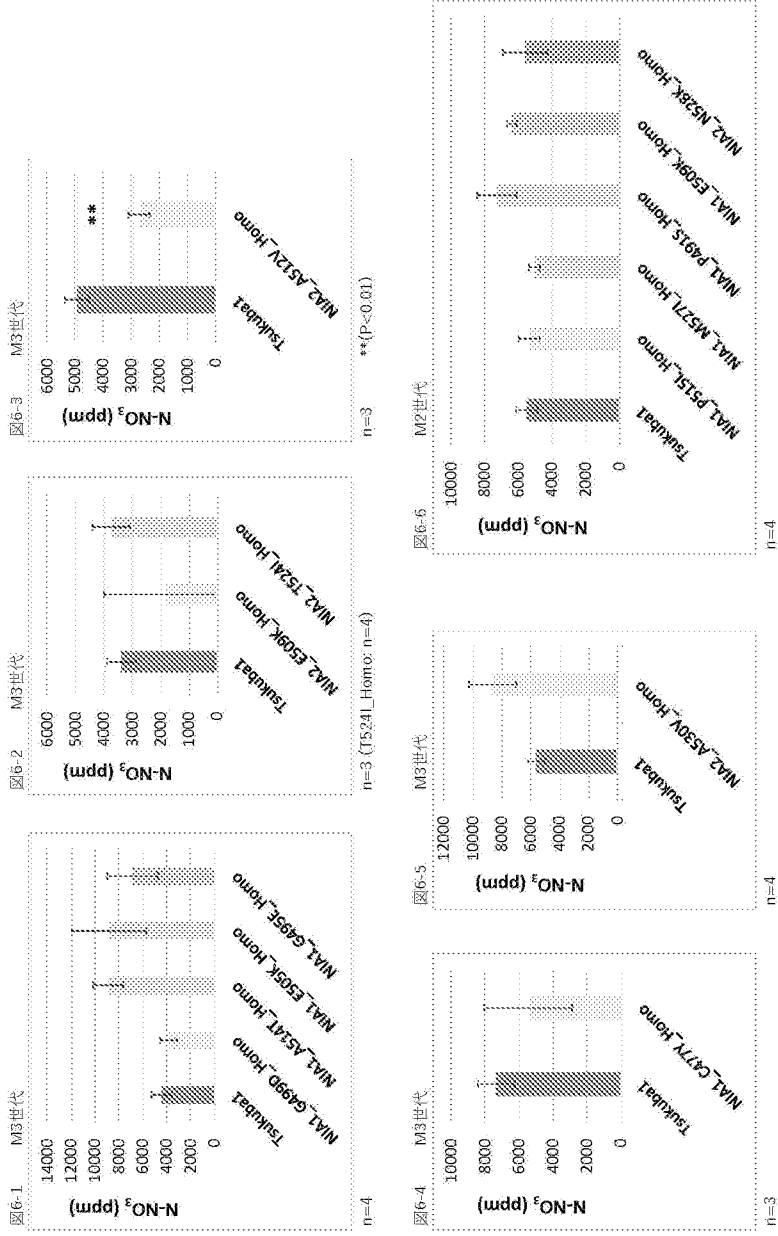
[図5]



n=4

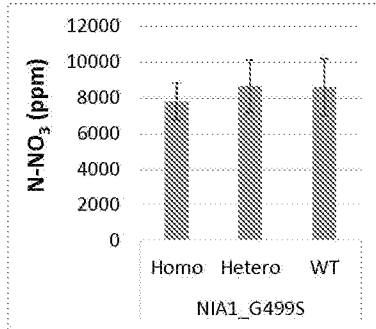
エラーバー：SE

[図6]



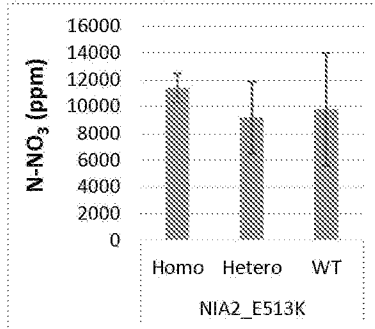
[図7A]

図7-1 M3世代



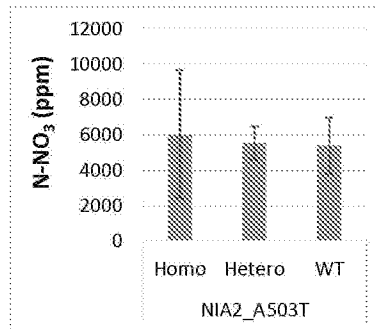
n=4 (Homo:n=3)

図7-2 M3世代



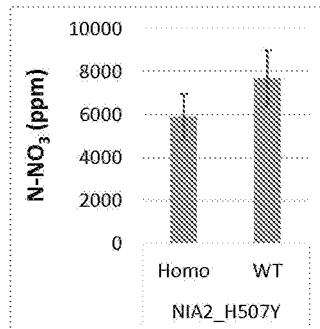
n=3

図7-3 M3世代



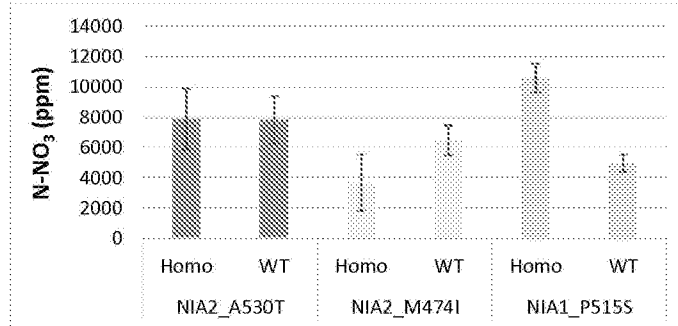
n=3 (Homo: n=4)

図7-4 M3世代



n=3

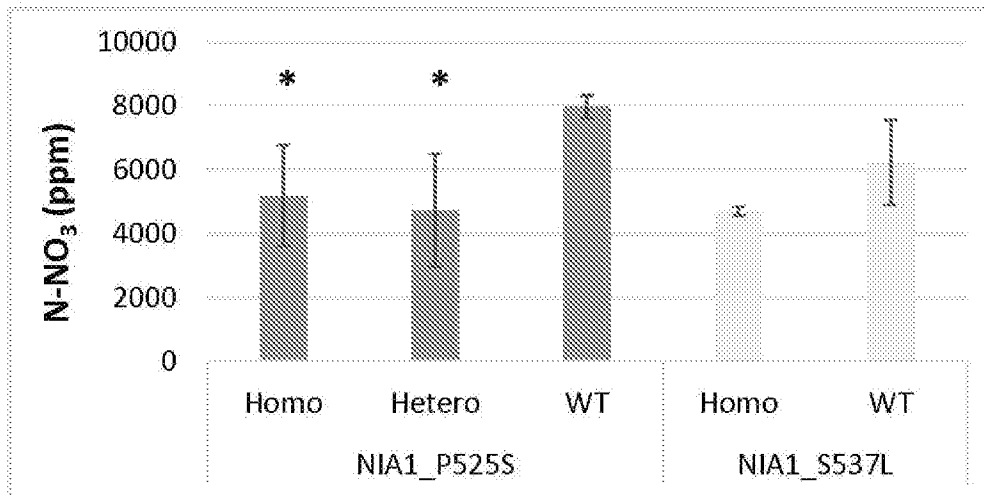
図7-5 M3世代



n=4 (A530T: n=3)

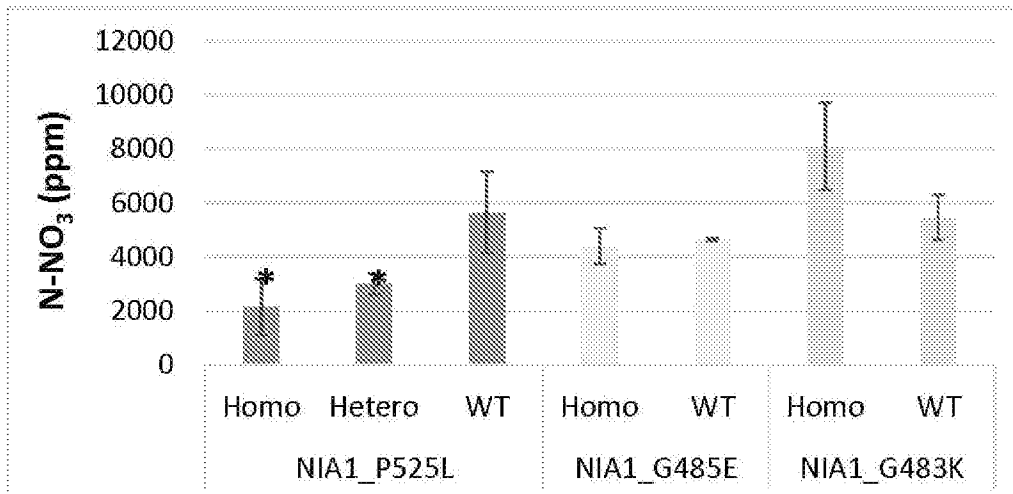
[図7B]

図7-6 M2世代



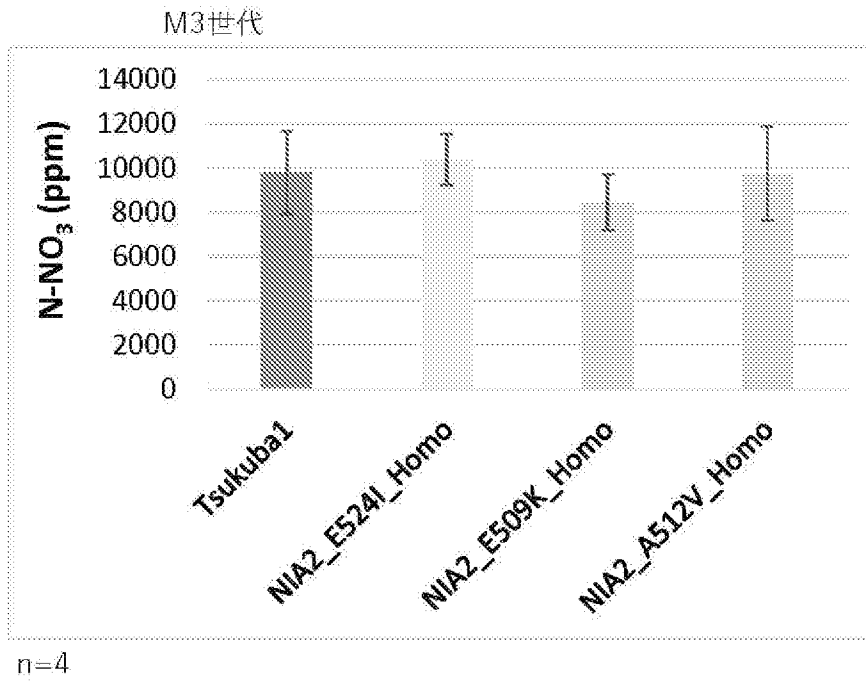
n=4 (P525S), n=3 (S537L) \* (P&lt;0.05)

図7-7 M2世代

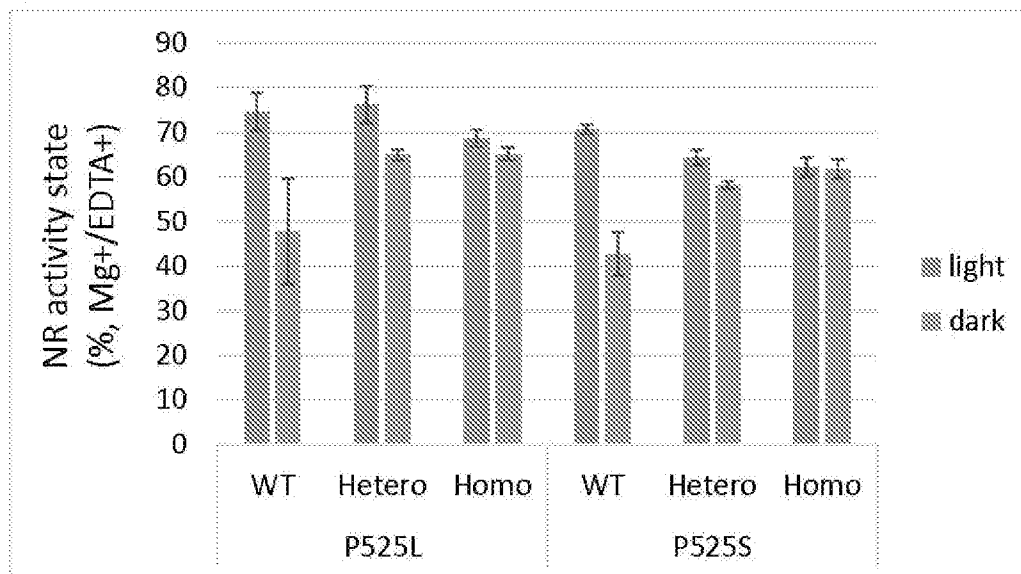


n=4 (P525L), n=3 (G485E, G483K) \* (P&lt;0.05)

[図8]

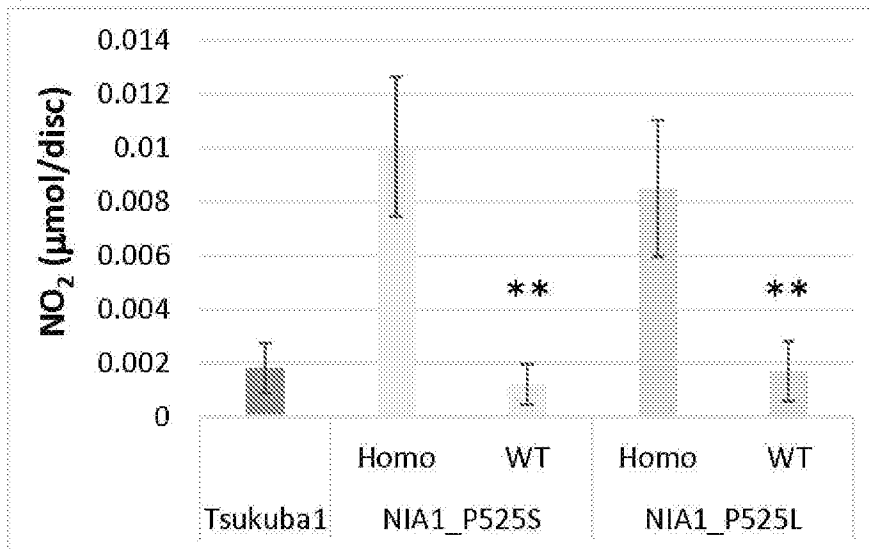


[図9]



n=3 (P525\_Homo: n=2)

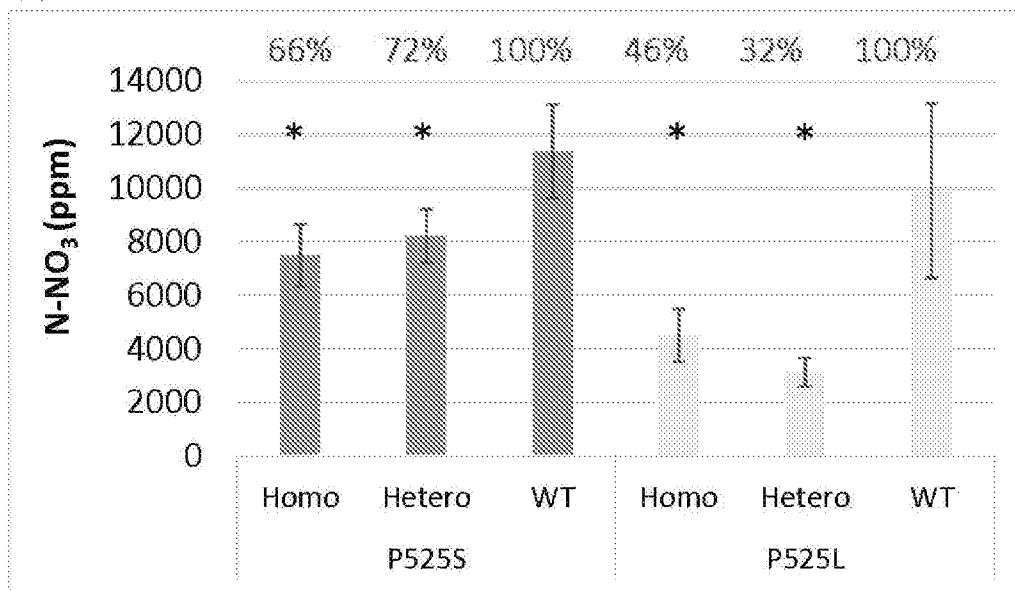
[図10]



n=4

\*\* (P&lt;0.01)

[図11]

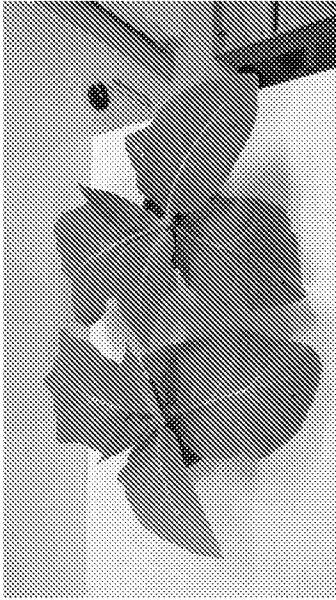


n=4

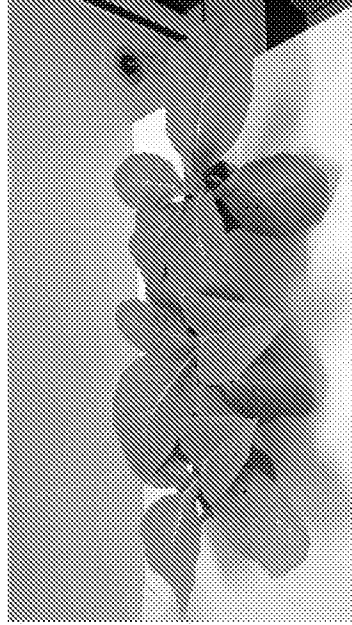
\* (P&lt;0.05)

[図12]

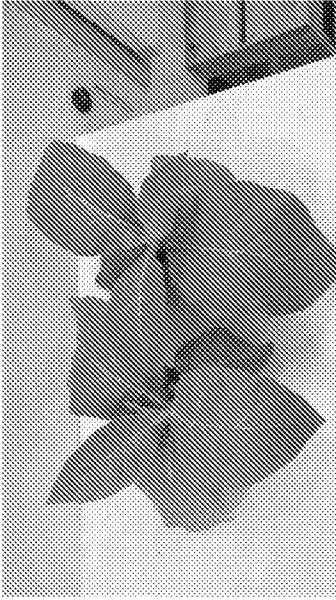
NIA1\_P525S (M3)  
変異ホモ WT



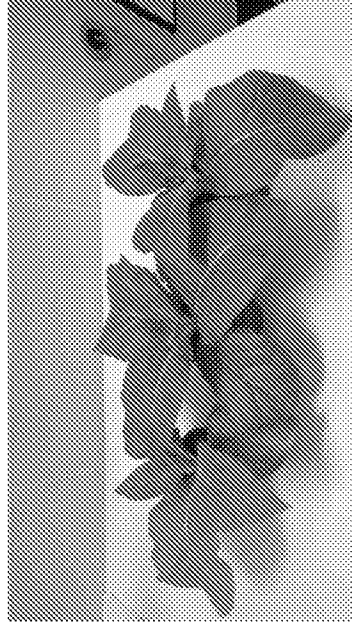
NIA1\_P525S (M3)  
変異ホモ 変異ヘテロ WT



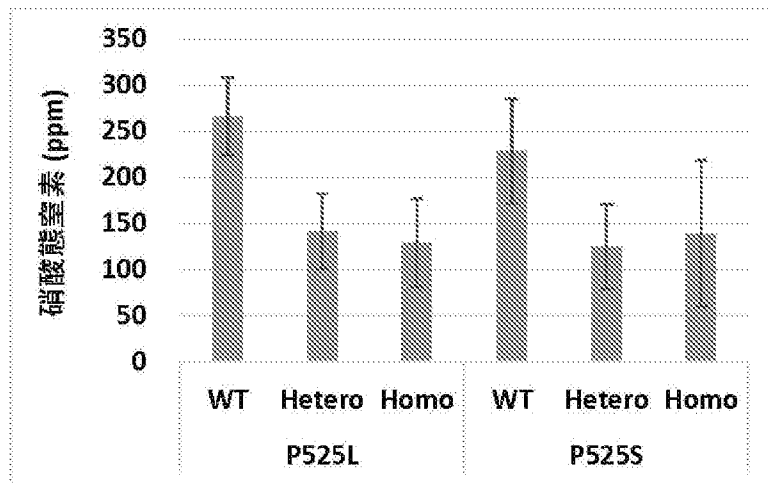
NIA1\_P525L (M3)  
変異ホモ WT




NIA1\_P525L (M3)  
変異ホモ 変異ヘテロ WT

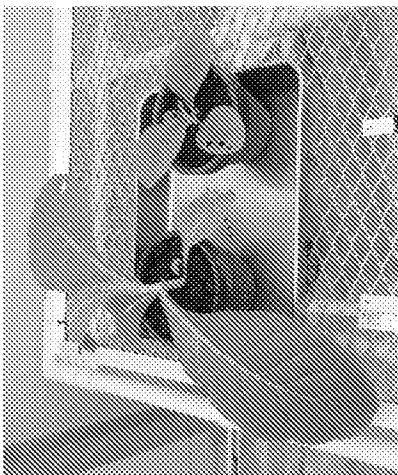


[図13]



[14]

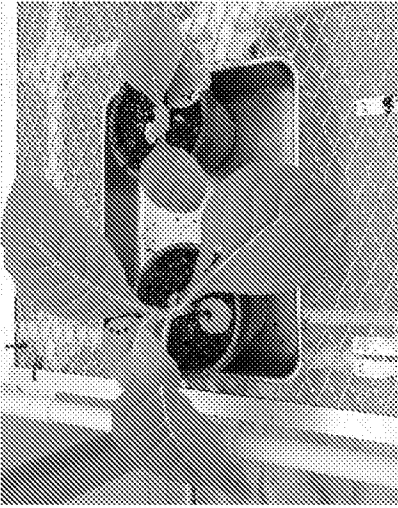
S523D-null\_1 S523D-OE\_1



S523D-null\_2 S523D-OE\_2



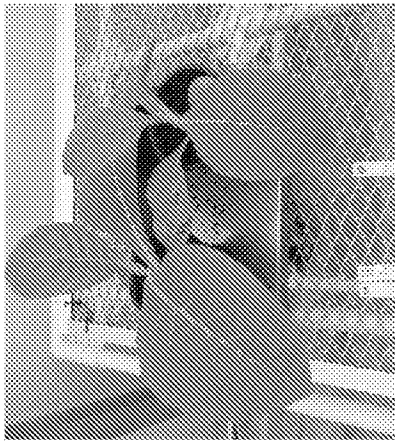
S523D-null\_3 S523D-OE\_3



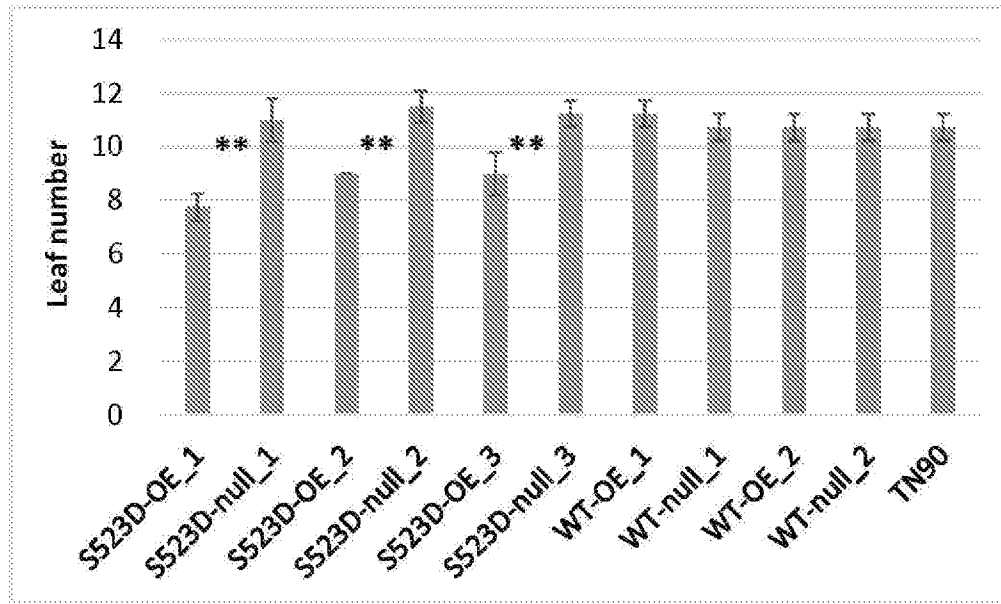
WT-null\_1 WT-OE\_1



WT-null\_1 WT-OE\_1

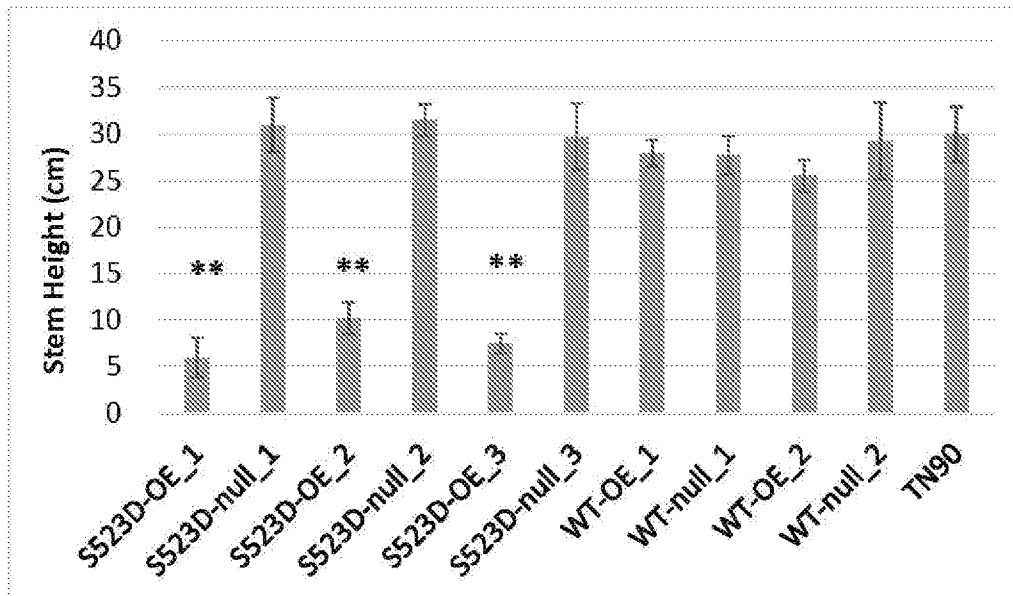


[圖15]

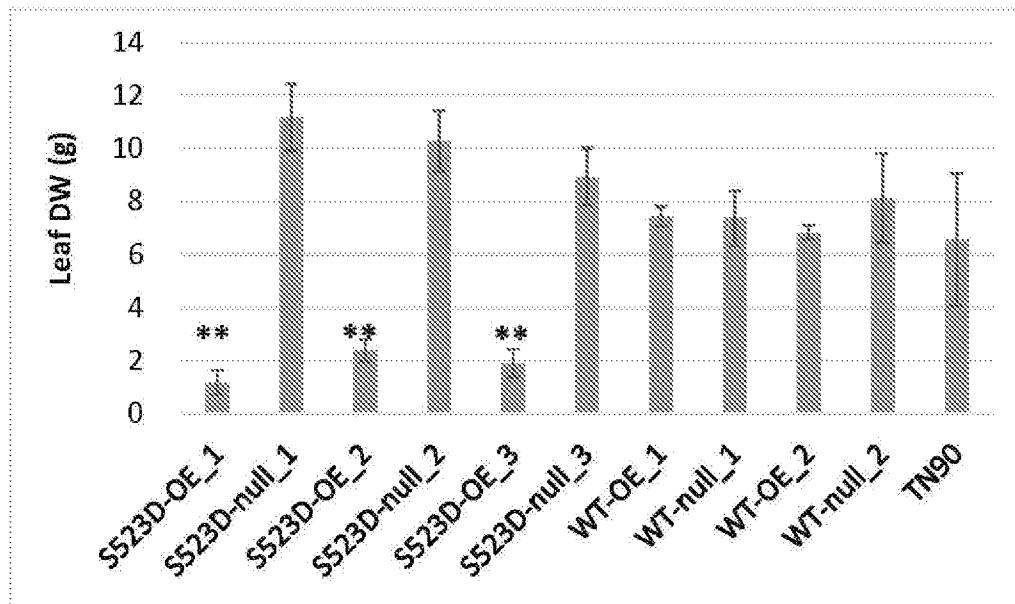


N=4, \*\*P&lt;0.01

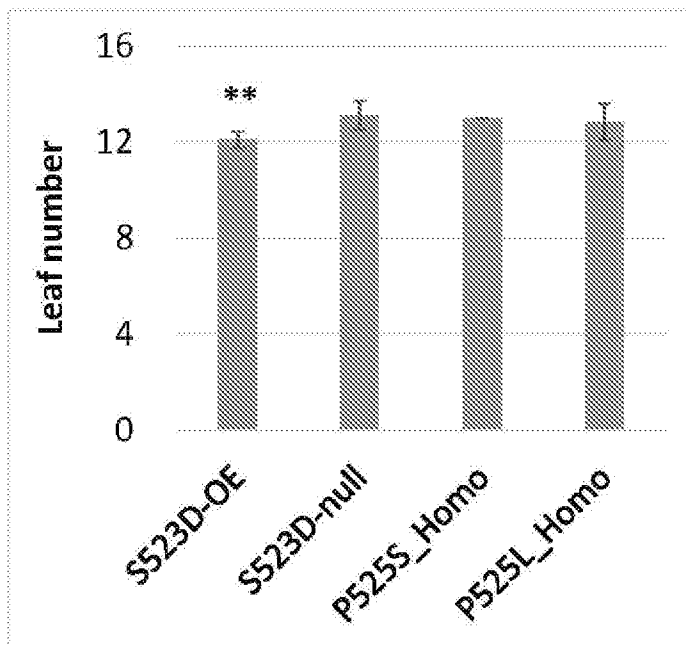
[圖16]



N=4, \*\*P&lt;0.01

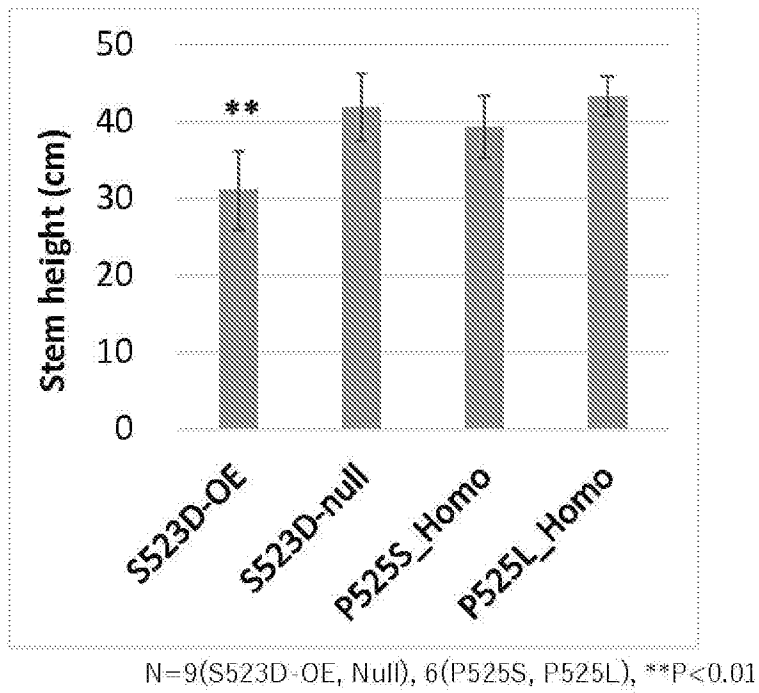
[17]

N=4, \*\*P&lt;0.01.

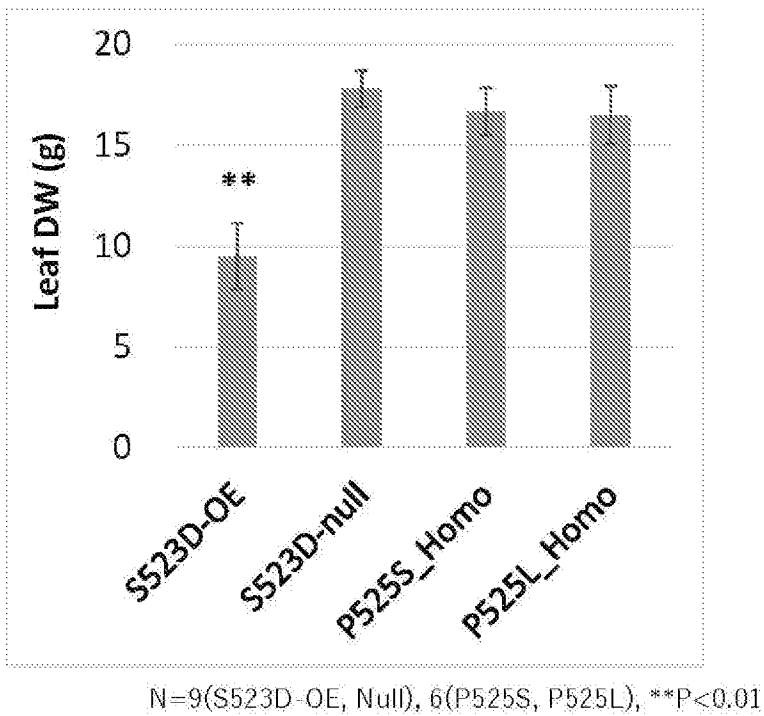
[18]

N=9(S523D-OE, Null), 6(P525S, P525L), \*\*P&lt;0.01

[圖19]



[圖20]



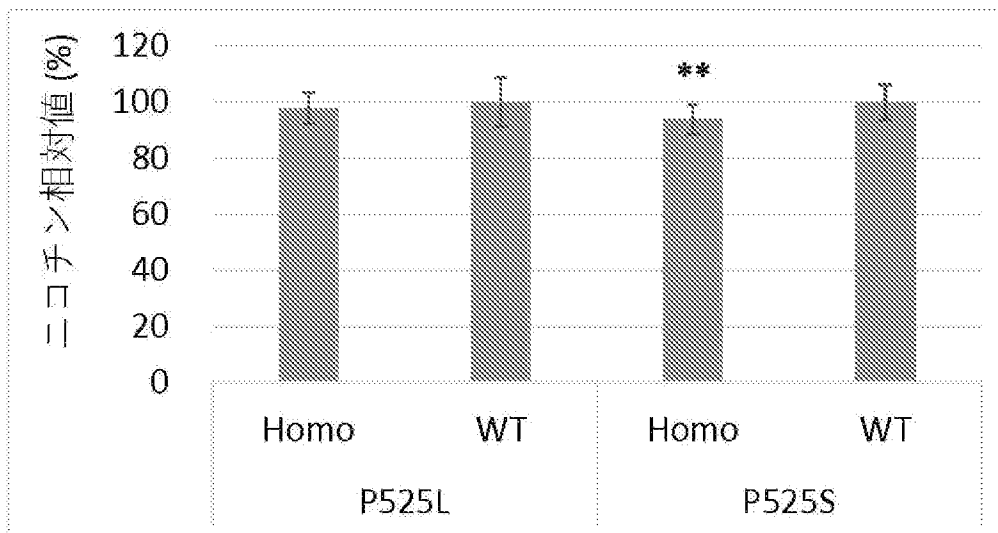
[図21]

## 開花期

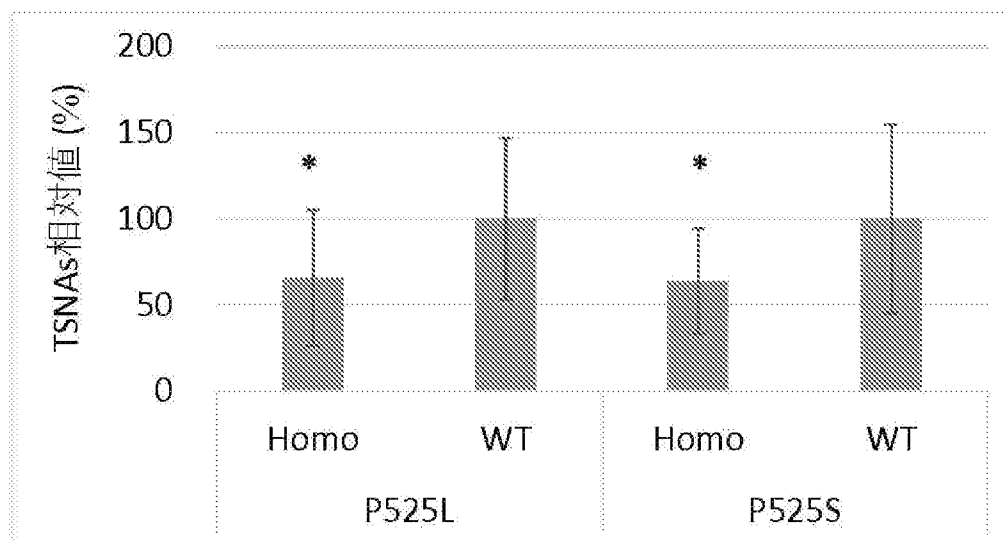


S523D-OE S523D-null  
開花13日前 開花6日後

[図22A]



[図22B]



n=20 (P525Lホモのみ19)

\*P<0.05, \*\*P<0.01

error bar: SD

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/JP2021/045295**

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<i>A01H 6/82</i> (2018.01)i; <i>A01H 5/00</i> (2018.01)i; <i>A24B 15/10</i> (2006.01)i; <i>C12N 15/29</i> (2006.01)n FI: A01H6/82 ZNA; A01H5/00 A; A24B15/10; C12N15/29		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A01H6/82; A01H5/00; A24B15/10; C12N15/29		
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 1971-2022 Registered utility model specifications of Japan 1996-2022 Published registered utility model applications of Japan 1994-2022		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); UniProt/GeneSeq		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2017-529850 A (PHILIP MORRIS PRODUCTS S.A) 12 October 2017 (2017-10-12) entire text	1-14
<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 "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 <b>05 January 2022</b>		Date of mailing of the international search report <b>18 January 2022</b>
Name and mailing address of the ISA/JP <b>Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan</b>		Authorized officer  Telephone No.

**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:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
    - on paper or in the form of an image file.
  - b.  furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
  - c.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
    - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/JP2021/045295**

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 2017-529850 A	12 October 2017	WO 2016/046288 A1	
<hr/> <p style="text-align: center;">entire text</p>			

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） A01H 6/82(2018.01)i; A01H 5/00(2018.01)i; A24B 15/10(2006.01)i; C12N 15/29(2006.01)n FI: A01H6/82 ZNA; A01H5/00 A; A24B15/10; C12N15/29		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） A01H6/82; A01H5/00; A24B15/10; C12N15/29 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2022年 日本国実用新案登録公報 1996-2022年 日本国登録実用新案公報 1994-2022年		
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） CAPlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); UniProt/GeneSeq		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2017-529850 A (フィリップ・モーリス・プロダクツ・ソシエテ・アノニム) 12.10.2017 (2017-10-12) 全文	1-14
.....		
<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。		
* 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、一般的な技術水準を示すもの	“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	
“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	“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	
“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）	“&” 同一パテントファミリー文献	
“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		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
05.01.2022	18.01.2022	
名称及びあて先	権限のある職員（特許庁審査官）	
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	長谷川 強 4N 1783	
	電話番号 03-3581-1101 内線 3446	

## 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
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式
- 紙形式又はイメージファイル形式
- b.  国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c.  国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
- 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)
2.  さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。
3. 補足意見:

国際調査報告  
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2021/045295

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2017-529850 A	12.10.2017	WO 2016/046288 A1 全文	