

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2020-72645

(P2020-72645A)

(43) 公開日 令和2年5月14日(2020.5.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
AO1H 1/00 (2006.01)	AO1H 1/00 Z	2B030
C12N 5/04 (2006.01)	C12N 5/04	4B065

審査請求 未請求 請求項の数 14 O L (全 18 頁)

(21) 出願番号	特願2017-15371 (P2017-15371)	(71) 出願人	000004569 日本たばこ産業株式会社 東京都港区虎ノ門二丁目2番1号
(22) 出願日	平成29年1月31日 (2017.1.31)	(71) 出願人	503359821 国立研究開発法人理化学研究所 埼玉県和光市広沢2番1号
		(71) 出願人	305027401 公立大学法人首都大学東京 東京都新宿区西新宿二丁目3番1号
		(74) 代理人	100140109 弁理士 小野 新次郎
		(74) 代理人	100118902 弁理士 山本 修
		(74) 代理人	100106208 弁理士 宮前 徹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 植物に物質を導入する方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 植物に物質を導入する方法の提供。

【解決手段】 細胞壁形成が不完全である植物生殖細胞に、核酸、タンパク質及びペプチドからなる群から選択される物質を導入する、ことを含む植物に物質を導入する方法。前記方法は、物質の導入の前に、植物生殖細胞に対し植物組織分解酵素による処理を行わない、方法。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞壁形成が不完全である植物生殖細胞に、核酸、タンパク質及びペプチドからなる群から選択される物質を導入する、ことを含む、植物に物質を導入する方法。

【請求項 2】

物質の導入の前に、植物生殖細胞に対し植物組織分解酵素による処理を行わない、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

細胞壁形成率が 65% 以下である、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

植物生殖細胞が、受精卵細胞である、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 5】

(1 - i) 植物の卵細胞と精細胞とを融合して受精卵を作出する、あるいは
 (1 - i i) 植物の受精卵細胞を含む組織から受精卵細胞を単離する、
 ことにより、受精卵細胞を取得し、
 (2) 得られた受精卵細胞に、核酸、タンパク質及びペプチドからなる群から選択される物質を導入する、
 ことを含む、請求項 1 - 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

(1 - i) の卵細胞と精細胞との融合を電気融合により行う、請求項 5 に記載の方法。

20

【請求項 7】

受精卵細胞の取得から、120 分以内に工程 (2) の物質導入を行う、請求項 5 又は 6 に記載の方法。

【請求項 8】

受精卵細胞の取得から、60 分以内に工程 (2) の物質導入を行う、請求項 5 又は 6 に記載の方法。

【請求項 9】

(1) 植物の卵細胞及び精細胞のいずれか若しくは両方に核酸、タンパク質及びペプチドからなる群から選択される物質を導入する、そして、
 (2) 工程 (1) を経た卵細胞と精細胞とを融合して受精卵を作出する、
 ことを含む、請求項 1 - 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 10】

(1) の卵細胞と精細胞との融合を電気融合により行う、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

物質導入が、PEG 法又はエレクトロポレーション法を用いて行われる、請求項 1 - 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

植物が、単子葉植物である、請求項 1 - 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

植物が、トウモロコシ、コムギ、オオムギ、イネ及びソルガムからなる群から選択される、請求項 12 に記載の方法。

40

【請求項 14】

請求項 1 - 16 のいずれか 1 項に記載の方法で得られた、物質導入植物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は植物に物質を導入する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

植物、特に単子葉植物への遺伝子組換え技術は、1990 年代にアグロバクテリウムを

50

利用した方法がイネ、トウモロコシで開発されたことを契機に急速に利用が普及した。現在までに様々な形質転換方法が開発されてきている。しかしながら、それらの多くは、植物組織の脱分化と再分化を経由することが必要であるが故に、種や品種間で形質転換の効率が大きく異なることが知られている。種や品種によっては形質転換の効率が低く、再現性をもって形質転換植物を得ることができない。例えば、トウモロコシにおいて育種上非常に重要な系統であるB73では、再現性を持った形質転換法はいまだ開発されていない。

【0003】

また、近年効率的にゲノム編集を行うことが可能になりつつあるが、これも作物種、品種ごとに組織培養の容易性が異なる点が、ゲノム編集効率に大きな影響を与えるため、実用化の妨げとなっている。

10

【0004】

一方、1990年代に、植物体から精細胞と卵細胞を単離し、それらを人工的に融合させる人工受精 (*in vitro* 受精) が試みられ、植物体の作出に成功している。非特許文献1には、トウモロコシの卵細胞及び精細胞を電気融合して受精卵細胞 (*in vitro* 受精卵) を作出し、それを植物体にまで培養する方法が記載されている。非特許文献1では卵細胞の分離に高濃度の植物組織分解酵素の混合物を用いている。また、非特許文献2には、イネの雌雄配偶子の電気融合により、受精卵を作出し、それを植物体にまで培養する方法が記載されている。植物の人工授精 (*in vitro* 受精系) は、受粉前の花からの配偶子細胞 (卵細胞及び精細胞) の単離、単離した細胞の融合 (受精)、融合細胞 (受精卵) の培養の3つのステップからなる。成功例として代表的なものは、トウモロコシ (非特許文献1) 及びイネ (非特許文献2) であり、コムギ、タバコでも数例の報告がある。一般的に、卵細胞は、受粉前の子房を切断すること、あるいは、セルラーゼやベクチナーゼ等の植物組織分解酵素で処理した子房又は胚珠を顕微鏡下で分解することで得られ、精細胞は適当な浸透圧溶液中で花粉をバーストさせることで得られる。次に、それら雌雄の配偶子をガラスキャピラリーで融合用ドロップに移す。配偶子細胞の融合法については、電氣的融合 (非特許文献1、2)、カルシウムイオンによる融合 (非特許文献3)、ポリエチレングリコール融合 (非特許文献4、5) の3種の方法が報告されている。しかしながら、受精卵が胚へと成長して植物体にまで再生することが報告されているのは、電氣的融合により作出した受精卵についてのみである (非特許文献1、2)。これら先行文献には、人工的に雌雄配偶子を融合させた受精卵細胞から植物体の誘導が可能であることが示されている。しかしながら、受精卵への遺伝子導入や形質転換といった点は全く記載されておらず、*in vitro* 受精卵を用いて形質転換が行えるかどうかは全く不明であった。

20

30

【0005】

トウモロコシ (非特許文献6)、イネ (非特許文献7)、コムギ (非特許文献8)、オオムギ (非特許文献9、11)、タバコ (非特許文献10) などの種において、受精後の子房や胚珠から受精卵をとりだして培養し、植物体を作成した例も知られている。トウモロコシ、オオムギに関する非特許文献6、11は、受精卵細胞にDNAをマイクロインジェクション法により導入したことを記載している。しかしながら、受精卵を対象としたマイクロインジェクション法による植物形質転換法が実用化された事実は報告されていない。また、そのほかの方法による遺伝子導入については全く知見がない。

40

【0006】

マイクロインジェクション法は細胞壁を有する細胞にも遺伝子導入が可能であり、導入対象の植物細胞の細胞壁を植物組織分解酵素処理等により除去する必要は特にない。しかし、一回の導入操作で一細胞しか扱えないという欠点があり、多数の植物細胞を用いた中～大規模な遺伝子導入実験には不向きである。また、検鏡下での複雑な操作を要し、熟練した技術を必要とするため、実用化は困難であった。他に細胞に遺伝子を導入する方法としては、マイクロインジェクション法以外にポリエチレングリコール法 (*polyethylene glycol*: PEG法)、ペプチド法 (非特許文献12)、エレクトロポ

50

レーション法、アグロバクテリウム法などがある。エレクトロポレーション法、ペプチド法やPEG法、特にPEG法は、マイクロインジェクション法に比べ手法が簡便であり、一回に多数の細胞を扱える利点がある。しかしながら、植物の細胞は細胞壁を有していることから、特にPEG法やエレクトロポレーション法を行う際には、セルラーゼやペクチナーゼ、プロテアーゼ、ヘミセルラーゼなどの植物組織分解酵素で組織及び細胞を処理、細胞壁を溶解し、細胞をプロトプラスト化するのが一般的である。このことから、これまで上記の方法では葉、培養細胞、カルスなどの大量にプロトプラストを得ることができる材料が対象となっている。(非特許文献13、14)、

一方、葉、培養細胞、カルスなどと異なり、受精卵は、作出や単離に手間がかかり、大量にプロトプラストを得られない。また、受精直前の卵細胞や精細胞は電気処理やカルシウム溶液添加など融合処理をしなければ分化を開始しない。またそのような*in vitro*受精系で得られた受精卵については、前記の融合処理のような人工的受精操作により細胞に何らかの損傷が発生している可能性が考えられている。さらに、受精卵細胞については、細胞壁除去後に細胞分裂を継続し植物体に成長できるような細胞活性を維持した状態で、細胞壁を受精卵から除去する方法が不明であった。このような事情から、卵細胞、精細胞や受精卵細胞については遺伝子を導入する対象として相応しくないと推察されており、PEG法等の方法により遺伝子導入を行い、細胞分裂にまで至らせた報告はなされていなかった。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】特開2016-63785(特許文献1)

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Kranz E. and Lorz H., (1993), *Plant Cell* 5:739-746.

【非特許文献2】Uchiumi, T. et al., (2007), *Planta* 226:581-589.

【非特許文献3】Faure, JE et al., (1994), *Science* 263:1598-1600.

【非特許文献4】Sun, MX et al., (1995), *Acta Bot Sin* 36:489-493.

【非特許文献5】Tian, HQ and Russell, SD (1997), *Plant Cell Rep* 16:657-661.

【非特許文献6】Leduc, N. et al., (1996), *Developmental Biology* 177:190-203.

【非特許文献7】Zhang, J. et al., (1999), *Plant Cell Reports* 19:128-132.

【非特許文献8】Kumlehn, J. et al., (1997), *Plant Cell Reports* 16:663-667.

【非特許文献9】Holm, P. B. et al., (1994), *The Plant Cell* 6:531-543.

【非特許文献10】Yuchi, H.E. et al., (2004), *Chinese Science Bulletin* 49:810-814.

【非特許文献11】Holm, P. B. et al., (2000), *Transgenic Research* 9:21-32.

【非特許文献12】Laksmanan, M. et al., (2012), *Biomacromolecules* 14, 10-16.

【非特許文献13】Yoo et al. (2007), *Nature Protocols* 2:1565-1572.

10

20

30

40

50

【非特許文献14】Zhai et al. (2009), Plant Physiology 149: 642-652.

【非特許文献15】Kranz et al., (1995), Plant Journal 8: 9-23.

【非特許文献16】Toda et al., (2016), Plant Physiology 171: 206-214.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明は、植物に物質を導入する方法、本発明の方法によって物質が導入された植物を提供することを目的とする。 10

受精卵は本来、植物体へと成長する能力を保有した細胞であり、それゆえ、種、品種間差によって生じる培養効率の影響を受けないことが期待される。接合子である受精卵細胞、あるいは、配偶子である卵細胞又は精細胞を対象に物質の導入を行えば、現状より幅広い種、作物に例えば形質転換、ゲノム編集などの処理を行うことが可能になる。本発明者らは鋭意検討の結果、植物組織分解酵素処理を行うことなく受精卵細胞に対し物質を導入可能である方法を発見した。さらに、単離した受精卵細胞を培養する方法を組み合わせることにより、植物組織分解酵素処理等を行うことなく受精卵細胞に対し物質を導入し、分裂を誘導し、形質転換が可能であることを見出し、本発明を想到した。

【課題を解決するための手段】 20

【0010】

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]

細胞壁形成が不完全である植物生殖細胞に、核酸、タンパク質及びペプチドからなる群から選択される物質を導入する、ことを含む、植物に物質を導入する方法。

[態様2]

物質の導入の前に、植物生殖細胞に対し植物組織分解酵素による処理を行わない、態様1に記載の方法。

[態様3]

細胞壁形成率が65%以下である、態様1又は2に記載の方法。 30

[態様4]

植物生殖細胞が、受精卵細胞である、態様1に記載の方法。

[態様5]

(1-i)植物の卵細胞と精細胞とを融合して受精卵を作出する、あるいは

(1-ii)植物の受精卵細胞を含む組織から受精卵細胞を単離する、

ことにより、受精卵細胞を取得し、

(2)得られた受精卵細胞に、核酸、タンパク質及びペプチドからなる群から選択される物質を導入する、

ことを含む、態様1-4のいずれか1項に記載の方法。

[態様6] 40

(1-i)の卵細胞と精細胞との融合を電気融合により行う、態様5に記載の方法。

[態様7]

受精卵細胞の取得から、120分以内に工程(2)の物質導入を行う、態様5又は6に記載の方法。

[態様8]

受精卵細胞の取得から、60分以内に工程(2)の物質導入を行う、態様5又は6に記載の方法。

[態様9]

(1)植物の卵細胞及び精細胞のいずれか若しくは両方に核酸、タンパク質及びペプチドからなる群から選択される物質を導入する、そして、 50

(2) 工程(1)を経た卵細胞と精細胞とを融合して受精卵を作出する、
ことを含む、態様1-4のいずれか1項に記載の方法。

[態様10]

(1)の卵細胞と精細胞との融合を電気融合により行う、態様9に記載の方法。

[態様11]

物質導入が、PEG法又はエレクトロポレーション法を用いて行われる、態様1-10
のいずれか1項に記載の方法。

[態様12]

植物が、単子葉植物である、態様1-11のいずれか1項に記載の方法。

[態様13]

植物が、トウモロコシ、コムギ、オオムギ、イネ及びソルガムからなる群から選択され
る、態様12に記載の方法。

[態様14]

態様1-16のいずれか1項に記載の方法で得られた、物質導入植物。

【発明の効果】

【0011】

従来、電気融合処理等により *in vitro* で作成した受精卵では、PEG法による
形質転換は適さない、と思われていた。本発明では、「細胞壁形成が不完全である植物生
殖細胞」を利用することにより、細胞に対する植物組織分解酵素処理を行わずに、物質の
導入、形質転換及び培養を行うことができる。本発明により、従来培養が困難等の理由で
形質転換が困難であったため有用形質を付与することができなかつた植物体であっても、安
定して再現性良く形質転換体を得ることが可能となった。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】図1は、イネ花から単離した卵細胞(上段)及び精細胞(下段)の光学顕微鏡写
真である。

【図2】図2は、図1の雌雄配偶子(卵細胞及び精細胞)の融合の過程と、作出された受
精卵(*in vitro* 受精卵)の光学顕微鏡写真である。

【図3】図3は、PEG法によるGFP核酸導入後、分裂を開始したイネ受精卵細胞の蛍
光顕微鏡写真である。図3Aは、配偶子融合の24時間後に蛍光観察(左)及び明視野観
察(右)を行ったものである。図3Bは、配偶子融合の2日後に蛍光観察(左)及び明視
野観察(右)を行ったものである。

【図4】図4は、GFP核酸導入を行ったイネ受精卵細胞由来の細胞塊の蛍光及び光学顕
微鏡写真である。配偶子融合後、18日後に蛍光観察(左)及び明視野観察(右)を行っ
た。受精卵から蛍光が継続して観察されるのものと(A)、蛍光が検出されなくなるもの
が観察された(B)。

【図5】図5は、GFP核酸導入を行ったイネ受精卵細胞由来の細胞塊から発生したシュ
ートの光学顕微鏡写真である。

【図6】図6は、図5の細胞塊から発生したシュート由来の幼植物体である。

【発明を実施するための形態】

【0013】

本発明は、植物に物質を導入する方法に関する。

本発明の方法は、細胞壁形成が不完全である植物生殖細胞に、核酸、タンパク質及びペ
プチドからなる群から選択される物質を導入する、ことを含む。

【0014】

一態様において、当該方法は、

(1-i) 植物の卵細胞と精細胞とを融合して受精卵を作出する、あるいは

(1-ii) 植物の受精卵細胞を含む組織から受精卵細胞を単離する、

ことにより、受精卵細胞を取得し、

(2) 得られた受精卵細胞に、核酸、タンパク質及びペプチドからなる群から選択され

10

20

30

40

50

る物質を導入する、
ことを含む。

【0015】

一態様において、当該方法は、

(1) 植物の卵細胞及び精細胞のいずれか若しくは両方に核酸、タンパク質及びペプチドからなる群から選択される物質を導入する、そして、

(2) 工程(1)を経た卵細胞と精細胞とを融合して受精卵を作出する、
ことを含む。

【0016】

植物

植物の種類は特に限定されるものではない。双子葉植物及び単子葉植物のいずれでもよく、好ましくは単子葉植物である。さらに好ましくは、トウモロコシ、コムギ、オオムギ、イネ、ソルガム、ライムギ等であり、最も好ましくは、トウモロコシ、コムギ、イネである。

【0017】

本発明の方法は、限定されるわけではないが、特に、「難培養」とされる植物あるいは品種に用いることが可能である。「難培養」とは、培養が困難、具体的には、例えば、植物体から単離された細胞の培養が困難、脱分化等の処理によるカルスの形成や、カルスからの植物体への再分化が困難である、ことを意味する。

【0018】

一般的に双子葉植物よりも単子葉植物の方が培養困難だが、「難培養」の植物は、例えば、大豆、インゲンマメ、トウガラシ等を含む。難培養品種とは、同じ種の一般的な研究用品種(トウモロコシならA188など)と比べ、培養が困難である品種を意味する、例えば、トウモロコシのB73及びB73を由来に持つトウモロコシのエリート品種、コムギのエリート品種(例えばAC BarrieやTAMなど)、オオムギのGolden PromiseとIgrri以外の品種、ソルガムの296B、C401、SA281、P898012、Pioneer 8505、Tx430以外の品種などが挙げられる。

【0019】

植物生殖細胞

本発明の方法は、植物の生殖細胞に物質を導入する。

生殖細胞は、生殖において遺伝情報を次世代へ伝える役割を持つ細胞で、多細胞生物を構成する細胞のうち、体細胞以外の細胞をいう。本明細書において、「生殖細胞」は、卵細胞(「卵」、「卵子」ともいう)、精細胞(「精子」ともいう)を含む、有性生殖のための配偶子、並びに、配偶子の接合の結果によって出来た細胞である接合子(「接合体」ともいう)、植物の場合は、受精によって形成される受精卵を含む。

【0020】

生殖細胞は、受精卵、卵細胞、精細胞のいずれであってもよい。好ましくは受精卵である。非限定的に、受精卵は、あるいは、受粉・受精前の植物体から卵細胞及び精細胞を単離したのち、それらを融合させて受精卵細胞を作出及び取得したものが好ましい。あるいは、受精卵細胞は、植物の胚嚢を含む組織から単離される受精した卵細胞である、即ち、植物体の段階で受粉・受精させ、該植物体から単離した受精卵細胞、であってもよい。なお、非限定的に、本発明は遺伝子導入・組換えによる形質転換、ゲノム編集などのための植物細胞への物質導入、特に遺伝子導入を目的とするため、半数体である受精前の精細胞及び卵細胞より、倍数体でありゲノム配列が決定した受精卵を用いるほうが好ましい。

【0021】

本明細書において「卵細胞」とは、雌ずいの中において、胚嚢母細胞の減数分裂により形成される雌性配偶子を意味する。卵細胞の単離方法は限定されないが、例えば、適切な浸透圧の溶液中において子房を切断し、その切断面から出てきた卵細胞を顕微鏡下においてガラスキャピラリーを用いて単離することができる。

【0022】

10

20

30

40

50

本明細書において「精細胞」とは、雄ずいの葯の中において、花粉母細胞の減数分裂により形成される雄性配偶子を意味する。精細胞の単離方法は限定されないが、例えば、適切な浸透圧の溶液に葯から採取した花粉を浸すと、数分後には、花粉から精細胞を含む花粉内容物が溶液中に放出されるので、顕微鏡下においてガラスキャピラリーを用いて精細胞を単離することができる。

【0023】

本明細書において「受精卵細胞」とは、精細胞と卵細胞とが融合した細胞を意味する。

受精卵細胞の取得方法（卵細胞及び精細胞の融合）

本発明の一態様において、植物の卵細胞と精細胞を *in vitro* で融合して受精卵を作出してもよい。即ち、植物体より先ず卵細胞と精細胞を単離し、電気融合法等の公知の方法により、*in vitro* で受精卵細胞を作出することが可能である（配偶子融合ともいう）。

10

【0024】

電気融合法は、電気刺激により2種又は2種以上の細胞を *in vitro* で融合する方法である。具体的には、適切な浸透圧の溶液中において単離した卵細胞及び精細胞に、電気パルスを加えることで細胞融合を引き起こす。

【0025】

電気融合により細胞融合を行う場合、電圧、電極間距離等の条件は、植物の種類又は細胞の大きさ等に応じて当業者が適宜決めることができる。例えば、特開2016-63785（特許文献1）に記載の条件を適用することができる。

20

【0026】

精細胞と卵細胞とを融合させる際の直流電圧は、下限を10kV以上にすることが好ましく、11kV以上にすることがより好ましく、12kV以上にすることがさらに好ましい。また、上限を17kV以下にすることが好ましく、16kV以下にすることがより好ましく、15kV以下にすることがさらに好ましい。上限と下限は、当業者がそれぞれ適宜選択することができる。

【0027】

精細胞又は卵細胞を電気融合して1つの融合細胞を作製する際、電極間距離は、下限を、融合させる卵細胞と精細胞の直径の和の1.5倍以上にすることが好ましく、2倍以上にすることがより好ましく、2.5倍以上にすることがさらに好ましく、3倍以上にすることが最も好ましい。また、上限を6倍以下にすることが好ましく、5倍以下にすることがより好ましく、4倍以下にすることがさらに好ましい。上限と下限は、当業者がそれぞれ適宜選択することができる。細胞の直径を測定する方法としては、顕微鏡に装着した測微接眼レンズを用いて直径を測定する方法や、顕微鏡で撮影した画像をコンピュータに取り込み、画像解析ソフトウェアで測定する方法がある。

30

【0028】

精細胞と卵細胞を電気融合する際の電極間距離は、当業者が適宜選択することができる。例えば、下限を80 μ m以上とすることが好ましく、90 μ m以上とすることがより好ましく、100 μ m以上とすることがさらに好ましい。また、上限を240 μ m以下とすることが好ましく、220 μ m以下とすることがより好ましく、200 μ m以下とすることがさらに好ましい。上限と下限は、当業者がそれぞれ適宜選択することができる。

40

【0029】

精細胞と卵細胞を電気融合する際の溶液の浸透圧は、下限を400mosmol/kg H₂O以上とすることが好ましく、410mosmol/kg H₂O以上とすることがより好ましく、420mosmol/kg H₂O以上とすることがさらに好ましい。また、上限を500mosmol/kg H₂O以下とすることが好ましく、480mosmol/kg H₂O以下とすることがより好ましく、470mosmol/kg H₂O以下とすることがさらに好ましい。上限と下限は、当業者がそれぞれ適宜選択することができる。

【0030】

50

あるいは、卵細胞と精細胞の細胞融合には、カルシウム融合法、PEG融合法等の他の公知の細胞融合方法を用いてもよい。「カルシウム融合法」は、カルシウム濃度依存的に細胞膜の融合が生じやすくなる、という細胞膜の性質を利用するものである。「PEG融合法」は、細胞をポリエチレングリコール (polyethylene glycol、PEG) で処理することによって細胞膜が結合し、PEGを取り除くと細胞が融合することを利用するものである。

【0031】

あるいは、自然受精法により植物体において受精卵細胞を作出し、作成された受精卵細胞を植物体から取得してもよい。自然受精法を用いた受精卵細胞の取得方法は、例えば、柱頭を露出させ、花粉を付着させ受粉させたのち、胚嚢を含む組織から受精卵を単離する方法である。植物体からの受精卵細胞の単離は、受粉後の植物体から受精直後の子房を取り出し、適切な浸透圧の溶液中においてその子房を切断し、その切断面から出て来た受精卵を顕微鏡下においてガラスキャピラリー等を用いて単離することができる。あるいは、酵素溶液で子房又は胚珠を一定時間処理した後に、例えば、ガラス針等を用いて顕微鏡下において珠心等の組織を解剖し摘出、単離することもできる。

10

【0032】

物質の導入

本発明の植物に物質を導入する方法は、「細胞壁形成が不完全である植物生殖細胞」に核酸、タンパク質及びペプチドからなる群から選択される物質を導入する、工程)を含む。

20

【0033】

本発明において、植物に導入される物質は、核酸、タンパク質及びペプチドからなる群から選択される。核酸は特に限定されず、RNA、DNA、両者の結合体、混合物であってもよい。好ましくはベクターのような環状DNA、直鎖DNA、環状RNA又は直鎖RNAである。使用される形質転換方法に応じた任意の長さのものを使用可能である。例えば、PEG法を用いる場合、核酸の長さは、好ましくは100kb以下、より好ましくは、50kb以下である。さらに好ましくは30kb以下、特に好ましくは20kb以下、もっとも好ましくは10kb以下である。

【0034】

ゲノム編集のためのCas9ヌクレアーゼ等ヌクレアーゼや、修飾酵素、抗体等のタンパク質も導入しうる。タンパク質の大きさは、非限定的に、好ましくは分子量300kDa以下、より好ましくは200kDa以下、さらに好ましくは150kDa以下である。

30

【0035】

ペプチドは、決まった順番で様々なアミノ酸が、アミド結合(「ペプチド結合」ともいう)つながった分子の総称で、一般にタンパク質よりも長さが短い。好ましくは、100a.a.以下、より好ましくは、50a.a.以下である。

【0036】

2種類以上の核酸、タンパク質及びペプチドを導入してもよい。核酸は、2種類以上のDNA又はRNAでも、DNAとRNAの組み合わせでもよい。核酸とタンパク質など異なる種の物質を導入してもよい。

40

【0037】

物質を植物に導入する方法は、植物に所望の物質を導入することのできる公知の方法ならば特に限定されず、植物の種類に応じて適宜選択することができる。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的方法(DNAの間接導入法)を好ましく用いることができる。好ましくは直接導入法、さらに好ましくはPEG法又はエレクトロポレーション法であり、最も好ましくはPEG法である。

【0038】

PEG法とは、プロトプラストにポリエチレングリコール(PEG)を作用させて、D

50

NA等物質を植物細胞内部に取り込ませる方法であるが、この物質取り込みの仕組みはまだ良く分かっていない。PEG法については、例えば、非特許文献13などに記載されているように、公知のプロトコールに従って実施することができる。非限定的にPEG濃度は、10%~30%とすることができる。

【0039】

エレクトロポレーション法は、細胞懸濁液に電気パルスをかけることで細胞膜に微小な穴を空け、細胞懸濁液中のDNAを細胞内部に送り込むことで、形質転換する方法である。植物細胞を材料とする場合には、細胞壁を分解除去したプロトプラストを用いるのが一般的である。しかし、細胞壁を有する細胞を用いて形質転換をすることも可能であり、これはエレクトロインジェクション法と呼ばれている。

10

【0040】

なお、PEG法、エレクトロポレーション法やエレクトロインジェクション法では、2種類以上のDNA等物質を懸濁液中に溶解し、植物細胞存在下でPEG添加又は電気パルスをかけることにより、共形質転換を行うことができる。

【0041】

細胞壁形成が不完全である植物生殖細胞

本発明の植物に物質を導入する方法において、「細胞壁形成が不完全である植物生殖細胞」に核酸、タンパク質及びペプチドからなる群から選択される物質を導入する。

【0042】

本発明は、「細胞壁形成が不完全である植物生殖細胞」を利用することにより、物質の導入の前に、植物生殖細胞に対し植物組織分解酵素による処理を行わない、行う必要がない、ということの特徴の1つとする。

20

【0043】

植物組織分解酵素とは、植物組織及び細胞周辺のペクチン、セルロース、ヘミセルロース、そのほかのマトリックス多糖、リン脂質、タンパク質等に直接あるいは間接的に作用して分解する酵素の総称である。例えば、ペクチナーゼ、セルラーゼ、プロテアーゼ、ヘミセルラーゼ類等及びそれらの混合物が挙げられる。しかし、それら植物組織分解酵素による植物細胞の処理は、細胞の生存率に悪影響を与える場合があり、植物組織培養の困難性の原因の一つとなることがあった。本発明において、植物細胞に対する植物組織分解酵素処理を行わずに、培養、物質の導入及び形質転換を行うことが可能となったことにより、従来培養が困難等の理由で形質転換が困難であったため有用形質を付与することができなかった植物体であっても、安定して再現性良く形質転換体を得ることが可能である。

30

【0044】

なお、本明細書において、「植物生殖細胞に対する植物組織分解酵素による処理」とは、植物生殖細胞をPEG法など遺伝子導入等のためのプロトプラスト化処理を目的に行う処理を含み、単に、子房など胚嚢を含む組織から植物生殖細胞を単離することのみを目的に行う処理（通常は、非常に低い濃度の酵素溶液を用いる）は含まないことが望ましい。単に、植物生殖細胞の単離のために非常に低い濃度の酵素溶液を用いるような態様は、本発明に含まれる。

【0045】

「細胞壁形成が不完全である細胞」とは、植物体細胞のように原形質連絡以外の細胞のほぼすべてが細胞壁で囲まれている細胞ではなく、細胞の一部あるいは全部が細胞壁に囲まれていない細胞である。細胞壁形成が不完全である植物生殖細胞は、卵細胞、精細胞を含む、有性生殖のための配偶子を含む。あるいは、受精によって形成される受精卵であって、細胞壁形成が開始していない、あるいは、細胞壁形成が開始しているがまだ完了しておらず、不完全である状態の受精卵細胞を含む。好ましくは、細胞壁形成が不完全である受精卵細胞である。

40

【0046】

植物生殖細胞の細胞壁形成は、例えば、カルコフロールによるセルロース染色、アニリンブルー染色等の公知の方法で確認することができる。カルコフロールは、植物細胞、真

50

菌等の細胞壁に含まれるセルロースやキチンと結合する非特異的蛍光染料である。励起は300～440nm(最大355nm)であり、0.1Mリン酸緩衝液pH7.0中のセルロースの最大蛍光は、433nmである。非限定的に、例えば、共焦点レーザー走査顕微鏡を用いて蛍光輝度を測定することができ、また蛍光強度の画像解析を行い、積算輝度を求めることができる。

【0047】

「細胞壁形成率」とは、非限定的に、例えば、植物細胞の細胞壁形成が完全に終了し、細胞全体が細胞壁で覆われている状態の細胞の輝度と比較した場合の、輝度の比率で表現することができる。「細胞壁形成が不完全である」とは、非限定的に、細胞壁形成率が、好ましくは80%以下、より好ましくは70%以下、さらに好ましくは65%以下、さら

10

【0048】

本発明の一態様において、植物生殖細胞として受精卵細胞を用いることができる。その場合、(1-i)植物の卵細胞と精細胞とを融合して受精卵を作出する、あるいは、(1-ii)植物の受精卵細胞を含む組織から受精卵細胞を単離する、ことにより、受精卵細胞を取得した後に、(2)得られた受精卵細胞に物質を導入する。

【0049】

卵細胞は、受精前は通常の状態の細胞壁を有し、卵細胞と精細胞とが融合するとはじめて完全な細胞壁が形成される。細胞壁が形成されると物質導入処理を行うために細胞壁を除去する必要がある。よって、物質導入操作は、受精後速やかに、細胞壁の形成完了前に行うことが好ましい。一般に、受精から20分程度で細胞壁の形成が始まり、約2時間程度でその形成が完了するとされているため、2時間(120分)以内に物質導入を行うことが好ましい。また、受精卵細胞を胚珠等から単離する場合も、受精卵細胞の単離後速やかに物質導入操作を行うことが好ましい。

20

【0050】

受精卵細胞の細胞壁形成が完了するまでの時間は、植物品種によって異なる。本発明の方法においては、「細胞壁形成が不完全である細胞」、即ち、受精卵細胞の細胞壁形成が完了する前の細胞に物質を導入する。当業者は、受精卵細胞取得から物質導入完了までの時間を、植物品種の種類に応じて適宜決定することができる。例えばイネ、トウモロコシ

30

【0051】

自然受精法により植物体において受精卵細胞を作出する場合、受精直後の受精卵を得る方法として、受粉から受精までの時間帯を特定し、受精後その特定した時間帯に受精卵を摘出することが好ましい。例えば、事前に受粉した花粉の花粉管の伸長速度を継続的にアニンブルー等の染色液を用いた蛍光観察を行えば、受粉から受精までの時間を推定することが可能である。

40

【0052】

あるいは、卵細胞と精細胞の接合を行う前に、卵細胞及び精細胞のいずれか若しくは両方に物質を導入し、その後、卵細胞と精細胞とを融合して受精卵を作出してもよい。好ましくは、卵細胞に物質を導入する。

【0053】

カルス又は胚様体(細胞塊)化・再分化

本発明の、植物に物質を導入する方法は、物質を導入する工程の後に、さらに、物質を導入した受精卵細胞をカルス化又は胚様体化し；そして、上記カルス化又は胚様体化した組織を再分化培地で再分化させる、ことを含んでもよい。

【0054】

50

カルス化又は胚様体化工程、及び、再分化工程は特に限定されず、受精卵細胞から植物体を再生するための公知の方法を利用することが可能である。

カルス化又は胚様体化工程において、得られた物質導入受精卵細胞を培養して、胚様体又はカルスを形成させる。受精卵細胞を分裂誘導し細胞増殖させ、カルス又は胚様体を形成させる工程は、植物によって最適条件が異なるため特に限定されないが、Feeder細胞を加えた、ナースカルチャー法が好ましい。例えば、次のように行うことができる。

【0055】

前処理：遺伝子導入受精卵細胞を、マンニトール液滴 ($450 \text{ mosmol/kg H}_2\text{O}$) の中に入れて洗浄し、無菌化を行う。

液体培地での培養：培地に物質導入受精卵細胞を移し、一晚静置した後、穏やかに振とう培養する。振とう速度は、 $30 \sim 50 \text{ rpm}$ が好ましく、 $35 \sim 45 \text{ rpm}$ がより好ましい。培養の温度は、 $24 \sim 28$ が好ましく、 $25 \sim 27$ がより好ましい。培養は暗下で行うことが好ましい。この時、培地にはフィーダー細胞を加え共培養（ナースカルチャー法）を行うことが好ましい。この培養期間は、 $4 \sim 14$ 日が好ましく、 $5 \sim 10$ 日がより好ましい。

【0056】

培地：2, 4 - ジクロロフェノキシ酢酸、ナフタレン酢酸などのオーキシンを添加した、液体のMS培地 (T. Murashige et al., *Physiol. Plant.*, 15, 473 (1962))、B5培地 (O. L. Gamborg et al., *Experimental Cell Research*, 50, 151 - 158 (1968))、N6培地 (Chu et al., *Sci. Sinica*, 18, 659 - 668 (1975)) 等である。

【0057】

培地にはインドール - 3 - 酢酸、2, 4 - D やダイカンバ等のオーキシン類が添加されることが好ましい。オーキシンの添加濃度は、 $0.1 \sim 3.0 \text{ mg/L}$ が挙げられるが、 $0.1 \sim 0.3 \text{ mg/L}$ が好ましく、 $0.15 \sim 0.25 \text{ mg/L}$ がより好ましい。

【0058】

フィーダー細胞：公知のフィーダー細胞を用いることが可能である。例えば、イネ浮遊細胞培養物 (Line Oc、理研バイオリソースセンター製) や、トウモロコシのナース細胞 (Mol et al., 1993)、非形態形成型細胞培養物 (nonmorphogenic cell suspension: Kranz et al., 1991) などが挙げられる。

【0059】

この工程によって、培養開始から $4 \sim 14$ 日後、直径 $50 \sim 200 \mu\text{m}$ 程度の球状の胚様体が形成される。

再分化工程も公知の再分化工程に従い実施することができる。例えば、一例として、以下のように行うことが可能である。

【0060】

培養：球状の胚様体を、フィーダー細胞を加えていない前記培地に移し、さらに $10 \sim 14$ 日程度培養する。その後、オーキシンを添加しない任意の培地、例えばMS培地に入れて培養し植物体を形成させる。この際、培養は光を照射して行うことが好ましく、光は、例えば、 $50 \sim 180 \mu\text{mol/m}^2 \cdot \text{sec}$ が好ましく、 $70 \sim 150 \mu\text{mol/m}^2 \cdot \text{sec}$ がより好ましい。

【0061】

培地：例えばMS培地、B5培地、N6培地であって、アガロース、寒天やゲランガム、ゲルライト等を使用した固体培地などが挙げられる。

物質導入植物

本発明はさらに、本発明の方法によって得られた、物質導入植物も含む。なお、本発明以前は、特に「難培養」とされる植物や品種について、物質導入植物を得ることは困難あるいは不可能であった。本発明により、このような植物、品種についても簡便な方法で効

10

20

30

40

50

率良く物質導入植物を得ることが可能になる。

【0062】

また、本発明の方法によって得られた物質導入植物とは、プラスミドや遺伝子配列断片などの核酸、ゲノム編集などのためのタンパク質、ペプチドが導入され植物内に保持されている植物だけではなく、物質、特に遺伝子の導入により得られた形質転換植物や、Cas9やガイドRNA等ゲノム編集関連物質の導入によりゲノム編集された植物、及びそれらの後代、クローン等を含む。

【実施例】

【0063】

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。

10

【0064】

実施例1 イネの卵細胞及び精細胞の単離

本実施例において、イネの花からの卵細胞及び精細胞の単離を行った(図1)。

卵細胞の単離は以下のように行った。イネの穂から得た未開花の花を解体して子房を採取し、3mLの6%マンニトール溶液(370mosmol/kg H₂O)が入った3.5cmプラスチックシャーレの中に子房を入れた。新しい3.5cmプラスチックシャーレ中の3mLの6%マンニトール溶液(370mosmol/kg H₂O)に柱頭を除去した子房を沈めて、シャーレの底でレーザーブレード(フェザー安全カミソリ(株)、FA-10)により子房の下部を切断した。顕微鏡観察により切断部から出てくる卵細胞を確認し、マイクロキャピラリーで卵細胞を単離した。30~40個の子房からおよそ10~15個の卵細胞が得られた。各卵細胞の直径は40~50μmであった。単離した卵細胞は、マイクロキャピラリーを用いカバーガラス上の液滴中に移動した。

20

【0065】

なお、カバーガラス上の液滴は以下の方法で作成した。

- 1) カバーガラス(20mm X 40mm)の周囲を、2%ジクロロメチルシランを含む1,1,1-トリクロロエタン溶液に浸し、乾燥させる;
- 2) 当該カバーガラス中央部分に0.2-0.3mLのミネラルオイル(Embryo Culture-tested Grade, シグマアルドリッチ社製、1001279270)を載せる;そして、
- 3) 当該ミネラルオイル内に1~2μLの6%マンニトール液(370mosmol/kg H₂O)をマイクロピペットで挿入する。

30

【0066】

精細胞の単離は以下のように行った。イネの穂から得た未開花の花を解体して葯を採取し、3mLの6%マンニトール溶液(370mosmol/kg H₂O)が入った3.5cmプラスチックシャーレに入れた。葯をマンニトール溶液に沈めたのち、ピンセットで葯を分解することにより、花粉がマンニトール溶液に散在させた。数分後、花粉がパーストし、精細胞を含む内容物がマンニトール溶液中に放出された。各精細胞の直径は8~10μmであった。この精細胞をマイクロキャピラリーを用いてカバーガラス上の液滴中に移動した。

40

【0067】

実施例2 配偶子融合によるイネ受精卵の作出

本実施例では、配偶子融合により*in vitro*でイネの受精卵(イネの*in vitro*受精卵)を作出した(図2)。

【0068】

カバーガラス上の液滴中に、実施例1に示した方法により単離した精細胞と卵細胞を1個ずつ移動した。その後、それら細胞を電極(ネッパジーン(株)CUY5100-100Ti)上に、交流下(1MHz、0.4kV/cm、ネッパジーン(株)ECFG21)で並べた。当該液滴中に、液滴の半量~等量のマンニトール溶液(520mosmol

50

/ kg H₂O) をマイクロキャピラリーで加えた。その後、DCパルス(50 μs、12 - 15 kV/cm、電極間距離50 - 150 μm) をかけることで、配偶子を融合させ、受精卵を作出した。

【0069】

実施例3 イネ受精卵への核酸導入

本実施例では、実施例2で作出したイネの*in vitro*受精卵に核酸を導入した。

実施例2で作出した受精卵を、配偶子融合処理から120分時点で物質の導入が完了するように、本実施例に沿って処理を行った。作出した受精卵細胞をMMG溶液(15 mM MgCl₂、4 mM MES (pH 5.7)、450 mosmol/kg H₂O マンニトール)の液滴(約2 μL)に移動し、その後MMGに導入する塩基配列、35 Sプロモーター：：シグナル配列：：GFP：：小胞体残留シグナル(HDEL)：：ノスターミネーターを含むプラスミド(GFP発現用のプラスミドDNA、約6,000 bp)を加えた液滴に移動した。なお、当該プラスミドは非特許文献16の記載に従って調整した。次に受精卵細胞を含む液滴とPEG溶液(12.5 mL マンニトール溶液(450 mosmol/kg H₂O)に、7.5 gのPEG4000、2.5 mLの1 M塩化カルシウムを加え蒸留水で25 mgになるように調整)の液滴(約2 μL)を混ぜ、ガラスキャピラリーで30~50回撹拌した。

10

【0070】

実施例4 イネ受精卵の培養

本実施例では、実施例3で核酸を導入したイネ受精卵を培養した。

20

実施例3で核酸導入処理を行った受精卵細胞を培養するため、受精細胞用培地を用意した。受精細胞用培地は、改変型N6Z培地(Kumlehn J. et al. (1998) *Planta* 205:327-333)に以下の改変を加えたものである；2 g/L CHU(N6) basal salt mixture(シグマアルドリッチ社製)、0.025 mg/L Na₂MoO₄·2H₂O、0.025 mg/L CoCl₂·6H₂O、0.025 mg/L CuSO₄·5H₂O、0.01 mg/L レチノール、0.01 mg/L カルシフェロール、0.01 mg/L ビオチン、1 mg/L チアミン·H₂O、1 mg/L ニコチン酸、1 mg/L ピリドキシン·HCl、1 mg/L 塩化コリン、1 mg/L Ca-パントテン酸、0.2 mg/L リボフラビン、0.2 mg/L 2,4-D、0.02 mg/L コバラミン、0.02 mg/L p-アミノ安息香酸、0.4 mg/L 葉酸、2 mg/L アスコルビン酸、40 mg/L リンゴ酸、40 mg/L クエン酸、40 mg/L フマル酸、20 mg/L Na-ピルビン酸、1,000 mg/L グルタミン、及び250 mg/L カゼイン加水分解物、100 mg/L ミオイノシトール。浸透圧はグルコースで450 mosmol/kg H₂Oに調整(pH 5.7)し作成した。作成した受精細胞用培地(0.2 mL)を直径12 mmのMilliCell CMインサート(ミリポア社製)内に入れ、2 mLの培地の入った3.5 cmプラスチックシャーレの中に入れた。さらに、40-60 μLのイネ浮遊細胞培養物(Line Oc、理研バイオリソースセンター製)をフィーダー細胞としてシャーレに加えた。

30

【0071】

40

洗浄・滅菌したマイクロキャピラリーを用い、受精卵細胞を新鮮なマンニトール液滴(450 mosmol/kg H₂O)中に投入し、その後、受精細胞用培地の入ったCMインサート内のメンブレン上に移した。

【0072】

受精卵細胞は、暗所に26℃で1日間静置したのち、蛍光顕微鏡で観察し、GFPの蛍光の有無で導入した核酸の発現状況及び細胞の分裂状況を確認した。その結果を図3Aに示す。核酸導入処理を行った受精卵は、確かにGFPによる発光が観察されたため、核酸導入が確認できた。さらに、それら受精卵を2日間振盪培養したのちに観察したところ、初期胚への分裂が確認され、さらには初期胚細胞中のGFPによる発光も観察できた(図3B)。これにより、胚的細胞塊の細胞群においても核酸導入が確認できた。

50

【0073】

それら初期胚を、さらに暗所約16日間振盪培養し、胚的細胞塊を得た。この際、培養開始後5~7日後に、培養液からフィーダー細胞を除いた。培養18日後の胚的細胞塊を観察したところ、GFPによる発光が検出される細胞塊(図4A)と、蛍光が検出されなくなった細胞塊(図4B)が観察された。これにより、受精卵から細胞塊のステージまでGFPの発現が続く場合と、受精卵から初期胚のステージで一過的にGFPが発現される場合の2通りのケースがあることは示された。また、1週間以上培養を継続した胚的細胞塊においても蛍光が観察されたことから、形質転換され安定的に蛍光タンパク質が生産されていることが確認された。以上の結果より、本発明の方法によって、遺伝子が植物に導入され、一過的又は安定的に発現可能であることが示された。

10

【0074】

実施例5 イネ胚的細胞塊の培養による分化誘導

本実施例では、実施例4で得られたイネ胚的細胞塊の培養による分化誘導を行った。

実施例4で得られたイネ胚的細胞塊について、分化誘導培地1(改変したMS培地; MS塩、MSビタミン、100mg/L ミオイノシトール、2g/L カサミノ酸(casamino acid)、30g/L スクロース、30g/L ソルビトール、0.2mg/L 1-ナフタレン酢酸(NAA)、1mg/L カイネチン及び0.3% Gelrite)に移した。培養は30℃で持続的に光照射しながら行った。移植10日後にはシュートが分化した(図5)。さらに、シュートを分化させた胚的細胞塊を分化誘導培地2(改変したMS培地; MS塩、MSビタミン、100mg/L ミオイノシトール、30g/L スクロース及び0.3% Gelrite)に移した。培養は30℃で持続的に光照射しながら行った。移植7日後には幼植物体が得られた(図6)。

20

【0075】

実施例6 融合後の時間と物質導入効率の関係

本実施例では、酵素処理なしでPEGにより物質導入が可能な受精卵のステージについて調べた。受精卵のステージは、電気融合後の経過時間を指標とした。電気融合を用いて作出した受精卵について、所定の時間経過後、実施例3で用いたGFP発現用のプラスミドDNAを導入し、実施例4のとおり核酸導入を確認した。核酸の導入が確認された受精卵について、その後実施例4の条件で培養を継続し、初期胚への分裂を確認した。その結果、配偶子融合後5-20分と120分時点での物質導入では導入効率に差が認められなかった。配偶子融合後5-20分と120分の時点で物質導入効率に差がなかったことから、物質導入は、受精卵作成時の電気融合の影響によるものではなく、PEG法によるものであることが理解される。240分経過後では核酸の導入は低効率で確認されたが、受精卵の分裂には至らなかった。

30

【0076】

【表1】

配偶子融合後経過時間(分)	受精卵数	導入確認数	分裂確認受精卵数
5-20	34	16	15
60	7	4	3
120	18	8	8
240	6	1	0

40

【0077】

実施例7 細胞壁形成度の測定

本実施例では、受精卵細胞の細胞壁形成度の測定を行った。

実施例2に記載したように、電気融合後2時間経過時の受精卵細胞及び細胞壁が十分に発達したステージにあると推察される電気誘導後20時間後の受精卵細胞に0.005%カルコフロール染色を行い、共焦点レーザー走査顕微鏡を用い、蛍光輝度を測定した。それぞれ3細胞について画像解析を行い積算輝度を求め比較したところ、受精後2時間後の

50

細胞壁から検出されたカルコフラワーによる蛍光輝度は、20時間後の受精卵と比較し、63%程度であることが確認された。

【産業上の利用可能性】

【0078】

本発明により、細胞に対する植物組織分解酵素処理を行わずとも、物質の導入、形質転換及び培養を行うことが可能となった。これにより、従来培養が困難等の理由で形質転換が困難であったため有用形質を付与することができなかった植物体であっても、簡便に、安定して再現性良く形質転換体を得ることが可能となる。

【図1】

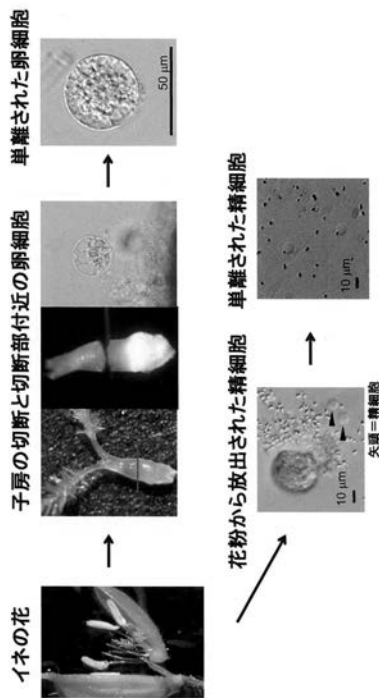


図1. イネ花からの卵細胞(上段)および精細胞(下段)の単離

【図2】

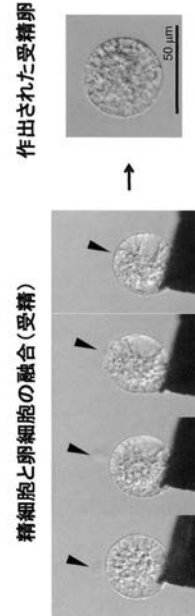


図2. 雌雄配偶子の融合過程と作出された受精卵 (in vitro 受精卵)

【 図 3 】

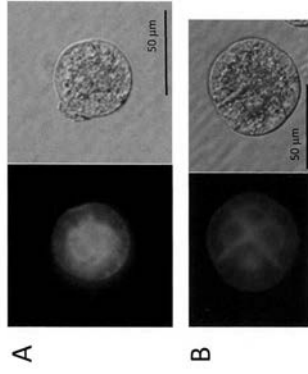


図3. PEG法によりGFP核酸を導入したイネ受精卵

【 図 4 】

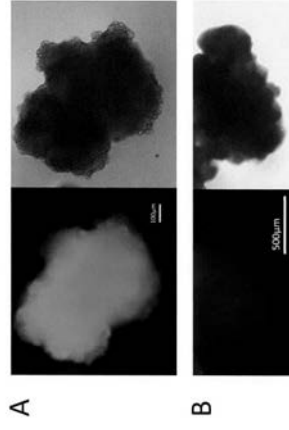


図4. PEG法によりGFP核酸を導入したイネ受精卵由来の細胞塊

【 図 5 】

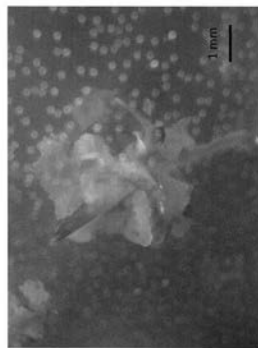


図5. PEG法によりGFP核酸を導入したイネ受精卵由来の再生シュート

【 図 6 】



図6. PEG法によりGFP核酸を導入したイネ受精卵由来の幼植物体

フロントページの続き

(74)代理人 100120112

弁理士 中西 基晴

(74)代理人 100107386

弁理士 泉谷 玲子

(72)発明者 加藤 紀夫

静岡県磐田市東原700番地 日本たばこ産業株式会社 植物イノベーションセンター内

(72)発明者 岡本 龍史

東京都八王子市南大沢1-1 首都大学東京 南大沢キャンパス内

(72)発明者 古磯 成美

東京都八王子市南大沢1-1 首都大学東京 南大沢キャンパス内

(72)発明者 木羽 隆敏

埼玉県和光市広沢2番1号 国立研究開発法人理化学研究所内

(72)発明者 戸田 絵梨香

埼玉県和光市広沢2番1号 国立研究開発法人理化学研究所内

Fターム(参考) 2B030 AB04 CA12

4B065 AA89X AB03 BA08