

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-509376
(P2025-509376A)

(43)公表日 令和7年4月11日(2025.4.11)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
A 0 1 H	6/82 (2018.01)	A 0 1 H	6/82	4 B 0 4 3	
A 0 1 H	1/00 (2006.01)	A 0 1 H	1/00	A Z N A	4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	A 0 1 H	1/00	Z	
C 1 2 N	5/04 (2006.01)	C 1 2 N	15/09	1 1 0	
A 2 4 B	13/00 (2006.01)	C 1 2 N	5/04		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全52頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2024-553662(P2024-553662)	(71)出願人	516015266
(86)(22)出願日	令和5年2月14日(2023.2.14)		ノース カロライナ ステイト ユニヴァーシティ
(85)翻訳文提出日	令和6年11月8日(2024.11.8)		アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 27606 ローリー メイン キャンパス
(86)国際出願番号	PCT/US2023/062580		ドライブ 1021 セカンド フロア オフィス オブ テクノロジー トランスファ
(87)国際公開番号	WO2023/172805	(74)代理人	100103610
(87)国際公開日	令和5年9月14日(2023.9.14)		弁理士 ▲吉▼田 和彦
(31)優先権主張番号	63/317,272	(74)代理人	100109070
(32)優先日	令和4年3月7日(2022.3.7)		弁理士 須田 洋之
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100119013
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV	(74)代理人	100111796
最終頁に続く		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 ニコチン性アルカロイドレベルが低減したタバコ植物を製造するための方法及び組成物

(57)【要約】

本開示は、タバコ植物に関連する組成物及び方法を提供する。とりわけ、本開示は、ニコチン性アルカロイド含有量が少ないタバコ植物、及び、任意の関連タバコ製品を製造するための新規の方法を提供する。本開示の方法に従って生産されたタバコ植物は、天然に存在するタバコ植物及びトランスジェニックタバコ植物の両方と比較して、ニコチン性アルカロイド（例えば、ニコチン）のレベルが低減しており、したがって、現在利用可能なタバコ変種に対する商業的に価値ある代替物を表す。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

自然に存在する対応するタバコ植物、またはその一部と比較して、レベルが低減した少なくとも 1 つのニコチン性アルカロイドを含むタバコ品種、またはその任意の一部。

【請求項 2】

前記品種は非トランスジェニックである、請求項 1 に記載のタバコ品種。

【請求項 3】

前記少なくとも 1 つのニコチン性アルカロイドは、ニコチン、ノルニコチン、アナタビン、及びアナバシンからなる群から選択される、請求項 1 または請求項 2 に記載のタバコ品種。

10

【請求項 4】

前記少なくとも 1 つのニコチン性アルカロイドはニコチンであり、前記品種は、0.35% 以下のニコチンを含む、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載のタバコ品種。

【請求項 5】

前記少なくとも 1 つのニコチン性アルカロイドはノルニコチンであり、前記品種は、0.04% 以下のノルニコチンを含む、請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載のタバコ品種。

【請求項 6】

前記少なくとも 1 つのニコチン性アルカロイドはアナタビンであり、前記品種は、0.06% 以下のアナタビンを含む、請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載のタバコ品種。

【請求項 7】

前記少なくとも 1 つのニコチン性アルカロイドはアナバシンであり、前記品種は、0.008% 以下のアナバシンを含む、請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載のタバコ品種。

20

【請求項 8】

前記少なくとも 1 つのニコチン性アルカロイドはニコチン及びノルニコチンであり、前記品種は、0.35% 以下のニコチン、及び、0.04% 以下のノルニコチンを含む、請求項 1 または請求項 2 に記載のタバコ品種。

【請求項 9】

前記品種は、野生型 *nic1* と比較して、発現及び／または機能が低下した *nic1* アレルを含む、請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載のタバコ品種。

【請求項 10】

前記品種は、野生型 *nic2* と比較して、発現及び／または機能が低下した *nic2* アレルを含む、請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載のタバコ品種。

30

【請求項 11】

前記 *nic1* 及び／または前記 *nic2* アレルは、以下の株のうちの少なくとも 1 つに由来する、請求項 9 または請求項 10 に記載のタバコ品種。

L A F C 5 3、M A F C 5、L M A F C 3 4、L A B u r l e y 2 1、L I B u r l e y 2 1、及び H I B u r l e y 2 1

【請求項 12】

前記品種は、機能的 C Y P 8 2 E 2 アレルを含む、請求項 1～11 のいずれか 1 項に記載のタバコ品種。

40

【請求項 13】

前記 C Y P 8 2 E 2 アレルは、*N. sylvestris* に由来する、請求項 12 に記載のタバコ品種。

【請求項 14】

前記品種は、機能的 C Y P 8 2 E 3 アレルを含む、請求項 1～13 のいずれか 1 項に記載のタバコ品種。

【請求項 15】

前記 C Y P 8 2 E 3 アレルは、*N. tomentosiformis* に由来する、請求項 14 に記載のタバコ品種。

【請求項 16】

50

前記 CYP82E2 及び／または前記 CYP82E3 アレルによりコードされたタンパク質の、ニコチン N-脱メチル化活性は、自然に存在するタバコ植物と比較して増加している、請求項 12～15 のいずれか 1 項に記載のタバコ品種。

【請求項 17】

請求項 1～16 に記載のタバコ品種のいずれかから産生される子孫植物、種子、または細胞。

【請求項 18】

請求項 1～16 に記載のタバコ品種、または、それらの一部のいずれかに由来するタバコ製品。

【請求項 19】

前記製品は、葉タバコ、細切りタバコ、切りタバコ、すりタバコ、粉末タバコ、タバコ抽出物、無煙タバコ、湿潤または乾燥嗅ぎタバコ、パイプタバコ、葉巻きタバコ、シガリロタバコ、紙巻きタバコ、及び噛みタバコからなる群から選択される、請求項 18 に記載のタバコ製品。

【請求項 20】

前記製品は、シガリロ、クレティックシガレット、非通気性凹部フィルターシガレット、通気性凹部フィルターシガレット、シガー、嗅ぎタバコ、タバコ含有ガム、タバコ含有ロゼンジ、及び噛みタバコからなる群から選択される、請求項 18 に記載のタバコ製品。

【請求項 21】

自然に存在する対応するタバコ植物、またはその一部と比較して、レベルが低減した少なくとも 1 つのニコチン性アルカロイドを含むタバコ品種の製造方法であって、前記方法は、

第 1 の低ニコチン形質を含む第 1 のタバコ変種を、第 2 の低ニコチン形質を含む第 2 のタバコ変種と交配させ、子孫植物を産生することを含み、

前記子孫植物は、濃度が低下した、少なくとも 1 つのニコチン性アルカロイドを含む、前記方法。

【請求項 22】

前記方法は、戻し交配を含む、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

前記少なくとも 1 つのニコチン性アルカロイドは、ニコチン、ノルニコチン、アナタピン、及びアナバシンからなる群から選択される、請求項 21 または 22 に記載の方法。

【請求項 24】

前記少なくとも 1 つのニコチン性アルカロイドはニコチンであり、前記品種は、0.35% 以下のニコチンを含む、請求項 21～23 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 25】

前記少なくとも 1 つのニコチン性アルカロイドはノルニコチンであり、前記品種は、0.04% 以下のノルニコチンを含む、請求項 21～24 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 26】

前記少なくとも 1 つのニコチン性アルカロイドはアナタピンであり、前記品種は、0.06% 以下のアナタピンを含む、請求項 21～25 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 27】

前記少なくとも 1 つのニコチン性アルカロイドはアナバシンであり、前記品種は、0.008% 以下のアナバシンを含む、請求項 21～26 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 28】

前記少なくとも 1 つのニコチン性アルカロイドはニコチン及びノルニコチンであり、前記品種は、0.35% 以下のニコチン、及び、0.04% 以下のノルニコチンを含む、請求項 21～27 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 29】

前記第 1 及び／または第 2 の低ニコチン形質は、野生型 nic1 と比較して、発現及び／または機能が低下した nic1 アレルを含む、請求項 21～28 のいずれか 1 項に記載

10

20

30

40

50

の方法。

【請求項 30】

前記第 1 及び／または第 2 の低ニコチン形質は、野生型 *nic2* と比較して、発現及び／または機能が低下した *nic2* アレルを含む、請求項 21～29 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 31】

前記第 1 及び／または第 2 のタバコ変種は、以下の株のうちの少なくとも 1 つに由来する *nic1* 及び／または *nic2* アレルを含む、請求項 21～30 のいずれか 1 項に記載の方法。

LAFC53、*MAFC5*、*MAFC34*、*LABurley21*、*LIBurley21*、及び *HIBurley21*

10

【請求項 32】

前記第 1 及び／または第 2 のタバコ変種は、機能的 *CYP82E2* アレル含む、請求項 21～31 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 33】

前記 *CYP82E2* アレルは、*N. sylvestris* に由来する、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

前記第 1 及び／または第 2 のタバコ変種は、機能的 *CYP82E3* アレル含む、請求項 21～33 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 35】

前記 *CYP82E3* アレルは、*N. tomentosiformis* に由来する、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

前記 *CYP82E2* 及び／または前記 *CYP82E3* アレルによりコードされたタンパク質の、ニコチン N-脱メチル化活性は、自然に存在するタバコ植物と比較して増加している、請求項 32～35 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 37】

前記第 1 の低ニコチン形質は、野生型 *nic1* 及び／または *nic2* と比較して、発現及び／または機能が低下した *nic1* 及び／または *nic2* アレルを含み、前記第 2 の低ニコチン形質は、機能的 *CYP82E2* アレル及び／または機能的 *CYP82E3* アレルを含む、請求項 21～36 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 38】

前記第 1 のタバコ変種、前記第 2 のタバコ変種、及び前記子孫植物は、非トランスジェニックである、請求項 21～37 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 39】

請求項 21 に記載の方法に従い産生した子孫植物から入手される、種子または細胞。

【請求項 40】

請求項 21 に記載の方法に従い産生した子孫植物に由来するタバコ製品。

【請求項 41】

前記製品は、葉タバコ、細切りタバコ、切りタバコ、すりタバコ、粉末タバコ、タバコ抽出物、無煙タバコ、湿潤または乾燥嗅ぎタバコ、パイプタバコ、葉巻きタバコ、シガリロタバコ、紙巻きタバコ、及び噛みタバコからなる群から選択される、請求項 40 に記載のタバコ製品。

40

【請求項 42】

前記製品は、シガリロ、クレティックシガレット、非通気性凹部フィルターシガレット、通気性凹部フィルターシガレット、シガー、嗅ぎタバコ、タバコ含有ガム、タバコ含有ロゼンジ、及び噛みタバコからなる群から選択される、請求項 40 に記載のタバコ製品。

【請求項 43】

前記 *CYP82E2* アレルは、配列番号 1 に記載の野生型 *CYP82E2* アミノ酸配列

50

と比較して、K 3 7 5 E 及び／または L 4 2 2 W 点突然変異をコードするヌクレオチド配列を含む、請求項 1 2 または 1 3 に記載のタバコ品種。

【請求項 4 4】

(a) 前記 C Y P 8 2 E 2 アレルは、配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を含む C Y P 8 2 E 2 タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、

(b) 前記 C Y P 8 2 E 2 アレルは、配列番号 3 に記載のアミノ酸配列を含む C Y P 8 2 E 2 タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、または

(c) 前記 C Y P 8 2 E 2 アレルは、配列番号 4 に記載のアミノ酸配列を含む C Y P 8 2 E 2 タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、

請求項 4 3 に記載のタバコ品種。

10

【請求項 4 5】

前記 C Y P 8 2 E 3 アレルは、配列番号 5 に記載の野生型 C Y P 8 2 E 3 アミノ酸配列と比較して、C 3 3 0 W 点突然変異をコードするヌクレオチド配列を含む、請求項 1 4 または 1 5 に記載のタバコ品種。

【請求項 4 6】

前記 C Y P 8 2 E 3 アレルは、配列番号 6 に記載のアミノ酸配列を含む C Y P 8 2 E 3 タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、請求項 4 5 に記載のタバコ品種。

【請求項 4 7】

前記品種は、N B B 1、A 6 2 2、キノール酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ (Q P T)、プトレシン N-メチルトランスフェラーゼ (P M T)、オルニチン脱炭酸酵素 (O D C)、アスパラギン酸オキシダーゼ (A O)、キノリン酸シンターゼ (Q S)、N-メチルプトレシンオキシダーゼ (M P O)、N t E R F 2 2 1、N t M Y C 1 a、N t M Y C 1 b、N t M Y C 2 a、または N t M Y C 2 b のうちの少なくとも 1 つの品種における、発現の抑制をさらに含む、請求項 4 3 ~ 4 6 のいずれか 1 項に記載のタバコ品種。

20

【請求項 4 8】

前記 C Y P 8 2 E 2 アレルは、配列番号 1 に記載の野生型 C Y P 8 2 E 2 アミノ酸配列と比較して、K 3 7 5 E 及び／または L 4 2 2 W 点突然変異をコードするヌクレオチド配列を含む、請求項 3 2 または 3 3 に記載の方法。

【請求項 4 9】

(a) 前記 C Y P 8 2 E 2 アレルは、配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を含む C Y P 8 2 E 2 タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、

(b) 前記 C Y P 8 2 E 2 アレルは、配列番号 3 に記載のアミノ酸配列を含む C Y P 8 2 E 2 タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、または

(c) 前記 C Y P 8 2 E 2 アレルは、配列番号 4 に記載のアミノ酸配列を含む C Y P 8 2 E 2 タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、

請求項 4 8 に記載の方法。

30

【請求項 5 0】

前記 C Y P 8 2 E 3 アレルは、配列番号 5 に記載の野生型 C Y P 8 2 E 3 アミノ酸配列と比較して、C 3 3 0 W 点突然変異をコードするヌクレオチド配列を含む、請求項 3 4 または 3 5 に記載の方法。

40

【請求項 5 1】

前記 C Y P 8 2 E 3 アレルは、配列番号 6 に記載のアミノ酸配列を含む C Y P 8 2 E 3 タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 2】

N i c o t i a n a t a b a c u m 植物細胞において、標的遺伝子の点突然変異を製作する方法であって、前記方法は、前記細胞に、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列反復 (C R I S P R) 関連 (C R I S P R-C a s) システムを導入することであって、

(a) 少なくとも 1 つのガイド RNA (g RNA) であって、前記少なくとも 1 つの g RNA は、前記標的遺伝子に、標的配列またはその一部とハイブリダイズ可能なヌクレオ

50

チド配列を含み、前記標的遺伝子は、CYP82E2タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、前記gRNAと、

(b)

(i) DNA断片であって、前記DNA断片は、標的遺伝子内の標的配列を置き換える、または、標的遺伝子内の標的部位に挿入される、前記DNA断片、及び

(ii) 2つの相同アームであって、各アームは、DNA断片の反対側に隣接する、前記相同アーム

を含むドナーDNA配列を含む核酸と、

(c) エフェクタータンパク質、または、前記エフェクタータンパク質をコードする1つ以上のポリヌクレオチドと、を含む、前記導入することを含み、

前記少なくとも1つのgRNAは、前記エフェクタータンパク質との複合体を形成し、前記エフェクタータンパク質は、ヌクレアーゼを含むCasタンパク質である、前記方法

【請求項53】

(a) 前記点突然変異は、配列番号1に記載の野生型CYP82E2アミノ酸配列と比較して、K375E点突然変異であるか、または

(b) 前記点突然変異は、配列番号1に記載の野生型CYP82E2アミノ酸配列と比較して、L422WE点突然変異である、

請求項52に記載の方法。

【請求項54】

少なくとも2種の点突然変異が作製される、請求項52に記載の方法。

【請求項55】

前記少なくとも2種の点突然変異は、配列番号1に記載の野生型CYP82E2アミノ酸配列と比較して、K375E点突然変異、及び、配列番号1に記載の野生型CYP82E2アミノ酸配列と比較して、L422W点突然変異を含む、請求項54に記載の方法。

【請求項56】

前記Nicotiana tabacum植物は、nic1の劣性アレル、及び／またはnic2の劣性アレルをさらに含む、請求項52～55のいずれか1項に記載の方法。

【請求項57】

NBB1、A622、キノール酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ(QPT)、プトレシンN-メチルトランスフェラーゼ(PMT)、オルニチン脱炭酸酵素(ODC)、アスパラギン酸オキシダーゼ(AO)、キノリン酸シンターゼ(QS)、N-メチルプトレシンオキシダーゼ(MPO)、NtERF221、NtMYC1a、NtMYC1b、NtMYC2a、またはNtMYC2bのうちの少なくとも1つの、前記Nicotiana tabacum植物での発現を抑制することをさらに含む、請求項52～56のいずれか1項に記載の方法。

【請求項58】

Nicotiana tabacum植物細胞において、標的遺伝子の点突然変異を作製する方法であって、前記方法は、前記細胞に、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列反復(CRISPR)関連(CRISPR-Cas)システムを導入することであって、

(a) 少なくとも1つのガイドRNA(gRNA)であって、前記少なくとも1つのgRNAは、前記標的遺伝子に、標的配列またはその一部とハイブリダイズ可能なヌクレオチド配列を含み、前記標的遺伝子は、CYP82E3タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、前記gRNAと、

(b)

(i) DNA断片であって、前記DNA断片は、標的遺伝子内の標的配列を置き換える、または、標的遺伝子内の標的部位に挿入される、前記DNA断片、及び

(ii) 2つの相同アームであって、各アームは、DNA断片の反対側に隣接する、前記相同アーム

10

20

30

40

50

を含むドナーDNA配列を含む核酸と、

(c) エフェクタータンパク質、または、前記エフェクタータンパク質をコードする1つ以上のポリヌクレオチドと、を含む、前記導入することを含み、前記少なくとも1つのgRNAは、前記エフェクタータンパク質との複合体を形成し、前記エフェクタータンパク質は、ヌクレアーゼを含むCasタンパク質である、前記方法。

【請求項59】

前記点突然変異は、配列番号5に記載の野生型CYP82E3アミノ酸配列と比較して、C330W点突然変異である、請求項58に記載の方法。

【請求項60】

前記Nicotiana tabacum植物は、nic1の劣性アレル、及び／またはnic2の劣性アレルをさらに含む、請求項58または請求項59に記載の方法。

【請求項61】

NBB1、A622、キノール酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ(QPT)、プトレシンN-メチルトランスフェラーゼ(PMT)、オルニチン脱炭酸酵素(ODC)、アスパラギン酸オキシダーゼ(AO)、キノリン酸シンターゼ(QS)、N-メチルプトレシンオキシダーゼ(MPO)、NtERF221、NtMYC1a、NtMYC1b、NtMYC2a、またはNtMYC2bのうちの少なくとも1つの、前記Nicotiana tabacum植物での発現を抑制することをさらに含む、請求項58～60のいずれか1項に記載の方法。

【請求項62】

ニコチン性アルカロイド含有量が低減したNicotiana tabacum植物の製造方法であって、Nicotiana tabacum植物中で、

(a) CYP82E2及び／またはCYP82E3の活性を増加させる1つ以上の遺伝子組み換えと、

(b) nic1の劣性アレル、及び／または、nic2の劣性アレルと、を組み合わせることを含み、

前記Nicotiana tabacum植物は、対応する、自然に存在する、または、形質転換されていない対照タバコ植物と比較して、ニコチン性アルカロイド含有量が低減している、前記方法。

【請求項63】

前記Nicotiana tabacum植物は、nic1のホモ接合劣性アレル、及び／または、nic2のホモ接合劣性アレルを含む、請求項62に記載の方法。

【請求項64】

CYP82E2及び／またはCYP82E3の活性を増加させる前記1つ以上の遺伝子組み換えは、転写活性化様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)、メガヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、CRISPR/Cas9システム、CRISPR/Cpf1システム、CRISPR/Csm1システム、遺伝子ノックイン技術または科学技術、及びこれらの任意の組み合わせにより導入される、請求項62または63に記載の方法。

【請求項65】

CYP82E2の活性を増加させる前記1つ以上の遺伝子組み換えは、Nicotiana tabacum植物細胞の標的遺伝子内に点突然変異を含み、前記点突然変異は、配列番号1に記載の野生型CYP82E2アミノ酸配列と比較して、K375E点突然変異、及び、配列番号1に記載の野生型CYP82E2アミノ酸配列と比較して、L422W点突然変異のうちの1つ以上から選択される、請求項62～64のいずれか1項に記載の方法。

【請求項66】

CYP82E3の活性を増加させる前記1つ以上の遺伝子組み換えは、Nicotiana tabacum植物細胞の標的遺伝子内に点突然変異を含み、前記点突然変異は、

10

20

30

40

50

配列番号 5 に記載の野生型 CYP82E3 アミノ酸配列と比較して、C330W 点突然変異である、請求項 62～64 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 67】

前記点突然変異は、

(a) 少なくとも 1 つのガイド RNA (gRNA) であって、前記少なくとも 1 つの gRNA は、前記標的遺伝子に、標的配列またはその一部とハイブリダイズ可能なヌクレオチド配列を含み、前記標的遺伝子は、CYP82E2 タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、前記 gRNA と、

(b)

(i) DNA 断片であって、前記 DNA 断片は、標的遺伝子内の標的配列を置き換える、または、標的遺伝子内の標的部位に挿入される、前記 DNA 断片、及び

(ii) 2 つの相同アームであって、各アームは、DNA 断片の反対側に隣接する、前記相同アーム

を含むドナー DNA 配列を含む核酸と、

(c) エフェクタータンパク質、または、前記エフェクタータンパク質をコードする 1 つ以上のポリヌクレオチドと、

を含む、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列反復 (CRISPR) 関連 (CRISPR-Cas) システムにより前記植物に導入され、

前記少なくとも 1 つの gRNA は、前記エフェクタータンパク質との複合体を形成し、

前記エフェクタータンパク質は、ヌクレアーゼを含む Cas タンパク質である、

請求項 65 または 66 に記載の方法。

【請求項 68】

NBB1、A622、キノール酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ (QPT)、プトレシン N-メチルトランスフェラーゼ (PMT)、オルニチン脱炭酸酵素 (ODC)、アスパラギン酸オキシダーゼ (AO)、キノリン酸シンターゼ (QS)、N-メチルプトレシンオキシダーゼ (MPO)、NtERF221、NtMYC1a、NtMYC1b、NtMYC2a、または NtMYC2b のうちの少なくとも 1 つの、前記 Nicotiana tabacum 植物での発現を抑制することをさらに含む、請求項 62～67 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 69】

請求項 62～68 のいずれか 1 項に記載の方法により産生された Nicotiana tabacum 植物であって、前記植物は、(A) CYP82E2 及び／または CYP82E3 の活性を増加させる 1 つ以上の遺伝子組み換えと、(B) nic1 の劣性アレル、及び／または nic2 の劣性アレルと、を含む、前記植物。

【請求項 70】

請求項 69 に記載の植物から産生した子孫植物または種子であって、前記子孫植物または種子は、(A) CYP82E2 及び／または CYP82E3 の活性を増加させる 1 つ以上の遺伝子組み換えと、(B) nic1 の劣性アレル、及び／または nic2 の劣性アレルと、を含む、前記子孫植物または種子。

【請求項 71】

請求項 69 に記載の Nicotiana tabacum 植物由来のタバコを含むタバコ製品であって、前記植物は、(A) CYP82E2 及び／または CYP82E3 の活性を増加させる 1 つ以上の遺伝子組み換えと、(B) nic1 の劣性アレル、及び／または nic2 の劣性アレルと、を含む、前記タバコ製品。

【請求項 72】

(a) 前記タバコは、葉タバコ、細切りタバコ、切りタバコ、すりタバコ、粉末タバコ、タバコ抽出物、無煙タバコ、湿潤または乾燥嗅ぎタバコ、パイプタバコ、葉巻きタバコ、シガリロタバコ、紙巻きタバコ、及び噛みタバコからなる群から選択されるか、または

(b) 前記製品は、シガリロ、クレティックシガレット、非通気性凹部フィルターシガレット、通気性凹部フィルターシガレット、シガー、嗅ぎタバコ、スヌース、タバコ含有

10

20

30

40

50

ガム、タバコ含有ロゼンジ、及び噛みタバコからなる群から選択されるニコチン軽減タバコ製品である、
請求項 7 1 に記載のタバコ製品。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2022年3月7日に出願された米国仮特許出願第63／317,272号の優先権及び利益を主張し、あらゆる目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0002】

電子的に提出された資料の参照による組み込み

本明細書と同時に提出され、以下のとおりに識別される、コンピュータ読み取り可能なヌクレオチド／アミノ酸配列表は、その全体が、参照により本明細書に組み込まれる：2023年2月14日に作製された、「NCSU-40676.601」という名の、1つの9,320バイトのByte ASCII（テキスト）ファイル。

【0003】

本開示は、タバコ植物に関連する組成物及び方法を提供する。とりわけ、本開示は、ニコチン性アルカロイド含有量が少ないタバコ植物、及び、任意の関連タバコ製品を製造するための新規の方法を提供する。本開示の方法に従って生産されたタバコ植物は、天然に存在するタバコ植物及びトランスジェニックタバコ植物の両方と比較して、ニコチン性アルカロイド（例えば、ニコチン）のレベルが低減しており、したがって、現在利用可能なタバコ変種に対する商業的に価値ある代替物を表す。

20

【背景技術】

【0004】

ニコチンは通常、タバコ（*Nicotiana tabacum* L.）により産生される、最も豊富なピリジンアルカロイドであるが、いくつかの植物では、ニコチンデメチラーゼ酵素をコードする遺伝子活性の増加により、ノルニコチンが優っている場合がある（Sisson and Saunders, 1982; Lewis et al., 2010）。ニコチンは、シガレットの依存性に寄与するため、一部の公衆衛生機関は、タバコ煤煙に関連する毒物の、ヒトへの曝露を下げるために、これらの製品中のニコチンレベルを今後強制的に下げる研究を推奨している（米国食品医薬品局、2018）。紙巻きタバコのニコチンレベルを、報告されている、 0.4 mg g^{-1} 以下の非中毒性レベルまで低減することを、世界保健機関（WHO）は推奨している（WHO, 2015）。これは、現在の紙巻きタバコに存在するレベルのおよそ95%の低減を示す。このような極めて低レベルの、葉のニコチンの蓄積を日常的に示すタバコ品種は、市販されていない（Lewis, 2018）。タバコ業界の数社が、提示された許容閾値を下回るニコチンレベルの、新しい品種の開発に、結果的に関心を持っている。

30

【発明の概要】

【0005】

本開示の実施形態は、自然に存在する対応するタバコ植物、またはその一部と比較して、レベルが低減した少なくとも1つのニコチン性アルカロイドを含むタバコ品種、またはその任意の一部を含む。

40

【0006】

いくつかの実施形態では、品種は非トランスジェニックである。

【0007】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのニコチン性アルカロイドは、ニコチン、ノルニコチン、アナタビン、及びアナバシンからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのニコチン性アルカロイドはニコチンであり、品種は、0.35%以下のニコチンを含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのニコチン性アルカ

50

ロイドはノルニコチンであり、品種は、0.04%以下のノルニコチンを含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのニコチン性アルカロイドはアナタビンであり、品種は、0.06%以下のアナタビンを含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのニコチン性アルカロイドはアナバシンであり、品種は、0.008%以下のアナバシンを含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのニコチン性アルカロイドはニコチン及びノルニコチンであり、品種は、0.35%以下のニコチン、及び、0.04%以下のノルニコチンを含む。

【0008】

いくつかの実施形態では、品種は、野生型 *nic1* と比較して、発現及び／または機能が低下した *nic1* アレルを含む。いくつかの実施形態では、品種は、野生型 *nic2* と比較して、発現及び／または機能が低下した *nic2* アレルを含む。いくつかの実施形態では、*nic1* 及び／または *nic2* アレルは、以下の株のうちの少なくとも1つに由来する：LAF C 53、MAFC 5、LMAFC 34、LA Burley 21、LI Burley 21、及びHI Burley 21。

【0009】

いくつかの実施形態では、品種は、機能的 CYP82E2 アレルを含む。いくつかの実施形態では、CYP82E2 アレルは、*N. sylvestris* に由来する。いくつかの実施形態では、品種は、機能的 CYP82E3 アレルを含む。いくつかの実施形態では、CYP82E3 アレルは、*N. tomentosiformis*（または、関連する種、例えば、*Nicotiana Section Tomentosae*）に由来する。いくつかの実施形態では、CYP82E2 及び／または CYP82E3 アレルによりコードされたタンパク質の、ニコチンN-脱メチル化活性は、自然に存在するタバコ植物と比較して増加している。

【0010】

本開示の実施形態は、本明細書に記載するタバコ品種のいずれかから産生される子孫植物、種子、または細胞もまた含む。

【0011】

本開示の実施形態は、本明細書に記載する、タバコ品種、またはその一部のいずれかに由来するタバコ製品もまた含む。

【0012】

いくつかの実施形態では、タバコ製品は、葉タバコ、細切りタバコ、切りタバコ、すりタバコ、粉末タバコ、タバコ抽出物、無煙タバコ、湿潤または乾燥嗅ぎタバコ、パイプタバコ、紙巻きタバコ、シガリロタバコ、葉巻きタバコ、及び噛みタバコからなる群から選択される。

【0013】

いくつかの実施形態では、タバコ製品は、シガリロ、クレティックシガレット、非通気性凹部フィルターシガレット、通気性凹部フィルターシガレット、シガー、嗅ぎタバコ、タバコ含有ガム、タバコ含有口ゼンジ、及び噛みタバコからなる群から選択される。

【0014】

本開示の実施形態は、自然に存在する対応するタバコ植物、またはその一部と比較して、レベルが低減した少なくとも1つのニコチン性アルカロイドを含むタバコ品種の製造方法もまた含む。これらの実施形態によれば、方法は、第1の低ニコチン形質を含む第1のタバコ変種を、第2の低ニコチン形質を含む第2のタバコ変種と交配させ、子孫植物を産生することを含む。いくつかの実施形態では、子孫植物は、濃度が低下した、少なくとも1つのニコチン性アルカロイドを含む。

【0015】

いくつかの実施形態では、方法は、戻し交配を含む。

【0016】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのニコチン性アルカロイドは、ニコチン、ノルニコチン、アナタビン、及びアナバシンからなる群から選択される。いくつかの実施形

10

20

30

40

50

態では、少なくとも1つのニコチン性アルカロイドはニコチンであり、品種は、0.35%以下のニコチンを含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのニコチン性アルカロイドはノルニコチンであり、品種は、0.04%以下のノルニコチンを含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのニコチン性アルカロイドはアナタピンであり、品種は、0.06%以下のアナタピンを含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのニコチン性アルカロイドはアナバシンであり、品種は、0.008%以下のアナバシンを含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのニコチン性アルカロイドはニコチン及びノルニコチンであり、品種は、0.35%以下のニコチン、及び、0.04%以下のノルニコチンを含む。

【0017】

いくつかの実施形態では、第1及び／または第2の低ニコチン形質は、野生型 *nic1* と比較して、発現及び／または機能が低下した *nic1* アレルを含む。いくつかの実施形態では、第1及び／または第2の低ニコチン形質は、野生型 *nic2* と比較して、発現及び／または機能が低下した *nic2* アレルを含む。いくつかの実施形態では、第1及び／または第2のタバコ変種は、以下の株のうちの少なくとも1つに由来する *nic1* 及び／または *nic2* アレルを含む：MAFC5、LMAFC34、LA Burley 21、LI Burley 21、及びHI Burley 21。いくつかの実施形態では、第1及び／または第2のタバコ変種は、*nic1* 及び／または *nic2* ヌルアレル（欠失）を含む。いくつかの実施形態では、*nic1* 及び／または *nic2* ヌルアレルは、自然に存在する *N. tabacum* germplasm に由来する。

【0018】

いくつかの実施形態では、第1及び／または第2のタバコ変種は、機能的 CYP82E2 アレルを含む。いくつかの実施形態では、CYP82E2 アレルは、*N. sylvestris* に由来する。いくつかの実施形態では、第1及び／または第2のタバコ変種は、機能的 CYP82E3 アレルを含む。いくつかの実施形態では、CYP82E3 アレルは、*N. tomentosiformis*（または、関連する種、例えば、*Nicotiana Section Tomentosae*）に由来する。いくつかの実施形態では、CYP82E2 及び／または CYP82E3 アレルによりコードされたタンパク質の、ニコチン N-脱メチル化活性は、自然に存在するタバコ植物と比較して増加している。

【0019】

いくつかの実施形態では、第1の低ニコチン形質は、野生型 *nic1* 及び／または *nic2* と比較して、発現及び／または機能が低下した *nic1* 及び／または *nic2* アレルを含み、第2の低ニコチン形質は、機能的 CYP82E2 アレル及び／または機能的 CYP82E3 アレルを含む。

【0020】

いくつかの実施形態では、第1のタバコ変種、第2のタバコ変種、及び子孫植物は、非トランスジェニックである。

【0021】

本開示の実施形態は、本明細書に記載の方法のいずれかに従い産生した子孫植物から入手した、種子または細胞もまた含む。

【0022】

本開示の実施形態は、本明細書に記載の方法のいずれかに従い産生した子孫植物に由来するタバコ製品もまた含む。

【0023】

いくつかの実施形態では、製品は、葉タバコ、細切りタバコ、切りタバコ、すりタバコ、粉末タバコ、タバコ抽出物、無煙タバコ、湿潤または乾燥嗅ぎタバコ、パイプタバコ、紙巻きタバコ、シガリロタバコ、葉巻きタバコ、及び噛みタバコからなる群から選択される。

【0024】

いくつかの実施形態では、製品は、シガリロ、クレティックシガレット、非通気性凹部

10

20

30

40

50

フィルターシガレット、通気性凹部フィルターシガレット、シガー、嗅ぎタバコ、タバコ含有ガム、タバコ含有ロゼンジ、及び噛みタバコからなる群から選択される。

【0025】

いくつかの実施形態では、品種はCYP82E2アレルを含み、これは、配列番号1に記載の野生型CYP82E2アミノ酸配列と比較して、K375E及び／またはL422W点突然変異をコードするヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、(a) CYP82E2アレルは、配列番号2に記載のアミノ酸配列を含むCYP82E2タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、(b) CYP82E2アレルは、配列番号3に記載のアミノ酸配列を含むCYP82E2タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、または、(c) CYP82E2アレルは、配列番号4に記載のアミノ酸配列を含むCYP82E2タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。

10

【0026】

いくつかの実施形態では、CYP82E3アレルは、配列番号5に記載の野生型CYP82E3アミノ酸配列と比較して、C330W点突然変異をコードするヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、CYP82E3アレルは、配列番号6に記載のアミノ酸配列を含むCYP82E3タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0027】

いくつかの実施形態では、品種はCYP82E2アレルを含み、これは、配列番号1に記載の野生型CYP82E2アミノ酸配列と比較して、K375E及び／またはL422W点突然変異をコードするヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、(a) CYP82E2アレルは、配列番号2に記載のアミノ酸配列を含むCYP82E2タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、(b) CYP82E2アレルは、配列番号3に記載のアミノ酸配列を含むCYP82E2タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、または、(c) CYP82E2アレルは、配列番号4に記載のアミノ酸配列を含むCYP82E2タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。

20

【0028】

いくつかの実施形態では、CYP82E3アレルは、配列番号5に記載の野生型CYP82E3アミノ酸配列と比較して、C330W点突然変異をコードするヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、CYP82E3アレルは、配列番号6に記載のアミノ酸配列を含むCYP82E3タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。

30

【0029】

いくつかの実施形態では、品種は、NBB1、A622、キノール酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ(QPT)、プトレシンN-メチルトランスフェラーゼ(PMT)、オルニチン脱炭酸酵素(ODC)、アスパラギン酸オキシダーゼ(AO)、キノリン酸シンターゼ(QS)、N-メチルプトレシンオキシダーゼ(MPO)、NtERF221、NtMYC1a、NtMYC1b、NtMYC2a、またはNtMYC2bのうちの少なくとも1つの品種における、発現の抑制をさらに含む。

【0030】

本開示の実施形態は、Nicotiana tabacum植物細胞において、標的遺伝子の点突然変異を作製する方法もまた含む。これらの実施形態によれば、方法は、細胞に、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列反復(CRISPR)関連(CRISPR-Cas)システムを導入することであって、(a) 少なくとも1つのガイドRNA(gRNA)であって、当該少なくとも1つのgRNAは、標的遺伝子に、標的配列またはその一部とハイブリダイズ可能なヌクレオチド配列を含み、上記標的遺伝子は、CYP82E2タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、gRNAと、(b) (i) DNA断片であって、当該DNA断片は、標的遺伝子内の標的配列を置き換える、または、標的遺伝子内の標的部位に挿入される、DNA断片、及び、(ii) 2つの相同アームであって、各アームは、DNA断片の反対側に隣接する、相同アームと、(c) エフェクタータンパク質、または、当該エフェクタータンパク質をコードする1つ以上のポリヌクレオチドを含むドナーDNA配列を含む核酸と、を含む、導入することを含む。いくつかの

40

50

実施形態では、少なくとも1つのgRNAは、エフェクタータンパク質との複合体を形成する。いくつかの実施形態では、エフェクタータンパク質は、ヌクレアーゼを含むCasタンパク質である。

【0031】

いくつかの実施形態では、(a)点突然変異は、配列番号1に記載の野生型CYP82E2アミノ酸配列と比較して、K375E点突然変異であるか、または、(b)点突然変異は、配列番号1に記載の野生型CYP82E2アミノ酸配列と比較して、L422WE点突然変異である。

【0032】

いくつかの実施形態では、少なくとも2種の点突然変異が作製される。いくつかの実施形態では、少なくとも2種の点突然変異は、配列番号1に記載の野生型CYP82E2アミノ酸配列と比較して、K375E点突然変異、及び、配列番号1に記載の野生型CYP82E2アミノ酸配列と比較して、L422W点突然変異を含む。

【0033】

いくつかの実施形態では、*Nicotiana tabacum*植物は、*nic1*の劣性アレル、及び／または*nic2*の劣性アレルをさらに含む。

【0034】

いくつかの実施形態では、方法は、NBB1、A622、キノール酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ(QPT)、プトレシンN-メチルトランスフェラーゼ(PMT)、オルニチン脱炭酸酵素(ODC)、アスパラギン酸オキシダーゼ(AO)、キノリン酸シンターゼ(QS)、N-メチルプトレシンオキシダーゼ(MPO)、NtERF221、NtMYC1a、NtMYC1b、NtMYC2a、またはNtMYC2bのうちの少なくとも1つの品種における、発現の抑制をさらに含む。

【0035】

本開示の実施形態は、*Nicotiana tabacum*植物細胞において、標的遺伝子の点突然変異を作製する方法もまた含む。これらの実施形態によれば、方法は、細胞に、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列反復(CRISPR)関連(CRISPR-Cas)システムを導入することであって、(a)少なくとも1つのガイドRNA(gRNA)であって、当該少なくとも1つのgRNAは、標的遺伝子に、標的配列またはその一部とハイブリダイズ可能なヌクレオチド配列を含み、上記標的遺伝子は、CYP82E3タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、gRNAと、(b)(i)DNA断片であって、当該DNA断片は、標的遺伝子内の標的配列を置き換える、または、標的遺伝子内の標的部位に挿入される、DNA断片、及び、(ii)2つの相同アームであって、各アームは、DNA断片の反対側に隣接する、相同アームと、(c)エフェクタータンパク質、または、当該エフェクタータンパク質をコードする1つ以上のポリヌクレオチドを含むドナーDNA配列を含む核酸と、を含む、導入することを含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのgRNAは、エフェクタータンパク質との複合体を形成する。いくつかの実施形態では、エフェクタータンパク質は、ヌクレアーゼを含むCasタンパク質である。

【0036】

いくつかの実施形態では、点突然変異は、配列番号5に記載の野生型CYP82E3アミノ酸配列と比較して、C330W点突然変異である。

【0037】

いくつかの実施形態では、*Nicotiana tabacum*植物は、*nic1*の劣性アレル、及び／または*nic2*の劣性アレルをさらに含む。

【0038】

いくつかの実施形態では、方法は、NBB1、A622、キノール酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ(QPT)、プトレシンN-メチルトランスフェラーゼ(PMT)、オルニチン脱炭酸酵素(ODC)、アスパラギン酸オキシダーゼ(AO)、キノリン酸シンターゼ(QS)、N-メチルプトレシンオキシダーゼ(MPO)、NtERF221、N

10

20

30

40

50

tMYC1a、NtMYC1b、NtMYC2a、またはNtMYC2bのうちの少なくとも1つの、Nicotiana tabacum植物での発現を抑制することをさらに含む。

【0039】

本開示の実施形態は、ニコチン性アルカロイド含有量が低減したNicotiana tabacum植物の製造方法もまた含む。これらの実施形態によれば、方法は、Nicotiana tabacum植物中で、(a) CYP82E2及び／またはCYP82E3の活性を増加させる1つ以上の遺伝子組み換えと、(b) nic1の劣性アレル、及び／またはnic2の劣性アレルと、を組み合わせることを含む。いくつかの実施形態では、Nicotiana tabacum植物は、対応する、自然に存在する、または、形質転換されていない対照タバコ植物と比較して、ニコチン性アルカロイド含有量が低減している。

10

【0040】

いくつかの実施形態では、Nicotiana tabacum植物は、nic1のホモ接合劣性アレル、及び／または、nic2のホモ接合劣性アレルを含む。

【0041】

いくつかの実施形態では、CYP82E2及び／またはCYP82E3の活性を増加させる1つ以上の遺伝子組み換えは、転写活性化様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)、メガヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、CRISPR/Cas9システム、CRISPR/Cpf1システム、CRISPR/Csm1システム、遺伝子ノックイン技術または科学技術、及びこれらの任意の組み合わせにより導入される。

20

【0042】

いくつかの実施形態では、CYP82E2の活性を増加させる1つ以上の遺伝子組み換えは、Nicotiana tabacum植物細胞の標的遺伝子内に点突然変異を含み、点突然変異は、配列番号1に記載の野生型CYP82E2アミノ酸配列と比較して、K375E点突然変異、及び、配列番号1に記載の野生型CYP82E2アミノ酸配列と比較して、L422W点突然変異のうちの1つ以上から選択される。

【0043】

いくつかの実施形態では、CYP82E3の活性を増加させる1つ以上の遺伝子組み換えは、Nicotiana tabacum植物細胞の標的遺伝子内に点突然変異を含み、点突然変異は、配列番号5に記載の野生型CYP82E3アミノ酸配列と比較して、C330W点突然変異である。

30

【0044】

いくつかの実施形態では、点突然変異は、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列反復(CRISPR)関連(CRISPR-Cas)システムであって、(a) 少なくとも1つのガイドRNA(gRNA)であって、当該少なくとも1つのgRNAは、標的遺伝子に、標的配列またはその一部とハイブリダイズ可能なヌクレオチド配列を含み、上記標的遺伝子は、CYP82E2タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、gRNAと、(b) (i) DNA断片であって、当該DNA断片は、標的遺伝子内の標的配列を置き換える、または、標的遺伝子内の標的部位に挿入される、DNA断片、及び、(ii) 2つの相同アームであって、各アームは、DNA断片の反対側に隣接する、相同アームと、(c) エフェクタータンパク質、または、当該エフェクタータンパク質をコードする1つ以上のポリヌクレオチドを含むドナーDNA配列を含む核酸と、を含む、システムにより、植物に導入される。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのgRNAは、エフェクタータンパク質との複合体を形成する。いくつかの実施形態では、エフェクタータンパク質は、ヌクレアーゼを含むCasタンパク質である。

40

【0045】

本開示の実施形態は、本明細書に記載の方法のいずれかに従い産生したNicotiana tabacum植物もまた含み、植物は、(a) CYP82E2及び／またはCYP82E3の活性を増加させる1つ以上の遺伝子組み換えと、(b) nic1の劣性アレル

50

ル、及び／または *nic2* の劣性アレルと、を含む。本開示の実施形態は、植物から産生した子孫植物または種子もまた含み、子孫植物または種子は、(A) *CYP82E2* 及び／または *CYP82E3* の活性を増加させる1つ以上の遺伝子組み換えと、(B) *nic1* の劣性アレル、及び／または *nic2* の劣性アレルと、を含む。本開示の実施形態は、*Nicotiana tabacum* 植物由来のタバコを含むタバコ製品もまた含み、植物は、(A) *CYP82E2* 及び／または *CYP82E3* の活性を増加させる1つ以上の遺伝子組み換えと、(B) *nic1* の劣性アレル、及び／または *nic2* の劣性アレルと、を含む。

【0046】

これらの実施形態によれば、(a) タバコは、葉タバコ、細切りタバコ、切りタバコ、すりタバコ、粉末タバコ、タバコ抽出物、無煙タバコ、湿潤または乾燥嗅ぎタバコ、パイプタバコ、紙巻きタバコ、シガリロタバコ、葉巻きタバコ、及び噛みタバコからなる群から選択されるか、または、(b) 製品は、シガリロ、クレティックシガレット、非通気性凹部フィルターシガレット、通気性凹部フィルターシガレット、シガー、嗅ぎタバコ、スヌース、タバコ含有ガム、タバコ含有口ゼンジ、及び噛みタバコからなる群から選択されるニコチン軽減タバコ製品である。

【図面の簡単な説明】

【0047】

【図1A】本開示の一実施形態に従った、試験した低量アルカロイドハイブリッド株 (*N. tomentosiformis* 由来の *CYP82E3* アレルと組み合わせた、*LAF53* 由来の *nic1* 及び *nic2* 座位)、ならびに、関連する対照に対するアルカロイド組成物の例示的なグラフィックデータである。ニコチン割合 (%) を含む。

【図1B】本開示の一実施形態に従った、試験した低量アルカロイドハイブリッド株 (*N. tomentosiformis* 由来の *CYP82E3* アレルと組み合わせた、*LAF53* 由来の *nic1* 及び *nic2* 座位)、ならびに、関連する対照に対するアルカロイド組成物の例示的なグラフィックデータである。ノルニコチン割合 (%) を含む。

【図1C】本開示の一実施形態に従った、試験した低量アルカロイドハイブリッド株 (*N. tomentosiformis* 由来の *CYP82E3* アレルと組み合わせた、*LAF53* 由来の *nic1* 及び *nic2* 座位)、ならびに、関連する対照に対するアルカロイド組成物の例示的なグラフィックデータである。アナタピン割合 (%) を含む。

【図1D】本開示の一実施形態に従った、試験した低量アルカロイドハイブリッド株 (*N. tomentosiformis* 由来の *CYP82E3* アレルと組み合わせた、*LAF53* 由来の *nic1* 及び *nic2* 座位)、ならびに、関連する対照に対するアルカロイド組成物の例示的なグラフィックデータである。アナバシン割合 (%) を含む。3つの野外環境に対して、平均値を平均化する。

【図2A】本開示の一実施形態に従った、試験した低量アルカロイドハイブリッド株 (*N. tomentosiformis* 由来の *CYP82E3* アレルと組み合わせた、*LAF53* 由来の *nic1* 及び *nic2* 座位)、ならびに、関連する対照に対する、収率及び品質測定の例示的なグラフィックデータである。収率 (ポンド/A) を含む。

【図2B】本開示の一実施形態に従った、試験した低量アルカロイドハイブリッド株 (*N. tomentosiformis* 由来の *CYP82E3* アレルと組み合わせた、*LAF53* 由来の *nic1* 及び *nic2* 座位)、ならびに、関連する対照に対する、収率及び品質測定の例示的なグラフィックデータである。ハンドレッドウェイト (Cwt) 値 (\$) を含む。

【図2C】本開示の一実施形態に従った、試験した低量アルカロイドハイブリッド株 (*N. tomentosiformis* 由来の *CYP82E3* アレルと組み合わせた、*LAF53* 由来の *nic1* 及び *nic2* 座位)、ならびに、関連する対照に対する、収率及び品質測定の例示的なグラフィックデータである。エーカー値 (\$) を含む。

【図2D】本開示の一実施形態に従った、試験した低量アルカロイドハイブリッド株 (*N. tomentosiformis* 由来の *CYP82E3* アレルと組み合わせた、*LAF53* 由来の *nic1* 及び *nic2* 座位)、ならびに、関連する対照に対する、収率及び品質測定の例示的なグラフィックデータである。エーカー値 (\$) を含む。

F C 5 3 由来の N i c 1 及び N i c 2 座位)、ならびに、関連する対照に対する、収率及び品質測定の例示的なグラフィックデータである。等級指数を含む。

【発明を実施するための形態】

【0048】

本開示の実施形態は、ニコチン性アルカロイド含有量が少ないタバコ植物、及び、任意の関連タバコ製品を製造するための新規の方法に関する。本開示の方法に従って生産されたタバコ植物は、天然に存在するタバコ植物及びトランスジェニックタバコ植物の両方と比較して、ニコチン性アルカロイド(例えば、ニコチン)のレベルが低減しており、したがって、現在利用可能なタバコ変種に対する商業的に価値ある代替物を表す。

【0049】

このセクション及び本明細書の開示全体で使用されるセクション見出しは、単に構成目的のためだけのものであり、制限を意図するものではない。

【0050】

1. 定義

別段に定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。矛盾する場合には、定義を含む本明細書が優先されることになる。好ましい方法及び材料については後述するが、本明細書に記載されるものと類似するまたは同等の方法及び材料も、本開示の実施または試験に使用することができる。本明細書において言及される全ての刊行物、特許出願、特許、及び他の参考文献は、参照により、それらの全体が組み込まれる。本明細書に開示される材料、方法、及び例は、例示に過ぎず、限定を意図するものではない。

【0051】

「約」という用語は、当業者が理解するとおりであり、その言葉が使用される文脈に応じてある程度変化することになる。当業者にとって明白ではない項目の使用がある場合、その項目が使用される文脈を考慮して、「約」は、特定の項目のプラスマイナス10%までを意味することになる。例えば、いくつかの実施形態では、「約」とは、特定の用語のプラスマイナス5%を意味する。ある特定の範囲は本明細書において、「約」という用語が先行する数値で示される。「約」という用語は、本明細書では、この語が先行する厳密な数、加えて、この語が先行する数に近い、または、近似する数の、文字通りの指示をもたらすために用いられる。ある数が、具体的に列挙される数に近い、または近似するか否かを決定する際には、近い、または、近似の、列挙されていない数は、その数が示される文脈において、具体的に列挙される数との実質的な等価物をもたらす数であってよい。

【0052】

本明細書で使用される用語「を含む(comprise)」、「を含む(include)」、「を有する(having)」、「を有する(has)」、「できる」、「を含有する」、及びそれらの変形は、追加の行為または構造の可能性を排除しないオープンエンドな移行句、用語、または単語であることが意図される。単数形「a」、「and」、及び「the」は、文脈で明確に別段指示されない限り、複数の参照を含む。本開示はまた、明示的に記載されるか否かにかかわらず、本明細書に提示される実施形態または要素「を含む(comprising)」、「～からなる」、及び「～から本質的になる」他の実施形態を企図する。

【0053】

本明細書における数値範囲の記載では、その間の各介在数が同じ精度で明示的に企図される。例えば、6～9の範囲については、数字7及び8は、6及び9に加えて企図され、6.0～7.0の範囲については、数字6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、及び7.0が明示的に企図される。

【0054】

本明細書で使用される「～への相関」は、～と比較して、を指す。

【0055】

本明細書で使用される場合、「核酸分子」という用語は、限定されないが、DNAまた

10

20

30

40

50

はRNAを含む任意の核酸含有分子を指す。この用語は、限定するものではないが、4つのアセチルシトシン、8-ヒドロキシ-N6-メチルアデノシン、アジリジニルシトシン、シュードイソシトシン、5-(カルボキシヒドロキシルメチル)ウラシル、5-フルオロウラシル、5-ブロモウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウラシル、5-カルボキシメチル-アミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルアデニン、1-メチルシュードラシル、1-メチルグアニン、1-メチルイリノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアデニン、3-メチルシトシン、5-メチルイソシトシン、N6-メチルアデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、ベータ-Dマンノイルキューオシン (queosine)、5-メトキシカルボニルメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸、オキシプトキソシン (butoxosine)、シュードラシル、キューオシン (queosine)、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、N-ウラシル-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸、シュードラシル、キューオシン (queosine)、2-チオシトシン、及び2,6-ジアミノプリン、を含む、任意の既知のDNA及びRNAの塩基アナログを含む配列を包含する。

10

【0056】

用語「遺伝子」は、ポリペプチド、前駆体、またはRNA（例えば、rRNA、tRNA、sRNA、マイクロRNA、lincRNA）の産生のためのコード配列を含む核酸（例えば、DNA）配列を指す。ポリペプチドは、全長または断片の所望の活性または機能特性（例えば、酵素活性、リガンド結合、シグナル伝達、免疫原性など）が保持される限り、全長コード配列によって、またはコード配列の任意の部分によってコードされてもよい。この用語はまた、構造遺伝子のコード領域と、遺伝子が全長mRNAの長さに対応するように、いずれの末端においても約1 kb以上の距離の間、5'末端及び3'末端の両方でコード領域に隣接して位置する配列と、を包含する。コード領域の5'側に位置し、かつmRNA上に存在する配列は、5'非翻訳配列と称される。コード領域の3'側または下流に位置し、かつmRNA上に存在する配列は、3'非翻訳配列と称される。用語「遺伝子」は、遺伝子のcDNA及びゲノムの形態の両方を包含する。遺伝子のゲノム型またはクローンは、「イントロン」、「介在領域」、「介在配列」のうちのいずれかと称される非コード配列で中断されたコード領域を含有する。イントロンは、核RNA（hnRNA）に転写される遺伝子のセグメントであり、イントロンは、エンハンサーなどの制御要素を含有してもよい。イントロンは、核または一次転写産物から除去されるかまたは「スプライシングにより出される」ため、イントロンは、メッセンジャーRNA（mRNA）転写産物には存在しない。mRNAは、新生ポリペプチドにおいてアミノ酸の配列または順序を特定するように翻訳中に機能する。

20

30

【0057】

本明細書で使用する場合、「異種遺伝子」という用語は、その自然環境には存在しない遺伝子を意味する。例えば、異種遺伝子は、別の種に導入される1つの種からの遺伝子を含む。異種遺伝子は、いくつかの方法（例えば変異、複数のコピーへの付加、非天然の調節配列配列への結合など）で変更されている生命体に対して天然の遺伝子もまた含む。異種遺伝子が、通常は、染色体内の遺伝子配列と自然に関連していることが見出されない、または、自然では見出されない染色体の部分（例えば、遺伝子が通常発現しない遺伝子座で発現する遺伝子）と関係するDNA配列に結合されるという点で、異種遺伝子は、天然遺伝子と区別される。

40

【0058】

本明細書で使用する場合、「作動可能に連結された」とは、2つの要素間での機能的連結を意味する。例えば、対象となるポリヌクレオチドと調節配列（例えば、プロモーター）との間での作動可能な連結は、対象となるポリヌクレオチドの発現を可能にする機能的

50

な連結である。作動可能に連結された要素は、連続している、または、非連続であってもよい。

【0059】

本明細書で使用する場合、「遺伝子発現」とは、遺伝子産物の転写及び／または翻訳を含む、遺伝子産物の生合成または産生を意味する。

【0060】

本明細書で使用する場合、「オリゴヌクレオチド」という用語は、長さが短い一本鎖ポリヌクレオチド連鎖を意味する。オリゴヌクレオチドは通常、約300残基長未満（例えば、15～100）であるが、本明細書で使用する場合、この用語は、より長いポリヌクレオチド鎖を包含することもまた意図する。オリゴヌクレオチドは多くの場合、それらの長さで言及される。例えば、24残基のオリゴヌクレオチドは、「24mer」と呼ばれる。オリゴヌクレオチドは、自己ハイブリダイゼーションにより、または、他のポリヌクレオチドへのハイブリダイゼーションにより、二次及び三次構造を形成することができる。このような構造としては、二重鎖、ヘアピン、十字型、バンド、及び三重鎖を挙げることができるが、これらに限定されない。

【0061】

「相同性」及び「相同」という用語は、同一性の程度を意味する。部分的な相同性または完全な相同性があってもよい。部分的に相同な配列は、別の配列と100%未満同一である配列である。

【0062】

本明細書で使用する場合、「相補的」または「相補性」という用語は、塩基対形成の規則により関係しているポリヌクレオチド（例えば、オリゴヌクレオチドまたは標的核酸などのヌクレオチドの配列）を言及して使用される。例えば、配列「5'-A-G-T-3'」は、配列「3'-T-C-A-5'」に相補的である。相補性は「部分的」であってもよく、その場合、核酸塩基の一部のみが塩基対合則に従って一致する。または、核酸間の「完全な」または「全体の」相補性があることができる。核酸鎖間での相補性の程度は、核酸鎖間でのハイブリダイゼーションの効率及び強度に著しい影響力を持っている。相補性は、核酸間の結合に依存する増幅反応及び検出法において特に重要である。いずれの用語も、とりわけ、ポリヌクレオチドの文脈において、個別のヌクレオチドを言及するためにもまた使用可能である。例えば、オリゴヌクレオチド内の特定のヌクレオチドは、別の核酸鎖内のヌクレオチドに対して、オリゴヌクレオチド及び核酸鎖の残り同士の相補性と対比または比較することで、相補的である、または相補性を欠いていると記載され得る。

【0063】

いくつかの文脈では、「相補性」という用語、及び、関連する用語（例えば「相補的である」、「相補体」）とは、水素結合により別の核酸配列に結合可能な、核酸配列のヌクレオチド、例えば、ワトソン-クリックの塩基対形成、または他の塩基対形成により、塩基対形成が可能なヌクレオチドを意味する。塩基対を形成可能な、例えば、互いに相補的なヌクレオチドは、シトシンとグアニン、チミンとアデニン、アデニンとウラシル、及び、グアニンとウラシルの対である。相補性割合(%)は、核酸配列の長さ全体にわたり計算する必要はない。相補性の割合(%)は、塩基対形成された核酸配列の特定の、例えば、最初の塩基対形成ヌクレオチドに始まり、最後の塩基対形成ヌクレオチドに終わる領域に限定され得る。本明細書で使用する場合、核酸配列の相補体とは、核酸配列と、一方の5'末端が他方の3'末端と対形成されるようにアラインされる際に、「逆平行会合」するオリゴヌクレオチドを意味する。自然の核酸では一般に見出されないある特定の塩基が、本発明の核酸に含まれ得、例えば、イノシン及び7-デアザグアニンが挙げられる。相補性は完全である必要はない。安定した二重鎖は、ミスマッチ塩基対またはアンマッチ塩基を含有し得る。核酸技術の当業者は、例えば、オリゴヌクレオチドの長さ、オリゴヌクレオチドの塩基組成及び配列、イオン強度、ならびに、ミスマッチ塩基対の発生率を含む多数の変数を考慮して、二重鎖の安定性を実験的に測定することができる。

【0064】

したがって、いくつかの実施形態では、「相補的」とは、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100個またはそれ以上の核酸塩基の領域で、第2の核酸塩基配列の相補体と少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、または99%同一である、第1の核酸塩基配列、または、2つの配列がストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下にてハイブリダイズすることを意味する。「完全に相補的」とは、第1の核酸の各核酸塩基が、第2の核酸の対応する位置において、各核酸塩基と対形成可能であることを意味する。例えば、ある特定の実施形態では、各核酸塩基が核酸に対して相補性を有するオリゴヌクレオチドは、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100個またはそれ以上の核酸塩基の領域にわたり、核酸の相補体と同一である核酸塩基配列を有する。

10

【0065】

本明細書で使用する場合、「二本鎖核酸」は、核酸の一部、より長い核酸の一領域、または、核酸全体であることができる。「二本鎖核酸」は、例えば、限定されるものではないが、二本鎖DNA、二本鎖RNA、二本鎖DNA/RNAハイブリッドなどであることができる。二次構造（例えば、塩基対形成された二次構造）、及び／または、より高次な構造を有する一本鎖核酸は「二本鎖核酸」を含む。例えば、三重鎖構造は「二本鎖」とみなされる。いくつかの実施形態では、任意の塩基対形成された核酸は「二本鎖核酸」である。

20

【0066】

用語「単離された」は、「単離されたオリゴヌクレオチド」または「単離されたポリヌクレオチド」のように、核酸に関して使用されるときに、その天然の供給源に通常関連付けられる少なくとも1つの構成成分または混入物から特定され、分離される核酸配列を指す。単離された核酸は、それが天然にみられる形態または状況にあるものと異なる形態または状況にそのように存在する。対照的に、DNA及びRNAなどの核酸として、単離されていない核酸は、それらが自然に存在する状態で見出される。例えば、所与のDNA配列（例えば、遺伝子）は、隣接する遺伝子に近接する宿主細胞染色体上で見出され、特定のタンパク質をコードする特定のmRNA配列などのRNA配列は、多数のタンパク質をコードする多数の他のmRNAとの混合物として細胞中に見出される。しかしながら、所与のタンパク質を符号化する単離された核酸は、例として、所与のタンパク質を通常発現する細胞中の核酸などを含み、そこで核酸は、天然細胞のものと異なる染色体位置にある、またはその他の点で天然に見出されるものと異なる核酸配列と隣接している。単離された核酸、オリゴヌクレオチド、またはポリヌクレオチドは、一本鎖または二本鎖の形態で存在することができる。単離された核酸、オリゴヌクレオチド、またはポリヌクレオチドがタンパク質を発現するために利用される場合、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドは、センス鎖またはコード鎖を最低限含む（すなわち、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドは一本鎖であってよい）が、センス鎖及びアンチセンス鎖の両方を含んでもよい（すなわち、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドは二本鎖であってよい）。

30

40

【0067】

本明細書で使用する場合、「座位」とは、多型核酸、形質決定因子、遺伝子、またはマーカが位置する染色体領域である。本開示の座位は、集団に1つ以上の多型を含む。例えば、代替アレルがいくつかの個体には存在する。本明細書で使用する場合、「アレル」とは、特定の座位における代替の核酸配列を意味する。アレルの長さは、最小で1ヌクレオチド塩基であることができるが、通常はこれよりも大きい。例えば、第1のアレルは一の染色体で生じることができる一方で、第2のアレルは、例えば、ヘテロ接合個体の異なる染色体に対して、または、集団の異なるホモ接合もしくはヘテロ接合個体間で生じるよ

50

うに、第2の相同染色体で生じる。本明細書で使用する場合、「染色体の間隔」という用語は、単一の染色体に存在するゲノムDNAの、連続した線状スパンを指す。

【0068】

本明細書で使用する場合、「移入」または「移入する」とは、ある遺伝的背景から別の遺伝子背景への、座位の所望のアレルの伝達を意味する。

【0069】

本明細書で使用する場合、「交配した」、または「交配する」とは、受精（例えば、細胞、種子、または植物）により子孫を産むことを意味し、植物（有性）と自家受精（自家）との交配を含む。

【0070】

本明細書で使用する場合、「戻し交配する」、及び「戻し交配」とは、子孫植物が繰り返し、その親の片方と戻し交配されるプロセスを意味する。戻し交配スキームにおいて、「ドナー」親とは、導入される所望の遺伝子または座位を有する親植物を意味する。「レシピエント」親（1回以上用いられる）、または「再発性」親（2回以上用いられる）とは、遺伝子または座位が移入される親植物を意味する。この初期交配により、F1世代が生まれる。「BC1」という用語は、再発性親の2回目の使用を意味し、「BC2」とは、再発性親の3回目の使用を意味し、他も同様である。いくつかの態様では、戻し交配は繰り返し行われ、それぞれの連続した戻し交配世代の子孫個体は、それ自体が同じ親の遺伝子型に戻し交配される。

【0071】

本明細書で使用する場合、「単一遺伝子変換された」または「単一遺伝子変換」とは、戻し交配として知られている植物育種技術を用いて、または、遺伝子組み換えにより開発された植物を意味し、ここで、戻し交配技術により、または、遺伝子組み換えにより、変種に移された単一遺伝子に加えて、変種の所望の形態的及び生理学的特徴の本質的に全てが回復される。

【0072】

本明細書で使用する場合、「変種」という用語は、同一変種の他の植物からこれらを区別する、一定の特徴を分かち合う植物の集団を意味する。変種は、常にではないが多くの場合、市販されている。1つ以上の異なる形質を有する一方で、変種はさらに、当該変種内の個体間での全体的な変動が非常に小さいことを特徴とする。「純粋な株」の変種は、数世代の自家受粉及び選択、または、組織もしくは細胞培養技術を用いる、単一の親からの栄養繁殖により作製可能である。変種は、別の株または変種に、本質的に由来することができる。International Convention for the Protection of New Varieties of Plants (1961年12月2日：1972年11月10日、1978年10月23日、及び1991年3月19日にジュネーブで改訂)により定義されるように、変種とは、a) 最初の変種の単一の遺伝子型、または遺伝子型の組み合わせから生じる本質的な特徴の発現を保持しながら、最初の変種に主に由来する、または、最初の変種に主に由来する変種に主に由来する、b) 最初の変種と明確に区別可能である、及び、c) 誘導作用により生じる差を除き、最初の変種の単一の遺伝子型、または遺伝子型の組み合わせから生じる本質的な特徴の発現における最初の変動に一致する場合に、最初の変種「に本質的に由来する」。例えば、自然もしくは誘発された変異体、ソマクローナルバリエント、最初の変種、戻し交配、または形質転換の植物からのバリエント個体の選択により、本質的に由来する変種を入手することができる。第1のタバコ変種、及び、第1の変種が本質的に由来する第2のタバコ変種は、本質的に同一の遺伝的背景を有するものとみなされる。変種と区別される「株」とは、最も多くの場合、例えば、植物調査において非商業的に用いられる植物の群を指す。株は通常、対象となる1つ以上の形質の、個体間での全体的な変動をほぼ示さないものの、他の形質に関しては、個体間で若干の変動が存在し得る。

【0073】

本明細書で使用する場合、「優れた変種」とは、優れた農学的性能のための育種及び選

10

20

30

40

50

択から生じた、任意の変種を意味する。

【0074】

本明細書で使用する場合、マーカーにより補助された選択または育種の文脈における、「選択すること」または「選択」とは、ある特定の所定の基準に基づき、通常は集団から、所望の個体を選び出すまたは選択する行為を意味する。

【0075】

本明細書で使用する場合、「形質」という用語は、遺伝子型により影響を受ける可能性がある、細胞または生命体の、1つ以上の検出可能な特徴を意味する。表現型は、肉眼で、または、当該技術分野において周知の、任意の他の評価手段、例えば、顕微鏡、生化学的分析、ゲノム分析、特定の疾患耐性に関するアッセイなどにより、観察可能であり得る。場合によっては、表現型は、単一遺伝子または座位、例えば、「単一の遺伝子形質」により直接制御される。他の場合、表現型は、いくつかの遺伝子の結果である。

【0076】

本明細書で使用する場合、「遺伝変異」または「遺伝変化」という用語は、遺伝子に導入され、遺伝子によりコードされる産物の発現または活性を変化させる、遺伝性の遺伝子組み換えを意味する。このような組み換えは、例えば、プロモーター、5' UTR、エクソン、イントロン、3' UTR、またはターミネーター領域における、遺伝子の任意の配列領域に存在することができる。一態様では、変異は、遺伝子産物の発現または活性を低下させる、阻害する、または取り除く。別の態様では、変異は、遺伝子産物の発現または活性を増加させる、上昇させる、強化する、または増強する。一態様では、変異は、特定のタバコ変種または品種に存在する自然の多型ではない。本明細書で使用する場合、「変異アレル」とは、アレルが変異を含む座位に由来するアレルを意味する。本明細書で使用する場合、「突然変異誘発性」とは、導入遺伝子を伴うことなく、または、最終的な変異体に、変異関連導入遺伝子が残らない、変異を生成することを意味する。一態様では、突然変異誘発性はシスジェニックである。別の態様では、突然変異誘発性は、遺伝子、またはゲノム編集によるものである。さらなる態様では、突然変異誘発性は、無作為な変異導入、例えば、化学的（例えば、EMS）または物理的（ γ -照射）変異導入によるものである。

【0077】

本明細書で使用する場合、「多型」とは、集団に、1つ以上の変動が存在することを意味する。多型は、核酸のヌクレオチド配列における変動として、または、タンパク質のアミノ酸配列における変動として、現れる場合がある。多型は、1つ以上の個体の集団内の1つ以上の座位における、核酸配列または核酸特徴の1つ以上に変動が存在することを含む。変動は、1つ以上のヌクレオチド塩基の変化、1つ以上のヌクレオチドの挿入、または、1つ以上のヌクレオチドの欠失を含み得るが、これらに限定されない。多型は、不等乗り換え、ゲノム重複、ならびに染色体破壊及び融合などの、核酸複製における無作為なプロセスから、変異導入により、可動性ゲノムエレメントの結果として、コピー数多型から、及び、減数分裂のプロセス中に生じ得る。変動は、一般的に見出すことができるが、または、集団内に低頻度で存在することができ、前者は、一般的な植物の育種において大きな実用性があり、後者は、希少ではあるが重要な表現型の変動と関連し得る。有用な多型としては、一塩基多型（SNP）、DNA配列における挿入または欠失（インデル）、DNA配列の単純な配列反復（SSR）、制限酵素断片長多型（RELP）、及び、タグSNPを挙げることができる。遺伝マーカー、遺伝子、DNA由来の配列、RNA由来の配列、プロモーター、遺伝子の5' 非翻訳領域、遺伝子の3' 非翻訳領域、マイクロRNA、siRNA、寛容座位、サテライトマーカー、導入遺伝子、mRNA、ds mRNA、転写プロファイル、及びメチル化パターンもまた、多型を含むことができる。加えて、前述したものの存在、不存在、または、コピー数の変動は、多型を含み得る。

【0078】

本明細書で使用する場合、「植物」という用語は、植物全体、移植植物、植物の祖先（複数可）及び子孫、ならびに、種子、苗条、茎、根（塊茎を含む）、根茎、接穂、及び、

10

20

30

40

50

植物細胞、組織、及び臓器を含む植物部位を包含する。植物は、懸濁培養液、胚、分裂組織領域、カルス細胞、葉、配偶体、孢子体、花粉、及び小孢子を含む任意の形態であることができる。本開示の方法でとりわけ有用な植物としては、*Nicotiana* 科に属する植物全てが挙げられる。

【0079】

本明細書で使用する場合、「タバコ」という用語は、ニコチン性アルカロイドを産生する、*Nicotiana* 属の任意の植物を意味する。タバコはまた、*Nicotiana* 植物により産生される物質を含む製品も意味し、故に、例えば、膨張タバコ、再構成タバコ、シガレット、シガー、噛みタバコ、または、GEが増加したニコチンタバコ製の、無煙タバコ、嗅ぎタバコ、及びスヌースの形態を含む。*Nicotiana* 種の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：*Nicotiana acaulis*、*Nicotiana acuminata*、*Nicotiana acuminata* var. *multiflora*、*Nicotiana africana*、*Nicotiana alata*、*Nicotiana amplexicaulis*、*Nicotiana arentsii*、*Nicotiana attenuata*、*Nicotiana benavidesii*、*Nicotiana benthamiana*、*Nicotiana bigelovii*、*Nicotiana bonariensis*、*Nicotiana cavicola*、*Nicotiana clevelandii*、*Nicotiana cordifolia*、*Nicotiana corymbosa*、*Nicotiana debneyi*、*Nicotiana excelsior*、*Nicotiana forgetiana*、*Nicotiana fragrans*、*Nicotiana glauca*、*Nicotiana glutinosa*、*Nicotiana goodspeedii*、*Nicotiana gossei*、*Nicotiana hybrid*、*Nicotiana ingulba*、*Nicotiana kawakamii*、*Nicotiana knightiana*、*Nicotiana langsdorffii*、*Nicotiana linearis*、*Nicotiana longiflora*、*Nicotiana maritima*、*Nicotiana megalosiphon*、*Nicotiana miersii*、*Nicotiana noctiflora*、*Nicotiana nudicaulis*、*Nicotiana obtusifolia*、*Nicotiana occidentalis*、*Nicotiana occidentalis* subsp. *hesperis*、*Nicotiana otophora*、*Nicotiana paniculata*、*Nicotiana pauciflora*、*Nicotiana petunioides*、*Nicotiana plumbaginifolia*、*Nicotiana quadrivalvis*、*Nicotiana raimondii*、*Nicotiana repanda*、*Nicotiana rosulata*、*Nicotiana rosulata* subsp. *ingulba*、*Nicotiana rotundifolia*、*Nicotiana rustica*、*Nicotiana setchellii*、*Nicotiana simulans*、*Nicotiana solanifolia*、*Nicotiana spegazzinii*、*Nicotiana stocktonii*、*Nicotiana suaveolens*、*Nicotiana sylvestris*、*N. tabacum*、*Nicotiana thyrsoiflora*、*Nicotiana tomentosa*、*Nicotiana tomentosiformis*、*Nicotiana trigonophylla*、*Nicotiana umbratica*、*Nicotiana undulata*、*Nicotiana velutina*、*Nicotiana wigandioides*、及び *Nicotiana x sanderiae*。

【0080】

本明細書で使用する場合、「トランスジェニック植物」という用語は、それ自体が別の生命体もしくは種にもまた存在する、または、宿主コドン使用頻度と比較して、別の生命

10

20

30

40

50

体もしくは種から最適化された核酸配列を含む植物を意味する。単子葉及び双子葉被子植物の両方、または、裸子植物の植物細胞を、当業者に既知の様々な方法で形質転換することができる。例えば、Klein et al., *Biotechnology* 4: 583-590 (1993); Bechtold et al., *C. R. Acad. Sci. Paris* 316: 1194-1199 (1993); Bent et al., *Mol. Gen. Genet.* 204: 383-396 (1986); Paszowski et al., *EMBO J.* 3: 2717-2722 (1984); Sagi et al., *Plant Cell Rep.* 13: 262-266 (1994)を参照されたい。

【0081】

本明細書において別途定義されない限り、本開示に関連して使用される科学用語及び技術用語は、当業者によって一般的に理解される意味を有するものとする。例えば、本明細書に記載する、細胞及び組織培養、分子生物学、植物生物学、遺伝学及びタンパク質及び核酸化学及びハイブリダイゼーションと関連して用いる任意の専門用語、ならびに、これらの技術は周知であり、かつ、当該技術分野において一般的に使用されているものである。用語の意味及び範囲は明確でなければならないが、何らかの潜在的な曖昧さが発生する場合は、本明細書で提供する定義を、あらゆる辞書または外的な定義に優先する。さらに、別途文脈により要求されない限り、単数形の用語は、複数形も含み、複数形の用語は、単数形も含む。

【0082】

2. 低ニコチンタバコ植物

タバコアルカロイドの蓄積は、複雑な遺伝制御の下にあると考えられている。研究者は歴史的に、Nic1及びNic2座位（文献によっては、A及びB座位とも呼ばれている）において自然に存在するアレル変動性を用い、タバコにおける、より低いニコチンレベルを達成することを調査してきた。このような変動性は、LA Burley 21 (Legg et al., 1970) 及びLAFC53 (Chaplin, 1975) などの、低アルカロイド育種株の開発に使用されてきた。しかし、これらの遺伝子型は、日常的に、 0.4 mg g^{-1} を下回る平均ニコチンレベルを有する乾葉を生み出さない (Lewis, 2018)。

【0083】

Nic2座位は、タバコアルカロイド生合成経路において、構造遺伝子の発現に影響を全体的に及ぼすエチレン応答因子 (ERF) 転写因子をコードする、N. tabacum 連結基19における一連の遺伝子を含むことが発見されている。この遺伝子クラスターは、「LA Burley 21」（戻し交配由来の、Burley 21のnic1/nic1 nic2/nic2版が欠失していることが判明している）。同様の遺伝子アレイが、N. tabacum 連結基7のNic1座位に、または、この付近に位置し (Sui et al., 2020; Qin et al., 2021)、ここでは、ERF199の、後成学的にライセンシングされたアレルが、LA Burley 21におけるこの座位での、アルカロイド蓄積の影響を説明し得る (Qin et al., 2021)。

【0084】

ニコチンデメチラーゼ (NDM) 酵素をコードする座位における、自然に存在する変動性は、脱メチル化からのノルニコチン形成の増加／減少により、ニコチンレベルに顕著に影響を及ぼす可能性もまたある。ノルニコチンが、乾いたタバコのキュアリング及び保管中に、対応するその発がん性タバコ特異的ニトロソアミン (TSMA) である、N'-ニトロソノルニコチン (NNN) を形成する傾向の増加故に、ニコチンからノルニコチンへの、生化学的変換は歴史的に、タバコ植物においてニコチンレベルを低減する魅力的でない方法と考えられてきた。アルカロイドがこのように多く蓄積することでまた、乾葉の物理的及び感覚刺激特性も望ましくなく変化する。N. tabacumにおけるニコチン脱メチル化度は、遺伝的に不安定な形質と考えられているが、N. tabacum、N.

10

20

30

40

50

syvestris、及び *tomentosiformis* の前駆種は、安定して高度なニコチン脱メチル化を呈する。

【0085】

本明細書でさらに記載するとおり、本開示の実施形態は、L A F C 5 3 由来の *N i c 1* 及び *N i c 2* 座位における遺伝変動性が、安定し高レベルの NDM 活性をコードする *N . syvestris* または *N . tomentosiformis* のいずれかに由来する、遺伝変動性と組み合わせた、新規のタバコ遺伝子型を開発するための、植物育種方法論を含む。これらの遺伝の組み合わせを用いることで、*N i c 1* 及び *N i c 2* 座位における変動性は、ニコチン生合成に関与する構造遺伝子の発現を低減するように作用するが、ニコチンをゼロまでは低減せず、またさらには通常、ニコチンを 0.4 mg g^{-1} 未満に低減もしない。残りのニコチンの大部分は、NDM 酵素をコードする、*N . syvestris* 由来または *N . tomentosiformis* 由来の遺伝子の活性により、取り除かれる。この戦略の結果として存在するのが、(標準的な鉄管乾燥タバコ品種と比較して) アナバシン、アナタピン、及びノルニコチンが対応して減少し、農場で成長したタバコに対して、公的に報告されている最低の、かつ商業的に入手可能なニコチンを生み出す遺伝子型である。重要なことに、ノルニコチンレベルは、標準的なタバコ品種と比較して増加していない。

【0086】

低ニコチン含有量に影響を及ぼす、*N i c 1* 及び *N i c 2* 座位における遺伝変動性の供給源は、鉄管乾燥タバコ育種株 L A F C 5 3 に由来した。安定し、かつ高レベルのニコチンデメチラーゼ活性をコードする遺伝変動性の供給源は、最終的に、*N . syvestris* または *N . tomentosiformis* のいずれかに由来した。従来の種間ハイブリダイゼーションを用い、続いて、戻し交配育種により、*N . syvestris* 由来の主たる NDM 遺伝子を、古い鉄管乾燥タバコ品種である「S C 5 8」の遺伝的背景に移すことにより、育種株 S C 5 8 C s C s が以前に開発された。同様に、育種株 S C 5 8 C t C t もまた、*N . tomentosiformis* 由来の主たる NDM 遺伝子を、「S C 5 8」の遺伝的背景に移す、同様の育種方法論を用いて開発した。S C 5 8 c s C s は後で、栽培されたタバコに、自然に存在する遺伝子とは違い、これにより、*N . tabacum* 版が、2つの変性変異により不活性化される、C Y P 8 2 E 2 として示される NDM 遺伝子を有することが判明した (Chakrabarti et al., 2007)。S C 5 8 C s C s に由来する C Y P 8 2 E 2 の発現は、葉の老化により刺激される。S C 5 8 C t C t は後で、栽培されたタバコに、自然に存在する遺伝子とは違い、これにより、*N . tabacum* 版が、単一の塩基対変異により不活性化される、m C Y P 8 2 E 3 として示されるニコチンデメチラーゼ遺伝子を有することが判明した (Gavilano et al., 2007)。S C 5 8 C t C t 由来の C Y P 8 2 E 3 は、緑葉において活性であり、この遺伝子が、ニコチンを脱メチル化して (C Y P 8 2 E 2 におけるよりも多くの) ノルニコチンを形成することにおいて、極めて効果的なものとなる。

【0087】

戻し交配育種法を用いて、精選された鉄管乾燥遺伝的背景において、L A F C 5 3 由来の *n i c 1* 及び *n i c 2* アレルを、それぞれ、*N . syvestris* または *N . tomentosiformis* のいずれかに由来する C Y P 8 2 E 2 または C Y P 8 2 E 3 のいずれかと組み合わせた。6世代の戻し交配を用いて、対象となるアレルを、放任受粉した鉄管乾燥タバコ品種である、品種「K 3 2 6」の遺伝的背景に移した。6番目の戻し交配世代の後、対象となるアレル変動性を有する B C₆ F₁ 植物を自己受粉させ、対象となるアレルに対してホモ接合の B C₆ F₂ 個体を同定した。選択された B C₆ F₂ 植物を自己受粉させ、安定した B C₆ F₃ シードロットを生み出した。上述の、花粉親としての同系交配株を、L A F C 5 3 由来の *n i c 1* 及び *n i c 2* アレルが、戻し交配育種手順により移された、C m s 版の K 3 2 6 とハイブリダイズすることにより、細胞質雄性不稔性 (C m s) F₁ ハイブリッドが生み出された。*N . syvestris* または *N .*

tomentosiformisのいずれかに由来するNDM遺伝子を、存在し得る、あらゆる有害な連結抗力の影響を減少させるために、F₁ハイブリッドにおけるヘテロ接合条件で展開する。

【0088】

上述に従うと、本開示の実施形態は、自然に存在する対応するタバコ植物、またはその一部と比較して、レベルが低減した少なくとも1つのニコチン性アルカロイドを含むタバコ品種、またはその任意の一部を含む。いくつかの実施形態では、本開示の方法に従い産生したタバコ品種は、ニコチン、ノルニコチン、アナタピン、及びアナバシンからなる群から選択される少なくとも1つのニコチン性アルカロイドを含む。

【0089】

いくつかの実施形態では、本開示のタバコ品種は、レベルが低下したニコチンを含む。いくつかの実施形態では、タバコ品種は、0.35%以下のニコチンを含む。いくつかの実施形態では、タバコ品種は、0.30%以下のニコチンを含む。いくつかの実施形態では、タバコ品種は、0.25%以下のニコチンを含む。いくつかの実施形態では、タバコ品種は、0.20%以下のニコチンを含む。いくつかの実施形態では、タバコ品種は、0.15%以下のニコチンを含む。いくつかの実施形態では、タバコ品種は、0.10%以下のニコチンを含む。いくつかの実施形態では、タバコ品種は、0.09%以下のニコチンを含む。いくつかの実施形態では、タバコ品種は、0.08%以下のニコチンを含む。いくつかの実施形態では、タバコ品種は、0.07%以下のニコチンを含む。いくつかの実施形態では、タバコ品種は、0.06%以下のニコチンを含む。いくつかの実施形態では、タバコ品種は、0.05%以下のニコチンを含む。いくつかの実施形態では、タバコ品種は、0.04%以下のニコチンを含む。いくつかの実施形態では、タバコ品種は、0.03%以下のニコチンを含む。いくつかの実施形態では、タバコ品種は、0.02%以下のニコチンを含む。いくつかの実施形態では、タバコ品種は、約0.1%～約0.35%のニコチンを含む。いくつかの実施形態では、タバコ品種は、約0.1%～約0.25%のニコチンを含む。いくつかの実施形態では、タバコ品種は、約0.1%～約0.15%のニコチンを含む。いくつかの実施形態では、タバコ品種は、約0.1%～約0.10%のニコチンを含む。いくつかの実施形態では、タバコ品種は、約0.15%～約0.35%のニコチンを含む。いくつかの実施形態では、タバコ品種は、約0.25%～約0.35%のニコチンを含む。いくつかの実施形態では、タバコ品種は、約0.10%～約0.20%のニコチンを含む。いくつかの実施形態では、タバコ品種は、約0.01%～約0.10%のニコチンを含む。いくつかの実施形態では、タバコ品種は、約0.01%～約0.5%のニコチンを含む。いくつかの実施形態では、タバコ品種は、約0.01%～約0.03%のニコチンを含む。

【0090】

いくつかの実施形態では、本開示のタバコ品種は、レベルが低下したノルニコチンを含む。いくつかの実施形態では、品種は、0.04%以下のノルニコチンを含む。いくつかの実施形態では、品種は、0.03%以下のノルニコチンを含む。いくつかの実施形態では、品種は、0.02%以下のノルニコチンを含む。いくつかの実施形態では、品種は、0.01%以下のノルニコチンを含む。いくつかの実施形態では、品種は、0.005%以下のノルニコチンを含む。いくつかの実施形態では、品種は、約0.005%～約0.04%のノルニコチンを含む。いくつかの実施形態では、品種は、約0.01%～約0.04%のノルニコチンを含む。いくつかの実施形態では、品種は、約0.02%～約0.04%のノルニコチンを含む。いくつかの実施形態では、品種は、約0.03%～約0.04%のノルニコチンを含む。いくつかの実施形態では、品種は、約0.005%～約0.03%のノルニコチンを含む。いくつかの実施形態では、品種は、約0.005%～約0.02%のノルニコチンを含む。いくつかの実施形態では、品種は、約0.005%～約0.01%のノルニコチンを含む。

【0091】

20

30

40

0.5%のアナバシンを含む。いくつかの実施形態では、品種は、約0.003%~約0.006%のアナバシンを含む。

【0093】

いくつかの実施形態では、品種は、野生型 *nic1* と比較して、発現及び／または機能が低下した *nic1* アレルを含む。いくつかの実施形態では、品種は、野生型 *nic2* と比較して、発現及び／または機能が低下した *nic2* アレルを含む。いくつかの実施形態では、品種は、野生型 *nic1* 及び野生型 *nic2* と比較して、発現及び／または機能が低下した *nic1* アレル及び *nic2* アレルを含む。いくつかの実施形態では、*nic1* 及び／または *nic2* アレルは、以下の株のうちの少なくとも1つに由来する：*LAF C 53*、*MAFC 5*、*LMAFC 34*、*LA Burley 21*、*LI Burley 21*、及び *HI Burley 21*。いくつかの実施形態では、第1及び／または第2のタバコ変種は、*nic1* 及び／または *nic2* ヌルアレル（欠失）を含む。いくつかの実施形態では、*nic1* 及び／または *nic2* ヌルアレルは、自然に存在する *N. tabacum germplasm* に由来する。

10

【0094】

いくつかの実施形態では、品種は、機能的 *CYP82E2* アレルを含む。いくつかの実施形態では、*CYP82E2* アレルは、*N. sylvestris* に由来する。いくつかの実施形態では、品種は、機能的 *CYP82E3* アレルを含む。いくつかの実施形態では、*CYP82E3* アレルは、*N. tomentosiformis*、または、関連する種（例えば、*Nicotiana Section Tomentosae*）に由来する。いくつかの実施形態では、品種は、*N. sylvestris* 由来の機能的 *CYP82E2* アレル、及び、*N. tomentosiformis*、または関連する種（例えば、*Nicotiana Section Tomentosae*）に由来する機能的 *CYP82E3* アレルを含む。いくつかの実施形態では、*CYP82E2* 及び／または *CYP82E3* アレルによりコードされたタンパク質の、ニコチンN-脱メチル化活性は、自然に存在するタバコ植物と比較して増加している。

20

【0095】

いくつかの実施形態では、本開示のタバコ品種は、非トランスジェニックである（例えば、異種導入遺伝子を有しない）。これらの実施形態によれば、本開示のタバコ品種は、レベルが低下した少なくとも1つのニコチン性アルカロイドに対応する、所望の形質（複数可）を有する様々なタバコ株の育種（例えば、戻し交配）により生産することができる。そのため、本開示のタバコ品種は、自然に存在しない。

30

【0096】

本開示に基づき、当業者により理解されるように、レベルが低下した本明細書に記載する少なくとも1つのニコチン性アルカロイドを有するタバコ品種は、トランスジェニックアプローチを用いてもまた生産することができる。いくつかの実施形態では、本開示のタバコ品種は、レベルが低下した少なくとも1つのニコチン性アルカロイドに対応する1つ以上の形質を含むように組み換えることができる。例えば、タバコ植物を組み換え、*LAF C 53*、*MAFC 5*、*LMAFC 34*、*LA Burley 21*、*LI Burley 21*、及び *HI Burley 21* で見出されるものに実質的に類似の *nic1* 及び／または *nic2* アレルを含めることができる。これらの *nic1* 及び／または *nic2* アレルは、レベルが低下した少なくとも1つのニコチン性アルカロイドをもたらす、1つ以上の遺伝子変化（例えば、機能喪失または質量形相変異）を有することができる。このような遺伝子変化は、限定されるものではないが、転写活性化様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）、メガヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、及び、クラスター化され、規則的に間隔が空いた短い回文構造の繰り返し（CRISPR）／Cas9 システム、CRISPR／Cpf1 システム、CRISPR／Csm1 システム、ならびに、これらの組み合わせを含む、当該技術分野において周知の任意の手段を用いて組み換えることができる（例えば、Gaj et al., Trends in Biotechnology, 31 (7): 397-405 (2013) を参照されたい）。

40

50

【0097】

レベルが低下した本明細書に記載する少なくとも1つのニコチン性アルカロイドを有するタバコ品種を組み換え、*nic1* 及び／または *nic2* への変化に加えて、レベルが低下した少なくとも1つのニコチン性アルカロイドに対応する1つ以上の形質を含めることもまた可能である。例えば、タバコ植物を組み換え、対応する、自然に存在するタバコ植物と比較して、機能的な *CYP82E2* アレル及び／または *CYP82E3* アレルを含めることができる。いくつかの実施形態では、*CYP82E2* アレル及び／または *CYP82E3* アレルを組み換え、遺伝子変異により非機能的となった、対応する *CYP82E2* 及び／または *CYP82E3* タンパク質の野生型機能を回復する。いくつかの実施形態では、*CYP82E2* 及び／または *CYP82E3* アレルを組み換え、レベルが低下した少なくとも1つのニコチン性アルカロイド（例えば、機能獲得または発現亢進変異）をもたらす1つ以上の遺伝子変化を有するようにすることができる。このような遺伝子変化は、限定されるものではないが、転写活性化様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）、メガヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、及び、クラスター化され、規則的に間隔が空いた短い回文構造の繰り返し（CRISPR）／Cas9システム、CRISPR／Cpf1システム、CRISPR／Csm1システム、ならびに、これらの組み合わせを含む、当該技術分野において周知の任意の手段を用いて組み換えることができる（例えば、Gaj et al., Trends in Biotechnology, 31 (7): 397-405 (2013) を参照されたい）。

10

【0098】

いくつかの実施形態では、タバコ植物を組み換え、対応する、自然に存在する、または、形質転換されていない対照タバコ植物と比較して、機能的な *CYP82E2* アレル及び／または *CYP82E3* アレルを含める。例えば、いくつかの実施形態では、*CYP82E2* アレルを組み換え、遺伝子変異によって非機能的となっている、対応する *CYP82E2* タンパク質の機能を回復する、または、対応する、自然に存在する、もしくは、形質転換されていない対照タバコ植物と比較して、対応する *CYP82E2* タンパク質の活性を増加させる。いくつかの実施形態では、タバコ植物の *CYP82E2* アレルを組み換え、野生型 *CYP82E2* アミノ酸配列（例えば、配列番号1）と比較して、K375E 及び／または L422W 点突然変異をコードするヌクレオチド配列を含める。例示的な野生型 *CYP82E2* アミノ酸配列は、配列番号1（GenBank 受託番号 ABA07806）に記載される： MVFPIEAFVGLVTFTFLLYFLWTKKSQKLPKPLPPKIPGGWPVIGHLFHFNNDDGDRPLARKLGLADKYGPVFTFRLGLPLVLVSSYEAIKDCFSTND AIFS NRPAFLYGEYLGYNNTMLFLANYGPYWRKNRKLVIQEVLSASRLEKFKQVRFTRIQTSIKNLYTRINGNSSTINLTDWLEELNFGGLIVKMIAGKNYESGKGDEQVERFKNAFKDFMVLSMEFVLWDAFPIPLFKWVDFQGHKAMKRTFKDIDSVFQNWLEE HINKREKMEVGAEGNEQDFIDVVL SKLSKEYLDEGYSRDTV I KATVFSLVLD AADTVALHINWGMTLLINNQNALMKAQEEIDTKVGKDRWVEESDIKDLVYLQAIVKKVLRRLYPPGPLLVP HENVKDCV VSGYHIPKGTRLFANVMKLQRDPKLLSNPDKFDPERFIAGDIDFRGHHYEFIPFGSGRRSCPGMTYALQVEHLTMAHLIQGFNYKTPNDEALDMKEGAGITIRKVNPVELIITPRLAPELY（配列番号1）。

20

30

40

【0099】

野生型 *CYP82E2* アミノ酸配列と比較して、K375E 点突然変異を含む例示的な *CYP82E2* アミノ酸配列を、配列番号2に記載する（点突然変異は、以下で太字かつ下線を引いた文字により表される）：

50

【化 1】

MVFPIEAFVGLVTFTFLLYFLWTKKSQKLPKPLPPKIPGGWPVIGHLFHFNNNDGDDRPLARKLGD
 LADKYGPVFTFRLGLPLVLVSSYEAIKDCFSTNDAIFSNRPAFLYGEYLGYNNTMLFLANYGP
 YWRKNRKLVIQEVLSASRLEKFKQVRFTRIQTSIKNLYTRINGNSSTINLTDWLEELNFGGLIVKMI
 AGKNYESGKGDEQVERFKNAFKDFMVLSMEFVLWDAFPIPLFKWVDFQGHKAMKRFTKIDIDS
 VFQNWLEEHINKREKMEVGAEGNEQDFIDVVLSSKLSKEYLDEGYSRDTPVIKATVFSLVLDAAD
 TVALHINWGMTLLINNQNALMKAQEEIDTKVGKDRWVEESDIKDLVYLQAIVKEVLRLYPPGP
 LLVPHENVKDCVVSgyHIPKGTRLFANVMKLQRDPKLLSNPDKFDPERFIAGDIDFRGHHYEFIP
 FGSGRRRSCPGMTYALQVEHLTMAHLIQGFNYKTPNDEALDMKEGAGITIRKVNVPVELIITPRLAP
 ELY（配列番号2）。

10

【0100】

野生型CYP82E2アミノ酸配列と比較して、L422W点突然変異を含む例示的なCYP82E2アミノ酸配列を、配列番号3に記載する（点突然変異は、以下で太字かつ下線を引いた文字により表される）：

【化 2】

MVFPIEAFVGLVTFTFLLYFLWTKKSQKLPKPLPPKIPGGWPVIGHLFHFNNNDGDDRPLARKLGD
 LADKYGPVFTFRLGLPLVLVSSYEAIKDCFSTNDAIFSNRPAFLYGEYLGYNNTMLFLANYGP
 YWRKNRKLVIQEVLSASRLEKFKQVRFTRIQTSIKNLYTRINGNSSTINLTDWLEELNFGGLIVKMI
 AGKNYESGKGDEQVERFKNAFKDFMVLSMEFVLWDAFPIPLFKWVDFQGHKAMKRFTKIDIDS
 VFQNWLEEHINKREKMEVGAEGNEQDFIDVVLSSKLSKEYLDEGYSRDTPVIKATVFSLVLDAAD
 TVALHINWGMTLLINNQNALMKAQEEIDTKVGKDRWVEESDIKDLVYLQAIVKKVLRRLYPPGP
 LLVPHENVKDCVVSgyHIPKGTRLFANVMKLQRDPKL~~W~~SNPDKFDPERFIAGDIDFRGHHYEFI
 PFGSGRRRSCPGMTYALQVEHLTMAHLIQGFNYKTPNDEALDMKEGAGITIRKVNVPVELIITPRLA
 PELY（配列番号3）。

20

【0101】

野生型CYP82E2アミノ酸配列と比較して、K375E点突然変異及びL422W点突然変異を含む例示的なCYP82E2アミノ酸配列を、配列番号4に記載する（点突然変異は、以下で太字かつ下線を引いた文字により表される）：

30

【化 3】

MVFPIEAFVGLVTFTFLLYFLWTKKSQKLPKPLPPKIPGGWPVIGHLFHFNNNDGDDRPLARKLGD
 LADKYGPVFTFRLGLPLVLVSSYEAIKDCFSTNDAIFSNRPAFLYGEYLGYNNTMLFLANYGP
 YWRKNRKLVIQEVLSASRLEKFKQVRFTRIQTSIKNLYTRINGNSSTINLTDWLEELNFGGLIVKMI
 AGKNYESGKGDEQVERFKNAFKDFMVLSMEFVLWDAFPIPLFKWVDFQGHKAMKRFTKIDIDS
 VFQNWLEEHINKREKMEVGAEGNEQDFIDVVLSSKLSKEYLDEGYSRDTPVIKATVFSLVLDAAD
 TVALHINWGMTLLINNQNALMKAQEEIDTKVGKDRWVEESDIKDLVYLQAIVKEVLRLYPPGP
 LLVPHENVKDCVVSgyHIPKGTRLFANVMKLQRDPKL~~W~~SNPDKFDPERFIAGDIDFRGHHYEFI
 PFGSGRRRSCPGMTYALQVEHLTMAHLIQGFNYKTPNDEALDMKEGAGITIRKVNVPVELIITPRLA
 PELY（配列番号4）。

40

【0102】

いくつかの実施形態では、CYP82E3アレルを組み換え、遺伝子変異によって非機能的となっている、対応するCYP82E3タンパク質の機能を回復する、または、対応する、自然に存在する、もしくは、形質転換されていない対照タバコ植物と比較して、対応するCYP82E3タンパク質の活性を増加させる。いくつかの実施形態では、タバコ植物のCYP82E3アレルを組み換え、野生型CYP82E3アミノ酸配列（例えば、配列番号5）と比較して、C330W点突然変異をコードするヌクレオチド配列を含める。例示的な野生型CYP82E3アミノ酸配列は、配列番号5（NCBI参照配列：NM

50

— 0 0 1 3 2 6 0 6 3 . 1) に記載される : MVFPVEAIVGLVTFTFLFYFLWTKKSQK
PSKPLPPKIPGGWPVIGHLFYFDDDGDDRPLARKLGLADKYGPVFTFRLGLPLVLV
VSSYEAIKDCFSTNDAIFSNRPAFLYGEYLGYNAMLFLANYGSYWRKNRKLIIQEV
SASRLEKFKHVRFARIQTSIKNLYTRIDGNSSTINLTDWLEELNFGILVVKMIAGKNYE
SGKGDEQVERFKKAFKDFMILSMEFVLWDAFPIPLFKWVDFQGHVKAMKRTFKDID
SVFQNWLEEHIKKREKIMEVGTEGNEQDFIDVVLKMSNEYLGEGYSRDVIKATVF
SLVLDAADTVALHINCGMALLINNQNALKKAQEEIDTKVGKDRWVEESDIKDLVYL
QAIVKEVLRLYPPGPLLVPHENVEDCVVSGYHIPKGTRLFANVMKLQRDPKLWSNP
DKFNPERFIARDIDFHGQHYEYIPFGSGRRSCPGMTYALQVEHLTMAHLIQGFNYRT
PTDEPLDMKEGAGITIRKVNVPVKVIITPRLAPELY (配列番号 5) 。

10

【 0 1 0 3 】

野生型 CYP82E3 アミノ酸配列と比較して、C330W 点突然変異を含む例示的な
CYP82E3 アミノ酸配列を、配列番号 6 に記載する (点突然変異は、以下で太字かつ
下線を引いた文字により表される) :

【 化 4 】

MVFPVEAIVGLVTFTFLFYFLWTKKSQKPSKPLPPKIPGGWPVIGHLFYFDDDGDDRPLARKLGL
LADKYGPVFTFRLGLPLVLVSSYEAIKDCFSTNDAIFSNRPAFLYGEYLGYNAMLFLANYGS
YWRKNRKLIIQEVLSASRLEKFKHVRFARIQTSIKNLYTRIDGNSSTINLTDWLEELNFGILVVKMI
AGKNYESGKGDEQVERFKKAFKDFMILSMEFVLWDAFPIPLFKWVDFQGHVKAMKRTFKDIDS
VFQNWLEEHIKKREKIMEVGTEGNEQDFIDVVLKMSNEYLGEGYSRDVIKATVFSLVLDAAD
TVALHINWG MALLINNQNALKKAQEEIDTKVGKDRWVEESDIKDLVYLQAIVKEVLRLYPPGP
LLVPHENVEDCVVSGYHIPKGTRLFANVMKLQRDPKLWSNPDKFNPERFIARDIDFHGQHYEYI
PFGSGRRSCPGMTYALQVEHLTMAHLIQGFNYRTPTDEPLDMKEGAGITIRKVNVPVKVIITPRLA
PELY (配列番号 6) 。

20

【 0 1 0 4 】

いくつかの実施形態では、本科学技術は、ニコチン性アルカロイド含有量が低下したタ
バコ植物の製造方法であって、当該方法は、タバコ植物 (例えば、*Nicotiana*
tabacum) 内で、(A) 対応する、自然に存在する、または、形質転換されてい
ない対照タバコ植物と比較して、CYP82E2 及び／または CYP82E3 の活性を増加
させる遺伝子組み換えと、(B) *nic1* の劣性アレル、及び／または、*nic2* の劣性
アレルと、を組み合わせることを含む、上記方法を提供する。

30

【 0 1 0 5 】

いくつかの実施形態では、*nic1* の劣性アレル、及び／または、*nic2* の劣性ア
レルを導入することは、劣性アレルのうちの 1 つ以上を、従来の育種により、例えば、野生
型タバコ植物と比較して、タバコ植物での CYP82E2 及び／または CYP82E3 の
活性を増加させる 1 つ以上の遺伝子組み換えを含むタバコ植物 (例えば、*Nicotia*
na tabacum) に組み込むことを含むことができる。

【 0 1 0 6 】

いくつかの実施形態では、(A) CYP82E2 及び／または CYP82E3 の活性を
増加させる遺伝子組み換えと、(B) *nic1* の劣性アレル及び／または *nic2* の劣性
アレルと、を有する本科学技術の方法により製造されたタバコ植物は、対応する、自然に
存在する、または、形質転換されていない対照タバコ植物と比較して、少なくとも約 40
% (例えば、少なくとも約 40 %、41 %、42 %、43 %、44 %、45 %、46 %、
47 %、48 %、49 %、50 %、51 %、52 %、53 %、54 %、55 %、56 %、
57 %、58 %、59 %、60 %、61 %、62 %、63 %、64 %、65 %、66 %、
67 %、68 %、69 %、70 %、71 %、72 %、73 %、74 %、75 %、76 %、
77 %、78 %、79 %、80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、
87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、

40

50

もしくはそれ以上、または、これらの中の任意の範囲もしくは値) 減少した、ニコチン性アルカロイド含有量を含むことができる。いくつかの実施形態では、タバコ植物中で減少したニコチン性アルカロイドは、ニコチンであることができ、ニコチン含有量は、対応する、自然に存在する、または、形質転換されていない対照タバコ植物と比較して、約 90 % 以上 (例えば、約 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % 以上) 減少することができる。

【0107】

いくつかの実施形態では、(A) CYP82E2 及び／または CYP82E3 の活性を増加させる遺伝子組み換えと、(B) nic1 の劣性アレル及び／または nic2 の劣性アレルと、を有する本科学技術の方法により製造されたタバコ植物は、レベルが低下したニコチンを含む。いくつかの実施形態では、タバコ植物は、約 0.35 % 以下のニコチンを含む。他の実施形態では、タバコ植物は、約 0.30 % 以下のニコチン、約 0.25 % 以下のニコチン、約 0.20 % 以下のニコチン、約 0.15 % 以下のニコチン、約 0.10 % 以下のニコチン、約 0.09 % 以下のニコチン、約 0.08 % 以下のニコチン、約 0.07 % 以下のニコチン、約 0.06 % 以下のニコチン、約 0.05 % 以下のニコチン、約 0.04 % 以下のニコチン、約 0.03 % 以下のニコチン、約 0.02 % 以下のニコチン、または、約 0.01 % 以下のニコチンを含む。

10

【0108】

いくつかの実施形態では、タバコ植物は、約 0.1 % ～ 約 0.35 % のニコチン、約 0.1 % ～ 約 0.25 % のニコチン、約 0.1 % ～ 約 0.15 % のニコチン、約 0.1 % ～ 約 0.10 % のニコチン、約 0.15 % ～ 約 0.35 % のニコチン、約 0.25 % ～ 約 0.35 % のニコチン、約 0.10 % ～ 約 0.20 % のニコチン、約 0.01 % ～ 約 0.10 % のニコチン、約 0.01 % ～ 約 0.5 % のニコチン、または、約 0.01 % ～ 約 0.03 % のニコチンを含む。

20

【0109】

いくつかの実施形態では、(A) CYP82E2 及び／または CYP82E3 の活性を増加させる遺伝子組み換えと、(B) nic1 の劣性アレル及び／または nic2 の劣性アレルと、を有する本科学技術の方法により製造されたタバコ植物は、レベルが低下したノルニコチンを含む。いくつかの実施形態では、植物は、約 0.04 % 以下のノルニコチン、約 0.03 % 以下のノルニコチン、約 0.02 % 以下のノルニコチン、約 0.01 % 以下のノルニコチン、または、約 0.005 % 以下のノルニコチンを含む。いくつかの実施形態では、植物は、約 0.005 % ～ 約 0.04 % のノルニコチン、約 0.01 % ～ 約 0.04 % のノルニコチン、約 0.02 % ～ 約 0.04 % のノルニコチン、約 0.03 % ～ 約 0.04 % のノルニコチン、約 0.005 % ～ 約 0.03 % のノルニコチン、約 0.005 % ～ 約 0.02 % のノルニコチン、または、約 0.005 % ～ 約 0.01 % のノルニコチンを含む。

30

【0110】

いくつかの実施形態では、(A) CYP82E2 及び／または CYP82E3 の活性を増加させる遺伝子組み換えと、(B) nic1 の劣性アレル及び／または nic2 の劣性アレルと、を有する本科学技術の方法により製造されたタバコ植物は、レベルが低下したアナタピンを含む。いくつかの実施形態では、植物は、約 0.06 % 以下のアナタピン、約 0.05 % 以下のアナタピン、約 0.04 % 以下のアナタピン、約 0.03 % 以下のアナタピン、約 0.02 % 以下のアナタピン、約 0.01 % 以下のアナタピン、約 0.005 % 以下のアナタピン、または、約 0.001 % 以下のアナタピンを含む。他の実施形態では、植物は、約 0.001 % ～ 約 0.06 % のアナタピン、約 0.005 % ～ 約 0.06 % のアナタピン、約 0.01 % ～ 約 0.06 % のアナタピン、約 0.02 % ～ 約 0.06 % のアナタピン、約 0.03 % ～ 約 0.06 % のアナタピン、約 0.04 % ～ 約 0.06 % のアナタピン、約 0.05 % ～ 約 0.06 % のアナタピン、約 0.005 % ～ 約 0.05 % のアナタピン、約 0.005 % ～ 約 0.04 % のアナタピン、約 0.005 % ～ 約 0.03 % のアナタピン、約 0.005 % ～ 約 0.02 % のアナタピン、約 0.005 %

40

50

～約 0.01% のアナタビン、約 0.01%～約 0.05% のアナタビン、または、約 0.02%～約 0.04% のアナタビンを含む。

【0111】

いくつかの実施形態では、(A) CYP82E2 及び／または CYP82E3 の活性を増加させる遺伝子組み換えと、(B) nic1 の劣性アレル及び／または nic2 の劣性アレルと、を有する本科学技術の方法により製造されたタバコ植物は、レベルが低下したアナバシンを含む。いくつかの実施形態では、植物は、約 0.008% 以下のアナバシン、約 0.007% 以下のアナバシン、約 0.006% 以下のアナバシン、約 0.005% 以下のアナバシン、約 0.004% 以下のアナバシン、約 0.003% 以下のアナバシン、約 0.002% 以下のアナバシン、約 0.001% 以下のアナバシン、または、約 0.0005% 以下のアナバシンを含む。他の実施形態では、植物は、約 0.0005%～約 0.008% のアナバシン、約 0.001%～約 0.008% のアナバシン、約 0.002%～約 0.008% のアナバシン、約 0.003%～約 0.008% のアナバシン、約 0.004%～約 0.008% のアナバシン、約 0.005%～約 0.008% のアナバシン、約 0.000%～約 0.008% のアナバシン、約 0.007%～約 0.008% のアナバシン、約 0.0005%～約 0.007% のアナバシン、約 0.0005%～約 0.006% のアナバシン、約 0.0005%～約 0.005% のアナバシン、約 0.0005%～約 0.005% のアナバシン、約 0.0005%～約 0.004% のアナバシン、約 0.0005%～約 0.003% のアナバシン、約 0.0005%～約 0.002% のアナバシン、約 0.0005%～約 0.001% のアナバシン、約 0.001%～約 0.006% のアナバシン、約 0.002%～約 0.005% のアナバシン、または、約 0.003%～約 0.006% のアナバシンを含む。

10

20

【0112】

本明細書に記載するように、遺伝子組み換えは、限定されるものではないが、転写活性化様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN)、メガヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、CRISPR/Cas9 システム、CRISPR/Cpf1 システム、CRISPR/Csm1 システム、遺伝子ロックイン技術または科学技術、またはこれらの任意の組み合わせを含む、当該技術分野において周知の任意の手段を用いて組み換えることができる。

【0113】

例えば、いくつかの実施形態では、本科学技術の方法は、ゲノム内の対象となる領域における標的部位に結合する CRISPR/Cas システムの使用に関し、CRISPR/Cas システムは、CRISPR/Cas ヌクレアーゼ、及び、組み換え crRNA/tracrRNA (または、シングलगイドRNA (sgRNA) もしくはガイドRNA (gRNA)) を含む。いくつかの実施形態では、CRISPR システムは一般に、(i) Cas タンパク質をコードするポリヌクレオチドと、(ii) 植物細胞での RNA ガイドゲノム組み換え用の、少なくとも 1 つの sgRNA と、を含む。Cas タンパク質の非限定例としては、Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9 (Csn1 及び Csx12 としても知られている)、Cas10、Csy1、Csy2、Cys3、Cse1、Cse2、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Smr1、Cmr3、Cmr4、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csx1、Csx15、Cs f1、Cs f2、Cs f3、Cs f4、これらのホモログ、または、これらの改変版が挙げられる。いくつかの実施形態では、Cas タンパク質は、Streptococcus pyogenes Cas9 タンパク質である。これらの酵素は周知である。例えば、S. pyogenes Cas9 タンパク質のアミノ酸配列を、受託番号 Q99ZW2 の下で、SwissProt データベースに見出すことができる。いくつかの実施形態では、本科学技術の方法は、ゲノム内の対象となる領域における標的部位に結合する CRISPR/Cpf1 システムの使用に関する。いくつかの実施形態では、本科学技術の方法は

30

40

50

、ゲノム内の対象となる領域における標的部位に結合するCRISPR/Cas1システムの使用に関する。

【0114】

いくつかの実施形態では、CRISPR/Cas、CRISPR/Cpf1、またはCRISPR/Csm1システムは、CYP82E2またはCYP82E3の1つ以上における標的部位を認識する。いくつかの実施形態では、CRISPR/Cas、CRISPR/Cpf1、またはCRISPR/Csm1システムは、CYP82E2またはCYP82E3遺伝子における特定の配列変化、例えば、CYP82E2アミノ酸配列においてK375E及び／またはL422W点突然変異をもたらす変異、または、CYP82E3アミノ酸配列においてC330W点突然変異をもたらす変異を生成する。いくつかの実施形態では、CRISPR/Cas、CRISPR/Cpf1、またはCRISPR/Csm1システムは、遺伝子ノックインまたは遺伝子置換により、特定の配列変化を生成する。遺伝子ノックインまたは遺伝子置換の方法は、当該技術分野において周知である。遺伝子ノックインまたは遺伝子置換の、CRISPRベースの方法は、相同組み換え修復（HDR）メカニズム、非相同末端結合（NHEJ）メカニズム、または、両HDR及びNHEJメカニズムの両方を利用することができる。HDR及びNHEJメカニズムの両方を利用するCRISPRベースの方法の非限定例は、タンデムリピートHDR（TR-HDR）と呼ばれ、Lu et al., “Targeted, efficient sequence insertion and replacement in rice,” Nature Biotechnology, 38 (12): 1402–1407. doi: 10.1038/s41587-020-0581-5, (2020)に記載されており、その全体が本明細書に参照により組み込まれる。

10

20

【0115】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法は、植物細胞のゲノム内の対象となる領域に結合するための、メガヌクレアーゼDNA結合ドメインを用いる。メガヌクレアーゼは、通常、DNA認識配列が延びた（例えば、約14～約40塩基対の長さ）、自然に存在する制限酵素の組み換え版である。メガヌクレアーゼ（ホーミングエンドヌクレアーゼとしても知られている）は、配列及び構造モチーフに基づき、一般に5つのファミリー：LAGLIDADGファミリー、GIY-YIGファミリー、His-Cys boxファミリー、PD-（D/E）XKファミリー、及びHNHファミリーに分類される。いくつかの実施形態では、メガヌクレアーゼは、組み換えホーミングエンドヌクレアーゼを含む。I-Sce、I-CeuI、PI-PspI、PI-Sce、I-SceIV、I-CsmI、I-PanI、I-SceII、I-PpoI、I-SceIII、I-CreI、I-TevI、I-TevII、及びI-TevIIIなどの、ホーミングエンドヌクレアーゼ及びメガヌクレアーゼの認識配列が周知である。

30

【0116】

いくつかの実施形態では、メガヌクレアーゼは、CYP82E2またはCYP82E3の1つ以上における標的を認識するように適合される。いくつかの実施形態では、メガヌクレアーゼは、CYP82E2またはCYP82E3遺伝子における特定の配列変化、例えば、CYP82E2アミノ酸配列においてK375E及び／またはL422W点突然変異をもたらす変異、または、CYP82E3アミノ酸配列においてC330W点突然変異をもたらす変異を生成する。

40

【0117】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法は、転写活性化様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）を用い、二本鎖の切断（DSB）を導入することにより植物ゲノムを編集する。TALENは、組み換えてDNAの特定の配列を切断することができる制限酵素である。TALENは、TALEエフェクターDNA結合ドメインをDNA切断ドメイン（例えば、FokIエンドヌクレアーゼに由来するものなどのヌクレアーゼドメイン）に融合させることで、構築される。転写活性化様エフェクター（TALE）を、当該技術分野において周知の方法に従って組み換え、所望のDNA配列に結合させることができ、

50

ヌクレアーゼと組み合わせた際には、特定の場所でDNAを切断する技術がもたらされる。例えば、いくつかの実施形態では、TALEN科学技術の使用により、CYP82E2またはCYP82E3遺伝子における特定の配列変化、例えば、CYP82E2アミノ酸配列においてK375E及び／またはL422W点突然変異をもたらし変異、または、CYP82E3アミノ酸配列においてC330W点突然変異をもたらし変異が生成される。
【0118】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載する組成物及び方法は、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）を用い、二本鎖の切断（DSB）を導入することで植物ゲノムを編集する。ZFNは、ジンクフィンガーDNA結合ドメインをDNA切断ドメイン（例えば、FokIエンドヌクレアーゼに由来するものなどのヌクレアーゼドメイン）に融合させることにより生成される人工制限酵素である。ZFNを組み換え、特定の場所においてDNAを結合、及び切断することができる。ZFNは、2つのタンパク質ドメインを含有する。第1のドメインはDNA結合ドメインであり、これは、真核性転写因子と、ジンクフィンガーとを含有する。第2のドメインは、DNAの切断を担う、FokI制限酵素を含有するヌクレアーゼドメインである。ZFNを、当該技術分野において周知の方法に従って組み換え、所望のDNA配列に結合させ、特定の場所でDNAを切断することができる。例えば、ニコチン生合成遺伝子において標的配列が同定された後、対応する（ZFN）配列を組み換え、プラスミドに挿入する。プラスミドを標的細胞に挿入し、ここで翻訳されて機能的ZFNが産生され、これが次に核に入り、ここで、二本鎖切断（DSB）を導入する、その標的配列に結合し、これを切断する。DSBは、相同性による修復、または、非相同の末端結合のいずれかにより修復されているため、このようなアプローチを用いて、外因性DNA配列を標的遺伝子に導入することができる。例えば、いくつかの実施形態では、ZFN科学技術の使用により、CYP82E2またはCYP82E3遺伝子における特定の配列変化、例えば、CYP82E2アミノ酸配列においてK375E及び／またはL422W点突然変異をもたらし変異、または、CYP82E3アミノ酸配列においてC330W点突然変異をもたらし変異が生成される。

【0119】

いくつかの実施形態では、本科学技術は、（例えば、（A）CYP82E2及び／またはCYP82E3の活性を増加させる遺伝子組み換えと、（B）nic1の劣性アレル及び／またはnic2の劣性アレルと、を有する本科学技術により製造された植物に関して上述したように、ニコチン性アルカロイド全ての含有量、ニコチン、ノルニコチン、アナタピン、及び／または、アナバシンが低下した）ニコチン性アルカロイド含有量が低下したタバコ植物の製造方法であって、上記方法は、タバコ植物内で、対応する、自然に存在する、または、形質転換されていない対照タバコ植物と比較して、（a）本明細書に記載するCYP82E2及び／またはCYP82E3の活性を増加させる遺伝子組み換えと、（b）（i）ERF199及び／またはERF189の活性、または（ii）ERF199をコードする核酸及び／またはERF189をコードする核酸の発現、を抑制する改変と、を組み合わせることを含む、上記方法を提供する。

【0120】

いくつかの実施形態では、本科学技術は、NtERF221、NtMYC1a、NtMYC1b、NtMYC2a、及び／またはNtMYC2b遺伝子などの、アルカロイド産生を正に制御する転写因子をコードする内因性遺伝子の発現を抑制し、植物中のニコチン性アルカロイドレベルを低下させることをさらに含む。

【0121】

いくつかの実施形態では、本科学技術は、A622、NBB1、QPT（キノール酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ）、PMT（プトレシンメチルトランスフェラーゼ）、ODC（オルニチン脱炭酸酵素）、AO（アスパラギン酸オキシダーゼ）、QS（キノリン酸シンターゼ）、及び、MPO（N-メチルプトレシンオキシダーゼ）遺伝子などの、1つ以上のニコチン性アルカロイド生合成遺伝子の発現を抑制し、植物中のニコチン性アルカロイドレベルを低下させることをさらに含む。

【0122】

ERF199、ERF189、NtERF221、NtMYC1a、NtMYC1b、NtMYC2a、NtMYC2b、A622、NBB1、QPT、PMT、ODC、AO、QS、及び／またはMPO遺伝子を抑制するために使用可能な方法の例としては、アンチセンス・センス同時抑制、RNAi、人工マイクロRNA、ウイルス誘発性遺伝子サイレンシング(VIGS)、アンチセンス・センス同時抑制、標的化変異導入、ならびに、限定されるものではないが、転写活性化様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)、メガヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、及び、クラスター化され、規則的に間隔が空いた短い回文構造の繰り返し(CRISPR)／Cas9システム、CRISPR／Cpf1システム、CRISPR／Csm1システムを含む関連するゲノム組み換え方法、ならびに、これらの任意の組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0123】

上述に従うと、本開示の実施形態は、トランスジェニック及び／または非トランスジェニック法を用いて産生される、本明細書に記載するタバコ品種のいずれかから産生される子孫植物、種子、または細胞もまた含む。本開示の実施形態は、本明細書に記載する、タバコ品種、またはその一部のいずれかに由来するタバコ製品もまた含む。いくつかの実施形態では、タバコ製品は、葉タバコ、細切りタバコ、切りタバコ、すりタバコ、粉末タバコ、タバコ抽出物、無煙タバコ、湿潤または乾燥嗅ぎタバコ、パイプタバコ、紙巻きタバコ、シガリロタバコ、葉巻きタバコ、及び噛みタバコからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、タバコ製品は、シガリロ、クレティックシガレット、非通気性凹部フ

20

【0124】

本開示の実施形態は、自然に存在する対応するタバコ植物、またはその一部と比較して、レベルが低減した少なくとも1つのニコチン性アルカロイドを含むタバコ品種の製造方法もまた含む。これらの実施形態によれば、方法は、第1の低ニコチン形質を含む第1のタバコ変種を、第2の低ニコチン形質を含む第2のタバコ変種と交配させ、子孫植物を産生することを含む。いくつかの実施形態では、子孫植物は、濃度が低下した、少なくとも1つのニコチン性アルカロイドを含む。いくつかの実施形態では、方法は、戻し交配を含む。レベルが低下した少なくとも1つのニコチン性アルカロイドを有するこのようなタバコ品種は、当業者により認識されるように、トランスジェニック、及び／または非トランスジェニック法を用いて製造することができる。

30

【0125】

いくつかの実施形態では、そして、上でさらに記載したように、少なくとも1つのニコチン性アルカロイドは、ニコチン、ノルニコチン、アナタピン、及びアナバシンからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのニコチン性アルカロイドはニコチンであり、品種は、0.35%以下のニコチンを含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのニコチン性アルカロイドはノルニコチンであり、品種は、0.04%以下のノルニコチンを含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのニコチン性アルカロイドはアナタピンであり、品種は、0.06%以下のアナタピンを含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのニコチン性アルカロイドはアナバシンであり、品種は、0.08%以下のアナバシンを含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのニコチン性アルカロイドはニコチン及びノルニコチンであり、品種は、0.35%以下のニコチン、及び、0.04%以下のノルニコチンを含む。

40

【0126】

いくつかの実施形態では、第1及び／または第2の低ニコチン形質は、野生型nic1と比較して、発現及び／または機能が低下したnic1アレルを含む。いくつかの実施形態では、第1及び／または第2の低ニコチン形質は、野生型nic2と比較して、発現及び／または機能が低下したnic2アレルを含む。いくつかの実施形態では、第1及び／または第2のタバコ変種は、以下の株のうちの少なくとも1つに由来するnic1及び／

50

または *nic2* アレルを含む：*LAF C 5 3*、*MAF C 5*、*LMAF C 3 4*、*LA Burley 2 1*、*LI Burley 2 1*、及び *HI Burley 2 1*。いくつかの実施形態では、第 1 及び／または第 2 のタバコ変種は、*nic1* 及び／または *nic2* ヌルアレル（欠失）を含む。いくつかの実施形態では、*nic1* 及び／または *nic2* ヌルアレルは、自然に存在する *N. tabacum germplasm* に由来する。

【0127】

いくつかの実施形態では、第 1 及び／または第 2 のタバコ変種は、機能的 *CYP82E2* アレルを含む。いくつかの実施形態では、*CYP82E2* アレルは、*N. sylvestris* に由来する。いくつかの実施形態では、第 1 及び／または第 2 のタバコ変種は、機能的 *CYP82E3* アレルを含む。いくつかの実施形態では、*CYP82E3* アレルは、*N. tomentosiformis*、または、関連する種（例えば、*Nicotiana Section Tomentosae*）に由来する。いくつかの実施形態では、*CYP82E2* 及び／または *CYP82E3* アレルによりコードされたタンパク質の、ニコチン N-脱メチル化活性は、自然に存在するタバコ植物と比較して増加している。

10

【0128】

いくつかの実施形態では、第 1 の低ニコチン形質は、野生型 *nic1* 及び／または *nic2* と比較して、発現及び／または機能が低下した *nic1* 及び／または *nic2* アレルを含み、第 2 の低ニコチン形質は、機能的 *CYP82E2* アレル及び／または機能的 *CYP82E3* アレルを含む。

【0129】

20

いくつかの実施形態では、第 1 のタバコ変種、第 2 のタバコ変種、及び子孫植物は、非トランスジェニックである。いくつかの実施形態では、第 1 のタバコ変種、第 2 のタバコ変種、及び／または子孫植物のうちの 1 つ以上は、非トランスジェニックである。

【0130】

本開示の実施形態は、本明細書に記載の方法のいずれかに従い産生した子孫植物から入手した、種子または細胞もまた含む。本開示の実施形態は、本明細書に記載の方法のいずれかに従い産生した子孫植物に由来するタバコ製品もまた含む。いくつかの実施形態では、製品は、葉タバコ、細切りタバコ、切りタバコ、すりタバコ、粉末タバコ、タバコ抽出物、無煙タバコ、湿潤または乾燥嗅ぎタバコ、パイプタバコ、紙巻きタバコ、シガリロタバコ、葉巻きタバコ、及び噛みタバコからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、製品は、シガリロ、クレティックシガレット、非通気性凹部フィルターシガレット、通気性凹部フィルターシガレット、シガー、嗅ぎタバコ、タバコ含有ガム、タバコ含有口ゼンジ、及び噛みタバコからなる群から選択される。

30

【0131】

いくつかの実施形態では、品種は *CYP82E2* アレルを含み、これは、配列番号 1 に記載の野生型 *CYP82E2* アミノ酸配列と比較して、*K375E* 及び／または *L422W* 点突然変異をコードするヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、（a）*CYP82E2* アレルは、配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を含む *CYP82E2* タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、（b）*CYP82E2* アレルは、配列番号 3 に記載のアミノ酸配列を含む *CYP82E2* タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、または、（c）*CYP82E2* アレルは、配列番号 4 に記載のアミノ酸配列を含む *CYP82E2* タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。

40

【0132】

いくつかの実施形態では、*CYP82E3* アレルは、配列番号 5 に記載の野生型 *CYP82E3* アミノ酸配列と比較して、*C330W* 点突然変異をコードするヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、*CYP82E3* アレルは、配列番号 6 に記載のアミノ酸配列を含む *CYP82E3* タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0133】

いくつかの実施形態では、品種は *CYP82E2* アレルを含み、これは、配列番号 1 に記載の野生型 *CYP82E2* アミノ酸配列と比較して、*K375E* 及び／または *L422*

50

W点突然変異をコードするヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、(a) CYP82E2アレルは、配列番号2に記載のアミノ酸配列を含むCYP82E2タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、(b) CYP82E2アレルは、配列番号3に記載のアミノ酸配列を含むCYP82E2タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、または、(c) CYP82E2アレルは、配列番号4に記載のアミノ酸配列を含むCYP82E2タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0134】

いくつかの実施形態では、CYP82E3アレルは、配列番号5に記載の野生型CYP82E3アミノ酸配列と比較して、C330W点突然変異をコードするヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、CYP82E3アレルは、配列番号6に記載のアミノ酸配列を含むCYP82E3タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。

10

【0135】

いくつかの実施形態では、品種は、NBB1、A622、キノール酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ (QPT)、プトレシンN-メチルトランスフェラーゼ (PMT)、オルニチン脱炭酸酵素 (ODC)、アスパラギン酸オキシダーゼ (AO)、キノリン酸シンターゼ (QS)、N-メチルプトレシンオキシダーゼ (MPO)、NtERF221、NtMYC1a、NtMYC1b、NtMYC2a、またはNtMYC2bのうちの少なくとも1つの品種における、発現の抑制をさらに含む。

【0136】

本開示の実施形態は、*Nicotiana tabacum*植物細胞において、標的遺伝子の点突然変異を作製する方法もまた含む。これらの実施形態によれば、方法は、細胞に、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列反復 (CRISPR) 関連 (CRISPR-Cas) システムを導入することであって、(a) 少なくとも1つのガイドRNA (gRNA) であって、当該少なくとも1つのgRNAは、標的遺伝子に、標的配列またはその一部とハイブリダイズ可能なヌクレオチド配列を含み、上記標的遺伝子は、CYP82E2タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、gRNAと、(b) (i) DNA断片であって、当該DNA断片は、標的遺伝子内の標的配列を置き換える、または、標的遺伝子内の標的部位に挿入される、DNA断片、及び、(ii) 2つの相同アームであって、各アームは、DNA断片の反対側に隣接する、相同アームと、(c) エフェクタータンパク質、または、当該エフェクタータンパク質をコードする1つ以上のポリヌクレオチドを含むドナーDNA配列を含む核酸と、を含む、導入することを含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのgRNAは、エフェクタータンパク質との複合体を形成する。いくつかの実施形態では、エフェクタータンパク質は、ヌクレアーゼを含むCasタンパク質である。

20

30

【0137】

いくつかの実施形態では、(a) 点突然変異は、配列番号1に記載の野生型CYP82E2アミノ酸配列と比較して、K375E点突然変異であるか、または、(b) 点突然変異は、配列番号1に記載の野生型CYP82E2アミノ酸配列と比較して、L422WE点突然変異である。

【0138】

いくつかの実施形態では、少なくとも2種の点突然変異が作製される。いくつかの実施形態では、少なくとも2種の点突然変異は、配列番号1に記載の野生型CYP82E2アミノ酸配列と比較して、K375E点突然変異、及び、配列番号1に記載の野生型CYP82E2アミノ酸配列と比較して、L422W点突然変異を含む。

40

【0139】

いくつかの実施形態では、*Nicotiana tabacum*植物は、nic1の劣性アレル、及び／またはnic2の劣性アレルをさらに含む。

【0140】

いくつかの実施形態では、方法は、NBB1、A622、キノール酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ (QPT)、プトレシンN-メチルトランスフェラーゼ (PMT)、オ

50

ルニチン脱炭酸酵素 (ODC)、アスパラギン酸オキシダーゼ (AO)、キノリン酸シンターゼ (QS)、N-メチルプトレシンオキシダーゼ (MPO)、NtERF221、NtMYC1a、NtMYC1b、NtMYC2a、またはNtMYC2bのうちの少なくとも1つの品種における、発現の抑制をさらに含む。

【0141】

本開示の実施形態は、*Nicotiana tabacum*植物細胞において、標的遺伝子の点突然変異を作製する方法もまた含む。これらの実施形態によれば、方法は、細胞に、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列反復 (CRISPR) 関連 (CRISPR-Cas) システムを導入することであって、(a) 少なくとも1つのガイドRNA (gRNA) であって、当該少なくとも1つのgRNAは、標的遺伝子に、標的配列またはその一部とハイブリダイズ可能なヌクレオチド配列を含み、上記標的遺伝子は、CYP82E3タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、gRNAと、(b) (i) DNA断片であって、当該DNA断片は、標的遺伝子内の標的配列を置き換える、または、標的遺伝子内の標的部位に挿入される、DNA断片、及び、(ii) 2つの相同アームであって、各アームは、DNA断片の反対側に隣接する、相同アームと、(c) エフェクタータンパク質、または、当該エフェクタータンパク質をコードする1つ以上のポリヌクレオチドを含むドナーDNA配列を含む核酸と、を含む、導入することを含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのgRNAは、エフェクタータンパク質との複合体を形成する。いくつかの実施形態では、エフェクタータンパク質は、ヌクレアーゼを含むCasタンパク質である。

10

20

【0142】

いくつかの実施形態では、点突然変異は、配列番号5に記載の野生型CYP82E3アミノ酸配列と比較して、C330W点突然変異である。いくつかの実施形態では、*Nicotiana tabacum*植物は、nic1の劣性アレル、及び／またはnic2の劣性アレルをさらに含む。

【0143】

いくつかの実施形態では、方法は、NBB1、A622、キノール酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ (QPT)、プトレシンN-メチルトランスフェラーゼ (PMT)、オルニチン脱炭酸酵素 (ODC)、アスパラギン酸オキシダーゼ (AO)、キノリン酸シンターゼ (QS)、N-メチルプトレシンオキシダーゼ (MPO)、NtERF221、NtMYC1a、NtMYC1b、NtMYC2a、またはNtMYC2bのうちの少なくとも1つの、*Nicotiana tabacum*植物での発現を抑制することをさらに含む。

30

【0144】

本開示の実施形態は、ニコチン性アルカロイド含有量が低減した*Nicotiana tabacum*植物の製造方法もまた含む。これらの実施形態によれば、方法は、*Nicotiana tabacum*植物中で、(a) CYP82E2及び／またはCYP82E3の活性を増加させる1つ以上の遺伝子組み換えと、(b) nic1の劣性アレル、及び／またはnic2の劣性アレルと、を組み合わせることを含む。いくつかの実施形態では、*Nicotiana tabacum*植物は、対応する、自然に存在する、または、形質転換されていない対照タバコ植物と比較して、ニコチン性アルカロイド含有量が低減している。

40

【0145】

いくつかの実施形態では、*Nicotiana tabacum*植物は、nic1のホモ接合劣性アレル、及び／または、nic2のホモ接合劣性アレルを含む。

【0146】

いくつかの実施形態では、CYP82E2及び／またはCYP82E3の活性を増加させる1つ以上の遺伝子組み換えは、転写活性化様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN)、メガヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、CRISPR/Cas9システム、CRISPR/Cpf1システム、CRISPR/Csm1システム、遺伝子ノック

50

イン技術または科学技術、及びこれらの任意の組み合わせにより導入される。

【0147】

いくつかの実施形態では、CYP82E2の活性を増加させる1つ以上の遺伝子組み換えは、Nicotiana tabacum植物細胞の標的遺伝子内に点突然変異を含み、点突然変異は、配列番号1に記載の野生型CYP82E2アミノ酸配列と比較して、K375E点突然変異、及び、配列番号1に記載の野生型CYP82E2アミノ酸配列と比較して、L422W点突然変異のうちの1つ以上から選択される。

【0148】

いくつかの実施形態では、CYP82E3の活性を増加させる1つ以上の遺伝子組み換えは、Nicotiana tabacum植物細胞の標的遺伝子内に点突然変異を含み、点突然変異は、配列番号5に記載の野生型CYP82E3アミノ酸配列と比較して、C330W点突然変異である。

【0149】

いくつかの実施形態では、点突然変異は、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列反復(CRISPR)関連(CRISPR-Cas)システムであって、(a)少なくとも1つのガイドRNA(gRNA)であって、当該少なくとも1つのgRNAは、標的遺伝子に、標的配列またはその一部とハイブリダイズ可能なヌクレオチド配列を含み、上記標的遺伝子は、CYP82E2タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、gRNAと、(b)(i)DNA断片であって、当該DNA断片は、標的遺伝子内の標的配列を置き換える、または、標的遺伝子内の標的部位に挿入される、DNA断片、及び、(ii)2つの相同アームであって、各アームは、DNA断片の反対側に隣接する、相同アームと、(c)エフェクタータンパク質、または、当該エフェクタータンパク質をコードする1つ以上のポリヌクレオチドを含むドナーDNA配列を含む核酸と、を含む、システムにより、植物に導入される。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのgRNAは、エフェクタータンパク質との複合体を形成する。いくつかの実施形態では、エフェクタータンパク質は、ヌクレアーゼを含むCasタンパク質である。

【0150】

本開示の実施形態は、本明細書に記載の方法のいずれかに従い産生したNicotiana tabacum植物もまた含み、植物は、(a)CYP82E2及び／またはCYP82E3の活性を増加させる1つ以上の遺伝子組み換えと、(b)n ic 1の劣性アレル、及び／またはn ic 2の劣性アレルと、を含む。本開示の実施形態は、植物から産生した子孫植物または種子もまた含み、子孫植物または種子は、(A)CYP82E2及び／またはCYP82E3の活性を増加させる1つ以上の遺伝子組み換えと、(B)n ic 1の劣性アレル、及び／またはn ic 2の劣性アレルと、を含む。本開示の実施形態は、Nicotiana tabacum植物由来のタバコを含むタバコ製品もまた含み、植物は、(A)CYP82E2及び／またはCYP82E3の活性を増加させる1つ以上の遺伝子組み換えと、(B)n ic 1の劣性アレル、及び／またはn ic 2の劣性アレルと、を含む。

【0151】

これらの実施形態によれば、(a)タバコは、葉タバコ、細切りタバコ、切りタバコ、すりタバコ、粉末タバコ、タバコ抽出物、無煙タバコ、湿潤または乾燥嗅ぎタバコ、パイプタバコ、紙巻きタバコ、シガリロタバコ、葉巻きタバコ、及び噛みタバコからなる群から選択されるか、または、(b)製品は、シガリロ、クレティックシガレット、非通気性凹部フィルターシガレット、通気性凹部フィルターシガレット、シガー、嗅ぎタバコ、スヌース、タバコ含有ガム、タバコ含有口ゼンジ、及び噛みタバコからなる群から選択されるニコチン軽減タバコ製品である。

【0152】

3. 実施例

当業者には当然のことながら、本明細書に記載の本開示の方法の他の適切な修正及び適合は、容易に適用可能かつ認識可能であり、本開示の範囲、または本明細書に開示の態様

10

20

30

40

50

及び実施形態を逸脱することなく、適切な同等物を使用して行われてよい。本開示を詳細に説明したので、以下の実施例を参照することにより、本開示がより明確に理解され、これらは、単に開示のいくつかの態様及び実施形態を説明することのみを意図し、開示の範囲を制限するものとみなすべきではない。本明細書において参照されるすべてのジャーナルの参照、米国特許、及び出版物の開示は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【0153】

本開示は、以下の非限定的な実施例によって示される複数の態様を有する。

【0154】

実施例 1

Cms NCLAハイブリッド。世界中の様々な国（米国を含む）において、従来のシガレットのニコチンレベルが、所謂「依存症の閾下」を下回るまで強制的に下げられる可能性を考慮すると、製造業者に、目標とするニコチンレベルを達成可能にする、ニコチンレベルを有する乾葉を生み出すタバコ品種に商業的な関心が存在する。現在、0.04%の、シガレットタバコフィラーのニコチンレベルが、議論されている及び／または推奨されている。（従来の農業管理システム下で成長し、全ての茎位置で平均化した際に）このような低レベルで日常的にニコチンを蓄積させる、鉄管乾燥タバコ品種は、現在入手可能ではない。

【0155】

したがって、本開示の実施形態は、極めてニコチン含有量が少ない、新規に確立された細胞質雄性不稔性（Cms）鉄管乾燥タバコハイブリッドである、NCLAハイブリッド1、NCLAハイブリッド2、及びNCLAハイブリッド3（N. tomentosiformis由来のCYP82E3アレルと組み合わせた、LAF53由来のNic1及びNic2座位）を含む。これらのハイブリッド品種は、公に報告されているあらゆる遺伝物質で最も低いレベルでニコチンを蓄積する。本明細書中に記載するように、自然に存在する遺伝変動及び従来の育種アプローチを用いて、これらの新しいF1ハイブリッドを開発した（即ち、これらの物質を開発するために、遺伝子編集、遺伝子組み換え、または、新規の育種アプローチは用いなかった）。これらのハイブリッドは、特許権侵害に関する懸念、または、遺伝子編集もしくは遺伝子組み換えの育種結果に関する規制を懸念することなく、世界中どこでも生育することができる。

【0156】

これらの新しいハイブリッドの、低ニコチン表現型を裏付けるデータが、3つのノースカロライナ州研究ステーションにおける圃場評価から生成された。各場所での実験設計は、4通りの乱塊法デザインであった。プロットは20個の植物列で構成され、これらを、ノースカロライナ州の鉄管乾燥タバコ製品に対する推奨事項に従い管理した。葉を、4回のプライミングで回収し、乾燥させ、以前のUSDAタバコ採点者により等級付けした。ガスクロマトグラフ法を用いて、複合乾葉試料のアルカロイド組成を分析した。

【0157】

最初の実験で評価した物質は、以下のとおりであった：K326－標準的な鉄管乾燥タバコ品種、LAF53－劣性アレルであるNic1及びNic2座位を含有する、鉄管乾燥タバコ品種NC95のほぼ同質遺伝版、ならびに、K326 nic1/nic2－劣性アレルであるNic1及びNic2座位を含有する、鉄管乾燥タバコ品種K326のほぼ同質遺伝版。3つのNC位置で評価した上述の物質に対するアルカロイドプロファイルを、図1A～1Dに示す。これらの物質の収率及び質の測定を、図2A～2Dに示す。Cms NCLAハイブリッドが、実験の全物質において、最も低いニコチンレベルを生み出した。Cms NCLAハイブリッドに対するノルニコチンレベルは、K326に対するものと同様であったが、これをわずかに下回っていた。新しいハイブリッドのアナタバピン及びアナバシンレベルは、K326に対するそれらのレベルを下回っていた。

【0158】

追加実験のデータを、表1で以下に示す。太い活字で強調したアルカロイドデータは、

10

20

30

40

50

数が検出下限を下回っていたため、分析実験に対する最低レベルの検出の、およそ半分である。（これは、分散分析を可能にするために行った。）

【表 1 - 1】

実験	所在地	遺伝子型	ニコチンの割合 (%)	ノルニコチンの割合 (%)	アナバシンの割合 (%)	アナタビンの割合 (%)
EX22K291	キンストン	K326	2.3261	0.0410	0.0152	0.0606
EX22K291	キンストン	K326 222 (22) (0.0086)	0.0376	0.0062	0.0001	0.0001
EX22K291	キンストン	K346	2.6808	0.0408	0.0183	0.0828
EX22K291	キンストン	Cms LA K326 x LA K326 CsCs; F1 ハイブリッド 1	0.1232	0.0384	0.0001	0.0104
EX22K291	キンストン	Cms LA K326 x LA K326 CtCt; F1 ハイブリッド 1	0.0245	0.0174	0.0001	0.0052
EX22K291	キンストン	LAF53	0.2227	0.0085	0.0001	0.0078
EX22K291	キンストン	K326	2.3419	0.0400	0.0152	0.0636
EX22K291	キンストン	K262 nic1/nic2	0.2436	0.0067	0.0001	0.0099
EX22K291	キンストン	K326 222	0.3003	0.0941	0.0108	0.0059
EX22K291	キンストン	K326 222 (22) (0.0086)	0.1590	0.0063	0.0001	0.0073
EX22K291	キンストン	LAF53	0.2146	0.0085	0.0001	0.0072
EX22K291	キンストン	Cms LA K326 x LA K326 CsCs; F1 ハイブリッド 1	0.0403	0.0427	0.0001	0.0063
EX22K291	キンストン	K326	2.6240	0.0521	0.0175	0.0823
EX22K291	キンストン	K262 nic1/nic2	0.1572	0.0047	0.0001	0.0062
EX22K291	キンストン	K346	2.5422	0.0339	0.0171	0.0794
EX22K291	キンストン	K326	2.7306	0.0477	0.0182	0.0810
EX22K291	キンストン	Cms LA K326 x LA K326 CtCt; F1 ハイブリッド 1	0.0387	0.0154	0.0001	0.0051
EX22K291	キンストン	K326 222	0.2866	0.1025	0.0114	0.0060
EX22K291	キンストン	K326 222	0.2989	0.1019	0.0107	0.0052
EX22K291	キンストン	K346	2.9874	0.0719	0.0203	0.0924
EX22K291	キンストン	K326	2.2057	0.2587	0.0165	0.0743
EX22K291	キンストン	Cms LA K326 x LA K326 CsCs; F1 ハイブリッド 1	0.0240	0.0555	0.0001	0.0077
EX22K291	キンストン	K326 222 (22) (0.0086)	0.0319	0.0048	0.0001	0.0001

表 1 : 2022 年の圃場研究からのアルカロイドデータ。

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

EX22K291	キンストン	Cms LA K326 x LA K326 CtCt; F1 ハイブリッド 1	0.0237	0.0176	0.0001	0.0050
EX22K291	キンストン	K326	2.5721	0.0440	0.0162	0.0659
EX22K291	キンストン	LAF53	0.1790	0.0065	0.0000	0.0063
EX22K291	キンストン	K262 nic1/nic2	0.1515	0.0052	0.0001	0.0050
EX22R291	ロッキーマウンテン	K326 222 (22) (0.0086)	0.1102	0.0070	0.0021	0.0053
EX22R291	ロッキーマウンテン	K326 222	0.2213	0.0787	0.0078	0.0052
EX22R291	ロッキーマウンテン	K326	2.0460	0.0301	0.0141	0.0521
EX22R291	ロッキーマウンテン	Cms LA K326 x LA K326 CtCt; F1 ハイブリッド 1	0.0051	0.0312	0.0001	0.0055
EX22R291	ロッキーマウンテン	K346	1.0151	0.5268	0.0116	0.0504
EX22R291	ロッキーマウンテン	K326	2.2771	0.0362	0.0129	0.0506
EX22R291	ロッキーマウンテン	Cms LA K326 x LA K326 CsCs; F1 ハイブリッド 1	0.0174	0.0701	0.0020	0.0083
EX22R291	ロッキーマウンテン	K262 nic1/nic2	0.1742	0.0089	0.0016	0.0077
EX22R291	ロッキーマウンテン	LAF53	0.1668	0.0056	0.0018	0.0065
EX22R291	ロッキーマウンテン	K326 222 (22) (0.0086)	0.0388	0.0047	0.0001	0.0001
EX22R291	ロッキーマウンテン	K326	2.2850	0.0325	0.0111	0.0467
EX22R291	ロッキーマウンテン	Cms LA K326 x LA K326 CsCs; F1 ハイブリッド 1	0.0464	0.0659	0.0001	0.0081
EX22R291	ロッキーマウンテン	LAF53	0.2749	0.0066	0.0019	0.0097
EX22R291	ロッキーマウンテン	Cms LA K326 x LA K326 CtCt; F1 ハイブリッド 1	0.0088	0.0281	0.0001	0.0055
EX22R291	ロッキーマウンテン	K346	2.1607	0.0298	0.0132	0.0609
EX22R291	ロッキーマウンテン	K326	2.1878	0.0309	0.0121	0.0441
EX22R291	ロッキーマウンテン	K326 222	0.2082	0.0861	0.0078	0.0048
EX22R291	ロッキーマウンテン	K262 nic1/nic2	0.1531	0.0047	0.0001	0.0065
EX22R291	ロッキーマウンテン	Cms LA K326 x LA K326 CtCt; F1 ハイブリッド 1	0.0014	0.0342	0.0001	0.0056
EX22R291	ロッキーマウンテン	Cms LA K326 x LA K326 CsCs; F1 ハイブリッド 1	0.0104	0.0701	0.0001	0.0081
EX22R291	ロッキーマウンテン	K346	2.3458	0.1139	0.0164	0.0750
EX22R291	ロッキーマウンテン	K326 222 (22) (0.0086)	0.0497	0.2018	0.0026	0.0123
EX22R291	ロッキーマウンテン	K326	1.8547	0.0278	0.0100	0.0381
EX22R291	ロッキーマウンテン	K326 222	0.2544	0.0821	0.0080	0.0049

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

EX22R291	ロッキーマウン	K326		1.8507	0.0234	0.0109	0.0428
EX22R291	ロッキーマウン	K262 nic1/nic2		0.1716	0.0045	0.0001	0.0061
EX22R291	ロッキーマウン	LAF53		0.2147	0.0066	0.0017	0.0074
EX22X291	オックスフォード	K326		3.5830	0.0655	0.0196	0.0948
EX22X291	オックスフォード	K326 222		0.5953	0.1233	0.0118	0.0180
EX22X291	オックスフォード	K346		3.7520	0.0501	0.0252	0.1242
EX22X291	オックスフォード	Cms LA K326 x LA K326 CsCs; F1 ハイブリッド1		0.1472	0.0595	0.0001	0.0100
EX22X291	オックスフォード	K326 222 (22) (0.0086)		0.0932	0.0071	0.0001	0.0001
EX22X291	オックスフォード	LAF53		0.3579	0.0129	0.0001	0.0125
EX22X291	オックスフォード	K262 nic1/nic2		0.2889	0.0117	0.0001	0.0103
EX22X291	オックスフォード	Cms LA K326 x LA K326 CtCt; F1 ハイブリッド1		0.0733	0.0339	0.0001	0.0081
EX22X291	オックスフォード	K326		3.4929	0.0523	0.0211	0.0894
EX22X291	オックスフォード	K326 222 (22) (0.0086)		0.0963	0.0195	0.0001	0.0001
EX22X291	オックスフォード	K262 nic1/nic2		0.2029	0.0314	0.0001	0.0080
EX22X291	オックスフォード	Cms LA K326 x LA K326 CsCs; F1 ハイブリッド1		0.0567	0.0905	0.0001	0.0109
EX22X291	オックスフォード	K326		3.7131	0.0789	0.0205	0.1044
EX22X291	オックスフォード	K326		3.2027	0.0500	0.0174	0.0750
EX22X291	オックスフォード	K326 222		1.2559	0.1025	0.0140	0.0329
EX22X291	オックスフォード	LAF53		0.4617	0.0108	0.0030	0.0157
EX22X291	オックスフォード	Cms LA K326 x LA K326 CtCt; F1 ハイブリッド1		0.1074	0.0379	0.0001	0.0105
EX22X291	オックスフォード	K346		3.3122	0.0649	0.0225	0.1001
EX22X291	オックスフォード	K326 222		0.3656	0.1335	0.0117	0.0080
EX22X291	オックスフォード	K346		2.9800	0.0731	0.0204	0.0970
EX22X291	オックスフォード	Cms LA K326 x LA K326 CtCt; F1 ハイブリッド1		0.0760	0.0320	0.0001	0.0072
EX22X291	オックスフォード	K326 222 (22) (0.0086)		0.1897	0.0093	0.0001	0.0066
EX22X291	オックスフォード	K262 nic1/nic2		0.2537	0.0081	0.0001	0.0088
EX22X291	オックスフォード	K326		3.4317	0.1700	0.0197	0.0895
EX22X291	オックスフォード	LAF53		0.4690	0.0125	0.0028	0.0161
EX22X291	オックスフォード	K326		3.8257	0.0662	0.0219	0.0937
EX22X291	オックスフォード	Cms LA K326 x LA K326 CsCs; F1 ハイブリッド1		0.1010	0.0945	0.0001	0.0119

【0159】

実施例 2。Nicotiana におけるニコチン生合成を制御するための CRISPR / Cas9 を用いる、標的化変異導入。本実施例は、植物中で、(A) CYP82E2 及び / または CYP82E3 の活性を増加させる 1 つ以上の遺伝子組み換えと、(B) nic1 の劣性アレル、及び / または nic2 の劣性アレルと、を組み合わせることによる、Nicotiana 植物におけるニコチン生合成を低減するための、CRISPR / Cas9 の使用を示す。

【0160】

方法。nic1 及び / または nic2 劣性アレルは、以下のタバコ植物株のうちの 1 つ

10

20

30

40

50

に由来することができる：L A F C 5 3 (n i c 1 / n i c 1)、M A F C 5 (N i c 1 / N i c 1 n i c 2 / n i c 2)、L M A F C 3 4 (n i c 1 / n i c 1 N i c 2 / N i c 2)、L A B u r l e y 2 1 (n i c 1 / n i c 1 n i c 2 / n i c 2)、L I B u r l e y 2 1 (n i c 1 / n i c 1 N i c 2 / N i c 2)、もしくはH I B u r l e y 2 1 (N i c 1 / N i c 1 n i c 2 / n i c 2)、または、N i c 1 及び／またはN i c 2 座位における劣性アレルが組み込まれているゲノムを有する、任意のタバコ植物株。

【0161】

タバコ植物のCYP82E2タンパク質にK375E及び／またはL422W点突然変異を、及び／または、CYP82E3タンパク質にC330W点突然変異を導入するために、当該技術分野において周知の標準的な方法を用いて、Cas9及びsgRNAベクターを調製する。例えば、Schiml et al., Methods in Molecular Biology, 1469:111-122 (2016)を参照されたい。配列解析ソフトウェアを用いて、標準的な形態の5'-NGGに一致する、プロトSpacer隣接モチーフ(PAM)配列のすぐ5'側にある、目的のsgRNA標的化配列を測定することができる。

10

【0162】

一本鎖DNAドナーオリゴまたはDNAドナープラスミドのいずれかの形態で、所望の変異(例えば、野生型CYP82E2アミノ酸配列(例えば、配列番号1)と比較して、K375E及び／またはL422W点突然変異、及び／または、野生型CYP82E3アミノ酸配列(例えば、配列番号5)と比較して、C330W点突然変異)を含むドナーDNAを含む修復鋳型を、当該技術分野において周知の方法に従って調製する。例えば、Ran et al., Nature Protocols, 8(11):2281-2308(2013) and Lu et al., "Targeted, efficient sequence insertion and replacement in rice," Nature Biotechnology, 38(12):1402-1407. doi: 10.1038/s41587-020-0581-5, (2020)を参照されたい。Cas9及びsgRNAと、ドナーオリゴまたはプラスミドと、を含むベクターを、Agrobacterium tumefaciensに形質転換する。以下の株のうちの1つへの、安定したAgrobacterium媒介形質転換を行う：MAFC5、LMAFC34、LA Burley 21、LI Burley 21、またはHI Burley 21(例えば、フローラルディップ形質転換、または、アグロインフィルトレーション法による)。形質転換の10~14日後に、DNA試料を植物から抽出し、変異導入事象をアッセイする。これらのCRISPR/Cas誘発突然変異は、例えば、PCR/制限酵素アッセイ、Surveyorヌクレアーゼアッセイ、及び／または配列決定により同定することができる。

20

30

【0163】

結果:n i c 1 及び／またはn i c 2 劣性アレル、ならびに、タバコ植物のCYP82E2タンパク質にK375E及び／またはL422W点突然変異、及び／または、CYP82E3タンパク質にC330W点突然変異を含む、遺伝子組み換えNicotiana植物は、対応する、自然に存在する、または、形質転換されていない対照タバコ植物と比較して、ニコチン、ノルニコチン、アナタピン、及び／またはアナバシンなどのニコチン性アルカロイドの蓄積が低減していると予想される。

40

【0164】

したがって、これらの結果は、本科学技術の方法は、CYP82E2及び／またはCYP82E3の活性を増加させる1つ以上の遺伝子組み換えと、n i c 1 の劣性アレル及び／またはn i c 2 の劣性アレルと、が組み合わせられた、ニコチン性アルカロイド含有量が低下したタバコ植物の製造に有用であることを示している。

【0165】

生物学的寄託

50

それぞれ、育種株 SC58 C s C s 及び SC58 C t C t の再生物質は、Crop and Soil Science Department, North Carolina State University, Raleigh, NC 27695 に寄託される。LA K326 C s C s として識別される SC58 C s C s は、受託番号 GH21-190-17 として寄託される。LA K326 C t C t として識別される SC58 C t C t は、受託番号 GH21-191-13 として寄託される。予め、NCSU により、そのようなものとして認可された第三者専門家は、いずれかの株に対して、Director of Office of Research Commercialization, North Carolina State University, Poulton Innovation Center, 2nd Floor, 1021 Main Campus Drive, Raleigh, NC 27606 への書面での要求により、生体物質の試料を入手することができる。

10

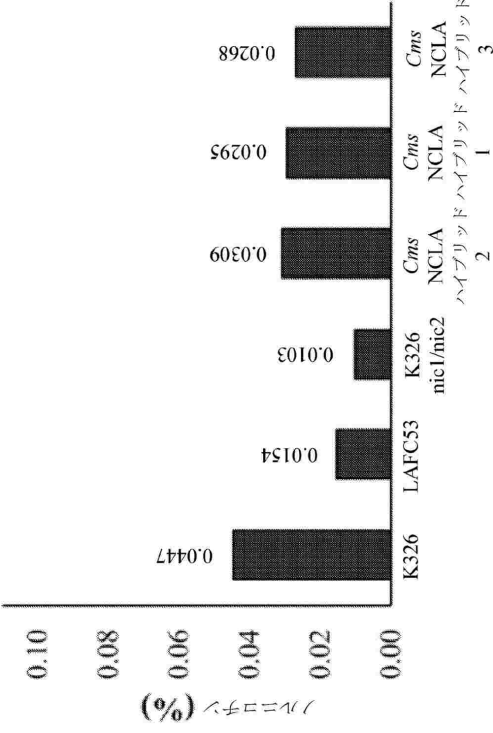
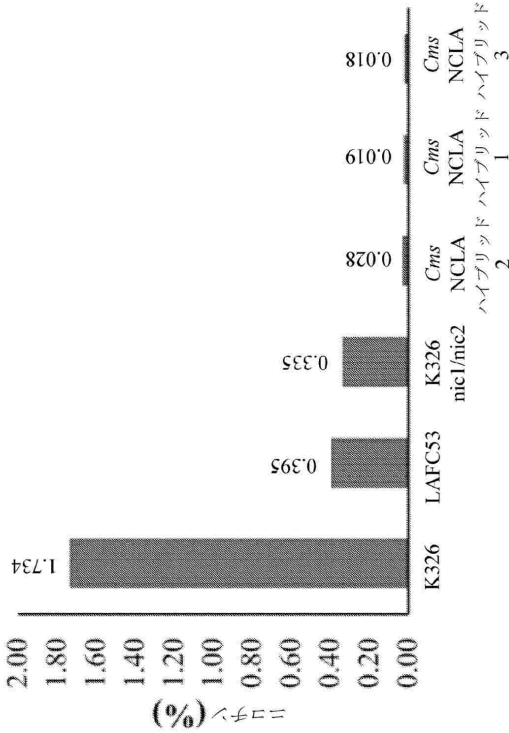
【0166】

連邦規則法典第37巻§1.808(b)で許可されている場合を除き、寄託された生体物質の、公衆への利用可能性に課された制限は全て、本出願からの特許、または、優先権のためにこれを引用するあらゆる出願への特許付与の際に、不可逆的に取り除かれる。

【図面】

【図1A】

【図1B】



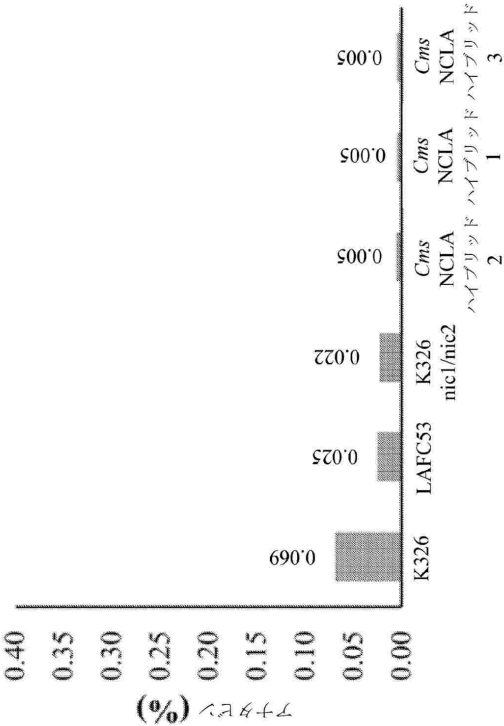
20

30

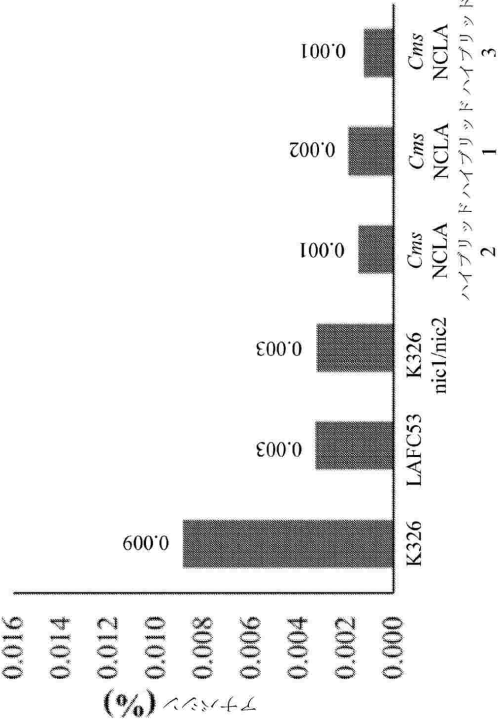
40

50

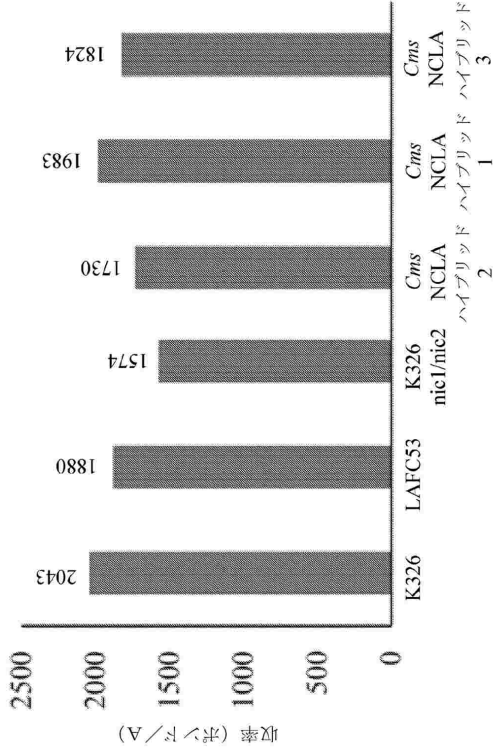
【図 1 C】



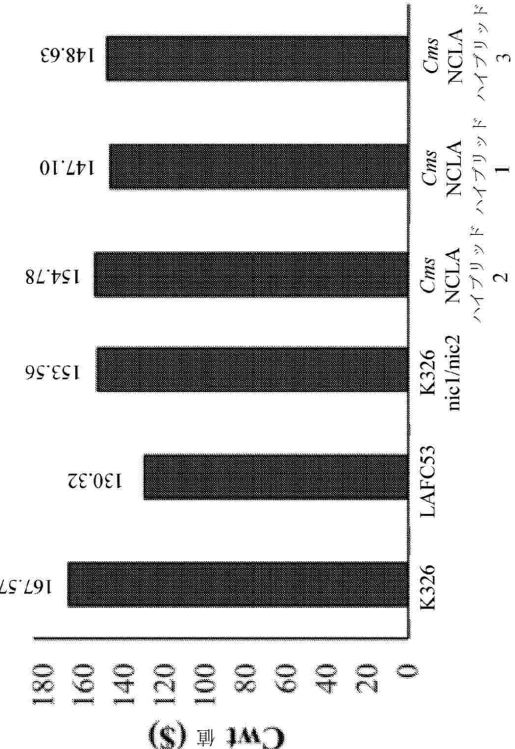
【図 1 D】



【図 2 A】



【図 2 B】



10

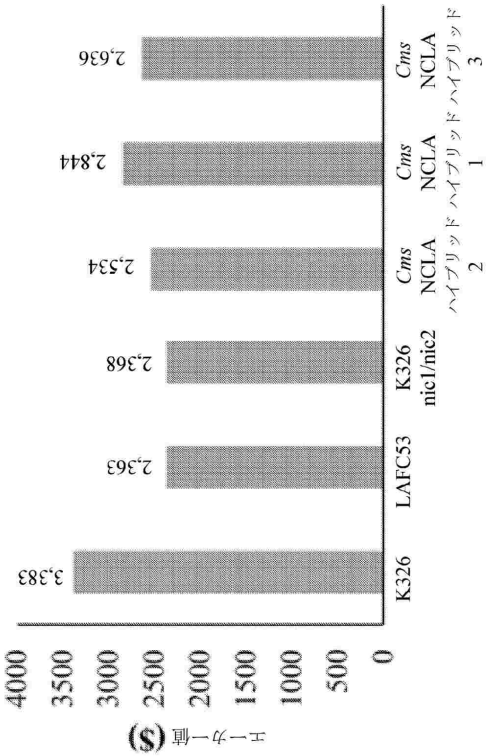
20

30

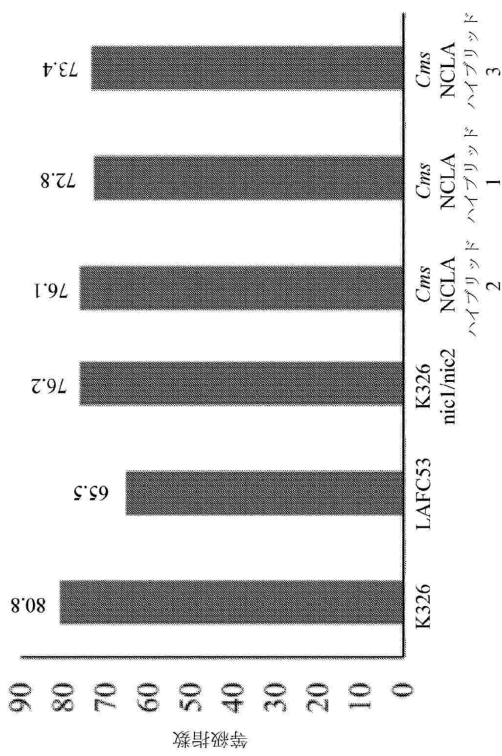
40

50

【図 2 C】



【図 2 D】



【配列表】

2025509376000001.xml

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 23/62580

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC - INV. A01H 5/12, A01H 6/82, A24B 13/00, A24B 13/02 (2023.01)
ADD. A24B 15/00, A24B 15/10 (2023.01)

GPC - INV. A01H 5/12, A01H 6/823, C12N 15/8243

ADD. A24B 13/00, A24B 13/02, A24B 15/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2020/154466 A1 (ALTRIA CLIENT SERVICES LLC) 30 July 2020 (30.07.2020) para [003]; [077]-[078]; [099]-[100]; [0124]; [0230]-[0231]	1-3, 8
A	US 2020/0340004 A1 (22ND CENTURY LIMITED, LLC) 29 October 2020 (29.10.2020) full document	1-3, 8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"D" document cited by the applicant in the international application

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

06 July 2023

Date of mailing of the international search report

JUL 31 2023

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer:

Karl Rodriguez

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 23/62580

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. ☒ forming part of the international application as filed.

b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),

☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 23/62580

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 4-7, 9-20, 24-38, 43-51, 57, 61, 65-72
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I, claims 1-3, 8, directed to a tobacco cultivar, or any part thereof, comprising reduced levels of at least one nicotinic alkaloid.

Group II, claims 21-23, 39-42, directed to a method of producing a tobacco cultivar comprising reduced levels of at least one nicotinic alkaloid comprising: crossing a first tobacco variety comprising a first low nicotine trait with a second tobacco variety comprising a second low nicotine trait to produce a progeny plant, a seed or cell obtained from said progeny plant, or a tobacco product derived from said progeny plant.

Group III, claims 52-56, 58-60, 62-64, directed to a method of producing a *Nicotiana tabacum* plant or plant cell comprising one or more genetic modifications.

--continued on extra sheet--

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-3, 8

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 23/62580

--continued from: Box No. III Observations where unity of invention is lacking--

The inventions listed as Groups I-III do not relate to a single special technical feature under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special technical features:

Group I has the special technical feature of a composition comprising or consisting of a tobacco cultivar, or any part thereof, that is not required by Group II or III.

Group II has the special technical feature of a method of producing a tobacco cultivar comprising crossing a first tobacco variety comprising a first low nicotine trait with a second tobacco variety comprising a second low nicotine trait to produce a progeny plant, or a seed, cell, or product obtained from said progeny, that is not required by Group I or III.

Group III has the special technical feature of introducing in a tobacco plant one or more genetic modifications that increases the activity of CYP82E2 and/or CYP82E3, that is not required by Group I or II.

Common technical features:

Groups I-III share the common technical feature of a tobacco plant, or any part thereof, comprising reduced levels of at least one nicotinic alkaloid compared to a corresponding naturally-occurring tobacco plant, or part thereof.

Groups II and III further share the common technical feature of a method of producing a tobacco plant comprising reduced levels of at least one nicotinic alkaloid compared to a corresponding naturally-occurring tobacco plant, or part thereof.

However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because this shared technical feature is previously disclosed by WO 2020/154466 A1 to Altria Client Services LLC, (hereinafter "Altria").

Altria teaches a tobacco plant, or part thereof, comprising reduced levels of at least one nicotinic alkaloid compared to a corresponding naturally-occurring tobacco plant, or part thereof (para [003] "tobacco plant comprising reduced amounts of tobacco specific nitrosamines (TSNAs). Also provided are tobacco plants with altered total alkaloid and nicotine levels"; [077]-[078] "a modified tobacco plant capable of producing cured tobacco leaf comprising a reduced level of one or more tobacco-specific nitrosamines (TSNAs) and further comprising an increased level of one or more antioxidants, wherein the reduced and increased levels are compared to a control tobacco plant or cured leaf from a control tobacco plant of the same variety when grown and cured under comparable conditions"; [0124] "Alkaloid levels...For example, nicotinic alkaloid levels"; [0175]), and a method of producing said tobacco plant (para [003] "their development via breeding or transgenic approaches, and production of tobacco products from these tobacco plants"; [052]-[053]).

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Therefore, Groups I-III inventions lack unity under PCT Rule 13 because they do not share the same or corresponding special technical feature.

**Continuation of Item 4 above: claims 4-7, 9-20, 24-38, 43-51, 57, 61, 65-72 are held unsearchable because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 2 4 B 13/02 (2006.01)	A 2 4 B 13/00	
A 2 4 B 15/10 (2006.01)	A 2 4 B 13/02	
	A 2 4 B 15/10	

,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT, JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,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

弁理士 服部 博信

(74)代理人 100123766

弁理士 松田 七重

(74)代理人 100212509

弁理士 太田 知子

(72)発明者 ルイス ラムジー

アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 27606 ローリー メイン キャンパス ドライブ 1021 セカンド フロア ノース カロライナ ステイト ユニヴァーシティ内

F ターム (参考) 4B043 BA68 BA80 BB28
4B065 AA89X AC20 BA25