(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2022年7月21日(21.07.2022)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2022/154115 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/82 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
A01H 1/00 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
A01H 5/00 (2018.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2022/001349

(22) 国際出願日： 2022年1月17日(17.01.2022)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2021-005883 2021年1月18日(18.01.2021) JP
特願 2021-210547 2021年12月24日(24.12.2021) JP

(71) 出願人: 株式会社カネカ (**KANEKA CORPORATION**) [JP/JP]; 〒5308288 大阪府大阪市北区中之島二丁目３番１８号 Osaka (JP).

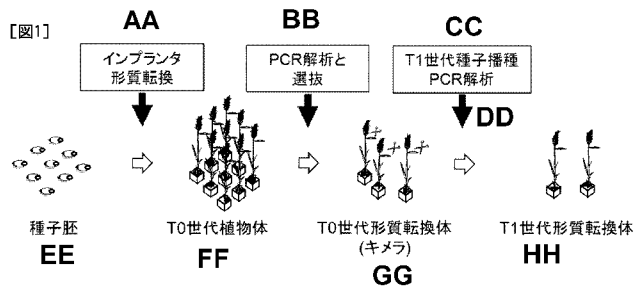
(72) 発明者: 濱田 晴康 (**HAMADA, Haruyasu**); 〒6768688 兵庫県高砂市高砂町宮前町１－８ 株式会社カネカ内 Hyogo (JP). 柳楽 洋三 (**NAGIRA, Yozo**); 〒6768688 兵庫県高砂市高砂町宮前町１－８ 株式会社カネカ内 Hyogo (JP). 瀬良 ゆり (**SERA, Yuri**); 〒6768688 兵庫県高砂市高砂町宮前町１－８ 株式会社カネカ内 Hyogo (JP). 田岡 直明 (**TAOKA, Naoaki**); 〒6768688 兵庫県高砂市高砂町宮前町１－８ 株式会社カネカ内 Hyogo (JP).

(74) 代理人: 伊東 忠重，外 (**ITOH Tadashige** et al.); 〒1000005 東京都千代田区丸の内二丁目１番１号 丸の内 ＭＹ ＰＬＡＺＡ （明治安田生命ビル） １６階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(54) **Title:** METHOD FOR PRODUCING TRANSFORMED OR GENOME-EDITED NEXT-GENERATION PLANT

(54) 発明の名称： 形質転換またはゲノム編集された次世代植物体の製造方法



AA In-planta transformation
BB PCR analysis and selection
CC Sowing of T1-generation seed
DD PCR analysis
EE Seed embryo
FF T0-generation plant
GG T0-generation transformant (chimera)
HH T1-generation transformant

(57) **Abstract:** Provided is a method for transforming or genome-editing a plant, said method being characterized by comprising: an introduction step for introducing at least one type of nucleic acid and/or at least one type of protein into a plant cell; a growth step for growing a plant from the plant cell to obtain a plant, the number of effective tillers of which is not more than one; and an acquisition step for acquiring a transformed or genome-edited next-generation plant from the plant.

(57) 要約：植物細胞に少なくとも１種の核酸および／または少なくとも１種のタンパク質を導入する導入工程と、該植物細胞から植物体を生育させ有効分げつ数が１以下の植物体を得る生育工程と、該植物体から形質転換またはゲノム編集された次世代植物体を取得する取得工程とを含むことを特徴とする植物の形質転換またはゲノム編集方法である。

WO 2022/154115 A1

［続葉有］

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第21条(3))

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

明　細　書

発明の名称 ：

形質転換またはゲノム編集された次世代植物体の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、植物の形質転換またはゲノム編集方法、およびそれを用いた植物の形質転換体またはゲノム編集個体の製造方法に関する。

背景技術

[0002] 現在普及している植物の一般的な形質転換法は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ培養系のプロトプラスト、カルス、または組織片などに外来遺伝子を、電気穿孔法、アグロバクテリウム・ツメファシエンス菌を介してまたはパーティクルガン法などにより導入する方法である。しかしこれらの方法では、遺伝子が細胞または組織に導入されたとしても、植物品種によっては、細胞の脱分化／再分化を伴う組織培養が困難であり、植物体を再生して形質転換体を作製することが難しいという問題があった。また、形質転換効率が十分に高くなく、そのため選択マーカー遺伝子を導入してマーカー選抜を行わなければならないという問題もあった。さらに、長期の組織培養を必要とすることに伴い、体細胞変異（ソマクローナル変異）が頻繁に生じる点も問題であった。そのため、形質転換植物作製の労力軽減や形質転換植物の安全性の観点から、上記の組織培養を伴わないインプランタ形質転換方法およびインプランタ形質転換植物体の作製方法の開発が求められていた。

[0003] 一方、コムギやイネなどにおいて、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ培養系のカルスまたは組織片を用いないインプランタ形質転換法も知られている。インプランタ形質転換方法としては、露出させた未熟胚または完熟胚の茎頂に、パーティクルガン法を用いて直接遺伝子導入する方法が知られている（特許文献１、２）。また、非特許文献１には、発芽直後の完熟胚にアグロバクテリウムを感染させ、遺伝子導入する方法が記載されている。これらの文献に記載の方法では、共通して、形質転換後の植物個体はキメラ（形質転換細胞と野生型

細胞が同一個体中に存在）となり、生殖細胞が形質転換細胞であった場合に限り、次世代に導入遺伝子が伝達される。

[0004] しかし、植物の体細胞に対する生殖細胞の割合は極めて少なく、インプランタ形質転換法においては、当代（形質転換後のキメラ個体）から次世代へ形質転換細胞が伝達される効率は低い。故に、次世代で形質転換体を取得するためには、当代の形質転換体数を増やす、および／または当代の分げつ数を増やし、多くの次世代植物（種子）を取得・解析する必要があり、多大な時間と労力、生育スペースを要する点が問題であった。さらに、上記組織培養を含めた他の形質転換法においても、キメラ性を有する形質転換体が作製された場合には、同様の点が問題であった。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：国際公開第２０１７／１９５９０５号

特許文献2：国際公開第２０１７／１９５９０６号

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Ｓｕｐａｒｔａｎａ ｅｔ ａｌ．（２００５）Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ ｏｆ ｓｉｍｐｌｅ ａｎｄ ｅｆｆｉｃｉｅｎｔ ｉｎ ｐｌａｎｔａ ｔｒａｎｓｆｏｒｍａｔｉｏｎ ｆｏｒ ｒｉｃｅ（Ｏｒｙｚａ ｓａｔｉｖａ Ｌ．）ｕｓｉｎｇ Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｍｅｆａｃｉｅｎｃｓ．Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ ＡＮＤ Ｂｉｏｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ（２００５）４，３９１－３９７

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は、キメラ性を有する当代の形質転換体またはゲノム編集個体から、短時間かつ低労力で次世代の形質転換体またはゲノム編集個体を取得する方法を提供する。本発明はまた、生育スペースを節約して、形質転換体また

はゲノム編集個体を取得する方法を提供する。本発明はさらに、再現性に優れる植物の形質転換体またはゲノム編集個体の作製方法を提供する。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、前述の課題解決のために鋭意検討を行なった結果、本発明を完成するに至った。

[0009] すなわち、本発明は以下を包含する。

＜１＞ 植物細胞に少なくとも１種の核酸および／または少なくとも１種のタンパク質を導入する導入工程と、該植物細胞から植物体を生育させ有効分げつ数が１以下の植物体を得る生育工程と、該植物体から形質転換またはゲノム編集された次世代植物体を取得する取得工程とを含むことを特徴とする植物の形質転換またはゲノム編集方法である。

＜２＞ 前記＜１＞に記載の方法を用いることを特徴とする植物の形質転換体またはゲノム編集個体の製造方法である。

＜３＞ 前記＜２＞の製造方法により製造された植物の形質転換体またはゲノム編集個体である（出願時に公知のものを除く）。

発明の効果

[0010] 本発明の方法によれば、キメラ性を有する当代の形質転換体またはゲノム編集個体から、短時間かつ低労力で次世代の形質転換体またはゲノム編集個体を取得することができる。本発明によれば、生育スペースを節約して、形質転換体またはゲノム編集個体を取得することができる。本発明によれば、植物の形質転換体またはゲノム編集個体を再現よく作製することができる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]図１は、実施例１における、本発明の一実施態様の手順の流れを示した図である。

発明を実施するための形態

[0012] 以下、本発明を詳細に説明する。

本発明に係る植物の形質転換方法またはゲノム編集方法は、植物細胞に少

なくとも１種の核酸および／または少なくとも１種のタンパク質を導入する導入工程、該植物細胞から植物体を生育させ植物体を得る生育工程、および該植物体から形質転換またはゲノム編集された次世代植物体を取得する取得工程を含む。

[0013] 本明細書において、「ゲノム編集」とは、ニューブリーディングテクニック（ＮＢＴ）といわれる技術の一部で、メガヌクレアーゼ、ＣＲＩＳＰＲ－ＣＡＳなどを用いて、ゲノム上の特定の遺伝子を切断して変異を導入することで遺伝子を破壊すること、部位特異的にＤＮＡ断片を挿入または置換すること、または、ＣＲＩＳＰＲシステムから、ヌクレアーゼ活性を除去したものに、脱アミノ化酵素であるデアミナーゼを付加した人工酵素複合体を構築し、細胞中で発現させることで、狙った点変異を高効率に導入して遺伝子機能を改変することも含まれるがこれらに限られず、ゲノムを編集できる技術であればよい。ゲノム編集技術を用いることで、狙った遺伝子を高い効率で破壊できる。遺伝子破壊の場合、遺伝子組換えの痕跡を残さずに狙った遺伝子のみを破壊できることから組換え植物と取り扱わない国もある。また、ゲノム編集によれば、切断配列の両側の配列に相同な断片を、その部位に導入したいＤＮＡ断片の両側に連結しておくことで、効率よく部位特異的なＤＮＡ断片の挿入または置換が可能である。

[0014] 上記意味で、ゲノム編集は、外来遺伝子がほぼランダムに組み込まれる従来型の植物の形質転換法、例えば、直接導入法やアグロバクテリウム法などとは異なる技術とも言え、形質転換法の定義からゲノム編集技術を除く考え方もあり得る。ゲノム編集技術では、切断部位をターゲティングできるヌクレアーゼまたはガイドＲＮＡとヌクレアーゼを用いてゲノムＤＮＡを切断する工程を含むことが特徴で、かかるターゲティングできるヌクレアーゼまたはガイドＲＮＡとヌクレアーゼを用いない従来型の形質転換法とは区別できる。ここで、「ヌクレアーゼまたはガイドＲＮＡとヌクレアーゼを用いて」という意味は、ヌクレアーゼタンパク質を細胞に導入してもよく、ヌクレアーゼ遺伝子をコードするＤＮＡおよび／またはＲＮＡを細胞に導入してヌク

レアーゼタンパク質を発現させてもよいという意味である。また、ガイドＲＮＡについてもＲＮＡを細胞に導入してもよく、ガイドＲＮＡを発現し得るＤＮＡを導入してガイドＲＮＡを発現させてもよい趣旨である。

[0015] １．植物細胞に少なくとも１種の核酸および／または少なくとも１種のタンパク質を導入する導入工程

核酸および／またはタンパク質を導入する植物細胞としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、植物の未熟種子または完熟種子の細胞が好ましく、種子胚の茎頂の細胞がより好ましく、未熟種子または完熟種子における胚の茎頂の細胞がさらに好ましく、完熟種子胚の茎頂の細胞が特に好ましい。

[0016] 前記種子胚の茎頂としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、該種子から胚乳、鞘葉、葉原基、および／または余分な胚盤を除去し、露出させた茎頂が好ましい。

[0017] 本明細書において、「種子」とは、植物を天然またはそれに近い条件下で栽培（または培養）して得られる天然の種子のみでなく、人工種子も含むが、好ましくは天然の種子である。ただし、形質転換可能な茎頂が取得できる人工種子が開発されればそれを用いることも好ましい。天然の種子には、野外の畑などで得られる種子のみでなく、温室栽培により得られる種子や、インビトロ苗などの組織培養物から得られる種子も含まれる。ダイレクト・リプログラミングなどにより得られる種子も茎頂が取得できる限り好ましく使用し得る。

[0018] 前記茎頂とは、茎の先端の成長点（茎頂分裂組織）ならびに成長点および成長点から生じた数枚の葉原基からなる組織を含む意味である。本発明においては、葉原基を除去した半球状（ドーム状）の成長点のみを茎頂として用いても良く、成長点および葉原基を含む茎頂や該茎頂を含む植物組織を用いてもよい。葉原基を除去した成長点のみを用いることでウイルスフリーの組織が得られる。

前記茎頂としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することがで

きるが、完熟種子胚の茎頂、または未熟胚の茎頂が好ましい。

前記完熟種子胚（完熟胚）とは、完熟種子の胚であり、前記完熟種子とは、受粉後の登熟過程が終了して種子として完熟しているものをいう。なお、前記登熟過程が終了したか否かは、種子の水分含量が３５％以下であるか否かで判別することができる。

前記未熟胚とは、未熟種子の胚であり、前記未熟種子とは、種子として完熟していないものをいう。未熟種子であるか否かは、上記のとおり、種子の登熟度（種子の水分含量が３５％より大きい）により判別することができる。

[0019] 植物細胞に少なくとも１種の核酸および／または少なくとも１種のタンパク質を導入する方法はインプランタ形質転換法またはインプランタゲノム編集方法であることが好ましく、広く一般に種子を生じる植物、地下茎を生じる植物および茎頂培養可能な植物に適用することができる。従って、本発明の対象植物は、被子植物および裸子植物を含む種子植物が好ましい。被子植物には、単子葉植物および双子葉植物が含まれる。インプランタ形質転換法またはインプランタゲノム編集方法とは、一般には組織培養の操作を含まない形質転換法またはゲノム編集方法であり、植物が成長する状態のまま成長点部位の細胞を形質転換またはゲノム編集させる方法である。ただし、本明細書においては、インプランタ形質転換法またはインプランタゲノム編集方法は、茎頂培養を用いる組織培養方法のみは含み、その他の組織培養の操作を含む方法は含まれないという意味で使用する。

[0020] 単子葉植物としては、いずれの種類であってもよいが、例えば、イネ科植物、ユリ科植物、バショウ科植物、パイナップル科植物、ラン科植物などが挙げられる。

[0021] イネ科植物としては、イネ、コムギ、オオムギ、トウモロコシ、エンバク、シバ、ソルガム、ライムギ、アワ、サトウキビなどが挙げられる。ユリ科植物としては、ネギ、アスパラガスなどが挙げられる。バショウ科植物としては、バナナなどが挙げられる。パイナップル科植物としては、パイナップ

ルなどが挙げられる。ラン科植物としては、ランなどが挙げられる。

[0022] 双子葉植物としては、例えば、アブラナ科植物、マメ科植物、ナス科植物、ウリ科植物、ヒルガオ科植物、バラ科植物、クワ科植物、アオイ科植物、キク科植物、ヒユ科植物、およびタデ科植物などが挙げられる。

[0023] アブラナ科植物としては、シロイヌナズナ、ハクサイ、ナタネ、キャベツ、カリフラワー、ダイコンなどが挙げられる。マメ科植物としては、ダイズ、アズキ、インゲンマメ、エンドウ、ササゲ、アルファルファなどが挙げられる。ナス科植物としては、トマト、ナス、ジャガイモ、タバコ、トウガラシなどが挙げられる。ウリ科植物としては、マクワウリ、キュウリ、メロン、スイカなどが挙げられる。ヒルガオ科植物としては、アサガオ、サツマイモ（カンショ）、ヒルガオなどが挙げられる。バラ科植物としては、バラ、イチゴ、リンゴなどが挙げられる。クワ科植物としては、クワ、イチジク、ゴムノキなどが挙げられる。アオイ科植物としては、ワタ、ケナフなどが挙げられる。キク科植物としては、レタスなどが挙げられる。ヒユ科植物としては、テンサイ（サトウダイコン）などが挙げられる。タデ科植物としては、ソバなどが挙げられる。

一方、裸子植物としては、マツ、スギ、イチョウおよびソテツなどが挙げられる。

[0024] 前記植物としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、コムギ、オオムギ、ライムギ、エンバク、イネ、トウモロコシ、またはダイズが好ましく、コムギ、オオムギ、ライムギ、またはエンバクがより好ましく、コムギ、オオムギ、またはライムギがさらに好ましく、コムギ、またはオオムギが特に好ましく、コムギが最も好ましい。

なお、ムギ類植物は、形態等が類似することが知られている（Ｚａｄｏｋｓ ＪＣ, Ｃｈａｎｇ ＴＴ, Ｋｏｎｚａｋ ＣＦ. Ａ Ｄｅｃｉｍａｌ Ｃｏｄｅ ｆｏｒ ｔｈｅ Ｇｒｏｗｔｈ Ｓｔａｇｅｓ ｏｆ Ｃｅｒｅａｌｓ. Ｗｅｅｄ Ｒｅｓｅａｒｃｈ. １９７４, １４４１５－２１.、Ｔｈｅ ｇｒｏｗｔｈ ｓｔａｇｅｓ ｏｆ ｃｅｒｅａｌｓ

（ｈｔｔｐｓ：／／ａｈｄｂ．ｏｒｇ．ｕｋ／ｋｎｏｗｌｅｄｇｅ－ｌｉｂｒａｒｙ／ｔｈｅ－ｇｒｏｗｔｈ－ｓｔａｇｅｓ－ｏｆ－ｃｅｒｅａｌｓ）、醸協２０００　第９５巻　第６号　３９５－４０３（ｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ．ｊｓｔａｇｅ．ｊｓｔ．ｇｏ．ｊｐ／ａｒｔｉｃｌｅ／ｊｂｒｅｗｓｏｃｊａｐａｎ１９８８／９５／６／９５＿６＿３９５／＿ｐｄｆ／－ｃｈａｒ／ｅｎ））。

[0025] 植物細胞に少なくとも１種の核酸および／または少なくとも１種のタンパク質を導入する工程の１実施態様としては、まず植物の完熟種子を吸水させる。必要により吸水前に春化処理をしてもよい。吸水は、種子を水に浸種し、インキュベートすることにより行われる。吸水温度は、例えば、コムギ、オオムギまたはイネの場合には、１５～２５℃が好ましく、トウモロコシまたはダイズでは２５～３５℃が好ましい。この際、一度以上、水を交換してもよい。吸水期間は、例えば、コムギの場合には、幼根が伸長を開始する前まで、または新しい葉原基が形成される前までが好ましい。吸水時間で表すと、種子の休眠状態にもよるが、吸水後１６時間未満であり、好ましくは１２時間である。この吸水工程により、種子を柔らくすることで茎頂を露出させ易くすることができる。

[0026] 次いで、上記で吸水させた種子における胚の茎頂を露出させる。コムギ、オオムギ、イネ、またはトウモロコシの場合には、鞘葉および葉原基を除去することで、茎頂を露出させる。ダイズの場合には、種皮および子葉を除去することで、茎頂を露出させる。ジャガイモの場合には、種芋から芽出しを行い、切り出した幼芽より葉原基を除去することで、茎頂を露出させる。リンゴの場合には、種子胚または摘出した頂芽もしくは側芽から葉原基を除去することで、茎頂を露出させる。露出手段としては、実体顕微鏡下において、鞘葉および葉原基または種皮および子葉を除去することができるものであればいずれのものであってよいが、例えば、直径０．２ｍｍ程度の針などの穿設するための器具、ピンセット、ピペット、注射器、並びにメスおよびカッターなどの切断器具が挙げられる。次いで、メスなどの切断器具を用いて

胚乳および余分な胚盤部分を切除し、露出した茎頂を含む胚および胚盤を寒天培地上に、茎頂を上向きに置床する。ウイルスフリーの茎頂を得るために、茎頂を切り出す最終段階でメスを新規な滅菌メスに取り替えてもよい。この場合はウイルスフリーの形質転換体またはゲノム編集個体を得ることができる。

[0027] 目的遺伝子の導入には、公知の遺伝子工学的手法を用いることができ、特に限定されない。一般的には、目的遺伝子を含む組換えベクターを作製して、完熟胚の茎頂を標的に、生物的手法としてアグロバクテリウム法・ウィルス法、物理的手法として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・プラズマ法・レーザーインジェクション法、化学的手法としてＰＥＧ－リン酸カルシウム法・リポソーム法、などにより、核酸（組換えベクターなど）やタンパク質などを導入することができるが、これらの中でも、物理的手法が好ましく、遺伝子銃（パーティクルガン）を用いる手法（パーティクルガン法）がより好ましい。

コムギ、イネ、トウモロコシまたはダイズでは、植物体への導入効率から、パーティクルガン法を用いて完熟種子胚に導入する方法が好ましい。また、パーティクルガン法はジャガイモの茎頂に遺伝子を導入するのにも有効である。パーティクルガン法は、金属微粒子に遺伝子をコーティングして細胞組織に打ち込む方法であり、単子葉植物のようにアグロバクテリウムの感染効率が低い場合に有効である。

[0028] 本発明に用いるベクターは特に限定されず、例えば、ｐＡＬ系（ｐＡＬ５１、ｐＡＬ１５６など）、ｐＵＣ系（ｐＵＣ１８、ｐＵＣ１９、ｐＵＣ９など）、ｐＢＩ系（ｐＢＩ１２１、ｐＢＩ１０１、ｐＢＩ２２１、ｐＢＩ２１３、ｐＢＩ１０１．２など）、ｐＰＺＰ系、ｐＳＭＡ系、中間ベクター系（ｐＬＧＶ２３Ｎｅｏ、ｐＮＣＡＴなど）、カリフラワーモザイクウイルス（ＣａＭＶ）、インゲンマメモザイクウイルス（ＢＧＭＶ）、タバコモザイクウイルス（ＴＭＶ）などを用いることができる。

[0029] 目的遺伝子を含むベクターは、例えば以下のようにして作製することがで

きる。ベクターに目的遺伝子を挿入するには、例えば、精製されたＤＮＡを適当な制限酵素で切断し、適当なベクターＤＮＡの制限酵素部位またはマルチクローニングサイトなどに挿入してベクターに連結する方法を用いることができる。また、二重交叉組換え（ｄｏｕｂｌｅ　ｃｒｏｓｓ－ｏｖｅｒ）により中間ベクターに目的遺伝子を挿入してもよく、ＴＡクローニング、Ｉｎ－Ｆｕｓｉｏｎクローニングなどを用いてもよい。

[0030] 形質転換の目的遺伝子は特に限定されず、その遺伝子の発現または発現の抑制が望まれるものであればよく、対象となる植物の内因性遺伝子または外来遺伝子でもよい。外来遺伝子としては、生物種が異なるものであってもよく、例えば、動物、植物、微生物、ウイルスなどの遺伝子を用いることができる。そのような遺伝子として、例えば、糖代謝関連遺伝子、脂質代謝関連遺伝子、有用物質（医薬、酵素、色素、芳香成分など）生産遺伝子、植物生長制御（促進／抑制）遺伝子、開花調節関連遺伝子、耐病虫害性（昆虫食害抵抗性、線虫、カビ（菌類）および細菌病抵抗性、ウイルス（病）抵抗性など）遺伝子、環境ストレス（低温、高温、乾燥、塩、光障害、紫外線）耐性遺伝子、トランスポーター遺伝子、製粉特性・製パン特性・製麺特性関連遺伝子、部位特異的ヌクレアーゼ遺伝子などが挙げられる。また、目的遺伝子は、センス鎖以外に、遺伝子導入の目的に応じてアンチセンス、リボザイム、ＲＮＡｉなどを発現するように導入してもよい。

[0031] ゲノム編集のターゲットとなる遺伝子は特に限定されず、その遺伝子の破壊または挿入・置換が望まれるものであればよい。また、導入するヌクレアーゼ遺伝子は、由来する生物種が異なるものであってもよく、例えば、動物、植物、微生物、ウイルスなどの遺伝子や、人工合成遺伝子を用いることができる。そのような遺伝子としては、例えば、メガヌクレアーゼ遺伝子、ＴＡＬＥＮ、ＣＲＩＳＰＲ－ＣＡＳシステム、ＴＡＲＧＥＴ－ＡＩＤなどがあげられる。

[0032] ゲノム編集のターゲットとなりうる遺伝子としては特に制限はないが、例えば、糖代謝関連遺伝子、脂質代謝関連遺伝子、有用物質（医薬、酵素、色

素、芳香成分など）生産関連遺伝子、植物生長制御（促進／抑制）関連遺伝子、開花調節関連遺伝子、耐病虫害性（昆虫食害抵抗性、線虫、カビ（菌類）および細菌病抵抗性、ウイルス（病）抵抗性など）関連遺伝子、環境ストレス（低温、高温、乾燥、塩、光障害、紫外線）耐性関連遺伝子、トランスポーター関連遺伝子、製粉特性・製パン特性・製麺特性関連遺伝子、組換え酵素関連遺伝子などが挙げられる。

[0033] ゲノム編集の標的となる遺伝子については、切断した部位の間に組換えにより外来ＤＮＡ挿入または置換することにより目的の変異を導入してもよい。

[0034] 部位特異的ヌクレアーゼ遺伝子がコードするタンパク質としては、例えば、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ活性を発現するタンパク質またはＴＡＬ ｅｆｆｅｃｔｏｒ ｎｕｃｌｅａｓｅ（ＴＡＬＥＮ）などが挙げられる。ジンクフィンガーヌクレアーゼは、特定の塩基を認識するジンクフィンガーモチーフ数個とＦｏｋＩヌクレアーゼの融合タンパク質である。ＴＡＬＬＥＮはＴｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ Ａｃｔｉｖａｔｏｒ Ｌｉｋｅ （ＴＡＬ） ｅｆｆｅｃｔｏｒとＦｏｋＩヌクレアーゼの融合タンパク質である。部位特異的ヌクレアーゼは、他の追加の標的化技術、例えば、メガヌクレアーゼ、ＲＮＡ誘発性ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９、またはロイシンジッパーなどで構成される。

[0035] 部位特異的ヌクレアーゼを遺伝子銃を用いて細胞に導入して、形質転換またはゲノム編集することにより、１つ以上の遺伝子産物の発現を変更または改変することができる。すなわち、１つ以上の遺伝子産物をコードするＤＮＡ分子を含有し、発現する細胞中に、Ｃａｓタンパク質およびＤＮＡ分子をターゲティングする１つ以上のガイドＲＮＡを含み得るＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムを導入し、それにより１つ以上のガイドＲＮＡが、１つ以上の遺伝子産物をコードするＤＮＡ分子のゲノム遺伝子座をターゲティングし、Ｃａｓタンパク質が、１つ以上の遺伝子産物をコードするＤＮＡ分子のゲノム遺伝子座を開裂し、それにより１つ以上の遺伝子産物の発現を変更または改

変することができる。

[0036] 遺伝子銃を用いてヌクレアーゼ遺伝子またはタンパク質を細胞に導入してゲノム編集を行う場合、必ずしもゲノムにインテグレートさせて安定な形質転換体を取る必要は無い。ヌクレアーゼ遺伝子を一過的に発現させ、それによりゲノム編集を行うことができる。また、タンパク質（およびガイドＲＮＡ）を細胞に導入することによってもゲノム編集を行うことができる。これらの方法によれば、得られたゲノム編集個体は遺伝子組換え体とはならない場合がある。

[0037] Ｃａｓタンパク質およびガイドＲＮＡは、天然に存在するもの（組み合わせ）であってもよく、天然には存在しない組み合わせであってもよい。本発明においては、２つ以上の遺伝子産物の発現を変更または改変してもよい。ガイドＲＮＡが、ｔｒａｃｒ配列に融合しているガイド配列を含んでいてもよい。

[0038] ガイドＲＮＡの長さは、少なくとも１５、１６、１７、１８、１９、２０ヌクレオチドであり、好ましい上限のヌクレオチド数は、３５以下、より好ましくは２５以下、さらに好ましくは２２以下、最も好ましくは２０である。

[0039] 本発明において、形質転換またはゲノム編集される細胞は、植物細胞であり、より好ましくは、茎頂分裂組織の細胞であり、さらに好ましくは茎頂分裂組織中のＬ２細胞であり、もっとも好ましくは茎頂分裂組織中の生殖細胞系列に移行する茎頂幹細胞である。ここで、「生殖細胞系列」とは、生殖細胞の源である始原生殖細胞から最終産物である卵細胞や精細胞に至るまでの生殖細胞の総称であり、「Ｌ２層」とは、茎頂分裂組織の外側から２番目の細胞層をいう。

[0040] 本発明においては、Ｃａｓタンパク質が１つ以上の核局在化シグナル（ＮＬＳ）を含んでいてもよい。一部の実施形態において、Ｃａｓタンパク質は、ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ系酵素である。一部の実施形態において、Ｃａｓタンパク質は、Ｃａｓ９タンパク質である。一部の実施形態において、Ｃａｓ９

タンパク質は、肺炎連鎖球菌（Ｓ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）、化膿性連鎖球菌（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ）、またはＳ．サーモフィラス（Ｓ．ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）Ｃａｓ９であり、それらの生物に由来する突然変異Ｃａｓ９を含み得る。タンパク質は、Ｃａｓ９ホモログまたはオルソログであり得る。

[0041] Ｃａｓタンパク質は、真核細胞中の発現のためにコドン最適化されていてもよい。Ｃａｓタンパク質は、標的配列の局在における１または２つの鎖の開裂を指向し得る。本発明の他の側面において、遺伝子産物の発現を減少させ、遺伝子産物はタンパク質である。

[0042] ベクターには、目的遺伝子のほかに、例えばプロモーター、エンハンサー、インシュレーター、イントロン、ターミネーター、ポリＡ付加シグナル、選抜マーカー遺伝子などを連結することができる。

[0043] ベクターに挿入する目的遺伝子は１ベクターあたり複数種であってもよく、微粒子に被覆する組換えベクターも１微粒子あたり複数種であってもよい。例えば、目的遺伝子を含む組換えベクターと、薬剤耐性遺伝子を含む組換えベクターを別々に作製し、混合して微粒子を被覆して植物組織に撃ち込んでもよい。

[0044] ゲノム編集の目的遺伝子は２以上であってもよく、２以上の目的遺伝子を切断できるようにベクターを構築してもよい。その場合、２種類以上のベクターを作製してもよく、１つのプラスミド上に複数のガイドＲＮＡを発現するように挿入してもよい。また、ガイドＲＮＡがｔｒａｃｒ配列に融合しているガイド配列を含んでいてもよい。

[0045] ゲノム編集により、部位特異的に二本鎖を切断し、相同組換えを促進して部位特異的ゲノム編集を行ってもよい。この場合は切断領域の両側に相同な配列を有するＤＮＡを導入して二重交叉組換えを起こせばよい。また、ニッカーゼ（一方のＤＮＡ鎖のみにｎｉｃｋを入れるＤＮＡ切断酵素）として機能することが知られているＣａｓ９のＤ１０Ａ変異体を用いても同様に相同組換えを行うことができる。

[0046] プロモーターとしては、植物体内または植物細胞において機能し、構成的に発現するか、植物の特定の組織内あるいは特定の発育段階において発現を導くことのできるＤＮＡであれば、植物由来のものでなくてもよい。具体例としては、例えば、カリフラワーモザイクウイルス（ＣａＭＶ）３５Ｓプロモーター、ＥＩ２－３５Ｓオメガプロモーター、ノパリン合成酵素遺伝子のプロモーター（Ｐｎｏｓ）、トウモロコシ由来ユビキチンプロモーター、イネ由来のアクチンプロモーター、タバコ由来ＰＲタンパク質プロモーター、ＡＤＨ、ＲｕＢｉｓｃｏプロモーターなどが挙げられる。翻訳活性を高める配列、例えば、タバコモザイクウイルスのオメガ配列を用いて翻訳効率を上げることができる。また、翻訳開始領域としてＩＲＥＳ（ｉｎｔｅｒｎａｌ ｒｉｂｏｓｏｍａｌ ｅｎｔｒｙ ｓｉｔｅ）をプロモーターの3’－下流側で、翻訳開始コドンの5’－上流側に挿入することで複数のコーディング領域からタンパク質を翻訳させることもできる。

[0047] ターミネーターとしては、前記プロモーターにより転写された遺伝子の転写を終結でき、ポリＡ付加シグナルを有する配列であればよく、例えば、ノパリン合成酵素（ＮＯＳ）遺伝子のターミネーター、オクトピン合成酵素（ＯＣＳ）遺伝子のターミネーター、ＣａＭＶ ３５Ｓ ターミネーターなどが挙げられる。

[0048] 選抜マーカー遺伝子としては、例えば、除草剤耐性遺伝子（ビアラホス耐性遺伝子、グリフォセート耐性遺伝子（ＥＰＳＰＳ）、スルホニル尿素系耐性遺伝子（ＡＬＳ））、薬剤耐性遺伝子（テトラサイクリン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、スペクチノマイシン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子など）、蛍光または発光レポーター遺伝子（ルシフェラーゼ、β－ガラクトシダーゼ、β－グルクロニターゼ（ＧＵＳ）、グリーンフルオレッセンスプロテイン（ＧＦＰ）など）、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼＩＩ（ＮＰＴ ＩＩ）、ジヒドロ葉酸レダクターゼなどの酵素遺伝子が挙げられる。ただし、選抜マーカー遺伝子を導入しなくても形

質転換体またはゲノム編集個体の作製は可能である。

[0049] 植物に導入する目的遺伝子を含むベクターとしては、環状のプラスミドでも良く、プラスミドを制限酵素等で切断した線状ＤＮＡ、導入するＤＮＡ断片のみを切り出した核酸カセット断片であってもよい。これらのＤＮＡ断片は、ＰＣＲによって増幅されたＤＮＡ断片であってもよい。この場合付加される核酸としては、特に制限されず、ベクター由来の配列であってもよいが、導入の標的部位の配列がより好ましく用いられる。

[0050] 上記目的遺伝子を含むベクターを、パーティクルガン法でコムギの完熟胚に導入する。目的遺伝子および／またはタンパク質は微粒子（マイクロキャリア）の表面に被覆して植物細胞に遺伝子銃で撃ち込むことで導入することができる。微粒子としては、細胞内への貫通力を高めるため、高比重で、かつ、化学的に不活性であり生体に害を及ぼしにくいという理由から金属微粒子が好ましく用いられる。金属微粒子の中でも、金粒子、タングステン粒子などが特に好ましく用いられる。

[0051] パーティクルガン法では以下のようにして目的遺伝子を植物細胞に導入することができる。まず、金粒子またはタングステン粒子などの微粒子を洗浄滅菌し、該微粒子、核酸（組換えベクター、直鎖状ＤＮＡ、ＲＮＡなど）および／またはタンパク質、$CaCl_2$、スペルミジンをボルテックスミキサーなどで攪拌しながら加えて、核酸および／またはタンパク質を金粒子またはタングステン粒子にコーティングし、必要に応じてエタノールまたはリン酸緩衝生理食塩水で洗浄する。

[0052] 前記微粒子の平均粒径の下限値としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、０．３μｍ以上が好ましく、０．４μｍ以上がより好ましく、０．５μｍ以上がさらに好ましく、０．６μｍが特に好ましい。

前記微粒子の平均粒径の上限値としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、１．５μｍ以下が好ましく、１．４μｍ以下がより好ましく、１．３μｍ以下さらに好ましく、１．２μｍ以下が特に好

ましく、１．１μｍがさらに特に好ましく、１．０μｍ以下が最も好ましい。

前記平均粒径としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、個数平均粒径などが挙げられる。

[0053] 金粒子またはタングステン粒子は、ピペットマンなどを用いてマクロキャリアフィルムに可能な限り均一に塗布した後、クリーンベンチなどの無菌環境中で乾燥させる。タンパク質をコートした微粒子の場合は、親水性のマクロキャリアフィルムを用いるのが好ましい。

[0054] 親水性のマクロキャリアフィルムは、マクロキャリアフィルムに親水性フィルムを貼付しても良いし、親水性コーティングを施しても良い。フィルムを親水化する手法としては、界面活性剤や光触媒、親水性ポリマーを利用する手法等が挙げられる。

[0055] 上記手法に用いられる親水性ポリマーとしては、ポリエステル、ポリエチレングリコール、ヒドロキシエチルメタクリレート、ヒドロキシプロピルメタクリレート、ジヒドロキシエチルメタクリレート、ジエチレングリコールメタクリレート、トリエチレングリコールメタクリレート、ポリエチレングリコールメタクリレート、ビニルピロリドン、アクリル酸、アクリルアミド、ジメチルアクリルアミド、グルコキシオキシエチルメタクリレート、３－スルホプロピルメタクリルオキシエチルジメチルアンモニウムベタイン、２－メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン、１－カルボキシジメチルメタクリロイルオキシエチルメタンアンモニウム等の親水性モノマーの重合体が挙げられる。

そして、マクロキャリアフィルム、ターゲットの完熟胚の茎頂を置床したプレートをパーティクルガン装置に設置し、ガス加速管から高圧ヘリウムガスをマクロキャリアフィルムに向かって発射する。マクロキャリアフィルムはストッピングプレートで止まるが、金粒子はストッピングプレートを通過して、ストッピングプレートの下に設置したターゲットに貫入し、目的遺伝子が導入される。

[0056] ストッピングプレートとターゲットとなる茎頂との距離は、微粒子の粒径にもよるが、例えば、９ｃｍ以下が好ましく、より好ましくは８ｃｍ以下、さらに好ましくは７ｃｍ以下、特に好ましくは６ｃｍ以下であり、距離の下限としては、例えば、２ｃｍ以上が好ましく、より好ましくは３ｃｍ以上、さらに好ましくは４ｃｍ以上である。ストッピングプレートとターゲットの距離は、微粒子の種類、粒径、ガス圧などに応じて、一過的発現実験などにより、適宜最適な値を決定することができる。

[0057] ガス圧としては、微粒子の種類、ターゲットとの距離にもよるが、好ましくは、例えば、１，１００～２，０００ｐｓｉが好ましく、より好ましくは１，２００～１，６００ｐｓｉである。ガス圧については、微粒子の種類、ターゲットの種類、ターゲットとストッピングプレートとの距離などに応じて、一過的発現実験などにより、適宜最適な圧力を決定することができる。

[0058] 茎頂に微粒子を撃ち込む回数としては、２回以上が好ましく、さらに好ましくは３回以上、より好ましくは４回以上である。茎頂に微粒子を撃ち込む回数の上限としては、２０回以下が好ましく、より好ましくは１５回以下、さらに好ましくは１０回以下である。撃ち込む回数については、一過的発現実験などにより、適宜最適な回数を決定することができる。

[0059] 形質転換法により微粒子を撃ち込まれた細胞中では、核酸が微粒子から遊離し、核酸がゲノムＤＮＡにインテグレートすることで形質転換細胞が得られる。ただし、ジェミニウイルスのようなプラスミド状で増殖する核酸や人工染色体を導入した場合はインテグレートせずに形質転換する場合もあり得る。また、本発明の形質転換法によれば、オルガネラへの外来遺伝子の導入も可能である。その場合にはオルガネラで特異的に発現するプロモーターを機能的に連結された遺伝子を用いるのが好ましい。

[0060] ゲノム編集方法により微粒子を撃ち込まれた細胞中では、核酸および／またはタンパク質が微粒子から遊離し、核酸が核に移行してヌクレアーゼを発現することでゲノムＤＮＡを切断し、その修復の過程で変異が起こりゲノム編集された細胞が得られる。タンパク質の場合は、核移行シグナル（オルガ

ネラ移行シグナルであってもよい）により核（オルガネラ）に移行し、ＤＮＡを切断することにより、ゲノム編集が起こる。ゲノム編集は核のゲノム遺伝子のみでなく、オルガネラ（葉緑体、ミトコンドリアなどの細胞内小器官）の遺伝子についても適用可能である。この場合は、各オルガネラへの移行シグナルをヌクレアーゼに連結させて導入してもよく、ヌクレアーゼなどに連結するプロモーターを各オルガネラでのみ発現するプロモーターを用いてもよい。

[0061] ２．植物細胞から植物体を生育させる生育工程

前記植物細胞から植物体を生育させる生育工程は、植物細胞から植物体を生育させ有効分げつ数が１以下の植物体を得る生育工程である。

[0062] 前記生育工程としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、少なくとも１種の核酸および／または少なくとも１種のタンパク質を導入した細胞を寒天培地上で２週間程度生育させた後、土へ移植する工程が挙げられる。

前記寒天培地は、通常用いられている植物培養用の培地であれば何でも良いが、好ましくはＭＳ培地、ガンボルグＢ５培地、ＬＳ培地等、より好ましくはＭＳ培地を用いることができる。生育温度は、例えば、コムギの場合には、１５～３０℃が好ましく、さらに好ましくは２０℃～２５℃、より好ましくは２２℃である。

[0063] 茎頂へのボンバードメントの場合、薬剤などによる選択圧をかけずに（抗生物質などを含まない）通常の培地で生育させることによっても形質転換体またはゲノム編集個体を得ることができるが、薬剤耐性遺伝子をさらに導入してもよい。薬剤耐性遺伝子を導入した場合は、薬剤により形質転換細胞またはゲノム編集細胞を選択的に培養することができる。茎頂培養に適した選択薬剤としては、例えば、スルフォニル尿素系除草剤クロロスルフロン（変異型ＡＬＳ遺伝子（アセト酪酸合成酵素遺伝子）導入により耐性獲得可能）などが知られている。薬剤耐性遺伝子を導入する場合、該薬剤耐性遺伝子は目的遺伝子と同じベクター上にあってもよく別のベクター上にあってもよい

。別々のベクター上に挿入した場合は、それらが別々の染色体に組み込まれた場合、自家受粉や戻し交配を行って後代を取ることにより目的遺伝子が導入された植物個体と薬剤耐性遺伝子を有する植物個体とに分離できるというメリットがある。

ヌクレアーゼと薬剤耐性遺伝子を同時に導入することでゲノム編集個体を選択することもできる。薬剤耐性遺伝子を導入した場合は、薬剤によりヌクレアーゼ遺伝子および／またはヌクレアーゼが導入された細胞を選択的に培養することができる。茎頂培養に適した選択薬剤としては、例えば、スルフォニル尿素系除草剤クロロスルフロン（変異型ＡＬＳ遺伝子（アセト酪酸合成酵素遺伝子）導入により耐性獲得可能）などが知られている。

[0064] 薬剤耐性遺伝子を導入する場合、該薬剤耐性遺伝子はヌクレアーゼ遺伝子と同じベクター上にあってもよく別のベクター上にあってもよい。別々のベクター上に挿入した場合は、それらが別々の染色体に組み込まれた場合、自家受粉や戻し交配を行って後代を取ることによりゲノム編集された植物個体と薬剤耐性遺伝子を有する植物個体とに分離できるというメリットがある。

[0065] 前記生育工程における、前記植物体１つあたりの土容量（前記土へ移植する際の１個体（植物体）あたりの土容量）としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、短時間かつ低労力で次世代の形質転換体またはゲノム編集個体を取得する点、および生育スペースを節約する点から、２００ｍＬ未満が好ましく、１９０ｍＬ以下がより好ましく、１８０ｍＬ以下がさらに好ましく、１５０ｍＬ以下が特に好ましく、１００ｍＬ以下が最も好ましい。

[0066] ただし、それ以上の容量の土を用いた場合においても、生育温度、施水量、施肥量、湿度、光強度、光周期、薬剤（農薬、除草剤、抗生物質）投与量等を調節することにより、有効分げつ数を１以下とすることが可能である。

例えば、施肥量を０とした場合の、前記生育工程における、前記植物体１つあたりの土容量（前記土へ移植する際の１個体（植物体）あたりの土容量）としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、

短時間かつ低労力で次世代の形質転換体またはゲノム編集個体を取得する点、および生育スペースを節約する点から、５００ｍＬ未満が好ましく、４００ｍＬ以下がより好ましく、２００ｍＬ以下がさらに好ましく、１５０ｍＬ以下が特に好ましく、１００ｍＬ以下が最も好ましい。

[0067] ここで、「有効分げつ」とは、発芽能力を有する種子を含む穂を形成した分げつをいう。有効分げつ数を１以下とすることにより、導入遺伝子の次世代への伝達効率を高めることが可能となる。ここで、有効分げつ数が「１以下」とは、主稈にのみ発芽能力を有する種子を含む穂を形成した状態、もしくは主稈および分げつ（ｔｉｌｌｅｒ）１か所にのみ発芽能力を有する種子を含む穂を形成した状態をいう。

[0068] 前記有効分げつ数が１以下の植物体の主稈の基部から穂の基部までの長さ（土から穂の基部までの主稈の長さ（草丈））の上限値としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、６００ｍｍ以下であることが好ましく、５００ｍｍ以下であることがより好ましい。主稈の基部から穂の基部までの長さが上記範囲である植物体を得ることにより、有効分げつ数が１以下の植物体を効率的に取得することができる。

[0069] 前記有効分げつ数が１以下の植物体の主稈の基部から穂の基部までの長さ（土から穂の基部までの主稈の長さ（草丈））の下限値としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、１００ｍｍ以上であることが好ましく、２００ｍｍ以上であることがより好ましい。

[0070] ３．植物体から形質転換またはゲノム編集された次世代植物体を取得する取得工程

生育したＴ０世代（当代）個体から、いずれかの葉または複数の葉からＤＮＡを抽出して、ＰＣＲ法および／またはサザンブロット法を行うことにより、遺伝子導入個体を選抜することができる。また、ＰＣＲ産物を制限酵素処理することにより、目的遺伝子がゲノム編集（標的変異）されたか否かを検出することで、ゲノム編集個体を選抜することができる。この際、Ｔ１世代（次世代）における遺伝子導入効率および／またはゲノム編集効率との相

関性の高さを考慮し、生育個体の止葉をサンプリングするのが好ましい。ただし、本発明によればＴ０世代において遺伝子導入個体および／またはゲノム編集個体を選抜しなくても、Ｔ１世代において遺伝子導入個体および／またはゲノム編集個体を取得することができる。

[0071] 遺伝子導入された生育個体または標的変異が確認された生育個体について、目的遺伝子から発現されたＲＮＡの有無を調べることもできる。ＲＮＡの有無は、例えばＲＴ－ＰＣＲ法などで確認することができる。ノザンブロッティングにより検出してもよい。また、目的遺伝子から発現されたタンパク質の有無を調べることもできる。タンパク質の有無は、例えば植物片の染色、電気泳動、ＥＬＩＳＡ法、ＲＩＡ、ドットイミュノバイディングアッセイ、および／またはウエスタンブロット法などで確認することができる。

[0072] 遺伝子導入効率は、導入に用いた外植片数と外来遺伝子を有していた生育個体数から算出する。ゲノム編集効率は、導入に用いた外植片数と標的変異を有していた生育個体数から算出する。

遺伝子導入された生育個体の主稈に形成された穂から収穫したＴ１世代種子を播種し、生育させることにより次世代の形質転換体またはゲノム編集個体を取得することができる。本発明の手法によれば、次世代の形質転換体またはゲノム編集個体を高効率で再現性良く取得することが可能となる。

[0073] 本発明に係る植物の形質転換体またはゲノム編集個体を製造する方法は、前記植物の形質転換またはゲノム編集方法を用いる。

実施例

[0074] 以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例により何ら限定されるものではない。

[0075] ［実施例１］茎頂への遺伝子導入（形質転換体の作製）

コムギにおける形質転換体を作製するため、パーティクルガン法を用いて、茎頂分裂組織へＧＦＰ遺伝子を導入した。

[0076] １．コムギ完熟種子の調製

コムギ（Ｔｒｉｔｉｃｕｍ ａｅｓｔｉｖｕｍ ｃｖ． Ｆｉｅｌｄｅｒ

）の完熟種子をハイター（次亜塩素酸濃度６％、花王株式会社）に浸漬し、室温で２０分間振とう後、クリーンベンチ内で滅菌水を用いて洗浄した。洗浄後、滅菌水で湿らせたキムタオルまたはろ紙上に載せ、休眠打破のため４℃にて２日間インキュベートした。その後、２２℃で約１２時間インキュベートし、以下の実験に用いた。

[0077] ２．完熟種子胚中の茎頂の露出

実体顕微鏡下において、上記発芽種子の胚部分の鞘葉および第１葉原基から第３葉原基を針（直径０．２０ｍｍ）の先端を用いて除去した。その後、滅菌済みナイフ（または滅菌済みメス）を用いて、胚乳および余分な胚盤部分を除去し、茎頂部分を完全に露出させた。これを３０個／プレートとなるようにＭＳ－ｍａｌｔｏｓｅ培地（４．３ｇ／Ｌ ＭＳ ｓａｌｔ，ＭＳ ｖｉｔａｍｉｎ，３０ｇ／Ｌ マルトース，０．９８ｇ／Ｌ ＭＥＳ，３％ＰＰＭ（ｐｌａｎｔ ｐｒｅｓｅｒｖａｔｉｖｅ ｍｉｘｔｕｒｅ，ナカライテスク），７．０ｇ／Ｌ ｐｈｙｔａｇｅｌ（登録商標、シグマアルドリッチ），ｐＨ５．８）に置床した。

[0078] ３．遺伝子導入

コムギ完熟胚の茎頂への遺伝子導入は、パーティクルガン法を用いて以下のようにして行った。実施例においては、導入遺伝子は蛍光レポーター遺伝子ＧＦＰ（Ｓ６５Ｔ）を含むプラスミドＤＮＡ（ｐＵＣ系プラスミド）を用いた。当該遺伝子は、トウモロコシのユビキチンプロモーターと第一イントロンの制御下で発現するよう設計されたものである。ターミネーターとしては、ノパリン合成酵素（ＮＯＳ）遺伝子のターミネーターが付加されている。０．６μｍの各金粒子３０ｍｇをはかり取り、７０％エタノール５００μＬを加え、ボルテックスにてよく懸濁した。その後、遠心により金粒子を沈殿させ、エタノールを除去した。その後、滅菌水５００μＬを加え滅菌金粒溶液とした。

[0079] １．５ｍＬチューブに、Ｑｉａｇｅｎ Ｐｌａｓｍｉｄ Ｍｉｄｉ Ｋｉｔ（Ｑｉａｇｅｎ）により精製したプラスミドＤＮＡ溶液（１μｇ／μＬ）

を、金粒子７５０μｇあたり５μｇになるように入れた。滅菌金粒子含有溶液は使用前に、超音波発生器（多賀電機製超音波洗浄機ＵＷ－２５）を使って念入りに懸濁し、上記チューブに適当量入れピペッティングにより攪拌した。次に上記チューブに、金粒子７５０μｇあたり２．５Ｍ　$CaCl_2$（ｎａｃａｌａｉ　ｔｅｓｑｕｅ）２５μＬと０．１Ｍ　Ｓｐｅｒｍｉｄｉｎｅ（ｎａｃａｌａｉ　ｔｅｓｑｕｅ）１０μＬを加えた。混合後すぐに、ボルテックスにより５分間激しく懸濁した。１０分間室温にて静置後、９，１００×ｇで２秒間遠心した。上清を除去し、７０％エタノールおよび９９．５％エタノールで洗浄した。最後に、上清を除去して９９．５％エタノールを２４μＬ添加してよく懸濁した。クリーンベンチ内でマクロキャリアの中央に６μＬずつ注ぎ、風乾させた。

[0080] パーティクルガンは、Ｂｉｏｌｉｓｔｉｃ（登録商標）　ＰＤＳ－１０００／Ｈｅ　Ｐａｒｔｉｃｌｅ　Ｄｅｌｉｖｅｒｙ　Ｓｙｓｔｅｍ（ＢＩＯ－ＲＡＤ）を使用し、撃ち込み時の圧力は約９４．９ｋｇｆ／ｃｍ^2（１，３５０ｐｓｉ）とし、標的組織までの距離は５ｃｍとした。１シャーレにつき４回ずつ撃ち込んだ。撃ち込み後、２２℃、暗所において一晩静置した。

[0081] ４．形質転換体の確認と生育

実体蛍光顕微鏡（Ｌｅｉｃａ社製ＭＺＦＬＩＩＩ）下で茎頂におけるＧＦＰ蛍光（励起：４７０／４０　吸収：５２５／５０）を観察することで、茎頂へ遺伝子導入されたことを確認した。これら遺伝子導入処理を施した全ての個体を、ＭＳ－ｍａｌｔｏｓｅ培地を入れたディスポーザブル植物細胞培養容器（Ｓｉｇｍａ）に移植し、長日（２２℃、１６時間日長）で育成した。１－２週間生育させた。培地上で１－２週間生育させた形質転換体およびゲノム編集個体を土へ移植した。２つ以上の分げつを誘導する場合は、１株あたり５７０ｍＬの土を使用した。一方、１つ以下の分げつを誘導する場合は、１株あたり９７．２ｍＬ（４５ｍｍ×４５ｍｍ×４７ｍｍセルトレイ）の土を使用した。その後、人工気象室内（２２℃、１６時間日長、１０００－１５０００ｌｕｘ）において、穂が登熟するまで生育させた。

[0082] ５．Ｔ０世代止葉における導入遺伝子の確認

得られた植物体において、蛍光レポーター遺伝子であるＧＦＰ遺伝子の有無をＰＣＲ法により調査した。主穂の止葉（５０ｍｇ）から塩化ベンジル法を用いてゲノミックＤＮＡを抽出し、これを鋳型として、ＧＦＰ遺伝子に特異的な配列から作製したプライマーを用いてＰＣＲ反応を行った。

ＧＦＰ－Ｆ：ＡＣＧＧＣＣＡＣＡＡＧＴＴＣＡＧＣＧＴ（配列番号１）

ＧＦＰ－Ｒ：ＡＣＣＡＴＧＴＧＡＴＣＧＣＧＣＴＴＣＴ（配列番号２）

[0083] ＰＣＲ反応液には、ゲノミックＤＮＡ２０ｎｇ、ＥｘＴａｑＨＳ（登録商標、ＴａＫａＲａ）０．２５Ｕ、１０×添付バッファー１．５μＬ、２ｍＭ ｄＮＴＰｓ、プライマー対各２．５ｐｍｏｌを加え、滅菌蒸留水で合計１５μＬにフィルアップした。

[0084] ＰＣＲは、ＴａＫａｒａ ＰＣＲ Ｔｈｅｒｍａｌ Ｃｙｃｌｅｒ Ｄｉｃｅ（登録商標）を用いて、９５℃で３分間処理後、９５℃を３０秒間、６０℃を３０秒間、および７２℃を１分間の反応を１サイクルとしてこれを３３サイクル行った。ＰＣＲ反応後、１．０％のアガロースゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色してＰＣＲ産物を検出し、予想される６０１ｂｐのＧＦＰ遺伝子断片が検出されたものを、遺伝子導入個体と判断した。

[0085] ６．Ｔ１世代幼葉における導入遺伝子の確認

主稈に形成された穂から収穫したＴ１世代種子を播種した。得られた植物体において、蛍光レポーター遺伝子であるＧＦＰ遺伝子の有無をＰＣＲ法により調査した。第１－２葉（５０ｍｇ）から塩化ベンジル法を用いてゲノミックＤＮＡを抽出し、それ以降の操作は実施例１－５に従った。

[0086] その結果、Ｔ０世代の有効分げつ数が１であった場合、Ｔ０世代からＴ１世代へＧＦＰ遺伝子が伝達される効率は６６．７％と高効率であった（表１）。一方、Ｔ０世代の有効分げつ数が２であった場合、Ｔ０世代からＴ１世代へＧＦＰ遺伝子が伝達される効率は１６．７％であった（表１）。インプランタ形質転換法により、キメラ性を有するＴ０世代形質転換体を作製した

場合、その有効分げつ数を抑制することで、導入遺伝子の次世代への伝達効率が高くなることがわかった。また、土容量を少なくすることで、当代個体の生育スペースを節約することが可能であった。さらにＴ０世代の主稈由来の穂から収穫したＴ１種子のみを解析対象とすることで、時間および労力を節約することが可能であった。

[0087] [表1]

T0世代 形質転換体数	T0世代 有効分げつ数	T1世代 形質転換数※	効率 T1世代/T0 世代
6	2	1	16.7%
6	1	4	66.7%

※T0世代の主稈由来の穂から収穫したT1世代種子を解析

[0088] ［実施例２］茎頂へのＲＮＰ導入（ゲノム編集個体の作製）

実施例１で示した手法は、ゲノム中に標的変異を誘導した際にも適用可能である。ここではその一例として、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９（ＲＮＰ）を導入した茎頂分裂組織から標的変異個体を作製し、次世代への変異伝達効率を確認した例を示す。作製するにあたり、ＴａＧＡＳＲ７遺伝子を標的としたｇＲＮＡを使用した。

[0089] １．コムギ完熟種子の調製

実施例１－１の方法に従った。

[0090] ２．完熟種子胚中の茎頂の露出

実施例１－２に記載の方法に準拠して行った。

[0091] ３．金粒子の調整とＲＮＰ撃ち込み

０．６μｍの金粒子６０ｍｇをはかり取り、７０％エタノール５００μＬを加え、ボルテックスにてよく懸濁した。その後、遠心により金粒子を沈殿させ、エタノールを除去した。その後、Ｎｕｃｌｅａｓｅ－Ｆｒｅｅ Ｗａｔｅｒで金粒子を３回洗浄し、Ｎｕｃｌｅａｓｅ－Ｆｒｅｅ Ｗａｔｅｒ５００μＬを加え金粒子ストック溶液とした。

実施例においては、ｇＲＮＡとしてｃｒＲＮＡおよびｔｒａｃｒＲＮＡ（

ファスマック）の混合物（０．５μｇ／μＬ）を用いた。Ｃａｓ９タンパク質として、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ　由来のＣａｓ９（ＴａＫａＲａ社製）を用いた。

[0092] ｃｒＲＮＡ：
ＧＵＵＧＣＣＧＵＡＧＧＵＧＣＣＣＧＧｇｕｕｕｕａｇａｇｃｕａｕｇｃｕｇｕｕｕｕｇ（配列番号３）
ｔｒａｃｒＲＮＡ：
ＡＡＡＣＡＧＣＡＵＡＧＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡＡＣＵＵＧＡＡＡＡＡＧＵＧＧＣＡＣＣＧＡＧＵＣＧＧＵＧＣＵ（配列番号４）

[0093] 上記ｇＲＮＡの混合物４μＬ、Ｃａｓ９タンパク質（ＴａＫａＲａ社製）１２μｇ、１０×Ｃｕｔ　Ｓｍａｒｔバッファー５μＬ、Ｒｉｂｏｌｏｃｋ　ＲＮａｓｅ　Ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ　１．０μＬを加え、滅菌蒸留水で合計２０μＬにフィルアップした。室温で１０分間静置した後、１，４－ビス（３－オレオイルアミドプロピル）ピペラジン／ヒストンＨ１タンパク質混合物（３：１、１３３０μｇ／ｍＬ）５μＬを加え、室温で５分間静置した。金粒子１５００μｇを入れ、氷上で１０分間静置した。上清を捨てた後、Ｎｕｃｌｅａｓｅ－Ｆｒｅｅ　Ｗａｔｅｒを２６μＬ加え、これを金粒子／Ｃａｓ９複合体とした。クリーンベンチ内でマクロキャリアの中央に、１．０～１．５ｃｍ角に切った親水性フィルム（３Ｍ、ＳＨ２ＣＬＨＦ）を貼りつけた。これに上記金粒子／Ｃａｓ９複合体を６μＬずつ注ぎ、風乾させた。なお、１プレートあたり４回の撃ち込みを行った。

[0094] ４．ＲＮＰ導入処理個体の生育

一晩静置したＲＮＰ導入処理個体をＭＳ－ｍａｌｔｏｓｅ培地を入れたディスポーザブル植物細胞培養容器（Ｓｉｇｍａ）に移植し、長日（２２℃、１６時間日長）で１－２週間生育させた。培地上で１－２週間生育させた形質転換体およびゲノム編集個体を土へ移植した。６つ以上の分げつを誘導する場合は、１株あたり２９００ｍＬの土を使用した。一方、１つ以下の分げ

つを誘導する場合は、１株あたり９７．２ｍＬ（４５ｍｍ×４５ｍｍ×４７ｍｍセルトレイ）の土を使用した。その後、人工気象室内（２２℃、１６時間日長、１００００－１５０００ｌｕｘ）において、穂が登熟するまで生育させた。

[0095] ５．Ｔ０世代止葉における標的変異の確認

得られた植物体において、標的遺伝子に変異が導入されているかを調査した。止葉（５０ｍｇ）から塩化ベンジル法を用いてゲノミックＤＮＡを抽出し、これを鋳型として、Ａゲノム、ＢゲノムおよびＤゲノムにおけるＴａＧＡＳＲ７遺伝子に共通な配列から作製したプライマーを用いてＰＣＲ反応を行った。

ＴａＧＡＳＲ７－Ｆ：ＣＣＴＴＣＡＴＣＣＴＴＣＡＧＣＣＡＴＧＣＡＴ（配列番号５）

ＴａＧＡＳＲ７－Ｒ：ＣＣＡＣＴＡＡＡＴＧＣＣＴＡＴＣＡＣＡＴＡＣＧ（配列番号６）

[0096] ＰＣＲ反応液には、ゲノミックＤＮＡ０．７μＬ、ＫＯＤＦＸＮｅｏ（ＴＯＹＯＢＯ）０．４Ｕ、２×添付バッファー５μＬ、０．４ｍＭｄＮＴＰｓ、プライマー対各０．２μＭを加え、滅菌蒸留水で合計１０μＬにフィルアップした。

[0097] ＰＣＲは、ＴａＫａｒａ ＰＣＲ Ｔｈｅｒｍａｌ Ｃｙｃｌｅｒ Ｄｉｃｅを用いて、９８℃を１０秒間、６８℃を１分間の反応を１サイクルとしてこれを３５サイクル行った。ＰＣＲ反応後、各ＰＣＲ産物を１μＬ、１０×添付バッファー１μＬ、適当な制限酵素５Ｕを加え、滅菌蒸留水で合計１０μＬにフィルアップした。３７℃、３時間で反応させた後、２．０％のアガロースゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色した。

[0098] 野生型株ではＰＣＲ産物が制限酵素により完全に切断されるのに対し、変異が導入された個体ではＰＣＲ産物に切れ残りが生じる。切れ残ったバンドからＤＮＡを抽出・精製し、シークエンス解析にかけ、標的遺伝子配列に変異が導入されているものについて、標的遺伝子変異導入個体と判断した。

[0099] ６．Ｔ１世代幼葉における標的変異の確認

主稈に形成された穂から収穫したＴ１世代種子を播種した。得られた植物体において、標的変異の有無を調査した。第１－２葉（５０ｍｇ）から塩化ベンジル法を用いてゲノミックＤＮＡを抽出し、それ以降の操作は実施例２－５に従った。

[0100] その結果、Ｔ０世代の有効分げつ数が０であった場合、Ｔ０世代からＴ１世代へ標的変異が伝達される効率は６６．７％と高効率であった（表２）。一方、Ｔ０世代の有効分げつ数が６以上であった場合、Ｔ０世代からＴ１世代へ標的変異が伝達された個体は得られなかった（表２）。以上の結果から、実施例１と同様に、インプランタ形質転換法により、キメラ性を有するＴ０世代ゲノム編集体を作製した場合、その有効分げつ数を抑制することで、導入変異の次世代への伝達効率が高くなることがわかった。

[0101] [表2]

T0世代 ゲノム編集個体数	T0世代 有効分げつ数	T1世代 ゲノム編集個体数※	効率 T1世代/T0 世代
3	6	0	0.00%
3	7	0	0.00%
3	0	2	66.7%

※T0世代の主稈由来の穂から収穫したT1世代種子を解析

[0102] ［実施例３］茎頂へのＤＮＡ導入（ゲノム編集個体の作製）

実施例１で示した手法は、ゲノム中に標的変異を誘導した際にも適用可能である。ここではその一例として、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９を発現するＤＮＡを導入した茎頂分裂組織から標的変異個体を作製し、次世代への変異伝達効率を確認した例を示す。作製するにあたり、ＴａＧＡＳＲ７遺伝子を標的としたｇＲＮＡを使用した。

[0103] １．コムギ完熟種子の調製

実施例１－１に従った。

[0104] ２．完熟種子胚中の茎頂の露出

実施例１－２に従った。

[0105] ３．遺伝子導入

コムギ完熟胚の茎頂への遺伝子導入は、パーティクルガン法を用いて以下のようにして行った。実施例においては、ｇＲＮＡ発現用プラスミドとして、ｐＴＡＫＮ－２ベクターのマルチクローニングサイトへコムギＵ６プロモーターおよびｇＲＮＡ　ｓｃａｆｆｏｌｄをクローニングした。その後、内部のＢｂｓＩサイトへ各標的遺伝子の標的配列を導入し、各ｇＲＮＡ発現用プラスミドとした。Ｃａｓ９発現用プラスミドとして、全合成したＳｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ　由来のＣａｓ９遺伝子を含むプラスミドＤＮＡ（ｐＵＣ系プラスミド）を用いた。当該遺伝子は、トウモロコシのユビキチンプロモーターと第一イントロンの制御下で発現するよう設計されたものである。ターミネーターとしては、ノパリン合成酵素（ＮＯＳ）遺伝子のターミネーターが付加されている。

ＴａＧＡＳＲ７標的配列：ＣＣＧＣＣＧＧＧＣＡＣＣＴＡＣＧＧＣＡＡＣ（配列番号７）

[0106] 上記各ｇＲＮＡ発現用プラスミド、Ｃａｓ９遺伝子発現用プラスミドを金粒子７５０μｇあたり各々７μｇ、３μｇを加えた。金粒子径は０．６μｍとし、金粒子量は１回の撃ち込みあたり、１８７．５μｇになるように入れた。

[0107] ４．ＤＮＡ導入個体の生育

一晩静置したＤＮＡ導入処理個体をＭＳ－ｍａｌｔｏｓｅ培地を入れたディスポーザブル植物細胞培養容器（Ｓｉｇｍａ）に移植し、長日（２２℃、１６時間日長）で１－２週間生育させた。培地上で１－２週間生育させた形質転換体およびゲノム編集個体を土へ移植した。１株あたり約１００ｍＬ（４５ｍｍ×４５ｍｍ×４７ｍｍセルトレイ）の土を使用した。その後、人工気象室内（２２℃、１６時間日長、１００００－１５０００ｌｕｘ）において、穂が登熟するまで生育させた。

[0108] ５．Ｔ０世代止葉における標的変異の確認および草丈の測定

Ｔ０世代止葉における標的変異の確認方法は実施例２－５に従った。標的

変異が確認されたゲノム編集個体の各々について、土から穂の基部までの主稈の長さ（草丈）を測定した（表３）。その結果、分げつ数が０であった１１個体のＴ０世代ゲノム編集個体について、草丈の最小値は２５０ｍｍ、最大値は４９６ｍｍであり、全個体において６００ｍｍ以下であった。

[0109] [表3]

T0世代 ゲノム編集個体	主稈の長さ (mm)	T1世代 種子数※	T1世代 ゲノム編集個体数
#1	345	14	0
#2	250	3	0
#3	342	10	1
#4	382	12	8
#5	310	6	0
#6	422	7	4
#7	496	17	17
#8	275	4	0
#9	480	11	0
#10	295	10	4
#11	418	9	1

※T0世代の主稈由来の穂から収穫したT1世代種子を解析

[0110] ６．Ｔ１世代幼葉における標的変異の確認

Ｔ１世代幼葉における標的変異の確認方法は実施例２－６に従った。１１系統のＴ０世代ゲノム編集個体のうち、６系統においてＴ１世代への標的変異の伝達が確認された（表３）。Ｔ０世代からＴ１世代へ標的変異が伝達される効率は５４．５％と高効率であった（表３）。以上の結果から、実施例１と同様に、インプランタ形質転換法により、キメラ性を有するＴ０世代ゲノム編集体を作製した場合、その有効分げつ数を抑制することで、導入変異の次世代への伝達効率が高くなることがわかった。

[0111] ［実施例４］茎頂への遺伝子導入（形質転換体の作製）

土容量、施肥の有無の違いによる分げつ数を調査した。

１．コムギ完熟種子の調製

実施例１と同様に調製した。

[0112] ２．完熟種子胚中の茎頂の露出

実施例１と同様に調製した。

[0113] ３．植物体の生育と分げつ数調査

翌日、調製した全ての個体を、ＭＳ－ｍａｌｔｏｓｅ培地を入れたディスポーザブル植物細胞培養容器（Ｓｉｇｍａ）に移植し、長日（２２℃、１６時間日長）で育成した。培地上で１週間生育させた植物体を土（スーパーミックスＡ、窒素：１５０－２６０ｍｇ／Ｌ、リン酸：７０－１６０ｍｇ／Ｌ、カリウム：１９０－３２０ｍｇ／Ｌ、ｐＨ５．０－６．０、サカタのタネ）へ移植し、温室で約２か月間が生育させ、分げつ数を調査した。調査にあたり、８０ｍＬ、１００ｍＬ、１５０ｍＬ、２００ｍＬ、３００ｍＬ、４００ｍＬ、５００ｍＬの容量の土を使用した。また、土容量８０ｍＬ～３００ｍＬ区については施肥区（ペレ丸くん１１１、保証成分量：窒素全量１１％、リン酸全量１１％、カリウム全量１１％、水溶性苦土２％、水溶性ホウ素０．１％、丸石株式会社）を設けた。施肥量は１．５ｇ／Ｌとし、第４－６葉期に１回行った。また、１試験区につき３個体を調査した。

[0114] 有効分げつ数を調査した結果、施肥しない場合は、土容量４００ｍＬまでは全ての植物個体において、有効分げつ数が１以下であった。一方、施肥した場合は、１５０ｍＬまでは全ての植物個体において有効分げつ数が１以下であった。この結果から、施肥の有無に関わらず、土容量２００ｍＬ未満までは有効分げつ数が１以下となることがわかった（表４）。

[0115]

[表4]

土容量	施肥の有無	有効分げつ数 (主稈を除いた穂の数)		
		植物個体1	植物個体2	植物個体3
80 mL	-	0	0	0
	+	1	1	1
100 mL	-	0	0	0
	+	1	1	1
150 mL	-	0	0	0
	+	1	1	1
200 mL	-	0	0	0
	+	2	3	2
300 mL	-	0	0	0
	+	3	3	2
400 mL	-	1	1	1
500 mL	-	2	2	2

[0116] 従来の方法（例えば、６５０ｍｍ×４２０ｍｍのばんじゅうを敷き、汎用の７号ポット（直径２１ｃｍ：土容量約３．５Ｌ）を用いる方法）では、仮に１００個体の植物体を生育させた場合、ばんじゅう１７個分のスペース（４．６４ｍ^2）が必要となる。一方、本発明の方法（例えば、５０ｍｍ×５０ｍｍのセルトレイ（土容量約８０ｍＬ－１００ｍＬ）を用いる方法）では、同数の植物体を生育させた場合、ばんじゅう１個分のスペース（０．２７ｍ^2）で足り、生育スペースを大幅に節約できる。

また、７号ポット（土容量約３．５Ｌ）で生育させ、１０本の分げつから平均２０粒／穂の種子を収穫した場合、１系統のＴ１世代の全ての個体を解析するためには２００個体を解析しなければならない。一方、本発明の方法では、主稈の種子のみを収穫した場合でも効率よくＴ１世代の形質転換体を取得できるため、Ｔ１世代２０個体を解析すれば良く、要する時間・労力を大幅に節約できる。

[0117] 本発明の態様としては、例えば、以下のものなどが挙げられる。

＜１＞ 植物細胞に少なくとも１種の核酸および／または少なくとも１種

のタンパク質を導入する導入工程と、該植物細胞から植物体を生育させ有効分げつ数が１以下の植物体を得る生育工程と、該植物体から形質転換またはゲノム編集された次世代植物体を取得する取得工程とを含むことを特徴とする植物の形質転換またはゲノム編集方法である。

＜２＞　前記有効分げつ数が１以下の植物体の主稈の基部から穂の基部までの長さが６００ｍｍ以下である、前記＜１＞に記載の方法である。

＜３＞　前記生育工程における、前記植物体１つあたりの土容量が１９０ｍＬ以下である、前記＜１＞または＜２＞に記載の方法である。

＜４＞　前記植物細胞が、種子胚の茎頂の細胞である、前記＜１＞から＜３＞のいずれかに記載の方法である。

＜５＞　前記種子胚の茎頂が、該種子から胚乳、鞘葉、葉原基、および／または余分な胚盤を除去し、露出させた茎頂である、前記＜４＞に記載の方法である。

＜６＞　前記種子胚の茎頂の細胞が、生殖細胞系列へ移行する茎頂幹細胞を含む、前記＜４＞または＜５＞のいずれかに記載の方法である。

＜７＞　前記種子胚の茎頂が、完熟種子胚の茎頂である、前記＜４＞から＜６＞のいずれかに記載の方法である。

＜８＞　前記導入工程において、物理的手法により、少なくとも１種の核酸および／または少なくとも１種のタンパク質を導入する、前記＜１＞から＜７＞のいずれかに記載の方法である。

＜９＞　前記物理的手法が、遺伝子銃を用いる手法である、前記＜８＞に記載の方法である。

＜１０＞　前記植物が、コムギ、オオムギ、ライムギ、エンバク、イネ、トウモロコシおよびダイズからなる群から選ばれるいずれか１である、前記＜１＞から＜９＞のいずれかに記載の方法である。

＜１１＞　前記＜１＞から＜１０＞のいずれかに記載の方法を用いることを特徴とする植物の形質転換体またはゲノム編集個体の製造方法である。

産業上の利用可能性

[0118] 本発明は、農業、医薬産業、酵素産業などに利用できる。

請求の範囲

[請求項1] 植物細胞に少なくとも１種の核酸および／または少なくとも１種のタンパク質を導入する導入工程と、該植物細胞から植物体を生育させ有効分げつ数が１以下の植物体を得る生育工程と、該植物体から形質転換またはゲノム編集された次世代植物体を取得する取得工程とを含むことを特徴とする植物の形質転換またはゲノム編集方法。

[請求項2] 前記有効分げつ数が１以下の植物体の主稈の基部から穂の基部までの長さが６００ｍｍ以下である、請求項１に記載の方法。

[請求項3] 前記生育工程における、前記植物体１つあたりの土容量が１９０ｍＬ以下である、請求項１または２に記載の方法。

[請求項4] 前記植物細胞が、種子胚の茎頂の細胞である、請求項１から３のいずれかに記載の方法。

[請求項5] 前記種子胚の茎頂が、該種子から胚乳、鞘葉、葉原基、および／または余分な胚盤を除去し、露出させた茎頂である、請求項４に記載の方法。

[請求項6] 前記種子胚の茎頂の細胞が、生殖細胞系列へ移行する茎頂幹細胞を含む、請求項４または５のいずれかに記載の方法。

[請求項7] 前記種子胚の茎頂が、完熟種子胚の茎頂である、請求項４から６のいずれかに記載の方法。

[請求項8] 前記導入工程において、物理的手法により、少なくとも１種の核酸および／または少なくとも１種のタンパク質を導入する、請求項１から７のいずれかに記載の方法。

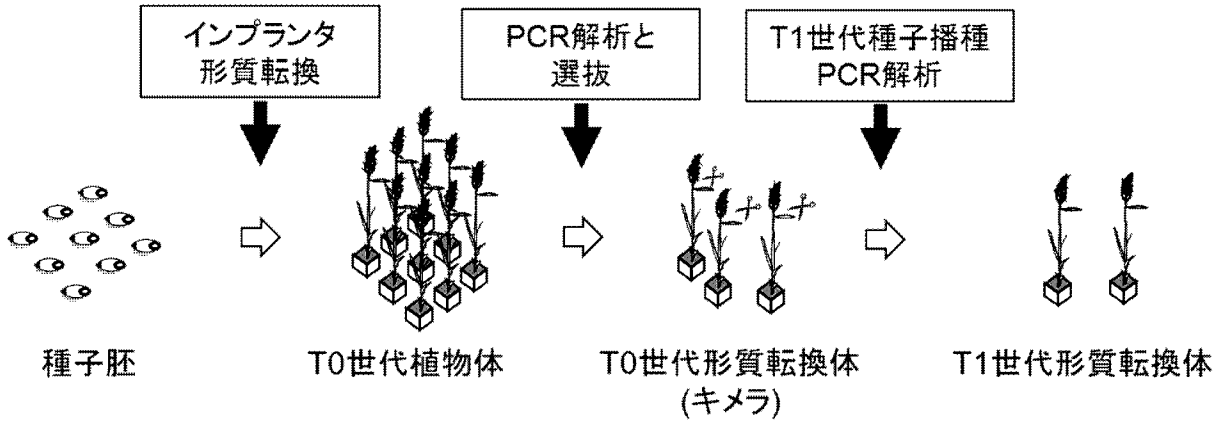
[請求項9] 前記物理的手法が、遺伝子銃を用いる手法である、請求項８に記載の方法。

[請求項10] 前記植物が、コムギ、オオムギ、ライムギ、エンバク、イネ、トウモロコシおよびダイズからなる群から選ばれるいずれか１である、請求項１から９のいずれかに記載の方法。

[請求項11] 請求項１から１０のいずれかに記載の方法を用いることを特徴とす

る植物の形質転換体またはゲノム編集個体の製造方法。

[図1]


インプランタ
形質転換
PCR解析と
選抜
T1世代種子播種
PCR解析
種子胚
T0世代植物体
T0世代形質転換体
(キメラ)
T1世代形質転換体

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2022/001349

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/82(2006.01)i; ***A01H 1/00***(2006.01)i; ***A01H 5/00***(2018.01)i; ***C12N 5/10***(2006.01)i; ***C12N 15/09***(2006.01)i
FI: C12N15/82 Z; C12N15/09 110; A01H1/00 A; C12N5/10; A01H5/00 A ZNA

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)

C12N15/82; A01H1/00; A01H5/00; C12N5/10; C12N15/09

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022
Registered utility model specifications of Japan 1996-2022
Published registered utility model applications of Japan 1994-2022

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2017/195905 A1 (KANEKA CORP.) 16 November 2017 (2017-11-16) claims, paragraphs [0020], [0082], example 12	1–11
Y	claims, paragraphs [0020], [0082], example 12	1-11
X	WO 2017/195906 A1 (KANEKA CORP.) 16 November 2017 (2017-11-16) claims, paragraphs [0022], [0060], example 18	1–11
Y	claims, paragraphs [0022], [0060], example 18	1-11
Y	CN 111662924 A (SHANDONG SHUNFENG BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 15 September 2020 (2020-09-15) claims, paragraphs [0051], examples	1-11
Y	CN 111848764 A (CHINESE UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 30 October 2020 (2020-10-30) claims, examples	1-11

☑ 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
"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	Date of mailing of the international search report
07 February 2022	**01 March 2022**

Name and mailing address of the ISA/JP	Authorized officer
Japan Patent Office (ISA/JP) **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2022/001349

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	日本育種学会編. 植物育種学辞典,初版. Baifukan Co., Ltd., 2005, ISBN: 4-563-07788-7, p.592, (JAPANESE SOCIETY OF BREEDING Ed.), non-official translation (Dictionary of Plant Thremmatology, First Edition.) "Tillering"	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2022/001349

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed:
      ☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
      ☐ on paper or in the form of an image file.
   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2022/001349

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 2017/195905 A1	16 November 2017	US 2019/0062766 A1 claims, paragraphs [0047], [0053], example 12 EP 3456181 A1 CN 109152343 A JP 2017-205103 A	
WO 2017/195906 A1	16 November 2017	US 2019/0062765 A1 claims, paragraphs [0046], [0086], example 18 EP 3456825 A1 CN 109153988 A JP 2017-205104 A	
CN 111662924 A	15 September 2020	(Family: none)	
CN 111848764 A	30 October 2020	(Family: none)	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2022/001349

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12N 15/82(2006.01)i; A01H 1/00(2006.01)i; A01H 5/00(2018.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 15/09(2006.01)i
FI: C12N15/82 Z; C12N15/09 110; A01H1/00 A; C12N5/10; A01H5/00 A ZNA

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12N15/82; A01H1/00; A01H5/00; C12N5/10; C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２２年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２２年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２２年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	WO 2017/195905 A1 (株式会社カネカ) 16.11.2017 (2017-11-16) [特許請求の範囲][0020][0082][実施例12]	1-11
Y	[特許請求の範囲][0020][0082][実施例12]	1-11
X	WO 2017/195906 A1 (株式会社カネカ) 16.11.2017 (2017-11-16) [特許請求の範囲][0022][0060][実施例18]	1-11
Y	[特許請求の範囲][0022][0060][実施例18]	1-11
Y	CN 111662924 A (SHANDONG SHUNFENG BIOTECHNOLOGY CO LTD) 15.09.2020 (2020-09-15) [特許請求の範囲][0051][実施例]	1-11
Y	CN 111848764 A (CHINESE UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 30.10.2020 (2020-10-30) [特許請求の範囲][実施例]	1-11
A	日本育種学会編，植物育種学辞典，初版，株式会社培風館，2005，ISBN 4-563-07788-7，p.592 「分げつ」の欄	1-11

☐ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☑ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊ 引用文献のカテゴリー
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
“&” 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
07.02.2022	01.03.2022

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）
原　大樹 4B 5278

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2022/001349

第Ⅰ欄　　ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第１ページの１．ｃの続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

a. ☑ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
　☑ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
　☐ 紙形式又はイメージファイル形式

b. ☐ 国際出願とともに、ＰＣＴ規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表

c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
　☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(ＰＣＴ規則13の3.1(a))
　☐ 紙形式又はイメージファイル形式（ＰＣＴ規則13の3.1(b)及びＰＣＴ実施細則第713号）

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2022/001349

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO 2017/195905 A1	16.11.2017	US 2019/0062766 A1 [特許請求の範囲][0047] [0053][実施例12] EP 3456181 A1 CN 109152343 A JP 2017-205103 A	
WO 2017/195906 A1	16.11.2017	US 2019/0062765 A1 [特許請求の範囲][0046] [0086][実施例18] EP 3456825 A1 CN 109153988 A JP 2017-205104 A	
CN 111662924 A	15.09.2020	（ファミリーなし）	
CN 111848764 A	30.10.2020	（ファミリーなし）	