(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
2020年9月17日(17.09.2020)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2020/183984 A1

(51) 国際特許分類:
C12M 1/42 (2006.01) *C12N 15/87* (2006.01)
C12N 13/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2020/004154

(22) 国際出願日： 2020年2月4日(04.02.2020)

(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 2019-046779 2019年3月14日(14.03.2019) JP

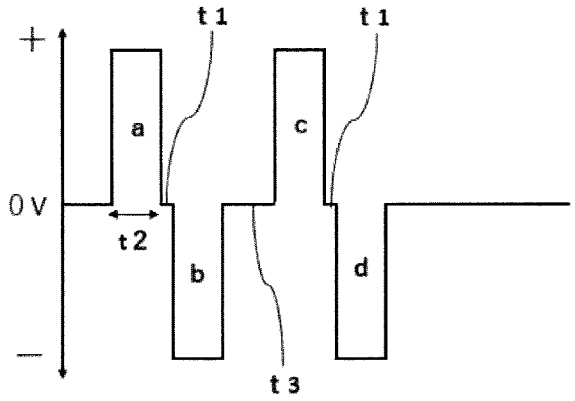
(71) 出願人: 株式会社ベックス (**BEX CO.,LTD.**) [JP/JP]; 〒1730004 東京都板橋区板橋２丁目６１番１４号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 眞壁 壮(**MAKABE So**); 〒1730004 東京都板橋区板橋２丁目６１番１４号 株式会社ベックス内 Tokyo (JP). 渡部 廣道(**WATANABE Hiromichi**); 〒1730004 東京都板橋区板橋２丁目６１番１４号 株式会社ベックス内 Tokyo (JP). 森泉 康裕(**MORIIZUMI Yasuhiro**); 〒1730004 東京都板橋区板橋２丁目６１番１４号 株式会社ベックス内 Tokyo (JP). 森泉 俊幸(**MORIIZUMI Toshiyuki**); 〒3560050 埼玉県ふじみ野市ふじみ野１－４－２０－６０１号 Saitama (JP).

(74) 代理人: 松本 征二 (**MATSUMOTO Seiji**); 〒1410031 東京都品川区西五反田１丁目１１番１号 アイオス五反田駅前ビル１００１号 Tokyo (JP).

(54) **Title:** METHOD FOR INTRODUCING SUBSTANCE INTO PROTOPLAST OR ALGA BY ELECTROPORATION AND POWER SUPPLY DEVICE FOR ELECTROPORATOR

(54) 発明の名称： エレクトロポレーションによるプロトプラストまたは藻類への物質導入方法、および、エレクトロポレーター用電源装置



(57) **Abstract:** The present invention addresses the problem of providing a method for introducing a substance into a protoplast or an alga by electroporation under novel voltage applying conditions. The problem can be solved by a method for introducing a substance into a protoplast or an alga by electroporation, the method comprising a mixed liquid placement step of placing a mixed liquid containing a protoplast or an alga and a substance to be introduced between a pair of electrodes for electroporation and a voltage application step of applying a voltage between the pair of electrodes for electroporation, wherein the voltage application step comprises one or more poration pulse application steps of applying a poration pulse of a negative voltage following a poration pulse of a positive voltage to one of the pair of electrodes for electroporation, and the interval from the application of the poration pulse of a positive voltage to the application of the poration pulse of a negative voltage is 50 μsec or less.

WO 2020/183984 A1

［続葉有］

(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, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

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

添付公開書類:

— 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))

(57) 要約:新たな電圧印加条件のエレクトロポレーションによるプロトプラストまたは藻類への物質導入方法を提供することを課題とする。エレクトロポレーションによるプロトプラストまたは藻類への物質導入方法であって、該物質導入方法は、一対のエレクトロポレーション用電極の間に、プロトプラストまたは藻類および導入する物質を含む混合液を配置する混合液配置工程と、一対のエレクトロポレーション用電極間に電圧を印加する電圧印加工程と、を含み、電圧印加工程が、一対のエレクトロポレーション用電極の一方に、プラス電圧のポレーションパルスに続きマイナス電圧のポレーションパルスを印加するポレーションパルス印加工程を１以上含み、プラス電圧のポレーションパルスを印加後、マイナス電圧のポレーションパルスを印加するまでの間隔が５０μｓｅｃ以下である、物質導入方法、により、課題が解決できる。

明　細　書

発明の名称 ：

エレクトロポレーションによるプロトプラストまたは藻類への物質導入方法、および、エレクトロポレーター用電源装置

技術分野

[0001] 本出願における開示は、エレクトロポレーションによるプロトプラストまたは藻類への物質導入方法（以下、単に「物質導入方法」と記載することがある。）、および、エレクトロポレーター用電源装置（以下、単に「電源装置」と記載することがある。）に関する。特に、エレクトロポレーションによるプロトプラストまたは藻類への物質導入の際に、物質の導入効率に優れた物質導入方法、および、当該物質導入方法に用いる電源装置に関する。

背景技術

[0002] ゲノム編集による遺伝子改変は、医学および生物学を含む様々な研究分野において、生物の基本的メカニズムの解明のために、あるいは、ヒトの疾患のモデルとして、使用されている。遺伝子改変には様々な方法が知られているが、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９システムを用いるゲノム編集技術が出現して以来、その手軽さと正確性からさまざまな応用例が開発されている。

[0003] ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９等の物質の細胞への導入方法としては、ＰＥＧ法、エレクトロポレーション法、パーティクルガン法、マイクロインジェクション法等が知られている。例えば、Ｃａｓ９タンパク質をエレクトロポレーション法により、哺乳動物の受精卵に導入した例が知られている（特許文献１参照）。

[0004] また、ゲノム編集による遺伝子改変は、植物細胞でも行われる。植物細胞は硬い細胞壁で覆われている。そのため、植物細胞の遺伝子改変は、細胞壁を取り除いたプロトプラストの状態で、エレクトロポレーションまたはマイクロインジェクションにより、核酸を導入した例が知られている（特許文献２参照）。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特開２０１７－１８４６３９号公報

特許文献2：特表２０１１－５１４１４１号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] エレクトロポレーション法は、上記のとおり、動物細胞やプロトプラストへの物質導入方法として知られている。ところで、市販のエレクトロポレーターは、電極間に挟んだ細胞と導入物質の混合液に印加する電気条件、例えば、電圧値、電圧印加回数、電圧を印加する時間、パルス間隔（電圧を印加後、次の電圧を印加するまでの休止時間）等の調整ができる。したがって、細胞の種類に応じて、適宜実験条件を選択している。しかしながら、上記特許文献２に記載のとおり、エレクトロポレーション法により、プロトプラストへ核酸等の物質を導入できることは記載されているが、エレクトロポレーション法によるプロトプラストへの物質導入はあまり行われていない。したがって、プロトプラストに対するエレクトロポレーションの望ましい条件はあまり知られていないという問題がある。

[0007] 本出願の開示は、上記問題点を解決するためになされたものである。そして、新たにエレクトロポレーター用電源装置を開発し、プロトプラストへ物質導入する際のエレクトロポレーションの条件を検討したところ、（１）プラス電圧のポレーションパルスに続きマイナス電圧のポレーションパルスを印加し、且つ、（２）プラス電圧のポレーションパルスを印加後、マイナス電圧のポレーションパルスを印加するまでの間隔を５０μｓｅｃ以下とすると、プロトプラストに対する物質の導入効率が向上すること、を新たに見出した。

[0008] すなわち、本出願の開示の目的は、新たな電圧印加条件による物質導入方法、および、当該新たな電圧印加条件を提供するための電源装置を提供する

ことである。

課題を解決するための手段

[0009] 本出願における開示は、以下に示す、エレクトロポレーションによるプロトプラストまたは藻類への物質導入方法、および、エレクトロポレーター用電源装置に関する。

[0010] （１）エレクトロポレーションによるプロトプラストまたは藻類への物質導入方法であって、

該物質導入方法は、

一対のエレクトロポレーション用電極の間に、プロトプラストまたは藻類、および、導入する物質を含む混合液を配置する混合液配置工程と、

一対のエレクトロポレーション用電極間に電圧を印加する電圧印加工程と、

を含み、

電圧印加工程が、

一対のエレクトロポレーション用電極の一方に、プラス電圧のポレーションパルスに続きマイナス電圧のポレーションパルスを印加するポレーションパルス印加工程を１以上含み、

プラス電圧のポレーションパルスを印加後、マイナス電圧のポレーションパルスを印加するまでの間隔が５０μｓｅｃ以下である、

物質導入方法。

（２）ポレーションパルス印加工程の後に、ドライビングパルスを印加するドライビングパルス印加工程を含む、

上記（１）に記載の物質導入方法。

（３）導入する物質が、核酸、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、および、イオン化もしくは帯電する物質、から選択される、

上記（１）または（２）に記載の物質導入方法。

（４）エレクトロポレーター用電源装置であって、

電源装置は、

ポレーションパルスを出力するためのポレーションパルス直流電源部と、

制御部と、

を含み、

制御部は、

プラス電圧のポレーションパルスに続きマイナス電圧のポレーションパルスを印加し、且つ、

プラス電圧のポレーションパルスを印加後、マイナス電圧のポレーションパルスを印加するまでの間隔が５０μｓｅｃ以下、

となるように、ポレーションパルスの出力を制御する、

エレクトロポレーター用電源装置。

（５）ドライビングパルスを出力するためのドライビングパルス直流電源部を更に含み、

制御部は、ポレーションパルスを出力した後、電圧の絶対値がポレーションパルスより小さいドライビングパルスを出力するように制御する、

上記（４）に記載のエレクトロポレーター用電源装置。

（６）制御部が、ハードタイマーを更に含む、

上記（４）または（５）に記載のエレクトロポレーター用電源装置。

発明の効果

[0011] 本出願で開示する電源装置を用い、新たなエレクトロポレーション条件により物質導入を行うと、物質の導入効率が向上する。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]図１は、第１の実施形態に係る物質導入方法の電圧印加工程で印加されるパルスの波形の一例を示す図である。

[図2]図２は、第２の実施形態に係る物質導入方法の電圧印加工程で印加されるパルスの波形の一例を示す図である。

[図3]図３は、実施例２で用いたプラスミドのプラスミドマップである。

[図4]図４は、図３に示すプラスミドマップの塩基配列である。

[図5]図５Ａは実施例２においてパルスを印加した際に、オシロスコープで得られたポレーションパルスとドライビングパルスの波形を表す。図５Ｂは、図５Ａの１セット目のポレーションパルスを時間軸方向に拡大した波形を表している。図５Ｃは比較例２、図５Ｄは比較例３で得られたポレーションパルスとドライビングパルスの波形を表す

[図6]図６は図面代用写真で、図６Ａは、実施例２のエレクトロポレーション後、２４時間培養後のプロトプラストを、倒立顕微鏡を用いて撮像した蛍光写真である。図６Ｂは比較例２、図６Ｃは比較例３の蛍光写真である。

[図7]図７は図面代用写真で、図７Ａは、実施例３のエレクトロポレーション後、２４時間培養後のプロトプラストの蛍光写真で、図７Ｂは、通常光写真である。

[図8]図８は図面代用写真で、図８Ａの左側は実施例４で得られた細胞塊の通常の拡大写真、右側は同じ細胞塊の自家蛍光の蛍光写真である。図８Ｂの左側は比較例４で得られた細胞塊の通常の拡大写真、右側は同じ細胞塊の自家蛍光の蛍光写真である。図８Ｃの左側は実施例４および比較例４で得られた６．５カ月培養後の細胞塊の写真、右側は同じ細胞塊の自家蛍光の蛍光写真である

[図9]図９は図面代用写真で、図９左側は、実施例５で得られたシュートのＧＦＰの蛍光写真である。図９右側は、比較例５で得られたシュートの自家蛍光の蛍光写真である。

[図10]図１０は、実施例５で用いたプライマーの概略を示す図である。

[図11]図１１は図面代用写真で、実施例５の電気泳動結果を示す写真である。

[図12]図１２は、実施例６で作製した電源装置を用いてパルスを印加した際に、オシロスコープで得られた、１セット目のポレーションパルスの波形を表す。

発明を実施するための形態

[0013] 以下、図面を参照しつつ、物質導入方法の実施形態、および、電源装置の

実施形態について、詳しく説明する。なお、本明細書において、同種の機能を有する部材には、同一または類似の符号が付されている。そして、同一または類似の符号の付された部材について、繰り返しとなる説明が省略される場合がある。

[0014] （物質導入方法および電源装置の第１の実施形態）

物質導入方法は、

（１）一対のエレクトロポレーション用電極の間に、プロトプラストまたは藻類、および、導入する物質を含む混合液を配置する混合液配置工程と、

（２）一対のエレクトロポレーション用電極間に電圧を印加する電圧印加工程と、

を含んでいる。

[0015] プロトプラストは、植物細胞から酵素を用いた公知の方法で単離することができる。植物の種類は、プロトプラストを作製できれば特に制限はない。また、細胞壁を有しない藻類も、プロトプラストと同様に物質導入方法に用いることができる。なお、藻類は、酸素発生型光合成を行う生物のうち、コケ植物、シダ植物、種子植物を除いた総称であり、例えば、シアノバクテリア（藍藻）；珪藻、黄緑藻、渦鞭毛藻などの真核細胞生物；紅藻、褐藻、緑藻などの多細胞生物である海藻類、等が挙げられる。なお、以下において、プロトプラストと藻類を纏める時には「プロトプラスト等」と記載する。

[0016] エレクトロポレーション法によりプロトプラスト等に導入する物質としては、プロトプラスト等に導入できる物質であれば特に制限はない。エレクトロポレーションは、一対のエレクトロポレーション用電極間に電気を印加することで物質を導入する。したがって、物質としては、エレクトロポレーション用媒体に添加した時に、電荷を帯びるもの（イオン化もしくは帯電する物質）であれば特に制限はない。例えば、ＤＮＡやＲＮＡ等の核酸、アミノ酸、アミノ酸が２～４９個程度結合したペプチド、アミノ酸が５０個以上結合したタンパク質等が挙げられる。なお、核酸の場合、一本鎖であっても２本鎖であってもよい。また、イオン化する物質としては、低分子有機化合物

や無機化合物であってもよい。なお、核酸やアミノ酸も帯電する物質である。したがって、重複を避けるため、本明細書において、「イオン化もしくは帯電する物質」と記載した場合、「イオン化もしくは帯電する物質」から「ＤＮＡやＲＮＡ等の核酸、アミノ酸、アミノ酸が２～４９個程度結合したペプチド、アミノ酸が５０個以上結合したタンパク質」は除かれる。

[0017] 媒体は、エレクトロポレーションで一般的に用いられるバッファーや培地等であれば特に制限はない。例えば、Ｏｐｔｉ－ＭＥＭＩ、ＰＢＳ、ＨＢＳ、ＨＢＳＳ、Ｈａｎｋｓ、ＨＣＭＦなどの培地またはバッファーが挙げられる。

[0018] エレクトロポレーション用電極（以下、単に「電極」と記載することがある。）は、従来からエレクトロポレーション法において使用される電極であれば特に制限はない。例えば、白金、金、ステンレス鋼、アルミニウムなどの金属からなる電極が挙げられる。通常、２本の電極が約０．２５ｍｍないし約１０ｍｍ、例えば約０．５ｍｍないし約４ｍｍまたは約１ｍｍないし約２ｍｍのギャップをあけ、そのギャップに混合液を配置すればよい。電極は、混合物を入れるための容器と組み合わせたキュベット電極であってもよい。エレクトロポレーション用電極は、例えば、ＢｉｏＲａｄ社、ＢＴＸ社、ＢＥＸ社、Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ社などから購入できる。

[0019] 図１を参照して、第１の実施形態に係る物質導入方法の電圧印加工程について、より詳しく説明する。図１は、第１の実施形態に係る物質導入方法の電圧印加工程で印加されるパルスの波形の一例を示す図である。第１の実施形態に係る電圧印加工程のポレーションパルスは、先ず、一対の電極の一方に、矩形状のプラス電圧のポレーションパルス（以下、「プラスＰｐ」と記載することがある。）が印加され（図１のａ）、続いて、マイナス電圧のポレーションパルス（以下、「マイナスＰｐ」と記載することがある。）が印加される（図１のｂ）。そして、第１の実施形態に係る発明では、プラスＰｐ（ａ）を印加後、マイナスＰｐ（ｂ）を印加するまでの間隔（ｔ１）が、５０μｓｅｃ以下であることが特徴である。なお、電極自体は極性を持たな

いので、電源装置と電極を接続すれば、一対の電極の一方には、プラスＰｐが印加され、続いて、マイナスＰｐが印加される。

[0020] 市販のエレクトロポレーター、例えば、ＣＵＹ２１ＥＤＩＴＩＩ ＤＥＣＡＹ ＳＱＵＡＲＥ ＭＯＤＥ（株式会社ベックス社製）では、プラスＰｐを印加後、マイナスＰｐを印加することはできるが、間隔（ｔ１）は５０ｍｓｅｃ～９９．９ｍｓｅｃとなっている。つまり、市販のエレクトロポレーターでは、ポレーションパルスを印加する場合のパルスの間隔（ｔ１）の下限値は５０ｍｓｅｃである。

[0021] 一方、第１の実施形態に係る物質導入方法（電源装置）では、従来のエレクトロポレーターが設定可能な電圧印加条件の範囲を超えて再検討した結果、プラスＰｐを印加後、マイナスＰｐを印加する間隔（ｔ１）を、市販装置の１／１０００程度にしている。つまり、市販のエレクトロポレーターでは、全く想定していない条件を試したところ、プロトプラスト等への物質の導入効率を高められることを新たに発見した。

[0022] プラスＰｐを印加後、マイナスＰｐを印加する間隔（ｔ１）を５０μｓｅｃ以下とするためには、電源装置のプログラムと、必要に応じてハードを改良することで実施できる。より具体的には、ＣＵＹ２１ＥＤＩＴＩＩ ＤＥＣＡＹ ＳＱＵＡＲＥ ＭＯＤＥ（株式会社ベックス社製）（以下、「従来装置」と記載することがある。）の制御部を、以下のとおり改良することで作製できる。

[0023] （１）プログラムで改良

プラスＰｐ印加後、マイナスＰｐを印加する間隔ｔ１の下限値は、ＣＰＵ性能に応じて決まる。より具体的には、従来装置では、プログラム上でｔ１（以下、プログラム上で設定するｔ１を「プログラムｔ１」と記載する。）を０秒に設定しても、実際にプログラムの指令に従って、プラスＰｐからマイナスＰｐを印加するまでに５０μｓｅｃのタイムラグが発生することを新たに発見した。従来装置では、プラグラムｔ１は５０ｍｓｅｃとなるように作製されていたが、プログラムを改良し、プログラムｔ１を０秒とすること

で、プラスＰｐ印加後、マイナスＰｐ印加までの実際の間隔ｔ１が５０μｓｅｃの電源装置を作製できる。なお、ＣＰＵの性能が上がれば、プログラムｔ１を０秒とすることで、実際の間隔ｔ１を更に短くすることも可能である。また、上記の５０μｓｅｃは、プログラムｔ１を０秒とした時の実際の間隔ｔ１に相当することから、プログラミングする際に、プログラムｔ１を０秒以上の値とすることで、実際の間隔ｔ１を５０μｓｅｃ以上に設定できる。例えば、従来装置の改良の場合、プログラムｔ１を５０μｓｅｃに改良することで、実際の間隔ｔ１を１００μｓｅｃとすることができる。

[0024] （２）プログラムおよびハードを改良

上記のとおり、プログラムｔ１を０秒に改良しても、実際の間隔ｔ１は５０μｓｅｃのタイムラグがある。そのため、実際の間隔ｔ１を５０μｓｅｃより更に短くしたい場合は、プログラムの改良のみでは困難である。したがって、実際の間隔ｔ１を５０μｓｅｃより短くしたい場合は、プログラムの改良と共に、ハードタイマーを制御部に組み込むことで電源装置を作製できる。より具体的には、ハードタイマーに間隔ｔ１を設定し、ハードタイマーはプラスＰｐの印加終了を検知すると同時にカウントを開始する。そして、ハードタイマーに設定した間隔ｔ１に到達したと同時にハードタイマーからポレーションパルス直流電源部にマイナスＰｐを印加する指令を出すことで、上記タイムラグの５０μｓｅｃより短い時間で、マイナスＰｐを印加できる。なお、ハードタイマーは、マイナスＰｐの印加指令に用いられ、マイナスＰｐの印加終了の指令はプログラムで行う。そのため、プログラムｔ１を０秒となるように改良すると、ハードタイマーの指令とプログラムの指令との間の誤差が少なくなるので望ましいが、誤差の許容範囲内であればプログラムｔ１は０秒でなくてもよい。なお、ハードタイマーには、ｔ１として所望の数値を入力できる。そのため、ハードタイマーを用いる場合には、実際の間隔ｔ１を５０μｓｅｃ以下の非常に短い時間で任意に調整が可能となる。したがって、ハードタイマーの設定を０秒にすれば、プラスＰｐの印加終了と同時にマイナスＰｐを印加できる。なお、本明細書において、ｔ１の具

体的な数値を挙げて説明した場合、厳密に当該数値の一点のみを意味するのではなく、解析の際の誤差を含んでもよい。

[0025] 上記に示した改良例は、従来装置を基に改良した一例に過ぎない。したがって、上記の改良例は、実施形態に係る電源装置を提供するための一例であって、他の方法を採用してもよい。

[0026] なお、上記のとおり、第１の実施形態に係る電源装置（物質導入方法）は、プラスＰｐを印加後、マイナスＰｐを印加する間隔（ｔ１）を、市販品から大幅に短くするという新たな視点でなされたものである。後述する実施例では、市販品の下限値である５０ｍｓｅｃの１／１０００（５０μｓｅｃ）となるように電源装置を作製して実験したところ、導入効率が向上したことを確認したが、市販品の導入効率と比較して導入効率が向上すれば、間隔（ｔ１）は５０μｓｅｃより長くてもよい。例えば、５ｍｓｅｃ以下、１ｍｓｅｃ以下、７５０μｓｅｃ以下、５００μｓｅｃ以下、４００μｓｅｃ以下、３００μｓｅｃ以下、２００μｓｅｃ以下、１００μｓｅｃ以下、７５μｓｅｃ以下、等としてもよい。

[0027] 第１の実施形態に係る電源装置（物質導入方法）により、物質の導入効率が向上したのは、プラスＰｐからマイナスＰｐを印加する間隔（ｔ１）が短くなることで、プラスＰｐの電圧の絶対値およびマイナスＰｐの電圧の絶対値に相当する電圧差があたかも連続して印加されたためと考えられる。したがって、間隔（ｔ１）の下限値は、０としてもよいし、０．０１μｓｅｃ以上、０．１μｓｅｃ以上、１μｓｅｃ以上、５μｓｅｃ以上、１０μｓｅｃ以上等、適宜設定すればよい。

[0028] 第１の実施形態に係る電源装置（物質導入方法）において、ポレーションパルスのその他の電圧印加条件は、市販品が設定可能な範囲と同じでよい。例えば、ポレーションパルスの波形は、矩形波であってもよいし、減衰波であってもよい。設定電圧範囲は、１～４００Ｖが挙げられる。設定電流範囲は、１～２０００ｍＡが挙げられる。設定パルス幅（図１のｔ２）は、０．０５ｍｓｅｃ～９９．９ｍｓｅｃが挙げられる。

[0029] なお、プラスＰｐに続きマイナスＰｐを印加するポレーションパルス印加工程は、一回でもよいし、図１に示すように２回、或いは、３回、４回、５回等、１以上の複数回印加できるようにしてもよい。また、ポレーションパルス印加工程を複数回実施する場合、マイナスＰｐを印加終了後、次のプラスＰｐを印加するまでの間隔（ｔ３）は、上記ｔ１と同様に設定してもよいし、従来のとおり、５０ｍｓｅｃ～１０００ｍｓｅｃとしてもよい。

[0030]（物質導入方法および電源装置の第２の実施形態）

次に、図２を参照して、物質導入方法および電源装置の第２の実施形態について説明する。図２は、第２の実施形態に係る物質導入方法の電圧印加工程で印加されるパルスの波形の一例を示す図である。第２の実施形態では、ポレーションパルスを印加後、ドライビングパルスを印加する点で第１の実施形態と異なり、その他の点は第１の実施形態と同様である。したがって、物質導入方法および電源装置の第２の実施形態の説明では、第１の実施形態と異なる点を中心に説明し、第１の実施形態において説明済みの事項についての繰り返しとなる説明は省略する。よって、第２の実施形態において明示的に説明されなかったとしても、第２の実施形態において、第１の実施形態で説明済みの事項を採用可能であることは言うまでもない。

[0031] ドライビングパルスは、ポレーションパルスの印加後、ポレーションパルスで印加する電圧の絶対値より小さい電圧のパルスが印加される。ポレーションパルスに引き続き、ドライビングパルスを印加することで、物質の導入効率を向上できる。

[0032] ドライビングパルス（図２のｄ）は、市販品のドライビングパルスと同じでよい。例えば、ドライビングパルスの波形は、矩形波であってもよいし、減衰波であってもよい。設定電圧範囲は、１～３５０Ｖが挙げられる。設定電流範囲は、１～２０００ｍＡが挙げられる。設定パルス幅（図２のｔ４）は、０．０５ｍｓｅｃ～１０００ｍｓｅｃが挙げられる。設定パルス間隔（図２のｔ５）は1～１０００ｍｓｅｃが挙げられる。設定パルス回数は、１～１０００回が挙げられる。なお、図２に示す例では、プラス電圧のドライビ

ングパルスを３回印加後、マイナス電圧のドライビングパルスを３回印加した例が示されているが、プラス電圧とマイナス電圧の組み合わせは適宜設定すればよい。例えば、プラス電圧とマイナス電圧を交互に組合わせてもよい。

[0033] ドライビングパルスを印加する場合は、ドライビングパルスを出力するためのドライビングパルス直流電源部を電源装置が更に備え、ポレーションパルスを印加後、ドライビングパルスが印加できるように、制御部を制御すればよい。

[0034] 以下に実施例を掲げ、各実施形態を具体的に説明するが、この実施例は単にその具体的な態様の参考のために提供されているものである。これらの例示は、発明の範囲を限定したり、あるいは制限するものではない。

実施例

[0035] ＜実施例１＞

［電源装置の作製］

ＣＵＹ２１ＥＤＩＴＩＩ ＤＥＣＡＹ ＳＱＵＡＲＥ ＭＯＤＥ（株式会社ベックス社製）の制御部のプログラムを、プログラムｔ１が０秒となるように改良することで、プラスＰｐを印加後、マイナスＰｐを印加するまでの間隔が５０μｓｅｃとなる電源装置を作製した。なお、その他の電気的条件は、ＣＵＹ２１ＥＤＩＴＩＩ ＤＥＣＡＹ ＳＱＵＡＲＥ ＭＯＤＥと同じである。

[0036] ＜比較例１＞

ＣＵＹ２１ＥＤＩＴＩＩ ＤＥＣＡＹ ＳＱＵＡＲＥ ＭＯＤＥを比較例１の電源装置とした。

[0037] ［物質導入実験１］

＜実施例２＞

［タバコの葉］

（１）プロトプラストの単離

（ａ）無菌植物（タバコの葉：Ｎｉｃｏｔｉａｎａ ｂｅｎｔｈａｍｉａｎ

ａ）からよく展開した葉を切り取り、太い葉脈を除去してシャーレに置いた（１ｇ）。

（ｂ） 約１ｍｌの酵素液を加え、葉を２ｍｍ幅くらいとなるように、メスで切り刻んだ。なお、酵素液には、１．５％ Ｃｅｌｌｕｌａｓｅ Ｙ－Ｃ（キッコーマン社製）、０．２５％ Ｍａｃｅｒｏｚｙｍｅ Ｒ２００（ヤクルト社製）、７００ｍｇ／ｌ 塩化カルシウム、０．５Ｍ マンニトール（富士フィルム和光純薬社製）、５ｍＭ ＭＥＳ（２－モルホリノエタンスルホン酸；２－Ｍｏｒｐｈｏｌｉｎｏｅｔｈａｎｅｓｕｌｆｏｎｉｃ ａｃｉｄ， ｍｏｎｏｈｙｄｒａｔｅ）（同仁化学研究所社製）を用いた。なお、酵素液のｐＨは５．６であった。以下において、ｐＨを記載する場合は、個々の試薬のｐＨではなく、溶液全体のｐＨを表す。

（ｃ）葉を全て刻んだら、更に９ｍｌの酵素液を加え、シャーレの周りをサージカルテープで密封し、軽く振り混ぜた。

（ｄ）暗黒下２５℃で約４時間静置し、その間に数回軽く振り混ぜた。

（ｅ）倒立顕微鏡でプロトプラスト単離されていることを確認した。

（ｆ）パストゥールピペットを使って、プロトプラストを含んだ酵素液を１００μｍのナイロンメッシュに通した。

（ｇ）ろ液を１０ｍｌの遠心管に移し、７００ｒｐｍで５分間遠心分離した。

（ｈ）上清をパストゥールピペットで除去し、８ｍｌの洗浄液でプロトプラストを懸濁し、７００ｒｐｍで３分間間遠心分離した。なお、洗浄液には、７００ｍｇ／ｌ 塩化カルシウム、０．５Ｍ マンニトール、５ｍＭ ＭＥＳ、ｐＨ５．６を用いた。

（ｉ）さらに２回同操作を繰り返した。

（ｊ）その後、プロトプラストを１８％ショ糖溶液上に重層し、７００ｒｐｍで５分間遠心分離して、プロトプラストを精製した。

[0038] （２）物質導入の実施

（ａ）上記（１）で単離したプロトプラストを、１ｍｌのエレクトロポレー

ション用緩衝液に懸濁した。なお、緩衝液には、７０ｍＭ　ＫＣｌ、０．５Ｍ　マンニトール、５ｍＭ　ＭＥＳ、ｐＨ５．６を用いた。

（ｂ）懸濁液の一部を用い、血球計算盤で密度を測定した。

（ｃ）プロトプラストの密度が５０万個/ｍｌになるように、エレクトロポレーション用緩衝液で調整し、１００μｌを０．２ｃｍのキュベット電極（ＢＥＸ社製，ＳＥ－２０２）に移し、プラスミドＤＮＡの濃度が１０μｇ／１００μｌとなるように加えた。なお、プラスミドＤＮＡは、ＧＦＰタンパク質を発現するように設計されたもので、図３にプラスミドマップを示す。また、配列（配列番号：１）を図４に示す。

[0039] （ｄ）実施例１で作製した電源装置を用い、以下の条件でパルスを印加した。

＜ポレーションパルス＞

・電圧設定：１４０Ｖ

・パルス幅（ｔ２）：０．５ｍｓｅｃ

・プラスＰｐを印加後、マイナスＰｐを印加するまでの間隔（ｔ１）：５０μｓｅｃ

・マイナスＰｐを印加終了後、次のプラスＰｐを印加するまでの間隔（ｔ３）：５０ｍｓｅｃ

・パルス印加回数：プラスＰｐ→マイナスＰｐのセットを２回

・減衰率：１０％

[0040] ＜ドライビングパルス＞

・電圧設定：２５Ｖ

・パルス幅（ｔ４）：２５ｍｓｅｃ

・パルス間隔（ｔ５）：５０ｍｓｅｃ

・パルス印加回数：プラス電圧を印加後、マイナス電圧を５回印加

・減衰率：１０％

[0041] （ｅ）キュベット内のプロトプラスト溶液を９００μｌの液体培地に移し、２４穴シャーレで２５℃、１６時間照明、８時間暗黒で培養した。なお、培

地は、ＭＳ培地、３０ｇ／ｌ　マルトース、０．５ｍｇ／ｌ　ＮＡＡ（ナフタレン酢酸）、０．５ｍｇ／ｌ　ＢＡ（６ベンジルアミノプリ）、０．５Ｍ　マンニトール、ｐＨ５．７を用いた。

（ｆ）２週間毎に、培地の濃度を０．１ｍｏｌ／ｌずつ下げるよう新しい培地を追加することで、浸透圧を調整した。

（ｇ）コロニーの形成を確認後、再分化用の培地に移した。再分化用の培地には、ＭＳ培地、３０ｇ／ｌ　マルトース、０．１ｍｇ／ｌ　ＮＡＡ、０．５ｍｇ／ｌ　ＢＡ、２．５ｇ／ｌ　ｇｅｌｌａｎ　ｇｕｍ、ｐＨ５．７を用いた。

[0042]　図５Ａは、上記（ｄ）において、パルスを印加した際に、オシロスコープで得られた、ポレーションパルスとドライビングパルスの波形を表す。図５Ｂは、図５Ａの１セット目のポレーションパルス（図５Ａの矢印部分）を時間軸方向に拡大した波形を表している。図５Ｂの矢印で示す、プラスＰｐを印加後、マイナスＰｐを印加するまでの間隔（ｔ１）は５０μｓｅｃで、設定どおりの間隔であることを確認した。また、図６Ａは、エレクトロポレーション後、２４時間培養後のプロトプラストを、倒立顕微鏡を用いて撮像した蛍光写真である。

[0043] ＜比較例２＞

比較例１の電源装置を用い、プラスＰｐを印加後、マイナスＰｐを印加するまでの間隔（ｔ１）を５０ｍｓｅｃとした以外は、実施例１と同様の手順により物質導入を実施した。図５Ｃは、オシロスコープで得られた、ポレーションパルスとドライビングパルスの波形を表す。また、図６Ｂは、エレクトロポレーション後、２４時間培養後のプロップラストの蛍光写真である。

[0044] ＜比較例３＞

比較例１の電源装置を用い、プラスＰｐを連続して２回印加後、マイナスＰｐを連続して２回印加し、夫々のパルス間隔（ｔ１）を５０ｍｓｅｃとした以外は、実施例１と同様の手順により物質導入を実施した。図５Ｄは、オシロスコープで得られた、ポレーションパルスとドライビングパルスの波形

を表す。また、図６Ｃは、エレクトロポレーション後、２４時間培養後のプロトプラストの蛍光写真である。

[0045] 図６Ａ乃至図６Ｃから明らかなように、実施例２の図６Ａの蛍光を示すプロトプラストの数は、図６Ｂおよび図６Ｃより多かった。そして、比較例２の図６Ｂと比較して、実施例２の図６Ａの写真の同一面積内で蛍光を示すプロトプラストの数は、約１．３倍であった。以上の結果から、プラスＰｐを印加後、マイナスＰｐを印加するまでの間隔（ｔ１）を短くするほど、エレクトロポレーションによるプロトプラストへのプラスミドの導入効率が向上することが明らかとなった。

[0046] ［物質導入実験２］

＜実施例３＞

［タマネギ］

（１）プロトプラストの準備

タバコの葉から形成したプロトプラストの代え、タマネギのプロトプラストを用いた実験を行った。タマネギのプロトプラストは、タマネギ種子を発芽させ、植物ホルモン０．５ｍｇ／ｌ ２，４－Ｄ（２，４－ジクロロフェノキシ酢酸）、０．１ｍｇ／ｌ ＴＤＺ（Ｎ－フェニル－Ｎ’－（１，２，３－チアジアゾール－５－イル）尿素）で脱分化したカルスを用いた。

（２）物質導入の実施

タバコの葉から形成したプロトプラストの代え、タマネギのプロトプラストを用いた以外は、実施例２と同様の手順で実験を行った。

[0047] 図７Ａは、エレクトロポレーション後、２４時間培養後のプロトプラストの蛍光写真である。図７Ｂは、通常光写真である。図７Ａから明らかなように、種類の異なるプロトプラストを用いた場合でも、物質導入ができることを確認した。

[0048] ［物質導入実験３］

＜実施例４＞

［タバコの葉のＰＤＳ遺伝子のノックアウト］

導入物質として、Ｃａｓ９タンパク質とｇＲＮＡを用いた。ノックアウトのターゲットには、カロテノイド生合成酵素であるフィトエン不飽和化酵素（ｐｈｙｔｏｅｎｅ　ｄｅｓａｔｕｒａｓｅ；ＰＤＳ）遺伝子を選択した。ＰＤＳは、植物のカロテノイドの合成に関連しており、ＰＤＳ遺伝子が欠損すると、カロテノイドが生成できなくなり、葉緑体特有の赤い自家蛍光が消失する。

（１）導入物質の調整

ＰＤＳ遺伝子をターゲットとするためｇＲＮＡのデザインを行い、５’末端側の配列（ｇＲＮＡ＿ｔａｒｇｅｔ１）と、３’末端側の配列（ｇＲＮＡ＿ｔａｒｇｅｔ２）を決定した。

（ａ）ｇＲＮＡ＿ｔａｒｇｅｔ１

５’－ＧＣＣＧＴＴＡＡＴＴＴＧＡＧＡＧＴＣＣＡ－３’（配列番号２）

（ｂ）ｇＲＮＡ＿ｔａｒｇｅｔ２

５’－ＧＴＣＡＡＧＡＴＧＴＴＴＧＣＴＴＧＣＡＡ－３’（配列番号３）

[0049] 上記配列番号２および配列番号３に基づき、Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ株式会社（ＩＤＴ）から、ｃｒＲＮＡおよびｔｒａｃｒＲＮＡ、並びに、Ｃａｓ９を購入した。

[0050] 購入したＣａｓ９、ｃｒＲＮＡおよびｔｒａｃｒＲＮＡを以下の濃度となるように調整し、ＩＤＴ社のプロトコルにしたがって、導入物質（Ｃａｓ９およびｇＲＮＡ）の調整を行った。

・Ｃａｓ９：１０μｇ／１００μｌ

・ｃｒＲＮＡ：１０μｇ／１００μｌ

・ｔｒａｃｒＲＮＡ：１０μｇ／１００μｌ

[0051] （２）物質導入

プラスミドに代え、調整した導入物質（Ｃａｓ９およびｇＲＮＡ）を用いた以外は、実施例２と同様の手順で物質の導入を行った。図８Ａの左側の写真は、エレクトロポレーション実施後、約２．５カ月培養後の細胞塊の様子を示す写真である。図８Ａの左側は細胞塊の通常の拡大写真、右側は同じ細

胞塊の自家蛍光の蛍光写真である。また、図８Ｃの左側は６．５カ月培養後の細胞塊の通常の写真、右側は同じ細胞塊の自家蛍光の蛍光写真である。

[0052] ＜比較例４＞

導入物質を用いなかった以外は、実施例４と同様の手順で実験を行った。図８Ｂの左側の写真は、エレクトロポレーション実施後、約２．５カ月培養後の細胞塊の様子を示す写真である。図８Ｂの左側は細胞塊の通常の拡大写真、右側は同じ細胞塊の自家蛍光の蛍光写真である。また、図８Ｃの左側は６．５カ月培養後の細胞塊の通常の写真、右側は同じ細胞塊の自家蛍光の蛍光写真である。

[0053] 図８Ａに示すとおり、ノックアウト物質を導入した実施例４では、〇で囲った細胞塊は自家蛍光が見られなかった。一方、ノックアウト物質を導入しなかった比較例４では、何れの細胞塊も自家蛍光を確認した。

[0054] また、図８Ｃに示すように、６．５カ月培養後の観察でも、実施例４の細胞塊は半透明で植物のカロテノイドが生合成されておらず、自家蛍光も見られなかった。一方、ノックアウト物質を導入しなかった比較例４の細胞塊は、カロテノイドの形成が目視で確認され、自家蛍光も確認できた。

[0055] 以上の結果より、導入物質としてＣａｓ９およびｇＲＮＡを用い、標的であるＰＤＳ遺伝子をノックアウトできたことを確認した。

[0056] ［物質導入実験４］

＜実施例５＞

［タバコの葉のＰＤＳ遺伝子のノックインおよびノックアウト］

導入物質として、実施例４のＣａｓ９タンパク質とｇＲＮＡに加え、ＧＦＰを発現するｄｓＤＮＡ（１０μｇ／１００μｌ）を用いた。ｄｓＤＮＡの配列は以下のとおり。

５’－ＴＧＴＴＣＡＡＴＡＡＡＡＴＧＣＣＣＣＡＡＴＧＡＧＡＣＴＴＴＴＣＡＡＣＡＡＡＧＧＧＴＡＡＴＡＴＣＧＧＧＡＡＡＣＣＴＣＣＴＣＧＧＡＴＴＣＣＡＴＴＧＣＣＣＡＧＣＴＡＴＣＴＧＴＣＡＣＴＴＣＡＴＣＧＡＡＡＡＧＧＡＣＡＧＴＡＧＡＡＡＡＡＧＧＡＡＧＧＴＧＧＣＴＣＣＴＡＣＡＡＡＴＧＣＣ

ATCATTGCGATAAAGGAAAGGCTATCGTTCAAGA
TGCCTCTACCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCC
CCACCCACGAGGAACATCGTGGAAAAAGAAGACG
TTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATG
TGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAA
TCCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCCTCTATAT
AAGGAAGTTCATTTCATTTGGAGAGGACAGGCTT
CTTGAGATCCTTCAACAATTACCAACAACAACAA
ACAACAAACAACATTACAATTACTATTTACAATT
ACAGTCGACTCTAGAGGATCCATGGTGAGCAAGG
GCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCT
GGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAG
TTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCA
CCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCAC
CACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTC
GTGACCACCTTCACCTACGGCGTGCAGTGCTTCA
GCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTT
CTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAG
GAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACT
ACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGA
CACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATC
GACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACA
AGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTA
TATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAG
GTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACG
GCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAA
CACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCC
GACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGA

ＧＣＡＡＡＧＡＣＣＣＣＡＡＣＧＡＧＡＡＧＣＧＣＧＡＴＣＡＣＡＴＧＧＴ
ＣＣＴＧＣＴＧＧＡＧＴＴＣＧＴＧＡＣＣＧＣＣＧＣＣＧＧＧＡＴＣＡＣＴ
ＣＡＣＧＧＣＡＴＧＧＡＣＧＡＧＣＴＧＴＡＣＡＡＧＴＡＡＡＧＣＧＧＣＣ
ＧＣＣＣＧＧＣＴＧＣＡＧＡＴＣＧＴＴＣＡＡＡＣＡＴＴＴＧＧＣＡＡＴＡ
ＡＡＧＴＴＴＣＴＴＡＡＧＡＴＴＧＡＡＴＣＣＴＧＴＴＧＣＣＧＧＴＣＴＴ
ＧＣＧＡＴＧＡＴＴＡＴＣＡＴＡＴＡＡＴＴＴＣＴＧＴＴＧＡＡＴＴＡＣＧ
ＴＴＡＡＧＣＡＴＧＴＡＡＴＡＡＴＴＡＡＣＡＴＧＴＡＡＴＧＣＡＴＧＡＣ
ＧＴＴＡＴＴＴＡＴＧＡＧＡＴＧＧＧＴＴＴＴＴＡＴＧＡＴＴＡＧＡＧＴＣ
ＣＣＧＣＡＡＴＴＡＴＡＣＡＴＴＴＡＡＴＡＣＧＣＧＡＴＡＧＡＡＡＡＣＡ
ＡＡＡＴＡＴＡＧＣＧＣＧＣＡＡＡＣＴＡＧＧＡＴＡＡＡＴＴＡＴＣＧＣＧ
ＣＧＣＧＧＴＧＴＣＡＴＣＴＡＴＧＴＴＡＣＴＡＧＡＴＣＣＣＡＡＧＧＴＡ
ＡＴＴＣＡＧＣＴＴＡＴＣ－３’（配列番号４）

[0057] エレクトロポレーション実施時に、上記ｄｓＤＮＡも混合液に添加した以外は、実施例４と同様の手順で実験を行った。図９左側は、エレクトロポレーション実施後、約８カ月培養後のシュートの蛍光写真である。

[0058] ＜比較例５＞

導入物質を含まなかった以外は、実施例５と同様の手順で実験を行った。図９右側は、エレクトロポレーション実施後、約８カ月培養後のシュートの蛍光写真である。

[0059] 図９に示すように、実施例５では、ＰＤＳ遺伝子上にｄｓＤＮＡがノックインされたため、ｄｓＤＮＡの発現により形成したＧＦＰの緑色の蛍光が確認できた。一方、物質を導入していない比較例５では、ＰＤＳ遺伝子が機能していることから、赤い自家蛍光が確認された。以上の結果から、ターゲットであるＰＤＳ遺伝子上にｄｓＤＮＡをノックインできたことを表現型から確認した。

[0060] ［ＤＮＡ配列の検討］

次に、実施例５の実験で得られたシュートのＤＮＡ配列の確認を行った。実施例５では、ＰＤＳ遺伝子を切断する機能を有するＣａｓ９およびｇＲＮ

Ａと、切断した箇所に導入するｄｓＤＮＡを混合してエレクトロポレーションを行った。したがって、得られたシュートは、ＰＤＳ遺伝子上にＧＦＰを発現するｄｓＤＮＡがノックインされたゲノムと、ＰＤＳ遺伝子がノックアウトされたゲノムのヘテロとなる。実施例５で得られたシュートの中から、図９に示す表現型でノックインが確認されたシュートを含め、６個の細胞塊およびシュートを選択し、以下の手順によりＤＮＡ配列を調べた。

[0061] （１）プライマーの設計

図１０に示すように、ゲノム編集標的部位を含むＰＤＳ遺伝子（７１３ｂｐ）をＰＣＲで増幅できるように、フォーワードプライマー、リバースプライマーを設計した。配列は以下のとおり。

（ａ）フォーワードプライマー

５’－ＴＧＴＧＧＧＴＡＡＣＧＧＣＣＡＡＡＣＣＡＣＣＡＣ－３’（配列番号５）

（ｂ）リバースプライマー

５’－ＧＡＧＴＡＣＧＡＡＴＣＣＴＴＡＡＣＴＴＡＴＧＣＣ－３’（配列番号６）

[0062] 選択した６種類の細胞塊もしくはシュートから常法により、ＤＮＡを抽出し、上記プライマーを用いてＤＮＡを増幅し、増幅した核酸のポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。マーカー（Ｍ）には、１ｋｂ　ＤＮＡ　Ｌａｄｄｅｒ　Ｍａｒｋｅｒ（品番：ＢＲＧ－１ｋｂ－０２、品名：ＤＮＡラダーマーカー１ｋｂ、ワトソン株式会社製）を用いた。また、コントロール（Ｃ）には、比較例５で得られた細胞塊から常法により、ＤＮＡを抽出し、上記プライマーを用いてＤＮＡを増幅したものを用いた。

[0063] 図１１に電気泳動の結果を示す。レーン番号１３が、図９に示すＧＦＰの緑色の蛍光が確認できたシュートである。次に、図１１中のノックインの表示のあるバンド、および、ノックアウトの表示のバンドを切り出し、シークエンサーを用いて当該バンドのＤＮＡシークエンスを解析した。

[0064] レーン番号１３のノックインのＤＮＡを解析したところ、ＰＤＳ遺伝子の

狙った部分にｄｓＤＮＡがヘテロにノックインされていることを確認した。また、レーン番号１０～１６番のノックアウトのＤＮＡを解析したところ、何れもＤＮＡの欠損が確認された。また、ＤＮＡ配列の解析から、レーン番号１０番はキメラノックアウト、レーン番号１１番はキメラノックアウト、レーン番号１２番はヘテロノックアウト、レーン番号１３番はヘテロノックアウト、レーン番号１５番はヘテロノックアウト、レーン番号１６番はホモノックアウトであることも確認した。

[0065] 以上の結果より、表現型に加え、ＤＮＡの配列からも、物質導入によりＰＤＳ遺伝子の標的部位のノックインおよびノックアウトを確認した。

[0066] ＜実施例６＞

実施例１の電源装置に、ハードタイマーを組み込むことで実施例６の電源装置を作製した。次に、実施例６で作製した電源装置を用い、ハードタイマーの設定を０秒にして、実施例２と同様の手順で物質導入実験を行った。図１２は実施例６で作製した電源装置を用いてパルスを印加した際に、オシロスコープで得られた、１セット目のポレーションパルスの波形を表している（図５Ｂと同じ時間軸）。図１２に示すように、プラスＰｐの印加終了と同時にマイナスＰｐが印加されたことを確認した。また、図示は省略するが、タバコの葉のプロトプラスにプラスミドが導入できたことも確認した。

産業上の利用可能性

[0067] 本出願で開示する物質導入方法、および、電源装置により、プロトプラストまたは藻類に、物質を効率的に導入できる。したがって、農林水産分野のゲノム編集に有用である。

請求の範囲

[請求項1] エレクトロポレーションによるプロトプラストまたは藻類への物質導入方法であって、

該物質導入方法は、

一対のエレクトロポレーション用電極の間に、プロトプラストまたは藻類、および、導入する物質を含む混合液を配置する混合液配置工程と、

一対のエレクトロポレーション用電極間に電圧を印加する電圧印加工程と、

を含み、

電圧印加工程が、

一対のエレクトロポレーション用電極の一方に、プラス電圧のポレーションパルスに続きマイナス電圧のポレーションパルスを印加するポレーションパルス印加工程を１以上含み、

プラス電圧のポレーションパルスを印加後、マイナス電圧のポレーションパルスを印加するまでの間隔が５０μｓｅｃ以下である、

物質導入方法。

[請求項2] ポレーションパルス印加工程の後に、ドライビングパルスを印加するドライビングパルス印加工程を含む、

請求項１に記載の物質導入方法。

[請求項3] 導入する物質が、核酸、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、および、イオン化もしくは帯電する物質、から選択される、

請求項１または２に記載の物質導入方法。

[請求項4] エレクトロポレーター用電源装置であって、

電源装置は、

ポレーションパルスを出力するためのポレーションパルス直流電源部と、

制御部と、

を含み、

制御部は、

プラス電圧のポレーションパルスに続きマイナス電圧のポレーションパルスを印加し、且つ、

プラス電圧のポレーションパルスを印加後、マイナス電圧のポレーションパルスを印加するまでの間隔が５０μｓｅｃ以下、

となるように、ポレーションパルスの出力を制御する、

エレクトロポレーター用電源装置。

[請求項5] ドライビングパルスを出力するためのドライビングパルス直流電源部を更に含み、

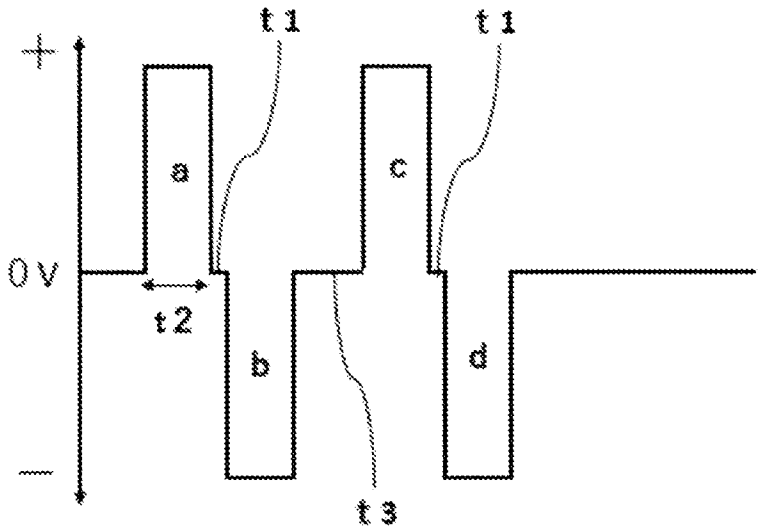
制御部は、ポレーションパルスを出力した後、電圧の絶対値がポレーションパルスより小さいドライビングパルスを出力するように制御する、

請求項４に記載のエレクトロポレーター用電源装置。

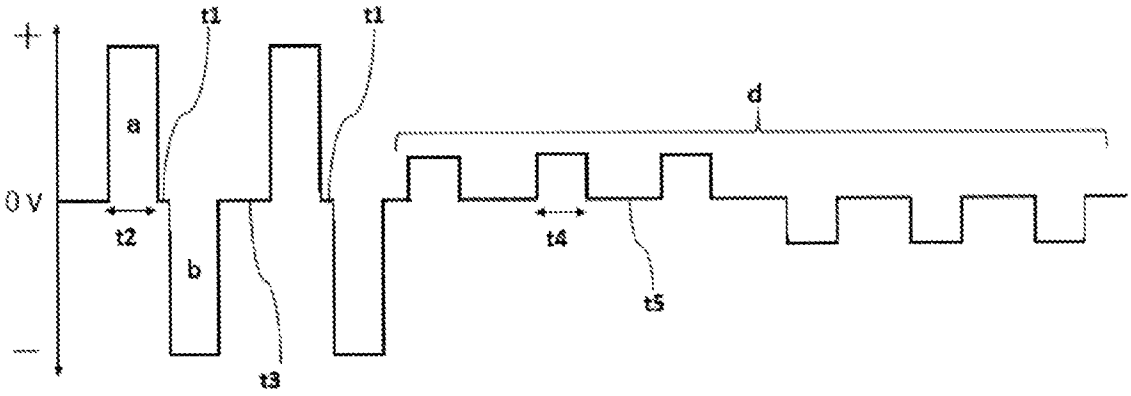
[請求項6] 制御部が、ハードタイマーを更に含む、

請求項４または５に記載のエレクトロポレーター用電源装置。

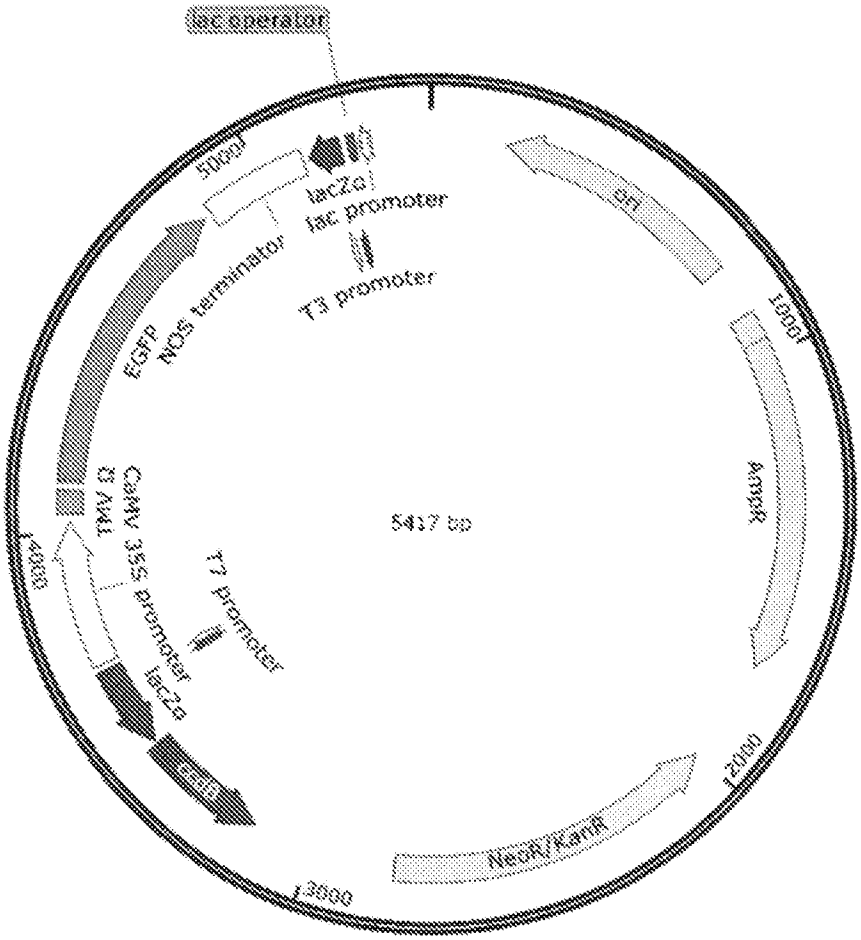
[図1]



[図2]



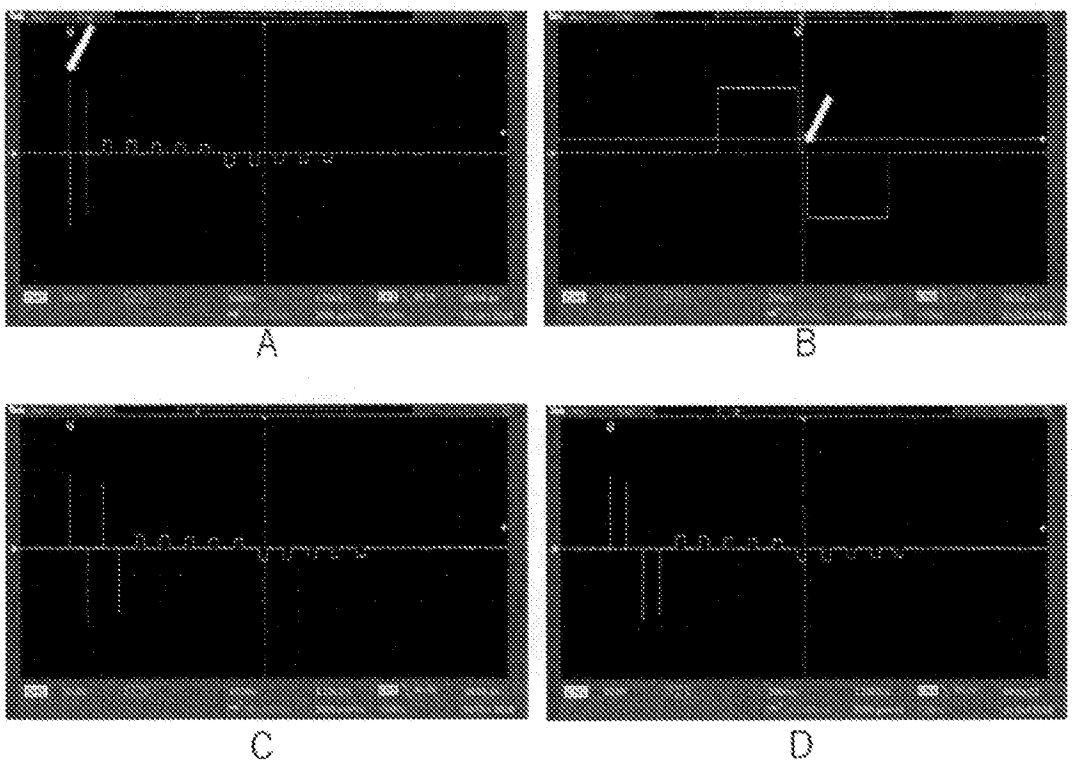
[図3]


lac operator
5000
lacZα
lac promoter
T3 promoter
EGFP
NOS terminator
ori
1000
AmpR
5417 bp
CaMV 35S promoter
5' UTR
T7 promoter
lacZα
4000
2000
NeoR/KanR
3000

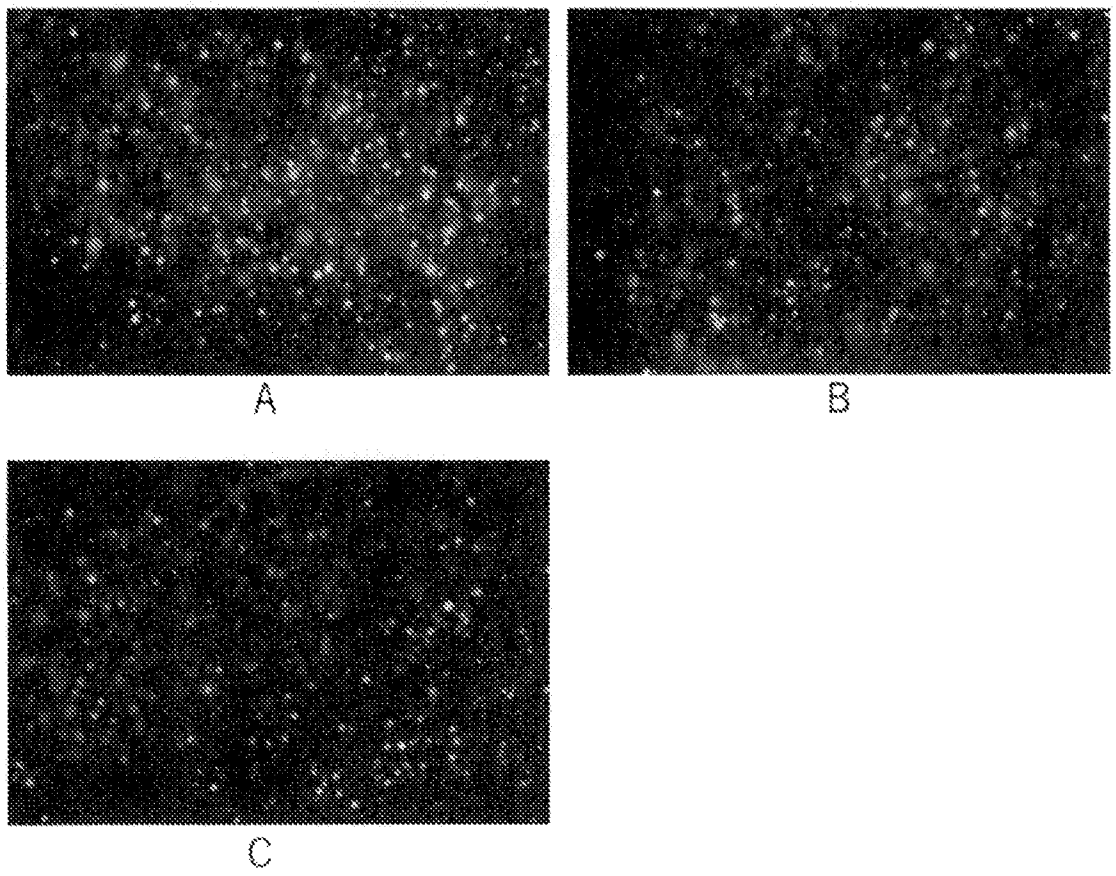
[図4]



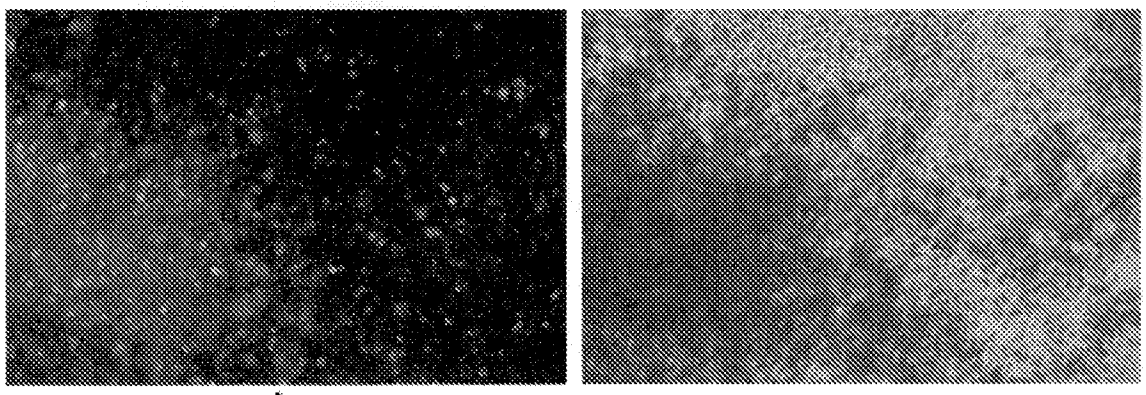
[図5]



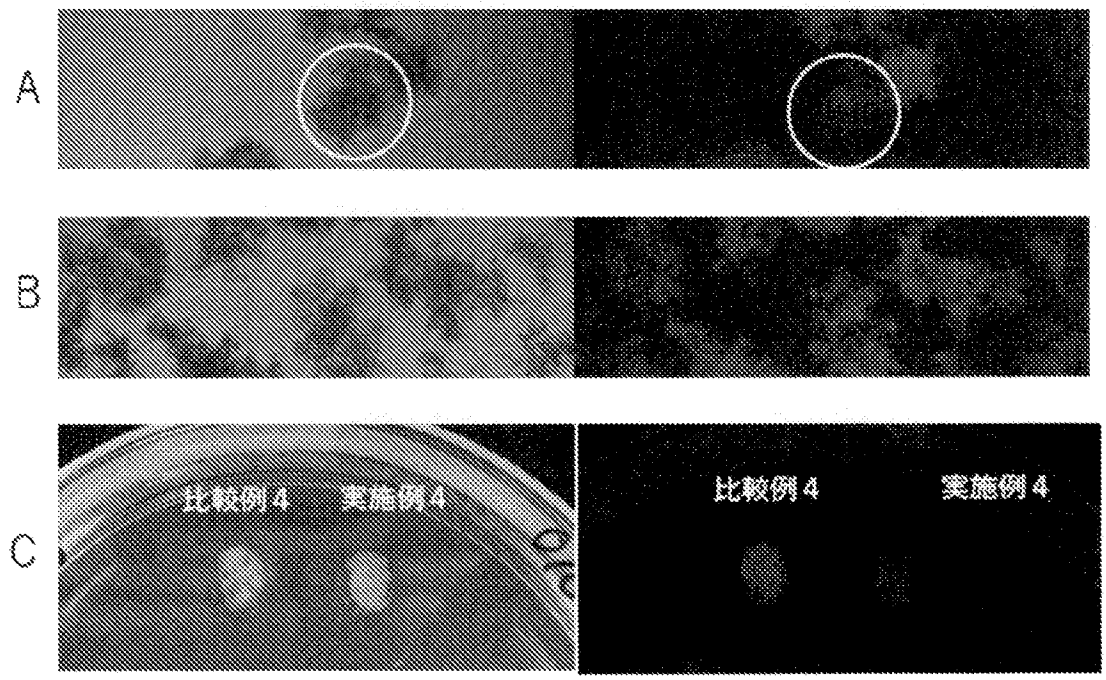
[図6]



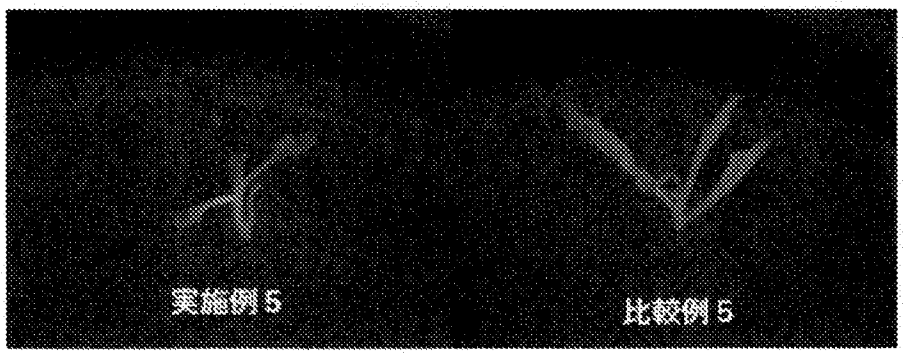
[図7]



[図8]



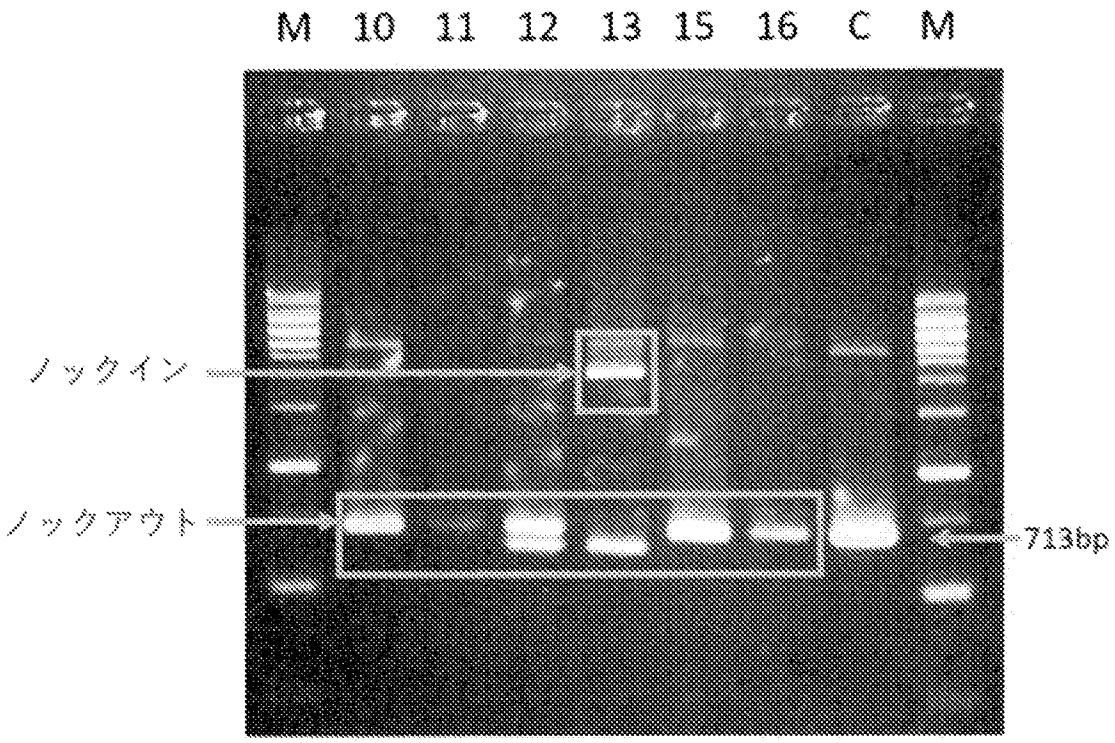
[図9]



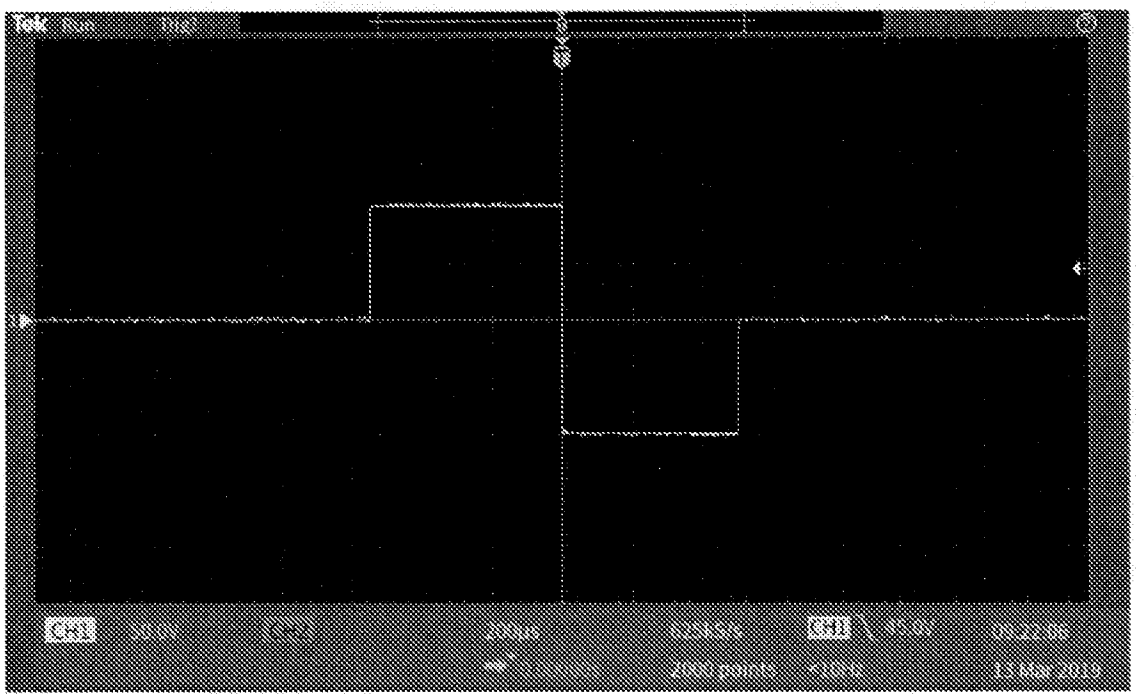
[図10]


NG_PDS_5F
TGTGGGTAACGGCCAAACCACCAC
5'
TGTGGGTAACGGCCAAACCACCACAAATTTTCAGTTCCCACTCTTAACTCTTTCAACTTCAACACAACAAATTAG
3'
ACACCCATTGCCGGTTTGGTGGTGTTTAAAAGTCAAGGGTGAGAATTGAGAAAGTTGAAGTTGTGTTGTTTAATC
TATTTGCTTTTCCTTCTTTGCTTATCTAGTGCATAACGATTTTCTACAACTTTAGCATAGTCCACAACGTGAAAC
ATAAACGAAAAGGAAGAAACGAATAGATCACGTATTGCTAAAAGATGTTGAAATCGTATCAGGTGTTGCACTTTG
ACAACTCCTTGGCGGTTTATACCGAGGTAAGAAATGATTTTGGTTTCTTTGGTTACATCAGCTGAATGCTTTGCT
TGTTGAGGAACCGCCAAATATGGCTCCATTCTTTACTAAAACCAAAGAAACCAATGTAGTCGACTTACGAAACGA
TGAGAAAAGCTCTCTTTTTCCCGTTTAGGATCTTGTTTATTTGCTTTCGTTTTTCTACTCGTTTGAATTTTAACT
ACTCTTTTCGAGAGAAAAAGGGCAAATCCTAGAACAAATAAACGAAAGCAAAAAGATGAGCAAACTTAAAATTGA
TGATTTTGTGGGTGAAGGCTAATTTTTCTCATAGTGTAAGAACAAGTTTCATATGTACTGTAAAAGCTAGAATCT
ACTAAAACACCCACTTCCGATTAAAAAGAGTATCACATTCTTGTTCAAAGTATACATGACATTTTCGATCTTAGA
TTTTTACTTTTGCATATAAATTTGTGTAATAAATGCTTAAGAACCAGAATATTTGAAAAAGATAAGGAATTTTGC
AAAAATGAAAACGTATATTTAAACACATTATTTACGAATTCTTGGTCTTATAAACTTTTTCTATTCCTTAAAACG
ATAGTATTTAGGTTCACAAGTGGGACAATCTTCTTACACTGAAATATCTTTATGTCAGGCTTAATTTACTGCTAT
TATCATAAATCCAAGTGTTCACCCTGTTAGAAGAATGTCACTTTATAGAAATACAGTCCGAATTAAATGACGATA
CTTGTTCAATAAAATGCCCCAAATTGGACTTGTTTCTGCCGTTAATTTGAGAGTCCAAGGTAATTCAGCTTATCT
GAACAAGTTATTTTACGGGGTTTAACCTGAACAAAGACGGCAATTAAACTCTCAGGTTCGATTAAGTCGAATAGA
gRNA_target1
TTGGAGCTCGAGGTCTTCGTTGGGAACTGAAAGTCAAGATGTTTGCTTGCAAAGGAATTTGTTATGTTTTGGTAG
AACCTCGAGCTCCAGAAGCAACCCTTGACTTTCAGTTCTACAAACGAACGTTTCCTTAAACAATACAAAACCATC
gRNA_target2
TAGCGACTCCATGGGGCATAAGTTAAGGATTCGTACTC 3'
713
ATCGCTGAGGTACCCCGTATTCAATTCCTAAGCATGAG 5'
CCGTATTCAATTCCTAAGCATGAG
NG_PDS_3F

[図11]



[図12]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2020/004154

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int. Cl. C12M1/42(2006.01)i, C12N13/00(2006.01)i, C12N15/87(2006.01)i
FI: C12N13/00 ZNA, C12M1/42, C12N15/87 Z

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)
Int. Cl. C12M1/42, C12N13/00, C12N15/87

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 1971-2020
Registered utility model specifications of Japan 1996-2020
Published registered utility model applications of Japan 1994-2020

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/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 2002-516088 A (EVOTEC AG) 04 June 2002, claims, fig. 2B	4, 6 5
Y	JP 2013-198637 A (MORIIZUMI, Toshiyuki) 03 October 2013, paragraph [0003]	5
A	JP 4-27393 A (ISEKI & CO., LTD.) 30 January 1992, entire text	1-6
A	JP 2014-521322 A (QVELLA CORP.) 28 August 2014, entire text	1-6
A	JP 2001-503208 A (GENETRONICS INC.) 06 March 2001, entire text	1-6

☒ 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
03.03.2020	17.03.2020
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2020/004154

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2008-521437 A (MAXCYTE, INC.) 26 June 2008, entire text	1-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2020/004154

Patent Documents referred to in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
JP 2002-516088 A	04.06.2002	WO 1999/061594 A2 claims, fig. 2B EP 1141230 A2 US 6542778 B1	
JP 2013-198637 A	03.10.2013	(Family: none)	
JP 4-27393 A	30.01.1992	(Family: none)	
JP 2014-521322 A	28.08.2014	US 2014/0004501 A1 WO 2013/013304 A1 EP 2737047 A	
JP 2001-503208 A	06.03.2001	US 5869326 A WO 1998/010515 A1 EP 925647 A1 KR 10-2000-0035966 A	
JP 2008-521437 A	26.06.2008	US 2006/0172422 A1 WO 2006/060409 A2 EP 1817406 A2 KR 10-2007-0091163 A	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2020/004154

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12M 1/42(2006.01)i; C12N 13/00(2006.01)i; C12N 15/87(2006.01)i
FI: C12N13/00 ZNA; C12M1/42; C12N15/87 Z

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））

C12M1/42; C12N13/00; C12N15/87

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	１９７１－２０２０年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２０年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２０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/WPIDS (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	JP 2002-516088 A (エボテック バイオシステムズ アーゲー) 04.06.2002 (2002-06-04) 特許請求の範囲、図２Ｂ	4, 6
Y		5
Y	JP 2013-198637 A (森泉 俊幸) 03.10.2013 (2013-10-03) ［０００３］	5
A	JP 4-27393 A (井関農機株式会社) 30.01.1992 (1992-01-30) 全文	1-6
A	JP 2014-521322 A (クヴェッラ コーポレーション) 28.08.2014 (2014-08-28) 全文	1-6
A	JP 2001-503208 A (ジェネトロニクス・インコーポレイテッド) 06.03.2001 (2001-03-06) 全文	1-6
A	JP 2008-521437 A (マックスサイト インコーポレーティッド) 26.06.2008 (2008-06-26) 全文	1-6

☐ 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
03.03.2020	17.03.2020

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）
川合　理恵 4B 4046

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

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/JP2020/004154

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2002-516088 A	04.06.2002	WO 1999/061594 A2 特許請求の範囲、図２Ｂ EP 1141230 A2 US 6542778 B1	
JP 2013-198637 A	03.10.2013	（ファミリーなし）	
JP 4-27393 A	30.01.1992	（ファミリーなし）	
JP 2014-521322 A	28.08.2014	US 2014/0004501 A1 WO 2013/013304 A1 EP 2737047 A	
JP 2001-503208 A	06.03.2001	US 5869326 A WO 1998/010515 A1 EP 925647 A1 KR 10-2000-0035966 A	
JP 2008-521437 A	26.06.2008	US 2006/0172422 A1 WO 2006/060409 A2 EP 1817406 A2 KR 10-2007-0091163 A	