

(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8月25日(25.08.2022)



(10) 国際公開番号

WO 2022/176971 A1

(51) 国際特許分類:  
A01H 1/00 (2006.01) C12N 15/29 (2006.01)  
A01P 5/00 (2006.01) A01H 6/46 (2018.01)  
A01N 65/44 (2009.01) C07K 14/415 (2006.01)  
A01H 5/00 (2018.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2022/006530

(22) 国際出願日: 2022年2月18日(18.02.2022)

(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 2021-024793 2021年2月19日(19.02.2021) JP

(71) 出願人: 国立大学法人 熊本大学 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION KUMAMOTO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒8608555 熊本県熊本市中央区黒髪二丁目39番1号 Kumamoto (JP).

(72) 発明者: 澤進一郎 (SAWA Shinichiro); 〒8608555 熊本県熊本市中央区黒髪二丁目39番1号 国立大学法人熊本大学内 Kumamoto (JP). 春原英彦 (SUNOHARA Hidehiko); 〒8608555 熊本県熊本市中央区黒髪二丁目39番1号 国立大学法人熊本大学内 Kumamoto (JP). 佐藤豊 (SATO Yutaka); 〒4118540 静岡県三島市谷田1111 大学共同利用機関法人情報・システム研究機構 国立遺伝学研究所内 Shizuoka (JP). 土井一行 (DOI Kazuyuki); 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人東海国立大学機構内 Aichi (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人平木国際特許事務所 (HIRAKI & ASSOCIATES); 〒1056232 東京都

港区愛宕二丁目5-1 愛宕グリーンヒルズ  
MORIタワー32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, JM, 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))

(54) Title: PLANT PARASITIC NEMATODE CONTROLLING AGENT

(54) 発明の名称: 植物寄生性センチュウ防除剤

(57) Abstract: Provided is a plant parasitic nematode controlling agent based on a new plant parasitic nematode resistant gene. The plant parasitic nematode controlling agent comprises: (a) an amino acid sequence represented by SEQ ID NO. 1; (b) an amino acid sequence resulting from deletion, substitution, or addition of one or more amino acid residues in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO. 1; or (c) a polypeptide having any one of amino acid sequences indicating an identity of 90% or more with respect to the amino acid sequence represented by SEQ ID NO. 1, or a fragment of said polypeptide.

(57) 要約: 新たな植物寄生性センチュウ抵抗性遺伝子に基づく植物寄生性センチュウ防除剤を提供することである。(a) 配列番号1で示すアミノ酸配列、(b) 配列番号1で示すアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列、又は(c) 配列番号1で示すアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列で示すいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチド又はその断片からなる植物寄生性センチュウ防除剤を提供する。

WO 2022/176971 A1

## 明 細 書

発明の名称：植物寄生性センチュウ防除剤

### 技術分野

[0001] 本発明は、植物寄生性センチュウ防除剤、植物形質転換体、及び植物形質転換体を製造する方法に関する。

### 背景技術

[0002] 植物寄生性センチュウは2,000種を超える植物に寄生すると言われ、宿主範囲が極めて広いことが知られている。宿主となり得る植物には農業上重要な作物が数多く含まれており、その被害額は全世界で1500億ドルに上ることが報告されている。

[0003] 植物寄生性センチュウの中で特に農業被害が大きいセンチュウ種としては、ネコブセンチュウ、ネグサレセンチュウ、及びシストセンチュウの3種類が知られている。例えば、ネコブセンチュウの一種であるサツマイモネコブセンチュウ (*Meloidogyne incognita*) は宿主範囲が広く、農作物を含む世界中の様々な植物へ寄生し、収量低下、品質低下、生育阻害、枯死等の影響が報告されている。食糧生産安定化の観点からも世界中で問題となっており、その対策は急務となっている。

[0004] 植物寄生性センチュウによる農業被害は、一般的に土壌中に隠れた状態で進行するため、制御が困難である。そのため、植物寄生性センチュウに対する有効な防除技術としては、毒性の強い化学物質（殺センチュウ剤）の散布が行われてきた。しかし、殺センチュウ剤のように強い毒性を有する化学物質は土壌汚染を引き起こすことが問題となっている。主要な殺センチュウ剤である臭化メチルは、オゾン層破壊を引き起こすとして2005年以降に使用が禁止されている。したがって、殺センチュウ剤によらない有効なセンチュウ防除技術が求められている。

[0005] 殺センチュウ剤に代わる有力な防除技術として、植物寄生性センチュウに対する抵抗性遺伝子の利用が進められている。トマトでは、サツマイモネコ

ブセンチュウに対する抵抗性遺伝子としてMi-1遺伝子が見出されている（非特許文献1）。Mi-1遺伝子が導入されたトマトは、サツマイモネコブセンチュウに対する強い抵抗性を発揮することから、この遺伝子が導入されたトマトが農業現場に広く普及している。また、トマト由来のMi-1遺伝子を導入したレタスはセンチュウ抵抗性を獲得することも報告されている（非特許文献2）。

[0006] しかしながら、Mi-1遺伝子の適用可能な植物種の範囲は限定的であり、特に単子葉植物では有効なセンチュウ抵抗性遺伝子は知られていない。単子葉植物では、主要な穀物に加えてバナナ、パイナップル、及びサトウキビでも、センチュウによる農業被害が相次いで報告されている。イネでは、ネコブセンチュウの一種であるイネネコブセンチュウ (*Meloidogyne graminicola*) が、アジアにおいて甚大な被害を与えており、イネネコブセンチュウが感染した地域では収穫量が70%程度低下することが報告されている（非特許文献3、4）。

[0007] したがって、植物寄生性センチュウに対する新たな抵抗性遺伝子、及びそれに基づく新たな植物寄生性センチュウ防除剤が必要とされている。

## 先行技術文献

### 非特許文献

- [0008] 非特許文献1: Milligan, S. B., et al., 1998, *Plant Cell*, 10:1307-1319.  
非特許文献2: Zhang, L.-Y., et al., 2010, *Plant Mol Biol Report*, 28:204-211.  
非特許文献3: De Waele, D. and Elsen, A., 2007, *Annu. Rev. Phytopathol.* 45:457-485.  
非特許文献4: Bridge, J., Plowright, R. A., and Peng, D., 2005, *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*, pp.87-130.

## 発明の概要

## 発明が解決しようとする課題

[0009] 本発明の目的は、新たな植物寄生性センチュウ抵抗性遺伝子に基づく植物寄生性センチュウ防除剤を提供することである。

## 課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは、上記課題を解決するために、サツマイモネコブセンチュウに対して罹患性及び抵抗性の2つのイネ品種に着目した。ジャポニカ品種台中65号はサツマイモネコブセンチュウに対して罹患性である一方、インディカ品種Kalo Dhanはサツマイモネコブセンチュウに対して抵抗性である。この2つのイネ品種間でセンチュウ抵抗性の違いをもたらす遺伝子を探索するために、2つのイネ品種を交配親とした組換え自殖系統 (Recombinant inbred line ; RIL) を128系統作製し、RILに基づくQTL解析、及びRILの作出過程で取得された残余ヘテロ接合系統 (Residual heterozygous line ; RHL) を用いたマッピングを行った。その結果、0s04g0112100遺伝子 (本明細書において、R00 T KNOT NEMATODE RESISTANCE 1又はRKNR1と表記する) がイネ品種間でセンチュウ抵抗性の違いをもたらす遺伝子であることを見出した。さらに、Kalo DhanのRKNR1遺伝子をセンチュウ罹患性品種である日本晴に導入して形質転換株を作製した結果、センチュウ抵抗性が得られることを見出し、本発明を完成させるに至った。本発明は、上記知見に基づくものであって以下を提供する。

[0011] (1) 以下の (a) ~ (c) で示すいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチド又はその断片からなる植物寄生性センチュウ防除剤。

(a) 配列番号1で示すアミノ酸配列、

(b) 配列番号1で示すアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列、又は

(c) 配列番号1で示すアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列

(2) (1) に記載のポリペプチド又はその断片をコードするポリヌクレオチドを含む、植物寄生性センチュウ防除剤。

(3) 前記ポリヌクレオチドが以下の (a) ~ (d) で示すいずれかの塩基配列を含む、(2) に記載の植物寄生性センチュウ防除剤。

(a) 配列番号 2 で示す塩基配列、

(b) 配列番号 2 で示す塩基配列において 1 若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列、

(c) 配列番号 2 で示す塩基配列と 90% 以上の同一性を有する塩基配列、又は

(d) 配列番号 2 で示す塩基配列に相補的な塩基配列と高ストリンジェントな条件でハイブリダイズする塩基配列

(4) (2) 又は (3) に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクターを含む、植物寄生性センチュウ防除剤。

(5) 前記植物寄生性センチュウがネコブセンチュウである、(1) ~ (4) のいずれかに記載の植物寄生性センチュウ防除剤。

(6) 前記ネコブセンチュウが、イネネコブセンチュウ、サツマイモネコブセンチュウ、キタネコブセンチュウ、及びジャワネコブセンチュウからなる群から選択される、(5) に記載の植物寄生性センチュウ防除剤。

(7) (2) 若しくは (3) に記載のポリヌクレオチド、又は (4) に記載の発現ベクターを含む、植物寄生性センチュウに対して抵抗性を有する植物形質転換体、又は前記ポリヌクレオチド若しくは前記発現ベクターを保持したその後代。

(8) 単子葉植物である、(7) に記載の植物形質転換体又はその後代。

(9) 単子葉植物がイネ科植物である、(8) に記載の植物形質転換体又はその後代。

(10) 前記イネ科植物が、イネ、コムギ、オオムギ、ライムギ、トウモロコシ、サトウキビ、アワ、キビ、ヒエ、及びソルガムからなる群から選択される、(9) に記載の植物形質転換体又はその後代。

(11) 遺伝子組換え体である、(7) ~ (10) のいずれかに記載の植物形質転換体又はその後代。

(12) 植物寄生性センチュウに対して抵抗性を有する植物形質転換体を製造する方法であって、(4)に記載の発現ベクターを植物に導入する工程、及び前記発現ベクターが導入された植物を選択する工程を含む、方法。

本明細書は本願の優先権の基礎となる日本国特許出願番号2021-024793号の開示内容を包含する。

## 発明の効果

[0012] 本発明によれば、新たな植物寄生性センチュウ抵抗性遺伝子に基づく植物寄生性センチュウ防除剤を提供することができる。

## 図面の簡単な説明

[0013] [図1]77種類のイネ品種、及びRKNR1形質転換株のサツマイモネコブセンチュウ抵抗性を評価した結果を示す図である。評価値 (Evaluation value ; EV) が低いほど、センチュウに対して抵抗性が高いことを示す。グラフ下に示す「S type」及び「L type」は、それぞれS型及びL型のRKNR1遺伝子を有する品種であることを示す。エラーバーは標準誤差を示す。

[図2]S型及びL型のRKNR1遺伝子を有するイネ品種、及びRKNR1形質転換株のサツマイモネコブセンチュウ抵抗性を評価した結果を示す図である。エラーバーは標準誤差を示す。

[図3]T65とKalo Dhanのサツマイモネコブセンチュウ抵抗性を比較した結果を示す図である。(A) サツマイモネコブセンチュウに対するイネ根尖部の誘引活性を測定した結果を示す。\*は $P < 0.05$  (ステューデントt検定)を示す。

(B) サツマイモネコブセンチュウのイネ根尖部への移行個体数を測定した結果を示す図である。(C) サツマイモネコブセンチュウによって誘導された瘤のサイズ (gall width) を、非瘤領域の幅 (左側のパネルにおける実線の長さ) と瘤領域の幅 (点線の長さ) との比率 (相対瘤幅) として評価した結果を示す図である。(D) 根部内に侵入したセンチュウの体幅に基づいてセンチュウの成長速度を評価した結果を示す図である。エラーバーは標準誤差を示す。

[図4]サツマイモネコブセンチュウによって根部内で誘導された巨大細胞を示

す図である。(A) センチュウ接種後7日目のT65における巨大細胞を示す図である。スケールバーは $100\mu\text{m}$ を示す。(B) センチュウ接種後21日目のT65における巨大細胞を示す図である。スケールバーは $100\mu\text{m}$ を示す。(C) センチュウ接種後7日目のKalo Dhanにおける巨大細胞を示す図である。スケールバーは $100\mu\text{m}$  (左側のパネル) 及び $50\mu\text{m}$  (右側のパネル) を示す。(D) センチュウ接種後21日目のKalo Dhanにおける巨大細胞を示す図である。スケールバーは $100\mu\text{m}$  (左側のパネル) 及び $50\mu\text{m}$  (右側のパネル) を示す。図中の「N」はセンチュウを示す。

[図5] サツマイモネコブセンチュウ抵抗性に関するQTL解析の結果を示す図である。(A) 第4染色体上のqRKNR1及び第6染色体上のqRKNR2が主要なQTLとして見出された結果を示す図である。(B) S4-693908及びS6-25039213の遺伝子型 (T65型又はKalo Dhan型) に基づいてRILを4つの群に分類し、各群についてRILの評価値をプロットした図である。S4-693908及びS6-25039213は、それぞれqRKNR1及びqRKNR2を示すピークに最も近いマーカーとして使用した。

[図6] 第4染色体上でqRKNR1がマッピングされた領域を示す図である。サツマイモネコブセンチュウ抵抗性遺伝子は、IDK0401とIDK0405の間の1.3Mb領域 (両矢印で示す領域) にマッピングされた。\*\*は $P<0.01$  (ステューデントt検定) を示す。エラーバーは標準誤差を示す。

[図7] 日本晴 (Nipponbare)、T65、N22、Kalo Dhan、Bei Khe、Naba、及び赤毛 (Akage) におけるRKNR1遺伝子の構造を示す図である。

## 発明を実施するための形態

### [0014] 1. 植物寄生性センチュウ防除剤

#### 1-1. 概要

本発明の第1の態様は、植物寄生性センチュウ防除剤である。本発明の植物寄生性センチュウ防除剤は、センチュウ抵抗性のRKNR1ポリペプチド若しくはその断片からなるか、又はそのいずれかをコードするポリヌクレオチド若しくはそれを含む発現ベクターを含む。本発明の植物寄生性センチュウ防除剤は、植物寄生性センチュウに対して防除効果を有する。

## [0015] 1 - 2. 用語の定義

本明細書において「植物寄生性センチュウ」は、植物に寄生し得るセンチュウであれば特に限定しない。植物寄生性センチュウとして、ネコブセンチュウ (Root-knot nematode ; Meloidogyne)、ネグサレセンチュウ (Pratylenchus)、シストセンチュウ (シストセンチュウには、Afenestrata、Cactodera、Dolichodera、Globodera、Heterodera、及びPunctoderaの6つの属が知られている)、ハセンチュウ (Aphelenchoides)、クキセンチュウ (Ditylenchus) 等が知られている。本発明の防除対象となる植物寄生性センチュウは、好ましくはネコブセンチュウである。

[0016] ネコブセンチュウは、植物の根に寄生して植物細胞の原形質から栄養をとり、植物の根に瘤を形成する。ネコブセンチュウの幼虫は、卵の中で1回脱皮し、第2期 (J2) 幼虫となってから孵化する。第2期幼虫は土壤中を移動し、植物の根の根尖部付近から組織内に侵入し、維管束付近に定着して養分を摂取した後、2回目の脱皮を行って成虫となる。成虫の体長はおよそ0.5~1mmであり、雌成虫は卵嚢を排出し、その中に約400~1500個の卵を産卵する。ネコブセンチュウに属する種としては、例えばジャワネコブセンチュウ (Meloidogyne javanica)、サツマイモネコブセンチュウ (Meloidogyne incognita ; 本明細書ではしばしば「Mi」と表記する)、キタネコブセンチュウ (Meloidogyne hapla)、リンゴネコブセンチュウ (Meloidogyne mali)、及びアレナリアネコブセンチュウ (Meloidogyne arenaria) が挙げられる。

[0017] ネグサレセンチュウに属する種としては、例えばキタネグサレセンチュウ (Pratylenchus penetrans)、ミナミネグサレセンチュウ (Pratylenchus coffeae)、ムギネグサレセンチュウ (Pratylenchus neglectus)、ノコギリネグサレセンチュウ (Pratylenchus crenatus)、クルミネグサレセンチュウ (Pratylenchus vulnus)、及びチャネグサレセンチュウ (Pratylenchus loosi) が挙げられる。

[0018] シストセンチュウに属する種としては、例えばジャガイモシストセンチュウ (Globodera rostochiensis)、ダイズシストセンチュウ (Heterodera gly

cines)、及びクローバーシストセンチュウ (*Heterodera trifolii*) が挙げられる。

[0019] ハセンチュウに属する種としては、例えばハガレセンチュウ (*Aphelenchoides ritzemabosi*)、イチゴセンチュウ (*Aphelenchoides fragariae*)、及びイネシンガレセンチュウ (*Aphelenchoides besseyi*) が挙げられる。

[0020] クキセンチュウに属する種としては、例えばイモグサレセンチュウ (*Ditylenchus destructor*)、及びナミクキセンチュウ (*Ditylenchus dipsaci*) が挙げられる。

[0021] 本明細書において植物は、植物寄生性センチュウが寄生し得る植物種であれば特に制限はされず、被子植物又は裸子植物のいずれであってもよい。また、被子植物には、双子葉類又は単子葉類植物のいずれも包含される。代表的なものとしては、農業上、特に種苗産業及び花卉園芸産業上、重要な植物、例えば、穀類、花、野菜、果物等の作物植物が挙げられる。具体的には、単子葉類植物であれば、イネ科に属する種 (例えば、イネ、コムギ、オオムギ、ライムギ、トウモロコシ、サトウキビ、アワ、キビ、ヒエ、ソルガム、コウリヤン)、バショウ科に属する種 (例えば、バナナ、バショウ)、又はパイナップル科 (例えば、パイナップル) が該当する。双子葉類植物であれば、アブラナ科に属する種 (例えば、キャベツ、ダイコン、ハクサイ、アブラナ)、マメ科に属する種 (例えば、ダイズ、ピーナッツ、エンドウ、インゲンマメ、アズキ、ソラマメ、スイートピー)、ナス科に属する種 (例えば、トマト、ナス、ジャガイモ、タバコ、ピーマン、トウガラシ、ペチュニア)、ヒルガオ科に属する種 (例えば、サツマイモ、ヨウサイ)、バラ科に属する種 (例えば、イチゴ、バラ、リンゴ、ナシ、モモ、ビワ、アーモンド、スモモ、ウメ、サクラ)、ラン科に属する種 (例えば、シンビジウム、ファレノプシス、カトレア、デンドロビウム)、ユリ科に属する種 (例えば、ユリ、チューリップ、ヒアシンス、ムスカリ、ネギ、タマネギ、ニンニク)、ミカン科 (例えば、ミカン、オレンジ、グレープフルーツ、レモン、ユズ)、ブドウ科に属する種 (例えば、ブドウ)、キク科に属する種 (例えば、レ

タス、キク、ダリア、マーガレット、ヒマワリ)、ナデシコ科に属する種(例えば、カーネーション、カスミソウ)、ツバキ科に属する種(例えば、サザンカ、チャノキ)が該当する。ネコブセンチュウは2,000種を超える植物に寄生(感染)することが報告されており、センチュウ種により寄生する宿主に違いはあるものの、ナス科、イネ科、アブラナ科、マメ科、ウリ化、ヒルガオ科、ユリ科、キク科、アカザ科、セリ科、サトイモ科、ショウガ科、アオイ科等の幅広い宿主範囲を有し、様々な農作物に寄生して植物病害をもたらす。ネコブセンチュウの宿主植物種の一例としては、トマト、ピーマン、ウリ、バレイショ、サツマイモ、ナス、ニンジン、ゴボウ、ホウレンソウ、フダンソウ、シュンギク、ネギ類、ショウガ、エンドウ、インゲンマメ、ササゲ、イネ等が挙げられる。

[0022] イネの栽培品種は、アジアイネ (*Oryza sativa*) とアフリカイネ (*Oryza glaberrima*) に分類される。アジアイネはインディカ (*Indica*) 及びジャポニカ (*Japonica*) の2種類の亜種に分類され、ジャポニカは温帯ジャポニカ (表1において「Temperate japonica」として示す) と熱帯ジャポニカ (表1において「Tropical japonica」として示す) に分類される。温帯ジャポニカに属する品種としては、例えば、台中65号 (Taichung65 ; T65)、日本晴 (Nipponbare)、金南風 (Kinmaze)、ヒノヒカリ (Hino Hikari)、ゆきひかり (Yukihikari)、愛国 (Aikoku)、亀治 (Kameji)、京都旭 (Kyoutoasahi)、赤毛 (Akage)、Dianyu1等が挙げられる。熱帯ジャポニカに属する品種としては、例えば、Ma Sho、Khao Nok、Jaguary、Khau Mac Kho、Padi Perak、Rexmont、Senshou、Kahei等が挙げられる。インディカはインディカ (表1において「Indica」として示す) とアウス (表1において「Aus」として示す) に分類できる。インディカに属する品種としては、例えば、Bei Khe、Naba、Puluk Arang、Ryou Suisan Koumai、Jinguoyin、Keiboba、Qingyu、Deng Pao Zhai、Milyang23、Karahoushi等が挙げられる。アウスに属する品種としては、Kasalath、Jena035、Muha、Jhona2、Nepal8、Jarjan、Kalo Dhan、Anjana Dhan、Shoni、Surjamukhi、ARC7291、ARC5955、ARC7047、ARC11094、Badari Dh

an, Nepal555, Kaluheenati, DV85, ARC10313, N22等が挙げられる。また、ネリカ (Nerica) はアジアイネとアフリカイネの間の交雑種である。ネリカに属する品種としては、NERICA 1、NERICA 2、NERICA 4、NERICA 6、NERICA L20、NERICA L41等が挙げられる（表1では、ネリカ品種を含むネリカ関連品種を「NERICA related」として示す）。上記のいずれのグループにも分類されない交雑種（表1において「Admixture」として示す）としては、Davao1、Asu、IR58、Co13、Vary Futsi、Shwe Nang Gyi、Pinulupot1、Local Basmati、Basilanon、Khou Tan Chiem、Tima1、Tupa729等が挙げられる。また、分類不明の品種（表1において「Unknown」として示す）として、Basmati370、IRAT109、LTH、IR24、Kinandang Patong、Silewah等が挙げられる。イネの栽培品種の分類方法については、Kojima et al., 2005, Breeding Science, 55, 431-440及びYonemaru et al., 2014, Plant Cell Physiol., 55 (1), e9を参照することができる。

[0023] イネ品種は、植物寄生性センチュウ罹患性の品種及び植物寄生性センチュウ抵抗性の品種に分類することができる。例えば、本明細書の実施例に記載の評価方法を用いて評価値 (Evaluation value; EV) を算出し、評価値が特定の値以上のイネ品種をセンチュウ罹患性の品種、評価値が特定の値未満のイネ品種をセンチュウ抵抗性の品種に分類することができる。

[0024] 本明細書において「植物寄生性センチュウ抵抗性」とは、植物寄生性センチュウによる宿主植物への加害及び／又は寄生（感染）を防止又は抑制する作用をいう。ネコブセンチュウ等の植物寄生性センチュウに対する植物の抵抗性は、当業者に公知の方法を用いて検査することができる。例えば、被験植物に一定数（例えば、200匹）のネコブセンチュウJ2幼虫をその培養土に接種し、一定期間後（例えば2か月後）に感染状態の評価を行う。評価は、植物体の根における瘤の数、及び／又はネコブセンチュウの卵塊数を計数することが好ましい。瘤の数は、目視により計数することができる。

[0025] 本明細書において「植物寄生性センチュウ防除」とは、植物寄生性センチュウの宿主植物への加害及び／又は寄生（感染）を防止又は抑制する作用を

いう。

- [0026] 本明細書において「RKNR1 (ROOT KNOT NEMATODE RESISTANCE 1) 遺伝子」とは、イネにおいて植物寄生性センチュウに対する抵抗性に関連する日本晴ゲノム上の0s04g0112100遺伝子、任意のイネ品種において0s04g0112100遺伝子に対応するオルソログ遺伝子、任意の植物種において0s04g0112100遺伝子に対応するオルソログ遺伝子、又はそのいずれかに由来する変異型遺伝子をいう。本明細書において単に「RKNR1遺伝子」というとき、任意の生物種に由来する野生型及び変異型のRKNR1遺伝子（それぞれ「野生型RKNR1遺伝子」及び「変異型RKNR1遺伝子」と表記する）が含まれ、また後述のL型RKNR1遺伝子及びS型RKNR1遺伝子が含まれるものとする。
- [0027] イネ品種間ではRKNR1遺伝子配列に差異がある場合がある。例えば、RKNR1遺伝子のORFにおいて、日本晴及びT65に見出されるRKNR1アミノ酸配列中のNB-ARCドメインの中央部分からLRRドメインのC末端側付近に至る1754bpの配列領域の有無が、イネ品種間で異なる。本明細書では、当該1754bp領域の有無によって、イネRKNR1遺伝子をS型RKNR1遺伝子とL型RKNR1遺伝子に分類する。すなわち、S型RKNR1遺伝子では、L型RKNR1遺伝子と比較して1754bp領域が欠失している（L型RKNR1遺伝子では、S型RKNR1遺伝子と比較して1754bp領域が挿入されている）。
- [0028] S型RKNR1遺伝子の例としては、温帯ジャポニカの一部の品種（例えば、T65、日本晴、金南風、ヒノヒカリ、ゆきひかり、愛国、亀治、京都旭、及びDianyu1）のRKNR1遺伝子等が挙げられる。S型RKNR1遺伝子の塩基配列の例として、配列番号3（T65）及び配列番号4（日本晴）が挙げられる。
- [0029] L型RKNR1遺伝子の例としては、温帯ジャポニカに属する一部の品種（例えば、赤毛及び銀坊主）、並びにインディカ、熱帯ジャポニカ、アウス、及びネリカに属する品種のRKNR1遺伝子が挙げられる。L型RKNR1遺伝子の塩基配列の例として、配列番号2（N22及びKalo Dhan）、配列番号5（Naba）、配列番号6（Bei Khe）、及び配列番号7（赤毛）が挙げられる。なお、RKNR1遺伝子の塩基配列はN22とKalo Dhanとの間で100%同一であり、いずれも配列番

号2で示される。

[0030] 本明細書において「RKNR1ポリペプチド」とは、イネにおいて植物寄生性センチュウに対する抵抗性に関連する日本晴ゲノム上の0s04g0112100遺伝子にコードされるポリペプチド（すなわちRKNR1遺伝子にコードされるポリペプチド）、任意のイネ品種においてそれに対応するオルソログ、任意の植物種においてそれに対応するオルソログ、又はそのいずれかに由来する変異型ポリペプチドをいう。本明細書において単に「RKNR1ポリペプチド」というとき、任意の生物種に由来する野生型及び変異型のRKNR1ポリペプチド（それぞれ「野生型RKNR1ポリペプチド」及び「変異型RKNR1ポリペプチド」と表記する）が含まれ、また後述のL型RKNR1ポリペプチド及びS型RKNR1ポリペプチドが含まれるものとする。

[0031] イネの野生型RKNR1ポリペプチドは、S型RKNR1遺伝子にコードされるS型RKNR1ポリペプチド、及びL型RKNR1遺伝子にコードされるL型RKNR1ポリペプチドに分類される。Bei Khe及びNaba以外のイネ品種では、L型RKNR1ポリペプチドは、ヌクレオチド結合ドメイン（NB-ARCドメイン）及び7つのロイシンリッチリピート（LRR）ドメインを有するNB-LRRタンパク質である。これに対して、S型RKNR1ポリペプチドは、L型RKNR1ポリペプチドにおいてヌクレオチド結合ドメインの一部とLRRドメインの大部分を欠失するポリペプチドである。なお、Bei Khe及びNabaのRKNR1ポリペプチドは、その遺伝子配列において1754bp領域が欠失していないため、L型RKNR1ポリペプチドに分類されるが、フレームシフトによって生じる終止コドンによってアミノ酸長の短いタンパク質となる。S型RKNR1ポリペプチドのアミノ酸配列の例としては、配列番号8（T65）及び配列番号9（日本晴）が挙げられる。L型RKNR1ポリペプチドのアミノ酸配列の例として、配列番号1（N22及びKalo Dhan）、配列番号10（Naba）、配列番号11（Bei Khe）、及び配列番号12（赤毛）が挙げられる。なお、RKNR1ポリペプチドのアミノ酸配列はKalo DhanとN22との間で100%同一であり、いずれも配列番号1で示される。

[0032] 本明細書において植物体の「全部」とは、生きている植物体を構成する全

領域をいう。また、植物体の「一部」とは、生きている植物体を構成する一部領域、具体的には、器官（例えば、根部、莖部、葉部、花部、表皮、若しくはそれらの組み合わせ、又は花粉、卵細胞若しくは種子等を含む）、形態的及び／又は機能的に分化した細胞群からなる組織若しくはその一部、又は細胞をいう。

[0033] 本明細書において「複数個」とは、例えば、2～100個、2～90個、2～80個、2～70個、2～60個、2～50個、2～40個、2～30個、2～20個、2～15個、2～10個、2～7個、2～5個、2～4個又は2～3個をいう。また、「アミノ酸同一性」とは、比較する2つのポリペプチドのアミノ酸配列において、アミノ酸残基の一致数が最大となるように、必要に応じて一方又は双方に適宜ギャップを挿入して整列化（アラインメント）したときに、全アミノ酸残基数における一致アミノ酸残基数の割合（%）をいう。アミノ酸同一性を算出するための2つのアミノ酸配列の整列化は、Blast、FASTA、ClustalW等の既知プログラムを用いて行うことができる。「塩基同一性」も同様に計算される。

[0034] 本明細書において「(アミノ酸の)置換」とは、天然のタンパク質を構成する20種類のアミノ酸間において、電荷、側鎖、極性、芳香族性等の性質の類似する保存的アミノ酸群内での置換をいう。例えば、低極性側鎖を有する無電荷極性アミノ酸群（Gly, Asn, Gln, Ser, Thr, Cys, Tyr）、分枝鎖アミノ酸群（Leu, Val, Ile）、中性アミノ酸群（Gly, Ile, Val, Leu, Ala, Met, Pro）、親水性側鎖を有する中性アミノ酸群（Asn, Gln, Thr, Ser, Tyr, Cys）、酸性アミノ酸群（Asp, Glu）、塩基性アミノ酸群（Arg, Lys, His）、芳香族アミノ酸群（Phe, Tyr, Trp）内での置換が挙げられる。これらの群内でのアミノ酸置換であれば、ポリペプチドの性質に変化を生じにくいことが知られているため好ましい。

[0035] 本明細書において「ストリンジентな条件」とは、非特異的なハイブリッドが形成されにくい条件を意味する。「高ストリンジентな条件」とは、非特異的なハイブリッドがより形成されにくい、又は形成されない条件をいう。一般に、反応条件が低塩濃度で、かつ高温になるほど高ストリンジエ

ントな条件となる。ハイブリダイゼーション後の洗浄において、例えば50℃～70℃、55℃～68℃、又は65℃～68℃で、0.1×SSC及び0.1%SDSで洗浄する条件である。この他、プローブ濃度、プローブ塩基長、ハイブリダイゼーション時間等のその他の条件を適宜組み合わせてハイブリダイゼーションのストリンジエンシーを高くすることもできる。

[0036] 1-3. 構成

本発明の植物寄生性センチュウ防除剤は、有効成分として、(1)植物寄生性センチュウ抵抗性のRKNR1ポリペプチド若しくはその断片からなるか、(2)植物寄生性センチュウ抵抗性のRKNR1ポリペプチド又はその断片をコードするポリヌクレオチドを含むか、又は(3)植物寄生性センチュウ抵抗性のRKNR1ポリペプチド又はその断片をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを含む。

[0037] 1-3-1. 有効成分

(1)植物寄生性センチュウ抵抗性のRKNR1ポリペプチド若しくはその断片  
一実施形態において、本発明の植物寄生性センチュウ防除剤は、植物寄生性センチュウ抵抗性のRKNR1ポリペプチド若しくはその断片からなる、又はそれを含む。

[0038] 本明細書において「植物寄生性センチュウ抵抗性のRKNR1ポリペプチド」とは、宿主植物に植物寄生性センチュウに対する抵抗性を付与する、及び／又は宿主植物の植物寄生性センチュウに対する抵抗性を増強するRKNR1ポリペプチドであって、植物寄生性センチュウ抵抗性の植物に由来する野生型又は変異型のRKNR1ポリペプチドをいう。

[0039] 植物寄生性センチュウ抵抗性の野生型RKNR1ポリペプチドとしては、Bei Khe、Naba、及び赤毛 (Akage) のRKNR1ポリペプチド以外のL型RKNR1ポリペプチドが挙げられる。Bei Khe、Naba、及び赤毛 (Akage) のRKNR1ポリペプチド以外のL型RKNR1ポリペプチドの例としては、配列番号1で示すN22の野生型RKNR1ポリペプチド、配列番号1で示すKalo Dhanの野生型RKNR1ポリペプチド、及びそれらの他のイネ品種又は他植物種の野生型RKNR1オルソログが挙げられる

。例えば、Ma Shoの野生型RKNR1ポリペプチド、Khao Nokの野生型RKNR1ポリペプチド、Jaguaryの野生型RKNR1ポリペプチド、Khau Mac Khoの野生型RKNR1ポリペプチド、Padi Perakの野生型RKNR1ポリペプチド、Rexmontの野生型RKNR1ポリペプチド、Senshouの野生型RKNR1ポリペプチド、Kaheiの野生型RKNR1ポリペプチド、Puluik Arangの野生型RKNR1ポリペプチド、Ryou Suisan Koumaiの野生型RKNR1ポリペプチド、Jinguoyinの野生型RKNR1ポリペプチド、Keibobaの野生型RKNR1ポリペプチド、Qingyuの野生型RKNR1ポリペプチド、Deng Pao Zhaiの野生型RKNR1ポリペプチド、Milyang23の野生型RKNR1ポリペプチド、Karahoushiの野生型RKNR1ポリペプチド、Kasalathの野生型RKNR1ポリペプチド、Jena035の野生型RKNR1ポリペプチド、Muhaの野生型RKNR1ポリペプチド、Jhona2の野生型RKNR1ポリペプチド、Nepal8の野生型RKNR1ポリペプチド、Jarjanの野生型RKNR1ポリペプチド、Anjana Dhanの野生型RKNR1ポリペプチド、Shoniの野生型RKNR1ポリペプチド、Surjamukhiの野生型RKNR1ポリペプチド、ARC7291の野生型RKNR1ポリペプチド、ARC5955の野生型RKNR1ポリペプチド、ARC7047の野生型RKNR1ポリペプチド、ARC11094の野生型RKNR1ポリペプチド、Badari Dhanの野生型RKNR1ポリペプチド、Nepal555の野生型RKNR1ポリペプチド、Kaluheenatiの野生型RKNR1ポリペプチド、DV85の野生型RKNR1ポリペプチド、ARC10313の野生型RKNR1ポリペプチド、WAB56-50の野生型RKNR1ポリペプチド、WAB56-104の野生型RKNR1ポリペプチド、NERICA 1の野生型RKNR1ポリペプチド、NERICA 2の野生型RKNR1ポリペプチド、NERICA 4の野生型RKNR1ポリペプチド、NERICA 6の野生型RKNR1ポリペプチド、NERICA L20の野生型RKNR1ポリペプチド、NERICA L41の野生型RKNR1ポリペプチド、CG14の野生型RKNR1ポリペプチド、WK18の野生型RKNR1ポリペプチド、Davao1の野生型RKNR1ポリペプチド、Asuの野生型RKNR1ポリペプチド、IR58の野生型RKNR1ポリペプチド、Co13の野生型RKNR1ポリペプチド、Vary Futsiの野生型RKNR1ポリペプチド、Shwe Nang Gyiの野生型RKNR1ポリペプチド、Pinulupot1の野生型RKNR1ポリペプチド、Local Basmatiの野生型RKNR1ポリペプチド、Basilanonの野生型RKNR1ポリペプチド、Khau Tan Chiemの野生型RKNR1ポリペプチド、Tima1の野

生型RKNR1ポリペプチド、Tupa729の野生型RKNR1ポリペプチド、Basmati370の野生型RKNR1ポリペプチド、IRAT109の野生型RKNR1ポリペプチド、LTHの野生型RKNR1ポリペプチド、IR24の野生型RKNR1ポリペプチド、Kinandang Patongの野生型RKNR1ポリペプチド、及びSilewahの野生型RKNR1ポリペプチドが該当する。

[0040] 植物寄生性センチュウ抵抗性の変異型RKNR1ポリペプチドとしては、上記いずれかの植物寄生性センチュウ抵抗性の野生型RKNR1ポリペプチドのアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列、又は、上記いずれかの植物寄生性センチュウ抵抗性の野生型RKNR1ポリペプチドのアミノ酸配列と60%以上、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、82%以上、85%以上、87%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、又は99%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドが挙げられる。例えば、配列番号1で示すアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列、又は、配列番号1で示すアミノ酸配列と60%以上、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、82%以上、85%以上、87%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、又は99%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドが挙げられる。植物寄生性センチュウ抵抗性の変異型RKNR1ポリペプチドは、植物寄生性センチュウ抵抗性の野生型RKNR1ポリペプチドの50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、若しくは90%以上の活性、又はそれと同等以上の活性を有するものが好ましい。

[0041] 一実施形態において、植物寄生性センチュウ抵抗性の変異型RKNR1ポリペプチドは、配列番号12で示すアミノ酸配列における315位がGly以外のアミノ酸残基（例えばAsp）であり、配列番号12で示すアミノ酸配列における505位がAsp以外のアミノ酸残基（例えばGlu）であり、配列番号12で示すアミノ酸配列における745位がVal以外のアミノ酸残基（例えばAla）であり、及び／又は配列番号12で示すアミノ酸配列における1040位がGln以外のアミノ酸

残基（例えばLeu）である。植物寄生性センチュウ抵抗性の変異型RKNR1ポリペプチドは、好ましくは配列番号12で示すアミノ酸配列における1040位がGln以外のアミノ酸残基（例えばLeu）である。

[0042] 一実施形態において、植物寄生性センチュウ抵抗性のRKNR1ポリペプチドは、（a）配列番号1で示すアミノ酸配列、（b）配列番号1で示すアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列、又は（c）配列番号1で示すアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列のいずれかを含むポリペプチド又はその断片からなる。

[0043] 本明細書において植物寄生性センチュウ抵抗性のRKNR1ポリペプチドの「断片」とは、上記の植物寄生性センチュウ抵抗性のRKNR1ポリペプチドにおいて、植物寄生性センチュウに対する抵抗性を宿主植物に付与する、及び／又は宿主植物の植物寄生性センチュウに対する抵抗性を増強する活性を有する断片、例えば植物寄生性センチュウ抵抗性のRKNR1ポリペプチドの活性の50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、若しくは90%以上の活性、又はそれと同等以上の活性を有する断片をいう。例えば、植物寄生性センチュウ抵抗性のRKNR1ポリペプチドにおいてLRRドメインを含むポリペプチド断片が挙げられる。本断片を構成するポリペプチドのアミノ酸長は、特に限定しないが、例えば、植物寄生性センチュウ抵抗性のRKNR1ポリペプチドにおいて、少なくとも50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、又は1000アミノ酸の連続する領域であればよい。

[0044] （2）植物寄生性センチュウ抵抗性のRKNR1ポリペプチド又はその断片をコードするポリヌクレオチド

一実施形態において、本発明の植物寄生性センチュウ防除剤は、植物寄生性センチュウ抵抗性のRKNR1ポリペプチド又はその断片をコードするポリヌクレオチドを含む、又はそれからなる。

[0045] 本発明のポリヌクレオチドは、上記の植物寄生性センチュウ抵抗性のRKNR1

ポリペプチド若しくはその断片をコードする。本発明のポリヌクレオチドは、植物寄生性センチュウ抵抗性のRKNR1ポリペプチド又はその断片をコードするポリヌクレオチドであれば、その塩基配列は特に限定しない。例えば、配列番号1で示すアミノ酸配列からなるN22の野生型RKNR1ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、N22の野生型RKNR1遺伝子であって、配列番号2で示す塩基配列からなるポリヌクレオチド）、又は配列番号1で示すアミノ酸配列からなるKalo DhanのRKNR1ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、Kalo Dhanの野生型RKNR1遺伝子であって、配列番号2で示す塩基配列からなるポリヌクレオチド）である。

[0046] 一実施形態において、本発明のポリヌクレオチドは、（a）配列番号2で示す塩基配列、（b）配列番号2で示す塩基配列において1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列、（c）配列番号2で示す塩基配列と60%以上、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、82%以上、85%以上、87%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、又は99%以上の同一性を有する塩基配列、又は（d）配列番号2で示す塩基配列に相補的な塩基配列と高ストリンジентな条件でハイブリダイズする塩基配列のいずれかを含む。

[0047] 一実施形態において、本発明のポリヌクレオチドの塩基配列は、当該ポリヌクレオチドが導入される細胞におけるコドン使用頻度に合わせてコドン最適化した塩基配列であってもよい。

[0048] 本発明のポリヌクレオチドは、DNA、又はmRNA等のRNAであってもよい。

本発明のポリヌクレオチドがmRNAである場合、その塩基配列は、上で例示したいずれかの塩基配列においてチミン（T）をウラシル（U）に置換した塩基配列をコーディング領域として含むmRNAとすることができる。本発明のポリヌクレオチドに該当するmRNAは、前記コーディング領域に加えて、5'末端のキャップ構造、3'末端のポリA鎖、開始コドン上流の5'非翻訳領域（5' UTR）、及び／又は終止コドン下流の3'非翻訳領域（3' UTR）等を含んでもよ

い。5' UTR及び／又は3' UTR等には、mRNAからの翻訳量を調節するための配列が含まれていてもよい。

[0049] (3) 植物寄生性センチュウ抵抗性のRKNR1ポリペプチド又はその断片をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクター

一実施形態において、本発明の植物寄生性センチュウ防除剤は、植物寄生性センチュウ抵抗性のRKNR1ポリペプチド又はその断片をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを含む、又はそれからなる。

[0050] 本発明の発現ベクターは、本発明の植物寄生性センチュウ抵抗性のRKNR1ポリペプチド又はその断片をコードするポリヌクレオチドを発現可能な状態を含む。本明細書において「発現可能な状態」とは、プロモーターの制御下にあるプロモーター下流域に、発現すべき遺伝子を配置していることをいう。

[0051] 本発明の発現ベクターは、必須構成要素として、プロモーター、及び「(2) 植物寄生性センチュウ抵抗性のRKNR1ポリペプチド又はその断片をコードするポリヌクレオチド」に記載のポリヌクレオチドを含む。

[0052] 本発明の発現ベクターとして使用可能なベクターは、例えば、プラスミド又はウイルスを利用した発現ベクターである。本明細書において、「発現ベクター」は、組換えベクターを包含するものとする。

[0053] プラスミドを利用した発現ベクター（以下、しばしば「プラスミド発現ベクター」と表記する）の場合、プラスミドには、限定はしないが、例えば、pPZP系、pSMA系、pUC系、pBR系、pBluescript系（Agilent Technologies社）、pTriEXTM系（TaKaRa社）、又はpBI系、pRI系若しくはpGW系のバイナリーベクター等を利用することができる。

[0054] ウイルスを利用した発現ベクター（以下、しばしば「ウイルス発現ベクター」と表記する）の場合、ウイルスには、カリフラワーモザイクウイルス（CaMV）、インゲンマメゴールデンモザイクウイルス（BGMV）、タバコモザイクウイルス（TMV）等を利用することができる。

[0055] また、アグロバクテリウム法を用いる場合には、バイナリーベクター等のアグロバクテリウム法に適した発現ベクター又はその改変ベクターを用いる

こともできる。そのような発現ベクターとしては、例えば、pBI121、pBIN19、pSMAB704、pCAMBIA、pGreen等が挙げられる。

[0056] プロモーターは、各種プロモーター、例えば、過剰発現型プロモーター、構成的プロモーター、部位特異的プロモーター、時期特異的プロモーター、及び／又は誘導性プロモーターを用いることができる。植物細胞で作動可能な過剰発現型で構成的プロモーターの具体例としては、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 由来の35Sプロモーター、Tiプラスミド由来のノパリン合成酵素遺伝子のプロモーターPnos、トウモロコシ由来の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等が挙げられる。様々な植物種のリブローズニリン酸カルボキシラーゼの小サブユニット (Rubisco ssu) プロモーター、又はヒストンプロモーターも使用することができる。誘導性プロモーターの例としては、温度によって制御可能なヒートショックプロモーターや、テトラサイクリンの有無によって制御可能なテトラサイクリン応答性プロモーター等の誘導性プロモーターが挙げられる。

[0057] 発現ベクターは、ターミネーター、エンハンサー、ポリA付加シグナル、5'-UTR (非翻訳領域) 配列、イントロン配列、リボソーム結合配列、標識若しくは選択マーカー遺伝子、マルチクローニング部位、ヌクレアーゼ認識配列、及び／又は複製開始点等を含むこともできる。それぞれの種類は、宿主細胞内でその機能を発揮し得るものであれば、特に限定されない。導入する植物細胞又は植物宿主に応じて当該分野で公知のものを適宜選択すればよい。

[0058] ターミネーターは、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、大腸菌リポポリプロテイン lppの3' ターミネーター、trpオペロンターミネーター、amyBターミネーター、ADH1遺伝子のターミネーター等が挙げられる。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る配列であれば特に限定はしない。

[0059] エンハンサーとしては、例えば、CaMV 35Sプロモーター内の上流側の配列

を含むエンハンサー領域が挙げられる。活性ペプチドをコードする核酸等の発現効率を増強できるものであれば特に限定はされない。

[0060] ヌクレアーゼ認識配列としては、制限酵素認識配列、Cre組換え酵素によって認識されるloxP配列、ZFNやTALEN等の人工ヌクレアーゼの標的となる配列、又はCRISPR/Cas9システムの標的となる配列が例示される。

複製起点配列としては、SV40複製起点配列が例示される。

[0061] 選択マーカー遺伝子としては、薬剤耐性遺伝子（例えば、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、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子、又はネオマイシン耐性遺伝子）、蛍光又は発光レポーター遺伝子（例えば、ルシフェラーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -グルクロニターゼ（GUS）、又はグリーンフルオレッセンスプロテイン（GFP））、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼII（NPT II）、ジヒドロ葉酸還元酵素等の酵素遺伝子が挙げられる。

[0062] 本発明の発現ベクターが包含し得る選択マーカー遺伝子は、本発明の発現ベクターが導入された細胞を選択することができる選択マーカー遺伝子である。選択マーカー遺伝子の具体例としては、例えばアンピシリン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、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、ピューロマイシン耐性遺伝子、又はハイグロマイシン耐性遺伝子等の薬剤耐性遺伝子が挙げられる。

[0063] 本発明の発現ベクターが包含し得るレポーター遺伝子は、本発明の発現ベクターが導入された細胞を識別可能なレポーターをコードする遺伝子である。レポーター遺伝子としては、例えば、GFPやRFP等の蛍光タンパク質をコードする遺伝子や、ルシフェラーゼ遺伝子等が例示される。

[0064] 1-3-2. その他の成分

本発明の植物寄生性センチュウ防除剤は、「1-3-1. 有効成分」に記載した有効成分のみから構成されていてもよいが、必要に応じてその他の成分を含むことができる。

[0065] 本発明の植物寄生性センチュウ防除剤は、農業製剤上許容可能な担体を含んでもよい。本明細書において「農業製剤上許容可能な担体」とは、本発明の植物寄生性センチュウ防除剤の活性に実質的に影響しない物質であって、植物の栽培に施用しても土壌及び水質等の環境に対する有害な影響がないか又は小さい、又は動物、特にヒトに対する有害性がないか又は低い物質をいう。例えば、溶媒、補助剤、賦形剤、乳化剤、分散剤、界面活性剤等が挙げられる。

[0066] 本発明の植物寄生性センチュウ防除剤は、有効成分の活性に影響しない範囲において、他の薬理作用を有する成分、すなわち、殺センチュウ剤、除草剤、肥料（例えば、尿素、硝酸アンモニウム、過リン酸塩）を包含することもできる。

[0067] 1-3-3. 剤形

本発明の植物寄生性センチュウ防除剤の剤形は、本発明の植物寄生性センチュウ防除剤が施用される植物体内に侵入し得る状態であれば、いかなる状態であってもよく、例えば、液体状態の液剤、固体状態の固形剤とすることができる。液剤の場合、有効成分を適当な溶液に懸濁した溶液剤、油性分散液剤、エマルジョン剤、懸濁剤が挙げられる。固形剤の場合、有効成分が施用植物に作用し得る状態であれば、特に制限しない。例えば、粉剤、散剤、ペースト剤、ゲル剤が挙げられる。

[0068] 1-4. 効果

本発明の植物寄生性センチュウ防除剤によれば、植物寄生性センチュウに罹患性の植物に、植物寄生性センチュウに対する抵抗性を付与することができる。また、本発明の植物寄生性センチュウ防除剤によれば、植物寄生性センチュウに抵抗性の植物において、植物寄生性センチュウに対する抵抗性を増強することができる。

[0069] 本発明の植物寄生性センチュウ防除剤によれば、本剤が適用される植物においてセンチュウ誘引活性、根部内へのセンチュウの移行、瘤形成、瘤成熟、根部内におけるセンチュウの成長、及び／又は宿主植物における巨大細胞

の誘導を抑制することができる。

[0070] 2. 植物寄生性センチュウに対して抵抗性を有する植物形質転換体又はその後代

#### 2-1. 概要

本発明の第2の態様は、植物寄生性センチュウに対して抵抗性を有する植物形質転換体又はその後代である。本発明の植物形質転換体又はその後代は、第1態様に記載のポリヌクレオチド又は発現ベクターを含み、ネコブセンチュウ等の植物寄生性センチュウに対して抵抗性を有する。本発明の植物形質転換体又はその後代は、センチュウ誘引活性、根部内へのセンチュウの移行、瘤形成、瘤成熟、根部内におけるセンチュウの成長、及び／又は宿主植物における巨大細胞の誘導が抑制されており、植物寄生性センチュウに対して抵抗性を有する。

[0071] 2-2. 構成

本明細書における「植物形質転換体」は、植物寄生性センチュウに対して抵抗性を獲得するように遺伝子改変された植物宿主をいう。

[0072] 本発明の植物形質転換体は、第1態様に記載の植物寄生性センチュウ抵抗性のRKNR1ポリペプチド若しくはその断片をコードするポリヌクレオチド、又は前記ポリヌクレオチドを含む発現ベクターを含む。

[0073] 本発明において形質転換される宿主植物種は、限定しない。宿主植物は、単子葉植物又は双子葉植物であってもよいが、単子葉植物が特に好ましい。単子葉植物であれば、イネ科に属する種（例えば、イネ、コムギ、オオムギ、ライムギ、トウモロコシ、サトウキビ、アワ、キビ、ヒエ、ソルガム、コウリヤン）、バショウ科に属する種（例えば、バナナ、バショウ）、ヒガンバナ科に属する種（例えば、ネギ、タマネギ、ニンニク、ニラ）、又はパイナップル科に属する種（例えば、パイナップル）であってもよい。宿主植物は、植物寄生性センチュウに対して罹患性の植物種や植物寄生性センチュウに対する抵抗性が弱い植物種（例えば、S型RKNR1遺伝子を有するイネ品種、又はL型RKNR1遺伝子を有しない植物種）が好ましい。

[0074] 本発明の植物形質転換体は、同一の遺伝情報を有するクローン体を包含する。植物形質転換体第1世代から採取した植物体の一部、例えば、表皮、師部、柔組織、木部若しくは維管束のような植物組織、葉、花弁、茎、根若しくは種子のような植物器官、又は植物細胞から植物組織培養法や挿し木、接木若しくは取り木によって得られるクローン体、あるいは根茎、塊根、球茎、ランナー等のような植物形質転換体第1世代から無性生殖で得られる栄養繁殖器官より新たに生じた新たなクローン体、植物形質転換体第1世代若しくはそれに由来するクローン体から脱分化処理によって誘導される不定胚等も本発明の植物形質転換体に含まれる。

一実施形態において、本発明の植物形質転換体は遺伝子組換え体であってもよい。

[0075] 本明細書において「その後代」とは、前記植物形質転換体第1世代の有性生殖を介した子孫であって、植物寄生性センチュウ抵抗性のRKNR1ポリペプチド若しくはその断片をコードするポリヌクレオチド、又は前記ポリヌクレオチドを含む発現ベクターを保持し、かつ植物寄生性センチュウに対して抵抗性を有する宿主植物を意味する。後代の世代は問わない。

[0076] 3. 植物寄生性センチュウに対して抵抗性を有する植物形質転換体を製造する方法

#### 3-1. 概要

本発明の第3の態様は、植物寄生性センチュウに対して抵抗性を有する植物形質転換体を製造する方法に関する。本発明の製造方法によれば、植物寄生性センチュウ罹患性の植物から、抵抗性の植物形質転換体を製造することができる。

#### [0077] 3-2. 方法

本発明の植物寄生性センチュウに対して抵抗性を有する植物形質転換体を製造する方法は、必須の工程として導入工程、及び選択工程を含む。以下、各工程について具体的に説明をする。

#### [0078] 3-2-1. 導入工程

本態様において「導入工程」は、植物寄生性センチュウ抵抗性のRKNR1ポリペプチド又はその断片をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを宿主植物に導入する工程である。本工程で導入される発現ベクターの構成は、前記第1態様の「(3)植物寄生性センチュウ抵抗性のRKNR1ポリペプチド又はその断片をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクター」の記載に準じる。

[0079] 発現ベクターの導入方法は、当該分野で公知の方法、例えば、アグロバクテリウム法、PEG-リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、リポソーム法、パーティクルガン法、マイクロインジェクション法を用いることができる。導入されたポリヌクレオチドは、宿主のゲノムDNA中に組み込まれてもよいし、導入されたポリヌクレオチドの状態（例えば、外来ベクターに含有されたまま）で存在していてもよい。さらに、導入されたポリヌクレオチドは、宿主のゲノムDNA中に組み込まれた場合のように宿主細胞内で維持され続けてもよいし、一過的に保持されてもよい。

[0080] アグロバクテリウム法を用いる場合は、アグロバクテリウム法に適した発現ベクターに植物寄生性センチュウ抵抗性のRKNR1ポリペプチド又はその断片をコードするポリヌクレオチドを挿入した後、適当なアグロバクテリウム、例えばアグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) にエレクトロポレーション法等により導入し、この菌株を植物細胞、カルス、又は子葉切片等に接種して感染させればよい。好適なアグロバクテリウムとしては、限定するものではないが、GV3101、C58、C58C1Rif(R)、EHA101、EHA105、AGL1、LBA4404等の株を利用することができる。

[0081] 導入対象の宿主試料としては、植物の葉等の切片を使用してもよく、プロトプラストを調製して使用してもよい (Christou P, et al., *Bio/Technology* (1991) 9: 957-962)。例えばパーティクルガン法では、遺伝子導入装置（例えばPDS-1000 (BIO-RAD社) 等）を製造業者の説明書に従って使用して、本発明に係る発現ベクター又はDNA構築物をまぶした金属粒子をこのような試料に打ち込むことにより、植物細胞内に導入させ、形質転換植物細胞を得るこ

とができる。操作条件は、通常は450~2000psi程度の圧力、4~12cm程度の距離で行う。

[0082] 3-2-2. 選択工程

本態様において「選択工程」は、前記発現ベクターが導入された植物を選択する工程である。

[0083] 本工程は、上述の方法で発現ベクターを宿主に導入した後、当該分野で公知の方法によって行えばよい。例えば、発現ベクター中の選択マーカー遺伝子やレポーター遺伝子にコードされるタンパク質の活性を利用して、形質転換体を選択することができる。

[0084] 一実施形態において、本発明の発現ベクター又はポリヌクレオチドを導入した植物細胞や子葉切片等を、植物組織培養法に従って選択培地で培養し、生存したカルスを再分化培地（適当な濃度の植物ホルモン（オーキシン、サイトカイニン、ジベレリン、アブシジン酸、エチレン、ブラシノライド等）を含む）で培養することにより、形質転換された植物体を再生することができる。このようにして形質転換体を選択することができる。

## 実施例

[0085] <実施例1：様々なイネ品種のサツマイモネコブセンチュウに対する抵抗性の検討>

（目的）

様々なイネ品種について、サツマイモネコブセンチュウ（Mi）に対する抵抗性を検討する。

[0086] （方法）

（1）イネ品種

本実施例において評価の対象としたイネ品種は、温帯ジャポニカに属する11品種、熱帯ジャポニカに属する8品種、アウスに属する20品種、インディカに属する10品種、12種類の交雑品種、ネリカ関連系統に属する8品種、及び分類不明の8品種であった。上記の品種は農業・食品産業技術総合研究機構（NARO）Genbank、及び名古屋大学から得た。

## [0087] (2) Mi抵抗性の評価方法

Mi抵抗性の評価は、本発明者の報告 (Sunohara, H., Kaida, S., and Sawa, S., 2020, *Plant Biotechnol.*, 37, 343-347) に記載の方法に従って行った。

[0088] 具体的には、イネの種子を殺菌液 (花王株式会社製キッチン用漂白剤の100倍希釈液) に26°Cで3日間浸し (吸水期)、カビや菌を死滅させると同時に発芽を誘導した。発芽後の種子をペーパーパウチ (CYG Seed Germination Pouch, Mega International, USA) にパウチ当たり2粒ずつ播種した。発芽した種子の入ったパウチを26°Cの暗所に3日間置いた。次に、10パウチを木板で挟み、バネクランプで固定した後、12時間明所 (26°C) / 12時間暗所 (24°C) で8日間育成した。なお、木板で挟む目的は、水分が多い状態ではセンチュウの感染効率が低下することから、ペーパーパウチから余分な水分を除去するためである。吸水14日後、1mLあたり400個体のJ2期サツマイモネコブセンチュウを含む溶液2mL (計800個体) を根に沿って添加した (センチュウ接種)。接種後、木板に挟んだ状態のパウチを暗所にて水平な状態で3日間置き、28°Cで12時間、26°Cで12時間暗所に直立させた。また、生育期間中は節水状態を維持し、各植物に対して、週1回 (接種後7、14、21、28日)、文献 (Nishiyama H. et al., 2015, *Nematol. Res.* 45:45-49.) に記載の液体肥料2mLを添加した。

[0089] 卵塊数は吸水後48日 (接種後34日) に計測した。根系全体を50ng/ $\mu$ Lのエリオグロウシンに少なくとも15分間浸漬することにより染色し、青く染色された卵塊の数を測定した。卵塊数の計測後、根系を50°Cのインキュベーターに最低5日間入れ、根内の水分を完全に除去した後に重量を測定した。得られた乾燥根重量と卵塊数から単位乾燥根重量当たりの卵塊数を計算した。T65の数値を基準値とした標準化した値を各品種の評価値 (Evaluation value; EV) とした。

[0090] 得られた評価値が0.6以上のイネ品種をMi罹患性の品種、評価値が0.6未満のイネ品種をMi抵抗性の品種に分類した。

[0091] (結果)

各品種について得られた評価値を図 1、図 2、及び以下の表 1 に示す。

[0092]

[表1]

表1. 様々なイネ品種の評価値(EV)

アクセシオン 番号	品種	原産地	分類	評価値(EV) (平均±標準誤差)	RKNR1
-	Taichung65 (T65)	Taiwan	<i>Temperate japonica</i>	1 (reference)	S type
WRC 01	Nipponbare	Japan	<i>Temperate japonica</i>	1.090±0.068	S type
-	Kinmaze	Japan	<i>Temperate japonica</i>	1.278±0.205	S type
-	Hinohikari	Japan	<i>Temperate japonica</i>	1.087±0.065	S type
-	Yukihikari	Japan	<i>Temperate japonica</i>	1.236±0.170	S type
WRC 43	Dianyu1	China	<i>Temperate japonica</i>	1.128±0.073	S type
JRC 17	Akage	Japan	<i>Temperate japonica</i>	1.180±0.371	L type
JRC 26	Aikoku	Japan	<i>Temperate japonica</i>	0.983±0.045	S type
JRC 27	Ginbouzu	Japan	<i>Temperate japonica</i>	0.362±0.043	L type
JRC 31	Kameji	Japan	<i>Temperate japonica</i>	0.869±0.004	S type
JRC 34	Kyoutoasahi	Japan	<i>Temperate japonica</i>	0.972±0.108	S type
WRC 45	Ma Sho	Myanmar	<i>Tropical japonica</i>	0.282±0.031	L type
WRC 46	Khao Nok	Laos	<i>Tropical japonica</i>	0.139±0.002	L type
WRC 47	Jaguary	Brazil	<i>Tropical japonica</i>	0.275±0.060	L type
WRC 48	Khau Mac Kho	Vietnam	<i>Tropical japonica</i>	0.204±0.086	L type
WRC 49	Padi Perak	Indonesia	<i>Tropical japonica</i>	0.154±0.038	L type
WRC 50	Rexmont	USA	<i>Tropical japonica</i>	0.085±0.029	L type
JRC 04	Senshou	Japan	<i>Tropical japonica</i>	0.157±0.018	L type
JRC 11	Kahei	Japan	<i>Tropical japonica</i>	0.348±0.048	L type
WRC 02	Kasalath	India	<i>Aus</i>	0.133±0.016	L type
WRC 04	Jena035	Nepal	<i>Aus</i>	0.006±0.006	L type
WRC 25	Muha	India	<i>Aus</i>	0.400±0.052	L type
WRC 26	Jhona2	India	<i>Aus</i>	0.376±0.015	L type
WRC 27	Nepal8	Nepal	<i>Aus</i>	0.018±0.002	L type
WRC 28	Jarjan	Bhutan	<i>Aus</i>	0.002±0.002	L type
WRC 29	Kalo Dhan	Nepal	<i>Aus</i>	0.011±0.003	L type
WRC 30	Anjana Dhan	Nepal	<i>Aus</i>	0.020±0.008	L type
WRC 31	Shoni	Bangladesh	<i>Aus</i>	0.143±0.014	L type
WRC 33	Surjamukhi	India	<i>Aus</i>	0.033±0.012	L type
WRC 34	ARC7291	India	<i>Aus</i>	0.242±0.054	L type
WRC 35	ARC5955	India	<i>Aus</i>	0.073±0.017	L type
WRC 37	ARC7047	India	<i>Aus</i>	0.060±0.008	L type
WRC 38	ARC11094	India	<i>Aus</i>	0.071±0.015	L type
WRC 39	Badari Dhan	Nepal	<i>Aus</i>	0.045±0.006	L type
WRC 40	Nepal555	India	<i>Aus</i>	0.006±0.006	L type
WRC 41	Kaluheenati	Sri Lanka	<i>Aus</i>	0.266±0.013	L type
-	DV85	-	<i>Aus</i>	0.333±0.021	L type
-	ARC10313	-	<i>Aus</i>	0.117±0.023	L type

-	N22	-	Aus	0.039±0.016	L type
WRC 03	Bei Khe	Cambodia	Indica	1.035±0.560	L type
WRC 05	Naba	India	Indica	1.126±0.289	L type
WRC 06	Puluik Arang	Indonesia	Indica	0.022±0.015	L type
WRC 09	Ryou Suisan Koumai	China	Indica	0.326±0.078	L type
WRC 11	Jinguoyin	China	Indica	0.308±0.092	L type
WRC 17	Keiboba	China	Indica	0.072±0.038	L type
WRC 18	Qingyu	Taiwan	Indica	0.083±0.058	L type
WRC 19	Deng Pao Zhai	China	Indica	0.344±0.085	L type
WRC 57	Milyang23	Korea	Indica	0.432±0.185	L type
JRC 44	Karahoushi	Japan	Indica	0.286±0.024	L type
WRC 07	Davao1	Philippines	Admixture	0.213±0.026	L type
WRC 13	Asu	Bhutan	Admixture	0.158±0.071	L type
WRC 14	IR58	Philippines	Admixture	0.416±0.171	L type
WRC 15	Co13	India	Admixture	0.199±0.022	L type
WRC 16	Vary Futsi	Madagascar	Admixture	0.085±0.065	L type
WRC 21	Shwe Nang Gyi	Myanmar	Admixture	0.151±0.038	L type
WRC 24	Pinulupot1	Philippines	Admixture	0.545±0.099	L type
WRC 42	Local Basmati	India	Admixture	0.032±0.018	L type
WRC 44	Basilanon	Philippines	Admixture	0.378±0.055	L type
WRC 52	Khau Tan Chiem	Vietnam	Admixture	0.461±0.025	L type
WRC 53	Tima	Bhutan	Admixture	0.157±0.099	L type
WRC 55	Tupa729	Bangladesh	Admixture	0.479±0.034	L type
-	Basmati370	India	Unknown	0.217±0.068	L type
-	IRAT109	-	Unknown	0.060±0.042	L type
-	LTH	China	Unknown	0.576±0.116	L type
-	IR24	Philippines	Unknown	0.393±0.015	L type
-	Kinandang Patong	-	Unknown	0.486±0.034	L type
-	Silewah	-	Unknown	0.042±0.009	L type
-	WAB56-50	-	Unknown	0.100±0.023	L type
-	WAB56-104	-	Unknown	0.232±0.029	L type
-	NERICA 1	-	NERICA related	0.320±0.041	L type
-	NERICA 2	-	NERICA related	0.189±0.076	L type
-	NERICA 4	-	NERICA related	0.274±0.020	L type
-	NERICA 6	-	NERICA related	0.014±0.003	L type
-	NERICA L20	-	NERICA related	0.350±0.043	L type
-	NERICA L41	-	NERICA related	0.053±0.012	L type
-	CG14	-	NERICA related	0.009±0.009	L type
-	WK18	-	NERICA related	0.025±0.012	L type

[0093] 温帯ジャポニカでは、銀坊主 (Ginbouzu) 以外の品種 (T65、日本晴、金南

風、ヒノヒカリ (Hinohikari)、ゆきひかり等) がMi罹患性を示した。一方、熱帯ジャポニカ、アウス、インディカ、及びネリカに属する品種では、Bei Khe及びNaba以外の品種がMi抵抗性を示した。

[0094] インディカ品種のKalo DhanはT65と比較して約1%の評価値を示し (EV=0.01)、Miに対して極めて抵抗性の強い品種の一つであることが判明した。この結果に基づき、以降の実施例ではKalo DhanをMi抵抗性品種として用いた。

[0095] <実施例2 : T65とKalo Dhanの比較>

(目的)

サツマイモネコブセンチュウ (Mi) に対する抵抗性について、ジャポニカ品種T65とインディカ品種Kalo Dhanとの間で比較を行う。

[0096] (方法と結果)

(1) センチュウ誘引活性

T65及びKalo Dhanについて、根尖部へのセンチュウ誘引活性を検討した。

センチュウ誘引活性の測定は、文献 (Wang, C., Lower, S., and Williams on, V.M., 2009, Nematology, 11:453-464) に記載のPluronic F-127ベースのマトリクスを使用し、以下の方法で行った。60mmディッシュにて2万匹のJ2幼虫期のMiを4℃にて3.5mLの培地 (1.5mL ddH<sub>2</sub>O, 2mL 50%[w/v] Pluronic F-127 [Sigma P2443]) 中で混合した後、培地を固化させた。1枚のディッシュ上にイネ根部を2つ配置し、26℃、暗所にてインキュベートした。一晚経過後、イネ根部に誘引されたネコブセンチュウをDP74カメラ (オリンパス) で記録した。誘引インデックスは、文献 (Tsai, A., et al., 2019, Mol Plant 12:99-112) に記載の方法を使用して、以下の式によって算出した。

誘引インデックス = [誘引個体数 - バックグラウンド個体数] / [全個体数]

(式中、誘引個体数及びバックグラウンド個体数はそれぞれイネ又は水に誘引された個体数を示し、全個体数はこれらの個体数の合計を示す)

N=8の実験から得られた平均値±標準誤差を図3Aに示す。この結果から、Kalo Dhanのセンチュウ誘引活性はT65に比べて有意に低いことが示された。

## [0097] (2) センチュウ移行個体数

Miをイネ根尖部に直接接種し、1～21日後にイネ根尖部の3cmの領域を回収した。サンプルをフクシン酸で処理した後、根内部に侵入したセンチュウ数を測定した。

結果を図3Bに示す。センチュウ移行個体数を測定した結果、接種7日後の時点では、T65の移行個体数は、根尖部1個当たり8.35匹であったのに対して、Kalo Dhanでは2.42匹であった。さらに、接種14～21日後の時点では、T65の移行個体数が根尖部1個当たり8～10匹であったのに対して、Kalo Dhanでは1～3匹のみであった。したがって、Kalo DhanではT65に比べてセンチュウ移行個体数が低いことが示された。

## [0098] (3) 瘤幅

上記(2)と同様にMiをイネ根尖部に直接接種し、T65及びKalo Dhanの根部における瘤幅を測定した。瘤幅の評価は、Mi接種の28日後に非瘤領域の根部の幅と瘤領域の幅を測定し(図3C左側)、その比率を相対瘤幅として算出することによって行った。

結果を図3C右側に示す。T65及びKalo Dhanにおける相対瘤幅は、それぞれ $2.86 \pm 0.07$ 及び $1.44 \pm 0.04$ であり、Kalo Dhanは瘤成熟過程においても抵抗性を有することが示された。なお、T65及びKalo Dhanの瘤形成数はそれぞれ301個及び46個であり、T65と比較してKalo Dhanの瘤形成数は少なかった。

## [0099] (4) センチュウ成長速度

上記(2)と同様にMiをイネ根尖部に直接接種し、接種から14～21日後の時点で根部内に侵入したセンチュウの体幅を測定した。

結果を図3Dに示す。Kalo Dhanでは、T65と比較して、センチュウの成長が大幅に抑制されることが示された。

## [0100] (5) 巨大細胞の形成

Miによる巨大細胞形成を観察するために、Miを接種してから7日後と21日後の時点で根部を回収した。回収後、根部サンプルを直ちにFAA緩衝液中(60%エタノール、7.5%酢酸、2.5%ホルマリン)に入れ、20時間の固定した後、

エタノールで脱水を行い、エポキシ樹脂Technovit 7100(Kulzer Friedrichsdorf)中にサンプルを包埋した。5 $\mu$ mの切片を作製し、2.5%[w/v]トルイジンブルー染色液で染色を行った後、顕微鏡下で観察した。

[0101] T65及びKalo Dhanの根部における巨大細胞の様子を図4に示す。Kalo Dhanの瘤では、T65の瘤と比較して、巨大細胞の巨大化が大幅に抑制されていた。また、Kalo Dhanの瘤では、周囲の細胞において細胞分裂が抑制されていた。

[0102] 以上の結果から、Kalo Dhanでは、T65と比較して、センチウ誘引活性、センチウの根部への移行、瘤形成の開始、瘤成熟、根部内におけるセンチウの成長、及び巨大細胞の誘導がいずれも強く抑制されることが示された。

[0103] <実施例3：Mi抵抗性遺伝子のマッピングと同定>

(目的)

QTL解析とポジショナルクローニングによってMi抵抗性遺伝子を同定する。

(方法と結果)

(1) RILの解析

T65とKalo Dhanを交配親とした組換え自殖系統 (Recombinant inbred line ; RIL) を128系統作製し、2,144個のSNPを用いてQTL (量的形質遺伝子座) 解析を行った。その結果、2つの主要なQTLが第4染色体及び第6染色体上で見出され、それぞれqRKNR1 (qROOT KNOT NEMATODE RESISTANCE 1) 及びqRKNR2と命名した (図5 A)。qRKNR1とqRKNR2の寄与率はそれぞれ29.84%と14.47%であった。

[0104] 次に、第4染色体及び第6染色体上におけるピークに最も近いマーカーであるS4-693908及びS6-25039213の各々の遺伝子型 (T65型又はKalo Dhan型) に基づいて、RILを4つの群に分類した (図5 B)。その結果、S4-693908がKalo Dhan型であり、かつS6-25039213がT65型の群が、S4-693908がT65型であり、かつS6-25039213がKalo Dhan型の群よりも評価値が低く、Mi抵抗性が高いことが判明した。この結果から、qRKNR1がMi抵抗性に最も強い影響を有することが示され、qRKNR1についてさらなるマッピングを進めた。

## [0105] (2) RHLの解析

qRKNR1のさらなるマッピングのために、上記RILの作出過程で取得した残余ヘテロ接合系統 (Residual heterozygous line ; RHL) に由来する43系統を取得し、indelマーカー (IDK0401、IDK0404、IDK0405、及びIDK0407) の遺伝子型と評価値の間の関連性を検討した。

結果を図6に示す。ライン#29267-39 (EV=0.45)とライン#29267-63 (EV=0.17)の結果から、抵抗性遺伝子はIDK0401とIDK0404との間の1.3Mb領域にマッピングされた。

## [0106] (3) RKNR1遺伝子の同定

上記(2)で特定された領域について、T65と同様にMi罹患性である日本晴のゲノム配列、及びKalo Dhanと同様にMi抵抗性であるN22のゲノム配列を比較した。その結果、0s04g0112100遺伝子座において、日本晴とN22の間で配列上の差異が見出された。T65及びKalo Dhanにおけるこの遺伝子座のゲノム配列をシーケンシングした結果、0s04g0112100遺伝子の配列は、それぞれ日本晴とN22の配列と完全に一致していた。0s04g0112100遺伝子をRKNR1 (ROOT KN OT NEMATODE RESISTANCE 1)と命名した。

[0107] N22及びKalo DhanにおけるRKNR1アレルは、日本晴RKNR1アミノ酸配列 (配列番号9) において271位と272位との間における1アミノ酸残基の挿入に対応する、3塩基の挿入を有する (図7のN22、Kalo Dhan)。また、日本晴RKNR1アミノ酸配列 (配列番号9) 上の339位に対応する位置では、塩基配列上の1塩基の違いにより、日本晴/T65ではThr残基であるのに対して、N22及びKalo DhanではArg残基であった (図7)。さらに、日本晴/T65ゲノムには、N22及びKalo Dhanと比較して、RKNR1アミノ酸配列中のNB-ARCドメインの中央部分からLRRドメインのC末端側付近に至る1754bpが欠失している。その結果、日本晴及びT65では、RKNR1アミノ酸配列においてLRRドメインの大部分が失われている (図7の日本晴、T65)。以下では、日本晴及びT65のRKNR1アミノ酸配列中に見出された1754bpの欠失を有するRKNR1アレルをS型と表記し、この欠失を有しないRKNR1アレルをL型と表記する。

## [0108] &lt;実施例4：様々なイネ品種におけるRKNR1遺伝子構造の決定&gt;

(目的)

実施例1で評価を行ったイネ品種について、RKNR1遺伝子の構造を決定し、Mi抵抗性との関係を検討する。

## [0109] (方法と結果)

実施例1で評価を行った様々なイネ品種について、日本晴/T65に見出されたRKNR1アミノ酸配列中の1754bp欠失の有無を検討し、RKNR1遺伝子をL型又はS型に分類する。

各イネ品種のRKNR1遺伝子についてL型又はS型に分類した結果を図1の下に示す。

[0110] 図1において、評価値が0.6以上であり、Mi罹患性であるイネ品種のうち、赤毛(Akage)、Bei Khe、及びNaba以外の品種では、RKNR1遺伝子はS型であることが判明した。一方、評価値が0.6未満であり、Mi抵抗性の品種では、RKNR1遺伝子はすべてL型であることが判明した。

[0111] 次に赤毛、Bei Khe、及びNabaにおいて、RKNR1遺伝子配列をシーケンシングにより決定した。その結果、Bei Khe及びNabaでは、NB-ARCドメインの前に4塩基の欠失があり、フレームシフトによってORF途中で終止コドンが生じていた(図7のBei Khe、Naba)。赤毛のRKNR1遺伝子配列には、N22のLRRドメインにおける1040位のアミノ酸がLeuからGluに置換されるSNP(図7のAkageにおけるL1040Q)が存在していることが判明した。赤毛では、このSNPによってLRRドメインの機能が変化していると考えられた。

## [0112] &lt;実施例5：Kalo Dhan型RKNR1遺伝子の導入によるMi抵抗性形質への影響&gt;

(目的)

Kalo DhanのRKNR1遺伝子を含むゲノム領域を日本晴に導入した形質転換株を作製し、Mi抵抗性が得られるか否かを検証する。

## [0113] (方法)

Os04g0112100遺伝子における-3060~-1307bpのRKNR1上流配列(領域1)をattB1-0sMi4c1p-F(配列番号13)及びattB2-0sMi4c1p-M3Fr(配列番号14

) のプライマーセット、並びにPrimeSTAR Max DNA Polymerase (TaKaRa)を用いて野生型Kalo DhanゲノムからPCR増幅した。次いで、attB1プライマー及びattB2プライマーを用いてPrimeSTAR Maxを用いてPCRを行い、PCR産物をBP clonase II (Thermo Fisher scientific)を用いてpDONR221ベクターにクローニングした。

[0114] 次に0s04g0112100における-1324~-560bpのRKNR1上流配列(領域2)を合成し、pUC57-Ampベクター(Genewiz, Kawaguchi)にクローニングした。

[0115] 0s04g0112100における-569~-1bpのRKNR1上流配列(領域3)及び一部のコーディング領域をpUC19-IF-0sMi4c1\_r5s(配列番号15)及びpUC19-IF-0sMi4c1p-L4-r(配列番号16)のプライマーセット、並びにSapphireAmp Fast PCR Master Mix (TaKaRa)を用いてKalo DhanゲノムからPCR増幅した。次いで、上記プライマーセットを用いてPrimeSTAR Maxを用いてPCRを行い、PCR産物をNEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix (New England Biolabs)を用いてpUC19 Linearized vector (TaKaRa)にクローニングした。

[0116] RKNR1コーディング配列をattB1-0sMi4c1-cDNA-F(配列番号17)及びattB2-0sMi4c1-cDNA-R(配列番号18)のプライマーセット、並びにPrimeSTAR Maxを用いてKalo DhanゲノムからPCR増幅した。次いで、attB1プライマー及びattB2プライマーを用いてPrimeSTAR Maxを用いてPCRを行い、PCR産物をBP clonase IIを用いてpDONR221ベクターにクローニングした。

[0117] RKNR1 3'配列(3007bp)をattB1-0sMi4c1t-F(配列番号19)及びattB2-0sMi4c1t-R(配列番号20)のプライマーセット、並びにPrimeSTAR Maxを用いてKalo DhanゲノムからPCR増幅した。次いで、attB1プライマー及びattB2プライマーを用いてPrimeSTAR Maxを用いてPCRを行い、PCR産物をBP clonase IIを用いてpDONR221ベクターにクローニングした。

[0118] 次に、領域1を含むエントリークローンから、pUC19-IF-M13F(配列番号29)及び0sMi4c1p-M3Fr(配列番号14)のプライマーセット、並びにPrimeSTAR Maxを用いて、Gateway attL1配列と共に領域1断片をPCR増幅した。領域1を含むベクターから、0sMi4c1p-M3F(配列番号21)及び0sMi4c1p-r5-r(配

列番号23)のプライマーセット、並びにKOD One PCR Master Mix -Blue- (TOYOBO)を用いて、領域2断片をPCR増幅した。領域3を含むベクターから、OsMi4C1\_r5 (配列番号24)及びOsMi4c1-IF-ATG-pro-R (配列番号25)のプライマーセット、並びにPrimeSTAR Maxを用いて、領域3断片をPCR増幅した。RKNR1コーディング領域を含むベクターから、OsMi4c1-ATG-F (配列番号26)及びOsMi4C1-TAA-R (配列番号27)のプライマーセット、並びにPrimeSTAR Maxを用いて、RKNR1コーディング領域をPCR増幅した。RKNR1 3'配列を含むエントリークローンから、OsMi4c1-IF-TAA-Ter-F (配列番号28)及びpUC19-IF-M13R (配列番号30)のプライマーセット、並びにPrimeSTAR Maxを用いて、Gateway attL2配列と共にRKNR1 3'配列をPCR増幅した。上記5つのPCR産物をNEBuilderを使用してpUC19 Linearized vectorに組み込んだ。RKNR1ゲノム配列のエントリークローンをLR clonase II (Thermo Fisher scientific)を用いてpGWB1ベクター (Nakagawa T., et al., 2007, J. Biosci. Bioeng. 104:34-41)に移した。本実施例において用いたプライマーの配列を以下の表2に示す。

[0119]

[表2]

表2. プライマーリスト

プライマー名	塩基配列 (5'→3')	配列番号
attB1-OsMi4c1p-F	AAAAAGCAGGCTTACATGAGTGGTCCTTGCTGGACAC	13
attB2-OsMi4c1p-M3Fr	AGAAAGCTGGGTtCTTTTGGGTCTTAGGACTAC	14
pUC19-IF-OsMi4c1_r5s	ctcggtagaccgggggatcGATAGGAACTGCCACTGCTAAAA	15
pUC19-IF-OsMi4c1p-L4-r	cgactctagagggatcGCAGTAGCAGTAGCACCCGG	16
attB1-OsMi4c1-cDNA-F	AAAAAGCAGGCTtgATGCCGATTGGAGCAATTTTCGACGG	17
attB2-OsMi4c1-cDNA-R	AGAAAGCTGGGTtTTAAACGATTTCTAGTCGCTGGATGG	18
attB1-OsMi4c1t-F	AAAAAGCAGGCTtgACTCATGGTACAGACTTTGCCCGAC	19
attB2-OsMi4c1t-R	AGAAAGCTGGGTtCTAGAGCCATACCCAAACTCTTCCG	20
OsMi4c1p-M3Fr	CTTTTGGGTCTTAGGACTAC	21
OsMi4c1p-M3F	TCCTAAGACCCAAAAGAGCC	22
OsMi4c1p-r5-r	AGTTCCTATCTTACCCGGTGCACC	23
OsMi4c1_r5	ggtaagataggaactgccactgctaaaa	24
OsMi4c1-IF-ATG-pro-R	TGCTCCAATCGGCATGCCTAGCCGCCGCTCTCTCCCTC	25
OsMi4c1-ATG-F	ATGCCGATTGGAGCAATTTTCGACGG	26
OsMi4c1-TAA-R	TTAAACGATTTCTAGTCGCTGGATG	27
OsMi4c1-IF-TAA-Ter-F	CTAGAAATCGTTTAAACTCATGGTACAGACTTTGCCCGAC	28
pUC19-IF-M13F	ctcggtagaccgggggatcGTAAACGACGGCCAGT	29
pUC19-IF-M13R	cgactctagagggatcGGAAACAGCTATGACCATG	30
OsMi4c1p-M1F	CTCTCTCATTTTCTATGGGC	31
OsMi4c1p-M2F	AATGCTCCACCTAGGAGGAC	32
OsMi4c1p-M5F	TATGTCATAGCAGGCTGCAG	33
OsMi4c1-cDNA-M1F	ACGGTTACAAGGAGGAGTAC	34
OsMi4c1-cDNA-M2F	TGCTTCTGCTCAAGAAGAGC	35
OsMi4c1-cDNA-M3F	CTGTCTGTAGCTCCTGTGAC	36
OsMi4c1-cDNA-M4F	GTCACATGAGCAAGTTCTCG	37
OsMi4c1-cDNA-M5F	CGGATCACATAAAGGCAATCGG	38
OsMi4c1t-M1F	GGTGAAACACTTGAGCATGG	39
OsMi4c1t-M2F	TATATATGGGCTGGGCCTTC	40
OsMi4c1t-M3F	TTGTCACGAGCAACCATCTC	41
OsMi4c1t-M4F	GGAGAAGTAGTGATGCTTGC	42

[0120] バイナリーベクターを、エレクトロポレーションにより *Agrobacterium tumefaciens* 株EHA105に導入した。イネの形質転換は、文献 (Toki S., et al, Plant J. 47:969-976) に記載の方法に従って行った。具体的には、日本晴の種子を2N6上に28℃にて7日間置き、アグロバクテリウム懸濁液に数分間浸漬した後、2N6-AS培地上に移した。2℃にて暗所で3日間共培養した後、種子を25mg/Lのメロペネム (Wako) を含む滅菌水で洗浄してアグロバクテリウムを除

去した。その後、50mg/Lのハイグロマイシンを含むN6D培地で、32°Cにて連続光下で2週間培養し、続いて小植物体の再生と回収を行った。得られた形質転換株を用いてMi抵抗性の試験を行った。

[0121] (結果)

Kalo DhanのRKNR1遺伝子を含むゲノム領域を日本晴に導入した形質転換株では、ベクターのみを導入した対照株と比較して、評価値が有意に低下した(図2)。この結果から、RKNR1遺伝子がMi抵抗性形質の原因遺伝子であり、Mi抵抗性品種のRKNR1遺伝子をMi罹患性品種に導入することによって、Mi抵抗性が付与されることが実証された。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願はそのまま引用により本明細書に組み入れられるものとする。

## 請求の範囲

- [請求項1] 以下の（a）～（c）で示すいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチド又はその断片からなる植物寄生性センチュウ防除剤。
- （a）配列番号1で示すアミノ酸配列、
  - （b）配列番号1で示すアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列、又は
  - （c）配列番号1で示すアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列
- [請求項2] 請求項1に記載のポリペプチド又はその断片をコードするポリヌクレオチドを含む、植物寄生性センチュウ防除剤。
- [請求項3] 前記ポリヌクレオチドが以下の（a）～（d）で示すいずれかの塩基配列を含む、請求項2に記載の植物寄生性センチュウ防除剤。
- （a）配列番号2で示す塩基配列、
  - （b）配列番号2で示す塩基配列において1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列、
  - （c）配列番号2で示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列、又は
  - （d）配列番号2で示す塩基配列に相補的な塩基配列と高ストリンジェントな条件でハイブリダイズする塩基配列
- [請求項4] 請求項2又は3に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクターを含む、植物寄生性センチュウ防除剤。
- [請求項5] 前記植物寄生性センチュウがネコブセンチュウである、請求項1～4のいずれか一項に記載の植物寄生性センチュウ防除剤。
- [請求項6] 前記ネコブセンチュウが、イネネコブセンチュウ、サツマイモネコブセンチュウ、キタネコブセンチュウ、及びジャワネコブセンチュウからなる群から選択される、請求項5に記載の植物寄生性センチュウ防除剤。
- [請求項7] 請求項2若しくは3に記載のポリヌクレオチド、又は請求項4に記

載の発現ベクターを含む、植物寄生性センチュウに対して抵抗性を有する植物形質転換体、又は前記ポリヌクレオチド若しくは前記発現ベクターを保持したその後代。

[請求項8] 単子葉植物である、請求項7に記載の植物形質転換体又はその後代。

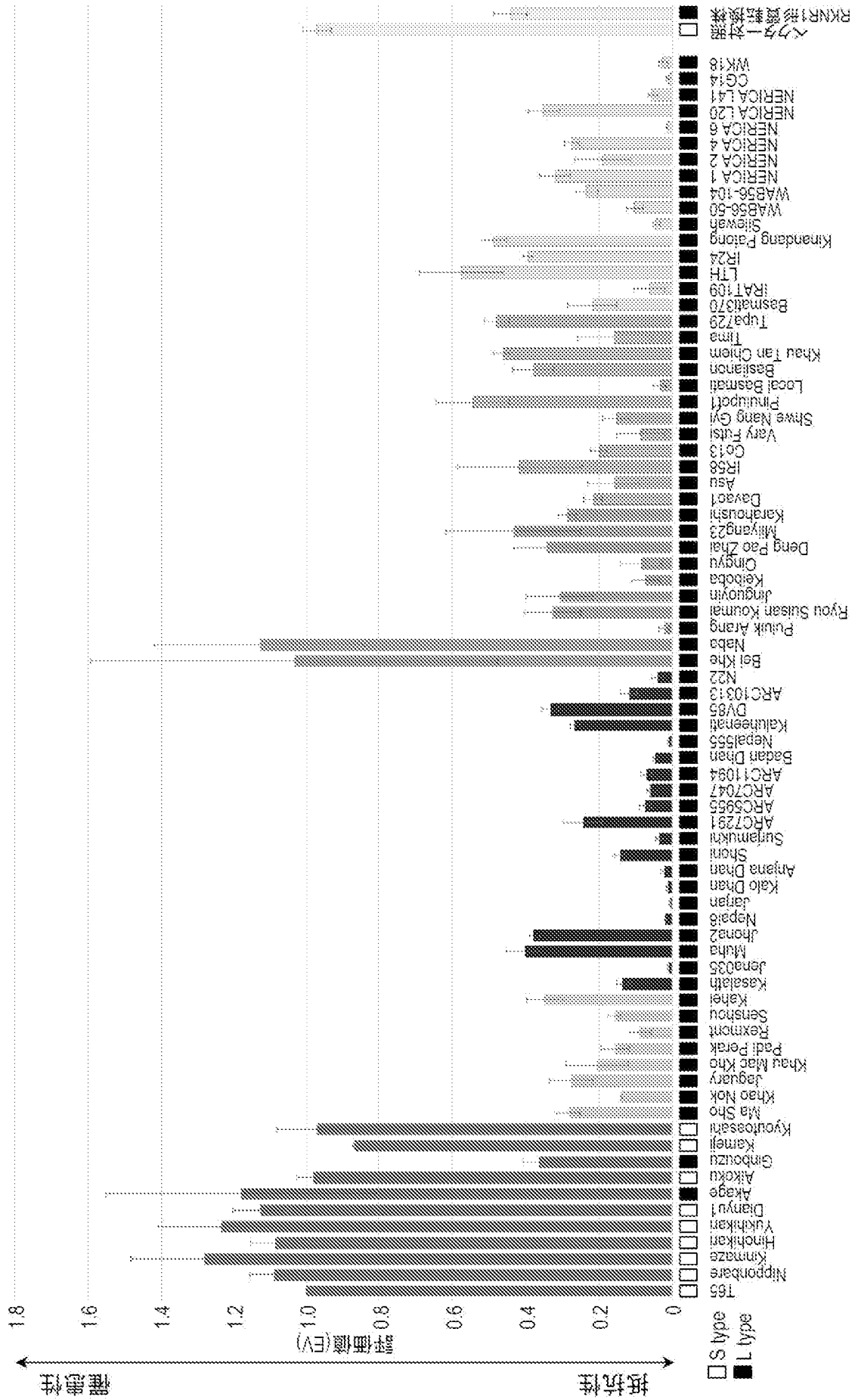
[請求項9] 単子葉植物がイネ科植物である、請求項8に記載の植物形質転換体又はその後代。

[請求項10] 前記イネ科植物が、イネ、コムギ、オオムギ、ライムギ、トウモロコシ、サトウキビ、アワ、キビ、ヒエ、及びソルガムからなる群から選択される、請求項9に記載の植物形質転換体又はその後代。

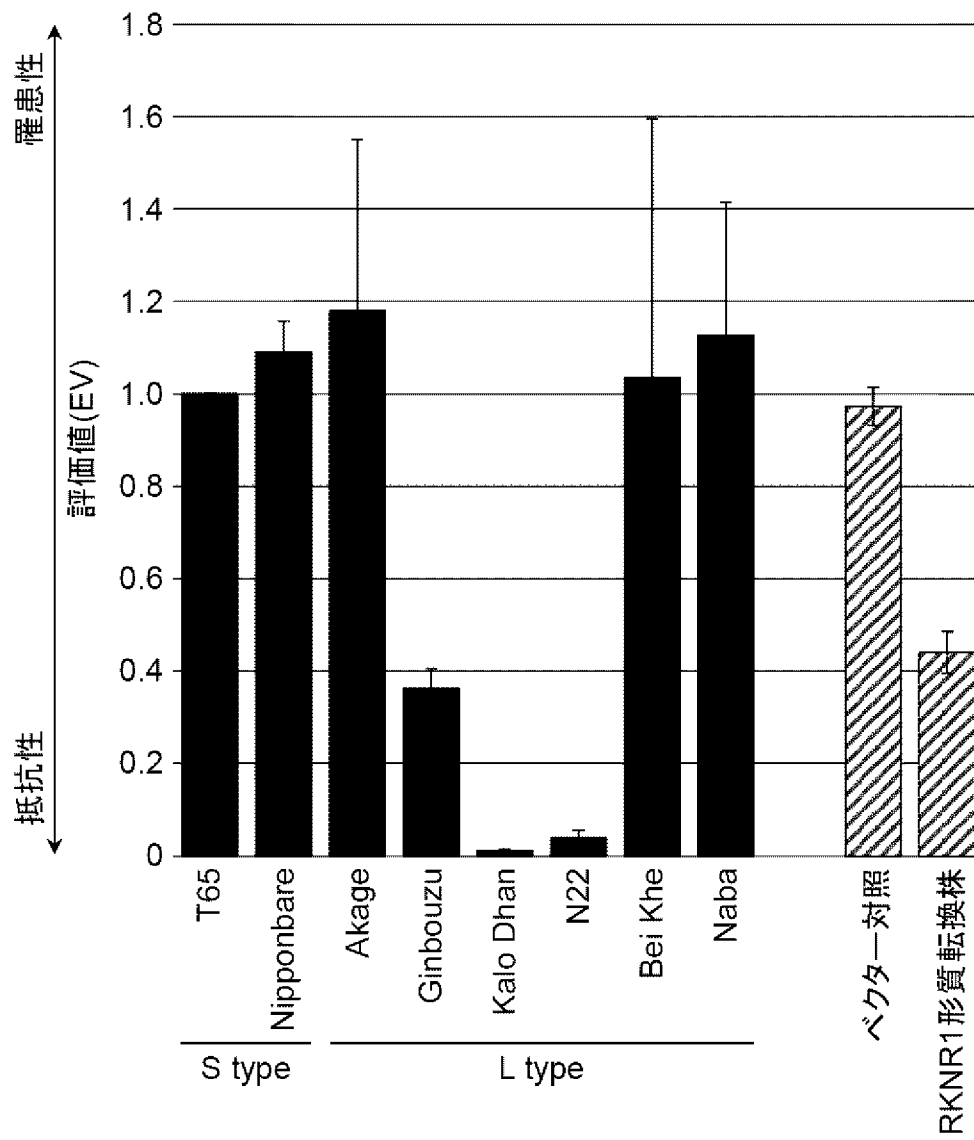
[請求項11] 遺伝子組換え体である、請求項7～10のいずれか一項に記載の植物形質転換体又はその後代。

[請求項12] 植物寄生性センチュウに対して抵抗性を有する植物形質転換体を製造する方法であって、  
請求項4に記載の発現ベクターを植物に導入する工程、及び  
前記発現ベクターが導入された植物を選択する工程  
を含む、方法。

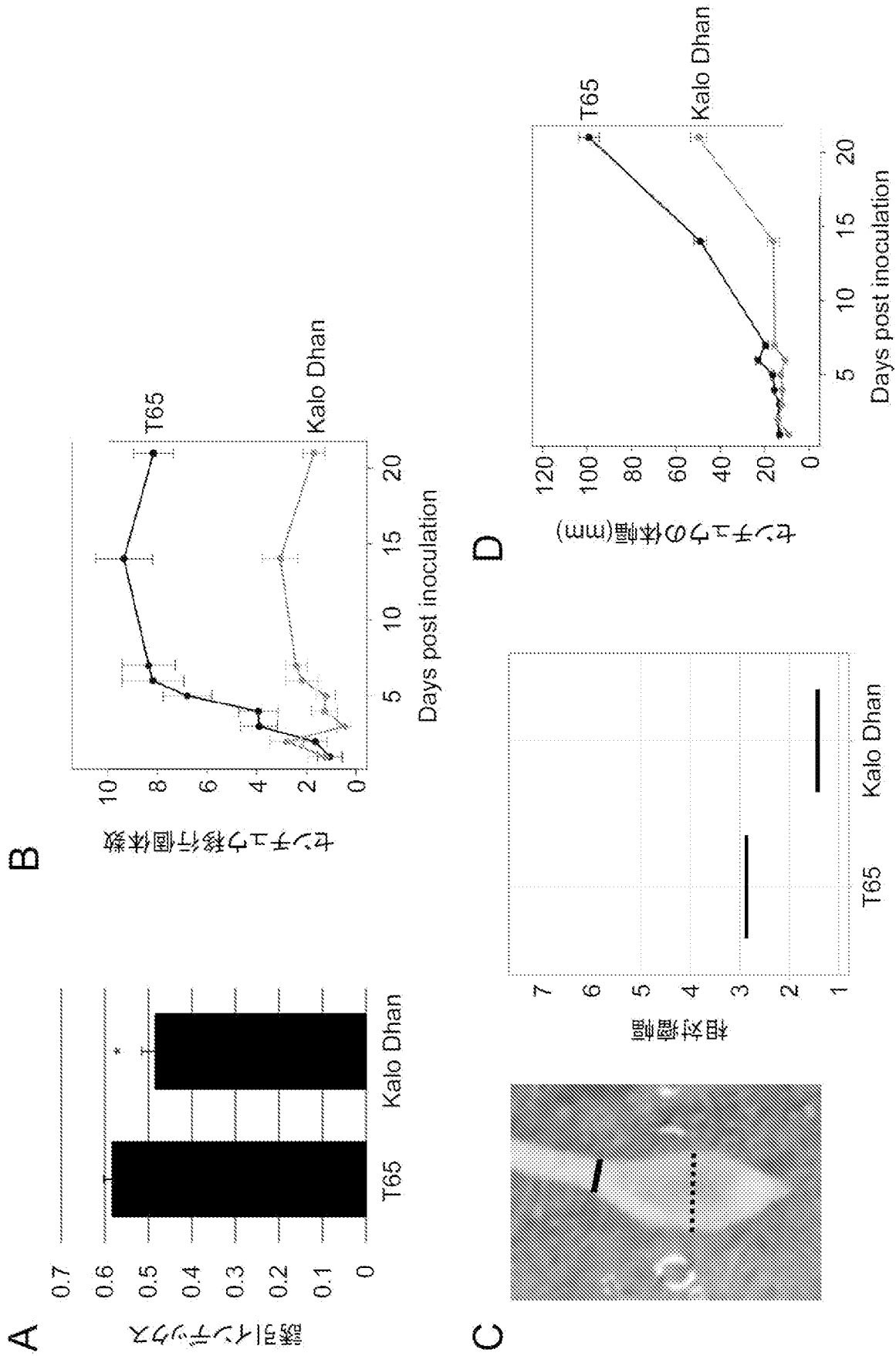
[図1]



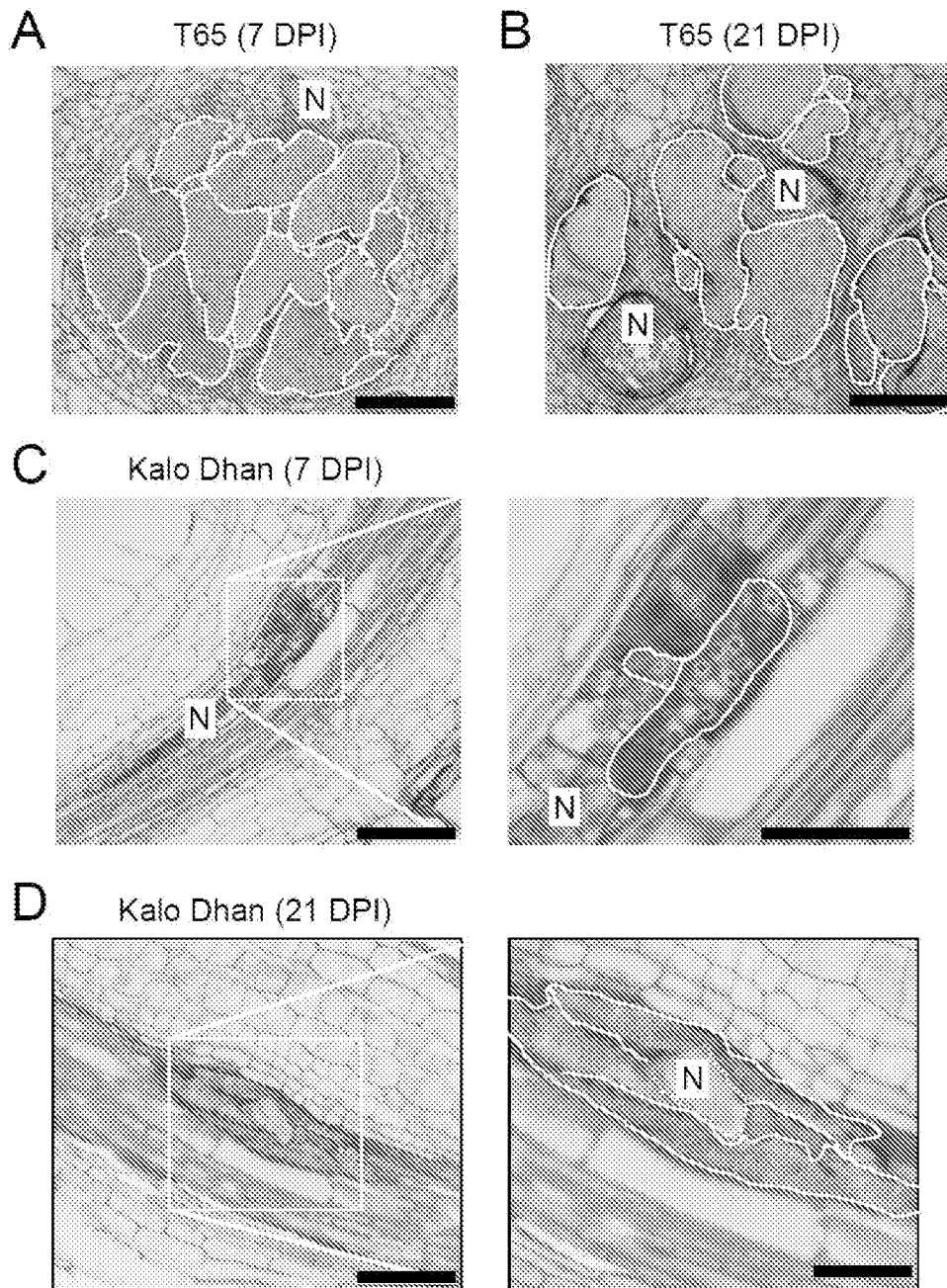
[図2]



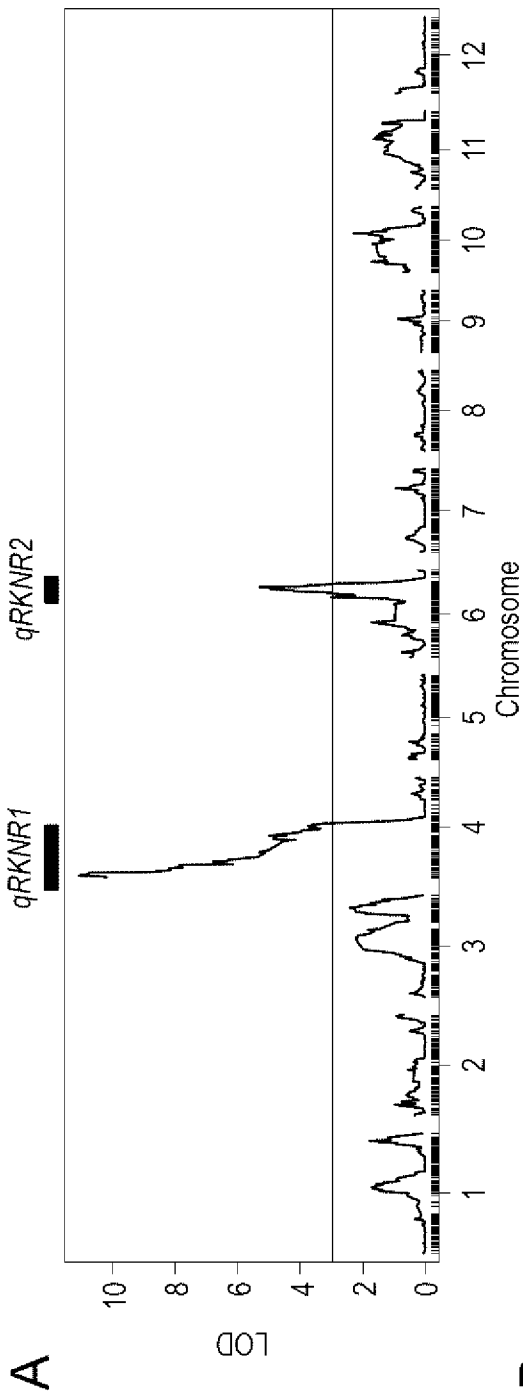
[図3]



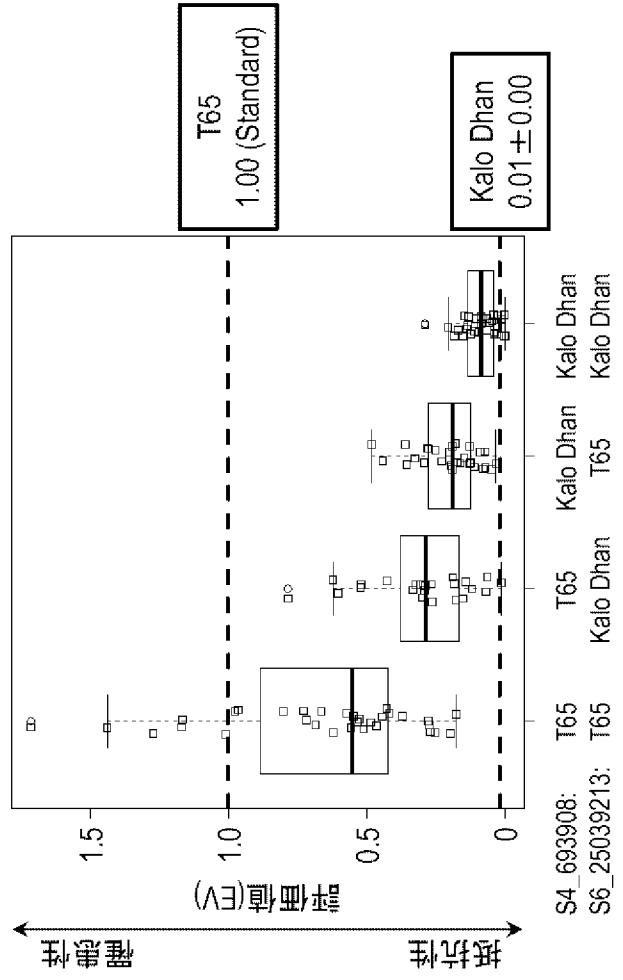
[図4]



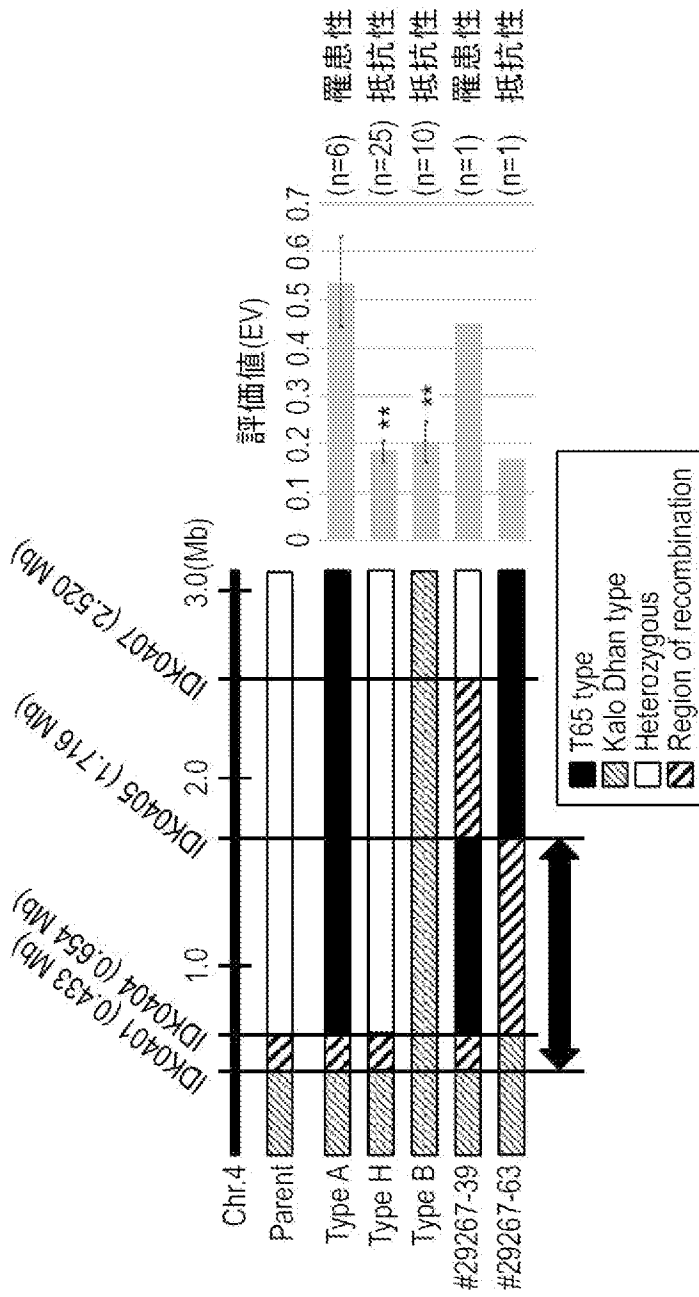
[5]



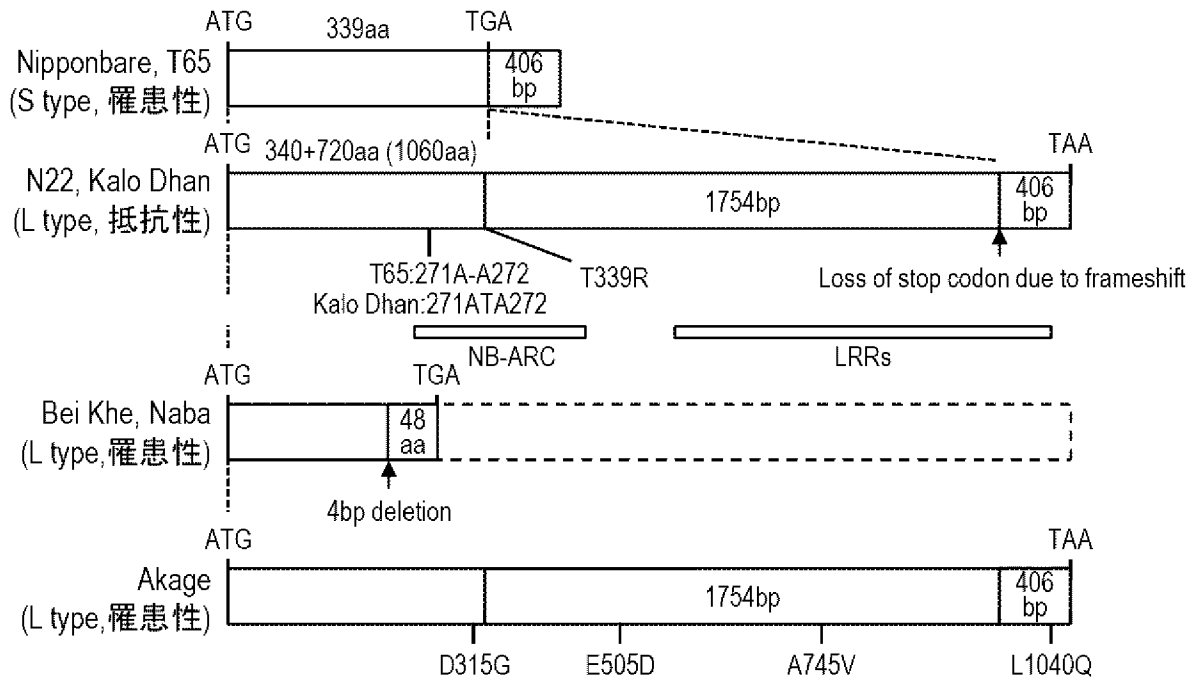
**B**



[図6]



[図7]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/006530

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<p><i>A01H 1/00</i>(2006.01)i; <i>A01P 5/00</i>(2006.01)i; <i>A01N 65/44</i>(2009.01)i; <i>A01H 5/00</i>(2018.01)i; <i>C12N 15/29</i>(2006.01)i; <i>A01H 6/46</i>(2018.01)i; <i>C07K 14/415</i>(2006.01)i  FI: A01N65/44 ZNA; A01P5/00; C12N15/29; C07K14/415; A01H5/00 A; A01H1/00 A; A01H6/46</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A01H1/00; A01P5/00; C07K14/415; A01N65/44; A01H5/00; C12N15/29; A01H6/46		
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); CApus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq; UniProt/GeneSeq		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Accession No. A0A0E0IQK0, Uniprot [online], 12 August 2020, <a href="https://www.uniprot.org/uniprot/A0A0E0IQK0.txt?version=26">https://www.uniprot.org/uniprot/A0A0E0IQK0.txt?version=26</a> , [retrieved on 11 April 2022] entire text, all drawings	1-12
A	Accession No. A0A0D3FRY9, Uniprot [online], 12 August 2020, <a href="https://rest.uniprot.org/beta/unisave/A0A0D3FRY9?format=txt&amp;version=22">https://rest.uniprot.org/beta/unisave/A0A0D3FRY9?format=txt&amp;version=22</a> , [retrieved on 11 April 2022] entire text, all drawings	1-12
A	Accession No. A2XPP2, Uniprot [online], 12 August 2020, <a href="https://rest.uniprot.org/beta/unisave/A2XPP2?format=txt&amp;version=80">https://rest.uniprot.org/beta/unisave/A2XPP2?format=txt&amp;version=80</a> , [retrieved on 11 April 2022] entire text, all drawings	1-12
A	OOIJEN, G. et al. Structure-function analysis of the NB-ARC domain of plant disease resistance proteins. <i>Journal of Experimental Botany</i> . 2008, vol. 59, no. 6, pp. 1383-1397 entire text, all drawings	1-12
A	JP 2001-500006 A (KEYGENE N.V.) 09 January 2001 (2001-01-09) entire text, all drawings	1-12
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“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)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&amp;” document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search <b>12 April 2022</b>		Date of mailing of the international search report <b>26 April 2022</b>
Name and mailing address of the ISA/JP <b>Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan</b>		Authorized officer  Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/JP2022/006530**

<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2006-507840 A (THE OHIO STATE UNIV.) 09 March 2006 (2006-03-09) entire text, all drawings	1-12
P, A	DASH, M. et al. A rice root-knot nematode <i>Meloidogyne graminicola</i> -resistant mutant rice line shows early expression of plant-defence genes. <i>Planta</i> . 17 April 2021, 253:108 entire text, all drawings	1-12

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

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

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

International application No.

**PCT/JP2022/006530**

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 2001-500006 A	09 January 2001	US 6613962 B1 entire text, all drawings EP 823481 A1	
JP 2006-507840 A	09 March 2006	US 2004/0210957 A1 entire text, all drawings	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） A01H 1/00(2006.01)i; A01P 5/00(2006.01)i; A01N 65/44(2009.01)i; A01H 5/00(2018.01)i; C12N 15/29(2006.01)i; A01H 6/46(2018.01)i; C07K 14/415(2006.01)i FI: A01N65/44 ZNA; A01P5/00; C12N15/29; C07K14/415; A01H5/00 A; A01H1/00 A; A01H6/46		
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）） A01H1/00; A01P5/00; C07K14/415; A01N65/44; A01H5/00; C12N15/29; A01H6/46 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		
国際調査で利用した電子データベース（データベースの名称、調査に利用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq; UniProt/GeneSeq		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	Accession No. A0A0E0IQK0, Uniprot [online], 2020.08.12, <a href="https://www.uniprot.org/uniprot/A0A0E0IQK0.txt?version=26">https://www.uniprot.org/uniprot/A0A0E0IQK0.txt?version=26</a> , [検索日2022.04.11] 全文、全図	1-12
A	Accession No. A0A0D3FRY9, Uniprot [online], 2020.08.12, <a href="https://rest.uniprot.org/beta/unisave/A0A0D3FRY9?format=txt&amp;version=22">https://rest.uniprot.org/beta/unisave/A0A0D3FRY9?format=txt&amp;version=22</a> , [検索日2022.04.11] 全文、全図	1-12
A	Accession No. A2XPP2, Uniprot [online], 2020.08.12, <a href="https://rest.uniprot.org/beta/unisave/A2XPP2?format=txt&amp;version=80">https://rest.uniprot.org/beta/unisave/A2XPP2?format=txt&amp;version=80</a> , [検索日2022.04.11] 全文、全図	1-12
A	00IJEN, G, et al., Structure-function analysis of the NB-ARC domain of plant disease resistance proteins, Journal of Experimental Botany, 2008, Vol. 59, No. 6, pp. 1383-1397 全文、全図	1-12
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー	“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “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	
“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		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
12.04.2022	26.04.2022	
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）  布川 莉奈 4H 6220  電話番号 03-3581-1101 内線 3443	

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2001-500006 A (ケイヘーネ・エヌ・ブイ) 09.01.2001 (2001 - 01 - 09) 全文、全図	1-12
A	JP 2006-507840 A (ザ オハイオ ステート ユニバーシティー) 09.03.2006 (2006 - 03 - 09) 全文、全図	1-12
P, A	DASH, M. et al., A rice root-knot nematode <i>Meloidogyne graminicola</i> -resistant mutant rice line shows early expression of plant-defence genes, <i>Planta</i> , 2021.04.17, 253:108 全文、全図	1-12

## 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/JP2022/006530

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2001-500006 A	09.01.2001	US 6613962 B1 全文、全図 EP 823481 A1	
JP 2006-507840 A	09.03.2006	US 2004/0210957 A1 全文、全図	