

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】令和6年9月26日(2024.9.26)

【国際公開番号】WO2023/127723

【出願番号】特願2023-570958(P2023-570958)

【国際特許分類】

A 0 1 H 6/82(2018.01)

A 0 1 H 1/06(2006.01)

A 0 1 H 5/00(2018.01)

A 2 4 B 15/10(2006.01)

A 2 4 B 15/20(2006.01)

A 0 1 H 3/04(2006.01)

C 1 2 N 15/10(2006.01)

C 1 2 N 15/29(2006.01)

10

【F I】

A 0 1 H 6/82 Z N A

A 0 1 H 1/06

A 0 1 H 5/00 A

A 2 4 B 15/10

A 2 4 B 15/20

A 0 1 H 3/04

C 1 2 N 15/10 2 0 0 Z

C 1 2 N 15/29

20

【手続補正書】

【提出日】令和6年8月6日(2024.8.6)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

30

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

(i) 配列番号2又は配列番号2と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列において、前記アミノ酸配列に対応するコドンの少なくとも1つが終止コドンに変異している塩基配列を含む核酸、をコード領域として含む内在性遺伝子、及び

(ii) 配列番号4又は配列番号4と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列において、前記アミノ酸配列に対応するコドンの少なくとも1つが終止コドンに変異している塩基配列を含む核酸、をコード領域として含む内在性遺伝子、のいずれか片方、あるいは、双方の内在性遺伝子を有するタバコ植物。

40

【請求項2】

以下の要件：

(i) の内在性遺伝子に含まれる核酸において、配列番号2の233位から285位のアミノ酸に相当するコドンの少なくとも1つが終止コドンに変異している、及び

(ii) の内在性遺伝子に含まれる核酸において、配列番号4の233位から285位のアミノ酸に相当するコドンの少なくとも1つが終止コドンに変異している、のいずれか片方、あるいは、双方の要件を具備する、請求項1に記載のタバコ植物。

【請求項3】

50

(i) 及び (i i) の双方の内在性遺伝子を有する、請求項 1 又は 2 に記載のタバコ植物。

【請求項 4】

(i) の内在性遺伝子、及び / 又は (i i) の内在性遺伝子がホモ接合体である、請求項 1 又は 2 に記載のタバコ植物。

【請求項 5】

(i) の内在性遺伝子に含まれる核酸において、配列番号 2 の 2 7 9 位のアミノ酸に相当するコドンが終止コドンに変異している、請求項 1 又は 2 に記載のタバコ植物。

【請求項 6】

(i i) の内在性遺伝子に含まれる核酸において、配列番号 4 の 2 8 5 位のアミノ酸に相当するコドンが終止コドンに変異している、請求項 1 又は 2 に記載のタバコ植物。 10

【請求項 7】

(i i) の内在性遺伝子に含まれる核酸において、配列番号 4 の 2 3 3 位のアミノ酸に対応するコドンが終止コドンに変異している、請求項 1 又は 2 に記載のタバコ植物。

【請求項 8】

(i) の内在性遺伝子に含まれる核酸において、配列番号 2 の 2 7 9 位のアミノ酸に相当するコドンが終止コドンに変異しており、かつ、

(i i) の内在性遺伝子に含まれる核酸において、配列番号 4 の 2 3 3 位又は 2 8 5 位のアミノ酸に相当するコドンが終止コドンに変異している、
請求項 1 又は 2 に記載のタバコ植物。 20

【請求項 9】

(i) の内在性遺伝子に含まれる核酸において、核酸によってコードされる配列番号 2 の 1 6 3 位に相当するアミノ酸がグリシンである、請求項 1 又は 2 に記載のタバコ植物。

【請求項 10】

(i i i) 配列番号 8 又は配列番号 8 と少なくとも 9 5 % の同一性を有するアミノ酸配列であって、前記アミノ酸配列の 2 3 1 位の相当するアミノ酸がプロリンであるアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む核酸、をコード領域として含む内在性遺伝子、をさらに含む、請求項 1 又は 2 に記載のタバコ植物。

【請求項 11】

以下の (a) - (c) のうち、1 以上の性質を有する、 30

(a) 対照と比較して、硝酸含量が低減している、

(b) 対照と比較して、亜硝酸含量が同等である、

(c) 対照と比較して、アミノ酸含量が増加する、

ここにおいて、対照は、配列番号 2 のアミノ酸配列を有するポリペプチド、及び、配列番号 4 のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む、タバコ植物である、
請求項 1 又は 2 に記載のタバコ植物。

【請求項 12】

対照と比較して、硝酸含量が少なくとも 8 0 % 低減している、請求項 11 に記載のタバコ植物。

【請求項 13】

突然変異体である、又は、遺伝子改変体である、請求項 1 又は 2 に記載のタバコ植物。 40

【請求項 14】

前記タバコ植物が、ニコチアナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*) である、請求項 1 又は 2 に記載のタバコ植物。

【請求項 15】

配列番号 2 又は配列番号 2 と少なくとも 9 5 % の同一性を有するアミノ酸配列において、2 3 3 位から 2 8 5 位の間のアミノ酸残基から C 末端のアミノ酸残基までのアミノ酸配列が欠如したポリペプチドをコードする塩基配列をコード領域として含む内在性遺伝子、及び

配列番号 4 又は配列番号 4 と少なくとも 9 5 % の同一性を有するアミノ酸配列において 50

、 2 3 3 位から 2 8 5 位の間のアミノ酸残基から C 末端のアミノ酸残基までのアミノ酸配列が欠如したポリペプチドをコードする塩基配列をコード領域として含む内在性遺伝子、のいずれか片方、あるいは、双方の内在性遺伝子を有するタバコ植物。

【請求項 1 6】

タバコ植物において、

(i) 配列番号 2 又は配列番号 2 と少なくとも 9 5 % の同一性を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む核酸、をコード領域として含む内在性遺伝子において、前記アミノ酸配列に対応するコドンの少なくとも 1 つが終止コドンとなるように変異を導入する、及び / 又は

(i i) 配列番号 4 又は配列番号 4 と少なくとも 9 5 % の同一性を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む核酸、をコード領域として含む内在性遺伝子において、前記アミノ酸配列に対応するコドンの少なくとも 1 つが終止コドンとなるように変異を導入する

ことを含む、請求項 1 に記載のタバコ植物の作成方法。

【請求項 1 7】

(i) 配列番号 2 又は配列番号 2 と少なくとも 9 5 % の同一性を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列において、前記アミノ酸配列に対応するコドンの少なくとも 1 つが終止コドンに変異している塩基配列を含む核酸、をコード領域として含む内在性遺伝子、及び

(i i) 配列番号 4 又は配列番号 4 と少なくとも 9 5 % の同一性を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列において、前記アミノ酸配列に対応するコドンの少なくとも 1 つが終止コドンに変異している塩基配列を含む核酸、をコード領域として含む内在性遺伝子、のいずれか片方、あるいは、双方の内在性遺伝子を有するタバコ植物を選抜する、

ことを含む、請求項 1 に記載のタバコ植物の作成方法。

【請求項 1 8】

さらに、硝酸含量が減少したタバコ植物を選抜する、ことを含む、請求項 1 6 又は 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

請求項 1 に記載のタバコ植物から収穫された葉たばこ。

【請求項 2 0】

請求項 1 9 記載の葉たばこから生成された、乾燥葉。

【請求項 2 1】

請求項 2 0 記載の乾燥葉から製造された、カットファイラー、粉末、シート、中骨、顆粒、又は抽出物。

【請求項 2 2】

請求項 2 0 に記載の乾燥葉、及び / 又は、請求項 2 1 に記載のカットファイラー、粉末、シート、中骨、顆粒、若しくは抽出物を含む、たばこ製品。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 0 9

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 0 9】

限定されるわけではないが、本発明は、以下の態様を含む。

[態様 1]

(i) 配列番号 2 又は配列番号 2 と少なくとも 9 5 % の同一性を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列において、前記アミノ酸配列に対応するコドンの少なくとも 1 つが終止コドンに変異している塩基配列を含む核酸、をコード領域として含む内在性遺伝子、及び

(i i) 配列番号 4 又は配列番号 4 と少なくとも 9 5 % の同一性を有するアミノ酸配列

10

20

30

40

50

をコードする塩基配列において、前記アミノ酸配列に対応するコドンの少なくとも1つが終止コドンに変異している塩基配列を含む核酸、をコード領域として含む内在性遺伝子、のいずれか片方、あるいは、双方の内在性遺伝子を有するタバコ植物。

[態様 2]

以下の要件：

(i) の内在性遺伝子に含まれる核酸において、配列番号 2 の 2 3 3 位から 2 8 5 位のアミノ酸に相当するコドンの少なくとも1つが終止コドンに変異している、及び

(i i) の内在性遺伝子に含まれる核酸において、配列番号 4 の 2 3 3 位から 2 8 5 位のアミノ酸に相当するコドンの少なくとも1つが終止コドンに変異している、

のいずれか片方、あるいは、双方の要件を具備する、態様 1 のタバコ植物。

10

[態様 3]

(i) 及び (i i) の双方の内在性遺伝子を有する、態様 1 又は 2 のタバコ植物。

[態様 4]

(i) の内在性遺伝子、及び / 又は (i i) の内在性遺伝子がホモ接合体である、態様 1 - 3 のいずれか 1 項に記載のタバコ植物。

[態様 5]

(i) の内在性遺伝子に含まれる核酸において、配列番号 2 の 2 7 9 位のアミノ酸に相当するコドンが終止コドンに変異している、態様 1 - 4 のいずれか 1 項に記載のタバコ植物。

[態様 6]

20

(i i) の内在性遺伝子に含まれる核酸において、配列番号 4 の 2 8 5 位のアミノ酸に相当するコドンが終止コドンに変異している、態様 1 - 5 のいずれか 1 項に記載のタバコ植物。

[態様 7]

(i i) の内在性遺伝子に含まれる核酸において、配列番号 4 の 2 3 3 位のアミノ酸に対応するコドンが終止コドンに変異している、態様 1 - 5 のいずれか 1 項に記載のタバコ植物。

[態様 8]

(i) の内在性遺伝子に含まれる核酸において、配列番号 2 の 2 7 9 位のアミノ酸に相当するコドンが終止コドンに変異しており、かつ、

30

(i i) の内在性遺伝子に含まれる核酸において、配列番号 4 の 2 3 3 位又は 2 8 5 位のアミノ酸に相当するコドンが終止コドンに変異している、態様 1 - 6 のいずれか 1 項に記載のタバコ植物。

[態様 9]

(i) の内在性遺伝子に含まれる核酸において、核酸によってコードされる配列番号 2 の 1 6 3 位に相当するアミノ酸がグリシンである、態様 1 - 8 のいずれか 1 項に記載のタバコ植物。

[態様 1 0]

(i i i) 配列番号 8 又は配列番号 8 と少なくとも 9 5 % の同一性を有するアミノ酸配列であって、前記アミノ酸配列の 2 3 1 位の相当するアミノ酸がプロリンであるアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む核酸、をコード領域として含む内在性遺伝子、をさらに含む、態様 1 - 9 のいずれか 1 項に記載のタバコ植物。

40

[態様 1 1]

以下の (a) - (c) のうち、1 以上の性質を有する、

(a) 対照と比較して、硝酸含量が低減している、

(b) 対照と比較して、亜硝酸含量が同等である、

(c) 対照と比較して、アミノ酸含量が増加する、

ここにおいて、対照は、配列番号 2 のアミノ酸配列を有するポリペプチド、及び、配列番号 4 のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む、タバコ植物である、

態様 1 - 1 0 のいずれか 1 項に記載のタバコ植物。

50

[態様 1 2]

対照と比較して、硝酸含量が少なくとも 80% 低減している、態様 1 1 に記載のタバコ植物。

[態様 1 3]

突然変異体である、又は、遺伝子改変体である、態様 1 - 1 2 のいずれか 1 項に記載のタバコ植物。

[態様 1 4]

前記タバコ植物が、ニコチアナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*) である、態様 1 - 1 3 のいずれか 1 項に記載のタバコ植物。

[態様 1 5]

配列番号 2 又は配列番号 2 と少なくとも 95% の同一性を有するアミノ酸配列において、233 位から 285 位の間のアミノ酸残基から C 末端のアミノ酸残基までのアミノ酸配列が欠如したポリペプチドをコードする塩基配列をコード領域として含む内在性遺伝子、及び

配列番号 4 又は配列番号 4 と少なくとも 95% の同一性を有するアミノ酸配列において、233 位から 285 位の間のアミノ酸残基から C 末端のアミノ酸残基までのアミノ酸配列が欠如したポリペプチドをコードする塩基配列をコード領域として含む内在性遺伝子、のいずれか片方、あるいは、双方の内在性遺伝子を有するタバコ植物。

[態様 1 6]

タバコ植物において、

(i) 配列番号 2 又は配列番号 2 と少なくとも 95% の同一性を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む核酸、をコード領域として含む内在性遺伝子において、前記アミノ酸配列に対応するコドンの少なくとも 1 つが終止コドンとなるように変異を導入する、及び/又は

(i i) 配列番号 4 又は配列番号 4 と少なくとも 95% の同一性を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む核酸、をコード領域として含む内在性遺伝子において、前記アミノ酸配列に対応するコドンの少なくとも 1 つが終止コドンとなるように変異を導入することを含む、態様 1 - 1 4 のいずれか 1 項に記載のタバコ植物の作成方法。

[態様 1 7]

(i) 配列番号 2 又は配列番号 2 と少なくとも 95% の同一性を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列において、前記アミノ酸配列に対応するコドンの少なくとも 1 つが終止コドンに変異している塩基配列を含む核酸、をコード領域として含む内在性遺伝子、及び

(i i) 配列番号 4 又は配列番号 4 と少なくとも 95% の同一性を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列において、前記アミノ酸配列に対応するコドンの少なくとも 1 つが終止コドンに変異している塩基配列を含む核酸、をコード領域として含む内在性遺伝子、のいずれか片方、あるいは、双方の内在性遺伝子を有するタバコ植物を選抜する、ことを含む、態様 1 - 1 4 のいずれか 1 項に記載のタバコ植物の作成方法。

[態様 1 8]

さらに、硝酸含量が減少したタバコ植物を選抜する、ことを含む、態様 1 6 又は 1 7 に記載の方法。

[態様 1 9]

態様 1 - 1 4 のいずれか 1 項に記載のタバコ植物から収穫された葉たばこ。

[態様 2 0]

態様 1 9 記載の葉たばこから生成された、乾燥葉。

[態様 2 1]

態様 2 0 記載の乾燥葉から製造された、カットフィルター、粉末、シート、中骨、顆粒、又は抽出物。

[態様 2 2]

10

20

30

40

50

態様 20 に記載の乾燥葉、及び/又は、態様 21 に記載のカットフィルター、粉末、シート、中骨、顆粒、若しくは抽出物を含む、たばこ製品。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0024

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0024】

核酸に含まれる塩基配列は、配列番号 2 又は配列番号 2 と少なくとも 95% の同一性を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列であってもよい。あるいは、配列番号 4 又は配列番号 4 と少なくとも 95% の同一性を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列であってもよい。一態様において、前記同一性は、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、又は少なくとも 99% である。

10

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0039

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0039】

一態様において、(i) の内在性遺伝子に含まれる核酸において、1 塩基置換によるナンセンス変異により、配列番号 2 の 233 位、235 位、238 位、246 位、251 位、253 位、254 位、255 位、258 位、273 位、278 位、279 位、280 位又は 285 位のアミノ酸に相当するコドンの少なくとも 1 つ が終止コドンに変異している。

20

【手続補正 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0040

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0040】

一態様において、(i) の内在性遺伝子に含まれる核酸において、1 塩基が挿入されることによりフレームシフトが生じ、翻訳されうるアミノ酸配列の先頭から 233 位、235 位、238 位、240 位、241 位、242 位、244 位、245 位、247 位、251 位、258 位、278 位、279 位、280 位、281 位又は 285 位のアミノ酸に相当するコドンの少なくとも 1 つ が終止コドンに変異している。

30

【手続補正 6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0041

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0041】

一態様において、(i) の内在性遺伝子に含まれる核酸において、1 塩基が欠失することにより、配列番号 1 に記載の CDS 配列の 794 - 796 番目の塩基が T A G、815 - 817 番目の塩基が T A G になることによって、配列番号 2 の 265 位、272 位のアミノ酸に相当するコドンが終止コドンに変異している。

40

【手続補正 7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0042

【補正方法】変更

【補正の内容】

50

【 0 0 4 2 】

一態様において、(i i) の内在性遺伝子に含まれる核酸において、1塩基置換によるナンセンス変異により、配列番号4の233位、235位、238位、246位、251位、253位、254位、255位、258位、273位、278位、279位、280位又は285位のアミノ酸に相当するコドンの少なくとも1つが終止コドンに変異している。

【 手続補正 8 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 0 0 4 3

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 0 0 4 3 】

一態様において、(i i) の内在性遺伝子に含まれる核酸において、1塩基が挿入されることによりフレームシフトが生じ、翻訳されうるアミノ酸配列の先頭から233位、235位、238位、240位、241位、242位、244位、245位、247位、251位、258位、278位、279位、280位、281位又は285位のアミノ酸に相当するコドンの少なくとも1つが終止コドンに変異している。

【 手続補正 9 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 0 0 4 4

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 0 0 4 4 】

一態様において、(i i) の内在性遺伝子に含まれる核酸において、1塩基が欠失することにより、配列番号3に記載のCDS配列の794 - 796番目の塩基がTAG、815 - 817番目の塩基がTAGになることによって、配列番号4の265位、272位のアミノ酸に相当するコドンが終止コドンに変異している。

【 手続補正 1 0 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 0 0 5 8

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 0 0 5 8 】

ここで、配列番号2又は4のアミノ酸配列（これらと少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含む）において、233位から285位の間のアミノ酸残基からC末端のアミノ酸残基までのアミノ酸配列が欠如したポリペプチドは、配列番号2又は4のアミノ酸配列において、233位から285位の間のアミノ酸残基からC末端のアミノ酸残基までのアミノ酸配列を含まないポリペプチドであってよい。即ち、当該ポリペプチドは、「配列番号2又は4のアミノ酸配列における、233位から285位の間のアミノ酸残基からC末端のアミノ酸残基までのアミノ酸配列を含まないが、フレームシフトによって生じた配列番号2又は4のアミノ酸配列以外のアミノ酸配列をC末端領域として含むポリペプチド」を含みうる。

【 手続補正 1 1 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 0 0 5 9

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 0 0 5 9 】

配列番号2又は4のアミノ酸配列（これらと少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含む）において、233位から285位の間のアミノ酸残基からC末端のアミノ

10

20

30

40

50

酸残基までのアミノ酸配列が欠如したポリペプチドは、配列番号 2 又は 4 のアミノ酸配列の 2 3 3 位から 2 8 5 位のアミノ酸に相当するコドンの少なくとも 1 つが終止コドンに変異している態様、及び / 又は、配列番号 1 又は 3 に記載の C D S 配列の 6 9 7 番目から 8 5 5 番目までの核酸配列における塩基の欠失又は挿入によりフレームシフトが生じている態様、であってよい。

【手続補正 1 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 7 1

【補正方法】変更

【補正の内容】

10

【0 0 7 1】

一態様において、前記タバコ植物は、対照と比較して、硝酸含量が好ましくは、少なくとも 5 0 %、少なくとも 5 5 %、少なくとも 6 0 %、少なくとも 6 5 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 5 % 減少している。一態様において、前記タバコ植物は、対照と比較して、硝酸含量が少なくとも 8 0 % 低減している。

【手続補正 1 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 7 3

【補正方法】変更

【補正の内容】

20

【0 0 7 3】

「対照と比較して、亜硝酸含量が同等である」とは、非限定的に、対照と比較して、亜硝酸の増減が、3 0 % 以下、2 8 % 以下、2 5 % 以下、2 3 % 以下、2 0 % 以下、1 8 % 以下、1 5 % 以下であることを意味する。一態様において、「対照と比較して、亜硝酸含量が同等である」とは、非限定的に、対照と比較して、亜硝酸の増加が、3 0 % 以下、2 8 % 以下、2 5 % 以下、2 3 % 以下、2 0 % 以下、1 8 % 以下、1 5 % 以下であることを意味する。

【手続補正 1 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 7 6

【補正方法】変更

【補正の内容】

30

【0 0 7 6】

一態様において、前記タバコ植物は、対照と比較して、含有するアミノ酸が、少なくとも 1 . 1 倍、1 . 3 倍、1 . 4 倍、1 . 5 倍、1 . 8 倍、2 倍増加する。アミノ酸の増加量に特に上限はない。一態様において、前記タバコ植物は、対照と比較して、含有するアミノ酸の増加量は、4 倍以下、3 . 5 倍以下、3 倍以下、2 . 8 倍以下、2 . 5 倍以下、2 . 2 倍以下である。一態様において、前記タバコ植物は、対照と比較して、含有するアミノ酸が、1 . 1 倍 ~ 4 倍、1 . 3 倍 ~ 3 . 5 倍、1 . 4 倍 ~ 3 倍、1 . 5 倍 ~ 2 . 5 倍増加する。一態様において、前記タバコ植物は、対照と比較して、含有するアミノ酸が、約 2 倍増加する。

40

【手続補正 1 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 7 9

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 7 9】

「対照と比較して、個体の生長が本質的に同等である」とは、植物体の高さ、葉の数、葉の大きさなど、個体のサイズ（成長）、マス（mass）（例えば、地上葉乾物重（バ

50

イオマス))、及び開花の時期等が実質的に同程度であることを意味する。非限定的に、例えば高さを比較した場合に、その差が20%以内、15%以内、10%以内、5%以内であることを意味する。

【手続補正16】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0080

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0080】

例えば、本明細書の実施例4で示したように、前記タバコ植物は、配列番号2又は4のアミノ酸配列からなる硝酸還元酵素を含み、タバコ植物である対照とラミナ重量が同等であった。実施例5において、NtNIA1の変異対立遺伝子のピラミディング(遺伝子変異の集積)を行った場合にも、タバコ生育に影響がなかった。

10

【手続補正17】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0089

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0089】

目的とする位置に終止コドンを含む遺伝子改変体、又は突然変異体の選択は、非限定的に、例えば、タバコ植物よりゲノムDNAを抽出し、PCR等により増幅し、そして、配列番号2又は4に相当するアミノ酸配列をコードするDNAの塩基配列を解析することによって行うことができる。その他に、SSCP(Single strand conformation Polymorphism)法を用いて配列の違いを電気泳動の距離の違いで検出する方法、T7 Endonuclease Iなどを用いてミスマッチ部位を切断することにより変異の有無を検出する方法、などから選択が可能である。

20

【手続補正18】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0121

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0121】

(3)配列解析

PCR産物のシーケンス反応に先立ち、PCR産物の精製はExoSAP-IT(登録商標) For PCR Product Clean-UP(Affymetrix)を用いて添付のプロトコルを参考に行った。シーケンス反応は、BigDye Terminator v.3.1 cycle sequencing kit(Thermo Fisher Scientific)を用い、キット添付の方法で反応させることにより行った(94 30秒、96 10秒/50 5秒/60 2分x25サイクル)。その後、BigDye X Terminator(商標) Purification Kit(Thermo Fisher Scientific)を用い、キット添付の方法でDNAを精製した(サンプル当たり、SAM Solutionを45µl、XTerminater 10µlを加えて、30分振とう後、1000g、2分間遠心)。Applied Biosystems(登録商標)3730 DNA Analyzer(Thermo Fisher Scientific)で配列情報を入手し、シーケンスアセンブリソフトウェアATGC(GENETYX)で解析した。

30

40

【手続補正19】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0138

【補正方法】変更

50

【補正の内容】

【0138】

(5) 遊離アミノ酸分析

「(2) 分析サンプルの調製」で調製した乾燥粉末0.4gに20mlの80%メタノール溶液(V/V)を加えて混合し、30分間超音波処理した。処理した溶液を遠心分離(3000rpm×5分)した。遠心分後の上清をHPLC分析装置(Agilent 1290 infinity)、分析カラム(Agilent ZORBAX Eclipse AAA 3.5um、3.0×150mm)、ガードカラム(Agilent ZORBAX Eclipse AAA 5um、4.6×12.5mm 4/PK)を用いて、移動相A:40mMリン酸緩衝液、移動相B:45%アセトニトリル・45%メタノール水溶液、グラジエント:有の条件で分析した。HoHoと対照であるWWについてのみ、19種の遊離アミノ酸を分析した。

10

【手続補正20】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0150

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0150】

(8) 葉中硝酸の日周変動

実施例2で得られたLine2のF3系統のHoHo個体、WW個体を「(1)栽培」に記載の通り栽培した。移植20日後の明期開始1時間、3時間後、5時間後、10時間半後、暗期開始4時間後、8時間後に、葉をサンプリングした。サンプリングのタイミングは、それぞれ、早朝、午前中半ば、昼前、日没1.5時間前、日没4時間後、日没8時間後に相当する。「(3)硝酸分析」、「(4)亜硝酸分析」に記載の通り、ラミナの硝酸及び亜硝酸を定量した。結果を図5、図6に示す。HoHoのラミナの硝酸濃度は昼夜を問わずWWに比べて低かった(図5)。また、ラミナの亜硝酸濃度は、昼夜を問わず、HoHoとWW間でほとんど同レベルであった(図6)。

20

【手続補正21】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0163

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0163】

Line1及びLine2由来のHoHo及びWWを、一般的なたばこ耕作法に従い、圃場にて栽培した。移植後54日の植物の写真を図9に示す(Line1)。

30

【手続補正22】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0169

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0169】

両者を交配して得たF2集団から、ホモ接合性のNtCLCa-Sの変異対立遺伝子とヘテロ接合性のNtCLCa-T変異対立遺伝子、ヘテロ接合性のNtNIA1変異対立遺伝子を保持するF2植物を選抜した。なお、選抜したF2植物は2つの遺伝子NtEGY1及びNtEGY2の劣性対立遺伝子を保持する二重ホモ接合体である。この劣勢対立遺伝子はフレームシフト変異を伴っており、パーレータイプのタバコにおけるクロロフィル欠乏及び低い窒素利用効率の原因と考えられている(BMC genomics, (2017) 18(1), 1-14)

40

【手続補正23】

【補正対象書類名】明細書

50

【補正対象項目名】 0 1 7 3

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 0 1 7 3 】

移植後 20 日の植物から実施例 3 に記した方法で葉をサンプリングし、乾燥させたのちに硝酸態窒素含量を分析した (n = 6)。結果を表 6 に示す (p 値は遺伝子型 H o H o W と各遺伝子型との間の両側検定の値である)。

【手続補正 2 4】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 1 7 6

10

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 0 1 7 6 】

また、移植後 20 日の植物の写真を図 1 0 に示す。N t C L C a - S 及び N t C L C a - T の変異対立遺伝子を有するタバコ植物への上記 N t N I A 1 の変異対立遺伝子のピラミディングはタバコ植物の生育に影響しなかった。

20

30

40

50