

(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
2018年8月9日(09.08.2018)



(10) 国際公開番号

WO 2018/143480 A1

- (51) 国際特許分類:
A01H 1/00 (2006.01) *C12N 5/04* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2018/004103
- (22) 国際出願日: 2018年1月31日(31.01.2018)
- (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 2017-015371 2017年1月31日(31.01.2017) JP
- (71) 出願人: 日本たばこ産業株式会社 (JAPAN TOBACCO INC.) [JP/JP]; 〒1058422 東京都港区虎ノ門2丁目2番1号 Tokyo (JP). 国立研究開発法人 理化学研究所 (RIKEN) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢2番1号 Saitama (JP). 公立大学法人 首都大学東京 (TOKYO METROPOLITAN UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1630926 東京都新宿区西新宿二丁目3番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 加藤 紀夫 (KATO, Norio); 〒4380802 静岡県磐田市東原700番地 日本たばこ産業株式会社 植物イノベーションセンター内 Shizuoka (JP). 市川 雅子 (ICHIKAWA, Masako); 〒4380802 静岡県磐田市東原700番地 日本たばこ産業株式会社 植物イノベーションセンター内 Shizuoka (JP). 岡本 龍史 (OKAMOTO, Takashi); 〒1920397 東京都八王子市南大沢1-1 首都大学東京 南大沢キャンパス内 Tokyo (JP). 古磯 成美 (KOISO, Narumi); 〒1920397 東京都八王子市南大沢1-1 首都大学東京 南大沢キャンパス内 Tokyo (JP). 木羽 隆敏 (KIBA, Takatoshi); 〒3510198 埼玉県和光市広沢2番1号 国立研究開発法人理化学研究所内 Saitama (JP). 戸田 絵梨香 (TODA, Erika); 〒3510198 埼玉県和光市広沢2番1号 国立研究開発法人理化学研究所内 Saitama (JP).
- (74) 代理人: 小野 新次郎, 外 (ONO, Shinjiro et al.); 〒1000004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル 206区 ユアサハラ法律特許事務所 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, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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:
一 国際調査報告 (条約第21条(3))
一 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: METHOD FOR INTRODUCING SUBSTANCE INTO PLANT

(54) 発明の名称: 植物に物質を導入する方法

(57) Abstract: The present invention relates to a method for introducing a substance into a plant. The method involves introducing a substance into plant gametes that have incomplete cell walls.

(57) 要約: 本発明は、植物に物質を導入する方法に関する。本発明の方法は、細胞壁形成が不完全である植物生殖細胞に対し、物質を導入することを含む。



WO 2018/143480 A1

明細書

発明の名称： 植物に物質を導入する方法

技術分野

[0001] 本発明は植物に物質を導入する方法に関する。

背景技術

[0002] 植物、特に単子葉植物への遺伝子組換え技術は、1990年代にアグロバクテリウムを利用した方法がイネ、トウモロコシで開発されたことを契機に急速に利用が普及した。現在までに様々な形質転換方法が開発されてきている。しかしながら、それらの多くは、植物組織の脱分化と再分化を経由することが必要であるが故に、種や品種間で形質転換の効率が大きく異なることが知られている。種や品種によっては形質転換の効率が低く、再現性をもって形質転換植物を得ることができない。例えば、トウモロコシにおいて育種上非常に重要な系統であるB73では、効率よく形質転換植物が得られる一般的な形質転換法はいまだ開発されていない。

[0003] また、近年効率的にゲノム編集を行うことが可能になりつつあるが、これも作物種、品種ごとに組織培養の容易性が異なる点が、ゲノム編集効率に大きな影響を与えるため、実用化の妨げとなっている。

[0004] 一方、1990年代に、植物体から精細胞と卵細胞を単離し、それらを人工的に融合させる人工受精 (*in vitro*受精) が試みられ、植物体の作出に成功している。非特許文献1には、トウモロコシの卵細胞及び精細胞を電気融合して受精卵細胞 (*in vitro*受精卵) を作出し、それを植物体にまで培養する方法が記載されている。非特許文献1では卵細胞の分離に高濃度の植物組織分解酵素の混合物を用いている。また、非特許文献2には、イネの雌雄配偶子の電気融合により、受精卵細胞を作出し、それを植物体にまで培養する方法が記載されている。植物の人工受精 (*in vitro*受精系) は、受粉前の花からの配偶子細胞 (卵細胞及び精細胞

)の単離、単離した細胞の融合(受精)、融合細胞(受精卵)の培養の3つのステップからなる。成功例として代表的なものは、トウモロコシ(非特許文献1)及びイネ(非特許文献2)であり、コムギ、タバコでも数例の報告がある。一般的に、卵細胞は、受粉前の子房を切断すること、あるいは、セルラーゼやペクチナーゼ等の植物組織分解酵素で処理した子房又は胚珠を顕微鏡下で分解することで得られ、精細胞は適当な浸透圧溶液中で花粉をバーストさせることで得られる。次に、それら雌雄の配偶子をガラスキャピラリーで融合用ドロップに移す。配偶子細胞の融合法については、電氣的融合(非特許文献1、2)、カルシウムイオンによる融合(非特許文献3)、ポリエチレングリコール融合(非特許文献4、5)の3種の方法が報告されている。しかしながら、受精卵細胞が胚へと成長して植物体にまで再生することが報告されているのは、電氣的融合により作出した受精卵細胞についてのみである(非特許文献1、2)。これら先行文献には、人工的に雌雄配偶子を融合させた受精卵細胞から植物体の誘導が可能であることが示されている。しかしながら、受精卵細胞への遺伝子導入や形質転換といった点は全く記載されておらず、*in vitro*受精卵細胞を用いて形質転換が行えるかどうかは全く不明であった。

[0005] トウモロコシ(非特許文献6)、イネ(非特許文献7)、コムギ(非特許文献8)、オオムギ(非特許文献9、11)、タバコ(非特許文献10)などの種において、受精後の子房や胚珠から受精卵細胞をとりだして培養し、植物体を作成した例も知られている。トウモロコシ、オオムギに関する非特許文献6、11は、受精卵細胞にDNAをマイクロインジェクション法により導入したことを記載している。しかしながら、受精卵細胞を対象としたマイクロインジェクション法による植物形質転換法が実用化された事実は報告されていない。また、そのほかの方法による遺伝子導入については全く知見がない。

[0006] マイクロインジェクション法は細胞壁を有する細胞にも遺伝子導入が可能で

あり、導入対象の植物細胞の細胞壁を植物組織分解酵素処理等により除去する必要は特にない。しかし、一回の導入操作で一細胞しか扱えないという欠点があり、多数の植物細胞を用いた中～大規模な遺伝子導入実験には不向きである。また、顕微鏡下での複雑な操作を要し、熟練した技術を必要とするため、実用化は困難であった。他に細胞に遺伝子を導入する方法としては、マイクロインジェクション法以外にポリエチレングリコール法 (polyethylene glycol: PEG法)、ペプチド法 (非特許文献12)、エレクトロポレーション法、アグロバクテリウム法などがある。エレクトロポレーション法、ペプチド法やPEG法、特にPEG法は、マイクロインジェクション法に比べ手法が簡便であり、一回に多数の細胞を扱える利点がある。しかしながら、植物の細胞は細胞壁を有していることから、特にPEG法やエレクトロポレーション法を行う際には、セルラーゼやペクチナーゼ、プロテアーゼ、ヘミセルラーゼなどの植物組織分解酵素で組織及び細胞を処理、細胞壁を溶解し、細胞をプロトプラスト化するのが一般的である。このことから、これまで上記の方法では葉、培養細胞、カルスなどの大量にプロトプラストを得ることができる材料が対象となっている (非特許文献13、14)。

[0007] 一方、葉、培養細胞、カルスなどと異なり、受精卵細胞は、作出や単離に手間がかかり、大量にプロトプラストを得られない。また、受精直前の卵細胞や精細胞は電気処理やカルシウム溶液添加など融合処理をしなければ分化を開始しない。またそのような *in vitro* 受精系で得られた受精卵細胞については、前記の融合処理のような人工的受精操作により細胞に何らかの損傷が発生している可能性が考えられている。さらに、受精卵細胞については、細胞壁除去後に細胞分裂を継続し植物体に成長できるような細胞活性を維持した状態で、細胞壁を受精卵細胞から除去する方法が不明であった。このような事情から、卵細胞、精細胞や受精卵細胞については遺伝子を導入する対象として相応しくないと推察されており、PEG法等の方法により

遺伝子導入を行い、細胞分裂にまで至らせた報告はなされていなかった。

先行技術文献

特許文献

[0008] [特許文献1] 特開2016-63785 (特許文献1)

非特許文献

[0009] [非特許文献1] Kranz E. and Loerz H., (1993), *Plant Cell* 5:739-746.

[非特許文献2] Uchiyumi, T. et al., (2007), *Planta* 226:581-589.

[非特許文献3] Faure, J. E. et al., (1994), *Science* 263:1598-1600.

[非特許文献4] Sun, M. X. et al., (1995), *Acta Bot Sin* 36:489-493.

[非特許文献5] Tian, H. Q. and Russell, S. D. (1997), *Plant Cell Rep* 16:657-661.

[非特許文献6] Leduc, N. et al., (1996), *Developmental Biology* 177:190-203.

[非特許文献7] Zhang, J. et al., (1999), *Plant Cell Reports* 19:128-132.

[非特許文献8] Kumlehn, J. et al., (1997), *Plant Cell Reports* 16:663-667.

[非特許文献9] Holm, P. B. et al., (1994), *The Plant Cell* 6:531-543.

[非特許文献10] Yuchi, H. E. et al., (2004)

Chinese Science Bulletin 49: 810-814

[非特許文献11] Holm, P. B. et al., (2000),
Transgenic Research 9: 21-32.

[非特許文献12] Laksmanan, M. et al., (2012),
Biomacromolecules 14, 10-16.

[非特許文献13] Yoo, S. D. et al. (2007), Nature
Protocol 2: 1565-1572.

[非特許文献14] Zhai, Z. et al. (2009), Plant
Physiol. 149: 642-652.

[非特許文献15] Kranz, E. et al., (1995), Plant
Journal 8: 9-23.

[非特許文献16] Toda, E. et al., (2016), Plant
Physiology 171: 206-214.

[非特許文献17] Koiso, N. et al., (2017), Plant
Direct 1:e00010

[非特許文献18] Hiei, Y. and Komari, T., (2008). Nature
Protocols 3: 824-834.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] 本発明は、植物に物質を導入する方法、本発明の方法によって物質が導入された植物を提供することを目的とする。

[0011] 受精卵細胞は本来、植物体へと成長する能力を保有した細胞であり、それゆえ、種、品種間差によって生じる培養効率の影響を受けないことが期待される。接合

子である受精卵細胞、あるいは、配偶子である卵細胞又は精細胞を対象に物質の導入を行えば、現状より幅広い種、作物に例えば形質転換、ゲノム編集などの処理を行うことが可能になる。本発明者らは鋭意検討の結果、植物組織分解酵素処理を行うことなく受精卵細胞に対し物質を導入可能である方法を発見した。さらに、単離した受精卵細胞を培養する方法を組み合わせることにより、植物組織分解酵素処理を行うことなく受精卵細胞に対し物質を導入し、分裂を誘導し、形質転換が可能であることを見出し、本発明を想到した。

課題を解決するための手段

[0012] 限定されるわけではないが、本発明は以下の態様を含む。

[0013] [態様 1]

細胞壁形成が不完全である植物生殖細胞に物質を導入する、ことを含む、植物に物質を導入する方法。

[0014] [態様 2]

物質の導入の前に、単離した植物生殖細胞に対し植物組織分解酵素による処理を行わない、態様 1 に記載の方法。

[0015] [態様 3]

細胞壁形成率が 65% 以下である、態様 1 又は 2 に記載の方法。

[0016] [態様 4]

植物生殖細胞が、受精卵細胞である、態様 1 に記載の方法。

[0017] [態様 5]

(1 - i) 植物の卵細胞と精細胞とを融合して受精卵細胞を作出する、あるいは

(1 - i i) 植物の受精卵細胞を含む組織から受精卵細胞を単離する、

ことにより、受精卵細胞を取得し、

(2) 得られた受精卵細胞に物質を導入する、

ことを含む、態様1－4のいずれか1項に記載の方法。

[0018] [態様6]

(1－i)の卵細胞と精細胞との融合を電気融合により行う、態様5に記載の方法。

[0019] [態様7]

受精卵細胞の取得から、120分以内に工程(2)の物質導入を行う、態様5又は6に記載の方法。

[0020] [態様8]

受精卵細胞の取得から、60分以内に工程(2)の物質導入を行う、態様5又は6に記載の方法。

[0021] [態様9]

(1－i)の卵細胞と精細胞との融合を自然受精法により行う、態様5に記載の方法。

[0022] [態様10]

受精卵細胞の取得から、360分以内に工程(2)の物質導入を行う、態様5又は9に記載の方法。

[0023] [態様11]

受精卵細胞の取得から、240分以内に工程(2)の物質導入を行う、態様5又は9に記載の方法。

[0024] [態様12]

(1) 植物の卵細胞及び精細胞のいずれか若しくは両方に物質を導入する、そして、
(2) 工程(1)を経た卵細胞と精細胞とを融合して受精卵細胞を作出する、
ことを含む、態様1－4のいずれか1項に記載の方法。

[0025] [態様 1 3]

(1) の卵細胞と精細胞との融合を電気融合または自然受精法により行う、態様 1 2 に記載の方法。

[0026] [態様 1 4]

物質導入が、PEG法又はエレクトロポレーション法を用いて行われる、態様 1-1 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

[0027] [態様 1 5]

植物が、単子葉植物である、態様 1-1 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

[0028] [態様 1 6]

植物が、トウモロコシ、コムギ、オオムギ、イネ及びソルガムからなる群から選択される、態様 1 5 に記載の方法。

[0029] [態様 1 7]

態様 1-1 6 のいずれか 1 項に記載の方法で得られた、物質導入植物。

発明の効果

[0030] 従来、電気融合処理等により *in vitro* で作成した受精卵細胞では、PEG法による形質転換は適さない、と思われていた。本発明では、「細胞壁形成が不完全である植物生殖細胞」を利用することにより、細胞に対する植物組織分解酵素処理を行わずに、物質の導入、形質転換及び培養を行うことができる。本発明により、従来培養が困難等の理由で形質転換が困難であったため有用形質を付与することができなかった植物体であっても、安定して再現性良く形質転換体を得ることが可能となる。

図面の簡単な説明

[0031] [図 1] 図 1 は、イネ花から単離した卵細胞（上段）及び精細胞（下段）の光学顕微鏡写真である。

[図2] 図2は、図1の卵細胞及び精細胞の融合の過程と、作出された受精卵細胞 (*in vitro* 受精卵細胞) の光学顕微鏡写真である。

[図3] 図3は、PEG法によるGFP核酸導入後、分裂を開始したイネ受精卵細胞の蛍光顕微鏡写真である。図3Aは、配偶子融合の24時間後に蛍光観察(左)及び明視野観察(右)を行ったものである。図3Bは、配偶子融合の2日後に蛍光観察(左)及び明視野観察(右)を行ったものである。

[図4] 図4は、GFP核酸導入を行ったイネ受精卵細胞由来の細胞塊の蛍光及び光学顕微鏡写真である。配偶子融合後、18日後に蛍光観察(左)及び明視野観察(右)を行った。受精卵から蛍光が継続して観察されるのものと(A)、蛍光が検出されなくなるものが観察された(B)。

[図5] 図5は、GFP核酸導入を行ったイネ受精卵細胞由来の細胞塊から発生したシュートの光学顕微鏡写真である。

[図6] 図6は、図5の細胞塊から発生したシュート由来の幼植物体である。

[図7] 図7は、GFPプラスミド導入処理1日後のイネ受精卵におけるプラスミド量を示した図である。核酸導入処理を行ったものをPEG処理+として表示し、蛍光顕微鏡による観察にてGFPの蛍光が認められたものをGFPシグナル+として表した。

[図8] 図8は、GFP核酸導入処理を行ったトウモロコシ受精卵 (*in vitro*) 及び当該受精卵細胞由来の細胞塊の蛍光顕微鏡写真(上段)、光学顕微鏡写真(下段)及びそのマージ(中段)である。

[図9] 図9は、DsRed2形質転換イネ由来受精卵及びゲノム編集核酸導入処理を行ったDsRed2形質転換イネ受精卵細胞由来の細胞塊の蛍光顕微鏡写真(各上段)及び光学顕微鏡写真(各下段)である。配偶子融合処理を行い作出した

D s R e d 2 形質転換イネ由来受精卵細胞を培養した細胞（ゲノム編集核酸導入無し）をAに、配偶子融合処理を行い作出したD s R e d 2 形質転換イネ受精卵細胞にゲノム編集核酸（プラスミドDNA）導入処理を行い、培養した細胞をBに示す。ゲノム編集核酸導入処理を行ったD s R e d 2 形質転換イネ受精卵では、D s R e d 2 の蛍光が消光したことが示された。

[図10] 図10は、GFP及びD s R e d 2 の2種類の核酸導入処理を行ったイネ卵細胞の蛍光顕微鏡写真（左及び中央）及び光学顕微鏡写真（右）である。核酸導入処理の24時間後にGFP蛍光観察（左）、RFP蛍光観察（中央）および明視野観察（右）を行った。

発明を実施するための形態

[0032] 本発明は、植物に物質を導入する方法に関する。

[0033] 本発明の方法は、細胞壁形成が不完全である植物生殖細胞に物質を導入する、ことを含む。

[0034] 一態様において、当該方法は、

(1-i) 植物の卵細胞と精細胞とを融合して受精卵細胞を作出する、あるいは

(1-ii) 植物の受精卵細胞を含む組織から受精卵細胞を単離する、

ことにより、受精卵細胞を取得し、

(2) 得られた受精卵細胞に物質を導入する、

ことを含む。

[0035] 一態様において、当該方法は、

(1) 植物の卵細胞及び精細胞のいずれか若しくは両方に物質を導入する、そして

(2) 工程(1)を経た卵細胞と精細胞とを融合して受精卵細胞を作出する、

ことを含む。

[0036] 植物

植物の種類は特に限定されるものではない。双子葉植物及び単子葉植物のいずれでもよく、好ましくは単子葉植物である。さらに好ましくは、イネ科植物であり、より好ましくは、トウモロコシ、コムギ、オオムギ、イネ、ソルガム、ライムギ等であり、最も好ましくは、トウモロコシ、コムギ、イネである。

[0037] 本発明の方法は、限定されるわけではないが、特に、「難培養」とされる植物あるいは品種に用いることが可能である。「難培養」とは、培養が困難、具体的には、例えば、植物体から単離された細胞の培養が困難、脱分化等の処理によるカルスの形成や、カルスからの植物体への再分化が困難である、ことを意味する。

[0038] 一般的に双子葉植物よりも単子葉植物の方が培養困難だが、「難培養」の植物は、例えば、大豆、インゲンマメ、トウガラシ等を含む。難培養品種とは、同じ種の一般的な研究用品種（トウモロコシならA188など）と比べ、培養が困難である品種を意味する、例えば、トウモロコシのB73及びB73を由来に持つトウモロコシのエリート品種、コムギのエリート品種（例えばAC BarrieやTAMなど）、オオムギのGolden PromiseとIgrri以外の品種、ソルガムの296B、C401、SA281、P898012、Pioneer 8505、Tx430以外の品種などが挙げられる。

[0039] 植物生殖細胞

本発明の方法は、植物の生殖細胞に物質を導入する。

[0040] 生殖細胞は、生殖において遺伝情報を次世代へ伝える役割を持つ細胞で、多細胞生物を構成する細胞のうち、体細胞以外の細胞をいう。本明細書において、「生殖細胞」は、卵細胞（「卵」、「卵子」ともいう）、精細胞（「精子」ともいう）を含む、有性生殖のための配偶子、並びに、配偶子の接合の結果によって出来た細胞である接合子（「接合体」ともいう）、植物の場合は、受精によって形成される受精卵細胞を含む

。

[0041] 生殖細胞は、受精卵細胞、卵細胞、精細胞のいずれであってもよい。好ましくは受精卵細胞である。非限定的に、受精卵細胞は、あるいは、受粉・受精前の植物体から卵細胞及び精細胞を単離したのち、それらを融合させて作出及び取得したものが好ましい。あるいは、受精卵細胞は、植物の胚嚢を含む組織から単離される受精した卵細胞である、即ち、植物体の段階で受粉・受精させ、該植物体から単離した受精卵細胞、であってもよい。なお、非限定的に、本発明は遺伝子導入・組換えによる形質転換、ゲノム編集などのための植物細胞への物質導入、特に遺伝子導入を目的とするため、半数体である受精前の精細胞及び卵細胞より、倍数体でありゲノム配列が決定した受精卵細胞を用いるほうが好ましい。

[0042] 本明細書において「卵細胞」とは、雌ずいの中において、胚嚢母細胞の減数分裂により形成される雌性配偶子を意味する。卵細胞の単離方法は限定されないが、例えば、適切な浸透圧の溶液中において子房を切断し、その切断面から出てきた卵細胞を顕微鏡下においてガラスキャピラリーを用いて単離することができる。

[0043] 本明細書において「精細胞」とは、雄ずいの葯の中において、花粉母細胞の減数分裂により形成される雄性配偶子を意味する。精細胞の単離方法は限定されないが、例えば、適切な浸透圧の溶液に葯から採取した花粉を浸すと、数分後には、花粉から精細胞を含む花粉内容物が溶液中に放出されるので、顕微鏡下においてガラスキャピラリーを用いて精細胞を単離することができる。

[0044] 本明細書において「受精卵細胞」とは、精細胞と卵細胞とが融合した細胞を意味する。

[0045] なお、本明細書において植物の生殖細胞は、雄ずい又は雌ずいから単離された精細胞又は卵細胞、それら単離された細胞を融合させた受精卵細胞、若しくは雌ずいから単離された受精卵細胞を示す。

[0046] 受精卵細胞の取得方法

本発明の一態様において、植物の卵細胞と精細胞を *in vitro* で融合して受精卵細胞を作出してもよい。即ち、植物体より先ず卵細胞と精細胞を単離し、電気融合法等の公知の方法により、*in vitro* で受精卵細胞を作出することが可能である（配偶子融合ともいう）。

[0047] 電気融合法は、電気刺激により2種又は2種以上の細胞を *in vitro* で融合する方法である。具体的には、本明細書においては、適切な浸透圧の溶液中において単離した卵細胞及び精細胞に、電気パルスを加えることで細胞融合を引き起こし、受精卵細胞を作出することができる。

[0048] 電気融合により細胞融合を行う場合、電圧、電極間距離等の条件は、植物の種類又は細胞の大きさ等に応じて当業者が適宜決めることができる。例えば、特開2016-63785（特許文献1）に記載の条件を適用することができる。

[0049] 精細胞と卵細胞とを電気融合により1つの融合細胞（受精卵細胞）を作製する際、直流電圧は、下限を10kV以上にすることが好ましく、11kV以上にすることがより好ましく、12kV以上にすることがさらに好ましい。また、上限を17kV以下にすることが好ましく、16kV以下にすることがより好ましく、15kV以下にすることがさらに好ましい。上限と下限は、当業者がそれぞれ適宜選択することができる。

[0050] また、電極間距離は、下限を、融合させる卵細胞と精細胞の直径の和の1.5倍以上にすることが好ましく、2倍以上にすることがより好ましく、2.5倍以上にすることがさらに好ましく、3倍以上にすることが最も好ましい。また、上限を6倍以下にすることが好ましく、5倍以下にすることがより好ましく、4倍以下にすることがさらに好ましい。上限と下限は、当業者がそれぞれ適宜選択することができる。細胞の直径を測定する方法としては、顕微鏡に装着した測微接眼レンズを用いて直

径を測定する方法や、顕微鏡で撮影した画像をコンピュータに取り込み、画像解析ソフトウェアで測定する方法がある。

[0051] さらに、電極間距離は、当業者が適宜選択することができる。例えば、下限を $80\ \mu\text{m}$ 以上とすることが好ましく、 $90\ \mu\text{m}$ 以上とすることがより好ましく、 $100\ \mu\text{m}$ 以上とすることがさらに好ましい。また、上限を $240\ \mu\text{m}$ 以下とすることが好ましく、 $220\ \mu\text{m}$ 以下とすることがより好ましく、 $200\ \mu\text{m}$ 以下とすることがさらに好ましい。上限と下限は、当業者がそれぞれ適宜選択することができる。

[0052] 精細胞と卵細胞を電気融合して1つの融合細胞を作製する際に用いる溶液の浸透圧は、用いる植物の種類に応じて適宜選択可能である。例えば、イネでは下限を $380\ \text{mosmol/kg H}_2\text{O}$ 以上とすることが好ましく、 $390\ \text{mosmol/kg H}_2\text{O}$ 以上とすることがより好ましく、 $400\ \text{mosmol/kg H}_2\text{O}$ 以上とすることがさらに好ましい。また、上限を $470\ \text{mosmol/kg H}_2\text{O}$ 以下とすることが好ましく、 $460\ \text{mosmol/kg H}_2\text{O}$ 以下とすることがより好ましく、 $450\ \text{mosmol/kg H}_2\text{O}$ 以下とすることがさらに好ましい。トウモロコシでは、下限を $500\ \text{mosmol/kg H}_2\text{O}$ 以上とすることが好ましく、 $530\ \text{mosmol/kg H}_2\text{O}$ 以上とすることがさらに好ましい。また、上限を $700\ \text{mosmol/kg H}_2\text{O}$ 以下とすることが好ましく、 $680\ \text{mosmol/kg H}_2\text{O}$ 以下とすることがさらに好ましい。上限と下限は、当業者がそれぞれ適宜選択することができる。

[0053] あるいは、卵細胞と精細胞の細胞融合には、カルシウム融合法、PEG融合法等の他の公知の細胞融合方法を用いてもよい。「カルシウム融合法」は、カルシウム濃度依存的に細胞膜の融合が生じやすくなる、という細胞膜の性質を利用するものである。「PEG融合法」は、細胞をポリエチレングリコール (polyethylene glycol、PEG) で処理することによって細胞膜が結合し、PEGを取り除

くと細胞が融合することを利用するものである。

[0054] あるいは、自然受精法により植物体において受精卵細胞を作出し、作成された受精卵細胞を植物体から取得してもよい。自然受精法を用いた受精卵細胞の取得方法は、例えば、柱頭を露出させ、花粉を付着させ受粉させたのち、胚嚢を含む組織から受精卵細胞を単離する方法である。植物体からの受精卵細胞の単離は、受粉後の植物体から受精直後の子房を取り出し、適切な浸透圧の溶液中においてその子房を切断し、その切断面から出て来た受精卵細胞を顕微鏡下においてガラスキャピラリー等を用いて単離することができる。あるいは、酵素溶液で子房又は胚珠を一定時間処理した後、例えば、ガラス針等を用いて顕微鏡下において珠心等の組織を解剖し摘出、単離することもできる。なお、本明細書において自然受精法とは、人工的に柱頭に花粉を付着させる人工交配であってもよいし、自然交配であってもよい。

[0055] 物質の導入

本発明の植物に物質を導入する方法は、「細胞壁形成が不完全である植物生殖細胞に物質を導入する、工程」を含む。

[0056] 本発明において、植物に導入される物質は、標的とする細胞内に供給可能なサイズ及び性状の物質をいう。天然に存在するものであってもよく、或いは人為的に製造されたものであってもよい。例としては種々の生体分子や、化合物が挙げられる。生体分子としては、例えば、核酸、タンパク質、ペプチド、多糖、脂質、細胞小器官などが挙げられる。一態様として、物質は、核酸、タンパク質及びペプチドからなる群から選択される。

[0057] 核酸は特に限定されず、RNA、DNA、両者の結合体、混合物であってもよい。好ましくはベクターのような環状DNA、直鎖DNA、環状RNA又は直鎖RNAである。使用される形質転換方法に応じた任意の長さのものを使用可能である。例えば、核酸の長さは、好ましくは100kb以下、より好ましくは、50kb以下

である。さらに好ましくは30 kb以下、特に好ましくは20 kb以下、もっとも好ましくは10 kb以下である。また、染色体のような核酸及びタンパク質の複合体であつてもよい。

[0058] ゲノム編集のためのCas9ヌクレアーゼ等ヌクレアーゼや、修飾酵素、抗体等のタンパク質も導入しうる。タンパク質の大きさは、非限定的に、好ましくは分子量300 kDa以下、より好ましくは200 kDa以下、さらに好ましくは150 kDa以下である。

[0059] ペプチドは、決まった順番で様々なアミノ酸が、アミド結合（「ペプチド結合」ともいう）つながった分子の総称で、一般にタンパク質よりも長さが短い。好ましくは、100 a. a. 以下、より好ましくは、50 a. a. 以下である。

[0060] 「多糖」は、グリコシド結合によって単糖分子が2個以上重合した物資の総称である。例えば、でんぷんなどのように構成単位となる単糖とは異なる性質を示すようになる。例えば、デンプン（アミロース、アミロペクチン）、グリコーゲン、セルロース、キチン、アガロース、カラギーナン、ヘパリン、ヒアルロン酸、ペクチン、キシログリカン、グルコマンナンなどが含まれる。

[0061] 「脂質」は、生物から単離される水に溶けない物質の総称である。特定の化学的、構造的性質ではなく、溶解度によって、定義される。生化学的定義では、「長鎖脂肪酸あるいは炭化水素鎖を有する、生物体内存在するまたは生物由来の分子」である。(i) アルコールと脂肪酸のみがエステル結合してできる、単純脂質（アシルグリセロール、セラミド等）、(ii) 分子中にリン酸や糖を含む脂質で、一般にスフィンゴシン若しくはグリセリンが骨格となる、複合脂質（リン脂質、糖脂質、リポタンパク質等）、並びに、(iii) 単純脂質や複合脂質から、加水分解によって誘導される疎水性化合物である、誘導脂質（脂肪酸、テンペノイド、ステロイド、カロテノイド等）、などが含まれる。

[0062] 「細胞小器官」は、細胞の内部で特に分化した形態や機能を有する構造の総称で、細胞内器官、オルガネラ、と呼ばれることもある。一態様として、核、小胞体、ゴルジ体、エンドソーム、リソソーム、ミトコンドリア、葉緑体、ペルオキシソーム等の生体膜に囲まれた構造体が含まれる。さらに、細胞骨格や、中心小体、鞭毛、繊毛といった非膜系のタンパク質の超複合体からなる構造体も含まれる。さらにまた、核小体、リボソーム等も含まれる。

[0063] 生体分子以外の金属イオンや化合物なども、「物質」に含まれる。2種類以上の核酸、タンパク質、ペプチド、多糖及び脂質等や、金属イオンや化合物等の物質を組み合わせて導入してもよい。例えば、核酸は、2種類以上のDNA又はRNAでも、DNAとRNAの組み合わせでもよい。核酸とタンパク質など異なる種の物質を同時に、または複合体として導入してもよい。

[0064] また、導入する物質の性状に応じて導入用の担体に担持または含有させて供給してもよい。ここで担体とは外来物質を細胞内に供給するための媒体（運搬体）をいう。例えば、リポソーム、金属（金、タングステン等）や無機物（例えばシリコン化合物）から成る粒子やウィスカー、アルギン酸ビーズ、ウイルス性物質（例えばコートタンパク質）が挙げられる。また、細胞への物質導入を促進する物質を同時に供給してもよい。例えば、フィブロネクチンなどのタンパク質、ペプチド、キレート化合物（例えばEDTA）、無機微小構造物（例えばナノ構造シリカ）が挙げられる。

[0065] 物質を植物に導入する方法は、植物に所望の物質を導入することのできる公知の方法ならば特に限定されず、植物の種類に応じて適宜選択することができる。例えば、ポリエチレングリコール法（PEG法）、電トロポレーション法、パーティクルガン法、マイクロインジェクション法、ウィスカー法などの物理化学的方法（DNAの直接導入法）あるいはアグロバクテリウム法などの生物学的方法（DNAの間接導入法）を好ましく用いることができる。好ましくは直接導入法、さらに好ましく

はPEG法又はエレクトロポレーション法である。

[0066] PEG法とは、プロトプラストにポリエチレングリコール（PEG）を作用させて、DNA等物質を植物細胞内部に取り込ませる方法であるが、この物質取り込みの仕組みはまだ良く分かっていない。PEG法については、例えば、非特許文献13などに記載されているように、公知のプロトコールに従って実施することができる。非限定的にPEG濃度は、10%～30%とすることができる。

[0067] エレクトロポレーション法は、細胞懸濁液に電気パルスをかけることで細胞膜に微小な穴を空け、細胞懸濁液中のDNAを細胞内部に送り込む方法である。なお、植物細胞を材料とする場合には、細胞壁を分解除去したプロトプラストを用いるのが一般的である。エレクトロポレーション法による物質の導入については、公知のプロトコールに従って実施することができ、使用する植物材料によって当業者が適宜選択することが可能であるが、例えば以下のような条件が挙げられる。

[0068] エレクトロポレーション法による細胞への電気パルスを与える操作は、キューベット電極等の電極容器内で行われる。電極は、例えば白金、金、アルミニウム等の金属からなり、電極間距離は、例えば、約0.5mm、約1mm、約2mm、約4mm、約10mmから当業者が適宜選択することができる。

[0069] 電圧については、電極間距離1mm当たりの下限として、例えば、5V以上、10V以上、20V以上、30V以上、40V以上、50V以上から、電圧の上限は、例えば、5000V以下、1000V以下、500V以下、100V以下から当業者が適宜選択することができる。電圧は、単回のパルスでも、複数回のパルスでもよい。複数回の場合は、例えば、2回、3回、4回、5回、6回、7回、8回、9回、10回、15回等のパルスとして電圧をかけることができる。各パルス間の間隔は、約0.5ないし約500msec、好ましくは約5ないし約250msec、より好ましくは約10ないし約150msec、さらに好ましくは約40ないし120m

secである。また、これらの間隔で複数回のパルスをかけた後、1 secないし10 sec、2 secないし8 sec、3 secないし5 sec後に、再度同程度、または電圧の異なるパルスをかけてもよい。さらに、複数のパルスに分けてかける場合、各パルスの大きさは同じであっても、異なってもよい。なお、各パルスの時間の下限は、0.01 msec以上、0.1 msec以上、1 msec以上から選択してもよく、そしてその上限は、15 msec以下、10 msec以下、5 msec以下、3 msec以下から選択してもよい。

[0070] エレクトロポレーション法に用いる溶液は、従来から植物を対象として行われていたエレクトロポレーション法に用いられていたものであってもよい。例えば、PBS、HEPES、MESを緩衝剤としたKCl、NaCl、CaCl₂などの無機塩が含まれた溶液や、アスパラギン酸カリウム塩、グルコン酸カルシウム塩、グルタミン酸カリウム塩などの有機塩が含まれた溶液が挙げられる。また、動物の細胞や組織に対してエレクトロポレーション法を行う際に用いられている溶液も使用できる。例えば、Thermo Fisher Scientific社製Opti-MEM培地などである。溶液の浸透圧は、用いる植物の種類に応じて適宜選択可能である。例えば、イネでは下限を380 mosmol/kg H₂O以上とすることが好ましく、390 mosmol/kg H₂O以上とすることがより好ましく、400 mosmol/kg H₂O以上とすることがさらに好ましい。また、上限を470 mosmol/kg H₂O以下とすることが好ましく、460 mosmol/kg H₂O以下とすることがより好ましく、450 mosmol/kg H₂O以下とすることがさらに好ましい。トウモロコシでは、下限を500 mosmol/kg H₂O以上とすることが好ましく、530 mosmol/kg H₂O以上とすることがさらに好ましい。また、上限を700 mosmol/kg H₂O以下とすることが好ましく、680 mosmol/kg H₂O以下とすることがさらに好ましい。

[0071] 導入する物質の濃度はこれに限定されるわけではないが、 $1\text{ ng}/\mu\text{L}$ から $2000\text{ ng}/\mu\text{L}$ 、好ましくは $10\text{ ng}/\mu\text{L}$ から $1000\text{ ng}/\mu\text{L}$ 、より好ましくは $20\text{ ng}/\mu\text{L}$ から $500\text{ ng}/\mu\text{L}$ である。

[0072] PEG法、エレクトロポレーション法では、2種類以上のDNA等物質を懸濁液中に溶解し、植物細胞存在下でPEG添加又は電気パルスをかけることにより、複数種類の物質の導入または共形質転換を行うことができる。

[0073] なお、物質の導入については、例えば核酸を細胞に導入し、その核酸がゲノムに組み込まれ安定的に保持されるような導入であってもよく、ゲノム編集の際のgRNA及びCas9タンパク質のように、細胞内にて恒常的、安定的に保持がされず、ある一時期においてのみ保持されるような、一時的な導入であってもよい。

[0074] 細胞壁形成が不完全である植物生殖細胞

本発明の植物に物質を導入する方法において、「細胞壁形成が不完全である植物生殖細胞」に核酸、タンパク質及びペプチドからなる群から選択される物質を導入する。

[0075] 本発明は、「細胞壁形成が不完全である植物生殖細胞」を利用することにより、物質の導入の前に、単離した植物生殖細胞に対し植物組織分解酵素による処理を行わない、行う必要がない、ということの特徴の1つとする。

[0076] 植物組織分解酵素とは、植物組織及び細胞周辺のペクチン、セルロース、ヘミセルロース、そのほかのマトリックス多糖、リン脂質、タンパク質等に直接あるいは間接的に作用して分解する酵素の総称である。例えば、ペクチナーゼ、セルラーゼ、プロテアーゼ、ヘミセルラーゼ類等及びそれらの混合物が挙げられる。しかし、それら植物組織分解酵素による植物細胞の処理は、細胞の生存率に悪影響を与える場合があり、植物組織培養の困難性の原因の一つとなることがあった。本発明において、植物細胞に対する植物組織分解酵素処理を行わずに、培養、物質の導入及び形質転換

を行うことが可能となったことにより、従来培養が困難等の理由で形質転換が困難であったため有用形質を付与することができなかった植物体であっても、安定して再現性良く形質転換体を得ることが可能である。

[0077] なお、本明細書において、「単離した植物生殖細胞に対する植物組織分解酵素による処理」とは、植物生殖細胞をPEG法など遺伝子導入等のためのプロトプラスト化処理を目的に行う処理を含み、単に、子房など胚嚢を含む組織から植物生殖細胞を単離することのみを目的に行う処理（通常は、非常に低い濃度の酵素溶液を用いる）は含まないことが望ましい。単に、植物生殖細胞の単離のために非常に低い濃度の酵素溶液を用いるような態様は、本発明に含まれる。具体的には、卵細胞の単離のために、胚珠や珠心に植物組織分解酵素を添加する処理を行い、単離した卵細胞に精細胞を融合させ受精卵細胞を得たあと、PEG法や電ポレーション法により物質を単離した受精卵細胞に導入するような場合や、自然受精法により植物体内において作出した受精卵細胞を胚珠や珠心から単離する目的のみのために植物組織分解酵素を処理し、受精卵細胞を単離したあと、PEG法や電ポレーション法により物質を単離した受精卵細胞に導入するような場合については、本発明に含まれる。

[0078] 「細胞壁形成が不完全である細胞」とは、植物体細胞のように原形質連絡以外の細胞のほぼすべてが細胞壁で囲まれている細胞ではなく、細胞の一部あるいは全部が細胞壁に囲まれていない細胞である。細胞壁形成が不完全である植物生殖細胞は、卵細胞、精細胞を含む、有性生殖のための配偶子を含む。あるいは、受精によって形成される受精卵細胞であって、細胞壁形成が開始していない、あるいは、細胞壁形成が開始しているがまだ完了しておらず、不完全である状態の受精卵細胞を含む。好ましくは、細胞壁形成が不完全である受精卵細胞である。

[0079] 植物生殖細胞の細胞壁形成は、例えば、カルコフロールによるセルロース染色、アニリンブルー染色等の公知の方法で確認することができる。カルコフロールは

、植物細胞、真菌等の細胞壁に含まれるセルロースやキチンと結合する非特異的蛍光染料である。励起は300～440 nm（最大355 nm）であり、0.1 M リン酸緩衝液 pH 7.0 中のセルロースの最大蛍光は、433 nmである。非限定的に、例えば、共焦点レーザー走査顕微鏡を用いて蛍光輝度を測定することができ、また蛍光強度の画像解析を行い、積算輝度を求めることができる。

[0080] 「細胞壁形成率」とは、非限定的に、例えば、植物細胞の細胞壁形成が完全に終了し、細胞全体が細胞壁で覆われている状態の細胞の輝度と比較した場合の、輝度の比率で表現することができる。「細胞壁形成が不完全である」とは、非限定的に、細胞壁形成率が、好ましくは80%以下、より好ましくは70%以下、さらに好ましくは65%以下、さらにより好ましくは63%以下、特に好ましくは60%以下、特にさらに好ましくは50%以下、最も好ましくは30%以下である、ことを意味する。

[0081] 本発明の一態様において、植物生殖細胞として受精卵細胞を用いることができる。その場合、(1-i) 植物の卵細胞と精細胞とを融合して受精卵細胞を作出する、あるいは、(1-ii) 植物の受精卵細胞を含む組織から受精卵細胞を単離する、ことにより、受精卵細胞を取得した後に、(2) 得られた受精卵細胞に物質を導入する。

[0082] 卵細胞は、受精前は通常/body cellとは異なる状態の細胞壁を有し、卵細胞と精細胞とが融合するとはじめて完全な細胞壁が形成される。細胞壁が形成されると物質導入処理を行うために細胞壁を除去する必要がある。よって、物質導入操作は、受精後速やかに、細胞壁の形成完了前に行うことが好ましい。例えば、トウモロコシおよびイネにおいては、受精から20分程度で細胞壁の形成が始まり（非特許文献15、16）、約2時間程度でその形成が完了するとされているため、2時間（120分）以内に物質導入を行うことが好ましい。また、自然受精法により植物体内で作出した受精卵細胞を胚珠等から単離する場合も、受精卵細胞の単離後速やかに物質導入操作

を行うことが好ましい。

[0083] 但し、自然受精法により植物体内で受精卵細胞を作出する場合は、単離卵細胞と精細胞の融合の場合とは異なり、花粉管が柱頭に付着してから実際に植物体内で受精が行われ受精卵細胞が形成されるまでに時間がかかる。よってこの場合、受精直後の受精卵細胞を得る方法として、受粉から受精までの時間帯を特定し、受精後その特定した時間帯に受精卵細胞を摘出することが好ましい。例えば、事前に受粉した花粉の花粉管の伸長速度を継時的にアニリンブルー等の染色液を用いた蛍光観察を行えば、受粉から受精までの時間を推定することが可能である。そのようにして推定した受粉から受精まで時間（受精卵形成までの時間）を鑑みた上で、当該受精卵細胞の細胞壁の形成が完了するまでの時間帯において物質導入操作を行うことが好ましい。

[0084] 受精卵細胞の細胞壁形成が完了するまでの時間は、植物品種によって異なる。本発明の方法においては、「細胞壁形成が不完全である細胞」、即ち、受精卵細胞の細胞壁形成が完了する前の細胞に物質を導入する。当業者は、受精卵細胞取得から物質導入完了までの時間を、植物品種の種類に応じて適宜決定することができる。例えばイネ、トウモロコシでは、単離した卵細胞及び精細胞の融合処理による受精卵細胞取得後、非限定的に、180分以内、好ましくは、150分以内、より好ましくは120分以内、さらに好ましくは60分以内、より好ましくは20分以内に、物質導入を行うことが好ましい。特にトウモロコシでは、受精卵細胞取得後、120分以内、好ましくは60分以内、より好ましくは20分以内である。

[0085] また、例えばイネ、トウモロコシでは、自然受精法による受粉（交配）処理後、非限定的に、6時間以内、5時間以内、4時間以内、好ましくは360分以内、240分以内、180分以内、さらに好ましくは120分以内、より好ましくは60分以内に、物質導入を行う。

[0086] あるいは、卵細胞と精細胞の接合を行う前に、卵細胞及び精細胞のいずれか

若しくは両方に物質を導入し、その後、卵細胞と精細胞とを融合して受精卵細胞を作出してもよい。好ましくは、卵細胞に物質を導入する。

[0087] カルス又は胚様体（胚的細胞塊）化・再分化

本発明の、植物に物質を導入する方法は、物質を導入する工程の後に、さらに、物質を導入した受精卵細胞をカルス化又は胚様体（胚的細胞塊ともいう）化し；そして、上記カルス化又は胚様体化した組織を再分化培地で再分化させる、ことを含んでもよい。

[0088] カルス化又は胚様体化工程、及び、再分化工程は特に限定されず、受精卵細胞から植物体を再生するための公知の方法を利用することが可能である。

[0089] カルス化又は胚様体化工程において、得られた物質導入受精卵細胞を培養して、胚様体又はカルスを形成させる。受精卵細胞を分裂誘導し細胞増殖させ、カルス又は胚様体を形成させる工程は、植物によって最適条件が異なるため特に限定されないが、F e e d e r細胞を加えた、ナースカルチャー法が好ましい。例えば、次のように行うことができる。

前処理：物質導入受精卵細胞を、マンニトール液滴（450 m o s m o l / k g H₂O）の中に入れて洗浄し、無菌化を行う。

液体培地での培養：培地に物質導入受精卵細胞を移し、一晩静置した後、穏やかに振とう培養する。振とう速度は、30～50 r p mが好ましく、35～45 r p mがより好ましい。培養の温度は、24～28℃が好ましく、25～27℃がより好ましい。培養は暗下で行うことが好ましい。この時、培地にはフィーダー細胞を加え共培養（ナースカルチャー法）を行うことが好ましい。この培養期間は、4～14日が好ましく、5～10日がより好ましい。

培地：2, 4-ジクロロフェノキシ酢酸、ナフタレン酢酸などのオーキシンを添加した、液体のMS培地（T. M u r a s h i g e e t a l., P h y s i o l. P

lant., 15, 473 (1962)), B5培地 (O. L. Gamborg et al., Experimental Cell Research, 50, 151-158 (1968)), N6培地 (Chu et al., Sci. Sinica, 18, 659-668 (1975)) 等である。

[0090] 培地にはインドール-3-酢酸、2, 4-Dやダイカンバ等のオーキシン類が添加されることが好ましい。オーキシンの添加濃度は、0.1~3.0 mg/Lが挙げられるが、0.1~0.3 mg/Lが好ましく、0.15~0.25 mg/Lがより好ましい。

フィーダー細胞：公知のフィーダー細胞を用いることが可能である。例えば、イネ浮遊細胞培養物 (Line Oc、理研バイオリソースセンター製) や、トウモロコシのナース細胞 (Mol et al., 1993)、非形態形成型細胞培養物 (nonmorphogenic cell suspension: Kranz et al., 1991) などが挙げられる。

[0091] この工程によって、培養開始から4~14日後、直径50~200 μm 程度の球状の胚様体が形成される。

[0092] 再分化工程も公知の再分化工程に従い実施することができる。例えば、一例として、以下のように行うことが可能である。

培養：球状の胚様体を、フィーダー細胞を加えていない前記培地に移し、さらに10~14日程度培養する。その後、オーキシンを添加しない任意の培地、例えばMS培地に入れて培養し植物体を形成させる。この際、培養は光を照射して行うことが好ましく、光は、例えば、50~180 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$ が好ましく、70~150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{sec}$ がより好ましい。

培地：例えばMS培地、B5培地、N6培地であって、アガロース、寒天やゲランガム、ゲルライト等を使用した固体培地などが挙げられる。

[0093] 物質導入植物

本発明はさらに、本発明の方法によって得られた、物質導入植物も含む。なお、本発明以前は、特に「難培養」とされる植物や品種について、物質導入植物を得ることは困難あるいは不可能であった。本発明により、このような植物、品種についても簡便な方法で効率良く物質導入植物を得ることが可能になる。

[0094] また、本発明の方法によって得られた物質導入植物とは、プラスミドや遺伝子配列断片などの核酸、ゲノム編集などのためのタンパク質、ペプチドが導入され植物内に保持されている植物だけではなく、物質、特に遺伝子の導入により得られた形質転換植物や、Cas9やガイドRNA等ゲノム編集関連物質の導入によりゲノム編集された植物、及びそれらの後代、クローン等を含む。

実施例

[0095] 以下、実施例に基づいて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。当業者は本明細書の記載に基づいて容易に本発明に修飾・変更を加えることができ、それらは本発明の技術的範囲に含まれる。

[0096] 実施例1 イネの卵細胞及び精細胞の単離

本実施例において、イネの花からの卵細胞及び精細胞の単離を行った(図1)。

[0097] 卵細胞の単離は以下のように行った。イネの穂から得た未開花の花を解体して子房を採取し、3mLの6%マンニトール溶液(370mosmol/kg H₂O)が入った3.5cmプラスチックシャーレの中に子房を入れた。新しい3.5cmプラスチックシャーレ中の3mLの6%マンニトール溶液(370mosmol/kg H₂O)に柱頭を除去した子房を沈めて、シャーレの底でレーザーブレード(フェザー安全カミソリ(株)、FA-10)により子房の下部を切断した。顕微鏡観察により切断部から出てくる卵細胞を確認し、マイクロキャピラリーで卵細胞を単離した。30~40個の子房からおよそ10~15個の卵細胞が得られた。各卵細胞の直径

は40～50 μ mであった。単離した卵細胞は、マイクロキャピラリーを用いカバーガラス上の液滴中に移動した。

[0098] なお、カバーガラス上の液滴は以下の方法で作成した。

1) カバーガラス(20mmX40mm)の周囲を、2%ジクロロメチルシランを含む1, 1, 1-トリクロロエタン溶液に浸し、乾燥させる；

2) 当該カバーガラス中央部分に0.2-0.3mLのミネラルオイル(Embryo Culture-tested Grade, シグマアルドリッチ社製、1001279270)を載せる；そして、

3) 当該ミネラルオイル内に1～2 μ Lの6%マンニトール液(370mosmol/kg H₂O)をマイクロピペットで挿入する。

[0099] 精細胞の単離は以下のように行った。イネの穂から得た未開花の花を解体して葯を採取し、3mLの6%マンニトール溶液(370mosmol/kg H₂O)が入った3.5cmプラスチックシャーレに入れた。葯をマンニトール溶液に沈めたのち、ピンセットで葯を分解することにより、花粉がマンニトール溶液に散在させた。数分後、花粉がバーストし、精細胞を含む内容物がマンニトール溶液中に放出された。各精細胞の直径は8～10 μ mであった。この精細胞を、マイクロキャピラリーを用いてカバーガラス上の液滴中に移動した。

[0100] 実施例2 配偶子融合によるイネ受精卵細胞の作出

本実施例では、電気融合による配偶子融合にて、*in vitro*でイネの受精卵細胞(イネの*in vitro*受精卵細胞)を作出した(図2)。

[0101] カバーガラス上の液滴中に、実施例1に示した方法により単離した精細胞と卵細胞を1個ずつ移動した。その後、それら細胞を電極(ネッパジーン(株) CUY 5100-100Ti)上に、交流下(1MHz、0.4kV/cm、ネッパジーン(株) ECFG21)で並べた。当該液滴中に、液滴の半量～等量のマンニトール溶

液 (520 mosmol/kg H₂O) をマイクロキャピラリーで加えた。その後、DCパルス (50 μs、12–15 kV/cm、電極間距離50–150 μm) をかけることで、配偶子を融合させ、受精卵細胞を作出した。

[0102] 実施例3 イネ受精卵細胞への核酸導入

本実施例では、実施例2で作出したイネの *in vitro* 受精卵細胞に核酸を導入した。

[0103] 実施例2で作出した受精卵細胞を、配偶子融合処理から120分時点で物質の導入が完了するように、本実施例に沿って処理を行った。作出した受精卵細胞をMMG溶液 (15mM MgCl₂、4mM MES (pH5.7)、450 mosmol/kg H₂O マンニトール) の液滴 (約2 μL) に移動し、その後MMGに導入する塩基配列、35Sプロモーター::シグナル配列::GFP::小胞体残留シグナル (HDEL)::ノスターミネーターを含むプラスミド (GFP発現用のプラスミドDNA、約6,000 bp) を加えた液滴に移動した。なお、当該プラスミドは非特許文献17の記載に従って調整した。次に受精卵細胞を含む液滴とPEG溶液 (12.5mL マンニトール溶液 (450 mosmol/kg H₂O) に、7.5gのPEG4000、2.5mLの1M塩化カルシウムを加え蒸留水で25mgになるように調整) の液滴 (約2 μL) を混ぜ、ガラスキャピラリーで30~50回攪拌した。

[0104] 実施例4 イネ受精卵細胞の培養

本実施例では、実施例3で核酸を導入したイネ受精卵細胞を培養した。

[0105] 実施例3で得た核酸導入受精卵細胞を培養するため、受精細胞用培地を用意した。受精細胞用培地は、改変型N6Z培地 (Kumlehn J. et al. (1998) *Planta* 205:327–333) に以下の改変を加えたものである; 2g/L CHU (N6) basal salt mixture (シグマアル

ドリッチ社製)、0.025mg/L $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.025mg/L $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.025mg/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、0.01mg/L レチノール、0.01mg/L カルシフェロール、0.01mg/L ビオチン、1mg/L チアミン・ H_2O 、1mg/L ニコチン酸、1mg/L ピリドキシ
ン・ HCl 、1mg/L 塩化コリン、1mg/L Ca -パントテン酸、0.2mg/L リボフラビン、0.2mg/L 2,4-D、0.02mg/L コバラ
ミン、0.02mg/L *p*-アミノ安息香酸、0.4mg/L 葉酸、2mg/L ア
スコルビン酸、40mg/L リンゴ酸、40mg/L クエン酸、40mg/L フ
マル酸、20mg/L Na -ピルビン酸、1,000mg/L グルタミン、及び
250mg/L カゼイン加水分解物、100mg/L ミオイノシトール。浸透圧
はグルコースで450mosmol/kg H_2O に調整 (pH5.7) し作成した
。作成した受精細胞用培地 (0.2mL) を直径12mmのMillicell C
Mインサート (ミリポア社製) 内に入れ、2mLの培地の入った3.5cmプラスチ
ックシャーレの中に入れた。さらに、40-60 μL のイネ浮遊細胞培養物 (Line
Oc、理研バイオリソースセンター製) をフィーダー細胞としてシャーレに加え
た。

[0106] 洗浄・滅菌したマイクロキャピラリーを用い、核酸導入受精卵細胞を新鮮なマ
ンニトール液滴 (450mosmol/kg H_2O) 中に投入し、その後、受精細
胞用培地の入ったCMインサート内のメンブレン上に移した。

[0107] 核酸導入受精卵細胞は、暗所に26°Cで1日間静置したのち、蛍光顕微鏡で
観察し、GFPの蛍光の有無で導入した核酸の発現状況及び細胞の分裂状況を確認し
た。その結果を図3Aに示す。核酸導入受精卵細胞には、確かにGFPによる発光が
観察されたため、核酸導入が確認できた。さらに、それら受精卵細胞を2日間振盪培
養したのちに観察したところ、初期胚への分裂が確認され、さらには初期胚細胞中の

GFPによる発光も観察できた(図3B)。これにより、胚的細胞塊の細胞群においても、受精卵細胞に導入した核酸が保持されていることが確認できた。

[0108] それら初期胚を、さらに暗所約16日間振盪培養し、胚的細胞塊を得た。この際、培養開始後5~7日後に、培養液からフィーダー細胞を除いた。培養18日後の胚的細胞塊を観察したところ、GFPによる発光が検出される細胞塊(図4A)と、蛍光が検出されなくなった細胞塊(図4B)が観察された。これにより、受精卵から細胞塊のステージまでGFPの発現が続く場合と、受精卵から初期胚のステージで一過的にGFPが発現される場合の2通りのケースがあることは示された。また、1週間以上培養を継続した胚的細胞塊においても蛍光が観察されたことから、受精卵に導入した核酸により形質転換され安定的に蛍光タンパク質が生産されていることが確認された。以上の結果より、本発明の方法によって、遺伝子が植物に導入され、一過的又は安定的に発現可能であることが示された。

[0109] 実施例5 イネ胚的細胞塊の培養による分化誘導

本実施例では、実施例4で得られたイネ胚的細胞塊の培養による分化誘導を行った。

[0110] 実施例4で得られたイネ胚的細胞塊について、分化誘導培地1(改変したMS培地;MS塩、MSビタミン、100mg/L ミオイノシトール、2g/L カサミノ酸(casamino acid)、30g/L スクロース、30g/L ソルビトール、0.2mg/L 1-ナフタレン酢酸(NAA)、1mg/L カイネチン及び0.3% Gelrite)に移した。培養は30°Cで持続的に光照射しながら行った。移植10日後にはシュートが分化した(図5)。さらに、シュートを分化させた胚的細胞塊を分化誘導培地2(改変したMS培地;MS塩、MSビタミン、100mg/L ミオイノシトール、30g/L スクロース及び0.3% Gelrite)に移した。培養は30°Cで持続的に光照射しながら行った。移植7日後には幼

植物体が得られた（図6）。なお、当該幼植物体は、非特許文献18の記載に従って再分化させた。

[0111] 実施例6 融合後の時間と物質導入効率の関係

本実施例では、酵素処理なしでPEG法により物質導入が可能な受精卵のステージについて調べた。受精卵のステージは、電気融合後の経過時間を指標とした。実施例1及び2に従い電気融合を用いて作出したイネ受精卵細胞について、所定の時間経過後、実施例3で用いたGFP発現用のプラスミドDNAを導入し、実施例4のとおり核酸導入を確認した。核酸の導入が確認された受精卵細胞について、その後実施例4の条件で培養を継続し、初期胚への分裂を確認した。その結果を表1に示す。結果より、配偶子融合後5-20分と120分時点での物質導入では導入効率に差が認められなかった。配偶子融合後5-20分と120分の時点で物質導入効率に差がなかったことから、物質導入は、受精卵細胞作成時の電気融合の影響によるものではなく、PEG法によるものであることが理解される。なお、240分経過後では核酸の導入は低効率で確認されたが、受精卵の分裂には至らなかった。

[0112] [表1]

| 配偶子融合後 経過時間(分) | 受精卵数 | 導入確認数 | 分裂確認受精卵数 |
|-------------------|------|-------|----------|
| 5-20 | 34 | 16 | 15 |
| 60 | 7 | 4 | 3 |
| 120 | 18 | 8 | 8 |
| 240 | 6 | 1 | 0 |

[0113] 実施例7 細胞壁形成度の測定

本実施例では、イネ受精卵細胞の細胞壁形成度の測定を行った。

[0114] 実施例2に記載したように、電気融合後2時間経過時の受精卵細胞及び細胞壁が十分に発達したステージにあると推察される電気誘導後20時間後の受精卵細胞に0.005%カルコフロール染色を行い、共焦点レーザー走査顕微鏡を用い、蛍光

輝度を測定した。それぞれ3細胞について画像解析を行い積算輝度を求め比較したところ、受精後2時間後の細胞壁から検出されたカルコフロールによる蛍光輝度は、20時間後の受精卵細胞と比較し、63%程度であることが確認された。

[0115] 実施例8 核酸導入処理イネ受精卵細胞中における相対的プラスミド量の推定

本実施例では、イネ受精卵細胞にプラスミド核酸を導入し、細胞中における相対的プラスミド量を推定した。

[0116] 実施例1-3に従い、配偶子の電気融合によりイネ受精卵細胞を作出し、PEG法による核酸導入を行った。ただし、電気融合処理から10分-1時間後に、35Sプロモーター：：シグナル配列：：GFP：：小胞体残留シグナル(HDEL)：：ノスターミネーターを含むプラスミド(GFP発現用のプラスミドDNA、約6,000bp)DNAを用い、融合処理から120分までに物質の導入が完了するように処理を行った。その後、実施例4に従い当該受精卵細胞を培養し、蛍光顕微鏡でGFP由来の蛍光を観察したのち、マイクロキャピラリーを用いて各受精卵細胞を一個ずつ10 μ Lの定量PCR溶液中に移した。この際、定量PCR溶液としてLightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche Applied Science)を、プライマーはプラスミド中のSP-GFP-ERを増幅する特異的プライマー(5'-TCTAGAATGGTGAGCAAGGGCGAG-3'、5'-TGGTGCAGATGAACTTCAGG-3')を用いた。PCR反応サイクルは94 $^{\circ}$ C10秒、55 $^{\circ}$ C10秒、72 $^{\circ}$ C10秒で行い、遺伝子導入処理をしていない受精卵細胞を対照として、受精卵細胞内の相対的プラスミド量を推定した。その結果を図7に示す。

[0117] 図7に示された通り、蛍光顕微鏡でGFP由来の蛍光が観察された細胞のみならず、蛍光が観察されない細胞においても、核酸導入がなされている個体があるこ

とが確認できた。また、GFP由来の蛍光が観察された個体においては、GFP蛍光強度と導入されたプラスミドの量には正の相関関係があることが示された。

[0118] 実施例9 トウモロコシ卵細胞及び精細胞の単離

本実施例では、トウモロコシの卵細胞及び精細胞の単離を行った。卵細胞及び精細胞の単離は、Kranz E. and Loerz H. (非特許文献1)を参考に以下のように行った。

[0119] 温室内で育成し、開花前に袋がけしたトウモロコシ (品種: A188) の交配適期の雌穂を供試した。採取した雌穂の胚珠から、胚嚢を含む珠心切片を摘出し、3.5 cmプラスチックシャーレ中の1.5 mL酵素溶液に加え室温で静置した。酵素溶液としては、0.33%セルラーゼ (Worthington社製)、0.1%マセロザイムR10 (ヤクルト本社製)、0.017%ペクトリアーゼY23 (盛進製薬製) を10%マンニトール溶液 (650 mosmol/kg H₂O) に添加したものをを用いた。

[0120] 20-30分の酵素処理後、2本のガラス針を用い卵細胞の単離を行った。片方のガラス針で珠心切片を固定し動かないようにし、もう一方のガラス針で、卵細胞が存在すると推定される領域の組織を掻き出すことにより卵細胞を単離した。卵細胞が位置する領域の推定は、珠心切片内に観察される胚嚢の位置に基づき行われた。単離した卵細胞は、ガラスキャピラリーを用いカバーガラス上のマンニトール液滴中に移動した。なお、カバーガラス上のマンニトール液滴は実施例1に従って作成し、卵細胞を単離した酵素液がマンニトール液滴に可能な限り混入しないように操作を行った。

[0121] 精細胞の単離は以下のように行った。トウモロコシ (品種: B73) の雄穂から花粉を3.5 cmプラスチックシャーレに採取し、そこに3 mLの10%マンニトール溶液 (650 mosmol/kg H₂O) を加えた。約3-5分後、マンニ

トール溶液中に花粉がバーストし、精細胞を含む花粉内容物がマンニトール溶液中に放出された。各精細胞の直径は $10\ \mu\text{m}$ であった。この精細胞を、ガラスキャピラリーを用いて、カバーガラス上のマンニトール液滴中に移動した。

[0122] 実施例 10 配偶子融合によるトウモロコシ受精卵の作出

本実施例では、電気融合による配偶子融合にて、*in vitro*でトウモロコシの受精卵細胞を作出した。

[0123] カバーガラス上の液滴中に、実施例 8 および 9 に示した方法により単離した精細胞と卵細胞を 1 個ずつ移動した。その後、それら細胞を電極（ネッパジーン（株）CUY5100-100Ti）上に、交流下（ 1MHz 、 0.4kV/cm 、ネッパジーン（株）ECFG21）で並べた。その後、DCパルス（ $50\ \mu\text{s}$ 、 $12-15\text{kV/cm}$ 、電極間距離 $50-100\ \mu\text{m}$ ）をかけることで、雌雄配偶子を融合させ、受精卵細胞を作出した。

[0124] 実施例 11 トウモロコシ受精卵への核酸導入

本実施例では、実施例 10 で作出したトウモロコシの *in vitro* 受精卵細胞に核酸を導入した。

[0125] 実施例 10 で作出した受精卵細胞を、配偶子融合処理から 30-90 分時点で物質の導入が完了するように、本実施例に沿って処理を行った。作出した受精卵細胞を MMG 溶液（ 15mM MgCl_2 、 4mM MES （ $\text{pH}5.7$ ）、 $650\text{mosmol/kg H}_2\text{O}$ マンニトール）の液滴（約 $2\ \mu\text{L}$ ）に移動し、その後さらに、MMG に対し、導入する塩基配列である 35S プロモーター：：シグナル配列：：GFP：：小胞体残留シグナル（HDEL）：：ノスターミネーターを含むプラスミド（GFP 発現用のプラスミド DNA、約 $6,000\text{bp}$ ）を $160\text{ng}/\mu\text{L}$ になるように加えた、核酸導入用液滴に移動した。なお、当該プラスミドは非特許文献 17 の記載に従って調整した。次に受精卵細胞を含んだ当該核酸導入用液滴と PEG 溶

液 (12.5 mL マンニトール溶液 (650 mosmol/kg H₂O)) に、7.5 g の PEG4000、2.5 mL の 1M 塩化カルシウムを加え蒸留水で 25 mg になるように調整) の液滴 (約 2 μL) を混ぜ、ガラスキャピラリーで 30~50 回 攪拌した。

[0126] 核酸導入処理を行った受精卵細胞について、洗浄・滅菌したマイクロキャピラリーを用い、新鮮な 10% マンニトール液滴 (650 mosmol/kg H₂O) 中に投入し、その後、受精細胞用培地の入った CM インサート内のメンブレン上に移した。

[0127] 核酸導入受精卵細胞は、暗所に 26°C で 1 日間静置した後、振盪培養を継続した。培養後の細胞を、倒立式蛍光顕微鏡で観察し、GFP の蛍光の有無で導入した核酸の発現状況及び細胞の分裂状況を確認した。核酸導入処理を行った受精卵細胞は、確かに GFP による発光が観察されたため、核酸導入が確認できた。さらに、それら核酸導入受精卵細胞を 6 日間振盪培養したのちに観察したところ、初期胚への分裂が確認され、さらには初期胚細胞中の GFP による発光も観察できた (図 8)。これにより、トウモロコシの胚的細胞塊の細胞群においても、受精卵細胞に導入した核酸が安定して保持されていることが確認できた。

[0128] なお、受精細胞用培地は、以下のとおり作成した；

MS 培地の NH₄NO₃ を 165 mg/L に改変し、有機物組成は以下の通りとした。1 mg/L ニコチン酸、10 mg/L チアミン・HCl、1 mg/L ピリドキシン・HCl、0.025 mg/L、750 mg/L グルタミン、150 mg/L プロリン、100 mg/L アスパラギン、100 mg/L ミオイノシトール。それらに 2 mg/L 2, 4-D を加え、浸透圧はグルコースで 650 mosmol/kg H₂O に調整 (pH 5.7) し作成した。作成した受精細胞用培地を直径 12 mm の Millicell CM インサート (ミリポア社製) 内に入れ、2 mL

の培地の入った3.5cmプラスチックシャーレの中に入れた。さらに、40～60 μ Lのイネ浮遊細胞培養物（Line Oc、理研バイオリソースセンター製）をフィーダー細胞としてシャーレに加え、受精細胞用培地とした。

[0129] 実施例12 自然受精法によって得られたイネ受精卵細胞の細胞壁形成度の測定

本実施例では、自然受精法（人工交配）によって得られた受精卵細胞の細胞壁形成度の測定を行った。

[0130] 昼温28℃前後、夜温23℃前後の温度帯であり、湿度が40～90%の環境で栽培されているイネ品種ゆきひかりを人工交配した。人工交配は、開花直前のイネの小花を指でつまむことによって行った。単離作業開始までの90分間、同環境で栽培した。受精卵細胞の単離は、実施例2に記載の卵細胞の単離と同様の操作によって行った。人工交配後3時間、5時間、8.5時間、20時間の受精卵の細胞壁を0.005%カルコフロールによって染色した。この間、受精卵細胞は23℃前後の温度帯で取り扱った。10分間カルコフロール染色した受精卵細胞を、Zeiss社製顕微鏡 AxioObserver A1にフィルターCFW-LP01-Clinicalを設置して撮影をした。撮影条件は、露出時間を25 msec、ホワイトバランスを3200Kとした。1細胞当たりのカルコフロール蛍光輝度を、画像解析ソフトZEN2を用いて測定した。細胞壁が十分に発達したステージであると推察される交配20時間後の受精卵の蛍光輝度を100%とした際の、交配数時間後の受精卵の蛍光輝度の割合を細胞壁形成度とした。その結果を表2に示す。交配3時間後の受精卵細胞は38%、5時間後は52%、8.5時間後は84%の細胞壁形成度であった。

[0131]

[表 2]

| 交配後時間 (h) | 1細胞当たりの 蛍光輝度 | 交配20時間後の受精卵に 対する蛍光輝度割合 (%) |
|--------------|-----------------|-------------------------------|
| 3 | 427 | 38 |
| 5 | 582 | 52 |
| 8.5 | 944 | 84 |
| 20 | 1121 | 100 |

[0132] 実施例 1 3 自然受精法によって得られたイネ受精卵細胞へのエレクトロポレーション法による核酸導入

本実施例では、人工交配によって得たイネ受精卵細胞へエレクトロポレーションを用いて GFP 核酸を導入した。

[0133] 実施例 1 2 に従いイネを人工交配し、受精卵細胞を単離した。単離した受精卵細胞に対し、DNA断片の導入完了までの時間が交配後4時間となるように、トウモロコシユビキチンプロモーター：：トウモロコシユビキチンイントロン：：GFP：：ノスターミネーターをコードする塩基配列からなる直鎖のDNA断片を導入した。当該DNA断片を100 ng/μLの濃度で含みマンニトールを用いて浸透圧を450 mOsmol/kg H₂Oに調整したOpti-MEM培地と受精卵細胞を混合した。ネッパジーン製NEPA21を用いて、エレクトロポレーションを行った。エレクトロポレーションの条件は、1 mm幅の電極を用い、電圧30 Vをパルス幅2.0 msec、パルス間隔50 msecで4回処理した。

[0134] エレクトロポレーション法による核酸導入処理を行った受精卵細胞を、実施例 4 に記載の方法に従い培養した。胚的細胞塊から形成されたカルスについて、培養42日目にPCR法及び増幅断片のシーケンスにより、GFPの導入を確認した。こ

の際、PCRプライマーはGFPを増幅する特異的プライマー（5' - a t g g t g a g c a a g g g c g a g - 3'、および5' - c c a t g a t a t a g a c g t t g t g g c t g - 3'）を用いた。PCR反応によって得られたDNA断片をシーケンシング解析したところ、このPCR産物の塩基配列はGFP配列と一致していた。

[0135] その結果より、エレクトロポレーション法による核酸導入受精卵細胞について、確かにDNA断片（GFP）が導入されていることが示された。なお、このDNA断片の導入が確認された受精卵由来のカルスを実施例5に記載の方法に従って培養し、分化誘導を行ったところ、再分化個体を得ることができた。

[0136] 実施例14 イネ受精卵細胞への核酸及びタンパク質の導入

本実施例では、イネ受精卵への核酸及びタンパク質の導入を行った。具体的には、DsRed2（クロンテック）をコードする核酸を導入したイネから由来する卵細胞と野生型イネ由来の精細胞を融合させて得られた受精卵細胞を用い、ゲノム編集実験を行った。

[0137] DsRed2をコードする遺伝子を導入したイネは以下のとおり作出した；
トウモロコシユビキチンプロモーター：：DsRed2をコードする遺伝子配列：：
ノスターミネーター：：CaMV35Sターミネーター及びホスフィノスリシン耐性マーカー遺伝子を含むpLC41プラスミド（Genebank accession No. LC215698）を調整し、Hiei and Komari（非特許文献18）に従ってイネ（品種：ゆきひかり）に形質転換し、DsRed2形質転換イネを作出した。

[0138] 実施例1及び2に従い、作出したDsRed2形質転換イネから卵細胞を、野生型イネ（品種：ゆきひかり）から精細胞を単離し、電気融合により受精卵細胞を得た。得られた受精卵細胞に対し、実施例3に従ってプラスミドDNA又はCas9タンパク質複合体を導入した。なお、導入するプラスミドDNA及びCas9タンパ

ク質複合体は以下のとおり作成した。

[0139] 導入するプラスミドDNAの作成：

tRNA1-tRNA-gRNA2を表3に示すプライマーセットを用いて増幅し、tRNA-gRNAユニットを作成した。

[0140] [表3]

| プライマー | ターゲット | Forward Primar (5' - 3') | Reverse Primar (5' - 3') |
|----------------------------|----------|--|--------------------------------------|
| All-in-one CRISPR/Cas9ベクター | gDsRed2 | TGCAGTGAAGCTGAAGGTGACCAA | AAACTTGGTCACCTTCAGCTTCAC |
| sgRNA合成 | sgDsRed2 | TAATACGACTCACTATAGGTGAAGCTGAAGGTGACCAA | TTCTAGCTCTAAAACCTTGGTCACCTTCAGCTTCAC |
| ゲノムPCRシーケンス | DsRed2-1 | ATGGCCTCCTCCGAGAACGTC | CTACAGGAACAGGTGGTGGCG |
| | DsRed2-2 | ACGTCATCACCGAGTTCATGC | GGAAGGACAGCTTCTTGTAGTCG |

[0141] 作成したtRNA-gRNAユニットを、ゴールドゲートクロニング法を用いてmultiplex CRISPR/Cas9ベクターのBsaIサイトに導入することで、イネU6snRNAプロモーター::tRNA-gRNAユニットを含むAll-in-one CRISPR/Cas9ベクタープラスミドを作成した。

[0142] 導入するCas9タンパク質複合体の作成：

GeneArt Precision gRNA Synthesis Kit (サーモフィッシャーサイエンティフィック社) を用い、sgRNAを合成した。使用したプライマーセットを表3に示す。2~3µgのsgRNAと、1µgのCas9タンパク質 (核酸局在化シグナルタグを有するGeneArt Platinum Cas9;サーモフィッシャーサイエンティフィック社) を、1.5~2.1µLのCas9タンパク質保存バッファ (10mM TrisHCl (pH8.0)、150

mM NaCl, 0.6 mM TCEP, 50% グリセロール) に加え、インキュベーションすることで、Cas9タンパク質複合体を得た。

[0143] プラスミドDNA又はCas9タンパク質の導入：

得られたCas9タンパク質複合体、または80–320 ng/μLになるように調整した前述のプラスミドDNAを、それぞれカバーガラス上の10 μLのMMGに添加し、実施例3に従ってイネ受精卵細胞に導入した。そのようにして得られたプラスミドDNA導入受精卵又はCas9タンパク質複合体導入受精卵細胞を、実施例4に従い培養し、蛍光顕微鏡でDsRed2の蛍光を観察した。プラスミドDNA導入受精卵の蛍光顕微鏡及び光学顕微鏡写真を図9に示す。その結果より、プラスミドDNA及びCas9タンパク質複合体導入受精卵のどちらにおいても、培養に従いDsRed2の蛍光が消光することが確認された。

[0144] プラスミドDNA導入処理を行っていない受精卵 (図9A) では、配偶子融合処理直後 (図9A : 0日) から胚的細胞塊の細胞群 (図9A : 7日) まで、すべての細胞においてDsRed2の発現が認められた。それに対し、プラスミドDNA導入受精卵 (図9B) では、配偶子融合処理及び核酸導入処理直後 (図9B : 0日) では認められたDsRed2の発光が、培養日数に従い認めらなくなった (図9B : 7日)。これは、プラスミドDNA導入に従い、形質転換イネのゲノムにおけるDsRed2をコードする遺伝子配列が編集された結果、消光したためである。

[0145] さらに、得られたプラスミドDNA導入受精卵細胞を実施例5に従い分化誘導し、再分化個体を得た。得られた再分化個体の葉からDNAを抽出し、DsRed2をコードする遺伝子配列についてPCR法及びシーケンス解析を用いて確認したところ、確かに再分化個体が有するDsRed2をコードする遺伝子配列の一部に、欠失や核酸の挿入が認められ、ゲノム編集されていることが示された。

[0146] なお、Cas9タンパク質複合体導入受精卵細胞においても同様の結果が得

られたため、Cas9タンパク質複合体の導入によっても同様に、形質転換イネのDsRed2遺伝子配列がゲノム編集されたことが示された。

[0147] この結果より、本発明の方法により受精卵細胞に核酸プラスミドだけではなく、Cas9タンパク質のような物質をも導入することが可能であり、さらに本発明の方法によりゲノム編集を行うことが可能であることが明らかになった。

[0148] 実施例15 イネの卵細胞への複数種の核酸の同時導入

実施例1に従ってイネの卵細胞を単離した。単離した卵細胞をMMG溶液の液滴（約2 μ L）に移動し、その後MMGに導入する塩基配列、35Sプロモーター：：シグナル配列：：GFP：：小胞体残留シグナル（HDEL）：：ノスターミネーターを含むプラスミド（非特許文献17）およびユビキチンプロモーター：：ユビキチンイントロン：：DsRed2をコードする遺伝子配列：：ノスターミネーターを含むプラスミドを加えた液滴に移動した。次に、実施例3に従い、卵細胞及び前記2種類のプラスミドを含む液滴とPEG溶液の液滴（約2 μ L）を混ぜ、ガラスキャピラリーで30～50回攪拌することで、卵細胞に対するPEG法による核酸導入処理を行った。

[0149] 核酸導入処理を行った卵細胞は、導入処理から12～16時間後に蛍光顕微鏡で観察し、GFP及びDsRed2の蛍光の有無で導入した核酸の発現状況を確認した。その結果を図10に示す。同一の卵細胞内に、GFP（図10：左）とDsRed2（図10：中央）による発光が両方とも観察されたため、本発明の方法により、卵細胞に対しても2種の核酸を同時導入可能であることが確認できた。

産業上の利用可能性

[0150] 本発明により、細胞に対する植物組織分解酵素処理を行わずとも、物質の導入、形質転換及び培養を行うことが可能となった。これにより、従来培養が困難等の理由で形質転換が困難であったため有用形質を付与することができなかった植物体であ

っても、簡便に、安定して再現性良く形質転換体やゲノム編集個体を得ることが可能となる。

請求の範囲

[請求項1] 細胞壁形成が不完全である植物生殖細胞に物質を導入することを含む、植物に物質を導入する方法。

[請求項2] 物質の導入の前に、単離した植物生殖細胞に対し植物組織分解酵素による処理を行わない、請求項1に記載の方法。

[請求項3] 細胞壁形成率が65%以下である、請求項1又は2に記載の方法。

[請求項4] 植物生殖細胞が、受精卵細胞である、請求項1に記載の方法。

[請求項5] (1-i) 植物の卵細胞と精細胞とを融合して受精卵細胞を作出する、あるいは

(1-ii) 植物の受精卵細胞を含む組織から受精卵細胞を単離する、ことにより、受精卵細胞を取得し、

(2) 得られた受精卵細胞に、物質を導入する、ことを含む、請求項1-4のいずれか1項に記載の方法。

[請求項6] (1-i) の卵細胞と精細胞との融合を電気融合により行う、請求項5に記載の方法。

[請求項7] 受精卵細胞の取得から、120分以内に工程(2)の物質導入を行う、請求項5又は6に記載の方法。

[請求項8] 受精卵細胞の取得から、60分以内に工程(2)の物質導入を行う、請求項5又は6に記載の方法。

[請求項9] (1-i) の卵細胞と精細胞との融合を自然受精法により行う、請求項5に記載の方法。

[請求項10] 受精卵細胞の取得から、360分以内に工程(2)の物質導入を行う、請求項5又は9に記載の方法。

[請求項11] 受精卵細胞の取得から、240分以内に工程(2)の物質導入を行う

、請求項5又は9に記載の方法。

[請求項12] (1) 植物の卵細胞及び精細胞のいずれか若しくは両方に物質を導入する、そして、

(2) 工程(1)を経た卵細胞と精細胞とを融合して受精卵細胞を作出する、ことを含む、請求項1-4のいずれか1項に記載の方法。

[請求項13] (1)の卵細胞と精細胞との融合を電気融合又は自然受精法により行う、請求項12に記載の方法。

[請求項14] 物質導入が、PEG法又はエレクトロポレーション法を用いて行われる、請求項1-13のいずれか1項に記載の方法。

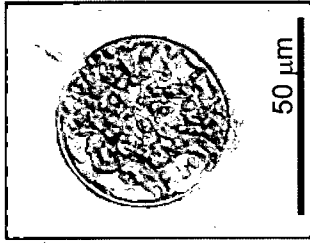
[請求項15] 植物が、単子葉植物である、請求項1-14のいずれか1項に記載の方法。

[請求項16] 植物が、トウモロコシ、コムギ、オオムギ、イネ及びソルガムからなる群から選択される、請求項15に記載の方法。

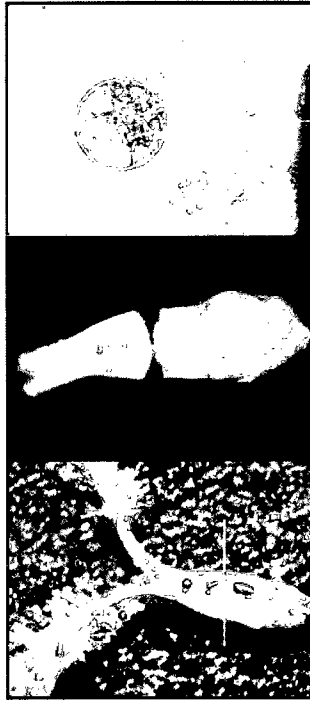
[請求項17] 請求項1-16のいずれか1項に記載の方法で得られた、物質導入植物。

[図 1]

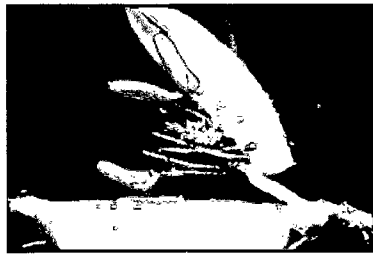
単離された卵細胞



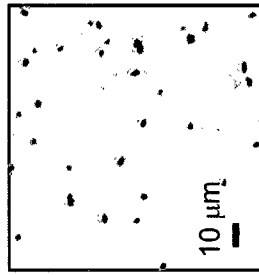
子房の切断と切断部付近の卵細胞



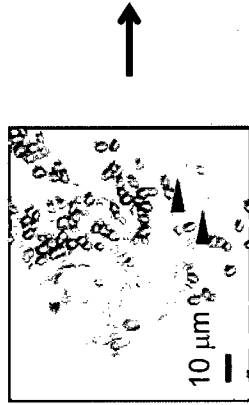
イネの花



単離された精細胞



花粉から放出された精細胞

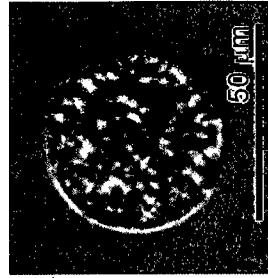


矢頭=精細胞



[図 2]

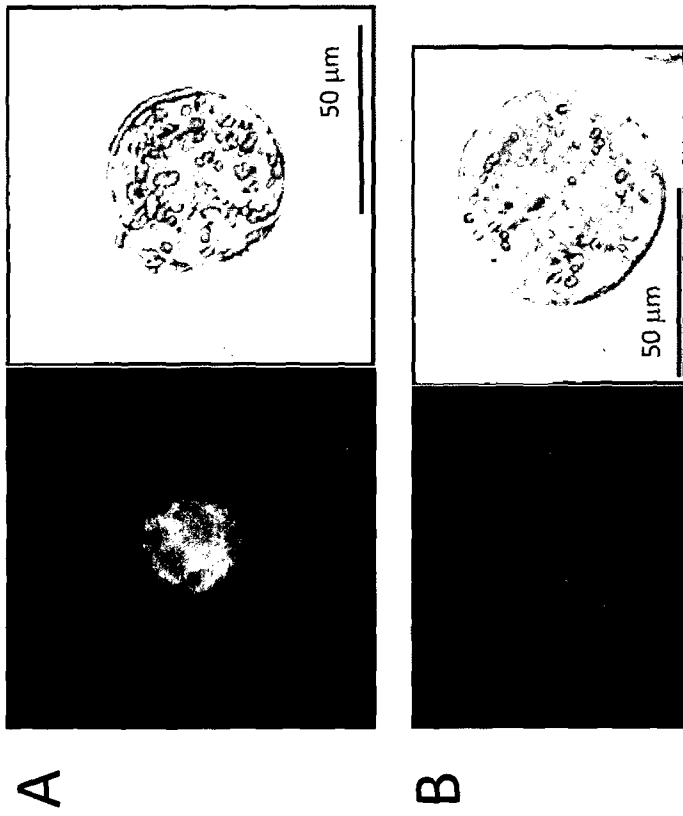
作出された受精卵



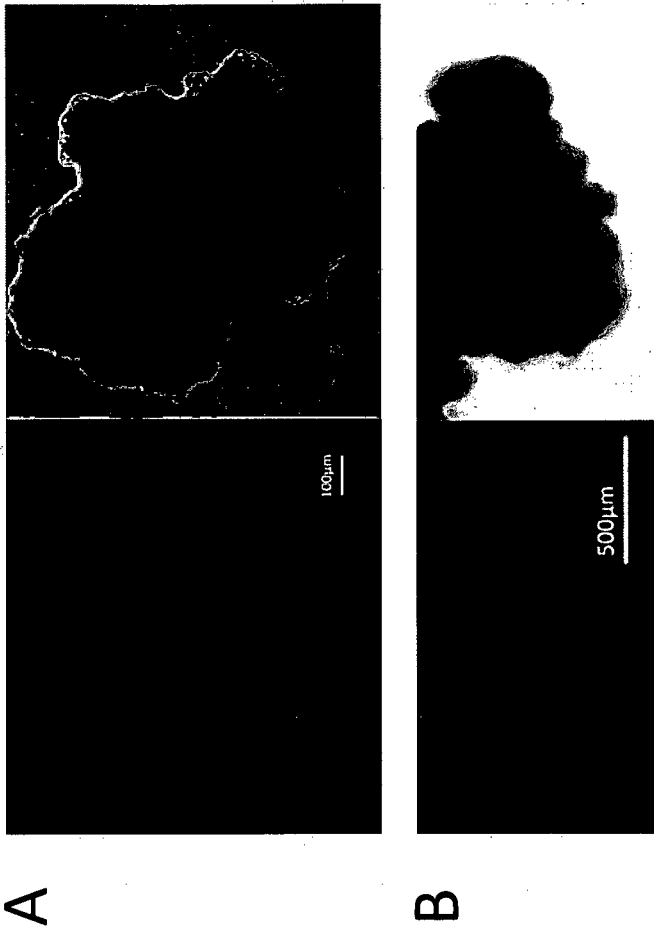
精細胞と卵細胞の融合(受精)



[図 3]



[図 4]



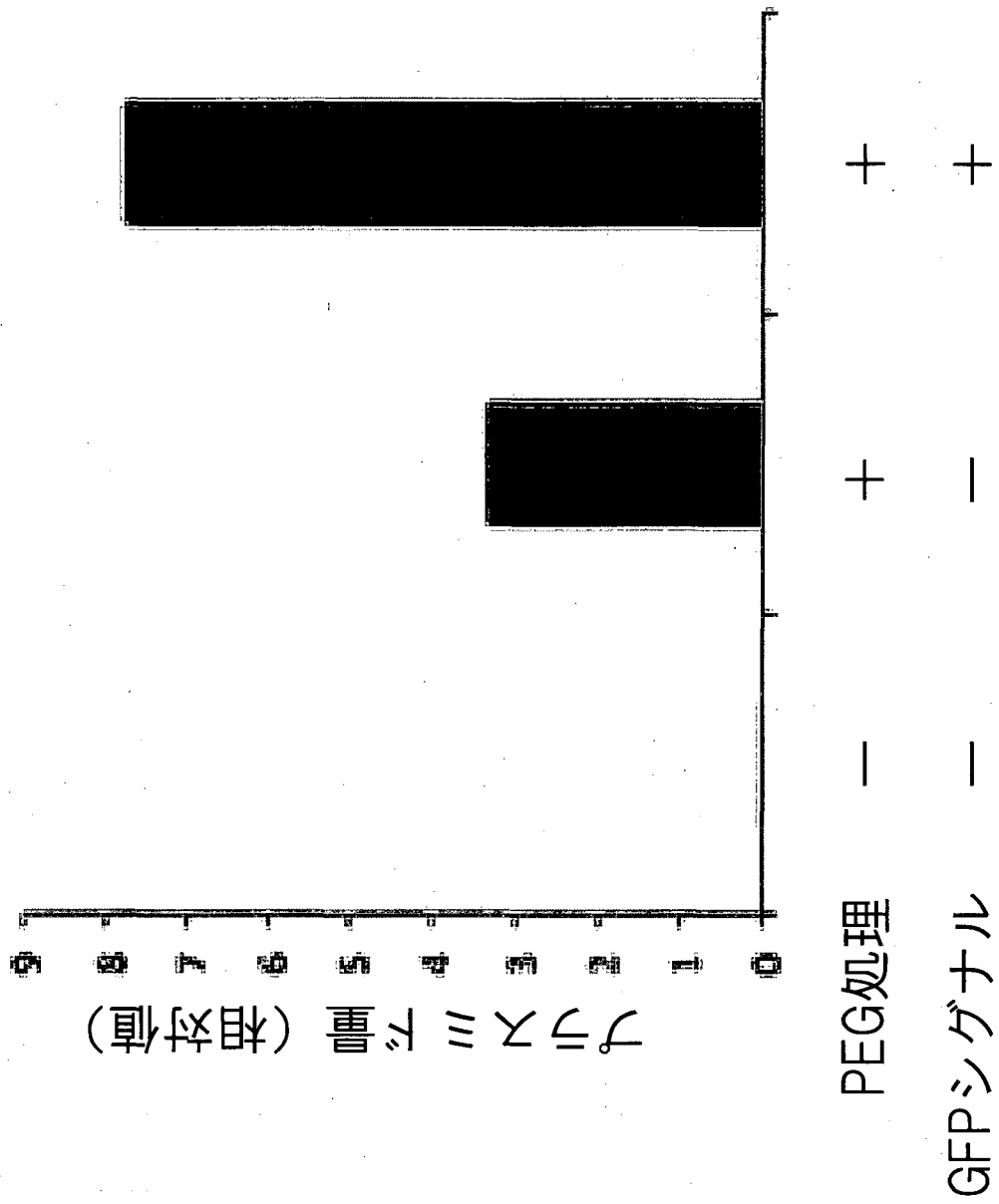
[図 5]



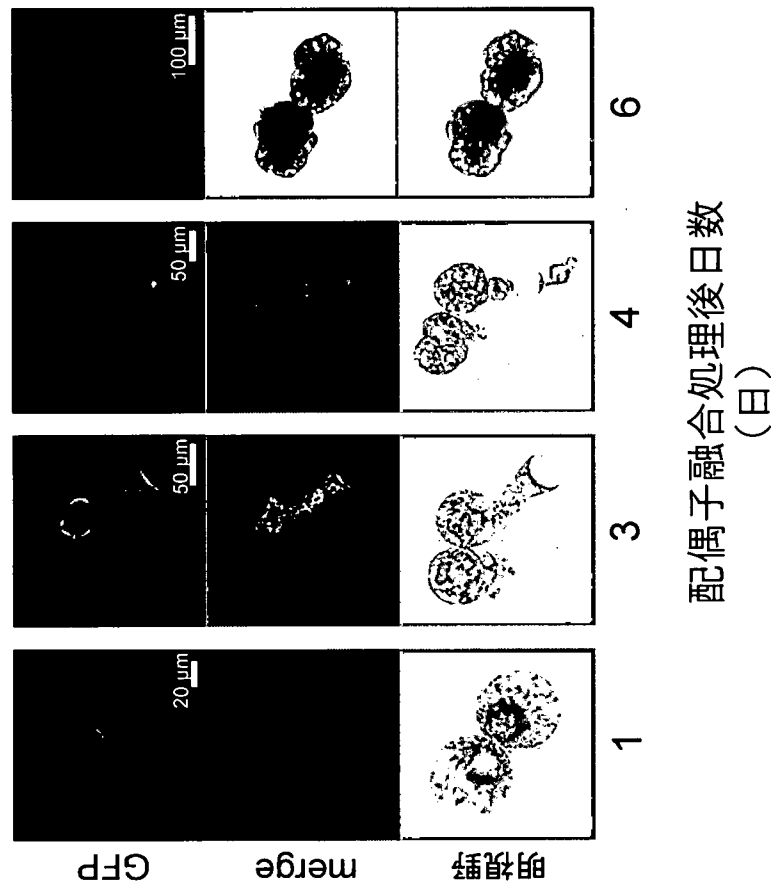
[図 6]



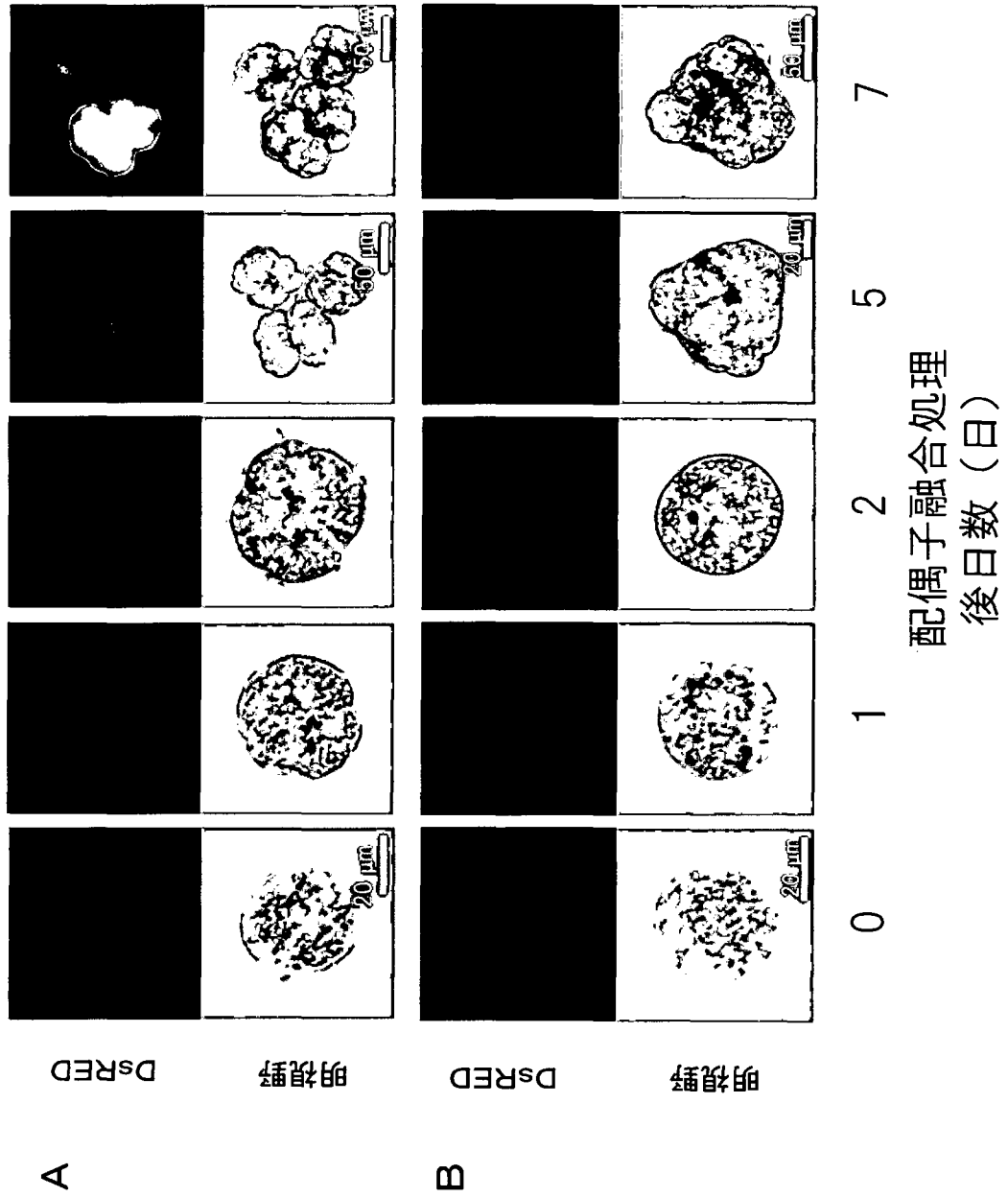
[図 7]



[図 8]



[図 9]



[図 10]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/004103

| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl. A01H1/00(2006.01) i, C12N5/04(2006.01) i 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. A01H1/00-4/00, C12N5/04 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 1971-2018 Registered utility model specifications of Japan 1996-2018 Published registered utility model applications of Japan 1994-2018 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII) | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | 古田顕尚外, イネ卵細胞および受精卵への物質導入系の確立. 植物化学調節学会研究発表記録集, 2014, vol. 49, p. 100 (entire text), (FURUTA, Kenshou et al., "Establishment of a microinjection with isolated rice egg cells and zygotes", The Japanese Society for Chemical Regulation of Plants) | 1-17 |
| X - A | JP 2016-63785 A (TOKYO METROPOLITAN UNIV.) 28 April 2016, (paragraphs [0054], [0045]) (Family: none) | 17 - 1-16 |
| X - A | WO 2016/119703 A1 (INSTITUTE OF GENETICS AND DEVELOPMENTAL BIOLOGY CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 04 August 2016, (claims, page 5, right column, lines 14-24) & EP 3252162 A1 (claims, paragraph [0035]) & JP 2018-503392 A | 17 - 1-16 |
| P, X - P, A | WO 2017/171092 A1 (JAPAN TOBACCO INC.) 05 October 2017, (claims, examples) (Family: none) | 1, 3-17 - 2 |
| <input type="checkbox"/> | Further documents are listed in the continuation of Box C. | <input type="checkbox"/> 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 10 April 2018 (10.04.2018) | Date of mailing of the international search report 01 May 2018 (01.05.2018) | |
| Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan | Authorized officer Telephone No. | |

| | | |
|--|---|-------------------|
| A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. A01H1/00(2006.01)i, C12N5/04(2006.01)i | | |
| 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）） Int.Cl. A01H1/00-4/00, C12N5/04 | | |
| 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 1971-2018年 日本国実用新案登録公報 1996-2018年 日本国登録実用新案公報 1994-2018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） CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII) | | |
| 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 | 古田顕尚 外, イネ卵細胞および受精卵への物質導入系の確立. 植物化学調節学会研究発表記録集, 2014, vol.49, p.100 (全文) | 1-17 |
| <u>X</u> A | JP 2016-63785 A (公立大学法人首都大学東京) 2016.04.28 (【0054】、【0045】) (ファミリーなし) | <u>17</u> 1-16 |
| <input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input 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 「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矛盾するものではなく、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 10.04.2018 | 国際調査報告の発送日 01.05.2018 | |
| 国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 | 特許庁審査官 (権限のある職員) 戸来 幸男 電話番号 03-3581-1101 内線 3448 | 4B 3964 |

| C (続き) . 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 |
| <u>X</u> A | WO 2016/119703 A1 (中国科学院遺伝与发育生物学研究所) 2016.08.04 (請求項、第5頁右欄第14-24行) & EP 3252162 A1 (Claims, [0035]) & JP 2018-503392 A | <u>17</u> 1-16 |
| <u>P, X</u> P, A | WO 2017/171092 A1 (日本たばこ産業株式会社) 2017.10.05 (請求項、 実施例) (ファミリーなし) | <u>1, 3-17</u> 2 |