(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118475234 A
(43)申请公布日 2024.08.09

(21)申请号 202280086508.0
(22)申请日 2022.12.23
(30)优先权数据
2021-212001 2021.12.27 JP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.06.27
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2022/047603 2022.12.23
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/127723 JA 2023.07.06
(71)申请人 日本烟草产业株式会社
地址 日本东京都
(72)发明人 铃木庄一 宇田川久史 平濑大志
(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105
专利代理师 王轩
(51)Int.Cl.
A01H 6/82(2018.01)
A01H 1/06(2006.01)
A01H 5/00(2018.01)
A24B 15/10(2006.01)
C12N 15/10(2006.01)
C12N 15/29(2006.01)

权利要求书3页 说明书29页
序列表（电子公布） 附图8页

(54)发明名称

烟草植物

(57)摘要

本发明涉及烟草植物等。本发明的烟草植物具有如下(i)的内源性基因及(ii)的内源性基因中的任一种或两种内源性基因:(i)包含含有编码序列号2或与序列号2具有至少95％的同一性的氨基酸序列的碱基序列的核酸作为编码区域的内源性基因,在上述碱基序列中,与上述氨基酸序列对应的密码子中的至少1个突变为终止密码子;以及(ii)包含含有编码序列号4或与序列号4具有至少95％的同一性的氨基酸序列的碱基序列的核酸作为编码区域的内源性基因,在上述碱基序列中,与上述氨基酸序列对应的密码子中的至少1个突变为终止密码子。

CN 118475234 A

1.一种烟草植物,其具有以下(i)的内源性基因及(ii)的内源性基因中的任一种或两种内源性基因:

(i)包含含有编码序列号2或与序列号2具有至少95%的同一性的氨基酸序列的碱基序列的核酸作为编码区域的内源性基因,在所述碱基序列中,与所述氨基酸序列对应的密码子中的至少1个突变为终止密码子;以及

(ii)包含含有编码序列号4或与序列号4具有至少95%的同一性的氨基酸序列的碱基序列的核酸作为编码区域的内源性基因,在所述碱基序列中,与所述氨基酸序列对应的密码子中的至少1个突变为终止密码子。

2.根据权利要求1的烟草植物,其具备以下的要件中的任一个或两个要件:

在(i)的内源性基因所包含的核酸中,相当于序列号2的233位~285位的氨基酸的密码子中的至少1个突变为终止密码子;以及

在(ii)的内源性基因所包含的核酸中,相当于序列号4的233位~285位的氨基酸的密码子中的至少1个突变为终止密码子。

3.根据权利要求1或2的烟草植物,其具有(i)及(ii)这两种内源性基因。

4.根据权利要求1~3中任一项所述的烟草植物,其中,

(i)的内源性基因和/或(ii)的内源性基因为纯合体。

5.根据权利要求1~4中任一项所述的烟草植物,其中,

在(i)的内源性基因所包含的核酸中,相当于序列号2的279位的氨基酸的密码子突变为终止密码子。

6.根据权利要求1~5中任一项所述的烟草植物,其中,

在(ii)的内源性基因所包含的核酸中,相当于序列号4的285位的氨基酸的密码子突变为终止密码子。

7.根据权利要求1~5中任一项所述的烟草植物,其中,

在(ii)的内源性基因所包含的核酸中,与序列号4的233位的氨基酸对应的密码子突变为终止密码子。

8.根据权利要求1~6中任一项所述的烟草植物,其中,

在(i)的内源性基因所包含的核酸中,相当于序列号2的279位的氨基酸的密码子突变为终止密码子,而且

在(ii)的内源性基因所包含的核酸中,相当于序列号4的233位或285位的氨基酸的密码子突变为终止密码子。

9.根据权利要求1~8中任一项所述的烟草植物,其中,

在(i)的内源性基因所包含的核酸中,相当于由核酸编码的序列号2的163位的氨基酸为甘氨酸。

10.根据权利要求1~9中任一项所述的烟草植物,其进一步包含以下(iii)的内源性基因:

(iii)包含含有编码序列号8或与序列号8具有至少95%的同一性的氨基酸序列的碱基序列的核酸作为编码区域的内源性基因,相当于所述氨基酸序列的231位的氨基酸为脯氨酸。

11.根据权利要求1~10中任一项所述的烟草植物,其具有以下的(a)~(c)中1种以上

的性质：

(a)与对照相比,硝酸含量减少；

(b)与对照相比,亚硝酸含量同等；

(c)与对照相比,氨基酸含量增加,

其中,对照是包含具有序列号2的氨基酸序列的多肽及具有序列号4的氨基酸序列的多肽的烟草植物。

12.根据权利要求11所述的烟草植物,其中,

与对照相比,硝酸减少了至少80％。

13.根据权利要求1～12中任一项所述的烟草植物,其为突变体或基因修饰体。

14.根据权利要求1～13中任一项所述的烟草植物,其中,

所述烟草植物为红花烟草(Nicotiana tabacum)。

15.一种烟草植物,其具有以下内源性基因中的任一种或两种内源性基因：

包含编码序列号2或与序列号2具有至少95％的同一性的氨基酸序列中从233位～285位之间的氨基酸残基至C末端的氨基酸残基的氨基酸序列缺失了的多肽的碱基序列作为编码区域的内源性基因;以及

包含编码序列号4或与序列号4具有至少95％的同一性的氨基酸序列中从233位～285位之间的氨基酸残基至C末端的氨基酸残基的氨基酸序列缺失了的多肽的碱基序列作为编码区域的内源性基因。

16.权利要求1～14中任一项所述的烟草植物的制备方法,该方法包括：

在烟草植物中,

(i)在包含含有编码序列号2或与序列号2具有至少95％的同一性的氨基酸序列的碱基序列的核酸作为编码区域的内源性基因中导入突变,使得与所述氨基酸序列对应的密码子中的至少1个成为终止密码子;和/或

(ii)在包含含有编码序列号4或与序列号4具有至少95％的同一性的氨基酸序列的碱基序列的核酸作为编码区域的内源性基因中导入突变,使得与所述氨基酸序列对应的密码子中的至少1个成为终止密码子。

17.权利要求1～14中任一项所述的烟草植物的制备方法,该方法包括：

挑选具有如下(i)的内源性基因及(ii)的内源性基因中的任一种或两种内源性基因的烟草植物,

(i)包含含有编码序列号2或与序列号2具有至少95％的同一性的氨基酸序列的碱基序列的核酸作为编码区域的内源性基因,在所述碱基序列中,与所述氨基酸序列对应的密码子中的至少1个突变为终止密码子;以及

(ii)包含含有编码序列号4或与序列号4具有至少95％的同一性的氨基酸序列的碱基序列的核酸作为编码区域的内源性基因,在所述碱基序列中,与所述氨基酸序列对应的密码子中的至少1个突变为终止密码子。

18.根据权利要求16或17所述的方法,该方法进一步包括：

选择硝酸含量减少了的烟草植物。

19.一种烟叶,其是由权利要求1～14中任一项所述的烟草植物收获而得到的。

20.一种干燥叶,其是由权利要求19所述的烟叶制成的。

21.一种烟丝、粉末、片、烟梗、颗粒或提取物,其是由权利要求20所述的干燥叶制造的。

22.一种烟草制品,其包含权利要求20所述的干燥叶、和/或权利要求21所述的烟丝、粉末、片、烟梗、颗粒或提取物。

烟草植物

技术领域

[0001] 本发明涉及烟草植物、该烟草植物的制备方法、由该烟草植物收获的烟叶及其利用。

背景技术

[0002] 烟草特有亚硝胺(TSNA)主要是烟叶在干燥时生成的烟草生物碱的亚硝基化产物。烟草植物在叶中蓄积高水平的游离硝酸盐,其与TSNA的生成相关。可以认为,与烟叶在干燥时的TSNA生成直接相关的物质是亚硝酸盐。烟草植物的叶中蓄积的游离硝酸盐通过烟草所具有的硝酸还原酶(NR)而被转变为亚硝酸盐,但由于亚硝酸盐具有细胞毒性而会被快速代谢,因此通常植物组织中包含的内源性的亚硝酸盐的量非常少。与烟叶在干燥时的TSNA生成相关的亚硝酸盐的大部分可以认为是通过生存在叶面的微生物由硝酸盐产生的。即,在烟叶的干燥工序中,随着叶的组织被分解,叶中蓄积的硝酸盐溶出,通过生存在叶面的微生物所具有的硝酸还原酶(NR)而被转变为亚硝酸盐。如果形成亚硝酸盐,则这些化合物会与各种烟草生物碱(含吡啶化合物等)结合而形成亚硝胺。

[0003] Plant J.2000,21(3)p259-267记载了拟南芥的CLCa突变体的叶中硝酸量减少,亚硝酸量增加。在拟南芥突变体的叶中蓄积的硝酸量的程度为对照的40％左右。New Phytologist,2009,183,p88-94记载了拟南芥的CLCe突变体的叶中硝酸量减少,亚硝酸量增加。设想在烟草中,如果亚硝酸量增加,则TSNA量也增加。

[0004] WO2014/096283记载了制作了分别用RNAi对推定为与拟南芥的CLCa和CLCe相对应的烟草的直向同源的基因CLC-NT2(相当于后述的NtCLCa-S基因)和NtCLCe基因进行表达抑制的重组体。任意RNAi重组体均抑制了CLC-NT2和NtCLCe这两者的基因表达。另外,任意RNAi重组体均确认到了叶中的硝酸减少,但不清楚硝酸减少效果是CLC-NT2、NtCLCe中的哪一者的效果、或者是协同效果,另外,硝酸减少的程度为40％-50％左右(实施例6、图3)。

[0005] WO2014/096283中公开的CLC-NT2的突变体G163R具有如下特征:(i)从清晨至上午的叶中硝酸量比对照小,另一方面,接近中午时高于对照(实施例8、图5);(ii)硝酸盐减少的程度也只不过是野生型的5成左右。NtCLCe的P143L突变体在接近中午的叶中硝酸量比对照低,但清晨高于对照(实施例9、图6)。G163R突变体、P143L突变体均为错义突变体。

[0006] 现有技术文献

[0007] 专利文献

[0008] 专利文献1:WO2014/096283

[0009] 专利文献2:WO2022/124361

[0010] 非专利文献

[0011] 非专利文献1:Plant J.2000,21(3)p259-267

[0012] 非专利文献2:New Phytologist,2009,183,p88-94

[0013] 非专利文献3:Nature(2006)442(7105):939-42

[0014] 非专利文献4:Communicative&Integrative Biology.2010;3(2)122-129

[0015] 非专利文献5:Mol.Genet.Genomics.(2010)283:233-241

[0016] 非专利文献6:Phil.Trans.R.Soc.B(2009)364,195-201

[0017] 非专利文献7:BMC genomics,(2017)18(1),1-14

发明内容

[0018] 发明所要解决的问题

[0019] 已知烟叶中所含的硝酸盐与TSNA生成相关。期望大幅减少(优选减少50％以上)烟叶中所含的硝酸盐的方法、减少了硝酸盐的烟草植物的开发。本发明人等为了解决上述问题而努力进行了深入研究,结果发现,在NtCLCa-S基因和/或NtCLCa-T基因中具有终止密码子的烟草植物与不具有终止密码子的对照烟草植物相比,不会对生长造成不良影响,叶中的硝酸显著减少,从而想到了本发明。

[0020] 解决问题的方法

[0021] 本发明包括以下的方式,但并没有限定。

[0022] [方式1]

[0023] 一种烟草植物,其具有以下(i)的内源性基因及(ii)的内源性基因中的任一种或两种内源性基因:

[0024] (i)包含含有编码序列号2或与序列号2具有至少95％的同一性的氨基酸序列的碱基序列的核酸作为编码区域的内源性基因,在上述碱基序列中,与上述氨基酸序列对应的密码子中的至少1个突变为终止密码子;以及

[0025] (ii)包含含有编码序列号4或与序列号4具有至少95％的同一性的氨基酸序列的碱基序列的核酸作为编码区域的内源性基因,在上述碱基序列中,与上述氨基酸序列对应的密码子中的至少1个突变为终止密码子。

[0026] [方式2]

[0027] 根据方式1的烟草植物,其具备以下的要件中的任一个或两个要件:

[0028] 在(i)的内源性基因所包含的核酸中,相当于序列号2的233位～285位的氨基酸的密码子中的至少1个突变为终止密码子;以及

[0029] 在(ii)的内源性基因所包含的核酸中,相当于序列号4的233位～285位的氨基酸的密码子中的至少1个突变为终止密码子。

[0030] [方式3]

[0031] 根据方式1或2的烟草植物,其具有(i)及(ii)这两种内源性基因。

[0032] [方式4]

[0033] 根据方式1-3中任一项所述的烟草植物,其中,

[0034] (i)的内源性基因和/或(ii)的内源性基因为纯合体。

[0035] [方式5]

[0036] 根据方式1-4中任一项所述的烟草植物,其中,

[0037] 在(i)的内源性基因所包含的核酸中,相当于序列号2的279位的氨基酸的密码子突变为终止密码子。

[0038] [方式6]

[0039] 根据方式1-5中任一项所述的烟草植物,其中,

[0040] 在(ii)的内源性基因所包含的核酸中,相当于序列号4的285位的氨基酸的密码子突变为终止密码子。

[0041] [方式7]

[0042] 根据方式1-5中任一项所述的烟草植物,其中,

[0043] 在(ii)的内源性基因所包含的核酸中,与序列号4的233位的氨基酸对应的密码子突变为终止密码子。

[0044] [方式8]

[0045] 根据方式1-6中任一项所述的烟草植物,其中,

[0046] 在(i)的内源性基因所包含的核酸中,相当于序列号2的279位的氨基酸的密码子突变为终止密码子,而且

[0047] 在(ii)的内源性基因所包含的核酸中,相当于序列号4的233位或285位的氨基酸的密码子突变为终止密码子。

[0048] [方式9]

[0049] 根据方式1-8中任一项所述的烟草植物,其中,

[0050] 在(i)的内源性基因所包含的核酸中,相当于由核酸编码的序列号2的163位的氨基酸为甘氨酸。

[0051] [方式10]

[0052] 根据方式1-9中任一项所述的烟草植物,其进一步包含以下(iii)的内源性基因:

[0053] (iii)包含含有编码序列号8或与序列号8具有至少95%的同一性的氨基酸序列的碱基序列的核酸作为编码区域的内源性基因,相当于上述氨基酸序列的231位的氨基酸为脯氨酸。

[0054] [方式11]

[0055] 根据方式1-10中任一项所述的烟草植物,其具有以下的(a)-(c)中1种以上的性质:

[0056] (a)与对照相比,硝酸含量减少;

[0057] (b)与对照相比,亚硝酸含量同等;

[0058] (c)与对照相比,氨基酸含量增加,

[0059] 其中,对照是包含具有序列号2的氨基酸序列的多肽及具有序列号4的氨基酸序列的多肽的烟草植物。

[0060] [方式12]

[0061] 根据方式11所述的烟草植物,其中,

[0062] 与对照相比,硝酸减少了至少80%。

[0063] [方式13]

[0064] 根据方式1-12中任一项所述的烟草植物,其为突变体或基因修饰体。

[0065] [方式14]

[0066] 根据方式1-13中任一项所述的烟草植物,其中,

[0067] 上述烟草植物为红花烟草(Nicotiana tabacum)。

[0068] [方式15]

[0069] 一种烟草植物,其具有以下内源性基因中的任一种或两种内源性基因:

[0070] 包含编码序列号2或与序列号2具有至少95％的同一性的氨基酸序列中从233位～285位之间的氨基酸残基至C末端的氨基酸残基的氨基酸序列缺失了的多肽的碱基序列作为编码区域的内源性基因;以及

[0071] 包含编码序列号4或与序列号4具有至少95％的同一性的氨基酸序列中从233位～285位之间的氨基酸残基至C末端的氨基酸残基的氨基酸序列缺失了的多肽的碱基序列作为编码区域的内源性基因。

[0072] [方式16]

[0073] 方式1-14中任一项所述的烟草植物的制备方法,该方法包括:

[0074] 在烟草植物中,

[0075] (i)在包含含有编码序列号2或与序列号2具有至少95％的同一性的氨基酸序列的碱基序列的核酸作为编码区域的内源性基因中导入突变,使得与上述氨基酸序列对应的密码子中的至少1个成为终止密码子;和/或

[0076] (ii)在包含含有编码序列号4或与序列号4具有至少95％的同一性的氨基酸序列的碱基序列的核酸作为编码区域的内源性基因中导入突变,使得与上述氨基酸序列对应的密码子中的至少1个成为终止密码子。

[0077] [方式17]

[0078] 方式1-14中任一项所述的烟草植物的制备方法,该方法包括:

[0079] 挑选具有如下(i)的内源性基因及(ii)的内源性基因中的任一种或两种内源性基因的烟草植物,

[0080] (i)包含含有编码序列号2或与序列号2具有至少95％的同一性的氨基酸序列的碱基序列的核酸作为编码区域的内源性基因,在上述碱基序列中,与上述氨基酸序列对应的密码子中的至少1个突变为终止密码子;以及

[0081] (ii)包含含有编码序列号4或与序列号4具有至少95％的同一性的氨基酸序列的碱基序列的核酸作为编码区域的内源性基因,在上述碱基序列中,与上述氨基酸序列对应的密码子中的至少1个突变为终止密码子。

[0082] [方式18]

[0083] 根据方式16或17所述的方法,该方法进一步包括:

[0084] 选择硝酸含量减少了的烟草植物。

[0085] [方式19]

[0086] 一种烟叶,其是由方式1-14中任一项所述的烟草植物收获而得到的。

[0087] [方式20]

[0088] 一种干燥叶,其是由方式19所述的烟叶制成的。

[0089] [方式21]

[0090] 一种烟丝(cut filler)、粉末、片、烟梗、颗粒或提取物,其是由方式20所述的干燥叶制造的。

[0091] [方式22]

[0092] 一种烟草制品,其包含方式20所述的干燥叶、和/或方式21所述的烟丝、粉末、片、烟梗、颗粒或提取物。

[0093] 发明的效果

[0094] 本发明的在NtCLCa-S基因和/或NtCLCa-T基因中具有终止密码子的烟草植物与在上述基因中不具有终止密码子的对照烟草植物相比,叶中的硝酸显著减少(优选减少约80%以上)。通过利用本发明的烟草植物,能够减少烟草原料、烟草制品的TSNA。本发明的烟草植物不仅叶中硝酸量降低,而且叶中亚硝酸量不增加,优选植物体的生长也良好,也未观察到开花延迟等栽培中的适应成本的升高。另外,本发明的烟草植物的叶中的氨基酸含量增加。已知氨基酸会对烟草的香吸味造成影响。由此,氨基酸含量增加会带来香吸味的改善,对于作为用于制造烟草制品的烟叶的材料而利用也是显著优异的效果。

附图说明

[0095] 图1示出了各突变体、野生型的叶(叶片)中的硝酸量。Ho、He、W分别是NtCLCa基因为突变等位基因的纯合体(homozygote)、突变等位基因和野生型等位基因的杂合体(heterozygote)、不具有突变的野生型(wildtype)。按照NtCLCa-S基因的基因型、NtCLCa-T基因的基因型的顺序记载,例如HeHo是NtCLCa-S基因为突变等位基因和野生型等位基因的杂合体、NtCLCa-T基因为突变等位基因的纯合体。WT是野生型基因的纯合体,是作为对照的烟草(品种:Tsukuba 1号)。对于重复数而言,WT为4,其它全部为5,误差条为标准偏差。基于t检验的显著差异:*P＜0.05、＊＊P＜0.01。

[0096] 图2示出了各突变体、野生型的叶(叶片)中的亚硝酸量。Ho、He、W分别是NtCLCa基因为突变等位基因的纯合体(homozygote)、突变等位基因和野生型等位基因的杂合体(heterozygote)、不具有突变的野生型(wildtype)。按照NtCLCa-S基因的基因型、NtCLCa-T基因的基因型的顺序记载,例如HeHo是NtCLCa-S基因为突变等位基因和野生型等位基因的杂合体、NtCLCa-T基因为突变等位基因的纯合体。WT是野生型烟草(品种:Tsukuba 1号)。对于重复数而言,WT为4,其它全部为5,误差条为标准偏差。

[0097] 图3示出了各突变体、野生型的叶(叶片)中的游离氨基酸量。Ho、W分别是NtCLCa基因为突变等位基因的纯合体(homozygote)、不具有突变的野生型(wildtype)。按照NtCLCa-S基因的基因型、NtCLCa-T基因的基因型的顺序记载,例如HeHo是NtCLCa-S基因为突变等位基因和野生型等位基因的杂合体、NtCLCa-T基因为突变等位基因的纯合体。重复数为5,误差条为标准偏差。基于t检验的显著差异:*P＜0.05、＊＊P＜0.01。

[0098] 图4是示出各突变体、野生型的烟草植物的取样时(移植20天后)的生长的照片。Ho、He、W是NtCLCa基因为突变等位基因的纯合体(homozygote)、突变等位基因和野生型等位基因的杂合体(heterozygote)、不具有突变的野生型(wildtype)。按照NtCLCa-S基因的基因型、NtCLCa-T基因的基因型的顺序记载,例如HeHo是NtCLCa-S基因为突变等位基因和野生型等位基因的杂合体、NtCLCa-T基因为突变等位基因的纯合体。

[0099] 图5是示出HoHo和WW的叶(叶片)中的硝酸量的昼夜变动的图。Ho、W是NtCLCa基因为突变等位基因的纯合体(homozygote)、不具有突变的野生型(wildtype)。按照NtCLCa-S基因的基因型、NtCLCa-T基因的基因型的顺序记载,例如HoHo是NtCLCa-S基因、NtCLCa-T基因均为突变等位基因的纯合体。暗处8小时的HoHo的重复数为3,其它为4,误差条为标准偏差。图5的黑圆表示HoHo的结果,黑四边形表示WW的结果。

[0100] 图6是示出HoHo和WW的叶(叶片)中的亚硝酸量的昼夜变动的图。Ho、W是NtCLCa基因为突变等位基因的纯合体(homozygote)、不具有突变的野生型(wildtype)。按照NtCLCa-

S基因的基因型、NtCLCa-T基因的基因型的顺序记载,例如HoHo是NtCLCa-S基因、NtCLCa-T基因均为突变等位基因的纯合体。暗处8小时的HoHo的重复数为3,其它为4,误差条为标准偏差。图6的黑圆表示HoHo的结果,黑四边形表示WW的结果。

[0101] 图7是进行NtCLCa突变体中的NtCLCa基因表达量的分析而得到的结果。以核糖体蛋白质L25(Accession编号L18908)作为控制基因,对目标表达量进行相对定量(ΔΔCt法),用得到的平均值表示结果。重复数为10,误差条为标准偏差。基于t检验的显著差异:*P＜0.05。在HoHo中与在WW相比,使用了NtCLCa基因的两组引物的表达水平均显著更低,约为1/2。

[0102] 图8是进行NtCLCa突变体中的NtCLCe基因表达量的分析而得到的结果。以核糖体蛋白质L25(Accession编号L18908)作为控制基因,对目标表达量进行相对定量(ΔΔCt法),用得到的平均值表示结果。在HoHo与WW间未观察到NtCLCe基因的表达水平的显著差异。重复数为10,误差条为标准偏差。

[0103] 图9是示出突变体、野生型的烟草植物的移植后54天后的生长的照片。Ho、W是NtCLCa基因为突变等位基因的纯合体(homozygote)、不具有突变的野生型(wildtype)。按照NtCLCa-S基因的基因型、NtCLCa-T基因的基因型的顺序记载,例如HoHo是NtCLCa-S基因、NtCLCa-T基因均为突变等位基因的纯合体。

[0104] 图10是示出突变体、野生型的烟草植物的移植后20天后(取样时)的生长的照片。Ho、W是NtCLCa基因、NtNIA1基因为突变等位基因的纯合体(homozygote)、不具有突变的野生型(wildtype)。按照NtCLCa-S基因的基因型、NtCLCa-T基因、NtNIA1基因的基因型的顺序记载。HoHoHe是NtCLCa-S基因、NtCLCa-T基因均为突变等位基因的纯合体,另外,NtNIA1基因为突变等位基因和野生型等位基因的杂合体。

具体实施方式

[0105] 本发明非限定性地包含以下方式。在本说明书中,只要没有特别说明,本说明书中使用的技术及科学用语具有本领域技术人员通常理解的含义。本说明书中公开的物质、材料及例子仅为示例,并不进行限制。在本说明书中,提及“在一个方式中”的情况下,意味着并不限定于该方式,即,是非限定的。

[0106] 1.烟草植物

[0107] 在一个方式中,本发明涉及烟草植物。本发明的烟草植物具有如下(i)的内源性基因、及(ii)的内源性基因中的任一种或两种内源性基因:

[0108] (i)包含含有编码序列号2或与序列号2具有至少95%的同一性的氨基酸序列的碱基序列的核酸作为编码区域的内源性基因,在上述碱基序列中,与上述氨基酸序列对应的密码子中的至少1个突变为终止密码子;以及

[0109] (ii)包含含有编码序列号4或与序列号4具有至少95%的同一性的氨基酸序列的碱基序列的核酸作为编码区域的内源性基因,在上述碱基序列中,与上述氨基酸序列对应的密码子中的至少1个突变为终止密码子。

[0110] “内源性基因”不是指从作为对象的烟草植物的体外导入的基因,而是指在该烟草植物的基因组中内源性地存在的基因。本发明中利用的“内源性基因”不是指包含编码所谓野生型的蛋白质的氨基酸序列(例如序列号2,序列号4等)的核酸的野生型基因,而是指如

上所述地包含突变的基因。(i)的内源性基因、和/或(ii)的内源性基因可以是包含上述突变的突变基因与不包含上述突变的基因的杂合体、包含上述突变的突变基因的纯合体中的任意内源性基因。

[0111] “烟草植物”是指茄科烟草属(Nicotina)的植物,可以列举例如:无茎烟草(Nicotiana acaulis)、渐尖叶烟草(Nicotiana acuminata)、渐尖叶烟草多花型变种(Nicotiana acuminata var.multzjlora)、非洲烟草(Nicotiana africana)、花烟草(Nicotiana alata)、抱茎烟草(Nicotiana amplexicaulis)、阿伦特氏烟草(Nicotiana arentsii)、渐狭叶烟草(Nicotiana attenuata)、贝纳米特氏烟草(Nicotiana benavidesii)、本塞姆氏烟草(Nicotiana benthamiana)、毕基劳氏烟草(Nicotiana bigelovii)、博内里烟草(Nicotiana bonariensis)、洞生烟草(Nicotiana cavicola)、克利夫兰式烟草(Nicotiana clevelandii)、心叶烟草(Nicotiana cordifolia)、伞状烟草(Nicotiana corymbosa)、迪勃纳氏烟草(Nicotiana debneyi)、高烟草(Nicotiana excelsior)、福尔吉特氏烟草(Nicotiana forgetiana)、香烟草(Nicotiana fragrans)、粉蓝烟草(Nicotiana glauca)、粘毛烟草(Nicotiana glutinosa),古特斯皮德氏烟草(Nicotiana goodspeedii)、哥西氏烟草(Nicotiana gossei)、因古儿巴烟草(Nicotiana ingulba)、川上烟草(Nicotiana kawakamii)、奈特氏烟草(Nicotiana knightiana)、蓝格斯多夫烟草(Nicotiana langsdorfi)、狭叶烟草(Nicotiana linearis)、长花烟草(Nicotiana longiflora)、海滨烟草(Nicotiana maritima)、特大管烟草(Nicotiana megalosiphon)、摩西烟草(Nicotiana miersii)、夜花烟草(Nicotiana noctiflora)、裸茎烟草(Nicotiana nudicaulis)、欧布特斯烟草(Nicotiana obtusifolia)、西方烟草(Nicotiana occidentalis)、西方烟草Hesperis亚种(Nicotiana occidentalis subsp.Hesperis)、耳状烟草(Nicotiana otophora)、圆锥烟草(Nicotiana paniculata)、少花烟草(Nicotiana pauczjlora)、矮牵牛状烟草(Nicotiana petunioides)、蓝茉莉叶烟草(Nicotiana plumbaginifolia)、四科烟草(Nicotiana quadrivalvis)、雷蒙德氏烟草(Nicotiana raimondii)、残波烟草(Nicotiana repanda)、莲座叶烟草(Nicotiana rosulata)、莲座叶烟草因古儿巴亚种(Nicotiana rosulata subsp.Ingulba)、圆叶烟草(Nicotiana rotundifolia)、黄花烟草(Nicotiana rustica)(黄花烟)、赛特氏烟草(Nicotiana setchellii)、拟似烟草(Nicotiana simulans),茄叶烟草(Nicotiana solanifolia)、斯佩格茨烟草(Nicotiana spegauinii)、斯托克通氏烟草(Nicotiana stocktonii)、香甜烟草(Nicotiana suaveolens)、林烟草(Nicotiana sylvestris)、红花烟草(Nicotiana tabacum)、蓝烟草(Nicotiana thyrsiflora)、绒毛烟草(Nicotiana tomentosa)、绒毛状烟草(Nicotiana tomentosifomis)、三角叶烟草(Nicotiana trigonophylla)、荫生烟草(Nicotiana umbratica)、波叶烟草(Nicotiana undulata)、颤毛烟草(Nicotiana velutina)、芹叶烟草(Nicotiana wigandioides)、以及烟草属植物的杂交种等。虽然没有限定,但更优选为本塞姆氏烟草、黄花烟草及红花烟草,特别优选为作为烟叶生产的原料而使用的黄花烟草及红花烟草。

[0112] 在一个方式中,上述烟草植物为红花烟草(Nicotiana tabacum)。

[0113] 烟草植物不仅可以包括烟草植物的成熟体、整体,还可以包括其部分。上述部分非限定性地选自叶(包含叶身和叶柄)、茎、根、种子、花、花粉、花药、胚珠、花梗、分裂组织、子

叶、胚轴、中柱鞘、胚、胚乳、外植体、愈伤组织、组织培养物、芽、细胞、以及原生质体。

[0114] 上述烟草植物其具有如下(i)的内源性基因、及(ii)的内源性基因中的任一种或两种内源性基因:

[0115] (i)包含含有编码序列号2或与序列号2具有至少95%的同一性的氨基酸序列的碱基序列的核酸作为编码区域的内源性基因,在上述碱基序列中,与上述氨基酸序列对应的密码子中的至少1个突变为终止密码子;以及

[0116] (ii)包含含有编码序列号4或与序列号4具有至少95%的同一性的氨基酸序列的碱基序列的核酸作为编码区域的内源性基因,在上述碱基序列中,与上述氨基酸序列对应的密码子中的至少1个突变为终止密码子。

[0117] 红花烟草是双二倍体植物,其基因组中包含来自于林烟草的祖先种的基因组(S基因组)、和来自于绒毛状烟草的祖先种的基因组(T基因组),在多种情况下,红花烟草的基因存在来自于S基因组的基因和来自于T基因组的基因这两种。

[0118] 序列号2是作为拟南芥(arabidopsis)的氯离子通道(CLC)家族的AtCLCa的烟草同源物,是由位于红花烟草(Nt)的S基因组的NtCLCa-S基因所编码的NtCLCa-S蛋白质的氨基酸序列。序列号1是NtCLCa-S基因的编码区域(CDS)的碱基序列。序列号4是AtCLCa的烟草同源物,是由位于红花烟草(Nt)的T基因组的NtCLCa-T基因所编码的NtCLCa-T蛋白质的氨基酸序列。序列号3是NtCLCa-T基因的CDS的碱基序列。NtCLCa-S蛋白质的氨基酸序列与NtCLCa-T蛋白质的氨基酸序列的同源性为98%,NtCLCa-S基因的CDS与NtCLCa-T基因的CDS的同源性为97%。

[0119] CLC家族是构成电位依赖性离子通道的组的一组蛋白质。在植物体中,氯离子通道与各种阴离子的运输相关(Phil.Trans.R.Soc.B(2009)364,195-201),对膨压的调整、气孔的活动、营养素的搬运、和/或金属耐性及类似的功能等数量众多的植物特异性功能有贡献。

[0120] 拟南芥CLCa(AtCLCa)作为硝酸/质子交换运输体而介导植物体液泡内的硝酸盐的蓄积(Nature(2006)442(7105):939-42)。该文献中记载了通过电生理学分析法进行分析的结果是,AtCLCa是能够在液泡内特异性地蓄积硝酸离子的$2NO^{3-}/1H^{+}$交换体。为了对NtCLCa的硝酸盐的运输体活性进行试验,可以使用类似的方法。Communicative&Integrative Biology.2010;3(2)122-129、及New Phytol.2009;183(1):88-94中公开了AtCLCe可能会参与通过叶绿体包膜的亚硝酸盐运输体而被导入的亚硝酸的从叶绿体的基质向类囊体的运输。非限定性地,可以将Nature(2006)442(7105):939-42所记载的用于测定其活性的方法用于NtCLCe的活性的测定。

[0121] 从序列同源性、功能的观点考虑,可以推定本说明书中的NtCLCa为拟南芥CLCa(AtCLCa)的直向同源。

[0122] 核酸中包含的碱基序列可以是编码序列号2或与序列号2具有至少95%的同一性的氨基酸序列的碱基序列。或者,可以是编码与序列号4具有至少95%的同一性的氨基酸序列的碱基序列。在一个方式中,上述同一性至少为96%、至少为97%、至少为98%、或者至少为99%。

[0123] 在本说明书中,2个氨基酸序列的同一性%可以通过视觉检查和数学计算来确定。另外,也可以使用计算机程序来确定同一性%。作为这样的计算机程序,可以举出例如

BLAST及ClustalW等。特别是基于BLAST程序的同一性检索的各种条件(参数)记载于Altschul等的(Nucl.Acids.Res.,25,p.3389-3402,1997),因此,可以从NCBI、DNA Data Bank of Japan(DDBJ)的网站公开获取(BLAST手册、Altschul等NCB/NLM/NIH Bethesda,MD20894;Altschul等)。另外,也可以使用遗传信息处理软件GENETYX(GENETYX)、DNASIS Pro(日立软件)、Vector NTI(Infomax)等程序而确定。

[0124] 在本说明书中,2个碱基序列的同一性%可以通过视觉检查和数学计算来确定。另外,也可以使用计算机程序来确定同一性%。作为这样的序列比较计算机程序,可以举出例如由美国国家医学图书馆的网站:https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi可以利用的BLASTN程序(Altschul et al.(1990)J.Mol.Biol.215:p.403-10):版本2.2.7、或者WU-BLAST2.0算法等。对于WU-BLAST2.0的标准默认参数的设定可以使用以下的网站:http://blast.wustl.edu所记载的参数。

[0125] “与序列号2具有至少95%的同一性的氨基酸序列、或者与序列号4具有至少95%的同一性的氨基酸序列”可以是在序列号2或4的氨基酸序列中缺失、置换、插入或添加了1个或数个氨基酸而成的氨基酸序列。“缺失、置换、插入或添加了1个或数个氨基酸”这样的情况是指,在作为对象的氨基酸序列中1个或数个氨基酸发生了缺失、或被置换为其它氨基酸、或插入了其它氨基酸、和/或添加了其它氨基酸的氨基酸序列。“数个氨基酸”非限定性地指40个以内、35个以内、30个以内、25个以内、20个以内、15个以内、12个以内、10个以内、8个以内、6个以内、5个以内、4个以内、3个以内、2个以内的氨基酸。或者,数个氨基酸是指相对于氨基酸序列的全长为5%、优选为4%、3%、2%或1%的氨基酸。

[0126] 与序列号2具有至少95%的同一性的氨基酸序列、或与序列号4具有至少95%的同一性的氨基酸序列中的上述氨基酸残基的置换优选为保守性置换。保守性置换是指以具有类似的物理化学特征的残基来替换特定的氨基酸残基,但只要不使与原序列的结构相关的特征发生实质上变化,则可以为任意的置换,例如,只要置换氨基酸不破坏原序列中存在的螺旋、不破坏表征原序列的其它种类的二级结构,则可以为任意的置换。以下,对于氨基酸残基的保守性置换,按照可置换的残基分类进行示例,但可置换的氨基酸残基并不限于以下的记载。

[0127] A组:亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、丙氨酸、甲硫氨酸、甘氨酸、半胱氨酸、脯氨酸

[0128] B组:天冬氨酸、谷氨酸

[0129] C组:天冬酰胺、谷氨酰胺

[0130] D组:赖氨酸、精氨酸

[0131] E组:丝氨酸、苏氨酸

[0132] F组:苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、组氨酸

[0133] 在非保守性置换的情况下,在上述种类中,可以将某1个成员与其它种类的成员进行交换。例如,为了排除意外的糖链修饰,可以将上述B、D、E组的氨基酸置换为除此以外的组的氨基酸。或者,为了防止在三级结构中被折叠于蛋白质中,可以使半胱氨酸缺失、或置换为其它氨基酸。或者,为了确保亲水性/疏水性的平衡、或为了易于合成而提高亲水度,可以考虑作为与氨基酸相关的疏水性/亲水性的指标的氨基酸的亲水指数(J.Kyte及R.Doolittle,J.Mol.Biol.,Vol.157,p.105-132,1982)而对氨基酸进行置换。

[0134] 作为其它方式,可以进行:向比原氨基酸立体位阻小的氨基酸的置换、例如从F组

向A、B、C、D、E组的置换;从具有电荷的氨基酸向不具有电荷的氨基酸的置换、例如从B组向C组的置换。

[0135] 包含与序列号2具有至少95％的同一性的氨基酸序列、或与序列号4具有至少95％的同一性的氨基酸序列、或者由这些氨基酸序列构成的蛋白质分别具有包含序列号2的氨基酸序列或序列号4的氨基酸序列、或者由这些氨基酸序列构成的蛋白质所具有的功能,优选具有作为CLC家族的CLCa的功能。具有CLCa的功能是指,能够在植物体中将硝酸离子特异性地蓄积于液泡内而作为$2NO^{3-}/1H^{+}$交换体发挥功能。

[0136] 在“编码序列号2或与序列号2具有至少95％的同一性的氨基酸序列的碱基序列”、或“编码序列号4或与序列号4具有至少95％的同一性的氨基酸序列的碱基序列”中,与上述氨基酸序列对应的密码子中的至少1个突变为终止密码子。通过使与氨基酸序列对应的密码子中的至少1个突变为终止密码子,能够产生与终止密码子对应之前的氨基酸残基以后(下游)缺失了的蛋白质。或者,也有时不产生蛋白质。

[0137] 上述烟草植物具有如下(i)的内源性基因、及(ii)的内源性基因中的任一种或两种内源性基因:(i)包含含有编码序列号2或与序列号2具有至少95％的同一性的氨基酸序列的碱基序列的核酸作为编码区域的内源性基因,在上述碱基序列中,与上述氨基酸序列对应的密码子中的至少1个突变为终止密码子;以及(ii)包含含有编码序列号4或与序列号4具有至少95％的同一性的氨基酸序列的碱基序列的核酸作为编码区域的内源性基因,在上述碱基序列中,与上述氨基酸序列对应的密码子中的至少1个突变为终止密码子。在一个方式中,具有两种内源性基因。

[0138] 在一个方式中,上述烟草植物以下的要件中的任一个或两个要件:

[0139] 在(i)的内源性基因所包含的核酸中,相当于序列号2的233位～285位的氨基酸的密码子中的至少1个突变为终止密码子;以及

[0140] 在(ii)的内源性基因所包含的核酸中,相当于序列号4的233位～285位的氨基酸的密码子中的至少1个突变为终止密码子。

[0141] 在一个方式中,具备两个要件。

[0142] “相当于序列号2的233位～285位的氨基酸”是指,在“与序列号2具有至少95％的同一性的氨基酸序列”中,与序列号2进行比较时,根据周围的氨基酸序列的信息能够理解为“相当于序列号2的233位～285位的氨基酸”的氨基酸残基,在“与序列号2具有至少95％的同一性的氨基酸序列”中,可以不一定与233位～285位的氨基酸的位置完全一致。例如,即使在N末端添加了不存在于序列号2的氨基酸序列这样的情况、或中途的氨基酸残基缺失了的情况下,也可以根据与序列号2的比较来把握能够理解为“相当于序列号2的233位～285位的氨基酸的”的氨基酸残基。“相当于序列号4的233位～285位的氨基酸”的含义也相同。

[0143] 在实施例中,得到了由NtCLCa-T基因翻译的多肽中编码第233位的色氨酸(W)的密码子变化为终止密码子的突变体(222T)、和编码第285位的色氨酸(W)的密码子变化为终止密码子的突变体(223T)这两种突变体,确认了任意突变体均具有减少硝酸的效果。由此,以至少包含在(ii)的内源性基因所包含的核酸中相当于序列号4的233位～285位之间的氨基酸的密码子中的至少1个突变为终止密码子的核酸作为编码区域的内源性基因的形式包含的烟草植物可获得同样的效果。

[0144] 另外,得到了由NtCLCa-S基因翻译的多肽中编码第279位的色氨酸(W)的密码子变化为终止密码子的突变体(220S),确认了该突变体具有减少硝酸的效果。序列号2与序列号4的233位～285位的氨基酸序列同一。由此,可以认为,与NtCLCa-T基因同样,关于NtCLCa-S基因,以至少包含在(i)的内源性基因所包含的核酸中相当于序列号2的233位～285位之间的氨基酸的密码子中的至少1个突变为终止密码子的核酸作为编码区域的内源性基因的形式包含的烟草植物可获得同样的效果。这与实施例中记载的表明NtCLCa-S与NtCLCa-T具有同等的硝酸运输能力的结果也是一致的。

[0145] 本发明中的向“终止密码子”的突变也包括:由于NtCLCa基因中发生的无义突变而使(仅)相当的密码子部分变成终止密码子的情况;和由于向NtCLCa基因的碱基插入、缺失而发生移码并在结果上突变为“终止密码子”的情况。在后者的情况下,优选在序列号1或3中记载的CDS序列的第697位以后进行了碱基的插入、缺失。

[0146] 在一个方式中,在(i)的内源性基因所包含的核酸中,通过由1个碱基置换导致的无义突变,相当于序列号2的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位或285位的氨基酸的密码子中的至少1个突变为终止密码子。

[0147] 在一个方式中,在(i)的内源性基因所包含的核酸中,通过插入1个碱基而发生移码,相当于从可翻译的氨基酸序列的开端起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位或285位的氨基酸的密码子中的至少1个突变为终止密码子。

[0148] 在一个方式中,在(i)的内源性基因所包含的核酸中,通过使1个碱基缺失而使序列号1中记载的CDS序列的第794-796位的碱基变成TAG、第815-817位的碱基变成TAG,由此,相当于序列号2的265位、272位的氨基酸的密码子突变为终止密码子。

[0149] 在一个方式中,在(ii)的内源性基因所包含的核酸中,通过由1个碱基置换导致的无义突变,相当于序列号4的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位或285位的氨基酸的密码子中的至少1个突变为终止密码子。

[0150] 在一个方式中,在(ii)的内源性基因所包含的核酸中,通过插入1个碱基而发生移码,相当于从可翻译的氨基酸序列的开端起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位或285位的氨基酸的密码子中的至少1个突变为终止密码子。

[0151] 在一个方式中,在(ii)的内源性基因所包含的核酸中,通过使1个碱基缺失而使序列号3中记载的CDS序列的第794-796位的碱基变成TAG、第815-817位的碱基变成TAG,由此,相当于序列号4的265位、272位的氨基酸的密码子突变为终止密码子。

[0152] 在一个方式中,在(i)的内源性基因所包含的核酸中,相当于序列号2的279位的氨基酸的密码子突变为终止密码子。

[0153] 在一个方式中,在(ii)的内源性基因所包含的核酸中,相当于序列号4的285位的氨基酸的密码子突变为终止密码子。

[0154] 在一个方式中,在(ii)的内源性基因所包含的核酸中,与序列号4的233位的氨基酸对应的密码子突变为终止密码子。

[0155] 在一个方式中,

[0156] 在(i)的内源性基因所包含的核酸中,相当于序列号2的279位的氨基酸的密码子

突变为终止密码子,而且

[0157] 在(ii)的内源性基因所包含的核酸中,相当于序列号4的233位或285位的氨基酸的密码子突变为终止密码子。

[0158] (i)的内源性基因、和/或(ii)的内源性基因可以是包含上述突变的突变基因与不包含上述突变的基因的杂合体、包含上述突变的突变基因的纯合体中的任意内源性基因。这里,纯合体只要是等位基因这两者包含上述突变的突变基因即可,不仅包含突变为终止密码子的位置相同的等位基因的组合,还包含突变为终止密码子的位置不同的等位基因的组合。优选(i)的内源性基因和/或(ii)的内源性基因是包含上述突变的突变基因的纯合体。优选为具有(i)的内源性基因及(ii)的内源性基因、并且均包含上述突变的突变基因的纯合体,即,NtCLCa的基因型为sstt的个体。这里,S是指不包含上述突变的NtCLCa-S基因,s是指包含上述突变的NtCLCa-S基因,T是指不包含上述突变的NtCLCa-T基因,t是指包含上述突变的NtCLCa-T基因。

[0159] 在一个方式中,在(i)的内源性基因所包含的核酸中,相当于由核酸编码的序列号2的163位的氨基酸为甘氨酸。“相当于序列号2的163位的氨基酸”与“相当于序列号2的233位～285位的氨基酸”的情况同样,可以根据与序列号2的比较来把握符合的氨基酸残基。WO2014/096283记载了包含NtCLCa的S基因组(序列号2)的163位从甘氨酸突变为精氨酸的错义突变的EMS突变体。在一个方式中,在(i)的内源性基因所包含的核酸中,相当于由核酸编码的序列号2的163位的氨基酸不是精氨酸。在一个方式中,在(i)的内源性基因所包含的核酸中,相当于由核酸编码的序列号2的163位的氨基酸的密码子不包含突变。

[0160] 在一个方式中,上述烟草植物进一步包含以下(iii)的内源性基因:

[0161] (iii)包含含有编码序列号8或与序列号8具有至少95%的同一性的氨基酸序列的碱基序列的核酸作为编码区域的内源性基因,相当于上述氨基酸序列的231位的氨基酸为脯氨酸。

[0162] 序列号6是作为拟南芥(arabidopsis)的CLC家族的AtCLCe的烟草同源物,是由位于红花烟草(Nt)的S基因组的NtCLCe-S基因所编码的蛋白质的氨基酸序列。序列号5是NtCLCe-S基因的CDS的碱基序列。烟草植物可以在NtCLCe-S基因中包含突变,也可以不包含突变。

[0163] 序列号8是作为拟南芥(arabidopsis)的CLC家族的AtCLCe的烟草同源物,是由位于红花烟草(Nt)的T基因组的NtCLCe-T基因所编码的蛋白质的氨基酸序列。序列号7是NtCLCe-T基因的CDS的碱基序列。对于“相当于序列号8的231位的氨基酸”而言,可以根据与序列号8的比较而把握符合的氨基酸残基。WO2014/096283中记载了包含来自于NtCLCe-T基因的NtCLCe蛋白质(该文献的序列号13)的143位从脯氨酸突变为亮氨酸的错义突变的EMS突变体。这里,该文献的序列号13的143位符合本说明书的序列号8的231位。在一个方式中,在(iii)的内源性基因所包含的核酸中,相当于由核酸编码的序列号8的231位的氨基酸不是亮氨酸。在一个方式中,在(iii)的内源性基因所包含的核酸中,相当于由核酸编码的序列号8的231位的氨基酸的密码子中不包含突变。

[0164] 在一个方式中,上述烟草植物可以为突变体或基因修饰体。

[0165] 在本说明书中,“突变体”是由天然或人工产生的随机的突变所形成的烟草植物的修饰体。制备突变体的方法在以下的“3.烟草植物的制备方法”中详细说明。另外,突变体可

以是从以突变体作为一个亲本与烟草植物交配而成的后代中挑选具有如下(i)的内源性基因及(ii)的内源性基因中的任一种或两种内源性基因的烟草植物而得到的烟草植物或其后代,但并不限定于此:

[0166] (i)包含含有编码序列号2或与序列号2具有至少95%的同一性的氨基酸序列的碱基序列的核酸作为编码区域的内源性基因,在上述碱基序列中,与上述氨基酸序列对应的密码子中的至少1个突变为终止密码子;以及

[0167] (ii)包含含有编码序列号4或与序列号4具有至少95%的同一性的氨基酸序列的碱基序列的核酸作为编码区域的内源性基因,在上述碱基序列中,与上述氨基酸序列对应的密码子中的至少1个突变为终止密码子。

[0168] "基因修饰体"是在烟草植物中如下所述地对内源性基因进行修饰而得到的烟草植物,包括其后代:

[0169] (i)在包含含有编码序列号2或与序列号2具有至少95%的同一性的氨基酸序列的碱基序列的核酸作为编码区域的内源性基因中导入突变,使得与上述氨基酸序列对应的密码子中的至少1个成为终止密码子;和/或

[0170] (ii)在包含含有编码序列号4或与序列号4具有至少95%的同一性的氨基酸序列的碱基序列的核酸作为编码区域的内源性基因中导入突变,使得与上述氨基酸序列对应的密码子中的至少1个成为终止密码子。

[0171] 在一个方式中,本发明的烟草植物是具有如下内源性基因中的任一种或两种内源性基因的烟草植物,包括其后代:

[0172] 包含编码序列号2或与序列号2具有至少95%的同一性的氨基酸序列中从233位~285位之间的氨基酸残基至C末端的氨基酸残基的氨基酸序列缺失了的多肽的碱基序列作为编码区域的内源性基因;以及

[0173] 包含编码序列号4或与序列号4具有至少95%的同一性的氨基酸序列中从233位~285位之间的氨基酸残基至C末端的氨基酸残基的氨基酸序列缺失了的多肽的碱基序列作为编码区域的内源性基因。

[0174] 这里,序列号2或4的氨基酸序列(包含与它们具有至少95%的同一性的氨基酸序列)中从233位~285位之间的氨基酸残基至C末端的氨基酸残基的氨基酸序列缺失了的多肽可以是不包含序列号2或4的氨基酸序列中从233位~285位之间的氨基酸残基至C末端的氨基酸残基的氨基酸序列的多肽。即,该多肽可以包含"不包含序列号2或4的氨基酸序列中的从233位~285位之间的氨基酸残基至C末端的氨基酸残基的氨基酸序列、但包含通过移码产生的序列号2或4的氨基酸序列以外的氨基酸序列作为C末端区域的多肽"。

[0175] 序列号2或4的氨基酸序列(包含与它们具有至少95%的同一性的氨基酸序列)中从233位~285位之间的氨基酸残基至C末端的氨基酸残基的氨基酸序列缺失了的多肽可以是相当于序列号2或4的氨基酸序列的233位~285位的氨基酸的密码子中的至少1个突变为终止密码子的方式、和/或通过从序列号1或3所记载的CDS序列的第697位至第855位的核酸序列中的碱基的缺失或插入而发生了移码的方式。

[0176] 上述烟草植物例如包含EMS突变体等突变体、通过基因组编辑等得到的基因修饰体。在一个方式中,上述烟草植物为突变体或基因修饰体。

[0177] "突变体"、"基因修饰体"不仅可以包括烟草植物的成熟体、整体,还可以包括其部

分。上述部分非限定性地选自叶(包含叶身和叶柄)、茎、根、种子、花、花粉、花药、胚珠、花梗、分裂组织、子叶、胚轴、中柱鞘、胚、胚乳、外植体、愈伤组织、组织培养物、芽、细胞、以及原生质体。

[0178] 在一个方式中,本发明的烟草植物进一步包含:(iv)与相当于序列号42或44的氨基酸序列中的525位相应的氨基酸残基从脯氨酸突变为脯氨酸以外的氨基酸残基的硝酸还原酶。上述脯氨酸以外的氨基酸残基优选为亮氨酸或丝氨酸。

[0179] 红花烟草具有被称为NIA1(来自于T基因组)和NIA2(来自于S基因组)的2个具有高度同源性的氮代谢酶基因。(iv)的硝酸还原酶包含由NIA1基因所编码的NIA1蛋白质及其突变体、和/或由NIA2基因所编码的NIA2蛋白质及其突变体。

[0180] NIA1基因及NIA2基因分别具有序列号41、43的碱基序列。NIA1蛋白质、NIA2蛋白质分别具有由序列号41、43的碱基序列所编码的序列号42、44的氨基酸序列(其中,相当于525位的氨基酸残基从脯氨酸突变为脯氨酸以外的氨基酸残基)。只要满足(iv)的突变的硝酸还原酶的氨基酸序列是与相当于序列号2或4的氨基酸序列中的525位相应的氨基酸残基从脯氨酸突变为脯氨酸以外的氨基酸残基的硝酸还原酶这样的条件,则可以是与序列号2或4相比具有一些多样性(突变)的突变体。

[0181] 本发明人等发现,在包含相当于NIA1蛋白质或NIA2蛋白质的氨基酸序列中的525位的氨基酸残基从脯氨酸突变为脯氨酸以外的氨基酸残基的硝酸还原酶的烟草植物中,叶中硝酸量降低,植物体的生长也良好(PCT/JP2021/45295、WO2022/124361)。

[0182] 具有如下(i)的内源性基因(NtCLCa-S基因)和/或(ii)的内源性基因(NtCLCa-T基因)、且包含相当于NIA1蛋白质或NIA2蛋白质的氨基酸序列中的525位的氨基酸残基从脯氨酸突变为脯氨酸以外的氨基酸残基的硝酸还原酶的烟草植物的叶中硝酸量与对照相比大幅降低(实施例5),所述(i)的内源性基因(NtCLCa-S基因)包含含有编码序列号2或与序列号2具有至少95%的同一性的氨基酸序列的碱基序列的核酸作为编码区域,在所述碱基序列中,与所述氨基酸序列对应的密码子中的至少1个突变为终止密码子,所述(ii)的内源性基因(NtCLCa-T基因)包含含有编码序列号4或与序列号4具有至少95%的同一性的氨基酸序列的碱基序列的核酸作为编码区域,在所述碱基序列中,与所述氨基酸序列对应的密码子中的至少1个突变为终止密码子。其中,NtCLCa-S基因及NtCLCa-T基因分别可以为:包含编码序列号2或与序列号2具有至少95%的同一性的氨基酸序列中从233位～285位之间的氨基酸残基至C末端的氨基酸残基的氨基酸序列缺失了的多肽的碱基序列作为编码区域的内源性基因;以及包含编码序列号4或与序列号4具有至少95%的同一性的氨基酸序列中从233位～285位之间的氨基酸残基至C末端的氨基酸残基的氨基酸序列缺失了的多肽的碱基序列作为编码区域的内源性基因。

[0183] 2.烟草植物的性质

[0184] 本发明的烟草植物具有以下的(a)-(c)中1种以上的性质:

[0185] (a)与对照相比,硝酸含量减少;

[0186] (b)与对照相比,亚硝酸含量同等;

[0187] (c)与对照相比,氨基酸含量增加,

[0188] 其中,对照是包含具有序列号2的氨基酸序列的多肽、以及具有序列号4的氨基酸序列的多肽的烟草植物。

[0189] 对照的“包含具有序列号2的氨基酸序列的多肽、以及具有序列号4的氨基酸序列的多肽的烟草植物”是指,在与上述氨基酸序列对应的密码子中不具有终止密码子、且具有全长的NtCLCa-S蛋白质(序列号2)及NtCLCa-T蛋白质(序列号4)的烟草植物。对照烟草植物可以为红花烟草,优选可以为野生型的红花烟草。野生型的红花烟草具有全长的NtCLCa-S蛋白质(序列号2)及NtCLCa-T蛋白质(序列号4),其表达、活性均未经任何修饰。

[0190] 在一个方式中,本发明的烟草植物具有(a)-(c)中2种以上的性质、或全部3种性质。

[0191] (a)与对照相比,硝酸含量减少

[0192] 在一个方式中,上述烟草植物与对照相比,所含有的硝酸的量减少。非限定性地,硝酸例如可以通过本说明书的实施例3的“(3)硝酸分析”中记载的方法来测定。例如,可以使从烟草植物采集到的叶干燥,用水进行提取后,进行过滤,将得到的滤液作为测定试样。

[0193] 在一个方式中,上述烟草植物与对照相比,优选硝酸含量减少了至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少95%。在一个方式中,上述烟草植物与对照相比,硝酸含量减少了至少80%。

[0194] (b)与对照相比,亚硝酸含量同等

[0195] 在一个方式中,上述烟草植物与对照相比,所含有的亚硝酸(实质上)为同等程度。亚硝酸例如可以通过本说明书的实施例3的“(4)亚硝酸分析”中记载的方法来测定。例如,可以使从烟草植物采集的叶干燥,用水对由此制备的粉末进行提取,然后进行过滤,将得到的滤液作为测定试样,通过比色法对亚硝酸进行定量。

[0196] 非限定性地,“与对照相比,亚硝酸含量同等”是指,与对照相比,亚硝酸的增减为30%以下、28%以下、25%以下、23%以下、20%以下、18%以下、15%以下。在一个方式中,非限定性地,“与对照相比,亚硝酸含量同等”是指,与对照相比,亚硝酸的增加为30%以下、28%以下、25%以下、23%以下、20%以下、18%以下、15%以下。

[0197] 上述烟草植物优选具有亚硝酸含量同等而硝酸含量减少的特征。

[0198] (c)与对照相比,氨基酸含量增加

[0199] 在一个方式中,上述烟草植物与对照相比,所含有的氨基酸增加。在一个方式中,氨基酸为游离氨基酸。(游离)氨基酸例如可以通过本说明书的实施例3的“(5)游离氨基酸分析”中记载的方法来测定。例如,可以通过对包含使从烟草植物采集的叶干燥而制备的粉末的溶液进行超声波处理,进行HPLC分析,从而进行测定。

[0200] 在一个方式中,上述烟草植物与对照相比,所含有的氨基酸至少增加1.1倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.8倍、2倍。氨基酸的增加量没有特别的上限。在一个方式中,上述烟草植物与对照相比,所含有的氨基酸的增加量为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。在一个方式中,上述烟草植物与对照相比,所含有的氨基酸增加1.1倍~4倍、1.3倍~3.5倍、1.4倍~3倍、1.5倍~2.5倍。在一个方式中,上述烟草植物与对照相比,所含有的氨基酸增加约2倍。

[0201] 本发明的烟草植物可以进一步具有以下的(d)的性质。

[0202] (d)与对照相比,个体的生长实质上同等

[0203] 在一个方式中,上述烟草植物包含由序列号2或4的氨基酸序列构成的硝酸还原酶,作为烟草植物的对照与个体的生长实质上为同等水平。

[0204] “与对照相比,个体的生长实质上同等”是指,植物体的高度、叶的数量、叶的大小等、个体的尺寸(生长)、质量(mass)(例如,地上叶干重(biomass))、以及开花的时期等实质上为相同程度。非限定性地,例如在对高度进行比较时,其差为20%以内、15%以内、10%以内、5%以内。

[0205] 例如,如本说明书的实施例4所示,上述烟草植物包含由序列号2或4的氨基酸序列构成的硝酸还原酶,叶片重量与作为烟草植物的对照同等。在实施例5中,即使在进行了NtNIA1的突变等位基因的聚合(pyramiding)(基因突变的累积)的情况下,也不会影响烟草生长。

[0206] 优选上述(a)-(d)中的1种以上的性质不仅是作为突变体或基因修饰体的M1代,而且在其以后的后代(M2代、M3代、M3代以后)中也可得到继承。

[0207] 3.烟草植物的制备方法

[0208] 在一个方式中,本发明涉及烟草植物的制备方法。

[0209] 烟草植物的制备方法包括:在烟草植物中,

[0210] (i)在包含含有编码序列号2或与序列号2具有至少95%的同一性的氨基酸序列的碱基序列的核酸作为编码区域的内源性基因中导入突变,使得与上述氨基酸序列对应的密码子中的至少1个成为终止密码子;和/或

[0211] (ii)在包含含有编码序列号4或与序列号4具有至少95%的同一性的氨基酸序列的碱基序列的核酸作为编码区域的内源性基因中导入突变,使得与上述氨基酸序列对应的密码子中的至少1个成为终止密码子。

[0212] 或者,烟草植物的制备方法包括:在烟草植物中挑选具有如下(i)的内源性基因及(ii)的内源性基因中的任一种或两种内源性基因的烟草植物:

[0213] (i)包含含有编码序列号2或与序列号2具有至少95%的同一性的氨基酸序列的碱基序列的核酸作为编码区域的内源性基因,在上述碱基序列中,与上述氨基酸序列对应的密码子中的至少1个突变为终止密码子;以及

[0214] (ii)包含含有编码序列号4或与序列号4具有至少95%的同一性的氨基酸序列的碱基序列的核酸作为编码区域的内源性基因,在上述碱基序列中,与上述氨基酸序列对应的密码子中的至少1个突变为终止密码子。

[0215] 对内源性基因的突变导入(内源性基因的修饰)例如可以使用基因组编辑系统进行。对于基因组编辑系统而言,可以在包含含有编码“序列号2或与序列号2具有至少95%的同一性的氨基酸序列”或“序列号4或与序列号4具有至少95%的同一性的氨基酸序列”的碱基序列的核酸作为编码区域的内源性基因中,在任意的位置导入基于碱基的缺失、插入、置换的无义突变,使得与上述氨基酸序列对应的密码子中的至少1个成为终止密码子。上述内源性基因可以通过包含将NtCLCa的S基因组的基因的CDS(序列号1)和/或NtCLCa的T基因组的基因的CDS(序列号3)切断的部位特异性核酸酶的基因组编辑系统进行修饰。基因组编辑系统也可以利用核酸酶介导的非同源末端结合或同源重组修复。可以对基因组编辑系统中使用的部位特异性核酸酶适当地进行修饰。例如,修饰的部位特异性核酸酶可以为CRISPR/Cas9类系统、ZFN或TALEN。部位特异性核酸酶可以将NtCLC基因切断。作为基因组编辑系统,也可以利用修饰的CRISPR/Cas-9系统、修饰的转录激活因子样效应物核酸酶、修饰的锌指核酸酶或修饰的大范围核酸酶等修饰的CRISPR/Cas系统。

[0216] 上述烟草植物的制备方法例如可以包括:挑选通过突变而具有如下(i)的内源性基因及(ii)的内源性基因中的任一种或两种内源性基因烟草植物:

[0217] (i)包含含有编码序列号2或与序列号2具有至少95%的同一性的氨基酸序列的碱基序列的核酸作为编码区域的内源性基因,在上述碱基序列中,与上述氨基酸序列对应的密码子中的至少1个突变为终止密码子;以及

[0218] (ii)包含含有编码序列号4或与序列号4具有至少95%的同一性的氨基酸序列的碱基序列的核酸作为编码区域的内源性基因,在上述碱基序列中,与上述氨基酸序列对应的密码子中的至少1个突变为终止密码子。

[0219] 使植物发生突变的方法在本领域是公知的,包括化学突变原或放射线在内,可以使用主要产生点突变及短的缺失、插入、碱基置换和/或转移的突变原而在植物所具有的CLC基因中产生突变。化学突变原包括:乙基甲磺酸盐(EMS)、甲基甲磺酸盐、N-乙基-N-亚硝基脲、三乙基三聚氰胺、N-甲基-N-亚硝基脲、甲基苄肼、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、二乙基硫酸盐、丙烯酰胺单体、苯丙氨酸氮芥、氮芥(nitrogen mustard/ナイトロジェン・マスタードカラシナ)、长春新碱、二甲基亚硝胺、N-甲基-N'-硝基-亚硝基胍、亚硝基胍、2-氨基嘌呤、7,12二甲基苯并(a)蒽、氧化乙烯氧化物、六甲基膦酰胺、白消安(bisulfane)、二环氧烷(二环氧辛烷、二环氧丁烷及类似物)、2-甲氧基-6-氯-9[3-(乙基-2-氯乙基)氨基丙基氨基]吖啶二盐酸盐及甲醛,但并不限定于此。另外,放射线包括:γ射线、重离子束、X射线、中子射线或UV,但并不限定于此。

[0220] 选择通过突变而包含NtCLCa基因的期望位置变为终止密码子的突变的烟草植物的工序可以包括一次以上的杂交工序。在一个方式中,可以对诱变后的种子进行播种、栽培,得到第一代的植物体,对于将其进行自花受粉而得到的第二代的植物体,进行突变体的筛选。筛选第二代的植物体的优点在于该突变为来自于生殖细胞的突变。诱变的对象没有限定,可以为种子、花粉。在以花粉作为对象进行诱变的情况下,对于由将该花粉与未进行诱变的植物体进行交配而得到的种子生长成的植物体,可以进行突变体的筛选。

[0221] 在目标位置包含终止密码子的基因修饰体、或突变体的选择非限定性地可以通过例如从烟草植物提取基因组DNA,利用PCR等进行扩增,然后对编码相当于序列号2或4的氨基酸序列的DNA的碱基序列进行分析而进行。此外,可以从以下方法中选择:使用SSCP(Single strand conformation Polymorphism)法按照电泳距离的差异检测序列的差异的方法、通过使用T7Endonuclease I等将错配部位切断而检测有无突变的方法等。

[0222] 在一个方式中,本发明可以是用于挑选包含如下内源性基因的烟草植物的挑选用核酸标记物,该内源性基因包含含有编码"序列号2或与序列号2具有至少95%的同一性的氨基酸序列"或"序列号4或与序列号4具有至少95%的同一性的氨基酸序列"的碱基序列的核酸中含有发生转变为目标的终止密码子的突变的无义突变和/或移码突变的核酸作为编码区域。或者,可以是用于检测上述转变为目标的终止密码子的突变的检测用多核苷酸。在一个方式中,挑选用核酸标记物或检测用多核苷酸可以是用于将编码包含序列号2的233位~285位的氨基酸残基或序列号4的233位~285位的氨基酸残基的部分的DNA的碱基序列进行扩增的核酸扩增用引物,可以是编码包含序列号2的233位~285位的氨基酸残基或序列号4的233位~285位的氨基酸残基的部分的DNA的碱基序列的序列确定用引物,或者可以是与编码包含序列号2的233位~285位的氨基酸残基或序列号4的233位~285位的氨基酸残

基的部分的DNA结合的探针。本领域技术人员可以基于公知技术而适当选择这些挑选用核酸标记物或检测用多核苷酸。

[0223] 在一个方式中,本发明可以是使包含转变为目标的终止密码子的突变的烟草植物、和通过与本发明的烟草植物不同的机理减少了含有硝酸量的烟草植物进行交配而得到的烟草植物及其后代。

[0224] 4.烟叶及干燥叶

[0225] 在一个方式中,本发明涉及由本发明的烟草植物收获的烟叶。另外,本发明涉及由本发明的烟叶制成的干燥叶。

[0226] “本发明的烟叶”含义如在“3.烟草植物的制备方法”中的说明所述。

[0227] 由烟叶制作干燥叶的工序没有特别限定,可以使用公知的方法。对于烟草植物,可以收获其叶,作为用于制造烟草制品等的材料。烟叶可以进行空气干燥、烘烤干燥(fire-cured)、烟熏干燥(flue-cured)或日晒干燥。非限定性地,对于空气干燥,悬挂于通风良好的仓库,暴露于空气中干燥4~8周(进行调制)。对于烘烤干燥烟草,在大的仓库中悬挂,根据工序及烟草用火力连续或间断地加热干燥3天~10周。对于烟熏干燥烟草,将烟草排成一列,在干燥小屋中悬挂,通常使温度缓慢上升使其干燥1周左右。对于日晒干燥处理烟草,在向阳处干燥。该方法是在土耳其、希腊、以及其它地中海各国为了制造东方烟叶而使用的。

[0228] 在一个方式中,本发明涉及来自于本发明的烟叶的干燥叶。

[0229] 5.烟丝、粉末、片、烟梗、颗粒、提取物、组合物

[0230] 在一个方式中,本发明涉及由本发明的干燥叶制造的烟丝、粉末、片、烟梗、颗粒或提取物。

[0231] “本发明的干燥叶”的含义如“4.烟叶及干燥叶”中的说明所述。

[0232] “烟丝”是指将干燥的烟叶细碎切断成细长的条状的烟丝,用于卷烟。

[0233] “烟梗”是指沿着叶的中央的最粗的叶脉部分。

[0234] “粉末”是指将干燥的烟叶粉碎而成为粉状的粉末。

[0235] “颗粒”是指将粉末成型为粒状的颗粒。

[0236] “提取物”是以改善烟草制品的香味的目的、降低烟草制品中的特定成分的含量的目的而对来自于烟草植物的叶、茎等材料(“部分”、优选包含“非增殖性部分”)进行提取所得到的物质。提取方法可以使用用于从植物提取精油、特定成分等的公知的方法。

[0237] 非限定性地,本发明涉及本发明的烟草植物(包含部分)或干燥叶、或包含来自于这些的烟草材料(烟丝等)的组合物。组合物可以直接使用烟草植物或其部分,或者使用进行裁切、粉碎或磨碎而形成细片状、浆料状或微粉状的材料。作为组合物,烟草植物或其部分可以直接使用从田地等收获到的烟草,可以使用在给定期间的屋内或屋外中使水分部分散失的材料,或者可以使用利用干燥机等使水分基本上散失的材料。

[0238] 非限定性地,组合物可以包含由本发明的干燥叶制造的烟丝、粉末、片、烟梗、颗粒或提取物。

[0239] 在一个方式中,本发明的烟丝、粉末、片、烟梗、颗粒或提取物、以及组合物包含烟草植物的非增殖性部分。

[0240] 在一个方式中,本发明的烟丝、粉末、片、烟梗、颗粒或提取物、以及组合物包含含有编码相当于序列号2和/或序列号4的氨基酸序列的碱基序列中与上述氨基酸序列对应的

密码子中的至少1个突变为终止密码子的碱基序列的核酸。

[0241] 6.制品

[0242] 在一个方式中,本发明涉及包含本发明的干燥叶、和/或本发明的烟丝、粉末、片、烟梗、颗粒或提取物的烟草制品。

[0243] “本发明的干燥叶、和/或本发明的烟丝、粉末、片、烟梗、颗粒或提取物”的含义如“5.烟丝、粉末、片、烟梗、颗粒、提取物、组合物”中的说明所述。

[0244] “烟草制品”的种类没有特别限定。除卷烟(香烟)以外,包括雪茄、烟斗烟草、鼻烟(包含唇烟(Snus)、鼻烟(Snuff))、嚼烟、烟丝(包含细烟丝)、水烟等。进一步,也包含以将烟草加热而产生的气溶胶作为气溶胶源而使用的非燃烧加热型烟草制品、不将烟草加热而抽吸其香味的非加热型烟草制品等。

[0245] 非限定性地,“烟草制品”包含烟草植物的非增殖性部分。

[0246] 在一个方式中,本发明提供本发明的烟草植物、烟叶、干燥叶、组合物的用于制造烟草制品的用途。

[0247] 在一个方式中,本发明涉及用于制造烟草制品本发明的烟草植物、烟叶、干燥叶、组合物。

[0248] 在一个方式中,本发明包括烟草制品的制造方法。非限定性地,烟草制品的制造方法包括:由具有如下(i)的内源性基因及(ii)的内源性基因中的任一种或两种内源性基因的烟草植物制备来自于烟草植物的材料:

[0249] (i)包含含有编码序列号2或与序列号2具有至少95%的同一性的氨基酸序列的碱基序列的核酸作为编码区域的内源性基因,在上述碱基序列中,与上述氨基酸序列对应的密码子中的至少1个突变为终止密码子;以及

[0250] (ii)包含含有编码序列号4或与序列号4具有至少95%的同一性的氨基酸序列的碱基序列的核酸作为编码区域的内源性基因,在上述碱基序列中,与上述氨基酸序列对应的密码子中的至少1个突变为终止密码子。

[0251] 上述制造方法可以包括从上述烟草植物采集叶而制备干燥叶的工序。烟草制品的制造方法可以使用公知的方法。例如,可以从本发明的烟草植物,将采集到的叶(烟叶)干燥(调制),并经由原料工序(分级、去梗、调整/干燥、贮藏/熟成)、原料加工工序(片材、提取、颗粒、加热、增香)、以及制品工序(混合、切碎、卷烟、包装)而制造烟草制品。

[0252] “烟草制品”的定义如上所述。

[0253] 实施例

[0254] 以下,基于实施例对本发明详细地进行说明,但本发明并不限定于这些实施例。本领域技术人员可以基于本说明书的记载而容易地对本发明进行修改/变更,这些均包含于本发明的技术范围。

[0255] 实施例1NtCLCa突变体的分离

[0256] 在本实施例中,进行了红花烟草的CLCa突变体的分离。

[0257] 位于S基因组的野生型NtCLCa-S基因的CDS序列(序列号1)

[0258] 位于T基因组的野生型NtCLCa-T基因的CDS序列(序列号3)。

[0259] 首先,对烟草种子(品种:Tsukuba 1号)进行EMS处理,制作了突变体库。通过对基因组序列进行解读,从该突变体库中挑选出在NtCLCa基因中具有无义突变的突变体。

NtCLCa基因是AtCLCa基因的烟草同源物。分离出了1种位于S基因组的NtCLCa-S基因的突变体、2种位于T基因组的NtCLCa-T基因的突变体。挑选通过以下的方法实施。

[0260] (1)基因组DNA的制备

[0261] 在96孔深孔板或2ml管中采集5mm见方左右的叶片,添加200-500μl的DNA提取缓冲液(0.2M Tris-HCl pH8.0、0.4M NaCl、25mM EDTA、0.5%SDS)和珠(96孔深孔板)或金属锥(2ml专用管)1个,通过ShakeMaster NEO(Bio-Medical Science)以1000rpm磨碎3～5分钟。以4400rpm(96孔深孔板)、12000rpm(2ml专用管)进行20分钟的离心,回收得到的上清。通过乙醇沉淀法使核酸从上清中沉淀,悬浮于50-100μl的TE缓冲液中。

[0262] (2)PCR

[0263] 将如上所述地制备的基因组DNA作为模板,使用KOD one(TOYOBO)或TKS Gflex DNA Polymerase(Takara Bio)进行了PCR。PCR反应组成依照附带的手册,应用了以下的反应条件。

[0264] KOD one:94℃2分钟、(98℃10秒钟、60℃15秒钟、68℃5秒钟)×40循环、68℃5分钟

[0265] TKS Gflex DNA Polymerase:94℃1分钟、(98℃10秒钟、55℃15秒钟、68℃1分钟)×40循环、68℃1分钟

[0266] 基于各基因的序列信息适当地制作引物,用于挑选。用于无义突变的分离/分析的引物如下。需要说明的是,220S是S基因分析用的引物,222T及223T是T基因分析用的引物。

[0267] 220S-F:ATTACCGGCTCAGGTGGCGT(序列号9)、220S-R:TGCCAGATTTGCAGTATTCA(序列号10)

[0268] 222T-F:CTTACCAACTCCTTTTTCCC(序列号11)、222T-R:TGTGATAAAAAGACCATGT(序列号12)

[0269] 223T-F:ATAATTACCGGCTCAAATGG(序列号13)、223T-R:TGTGATAAAAAGACCATGT(序列号14)

[0270] (3)序列分析

[0271] 在PCR产物的测序反应之前,使用ExoSAP-IT(注册商标)For PCR Product Clean-UP(Affymetrix)并以附带的实验方案作为参考进行了PCR产物的纯化。通过试剂盒附带的方法,使用BigDye Terminator v.3.1cycle sequencing kit(Thermo Fisher Scientific)进行反应,从而进行了测序反应(94℃30秒钟、96℃10秒钟/50℃5秒钟/60℃2分钟×25循环)。然后,使用BigDye XTerminator(商标)Purification Kit(Thermo Fisher Scientific),通过试剂盒附带的方法对DNA进行了纯化(平均每个样品添加45μl的SAM Solution、10μl的XTerminater,振荡30分钟后,1000g、2分钟的离心)。通过Applied Biosystems(注册商标)3730DNA Analyzer(Thermo Fisher Scientific)获取序列信息,通过序列组合软件ATGC(GENETYX)进行了分析。

[0272] 筛选的结果是,分离了NtCLCa-S基因中具有终止密码子的1种突变体。是编码第279位的色氨酸(W)的密码子(TGG)变为终止密码子(TAG)的突变体(220S)。另外,分离了在NtCLCa-T基因中具有终止密码子的2种突变体。是编码第233位的色氨酸(W)的密码子(TGG)变为终止密码子(TAG)的突变体(222T)、和编码第285位的色氨酸(W)的密码子(TGG)变为终止密码子(TAG)的突变体(223T)。以下,有时将突变体220S所具有的NtCLCa-S突变基因记载为NtCLCa-S-Δ1基因,将突变体222T所具有的NtCLCa-T突变基因记载为NtCLCa-T-Δ1基

因,将突变体223T所具有的NtCLCa-T突变基因记载为NtCLCa-T-Δ2基因。

[0273] 对于NtCLCa-S基因和NtCLCa-T基因,使突变基因为纯合型的M2个体彼此进行交配,培育F1品系,进一步使其进行自体繁殖,由此获得了F2品系。对于F2品系,通过上述的(1)-(3)的方法对各基因的碱基序列进行了分析。由此,判别各个体是突变基因的纯合体、杂合体、还是不具有突变的野生型个体。

[0274] 使用F2代的分离品系进行了叶中硝酸、亚硝酸的分析。在F2代的独立的2个品系中,NtCLCa-S基因和NtCLCa-T基因这两者具有无义突变的突变基因的纯合体与不具有突变的野生型个体相比,得到了叶中硝酸浓度大幅减少的结果(方法如实施例3中所记载。数据未记载)。

[0275] 实施例2F3品系的挑选

[0276] 在本实施例中,进行了F3品系的挑选。

[0277] 使用实施例1中得到的F2代的分离品系,获得了自体繁殖F3品系。作为Line1,获得了通过F2代分离的2个个体、野生型NtCLCa-S基因与NtCLCa-S-Δ1基因的杂合体、NtCLCa-T-Δ2基因的纯合体即HeHo(1-7)、和野生型NtCLCa-S基因的纯合体、野生型NtCLCa-T基因与NtCLCa-T-Δ2基因的杂合体即WHe(1-55)各自的自体繁殖F3种子。

[0278] 作为Line2,获得了通过F2代分离的NtCLCa-S-Δ1基因的纯合体、野生型NtCLCa-T基因与NtCLCa-T-Δ1基因的杂合体即HoHe(2-9)、和野生型NtCLCa-S基因的纯合体、野生型NtCLCa-T的纯合体即WW(2-54)各自的自体繁殖F3种子。

[0279] 从个体(1-7)的自体繁殖F3品系中挑选了以下的三种类型的植物。NtCLCa-S-Δ1基因、NtCLCa-T-Δ2基因这两者为纯合体的HoHo;野生型NtCLCa-S基因与NtCLCa-S-Δ1基因的杂合体、NtCLCa-T-Δ2基因的纯合体即HeHo;野生型NtCLCa-S基因的纯合体、NtCLCa-T-Δ2基因的纯合体即WHo。从个体(1-55)的自体繁殖F3品系中挑选了野生型NtCLCa-S基因的纯合体、野生型NtCLCa-T的纯合体即WW。

[0280] 另一方面,从个体(2-9)的自体繁殖F3品系中挑选了以下的三种类型的植物。NtCLCa-S-Δ1基因、NtCLCa-T-Δ2基因这两者为纯合体的HoHo;NtCLCa-S-Δ1基因的纯合体、野生型NtCLCa-T基因与NtCLCa-T-Δ1基因的杂合体即HoHe;NtCLCa-S-Δ1基因的纯合体、野生型NtCLCa-T的纯合体的个体即HoW。由2-54的自体繁殖F3品系得到了具有野生型NtCLCa-S基因的纯合体、野生型NtCLCa-T的纯合体的个体即WW。

[0281] 实施例3F3品系的分析

[0282] 在本实施例中,进行了实施例2中得到的F3品系的分析。

[0283] (1)栽培

[0284] 通过人工气象器Koitotoron(KGBH-2416、KOITO ELECTRIC)从播种至取样进行了栽培。从播种至移植前的栽培条件设为16小时日长、室温28℃、湿度60%。

[0285] 播种实施例2中得到的F3品系的种子,约2周后进行假植,进一步栽培约2周。然后,将苗移植至装入有500~600ml的蛭石的12cm赤陶土容器。移植后,在明期25℃/暗期18℃、12小时日长、湿度60%(明期)/80%(暗期)的栽培条件下栽培了约3周。移植后,平均每1个个体施加了100ml/天左右的硝酸液肥(以NO_3计为20mM:4mM $Ca(NO_3)_2$、4mM $Mg(NO_3)_2$、4mM KNO_3)。

[0286] (2)分析样品的制备

[0287] 移植20天后,对各个个体的地上叶的6片叶片进行取样,装入纸袋中,使用强制循环式恒温器(ISUZU SEISAKUSHO)在80℃的恒定条件下干燥。将干燥叶片粉碎,制成干燥粉末。将该干燥粉末用于硝酸、亚硝酸、游离氨基酸的分析。

[0288] (3)硝酸分析

[0289] 将平均每0.1g“(2)分析样品的制备”中制备的干燥粉末混合1ml的Milli-Q水,在室温下以240pm振荡提取1小时以上。使用Ntrachek 404Meter(KPG Products Ltd),按照附带的手册对将提取液过滤而得到的滤液测定了硝酸浓度。将滴加至MQuant试验纸(Millipore)的液量设为7-8μl,平均每个样品测定2次,将平均值作为测定值。对试样进行稀释并进行测定,使得测定值达到100ppm以下。

[0290] 将结果示于图1。根据测得的硝酸的浓度换算成硝态氮。HoHo的叶中硝酸浓度是作为在NtCLCa基因中不具有突变的对照的WW的1/20以下。另外,与作为在两个基因中不具有突变的对照的WW相比,HoHe、HeHo、HoW、WHo也观察到了叶中硝酸浓度的显著减少。

[0291] (4)亚硝酸分析

[0292] 亚硝酸使用“(3)硝酸分析”中制备的滤液,通过比色法进行了定量。在100μl中混合50μl的显色试剂1(2%对氨基苯磺酰胺、3N HCl中),在室温下反应5分钟。添加50μl的显色试剂2(0.1%N-萘基乙二胺、水中)并混合,在室温下反应10分钟。利用酶标仪Infinite 200PRO(TECAN)对A540和作为参考的A700进行测定,将A540-A700(差值)作为测定值。使用$NaNO_2$(和光纯药/特级)作为标准品,进行了定量。

[0293] 将结果示于图2。根据NtCLCa基因内的无义突变的有无,未观察到显著的叶中亚硝酸浓度的增减。在显示出硝酸严重减少的HoHo中也未观察到亚硝酸浓度的增加。这一点是与拟南芥的CLCa突变体分析结果(非专利文献2)不同的意外的结果。

[0294] (5)游离氨基酸分析

[0295] 在“(2)分析样品的制备”中制备的干燥粉末0.4g中添加20ml的80%甲醇溶液(V/V)并混合,进行了30分钟的超声波处理。对处理后的溶液进行离心分离(3000rpm×5分钟)。使用HPLC分析装置(Agilent 1290infinity)、分析柱(Agilent ZORBAX Eclipse AAA 3.5um、3.0×150mm)、保护柱(Agilent ZORBAX Eclipse AAA 5um、4.6×12.5mM 4/PK)在流动相A:40mM磷酸缓冲液、流动相B:45%乙腈/45%甲醇水溶液、有梯度的条件下对离心分后的上清进行了分析。仅对HoHo和作为对照的WW分析了19种游离氨基酸。

[0296] 将结果示于表1、图3。

[0297] [表1]

[0298]

游离氨基酸	F3品系			
	CLCa_1_HoHo	CLCa_1_WW	CLCa_2_HoHo	CLCa__2_WW
丙氨酸	1918±452	1306±446	2093±473	1106±272
精氨酸	350±115	205±45	483±194	188±28
天冬酰胺	2493±526	1405±253	2713±756	870±247
天冬氨酸	511±111	635±241	423±236	335±59
谷氨酰胺	10589±2684	6010±2828	11378±4071	2748±1440
谷氨酸	143±24	479±289	192±129	230±79
甘氨酸	790±176	289±98	975±463	350±103
组氨酸	155±57	107±25	175±51	64±7
异亮氨酸	240±68	196±25	250±113	133±27
亮氨酸	681±147	486±90	748±216	346±62
赖氨酸	381±142	272±44	494±112	149±29
甲硫氨酸	112±24	63±20	144±30	45±8
正缬氨酸	579±87	411±111	625±47	358±87
苯丙氨酸	518±80	442±77	631±166	334±52
脯氨酸	6395±952	5365±369	5500±844	3138±420
丝氨酸	634±85	392±77	660±264	265±53
苏氨酸	820±161	516±107	753±300	349±46
酪氨酸	634±112	548±141	860±167	310±27
缬氨酸	492±93	335±72	523±169	235±44

[0299] N＝5,平均±SD

[0300] 单位为μg/g

[0301] 在Line1及Line2中,HoHo的至少除谷氨酸和天冬氨酸以外的17种氨基酸的叶中浓度均比WW的情况高(表1)。

[0302] 对于19种游离氨基酸合计的浓度而言,HoHo比WW高1.5～2.6倍(图3)。这一点也是与拟南芥的CLCa突变体分析结果(非专利文献1)不同的意外的结果。

[0303] (6)生长

[0304] 为了比较生长,将移植20天后的各基因型的个体横向并排,拍摄了照片(图4)。无论有无NtCLCa基因的无义突变,在Line1及Line2中均未观察到F3个体的生长存在差异。根据这些结果表明,通过利用在NtCLCa基因中具有无义突变的突变体,不会对生长造成影响而能够大幅减少叶中的硝酸浓度,并且不会增加亚硝酸浓度而能够增加游离氨基酸浓度。

[0305] (7)NtCLCe基因的序列确认

[0306] 对于实施例2中得到的NtCLCa基因的突变体,如下所述地确认了NtCLCe基因的CDS序列中不具有突变。

[0307] 使用RNeasy Plant Mini Kit(QIAGEN),从实施例2中得到的F3品系的2个品系、Line1的HoHo、Line2的HoHo个体的嫩叶中提取RNA。将该RNA作为模板,使用PrimeScript(商标)RT reagent Kit with gDNA Eraser(Takara Bio)制备了cDNA。根据S基因组、T基因组各自的NtCLCe基因的推定CDS序列信息(根据专利文献1中记载的NtCLCe基因的碱基序列信息推定)设计PCR引物,将cDNA作为模板进行了PCR。使用TKS Gflex DNA Polymerase(Takara Bio)作为PCR酶,按照附带的手册,反应条件如下所述地进行。

[0308] 94℃1分钟、(98℃10秒钟、55℃15秒钟、68℃1～2分钟)×40循环、68℃1～2分钟

[0309] 使用的引物序列表如以下的表2所示。(序列号15-27)

[0310] [表2]

[0311] RT-PCR引物

[0312]

名称	序列(5'-3')	用途	靶基因组
S/T_FW1	TTGGTCTGACGAAGTTGTACG	PCR、测序	S
S_RT_F1	ATCGCTTCTGGATTTAATGC	PCR、测序	S、T
S_RT_F2	ATATGGCCTGGTTGGCATGG	PCR、测序	S
S/T_RT_R1	TTCATGAACCGCAGCGTTGA	测序	S、T
S_RT_R2	GCATTAAATCCAGAAGCGAT	PCR、测序	S、T
S_RT_R3	AGCCTTTCCTTCGTGGAGAA	PCR、测序	S
S_RT_R4	AACCGCAGTGAGAGGCACCT	测序	S
T_RT_F1	TCAACGCTGCGGTTCATGAA	测序	S、T
T_RT_F2	GTACACCTACTGAGCTGCCG	PCR、测序	S、T
T_RT_F3	TTATGGCCTGGTTGGCATG	PCR、测序	S、T
T_RT_F4	CTCATTGGTCTGCTGACACTT	测序	S、T
T_RT_R2	CGGCAGCTCAGTAGGTGTAC	PCR、测序	S、T
T_RT_R3	GAAGAAGAGGCTTGAACATCAG	PCR、测序	T

[0313] 通过以下的引物对实施了PCR,结果是S、T基因组的NtCLCe基因的cDNA序列扩增。

[0314] S/T_FW1与S_RT_R2;

[0315] S_RT_F1与S_RT_R3;

[0316] S_RT_F2与S_RT_R3;

[0317] S/T__FW1与S__RT__R3;

[0318] S/T__FW1与T__RT__R2;

[0319] T__RT__F2与T__RT__R3;

[0320] T__RT__F3与T__RT__R3;

[0321] S/T__FW1与T__RT__R3

[0322] 通过实施例1的“(3)序列分析”中记载的方法对PCR产物的序列进行了分析,结果是序列完全一致。由此,确认了实施例2中得到的NtCLCa基因的突变体中的NtCLCe基因序列是与Tsukuba 1号的野生型完全相同的序列。

[0323] 位于S基因组的NtCLCe-S基因的CDS序列(序列号5)

[0324] 位于T基因组的NtCLCe-T基因的CDS序列(序列号7)

[0325] (8)叶中硝酸的昼夜变动

[0326] 按照“(1)栽培”中的记载所述栽培了实施例2中得到的Line2的F3品系的HoHo个体、WW个体。在移植20天后的明期开始1小时、3小时后、5小时后、10个半小时后、暗期开始4小时后、8小时后对叶进行了取样。取样的时机分别相当于清晨、上午前半、接近中午、日落1.5小时前、日落4小时后、日落8小时后。按照“(3)硝酸分析”、“(4)亚硝酸分析”中的记载所述对叶片的硝酸及亚硝酸进行了定量。将结果示于图5、图6。无论昼夜,HoHo的叶片的硝酸浓度均比WW低(图5)。另外,无论昼夜,叶片的亚硝酸浓度在HoHo和WW之间均为基本相同的

水平(图6)。

[0327] (9)NtCLCa突变体中的NtCLCa及NtCLCe基因表达分析

[0328] 在实施例2中得到的Line1的F3品系的HoHo、WW各10个个体的展开叶中,进行了NtCLCa及NtCLCe的各基因的表达分析。

[0329] 平均每1个个体采集10片直径5mm的叶盘并混合,使用NucleoSpin Plant II (Takara Bio)提取了RNA。使用Nanodrop 8000(Thermo Fisher Scientific)对提取的RNA的浓度进行了测定。

[0330] 将各样品的RNA 750ng用于以下的反应。将各RNA作为模板,使用ReverTra Ace(注册商标)qPCR RT Master Mix with gDNA Remover(TOYOBO)制备了cDNA。分别将由10ng的RNA合成的cDNA、THUNDERBIRD(注册商标)SYBR qPCR Mix(TOYOBO公司)及表3所示的引物混合后,使用StepOne(商标)(Applied Biosystem)对各基因的表达量进行了测定。

[0331] (序列号28-37)

[0332] [表3]

[0333]

引物组	引物名	序列(5'-3')
CLCa组1	CLCa_qRT-PCR_F3	CATGGACGGACAACAGAATG
	CLCa_qRT-PCR_R3	GGGAGACCTTAGCTCCAACC
CLCa组2	CLCa_qRT-PCR_F7	ATTGGTTCACATTGGCGCTT
	CLCa_qRT-PCR_R7	ATAAGATCTCGCCTGTCCCG
CLCe组1	CLCa_qRT-PCR_F4	CTTGCTTTGTTGGCCTCTTC
	CLCa_qRT-PCR_R4	TGTACTCCAATGGGCTCCTC
CLCe组2	CLCa_qRT-PCR_F6	ACGAAAGTTGTTGGGTCGTC
	CLCa_qRT-PCR_R6	TATCGTCTTTGCTGCTGTCG
对照	核糖体蛋白质L25_qRT_F	CCCCTCACCACAGAGTCTGC
	核糖体蛋白质L25_qRT_R	AAGGGTGTTGTTGTCCTCAATCTT

[0334] 将核糖体蛋白质L25(Accession编号L18908)作为控制基因(Mol.Genet.Genomics.(2010)283:233-241),对目标表达量进行相对定量(ΔΔCt法),以得到的平均值表示结果。对于用于表达分析的两组引物而言,HoHo与WW相比,NtCLCa基因的表达水平均显著地低,为约1/2(图7)。另一方面,未观察到NtCLCe基因的表达水平在HoHo与WW之间存在显著差异(图8)。

[0335] 在专利文献1中公开了在使用了CLC-Nt2-s基因(相当于NtCLCa-S)的序列的RNAi重组烟草中,NtCLCe基因的表达也同时被抑制。即,在使用了CLC-Nt2-s基因的序列的RNAi重组烟草中观察到的硝酸减少是NtCLCa和NtCLCe基因这两者的表达抑制的结果。与此相对,可以明确在本发明NtCLCa突变体中观察到的硝酸减少并不伴随着NtCLCe基因的表达抑制。

[0336] (10)在NtCLCa突变体中,NtCLCa-S基因的第163位的氨基酸为甘氨酸的确认

[0337] 将由实施例2中得到的Line1、Line2的NtCLCa突变体(HoHo)制备的cDNA作为模板,用PCR对NtCLCa-S基因片段进行了特异性扩增。cDNA使用"(7)NtCLCe基因的序列确认"中制备的cDNA,使用TKS Gflex DNA Polymerase(Takara Bio)作为PCR酶,按照附带的手册在以下的反应条件下进行了PCR。

[0338] 94℃1分钟、(98℃10秒钟、55℃15秒钟、68℃1分钟)×40循环、68℃12分钟

[0339] 作为引物,使用了下述的两组。

[0340] CLCA__S__F1(5'-CATGACTGGAGAAGGAGATCT-3')和

[0341] CLCA__S__R1(5'-AAGTGTGGTTGCTCCATACATA-3');(序列号38和39)

[0342] CLCA__S__F1(5'-CATGACTGGAGAAGGAGATCT-3')和

[0343] CLCa__220s__R(5'-TGCCAGATTTGCAGTATTCA-3')(序列号38和40)

[0344] 将这些PCR扩增产物作为模板,通过实施例1的(3)序列分析中记载的方法对序列进行了分析。其结果是,确认了相当于NtCLCa-S基因的第163位的氨基酸的核酸序列为甘氨酸。

[0345] NtCLCa-S基因的CDS序列(序列号1)

[0346] [化学式1]

[0347]

ATGGAGGAGCCAACTCGATTAGTAGAAGAAGCAACGATTAATAACATGGACGGACAACAGAATGAA
GAAGAAAGAGATCCAGAGAGCAATTCACTGCATCAGCCTCTTCTCAAGAGAAACAGAACACTATCA
TCCAGTCCATTTGCCTTGGTTGGAGCTAAGGTCTCCCACATCGAAAGTTTGGATTATGAGATCAAC
GAGAATGATCTCTTCAAGCATGACTGGAGAAGGAGATCTAGAGTTCAAGTATTACAGTATGTGTTC
TTGAAATGGACACTGGCATTTTTGGTCGGCCTGCTTACAGGAGTTACAGCCACCCTCATCAATCTT
GCAATCGAAAACATGGCTGGTTACAAACTTCGAGCTGTTGTGAACTATATCGAGGATAGAAGGTAC
CTTATGGGATTTGCATATTTTGCGGGTGCTAATTTTGTGCTCACTTTGATAGCTGCCCTTCTCTGCG
TGTGCTTTGCACCTACTGCTGCAGGGCCTGGAATTCCTGAAATCAAAGCTTATCTCAACGGTGTAG
ATACTCCCAATATGTATGGAGCAACCACACTTTTTGTCAAGATCATTGGAAGCATTGCAGCAGTTT
CTGCTAGCTTAGACCTTGGAAAAGAAGGGCCATTGGTTCACATTGGCGCTTGCTTTGCTTCCTTAC
TAGGTCAAGGTGGTCCAGATAATTACCGGCTCAGGTGGCGTTGGCTCCGTTACTTCAACAACGATC
GGGACAGGCGAGATCTTATCACATGTGGGTCATCATCAGGTGTGTGTGCTGCTTTCCGTTCTCCAG
TAGGTGGTGTCCTATTTGCTTTAGAGGAAGTGGCAACATGGTGGAGAAGTGCACTCCTCTGGAGAA
CTTTCTTCAGCACGGCAGTTGTGGTGGTGATACTGAGGGCCTTCATTGAATACTGCAAATCTGGCA
ACTGTGGACTTTTTGGAAGAGGAGGGCTTATCATGTTTGATGTGAGTGGTGTCAGTGTTAGCTACC
ATGTTGTGGACATCATCCCTGTTGTAGTGATTGGAATCATAGGCGGACTTTTGGGAAGCCTCTACA
ATCATGTCCTCCACAAAATTCTGAGGCTCTACAATCTGATCAACGAGAAGGGAAAACTACATAAGG
TTCTTCTCGCTCTGAGTGTCTCCCTTTTCACCTCCATTTGCATGTATGGACTTCCTTTTTTGGCCAA
ATGCAAGCCTTGTGATCCATCACTTCCCGGGTCTTGTCCTGGTACTGGAGGGACAGGAAACTTCAA
GCAGTTCAACTGCCCAGACGGCTATTACAATGATCTTGCTACTCTTCTCCTTACAACCAACGATGA
TGCAGTCCGAAACATTTTCTCCATAAACACTCCCGGTGAATTCCAAGTTATGTCTCTTATTATCTAC
TTCGTTCTGTATTGCATATTGGGACTCATCACTTTTGGGATTGCTGTGCCATCTGGTCTCTTCCTTC
CAATCATCCTCATGGGTTCAGCTTATGGTCGCTTGCTTGCCATTGCCATGGGATCTTATACAAAAA
TTGATCCAGGGCTGTATGCGGTTCTCGGAGCAGCTTCCCTTATGGCTGGTTCAATGAGAATGACTG
TTTCTCTTTGCGTCATATTTCTTGAGCTAACAAACAATCTTCTCCTTCTGCCAATAACAATGCTGGT
TCTTCTAATTGCCAAAAGTGTAGGAGACTGCTTCAACCTAAGTATTTATGAAATAATATTGGAGCTG
AAAGGTCTACCTTTCCTGGATGCCAACCCGGAGCCATGGATGAGAAATATCACTGCTGGTGAGCTT
GCTGATGTAAAGCCACCAGTAGTTACACTCTGTGGAGTTGAGAAGGTGGGACGTATCGTAGAGGC
CTTGAAGAACACCACATATAACGGATTCCCTGTCGTCGATGAAGGAGTAGTGCCACCGGTGGGTCT
GCCAGTTGGGGCAACTGAATTGCACGGTCTTGTCCTAAGAACTCACCTTCTTTTGGTTCTCAAGAA
AAAGTGGTTCCTTCATGAAAGACGGAGGACAGAGGAGTGGGAAGTGAGAGAGAAATTCACCTGGA
TTGATTTAGCTGAGAGGGGCGGTAAGATCGAAGATGTGTTAGTTACAAAGGATGAAATGGAGATGT
ATGTCGATTTGCATCCCCTGACTAACACAACCCCTTATACTGTGGTAGAAAGCTTGTCAGTGGCTA
AGGCAATGGTGCTTTTCAGGCAGGTGGGGCTCCGCCACATGCTCATTGTACCCAAATACCAAGCA
GCAGGGGTATCTCCTGTGGTGGGAATCTTGACCAGGCAAGACTTGAGAGCCCACAACATTTTGAGT
GTCTTCCCTCATCTGGAGAAGTCAAAAAGCGGTAAAAAGGGGAACTGA

[0348] 标记下划线的序列是相当于第163位的甘氨酸的序列

[0349] 实施例4在田地中栽培的植物的生物质(biomass)量

[0350] 在本实施例中,对实施例2中得到的F3植物调查了叶的叶片重量。

[0351] 按照一般的烟草耕作法在田地中栽培来自于Line1及Line2的HoHo及WW。将移植后54天的植物的照片示于图9(Line1)。

[0352] 移植起第70天对植物进行掐尖。掐尖起15天后从12株植物对从上方起第9片及第10片叶进行取样,18天后从另外的12株植物对从上方起第5片及第6片叶进行取样。对于取

样的叶,立即将主脉(midrib、烟梗)去除,将叶片在70℃下干燥2天,在50℃下干燥1天。测定了从2片叶得到的干燥后的叶片的重量,将结果示于表4。HoHo的叶片重量与不具有NtCLCa-S及NtCLCa-T的突变等位基因的作为对照的WW同等。

[0353] [表4]

[0354]

品系	基因型	第9和第10片叶			第5和第6片叶		
		平均值	SD	p值	平均值	SD	p值
品系1	HoHo	16.826	2.109	0.2432	16.849	2.749	0.4123
	WW	15.560	2.987		15.941	2.573	
品系2	HoHo	15.863	1.962	0.2194	14.139	1.358	0.5628
	WW	14.838	2.009		14.559	2.071	

[0355] 实施例5基因聚合(pyramiding)

[0356] WO2022/124361(由与本申请相同的申请人申请的国际申请PCT/JP2021/045295的国际公开)中公开了一种烟草植物,其包含相当于NIA1蛋白质的氨基酸序列(序列号2)或NIA2蛋白质的氨基酸序列(序列号4)中的525位的氨基酸残基从脯氨酸突变为脯氨酸以外的氨基酸残基(优选为亮氨酸或丝氨酸)的硝酸还原酶。该文献公开了该烟草植物的叶中硝酸量降低,植物体的生长也良好。

[0357] 在本实施例中,调查了上述NtNIA1的突变等位基因向具有NtCLCa-S及NtCLCa-T的突变等位基因的烟草植物的聚合(基因突变的累积)对烟草植物的硝酸蓄积量造成的影响。

[0358] 作为具有NtCLCa-S及NtCLCa-T的突变等位基因的烟草植物,使用了来自于实施例2中得到的Line1的NtCLCa-S-Δ1基因、NtCLCa-T-Δ2基因这两者为纯合性的HoHo。用于基因聚合的交配使用了编码P525L-NR蛋白质的NtNIA1突变等位基因的纯合体(P525L__Homo)。需要说明的是,该纯合体是WO2022/124361的实施例7中记载的将EMS突变体(M3)与回归亲本TN90(白肋型)进行交配而得到的BC2F3植物。

[0359] 从将两者进行交配而得到的F2群体中挑选出保持纯合性的NtCLCa-S的突变等位基因和杂合性的NtCLCa-T突变等位基因、杂合性的NtNIA1突变等位基因的F2植物。需要说明的是,挑选出的F2植物为保持2个基因NtEGY1及NtEGY2的隐性基因的双重纯合体(double homozygote)。可以认为,该隐性基因伴随着移码突变,是白肋型的烟草中的叶绿素欠缺及低氮利用效率的原因(BMC genomics,(2017)18(1),1-14)

[0360] 此外,从来自于该F2植物的F3群体中挑选出表现出表5中记载的4种类型的基因型的F3植物,按照实施例3中记载的方法进行了栽培。

[0361] [表5]

[0362]

基因型	NtCLCa-S	NtCLCa-T	NtNIA1
HoHoW	Ho	Ho	W
HoHoHo	Ho	Ho	Ho
HoHoHe	Ho	Ho	He
HoHeHo	Ho	He	Ho

[0363] 表5中的Ho、He、W分别表示植物为突变等位基因的纯合体、突变等位基因与野生型等位基因的杂合体、野生型等位基因的纯合体。

[0364] 通过实施例3中记载的方法从移植后20天的植物对叶进行取样,干燥后对硝态氮含量进行了分析(n=6)。将结果示于表6(p值为基因型HoHoW与各基因型之间的双侧检验的值)。

[0365] [表6]

[0366] 表6硝态氮含量(ppm)

[0367]

基因型	Mene.	SD	n	p值
HoHoW	198.1	32.3	6	
HoHoHo	90.9	23.5	6	6.230E-05
HoHoHe	96.2	23.6	6	9.654E-05
HoHeHo	2021.0	361.8	6	2.330E-07

[0368] 与HoHoW植物相比,HoHoHo植物及HoHoHe植物具有显著低的硝态氮。因此,上述NtNIA1的突变等位基因向具有NtCLCa-S及NtCLCa-T的突变等位基因的烟草植物的聚合进一步降低了烟草植物的硝态氮含量。

[0369] 另外,将移植后20天的植物的照片示于图10。上述NtNIA1的突变等位基因向具有NtCLCa-S及NtCLCa-T的突变等位基因的烟草植物的聚合不影响烟草植物的生长。

[0370] 工业实用性

[0371] 通过利用本发明的烟草植物,能够减少烟草原料、烟草制品的TSNA。本发明的烟草植物不仅叶中硝酸量降低,而且优选植物体的生长也良好,氨基酸含量增加。本发明的烟草植物能够作为用于制造烟草制品的优异的烟叶的材料而利用。

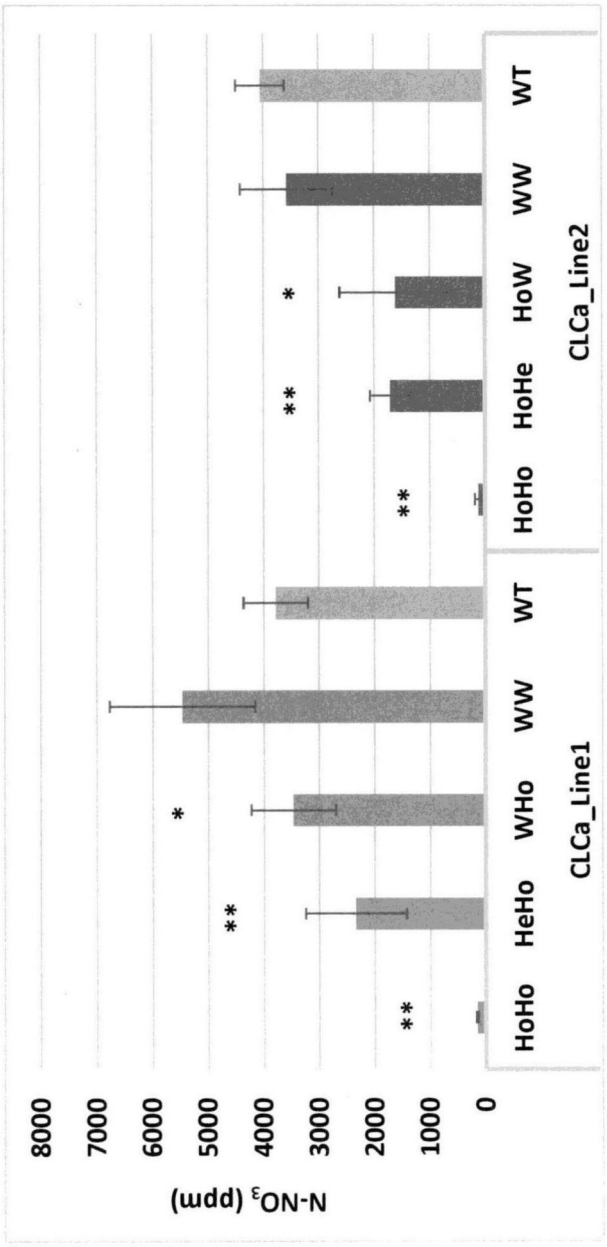

N-NO3 (ppm)
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
CLCa_Line1
HoHo
HeHo
WHo
WW
WT
CLCa_Line2
HoHo
HoHe
HoW
WW
WT
*
**
**
*
**
**
*

图1

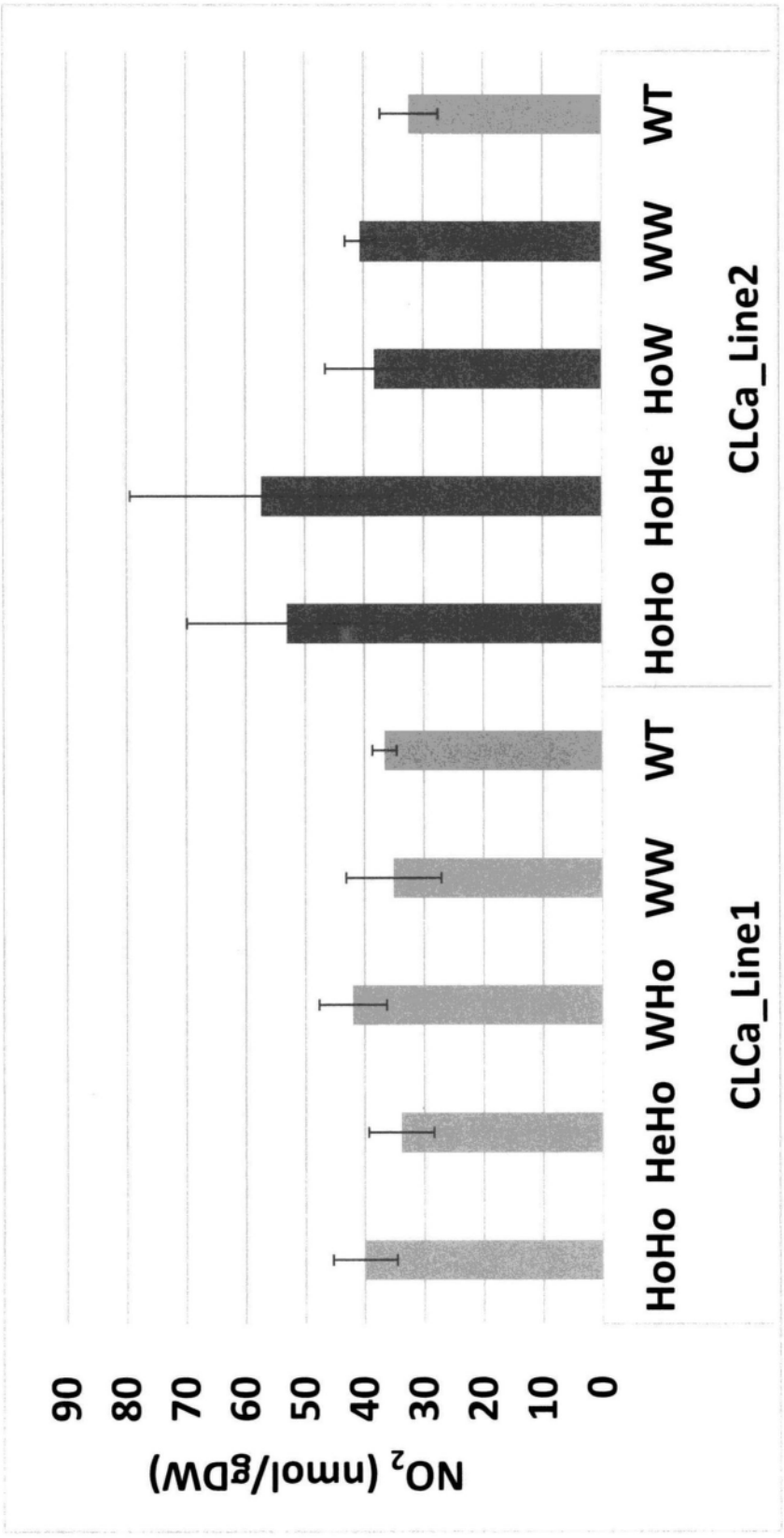
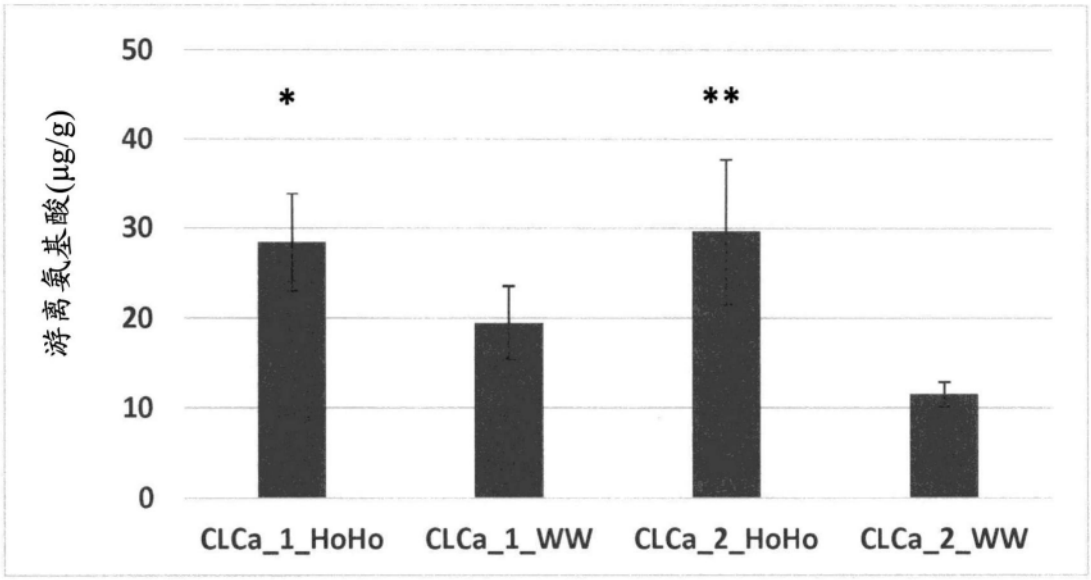

NO2 (nmol/gDW)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
HoHo
HeHo
WHo
WW
WT
HoHo
HoHe
HoW
WW
WT
CLCa_Line1
CLCa_Line2

图2


游离氨基酸(μg/g)
50
40
30
20
10
0
*
**
CLCa_1_HoHo
CLCa_1_WW
CLCa_2_HoHo
CLCa_2_WW

*P<0.05、**P<0.01

图3

CLCa_Line1



HoHo HeHo Who WW

CLCa_Line2



HoHo HeHo Who WW

图4

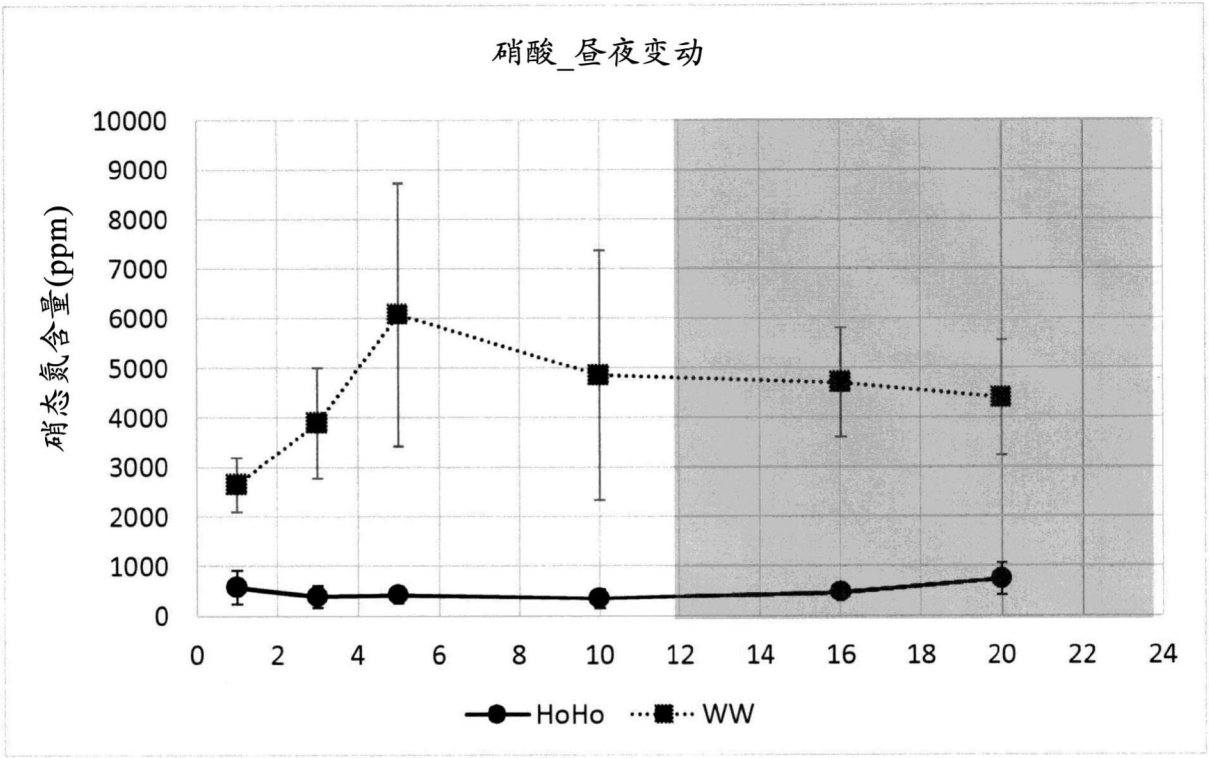

硝酸_昼夜变动
硝态氮含量(ppm)
10000
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24
HoHo
WW

图5

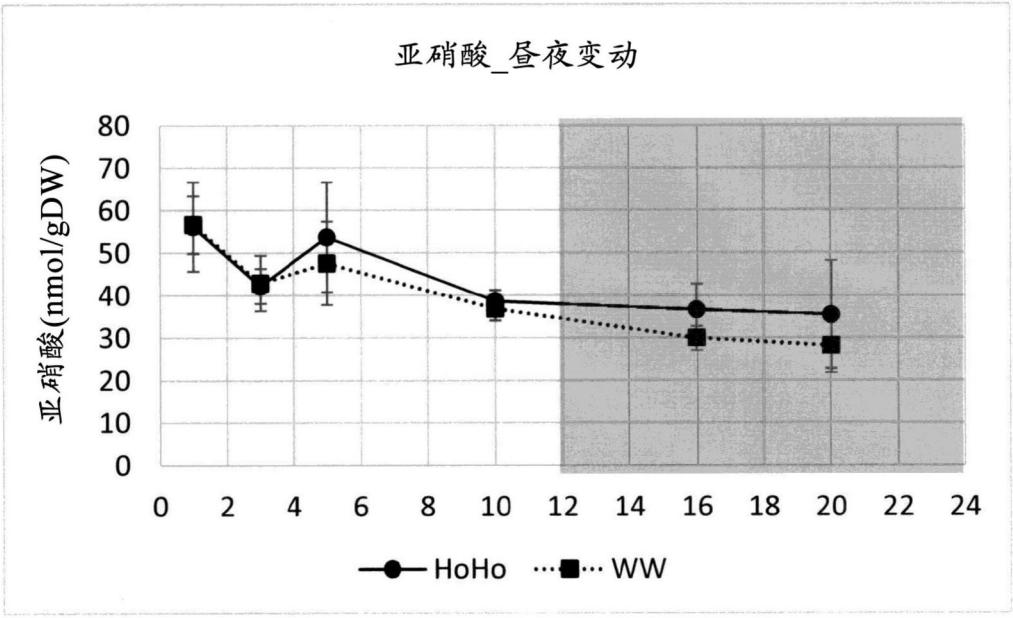

亚硝酸_昼夜变动
亚硝酸(nmol/gDW)
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24
HoHo
WW

图6

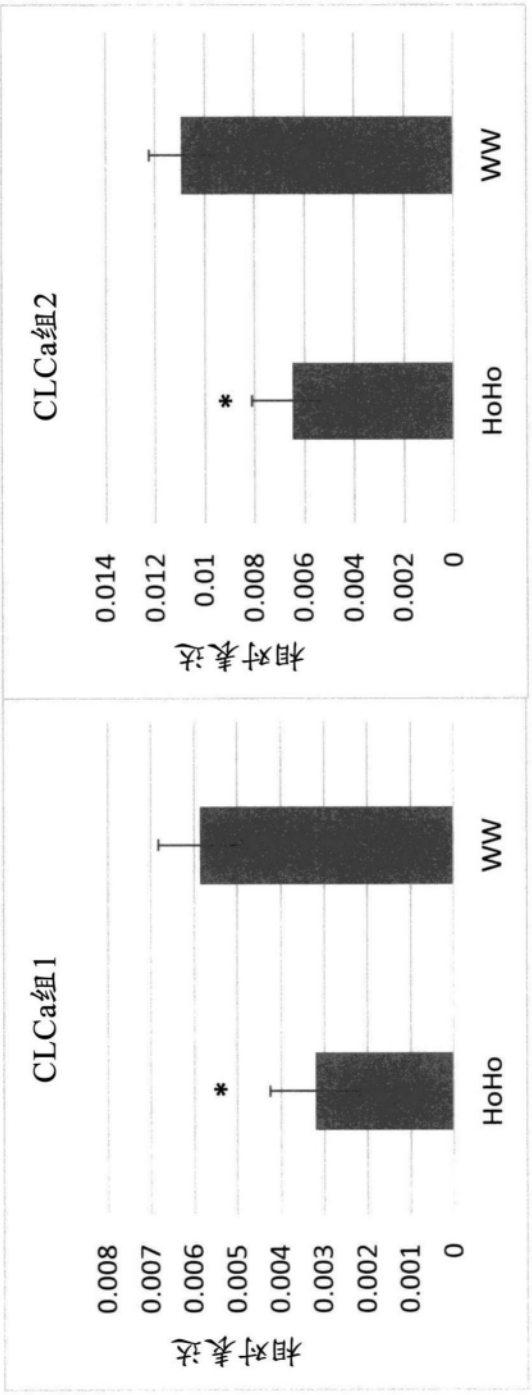

CLCa组2
相对表达
0.014
0.012
0.01
0.008
0.006
0.004
0.002
0
*
HoHo
WW
CLCa组1
相对表达
0.008
0.007
0.006
0.005
0.004
0.003
0.002
0.001
0
*
HoHo
WW

图7

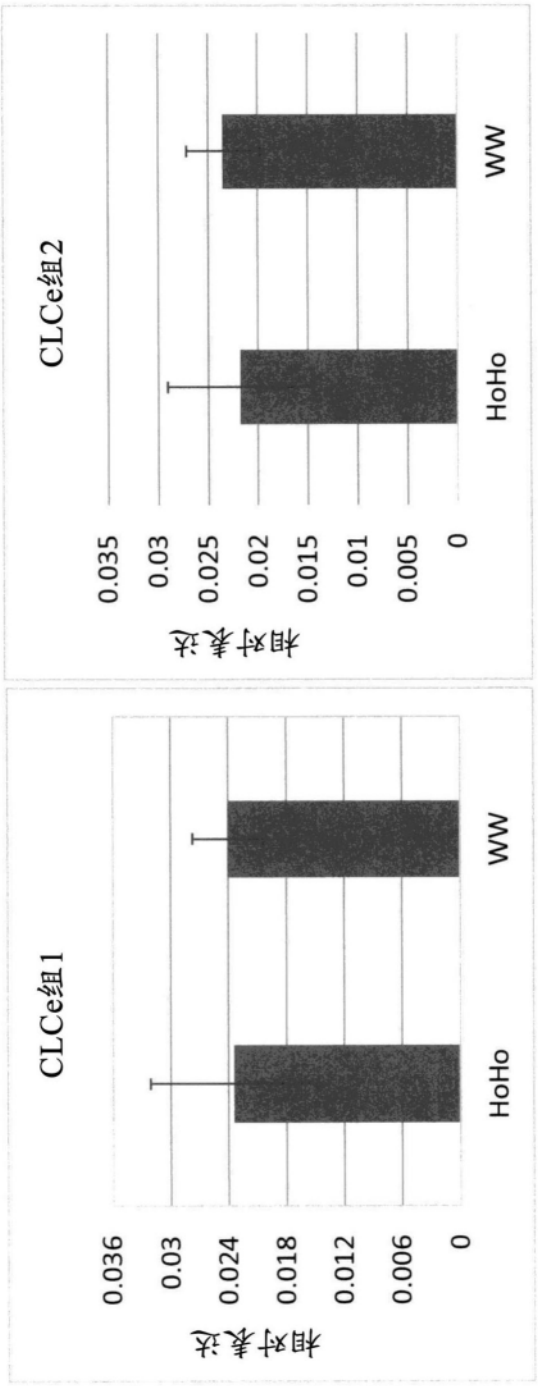

CLCe组2
相对表达
0.035
0.03
0.025
0.02
0.015
0.01
0.005
0
HoHo
WW
CLCe组1
相对表达
0.036
0.03
0.024
0.018
0.012
0.006
0
HoHo
WW

图8



WW HoHo

图9



HoHoW HoHoHo HoHoHo

图10