

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-530323

(P2018-530323A)

(43) 公表日 平成30年10月18日(2018.10.18)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 12 N 15/29 (2006.01)	C 12 N 15/29	2 B 03 O
C 07 K 14/415 (2006.01)	C 07 K 14/415	Z N A 4 B 06 5
C 12 N 15/62 (2006.01)	C 12 N 15/62	Z 4 H 04 5
C 12 N 15/82 (2006.01)	C 12 N 15/82	Z
A 01 H 5/00 (2018.01)	A 01 H 5/00	A

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 33 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-515803 (P2018-515803)	(71) 出願人	508186875 キージーン ナムローゼ フェンノートシ ヤップ オランダ王国, エヌエル-6700 アー エー ワーゲニンゲン, ポストブス 21 6
(86) (22) 出願日	平成28年10月3日 (2016.10.3)	(74) 代理人	100107456 弁理士 池田 成人
(85) 翻訳文提出日	平成30年5月22日 (2018.5.22)	(74) 代理人	100162352 弁理士 酒巻 順一郎
(86) 國際出願番号	PCT/NL2016/050683	(74) 代理人	100123995 弁理士 野田 雅一
(87) 國際公開番号	W02017/058023	(74) 代理人	100148596 弁理士 山口 和弘
(87) 國際公開日	平成29年4月6日 (2017.4.6)		
(31) 優先権主張番号	2015549		
(32) 優先日	平成27年10月2日 (2015.10.2)		
(33) 優先権主張国	オランダ (NL)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】半数体及びそれに続く倍加半数体植物の產生方法

(57) 【要約】

M₂タンパク質における未成熟な終止コドンの導入をもたらすヌクレオチド多型により、機能性M₂タンパク質を喪失した植物が、機能性M₂タンパク質を含む野生型植物への又はそれとの交配後に、半数体子孫を誘導できることがわかった。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

機能喪失型変異を含む、植物起源の M s i 2 タンパク質。

【請求項 2】

前記変異が、W D 4 0 リピート及び / 又は C A F 1 C ドメイン中に存在する、請求項 1 に記載の M s i 2 タンパク質。

【請求項 3】

機能喪失型変異を有する、植物 M s i 2 タンパク質をコードするポリヌクレオチドによりコードされ、前記タンパク質は、その内在性 M s i 2 タンパク質の非存在下で植物中に存在する場合、前記植物が野生型植物と交配されるときに、いくつかの半数体後代又は異常な倍数性を有する後代の生成を可能とする、請求項 1 又は 2 に記載の M s i 2 タンパク質。

10

【請求項 4】

配列番号 1 若しくは 1 0 のアミノ酸配列、又は配列番号 1 若しくは 1 0 のアミノ酸配列に対して少なくとも 7 0 %、より好ましくは少なくとも 8 0 %、さらにより好ましくは少なくとも 9 0 %、なおさらにより好ましくは少なくとも 9 5 %、最も好ましくは少なくとも 9 8 % 若しくは 9 9 % の配列同一性を有するその変異体を含むポリペプチドに由来し、前記タンパク質は、機能喪失型変異を有する、植物 M s i 2 タンパク質をコードするポリヌクレオチドによりコードされ、前記タンパク質は、その内在性 M s i 2 タンパク質の非存在下で植物中に存在する場合、前記植物が野生型植物と交配されるときに、いくつかの半数体後代又は異常な倍数性を有する後代の生成を可能とする、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の M s i 2 タンパク質。

20

【請求項 5】

配列番号 2 若しくは 3 のアミノ酸配列、又は配列番号 2 若しくは 3 のアミノ酸配列に対して少なくとも 7 0 %、より好ましくは少なくとも 8 0 %、さらにより好ましくは少なくとも 9 0 %、なおさらにより好ましくは少なくとも 9 5 %、最も好ましくは少なくとも 9 8 % 若しくは 9 9 % の配列同一性を有するその変異体を含むポリペプチドに由来し、前記タンパク質は、機能喪失型変異を有する、植物 M s i 2 タンパク質をコードするポリヌクレオチドによりコードされ、前記タンパク質は、その内在性 M s i 2 タンパク質の非存在下で植物中に存在する場合、前記植物が野生型植物と交配されるときに、いくつかの半数体後代又は異常な倍数性を有する後代の生成を可能とする、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の M s i 2 タンパク質。

30

【請求項 6】

産生された後代の 0 . 1 、 0 . 5 、 1 又は 5 % が、半数体であるか、又は異常な倍数性を有するか、又は倍加半数体である、請求項 4 又は 5 に記載の M s i 2 タンパク質。

【請求項 7】

前記機能喪失型変異が、タンパク質の切断を引き起こす未成熟な終止コドンを導入する、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の M s i 2 タンパク質。

【請求項 8】

配列番号 2 、 3 若しくは 1 0 の 1 2 5 位のアミノ酸残基の後で、又は配列番号 1 の 1 2 3 位のアミノ酸残基の後で、タンパク質が切断されている、請求項 7 に記載の M s i 2 タンパク質。

40

【請求項 9】

配列番号 6 のアミノ酸配列からなる、 M s i 2 タンパク質。

【請求項 10】

配列番号 4 又は 9 の核酸配列を含む核酸分子によりコードされている、請求項 8 又は 9 に記載の M s i 2 タンパク質。

【請求項 11】

標的ヌクレオチド交換を使用して又はエンドヌクレアーゼを適用することにより、内在性 M s i 2 タンパク質をコードするポリヌクレオチドから得られた、機能喪失型変異を含

50

むポリヌクレオチドによりコードされている、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の M s i 2 タンパク質。

【請求項 1 2】

請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の M s i 2 タンパク質をコードする核酸分子。

【請求項 1 3】

配列番号 5、7 若しくは 8 の核酸配列、又は配列番号 5、7 若しくは 8 の核酸配列に対して少なくとも 70%、より好ましくは少なくとも 80%、さらにより好ましくは少なくとも 90%、なおさらにより好ましくは少なくとも 95%、最も好ましくは少なくとも 98% 若しくは 99% の配列同一性を有するその変異体を含む核酸分子であって、配列番号 5、7 又は 8 の核酸配列のうちの 1 つ又は複数のヌクレオチドが、前記核酸分子が機能喪失型変異を含む M s i 2 タンパク質をコードするように修飾されている、核酸分子。10

【請求項 1 4】

配列番号 5、7 若しくは 8 の核酸配列、又は配列番号 5、7 若しくは 8 の核酸配列に対して少なくとも 70%、より好ましくは少なくとも 80%、さらにより好ましくは少なくとも 90%、なおさらにより好ましくは少なくとも 95%、最も好ましくは少なくとも 98% 若しくは 99% の配列同一性を有するその変異体を含む核酸分子であって、1 つ又は複数のヌクレオチドが、未成熟の終止コドンが導入され、前記核酸分子が切断型 M s i 2 タンパク質をコードするように修飾されている、核酸分子。

【請求項 1 5】

配列番号 5 若しくは 7 の核酸配列の 376、377 及び / 若しくは 378 位における 1 つ又は複数のヌクレオチド、又は配列番号 8 の核酸配列の 685、686 及び / 若しくは 687 位における 1 つ又は複数のヌクレオチドが、終止コドンが導入され、前記核酸分子が、配列番号 2 又は 3 の 125 位に対応するアミノ酸残基の後で切断されているアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするように修飾されている、請求項 1 4 に記載の核酸分子。20

【請求項 1 6】

配列番号 4 又は 9 の核酸配列を含む、核酸分子。

【請求項 1 7】

単離された核酸、ゲノム核酸又は c D N A である、請求項 1 2 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の核酸分子。30

【請求項 1 8】

請求項 1 2 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の核酸分子を含む、キメラ遺伝子。

【請求項 1 9】

請求項 1 2 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の核酸分子又は請求項 1 8 に記載のキメラ遺伝子を含む、ベクター。

【請求項 2 0】

請求項 1 2 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の核酸分子、請求項 1 8 に記載のキメラ遺伝子又は請求項 1 9 に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 2 1】

植物細胞、好ましくはトマト植物細胞である、請求項 2 0 に記載の宿主細胞。40

【請求項 2 2】

請求項 1 2 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の核酸分子、請求項 1 8 に記載のキメラ遺伝子又は請求項 1 9 に記載のベクターを含む、植物、種子又は植物細胞。

【請求項 2 3】

内在性 M s i 2 タンパク質が発現されていない、請求項 2 2 に記載の植物、種子又は植物細胞。

【請求項 2 4】

内在性 M s i 2 タンパク質が発現されておらず、前記植物がシロイヌナズナ植物、種子又は植物細胞でない、植物、種子又は植物細胞。

【請求項 2 5】

内在性 M s i 2 遺伝子がノックアウトされている、請求項 2 4 に記載の植物、種子又は植物細胞。

【請求項 2 6】

ナス属植物、種子又は植物細胞、好ましくはトマト植物細胞、種子又は植物細胞である、請求項 2 2 ~ 2 5 のいずれか一項に記載の植物、種子又は植物細胞。

【請求項 2 7】

請求項 2 2 ~ 2 6 のいずれか一項に記載の植物、種子又は植物細胞を作製するための方法であって、

a) 植物内の内在性 M s i 2 遺伝子を改変して、変異した、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の M s i 2 タンパク質をコードする M s i 2 遺伝子を得るか、又は植物細胞内の内在性 M s i 2 タンパク質の発現をノックアウトするために、植物細胞内の内在性 M s i 2 遺伝子を改変するステップと；

b) 変異した M s i 2 遺伝子を含む植物細胞、又は前記内在性 M s i 2 タンパク質の発現がノックアウトされている植物細胞を選択するステップと；

c) 任意選択で、前記植物細胞から植物を再生するステップとを含む、方法。

【請求項 2 8】

請求項 2 2 ~ 2 6 のいずれか一項に記載の植物、種子又は植物細胞を作製するための方法であって、

a) 請求項 1 2 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の核酸分子、請求項 1 8 に記載のキメラ遺伝子、又は請求項 1 9 に記載のベクターを使用して植物細胞を形質転換するか、又は内在性 M s i 2 タンパク質の発現をノックアウトするために、核酸分子を使用して植物細胞を形質転換するステップと；

b) 任意選択で、前記植物細胞内の内在性 M s i 2 タンパク質の発現をノックアウトするために、追加的に植物細胞内の内在性 M s i 2 遺伝子を改変するステップと；

c) 請求項 1 2 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の核酸分子、請求項 1 8 に記載のキメラ遺伝子、若しくは請求項 1 9 に記載のベクターを含む植物細胞、及び／又は内在性 M s i 2 タンパク質の発現がノックアウトされている植物細胞を選択するステップと；

d) 任意選択で、前記植物細胞から植物を再生するステップとを含む、方法。

【請求項 2 9】

半数体植物、異常な倍数性を有する植物、又は倍加半数体植物を生成する方法であって、

a) 内在性 M s i 2 タンパク質を発現する植物を請求項 2 2 ~ 2 6 のいずれか一項に記載の植物に交配するステップであって、請求項 2 2 ~ 2 6 のいずれか一項に記載の植物は、少なくともその生殖部分において及び／又は胚発生の間は内在性 M s i 2 タンパク質の発現を欠く、ステップと；

b) 種子を収集するステップと；

c) 前記種子から、少なくとも 1 つの実生、小植物又は植物を生育させるステップと；

d) 半数体実生、小植物若しくは植物、異常な倍数性を有する実生、小植物若しくは植物、又は倍加半数体実生、小植物若しくは植物を選択するステップとを含む、方法。

【請求項 3 0】

倍加半数体植物を生成する方法であって、

a) 内在性 M s i 2 タンパク質を発現する植物を請求項 2 2 ~ 2 6 のいずれか一項に記載の植物に交配するステップであって、請求項 2 2 ~ 2 6 のいずれか一項に記載の植物は、少なくともその生殖部分において及び／又は胚発生の間は内在性 M s i 2 タンパク質の発現を欠く、ステップと；

b) 半数体植物を選択するステップと；

c) 前記半数体植物を倍加半数体植物に転換するステップと

10

20

30

40

50

を含む、方法。

【請求項 3 1】

ステップ c) における前記転換が、コルヒチンによる処理によって実施される、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記内在性 M s i 2 タンパク質を発現する植物が F 1 植物である、請求項 2 9 ~ 3 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記内在性 M s i 2 タンパク質を発現する植物が、交配の花粉親である、請求項 2 9 ~ 3 2 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 3 4】

前記内在性 M s i 2 タンパク質を発現する植物が、交配の胚珠親である、請求項 2 9 ~ 3 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 5】

交配が、約 2 4 ~ 約 3 0 の範囲、好ましくは約 2 6 ~ 約 2 8 の範囲の温度において実施される、請求項 2 9 ~ 3 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 6】

半数体インデューサー系統を產生するための、請求項 1 2 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の核酸分子の使用。

【請求項 3 7】

請求項 1 2 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の核酸分子、請求項 1 8 に記載のキメラ遺伝子、又は請求項 1 9 に記載のベクターを含む、トマト植物、種子又は植物細胞。

20

【請求項 3 8】

配列番号 6 のアミノ酸配列を含むか又はそれからなるポリペプチドをコードする核酸分子を含む、トマト植物、種子又は植物細胞。

【請求項 3 9】

配列番号 4 又は 9 の核酸分子を含む、トマト植物、種子又は植物細胞。

【請求項 4 0】

請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の M s i 2 タンパク質をコードする核酸分子を含む、トマト植物、種子又は植物細胞。

30

【請求項 4 1】

機能性 M s i 2 タンパク質の発現を欠き、任意選択で、機能喪失型変異を含む M s i 2 タンパク質が発現されている、トマト植物、種子又は植物細胞。

【請求項 4 2】

M s i 2 タンパク質が切断されているか又は非存在である、請求項 4 1 に記載のトマト植物、種子又は植物細胞。

【請求項 4 3】

半数体トマト植物、種子又は植物細胞を產生するための、請求項 3 7 ~ 4 2 のいずれか一項に記載のトマト植物、種子又は植物細胞の使用。

【請求項 4 4】

倍加半数体トマト植物、種子又は植物細胞を產生するための、請求項 3 7 ~ 4 2 のいずれか一項に記載のトマト植物、種子又は植物細胞の使用。

40

【請求項 4 5】

前記トマト植物が、少なくともその生殖部分において及び / 又は胚発生の間は内在性 M s i 2 タンパク質の発現を欠く、請求項 4 3 又は 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 6】

半数体又は倍加半数体植物を生成する方法であって、内在性 M s i 2 タンパク質を発現する植物及び請求項 2 2 ~ 2 6 のいずれか一項に記載の植物を同定するステップであって、請求項 2 2 ~ 2 6 のいずれか一項に記載の前記植物が、少なくともその生殖部分において及び / 又は胚発生の間は内在性 M s i 2 タンパク質の発現を欠く、ステップを含む、方

50

法。

【請求項 4 7】

前記植物の全ゲノムを有性交配するステップを含まない、請求項 2 9 ~ 3 5 又は 4 6 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本開示は、農業分野に関する。特に、本開示は、半数体及びそれに続く倍加半数体植物の產生に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

育種材料の高度なヘテロ接合性は、植物育種及び有益な形質の選択を非常に時間のかかるプロセスにする可能性がある。広範な集団のスクリーニングは、最新の分子育種ツールを用いたとしても、労力と費用の両方を要する。

【0 0 0 3】

半数体植物の創出とそれに続く化学的又は自発的ゲノム倍加は、高いヘテロ接合性の問題を解決するための効率的な方法である。そのような倍加半数体は、そうでなければ許容できるレベルまでヘテロ接合性を低減させるために必要とされる、少なくとも 7 世代の自殖を回避する。半数体植物は、小胞子培養によって一部の作物において產生されうる。しかしながら、これは、費用と時間がかかる。多くの作物において小胞子培養法が機能しないことは、より重要である。一部の作物種において、(倍加) 半数体植物は、卵細胞の単為生殖又は親ゲノムのうちの一方の排除により得られうる。しかしながら、これらの方法も選ばれたわずかな作物に限定され、倍加半数体植物の產生率は低い。

【0 0 0 4】

国際公開第 WO 2 0 1 1 / 0 4 4 1 3 2 号は、半数体植物を產生する方法を開示する。採用された方法のうちの 1 つは、CenH3 タンパク質を不活性化又はノックアウトすることである。これは、N 末端 GFP を CenH3 タンパク質に付加し、それによって GFP - CenH3 を創出することによって行われた。これは、「テールスワップ (tail swap)」とも呼ばれる。テールスワップは、CenH3 タンパク質のそのような修飾 N 末端部分を含まない植物への交配に際して、片親ゲノムの排除を誘導するのに十分であった。片親ゲノムの排除は、半数体植物の產生をもたらした。これまで、このプロセスは、モデル植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) においてのみ実証され、作物植物においては実証されていない。加えて、異なる遺伝子導入により修飾された CenH3 タンパク質の N 末端部分からなる別の人工構築物が、内在性 CenH3 を欠く遺伝的背景を有する植物に導入された場合、これは、片親ゲノムの排除及びそれに続く半数体植物の產生をもたらさないようであった(国際公開第 WO 2 0 1 4 / 1 1 0 2 7 4 号)。したがって、CenH3 タンパク質のどの修飾が片親ゲノムの排除に十分であるかは不明確なままである。

【0 0 0 5】

よって、本分野においては、後に倍加されて、倍加半数体植物を產生することのできる半数体植物の効率的な生成を可能とする方法に対する必要が残っている。倍加半数体產生系により、ホモ接合性が一世代で達成される。

【発明の概要】

【0 0 0 6】

ここに、本発明者らは、トマト (*Solanum lycopersicum*) Ms i 2 タンパク質の 126 位における K から終止コドンへのアミノ酸修飾をもたらす独特の一塩基多型によって、機能性 Ms i 2 タンパク質を喪失したトマト植物が、機能性 Ms i 2 タンパク質を含む野生型植物への又はそれとの交配後に半数体子孫を誘導することができることを見出した。Ms i 2 タンパク質において K から M へのアミノ酸修飾をもたらす一塩基多型は、コンピュータを用いた方法によって非破壊的であることがわかった (SIF 50

10

20

30

40

50

T、Kumar P、Henikoff S、Ng PC. (2009年) Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm.、Nat Protoc; 4巻(7号): 1073~81ページ)。これらのモデルと一致して、後者のアミノ酸修飾は、Msi2タンパク質における上記KからMへの特定の酸修飾を欠く野生型植物への又はそれとの交配後に、半数体子孫を誘導しなかった。アミノ酸配列(Msi2D337D)を変更しない同義一塩基多型との正逆コントロール交配(reciprocal control cross)は、いかなる半数体子孫も生じさせなかった。

【0007】

10

第1の態様において、本発明は、機能喪失型変異を含む、植物起源のMsi2タンパク質に関する。

【0008】

上記変異は、WD40リピート及び/又はCAF1Cドメイン中に存在しうる。

【0009】

上記Msi2タンパク質は、機能喪失型変異を有する、植物Msi2タンパク質をコードするポリヌクレオチドによりコードされてもよく、このタンパク質は、その内在性Msi2タンパク質の非存在下で植物中に存在する場合、上記植物が野生型植物と交配されるときに、いくつかの半数体後代又は異常な倍数性を有する後代の生成を可能とする。

【0010】

20

上記Msi2タンパク質は、配列番号1若しくは10のアミノ酸配列、又は配列番号1若しくは10のアミノ酸配列に対して少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、さらにより好ましくは少なくとも90%、なおさらにより好ましくは少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも98%若しくは99%の配列同一性を有するその変異体を含むポリペプチドに由来してもよく、上記タンパク質は、機能喪失型変異を有する、植物Msi2タンパク質をコードするポリヌクレオチドによりコードされ、このタンパク質は、その内在性Msi2タンパク質の非存在下で植物中に存在する場合、上記植物が野生型植物と交配されるときに、いくつかの半数体後代又は異常な倍数性を有する後代の生成を可能とする。

【0011】

30

上記Msi2タンパク質は、配列番号2若しくは3のアミノ酸配列、又は配列番号2若しくは3のアミノ酸配列に対して少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、さらにより好ましくは少なくとも90%、なおさらにより好ましくは少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも98%若しくは99%の配列同一性を有するその変異体を含むポリペプチドに由来してもよく、上記タンパク質は、機能喪失型変異を有する、植物Msi2タンパク質をコードするポリヌクレオチドによりコードされ、このタンパク質は、その内在性Msi2タンパク質の非存在下で植物中に存在する場合、上記植物が野生型植物と交配されるときに、いくつかの半数体後代又は異常な倍数性を有する後代の生成を可能とする。例えば、産生された後代の0.1、0.5、1又は5%は、半数体であるか、又は異常な倍数性を有するか、又は倍加半数体である。

【0012】

40

機能喪失型変異は、タンパク質の切断を引き起こす未成熟な終止コドンを導入しうる。例えば、上記タンパク質は、配列番号2、3若しくは10の125位のアミノ酸残基の後で、又は配列番号1の123位のアミノ酸残基の後で切断されうる。

【0013】

ある実施形態において、Msi2タンパク質は、配列番号6のアミノ酸配列を含むか又は配列番号6のアミノ酸配列からなる。

【0014】

ある実施形態において、Msi2タンパク質は、配列番号4又は9の核酸配列を含む核酸分子によりコードされていてもよい。

50

【0015】

M_si 2タンパク質は、標的ヌクレオチド交換を使用して又はエンドヌクレアーゼを適用することにより、内在性M_si 2タンパク質をコードするポリヌクレオチドから得られた、機能喪失型変異を含むポリヌクレオチドによりコードされていてもよい。

【0016】

別の態様において、本発明は、本明細書に教示されるM_si 2タンパク質をコードする核酸分子を提供する。

【0017】

また、本発明は、配列番号5、7若しくは8の核酸配列、又は配列番号5、7若しくは8の核酸配列に対して少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、さらにより好ましくは少なくとも90%、なおさらにより好ましくは少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも98%若しくは99%の配列同一性を有するその変異体を含む核酸分子であって、配列番号5、7又は8の核酸配列のうちの1つ又は複数のヌクレオチドが、上記核酸分子が機能喪失型変異を含むM_si 2タンパク質をコードするように修飾されている、核酸分子を提供する。

10

【0018】

本発明は、配列番号5、7若しくは8の核酸配列、又は配列番号5、7若しくは8の核酸配列に対して少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、さらにより好ましくは少なくとも90%、なおさらにより好ましくは少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも98%若しくは99%の配列同一性を有するその変異体を含む核酸分子であって、1つ又は複数のヌクレオチドが、未成熟の終止コドンが導入され、上記核酸分子が切断型M_si 2タンパク質をコードするように修飾されている、核酸分子も提供する。

20

【0019】

ある実施形態において、配列番号5若しくは7の核酸配列の376、377及び／若しくは378位における1つ又は複数のヌクレオチド、又は配列番号8の核酸配列の685、686及び／若しくは687位における1つ又は複数のヌクレオチドが、終止コドンが導入され、上記核酸分子が、配列番号2又は3の125位に対応するアミノ酸残基の後で切断されているアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするように、修飾されている。

【0020】

配列番号4又は9の核酸配列を含む核酸分子も教示される。

30

【0021】

本明細書に教示される核酸分子は、単離された核酸、ゲノム核酸又はcDNAであってよい。

【0022】

本発明は、さらに、本明細書に教示される核酸分子を含むキメラ遺伝子、及び本明細書に教示される核酸分子又は本明細書に教示されるキメラ遺伝子を含むベクターを提供する。

【0023】

本発明は、さらに、本明細書に教示される核酸分子、本明細書に教示されるキメラ遺伝子、又は本明細書に教示されるベクターを含む宿主細胞に関する。

40

【0024】

上記宿主細胞は、プロトプラストを含む植物細胞、好ましくはトマト植物細胞である。

【0025】

本明細書に教示される核酸分子、本明細書に教示されるキメラ遺伝子、又は本明細書に教示されるベクターを含む、植物、種子又は植物細胞も開示される。

【0026】

ある実施形態において、内在性M_si 2タンパク質は、上記植物、種子又は植物細胞において発現されない。

【0027】

50

本発明は、植物、種子又は植物細胞であって、内在性Msi2タンパク質が発現されていない、例えば、内在性Msi2遺伝子がノックアウトされている、植物、種子又は植物細胞にも関する。ある実施形態において、上記植物、種子又は植物細胞は、シロイヌナズナ植物、種子又は植物細胞ではない。

【0028】

上記植物、種子又は植物細胞は、ナス属植物、種子又は植物細胞、好ましくはトマト植物、

種子又は植物細胞でありうる。

【0029】

本発明は、さらに、本明細書に教示される植物、種子又は植物細胞を作製するための方法であって、

a) 植物細胞内の内在性Msi2遺伝子を改変して、変異した、本明細書に教示されるMsi2タンパク質をコードするMsi2遺伝子を得るか、又は植物細胞内の内在性Msi2タンパク質の発現をノックアウトするために、植物細胞内の内在性Msi2遺伝子を改変するステップと；

b) 変異したMsi2遺伝子を含む植物細胞、又は上記内在性Msi2タンパク質の発現がノックアウトされている植物細胞を選択するステップと；

c) 任意選択で、上記植物細胞から植物を再生するステップとを含む、方法に関する。

【0030】

本発明は、本明細書に教示される植物、種子又は植物細胞を作製するための方法であって、

a) 本明細書に教示される核酸分子、本明細書に教示されるキメラ遺伝子、又は本明細書に教示されるベクターを使用して植物細胞を形質転換するか、又は内在性Msi2タンパク質の発現をノックアウトするために、核酸分子を使用して植物細胞を形質転換するステップと；

b) 任意選択で、植物細胞内の内在性Msi2タンパク質の発現をノックアウトするために、追加的に上記植物細胞内の内在性Msi2遺伝子を改変するステップと；

c) 本明細書に教示される核酸分子、本明細書に教示されるキメラ遺伝子、若しくは本明細書に教示されるベクターを含む植物細胞、及び／又は上記内在性Msi2タンパク質の発現がノックアウトされている植物細胞を選択するステップと；

d) 任意選択で、上記植物細胞から植物を再生するステップとを含む、方法も対象とする。

【0031】

別の態様において、本発明は、半数体植物、異常な倍数性を有する植物、又は倍加半数体植物を生成する方法であって、

a) 内在性Msi2タンパク質を発現する植物を本明細書に教示される植物に交配するステップであって、本明細書に教示される植物は、少なくともその生殖部分において及び／又は胚発生の間は内在性Msi2タンパク質の発現を欠く、ステップと；

b) 種子を収集するステップと；

c) 上記種子から、少なくとも1つの実生、小植物又は植物を生育させるステップと；

d) 半数体実生、小植物若しくは植物、異常な倍数性を有する実生、小植物若しくは植物、又は倍加半数体実生、小植物若しくは植物を選択するステップとを含む、方法を提供する。

【0032】

本発明は、倍加半数体植物を生成する方法であって、

a) 内在性Msi2タンパク質を発現する植物を本明細書に教示される植物に交配するステップであって、本明細書に教示される植物は、少なくともその生殖部分において及び／又は胚発生の間は内在性Msi2タンパク質の発現を欠く、ステップと；

b) 半数体植物を選択するステップと；

10

20

30

40

50

c) 上記半数体植物を倍加半数体植物に転換するステップとを含む、方法にも関する。

【0033】

ステップc) における転換は、コルヒチンによる処理によって実施されてもよい。

【0034】

内在性Ms i 2タンパク質を発現する植物は、F1植物であってもよい。

【0035】

内在性Ms i 2タンパク質を発現する植物は、交配の花粉親であってもよく、又は交配の胚珠親であってもよい。

【0036】

交配は、約24～約30 の範囲、好ましくは約26～約28 の範囲の温度において実施されうる。

【0037】

本発明は、さらに、半数体インデューサー系統を產生するための本明細書に教示される核酸分子の使用に関する。

【0038】

また、本発明は、本明細書に教示される核酸分子、本明細書に教示されるキメラ遺伝子、又は本明細書に教示されるベクターを含むトマト植物、種子又は植物細胞を対象とする。

【0039】

さらに、配列番号6のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸分子を含むトマト植物、種子又は植物細胞が、本明細書に教示される。

【0040】

また、配列番号4又は9の核酸分子を含むトマト植物、種子又は植物細胞も本明細書に教示される。

【0041】

なお別の態様において、本明細書に教示されるMs i 2タンパク質をコードする核酸分子を含むトマト植物、種子又は植物細胞が提供される。

【0042】

また、機能性Ms i 2タンパク質の発現を欠き、任意選択で、機能喪失型変異を含むMs i 2タンパク質が発現されているトマト植物、種子又は植物細胞も、本明細書に教示される。

【0043】

本明細書に教示されるトマト植物は、半数体トマト植物を產生するため、及び／又は倍加半数体トマト植物を產生するために使用されうる。

【0044】

本明細書に教示されるトマト植物は、少なくともその生殖部分において及び／又は胚発生の間は内在性Ms i 2タンパク質の発現を欠く可能性がある。

【0045】

最終的な態様において、本発明は、半数体又は倍加半数体植物を生成する方法であって、内在性Ms i 2タンパク質を発現する植物及び本明細書に教示される植物を同定するステップであって、本明細書に教示される植物が、少なくともその生殖部分において及び／又は胚発生の間は内在性Ms i 2タンパク質の発現を欠く、ステップを含む、方法を対象とする。

【0046】

本明細書に教示される交配方法は、上記植物の全ゲノムを有性交配するステップを含まない。

【図面の簡単な説明】

【0047】

【図1】Ms i 2 - K126 - stop変異体の四分染色体を示す。矢印は、微小核を示

10

20

30

40

50

す。

【発明を実施するための形態】

【0048】

定義

用語「Msi2」は、RNA結合タンパク質Mussashii2を指す。RNA結合タンパク質Mussashii2は、WD-40リピート含有タンパク質である。(WD又はベータ-トランスデューションリピートとしても知られている)WD-40リピートは、Trp-Asp(W-D)ジペプチドで終端することの多い、短い約40アミノ酸モチーフである。WD40リピートは、通常、7~8枚羽根のプロペラ折りたたみ構造(beta-propeller fold)と推定されるが、タンパク質は、環化したプロペラ構造も形成する4~16個の反復単位が認められている。WDリピートタンパク質は、すべての真核生物に認められる大きなファミリーであり、シグナル伝達及び転写制御から細胞周期調節及びアポトーシスまでにわたる多様な機能に関係している。反復するWD40モチーフは、タンパク質-タンパク質相互作用のための部位として作用し、WD40リピートを含有するタンパク質は、タンパク質複合体の組み立てのためのプラットフォーム又は他のタンパク質の間の一過性の相互作用のメディエーターとして働くことが知られている。タンパク質の特異性は、リピート自体の外部の配列により決定される。Msi2は、標的mRNAの発現を翻訳レベルで調節するRNA結合タンパク質であると考えられている。アラビドブシス種(Arabidopsis spp.)において、数種のWD40含有タンパク質が、植物特異的な発生イベントの主要調節因子として作用する。シロイヌナズナMsi2(At2g16780)のT-DNA挿入変異体及びMsi2を過剰発現するトランスジェニック植物は、野生型と同じ表現型を有すると報告された。野生型におけるMsi2遺伝子の発現は、乾燥、塩、高温、低温、マンニトール、ABA、GA、サリチル酸及びジャスモン酸によって誘発することはできなかった。35Sプロモーターによる制御下で完全長のMsi2 cDNA及びGFPからなる融合タンパク質を使用する、局在化試験は、細胞質及び核の両方で蛍光が検出されたことを明らかにした。植物におけるMsi2の正確な役割は、いまだ知られていない。

10

20

30

【0049】

「変異」は、生物、ウイルスのゲノム又は染色体外DNA又は他の遺伝要素のヌクレオチド配列の恒久的変化である。(放射線又は化学的変異原により典型的に引き起こされる)修復されないDNA、若しくはRNAゲノムに対する損傷、複製の過程におけるエラーにより、又は可動遺伝因子によるDNAのセグメントの挿入若しくは欠失によりもたらされる。変異は、生物の観察可能な特徴(表現型)において認識できる変化を生じても生じなくてもよい。変異は、配列に数種の異なるタイプの変化をもたらすことができる。遺伝子における変異は、影響を及ぼさないか、遺伝子産物を変化させるか、又は遺伝子が適切に若しくは完全に機能することを阻むことのいずれかであります。変異は、非遺伝子領域においても起こりうる。

30

【0050】

本発明の状況におけるタンパク質の「機能喪失型変異」は、その機能の喪失を引き起こす、タンパク質の変異を指す。ポリヌクレオチドの「機能喪失型変異」は、タンパク質の機能喪失を引き起こす、上記タンパク質をコードするポリヌクレオチドの変異を指す。タンパク質はなお、機能喪失型変異を含むポリヌクレオチドから産生されうるが、上記タンパク質はもはや機能を発揮できないか又はその機能を有効に発揮することができない。

40

【0051】

「発現喪失型変異」は、変異した遺伝子又は上記変異した遺伝子によりコードされる産物の発現の喪失をもたらす。

【0052】

「機能喪失型Msi2タンパク質」は、機能喪失型変異を含むMsi2タンパク質である。上記機能喪失型Msi2タンパク質は、その内在性Msi2タンパク質の非存在下で植物中に存在する場合、上記植物が野生型植物、好ましくは同じ種の野生型植物と交配さ

50

れるときに、いくつかの半数体後代又は異常な倍数性を有する後代の生成を可能とする。機能喪失型 Ms i 2 タンパク質は、Ms i 2 タンパク質に特異的に結合する抗体、又は他の Ms i 2 阻害剤、例えば、内在性 Ms i 2 タンパク質の活性を遮断し、阻止し若しくは低減させるタンパク質、又はイオン若しくは金属のような化学阻害剤のようなタンパク質の阻害剤を使用することにより、或いはコファクターを除去することにより、非機能性に又はより機能性が低くもなりうる。例えば、Ms i 2 タンパク質に特異的に結合する抗体が、上記 Ms i 2 タンパク質と同時に発現され、それによって、上記 Ms i 2 タンパク質の比活性を低減しうる。Ms i 2 タンパク質の機能が減損されてもよく、又はMs i 2 タンパク質は内在性 Ms i 2 タンパク質よりも機能性が低くてもよい。

【0053】

10

「機能喪失型 Ms i 2 タンパク質をコードするポリヌクレオチド」は、非内在性の、変異した Ms i 2 タンパク質をコードするポリヌクレオチドであって、機能喪失型変異を含む Ms i 2 タンパク質をコードし、その内在性 Ms i 2 タンパク質をコードするポリヌクレオチドの非存在下で植物中に存在する場合、上記植物が野生型植物、好ましくは同じ種の野生型植物と交配されるときに、いくつかの半数体後代又は異常な倍数性を有する後代の生成を可能とするポリヌクレオチドを指す。機能喪失型変異は、フレームシフト変異を含む。

【0054】

20

本発明の状況において、タンパク質、遺伝子又はポリヌクレオチドと組み合わせて使用される用語「内在性」は、上記タンパク質、遺伝子又はポリヌクレオチドが、それがなお含有されている植物に起源を有することを意味する。内在性遺伝子は、植物中で、その正常な遺伝学的状況にあることが多い。

【0055】

30

本明細書中で使用される用語「遺伝子」は、好適な調節領域（例えば、プロモーター）に操作可能に連結されている、細胞中で RNA 分子（例えば、mRNA）に転写される領域（転写領域）を含む DNA 配列を指す。この結果、遺伝子は、プロモーター、例えば、翻訳開始に関与する配列などを含む 5' リーダー配列、（タンパク質）コード領域（cDNA 又はゲノム DNA）及び、例えば、転写終結点などを含む 3' 非翻訳配列のような数種の操作可能に連結された配列を含んでもよい。

【0056】

40

本開示の状況において使用される用語「半数体インデューサー系統」は、非インデューサー系統と少なくとも 1 つの一塩基多型において異なる植物系統を指す。雌株又は花粉ドナーのいずれかとして使用される半数体インデューサー系統が交配される場合、半数体インデューサー系統のゲノムの片親ゲノムの排除をもたらす。

【0057】

本明細書中で使用される用語「片親ゲノムの排除」は、交配後に、交配の方向に関わりなく一方の親のすべての染色体を意味するすべての遺伝情報を失うという効果を指す。これは、そのような交配の子孫が、排除されない親ゲノムの染色体のみを含有するような方法で起こる。排除されるゲノムは、常に半数体インデューサーである親に起源を有する。

【0058】

「倍加半数体」は、半数体細胞が染色体倍加を受けるときに形成される遺伝子型である。これは、半数体細胞からの誘導された又は自発的な染色体倍加により產生されうる。二倍体植物にとって、半数体細胞は一倍体であり、用語「倍加一倍体」も、倍加半数体について使用されうる。

【0059】

50

（フレーミングエラー（framing error）又は読み枠シフトとも呼ばれる）「フレームシフト変異」は、ヌクレオチド配列中で均一に 3 で割り切れないいくつかのヌクレオチドのインデル（挿入又は欠失）に起因する遺伝子変異である。コドンによる遺伝子発現のトリプレットの性質により、挿入又は欠失は、読み枠（コドンのグループ分け）を変化させることができ、テンプレートの完全に異なる翻訳をもたらす。挿入又は欠失

が配列中で早く起こるほど、タンパク質産物はより大きく変更される。フレームシフト変異は、一般に、変異後のコドンの読みが、異なるアミノ酸をコードするようにさせるが、遺伝コードの縮重の結果として生じる例外もありうる。さらに、元の配列中の終止コドンは読まれず、代替の終止コドンがより早い又はより遅い終結部位を生じさせうる。タンパク質産物は、異常に短いか又は異常に長い。

【0060】

用語「ポリヌクレオチド」、「核酸分子」及び「核酸」は、本明細書において互換的に使用される。

【0061】

「キメラ遺伝子」（又は組換え遺伝子）は、通常、ある種において自然界で見られない任意の遺伝子、特に、自然界で互いに関連し合わない核酸配列の1つ又は複数の部分がその中に存在する遺伝子を指す。例えば、プロモーターは、自然界で転写領域の一部若しくはすべて、又は別の調節領域とは関連し合わない。用語「キメラ遺伝子」は、その中のプロモーター又は転写調節配列が、1つ若しくは複数のコード配列に又はアンチセンス（センス鎖の逆相補体）若しくは逆位反復配列（それによって、転写に際してRNAトランスクリプトが二本鎖RNAを形成する、センス及びアンチセンス）に操作可能に連結される、発現構築物を含むと理解される。

10

【0062】

「配列同一性」及び「配列類似性」は、グローバル又はローカルアライメントアルゴリズムを使用する2つのペプチド又は2つのヌクレオチド配列のアライメントにより決定される。その結果、配列は、それらが（例えばデフォルトパラメータを使用するGAP又はBESTFITプログラムにより最適に整列化された場合に）少なくとも（以下に定義される）ある特定の最小限のパーセンテージの配列同一性を共有する場合に、「実質的に同一」又は「本質的に類似する」と呼ばれる。GAPは、Needleman-Wunschグローバルアライメントアルゴリズムを使用して、マッチの数を最大にし、ギャップの数を最小としつつ、2つの配列をその長さ全体にわたって整列化する。一般に、ギャップクリエーションペナルティ = 50（ヌクレオチド）/ 8（タンパク質）及びギャップエクステンションペナルティ = 3（ヌクレオチド）/ 2（タンパク質）でGAPデフォルトパラメータが使用される。ヌクレオチドについては、使用されるデフォルトスコアリングマトリックスは、nwsgapdnaであり、タンパク質については、デフォルトスコアリングマトリックスは、Blosum62である（Henikoff及びHenikoff、1992年、PNAS 89巻、915~919ページ）。配列アライメント及び配列同一性パーセンテージのためのスコアが、Accelerys Inc.、9685 Scranton Road、San Diego、CA 92121-3752 USからのGCG Wisconsin Package、バージョン10.3又は（「needle」プログラムを使用する）EmbossWinバージョン2.10.0などのコンピュータプログラムを使用して決定されうる。代替的には、類似性又は同一性パーセントは、FASTA、BLASTなどのアルゴリズムを使用してデータベースを検索することによって決定されうる。

20

30

【0063】

「宿主細胞」又は「組換え宿主細胞」又は「形質転換細胞」は、特に所望のタンパク質をコードするキメラ遺伝子を含む、少なくとも1つの核酸分子の導入の結果として生じる新しい個別の細胞（又は生物）を指す用語である。宿主細胞は、植物細胞又は細菌細胞であることが好ましい。宿主細胞は、染色体外で（エピソームの）複製する分子として核酸分子若しくはキメラ遺伝子を含有してもよく、又はより好ましくは、宿主細胞の核若しくはプラスチドゲノム中に集積された核酸分子若しくはキメラ遺伝子を含む。

40

【0064】

本明細書において使用される場合、用語「植物」は、植物細胞、植物組織又は器官、植物プロトプラスト、そこから植物が再生されることのできる植物細胞組織培養、植物カルス、植物細胞凝集塊、及び植物中で無傷である植物細胞、又は胚、花粉、胚珠、果実（例

50

えば、収穫されたトマト)、花、葉、種子、根、毛根などのような植物の部分を含む。

【0065】

この文書において及びその請求の範囲において、動詞「含む」及びその活用形は、その非限定的な意味で使用されて、この単語に続く項目が含まれるが、具体的に言及されない項目が除外されないことを意味する。これは、動詞「から本質的になる」及び「からなる」を包含する。

【0066】

加えて、不定冠詞「1つの(a)」又は「1つの(a n)」による要素への言及は、要素のうちの1つ及び1つのみが存在することを文脈が明らかに要求しない限り、要素のうちの複数が存在する可能性を排除しない。よって、不定冠詞「1つの(a)」又は「1つの(a n)」は、通常、「少なくとも1つ」を意味する。さらに、本明細書において「配列」に言及する場合、一般に、サブユニット(例えば、アミノ酸)のある特定の配列を含む実際の物理的な分子が言及される。

10

【発明の詳細な説明】

【0067】

本発明の作用機序

機能性Ms i 2タンパク質の非存在下又は低減された存在下で生じる、機能性Ms i 2タンパク質の発現が減損され及び/又はMs i 2タンパク質の機能が減損されている植物は、そのような植物に半数体インデューサー表現型を付与すると考えられる。上記植物が性的に適合性の野生型植物、好ましくは同じ種の野生型植物と交配される場合、いくつかの半数体後代又は異常な倍数性を有する後代の生成が、比較的高い頻度で誘発される。そのような植物を使用して生成される半数体後代又は異常な倍数性を有する後代のパーセンテージは、例えば、少なくとも0.1、0.5、1、5、10、20%又はそれ超であります。

20

【0068】

機能性Ms i 2タンパク質の減損された発現は、Ms i 2遺伝子の発現が減損され、及び/又はMs i 2遺伝子の発現は正常であるが、転写されたmRNAの翻訳が(例えば、RNA干渉によって)阻害又は阻止されることを意味しうる。

【0069】

転写レベルでの機能性Ms i 2タンパク質の減損された発現は、プロモーター、エンハンサー、又は開始、終結若しくはイントロンスプライシング配列を含む転写調節配列における1つ又は複数の変異の導入の結果であります。一般に、これらの配列は、Ms i 2タンパク質をコードする遺伝子(单数又は複数)のコード配列の5'又は3'又はその内部に位置する。代替的に、又は追加的に、機能性Ms i 2タンパク質の減損された発現は、内在性Ms i 2遺伝子(单数又は複数)のコード領域におけるヌクレオチドの欠失、置換、再構成又は挿入によっても達成されうる。例えば、コード領域において、ヌクレオチドは、置換され、挿入され又は欠失されて、1つ、2つ又はそれ超の未成熟な終止コドンの導入をもたらす。また、挿入、欠失、再構成又は置換は、コードされるアミノ酸配列における改変をもたらし、それによって機能性Ms i 2タンパク質の減損された発現をもたらすことができる。Ms i 2遺伝子(複数可)の大部分、例えば、Ms i 2遺伝子(複数可)の(コード領域の)少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%又はさらに100%が、植物中に存在するDNAから除去され、それによって機能性Ms i 2タンパク質の発現を減損しうる。

30

【0070】

代替的に、1つ、2つ、3つ又はそれ超のヌクレオチドがMs i 2遺伝子(複数可)に導入され、例えば、フレームシフトをもたらすか又はMs i 2タンパク質への追加のアミノ酸の導入をもたらすか、又はアミノ酸をコードしない核酸配列の導入をもたらすか、又は大きな挿入断片の導入(例えば、T-DNA挿入)をもたらし、それによって、機能性Ms i 2タンパク質の供給/発現を減損しうる。

40

【0071】

50

翻訳レベルでの減損は、未成熟な終止コドンの導入により、或いは（スプライシングのような）他のRNAからタンパク質へのプロセシングメカニズム又はタンパク質のフォールディング若しくは細胞輸送などに影響を及ぼす翻訳後修飾に影響を及ぼすことによって達成されうる。

【0072】

タンパク質レベルでの減損又は機能喪失は、活性、基質結合、補助因子結合、フォールディング、タンパク質-タンパク質相互作用などに重要なアミノ酸残基の切断により、又は修飾によってもたらされうる。

【0073】

機能性Ms i 2タンパク質の発現の減損は、例えば、CRISP、RNAi、VIGSなどを使用する、遺伝子サイレンシングによっても達成されうる。

10

【0074】

加えて、機能性Ms i 2タンパク質の発現の減損は、Ms i 2タンパク質に特異的に結合する抗体のようなMs i 2タンパク質阻害剤、又は他のMs i 2阻害剤、例えば、内在性Ms i 2タンパク質の活性を遮断し、阻止し若しくは低減するタンパク質又はイオン若しくは金属のような化学阻害剤を使用することにより、或いは補助因子の除去により達成されうる。例えば、Ms i 2タンパク質に特異的に結合する抗体が、上記Ms i 2タンパク質と同時に発現され、それによってその比活性を低減することができる。

【0075】

機能喪失型変異を含むMs i 2タンパク質

20

本発明は、1つ又は複数の機能喪失型変異を含む、Ms i 2タンパク質、好ましくは植物起源のMs i 2タンパク質を提供する。1つ又は複数の機能喪失型変異を含むそのようなMs i 2タンパク質を発現し、内在性Ms i 2タンパク質の発現を欠くか若しくはその発現の抑制された植物が、内在性Ms i 2タンパク質を発現する野生型植物と交配される場合、比較的高頻度で半数体植物が形成される。半数体植物は、少なくとも0.1、0.5、1、5、10、20%又はそれ超のような、正常を超える頻度で形成される。1つ又は複数の機能喪失型変異を含むMs i 2タンパク質は、当業者に公知の多様な手段によって創出されうる。これらは、制限なく、ランダム変異誘発、單一又は複数アミノ酸標的変異誘発、完全な又は部分的なタンパク質ドメイン欠失の生成、異種アミノ酸配列との融合などを含む。典型的に、内在性Ms i 2タンパク質をコードするポリヌクレオチドがノックアウトされ又は不活性化されて、内在性Ms i 2タンパク質の発現を欠く植物を創出する。

30

【0076】

1つ又は複数の機能喪失型変異を含むMs i 2タンパク質は、例えば、内在性Ms i 2タンパク質の発現を欠く植物における、1つ又は複数の機能喪失型変異を含むMs i 2タンパク質の組換え発現、上記トランスジェニック植物を内在性Ms i 2タンパク質を発現する植物に交配させること、次いで半数体後代の產生についてスクリーニングすることによって試験されうる。

【0077】

任意の数の変異が、内在性Ms i 2タンパク質に導入されて、1つ又は複数の機能喪失型変異を含むMs i 2タンパク質を生成することができる。例えば、1つ又は複数の機能喪失型変異を含むMs i 2タンパク質は、1、2、3、4、5、6、7、8個又はそれ超のアミノ酸以外は内在性Ms i 2タンパク質と同一であってもよい。

40

【0078】

Ms i 2タンパク質は、植物Ms i 2タンパク質であることが好ましい。植物は任意の植物であってもよいが、ナス科に、より好ましくはナス属に、さらにより好ましくはトマト種に属することが好ましい。

【0079】

ある実施形態において、1つ又は複数の機能喪失型変異は、配列番号1、10、2又は3のいずれかに示されるアミノ酸配列によって表される内在性Ms i 2タンパク質におい

50

て引き起こされる。代替的に又は追加的に、1つ又は複数の機能喪失型変異は、配列番号1、10、2若しくは3のいずれかに示されるアミノ酸配列、又は配列番号1、10、2若しくは3のいずれかのアミノ酸配列に対して少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%，94%，95%，96%，97%，98%，99%若しくはそれ超、例えば、100%のアミノ酸配列同一性を、好ましくは長さ全体にわたって有するその変異体により表される内在性Msi2タンパク質において引き起こされてもよい。アミノ酸配列同一性は、上で定義されたNeedleman-Wunschアルゴリズム並びにGAPデフォルトパラメータを使用するペアワイズアライメントにより決定される。

【0080】

10

1つ又は複数の機能喪失型変異を含むMsi2タンパク質内の1つ又は複数の機能喪失型変異は、タンパク質内のあらゆる場所に位置する可能性がある。ある実施形態において、機能喪失型変異は、配列番号1、10、2若しくは3のいずれかに示されるアミノ酸配列により表される内在性Msi2タンパク質又は本明細書に教示されるその変異体のWD40リピート中に又はCAF1Cドメイン中に位置する。

【0081】

20

本明細書に教示されるMsi2タンパク質は、機能喪失型変異を有する、植物Msi2タンパク質をコードするポリヌクレオチドによりコードされてもよい。このタンパク質は、その内在性Msi2タンパク質の非存在下で植物中に存在する場合、上記植物が野生型植物と交配されるときに、上記植物の生存可能性に影響を及ぼすことなく、いくつかの半数体後代又は異常な倍数性を有する後代の生成を可能とする。

【0082】

30

本明細書に教示されるMsi2タンパク質は、配列番号1若しくは10のアミノ酸配列、又は配列番号1若しくは10のアミノ酸配列に対して、少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、さらにより好ましくは少なくとも90%、なおさらにより好ましくは少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも98%若しくは99%の配列同一性を有するその変異体を含むポリペプチドに由来してもよく、前記タンパク質は、機能喪失型変異を有する、植物Msi2タンパク質をコードするポリヌクレオチドによりコードされており、このタンパク質は、その内在性Msi2タンパク質の非存在下で植物中に存在する場合、上記植物が野生型植物と交配されるときに、いくつかの半数体後代又は異常な倍数性を有する後代の生成を可能とする。

【0083】

40

本明細書に教示されるMsi2タンパク質は、配列番号2若しくは3のアミノ酸配列、又は配列番号2のアミノ酸配列に対して、少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、さらにより好ましくは少なくとも90%、なおさらにより好ましくは少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも98%若しくは99%の配列同一性を有するその変異体を含むポリペプチドに由来してもよく、前記ポリペプチドは、機能喪失型変異を有する、植物Msi2タンパク質をコードするポリヌクレオチドによりコードされており、このポリペプチドは、その内在性Msi2タンパク質の非存在下で植物中に存在する場合、上記植物が野生型植物と交配されるときに、いくつかの半数体後代又は異常な倍数性を有する後代の生成を可能とする。

【0084】

50

本明細書に教示されるMsi2タンパク質は、配列番号3のアミノ酸配列、又は配列番号3のアミノ酸配列に対して、少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、さらにより好ましくは少なくとも90%、なおさらにより好ましくは少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも98%若しくは99%の配列同一性を有するその変異体を含むポリペプチドに由来してもよく、上記ポリペプチドは、機能喪失型変異を有する、植物Msi2タンパク質をコードするポリヌクレオチドによりコードされており、これは、その内在性Msi2タンパク質の非存在下で植物中に存在する場合、上記植物が野生型植物と交配されるときに、いくつかの半数体後代又は異常な倍数性を有する後代の生成を可能とす

る。

【0085】

本明細書に教示される植物が野生型植物と交配される場合、產生される後代の少なくとも0.1、0.5、1又は5%が半数体であるか、又は異常な倍数性を有するか、又は倍加半数体であることが好適である。

【0086】

ある実施形態において、1つ又は複数の機能喪失型変異は、タンパク質の切斷を引き起こす未成熟な終止コドンを導入する。

【0087】

一実施形態において、タンパク質は、配列番号2又は3の125位のアミノ酸残基の後で切斷されている。

【0088】

ある実施形態において、本明細書に教示されるMs i 2タンパク質は、配列番号4又は9の核酸配列を含む核酸分子によりコードされている。

【0089】

1つ又は複数の機能喪失型変異を含むMs i 2タンパク質をコードするポリヌクレオチド、キメラ遺伝子、ベクター、宿主細胞

cDNA、ゲノムDNA及びRNA分子のような、上記タンパク質のいずれかをコードする核酸配列を有するポリヌクレオチドも提供される。遺伝コードの縮重により、様々な核酸配列が同じアミノ酸配列をコードしうる。Ms i 2タンパク質又はその変異体をコードする任意のポリヌクレオチドは、本明細書において「Ms i 2をコードするポリヌクレオチド」と呼ばれる。提供されるポリヌクレオチドは、自然起源の、人工の又は合成の核酸配列を含む。配列がDNA配列として示されるが、RNAが言及される場合、RNA分子の実際の塩基配列は、チミン(T)がウラシル(U)に置換されているという相違以外は同一であると理解される。

【0090】

本発明は、さらに、本明細書に教示される1つ又は複数の機能喪失型変異を含むMs i 2タンパク質をコードするポリヌクレオチドに関する。上記ポリヌクレオチドは、合成、組換え及び/又は単離されたポリヌクレオチドであってもよい。ある実施形態において、上記ポリヌクレオチドは、配列番号5、7若しくは8の核酸配列、又は配列番号5、7若しくは8の核酸配列に対して、好ましくは全長にわたって、少なくとも70%、好ましくは、80%、85%、90%、95%のような少なくとも75%、より好ましくは少なくとも97%、98%若しくは99%の配列同一性を有するその変異体を含む、内在性Ms i 2タンパク質をコードするポリヌクレオチド、例えば、Ms i 2遺伝子に由来し、これは、配列番号5、7又は8のアミノ酸配列を含むポリペプチドの内在性Ms i 2活性を共有する。対照的に、本明細書に教示される1つ又は複数の機能喪失型変異を含む、Ms i 2タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、内在性Ms i 2タンパク質のMs i 2活性の90、80、70、60、50、40、30、20、10%未満まで、内在性Ms i 2活性を低減又は除去する、1つ又は複数の変異を含む。本明細書に教示されるMs i 2タンパク質は、内在性Ms i 2タンパク質をコードするポリヌクレオチドの非存在下で植物中に存在する場合、上記植物が野生型植物と交配されるときに、いくつかの半数体後代又は異常な倍数性を有する後代の生成を可能とすることが好ましい。

【0091】

本明細書に教示される核酸分子は、半数体インデューサー系統を產生するために使用されうる。

【0092】

本発明の一実施形態において、上述の(1つ又は複数の機能喪失型変異を含むMs i 2タンパク質、又はその変異体若しくは断片を含む)Ms i 2タンパク質をコードする核酸配列は、宿主細胞中へのMs i 2タンパク質をコードするポリヌクレオチドの導入及び形質転換された細胞(複数可)に由来する細胞、組織、器官又は生物のような、宿主細胞に

10

20

30

40

50

おける *Msi2* タンパク質（複数可）の產生のためのキメラ遺伝子、及び / 又はベクターを作製するために使用される。植物細胞における本明細書に教示される *Msi2* タンパク質（又はそのタンパク質断片若しくは変異体）の產生のためのベクターは、本明細書において「発現ベクター」と呼ばれる。

【0093】

Msi2 タンパク質の発現のための好適な宿主細胞としては、原核生物、酵母又は高等真核細胞が挙げられる。細菌、真菌、酵母及び哺乳動物細胞宿主とともに使用するのに適したクローニング及び発現ベクターは、例えば、*Pouwels*ら、*Cloning vectors: A Laboratory Manual*、*Elsevier*、N.Y.、（1985年）に記載されている。本明細書に記載の核酸配列由来の RNA を使用して本発明のタンパク質を產生するために、無細胞翻訳システムも採用されうる。10

【0094】

好適な原核生物宿主細胞としては、グラム陰性及びグラム陽性生物、例えば、大腸菌 (*Escherichia coli*) 又は桿菌が挙げられる。別の好適な原核生物宿主細胞は、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*)、特にアグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) が挙げられる。

【0095】

本明細書に教示される *Msi2* タンパク質は、例えば、サッカロミセス属（例えば、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)）由来の酵母宿主細胞においても発現されうる。ピキア (*Pichia*) 又はクリベロミセス (*Kluyveromyces*) のような他の酵母属も採用されうる。20

【0096】

代替的には、本明細書に教示される *Msi2* タンパク質は、植物細胞、真菌細胞、昆虫細胞及び哺乳動物細胞、任意選択で非ヒト細胞を含む、高等真核生物宿主細胞において発現されてもよい。

【0097】

本発明の一実施形態は、本明細書に教示されるポリヌクレオチドを含むように改変された非ヒト生物である。非ヒト生物及び / 又は宿主細胞は、例えば、脂質及びウイルスベクターのような送達デバイスの使用、裸の DNA、エレクトロポレーション、化学的方法及び粒子媒介性遺伝子導入を含む、遺伝子導入のための本分野で公知の任意の方法により改変されてもよい。有利な実施形態において、非ヒト生物は植物である。30

【0098】

任意の植物細胞が好適な宿主細胞でありうる。本明細書中で使用される用語「植物細胞」は、プロトプラストを含む。好適な植物細胞としては、単子葉植物又は双子葉植物由来のものが挙げられる。例えば、植物は、（トマトを含む）ナス属、タバコ属、トウガラシ属、ペチュニア属及び他の属に属しうる。以下の宿主種：タバコ（タバコ種、例えば、*N. benthamiana*）、*N. plumbaginifolia*）、*N. tabacum* など）、例えば、チェリートマト、セラシフォルム (*cerasiforme*) 变種又はカラントトマト、ピンピネリフォリウム (*pimpinellifolium*) 变種又はツリートマト（タマリロ (*S. betaceum*)、キフォマンドラー・ベタケア (*Cyphomandra betacea*) の同義語）、ジャガイモ (*Solanum tuberosum*)、ナス（ソラヌム・メロンゲナ (*Solanum melongena*)）、ペピーノ（ソラヌム・ムリカツム (*Solanum muricatum*)）、ココナ（ソラヌム・シリフロラム (*Solanum sessiliflorum*)）及びナランジラ（ソラヌム・キトエンセ (*Solanum quitoense*)）、ペッパー（トウガラシ、キダチトウガラシ (*Capsicum frutescens*)、キイロトウガラシ (*Capsicum baccatum*)）のようなトマト (*L. esculentum*)、トマトの同義語）のような野菜種、観賞用種（例えば、ニチニチア4050

サガオ (*Petunia hybrida*)、ペチュニア・アキシラリス (*Petunia axillaries*)、*P. integrifolia*))、コーヒーノキ (コーヒーノキ (*Coffea*)) が好適に使用されうる。

【0099】

代替的には、植物は、ウリ科又はイネ科 (*Gramineae*) のような任意の他の科に属してもよい。好適な宿主植物としては、例えば、トウモロコシ / コーン (ゼア (*Zea*) 種)、コムギ (トリティクム (*Triticum*) 種)、オオムギ (例えば、ホルデウム・ウルガレ (*Hordeum vulgare*))、エンバク (例えば、アベナ・サティバ (*Avena sativa*))、モロコシ (タカキビ (*Sorghum bicolor*))、ライムギ (セカレ・ケレアレ (*Secale cereale*))、ダイズ (グリキーネ種 (*Glycine spp.*)、例えば、*G. Max* (*G. max*))、ワタ (ゴシピウム種 (*Gossypium species*)、例えば、*G. hirsutum* (*G. hirsutum*)、*G. barbadense*))、アブラナ種 (*Brassica spp.*) (例えば、セイヨウアブラナ (*B. napus*)、カラシナ (*B. juncea*)、芽キャベツ (*B. oleracea*)、カブ (*B. rapa*) など)、ヒマワリ (ヘリアンサス・アヌース (*Helianthus annus*))、紅花、ヤム、キャッサバ、アルファルファ (ムラサキウマゴヤシ (*Medicago sativa*))、コメ (オリザ種 (*Oryza species*)、例えば、*O. sativa indica cultivar-group*)、又はジャポニカ栽培品種群 (*japonica cultrivar-group*))、飼料草、パールミレット (ペニセツム種 (*Pennisetum spp.*)、例えば、トウジンビエ (*P. glaucum*))、樹木種 (松果体、ポプラ、モミ、プラシテンなど)、チャノキ、コーヒーノキ、油やし、ココナツ、エンドウ、ズッキーニ、マメ (例えば、インゲンマメ種 (*Phaseolus Species*))、キュウリ、アーティチョーク、アスパラガス、ブロッコリー、ニンニク、リーク、レタス、タマネギ、ラディッシュ、カブ、芽キャベツ、ニンジン、カリフラワー、チコリ、セロリ、ホウレンソウ、エンダイブ、フェンネル、ビーツ、生果実を含む植物 (ブドウ、モモ、プラム、イチゴ、マンゴー、リンゴ、プラム、サクランボ、アプリコット、バナナ、ブラックベリー、ブルーベリー、ミカン、キーウィ、イチジク、レモン、ライム、ネクタリン、ラズベリー、スイカ、オレンジ、グレープフルーツなど) のような野菜種、観賞用種 (例えば、バラ、ペチュニア、キク、ユリ、ガーベラ種)、ハーブ (ミント、パセリ、バジル、タイムなど)、木質性樹木 (woody tree) (例えば、ハコヤナギ、シダレヤナギ、コナラ、ユーカリ)、纖維種、例えば、麻 (アマ) 及び大麻 (*Cannabis sativa*))、又はシロイヌナズナのようなモデル生物が挙げられる。

【0100】

好ましい宿主細胞は、「作物植物」又は「栽培植物」、すなわち、ヒトにより栽培され、育種される植物種に由来する。作物植物は、食品若しくは飼料目的 (例えば、農作物) のため、又は鑑賞目的 (例えば、切り花、芝生のための草の生産など) のために栽培されうる。本明細書に定義される作物植物としては、燃料のための油、プラスチックポリマー、医薬品、コルク、(ワタのような) 纖維などのような、非食品製品がそこから収穫される植物も挙げられる。

【0101】

本明細書に教示される *Msi2* タンパク質をコードする核酸配列の宿主細胞のゲノムへの、好ましくは安定な、導入のためのキメラ遺伝子及びベクターの構築は、当分野で一般に公知である。キメラ遺伝子を生成するために、本明細書に教示される *Msi2* タンパク質をコードする核酸配列が、標準的な分子生物学の技術を使用して、宿主細胞における発現に好適なプロモーター配列に操作可能に連結される。*Msi2* タンパク質をコードする核酸配列が、プロモーター配列の下流のベクター中に単純に挿入されるように、プロモーター配列はすでにベクター中に存在してもよい。次いで、ベクターは、宿主細胞を形質転

10

20

30

40

50

換するために使用されることができ、キメラ遺伝子は、核ゲノム又はプラスチド、ミトコンドリア若しくは葉緑体ゲノム中に挿入されて、好適なプロモーターを使用して発現することができる（例えば、Mc Brideら、1995年、Bio/Technology、13巻、362ページ；米国特許第5,693,507号）。ある実施形態において、本明細書に教示されるキメラ遺伝子は、本明細書に教示されるMs i 2タンパク質をコードする核酸配列に操作可能に連結された、植物細胞又は微生物細胞（例えば、細菌）における発現のための好適なプロモーターであって、任意選択で3'非翻訳核酸配列がその後に続く、プロモーターを含む。細菌はその後、植物の形質転換に使用されてもよい（アグロバクテリウム媒介性の植物形質転換）。

【0102】

本発明は、1) 例えば、Ms i 2遺伝子をノックアウトすることによるMs i 2遺伝子の発現の阻止若しくは低減；2) Ms i 2遺伝子から転写されたmRNAの翻訳の阻止若しくは低減、或いは3) 非機能性Ms i 2タンパク質の発現のいずれかにより、機能性Ms i 2タンパク質の発現を欠く、植物、特に作物植物、より具体的には、ナス科に、より具体的には、ナス属に、なおより具体的には、トマト種に属する植物にも関する。

10

【0103】

1つ又は複数の機能喪失型変異を含むMs i 2ポリペプチドを発現する植物

本発明は、本明細書に教示される1つ又は複数の機能喪失型変異を含むMs i 2ポリペプチドを発現する植物、種子又は植物細胞を提供する。本発明は、本明細書に教示されるポリヌクレオチド、本明細書に教示されるキメラ遺伝子又は本明細書に教示されるベクターを含む植物、種子、又は植物細胞も提供する。植物、種子又は植物細胞は、好ましくはナス科に、より好ましくはナス属に、なおより好ましくはトマト種に属する。

20

【0104】

植物、種子又は植物細胞は、内在性Ms i 2タンパク質を発現しないか、又は低減されたレベル（例えば、野生型レベルの90、80、70、60、50、40、30、20、10%未満）で発現することが好ましい。例えば、内在性Ms i 2タンパク質の活性若しくは発現を低減させるか若しくは除去する変異を内在性Ms i 2タンパク質に作り出すことができ、又は内在性Ms i 2タンパク質のノックアウトを作り出すことができる。この場合、遺伝子のノックアウト又は変異についてヘテロ接合性の植物を作り出すことができ、本明細書に教示される1つ又は複数の機能喪失型変異を含むMs i 2タンパク質の植物中での発現のための発現ベクターを導入することができる。次いで、変異又はノックアウトについてホモ接合性であるが、1つ又は複数の機能喪失型変異を含むMs i 2タンパク質を含む、ヘテロ接合体由来の後代が選択されうる。

30

【0105】

したがって、本明細書に教示される植物、種子又は植物細胞において、上記植物又は植物細胞が顕著に又は本質的に完全に、内在性Ms i 2活性を欠くように、一方又は両方の内在性Ms i 2アレルがノックアウトされるか又は変異させられる。そのような植物は生存可能であることがわかった。二倍体を超える染色体の組を有する植物において、すべての内在性Ms i 2アレルは、不活性化され、変異させられ又はノックアウトされてもよい。代替的に、当分野で公知の任意の方法で、例えば、内在性Ms i 2タンパク質の発現を低減させ又は除去するsiRNA又はマイクロRNAを導入することにより、内在性Ms i 2タンパク質の発現が停止されてもよい。

40

【0106】

ある実施形態において、本発明は、本明細書に教示される核酸分子を含むトマト植物、種子又は植物細胞に関する。

40

【0107】

ある実施形態において、本発明は、本明細書に教示されるMs i 2タンパク質をコードする核酸分子を含むトマト植物、種子又は植物細胞に関する。

50

【0108】

ある実施形態において、上記トマト植物、種子又は植物細胞は、配列番号6のアミノ酸

50

配列を含むポリペプチドをコードする核酸分子を含む。

【0109】

ある実施形態において、上記トマト植物、種子又は植物細胞は、配列番号4又は9の核酸分子を含む。

【0110】

上記トマト植物、種子又は植物細胞は、半数体トマト植物を產生するため及び/又は倍加半数体トマト植物を產生するために使用されうる。

【0111】

ある実施形態において、上記トマト植物、種子又は植物細胞は、少なくとも胚発生の間は内在性Ms i 2タンパク質の発現を欠いている。

10

【0112】

植物の生成のための方法

(標的ヌクレオチド交換(TNE)又はオリゴ指向変異誘発(oligo-directed mutagenesis)(ODM)とも呼ばれる)標的変異誘発法を使用して、内在性Ms i 2遺伝子を修飾することは、本発明の一実施形態である。標的変異誘発法としては、制限なく、植物プロトプラストへの、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、Cas 9様、Cas 9/crRNA/tracrRNA若しくはCas 9/gRNA CRISPRシステムを採用するもの、又はMs i 2遺伝子に相補的な配列により変異誘発を促進するための、化学修飾されたヌクレオチドを含有する可能性のある変異誘発性のオリゴヌクレオチドを採用する標的変異誘発(例えば、Key Base(登録商標)又はTALEN)が挙げられる。

20

【0113】

代替的に、1つ又は複数の機能喪失型変異を含むMs i 2タンパク質をコードするMs i 2遺伝子を含む植物系統を生成するために、TILLING(どちらも参照により本明細書に組み込まれる、Targeting Induced Local Lesions IN Genomics; McCallumら、2000年、Nat Biotech.、18巻:455ページ及びMcCallumら、2000年、Plant Physiol.、123巻、439~442ページ)のような変異誘発システムが使用されてもよい。TILLINGは、伝統的な化学的変異誘発(例えば、EMS変異誘発)、その後に続く変異に関するハイスループットスクリーニングを使用する。よって、所望の変異を有するMs i 2遺伝子を含む植物、種子及び組織が得られうる。

30

【0114】

この方法は、植物種子に変異を起こさせるステップ(例えば、EMS変異誘発)、植物個体又はDNAをプールするステップ、目的の領域のPCR増幅ステップ、ヘテロ二本鎖の形成及びハイスループット検出ステップ、変異体植物の同定ステップ、変異体PCR産物のシーケンシングステップを含みうる。そのような変異植物を生成するために、他の変異誘発及び選択方法が同等に使用されうることは理解される。例えば、種子が照射されるか又は化学処理されてもよく、植物が変異表現型に関してスクリーニングされてもよい。

【0115】

変異植物は、非変異植物、すなわち、野生型植物から、DNA中に存在する変異(複数可)のような分子的方法により及び変異表現型の特徴により識別することができる。変異植物は、変異に関してホモ接合性又はヘテロ接合性でありうる。

40

【0116】

よって、本明細書に教示される植物を作製するための方法であって、

a) 植物細胞内の内在性Ms i 2タンパク質をコードする核酸分子を変更して、本明細書に教示される変異した、Ms i 2タンパク質をコードする核酸分子を得るか、又は植物細胞内の内在性Ms i 2タンパク質の発現を阻止するか、又は発現をノックアウトするために、植物細胞内の上記内在性Ms i 2タンパク質をコードする核酸分子を変更するステップと;

b) 変異した核酸分子を含む植物細胞、又は上記内在性Ms i 2タンパク質の発現が阻

50

止され若しくはノックアウトされている植物細胞を選択するステップと；

c) 任意選択で、上記植物細胞から植物を再生するステップと
を含む、方法が提供される。

【 0 1 1 7 】

本発明は、本明細書に教示される植物を作製するための方法であって、

a) 本明細書に教示される核酸分子、本明細書に教示されるキメラ遺伝子又は本明細書に教示されるベクターを使用して植物細胞を形質転換するか、又は内在性 M s i 2 タンパク質の発現を阻止し又は発現をノックアウトするために、核酸分子を使用して植物細胞を形質転換するステップと；

b) 任意選択で、内在性 M s i 2 タンパク質の発現を阻止し又は発現をノックアウトするため、追加的に、上記植物細胞において内在性 M s i 2 タンパク質をコードする核酸分子を改変するステップと；

c) 本明細書に教示される核酸分子、本明細書に教示されるキメラ遺伝子若しくは本明細書に教示されるベクターを含む植物細胞、又は上記内在性 M s i 2 タンパク質の発現が阻止されているか又はノックアウトされている植物細胞を選択するステップと；

d) 任意選択で、上記植物細胞から植物を再生するステップと
を含む、方法をさらに提供する。

【 0 1 1 8 】

本発明は、本明細書に教示される植物を作製するための方法であって、i) 本明細書に教示されるポリヌクレオチド、本明細書に教示されるキメラ遺伝子、又は本明細書に教示されるベクターを使用して、植物細胞を形質転換するステップと； ii) 上記ポリヌクレオチドを含む植物細胞を選択するステップと； iii) 任意選択で、上記植物細胞から植物を再生するステップとを含む、方法も提供する。

【 0 1 1 9 】

本明細書に教示される植物を作製するための方法は、上記植物細胞内の内在性植物 M s i 2 タンパク質をコードするポリヌクレオチドを修飾して、内在性 M s i 2 タンパク質の発現を防止するステップをさらに含んでもよい。

【 0 1 2 0 】

本明細書に教示される M s i 2 タンパク質をコードするポリヌクレオチド、好ましくは M s i 2 タンパク質をコードするキメラ遺伝子は、従来の方法で单一の植物細胞の核ゲノム中に安定に挿入することができ、そのようにして形質転換された植物細胞は、従来の方法において使用されて、ある特定の時点におけるある特定の細胞中の本明細書に教示される M s i 2 タンパク質の存在により、変更された表現型を有する形質転換された植物を生成することができる。これに関して、アグロバクテリウム・ツメファシエンス中の本明細書に教示される M s i 2 タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む T - D N A ベクターは、植物細胞を形質転換するために使用することができ、その後、例えば、欧州特許第 0 1 1 6 7 1 8 号、同第 0 2 7 0 8 2 2 号、国際公開第 8 4 / 0 2 9 1 3 号及び欧州特許出願公開第 0 2 4 2 2 4 6 号に、並びに G o u l d ら、(1 9 9 1 年、 P l a n t

Physiol. 、 9 5 卷、 4 2 6 ~ 4 3 4 ページ) に記載の手順を使用して、形質転換された植物が再生されうる。アグロバクテリウム媒介性の植物形質転換のための T - D N A ベクターの構築は、当分野で周知である。 T - D N A ベクターは、欧州特許第 0 1 2 0 5 6 1 号及び同第 0 1 2 0 5 1 5 号に記載のバイナリーベクター又は欧州特許第 0 1 1 6 7 1 8 号に記載の相同組換えによりアグロバクテリウム T i プラスミド中に組み入れることのできる共挿入ベクターのいずれかであってもよい。

【 0 1 2 1 】

同様に、形質転換された植物細胞からの形質転換された植物の選択及び再生は、当分野で周知である。明らかに、異なる種ごとに、さらには单一の種の様々な亜種又は栽培品種ごとに、高頻度で形質転換体が再生されるように具体的にプロトコールを適合させる。

【 0 1 2 2 】

結果として生じる形質転換された植物は、その後倍加半数体となりうる半数体植物を産

10

20

30

40

50

生するために、従来の植物育種スキームにおいて使用されうる。

【0123】

半数体植物及び／又は倍加半数体植物の生成のための方法

本発明は、半数体植物、異常な倍数性を有する植物又は倍加半数体植物を生成する方法であって、

a) 内在性 Msi2 タンパク質を発現する植物を、本明細書に教示される改変植物に交配するステップであって、本明細書に教示される改変植物は、少なくとも胚発生の間は、内在性 Msi2 タンパク質の発現を欠く、ステップと；

b) 種子を収集するステップと；

c) 上記種子から、少なくとも 1 つの実生、小植物又は植物を生育させるステップと；

d) 半数体実生、小植物若しくは植物、異常な倍数性を有する実生、小植物若しくは植物；又は倍加半数体実生、小植物若しくは植物を選択するステップと；
を含む、方法にも関する。

【0124】

内在性 Msi2 タンパク質を発現する上記植物は、F1 植物であってもよい。

【0125】

内在性 Msi2 タンパク質を発現する植物は、交配の花粉親であってもよく、又は交配の胚珠親であってもよい。

【0126】

内在性 Msi2 タンパク質の発現を欠く、本明細書に教示される改変植物を、野生型植物に交配することは、半数体であって、内在性 Msi2 タンパク質を発現する植物由来の染色体のみを含む、少なくともいくつかの後代をもたらす。よって、本発明は、目的の植物と機能性 Msi2 タンパク質の発現を欠く植物を交配し、生じた半数体種子を採取することによって、そのすべてが目的の植物に由来する染色体を有する半数体植物の生成を可能とする。

【0127】

よって、親の遺伝子型に依存しない正確な分子変化により、ゲノム排除が操作されうる。Msi2 タンパク質はいかなる植物種にも見出される。これは、半数体細胞の組織培養及び遠縁交雑のような半数体植物產生のための従来の方法が成功しない種において半数体植物を作製することを可能とする。

【0128】

本明細書に教示される機能性 Msi2 タンパク質の発現を欠く植物は、雄親又は雌親のいずれかとして交配されてもよい。本明細書に教示される方法は、親染色体の母系細胞質への導入を可能にする。よって、単一のステップにおいて、所望の遺伝子型を有する細胞質雄性不稔系統を生成することができる。

【0129】

本発明は、倍加半数体植物を生成する方法であって、

a) 内在性 Msi2 タンパク質を発現する植物を、本明細書に教示される改変植物に交配するステップであって、本明細書に教示される改変植物は、少なくとも胚発生の間は、内在性 Msi2 タンパク質の発現を欠く、ステップと；

b) 半数体植物を選択するステップと；

c) 上記半数体植物を倍加半数体植物に転換するステップと
を含む方法に関する。

【0130】

よって、半数体植物は、ひとたび生成されると、染色体の正確な二本鎖コピーを含む倍加半数体植物の生成に使用することができる。半数体生物から倍加半数体生物を生成するために多種多様な方法が公知である。半数体植物を倍加半数体植物に転換するために、例えば、コルヒチンのような化学物質が適用されてもよい。代替的には、倍数体は、胚発生の間又は植物の後期発生段階において自発的に倍加しうる。

【0131】

10

20

30

40

50

F 1、F 2 又は所望の形質を有する次世代の植物を生成するために、倍加半数体植物は他の植物にさらに交配されうる。

【0132】

トランスジェニック又は変異誘発された遺伝子を保有しない倍加半数体植物が得られる。加えて、倍加半数体植物は、ハイブリッドF 1から速やかにホモ接合性のF 2を創出することができる。

【0133】

本発明は、半数体又は倍加半数体植物を生成する方法であって、内在性M s i 2タンパク質を発現する植物及び本明細書に教示される植物を同定するステップであって、本明細書に教示される植物は、少なくともその生殖部分において及び／又は胚発生の間は内在性M s i 2タンパク質の発現を欠く、ステップを含む、方法にも関する。

10

【0134】

ある実施形態において、交配することは、植物の全ゲノムを有性交配することを含まない。その代わりに、1組の染色体が排除される。

【0135】

配列表

配列番号1：植物M s i 2コンセンサスタンパク質配列

配列番号2：ナス属コンセンサスM s i 2タンパク質配列

配列番号3：トマトM s i 2タンパク質配列

配列番号4：トマトM s i 2_K 1 2 6 *コード配列

20

配列番号5：トマトM s i 2コード配列

配列番号6：トマトM s i 2_K 1 2 6 *切断型タンパク質配列

配列番号7：ナス属コンセンサスM s i 2コード配列

配列番号8：トマトM s i 2ゲノムDNA配列

配列番号9：トマトM s i 2_K 1 2 6 *ゲノムDNA配列

配列番号10：ナス科コンセンサスM s i 2タンパク質配列

【実施例】

【0136】

実施例1：トマトにおける片親ゲノム排除

30

材料及び方法

植物材料

3種のトマト栽培品種、すなわち、「MoneymbergTMV+」、「Microtom」及び「RZ52201」を使用した。国際公開第WO2007/037678号及び同第WO2009/041810号に記載の方法に従って、トマトRZ52201変異体集団から、遺伝子M s i 2における2種の体細胞非同義変異体、すなわち、どちらもアミノ酸126位において変異しているM s i 2_K 1 2 6 - STOP及びM s i 2_K 1 2 6 Mを選択した。選択した変異体植物を自家授粉させ、子孫において、変異遺伝子座についてホモ接合性であった植物を選択した。国際公開第WO2007/037678号及び同第WO2009/041810号に記載の方法に従って、トマトMoneymbergTMV+変異体集団から、遺伝子M s i 2における体細胞同義変異体、すなわち、アミノ酸337位において変異した(CからT)M s i 2_D 3 3 7 Dを選択した。選択した変異体を自家授粉させ、子孫において、変異遺伝子座についてホモ接合性であった植物を選択した。

40

【0137】

方法

片親ゲノムの排除及び結果として生じる半数体植物の產生を、いわゆる半数体インデューサー系統と別の非半数体インデューサー系統、例えば、育種系統の間の交配を行うことによって誘発した。高い温度が、一部の場合のみではあるが、片親ゲノムの排除を起こすのに好ましい効果を及ぼすことがわかっている(Saneiら、PNAS 108.33(2011年)；E498～E505)ため、片親ゲノムの排除のためのトマト系統の交

50

配を、比較的高温（26～28）で実施した。

【0138】

結果

Msi2_K126-STOP変異体におけるAからTへの非同義変異は、未成熟の終止コドンの導入及びそれにより切断型タンパク質（配列番号6）の产生をもたらした。Msi2_K126M変異体におけるAからTへの非同義変異は、リシンからメチオニンへのアミノ酸修飾をもたらした。さらに、Msi2タンパク質についてSIFT解析を実施し、この解析により、126位におけるリシンからメチオニンへの変異をニュートラルと等級付けした（Kumaraら、Nat Protoc.、2009年；4巻（7号）：1073～81ページ）。Msi2_D337D変異体におけるCからTへの同義変異は、アミノ酸修飾をもたらさなかった。変異していない野生型MicroTom植物を雌株又は花粉ドナーとしてそれぞれ使用する、比較的高温（26～28）での交配において、Msi2_K126-STOP、Msi2_K126M又はMsi2_D337Dについてホモ接合性の3種の変異体植物それぞれを、花粉ドナーとして及び雌株として使用した。表1は、行ったすべての交配及びMicroTom表現型について評価した蒔いた種子の概要を列挙する。

10

20

30

40

【0139】

【表1】

表1. 作製された交配: 使用される親の遺伝的バックグラウンド、試験された子孫植物の数及びMicroTom矮性表現型を示した子孫植物の数のリスト

雌株として使用される植物	雄株として使用される植物	バックグラウンド変異体親	試験された植物の数	MicroTom表現型を有する植物の数	年
Msi2_K126-STOP	MicroTom	RZ52201	98	3	2014
MicroTom	Msi2_K126-STOP	RZ52201	89	2	2014
Msi2_K126-STOP	MicroTom	RZ52201	564	4	2015
MicroTom	Msi2_K126-STOP	RZ52201	325	1	2015
Msi2_K126M	MicroTom	RZ52201	19	0	2014
MicroTom	Msi2_K126M	RZ52201	205	0	2014
Msi2_D337D	MicroTom	MoneyBergTMV+	160	0	2014
MicroTom	Msi2_D337D	MoneyBergTMV+	36	0	2014
RZ52201	MicroTom	-	188	0	2015
MicroTom	RZ52201	-	188	0	2015

【0140】

表1に列挙した交配に由来する種子を蒔き、フローサイトメトリーによってそのDNA含有量について植物を評価した。フローサイトメトリー分析は、試験したすべての植物について、MoneyBergTMV+のような野生型トマト栽培品種と同様の正常な二倍体の倍数性レベルのみの決定をもたらした。栽培品種MicroTomは、劣性であることが公知の矮性表現型を有する（Marliiら、J Expt Bot.、57巻、9号、2037～2047ページ、2006年）。MicroTomの、例えば、MoneyBergTMV+又はRZ52201野生型栽培品種への又はそれとの交配後、それぞれMo

50

ney Berg TMV + 又は RZ52201 野生型栽培品種の不確定な非矮性表現型を有する子孫のみを認めた。Ms i 2 - D 3 3 7 D 同義変異体と MicroTom の交配について同じことが認められ；MicroTom と Ms i 2 - D 3 3 7 D 変異体の交配のすべての子孫は、Money Berg TMV + 親の不確定な非矮性表現型を示した。MicroTom 及び Ms i 2 - K 1 2 6 M 変異体の相反交配は、MicroTom 表現型を有する子孫を生じさせなかった。雄親又は雌親として Ms i 2 - K 1 2 6 - STOP を使用して、全部で 10 個の植物が、MicroTom 表現型を示したことがわかった。これは、RZ52201 親の遺伝物質が、生じた子孫の一部でないことを示しており、これらの 10 個の子孫植物が、半数体 MicroTom 起源であることを示している。後者の 10 個の植物のすべての植物の倍数性は、二倍体であることがわかり、トマトにとっては例外的に高い出現頻度を有すると記載されている現象である自発的な倍加が起こったことを示していた (Report of the Tomato Genetics, 62 号 - 2012 年 12 月)。

【0141】

片親ゲノムの排除が起こったか否か、及びどの程度であったかを決定するために、2014 年の子孫について、12 個のトマト染色体のそれぞれにわたって広がる、全 44 の位置について一塩基多型 (SNP) アッセイを行った (1, 2, 3, 4, 5, 6, 11 及び 12 番染色体上の 4 つの SNP; 8 及び 10 番染色体上の 3 つの SNP; 9 番染色体上の 2 つの SNP)。2015 年の子孫について同じ分析を、ここでは、22 の位置 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 及び 12 番染色体上の 2 つの SNP; 9 及び 11 番染色体上の 1 つの SNP) について実施した。5 つの選択した一塩基多型は、MicroTom 親に関して一塩基対についてホモ接合性であり、RZ52201 親における MicroTom 塩基対以外はすべてについてホモ接合性であった。野生型 MicroTom 栽培品種と RZ52201 栽培品種の間の通常の交配は、ヘテロ接合性の一塩基多型スコアをもたらした。しかしながら、片親ゲノム排除のプロセスが起こった場合、半数体インデューサー系統ゲノムの損失が予想される。一塩基多型試験は、MicroTom 表現型も示す 5 個の子孫植物のそれぞれについて MicroTom 親由来のホモ接合性塩基対スコアのみのコールをもたらし、RZ52201 親のいずれもコールしなかった。一塩基多型スコアに基づいて、Ms i 2 - K 1 2 6 - STOP 変異体の完全なゲノムはもはや子孫に存在しないと結論付けた。したがって、Ms i 2 - K 1 2 6 - STOP 変異体は、高効率の半数体インデューサー系統として機能すると結論付けられる。Ms i 2 - K 1 2 6 - STOP 変異体が雌親として使用される交配においては、MicroTom の自殖は無視できる。MicroTom を雌親として使用する実験においては、MicroTom 表現型を示す子孫の数が非常に少なく (89 のうちわずか 2 つの種子、325 のうち 1 つの種子)、ホモ接合性の塩基対のみが得点したことを考えると、自殖が起こった可能性は極めて低い。

【0142】

Ms i 2 - K 1 2 6 - s t o p 変異体及び RZ52201 対照植物の花粉四分染色体を異常の発生についてチェックした。4 つの異なる花房から少なくとも 2 つの花を採取し、花粉四分染色体を検査するために、薬を押しつぶした。Ms i 2 - K 1 2 6 - s t o p 変異体については、5 個の個別の花からの全部で 10 個の観察した薬において、微小核を観察した (図 1 を参照されたい)。観察した各薬において数例の微小核を認めたが、ある薬中の花粉四分染色体の 1 % 以下は異常性を示した。RZ52201 対照については、微小核とともに花粉四分染色体を含有する薬はめったに観察されなかった。2 つの薬が、その中に全部でわずか 2 又は 3 例の微小核を観察できたことがわかった。第 2 ラウンドの実験において、微小核を計数した；Ms i 2 - K 1 2 6 - s t o p 変異体については、1.94 % (n = 1) の頻度で微小核を観察した。RZ52201 対照植物の花については、0.58 ± 0.36 % (n = 5) の平均頻度で微小核を観察した。Ms i 2 - K 1 2 6 - s t o p 変異の結果、対照と比較してかなり高い頻度で減数分裂の間の染色体の分離が妨げられると結論する。異常な有糸分裂、例えば、微小核の所見は、作物における種間交配、

10

20

30

40

50

種内交配における染色体排除及び半数体産生の直接証拠として使用されることが多い。例えば、異常な有糸分裂並びに異常な減数分裂、例えば、微小核を、トウモロコシDH-インデューサー系統の研究において発見した(Qu, Fazhanら、Current Plant Biology、1巻(2014年):83~90ページ)。Ms i 2_K126-stop変異体における減数分裂時の微小核の所見は、有糸分裂の間に同様のプロセスが起こることを示唆している。野生型とMs i 2_K126-stop接合体の融合後、最初の有糸分裂の間に片親ゲノムの排除のプロセスが起り、これが観察した半数体の誘導をもたらした可能性がある。

【0143】

実施例2：アラビドプシスにおける片親ゲノム排除

10

材料及び方法

植物材料

以下のArabidopsis NASC stock centre系統：Colombia(バックグラウンド系統、Col-0、N1092)、Col-5(N1644)、アラビドプシスMs i 2遺伝子(At2g16780)T-DNA挿入系統(N720344及びN501214、Col-0バックグラウンド中)及びMs i 2及びMs i 3遺伝子が機能的に重複した遺伝子であるか否かが不明であるため、アラビドプシスMs i 3遺伝子(At4g35050)T-DNA挿入変異体(N309860、N309863及びN564092、Col-0バックグラウンド中)を使用した。アラビドプシスMs i 2及びMs i 3遺伝子における正確な挿入を決定するために、PCR增幅及びそれに続く推定上のT-DNA挿入遺伝子座のシーケンシングによって、T-DNA挿入系統を評価した。Ms i 2又はMs i 3遺伝子のいずれかのエクソンに挿入物が位置したという知見に基づいて、これらのT-DNA挿入系統が、Ms i 2又はMs i 3遺伝子のいずれかのための真のノックアウトであると結論付けた。開始コドンから下流側の塩基の数で計数した正確な位置は、N720344(429位、エクソン2)、N501214(111位、エクソン1)、N309863/N309860(どちらも559位、エクソン2)及びN564092(1237位、エクソン6)であった。2つの挿入系統の間で交配を行い、Ms i 2及びMs i 3遺伝子の両方におけるホモ接合性のT-DNA挿入物について選択することによって、2種の新規な二重T-DNA挿入系統：N720344+N309860及びN309863+N501214を產生した。

20

30

【0144】

方法

いわゆる半数体インデューサー系統と別の非半数体インデューサー系統、例えば、Colombiaバックグラウンド(Col-0)対照系統との間の交配を行うことによって、片親ゲノム排除及び結果として生じる半数体植物の產生を引き起す。

【0145】

結果

Ms i 2のための単一T-DNA挿入系統(N720344及びN501214)、Ms i 3 T-DNA挿入系統(N309863及びN564092)、2つの新たに生成したMs i 2/Ms i 3二重T-DNA挿入系統(N720344+N309860及びN309863+N501214)のいずれか又はCol-0バックグラウンド植物を、それぞれ花粉ドナーとして及び雌株として、Col-5を雌株又は花粉ドナーとして使用する交配において使用する。表2は、行うことができる典型的な交配の例及びCol-5表現型についての子孫の評価の例を列挙する。Col-5は、T-DNA挿入系統及びCol-0、すなわち、毛状突起のない葉に比較して、明確な異なる劣性表現型を有する。

40

【0146】

【表2】

表2. すべての挿入系統の遺伝的バックグラウンドが Col-0 の作製可能な交配及び試験される子孫植物の数のリスト

雌株として使用される植物	雄株として使用される植物	試験された植物の数
Msi2 (N720344)	Col-5	300
Col-5	Msi2 (N720344)	300
Msi2 (N501214)	Col-5	300
Col-5	Msi2 (N501214)	300
Msi3 (N309863)	Col-5	300
Col-5	Msi3 (N309863)	300
Msi3 (N564092)	Col-5	300
Col-5	Msi3 (N564092)	300
Msi2/Msi3 (N720344+N309860)	Col-5	300
Col-5	Msi2/Msi3 (N720344+N309860)	300
Msi2/Msi3 (N309863+N501214)	Col-5	300
Col-5	Msi2/Msi3 (N309863+N501214)	300
Col-0	Col-5	300
Col-5	Col-0	300

10

20

30

40

【0147】

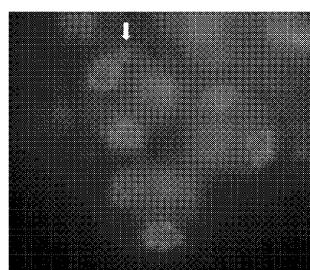
Col-5 系統は、毛状突起のない表現型を与える $g11-1/g11-1$ 遺伝子座を有し、これは劣性であることが公知である (Kuppula, PLoS Genet, 11.9, 2015年, e1005494)。Col-5 の例えは Col-0 野生型栽培品種への又はこれとの交配後、優性な Col-0 アレル由来の毛状突起を有する子孫のみを認めた。雄親又は雌親としての Msi2 単一、Msi3 単一又は Msi2/Msi3 二重 T-DNA 挿入系統を使用して、全部で数種の植物が、毛状突起のない表現型を示すことがわかった。これは、Col-0 親の遺伝物質が、生じた子孫の一部でないことを示しており、これらの子孫植物が、半数体 Col-5 起源であることを示している。

【0148】

実施した交配の子孫の中で Col-5 単一の表現型を有する個体に基づいて、Col-0 バックグラウンドにおいて各 T-DNA 挿入系統の完全なゲノムはもはや子孫に存在しないことが結論付けられる。したがって、T-DNA 挿入系統「N720344、N501214、N309863、N564092、N720344+N309860 (二重挿入系統) 及び N309863+N501244 (二重挿入系統)」は、高効率の (倍加) 半数体インデューサー系統として機能することが結論付けられる。

【図1】

Fig. 1



【配列表】

2018530323000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/NL2016/050683						
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N15/82 A01H1/08 C07K14/415 ADD.								
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) C12N A01H C07K								
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched								
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data								
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category*</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;"> DATABASE UniProt [Online] 28 November 2012 (2012-11-28), "SubName: Full=Uncharacterized protein {ECO:0000313 EnsemblPlants:SolyC01g111590. 2.1};", XP002757846, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:K4B421 Database accession no. K4B421 sequence fully comprises present SEQ ID NO:6; abstract; sequence ----- -/-/ </td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">9,10,12, 16,17</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	DATABASE UniProt [Online] 28 November 2012 (2012-11-28), "SubName: Full=Uncharacterized protein {ECO:0000313 EnsemblPlants:SolyC01g111590. 2.1};", XP002757846, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:K4B421 Database accession no. K4B421 sequence fully comprises present SEQ ID NO:6; abstract; sequence ----- -/-/	9,10,12, 16,17
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.						
X	DATABASE UniProt [Online] 28 November 2012 (2012-11-28), "SubName: Full=Uncharacterized protein {ECO:0000313 EnsemblPlants:SolyC01g111590. 2.1};", XP002757846, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:K4B421 Database accession no. K4B421 sequence fully comprises present SEQ ID NO:6; abstract; sequence ----- -/-/	9,10,12, 16,17						
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" 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								
Date of the actual completion of the international search 4 January 2017		Date of mailing of the international search report 13/01/2017						
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Kania, Thomas						

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/NL2016/050683

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MARUTHACHALAM RAVI & SIMON W L CHAN: "Haploid plants produced by centromere-mediated genome elimination", NATURE, NATURE PUBLISHING GROUP, UNITED KINGDOM, vol. 464, no. 7288, 25 March 2010 (2010-03-25), pages 615-620, XP002677783, ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/NATURE08842 -----	1-47
A	MARUTHACHALAM RAVI ET AL: "A haploid genetics toolbox for <i>Arabidopsis thaliana</i> ", NATURE COMMUNICATIONS, vol. 5, 31 October 2014 (2014-10-31), page 5334, XP055191112, DOI: 10.1038/ncomms6334 -----	1-47
A	WO 2011/044132 A1 (UNIV CALIFORNIA [US]; CHAN SIMON [US]; MARUTHACHALAM RAVI [US]) 14 April 2011 (2011-04-14) -----	1-47
A	WO 2014/110274 A2 (UNIV CALIFORNIA CORP [US]; MAHESWARI ARUNDHATI [US]; SPILLER MARK [US]) 17 July 2014 (2014-07-17) -----	1-47
A	WO 2008/097791 A2 (PIONEER HI BRED INT [US]; DU PONT [US]; WILLIAMS MARK E [US]; GORDON-K) 14 August 2008 (2008-08-14) -----	1-47
1		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/NL2016/050683

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 2011044132	A1	14-04-2011	AU 2010303635 A1 CA 2774941 A1 EP 2486135 A1 RU 2012118381 A US 2011083202 A1 US 2014090099 A1 US 2016057953 A1 WO 2011044132 A1		19-04-2012 14-04-2011 15-08-2012 20-11-2013 07-04-2011 27-03-2014 03-03-2016 14-04-2011
WO 2014110274	A2	17-07-2014	NONE		
WO 2008097791	A2	14-08-2008	AR 065103 A1 AU 2008214051 A1 BR P10806864 A2 CN 101652481 A US 2008189801 A1 US 2012023612 A1 US 2012311736 A1 WO 2008097791 A2		13-05-2009 14-08-2008 29-04-2014 17-02-2010 07-08-2008 26-01-2012 06-12-2012 14-08-2008

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 01 H 5/10 (2018.01)	A 01 H 5/10	
A 01 H 1/02 (2006.01)	A 01 H 1/02	Z
C 12 N 5/10 (2006.01)	C 12 N 5/10	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, T, J, TM), EP(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, R, O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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, JP, KE, KG, 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

(72) 発明者 オプ デン キャンプ, リク ヒューベルトウス マルティニユス
オランダ, 6700 アーエー ワーゲニンゲン, ケアオブ ピー. オー. ボックス 216

(72) 発明者 ファン ダイク, ピーター ヨハネス
オランダ, 6700 アーエー ワーゲニンゲン, ケアオブ ピー. オー. ボックス 216

(72) 発明者 ギャラード, アンソニー
オランダ, 6700 アーエー ワーゲニンゲン, ケアオブ ピー. オー. ボックス 216

F ターム(参考) 2B030 AA02 AB03 AD20 CA17 CA24 CB02 CG05 HA05
4B065 AA88X AA88Y AB01 BA02 CA53
4H045 AA30 BA10 BA41 CA30 EA05 FA74