

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7273033号

(P7273033)

(45)発行日 令和5年5月12日(2023.5.12)

(24)登録日 令和5年5月1日(2023.5.1)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 1 1 0

A 0 1 H 1/00 (2006.01)

A 0 1 H 1/00 A Z N A

A 0 1 H 5/08 (2018.01)

A 0 1 H 5/08

A 0 1 H 6/00 (2018.01)

A 0 1 H 6/00

C 1 2 N 15/53 (2006.01)

C 1 2 N 15/53

請求項の数 17 (全71頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2020-516971(P2020-516971)

(86)(22)出願日 平成30年5月31日(2018.5.31)

(65)公表番号 特表2020-521512(P2020-521512
A)

(43)公表日 令和2年7月27日(2020.7.27)

(86)国際出願番号 PCT/IB2018/053903

(87)国際公開番号 WO2018/220581

(87)国際公開日 平成30年12月6日(2018.12.6)

審査請求日 令和3年5月21日(2021.5.21)

(31)優先権主張番号 1708662.0

(32)優先日 平成29年5月31日(2017.5.31)

(33)優先権主張国・地域又は機関
英国(GB)

前置審査

(73)特許権者 519428096

トロピック バイオサイエンス ユー
ケー リミテッドイギリス国 ノーウィッチ エヌアール4
7 ジー・ジェイ コルニー コルニー レーン
ノーウィッチ リサーチ パーク イノベ
ーション センター

(74)代理人 100136629

弁理士 鎌田 光宜

(74)代理人 100080791

弁理士 高島 一

(74)代理人 100125070

弁理士 土井 京子

(74)代理人 100121212

弁理士 田村 弥栄子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 バナナの貯蔵寿命を延長するための組成物及び方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

バナナの貯蔵寿命の延長方法であって、

(a) バナナ植物細胞を、バナナのエチレン生合成経路における成分をコードする核酸配列に向けられたDNA編集剤に供し、核酸配列の中に機能喪失型変異を生じる工程と、

(b) 前記植物細胞から植物を再生する工程と

を備え、

前記成分が、Ma09__g19150(配列番号13)、Ma04__g35640(配列番号9)、Ma04__g31490(配列番号8)、Ma01__g11540(配列番号20)及びMa07__g19730(配列番号27)からなる群から選択され、

Ma09__g19150(配列番号13)、Ma04__g35640(配列番号9)、及び/又は、Ma04__g31490(配列番号8)については、前記DNA編集剤は前記核酸配列のエクソン1とエクソン3との間を標的とし、Ma01__g11540(配列番号20)及び/又はMa07__g19730(配列番号27)については、前記DNA編集剤は前記核酸配列のエクソン1とエクソン4との間を標的とする方法。

【請求項2】

前記植物から果実を収穫する工程をさらに備える請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記植物が、前記DNA編集剤をコードする導入遺伝子を欠く請求項1又は2に記載の方法。

10

20

【請求項 4】

前記変異がホモ接合型である請求項 1 から請求項 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記変異が、欠失、挿入、挿入／欠失（インデル）及び置換からなる群から選択される請求項 1 から請求項 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記 DNA 編集剤が、メガヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）及び CRISPR - Cas からなる群から選択される DNA 編集システムのものである請求項 1 から請求項 5 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 7】

前記 DNA 編集剤が CRISPR - Cas を含む DNA 編集システムのものである請求項 1 から請求項 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記 DNA 編集剤が、配列番号 47 ～ 配列番号 54 からなる群から選択される核酸配列に少なくとも 99% 同一の核酸配列を含む請求項 1 から請求項 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記 DNA 編集剤が、配列番号 47 に示される核酸配列に少なくとも 99% 同一の核酸配列を含む請求項 1 から請求項 7 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 10】

前記 DNA 編集剤が配列番号 47 に示される核酸を含む請求項 1 から請求項 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記 DNA 編集剤が、配列番号 47 ～ 配列番号 54 に示される複数の核酸配列を含む請求項 1 から請求項 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

前記 DNA 編集剤が、配列番号 47、配列番号 49 又は配列番号 50 に示される複数の核酸配列を含む請求項 1 から請求項 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

前記 DNA 編集剤が、配列番号 51 及び配列番号 53 に示される複数の核酸配列を含む請求項 1 から請求項 7 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 14】

バナナのエチレン生合成経路における成分をコードする核酸配列の中に機能喪失型変異を含むゲノムを含むバナナ植物であって、前記成分が、Ma09__g19150（配列番号 13）、Ma04__g35640（配列番号 9）、Ma04__g31490（配列番号 8）、Ma01__g11540（配列番号 20）及び Ma07__g19730（配列番号 27）からなる群から選択され、

Ma09__g19150（配列番号 13）、Ma04__g35640（配列番号 9）、及び／又は、Ma04__g31490（配列番号 8）については、前記機能喪失型変異は前記核酸配列のエクソン 1 とエクソン 3 との間に存在し、Ma01__g11540（配列番号 20）及び／又は Ma07__g19730（配列番号 27）については、前記機能喪失型変異は前記核酸配列のエクソン 1 とエクソン 4 との間に存在するバナナ植物。

40

【請求項 15】

前記 DNA 編集剤をコードする導入遺伝子を欠く、請求項 14 に記載のバナナ植物。

【請求項 16】

前記変異がホモ接合型である、請求項 14 又は 15 に記載のバナナ植物。

【請求項 17】

前記変異が、欠失、挿入、挿入／欠失（インデル）及び置換からなる群から選択される、請求項 14 から請求項 16 のいずれか一項に記載のバナナ植物。

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、そのいくつかの実施形態では、バナナの貯蔵寿命を延長するための組成物及び方法に関する。

【背景技術】

【0002】

栽培されるバナナ及びプランテンは、バショウ属に属する巨大な草本植物である。それらは不稔性かつ単為結実性であり、そのため、果実は種なしで発生する。栽培されている雑種及び種は、ほとんど三倍体であり ($2n = 3x = 33$; いくつかは二倍体又は四倍体である)、ほとんどは、野生で見つけられた変異体から繁殖されてきた。

10

【0003】

バナナは、世界の食用作物のトップ10のうちの1つである。バナナは、栽培品種によって、生でも食べられるし、調理して食べられもする。バナナの約60%はデザート果実として生で食され、他の40%は蒸熟、煮込み、焙煎、及び揚げ等のプロセスによって調理される。1.2億トン超のバナナ果実が毎年生産され、3大産地であるインド、ウガンダ及び中国は、自国で生産するもののほとんどすべてを自国で消費している。

【0004】

バナナはクリマクテリック型果実に属し、収穫後に、青いバナナは、果肉が柔らかくなり、甘味が増し、及び芳香物質が生成され、次いで、その食餌としての価値が高まりうるまで、内生エチレンの生成、デンプン及びプロトペクチン等の加水分解を含むその追熟プロセスを通してクリマクテリック型変化を受ける必要がある。

20

【0005】

従来は、バナナは前もって収穫され、その輸送及び貯蔵の期間は追熟の進行により延長されていた。しかしながら、バナナ果実は、輸送過程の間のエチレンの生成に起因して追熟を受けることが多い可能性がある。さらには、果実は熟し過ぎて腐る可能性があり、このマーカーの価値を著しく低下させる。従って、エチレンの生合成の制御は、バナナの追熟を制御する方法を提供するために使用することができる。

【0006】

エチレンは、気体として存在する植物ホルモンであり、植物におけるいくつかの生理的反応及び生化学反応に影響を及ぼすことができる。エチレンは、植物の成長、発生及びストレス応答に重要な役割を果たし、例えば、植物が洪水、機械的損傷、細菌感染、葉及び花の老化、果実追熟等に曝されたとき、植物はエチレンを生成する。エチレンの生合成経路は、S-アデノシル-メチオニン (AdoMet) シンターゼによるメチオニンのAdoMetへの変換、1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸 (ACC) シンターゼ (ACS) によるAdoMetからのACCの合成、次いでACCオキシダーゼ (ACO) によるACCのエチレンへの酸化を含む (図1を参照。Rudusら、2013、第35巻、第2号、295-307頁から改変)。ACOはエチレンの生合成経路で使用される最後の酵素であるということが知られており、その結果として、ACO遺伝子又はそのタンパク質発現に対する阻害は、エチレンの生合成を阻害/ノックダウンすることができ、さらには果実の後熟を遅延させるという目的を成し遂げることができる。

30

40

【0007】

ほとんどの他の主要食用作物とは異なり、バナナは遺伝的に改良することが難しい。課題は、ほとんどすべてのバナナ栽培品種及び在来種は三倍体であり、高レベルの雄性不妊及び雌性不妊を伴うということである。いくつかの国際的な協定による育種プログラムがあり、これらのうちの多くは新しい栽培品種を開発している。しかしながら、バナナを戻し交配することは事実上不可能であり、従って新しい形質を現在の栽培品種に遺伝子移入する可能性は排除される。

【0008】

従って、食物生産に対する世界的な需要を高めるという課題を満足させるために、農業

50

生産性の向上（例えば収量の増大又は遺伝子操作による害虫耐性）に向けた典型的なアプローチは、変異育種、又は形質転換による作物種のゲノムへの新規な遺伝子の導入に頼ってきた。これらのプロセスは、本質的に非特異的であり、相対的に非効率的である。例えば、植物形質転換方法は、外来性DNAを送達するが、このDNAはランダムな位置でゲノムに組み込まれる。従って、望ましい特質を持つ遺伝子導入植物系統を特定して単離するために、1つの構築物あたり数百ものユニークなランダム組み込みイベントを生成すること、及びその後の所望の個体についてのスクリーニングが必要である。結果として、従来の植物形質操作は、労力を要し、時間がかかり、そして予測できない仕事である。さらには、これらの組み込みのランダム性のため、意図されないゲノムの破壊に起因する多面的効果が起こったか否かを予測することが困難になる。

10

【0009】

現在の形質転換プロセスのランダム性は、導入遺伝子イベント候補の特定及び選択のための数百ものイベントを必要とする（機能的ゲノム研究から特定された遺伝子候補よりも形質転換及びイベントスクリーニングが律速になる）。加えて、ゲノム内の組み込みの場所によっては、ゲノム位置の効果の結果として遺伝子発現カセットが異なるレベルで発現される可能性がある。結果として、操作された遺伝子又は形質を持つ植物系統の生成、単離及び特性解析は、極めて労力と費用とを要するが、成功の可能性が低いプロセスである。遺伝子導入イベントの選択に関連する障害に加えて、遺伝子の隔離及び商業的応用のために遺伝子導入植物を環境に放出することについて必要な厳格さの程度に関連するいくつかの主要な懸念が起きている。

20

【0010】

ゲノム編集技法の最近の進展により、生細胞においてDNA配列を変更することが可能になった。ゲノム編集は、従来の作物育種方法又は標準的な遺伝子操作（遺伝子導入又はGM）方法よりも精密である。植物の細胞の中の数十億ものヌクレオチド（遺伝子の基本単位）のうちのわずかに数個だけを編集することにより、これらの新しい技法は、厳しい気候でよりよく成長し、虫害に抵抗し、又は栄養摂取を向上するための作物を手に入れる最も効果的な方法である可能性がある。この技法が精密であるほど、より少ない遺伝子材料が変更されるので、植物の挙動に対する他の効果についての不確実性は下がる。

【0011】

CRISPR Cas9ゲノム編集技術を使用する植物遺伝子操作の最も確立された方法は、宿主のゲノムへの新しいDNAの挿入を必要とする。この挿入物、トランスファーDNA（T-DNA）は、成功裏のCRISPR Cas9ゲノム編集を成し遂げるために、数個の転写単位を保有する。これらは共通に、遺伝子導入植物について選択するための抗生物質耐性遺伝子、Cas9機構、及びいくつかのsgRNA単位からなる。ゲノムへの外来DNAの組み込みのため、このようにして生成された植物は、遺伝子導入又は遺伝子組換え（GM）として分類される。ゲノム編集が宿主の中で樹立されると、このT-DNA骨格は有性繁殖（実生繁殖）及び育種により取り除くことができる。というのも、CRISPR Cas9機構は、もはや表現型を維持するために必要とされないからである。しかしながら、上述のように、バナナ種は単為結実性であり（生存可能な種を産生しない）、このため、有性生殖によるT-DNA骨格の除去は不可能である。

30

40

【0012】

さらなる背景技術としては以下が挙げられる。

米国特許出願公開第20130097732号明細書、

米国特許出願公開第20140075593号明細書、

Zhang, Y. ら、Efficient and transgene-free genome editing in wheat through transient expression of CRISPR/Cas9 DNA or RNA. Nat Commun, 2016. 7: 12617 頁、

Woo, J. W. ら、DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonuc

50

leoproteins. Nat Biotechnol, 2015. 33(11): 1162 - 4頁、

Svitashev, S. 5、Genome editing in maize directed by CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes. Nat Commun, 2016. 7: 13274頁、

Luo, S. 5、Non-transgenic Plant Genome Editing Using Purified Sequence-Specific Nucleases. Mol Plant, 2015. 8(9): 1425 - 7頁、

Hoffmann 2017 PlosOne 12(2): e0172630、

Chiang 5、2016. SP1, 2, 3. Sci Rep. 2016 Apr 15; 6: 24356。 10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0013】

【文献】米国特許出願公開第20130097732号明細書

米国特許出願公開第20140075593号明細書

【非特許文献】

【0014】

【文献】Rudus 5、2013. Acta Physiol Plant. 第35巻、295 - 307頁 20

Zhang, Y. 5、Efficient and transgene-free genome editing in wheat through transient expression of CRISPR/Cas9 DNA or RNA. Nat Commun, 2016. 7: 12617頁

Woo, J. W. 5、DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. Nat Biotechnol, 2015. 33(11): 1162 - 4頁

Svitashev, S. 5、Genome editing in maize directed by CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes. Nat Commun, 2016. 7: 13274頁 30

Luo, S. 5、Non-transgenic Plant Genome Editing Using Purified Sequence-Specific Nucleases. Mol Plant, 2015. 8(9): 1425 - 7頁

Hoffmann 2017 PlosOne 12(2): e0172630

Chiang 5、2016. SP1, 2, 3. Sci Rep. 2016 Apr 15; 6: 24356

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0015】 40

本発明のいくつかの実施形態の一態様によれば、バナナのエチレン生合成経路における成分をコードする核酸配列の中に機能喪失型変異を含むゲノムを含むバナナ植物（バショウ）が提供される。

【0016】

本発明のいくつかの実施形態の一態様によれば、バナナの貯蔵寿命の延長方法であって、

（a）バナナ植物細胞を、バナナのエチレン生合成経路における成分をコードする核酸配列に向けられたDNA編集剤に供し、上記エチレン生合成経路をコードする核酸配列の中に機能喪失型変異を生じる工程と、

（b）上記植物細胞から植物を再生する工程とを備える方法が提供される。 50

【 0 0 1 7 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、当該方法は、上記植物から果実を収穫する工程をさらに備える。

【 0 0 1 8 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記植物は、上記DNA編集剤をコードする導入遺伝子を欠く。

【 0 0 1 9 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記変異はホモ接合型である。

【 0 0 2 0 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記植物又はその祖先は、エチレン生合成経路における上記成分をコードするゲノム配列に向けられたDNA編集剤で処理されたものである。

10

【 0 0 2 1 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記変異は、欠失、挿入、挿入／欠失（インデル）及び置換からなる群から選択される。

【 0 0 2 2 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記エチレン生合成経路における上記成分は、1 - アミノシクロプロパン - 1 - カルボン酸シンターゼ（ACS）及びACCオキシダーゼ（ACO）からなる群から選択される。

【 0 0 2 3 】

本発明のいくつかの実施形態の一態様によれば、植物プロモーターに動作可能に連結されている、バナナのエチレン生合成経路における成分をコードする核酸配列に向けられたDNA編集剤をコードする核酸配列を含む核酸構築物が提供される。

20

【 0 0 2 4 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記DNA編集剤は、メガヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）及びCRISPR - Casからなる群から選択されるDNA編集システムのものである。

【 0 0 2 5 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記DNA編集剤はCRISPR - Casを含むDNA編集システムのものである。

30

【 0 0 2 6 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記エチレン生合成経路における上記成分は、Ma04__g35640（配列番号9）及びMa07__g19730（配列番号27）からなる群から選択される。

【 0 0 2 7 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記エチレン生合成経路における上記成分は、Ma09__g19150（配列番号13）、Ma04__g35640（配列番号9）、Ma04__g31490（配列番号8）、Ma01__g11540（配列番号20）及びMa07__g19730（配列番号27）からなる群から選択される。

40

【 0 0 2 8 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記エチレン生合成経路における上記成分は、Ma04__g35640（配列番号9）及びMa07__g19730（配列番号27）からなる群から選択される。

【 0 0 2 9 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記エチレン生合成経路における上記成分は、Ma09__g19150（配列番号13）、Ma04__g31490（配列番号8）及びMa01__g11540（配列番号20）からなる群から選択される。

【 0 0 3 0 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記DNA編集剤は、上記エチレン生合成経路

50

における上記成分をコードする複数の核酸配列を特異的に標的とする核酸座標向けられている。

【 0 0 3 1 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記 DNA 編集剤は、配列番号 4 7 ~ 配列番号 5 4 からなる群から選択される核酸配列に少なくとも 9 9 % 同一の核酸配列を含む。

【 0 0 3 2 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記 DNA 編集剤は、配列番号 4 7 に示される核酸配列に少なくとも 9 9 % 同一の核酸配列を含む。

【 0 0 3 3 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記 DNA 編集剤は配列番号 4 7 に示される核酸を含む。

10

【 0 0 3 4 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記 DNA 編集剤は、配列番号 4 7 ~ 配列番号 5 4 に示される複数の核酸配列を含む。

【 0 0 3 5 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記 DNA 編集剤は、配列番号 4 7、配列番号 4 9 又は配列番号 5 0 に示される複数の核酸配列を含む。

【 0 0 3 6 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記 DNA 編集剤は、配列番号 5 1 及び配列番号 5 3 に示される複数の核酸配列を含む。

20

【 0 0 3 7 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記バナナ植物は非遺伝子組換えのものである。

【 0 0 3 8 】

本発明のいくつかの実施形態の一態様によれば、本明細書に記載される植物の植物部分が提供される。

【 0 0 3 9 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記植物部分は果実である。

【 0 0 4 0 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記果実は乾燥している。

【 0 0 4 1 】

本発明のいくつかの実施形態の一態様によれば、バナナの製造方法であって、
(a) 本明細書に記載される植物を成長させる工程と、
(b) 上記植物から果実を収穫する工程と
を備える方法が提供される。

30

【 0 0 4 2 】

本発明のいくつかの実施形態の一態様によれば、バナナのエチレン生合成経路における成分をコードする核酸配列の中に機能喪失型変異を含むゲノムバナナ DNA を含む加工バナナ製品が提供される。

【 0 0 4 3 】

本発明のいくつかの実施形態の一態様によれば、バナナのエチレン生合成経路における成分であるタンパク質をコードするゲノム核酸配列に導入された機能喪失型変異を含むバナナ植物、又はその部分であって、上記変異は、上記機能喪失型変異を欠くバナナ植物と比べて上記タンパク質のレベルの低下又は活性の低下を生じるバナナ植物、又はその部分が提供される。

40

【 0 0 4 4 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記植物は、上記バナナのエチレン生合成経路における成分である 1 以上のタンパク質をコードする 1 以上のゲノム核酸配列に導入された 1 以上の非天然の機能喪失型変異を含み、上記 1 以上の変異は、各々、上記機能喪失型変異を欠くバナナ植物と比べて上記タンパク質のレベルの低下又は活性の低下を生じる。

【 0 0 4 5 】

50

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記 1 以上のタンパク質は、1 - アミノシクロプロパン - 1 - カルボン酸シンターゼ (ACS) 及び ACC オキシダーゼ (ACO) からなる群から選択される。

【0046】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記 ACS タンパク質ゲノム核酸配列は、Ma01__g07800.1 (配列番号 1)、Ma01__g12130.1 (配列番号 2)、Ma02__g10500.1 (配列番号 3)、Ma03__g12030.1 (配列番号 4)、Ma03__g27050.1 (配列番号 5)、Ma04__g01260.1 (配列番号 6)、Ma04__g24230.1 (配列番号 7)、Ma04__g31490.1 (配列番号 8)、Ma04__g35640.1 (配列番号 9)、Ma04__g37400.1 (配列番号 10)、Ma05__g08580.1 (配列番号 11)、Ma05__g13700.1 (配列番号 12)、Ma09__g19150.1 (配列番号 13)、及び Ma10__g27510.1 (配列番号 14) からなる群から選択される核酸配列に少なくとも 85% 同一、少なくとも 90% 同一、少なくとも 95% 同一の核酸配列を含むか、又は Ma01__g07800.1 (配列番号 1)、Ma01__g12130.1 (配列番号 2)、Ma02__g10500.1 (配列番号 3)、Ma03__g12030.1 (配列番号 4)、Ma03__g27050.1 (配列番号 5)、Ma04__g01260.1 (配列番号 6)、Ma04__g24230.1 (配列番号 7)、Ma04__g31490.1 (配列番号 8)、Ma04__g35640.1 (配列番号 9)、Ma04__g37400.1 (配列番号 10)、Ma05__g08580.1 (配列番号 11)、Ma05__g13700.1 (配列番号 12)、Ma09__g19150.1 (配列番号 13)、及び Ma10__g27510.1 (配列番号 14) からなる群から選択される核酸配列であり、上記 ACO タンパク質ゲノム核酸配列は、Ma09__g04370.1 (配列番号 15)、Ma06__g17160.1 (配列番号 16)、Ma11__g05490.1 (配列番号 17)、Ma00__g04490.1 (配列番号 18)、Ma07__g15430.1 (配列番号 19)、Ma01__g11540.1 (配列番号 20)、Ma10__g16100.1 (配列番号 21)、Ma05__g08170.1 (配列番号 22)、Ma06__g14430.1 (配列番号 23)、Ma05__g09360.1 (配列番号 24)、Ma11__g22170.1 (配列番号 25)、Ma05__g31690.1 (配列番号 26)、Ma07__g19730.1 (配列番号 27)、Ma06__g02600.1 (配列番号 28)、Ma10__g05270.1 (配列番号 29)、Ma06__g14370.1 (配列番号 30)、Ma11__g05480.1 (配列番号 31)、Ma06__g14410.1 (配列番号 32)、Ma06__g14420.1 (配列番号 33)、Ma06__g34590.1 (配列番号 34)、Ma02__g21040.1 (配列番号 35)、Ma11__g04210.1 (配列番号 36)、Ma05__g12600.1 (配列番号 37)、Ma04__g23390.2 (配列番号 38)、Ma03__g06970.1 (配列番号 39)、Ma05__g09980.1 (配列番号 40)、Ma04__g36640.1 (配列番号 41)、Ma11__g04180.1 (配列番号 42)、Ma11__g02650.1 (配列番号 43)、及び Ma00__g04770.1 (配列番号 44) からなる群から選択される核酸配列に少なくとも 85% 同一、少なくとも 90% 同一、少なくとも 95% 同一の核酸配列を含むか、又は Ma09__g04370.1 (配列番号 15)、Ma06__g17160.1 (配列番号 16)、Ma11__g05490.1 (配列番号 17)、Ma00__g04490.1 (配列番号 18)、Ma07__g15430.1 (配列番号 19)、Ma01__g11540.1 (配列番号 20)、Ma10__g16100.1 (配列番号 21)、Ma05__g08170.1 (配列番号 22)、Ma06__g14430.1 (配列番号 23)、Ma05__g09360.1 (配列番号 24)、Ma11__g22170.1 (配列番号 25)、Ma05__g31690.1 (配列番号 26)、Ma07__g19730.1 (配列番号 27)、Ma06__g02600.1 (配列番号 28)、Ma10__g05270.1 (配列番号 29)、Ma06__g14370.1 (配列番号 30)、Ma11__g05480.1 (配列番号 31)、Ma06__g

10

20

30

40

50

1 4 4 1 0 . 1 (配列番号 3 2)、M a 0 6 _ _ g 1 4 4 2 0 . 1 (配列番号 3 3)、M a 0 6 _ _ g 3 4 5 9 0 . 1 (配列番号 3 4)、M a 0 2 _ _ g 2 1 0 4 0 . 1 (配列番号 3 5)、M a 1 1 _ _ g 0 4 2 1 0 . 1 (配列番号 3 6)、M a 0 5 _ _ g 1 2 6 0 0 . 1 (配列番号 3 7)、M a 0 4 _ _ g 2 3 3 9 0 . 2 (配列番号 3 8)、M a 0 3 _ _ g 0 6 9 7 0 . 1 (配列番号 3 9)、M a 0 5 _ _ g 0 9 9 8 0 . 1 (配列番号 4 0)、M a 0 4 _ _ g 3 6 6 4 0 . 1 (配列番号 4 1)、M a 1 1 _ _ g 0 4 1 8 0 . 1 (配列番号 4 2)、M a 1 1 _ _ g 0 2 6 5 0 . 1 (配列番号 4 3)、及び M a 0 0 _ _ g 0 4 7 7 0 . 1 (配列番号 4 4) からなる群から選択される核酸配列である。

【 0 0 4 7 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記エチレン生合成経路における上記タンパク質成分をコードするゲノム核酸配列は、M a 0 9 _ _ g 1 9 1 5 0 (配列番号 1 3)、M a 0 4 _ _ g 3 5 6 4 0 (配列番号 9)、M a 0 4 _ _ g 3 1 4 9 0 (配列番号 8)、M a 0 1 _ _ g 1 1 5 4 0 (配列番号 2 0) 及び M a 0 7 _ _ g 1 9 7 3 0 (配列番号 2 7) からなる群から選択される核酸配列に少なくとも 8 5 % 同一、少なくとも 9 0 % 同一、少なくとも 9 5 % 同一の核酸配列を含むか、又は M a 0 9 _ _ g 1 9 1 5 0 (配列番号 1 3)、M a 0 4 _ _ g 3 5 6 4 0 (配列番号 9)、M a 0 4 _ _ g 3 1 4 9 0 (配列番号 8)、M a 0 1 _ _ g 1 1 5 4 0 (配列番号 2 0) 及び M a 0 7 _ _ g 1 9 7 3 0 (配列番号 2 7) からなる群から選択される核酸配列である。

【 0 0 4 8 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記エチレン生合成経路における上記タンパク質成分をコードするゲノム核酸配列は、M a 0 4 _ _ g 3 5 6 4 0 (配列番号 9)、及び M a 0 7 _ _ g 1 9 7 3 0 (配列番号 2 7) からなる群から選択される核酸配列に少なくとも 8 5 % 同一、少なくとも 9 0 % 同一、少なくとも 9 5 % 同一の核酸配列を含むか、又は M a 0 4 _ _ g 3 5 6 4 0 (配列番号 9)、及び M a 0 7 _ _ g 1 9 7 3 0 (配列番号 2 7) からなる群から選択される核酸配列である。

【 0 0 4 9 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記エチレン生合成経路における上記タンパク質成分をコードするゲノム核酸配列は、M a 0 9 _ _ g 1 9 1 5 0 (配列番号 1 3)、M a 0 4 _ _ g 3 1 4 9 0 (配列番号 8)、及び M a 0 1 _ _ g 1 1 5 4 0 (配列番号 2 0) からなる群から選択される核酸配列に少なくとも 8 5 % 同一、少なくとも 9 0 % 同一、少なくとも 9 5 % 同一の核酸配列を含むか、又は M a 0 9 _ _ g 1 9 1 5 0 (配列番号 1 3)、M a 0 4 _ _ g 3 1 4 9 0 (配列番号 8)、及び M a 0 1 _ _ g 1 1 5 4 0 (配列番号 2 0) からなる群から選択される核酸配列である。

【 0 0 5 0 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記非天然の機能喪失型変異は、D N A 編集剤を使用して導入されたものである。

【 0 0 5 1 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記植物は、上記 D N A 編集剤をコードする導入遺伝子、選択マーカー若しくはレポーターをコードする導入遺伝子を含まないか、又は上記 D N A 編集剤、選択マーカー若しくはレポーターのいずれをコードする導入遺伝子も含まない。

【 0 0 5 2 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記 D N A 編集剤は、メガヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (Z F N)、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (T A L E N) 及び C R I S P R - C a s からなる群から選択される D N A 編集システムを含んでいた。

【 0 0 5 3 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記 D N A 編集剤は C R I S P R - C a s であった。

【 0 0 5 4 】

10

20

30

40

50

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記変異はホモ接合性である。

【 0 0 5 5 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記変異は、欠失、挿入、挿入 / 欠失（インデル）、及び置換からなる群から選択される。

【 0 0 5 6 】

本発明のいくつかの実施形態の一態様によれば、DNA編集剤及びDNAターゲティング剤をコードする核酸配列を含む核酸構築物であって、このターゲティング剤は、バナナのエチレン生合成経路におけるタンパク質成分をコードするゲノム核酸配列に機能喪失型変異を導入するためにそのゲノム核酸配列に対する編集剤を標的とし、これらの編集剤及びターゲティング剤は植物プロモーターに動作可能に連結されており、上記変異は、上記機能喪失型変異を欠くバナナ植物と比べて上記タンパク質のレベルの低下又は活性の低下を生じる核酸構築物が提供される。

10

【 0 0 5 7 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記DNA編集剤及び上記DNAターゲティング剤は、請求項1から請求項13のいずれか一項に記載の植物のゲノムにおいて上記変異のうちの1つを生成する。

【 0 0 5 8 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、DNAターゲティング剤は、上記エチレン生合成経路における成分をコードする複数のゲノム核酸配列に共通である核酸を標的とするように設計されている。

20

【 0 0 5 9 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記DNAターゲティング剤は、配列番号47～配列番号54からなる群から選択される核酸配列に少なくとも99%同一の核酸配列を含む。

【 0 0 6 0 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記DNA編集剤は、配列番号47に示される核酸配列に少なくとも99%同一の核酸配列を含む。

【 0 0 6 1 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記DNA編集剤は、配列番号47に示される核酸を含む。

30

【 0 0 6 2 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記核酸構築物は、配列番号47～配列番号54に示される核酸配列から選択される を含む2以上のDNA編集剤を含む。

【 0 0 6 3 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記核酸構築物は、配列番号47、配列番号49又は配列番号50に示される核酸配列から選択される を含む2以上のDNA編集剤を含む。

【 0 0 6 4 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記核酸構築物は、配列番号51及び配列番号53に示される核酸配列を含む少なくとも2つのDNA編集剤を含む。

40

【 0 0 6 5 】

本発明のいくつかの実施形態の一態様によれば、バナナの貯蔵寿命の延長方法であって、
（a）バナナ植物の1以上の細胞を請求項14から請求項22のいずれか一項に記載の核酸構築物で形質転換する工程と、

（b）上記エチレン生合成経路の上記タンパク質成分をコードするゲノム核酸配列の中に機能喪失型変異を生成する工程であって、この変異は上記タンパク質のレベルの低下又は活性の低下を生じる工程と、

（c）上記植物細胞から植物を再生する工程と
を備える方法が提供される。

【 0 0 6 6 】

50

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記DNA編集剤はCRISPR-Casであり、上記DNAターゲティング剤はsgRNAである。

【0067】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記バナナのエチレン生合成経路におけるタンパク質成分をコードするゲノム核酸配列は、Ma09__g19150（配列番号13）、Ma04__g35640（配列番号9）、Ma04__g31490（配列番号8）、Ma01__g11540（配列番号20）及びMa07__g19730（配列番号27）からなる群から選択される。

【0068】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記sgRNA DNAターゲティング剤は、sg-183（配列番号47）、sg-184（配列番号48）、sg-188（配列番号49）、sg-189（配列番号50）、sg-190（配列番号51）、sg-191（配列番号52）、sg-194（配列番号53）、及びsg-195（配列番号54）からなる群から選択される。

【0069】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記機能喪失型変異は本明細書に記載されたとおりである。

【0070】

本発明のいくつかの実施形態の一態様によれば、変異体バナナを含む変異体バナナ植物であって、この変異体植物は、1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸シンターゼ（ACS）タンパク質をコードする遺伝子の中に変異を含み、当該変異体バナナ植物におけるこのACSタンパク質の活性は、上記変異を欠くバナナ植物由来のそのタンパク質の活性と比べて低下しており、上記変異体バナナの果実は、上記変異を欠くバナナ植物由来のバナナよりもゆっくり追熟する変異体バナナ植物が提供される。

【0071】

本発明のいくつかの実施形態の一態様によれば、変異体バナナを含む変異体バナナ植物であって、この変異体植物は、遺伝子Ma09__g19150（配列番号13）に変異を含み、遺伝子Ma09__g19150はタンパク質1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸シンターゼ（ACS）をコードし、この変異体バナナ植物におけるタンパク質ACSの活性は、上記変異を欠くバナナ植物由来のそのタンパク質の活性と比べて低下しており、上記変異体バナナの果実は、上記変異を欠くバナナ植物由来のバナナよりもゆっくり追熟する変異体バナナ植物が提供される。

【0072】

本発明のいくつかの実施形態の一態様によれば、変異体バナナを含む変異体バナナ植物であって、この変異体植物は、遺伝子Ma04__g35640（配列番号9）に変異を含み、遺伝子Ma04__g35640はタンパク質1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸シンターゼ（ACS）をコードし、この変異体バナナ植物におけるタンパク質ACSの活性は、上記変異を欠くバナナ植物由来のそのタンパク質の活性と比べて低下しており、上記変異体バナナの果実は、上記変異を欠くバナナ植物由来のバナナよりもゆっくり追熟する変異体バナナ植物が提供される。

【0073】

本発明のいくつかの実施形態の一態様によれば、変異体バナナを含む変異体バナナ植物であって、この変異体植物は、遺伝子Ma04__g31490（配列番号8）に変異を含み、遺伝子Ma04__g31490はタンパク質1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸シンターゼ（ACS）をコードし、この変異体バナナ植物におけるタンパク質ACSの活性は、上記変異を欠くバナナ植物由来のそのタンパク質の活性と比べて低下しており、上記変異体バナナの果実は、上記変異を欠くバナナ植物由来のバナナよりもゆっくり追熟する変異体バナナが提供される。

【0074】

本発明のいくつかの実施形態の一態様によれば、変異体バナナを含む変異体バナナ植物

であって、この変異体植物は、A C C オキシダーゼ (A C O) タンパク質をコードする遺伝子に変異を含み、当該変異体バナナ植物におけるこのA C O タンパク質の活性は、上記変異を欠くバナナ植物由来のそのタンパク質の活性と比べて低下しており、上記変異体バナナの果実は、上記変異を欠くバナナ植物由来のバナナよりもゆっくり追熟する変異体バナナ植物が提供される。

【 0 0 7 5 】

本発明のいくつかの実施形態の一態様によれば、変異体バナナを含む変異体バナナ植物であって、この変異体植物は、遺伝子 M a 0 1 _ g 1 1 5 4 0 (配列番号 2 0) に変異を含み、遺伝子 M a 0 1 _ g 1 1 5 4 0 はタンパク質 A C C オキシダーゼ (A C O) をコードし、この変異体バナナ植物におけるタンパク質 A C O の活性は、上記変異を欠くバナナ植物由来のそのタンパク質の活性と比べて低下しており、上記変異体バナナの果実は、上記変異を欠くバナナ植物由来のバナナよりもゆっくり追熟する変異体バナナ植物が提供される。

10

【 0 0 7 6 】

本発明のいくつかの実施形態の一態様によれば、変異体バナナを含む変異体バナナ植物であって、この変異体植物は、遺伝子 M a 0 7 _ g 1 9 7 3 0 (配列番号 2 7) に変異を含み、遺伝子 M a 0 7 _ g 1 9 7 3 0 はタンパク質 A C C オキシダーゼ (A C O) をコードし、この変異体バナナ植物におけるタンパク質 A C O の活性は、上記変異を欠くバナナ植物由来のそのタンパク質の活性と比べて低下しており、上記変異体バナナは、上記変異を欠くバナナ植物由来のバナナよりもゆっくり追熟する変異体バナナ植物が提供される。

20

【 0 0 7 7 】

本発明のいくつかの実施形態の一態様によれば、バナナの製造方法であって、
(a) 本明細書に記載される植物を成長させる工程と、
(b) 上記植物から果実を収穫する工程と
を備える方法が提供される。

【 0 0 7 8 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記植物、又はその部分、は植物部分である。

【 0 0 7 9 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記植物部分は果実である。

【 0 0 8 0 】

本発明のいくつかの実施形態の一態様によれば、上記植物部分を含む加工バナナ製品が提供される。

30

【 0 0 8 1 】

特段の記載がない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語及び / 又は科学用語は、本発明が関係する技術分野の当業者によって一般に理解される意味と同じ意味を有する。本明細書に記載される方法及び材料と類似又は等価な方法及び材料を本発明の実施形態の実施又は試験で使用するができるが、例示的な方法及び / 又は材料が以降に記載される。矛盾する場合、定義を含めこの特許明細書が優先することになる。加えて、材料、方法及び例は説明のためのものにすぎず、必ずしも限定を意図したものではない。

【 図面の簡単な説明 】

40

【 0 0 8 2 】

本発明のいくつかの実施形態が、添付の図面を参照して、単なる例として本明細書に記載される。ここで図面を詳細に具体的に参照するにあたり、示される特定のものは、例として、そして本発明の実施形態の説明のための記述のために示されているということが強調される。これに関して、図面を参照した記載により、本発明の実施形態をどのように実施してよいか当業者に明らかになる。

【 0 0 8 3 】

【 図 1 】 図 1 は、B l e e c k e r 及び K e n d e . 2 0 0 0 . A n n u . R e v . C e l l . D e v 1 6 : 1 - 1 8 から採ったエチレン生合成経路のスキームである。

【 図 2 】 図 2 は、ゲノム編集イベントを含む細胞の選択方法の一実施形態のフロー図であ

50

る。

【図3】図3は、mCherryプラスミドを用いたバナナプロトプラストの陽性のトランスフェクションを示す。1 × 10⁶のバナナプロトプラストが、PEGを使用し、mCherry（蛍光マーカー）を保有するプラスミドpAC2010を用いてトランスフェクションされた。トランスフェクション後3日目に、蛍光顕微鏡のもとでトランスフェクション効率分析された。この図は、バナナプロトプラストを示し、上側のパネルは明視野のものであり、下側のパネルは蛍光によるものである。

【図4A】図4Aは、陽性のmCherryバナナのFACS濃縮を示す。1 × 10⁶バナナプロトプラストが、PEGを使用し、蛍光マーカーmCherryを保有するプラスミドpAC2010を用いてトランスフェクションされた。トランスフェクションから3日後に、プロトプラストはFACSにより分析され、すべてのmCherry陽性細胞がソートされ、収集された。

10

【図4B】図4Bは、陽性のmCherryバナナプロトプラストのFACS濃縮を示す。mCherryバナナプロトプラストの濃縮が、蛍光顕微鏡法により確認された。未ソートの（上側のパネル）及びソートされた（下側のパネル）トランスフェクションされたプロトプラストが、トランスフェクション後3日目に蛍光顕微鏡を用いて撮像された。

【図5】図5A～図5Cは、一過性の形質転換イベントを示す、経時的なmCherry陽性バナナプロトプラストの減少を示す。mCherry蛍光マーカーを保有するプラスミドを用いてトランスフェクションされたバナナプロトプラストが、トランスフェクション後3日目（図5A）及び10日目（図5B）に撮像された。図5C。FACSによる測定によると、トランスフェクション後25日目までのmCherry陽性プロトプラストの数の漸進的な減少が認められた。100%は、トランスフェクション後3日目のmCherry発現細胞の割合を表す。

20

【図6A】図6Aは、未ソートの、そしてFACSの前に撮像されたプロトプラストについての一過性の形質転換イベントを示す経時的なmCherry陽性バナナプロトプラストの減少を示す。マレーヤマバショウプロトプラストが、mCherry蛍光マーカーを保有するプラスミド（pAC2010）を用いて、又はDNAなしでトランスフェクションされた。未ソートのプロトプラストが、示されているように、トランスフェクション後3日目、6日目及び10日目に撮像された。顕微鏡写真は、時間に沿ったmCherry陽性プロトプラストの数及び強度の漸進的な減少を示す。BF（明視野）。

30

【図6B】図6Bは、ソート後の、FACS後に撮像されたプロトプラストについての一過性の形質転換イベントを示す経時的なmCherry陽性プロトプラストの減少を示す。mCherry蛍光マーカーを保有するプラスミド（2010）を用いてトランスフェクションされたマレーヤマバショウプロトプラストがソートされ、示されているように、トランスフェクション後3日目、6日目及び10日目に撮像された。顕微鏡写真は、時間に沿ったmCherry陽性プロトプラストの数及び強度の漸進的な減少を示す。BF（明視野）。

【図7】図7A～図7Bは、トマト及びマレーヤマバショウにおけるシステム1からシステム2への移行期の間のエチレン生合成及び調節の模式図である。トマト（図7A）及びバナナ果実（図7B）の追熟の間の、S-アデノシル-L-メチオニン（S-Ado-Met）から1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸（ACC）へ、そしてエチレンへのエチレンの2工程生化学的経路の単純化されたスキーム並びにシステム1～システム2の移行に関与する遺伝子。システム1からシステム2への移行は、ACCシンターゼ（ACS）遺伝子及びACCオキシダーゼ（ACO）遺伝子ファミリーのいくつかのメンバーの遺伝子発現の調節に依存する。紫色のボックスは、さらなる分析のために選択されたトマト遺伝子を示す。トマトスキームは、Alexander及びGrierson, 2002. Journal of Experimental Botany、第53巻、第377号、2039-2055頁；Cara及びGiovannoni, 2008. Plant Science、第175巻、106-113頁；並びにPechら、2012. Annual Plant Reviews、第44巻、275-304頁から改変した。

40

50

バナナスキームは、トマトの知見並びに Liu ら、1999. *Plant Physiology*、第121巻、1257-1265頁及び Rudus ら、2013. *Acta Physiologiae Plantarum*、第35巻、295-307頁に基づいた。

【図8】図8は、ACCシンターゼ (ACS) 遺伝子の進化的関係の模式図である。進化歴は近隣結合法を使用して推察された。関連するタクソンがブートストラップ検定 (1000複製物) において一緒にクラスター化した複製ツリーの百分率が、色づけされた枝として示されている (赤色 < 20%; 青色 50%; 緑色 > 90%)。破線の紫色のボックスは、トマト果実の追熟の際に関与することが示されており、かつマレーヤマバショウのゲノムにおいて密に関連する遺伝子を検索するためのクエリ配列として使用されたトマト遺伝子を示す。橙色の遺伝子IDは、果実追熟に関与する特徴付けられたトマト遺伝子に対する最も近いホモログである可能性が高いマレーヤマバショウ候補遺伝子を示す。

10

【図9】図9は、ACCオキシダーゼ (ACO) 遺伝子の進化的関係の模式図である。進化歴は近隣結合法を使用して推察された。関連するタクソンがブートストラップ検定 (1000複製物) において一緒にクラスター化した複製ツリーの百分率が、色づけされた枝として示されている (赤色 < 20%; 青色 50%; 緑色 > 90%)。紫色又は赤色の遺伝子IDは、果実の追熟の際に特徴付けられており、かつマレーヤマバショウのゲノムにおいて密に関連する遺伝子を検索するためのクエリ配列として使用された、それぞれシロイヌナズナ (*Arabidopsis*) 又はトマト由来の遺伝子を示す。橙色の遺伝子IDは、果実追熟に関与する特徴付けられたトマト遺伝子に対する (トマト及びシロイヌナズナに対する) 最も近いホモログである可能性が高いマレーヤマバショウ候補遺伝子を示す。

20

【図10】図10はsgRNA選択の例を示す。目的の配列におけるsgRNAを発見及び設計するための公開されているアルゴリズムを使用した後に、手作業によるキュレーション工程が、タンパク質機能にとって重要であることが経験的に示されているか又は予測されてきた領域 (赤色のボックス) とオーバーラップするsgRNAの選択を確実にする。青色のボックスは、sgRNAが設計された位置をハイライトする。本発明の実施形態によれば、青色及び赤色のボックスとオーバーラップするsgRNAが選択される。

【図11】図11は、マレーヤマバショウ果実における選択されたACS候補遺伝子の遺伝子発現を示すグラフである。実験条件は、D' Hont ら、2012 *Nature*、2012 Aug 9; 488 (7410): 213-7に記載されている。果実は開花後に (40日、60日及び90日) 収穫され、バナナ果実の追熟におけるトランスクリプトーム変化を確認するためにアセチレンで処理されずに (-) 又はアセチレンで処理されて (+)、20 で5日間保たれた。RNAseqデータは、アセチレン処理がバナナACS候補遺伝子 Ma04_g35640の遺伝子発現に変化を誘導することを示した。

30

【図12】図12は、マレーヤマバショウ果実における選択されたACO候補遺伝子の遺伝子発現を示すグラフである。実験条件は、D' Hont ら、2012、前出、に記載されている。果実は開花後に (40日、60日及び90日) 収穫され、バナナ果実の追熟におけるトランスクリプトーム変化を確認するためにアセチレンで処理されずに (-) 又はアセチレンで処理されて (+)、20 で5日間保たれた。RNAseqデータは、アセチレン処理がバナナACO候補遺伝子 Ma07_g19730の遺伝子発現に変化を誘導することを示した。

40

【図13】図13A~図13Dは、候補遺伝子 Ma09_19150における変異の存在を明らかにするシーケンシング解析及びT7アッセイを示す。(図13A) 他のACS遺伝子を有する保存された領域に基づいてsgRNAが設計され選択された相対的位置を示す Ma09_19150 遺伝子座を表すポンチ絵。(図13B) Ma09_19150 遺伝子座は、このsgRNA領域の外部の特異的プライマーを用いて増幅され、配列解析及びT7E1アッセイのために、pBLUNT (インビトロジェン (*In vitro* gen)) にクローニングされた。(図13C) T7E1アッセイによって測定された変異検出。「Ctr」はsgRNAを有しない対照プラスミドを示し、WTはトランスフェクションしていない試料 (DNAなし) を示す。07及び08は、使用したsgRNAの組み合わせである。(図13D) 特異的sgRNAによってガイドされるゲノム編集機械の発

50

現によって誘導される変異体DNA配列が野生型(WT)配列と配列比較される。PAMは灰色でハイライトされて示され、sgRNAは赤色の文字で示されている。小さい欠失が分析したいいくつかのクローンで見つかった。

【図14】図14A～図14Cは、候補遺伝子Ma04__35640における変異の存在を明らかにするT7アッセイ結果を示す。(図14A)他のACS遺伝子を有する保存された領域に基づいてsgRNAが設計され選択された相対的位置を示すMa04__35640遺伝子座を表すポンチ絵。(図14B)Ma04__35640遺伝子座は、T7E1アッセイのために、このsgRNA領域の外部の特異的プライマーを用いて増幅された。(図14C)T7E1アッセイによって測定された変異検出。「Ctr」はsgRNAを有しない対照プラスミドを示し、WTはトランスフェクションしていない試料(DNAなし)を示す。07及び08は、使用したsgRNAの組み合わせである。

10

【図15】図15A～図15Dは、候補遺伝子Ma04__31490における変異の存在を明らかにするシーケンシング解析及びT7アッセイを示す。(図15A)他のACS遺伝子を有する保存された領域に基づいてsgRNAが設計され選択された相対的位置を示すMa04__31490遺伝子座を表すポンチ絵。(図15B)Ma04__31490遺伝子座は、このsgRNA領域の外部の特異的プライマーを用いて増幅され、配列解析及びT7E1アッセイのために、pBLUNT(インビトロジェン(Invitrogen))にクローニングされた。(図15C)T7E1アッセイによって測定された変異検出。「Ctr」はsgRNAを有しない対照プラスミドを示し、WTはトランスフェクションしていない試料(DNAなし)を示す。07及び08は、使用したsgRNAの組み合わせである。(図15D)特異的sgRNAによってガイドされるゲノム編集機械の発現によって誘導される変異体DNA配列が野生型(WT)配列と配列比較される。PAMは灰色でハイライトされて示され、sgRNAは赤色の文字で示されている。WT及び小さい欠失が分析したいいくつかのクローンで見つかった。

20

【図16】図16A～図16Cは、候補遺伝子Ma07__19730における変異の存在を明らかにするT7アッセイ結果を示す。(図16A)他のACO遺伝子を有する保存された領域に基づいてsgRNAが設計され選択された相対的位置を示すMa07__19730遺伝子座を表すポンチ絵。(図16B)Ma07__19730遺伝子座は、T7E1アッセイのために、このsgRNA領域の外部の特異的プライマーを用いて増幅された。(図16C)T7E1アッセイによって測定された変異検出。「Ctr」はsgRNAを有しない対照プラスミドを示し、WTはトランスフェクションしていない試料(DNAなし)を示す。11及び12は、使用したsgRNAの組み合わせである。

30

【図17】図17A～図17Cは、候補遺伝子Ma01__11540における変異の存在を明らかにするT7アッセイ結果を示す。(図17A)他のACO遺伝子を有する保存された領域に基づいてsgRNAが設計され選択された相対的位置を示すMa01__11540遺伝子座を表すポンチ絵。(図17B)Ma01__11540遺伝子座は、T7E1アッセイのために、このsgRNA領域の外部の特異的プライマーを用いて増幅された。(図17C)T7E1アッセイによって測定された変異検出。「Ctr」はsgRNAを有しない対照プラスミドを示し、WTはトランスフェクションしていない試料(DNAなし)を示す。11及び12は、使用したsgRNAの組み合わせであり、231は野生型gDNAである。

40

【図18】図18は、遺伝子Ma01__11540における変異のシーケンシング解析を示す。特異的sgRNAによってガイドされるゲノム編集機械の発現によって誘導される変異体DNA配列が野生型(WT)配列と配列比較される。PAMは灰色でハイライトされて示され、sgRNAは赤色の文字で示されている。WT及びインデルが分析したいいくつかのクローンで見つかった。

【図19】図19は、候補遺伝子Ma01__11540における変異のシーケンシング解析を示す。特異的sgRNAによってガイドされるゲノム編集機械の発現によって誘導される変異体DNA配列が野生型(WT)配列と配列比較される。PAMは灰色でハイライトされて示され、sgRNAは赤色の文字で示され、挿入は緑色の文字で示されている

50

。WT及び小さいインデルが分析したいいくつかのクローンで見つかった。

【図20A】図20Aは、種々のsgRNAを有する候補遺伝子Ma01_11540における変異のシーケンシング解析を示す。特異的sgRNAによってガイドされるゲノム編集機械の発現によって誘導される変異体DNA配列が野生型(WT)配列と配列比較される。PAMは灰色でハイライトされて示され、sgRNAは赤色の文字で示されている。WT配列、小さい欠失及び大きい欠失が分析したいいくつかのクローンで見つかった。

【図20B】図20Bは、種々のsgRNAを有する候補遺伝子Ma01_11540における変異シーケンシング解析を示す。特異的sgRNAによってガイドされるゲノム編集機械の発現によって誘導される変異体DNA配列が野生型(WT)配列と配列比較される。PAMは灰色でハイライトされて示され、sgRNAは赤色の文字で示されている。WT配列、小さい欠失及び大きい欠失が分析したいいくつかのクローンで見つかった。

10

【図21】図21は、標的としたACS遺伝子におけるゲノム編集イベントの根拠のまとめを示す。ゲノム編集イベントは、(i)PCR、クローニング及びシーケンシング；並びに(ii)TFEIアッセイによって評価された。Y=インデルが検出された；N=検出されたインデルなし；X=不確定のデータ。

【図22】図22は、標的としたACO遺伝子におけるゲノム編集イベントの根拠のまとめを示す。ゲノム編集イベントは、(i)PCR、クローニング及びシーケンシング；並びに(ii)TFEIアッセイによって評価された。Y=インデルが検出された；N=検出されたインデルなし；X=不確定のデータ。

【図23】図23A～図23Eは、トランスフェクションされたバナナプロトプラストの再生を示す。図23A。新しく単離されたプロトプラストであり、これがプラスミドpAC007、pAC2008、pAC2010、pAC2011又はpAC2012を用いたトランスフェクションに供された。図23B。最初の細胞分裂がプロトプラスト単離及びトランスフェクションの48時間後に起こる。図23C。胚形成細胞(embryogenic cell)のマイクロカルスが1～2ヶ月後に発生する。図23D。胚形成細胞からの前胚の発生；図23E。球状胚；図23F。再生されたバナナの栄養分体。

20

【図24】図24Aは、トランスフェクションされたバナナプロトプラストの再生を示す。図24A。MS塩及びビタミンを含有する発芽培地(GM)中でトランスフェクションされたバナナプロトプラストから誘導された成熟胚。図24B～図24C。胚は、移しかえから1～2週間後に発芽し始める。図24D。GM(発芽培地)への移しかえから3～4週間後の発芽胚であり、苗条の伸長のための増殖培地に移される準備が整っている。

30

【図25】図25A～図25Eは、貯蔵寿命を延ばすための撃ち込まれたバナナ胚形成細胞懸濁液(ECS)の再生を示す。図25A。撃ち込み後3日齢の増殖培地でのECS；図25B。撃ち込みから一週間後の撃ち込まれたECSの増殖；図25C。撃ち込みから一ヶ月後、胚は撃ち込まれたECSから、胚発生培地(EDM)で発生する；図25D。成熟培地での胚；図25E。球状胚。

【図26(1)】図26は、ACO及びACSの配列並びに本発明のいくつかの実施形態に従って使用されるsgRNAs、sgRNA結合部位及びプライマーを示す。赤色のハイライトは、標的配列に沿ったsgRNAの位置を表し、色コードは図中に与えられている。

40

【図26(2)】図26(1)の続きを示す。

【図26(3)】図26(2)の続きを示す。

【図26(4)】図26(3)の続きを示す。

【図26(5)】図26(4)の続きを示す。

【図26(6)】図26(5)の続きを示す。

【図26(7)】図26(6)の続きを示す。

【図26(8)】図26(7)の続きを示す。

【図26(9)】図26(8)の続きを示す。

【図26(10)】図26(9)の続きを示す。

【図26(11)】図26(10)の続きを示す。

50

【図 2 6 (1 2)】図 2 6 (1 1) の続きを示す。

【図 2 6 (1 3)】図 2 6 (1 2) の続きを示す。

【図 2 6 (1 4)】図 2 6 (1 3) の続きを示す。

【図 2 6 (1 5)】図 2 6 (1 4) の続きを示す。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 8 4 】

本発明は、そのいくつかの実施形態では、バナナの貯蔵寿命を延長するための組成物及び方法に関する。

【 0 0 8 5 】

本発明の少なくとも 1 つの実施形態を詳細に説明する前に、本発明は、その適用において以下の記載に示され又は実施例によって例示される詳細に必ずしも限定されないということを理解されたい。本発明は、他の実施形態が可能であり、又は種々のやり方で実行又は実施することができる。

【 0 0 8 6 】

最も単純な不飽和炭化水素（二重結合を持つ 2 個の炭素）であるエチレンは、植物の生活環の中の実質的にすべての生理的なプロセスを制御する気体状植物ホルモンである。エチレンは、種子休眠性及び発芽、根の成長及び根粒形成、苗条及び葉の形成、花及び果実の発生、様々な器官の老化及び器官脱離、植物生体防御機構、並びに他の植物ホルモンとのいくつかの相互作用におけるシグナル伝達変化に関与する。エチレンは適正な植物の成長、発生、及び生存にとって疑いなく必須ではあるが、いくつかの例では、エチレンは植物にとって有害でもありうる。冷却、熱、栄養欠乏、嫌気生活、創傷及び病原体感染を含めた種々のストレスに曝された植物におけるエチレンレベルの上昇並びにその結果としての植物の成長及び健康に対する損傷の増大が報告されている。従って、追熟、老化又はストレス状態のもとで生成されるエチレンの量を遺伝的に改変し、これにより、より堅牢かつ／又は望ましい形質を持つ植物を作出することに対するかなり大きい商業的な関心がある。

【 0 0 8 7 】

C R I S P R C a s ゲノム編集技術を使用する植物遺伝子操作の最も確立された方法は、宿主のゲノムへの新しい DNA の挿入を必要とする。この挿入物、トランスファー DNA (T - DNA) は、成功裏の C R I S P R - C a s 媒介ゲノム編集を成し遂げるために、いくつかの転写単位を保有する。これらは共通に、遺伝子導入植物について選択するための抗生物質耐性遺伝子、C a s 機構、及びいくつかの s g R N A 単位からなる。ゲノムへの外来 DNA の組み込みのため、このようにして生成された植物は、遺伝子導入又は遺伝子組換え (G M) として分類される。ゲノム編集が宿主の中で樹立されると、T - DNA は有性繁殖及び育種により取り除くことができる。というのも、C R I S P R C a s 9 機構は、もはや表現型を維持するために必要とされないからである。しかしながら、バナナ等の生存可能な種を産生しない単為結実性作物については、有性生殖による T - DNA の除去は不可能である。

【 0 0 8 8 】

本発明の実施形態は、バナナのエチレン生合成経路におけるゲノム編集のための標的の特定に関する。

【 0 0 8 9 】

従って、バナナ植物においてエチレンレベルを低下させることはバナナ果実の貯蔵寿命の延長をもたらす可能性があるが、このエチレンレベルを低下させるために、エチレンの生合成に関与する遺伝子、例えば A C S 及び A C O (図 7 A 、 図 7 B) のノックアウトが試みられた。しかしながら、バナナゲノムは、これらの遺伝子に相長的である複数の配列を含有する。

【 0 0 9 0 】

機能的な A C S 及び A C O をコードするバナナゲノム内のより優れた標的遺伝子を特定するために、モデル又は作物種における特徴づけられた経路由来の相同配列が特定された

10

20

30

40

50

。このプロセスは、系統発生解析により遺伝子の進化歴を再構築すること、一般組織及び標的組織における候補の発現を検証することにより候補を選別すること、及び適切な s g R N A 設計を確実にするために（ミスマッチを回避するために）候補遺伝子をシーケンシング（配列決定）することを目指す、D N A 配列及びタンパク質配列の比較分析のための一連の逐次的工程を伴った。この手順により、遺伝子の選択、ノックアウトのための最適化された標的領域（保存的かつ潜在的に触媒的なドメイン）の特定及び適切な s g R N A の設計が可能になった。

【 0 0 9 1 】

エチレン生合成経路における複数の遺伝子に向けられた s g R N A を用いたバナナプロトプラストのトランスフェクションの後、本発明者らは、重複性による補償を回避するために、鍵となる遺伝子、例えば M a 0 7 _ g 1 9 7 3 0 及び M a 0 4 _ g 3 5 6 4 0 において並びにそのファミリーの他の遺伝子においてロバストなゲノム編集を特定することができた。このようなプロトプラストも、長い貯蔵寿命を有するバナナ植物を得るように、再生プロトコルに供した（図 8 ~ 2 5 A ~ E を参照）。

10

【 0 0 9 2 】

従って、一態様によれば、バナナの貯蔵寿命の延長方法であって、

（ a ）バナナ植物細胞を、バナナのエチレン生合成経路における成分をコードする核酸配列に向けられた D N A 編集剤に供し、上記エチレン生合成経路をコードする核酸配列の中に機能喪失型変異を生じる工程と、

（ b ）上記植物細胞から植物を再生する工程と
を備える方法が提供される。

20

【 0 0 9 3 】

本明細書で使用する場合、用語「バナナ」は、プランテンを含めてバショウ属の植物を指す。

【 0 0 9 4 】

特定の実施形態によれば、バナナは三倍体である。

【 0 0 9 5 】

二倍体及び四倍体を含めて他の倍数性も想定される。

【 0 0 9 6 】

本明細書で使用する場合、「植物」は、植物全体（ 1 又は複数）、接ぎ木された植物（穂木）、これらの植物及び植物部分の祖先及び子孫を指し、種子、果実、苗条、茎、根（塊茎を含む）、台木、若枝、並びに植物の細胞、組織及び器官を含む。

30

【 0 0 9 7 】

特定の実施形態によれば、上記植物部分は果実である。

【 0 0 9 8 】

特定の実施形態によれば、上記植物部分は種子である。

【 0 0 9 9 】

「種子」は、顕花植物の繁殖単位であって、別のそのような植物に発生することができる繁殖単位を指す。

【 0 1 0 0 】

特定の実施形態によれば、上記細胞は胚細胞である。

【 0 1 0 1 】

特定の実施形態によれば、上記細胞は体細胞である。

【 0 1 0 2 】

上記植物は、懸濁培養液、プロトプラスト、胚、成長点領域、カルス組織、葉、配偶体、孢子体、花粉、及び小孢子を含めたいずれの形態にあってもよい。

【 0 1 0 3 】

特定の実施形態によれば、上記植物部分は D N A を含む。

【 0 1 0 4 】

以下は、本教示に従って使用することができる栽培品種の非限定的なリストである。

50

【0105】

AA群

二倍体マレーヤマバショウ (*Musa acuminata*)、野生のバナナ植物及び栽培品種の両方

Chinganバナナ

Lacatanバナナ

Lady Fingerバナナ (Sugarバナナ)

Pisang jari buaya (Crocodile fingersバナナ)

Senoritaバナナ (Monkoy、Arnibalバナナ、Cuarenta dias、Carinosa、Pisang Empat Puluh Hari、Pisang Lampung) [12]

10

Sinwobogiバナナ

【0106】

AAA群

三倍体マレーヤマバショウ、野生のバナナ植物及び栽培品種の両方

Cavendish亜族

「Dwarf Cavendish」

「Giant Cavendish」(「Williams」)

「Grand Nain」(「Chiquita」)

「Masak Hijau」

20

「Robusta」

「Red Dacca」

Dwarf Redバナナ

Gros Michelバナナ

East African Highlandバナナ (AAA-EA亜族)

【0107】

AAAA群

四倍体マレーヤマバショウ、野生のバナナ及び栽培品種の両方

Bodles Altafortバナナ

Golden Beautyバナナ

30

【0108】

AAAB群

マレーヤマバショウとリュウキュウバショウとの間の交雑種 (*Musa × paradisiaca*) の四倍体栽培品種

Atanバナナ

Goldfingerバナナ

【0109】

AAB群

マレーヤマバショウとリュウキュウバショウとの間の交雑種の三倍体栽培品種。この群は、「純粋の」プランテン又はアフリカプランテン - その多様性の中心は中央アフリカ及び西アフリカである - から構成されるプランテン亜族を含み、中央アフリカ及び西アフリカでは、おそらく2000～3000年前にアジアからの先祖のプランテンの導入のあと、非常に多くの栽培品種が栽培化された。

40

【0110】

Iholena及びMaoli-Popo'ulu亜族は、パシフィックプランテンと呼ばれる。

【0111】

Iholena亜族 - 太平洋地域で栽培化された料理用バナナの亜族

Maoli-Popo'ulu亜族 - 太平洋地域で栽培化された料理用バナナの亜族

Maquenoバナナ

50

Popoulubanana	
Mysore 亜族 - 料理用及びデザートのパナナ [15]	
Mysorebanana	
Pisang Raja 亜族	
Pisang Rajabanana	
プランテン 亜族	
Frenchプランテン	
Green Frenchbanana	
Horn プランテン & Rhino Hornbanana	
Nendranbanana	10
Pink Frenchbanana	
Tigerbanana	
Pome 亜族	
Pomebanana	
Prata - anabanana (Dwarf Brazilianbanana、Dwarf Prata)	
Silk 亜族	
Latundanbanana (Silkbanana、Applebanana)	
その他	
Pisang Seribubanana	20
plubanana	
【 0112 】	
AABB 群	
マレーヤマバショウとリュウキュウバショウとの間の交雑種の四倍体栽培品種	
Kalamagolbanana	
Pisang Awak (Ducassebanana)	
【 0113 】	
AB 群	
マレーヤマバショウとリュウキュウバショウとの間の交雑種の二倍体栽培品種	
Ney Poovanbanana	30
【 0114 】	
ABB 群	
マレーヤマバショウとリュウキュウバショウとの間の交雑種の三倍体栽培品種	
Blue Javabanana (Ice Creambanana、Ney mannan、Ash	
プランテン、Pata hina、Dukuru、Vata)	
Bluggoe 亜族	
Bluggoebanana (orinoco (オリノコ) 及び「 burro 」としても知られる)	
Silver Bluggoebanana	
Pelipitabanana (Pelipia、Pilipia)	40
Saba 亜族	
Sababanana (Cardaba、Dippig)	
Cardababanana	
Benedettabanana	
【 0115 】	
ABBB 群	
マレーヤマバショウとリュウキュウバショウとの間の交雑種の四倍体栽培品種	
Tiparotbanana	
【 0116 】	
BB 群	50

二倍体リュウキュウバショウ (*Musa balbisiana*)、野生のバナナ
【0117】

B B B 群

三倍体リュウキュウバショウ、野生のバナナ及び栽培品種
Kluai Lep Chang Kut

【0118】

特定の実施形態によれば、上記植物は、植物細胞、例えば胚細胞懸濁液中の植物細胞である。

【0119】

特定の実施形態によれば、上記植物細胞はプロトプラストである。

10

【0120】

このプロトプラストはいずれかの植物組織、例えば根、葉、胚細胞懸濁液、カルス又は実生組織に由来する。

【0121】

本明細書で使用する場合、「エチレン生合成経路における成分」は、バナナにおけるエチレン生合成にとって必須であるポリペプチド、例えば酵素を指す。具体的には、Pechra (2010, Ethylene biosynthesis. Plant hormones: biosynthesis, transduction, action、第3版、Springer、ドルトレヒト (Dordrecht) 所収、115 - 136 頁) により総説されているように、エチレン生合成は、S - アデノシルメチオニン (SAM) から始まり、2つの鍵となる工程を備える (図1)。

20

【0122】

エチレンの生合成経路は、S - アデノシル - メチオニン (AdoMet、SAM) シンターゼによるメチオニンの AdoMet への変換を含む。1 - アミノシクロプロパン - 1 - カルボン酸シンターゼ (ACS) [EC 4.4.1.14] は、SAM の 1 - アミノシクロプロパン - 1 - カルボン酸 (ACC) への環化を触媒し、この環化は、この経路における律速反応と考えられることが多い。ACS は、5' - メチルチオアデノシン (MTA) も生成し、MTA はメチオニンを生成するために再利用される。最終工程である、ACC のエチレンへの酸素依存的変換は ACC オキシダーゼ (ACO) [EC 1.14.17.4] により触媒される。ACC は、ACC の炭素 C - 2 及び C - 3 の修飾によりエチレンへと変換されるが、C - 1 はシアニドへと変換され、カルボキシル基は二酸化炭素へと変換される。

30

【0123】

特定の実施形態によれば、上記 AdoMet シンターゼはバナナ AdoMet である。

【0124】

すべての受入番号は、Pahang (2n = 22) アセンブリ、第2版と名付けられた生殖質コレクション系統の公開されているゲノム *M. acuminata* (マレーヤマバショウ) 倍加半数体に対応する。

【0125】

すべての受入番号は、Pahang (2n = 22) アセンブリ、第2版と名付けられた生殖質コレクション系統の公開されているゲノム *M. acuminata* (マレーヤマバショウ) 倍加半数体に対応する。

40

【0126】

特定の実施形態によれば、ACS は以下のものである。

- > Ma01__g07800.1 (配列番号 1)
- > Ma01__g12130.1 (配列番号 2) ;
- > Ma02__g10500.1 (配列番号 3) ;
- > Ma03__g12030.1 (配列番号 4) ;
- > Ma03__g27050.1 (配列番号 5) ;
- > Ma04__g01260.1 (配列番号 6) ;

50

> M a 0 4 __ g 2 4 2 3 0 . 1 (配列番号 7) ;
 > M a 0 4 __ g 3 1 4 9 0 . 1 (配列番号 8) ;
 > M a 0 4 __ g 3 5 6 4 0 . 1 (配列番号 9) ;
 > M a 0 4 __ g 3 7 4 0 0 . 1 (配列番号 10) ;
 > M a 0 5 __ g 0 8 5 8 0 . 1 (配列番号 11) ;
 > M a 0 5 __ g 1 3 7 0 0 . 1 (配列番号 12) ;
 > M a 0 9 __ g 1 9 1 5 0 . 1 (配列番号 13) ; 又は
 > M a 1 0 __ g 2 7 5 1 0 . 1 (配列番号 14)

【 0 1 2 7 】

特定の実施形態によれば、A C O は以下のものである。

10

> M a 0 9 __ g 0 4 3 7 0 . 1 (配列番号 15) ;
 > M a 0 6 __ g 1 7 1 6 0 . 1 (配列番号 16) ;
 > M a 1 1 __ g 0 5 4 9 0 . 1 (配列番号 17) ;
 > M a 0 0 __ g 0 4 4 9 0 . 1 (配列番号 18) ;
 > M a 0 7 __ g 1 5 4 3 0 . 1 (配列番号 19) ;
 > M a 0 1 __ g 1 1 5 4 0 . 1 (配列番号 20) ;
 > M a 1 0 __ g 1 6 1 0 0 . 1 (配列番号 21) ;
 > M a 0 5 __ g 0 8 1 7 0 . 1 (配列番号 22) ;
 > M a 0 6 __ g 1 4 4 3 0 . 1 (配列番号 23) ;
 > M a 0 5 __ g 0 9 3 6 0 . 1 (配列番号 24) ;
 > M a 1 1 __ g 2 2 1 7 0 . 1 (配列番号 25) ;
 > M a 0 5 __ g 3 1 6 9 0 . 1 (配列番号 26) ;
 > M a 0 7 __ g 1 9 7 3 0 . 1 (配列番号 27) ;
 > M a 0 6 __ g 0 2 6 0 0 . 1 (配列番号 28) ;
 > M a 1 0 __ g 0 5 2 7 0 . 1 (配列番号 29) ;
 > M a 0 6 __ g 1 4 3 7 0 . 1 (配列番号 30) ;
 > M a 1 1 __ g 0 5 4 8 0 . 1 (配列番号 31) ;
 > M a 0 6 __ g 1 4 4 1 0 . 1 (配列番号 32) ;
 > M a 0 6 __ g 1 4 4 2 0 . 1 (配列番号 33) ;
 > M a 0 6 __ g 3 4 5 9 0 . 1 (配列番号 34) ;
 > M a 0 2 __ g 2 1 0 4 0 . 1 (配列番号 35) ;
 > M a 1 1 __ g 0 4 2 1 0 . 1 (配列番号 36) ;
 > M a 0 5 __ g 1 2 6 0 0 . 1 (配列番号 37) ;
 > M a 0 4 __ g 2 3 3 9 0 . 2 (配列番号 38) ;
 > M a 0 3 __ g 0 6 9 7 0 . 1 (配列番号 39) ;
 > M a 0 5 __ g 0 9 9 8 0 . 1 (配列番号 40) ;
 > M a 0 4 __ g 3 6 6 4 0 . 1 (配列番号 41) ;
 > M a 1 1 __ g 0 4 1 8 0 . 1 (配列番号 42) ;
 > M a 1 1 __ g 0 2 6 5 0 . 1 (配列番号 43) ; 又は
 > M a 0 0 __ g 0 4 7 7 0 . 1 (配列番号 44)

20

30

40

【 0 1 2 8 】

特定の実施形態によれば、A C O は、M a 0 1 __ g 1 1 5 4 0 . 1 (配列番号 20) 及び / 又は M a 0 7 __ g 1 9 7 3 0 . 1 (配列番号 27) である。

【 0 1 2 9 】

特定の実施形態によれば、A C S は、M a 0 9 __ g 1 9 1 5 0 . 1 (配列番号 13)、M a 0 4 __ g 3 5 6 4 0 . 1 (配列番号 9) 及び / 又は M a 0 4 __ g 3 1 4 9 0 . 1 (配列番号 8) である。

【 0 1 3 0 】

上記遺伝子のうちの各々のものの天然に存在する機能的ホモログであって、例えば、上記の遺伝子に対して少なくとも少なくとも 80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、8

50

5 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %又は99 %の同一性を提示し上で定義されたとおりACS活性又はACO活性を有するものも想定される。

【0131】

本明細書で使用する場合、「配列同一性」又は「同一性」又は2つの核酸配列若しくはポリペプチド配列に関して本明細書で使用する文字通りの等価物は、整列させた（配列比較した）ときに同じである2つの配列の中の残基への言及を含む。タンパク質に言及する際に配列同一性のパーセントが使用される場合、同一ではない残基位置は保存的アミノ酸置換によって異なっていることが多く、保存的アミノ酸置換ではアミノ酸残基が類似の化学特性（例えば電荷又は疎水性）を有する他のアミノ酸残基に置換され、それゆえ分子の機能的特性を変化させないということが認識される。配列が保存的置換において異なる場合、パーセント配列同一性は、置換の保存的性質について補正するために上向きに調整されてもよい。このような保存的置換によって異なる配列は「配列類似性」又は「類似性」を有すると考えられる。この調整を行うための手段は当業者にとって周知である。典型的には、これは保存的置換を完全ミスマッチよりはむしろ部分ミスマッチとして点数化し、これによりパーセント配列同一性を大きい値にすることを伴う。このように、例えば、同一のアミノ酸がスコア1を与えられ、非保存的置換がスコア0を与えられる場合、保存的置換は0と1の間のスコアが与えられる。保存的置換の点数化は、例えばHenikoff S及びHenikoff J G.のアルゴリズム[Amino acid substitution matrices from protein blocks. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1992, 89(22):10915-9]に従って算出される。

【0132】

同一性は、例えば国立生物工学情報センター(National Center of Biotechnology Information:NCBI)のBlastNソフトウェアを含むいずれかの相同性比較ソフトウェアを使用して、例えばデフォルトパラメータを使用することにより決定することができる。

【0133】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記同一性は、全体的な同一性、すなわち、本発明の核酸配列全体にわたる同一性であり、その一部分にわたる同一性ではない。

【0134】

本明細書で使用する場合、「植物」は、植物全体（1又は複数）、接ぎ木された植物、これらの植物及び植物部分の祖先及び子孫を指し、種子、果実、苗条、茎、根（塊茎を含む）、台木、若枝、並びに植物の細胞、組織及び器官を含む。

【0135】

上記植物は、懸濁培養液、プロトプラスト、胚、成長点領域、カルス組織、葉、配偶体、孢子体、花粉、及び小孢子を含めたいずれの形態にあってもよい。

【0136】

特定の実施形態によれば、上記植物部分はDNAを含む。

【0137】

特定の実施形態によれば、上記バナナ植物は、バナナ育種系統、より好ましくはエリート系統のものである。

【0138】

特定の実施形態によれば、上記バナナ植物はエリート系統のものである。

【0139】

特定の実施形態によれば、上記バナナ植物は純粋種系統のものである。

【0140】

特定の実施形態によれば、上記バナナ植物は、バナナ変種又は育種対象の生殖質(breeding germplasm)のものである。

【0141】

用語「育種系統」は、本明細書で使用する場合、野生の変種又は在来種とは異なり、商業的に価値があるか又は農学的に望ましい特徴を有する、栽培されるバナナの系統を指す。この用語は、エリート育種系統又はエリート系統への言及を含み、このエリート育種系統又はエリート系統は、商業用のF₁雑種を生産するために使用される実質的にホモ接合の系統の、通常近交系の植物を表す。エリート育種系統は、多数の農学的に望ましい形質を含むより優れた農学的性能のための育種及び選択により得られる。エリート植物は、エリート系統由来のあらゆる植物である。より優れた農学的性能は、本明細書中に規定される農学的に望ましい形質の所望の組み合わせを指し、その農学的に望ましい形質の大部分、好ましくはすべてが、非エリート育種系統と比べてエリート育種系統において向上していることが望ましい。エリート育種系統は、実質的にホモ接合性であり、好ましくは近交系である。

10

【0142】

用語「エリート系統」は、本明細書で使用する場合、より優れた農学的性能のための育種及び選択から得られたあらゆる系統を指す。エリート系統は、好ましくは、複数の、好ましくは少なくとも3、4、5、6又はこれ以上の本明細書に規定される望ましい農学的形質（のための遺伝子）を有する系統である。

【0143】

用語「栽培品種」及び「変種」は、本明細書中で互換的に使用され、商業化される目的、例えば、自身による消費又は商業化用に農産物を生産するために農業者及び栽培者によって使用される目的で育種、例えば、交雑及び選択によって意図的に開発された植物を表す。用語「育種対象の生殖質」は、「野生」状態以外の生物の状態を有する植物を表し、この「野生」状態は、植物又は系統種の本来の栽培されていない状態、又は天然状態を意味する。

20

【0144】

用語「育種対象の生殖質」としては、半自然、半野生、雑草、伝統的栽培品種、在来種、育種材料、研究材料、育種用系統、合成集団、雑種、創始株（founder stock）/基礎集団、近交系（雑種栽培品種の親）、分離集団、変異体/遺伝材料（genetic stock）、市場クラス及び後生的な/改良された栽培品種が挙げられるが、これらに限定されない。本明細書で使用する場合、用語「純粋種」、「純系」又は「近交系」は、互換的であり、反復的な自家受粉及び/又は戻し交配によって得られる実質的にホモ接合性の植物又は植物系統を指す。

30

【0145】

本明細書で使用する場合、「ゲノムを改変する（こと）」は、バナナのエチレン生合成経路における成分をコードする少なくとも1つの対立遺伝子に少なくとも1つの変異を導入することを指す。いくつかの実施形態によれば、改変（すること）は、エチレン生合成経路における成分の各対立遺伝子に変異を導入することを指す。少なくともいくつかの実施形態によれば、上記エチレン生合成経路における上記成分の2つの対立遺伝子上の変異はホモ接合型である

【0146】

いくつかの実施形態によれば、エチレン生合成経路における成分をコードする2つの対立遺伝子上の変異は非相補的である。

40

【0147】

特定の実施形態によれば、上記DNA編集剤は、上記エチレン生合成経路における成分の標的配列を改変し、「オフターゲット」活性を欠く、すなわちバナナゲノムの中の他の配列を改変しない。

【0148】

特定の実施形態によれば、上記DNA編集剤は、バナナゲノム中の非必須遺伝子に対する「オフターゲット活性」を備える。

【0149】

非必須は、上記DNA編集剤を用いて改変されたときに、農業的に価値ある態様（例え

50

ば、栄養価、香り、バイオマス、収量、生物的／非生物的なストレス耐性等）で標的ゲノムの表現型に影響を及ぼさない遺伝子を指す。

【 0 1 5 0 】

オフターゲット作用は、当該技術分野で周知であり本明細書に記載される方法を使用してアッセイすることができる。

【 0 1 5 1 】

本明細書で使用する場合、「機能喪失型」変異は、エチレン生合成経路の成分がエチレン又はその前駆体の合成を促進する能力の低下（すなわち、機能障害）又はエチレン又はその前駆体の合成を促進することができなくなることを生じるゲノム異常を指す。

【 0 1 5 2 】

本明細書で使用する場合、「能力の低下」は、その機能喪失型変異を欠く野生型酵素のエチレン生合成経路活性（すなわち、エチレンの合成）と比べて低下したエチレン生合成経路活性中の上記成分の活性を指す。特定の実施形態によれば、活性の低下は、同じアッセイ条件下での野生型酵素の活性と比べて、少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%又はこれ以上にもなる。エチレン生合成は、ガスクロマトグラフィー（GC）又はレーザーベースのアッセイにより小さい植物片において測定することができる（Cristescu SM, Mandon J, Arslanov D, De Pessemier J, Hermans C, Harren FJM. Current methods for detecting ethylene in plants. Ann Bot - London. 2013; 111(3): 347-60）。

【 0 1 5 3 】

特定の実施形態によれば、上記機能喪失型変異は、（エチレン生合成経路の成分をコードする遺伝子における異常の場所によっては）エチレン生合成経路の成分、mRNA又はタンパク質、の発現を生じない。

【 0 1 5 4 】

特定の実施形態によれば、上記機能喪失型変異は、エチレン生合成経路の上記成分の発現を生じるが、この成分はエチレン若しくはその前駆体を合成することができないか、又は非効率的にしか合成できない。

【 0 1 5 5 】

特定の実施形態によれば、上記機能喪失型変異は、欠失、挿入、挿入 - 欠失（インデル）、逆位、置換及びこれらの組み合わせ（例えば、欠失及び置換、例えば欠失及びSNP）からなる群から選択される。

【 0 1 5 6 】

特定の実施形態によれば、上記機能喪失型変異は、1 Kb未満又は0.1 Kb未満である。

【 0 1 5 7 】

特定の実施形態によれば、「機能喪失型」変異は、何らかの発現産物の生成を阻害するようにエチレン生合成経路の成分をコードする遺伝子の5'にある（例えば、エクソン1）。

【 0 1 5 8 】

特定の実施形態によれば、この「機能喪失型」変異は、エチレン又はその前駆体の合成を促進する（エチレン又はその前駆体の合成に寄与する）ことができないままの発現産物、すなわち、不活性タンパク質の産生を可能にする遺伝子の中のいずれかにある。この遺伝子の調節エレメント、例えばプロモーターにおける変異も本明細書に提示される。

【 0 1 5 9 】

上述のように、当該バナナ植物は、エチレン生合成経路の成分をコードする遺伝子の少なくとも1つの対立遺伝子における機能喪失型変異を含む。

【 0 1 6 0 】

特定の実施形態によれば、上記変異はホモ接合性である。

10

20

30

40

50

【 0 1 6 1 】

一態様によれば、バナナの貯蔵寿命の延長方法であって、

(a) バナナ植物細胞を、バナナのエチレン生合成経路における成分をコードする核酸配列に向けられた D N A 編集剤に供し、上記エチレン生合成経路をコードする核酸配列の中に機能喪失型変異を生じる工程と、

(b) 上記植物細胞から植物を再生する工程とを備える方法が提供される。

【 0 1 6 2 】

特定の実施形態によれば、当該方法は、上記植物から果実を収穫する工程をさらに備える。

【 0 1 6 3 】

特定の実施形態によれば、果実は、追熟の 7 ~ 1 4 日前にまだ緑色で堅いまま収穫される。各バナナ成体植物は単一の果房を生成し、この果房は多くのバナナ果実又は「子房」によって形成されており、バナナ果実又は「子房」はいくつかの果段で房になっている (F A O 、 2 0 1 4) 。バナナの果房は、鋭利な弓なりのナイフ又はマチェーテを使用して「果段」によって切断される (通常 2 ~ 3 人が関与する) 。

【 0 1 6 4 】

本明細書で使用する場合、「貯蔵寿命の延長」は、当該技術分野で周知である方法 (後述の実施例の節を参照) によってアッセイされる場合に、上記機能喪失型変異を含まない同じ遺伝的背景のバナナ植物の貯蔵寿命と比べて、そして貯蔵寿命によって明らかにされると、ゲノムに機能喪失型変異 (本明細書に記載されるとおり) を有する収穫されたバナナ果実の貯蔵寿命の少なくとも 1 0 % 、 2 0 % 、 3 0 % 、 4 0 % 、 5 0 % 、 6 0 % 、 7 0 % 、 8 0 % 、 8 5 % 、 9 0 % 又はさらには 9 5 % の延長を指す。貯蔵寿命は、果実の色及び粘稠度を追跡することにより推定される。

【 0 1 6 5 】

以降は、核酸変更を目的の遺伝子に導入するために使用される方法及び D N A 編集剤、並びにそれを実行するために本開示の特定の実施形態に従って使用することができる薬剤の種々の非限定的な例の説明である。

【 0 1 6 6 】

遺伝子操作されたエンドヌクレアーゼを使用するゲノム編集 - このアプローチは、典型的にはゲノム中の所望の場所 (1 又は複数) で二本鎖を切断し、特定の二本鎖切断を作り出すために人工的に遺伝子操作されたヌクレアーゼを使用する逆遺伝学的方法を指し、この二本鎖切断は、次に相同組換え (H R) 又は非同源末端結合 (N H E J) 等の細胞の内因的過程により修復される。 N H E J は二本鎖切断の D N A 末端に直接結合するが、 H R は、失われた D N A 配列を切断部位で再生するための鋳型 (すなわち、 S 期の間に形成される姉妹染色分体) として相同的なドナー配列を利用する。特定のヌクレオチド改変をゲノム D N A に導入するために、所望の配列を含有するドナー D N A 修復鋳型が H R の際に存在する必要がある (外因的に提供される一本鎖 D N A 又は二本鎖 D N A) 。

【 0 1 6 7 】

ゲノム編集は、従来からの制限エンドヌクレアーゼを使用して実施することができない。なぜなら、多くの制限酵素は D N A 上の数個の塩基対をその標的として認識し、これらの配列がゲノムにわたって多くの場所で見出されることになることが多く、所望の場所に限定されない複数の切断部位を生じるからである。この課題を克服し部位特異的な単鎖切断又は二本鎖切断を作り出すために、いくつかの別個のクラスのヌクレアーゼがこれまでに発見され生物工学的に扱われてきた。これらとしては、メガヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (Z F N) 、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (T A L E N) 及び C R I S P R / C a s システムが挙げられる。

【 0 1 6 8 】

メガヌクレアーゼ - メガヌクレアーゼは、一般に 4 つのファミリーに分類される : L A G L I D A D G ファミリー、 G I Y - Y I G ファミリー、 H i s - C y s ボックスファ

10

20

30

40

50

ミリー及びHNHファミリー。これらのファミリーは、触媒活性及び認識配列に影響を及ぼす構造モチーフを特徴とする。例えば、LAGLIDADGファミリーのメンバーは、保存されたLAGLIDADGモチーフの1コピー又は2コピーのいずれかを有することを特徴とする。これら4ファミリーのメガヌクレアーゼは、保存された構造要素に関して、従ってDNA認識配列特異性及び触媒活性に関して互いに大きく隔てられている。メガヌクレアーゼは、微生物種において一般に見出され、非常に長い認識配列(>14bp)を有するというユニークな特性を有し、このためメガヌクレアーゼは、天然に、所望の場所での切断に非常に特異的なものになっている。

【0169】

これは、ゲノム編集において部位特異的二本鎖切断を行うために活用することができる。当業者はこれらの天然に存在するメガヌクレアーゼを使用することができるが、しかしながら、このような天然に存在するメガヌクレアーゼの数は限られている。この課題を克服するべく、ユニークな配列を認識するメガヌクレアーゼ変異体を作り出すために、変異生成及び高スループットスクリーニング方法が使用されてきた。例えば、種々のメガヌクレアーゼが融合され、新しい配列を認識するハイブリッド酵素が作り出されてきた。

【0170】

あるいは、メガヌクレアーゼのDNA相互作用性のアミノ酸を、配列特異的メガヌクレアーゼを設計するために変更することができる(例えば、米国特許第8,021,867号明細書を参照)。メガヌクレアーゼは、例えば、Certo, MTR、Nature Methods(2012) 9:073-975;米国特許第8,304,222号明細書;米国特許第8,021,867号明細書;米国特許第8,119,381号明細書;米国特許第8,124,369号明細書;米国特許第8,129,134号明細書;米国特許第8,133,697号明細書;米国特許第8,143,015号明細書;米国特許第8,143,016号明細書;米国特許第8,148,098号明細書;又は米国特許第8,163,514号明細書に記載されている方法を使用して設計することができ、これらの各々の内容は、参照によりその全体を本明細書に援用する。あるいは、部位特異的な切断特性を有するメガヌクレアーゼを、市販の技術、例えばプレシジョン・バイオサイエンス(Precision Biosciences)のDirected Nuclease Editor(商標)ゲノム編集技術を使用して得ることができる。

【0171】

ZFN及びTALEN - 遺伝子操作されたヌクレアーゼの2つの別個のクラス、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)及び転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)は、ともに、標的の二本鎖切断を生成することに有効であることが明らかになっている(Christianら、2010;Kimら、1996;Liら、2011;Mahfouzら、2011;Millerら、2010)。

【0172】

基本的に、ZFN及びTALENの制限エンドヌクレアーゼ技術は、特定のDNA結合ドメイン(それぞれ、一列のジンクフィンガードメイン又はTALEリピート)に連結されている非特異的なDNA切断酵素を利用する。典型的には、DNA認識部位及び切断部位が互いに隔てられている制限酵素が選択される。切断性部分が分離され、次いでDNA結合ドメインに連結され、これにより所望の配列に対して非常に高い特異性を有するエンドヌクレアーゼが得られる。このような特性を有する例示的な制限酵素はFokIである。加えて、FokIは、ヌクレアーゼ活性を有するには二量化を必要とするという利点を有し、これは、各ヌクレアーゼパートナーがユニークなDNA配列を認識するため特異性が劇的に増すことを意味する。この効果を増強するため、ヘテロ二量体として機能できるだけであり増大した触媒活性を有するFokIヌクレアーゼが遺伝子操作された。ヘテロ二量体機能性のヌクレアーゼは、望ましくないホモ二量体活性の可能性を回避し、従って二本鎖切断の特異性を高める。

【0173】

このように、例えば特定部位を標的にするために、ZFN及びTALENは、ヌクレア

10

20

30

40

50

ーゼ対として構築され、この対の各メンバーは、標的部位で隣接する配列に結合するように設計される。細胞における一過性発現の際に、ヌクレアーゼはその標的部位に結合し、FokIドメインはヘテロ二量化して二本鎖切断を作り出す。非相同末端結合(NHEJ)経路によるこれらの二本鎖切断の修復は、小さい欠失又は小さい配列挿入を生じることが多い。NHEJによってなされる各修復はユニークであるので、単一のヌクレアーゼ対の使用により、標的部位に一定範囲の異なる欠失を有する対立遺伝子の系列を生成することができる。

【0174】

一般に、NHEJは比較的正確であり(ヒトの細胞のDSBの約85%が検出から約30分以内にNHEJによって修復される)、遺伝子編集では、NHEJのエラーが頼られる。というのも、修復が正確であるとき、ヌクレアーゼは、修復産物に変異原性であり認識/切断部位/PAMモチーフが消失/変異されるまで、又は一過性に導入されたヌクレアーゼがもはや存在しなくなるまで切断を続けることになるからである。

【0175】

欠失は、典型的には長さが数塩基対~数百塩基対のいずれの範囲にも及ぶが、より大きい欠失が、2対のヌクレアーゼを同時に使用することにより、細胞培養液中で成功裏に生成されている(Carlsonら、2012;Leeら、2010)。加えて、標的の領域に対する相同性を有するDNAの断片(フラグメント)が上記ヌクレアーゼ対と併用されて導入されるとき、上記二本鎖切断は相同組換え(HR)を経由して修復され、特定の改変が生成されうる(Liら、2011;Millerら、2010;Urnovら、2005)。

【0176】

ZFN及びTALENの両方のヌクレアーゼ部分は類似の特性を有するが、これらの遺伝子操作されたヌクレアーゼの間の差は、それらのDNA認識ペプチドにある。ZFNは、Cys2-His2ジンクフィンガーに依存し、TALENはTALEに依存する。これらのDNA認識ペプチドドメインはともに、それらドメインが組み合わせでそれらのタンパク質に天然に見出されるという特徴を有する。Cys2-His2ジンクフィンガーは、通常3bp離れたリピートで見出され、様々な核酸相互作用性のタンパク質で多様な組み合わせで見出される。他方、TALEは、リピートにおいて上記アミノ酸と認識されたヌクレオチド対との間の1対1の認識比で見出される。ジンクフィンガー及びTALEはともに繰り返しパターンで起こるため、異なる組み合わせを試して、実に様々な配列特異性を作り出すことができる。部位特異的ジンクフィンガーエンドヌクレアーゼを作製するためのアプローチとしては、例えば、とりわけ、モジュールアセンブリ(三塩基配列と関係づけられたジンクフィンガーが一列につなが合わされ、必要とされる配列をカバーするようにする)、OPEN(ペプチドドメイン対三塩基ヌクレオチドの低ストリンジェンシー選抜、及びその後の細菌系におけるペプチド組み合わせ対最終の標的の高ストリンジェンシー選抜)、及びジンクフィンガーライブラリーの細菌ワンハイブリッドスクリーニングが挙げられる。ZFNは、例えばSangamo Biosciences(商標)(リッチモンド(Richmond)、カリフォルニア州)から商業的に設計及び入手することもできる。

【0177】

TALENを設計及び入手するための方法は、例えばReyonら、Nature Biotechnology 2012 May;30(5):460-5;Millerら、Nat Biotechnol.(2011)29:143-148;Cermakら、Nucleic Acids Research(2011)39(12):e82及びZhangら、Nature Biotechnology(2011)29(2):149-53に記載されている。Mojo Handと名付けられた最近開発されたウェブベースのプログラムが、Mayo Clinicによって、ゲノム編集への応用のためのTAL及びTALEN構築物を設計するために導入された(www.talendesig.orgによってアクセスすることができる)。TALENは、例えば、Sanga

10

20

30

40

50

mo Biosciences (商標) (リッチモンド (Richmond)、カリフォルニア州) から商業的に設計及び入手することもできる。

【0178】

T-GEESシステム (Target Gene's Genome Editing Engine) - ポリペプチド部分及び特異性付与核酸 (specificity conferring nucleic acid: SCNA) を含有する、インビボで、標的細胞中で会合し所定の標的核酸配列と相互作用することができるプログラム可能な核タンパク質分子複合体が提供されている。このプログラム可能な核タンパク質分子複合体は、標的核酸配列内の標的部位を特異的に改変及び/若しくは編集すること、並びに/又はその標的核酸配列の機能を改変することができる。核タンパク質組成物は、(a) キメラポリペプチドをコードし、(i) 標的部位を改変することができる機能ドメイン、及び(ii) 特異性付与核酸と相互作用することができる連結ドメインを含むポリヌクレオチド分子と、(b) (i) 標的部位に隣接している標的核酸の領域に相補的なヌクレオチド配列、及び(ii) 上記ポリペプチドの連結ドメインに特異的に結合することができる認識領域を含む特異性付与核酸 (SCNA) とを含む。この組成物は、特異性付与核酸及び標的核酸の塩基対形成を通しての標的核酸に対する分子複合体の高い特異性及び結合能力を用いて、所定の核酸配列標的を正確に、信頼性高くかつ費用効率よく改変することを可能にする。この組成物は、遺伝毒性がより低く、そのアセンブリがモジュール式であり、カスタマイズを要しない単一のプラットフォームを利用し、専門の中核施設の外での独立の使用にとって実用的であり、かつより短い開発期間及び低減されたコストを有する。

【0179】

CRISPR-Casシステム (本明細書で「CRISPR」とも呼ばれる) - 多くの細菌及び古細菌は、侵入するファージ及びプラスミドの核酸を分解することができる内在性のRNAベースの適応免疫系を含有する。これらのシステムは、RNA成分を産生するclustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR: クラスター化され、規則的に間隔があいた短い回文構造の繰り返し) ヌクレオチド配列と、タンパク質成分をコードするCRISPR associated (Cas) 遺伝子とからなる。このCRISPR RNA (crRNA) は、特定のウイルス及びプラスミドのDNAに対して相同性を有する短鎖を含有し、Casヌクレアーゼを対応する病原体の相補的核酸を分解するように導くガイドとして作用する。Streptococcus pyogenes (化膿レンサ球菌) のII型CRISPR/Casシステムの研究により、下記の3つの成分がRNA/タンパク質複合体を形成し、一緒になれば配列特異的ヌクレアーゼ活性には十分であることが示された: Cas9ヌクレアーゼ、標的配列に対して相同性を有する20塩基対を含有するcrRNA、及びトランス活性化型crRNA (tracrRNA) (Jinekら、Science (2012) 337: 816-821.)。

【0180】

crRNAとtracrRNAとの融合物から構成される合成のキメラのガイドRNA (gRNA) が、Cas9を、crRNAに相補的なDNA標的をインビトロで開裂させるように導くことができるということがさらに実証された。合成gRNAと併用したCas9の一過性発現は、様々な異なる種において標的とされた二本鎖切断を生成するために使用することができるということも実証された (Choiら、2013; Congら、2013; DiCarloら、2013; Hwangら、2013a, b; Jinekら、2013; Maliら、2013)。

【0181】

ゲノム編集のためのCRISPR/Casシステムは、2つの明確に異なる成分、gRNA及びエンドヌクレアーゼ、例えばCas9を含有する。

【0182】

gRNAは、典型的には、標的相同配列 (crRNA) と、crRNAを単一のキメラ転写物の中でCas9ヌクレアーゼに連結する内在性の細菌RNA (tracrRNA)

との組み合わせをコードする20ヌクレオチド配列である。このgRNA/Cas9複合体は、gRNA配列と相補的ゲノムDNAとの間の塩基対形成により標的配列に動員される。Cas9の結合の成功のために、ゲノム標的配列は、標的配列直下に正しいプロトSpacer隣接モチーフ(Protospacer Adjacent Motif: PAM)配列も含有する必要がある。gRNA/Cas9複合体の結合はCas9をゲノム標的配列に局在化させ、これによりCas9はDNAの両方の鎖を切断して二本鎖切断を引き起こすことができる。ZFN及びTALENを用いる場合のように、CRISPR/Casによって生成されたこの二本鎖切断は、HR(相同組換え)又はNHEJ(非相同末端結合)により修復されることが可能で、DNA修復の間の特異的配列改変を受けやすい。

【0183】

Cas9ヌクレアーゼは、2つの機能ドメイン、RuvC及びHNH、を有し、これらは各々異なるDNA鎖を切断する。これらのドメインの両方が活性であるとき、Cas9は、ゲノムDNAにおいて二本鎖切断を引き起こす。

【0184】

CRISPR/Casの顕著な優位点は、合成gRNAを簡単に作り出すことができることと合わせたこのシステムの高効率である。これは、異なるゲノム部位での改変物を標的にする、及び/又は同じ部位の異なる改変物を標的にするように容易に改変されることが可能なシステムを作り出す。加えて、複数の遺伝子の同時ターゲティングを可能にするプロトコルが確立されている。変異を有する細胞の大部分は、標的とされた遺伝子において二対立遺伝子変異を提示する。

【0185】

しかしながら、gRNA配列とゲノムDNA標的配列との間の塩基対形成相互作用におけるみかけの柔軟性により、標的配列に対する不完全なマッチもCas9によって切断されることが可能になる。

【0186】

単一の不活性触媒ドメイン、RuvCドメイン又はHNHドメイン、のいずれかを含有するCas9酵素の改変型は「ニッカーゼ」と呼ばれる。ただ1つの活性なヌクレアーゼドメインを有するため、Cas9ニッカーゼは、標的DNAの一本の鎖だけを切断し、単鎖切断又は「ニック」を生じる。単鎖切断、又はニック、は、PARP(センサー)及びXRCC1/LIG III複合体(ライゲーション)等(これらに限定されない)のタンパク質が関与する単鎖切断修復機構によりたいてい修復される。単鎖切断(SSB)がトポイソメラーゼI毒(ポイズン)により、又は天然に存在するSSBでPARP1を捕捉する薬物により生成されれば、これらは存在し続けるであろうし、その細胞がS期に入り、複製フォークがそのようなSSBに遭遇すれば、このようなSSBは末端を1つしか持たないDSB(single ended DSB)になり、これはHRによって修復できるだけである。しかしながら、Cas9ニッカーゼによって導入された2つの近接する反対鎖のニックは、「ダブルニック」CRISPRシステムと呼ばれることが多いものにおいて二本鎖切断として処理される。基本的に非平行DSBであるダブルニックは、他のDSBのように、遺伝子標的に対する所望の効果、ドナー配列の存在、及び細胞周期の期(HRは存在量が非常に低く、細胞周期のS期及びG2期においてのみ起こることができる)に応じてHR又はNHEJによって修復されることが可能である。このように、特異性及び低下したオフターゲット作用が非常に重要である場合、ごく近傍にありゲノムDNAの反対鎖上にある複数の標的配列を用いて2つのgRNAを設計することによりダブルニックを作り出すためにCas9ニッカーゼを使用することで、オフターゲット作用が低減されるであろう。というのも、いずれのgRNA単独では、ゲノムDNAを変えることが不可能ではないとしてもこれらのイベントの可能性が高くないニックを生じるであろうからである。

【0187】

2つの不活性触媒ドメインを含有するCas9酵素の改変型(dead Cas9、又はdCas9)は、gRNA特異性に基づいてDNAに結合することはなお可能であるが

10

20

30

40

50

、ヌクレアーゼ活性を有しない。この d C a s 9 は、DNA 転写制御因子が不活性酵素を既知の制御ドメインに融合することにより遺伝子発現を活性化又は抑制するためのプラットフォームとして利用することができる。例えば、ゲノム DNA 中の標的配列に d C a s 9 単独で結合することで遺伝子転写を妨げることができる。

【0188】

標的配列を選択及び/又は設計するのに支援するために利用できるツール、並びに様々な種の様々な遺伝子について生物情報学的に決定されたユニークな g R N A のリストがいくつか公開されており、例えば F e n g Z h a n g 研究室の T a r g e t F i n d e r 、 M i c h a e l B o u t r o s 研究室の T a r g e t F i n d e r (E - C R I S P) 、 R G E N T o o l s : C a s - O F F i n d e r 、 C a s F i n d e r : ゲノム中の特定の C a s 9 標的を特定するための F l e x i b l e アルゴリズム、及び C R I S P R O p t i m a l T a r g e t F i n d e r がある。

10

【0189】

本開示において使用することができる g R N A の非限定的な例としては、後述する実施例の節に記載されるものが挙げられる。

【0190】

C R I S P R システムを使用するためには、g R N A 及び C a s 9 の両方が標的細胞の中に存在するか、又はリボ核タンパク質複合体として送達される必要がある。挿入ベクターが単一のプラスミドに両方のカセットを含有してもよいし、又はそれらのカセットは2つの別個のプラスミドから発現される。C R I S P R プラスミドは、A d d g e n e からの p x 3 3 0 プラスミド等、市販されている。また、植物ゲノムを改変するための、c l u s t e r e d r e g u l a r l y i n t e r s p a c e d s h o r t p a l i n d r o m i c r e p e a t s (C R I S P R) - a s s o c i a t e d (C a s) - ガイドRNA 技術及び C a s エンドヌクレアーゼの使用は、S v i t a s h e v ら、2 0 1 5 , P l a n t P h y s i o l o g y , 1 6 9 (2) : 9 3 1 - 9 4 5 ; K u m a r 及び J a i n , 2 0 1 5 , J E x p B o t 6 6 : 4 7 - 5 7 により、並びに米国特許出願公開第 2 0 1 5 0 0 8 2 4 7 8 号に少なくとも開示されており、これらは個々に参照によりその全体を本明細書に援用される。

20

【0191】

「ヒットエンドラン (h i t a n d r u n) 」又は「インアウト (i n - o u t) 」 - は 2 工程組換え手順を伴う。第 1 工程では、正 / 負二重選択マーカーカセットを含有する挿入型ベクターが使用され、所望の配列変更が導入される。この挿入ベクターは、標的座位に対して相同性を有する単一の連続領域を含有し、目的の変異を保有するように改変される。このターゲティング構築物は、相同性を有する領域内の 1 つの部位で制限酵素を用いて線状化され、細胞に導入され、正の選択が実施されて、相同組換えイベントが単離される。相同配列を保有する DNA は、プラスミド、一本鎖又は二本鎖のオリゴとして提供されてもよい。これらの相同的な組換え体は、選択カセットを含めた介在するベクター配列によって隔てられている局所的な重複を含有する。第 2 工程では、標的クローンが、重複した配列間の染色体内組換えにより選択カセットを失った細胞を特定するための負の選択に供される。この局所的な組換えイベントは上記重複を除去し、組換えの部位に応じて、対立遺伝子は導入された変異を保持するか、又は野生型に復帰するかする。最終結果は、何らの外来性配列の保持もない所望の改変の導入である。

30

40

【0192】

「二重置換 (d o u b l e - r e p l a c e m e n t) 」又は「タグ及び交換 (t a g a n d e x c h a n g e) 」戦略 - は、上記ヒットエンドランアプローチに類似した 2 工程選択手順を伴うが、2 つの異なるターゲティング構築物の使用を必要とする。第 1 工程では、変異が導入されるべき場所の近くに正 / 負二重選択カセットを挿入するために、3 ' 及び 5 ' 相同性アームを有する標準的なターゲティングベクターが使用される。上記システム成分が細胞に導入されて正の選択がかけられた後で、H R イベントを特定することができよう。次に、所望の変異に相同性を有する領域を含有する第 2 ターゲティングベ

50

クターが標的クローンに導入され、負の選択がかけられ、上記選択カセットが除去され、変異が導入される。最終の対立遺伝子は、望まれない外来性配列を解消しつつ所望の変異を含有する。

【0193】

部位特異的リコンビナーゼ - P1バクテリオファージ由来のCreリコンビナーゼ及び酵母*Saccharomyces cerevisiae* (出芽酵母) 由来のFlpリコンビナーゼは、各々ユニークな34塩基対DNA配列(それぞれ「Lox」及び「FRT」と呼ばれる)を認識する部位特異的DNAリコンビナーゼであり、Lox部位又はFRT部位のいずれかに隣接している配列は、それぞれCreリコンビナーゼ又はFlpリコンビナーゼの発現の後に、部位特異的組換えにより容易に除去されることが可能である。例えば、Lox配列は、13塩基対逆方向リピートに隣接する非対称の8塩基対スペーサ領域から構成される。Creは、この13塩基対逆方向リピートに結合してスペーサ領域内の鎖切断及び再連結を触媒することにより、上記34塩基対Lox DNA配列を組換える。スペーサ領域でCreによってなされる突出型(staggered) DNA切断は6塩基対によって隔てられ、同じオーバーラップ領域を有する組換え部位だけが再結合することを確実にするための相同性センサーとして作用するオーバーラップ領域を与える。

10

【0194】

基本的に、部位特異的リコンビナーゼシステムは、相同組換えイベントの後の選択カセットの除去のための手段を与える。このシステムは、時間的に又は組織特異的に不活性化又は活性化されうる条件付きの変更された対立遺伝子の生成も可能にする。なお、Creリコンビナーゼ及びFlpリコンビナーゼは、34塩基対のLox又はFRTの「傷痕」を残す。残るLox又はFRT部位は、通常、改変された遺伝子座のイントロン又は3' UTRに残され、現在の証左は、これらの部位は、通常遺伝子機能を顕著には妨げないということを示唆する。

20

【0195】

このように、Cre/Lox及びFlp/FRT組換えは、目的の変異、2つのLox又はFRT配列及び典型的には2つのLox又はFRT配列の間に置かれた選択カセットを含有する3'及び5'相同性アームを持つターゲティングベクターの導入を伴う。正の選択がかけられ、目的の変異を含有する相同組換えイベントが特定される。負の選択と併用したCre又はFlpの一過性発現は、選択カセットの切除を生じ、カセットが失われた細胞を選択する。最終の目的の対立遺伝子は外来性の配列のLox又はFRT傷痕を含有する。

30

【0196】

特定の実施形態によれば、上記DNA編集剤はCRISPR-Cas9である。

【0197】

例示のgRNA配列が本明細書に提示される。

【0198】

>Ma04__g31490

GACTCTAAGATCAGGGTTAAAGG (配列番号45) ;

40

>Ma09__g19150 / Ma04__g35640 / Ma04__g31490

G C A G C T A A C A T C A G G G T T A A A G G (配列番号46)。

【0199】

特定の実施形態によれば、上記エチレン生合成経路における上記成分は、Ma09__g19150 (配列番号13)、Ma04__g35640 (配列番号9)、Ma04__g31490 (配列番号8)、Ma01__g11540 (配列番号20) 及びMa07__g19730 (配列番号27) からなる群から選択される。

【0200】

特定の実施形態によれば、上記エチレン生合成経路における上記成分は、Ma04__g35640 (配列番号9) 及びMa07__g19730 (配列番号27) からなる群から

50

選択される。

【0201】

特定の実施形態によれば、上記エチレン生合成経路における上記成分は、Ma09__g19150（配列番号13）、Ma04__g31490（配列番号8）及びMa01__g11540（配列番号20）からなる群から選択される。

【0202】

特定の実施形態によれば、上記DNA編集剤は、上記エチレン生合成経路における上記成分をコードする複数の核酸配列を特異的に標的とする核酸座標に向けられている。

【0203】

特定の実施形態によれば、上記DNA編集剤は、配列番号47～配列番号54（sgRNA：183、184、188、189、190、191、194及び195）からなる群から選択される核酸配列に少なくとも99%同一の核酸配列を含む。

10

【0204】

特定の実施形態によれば、上記DNA編集剤は、配列番号47（sgRNA：183）に示される核酸配列に少なくとも99%同一の核酸配列を含む。

【0205】

特定の実施形態によれば、上記DNA編集剤は、配列番号47（sgRNA：183）に示される核酸を含む。

【0206】

特定の実施形態によれば、上記DNA編集剤は、配列番号47～配列番号54（sgRNA：183、184、188、189、190、191、194及び195）に示される複数の核酸配列を含む。

20

【0207】

特定の実施形態によれば、上記DNA編集剤は、配列番号47、配列番号49及び/又は配列番号50（sgRNA：183、188、189）に示される複数の核酸配列を含む。

【0208】

特定の実施形態によれば、上記DNA編集剤は、配列番号51及び/又は配列番号53（sgRNA：190及び194）に示される複数の核酸配列を含む。

【0209】

上記DNA編集剤は、通常、発現ベクターを使用して植物細胞に導入される。

30

【0210】

このように、本発明の一態様によれば、バナナのエチレンの生合成の成分をコードする遺伝子にハイブリダイズし、上記遺伝子の編集を容易にすることができるDNA編集剤をコードする核酸配列を含む核酸構築物（コンストラクト）であって、この核酸配列が、上記DNA編集剤をバナナの細胞において発現するためのシス作用性調節エレメントに動作可能に連結されている核酸構築物が提供される。

【0211】

本発明の実施形態は、上記のもの等のあらゆるDNA編集剤に関する。

【0212】

特定の実施形態によれば、ゲノム編集剤は、エンドヌクレアーゼを含み、このエンドヌクレアーゼはDNAターゲティングモジュールの補助ユニット（例えば、sgRNA、又は本明細書中で「gRNA」とも呼ばれる）を含んでも又は有してもよい。

40

【0213】

特定の実施形態によれば、上記DNA編集剤はCRISPR/Cas9 sgRNAである。

【0214】

特定の実施形態によれば、当該核酸構築物は、DNA編集剤のエンドヌクレアーゼ（例えば、Cas9又は上記のエンドヌクレアーゼ）をコードする核酸配列をさらに含む。

【0215】

50

別の特定の実施形態によれば、上記エンドヌクレアーゼ及び sgRNA は異なる構築物からコードされ、これにより各々が、植物細胞において活性なシス作用性調節エレメント（例えば、プロモーター）に動作可能に連結される。

【0216】

本発明のいくつかの実施形態の特定の実施形態では、調節配列は植物で発現可能なプロモーターである。

【0217】

いくつかの実施形態に係る方法において有用な構築物は、当業者にとっては周知である組換え DNA 技術を使用して構築されてよい。このような構築物は、市販され、植物への形質転換に好適であり、形質転換細胞（トランスフォーム細胞）における目的の遺伝子の発現に好適である可能性がある。

10

【0218】

本明細書で使用する場合、句「植物で発現可能」は、加えられるか又は含有される何らかの付加的な調節エレメントを含めたプロモーター配列が、植物の細胞、組織又は器官、好ましくは単子葉植物又は双子葉植物の細胞、組織若しくは器官における発現を少なくとも誘導、付与、活性化又は増強することができることを指す。本発明のいくつかの実施形態の方法に有用なプロモーターの例としては、Actin、CANV 35S、CaMV 19S、GOS2 が挙げられるが、これらに限定されない。種々の組織、又は発生段階で活性であるプロモーターも使用できる。

【0219】

20

本発明のいくつかの実施形態のポリペプチドの核酸配列は、植物発現のために最適化されてもよい。このような配列改変の例としては、目的の植物種において通常見出される G / C 含有量により近づくための変更された G / C 含有量、及びコドン最適化と一般に呼ばれる、植物種において変則的に見出されるコドンの除去が挙げられるが、これらに限定されない。

【0220】

植物細胞は、本発明のいくつかの実施形態の核酸構築物を用いて安定に又は一過性に形質転換されてもよい。安定的な形質転換では、本発明のいくつかの実施形態の核酸分子は植物ゲノムに組み込まれ、従ってその植物は、安定な及び遺伝性の形質を表す。一過性の形質転換では、核酸分子は形質転換された細胞によって発現されるが、ゲノムに組み込まれず、従ってその植物は、一過性の形質を表す。

30

【0221】

特定の実施形態によれば、上記植物は、DNA 編集剤を用いて一過性にトランスフェクションされる。

【0222】

特定の実施形態によれば、上記核酸構築物中のプロモーターは、Pol3 プロモーターを含む。Pol3 プロモーターの例としては、AtU6-29、AtU626、AtU3B、AtU3d、TaU6 が挙げられるが、これらに限定されない。

【0223】

特定の実施形態によれば、上記核酸構築物中のプロモーターは、Pol2 プロモーターを含む。Pol2 プロモーターの例としては、CaMV 35S、CaMV 19S、ユビキチン、CVMV が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0224】

特定の実施形態によれば、上記核酸構築物中のプロモーターは 35S プロモーターを含む。

【0225】

特定の実施形態によれば、上記核酸構築物中のプロモーターは、U6 プロモーターを含む。

【0226】

特定の実施形態によれば、上記核酸構築物中のプロモーターは、少なくとも 1 つの gR

50

NAをコードする核酸剤に動作可能に連結されたPol3（例えば、U6）プロモーター及び/又は上記ゲノム編集剤をコードする核酸配列若しくは蛍光レポーター（後述の特定の実施形態に記載されているとおり）をコードする核酸配列に動作可能に連結されたPol2（例えば、CamV35S）プロモーターを含む。

【0227】

特定の実施形態によれば、上記構築物は、アグロバクテリウム媒介形質転換による一過性発現に有用である（Helensら、2005、Plant Methods 1:13）。一過性形質転換の方法は本明細書中にさらに記載される。

【0228】

特定の実施形態によれば、上記構築物に含まれる核酸配列は、上記植物ゲノムへの組み込みを回避するよう、sgRNA配列中のいずれのガイド配列以外の上記植物細胞のゲノムに相同的な配列を欠く。

10

【0229】

ある実施形態では、上記核酸構築物は非組み込み性構築物であり、好ましくは上記蛍光レポーターをコードする核酸配列も非組み込み性である。本明細書で使用する場合、「非組み込み性」は、目的の植物のゲノムへの組み込みを促進するように積極的に設計されていない構築物又は配列を指す。例えば、アグロバクテリウム（Agrobacterium）媒介の遺伝子形質転換用の機能的T-DNAベクターシステムは非組み込み性ベクターシステムではない。というのも、このシステムは、植物ゲノムに組み込まれるように積極的に設計されているからである。同様に、目的の植物のゲノムへの蛍光レポーター遺伝子配列又は選択マーカー配列の相同組換えを促進するための、目的の植物のゲノムに相同的な隣接配列を有するその蛍光レポーター遺伝子配列又は選択マーカー配列は、非組み込み性の蛍光レポーター遺伝子配列又は選択マーカー配列ではないであろう。

20

【0230】

種々のクローニングキットを、本発明のいくつかの実施形態の教示に従って使用することができる。

【0231】

特定の実施形態によれば、上記核酸構築物はバイナリーベクターである。バイナリーベクターの例は、pBIN19、pBI101、pBinAR、pGPTV、pCAMBIA、pBIB-HYG、pBecks、pGreen又はpPZP（Hajukiewicz、P.ら、Plant Mol. Biol. 25, 989（1994）、及びHelensら、Trends in Plant Science 5, 446（2000））である。

30

【0232】

DNA送達の方法（例えばトランスフェクション、電気穿孔、撃ち込み（ボンバードメント）、ウイルス接種）で使用されることができる他のベクターの例は、pGE-sgRNA（Zhangら Nat. Comms. 2016 7:12697）、pJIT163-Ubi-Cas9（Wangら、Nat. Biotechnol. 2004 32, 947-951）、pICH47742::2x35S-5'UTR-hCas9（STOPP）-NOST（Belhanら、Plant Methods 2013 11;9（1）:39）である。

40

【0233】

本明細書に記載される実施形態は、ゲノム編集イベントを含む細胞の選択方法であって、
（a）バナナ植物の細胞を、ゲノム編集剤（上記のとおり）及び蛍光レポーターを含む核酸構築物で形質転換する工程と、

（b）フローサイトメトリ又は撮像を使用して、蛍光レポーターによって発せられる蛍光を呈する形質転換細胞を選択する工程と、

（c）上記DNA編集剤によって生成されたゲノム編集イベントを含むが上記DNA編集剤をコードするDNAを欠く細胞を得るために、上記DNA編集剤によるゲノム編集イベントを含む形質転換細胞を、上記DNA編集剤の発現を失うのに十分な時間のあいだ培

50

養する工程と

を備える方法にも関する。

【0234】

いくつかの実施形態によれば、当該方法は、工程(c)後に、上記形質転換細胞において、上記蛍光レポーターの発現の喪失を検証する工程をさらに備える。

【0235】

いくつかの実施形態によれば、当該方法は、工程(c)後に、上記形質転換細胞において、上記DNA編集剤の発現の喪失を検証する工程ことをさらに含む。

【0236】

当該方法の非限定的な実施形態は、図1のフロー図に記載されている。

10

【0237】

特定の実施形態によれば、上記植物は、植物細胞、例えば胚細胞懸濁液中の植物細胞である。

【0238】

特定の実施形態によれば、この植物細胞はプロトプラストである。

【0239】

このプロトプラストはいずれかの植物組織、例えば根、葉、胚細胞懸濁液、カルス又は実生組織に由来する。

【0240】

植物細胞に、例えばプロトプラストを使用してDNAを導入する方法はいくつかあり、当業者はどれを選択するべきかを知っているであろう。

20

【0241】

核酸の送達は、本発明の実施形態では、DNA、RNA、ペプチド及び/若しくはタンパク質又は核酸及びペプチドの組み合わせを植物細胞に送達するための方法において当業者にとって公知であるいずれの方法によって植物細胞に導入されてもよく、その方法としては、例えば以下が挙げられるが、これらに限定されない：プロトプラストの形質転換による（例えば、米国特許第5,508,184号明細書を参照）；乾燥/阻害媒介DNA取り込みによる（例えば、Potrykusら(1985) Mol. Gen. Genet. 199:183-8を参照）；電気穿孔による（例えば、米国特許第5,384,253号明細書を参照）；炭化ケイ素繊維を用いたかき混ぜによる（例えば、米国特許第5,302,523号明細書及び米国特許第5,464,765号明細書を参照）；アグロバクテリウム媒介の形質転換による（例えば、米国特許第5,563,055号明細書、米国特許第5,591,616号明細書、米国特許第5,693,512号明細書、米国特許第5,824,877号明細書、米国特許第5,981,840号明細書及び米国特許第6,384,301号明細書を参照）；DNA被覆粒子の加速による（例えば、米国特許第5,015,580号明細書、米国特許第5,550,318号明細書、米国特許第5,538,880号明細書、米国特許第6,160,208号明細書、米国特許第6,399,861号明細書及び米国特許第6,403,865号明細書を参照）並びにナノ粒子、ナノ担体及び細胞膜透過ペプチドによる（国際公開第201126644A2号パンフレット；国際公開第2009046384A1号パンフレット；国際公開第2008148223A1号パンフレット）。

30

40

【0242】

トランスフェクション（形質移入）の他の方法としては、トランスフェクション試薬の使用（例えばLipofectin、ThermoFisher（サーモフィッシャー））、デンドリマー（Kukowska-Latallo, J.F.ら、1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 4897-902）、細胞膜透過ペプチド（Maeら、2005, Internalisation of cell-penetrating peptides into tobacco protoplasts, Biochimica et Biophysica Acta 1669(2):101-7）又はポリアミン（Zhang及びVinogradov, 2010, Short

50

biodegradable polyamines for gene delivery and transfection of brain capillary endothelial cells, J Control Release, 143(3):359-366) が挙げられる。

【0243】

特定の実施形態によれば、植物細胞（例えば、プロトプラスト）へのDNAの導入は電気穿孔によって行われる。

【0244】

特定の実施形態によれば、植物細胞（例えば、プロトプラスト）へのDNAの導入は撃ち込み／微粒子銃によって行われる。

10

【0245】

特定の実施形態によれば、DNAをプロトプラストに導入するために、当該方法は、ポリエチレングリコール（PEG）に媒介されるDNA取り込みを含む。さらなる詳細については、Kareschら（1991）Plant Cell Rep. 9:575-578; Mathurら（1995）Plant Cell Rep. 14:221-226; Negrutiuら（1987）Plant Cell Mol. Biol. 8:363-373を参照。次に、プロトプラストは、プロトプラストが細胞壁を発達させ、分裂を開始してカルスを形成し、シュートを及び根を発達させ、植物全体を再生することを可能にする条件下で培養される。

【0246】

20

一過性形質転換は、改変植物ウイルスを使用するウイルス感染によっても行うことができる。

【0247】

植物宿主の形質転換に有用であることが示されたウイルスとしては、CaMV、TMV、TRV及びBVが挙げられる。植物ウイルスを使用する植物の形質転換は、米国特許第4,855,237号明細書（BGV）、欧州特許出願公開第67,553号明細書（TMV）、特開昭63-14693号公報（TMV）、欧州特許出願公開第194,809号明細書（BV）、欧州特許出願公開第278,667号明細書（BV）；及びGluzman, Y.ら、Communications in Molecular Biology: Viral Vectors, Cold Spring Harbor Laboratory, ニューヨーク（New York）、172-189頁（1988）に記載されている。外来DNAを、植物を含めた多くの宿主で発現することにおいて使用するための偽ウイルス粒子は国際公開第87/06261号パンフレットに記載されている。

30

【0248】

植物における非ウイルス性の外来性核酸配列の導入及び発現のための植物RNAウイルスの構築は、上述の参考文献並びにDawson, W.O.ら、Virology（1989）172:285-292; Takamatsuら、EMBO J.（1987）6:307-311; Frenchら、Science（1986）231:1294-1297；及びTakamatsuら、FEBS Letters（1990）269:73-76によって実証されている。

40

【0249】

ウイルスがDNAウイルスである場合、好適な改変はウイルス自体に対して行うことができる。あるいは、外来DNAを有する所望のウイルスベクターを構築することの簡単さのため、ウイルスDNAは最初に細菌プラスミドにクローニングされてもよい。この後、このウイルスDNAは、上記プラスミドから取り出すことができる。ウイルスがDNAウイルスであれば、細菌の複製開始点がウイルスDNAに結合していることが可能で、ウイルスDNAは、次にその細菌によって複製される。このDNAの転写及び翻訳は、ウイルスDNAを包むことになるコートタンパク質をもたらす。ウイルスがRNAウイルスであれば、そのウイルスは、一般にcDNAとしてクローニングされ、プラスミドに挿入される。次に、このプラスミドが上記構築物のすべてを作製するために使用される。RNAウ

50

イルスが、ウイルスRNAを包むコートタンパク質（１又は複数）をもたらすための、プラスミドのウイルス配列の転写及びウイルス遺伝子の翻訳によって産生される。

【０２５０】

本発明のいくつかの実施形態の構築物に含まれるもの等の非ウイルス性の外来性核酸配列の導入及び植物における発現のための植物RNAウイルスの構築は、上記の参考文献及び米国特許第５，３１６，９３１号明細書によって実証されている。

【０２５１】

１つの実施形態では、天然のコートタンパク質コード配列がウイルス核酸から欠失しており、非天然の植物ウイルス性コートタンパク質コード配列、並びに植物宿主中で発現し、組換え植物ウイルス核酸をパッケージ化すること、及び上記組換え植物ウイルス核酸による宿主の全身感染を確実にすることができる非天然のプロモーター、好ましくは上記非天然のコートタンパク質コード配列のサブゲノムプロモーターが挿入されている植物ウイルス核酸が提供される。あるいは、タンパク質が産生されるように、コートタンパク質遺伝子は、非天然の核酸配列をその内部に挿入することにより不活性化されてもよい。この組換え植物ウイルス核酸は、１以上のさらなる非天然のサブゲノムプロモーターを含有してもよい。各非天然のサブゲノムプロモーターは、隣接する遺伝子又は核酸配列を植物宿主中で転写又は発現することができ、互いに及び天然のサブゲノムプロモーターと組み換わることができない。複数の核酸配列が含まれる場合には、非天然の（外来の）核酸配列が、上記天然の植物ウイルスサブゲノムプロモーター又は上記天然及び非天然の植物ウイルスサブゲノムプロモーターに隣接して挿入されてもよい。この非天然の核酸配列は宿主植物中で、上記サブゲノムプロモーターの制御下で転写又は発現され、所望の産物が産生される。

【０２５２】

第２の実施形態では、上記天然のコートタンパク質コード配列が非天然のコートタンパク質コード配列の代わりに非天然のコートタンパク質サブゲノムプロモーターのうちの１つに隣接して置かれていることを除いて第１実施形態のように組換え植物ウイルス核酸が提供される。

【０２５３】

第３実施形態では、上記天然のコートタンパク質遺伝子がそのサブゲノムプロモーターに隣接しており、１以上の非天然のサブゲノムプロモーターがウイルス核酸に挿入されている組換え植物ウイルス核酸が提供される。この挿入された非天然のサブゲノムプロモーターは、隣接する遺伝子を植物宿主中で転写又は発現することができ、互いに及び天然のサブゲノムプロモーターと組み換わることができない。上記配列が宿主植物中で、上記サブゲノムプロモーターの制御下で転写又は発現され、所望の産物が産生されるように、非天然の核酸配列がこの非天然のサブゲノム植物ウイルスプロモーターに隣接して挿入されてもよい。

【０２５４】

第４実施形態では、上記天然のコートタンパク質コード配列が非天然のコートタンパク質コード配列によって置き換えられていることを除いて上記第３実施形態のように組換え植物ウイルス核酸が提供される。

【０２５５】

上記ウイルスベクターは、組換え植物ウイルスを産生するための組換え植物ウイルス核酸によってコードされるコートタンパク質によって包まれている。この組換え植物ウイルス核酸又は組換え植物ウイルスは、適切な宿主植物を感染させるために使用される。この組換え植物ウイルス核酸は、所望のタンパク質を産生するための、宿主中での複製、宿主の全身への広がり、及び宿主中での外来の遺伝子（１又は複数）（単離された核酸）の転写又は発現が可能である。

【０２５６】

用いられる形質転換／感染方法にかかわらず、本教示は、本明細書に記載される核酸構築物（１若しくは複数）を含む任意の細胞、例えば植物細胞（例えば、プロトプラスト）

10

20

30

40

50

又はバクテリア細胞にさらに関する。

【0257】

形質転換の後、細胞は、蛍光レポーター（すなわち、蛍光タンパク質）によって発せられる蛍光を呈する形質転換細胞を選択するために、フローサイトメトリに供される。

【0258】

本明細書で使用する場合、「蛍光タンパク質」は、蛍光を発し、通常はフローサイトメトリ又は撮像により検出可能であり、それゆえそのようなタンパク質を発現する細胞の選択の基礎として使用することができるポリペプチドを指す。

【0259】

レポーターとして使用することができる蛍光タンパク質の例は、緑色蛍光タンパク質（GFP）、青色蛍光タンパク質（BFP）及び赤色蛍光タンパク質 dsRed である。蛍光レポーター又は他のレポーターの非限定的な一覧は、ルミネセンスにより検出可能なタンパク質（例えばルシフェラーゼ）又は比色分析により検出可能なタンパク質（例えばGUS）を含む。特定の実施形態によれば、蛍光レポーターはDsRed又はGFPである。

【0260】

この分析は、通常は形質転換後、24～72時間以内、例えば48～72時間以内、24～28時間以内に行われる。一過性発現を確実にするために、抗生物質選択、例えば選択マーカーに対する抗生物質は用いられない。この培養物はなお抗生物質を含んでよいが、それは選択マーカーに対するものではない。

【0261】

植物細胞のフローサイトメトリは、通常、蛍光活性化セルソーティング（Fluorescence Activated Cell Sorting: FACS）によって実施される。蛍光活性化セルソーティング（FACS）は細胞を含めた粒子をその粒子の蛍光特性に基づいて分離するための周知の方法である（例えばKamarch, 1987, Methods Enzymol, 151: 150-165を参照）。

【0262】

例えば、GFP陽性細胞のFACSは、488nmレーザーによって励起されたプロトプラストの緑色対赤色の発光スペクトルの可視化を利用する。GFP陽性プロトプラストは、赤色発光に対する緑色発光の比の上昇によって区別することができる。

【0263】

以下は、Bastiaanら、J Vis Exp. 2010; (36): 1673から改変した非結合プロトコルである。この文献は、参照により本明細書に援用される。FACS装置は市販されており、例えばFACS Melody (BD)、FACS Aria (BD) がある。

【0264】

100 μ mノズル及び20psi（約0.138MPa）シース圧を用いてフローストリームが設定される。細胞密度及び試料注入速度は、最良の収率又は達成可能な最も大きい速度、例えば10,000,000細胞/ml以下が望まれるか否かに基づいて、特定の実験に対して調整することができる。プロトプラストの沈降を防ぐために、試料はFACS上で攪拌される。FACSの詰まりが問題になれば、3つの可能なトラブルシューティング工程がある：1. 試料ラインの逆流を実施する、2. 密度を下げるためにプロトプラスト懸濁液を希釈する、3. 遠心分離及び再懸濁後に濾過工程を繰り返すことによりプロトプラスト溶液を清浄にする。この装置は、488nmレーザーによる励起後の前方散乱光（FSC）、側方散乱光（SSC）、並びにGFPについて530/30nm及び赤色スペクトル自己蛍光（RSA）について610/20nmの発光を測定するように準備されている。これらは、実質的に、GFP陽性プロトプラストを単離するために使用される唯一のパラメータである。以下の電圧設定値が使用できる：FSC - 60V、SSC 250V、GFP 350V及びRSA 335V。なお、最適の電圧設定値は、FACSごとに異なり、セルソーターの耐用期間全体にわたってなお調整される必要がある。

【0265】

プロセスは、前方散乱光対側方散乱光についてのドットプロットを組み立てることにより開始される。測定されるイベントがプロットの中心にくるように電圧設定値が印加される。次に、緑色蛍光シグナル対赤色蛍光シグナルのドットプロットが作成される。野生型（非GFP）プロトプラスト懸濁液を見るときに、測定されるイベントがプロットで中央に集まった対角線上の集団を与えるように電圧設定値が印加される。GFPマーカーラインに由来するプロトプラスト懸濁液は、野生型試料では決して見られない緑色蛍光イベントの明確な集団を生成することになる。GFPとRSAとの間のスペクトルのオーバーラップを調整するために、コンペンセーション制約が設定される。適正なコンペンセーション制約設定値は、非GFPプロトプラスト及びデブリからのGFP陽性プロトプラストのより良好な分離を可能にすることになる。本願で使用する制約は以下のとおりである：RSA、マイナス17.91%GFP。ゲートはGFP陽性イベントを特定するように設定され、非GFPプロトプラストの陰性対照が、ゲート境界を画定することを支援するために使用される必要がある。小さいデブリを分析から外すために前方散乱光カットオフが実行される。カットオフの配置を決定するのを助けるためにGFP陽性イベントがFSC対SSCプロットで可視化される。例えば、カットオフは5,000に設定される。なお、FACSは、デブリをソートイベントとしてカウントすることになり、高レベルのデブリを有する試料は、予測とは異なるGFP陽性イベントパーセントを有する可能性がある。これは必ずしも問題ではない。しかしながら、試料中にデブリが多いほど、ソートに長い時間がかかることになる。実験に応じて及び分析する対象の細胞型の存在量に応じて、FACSの精度モードはソートされた細胞の最適収率又は最適純度のいずれかを求めて設定される。

10

20

【0266】

FACSソーティングの後、蛍光マーカーを提示する形質転換された植物細胞（例えば、プロトプラスト）の正に選択されたプールが集められ、そしてアリコート（一定分量）がこのDNA編集イベントを試験する（任意の工程。図1を参照）ために使用されてもよい。あるいは（又は任意の検証する工程に続いて）、クローンがコロニー、すなわちクローン（少なくとも28日）及びマイクロカルスへと発生するまで、クローンが選択（例えば、選択マーカーに対する抗生物質）の不存在下で培養される。培養下の少なくとも60～100日間（例えば、少なくとも70日、少なくとも80日）の後、カルスの細胞の一部が、DNA編集イベント及びDNA編集剤の存在、つまりそのDNA編集剤をコードするDNA配列の喪失（これは当該方法の一過性を指摘する）について分析（検証）される。

30

【0267】

このように、クローンは、求められる編集の種類、例えば、挿入、欠失、挿入-欠失（インデル）、逆位、置換及びこれらの組み合わせに応じて本明細書中で「変異」又は「編集」とも呼ばれるDNA編集イベントの存在について検証される。

【0268】

特定の実施形態によれば、ゲノム編集イベントは、これがなければ従来の育種によって目的の植物に導入されることが可能な欠失、一塩基対置換、又は第2植物由来の遺伝子材料の挿入を含む。

【0269】

特定の実施形態によれば、ゲノム編集イベントは、従来の育種を通しては導入できないと思われる目的の植物のゲノムへの外来DNAの導入を含まない。

40

【0270】

配列変更の検出方法は当該技術分野で周知であり、その例としては、DNAシーケンシング（例えば、次世代シーケンシング）、電気泳動、酵素ベースのミスマッチ検出アッセイ、並びにPCR、RT-PCR、RNA-seqプロテクション、インサイツハイブリダイゼーション、プライマー伸長法、サザンブロット、ノーザンブロット及びドットブロット解析等のハイブリダイゼーションアッセイが挙げられるが、これらに限定されない。一塩基多型（SNP）の検出のために使用される種々の方法、例えばPCRを伴うT7エンドヌクレアーゼ、ヘテロ二本鎖及びSangerシーケンシングも使用することがで

50

きる。

【0271】

DNA編集イベント、例えばインデルの存在の別の検証方法は、ミスマッチのDNAを認識してこれを切断する構造選択的な酵素（例えばエンドヌクレアーゼ）を利用するミスマッチ切断アッセイを含む。

【0272】

ミスマッチ切断アッセイは、インデルの検出について簡便で費用効率が高い方法であり、それゆえゲノム編集により誘導された変異を検出するための代表的な手順である。このアッセイは、ミスマッチ部分及び複数のヌクレオチドによって形成される追加らせんループ（*extra helical loop*）でヘテロ二本鎖DNAを切断し、2以上のより断片（フラグメント）を与える酵素を使用する。得られた断片がサイズで類似しておらず従来のゲル電気泳動又は高速液体クロマトグラフィ（HPLC）により簡単に分離できるように、予測されるヌクレアーゼ切断部位を外して約300～1000bpのPCR産物が生成される。末端標識された消化産物も自動的ゲル電気泳動又はキャピラリー電気泳動によって分析できる。遺伝子座のインデルの頻度は、PCR増幅産物及び切断されたDNAバンドの積分強度を測定することにより推定することができる。消化工程には15～60分かかり、DNA調製工程及びPCR工程が加えられるときには、アッセイ全体は3時間未満で完了することができる。

【0273】

2つの択一的な酵素が、通常、このアッセイで使用される。T7エンドヌクレアーゼ1（T7E1）は、ミスマッチの上流にある第1、第2又は第3のホスホジエステル結合で不完全マッチのDNAを認識して切断するリゾルパーゼである。T7E1ベースのアッセイの感度は0.5～5%である。対照的に、Surveyor（商標）ヌクレアーゼ（Transgenomic Inc.、オマハ（Omaha）、ネブラスカ州、米国）は、オランダミツバ由来のミスマッチ特異的ヌクレアーゼのCELファミリーのメンバーである。これは、一塩基多型（SNP）又は小さいインデルの存在に起因するミスマッチ部分を認識して切断し、ミスマッチの下流の両方のDNA鎖を切断する。このヌクレアーゼは、12ntまでのインデルを検出することができ、約3%、すなわち32コピーに1つという低い頻度で存在する変異に感受性がある。

【0274】

編集イベントの存在のさらに別の検証方法は、高分解能融解曲線分析を含む。

【0275】

高分解能融解曲線分析（HRMA）は、ゲノム標的（90～200bp）にまたがるDNA配列を、蛍光染料を組み込んでリアルタイムPCRにより増幅すること、及びこれに続く増幅産物の融解曲線分析を伴う。HRMAは、挿入染料が熱変性の間に二本鎖DNAから放出されるときの蛍光の喪失に基づく。この分析は、増幅産物の温度依存的変性プロファイルを記録し、融解プロセスが1又は複数の分子種を伴うかを検出する。

【0276】

さらに別の方法はヘテロ二本鎖移動度アッセイである。変異も、再ハイブリダイズしたPCR断片を直接未変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAGE）によって分析することにより、検出することができる。この方法は、ポリアクリルアミドゲル中でのヘテロ二本鎖DNA及びホモ二本鎖DNAの泳動の差を利用する。インデルによって引き起こされるマッチDNA鎖とミスマッチDNA鎖との間の角度は、未変性条件下ではヘテロ二本鎖DNAがホモ二本鎖DNAよりも著しく小さい速度で泳動し、それらは移動度に基づいて簡単に区別できるということを意味する。140～170bpの断片は15%ポリアクリルアミドゲル中で分離できる。そのようなアッセイの感度は、最適条件下では0.5%に近づくことができ、これはT7E1に近い。PCR産物の再アニール後、このアッセイの電気泳動部分には約2時間を要する。

【0277】

編集イベントの存在の他の検証方法は、Zischewski 2017 Biotech

10

20

30

40

50

h n o l . A d v a n c e s 1 (1) : 9 5 - 1 0 4 に詳しく記載されている。

【 0 2 7 8 】

陽性クローンは、DNA編集イベントについてホモ接合性であってもよく又はヘテロ接合性であってもよいということは分かるであろう。当業者は、目的の用途に従ってクローンをさらなる培養/再生のために選択する。

【 0 2 7 9 】

所望のDNA編集イベントの存在を提示するクローンは、DNA編集剤の存在、つまりDNA編集剤をコードするDNA配列の喪失（これは当該方法の一過性を指摘する）についてさらに分析される。

【 0 2 8 0 】

これは、例えば、GFPの蛍光検出又はq-PCRによりDNA編集剤の発現（例えば、mRNA、タンパク質での）を分析することにより行うことができる。

【 0 2 8 1 】

あるいは又は加えて、細胞は、本明細書に記載される核酸構築物又はその部分、例えばレポーターポリペプチド又はDNA編集剤をコードする核酸配列の存在について分析される。

【 0 2 8 2 】

蛍光レポーター又はDNA編集剤をコードするDNA（例えば、蛍光顕微鏡法、q-PCR及び/又はサザンプロット、PCR、シーケンシング等のいずれかの他の方法によって確認される）を示さないが、所望のDNA編集イベント（1又は複数）[変異（1又は複数）]を含むクローンが、さらなる処理のために単離される。

【 0 2 8 3 】

それゆえ、これらのクローンは保存することができる（例えば、凍結保存される）。

【 0 2 8 4 】

あるいは、細胞（例えば、プロトプラスト）は、カルスへと発生する一群の植物細胞へとまず成長し、次いで植物組織培養方法を使用してそのカルスからシュートを再生すること（不定芽形成（caulogenesis））により植物全体へと再生されてもよい。カルスへのプロトプラストの成長及びシュートの再生は、植物の種それぞれについて誂えられる必要がある組織培地中での植物成長調節物質の適正なバランスを必要とする。

【 0 2 8 5 】

プロトプラストも、プロトプラスト融合と呼ばれる技術を使用する植物育種のために使用されてよい。異なる種に由来するプロトプラストは、電場又はポリエチレングリコールの溶液を使用することにより融合するように誘導される。この技術は、組織培養において体細胞雑種を生成するために使用されてもよい。

【 0 2 8 6 】

プロトプラスト再生の方法は当該技術分野で周知である。いくつかのファクター、つまり遺伝子型、ドナー組織及びその前処理、プロトプラスト単離のための酵素処理、プロトプラスト培養の方法、培養、培地、及び物理的環境が、プロトプラストの単離、培養、及び再生に影響を及ぼす。詳細な総説のために、Maheshwariら、1986、Differentiation of Protoplasts and of Transformed Plant Cells: 3-36. Springer-Verlag, Berlinを参照。

【 0 2 8 7 】

再生された植物は、当業者が適切と考える場合には、さらなる育種及び選択に供されてもよい。

【 0 2 8 8 】

上記植物又はその細胞は、DNA編集剤をコードする導入遺伝子を欠く。

【 0 2 8 9 】

最終系統、植物又は中間育種産物の表現型は、例えばエチレン生合成経路の成分をコードする遺伝子の配列、mRNA若しくはタンパク質のレベル（量）でのその発現、そのタ

10

20

30

40

50

ンパク質の活性を決定すること、及び／又は果実の特性（貯蔵寿命）を分析すること等により、分析することができる。

【0290】

エチレン産生：エチレン生合成は、ガスクロマトグラフィー（GC）又はレーザーベースのアッセイ（Cristescu SM, Mandon J, Arslanov D, De Pessemier J, Hermans C, Harren FJM. Current methods for detecting ethylene in plants. Ann Bot - London. 2013; 111(3): 347-60）により小さい植物片において測定することができる。

【0291】

本明細書及び後述の実施例の中で説明されるように、本発明者らは、安定な遺伝子組換えを回避しつつゲノム編集剤（１又は複数）を用いてバナナを形質転換することができた。

【0292】

従って、本発明の方法論は、選択可能又はスクリーニング可能なレポーターの組み込みを伴わないゲノム編集を可能にする。

【0293】

このように、本発明の実施形態は、本発明の教示に従って生成された遺伝子編集イベント（１又は複数）を含む植物、植物細胞及び植物の加工産物にさらに関する。

【0294】

このように、本発明の教示は、本明細書に記載される植物の一部分又はその加工産物にも関する。

【0295】

バナナ果実、及びバナナ果実に基づく製品並びにそれらの製造方法は、本明細書に記載される植物を使用して想定される。

【0296】

増粘剤、着色剤及び香料、主要栄養素及び微量栄養素についての代替供給源、栄養補助食品、家畜飼料、天然繊維、並びに天然の生理活性化合物及び生物肥料の供給源として役立つ、種々の食品及び非食品の用途における皮、葉、偽茎、柄及び花房等のバナナ副製品及びその製造方法も想定される。

【0297】

特定の実施形態によれば、加工製品はDNAを含む。

【0298】

本願から成立した特許の有効期間の間に、多くの関連するDNA編集剤が開発されることが予想され、用語DNA編集剤の範囲は、すべてのこのような新しい技術を事前を含むことが意図されている。

【0299】

本明細書で使用する場合、用語「約」は±10%を指す。

【0300】

用語「comprises (...を含む、...を備える)」、「comprising」、「includes (...を含む)」、「including」、「having (...を有する)」及びこれらの接合語は、「including but not limited to (含む(備える)が、これらに限定されない)」を意味する。

【0301】

用語「consisting of (...からなる)」は、「including and limited to (...を含み、かつ...に限定される)」を意味する。

【0302】

用語「consisting essentially of (...から実質的になる)」は、組成物、方法又は構造は、追加の原料、工程及び／又は部品を含んでもよいが、それは、その追加の原料、工程及び／又は部品が請求項に係る組成物、方法又は構造の基本で新規な特徴を実質的に変えない場合に限られるということを意味する。

10

20

30

40

50

【0303】

本明細書で使用する場合、単数形「a」、「an」及び「the」は、文脈と明らかに矛盾する場合を除いて複数の指示対象を含む。例えば、用語「a compound（化合物）」又は「at least one compound（少なくとも1つの化合物）」は、a plurality of compounds（複数の化合物）、及びこれらのmixtures（混合物）を含んでもよい。

【0304】

本願全体にわたって、本発明の種々の実施形態は、範囲形式で提示されてもよい。範囲形式での記載は単に便宜及び簡潔さのためであり、本発明の範囲に対する変更できない限定と解釈されるべきではないということを理解されたい。従って、範囲の記載は、すべての可能な部分範囲及びその範囲内の個々の数値を具体的に開示したと考えられるべきである。例えば、1～6等の範囲の記載は、1～3、1～4、1～5、2～4、2～6、3～6等の部分範囲、並びにその範囲内の個々の数、例えば、1、2、3、4、5、及び6を具体的に開示したと考えられるべきである。これは、範囲の広さにかかわらず当てはまる。

【0305】

本明細書中で数値範囲が示されている場合にはいつでも、その数値範囲は、示された範囲内のあらゆる引用された数値（分数又は整数）を含むことが意図されている。句、第1の示された数と第2の示された数との間「にわたる／の範囲」、及び第1の示された数から第2の示された数まで（第1の示された数～第2の示された数）「にわたる／の範囲」は、本明細書中で互換的に使用され、その第1及び第2の示された数並びにそれらの間のすべての分数及び整数を含むことが意図されている。

【0306】

本明細書で使用する場合、用語「方法」は、与えられた課題を成し遂げるためのやり方、手段、技法及び手順を指し、それらには、化学、薬理学、生物学、生化学及び医学の分野の当業者に公知であるか、又は化学、薬理学、生物学、生化学及び医学の分野の当業者によって公知のやり方、手段、技法及び手順から容易に開発されるやり方、手段、技法及び手順が含まれるが、これらに限定されない。

【0307】

特定の配列表に言及されるとき、そのような言及は、その相補的配列に実質的に対応する配列、例えば、シーケンシングエラー、クローニングエラーから生じるわずかな配列変化、又は塩基置換、塩基欠失若しくは塩基付加を生じる他の変更を含む配列も包含すると理解されたい。ただし、そのような変化の頻度は、50ヌクレオチドに1未満、あるいは100ヌクレオチドに1未満、あるいは200ヌクレオチドに1未満、あるいは500ヌクレオチドに1未満、あるいは1000ヌクレオチドに1未満、あるいは5,000ヌクレオチドに1未満、あるいは10,000ヌクレオチドに1未満である。

【0308】

本願に開示されるあらゆる配列番号は、その配列番号がDNA配列フォーマット又はRNA配列フォーマットでのみ表されている場合であっても、配列番号が言及される文脈に応じて、DNA配列又はRNA配列のいずれかを指すことができるということは理解される。例えば、ある与えられた配列番号はDNA配列フォーマットで表される（例えば、チミンについてTと書かれている）が、それは、与えられた核酸配列に対応するDNA配列、又はRNA分子核酸配列のRNA配列のいずれかを指すことができる。同様に、いくつかの配列は、記載される分子の現実の種類に応じて、RNA配列フォーマットで表されている（例えば、ウラシルについてUと書かれている）が、それは、dsRNAを含むRNA分子の配列、又は示されたRNA配列に対応するDNA分子の配列のいずれかを指すことができる。いずれにせよ、いずれかの置換を有して開示された配列を有するDNA分子及びRNA分子の両方が想定される。

【0309】

明確性のために、別個の実施形態に関して記載される本発明の特定の特徴が、単一の実施形態において組み合わせて提供されてもよいことが理解される。逆に、簡潔さのために

10

20

30

40

50

、単一の実施形態に関して記載される本発明の種々の特徴が、別個に若しくはいずれかの好適なサブコンビネーションにおいて、又は適宜本発明のいずれかの他の記載された実施形態において提供されてもよい。種々の実施形態に関して記載される特定の特徴は、それらの要素がなければその実施形態が動作不能である場合を除き、それらの実施形態の必須の特徴と考えられるべきではない。

【0310】

本明細書中でこれまで記載された及び添付の特許請求の範囲でクレームされる本発明の種々の実施形態及び態様は、以下の実施例で実験的にサポートされる。

【0311】

本明細書で使用する場合、用語「約」は $\pm 10\%$ を指す。

10

【0312】

用語「comprises (...を含む、...を備える)」、「comprising」、「includes (...を含む)」、「including」、「having (...を有する)」及びこれらの接合語は、「including but not limited to (含む (備える) が、これらに限定されない)」を意味する。

【0313】

用語「consisting of (...からなる)」は、「including and limited to (...を含み、かつ...に限定される)」を意味する。

【0314】

用語「consisting essentially of (...から実質的になる)」は、組成物、方法又は構造は、追加の原料、工程及び/又は部品を含んでもよいが、それは、その追加の原料、工程及び/又は部品が請求項に係る組成物、方法又は構造の基本で新規な特徴を実質的に変えない場合に限られるということを意味する。

20

【0315】

本明細書で使用する場合、単数形「a」、「an」及び「the」は、文脈と明らかに矛盾する場合を除いて複数の指示対象を含む。例えば、用語「a compound (化合物)」又は「at least one compound (少なくとも1つの化合物)」は、a plurality of compounds (複数の化合物)、及びこれらのmixtures (混合物)を含んでもよい。

【0316】

30

本願全体にわたって、本発明の種々の実施形態は、範囲形式で提示されてもよい。範囲形式での記載は単に便宜及び簡潔さのためであり、本発明の範囲に対する変更できない限定と解釈されるべきではないということを理解されたい。従って、範囲の記載は、すべての可能な部分範囲及びその範囲内の個々の数値を具体的に開示したと考えられるべきである。例えば、1~6等の範囲の記載は、1~3、1~4、1~5、2~4、2~6、3~6等の部分範囲、並びにその範囲内の個々の数、例えば、1、2、3、4、5、及び6を具体的に開示したと考えられるべきである。これは、範囲の広さにかかわらず当てはまる。

【0317】

本明細書中で数値範囲が示されている場合にはいつでも、その数値範囲は、示された範囲内のあらゆる引用された数値 (分数又は整数) を含むことが意図されている。句、第1の示された数と第2の示された数との間「にわたる / の範囲」、及び第1の示された数から第2の示された数まで (第1の示された数~第2の示された数) 「にわたる / の範囲」は、本明細書中で互換的に使用され、その第1及び第2の示された数並びにそれらの間のすべての分数及び整数を含むことが意図されている。

40

【0318】

本明細書で使用する場合、用語「方法」は、与えられた課題を成し遂げるためのやり方、手段、技法及び手順を指し、それらには、化学、薬理学、生物学、生化学及び医学の分野の当業者に公知であるか、又は化学、薬理学、生物学、生化学及び医学の分野の当業者によって公知のやり方、手段、技法及び手順から容易に開発されるやり方、手段、技法及び手順が含まれるが、これらに限定されない。

50

【 0 3 1 9 】

本明細書で使用する場合、用語「処置すること」は、状態の進行を排除すること、実質的に阻害すること、緩慢化すること若しくは逆転させること、状態の臨床症候若しくは美的症候を実質的に改善すること、又は状態の臨床症候若しくは美的症候の外観を実質的に予防することを含む。

【 0 3 2 0 】

特定の配列表に言及されるとき、そのような言及は、その相補的配列に実質的に対応する配列、例えば、シーケンシングエラー、クローニングエラーから生じるわずかな配列変化、又は塩基置換、塩基欠失若しくは塩基付加を生じる他の変更を含む配列も包含すると理解されたい。ただし、そのような変化の頻度は、50ヌクレオチドに1未満、あるいは100ヌクレオチドに1未満、あるいは200ヌクレオチドに1未満、あるいは500ヌクレオチドに1未満、あるいは1000ヌクレオチドに1未満、あるいは5,000ヌクレオチドに1未満、あるいは10,000ヌクレオチドに1未満である。

10

【 0 3 2 1 】

本願に開示されるあらゆる配列番号は、その配列番号がDNA配列フォーマット又はRNA配列フォーマットでのみ表されている場合であっても、その配列番号が言及される文脈に応じて、DNA配列又はRNA配列のいずれかを指すことができるということは理解される。例えば、ある配列番号はDNA配列フォーマットで表される（例えば、チミンについてTと書かれている）が、それは、DNA配列又はRNA分子核酸配列のRNA配列のいずれかを指すことができる。同様に、いくつかの配列は、記載される分子の現実の種類に応じて、RNA配列フォーマットで表されている（例えば、ウラシルについてUと書かれている）が、それは、dsRNAを含むRNA分子の配列、又は示されたRNA配列に対応するDNA分子の配列のいずれかを指すことができる。いずれにせよ、いずれかの置換を有して開示された配列を有するDNA分子及びRNA分子の両方が想定される。

20

【 0 3 2 2 】

明確性のために、別個の実施形態に関して記載される本発明の特定の特徴が、単一の実施形態において組み合わせて提供されてもよいことが理解される。逆に、簡潔さのために、単一の実施形態に関して記載される本発明の種々の特徴が、別個に若しくはいずれかの好適なサブコンビネーションにおいて、又は適宜本発明のいずれかの他の記載された実施形態において提供されてもよい。種々の実施形態に関して記載される特定の特徴は、それらの要素がなければその実施形態が動作不能である場合を除き、それらの実施形態の必須の特徴と考えられるべきではない。

30

【 0 3 2 3 】

本明細書中でこれまで記載された及び添付の特許請求の範囲でクレームされる本発明の種々の実施形態及び態様は、以下の実施例で実験的にサポートされる。

【実施例】

【 0 3 2 4 】

これより以下の実施例が参照されるが、この実施例は、上記の記載と一緒にあって、本発明のいくつかの実施形態を限定せずに説明する。

【 0 3 2 5 】

40

全般的に、本明細書で使用する命名法及び本発明で利用する実験室手順は、分子技法、生化学的技法、微生物学的技法及び組換えDNA技法を含む。このような技法は、文献に十分に説明されている。例えば下記を参照。「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、Sambrookら、(1989);「Current Protocols in Molecular Biology」、I~II巻、Ausubel, R.M. 編(1994); Ausubelら、「Current Protocols in Molecular Biology」、John Wiley and Sons、ボルチモア(Baltimore)、メリーランド州(Maryland)(1989); Perbal、「A Practical Guide to Molecular Cloning」、John Wiley & Sons、ニューヨ

50

ーク(New York)(1988);Watsonら、「Recombinant DNA」、Scientific American Books、ニューヨーク(New York);Birrenら(編)「Genome Analysis: A Laboratory Manual Series」、1~4巻、Cold Spring Harbor Laboratory Press、ニューヨーク(New York)(1998);米国特許第4,666,828号明細書;米国特許第4,683,202号明細書;米国特許第4,801,531号明細書;米国特許第5,192,659号明細書及び米国特許第5,272,057号明細書に示される方法論;「Cell Biology: A Laboratory Handbook」、I~III巻、Cellis, J.E.編(1994);Freshney、Wiley-Lissによる「Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique」、N.Y.(1994)、第3版;「Current Protocols in Immunology」、I~III巻、Coligan J.E.編(1994);Stitesら(編)、「Basic and Clinical Immunology」(第8版)、Appleton & Lange、ノーウォーク(Norwalk)、コネチカット州(1994);Mishell及びShiigi(編)、「Selected Methods in Cellular Immunology」、W.H. Freeman and Co.、ニューヨーク(New York)(1980);利用可能なイムノアッセイは、特許文献及び科学文献に詳細に記載されている。例えば、米国特許第3,791,932号明細書;米国特許第3,839,153号明細書;米国特許第3,850,752号明細書;米国特許第3,850,578号明細書;米国特許第3,853,987号明細書;米国特許第3,867,517号明細書;米国特許第3,879,262号明細書;米国特許第3,901,654号明細書;米国特許第3,935,074号明細書;米国特許第3,984,533号明細書;米国特許第3,996,345号明細書;米国特許第4,034,074号明細書;米国特許第4,098,876号明細書;米国特許第4,879,219号明細書;米国特許第5,011,771号明細書及び米国特許第5,281,521号明細書を参照;「Oligonucleotide Synthesis」、Gait, M.J.編(1984);「Nucleic Acid Hybridization」、Hames, B.D.、及びHiggins S.J.編(1985);「Transcription and Translation」、Hames, B.D.、及びHiggins S.J.編(1984);「Animal Cell Culture」、Freshney, R.I.編(1986);「Immobilized Cells and Enzymes」、IRL Press, (1986);「A Practical Guide to Molecular Cloning」、Perbal, B.、(1984)及び「Methods in Enzymology」、1~317巻、Academic Press;「PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications」、Academic Press、サンディエゴ(San Diego)、カリフォルニア州(1990);Marshakら、「Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual」、CSHL Press(1996);これらのすべては、参照により、本明細書中にすべて示されているが如く援用される。他の一般的な参考文献は、本明細書全体にわたって提供されている。これらの文献の中にある手順は当該技術分野で周知であると考えられるが、読者の便宜のために提供されている。上記文献に含まれるすべての情報は、参照により本明細書に援用される。

【0326】

材料及び方法

胚発生カルス及び細胞懸濁液の生成及び維持

胚発生カルスを、Ma、1988(Ma S.S. 1991 Somatic embryogenesis and plant regeneration from cell

suspension culture of banana. Proceedings of Symposium on Tissue culture of horticultural crops、台北、台湾、1988年3月8～9日所収、181-188頁)及びSchoofs、1997(Schoofs H. 1997. The origin of embryogenic cells in Musa. PhD thesis、KU Leuven、ベルギー)によって記載されているように、未熟な雄花又は茎頂等の初期外植片から発生させる。胚形成細胞懸濁液は、新しく発生した高胚発生のカルスから液体媒体中で開始する。この培地の80%を、最初の細胞懸濁液が十分に樹立するまで(6～9ヶ月)まで、12～14日ごとに新しくした。

【0327】

s gRNAクローニング

利用したトランスフェクションプラスミドは、1、G7終結配列によって終結したCaMV35Sプロモーターによって駆動されるeGFP；2、Mas終結配列によって終結したCaMV35Sプロモーターによって駆動されるCas9(ヒトコドンに最適化済み)；3、ガイド1のためにs gRNAを駆動するAtU6プロモーター；4、ガイド2のためにs gRNAを駆動するAtU6プロモーターを含む4つのモジュールから構成された。pCAMBIA又はpRI-201-AN DNA等のバイナリーベクターを使用することができる。

【0328】

外来性レポーター遺伝子GFPを標的とすることによる遺伝子編集システムの検証

ここで提案する非遺伝子組換えGEシステムを、外来性遺伝子(GFP)のDNAを標的とすることにより検証し最適化した。異なるRNAポリメラーゼIII(pol-III)プロモーターの強さを分析するために、s gRNAを、上記CRISPR-Cas9複合体中のeGFPを標的とするために設計し、次いで形質転換細胞においてeGFP発現をロックアウトすることにおける異なるプロモーターの効果を試験した。

【0329】

具体的には、プラスミド(例えばpBluescript、pUC19)は、異なるpol-III及びpol-IIIプロモーター(例えばCaMV35S、U6)によって駆動されるCas9、eGFP、dsRED、及びs gRNA-GFPを含有する4つの転写単位を含有していた。これらのプラスミドをプロトプラスト培養物にトランスフェクションし、24～72時間のインキュベーション時間の後にFACSにより分析した。dsRED(又はmCherry、RFP)発現における高頻度は、高いトランスフェクション効率を示し、eGFP発現における低頻度は、CRISPR-Cas9による成功裏の遺伝子編集を示した。それゆえ、最低のeGFP:dsRED発現比を示した系統は、選んだpol-IIIプロモーターであった。というのも、それは、CRISPR-Cas9複合体による最高の割合のeGFP不活化を引き起こしたからである。

【0330】

最終プラスミド設計

一過性発現のために、4つの転写単位を含有するプラスミドを使用した。第1転写単位は、Cas9の発現を駆動するCaMV-35Sプロモーター及びタバコモザイクウイルス(TMV)ターミネーターを含有していた。次の転写単位は、eGFPの発現を駆動する別のCaMV-35Sプロモーター及びnoスターミネーターからなっていた。第3及び第4の転写単位は、各々、標的遺伝子に対するs gRNA(上述のように、各ベクターは、2つのs gRNAを含む)を発現するシロイヌナズナU6プロモーターを含有していた。

【0331】

プロトプラスト単離

植物材料(例えば葉、カルス、細胞懸濁液)を、消化溶液(1%セルラーゼ、0.5%マセロザイム(macerozyme)、0.5%ドリセラゼ(driselase)、0.4Mマンニトール、154mM NaCl、20mM KCl、20mM MES

10

20

30

40

50

pH 5.6、10 mM CaCl_2) 中、室温で4~24時間、ゆっくりと振盪しながらインキュベーションすることにより、プロトプラストを単離した。消化後、残りの植物材料をW5溶液(154 mM NaCl 、125 mM CaCl_2 、5 mM KCl 、2 mM MES pH 5.6)で洗浄し、プロトプラスト懸濁液を40 μm 濾過器により濾過した。80 gで、室温、3分間の遠心分離の後、プロトプラストを2 mlのW5緩衝液に再懸濁し、氷中で重力により沈殿させた。最終のプロトプラストペレットを2 mlのMMg(0.4 Mマンニトール、15 mM MgCl_2 、4 mM MES pH 5.6)に再懸濁し、血球計数器を使用してプロトプラスト濃度を決定した。プロトプラスト生存率をトリパンブルー染色を使用して推定した。

【0332】

ポリエチレングリコール(PEG)媒介プラスミドトランスフェクション。バナナのプロトプラストのPEG-トランスフェクションを、Wangら(2015) [Wang, H.ら、An efficient PEG-mediated transient gene expression system in grape protoplasts and its application in subcellular localization studies of flavonoids biosynthesis enzymes. *Scientia Horticulturae*, 2015. 191: 82-89頁]によって報告された戦略の改変版を使用して行った。プロトプラストをMMg溶液中で $2 \sim 5 \times 10^6$ プロトプラスト/mlの密度に再懸濁した。100~200 μl のプロトプラスト懸濁液を、プラスミドが入っているチューブに加えた。プラスミド:プロトプラスト比は、形質転換効率に大きく影響を及ぼし、それゆえプロトプラスト懸濁液中のプラスミド濃度の範囲、5~300 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ をアッセイした。PEG溶液(100~200 μl)をこの混合物に加え、10~60分の範囲の種々の長さの時間にわたり23℃でインキュベーションした。PEG4000濃度を最適化し、200~400 mMマンニトール、100~500 mM CaCl_2 溶液中の20~80%PEG4000の範囲をアッセイした。次いで、このプロトプラストをW5中で洗浄し、80 gで3分間遠心分離し、予め1 ml W5に再懸濁し、暗所で23℃でインキュベーションした。24~72時間のインキュベーション後、蛍光を顕微鏡法により検出した。

【0333】

電気穿孔

関連する遺伝子(上記表2のリストを参照)を標的とするPol2駆動GFP/RFP、Pol2駆動NLS-Cas9及びPol3駆動sgRNAを含有するプラスミドを、電気穿孔(BIORAD-GenePulser II; Miao及びJian 2007 *Nature Protocols* 2(10): 2348-2353)を使用して上記細胞に導入した。500 μl のプロトプラストを電気穿孔キュベットに移し、100 μl のプラスミド(10~40 μg DNA)と混合した。プロトプラストを130 V及び1,000 Fで電気穿孔にかけ、室温で30分間インキュベーションした。1 mlのプロトプラスト培地を各キュベットに加え、このプロトプラスト懸濁液を小さいペトリ皿の中へと注ぎ込んだ。24~48時間のインキュベーションの後、蛍光を顕微鏡法により検出した。

【0334】

蛍光タンパク質発現細胞のFACSソーティング

プラスミド/RNA送達から48時間後に、細胞を収集し、そしてGFP/編集剤発現細胞について濃縮するためにフローサイトメーターを使用して蛍光タンパク質発現についてソートした [Chiang, T.W.ら、CRISPR-Cas9(D10A) nickase-based genotypic and phenotypic screening to enhance genome editing. *Sci Rep*, 2016. 6: 24356頁]。この濃縮工程により、抗生物質選択を省略して、蛍光タンパク質、Cas9及びsgRNAを一過性に発現する細胞だけを収集することが可能になる。これらの細胞は、非相同末端結合(NHEJ)による標的遺伝子の編集及び対応する遺伝子発現の喪失についてさらに試験することができる。

【 0 3 3 5 】

コロニー形成

蛍光タンパク質陽性細胞を一部サンプリングし、DNA抽出及びゲノム編集（GE）試験のために使用し、一部は液体媒体中において高希釈でプレティングし、28～35日間コロニー形成させた。コロニーを採集し、成長させ、2つのアリコートに分けた。1つのアリコートをDNA抽出及びゲノム編集（GE）試験並びにCRISPR DNAフリー試験（下記参照）のために使用し、他方をその状態が検証されるまで培養液中で保った。GE及びCRISPR DNAフリーであることを明確に示すものだけを次の段階へと選択した。

【 0 3 3 6 】

暗所で20日後（GE分析のために分けてから、すなわち60日目から。従って全体で80日目）、グルコース（0.46M）及び0.4%アガロースに減らしたこと以外は同じ培地にコロニーを移し、低照度でインキュベーションした。6週間後、アガロースをスライスし、0.31Mグルコース及び0.2%ゲルライト（登録商標）を含むプロトプラスト培地に置いた。1ヶ月後、プロトコロニー（すなわちカルス）を再生培地（半分量MS + B5ビタミン、20g/lスクロース）へと継代培養した。再生された栄養分体を低照度で28の固体培地（0.8%寒天）に置いた。2ヶ月後、栄養分体を土壌に移し、80～100%湿度の温室の中に置いた。

【 0 3 3 7 】

遺伝子改変について及びCRISPRシステムDNAの不存在についてのスクリーニング
各コロニーから、DNAを、GFPソートしたプロトプラスト（任意の工程）のアリコートから、及びプロトプラスト由来のコロニーから抽出し、標的とした遺伝子に隣接しているプライマーを用いてPCR反応を実施した。陽性コロニーを植物を再生するために使用することになるため、コロニーをサンプリングするために測定を行う。Cas9-sgRNAを用いないこと以外は同じ方法に供したプロトプラスト由来の対照反応物を含め、これを野生型（WT）と考える。PCR産物を、次に、WTと比べて産物サイズの何らかの変化を検出するためにアガロースゲルで分離した。WT産物とは異なるPCR反応産物をpBLUNT又はPCR-TOPO（インビトロジェン（Invitrogen））にクローニングした。あるいは、シーケンシングを使用して、上記編集イベントを検証した。得られたコロニーを採集し、プラスミドを単離し、変異の性質を判定するために配列決定した。CRISPRシステムDNA/RNAを含まないことを検証するために、及びゲノムDNAレベルで変異を検出するために、ドメイン変更又は対応するタンパク質の完全な喪失を生じると予測される変異を有するクローン（コロニー又はカルス）を全ゲノムシーケンシング用にした。

【 0 3 3 8 】

所望のGEを提示する陽性クローンを最初に顕微鏡法分析により（WTと比べて）GFP発現について試験した。次に、GFP陰性植物を、Cas9配列又はその発現カセットのいずれかの他の配列に特異的な（又は次世代シーケンシング、NGS）プライマーを使用するPCRによってCas9カセットの存在について試験した。上記構築物の他の領域も、もとの構築物の何もゲノムの中にはないことを確認するために試験できる。

【 0 3 3 9 】

植物再生

エチレン産生：エチレン生合成は、ガスクロマトグラフィー（GC）又はレーザーベースのアッセイ（Criscuら、2013、前出）により小さい植物片において測定することができる。

【 0 3 4 0 】

実施例 2

バナナのACS遺伝子及びACO遺伝子におけるゲノム編集並びに植物再生

10

20

30

40

【表 1】

表 1. プライマーのリスト

ID	配列/配列番号
42	Atgaggatctacggcgaggagcac/55
44	Atggggctccacgttgatgaacac/56
46	Atggggattcccggtgacgag/57
50	Atggcgtgctcctcccg/58
236	Gtggcactgaataggaggagt/59
237	Cgatcggtcctcctcaaacag/60
239	Gagttcgagccttctgtaagca/61
240	Cctgaagtctcgatcgatctg/62
242	Gtggcagcgaataggaggagt/63
243	Gaacggggaagttagcagcaattac/64
245	Gaggcgatcgacatctgttgc/65
246	Ctctatctgatccgaggtgac/66
249	Ggtgaccacgctctgtac/67
250	Atggattccttccggttatcgacatg/68
251	Ctcgagctggctgcgag/69
277	Accgaagccccttaacc/70
278	Gtatggctgacaccatacc/71
321	Ggggtcatcaaatggactg/72
322	Ggctatatataagtagcaacg/73
323	Acactccagatagaagcac/74

10

20

【0341】

s g R N A s 及び標的配列は図 26 に記載している。

【0342】

マレーヤマバショウ細胞懸濁液からのプロトプラストの効率的な単離のためのロバストなプロトコルを、上記実施例 1 に従って行い、その後、目的の遺伝子（内在性の A C S 遺伝子及び A C O 遺伝子）を標的とするための C R I S P R / C a s 9 機構を保有するプラスミドを用いてそのプロトプラストをトランスフェクションし、F A C S ソーティングを使用してレポーターを発現する細胞を濃縮する。この目的を果たすために、本発明者らは、（i）胚形成材料を生成して維持し、（ii）その材料からプロトプラストを単離し、（iii）A C S 遺伝子及び / 又は A C O 遺伝子を標的とする特異的なプラスミドを用いてトランスフェクションし、（iv）C R I S P R / C a s 9 複合体及び目的の遺伝子を標的とする s g R N A を保有する細胞（例えば、m C h e r r y）の代理としての蛍光マーカーを発現する細胞を濃縮し、（v）ソートしたプロトプラストをプロトプラスト再生パイプラインに進め、栄養分体を再生した。

30

【0343】

マレーヤマバショウ植物材料由来の生存可能なプロトプラストを回収できるか否かを試験するために、バナナ植物の材料（細胞懸濁液）を、消化溶液中、室温で 4 ~ 24 時間、ゆっくりと振盪しながらインキュベーションした。消化後、この植物材料を洗浄し、濾過し、2 ml の M M G 緩衝液（0.4 M マンニトール、15 mM M a g C l 2、4 mM M E S p H 5.6）に再懸濁した。プロトプラスト濃度を決定し、 1×10^6 に調整した。次に、DNA プラスミド p A C 2 0 1 0（蛍光マーカーとしての m C h e r r y を保有する）を、バナナ由来のプロトプラストとともにポリエチレングリコール（P E G）の存在下でインキュベーションした。このプロトプラスト中の m C h e r r y の発現を、トランスフェクション後 3 日目に蛍光顕微鏡により検出した（図 3）。

40

【0344】

50

遺伝子編集した植物を回収することにおける次の工程は、C R I S P R / C a s 9 複合体及び目的の遺伝子を標的とする s g R N A をバナナプロトプラスト中に送達し、そのような複合体を保有する細胞を蛍光活性化セルソーティング (F A C S) により濃縮し、これにより、一過性に上記蛍光タンパク質、C a s 9 及び上記 s g R N A を発現する成功裏にトランスフェクションしたバナナ細胞を分離することである。F A C S を使用して、陽性の m C h e r r y 発現プロトプラストを濃縮し収集した (図 4 A)。ソートしたプロトプラストはまだインタクトであり、蛍光顕微鏡によると実際に蛍光マーカを発現する (図 4 B) ことを確認した。

【 0 3 4 5 】

C R I S P R / C a s 9 複合体及びマレーヤマバショウプロトプラスト中の目的の遺伝子を標的とする s g R N A のトランスフェクションの一過性を、次に調べた。本発明者らのすべてのプラスミドは蛍光マーカ (例えば d s R e d、m C h e r r y)、C a s 9、及び s g R N A s (U 6 プロモーターに制御され、目的の内在性遺伝子を標的とする) からなっているため、トランスフェクションしたバナナプロトプラストにおける上記蛍光マーカの発現を経時的に観察し、m C h e r r y 陽性プロトプラストの数を、どのくらい長く C R I S P R / C a s 9 複合体及び s g R N A が発現されうるかの指標を得るための代理として使用した (図 5 A ~ 図 5 C)。F A C S を使用して、m C h e r r y 陽性バナナプロトプラストの百分率を経時的に定量し、トランスフェクション後 3 日目 (3 d p t) の m C h e r r y 陽性バナナプロトプラストの総数を 1 0 0 % に設定した。すでに 1 0 d p t で、m C h e r r y 陽性バナナプロトプラストは、m C h e r r y 陽性バナナプロトプラストの初期数の 3 0 % が減少し、2 5 d p t までに、トランスフェクションしたバナナプロトプラストのほぼ 8 0 % が何らの蛍光も示さないということが見出された (図 5 C)。ソートしなかったバナナプロトプラストにおいても、3 d p t (図 5 A ; 図 6 A)、6 d p t (図 6 A) 及び 1 0 d p t (図 5 B ; 図 6 A) で顕微鏡法により m C h e r r y 発現をモニタリングし、これにより実際に m C h e r r y 発現が経時的に減少することを確認した。さらに、ソートしたバナナプロトプラストの蛍光顕微鏡は、F A C S (図 4 A) によって見られるように、m C h e r r y 陽性プロトプラストの数及び強度の漸進的な減少 (図 6 B) を示す。すべてを合わせて考慮すると、これらの結果は、C R I S P R / C a s 9 複合体及び s g R N A を保有するベクターの発現は一過性であり、さらなる C a s 9 活性又は植物ゲノムへの組み込みは予想されないことを示す。

【 0 3 4 6 】

バナナ植物においてエチレンレベルを低下させることはバナナ果実の貯蔵寿命の延長をもたらす可能性があるが、バナナ植物においてエチレンレベルを低下させるために、エチレンの生合成に関与する遺伝子、例えばハイライトした A C S 及び A C O (図 7 A、図 7 B) のノックアウトを試みた。しかしながら、バナナゲノムは、これらの遺伝子に相長的である複数の配列を含有する。

【 0 3 4 7 】

機能的な A C S 及び A C O をコードするバナナゲノム内の遺伝子を特定するために、モデル又は作物種における特徴づけられた経路由来の相同配列が特定された。このプロセスは、系統発生解析により遺伝子の進化歴を再構築すること、一般組織及び標的組織における候補の発現を検証することにより候補を選別すること、及び適切な s g R N A 設計を確実にするために (ミスマッチを回避するために) 候補遺伝子をシーケンシングすることを目指す、D N A 配列及びタンパク質配列の比較分析のための一連の逐次的工程を伴う。この手順により、遺伝子の選択、ノックアウトのための最適化された標的領域 (保存的かつ潜在的に触媒的なドメイン) の特定、及び適切な s g R N A の設計が可能になった。

【 0 3 4 8 】

このパイプラインは、共通の祖先を持つ相同タンパク質は類似の機能を有する可能性があり、系統発生的再構築を行うことにより、遺伝子ファミリーが確立され進化の文脈における機能的多様性について評価されるとの仮定に基づく。これは、大規模のゲノム重複を経験した植物種及び発展した遺伝子ファミリーにとって特に重要である。しかしながら、

遺伝子ファミリー内のパラログは、必ずしも同じ機能を有さず、そしてこのプロセスの一部は、ファミリー内の遺伝子の選択物を、個々に又は重複性をも考慮するための群として標的とすることになる。

【0349】

手短に言えば、エチレンの合成には、3工程反応が関与する。酵素S - アデノシル - メチオニンシンターゼ (S - AdoMet) はメチオニンのアデノシル化を触媒する。次いで、S - AdoMetは、酵素ACCシンターゼ (ACS) によりエチレン生合成に関わる第1化合物、1 - アミノシクロプロパン - 1 - カルボン酸 (ACC) へと代謝される。最後に、ACCは、酵素ACCオキシダーゼ (ACO) によりエチレンへと変換される (図7A) (Cara及びGiovannoni, 2008, Plant Science, 第175巻、106 - 113頁)。追熟の間、バナナのようなクリマクテリック型果実では、ACCシンターゼ (ACS) 及びACCオキシダーゼ (ACO) の両方が誘導され、エチレン生合成の調節に寄与する (図7B) (Liuら、1999, Plant Physiology, 第121巻、1257 - 1265頁)。エチレンの制御は2システムプロセスとして提案されており、このプロセスでは、システム1は正常な栄養成長の間は機能的であり、エチレンは自己抑制的な役割を有し、非クリマクテリック型果実の組織を含めすべての組織で検出される基礎的なエチレンレベルを産生することに関与するのに対して、システム2は、クリマクテリック型果実の追熟及びおそらく老化のあいだ機能する (図7A ~ 図7B)。移行段階では、RIN、CNR等の追熟調節遺伝子が特定されており、システム1に対する負のフィードバックをもたらしエチレンの自己触媒反応につながる特異的なACS遺伝子 (LeACS4) の誘導も特定されている。加えて、他のACS遺伝子及びACO遺伝子 (LeACS2、4及びLeACO1、4) が誘導され、これらはシステム2を介する高エチレン産生に関与する (図7A) (Cara及びGiovannoni, 2008, Plant Science, 第175巻、106 - 113頁)。

【0350】

マレーヤマバショウの全ゲノム配列解析は、バショウ属系統における特定の祖先の全ゲノム重複 (WGD) 及び遺伝子分画 (gene fractionation) に対するその影響を明らかにした (D'Hontら、2012, Nature, 第488巻; Martinら、2016, BMC Genomics, 17:243)。さらに、エチレン生合成及びシグナル伝達に関与するいくつかのバナナ遺伝子ファミリーがWGDを通して進化し、優先的に保持されたことが報告されている (Jourdaら、2014, New Phytologist, 第202巻、986 - 1000頁)。興味深いことに、このエチレン経路における主要遺伝子は発展し、遺伝子発現プロファイルはWGD由来の遺伝子のうちのいくつかについての機能的重複性を示唆した (Jourdaら、2014, New Phytologist, 第202巻、986 - 1000頁)。それゆえ、候補遺伝子の選択には慎重な評価が必要である。

【0351】

エチレン生合成経路は、トマトにおいて十分に研究されており、システム1及び2に添う工程に関与するACS遺伝子及びACO遺伝子の特徴付けられている。これらの特徴付けられた遺伝子をクエリ配列として使用した。これらの遺伝子は、ACS及びACOについてそれぞれ図9及び図10でハイライトされている。類似性検索は、ACSファミリー及びACOファミリーの両方がバナナに存在することを明らかにし (それぞれ図8、図9)、いくつかのACS及びACOの遺伝子候補をさらなる研究のために選択した。明確に異なるバナナ変種におけるこれらの候補のシーケンシングにより、図10に示すsgRNAの具体的な設計及び選択が可能になった。加えて、これらの遺伝子の可能性のある役割に関するいくらかの見通しを得るために、追熟するバナナ果実の公開されている発現データをすべてのACS及びACOの候補遺伝子 (ACS: Ma09__g19150; Ma04__g35640; Ma04__g31490。ACO: Ma01__g11540; Ma07__g19730) (それぞれ図11及び図12) について検索した。バナナトランスクリプトームデータベースからの各遺伝子のRPKMデータは、ACS Ma04__g3

5640及びACO Ma07__g19730がエチレン生合成を低下させるために標的とすべき候補遺伝子であることを示した(それぞれ図11及び図12)。本発明の実施形態は、ロバストな表現型を得るために他のACO遺伝子及び/又はACS遺伝子を標的とすることも想定する。

【0352】

ACS遺伝子(Ma09__g19150; Ma04__g35640; Ma04__g31490)を、図13A、図14A及び図15Aに示す2対のsgRNAを用いて標的とした。これらのsgRNAは、上記候補遺伝子のエクソン1とエクソン3との間に位置し、これらの領域は、すべての3つの候補遺伝子の中で高度に保存されているため、選択した。同様に、ACO遺伝子(Ma01__g11540; Ma07__g19730)を、図6A及び図17Aに示す2対のsgRNAを用いて標的とした。これらのsgRNAは上記2つの候補遺伝子のエクソン1とエクソン4との間に位置し、それらsgRNAは各遺伝子について個々に設計されているが、トランスフェクションプラスミドにおいて組み合わせられる。sgRNAを、U6 pol3プロモーターによって駆動されるmCherry、Cas9、及び2つのsgRNAを含有するトランスフェクションプラスミドにクローニングした。

【0353】

次に、CRISPR/Cas9複合体並びにACS候補遺伝子及びACO候補遺伝子を標的とするsgRNAをバナナプロトプラストにトランスフェクションし、そのような複合体を保有する細胞を蛍光活性化セルソーティング(FACS)により濃縮した。mCherryマーカ―を使用して、トランスフェクション後3日目(3dpt)に、上記蛍光タンパク質、Cas9及び上記sgRNAを一過性に発現するトランスフェクションしたバナナ細胞を分離し、ソートし、mCherry陽性バナナプロトプラストを収集した。6dptに、5000個のソートしたプロトプラストからDNAを抽出した(Qiagen PlaniDneasy抽出キット)。図13A、図14A、図15A、図16A、図17Aに示すプライマーを使用して感度向上のためにネステッドPCRを実施した。すべての候補ACS遺伝子及びACO遺伝子についての増幅した領域のアガロースゲルを図13B、図14B、図15B、図16B、図17Bに示す。ACO遺伝子Ma01__g11540についてだけ、約350bpの明確な欠失が認められる(図17B)。

【0354】

上記sgRNA及び上記CRISPR/Cas9複合体が活性であり、すべての他のACS遺伝子及びACO遺伝子においてゲノム編集イベントを誘導するか否かを評価するために、T7E1アッセイを実施した。すべてのsgRNAの組み合わせがすべてのACS遺伝子及びACO遺伝子(ACS: Ma09__g19150; Ma04__g35640; Ma04__g31490。ACO: Ma01__g11540; Ma07__g19730)においてゲノム編集イベントを誘導するという事を見出した(図13C、図14C、図15C、図16C、図17C)。さらに、クローニング及びシーケンシングにより、上記遺伝子のいくつかについてのT7E1結果を確認し、使用したsgRNAのうちのいくつかは、図13D、図15D、図18、図19、図20A、図20Bに示すように、実際にインデルを誘導するという事を見出した。結論として、これらの結果は、CRISPR/Cas9システムは、内在性のACS遺伝子及びACO遺伝子に精密な変異を導入するために成功裏に使用できること、及びsgRNAの設計及び選択がゲノム編集の効率に影響することを明らかにする。

【0355】

並行して、さらなるソートしたmCherry陽性プロトプラストをプロトプラスト再生に進めた。手短に言えば、ソートしたプロトプラストを液体媒体中において高希釈でプレートングし、28~35日間コロニー形成させた。コロニーを採集し、成長させ、2つのアリコートに分けた。1つのアリコートをDNA抽出及びゲノム編集(GE)試験並びにCRISPR DNAフリー試験のために使用し、他方をその状態が検証されるまで培養液中で保った。GE及びCRISPR DNAフリーであることを明確に示すものだ

10

20

30

40

50

けを次の段階へと選択した。

【0356】

暗所で20日後（GE分析のために分けてから、すなわち60日目から。従って全体で80日目）、グルコース（0.46M）及び0.4%アガロースに減らしたこと以外は同じ培地にコロニーを移し、低照度でインキュベーションした。6週間後、アガロースをスライスし、0.31Mグルコース及び0.2%ゲルライト（登録商標）を含むプロトプラスト培地に置いた。1ヶ月後、プロトコロニー（すなわちカルス）を再生培地（半分量MS+B5ビタミン、20g/lスクロース）へと継代培養した。（図23A～図23E）。次に、成熟胚をMS塩及びビタミンを含有する発芽培地（GM）に通し、この培地でこの胚は、移動から1～2週間後に発芽し始める。3～4週間後、発芽胚は苗条の伸長のための増殖培地に移される準備が整っている（図24A～D）。

10

【0357】

加えて、バナナ胚形成細胞懸濁液（ECS）を、貯蔵寿命を延ばすために、トランスフェクションのために使用したのと同じプラスミド（pAC2007、pAC2008、pAC2010、pAC2011、及びpAC2012）で撃ち込んだ。撃ち込み後3日齢のECS、細胞を増殖培地に移し、撃ち込んだECSから胚が発生するにつれて、胚を胚発生培地（EDM）及び成熟培地（図25A～E）に通した。

【0358】

本発明がその特定の実施形態と併せて説明されたが、多くの代替、改変及び変更が当業者に明らかであろうことは明白である。従って、添付の特許請求の範囲の趣旨及び幅広い範囲に入るすべてのそのような代替、改変及び変更を包含することが意図されている。

20

【0359】

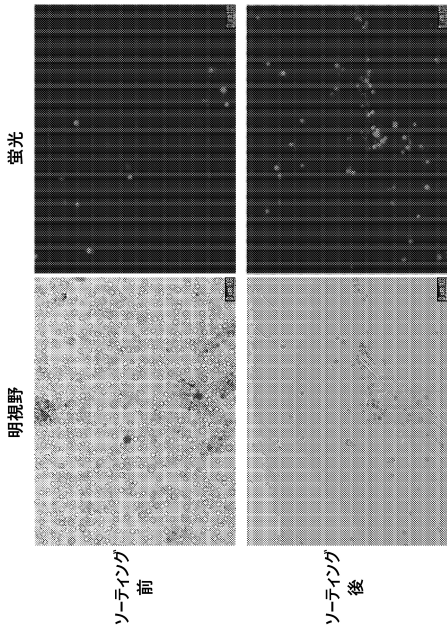
本明細書で言及されるすべての刊行物、特許及び特許出願は、個々の刊行物、特許又は特許出願がそれぞれ具体的に及び個々に参照により本明細書に援用されると示されているのと同じ程度に、参照によりその全体が本明細書に援用される。加えて、本願でのあらゆる参考文献の引用又は特定は、そのような参考文献は本発明の先行技術として利用できるということの自白とは解釈されないものとする。節の見出しが使われているところでは、それらは、必ずしも限定するものではないと解釈されるべきである。

30

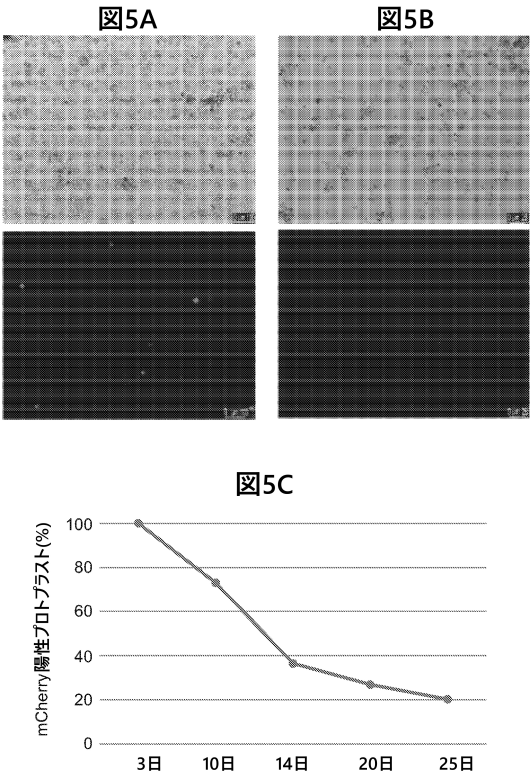
40

50

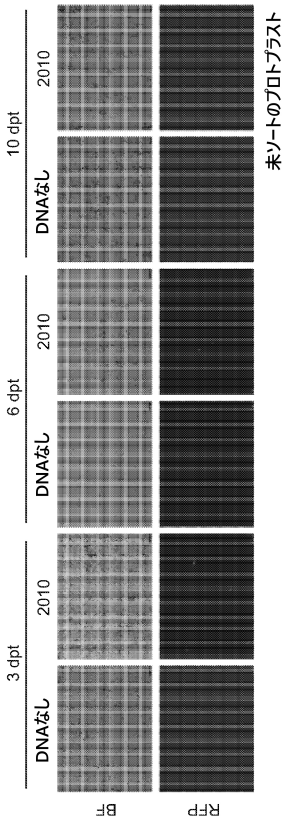
【図 4 B】



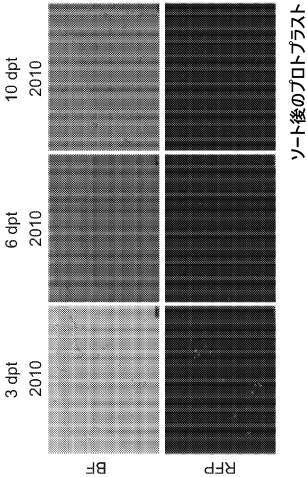
【図 5】



【図 6 A】



【図 6 B】



10

20

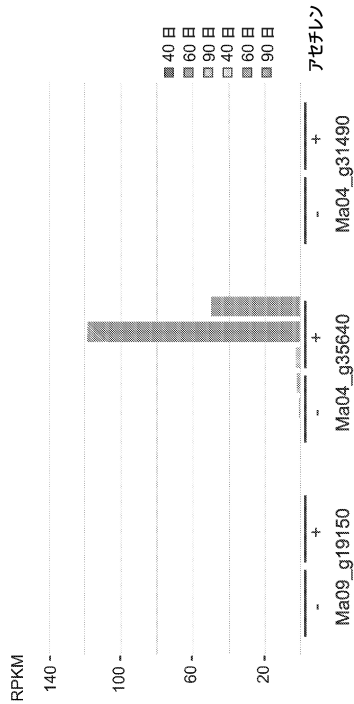
30


40

50

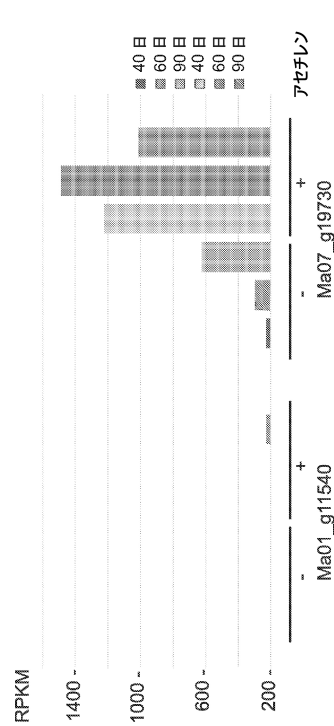
【 1 1】


ACS

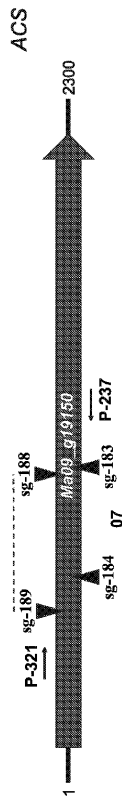


【 1 2】

ACO



【 1 3 A】




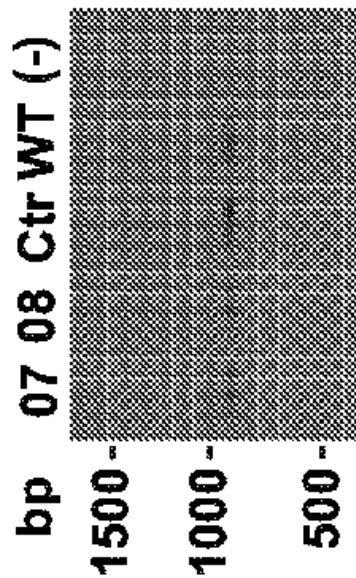
【 1 3 B】

Fig. 13B



10

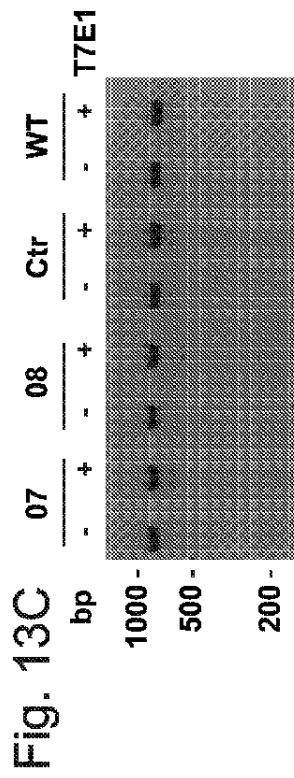
20

30

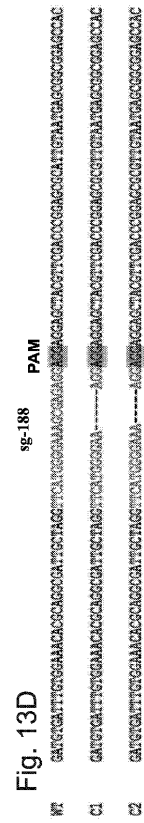
40

50

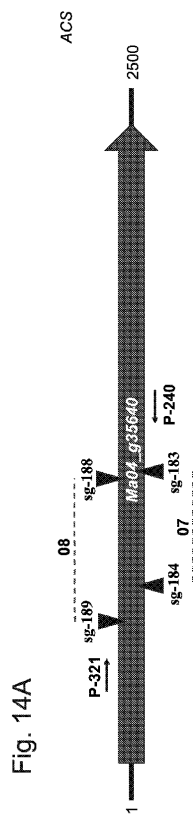
【 図 1 3 C 】



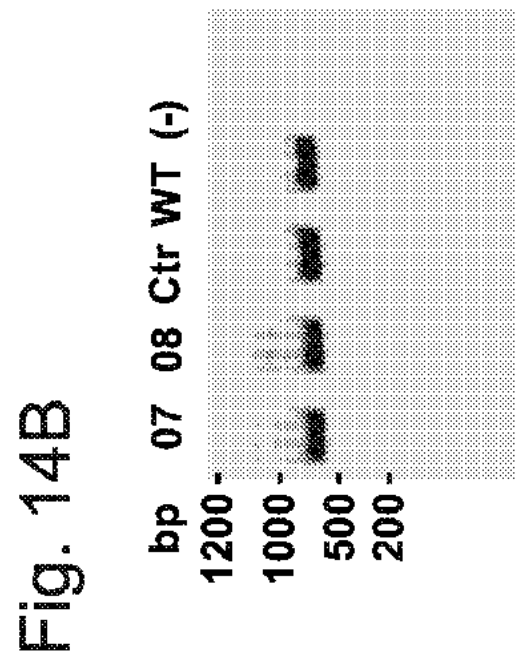
【 図 1 3 D 】



【 図 1 4 A 】



【 図 1 4 B 】



10

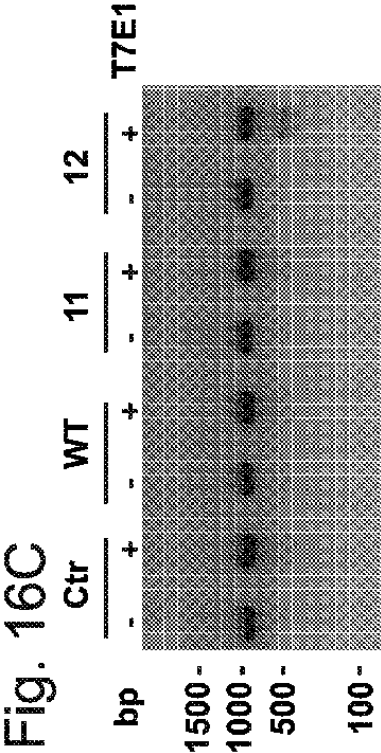
20

30

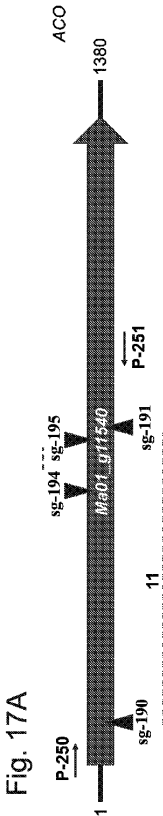
40

50

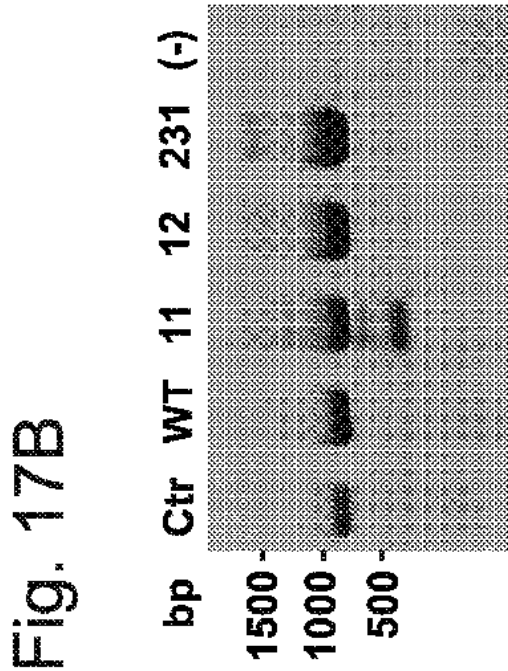
【 16 C 】



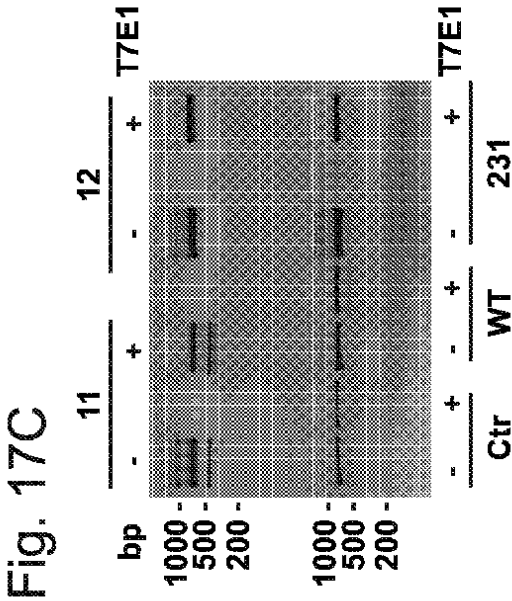
【 17 A 】



【 17 B 】



【 17 C 】



10

20

30

40

50

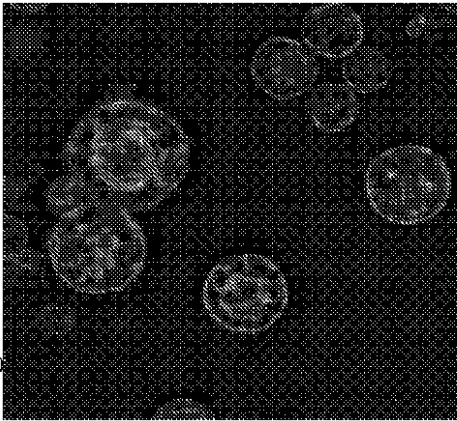
【図 2 1】

ACS		Ma09_g19150		Ma04_g35640		Ma04_31490	
		ゲノム編集イベントの根拠					
		クローニング及び シーケンシング	T7E1	クローニング及び シーケンシング	T7E1	クローニング及び シーケンシング	T7E1
sgRNA- 2007	sgRNA 183 (19150) (58/83%) (RGEN/MT)	N	Y	N	Y	Y	Y
	sgRNA 184 (31490) (74/79%)	N	N	N	N	N	Y
	sgRNA 188 (19150) (68/71%)	Y	N	N	N	Y	Y
sgRNA- 2008	sgRNA 189 (35640) (72/40%)	N	Y	N	Y	N	X

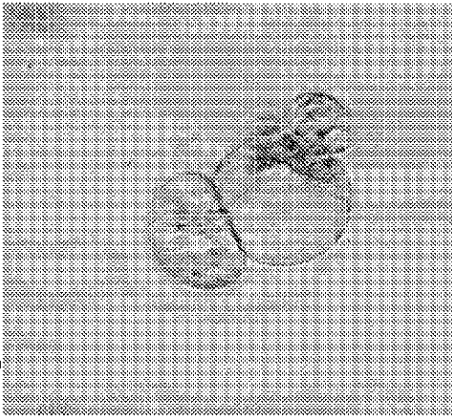
【図 2 2】

ACO	Ma07_g19730	Ma01_g11540	
		ゲノム編集イベントの根拠	
	クロニング及び シーケンシング	T7	クロニング及び シーケンシング
sgRNA- 2011	sgRNA 190 (11540) (60/13%) (RGEN/MT)	N	Y
	sgRNA 191 (19730) (57/80%)	N	N
	sgRNA 194 (19730) (75/43%)	N	N
sgRNA- 2012	sgRNA 195 (11540) (71/77)	N	Y

【図 2 3 A】



【図 2 3 B】



10

20

30

40

50

【 2 3 C 】

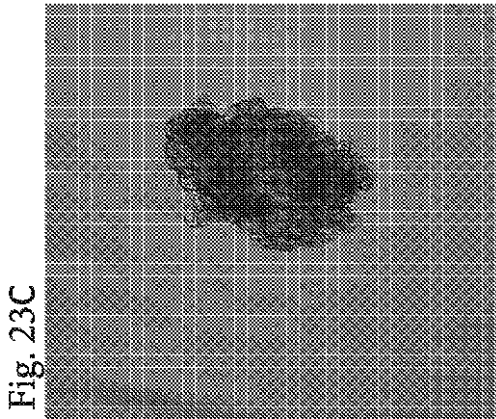


Fig. 23C

【 2 3 D 】

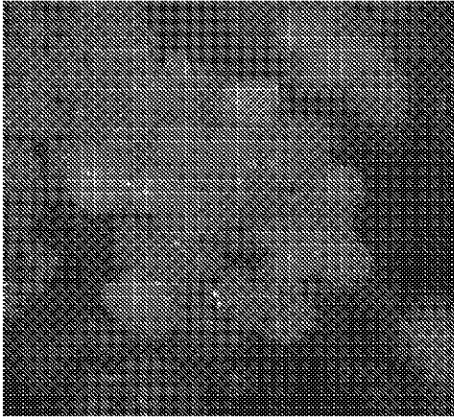


Fig. 23D

【 2 3 E 】

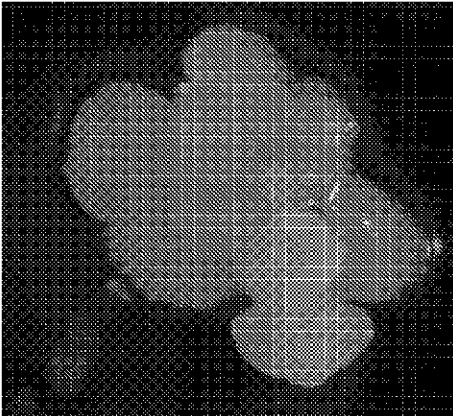


Fig. 23E

【 2 4 A - 2 4 D 】

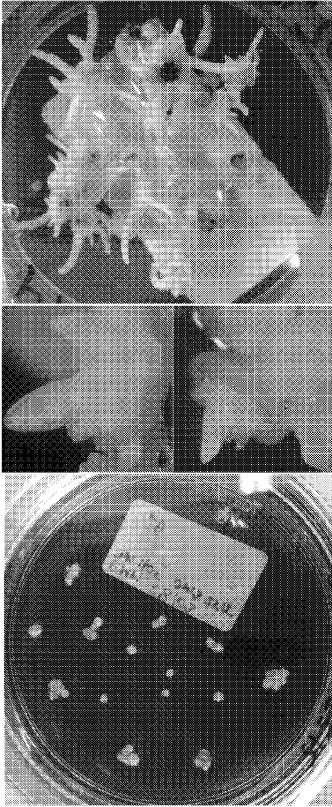


Fig. 24B

Fig. 24D

Fig. 24C

Fig. 24A

10

20

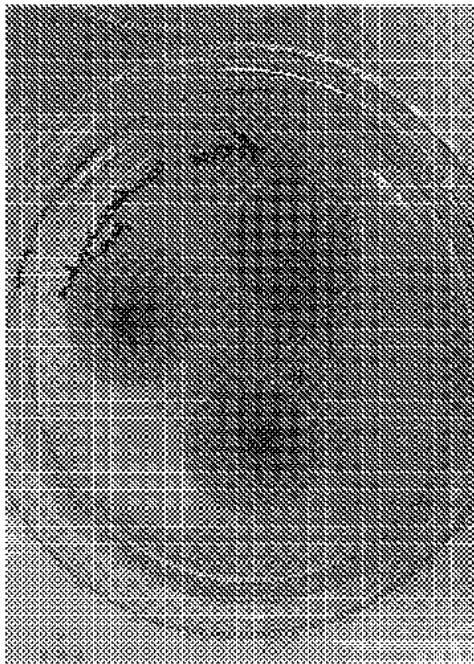
30

40

50

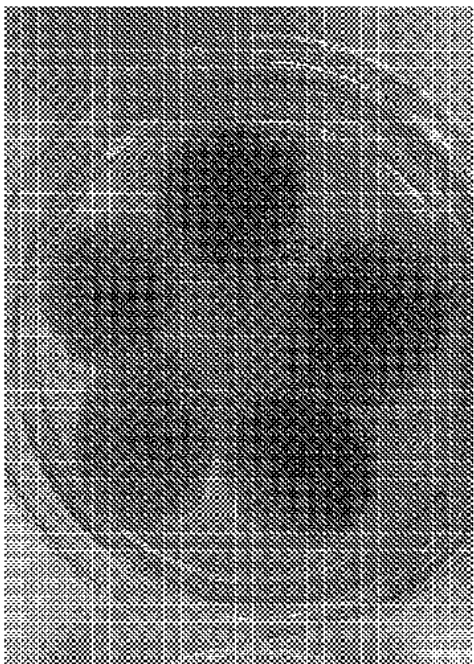
【 図 2 5 A 】

Fig. 25A



【 図 2 5 B 】

Fig. 25B

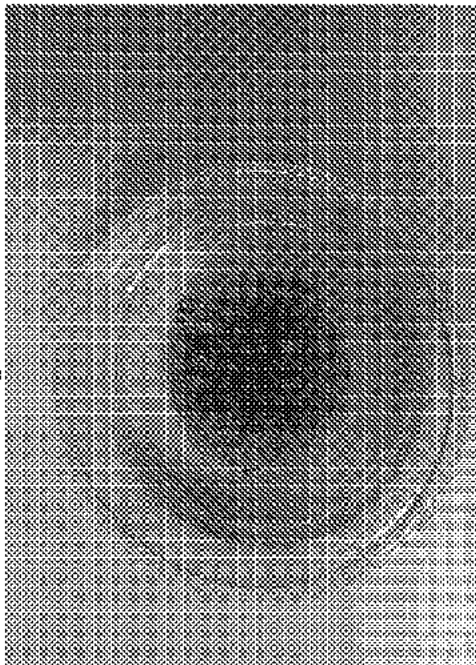


10

20

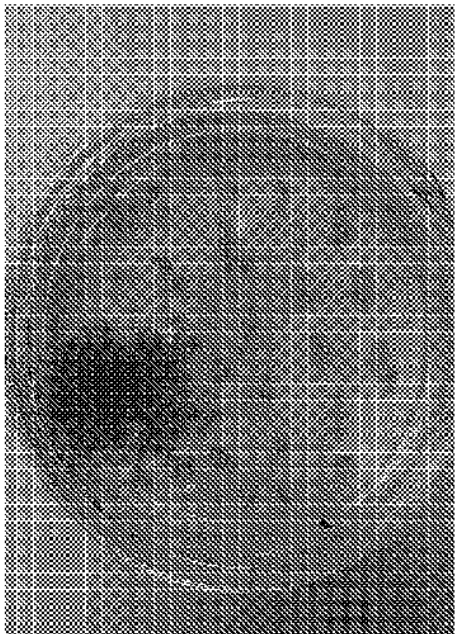
【 図 2 5 C 】

Fig. 25C



【 図 2 5 D 】

Fig. 25D



30

40

50

【 図 2 6 (8) 】

[illegible]

【図 2 6 (9)】

[illegible]

【 図 2 6 (1 0) 】

Ma04_335640	GGAGTGCCTCTCTACTCTCGAGCGCGCGGTGTCTAGGGGCTGGCTGGCCACACAGG
Ma09_319150	CGATACACATGGAAACCGCATTAAGAGATACAGGAAGATTGTGTCTCCCGGGAATCA
Ma09_319150	CAGAGACATCATGAGAGAGGCGCTCCGGCGATCATGAGAGATTTGTGTCTCCCGGGAATCA
Ma04_335640	CGACACCGCTCATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
Ma09_319150	CATCTGGCGTCCGCAAGTCAGAGAGACAAGAGATGGGAGCCGGCTCCGGCTTAAG
Ma04_335640	C---CGAGTACTTCGCGAGACAGCAAG---AAGATGTGGAGACATCTGCTGGCTGAG
Ma04_335640	C---CGGCTGCTCCGCGAGAGACAG---AAGATGTGGAGACATCTGCTGGCTGAG
Ma09_319150	TTTGTCTGCTGCT---GGTTGGAGACTGAGATCATACACCTGCTCATGTGTCTCTCA
Ma04_335640	CTTGCTGCTGAGAGTGGTGGAGATCCGACATCTTGACACACATCATGATGTGCTCCCA
Ma09_319150	CTGSCCTCTGTTCAGGCTCCATCTATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
Ma04_335640	CTGGCTCTGTCTGACGCGCCACTTAC---AAGATGTGGAGACATCTGCTGGCTGAG
Ma04_335640	CCG-----
Ma09_319150	AGGTTAATACCGCTGATATGAGGACATCTTGCTGTCTGGATATTAATTTTTTT

【図 2 6 (1 1) 】

[illegible]

gRNA190 CGAGATGCTTGCAGAGAAATGGG (配列番号 51)
gRNA191 CCGACGCCGGAGGCATCATCTTG (配列番号 52)

ACO関連遺伝子の検証された配列

- 対立遺伝子間の変化は緑色でマークされている
- sgRNAは赤色でマークされている
- NGGは灰色でハイライトされている
- 青色：検証されていない配列

Ma07_p19730

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 N 15/60 (2006.01)
C 1 2 N 15/29 (2006.01)

F I

C 1 2 N 15/60
C 1 2 N 15/09 1 0 0
C 1 2 N 15/29

(74)代理人 100174296

弁理士 當麻 博文

(74)代理人 100137729

弁理士 赤井 厚子

(74)代理人 100151301

弁理士 戸崎 富哉

(72)発明者 マオリ エヤル

イギリス国 ケンブリッジ シービー 4 3 アールキュー ハーレル ロード 5

(72)発明者 ガランティ ヤーロン

イギリス国 ケンブリッジ シービー 2 3 7 ピーエス コトン ベニーズ ウェイ 8

(72)発明者 ビグノッチ クリスティナ

イギリス国 ノーウィッチ エヌアール 9 3 イーピー ヘザーセット セントラル クレセント 4 9

(72)発明者 チャパッコ ガルシア アンジェラ

イギリス国 ノーウィッチ エヌアール 1 3 アールダブリュー グローブ ロード 5 8

(72)発明者 メイア オフィール

イギリス国 ノーフォーク エヌアール 4 6 ピーエックス ノーウィッチ ターンベリー 7

審査官 太田 雄三

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 6 / 2 0 5 6 1 3 (W O , A 1)

JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY , 2006年05月03日 , Vol. 54, No. 1
1 , p. 3859-3868 , doi:10.1021/jf060001w

Plant Physiology , 1999年05月 , Vol. 120 , p. 33-340, PGR-062

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0

A 0 1 H 1 / 0 0

A 0 1 H 5 / 0 0

A 0 1 H 6 / 0 0